

**Untersuchungen zur Bedeutung der PKA
für die Spermatogenese in *Drosophila
melanogaster***

Inaugural Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
im Fachbereich 10 Mathematik und Naturwissenschaften
der Universität Kassel

vorgelegt von Franziska Gustke
Kassel, Januar 2011

Tag der Disputation: 26.04.2011

Referentin: Prof. Dr. M. A. Schäfer
Koreferent: Prof. Dr. F. W. Herberg



WWW.PHDCOMICS.COM

“ I almost wish I hadn't
gone down that rabbit-hole
—and yet—and yet—
it's rather curious, you know,
this sort of life ! ”

- Alice



Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	3
2.1	Die cAMP-abhängige Proteinkinase	3
2.2	Die Proteinkinase A in <i>Drosophila melanogaster</i>	5
2.3	Spermatogenesespezifische Untereinheiten der Proteinkinase A in Säugetieren	9
2.4	Die Spermatogenese in <i>Drosophila melanogaster</i>	9
2.5	Die Familie der testisspezifischen Serin/Threonin-Kinasen	12
2.6	Zielsetzung der Arbeit	14
3.	Ergebnisse	16
3.1	Die regulatorische Untereinheit PKA-R1	16
3.1.1	Für PKA-R1 existieren Transkripte im Hoden	16
3.1.2	PKA-R1 lokalisiert während der gesamten Spermatogenese in den Keimzellen	18
3.2	Die regulatorische Untereinheit PKA-R2	20
3.2.1	Das Expressionsmuster von R2-GFP ist abhängig von der Länge des Promotorbereichs	20
3.2.2.	Die Reduktion des <i>pka-r2</i> -Transkripts beeinträchtigt die Fertilität der transgenen Männchen	23
3.3	Die katalytische Untereinheit PKA-C1	30
3.3.1	Wenigstens ein <i>pka-c1</i> -Transkript wird im Hodengewebe exprimiert	30
3.3.2	Northern-Hybridisierung zeigt drei <i>c1</i> -Transkripte im Testis	31
3.3.3	PKA-C1 lokalisiert zu Beginn der Spermatogenese in den Keimzellen, am Ende jedoch in den Zystenzellen	32
3.3.4	PKA-C1 interagiert mit PKA-R1 und -R2 sowie mit allen getesteten humanen regulatorischen Untereinheiten	33
3.3.5	Westernblot-Analysen zum Nachweis der Expression der Fusionsproteine bei den BRET-Messungen	37
3.4	Die katalytische Untereinheit PKA-C3	38
3.4.1	Für PKA-C3 existieren zwei hodenspezifische Transkripte	38

3.4.2	Mit Northern-Analysen konnte mindestens eines der hodenspezifischen c3-Transkripte nachgewiesen werden	39
3.4.3	Die PKA-C3-Isoformen B und B' lokalisieren während der Spermatogenese in den Keimzellen	42
3.4.4	C3 as-Mutanten zeigen keinen Defekt in der Spermatogenese	48
3.4.5	Die verkürzte Form von PKA-C3 B ist wahrscheinlich in der Lage, sowohl mit PKA-R1 als auch -R2 zu interagieren	49
3.5	Die katalytische Untereinheit PKA-C2	51
3.5.1	GFP-PKA-C2 zeigt ein anderes Expressionsmuster als PKA-C2-GFP	51
3.5.2	C2-Mutanten zeigen keinen Phänotyp	54
3.5.3	Keine der PKA-C2-Isoformen zeigte eine Interaktion mit PKA-R1 oder -R2	57
3.6	Die katalytische Untereinheit PKA-C2-like	
3.6.1	Analog zu PKA-C2 zeigt auch GFP-C2-like zeigt ein anderes Expressionsmuster als C2-like-GFP	59
3.6.2	C2-like as-Mutanten zeigen Defekte in der Spermiogenese	61
3.6.3	PKA-C2-like interagiert mit PKA-R2 jedoch nicht mit PKA-R1	66
3.7	Die C2-like Substrat-Kandidaten CG9222 und CG14305	67
3.7.1	CG9222 und CG14305 werden hodenspezifisch transkribiert	68
3.7.2	CG9222 lokalisiert an die Individualisierungskomplexe	69
3.7.3	Die Lokalisierung von CG9222-GFP bleibt in dem C2-like as-mutanten Hintergrund unverändert	73
3.7.4	CG14305 lokalisiert in den elongierten Spermatiden	73
3.7.5	Sowohl CG9222- als auch CG14305-RNAi führt zu Sterilität der mutanten Männchen	75
4.	Diskussion	79
4.1	C3-Isoformen zeigen ein differenziertes Expressionsmuster in der Spermatogenese	79
4.2	Mögliche Paarungen der verschiedenen PKA-Untereinheiten in Keim- und Zysten Zellen während der Spermatogenese	81
4.3	C2-like, aber nicht C2, ist eine katalytische Untereinheit der PKA	83
4.4	PKA-C2-Isoformen und PKA-C3 B' könnten Pseudokinasen sein	85
4.5	CG9222 und CG14305 stellen potentielle Substrate von C2-like dar und haben eine Funktion in der Spermiogenese	86

5.	Material	91
5.1	Vektoren	91
5.2	Fliegenstämme	91
5.3	Bakterienstämme	92
5.4	Gelelektrophorese-Standards	92
6.	Methoden	93
6.1	DNA-Klonierung	93
6.1.1	Isolierung genomischer DNA aus einzelnen Fliegen	93
6.1.2	RNase A-Behandlung von genomischer DNA	93
6.1.3	Phenol/Chloroform-Extraktion von Plasmid-DNA	94
6.1.4	Salz-Alkohol-Fällung von Plasmid-DNA	94
6.1.5	Agarosegelelektrophorese	94
6.1.6	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	95
6.1.7	Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen	95
6.1.8	Dephosphorylierung von Plasmiden	96
6.1.9	Konzentrationsbestimmung von DNA	96
6.1.10	Ligation	97
6.1.11	Transformation von NovaBlue GigaSingles™ (Novagen) durch Hitzeschock	97
6.1.12	Transformation von <i>E. coli</i> DH5α durch Elektroporation	98
6.1.13	Blau-Weiß-Selektion	98
6.1.14	Colony Blot Analysen	99
6.1.15	Plasmid-Minipräparation durch alkalische Lyse	101
6.1.16	Plasmid-Minipräparation mit einem Kit der Firma PeqLab	102
6.1.17	Plasmid-Midipräparationen mit Kits der Firmen Qiagen und Machery-Nagel	102
6.1.18	PCR-Techniken	102
6.2	P-Element-vermittelte Keimbahntransformation	103
6.2.1	Vorbereitung der DNA	103
6.2.2	Apfelsaftagarplatten	104
6.2.3	Die Injektion des P-Konstrukt-Gemisches in <i>w¹¹¹⁸</i> -Embryonen	104
6.2.4	Etablierung stabiler transgener Fliegenlinien	105
6.3	Fliegenzucht	106
6.3.1	Herstellung des Fliegennährbreis	107
6.3.2	Präparation von Gonaden	107
6.3.3	Färbungen von Hodengewebe mit Hoechst 33258 und TRITC-Phalloidin	107

Inhaltsverzeichnis

6.3.4	Fertilitätstest	108
6.3.5	Erzeugung von Fliegen, die homozygot für zwei Integrationen sind	108
6.3.6	GAL4/UAS-Kreuzungen	109
6.4	Methoden zur RNA-Analyse	110
6.4.1	Poly(A)-Isolierung mit oligo(dT)-gekoppelten Partikeln aus Geweben (Novagen)	110
6.4.2	Regenerierung der oligo(dT)-Partikel	111
6.4.3	RNase H-Behandlung von mRNA	111
6.4.4	Auftrennung der mRNA in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel	112
6.4.5	Northern Transfer	113
6.4.6	Erzeugung einer radioaktiv markierten Sonde durch <i>in vitro</i> -Transkription	114
6.4.7	Northern Blot Hybridisierung und Exposition gegen einen Röntgenfilm	115
6.4.8	Entfernen von Signalen von einer Northern Blot Membran	116
6.5	Biochemische Verfahren	117
6.5.1	BRET ² -Assay	117
6.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	119
6.5.3	Western Blot Analysen	120
7.	Literaturverzeichnis	122
8.	Abkürzungsverzeichnis	136
9.	Anhang	139
9.1	Übersicht zu den Transkripten des <i>pka-r1</i> -Gens	139
9.2	Übersicht zu den Transkripten des <i>pka-r2</i> -Gens	140
9.3	Übersicht zu den Transkripten des <i>pka-c1</i> -Gens	140
9.4	Übersicht zu den Transkripten der Gene <i>pka-c2</i> und <i>CG12069</i>	141
9.5	Übersicht zu den Transkripten des <i>pka-c3</i> -Gens	141
9.6	Liste der Primer	142
9.7	Sequenzvergleich der C2-like-Orthologen aus verschiedenen <i>Drosophila</i> -Arten	144
9.8	Liste potentieller C2-like-Substrate	149
	Danksagung	156
	Erklärung	157

1. Zusammenfassung

Für die Proteinkinase A in *Drosophila melanogaster* sind zwei regulatorische Untereinheiten (R1 und R2) und drei katalytische Untereinheiten (C1, C2 und C3) beschrieben. Außerdem gibt es eine weitere mögliche katalytische Untereinheit mit einer auffälligen Ähnlichkeit zu C2, dementsprechend C2-like genannt. Für R2, C2 und C2-like konnte bereits gezeigt werden, dass sie im Hodengewebe synthetisiert werden. Die Expression der verbleibenden PKA-Untereinheiten im Hodengewebe wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von RT-PCR, Northern-Hybridisierungen, GFP-Reporter- bzw. GFP-Fusionskonstrukten untersucht. So konnte gezeigt werden, dass alle PKA-Untereinheiten im Hoden exprimiert werden. Dabei wird von jeder Untereinheit mindestens eine Isoform in den Keimzellen synthetisiert. R2 und C1 treten außerdem in den die Keimzellen umschließenden Zysten auf, wobei R2 während der gesamten Spermatogenese exprimiert wird, C1 jedoch nur am Ende des Prozesses während des Stadiums der elongierten Spermatozoen. In BRET-Analysen sind die beiden Untereinheiten in der Lage, miteinander zu interagieren. Somit könnten sie zusammen eine Funktion in den Zysten vermitteln, die während der Differenzierungsphase stattfindet.

Die katalytischen Untereinheiten C2, C2-like und zwei Isoformen von C3 (B und B') werden keimzellspezifisch exprimiert. Die BRET-Analysen lassen darauf schließen, dass C2 und C3 B' möglicherweise keine funktionellen PKA-Untereinheiten sind. Auch der Versuch, durch Antisense- und RNAi-Konstrukte einen mutanten Phänotyp zu erzeugen, schlug fehl. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die beiden Untereinheiten C2 und C3 B' gar keine oder zumindest keine essentielle Funktion während der Spermatogenese haben. Das *C2-like* as-Konstrukt führte hingegen zu einem starken Phänotyp. Schon eine geringe Reduktion der endogenen *c2-like*-mRNA führte zu einer starken Beeinträchtigung der männlichen Fertilität. Die elongierten Spermatozoen zeigten einen Defekt in der Kernmorphologie und waren nicht in der Lage, Individualisierungskomplexe auszubilden. Dementsprechend fand keine Individualisierung statt und es konnten keine reifen Spermien in die Samenblase entlassen werden. Der mutante Phänotyp weist darauf hin, dass C2-like an mehreren Prozessen während der Keimzeldifferenzierung beteiligt ist.

Gao *et al.* veröffentlichten 2008 Listen mit potentiellen PKA-Substraten für alle bekannten katalytischen Untereinheiten verschiedener Organismen. Zwei Substrat-Kandidaten für C2-like sind die testisspezifischen Serin/Threonin-Kinasen (TSSK) CG9222 und CG14305. Beide Proteine werden exklusiv im Hoden exprimiert. CG9222-GFP lokalisierte in die Individualisierungskomplexe (ICs) elongierter Spermatozoen. Das entsprechende RNAi-Konstrukt zeigte allerdings keinen Effekt auf den Zusammenbau der ICs. Dagegen zeigte CG14305-GFP kei-

ne subzelluläre Lokalisierung, sondern war cytoplasmatisch über die gesamten Spermatiden verteilt. Das entsprechende RNAi-Konstrukt führte aber dazu, dass keine ICs ausgebildet werden. Beide Proteine spielen dementsprechend eine Rolle während der Individualisierung. Dies ist in Übereinstimmung mit dem Phänotyp der *C2-like as*-mutanten Männchen. So ist es vorstellbar, dass CG9222 und CG14305 von C2-like phosphoryliert werden müssen, um ihre Funktion während der Individualisierung der Spermatiden erfüllen zu können. Ein direkter Nachweis, dass C2-like die beiden Proteine tatsächlich phosphorylieren kann, steht allerdings noch aus.

2. Einleitung

2.1 Die cAMP-abhängige Proteinkinase

Die cAMP-abhängige Proteinkinase (Proteinkinase A, PKA) ist der Haupteffektor des *second messenger* cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) und spielt bei zahlreichen Zellprozessen eine essentielle Rolle, indem sie ihre Substrate an Serin- oder Threonin-Resten phosphoryliert. Im inaktiven Zustand liegt die Proteinkinase A als tetramerer Holoenzymkomplex vor, der aus einem Dimer aus regulatorischen Untereinheiten (R-Untereinheiten) und zwei katalytischen Untereinheiten (C-Untereinheiten) besteht. Die R-Untereinheiten sind über die Dimerisierungs- und Docking-Domäne (D/D-Domäne) im N-terminalen Bereich des Proteins miteinander verbunden. Auf die D/D-Domäne folgt eine variable Linkerregion, in der die Substrat- bzw. Pseudosubstrat-Stelle liegt, an die die C-Untereinheiten des Holoenzymkomplexes gebunden sind. Des Weiteren besitzen die R-Untereinheiten zwei cAMP-Bindestellen, die mit A und B bezeichnet werden, dabei liegt die Bindestelle B weiter C-terminal als die Bindestelle A. Letztere wird in dem Holoenzymkomplex von der C-Untereinheit verdeckt und ist maßgeblich an der Stabilisierung der Bindung zwischen C- und R-Untereinheit beteiligt (zusammengefasst in Taylor *et al.*, 2004 und Taylor *et al.*, 2008) Die katalytische Untereinheit weist eine etwa 250 AS lange Kinasedomäne auf (Taylor *et al.*, 2008). Diese besteht aus einer kleineren N-terminalen Schleife, die unter anderem der Bindung von ATP dient, und einer größeren C-terminalen Schleife mit der Substratbindestelle. Die C-terminale Schleife vermittelt die Übertragung des γ -Phosphats des ATPs auf das Substrat (Taylor *et al.*, 2004). Sowohl das N-terminale als auch das C-terminale Ende spielen bei der Ausrichtung der Kinasedomäne eine Rolle. Das C-terminale Ende ist unter den AGC-Kinasen konserviert, wirkt als *cis*-regulierendes Element und ist an der Aktivität des Enzyms beteiligt. Das N-terminale Ende ist variabel und spielt bei der Lokalisierung sowohl der aktiven C-Untereinheit als auch des Holoenzymkomplexes eine Rolle (Taylor *et al.*, 2008).

Die Aktivierung der katalytischen Untereinheiten erfolgt durch die Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten des Holoenzymkomplexes. Dabei bindet zunächst jeweils ein cAMP-Molekül an die cAMP-Bindestellen B der beiden R-Untereinheiten. Der Enzymkomplex durchläuft daraufhin eine Konformationsänderung und die cAMP-Bindestelle A wird frei. An diese bindet wiederum jeweils ein cAMP-Molekül, woraufhin sich die Konformation des Enzymkomplexes ein weiteres Mal ändert und er in die beiden C-Untereinheiten und die dimerisierten R-Untereinheiten zerfällt (Herberg *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2008). Die auf diesem Wege aktivierten C-Untereinheiten sind nun in der Lage, ihre Substrate an Serin- oder

Lage und Verfügbarkeit des Rezeptors. Durch die Aktivität der Adenylylcyclase ist die cAMP-Konzentration lokal erhöht. Die Ausbreitung des cAMPs wird durch Phosphodiesterasen (PDEs) verhindert. Die so entstandenen Pools unterscheiden sich stark sowohl in ihrer räumlichen Lage als auch in ihrer Stärke (Abb. 1; Taskén und Aandahl, 2004). Eine essentielle Rolle bei der Spezifität des jeweiligen PKA-Signalweges stellen die A-Kinase-Anker-Proteine (AKAPs) dar. Sie binden die R-Untereinheiten an der Dimerisierungsdomäne. Für Säuger konnte gezeigt werden, dass die Affinität der Bindung aufgrund struktureller Unterschiede in der Dimerisierungsdomäne zu den RII-Isoformen stärker ist als zu den RI-Isoformen. Dadurch liegt die Mehrheit der mit RII assoziierten Komplexe gebunden, die Mehrheit der mit RI assoziierten Komplexe jedoch cytoplasmatisch vor. Die AKAPs, die sowohl RI-, RII- als auch dualspezifisch sein können, lokalisieren die Holoenzymkomplexe an intrazelluläre Strukturen wie zum Beispiel die Centrosomen, das endoplasmatische Retikulum, die Mikrotubuli und die Zellmembran und bringen die katalytisch aktiven C-Untereinheiten somit in die Nähe der für den Signalweg spezifischen Substrate. Auch andere Proteine wie zum Beispiel PDEs und Proteinphosphatasen können von AKAPs gebunden werden (Pidoux und Taskén, 2010).

2.2 Die Proteinkinase A in *Drosophila melanogaster*

Für *Drosophila melanogaster* wurden bisher drei katalytische und zwei regulatorische Untereinheiten der Proteinkinase A beschrieben (Kalderon und Rubin, 1988; Inoue und Yoshioka, 1997): PKA-C1, -C2, -C3, -R1 und -R2. Im Folgenden werden die bisherigen Erkenntnisse zu diesen Untereinheiten kurz dargestellt. Eine Übersicht über die verschiedenen Transkripte aller Untereinheiten befindet sich im Anhang.

Ausgehend von dem *pka-c1*-Gen entstehen durch alternatives Splicen drei Transkripte, die alle das gleiche Leseraster aufweisen und dementsprechend zu einer einzigen 353 AS langen Isoform führen (Tweedie *et al.*, 2009). PKA-C1 ist zum Beispiel essentiell für die Oogenese und die frühe Embryonalentwicklung. Weibchen, die mutant für PKA-C1 sind, zeigen eine fehlerhafte Polarisation des Cytoskeletts in Oocyten der Stadien 8 und 9. Die für die frühe Embryonalentwicklung benötigten maternalen mRNAs *bicoid* und *oskar* können daraufhin nicht korrekt lokalisiert werden (Lane und Kalderon, 1994; Steinhauer und Kalderon, 2005). Ebenfalls für die Embryonalentwicklung essentiell ist der Transkriptionsfaktor Dorsal. Die Phosphorylierung des Proteins 22 AS N-terminal von dem Kernlokalisierungssignal (NLS) durch PKA-C1 führt zu einer verbesserten Erkennung des Signals und damit verbunden zu einem erleichterten Eintritt von Dorsal in den Kern (Norris und Manley, 1992; Briggs *et al.*, 1998).

Für PKA-C2 ist in der Datenbank FlyBase ein Protein mit einer Länge von 354 AS aufgeführt. Bei einer allgemeinen Untersuchung über den Einfluss von 228 verschiedenen Kinasen auf den Zellzyklus in *Drosophila* S2 Zellen zeigten die für PKA-C2 mutanten Zellen Anomalien während der Mitose (Bettencourt-Dias *et al.*, 2004). In Gustke (2006) konnte bewiesen werden, dass PKA-C2 hodenspezifisch ist. Die Fluoreszenz des Fusionsproteins C2-GFP zeigte sich während der gesamten Spermatogenese in den Keimzellen.

Im Anschluss an das Gen für PKA-C2 folgt das Gen *CG12069*, für welches zwei Proteine mit Längen von 356 AS und 180 AS vorausgesagt wurden (Tweedie *et al.*, 2009). Das größere der Proteine (*CG12069-PA*) enthält eine Proteinkinasedomäne und hat eine Ähnlichkeit von 58 % zu C2. Es wurde daher C2-like benannt. Das kleinere der Proteine entsteht durch alternatives Splicen und Nutzung eines alternativen ATG. Die Proteinkinasedomäne ist dadurch N-terminal verkürzt. In der dieser Arbeit vorausgegangenen Diplomarbeit konnte das längere der beiden Transkripte (*CG12069-RA*) als testisspezifisch nachgewiesen werden. Die Fluoreszenz des Fusionsproteins C2-like-GFP zeigte sich ab dem Spermatocyten-Stadium in den Keimzellen (Gustke, 2006). Das kürzere konnte nicht durch Northern-Analyse nachgewiesen werden, was darauf zurückzuführen ist, dass die verwendete Sonde nur etwa 48 nt der entsprechenden mRNA abdeckt. Zudem ist es wahrscheinlich seltener als das lange Transkript, da bisher auch nur eine entsprechende cDNA gefunden wurde. Diese stammt aus dem Hoden und somit könnte auch diese Isoform eine Rolle im Hoden spielen.

Laut der Datenbank FlyBase führt das *pka-c3*-Gen zu zwei Proteinen mit Längen von 500 AS und 583 AS. Beide Proteine haben einen für eine C-Untereinheit der PKA ungewöhnlich langen N-Terminus. C3 wird im Nervensystem von *Drosophila* von dem Protein Swiss Cheese reguliert. Dabei handelt es sich um ein Protein, das eine Domäne mit Homologien zu den regulatorischen Untereinheiten der PKA aufweist. Mithilfe dieser Domäne wird C3 gebunden und somit inhibiert. Die Überexpression von C3 führt zu einem neurodegenerativen Phänotyp (Bettencourt da Cruz *et al.*, 2008).

Für PKA-R1 sind zurzeit 18 Transkripte postuliert, die durch alternatives Splicen entstehen und zu zehn verschiedenen Isoformen führen sollen (Tweedie *et al.*, 2009). Für R1 konnte zum Beispiel eine Rolle bei der Verteilung des Oskar-Proteins in der Oocyte gezeigt werden. Oskar dient der Ausbildung des Abdomens und der Polzellen während der frühen Embryogenese. R1 ist daran beteiligt, die Ausbreitung von Oskar über das posteriore Ende hinaus zu verhindern (Yoshida *et al.*, 2004). Außerdem wird R1 im Gehirn bevorzugt in den *mushroom bodies* exprimiert. Dort ist es essentiell für das mit dem Geruchssinn assoziierte

Lernen, wobei es wahrscheinlich mit PKA-C1 interagiert (Skoulakis *et al.*, 1993; Goodwin *et al.*, 1997).

Durch alternatives Splicen des *pka-r2*-Gens sollen fünf Transkripte entstehen, die zu drei verschiedenen Isoformen führen (Tweedie *et al.*, 2009). Eine Mutation des *pka-r2*-Gens führte zu zahlreichen unterschiedlichen Defekten. Zum einen zeigten die Mutanten Defekte in der Oogenese, zum Beispiel in Form von multinukleären Nährzellen, zum anderen zeigten sie lokomotorische Arrhythmie, sowie abnormale Reaktionen auf Alkohol und Kokain (Park *et al.*, 2000).

Im Folgenden soll der Hedgehog-Signalweg, der in zahlreichen entwicklungsbiologischen Prozessen von *Drosophila* eine essentielle Rolle spielt, dargestellt werden. Die Proteinkinase A ist gleich an drei verschiedenen Stellen dieses Signalwegs von Bedeutung. Der Signalweg wurde nach dem Liganden Hedgehog (Hh) benannt. Er kommt unter anderem bei der Ausbildung der Segmentgrenzen in *Drosophila*-Embryonen und bei der Entwicklung der Extremitäten, wie zum Beispiel Flügel und Beine, sowie den Augen aus den Imaginalscheiben zum Tragen (Perrimon und Mahowald, 1987; Mohler und Vani, 1992; Felsenfeld und Kennison, 1995). Die generelle Bedeutung dieses Signalwegs und seine Konserviertheit kommt zum Beispiel darin zum Ausdruck, dass Mutationen des Säuger-Homologs Sonic Hedgehog (Shh) zu zahlreichen Krebserkrankungen führen (z.B. Caro und Low, 2010; Martin *et al.*, 2010).

Die Komponenten des Hh-Signalwegs sind in Abbildung 2 graphisch dargestellt. Bei Smoothed (Smo) handelt es sich um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor der Frizzled-Familie. Ob Smo seine Funktion im Hedgehog-Signalweg über dieses G-Protein manifestiert, steht zurzeit noch zur Diskussion (Ogden *et al.*, 2004; Ogden *et al.*, 2008; Philipp und Caron, 2009). In Abwesenheit von Hh wird die Smo-Aktivität durch den Membranrezeptor Patched (Ptc) gehemmt. Der Effektor des Signalwegs, der Transkriptionsfaktor Cubitus interruptus (Ci), ist in den trimerischen *Hedgehog signaling complex* (HSC, Komponenten in Abb. 2) eingebunden. Dieser assoziiert mit den Mikrotubuli des Cytoskeletts (Ogden *et al.*, 2004). Ci kann sowohl als Transkriptionaktivator (Ci₁₅₅) als auch als Transkriptionsrepressor (Ci₇₅) wirken. In Abwesenheit von Hh wird das 155 kDa schwere Protein zunächst an drei definierten Stellen von der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) und anschließend in deren unmittelbarer Umgebung von der Caseinkinase 1 (CK1) und der Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) phosphoryliert (Aza-Blanc *et al.*, 1997; Jia *et al.*, 2002 ; Price und Calderon, 2002). Die Phosphorylierung führt zu der Bildung einer Bindestelle für das Protein Supernumerary limbs (Slimb), einer Komponente des Skp1/Cullin1/F-Box-Komplexes (Ogden *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2005; Smelkinson und Calderon, 2006). Dies führt zur Ubiquitinierung von Ci₁₅₅ und

der anschließend teilweisen Proteolyse durch das Proteasom (Tian *et al.*, 2005). Dadurch entsteht eine 75 kDa schwere Form, Ci₇₅, die als Repressor die Transkription ihre Zielgene hemmt (Ogden *et al.*, 2004).

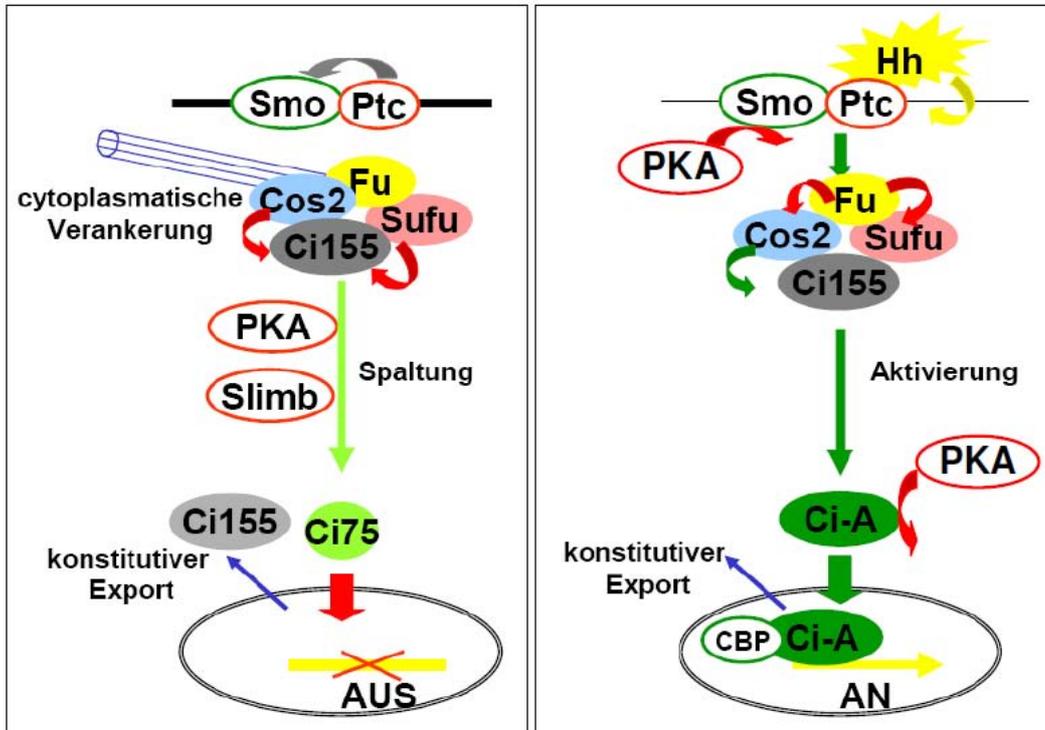


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Hh-Signalwegs. Monnier *et al.*, 2002 modifiziert. Hh: Hedgehog; Smo: Smoothened; Ptc: Patched; Fu: Fused; Cos2: Costal-2; Sufu: Suppressor of Fused; Fu, Cos2 und Sufu sind Komponenten des *Hedgehog signaling complex* HSC; Ci155: Cubitus interruptus in voller Länge; Ci-A: aktive Form von Ci155; Ci75: auf 75 kDa prozessierte Form von Ci155; PKA: cAMP-abhängige Proteinkinase; Slimb: Supernumerary limbs; CBP: CREB-Bindeprotein.

Bindet Hh an Ptc, wird die negative Wirkung von Ptc auf Smo blockiert und Smo wird durch PKA und CK1 phosphoryliert. Das führt zur Akkumulation von Smo an der Zelloberfläche und zu seiner Aktivierung. Die Aktivierung wird dabei durch eine Konformationsänderung und der damit einhergehenden Dimerisierung des cytoplasmatischen C-Terminus des Proteins vermittelt (Ogden *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2007). Durch ein Signal von Smo an den HSC, diffundiert dieser von den Mitochondrien ab und die Prozessierung von Ci₁₅₅ zu Ci₇₅ unterbleibt. Ci₁₅₅ akkumuliert und schaltet die Transkription der Zielgene des Hh-Signalweges an. Dabei wurden unterschiedlich aktive Ci₁₅₅-Formen identifiziert, die in Abhängigkeit der Hh-Konzentration generiert werden. Die genauen Prozesse, wie die unterschiedlichen Aktivitätsniveaus zustande kommen, sind bisher nicht geklärt. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass für die Erzeugung der aktivsten Form die PKA eine Rolle spielt (Ogden *et al.*, 2004).

2.3 Spermatogenesespezifische Untereinheiten der Proteinkinase A in Säugetieren

Für Säuger konnten spermatogenese- bzw. spermien-spezifische katalytische und regulatorische Untereinheiten identifiziert werden (San Agustin *et al.*, 1998; Reinton *et al.*, 2000, Dahle *et al.*, 2001). Zunächst wurde eine Variante der Ca aus Spermien von Schafsböcken durch Massenspektrometrie identifiziert – Ca-s (San Agustin *et al.*, 1998). Sie unterscheidet sich in ihrem N-terminalen Ende von der ubiquitär exprimierten Ca . Die entsprechende Sequenz geht auf das jeweilige erste Exon zurück, was darauf schließen lässt, dass die beiden Isoformen durch alternatives Splicen des Ca -Gens entstanden sind (San Agustin *et al.*, 1998). Das homologe Ca-s -Protein aus dem Menschen wurde 2000 von Reinton *et al.* beschrieben. Die mRNA erwies sich als testisspezifisch und konnte in Spermatozyten des Pachytän-Stadiums gezeigt werden. Das Protein selbst lokalisiert am Mittelstück der reifen Spermien. Ebenfalls in diese Region lokalisieren die regulatorischen Untereinheiten $\text{RI}\alpha$, $\text{RII}\alpha$ und das A-Kinase-Ankerprotein AKAP220, welche somit potentielle Interaktionspartner von Ca-s darstellen (Reinton *et al.*, 2000). Skalhegg *et al.* (2002) erzeugten Mäuse, denen das Gen für die katalytische Untereinheit Ca fehlt. Die wenigen mutanten Mäuse, die das Erwachsenenalter erreichten, zeigten neben einem verzögerten Wachstum mehr deformierte Spermien als der Wildtyp. Durch das gezielte Ausschalten der Ca-s -Isoform ergaben sich Hinweise, dass diese für die Geschwindigkeit des Flagellenschlages und bei der Kontrolle der cAMP-Produktion essentielle Rollen spielt (Nolan *et al.*, 2004).

Von der regulatorischen Untereinheit $\text{RI}\alpha$ existiert ebenfalls eine spermien-spezifische Isoform (Dahle *et al.*, 2001). Für die Ratte konnte nachgewiesen werden, dass die *Rla 1c*-mRNA nur in den männlichen postmeiotischen Keimzellen, die *Rla 1a*- und *1b*-mRNAs dagegen in prämeiotischen Spermatogenesestadien und in den Sertolizellen exprimiert werden. Das $\text{RI}\alpha$ -Protein assoziiert mit dem Mittelstück reifer Spermien (Dahle *et al.*, 2001).

2.4 Die Spermatogenese in *Drosophila melanogaster*

Die Gonaden des *Drosophila melanogaster*-Männchens sind paarig angelegt. Ort der Spermatogenese sind die schraubig aufgewundenen Hodenschläuche, die jeweils in eine Samenblase münden, in denen die reifen Spermien gespeichert werden (T und V in Abb. 3A). Ebenfalls Bestandteil der männlichen Gonaden sind die Paragonien (Anhangsdrüsen; G in Abb. 3A), in denen ein Sekret produziert wird, das bei der Begattung zusammen mit den Spermien an das Weibchen abgegeben wird. Sowohl die Samenblasen als auch die Para-

gonien münden in den Ausführungsgang, der über die muskulöse Spermienpumpe zur Genitalplatte und damit nach außen führt (AD, B und PD in Abb. 3A; Lindsley und Tokuyasu 1980).

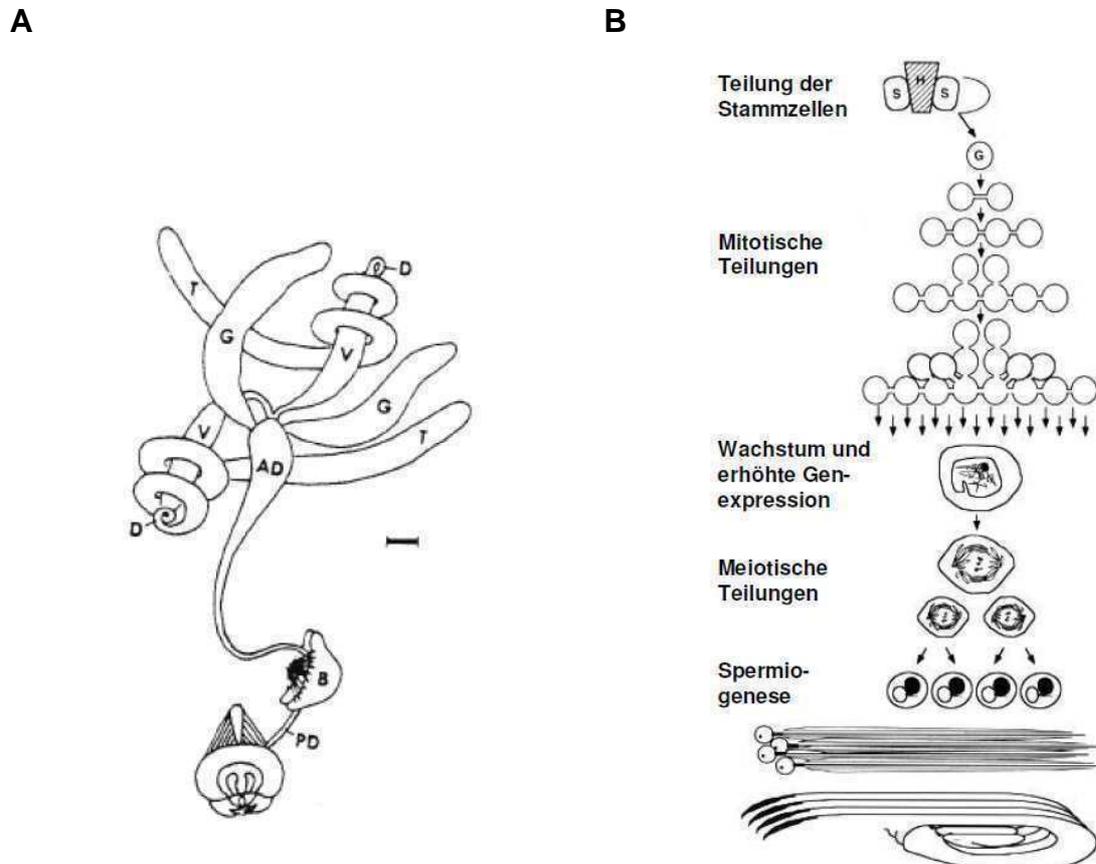


Abbildung 3: Schematische Darstellungen der männlichen Gonade von *Drosophila melaongaster* (A) und der verschiedenen Stadien der Spermatogenese (B). A: Lindsley und Tokuyasu, 1980. AD und PD: Ausführungsgang; B: Spermienpumpe; D: Übergänge der Hodenschläuche zu den Samenblase; G: Paragonien; T: Hodenschläuche; V: Samenblasen. Der Balken entspricht 0,1 mm. B: Fuller, 1998, modifiziert. S: Stammzelle; H: somatische *hub*-Zelle; G: Spermatoblast.

Der Ablauf der Spermatogenese ist in Abbildung 3B schematisch dargestellt. Die Spermatogenese beginnt in der apikalen Spitze des Hodenschlauchs. Dort befindet sich die Stammzellnische, die als *hub* bezeichnet wird. Sie besteht aus etwa zwölf somatischen Zellen, um die sich bis zu neun Keimbahnstammzellen (*germ line stem cells*; GSC) und etwa doppelt so viele somatische Stammzellen (*cyst progenitor cells*; CPC) lagern. Die Spermatogenese wird durch eine asymmetrische Teilung der GSC und CPC eingeleitet. Dabei entscheidet die Lage der Tochterzellen zu der nächstgelegenen *hub*-Zelle ihr jeweiliges Schicksal. Die Tochterzelle, die in Kontakt mit einer somatischen *hub*-Zelle steht, behält ihren Stammzellcharakter. Die andere Tochterzelle wird als Spermatoblast bezeichnet und durchläuft nun die Entwicklung zu reifen Spermien. Sie wird von zwei aus CPC hervorgegangenen Zysten umgeben. Diese teilen sich nicht weiter und umgeben während der gesamten Spermatogenese die sich aus dem Spermatoblasten entwickelnden Keimzellen. Dieser Verbund wird als Zyste bezeichnet (zusammengefasst in Yamashita *et al.*, 2005). Mit fortschreitender Spermato-

genese bewegt sich die Zyste zum basalen Ende des Hodenschlauchs. Die Keimzelle durchläuft, nun als Spermatogonie bezeichnet, vier mitotische Teilungen. Diese Teilungen sind nicht vollständig. Die Keimzellen bleiben über Cytoplasmabrücken miteinander verbunden (Lindsley und Tokuyasu, 1980). So stehen auch nach den folgenden Reduktionsteilungen allen Keimzellen sämtliche Genprodukte zur Verfügung (Braun *et al.*, 1989; Caldwell und Handel, 1991). Die 16 Spermatocyten verbleiben für die folgenden etwa 90 Stunden in der G2-Phase. Dieser Abschnitt der Spermatogenese zeichnet sich durch eine extrem hohe Genaktivität aus, die unter anderem durch die Ausbildung von Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen gekennzeichnet ist. Das Volumen der Zelle nimmt in etwa um das 25 fache zu (zusammengefasst in Hackstein und Hochstenbach, 1995). Es werden fast alle während der restlichen Spermatogenese benötigten Transkripte synthetisiert und unter Translationskontrolle gestellt, da mit Voranschreiten der Meiose die Transkription eingestellt wird (Gould-Somero und Holland, 1974; Schäfer *et al.*, 1995). Zu einer *de novo*-Transkription in postmeiotischen Stadien kommt es nur selten (Vibrantovski *et al.*, 2010). Zu diesen Ausnahmen zählen Transkripte, die als *comets and cups* bezeichnet werden. Sie lokalisieren an den Enden von elongierten Spermatiden und sind in *in situ*-Hybridisierungen als kappenähnliche Strukturen sichtbar (Barreau *et al.*, 2008; White-Cooper, 2010).

Die 64 aus den Reduktionsteilungen hervorgehenden Keimzellen werden als Spermatiden bezeichnet. Sie durchlaufen nun die Spermio-genese. Dabei handelt es sich um die Differenzierung der runden Keimzellen in die spezialisierten Spermien. Zu den Spezialisierungen, die für die Befruchtung der Eizelle notwendig sind, gehören die Ausbildung eines Akrosoms, die Beweglichkeit des Spermiums und die Kompaktierung des Genoms. Am Ende der Spermio-genese erfolgt die Individualisierung der Spermatiden, die anschließend als reife Spermien in die Samenblase entlassen werden. Ausgehend von dem Basalkörper, der aus der Centriole nahe dem Zellkern gebildet wird, entsteht das Axonem. Dieses wird während seines Wachstums von der axonemalen Scheide umgeben, die aus Endoplasmatischem Reticulum besteht. Die Keimzellen nehmen nun eine längliche Form an und werden als elongierte Spermatiden bezeichnet. Sie sind so in dem Hodenschlauch orientiert, dass die Kopfenden mit den kompaktierten Kernen zu der basalen Endzone und die Schwanzenden zu der apikalen Spitze des Hodenschlauchs weisen. Die Kopfenden der Spermatiden werden dabei von der einen Zystenzelle umgeben, die Schwanzenden von der anderen. Die beiden Zystenzellen werden dementsprechend als Kopf- und Schwanzzystenzelle bezeichnet (Tokuyasu, 1974). Noch vor dem Auswachsen des Axonems verschmelzen die Mitochondrien, die zuvor bei den meiotischen Teilungen gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt wurden, zu zwei Organellen, die als Nebenkern bezeichnet werden (Tokuyasu, 1974; Fuller, 1998). Während der Elongation teilt sich der Nebenkern in zwei mitochondriale Derivate, die sich parallel zu dem

Axonem verlängern. Dabei verliert das kleinere der Derivate während der Verlängerung immer mehr an Masse und ist im reifen Spermium nur noch rudimentär vorhanden. Das größere Derivat versorgt das reife Spermium mit ATP und stellt somit seine Beweglichkeit sicher (Tokuyasu, 1974). Im Verlaufe der Spermiogenese wird der bis dahin runde Zellkern durch Wasserverlust, der Inaktivierung und Kompaktierung des Genoms zu dem für die reifen Spermien typischen nadelförmigen Kern umstrukturiert. Dabei reduziert sich das Volumen des Kerns auf ein Zweihunderstel (Tates, 1971). Die Kompaktierung des Genoms wird durch den Austausch der Histone zunächst durch Transitionsproteine und schließlich durch Protamine vermittelt (Rathke *et al.*, 2007). Im letzten Schritt der Spermiogenese werden die Spermatiden individualisiert und alles überflüssige Material abgestreift. Um jeden einzelnen Kern bildet sich ein *investment cone*. Dieser basiert auf Aktin, Myosin VI, Arp2/3 (actin related protein 2/3) sowie den regulatorischen Proteinen Cortactin und Actin Capping Protein (zusammengefasst in Renkawitz-Pohl *et al.*, 2005). Die 64 *investment cones* einer Zyste werden als Individualisierungskomplex (IC) bezeichnet und wandern vom Kopf ausgehend zu den Schwanzenden der Spermatiden. Sie sind als Ausbeulungen entlang der Zysten (*cystic bulge*) sichtbar (Tokuyasu *et al.*, 1972). Auf ihrer Wanderung schließen sie die Cytoplasma-Brücken, die die Keimzellen seit der ersten mitotischen Teilung verbinden, ordnen die Membranen neu und streifen das Cytoplasma und nicht benötigte Zellorganellen, wie zum Beispiel den Großteil der axonemalen Scheide, ab. Für diesen Vorgang sind apoptotische Prozesse notwendig, die sich nur auf das Cytoplasma beschränken (Arama *et al.*, 2003; Kaplan *et al.*, 2010). Das abgestreifte Material sammelt sich in Ausstülpungen an den Schwanzspitzen der Spermatiden, den *waste bags* (Lindsley und Tokuyasu, 1980). Nach der Individualisierung wird die Kopfzystenzone von Zellen des Terminalepithels am basalen Ende des Hodenschlauchs umschlossen. Die Spermatiden winden sich auf, die Zystenzone brechen auf und die reifen motilen Spermien werden in die Samenblase überführt. Die Zystenzone-Reste werden von den Zellen des Terminalepithels absorbiert (Tokuyasu *et al.*, 1972).

2.5 Die Familie der testisspezifischen Serin/Threonin-Kinasen

Mit der murinen TSSK 1 wurde 1994 von Bielke *et al.* das erste Mitglied der Familie der testisspezifischen Serin/Threonin-Kinasen (TSSK) beschrieben. Der Name geht sowohl auf die Funktion der Enzyme als auch auf ihre überwiegende Expression im Hodengewebe zurück (Hao *et al.*, 2004). Bisher wurden zahlreiche TSSK aus Säugern identifiziert und charakterisiert. Soweit es bisher gezeigt werden konnte, spielen sie eine essentielle Rolle während der Spermiogenese.

Kueng *et al.* (1997) identifizierte TSSK2 und ein potentielles Substrat für TSSK 1 und 2: TSKS (testisspezifisches Kinase Substrat). Hao *et al.* (2004) konnten zeigen, dass die mRNA von TSSK 1 und TSSK 2 nicht nur im Hoden exprimiert wird. Für TSSK 1 konnten geringe Mengen an mRNA in der Bauchspeicheldrüse und für TSSK 2 im Herzen, im Gehirn und in der Plazenta nachgewiesen werden. Das TSSK 2-Protein ist in der Lage, an sein Substrat TSKS zu binden und es am Ser285 zu phosphorylieren (Hao *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008b). Ein weiteres TSSK 2-Substrat ist SPAG16L, das mit den zentralen Mikrotubuli assoziiert ist. TSSK 2 bindet an die C-terminale Region von SPAG16L und kann es *in vitro* phosphorylieren (Zhang *et al.*, 2008).

Die murine TSSK 3 wird ab der Pubertät der Männchen und dann während des gesamten Erwachsenenalters exklusiv in den Leydig-Zellen exprimiert (Zuercher *et al.*, 2000). Auch die entsprechende humane Isoform ist testisspezifisch (Visconti *et al.*, 2001). Es ist die einzige bisher identifizierte TSSK, die nicht in den Keimzellen sondern in den die Spermatogenese begleitenden somatischen Zellen exprimiert wird.

Die murine TSSK 5 hat vier Splicevarianten, von denen nur die α -Variante zu einem Protein mit Kinaseaktivität führt. Die mRNA wurde hauptsächlich im Hoden, im Herzen und in der Milz von geschlechtsreifen Mäusen gefunden. Es konnte nachgewiesen werden, dass TSSK 5 α Einfluss auf den CRE/CREB-Signalweg hat (Wei *et al.*, 2007). Die humane TSSK 5 wird exklusiv im Hoden exprimiert und stimuliert dort den CRE/CREB-Signalweg, indem es CREB an dem Ser133 phosphoryliert (Chen *et al.*, 2005). Su *et al.* benannten 2008 TSSK 5 in TSSK 4 um und beschrieben Mutationen des *tssk 4*-Gens, die zu Aspermie oder Oligospermie beim Menschen führen.

TSSK 6 oder auch SSTK (*small serine/threonine kinase*) wird hauptsächlich im Hoden exprimiert. Im Menschen kann die mRNA in geringen Mengen in allen Geweben nachgewiesen werden. In Mäusen lokalisiert das Protein in den Köpfen der elongierten Spermatozoen. Es ist in der Lage, die Histone H1, H2A, H2AX und H3 *in vitro* zu phosphorylieren, nicht aber die Histone H2B und H4 oder das Transitionsprotein 1. Es scheint somit eine Funktion bei der DNA-Kondensierung während der Spermiogenese zu haben. Die Deletion des Gens führt zur Sterilität der Männchen. Ihre Spermien weisen eine stark eingeschränkte Motilität auf und sind zumeist deformiert, was auf Fehler während der DNA-Kondensierung zurückgehen könnte (Spiridonov *et al.*, 2005). Sosnik *et al.* (2009) konnten außerdem zeigen, dass Nullmutanten Defekte bei der Ei-Spermien-Verschmelzung aufweisen. Sie konnten eine Rolle von TSSK 6 in der Regulierung der Aktin-Polymerisierung und der Umlagerung von Izuma, einem

für die Befruchtung wichtigen Faktor, nachweisen. Mutationen in dem Gen führen ebenfalls zu Aspermie oder Oligospermie beim Menschen (Su *et al.*, 2010).

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Da PKA-C2 und PKA-C2-like und ihr potentieller Interaktionspartner PKA-R2 teilweise sehr unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen, sollen die anderen aus *Drosophila* bekannten Untereinheiten der Proteinkinase A ebenfalls auf eine mögliche Expression im Hodengewebe untersucht werden. Dies soll zeigen, ob PKA-C1 oder PKA-C3 mögliche Interaktionspartner für R2 in den Zysten Zellen darstellen und ob PKA-R1 mit C2 oder C2-like in den Keimzellen interagieren könnte. Dabei wird zunächst mithilfe von RT-PCR und Northern-Analysen überprüft, ob die jeweilige Untereinheit Transkripte im Hoden aufweisen. Anschließend werden GFP-Fusionen unter Kontrolle der geneigenen Promotoren hergestellt, die zeigen sollen, in welchem Zelltyp und zu welchem Zeitpunkt C1, C3 und R1 während der Spermatogenese exprimiert werden.

Für Hinweise auf eine mögliche Funktion während der Spermatogenese sollen für die hoden-spezifischen Isoformen, wie zum Beispiel die katalytischen Untereinheiten C2 und C2-like, sowie der ubiquitären regulatorischen Untereinheit R2, Mutanten hergestellt werden. Die Reduktion der jeweiligen endogenen mRNA soll mithilfe von Antisense- bzw. RNAi-Konstrukten erfolgen, die durch einen starken spermatogenesespezifischen Promotor exprimiert werden. Die transgenen Männchen werden zunächst auf ihre Fertilität hin überprüft. Wird dabei eine Beeinträchtigung der Fertilität beobachtet, sollen weitere Analysen folgen, die Aufschluss darüber geben, an welchen Prozessen der Keimzellreifung die Proteinkinase A beteiligt ist.

Zur Überprüfung, ob die verschiedenen katalytischen Untereinheiten *in vivo* in der Lage sind, von R1 und R2 in einem Holoenzymkomplex gebunden zu werden, wird die Methode des Biolumineszenz Resonanz Energietransfers (BRET) herangezogen. Dazu werden die katalytischen Untereinheiten N-terminal mit GFP und die regulatorischen Untereinheiten C-terminal mit *Renilla* Luziferase versehen. Jeweils eine katalytische und eine regulatorische Untereinheit werden in COS-7-Zellen eingebracht und dort überexprimiert. Durch Zugabe des Substrats Coelenterazin wird die Luziferase aktiviert. Befinden sich die jeweiligen R- und C-Untereinheiten in einem Komplex, so wird aufgrund der räumlichen Nähe die Energie auf das GFP übertragen. Durch Zugabe von Reagenzien, die einen Überschuss an cAMP provozieren, soll überprüft werden, ob die jeweils von R1 oder R2 inaktivierte C-Untereinheit aktiviert wer-

den kann. Im Falle einer Aktivierung kommt es zur Auflösung des Komplexes, sodass nun der Abstand zwischen Luziferase und GFP zu groß ist für einen Energietransfer.

Ein weiterer wichtiger Punkt in dieser Arbeit ist die Identifizierung und Charakterisierung von möglichen Substraten von C2-like. Für eine Charakterisierung soll zunächst mithilfe von Northern-Analysen und GFP-Fusionen unter Kontrolle des geeigneten Promotors überprüft werden, ob und wo der jeweilige Substrat-Kandidat im Hoden exprimiert wird. Anschließend wird das GAL4-UAS-System herangezogen, um transgene Fliegen herzustellen, in denen das potentielle Substrat zu verschiedenen Zeitpunkten in der Spermatogenese reduziert ist. Auch hier werden zunächst Fertilitätstests durchgeführt und im Falle einer Beeinträchtigung weitere Analysen angeschlossen, die erste Hinweise auf eine spezifische Funktion der Kandidaten liefern könnten.

3. Ergebnisse

3.1 Die regulatorische Untereinheit PKA-R1

3.1.1 Für PKA-R1 existieren Transkripte im Hoden

Zunächst wurden RT-PCRs und Northern-Hybridisierungen durchgeführt, um zu überprüfen, ob im Hodengewebe Transkripte für PKA-R1 vorliegen. Bei der RT-PCR wurde als Matrize mRNA eingesetzt, die durch Poly(A)-Isolierung mit oligo(dT)-gekoppelten Partikeln erzeugt wurde. Auf deren Basis wurde mithilfe der Reversen Transkriptase und spezifischen Primern im ersten Schritt cDNA hergestellt. Im zweiten Schritt wurde durch die *Taq*-Polymerase mit den gleichen spezifischen Primern auf der cDNA das PCR-Produkt vervielfältigt. In diesem Fall wurden die RT-PCRs auf mRNA aus Wildtyp-Hoden und als Positivkontrolle ebenfalls auf mRNA aus Wildtyp-Weibchen durchgeführt. Da für R1 bereits bewiesen werden konnte, dass es in den *mushroom bodies* im Kopf der Fliegen exprimiert wird (Skoulakis *et al.*, 1993), müssten hier definitiv Transkripte vorliegen und dementsprechend amplifiziert werden können. Für PKA-R1 werden bei FlyBase 18 Transkripte mit Größen von 1648 bp bis 3634 bp aufgeführt, die zur Translation von zehn R1-Isoformen führen. Die Primer wurden so gewählt, dass sie die kodierende Region von neun der 18 Transkripte amplifizieren. Diese werden zu insgesamt zwei unterscheidbaren Proteinen translatiert, die alle nötigen Elemente einer regulatorischen Untereinheit der PKA enthalten. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den acht anderen Isoformen um Proteine ohne Dimerisierungsdomäne. Ob sie somit Bestandteil in einem klassischen PKA-Holoenzymkomplex sein könnten, ist fraglich.

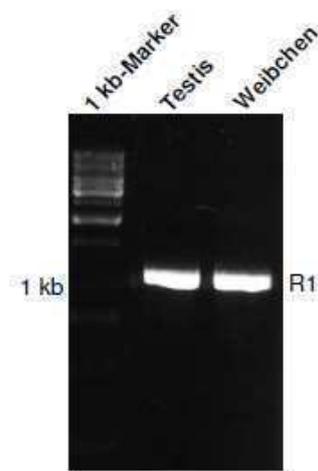


Abbildung 4: Darstellung der PCR-Produkte PKA-R1 auf einem 0,7% Agarose-Gel. Die RT-PCR wurde mit den Primern *R1-BRET-Rluc5* und *R1-BRET-Rluc3* bei einer Annealing-Temperatur von 56 °C und einer Elongationszeit von 2 min durchgeführt. Das Produkt hat eine Größe von 1157 bp.

Die RT-PCR zeigte, dass jeweils mindestens eins der neun einbezogenen Transkripte im Hoden und im restlichen Fliegenkörper exprimiert wird (Abb. 4). Ob es sich dabei um eines oder mehrere Transkripte handelt und um welche genau, kann mit diesem Ansatz nicht bestimmt werden.

Im Anschluss an die RT-PCRs folgten Northern-Hybridisierungen, die Hinweise zu der Anzahl und der Identität der Transkripte im Hodengewebe liefern sollten. Die R1-Sonde FG939 deckt die gesamte kodierende Region der beiden vollständigen R1-Isoformen ab. Da alle 18 Transkripte die letzten vier Exons gemein haben, sollte die Sonde alle *r1*-Transkripte in einer Northern-Hybridisierung anzeigen können.

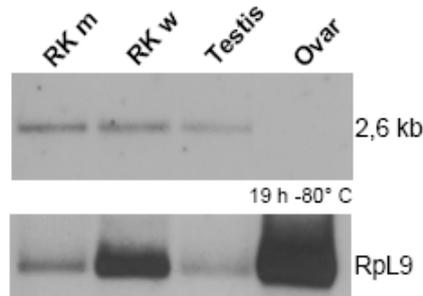


Abbildung 5: Northern-Hybridisierung mit der Sonde FG939 (PKA-R1). Für die R1-Northern-Sonde FG939 wurde das PCR-Produkt aus der in 3.1.1 beschriebenen RT-PCR auf Hoden-mRNA in *Sp6*-Orientierung in den Vektor pGem-T kloniert. Die für die *in vitro*-Transkription erforderliche Linearisierung erfolgte mit *NdeI*. Für die Transkription wurde die *T7*-RNA-Polymerase verwendet. Die Hybridisierung erfolgte auf einer Membran mit mRNA aus den Restkörpern von Männchen (RK m) und Weibchen (RK w), sowie aus Testes und Ovarien. Die Exposition erfolgte für 19 h bei -80°C . Als Ladekontrolle diente die Hybridisierung mit der Sonde Rpl9 (Schmidt *et al.*, 1996; mit *SacII* linearisiert).

Das Autoradiogramm zeigte nur ein etwa 2,6 kb-großes Transkript in den Restkörpern von Männchen und Weibchen sowie im Hoden (Abb. 5). Nur fünf der 18 vorausgesagten Transkripte liegen in diesem Größenbereich: Die Transkripte L, K, Q, V und W (Nomenklatur laut FlyBase Januar 2010; eine Übersicht befindet sich im Anhang) mit Längen von 2863 bp, 2241 bp, 2423 bp, 1648 bp und 2426 bp. Die Transkripte L und K führen zu einer Isoform mit Dimerisierungsdomäne, die anderen drei hingegen zu einer Isoform ohne Dimerisierungsdomäne. Es ist somit wahrscheinlich, dass mindestens eine funktionstüchtige R1-Isoform während der Spermatogenese exprimiert wird.

In Kalderon und Rubin (1988) sind bereits Northern Blot-Analysen veröffentlicht worden. Die entsprechenden Membranen enthielten die mRNA von Embryonen, dem ersten Larvenstadium, 1 Tag- und 2 Tage-alte Puppen, sowie Kopf und Restkörper adulter Tiere. Sie konnten eine Vielzahl von Signalen nachweisen, denen alle der zurzeit bei FlyBase postulierten Transkripte zugeordnet werden können. Mit den Sonden, die sie verwendet haben, konnten

teilweise spezifische von ihnen definierte Transkriptklassen, sowie auch alle Transkripte nachgewiesen werden. Da die in dieser Arbeit verwendete Sonde, wie bereits oben erwähnt, in der Lage sein sollte, an alle Transkripte zu hybridisieren, hätte das entsprechende Northern-Experiment zumindest in den Restkörpern zu einem ähnlichen Bandenmuster führen müssen. Warum jedoch nur eine Bande zu sehen war, kann nicht erklärt werden. So erfolgten die Northern-Experimente zum Beispiel in beiden Fällen mit mRNA und die aufgetragenen Mengen an mRNA waren in etwa gleich. Auch die Möglichkeit, dass es sich bei einigen der von Calderon und Rubin gezeigten Signalen um Kreuzhybridisierungen handelt, kann ausgeschlossen werden, da sie mit unterschiedlichen spezifischen Sonden einzelne Transkriptklassen nachweisen konnten. Dass es sich auf dem in Abbildung 5 gezeigten Northern nicht um eine vollständige Darstellung der *r1*-Transkripte handelt, kann schon allein daran festgemacht werden, dass kein Signal in der Ovarspur zu erkennen war. Es wurde aber für R1 schon eine Funktion in der Oogenese postuliert (Yoshida *et al.*, 2004).

3.1.2 PKA-R1 lokalisiert während der gesamten Spermatogenese in den Keimzellen

Mithilfe eines *R1-GFP-Reporter*-Konstrukts sollte überprüft werden, ob und zu welchem Zeitpunkt PKA-R1 in den Keim- und Zystenzellen exprimiert wird. Ein *GFP-Reporter*-Konstrukt führt zur Expression von GFP unter Kontrolle eines spezifischen Promotors. Diese Art von Konstrukt lässt somit nur eine Aussage über die Aktivität des jeweiligen Promotors und der eventuell in der 5' UTR vorhandenen regulatorischen Elemente zu, nicht aber eine Analyse der subzellulären Lokalisierung. Um möglichst alle regulatorischen Elemente in das Konstrukt einzuschließen, wurde ein etwa 3 kb-großer Promotorbereich ausgewählt, gefolgt von der 5' UTR der Transkripte, die zu den beiden vollständigen R1-Isoformen führen. Der Promotorbereich und die 5' UTR wurden per PCR mit der *Taq*-Polymerase auf genomischer DNA amplifiziert. Aufgrund der Länge der Sequenz erfolgte die Amplifizierung in zwei Abschnitten. Der 5'-Abschnitt wurde mit den Primern *R1-GFP-pro 5'* und *R1-GFP-pro5'-2* erzeugt und war 2170 bp lang. Der 3'-Abschnitt wurde mit den Primern *R1-GFP-pro 3'* und *R1-GFP-pro3'-2* erzeugt und war 1518 bp lang. Beide PCR-Produkte wurden in *T7*-Orientierung in den Vektor pGem-T kloniert. Der 5'-Abschnitt wurde über die Schnittstellen für *Pst*I und *Bam*HI in den Vektor pBluescript KS(-) ligiert und anschließend über der aus der MCS des Vektors stammenden Schnittstelle für *Kpn*I und *Bam*HI wieder ausgeschnitten und zusammen mit dem 3' Abschnitt, der über *Bam*HI und *Age*I aus pGem-T ausgeschnitten wurde, in pUASTgreen kloniert. Bei pUASTgreen handelt es sich um einen P-Element-Vektor, der im Anschluss an die MCS das Gen für eGFP trägt (Renner, 2001). Das *egfp*-Gen stammt ursprünglich aus dem Vektor pEGFP-N1 (Clontech). Bei dem Genprodukt handelt es sich um

eine Mutation des GFP, die unter anderem durch zwei Basenpaarsubstitutionen zu einer helleren Fluoreszenz führen soll (GFPmut1, Cormack *et al.*, 1996). Nach der Keimbahntransformation mit dem Konstrukt und der Etablierung von mutanten Linien wurden die Hoden homozygoter transgener Männchen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

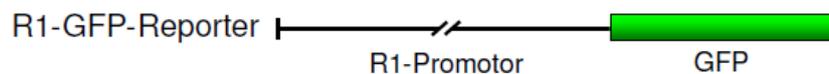
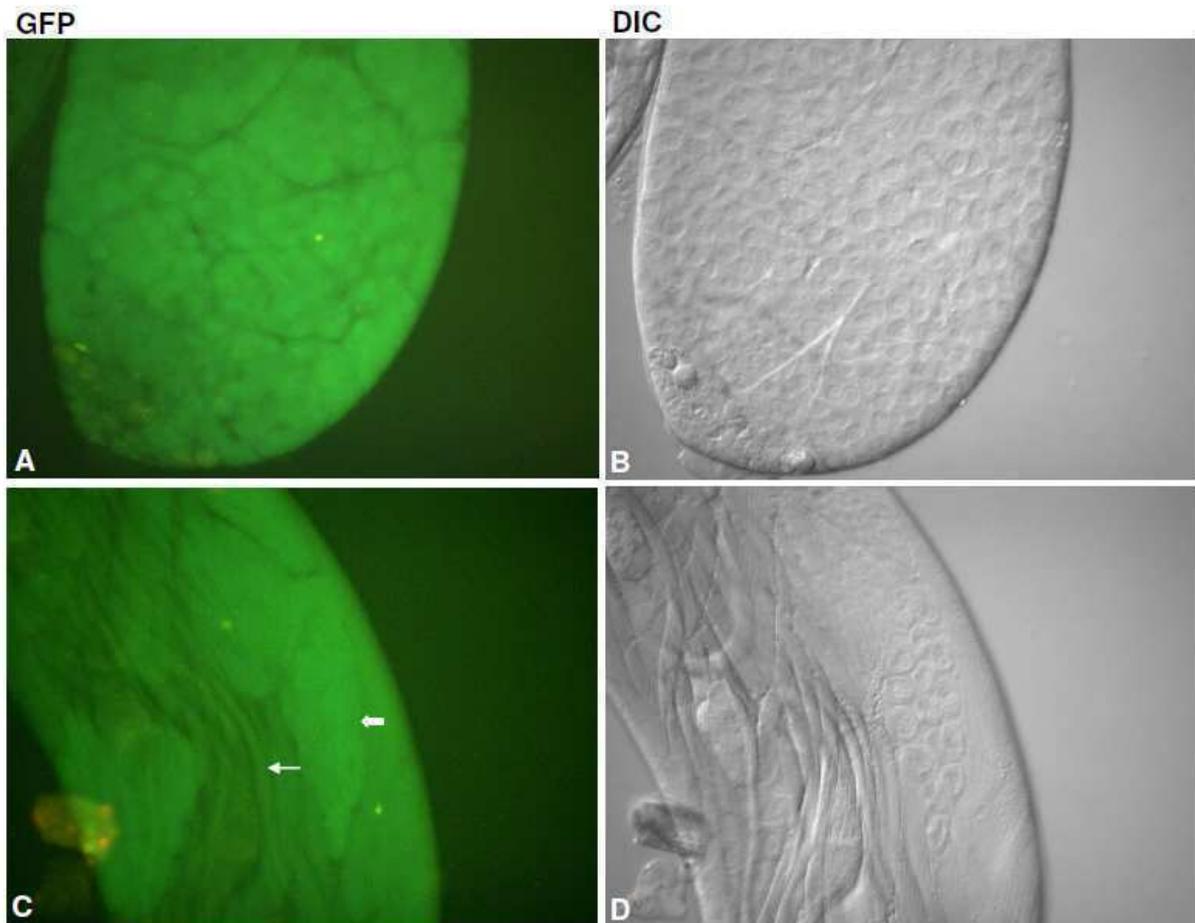


Abbildung 6: Fluoreszenz von GFP unter *pka-r1*-Promotorkontrolle. A und B: Hodenspitze mit GFP-Fluoreszenz in den frühen Stadien der Spermatogenese. C und D: Mittlerer Bereich eines Hodenschlauchs mit Fluoreszenz in runden Spermatogenese-Stadien (Blockpfeil weist auf Spermatocyten) und elongierten Spermatiden (dünner Pfeil).

Die Fluoreszenz des GFP unter *r1*-Promotor-Kontrolle erschien in den Keimzellen während der gesamten Spermatogenese (Abb. 6). Dabei wies die Intensität Unterschiede in den verschiedenen Stadien auf. Sie war in den frühen Spermatogonien noch schwach und stieg allmählich an (Abb. 6 A). Das weist darauf hin, dass der Promotor von Beginn der Spermatogenese an aktiv war und das GFP sogleich translatiert wurde. Die Zunahme der Intensität korrelierte mit der Anhäufung des kontinuierlich translatierten GFPs. Ab einem bestimmten Level blieb die Intensität der Fluoreszenz bis zum Eintritt in die Spermiogenese gleich. Während dieser letzten Phase der Spermatogenese nahm sie dann stetig ab. Der Blockpfeil in Abbildung 6 C weist auf eine Zyste mit Spermatozyten, die neben elongierten Spermatiden

mit wesentlich schwächerer Fluoreszenz (dünner Pfeil in Abb. 6 C) liegt. Die Abnahme der Fluoreszenz könnte durch zwei Ursachen zustande kommen. Die Transkription des Transgens könnte mit Eintritt in die Meiose gestoppt und dementsprechend kein weiteres GFP exprimiert werden. Die Abnahme der Intensität könnte nun zum einen damit zusammenhängen, dass das im Cytoplasma vorhandene GFP durch die Dehnung der Keimzellen auf eine größere Fläche verteilt wurde oder, zum anderen, dass das GFP zu diesem Zeitpunkt deutlich instabiler war und in den elongierten Spermatiden damit schneller abgebaut wurde.

3.2 Die regulatorische Untereinheit PKA-R2

3.2.1 Das Expressionsmuster von R2-GFP ist abhängig von der Länge des Promotorbereichs

Das R2-GFP-Fusionskonstrukt, das während der Diplomarbeit zum Einsatz gekommen ist, bestand aus einem etwa 1 kb-langen Promotorbereich gefolgt von der 5' UTR und dem offenen Leseraster des *pka-r2*-Gens und liegt in dem Vektor pUASTgreen vor. Es gibt Hinweise, dass die Fluoreszenz des Fusionsproteins nicht die vollständige Expression des endogenen R2 zeigt. So wurden neben den Hoden der transgenen *R2-GFP*-Tiere auch die Ovarien auf Fluoreszenz hin untersucht, da bekannt ist, dass R2 eine Rolle während der Oogenese spielt (Jackson und Berg, 2002). Es konnte allerdings in den Ovarien keine Fluoreszenz beobachtet werden. Es ist möglich, dass dem Konstrukt regulierende Elemente fehlen, die zum Beispiel in den teilweise sehr langen Introns liegen könnten. Diese konnten aufgrund ihrer Größe nicht kloniert werden. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass der Promotor nicht vollständig in dem Konstrukt eingeschlossen war (Gustke, 2006). Letzterer Punkt wurde in dieser Arbeit durch eine Erweiterung des Promotorbereichs um 2 kb überprüft. Für das R2-GFP-Fusionskonstrukt mit dem erweiterten Promotorbereich, nachfolgend als R2-3 kb Prom-GFP bezeichnet, wurde ein etwa 3 kb-langer Promotorbereich mit den Primern *R2-3 kb-pro* und *PKA-R2-Pro3'* mithilfe der *Taq*-Polymerase auf genomischer DNA amplifiziert und in den Vektor pGem-T kloniert. Das offene Leseraster des *pka-r2*-Gens lag bereits als cDNA in dem Vektor pBluescript KS (-) vor. Der Promotor wurde mit den Enzymen *SacII* und *EcoRI* und das Leseraster mit *EcoRI* und *AgeI* aus ihren jeweiligen Klonen ausgeschnitten und in den mit *SacII* und *AgeI* geöffneten P-Element-Vektor pUASTgreen kloniert. Die Fluoreszenz in den Hoden von Männchen, die homozygot für das *R2-3 kb Prom-GFP*-Konstrukt sind, war sehr schwach. Daher wurden durch Kreuzung Männchen erzeugt, die vier Kopien des Konstrukts trugen. Zum Vergleich mit der Expression des R2-3 kb Prom-GFP-Fusionsproteins sind in Abbildung 7 nochmals einige Aufnahmen von der R2-GFP-Fluoreszenz im

Hoden gezeigt. Die dort abgebildeten Hoden stammen ebenfalls von Männchen, die vier Kopien des entsprechenden Transgens tragen.

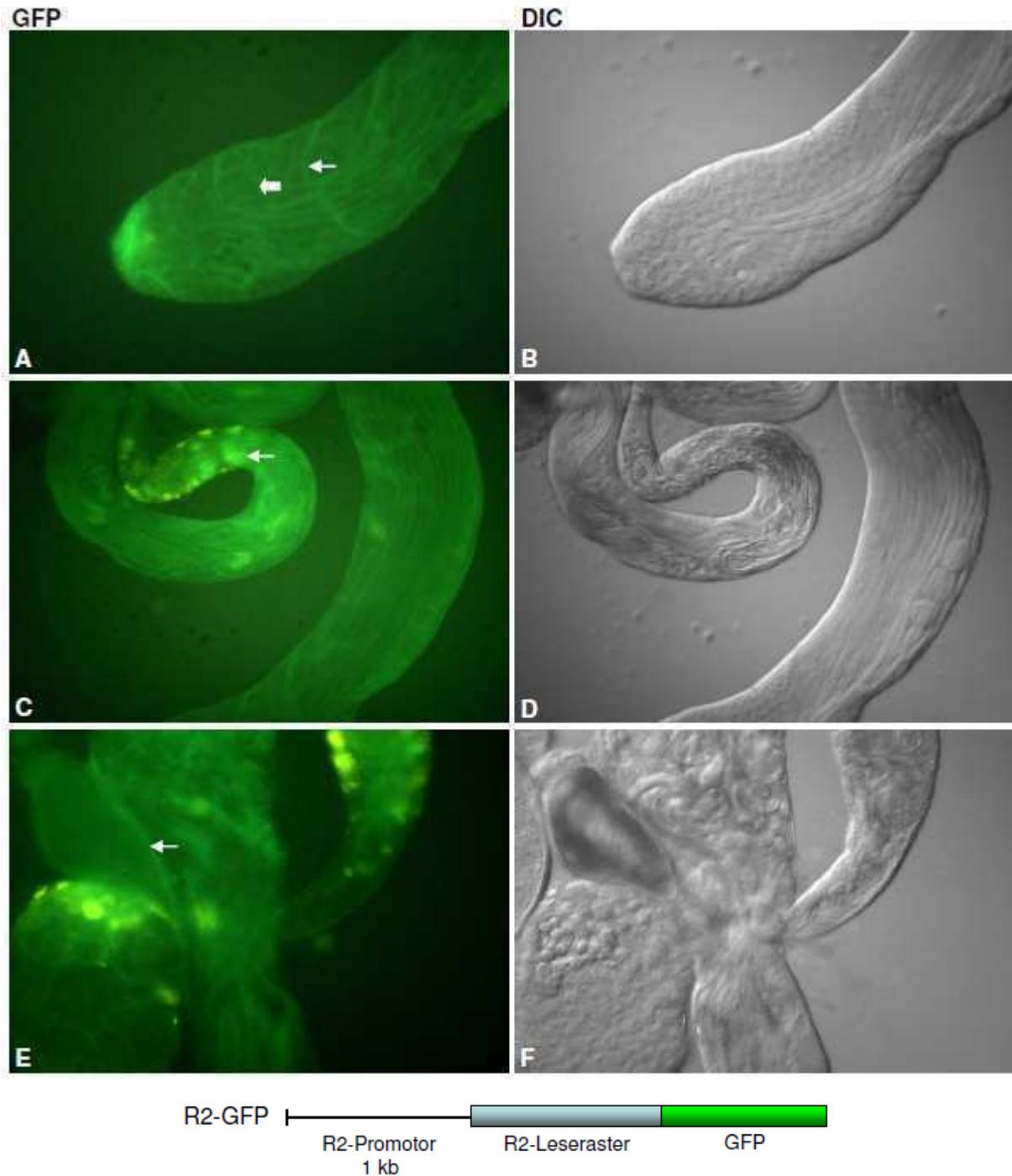


Abbildung 7: Fluoreszenz des R2-GFP-Fusionsproteins. A und B: Hodenspitze mit GFP-Fluoreszenz in den Zysten Zellen (dünner Pfeil) und an membranösen Strukturen in den Keimzellen (Blockpfeil). C und D: Mittlerer und terminaler Bereich eines Hodenschlauchs mit Fluoreszenz in den Zysten Zellen. Der Pfeil weist auf degradierendes Zystenmaterial am Terminalepithel. E und F: Terminaler Bereich und Samenblase. Der Pfeil weist auf die Samenblase mit nicht-fluoreszierenden Spermien.

Die Fluoreszenz zeigte sich im Hodenschlauch in feinen Linien mit größtenteils gleichmäßiger Intensität (Abb. 7 A und C). Sie weist somit auf eine Expression von R2 in den die

Keimzellen umschließenden Zystenzellen hin. In der terminalen Region des Hodenschlauchs, wo die Zystenzellen nach dem Entlassen der reifen Spermien in die Samenblase degradiert werden, erschien die Fluoreszenz stärker und flächig (Pfeil in Abb. 7 C). Auch in der Hodenspitze war die Intensität der Fluoreszenz höher. Hier sind die Zystenzellen, die die primären Spermatogonien umgeben, noch wenig ausgedehnt. Das Fusionsprotein liegt somit konzentriert im Cytoplasma vor. Im weiteren Verlauf der Spermatogenese dehnen sich die Zystenzellen mit der Erhöhung der Anzahl der Keimzellen und deren Wachstum aus. Das Fusionsprotein verteilt sich somit über einen größeren Bereich und die Fluoreszenz wirkt schwächer. Der dünne Pfeil in Abbildung 7 A weist auf die Begrenzung einer Zyste von Spermatozyten. Außerdem trat auch in den Spermatozyten selbst eine schwache Fluoreszenz auf, die sich an der Zellperipherie zu konzentrieren scheint (Blockpfeil in Abb. 7 A). Die reifen Spermien, die in den Samenblasen lagern, zeigen keine Fluoreszenz (Pfeil in Abb. 7 E).

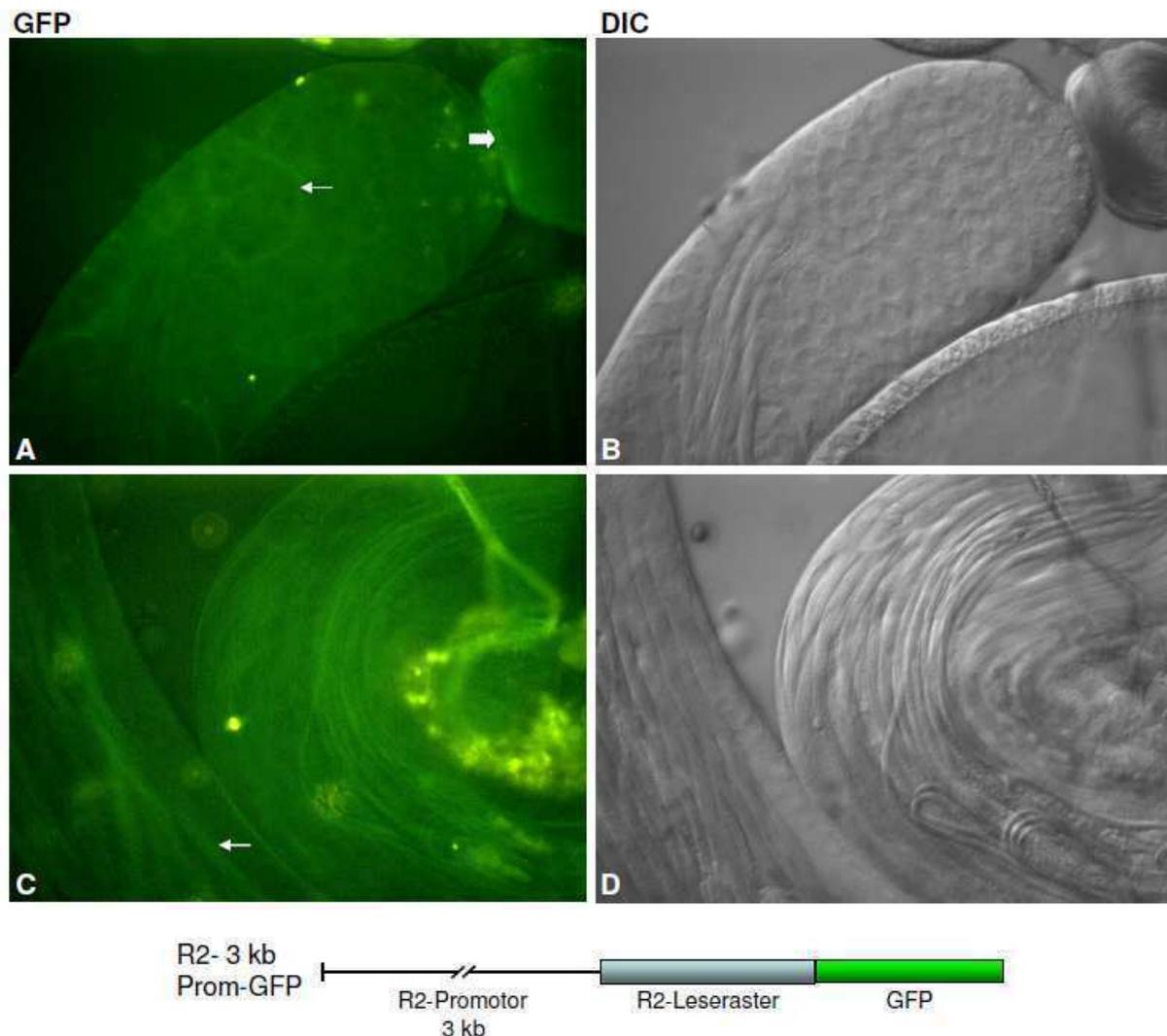


Abbildung 8: Fluoreszenz des R2 -3 kb Prom-GFP-Fusionsproteins. A und B: Hodenspitze mit Fluoreszenz des Fusionsproteins in Keim- und Zystenzellen. Der Pfeil weist auf eine Zystenbegrenzung. Der Blockpfeil weist auf die nicht-fluoreszierenden Spermien in der Samenblase. C und D: Mittlerer und terminaler Bereich eines Hodenschlauchs mit Fluoreszenz in den Keimzellen. Der Pfeil weist auf ein fluoreszierendes elongiertes Spermatidenbündel.

Wie die Aufnahmen in Abbildung 8 zeigen, führt die Verlängerung des Promotorbereichs von R2 tatsächlich zu einem veränderten Expressionsmuster. In der Hodenspitze waren kaum Zystenbegrenzungen auszumachen. So zeigten die Zystenzellen, die die Spermatogonien umgeben, keine Fluoreszenz (Vergleich Abbildungen 7 A und 8 A). Der Pfeil in Abbildung 8 A weist auf die Begrenzung einer Spermatozytenzyste, die nur schwach fluoreszierte. Die runden Spermatogenese-Stadien in der Hodenspitze zeichneten sich durch eine gleichbleibend schwache Fluoreszenz des R2-3 kb Prom-GFP-Fusionsproteins aus. Sie wirkte an einigen Stellen cytoplasmatisch, an anderen eher membrangebunden. Aufgrund der geringen Intensität konnte eine genaue subzelluläre Lokalisierung nicht untersucht werden. Auch die elongierten Spermatozoen zeigten eine gleichmäßig verteilte Fluoreszenz, die bei dem R2-GFP-Fusionsprotein unter Kontrolle des kürzeren Promotorbereichs nicht auszumachen war (Vergleich Abb. 7 C und Pfeil in Abb. 8 C). Ob dabei auch die die Spermatozoen umgebenden Zystenzellen fluoreszieren, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Die in der Samenblase gespeicherten Spermien zeigten auch für dieses Konstrukt keine Fluoreszenz (Blockpfeil in Abb. 8 A). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Fluoreszenz in den Zystenzellen abgenommen, die in den Keimzellen dagegen zugenommen hat. Dabei ist die Intensität der Fluoreszenz unverändert schwach. Dies könnte darauf hinweisen, dass der Promotor im Allgemeinen nicht sehr stark ist oder dass die regulatorischen Elemente, die zu einem vollständigen Expressionsmuster führen, auch von diesem Konstrukt nicht erfasst wurden. Gegen das letzte Argument spricht, dass die Ovarien der *R2-3kb Prom-GFP*-transgenen Weibchen im Gegensatz zu denen der *R2-GFP*-transgenen Weibchen eine schwache Fluoreszenz aufwiesen. Das Fusionsprotein schien membrangebunden zu sein, was mit den Ergebnissen von Jackson und Berg (2002) übereinstimmt (Daten nicht gezeigt).

3.2.2. Die Reduktion des *pka-r2*-Transkripts beeinträchtigt die Fertilität der transgenen Männchen

Mithilfe eines mutanten Phänotyps ist es möglich, auf die Funktion eines Proteins zu schließen. Die sicherste Methode, die Funktion eines Proteins vollkommen auszuschalten, ist es, durch Deletion das entsprechende Gen aus dem Genom zu entfernen. In der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit gelang es eine solche Deletionsmutante für PKA-R2 zu erzeugen (Gustke, 2006). Da R2 in zahlreichen Geweben in *Drosophila* eine Rolle spielt, führte die Deletion zu einem letalen Phänotyp und der Effekt auf die Spermatogenese konnte nicht untersucht werden.

Als Alternative zu einer Deletion des entsprechenden Gens sollten zelltypspezifische Antisense- und RNAi-Konstrukte genutzt werden. Falls nicht anders beschrieben, wurde für diese Konstrukte der *Testis Expression Vector* (TEV, Schäfer, 2003) verwendet. Dabei handelt es sich um einen P-Element-Vektor mit dem starken keimzellspezifischen *Mst87F*-Promotor inklusive des Transkriptions- und Translationskontrollelements (TCE). Das TCE vermittelt eine Erhöhung des Transkriptionsniveaus und eine zeitweise Inhibierung der Translation. Gleichzeitig wird die RNA vor Degradation geschützt und sie akkumuliert im Cytoplasma der Keimzellen (Kempe *et al.*, 1993). Die Antisense-RNA hybridisiert an die komplementäre mRNA des Zielgens und verhindert somit deren Translation bzw. bewirkt den Abbau des doppelsträngigen RNA-Bereichs. Das Transkript des RNAi-Konstrukts besteht aus der Antisense-RNA des Zielgens, einer unspezifischen Sequenz (in diesem Fall einem GFP-Stuffer) und der Sense-RNA des Zielgens. Der Antisense- und Sense-Abschnitt hybridisieren miteinander, wobei die unspezifische Sequenz dazwischen eine Schleife ausbildet. In dieser Konformation wird die RNA von der endogenen RNAi-Maschinerie erkannt und prozessiert. Die dabei entstehenden 21 nt langen Abschnitte binden dann wiederum an die endogene mRNA des Zielgens und führen zum Abbau derselben (zusammengefasst in Wu und Belasco, 2008). Die Effektivität dieser beiden Methoden hängt stark von der jeweiligen Ziel-mRNA und von dem Integrationsort des entsprechenden Konstrukts im Genom ab.

Da die Fluoreszenz der PKA-R2-GFP-Fusionen sowohl in den Keimzellen als auch in den Zystenzellen zu finden war (Gustke, 2006), sollte die mRNA nicht nur spezifisch in den Keimzellen, sondern auch in den Zystenzellen reduziert werden, um auf die Funktionen von R2 in dem jeweiligen Zelltyp schließen zu können. Für die Expression der Antisense-Sequenz in den Zystenzellen wurde das GAL4-UAS-System verwendet (siehe 6.3.6). Dazu wurde die Antisense-Sequenz in den Vektor pUAST kloniert. Dabei handelt es sich um einen P-Element-Vektor, der mehrere *upstream activating sequences* (UAS) enthält, die durch Bindung des Transkriptionsfaktors GAL4 die Transkription nachfolgender Sequenzen aktivieren. Die Expression von GAL4 stand in diesem Fall unter der Kontrolle von unterschiedlich starken, zystenzellspezifischen Promotoren, auf die weiter unten näher eingegangen wird.

Für die ersten beiden Antisense-Konstrukte, *R2 as* und *UAS R2 as*, wurde eine RT-PCR mit den Primern *PKA-R2-ex1* und *PKA-R2-fus* auf Hoden-mRNA durchgeführt. Das 1490 bp-lange Produkt, das die *r2*-mRNA von Exon 1 bis Exon 9 abdeckt, wurde in pGem-T kloniert. Über die Schnittstellen für *NotI*, die aus der *MCS* von pGem-T stammt, und *XbaI*, die über die PCR an das 5'-Ende der Sequenz angehängt wurde, konnte das Fragment in die Vektoren TEV^{TCE} und pUAST kloniert werden. Es wurden acht *R2 as*- und zwei *UAS R2 as*-Linien etabliert. Die für das *R2 as*-Transgen homozygoten Männchen wurden auf ihre Fertilität hin

untersucht. Sie zeigten keinen Phänotyp. Die für das *UAS R2 as*-Transgen homozygoten Tiere wurden mit den Treiberlinien *PPY-GAL4 8s* und *PPY-GAL4 18s* gekreuzt (Jung *et al.*, 2007). Bei *PPY* handelt es sich um die Proteinphosphatase Y, die spezifisch in den Zysten-zellen exprimiert wird (Cohen *et al.*, 1990; Armstrong *et al.*, 1995). Mit den männlichen Nachkommen, die für beide Konstrukte heterozygot sind, wurden Fertilitätstests durchgeführt. Sie waren alle fertil.

Durch weitere Experimente in der Abteilung kam der Verdacht auf, dass unter Umständen Antisense-Konstrukte, die einen kleineren Bereich der Ziel-mRNA abdecken, besser funktionieren als solche, die die gesamte Ziel-mRNA abdecken. Als Alternative zu *R2 as* und *UAS R2 as* wurde daher ein zweites Set an Antisense-Konstrukten erzeugt: *R2 as 3' UTR* und *UAS R2 as 3' UTR*. Für diese Konstrukte wurde eine 590 bp-lange Sequenz aus der 3' UTR ausgewählt. Sie wurde durch PCR mit den Primern *R2 as 5* und *R2 as 3* auf genomischer DNA erzeugt und in den Vektor pGem-T ligiert. Anschließend wurde sie gerichtet über *SacI* und *SacII* in den Zwischenvektor pBluescript KS (-) und letztendlich ebenfalls gerichtet über *XhoI* und *XbaI* in die Vektoren TEV^{TCE} und pUAST kloniert. Es konnten für *R2 as 3' UTR* neun Linien und für *UAS R2 as 3' UTR* sechs Linien etabliert werden. Die für das *R2 as 3' UTR*-Transgen homozygoten Männchen zeigten keinen sterilen Phänotyp. Auch Männchen, die sowohl für die Integration *18.1* als auch für die Integration *21.1* homozygot waren, waren fertil. Die *UAS R2 as 3' UTR*-Linien *8.2* und *11.1* wurden mit den zystenzellspezifischen Treiberlinien *PPY 18s*, *PPY long 2.1*, *PPY long 5.1*, *C729*, *C833* kombiniert. In den Linien *PPY 18s*, *PPY long 2.1* und *PPY long 5.1* tragen die transgenen Tiere jeweils ein Konstrukt, in dem das *GAL4*-Gen unter Kontrolle des *PPY*-Promotors steht. Der Promotorbereich für die Linie *PPY 18s* umfasst etwa 1,5 kb (Jung *et al.*, 2007), der der Linien *PPY long 2.1* und *5.1* etwa 3,2 kb. Kreuzungen mit der Linie *UAS-GFP 28 (x)* zeigten, dass die unterschiedlichen Längen des Promotorbereichs keinen Einfluss auf das Expressionsmuster haben. Der Promotor ist während der gesamten Spermatogenese in den Zysten-zellen aktiv (Jung *et al.*, 2007 und eigene Untersuchungen). Bei den Linien *C729* und *C833* handelt es sich um *GAL4/Enhancertrap*-Linien (Hrdlicka *et al.*, 2002; erhalten von B. M. Mechler). Bei beiden Linien erfolgte die Integration auf dem dritten Chromosom. Das Expressionsmuster der Linie *C729* entspricht in etwa dem der *PPY*-Treiberlinien. Für die Linie *C833* zeigte sich eine höhere Promotoraktivität während der frühen Spermatogenese. Das Zusammenkreuzen der Treiber- und Effektorlinien erfolgte so, dass die Nachkommenschaft jeweils heterozygot für beide Konstrukte ist. Die entsprechenden Männchen wurden auf ihre Fertilität hin überprüft. Sie zeigten keinen Phänotyp.

Das *R2 RNAi*-Konstrukt basiert auf der R2-Northern-Sonde TM489, welche eine Sequenz aus dem dritten Exon der *r2*-mRNA erkennt. Die unspezifische Sequenz, die die Schleife des RNAi-Konstrukts ausbilden soll, wurde zunächst über *HindIII* in den Vektor pBluescript KS(-) ligiert. Die R2-Northern-Sonde lag in *Sp6*-Orientierung in dem Vektor pGem-T vor. Die R2-Sequenz wurde über die Schnittstellen für *SacII* und *NotI*, die aus der MCS des Vektors stammen, in Antisense-Orientierung vor die unspezifische Sequenz in den pBluescript KS(-) kloniert. Im nächsten Schritt wurde die gleiche R2-Sequenz über die Schnittstellen für *SaI* und *ApaI*, die ebenfalls in der MCS von pGem-T vorlagen, in Sense-Orientierung hinter die unspezifische Sequenz ligiert. Das nun vollständige Konstrukt, bestehend aus der R2 as-Sequenz, der unspezifischen Sequenz und der sense-orientierten R2-Sequenz, wurde dann über die Schnittstellen für *SacII* in den P-Elementvektor pCaSpeR 2 eingebracht, der zusätzlich den spermatogenesespezifischen Promotor *Mst87F* mit dem TCE enthält. Es wurden 13 *R2 RNAi*-Linien etabliert. Die Etablierung gestaltete sich dabei schwierig, da schon die heterozygoten Männchen in ihrer Fertilität stark eingeschränkt sind. Für die Haltung der Stämme werden die transgenen Weibchen sowohl mit *w¹¹¹⁸*-Männchen als auch mit Männchen, die heterozygot für das Konstrukt sind, gekreuzt. Da die transgenen Männchen nicht zu 100 % steril sind, können immer wieder auch homozygote Männchen in einigen Linien auftreten. Um das Ausmaß der Einschränkung in ihrer Fertilität zu untersuchen, wurden Fertilitätstests mit den heterozygoten Männchen der *R2 RNAi*-Linien und auch von einigen homozygoten Männchen durchgeführt. Homozygote Männchen konnten dabei nur von den Linien gewonnen werden, bei denen die Kartierungskreuzungen erfolgreich durchgeführt werden konnten (Tab. 1). Bei diesen Linien konnten hetero- und homozygote Tiere anhand der Markermutation des entsprechenden Balancer-Chromosoms identifiziert werden (siehe 6.2.4). Eine eindeutige Identifizierung von homozygoten Tieren ist ohne Marker nicht möglich. Pro Linie wurden acht bis zehn Tests durchgeführt. Die Nachkommenschaft dieser Tests wurde sieben Tage, nachdem die ersten Tiere geschlüpft waren, ausgezählt. Die Anzahl wurde im Verhältnis zum Wildtyp gesetzt (Tab. 1). Mit Ausnahme der Linien 9.1, 37.1 und 44.2 liegt die Fertilität der heterozygoten Männchen zwischen 2,4 % bis 11,3 %. Die mangelnde Effizienz des RNAi-Konstrukts bei der Linie 9.1 hängt wahrscheinlich mit dem Integrationsort des Konstrukts zusammen. Die beiden Linien 37.1 und 44.2 zeigen einen heterogenen Phänotyp. So lag die Fertilität von fünf Männchen der Linie 37.1 bei 9 % im Vergleich zum Wildtyp, während die restlichen vier getesteten Männchen mit im Durchschnitt 73,8 % eine wesentlich schwächer eingeschränkte Fertilität zeigten. Ähnlich verhielt sich das auch für die Linie 44.2. Hier waren fünf Männchen nur zu 6,1 % fertil während drei Männchen zu 100 % fertil waren. Warum die Männchen dieser beiden Linien in ihrer Fertilität so heterogen sind, kann nicht erklärt werden. Für die Linien 21.2, 27.2 und 43.1 konnten homozygote Männchen getestet werden. Dabei zeigte sich, dass die Fertilität im Vergleich zu den für die entsprechende

Integration heterozygoten Männchen zwar noch weiter herabgesetzt ist, die Tiere aber nicht vollkommen steril sind.

Tabelle 1: Fertilitätstests der R2 RNAi-Linien.

R2 RNAi-Linie	Nachkommen im Vergleich zum Wildtyp
9.1; +	67,9 %
21.1; +	11,3 %
21.2; +	6 %
21.2; 21.2	2,9 %
23.1; +	6,5 %
23.2; +	5,8 %
27.1; +	7,2 %
27.2; +	7,2 %
27.2; 27.2	4,9 %
27.3; +	10,2 %
37.1; +	5 ♂: 9 % 4 ♂: 73,8 %
39.1; +	2,4 %
43.1; +	8,6 %
43.1; 43.1	3,8 %
44.1; +	8,2 %
44.2; +	5 ♂: 6,1% 3 ♂: 100 %

Für eine Charakterisierung des Phänotyps wurden zunächst die Hoden von für das Transgen homozygoten Männchen präpariert und unter dem Lichtmikroskop betrachtet. In Abbildung 9 ist der mutante Hoden (Abb. 9 B) im Vergleich zu einem w^{118} -Hoden (Abb. 9 A) dargestellt. Die Morphologie des mutanten Hodens entspricht weitestgehend der des w^{118} -Hodens. Es sind alle Spermatogenese-Stadien vorhanden. Die einzige Auffälligkeit ist die stark aufgetriebene terminale Region des mutanten Hodens (Abb. 9, Pfeil). Bei dem angesammelten Material könnte es sich um degradierende Zellreste von fehlerhaften Spermatogenese-Stadien handeln. Trotz dieser Erscheinung ist die Samenblase, die an diese Region des Hodenschlauchs anschließt, mit reifen beweglichen Spermien angefüllt.

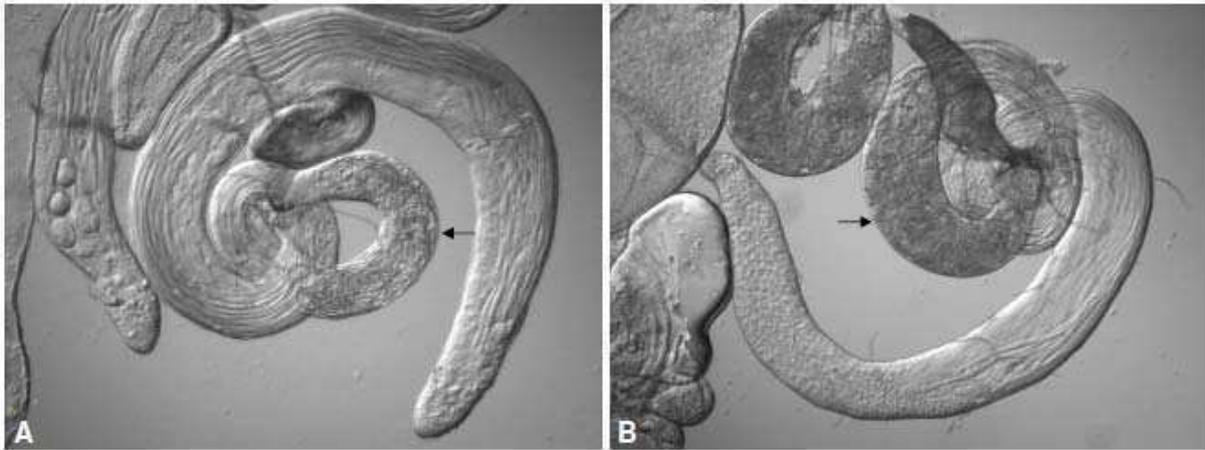


Abbildung 9: Hoden-Morphologie der *R2 RNAi*-Mutante (B) im Vergleich zu *w¹¹⁸* (A). Pfeile weisen jeweils auf die Terminalregion des Hodenschlauchs.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Hoden von *R2 RNAi*-transgenen Männchen mit Hoechst 33258 und TRITC-Phalloidin angefärbt. Hoechst 33258 färbt DNA und somit kann man die Änderung der Kernmorphologie der Keimzellen während der Spermatogenese verfolgen. So ist zum Beispiel die Hodenspitze auffällig, in der die Kerne der noch sehr kleinen und runden Spermatogonien dicht aneinandergedrängt vorliegen (Pfeil in Abb. 10 B). Ebenfalls auffällig ist die terminale Region des Hodenschlauchs. Die Kerne der elongierten Spermatozonen sind hier nadelförmig. Die Kerne einer Zyste liegen dicht beisammen und bilden so die für dieses Stadium typischen pfeilförmigen Strukturen (Pfeil in Abb. 10 H). Der Hoden des *R2 RNAi*-Männchens zeigt die dicht gepackten Spermatogonienkerne, auch wenn die Fluoreszenz in der Aufnahme des mutanten Hodens nicht so intensiv ist wie die in der Aufnahme des Wildtyp-Hodens (Vergleich der Abb. 10 E mit B). Auch die pfeilförmigen Strukturen der Kerne der elongierten Spermatozonen in der terminalen Region sind in dem mutanten Hoden auszumachen (Vergleich der Abb. 10 K mit H).

TRITC-Phalloidin färbt F-Aktin. F-Aktin ist ein Bestandteil der Individualisierungskomplexe, die sich am Ende der Spermiogenese bilden, um das überflüssige Material von den Spermatozonenköpfen abzustreifen und um sie voneinander zu trennen. Sie werden in Höhe der Spermatozonenköpfe im terminalen Bereich des Hodenschlauchs zusammengesetzt und wandern dann entlang der Spermatozonenbündel in Richtung Hodenspitze (Pfeile in den Abb. 10 C und I). Am Ende des Spermatozonenbündels angekommen gelangen sie zusammen mit dem überflüssigen Zellmaterial in die *waste bags*. In dem *R2 RNAi*-Hoden können sowohl in der Übersicht (Pfeil in Abb. 10 E) als auch in der Vergrößerung des terminalen Bereichs des Hodens (Pfeil in Abb. 10 L) Individualisierungskomplexe ausgemacht werden. Durch die Hoechst-Phalloidin-Färbungen war kein Defekt in der Spermatogenese zu erkennen.

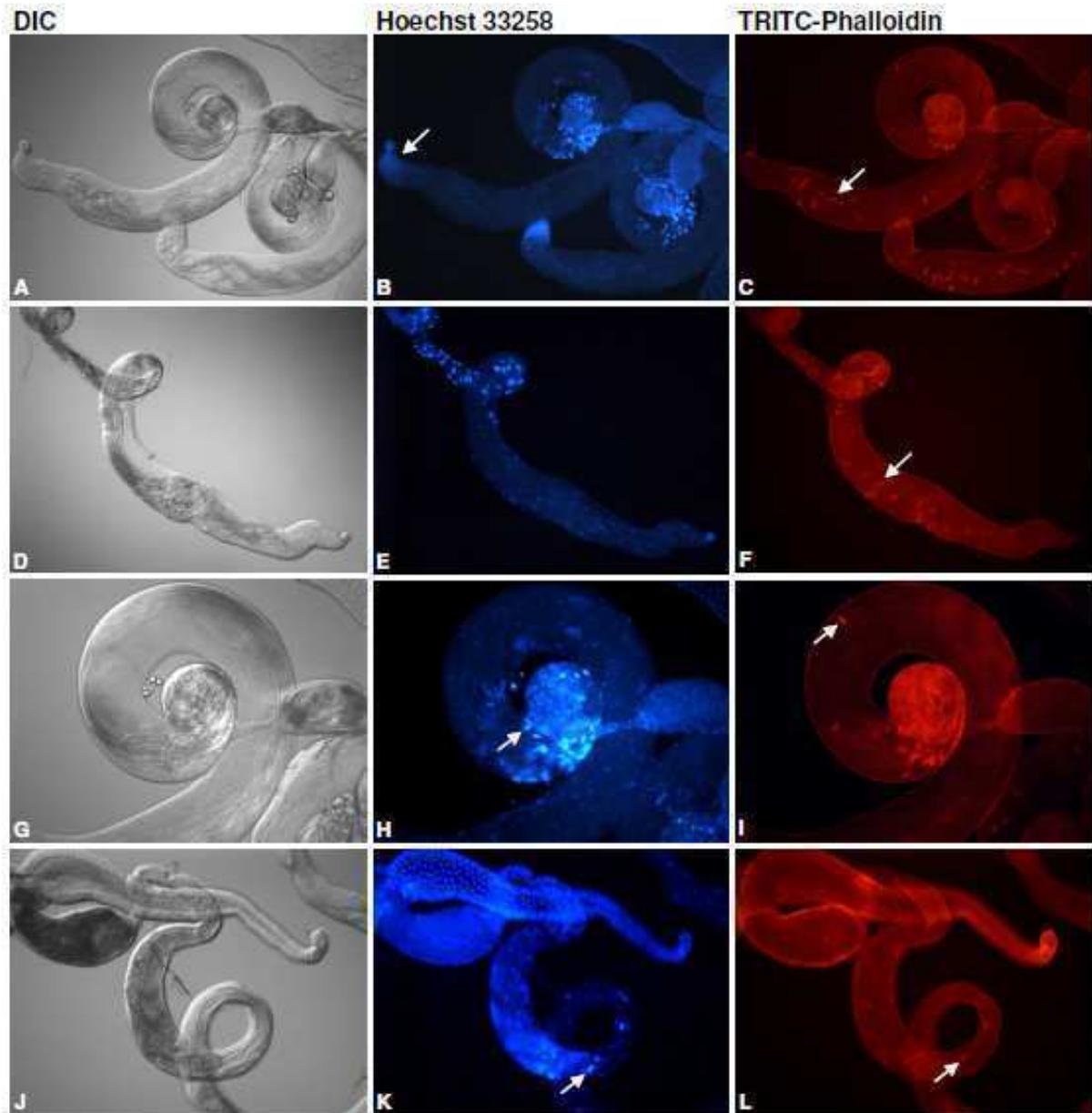


Abbildung 10: Hoechst- und Phalloidin-Färbungen von *R2 RNAi*-mutanten Hoden im Vergleich zu *w¹¹⁸*-Hoden. A-C: Übersicht über einen *w¹¹⁸*-Hoden. B: Pfeil zeigt auf die runden Spermatozytenkerne. D-F: Übersicht über einen *R2 RNAi*-mutanten Hoden. G-I: Vergrößerung der terminalen Region des *w¹¹⁸*-Hodens. H: Pfeil weist auf die nadelförmigen Kerne der elongierten Spermatozyten. J-L: Vergrößerung der terminalen Region des *R2 RNAi*-Hodens. K: Pfeil weist auf Spermatozytenkerne. C, F, I und L: Pfeile zeigen jeweils auf einen Individualisierungskomplex.

Da kein augenscheinlicher Defekt in der Spermatogenese aufgedeckt werden konnte, sollte nun überprüft werden, ob der Defekt in der Haltbarkeit der Spermien oder in ihrer Lagerung in den Weibchen liegt. Dazu wurde von den Linien 21.2, 27.2 und 43.1 jeweils ein Männchen mit mehreren Wildtyp-Weibchen zusammengesetzt. Nach drei Tagen wurde das Männchen entfernt. Noch am selben Tag, zwei Tage später und vier Tage später wurden von jeweils ein bis zwei Weibchen die Spermatheken und das *Receptaculum seminis*, die Organe zur Speicherung der Spermien, herauspräpariert und die Motilität der Spermien in diesen Organen beobachtet. Als Vergleich dienten die entsprechenden Organe von Weibchen, die von einem

Wildtyp-Männchen begattet worden sind. Auch in der Speicherung und bei der Haltbarkeit der Spermien der transgenen Männchen konnte kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden: Die Motilität und die Anzahl der Spermien nahm in beiden Fällen über die Zeit allmählich ab, bis die Spermien am fünften Tag kaum noch Bewegung zeigten.

Die Effizienz der RNAi- und Antisense-Konstrukte konnte für PKA-R2 nicht überprüft werden, da die *R2*-Signale, die bei einem Northern nachgewiesen werden können, sowohl aus den Zystenzellen als auch aus den Keimzellen stammen könnten. Ein Versuch, eine mögliche zelltypspezifische Reduktion auf der Ebene des Proteins nachweisen zu können, sollte über einen *R2*-spezifischen Antikörper erfolgen (erhalten von D. Kalderon). Leider war die Färbung bereits in Wildtyp-Hoden so schwach, dass sie nicht dokumentiert werden konnte.

3.3 Die katalytische Untereinheit PKA-C1

Die bisher untersuchten katalytischen Untereinheiten C2 und C2-like werden exklusiv in den Keimzellen exprimiert (Gustke, 2006). Sie kommen dementsprechend nicht als Interaktionspartner für R2 in den Zystenzellen infrage. Daher sollen nun die beiden anderen katalytischen Untereinheiten aus *Drosophila*, PKA-C1 und -C3 auf ihre Expression im Hoden untersucht werden.

3.3.1 Wenigstens ein *pka-c1*-Transkript wird im Hodengewebe exprimiert

Für PKA-C1 werden drei Transkripte vorausgesagt, die sich sowohl in der 5'- als auch in der 3'-UTR unterscheiden, aber alle für das gleiche Protein kodieren. Für die RT-PCRs wurden Primer ausgewählt, die das entsprechende offene Leseraster amplifizieren. Als Template wurde, wie zuvor schon für die RT-PCRs für PKA-R1, mRNA von Hoden und von ganzen Weibchen eingesetzt. Die Weibchen-mRNA dient dabei als Positivkontrolle, da auch für C1 bereits eine Rolle in der Oogenese beschrieben wurde (Lane und Kalderon, 1994). Es entstand sowohl mit der Hoden-mRNA als auch mit der Weibchen-mRNA ein Produkt, was zu der Vermutung führt, dass mindestens eines der drei Transkripte im Hoden exprimiert wird und C1 dementsprechend eine Funktion während der Spermatogenese bestreiten könnte (Abb. 11). Northern-Analysen sollten zeigen, um welches Transkript bzw. welche Transkripte es sich dabei handelt.

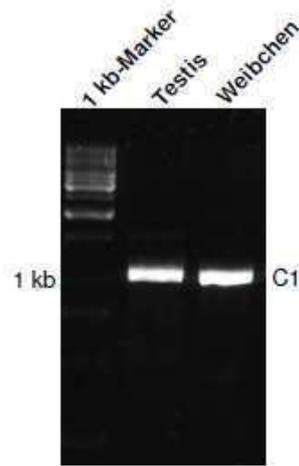


Abbildung 11: Darstellung der PCR-Produkte für PKA-C1 auf einem 0,7% Agarose-Gel. Die RT-PCR für C1 wurde mit den Primern C1-BRET-GFP5 und C1-BRET-GFP3 bei einer Annealing-Temperatur von 56 °C und einer Elongationszeit von 2 min durchgeführt. Das Produkt hat eine Größe von 1087 bp.

3.3.2 Northern-Hybridisierung zeigt drei c1-Transkripte im Testis

Mithilfe einer Northern-Hybridisierung sollte analysiert werden, welche der drei Transkripte während der Spermatogenese exprimiert werden. Da die Sonde FG927 das offene Leseraster aller drei annotierten Transkripte (2130 bp, 2769 bp und 2967 bp) abdeckt, sollten sie alle erkannt werden.

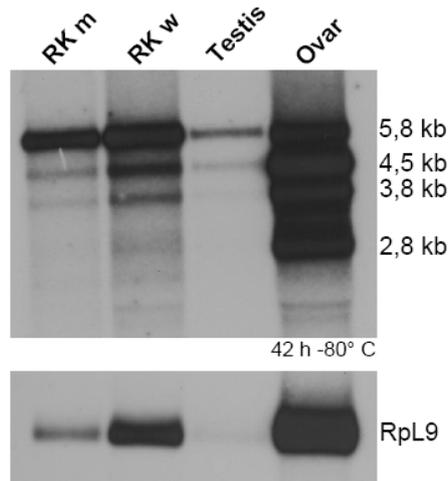


Abbildung 12: Northern-Hybridisierung mit der Sonde FG927 (PKA-C1). Bei der C1-Sonde handelt es sich um das in 3.3.1 amplifizierte, auf Hoden-mRNA basierende PCR-Produkt, das in *Sp6*-Orientierung in pGem-T kloniert wurde. Die Linearisierung für die *in vitro*-Transkription erfolgte mit *NdeI*. Es wurde die *T7*-RNA-Polymerase verwendet. Die Hybridisierung wurde auf einer Membran mit mRNA aus den Restkörpern von Männchen (RK m) und Weibchen (RK w), sowie aus Testes und Ovarien durchgeführt. Die Exposition erfolgte bei -80 °C für 42 h. Als Ladekontrolle diente die Hybridisierung mit der Sonde RpL9 (Schmidt *et al.*, 1996; mit *SacI* linearisiert).

Das Exponat zeigte für C1 vier Transkripte im Ovar mit Längen von ca. 5,8 kb, 4,5 kb, 3,8 kb und 2,8 kb, wobei das 4,5 kb- und das 2,8 kb-Transkript die stärksten Signale lieferten (Abb. 12). Die beiden höchsten Banden (5,8 kb und 4,5 kb) haben keine Entsprechung unter den annotierten Transkripten. In den Restkörpern beider Geschlechter und den Testes wurden die drei großen Transkripte (5,8 kb, 4,5 kb und 3,8 kb) exprimiert. Hier war das 5,8 kb-Transkript das prominenteste. Dementsprechend wäre das 2,8 kb-Transkript oogenesespezifisch. Dieses Ergebnis bestätigt, dass zumindest die bereits annotierte C1-Isoform im Hoden eine Rolle spielt.

3.3.3 PKA-C1 lokalisiert zu Beginn der Spermatogenese in den Keimzellen, am Ende jedoch in den Zystenzellen

Analog zu dem *R1-GFP-Reporter*-Konstrukt wurde ein *C1-GFP-Reporter*-Konstrukt erzeugt. Es sollte Aufschluss darüber geben, ob C1 als Interaktionspartner der regulatorischen Untereinheit R2 in den Zystenzellen infrage kommt, oder ob es wie die katalytischen Untereinheiten C2 und C2-like in Keimzellen exprimiert wird und dort entweder mit R1 oder R2 interagiert. Der C1-Promotorbereich mit anschließender 5' UTR des *pka-c1*-Gens wurde in zwei Abschnitten durch PCR mit der *Taq*-Polymerase auf genomischer DNA amplifiziert. Für den 2377 bp-langen 5'-Abschnitt wurden die Primer *C1-GFP-51* und *C1-GFP-52* und für den 2139 bp-langen 3'-Abschnitt die Primer *C1-GFP-31* und *C1-GFP-32* verwendet. Beide PCR-Produkte wurden in pGem-T kloniert. Der 5'-Bereich wurde anschließend über *KpnI* und *EcoRI* und der 3'-Bereich über *EcoRI* und *AgeI* aus pGem-T geschnitten und in den mit *KpnI* und *AgeI* geöffneten Vektor pUASTgreen ligiert. Nach erfolgreicher Transformation und Etablierung von mutanten Fliegenlinien wurden die Hoden von Männchen, die homozygot für das *C1-GFP-Reporter*-Transgen sind, unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und deren Fluoreszenzmuster dokumentiert. Die Fluoreszenz erschien sowohl in den Keimzellen als auch in den Zystenzellen (Abb. 13). Dabei war die Intensität der Fluoreszenz im Cytoplasma der Spermatogonien, die in der Hodenspitze liegen, am stärksten (Abb. 13 A und C). In späteren prämeiotischen Stadien nahm sie dann ab. Während des Stadiums der elongierten Spermatiden erschien die sehr intensive Fluoreszenz streifig, was darauf hindeutete, dass das GFP in den Zystenzellen exprimiert wurde. Der Pfeil in Abbildung 13 A weist auf die Begrenzung einer solchen Spermatidenzyste. Die Breite der Streifen lässt die Vermutung zu, dass entweder die Zystenzellen stellenweise breiter erscheinen als generell angenommen oder dass das GFP unter *c1*-Promotorkontrolle möglicherweise zusätzlich in den interstitiellen Zellen exprimiert wurde, die von der Zytologie her gesehen in der Vergangenheit auch mit den Zystenzellen gleichgesetzt wurden (zitiert nach Demerec, 1950). Die Intensität

dieser Fluoreszenz erschien deutlich stärker als die in den frühen Spermatogonien. Ausgehend von dem Expressionsmuster des GFP unter *c1*-Promotorkontrolle könnte C1 sowohl mit R1 und R2 in den frühen Keimzellstadien, als auch später mit R2 in den Zystenzellen interagieren.

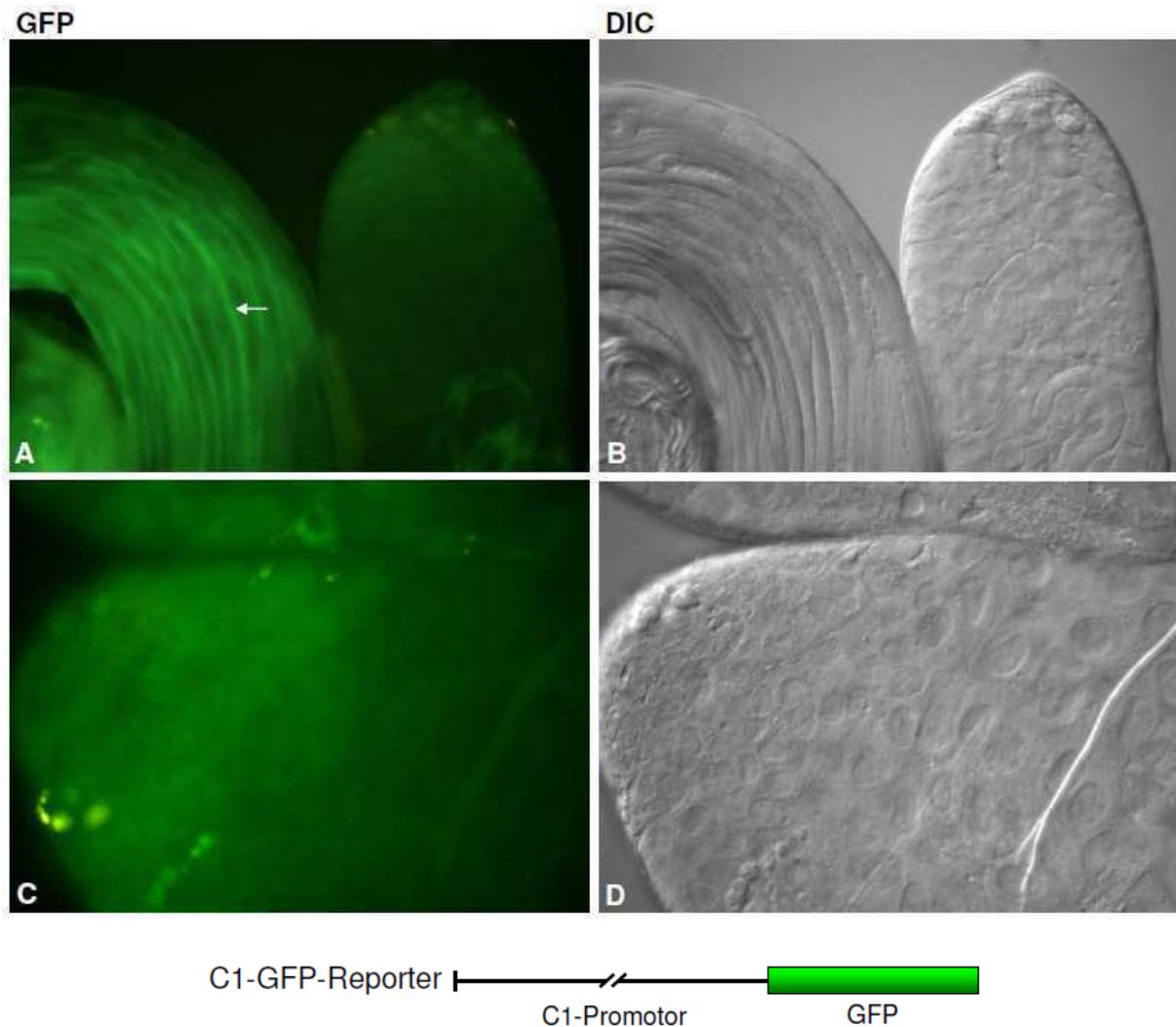


Abbildung 13: Fluoreszenz von GFP unter *pka-c1*-Promotorkontrolle. A und B: Hodenspitze mit GFP-Fluoreszenz in den Keimzellen und mittlerer Bereich eines Hodenschlauchs mit GFP-Fluoreszenz in den Zystenzellen, die die elongierten Spermatiden umgeben sowie in den interstitiellen Zellen (Pfeil in A). C und D: Vergrößerung einer Hodenspitze mit Fluoreszenz im Cytoplasma der Spermatogonien.

3.3.4 PKA-C1 interagiert mit PKA-R1 und -R2 sowie mit allen getesteten humanen regulatorischen Untereinheiten

Der Biolumineszenz Resonanz Energietransfer (BRET) ist ein ausgezeichnetes Mittel, mögliche Interaktionen zwischen zwei Proteinen zu untersuchen. Dieses System wurde von der Abteilung Biochemie an der Universität Kassel für das PKA-System etabliert (Prinz *et al.*, 2006b). In der Abbildung 14 ist die entsprechende Funktionsweise dargestellt. An die

regulatorische Untereinheit ist die *Renilla*-Luziferase (Rluc) gekoppelt, an die katalytische Untereinheit dagegen GFP². In Anwesenheit des Substrats Coelenterazin (DeepBlueCTM, BioSignal Packard) wird dieses oxidiert. Die Reaktion setzt Licht mit einer Wellenlänge von 410 nm frei. Sind die regulatorische und die katalytische Untereinheit nun in der Lage, miteinander den PKA-Holoenzymkomplex auszubilden, kommt das GFP² in unmittelbare Nähe der aktivierten Rluc (Abb. 14 A). Die Energie kann daher von der Luziferase auf das GFP² transferiert werden. Das so aktivierte GFP² strahlt Licht mit einer Wellenlänge von 515 nm ab. Kommt es zu keiner Interaktion zwischen der regulatorischen und der katalytischen Untereinheit, so bleibt die Distanz zwischen Rluc und GFP² für einen Energietransfer zu groß (Abb. 14 B).

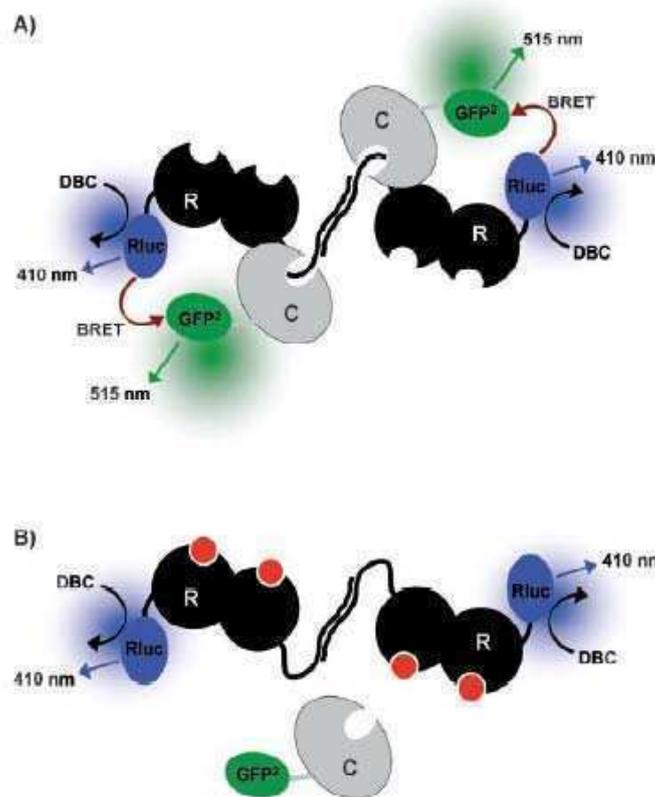


Abbildung 14: Graphische Darstellung des BRET-Systems angewandt auf die Proteinkinase A (Prinz et al., 2006b). A: Komplexbildung bei Abwesenheit von cAMP. B: Dissoziation der katalytischen Untereinheiten in Anwesenheit von cAMP. C (grau) - Katalytischen Untereinheiten; R (schwarz) - regulatorischen Untereinheiten; rote Sphäre - cAMP; GFP² (grün) - grün fluoreszierendes Protein; Rluc (blau) - *Renilla* Luziferase; DBC - DeepBlueCTM, BioSignal Packard; brauner Pfeil: Energietransfer (BRET) von dem Donor Rluc auf den Akzeptor GFP².

Für die Untereinheiten der humanen PKA Typ Ia wurde ausgetestet, welche Fusionskonstrukte sich für die BRET²-Messungen am besten eignen. So wurde die R-Untereinheit sowohl C- als auch N-terminal an Rluc und GFP² fusioniert. Die C-Untereinheit wurde N-terminal an Rluc sowie N- und C-terminal an GFP² fusioniert (Prinz et al., 2006b). Die Kombination aus R-Rluc und GFP²-C führte zu den besten Ergebnissen. Das Signal

entsprach dem Zwei- bis Dreifachen des Hintergrundsignals, welches durch die Expression der unfusionierten Rluc zustande kam. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Konstrukte für die Interaktionsstudien mit den *Drosophila* PKA-Untereinheiten geplant (Abb. 15). Zur Klonierung der Konstrukte wurden die offenen Leseraster aller Untereinheiten per PCR auf Hoden-cDNA erzeugt. Die für die Amplifizierung genutzten Primer waren mit Schnittstellen versehen, die es ermöglichten, die Produkte entsprechend dem Leseraster von GFP² bzw. von Rluc in die BRET²-Vektoren (BioSignal Packard) zu klonieren. So wurde die katalytische Untereinheit C1 mithilfe von *XhoI* und *HindIII* in den Vektor pGFP²-C1 kloniert. Die regulatorischen Untereinheiten wurden über *XhoI* und *HindIII* (R1) bzw. über *KpnI* und *Apal* (R2) in den Vektor pRluc-N1 kloniert. Die Konstrukte für Δ C3 B und die humanen Untereinheiten RIα, RIα, RIβ und RIβ wurden von Mitarbeitern der Abteilung Biochemie hergestellt (Prinz *et al.*, 2006a; Diskar *et al.*, 2010).

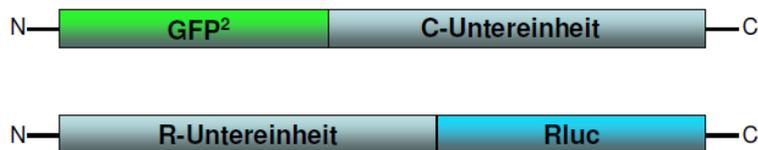


Abbildung 15: Schematische Darstellung der BRET-Fusionsproteine. Die katalytischen (C-) Untereinheiten sind N-terminal an GFP² fusioniert. Die regulatorischen (R-) Untereinheiten sind C-terminal an *Renilla*-Luziferase (Rluc) fusioniert.

Die Messungen und die Auswertung der Daten erfolgten entsprechend den Angaben in 6.5.1. 30 Minuten vor dem Auslesen der Ansätze in dem *Fusion α-FP* wurde die Hälfte der Proben nach einem Waschschrift mit D-PBS und die andere Hälfte mit IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) und Forskolin versetzt. Bei D-PBS handelt es sich um einen D-Glukosehaltigen Phosphatpuffer, in dem die jeweiligen R- und C-Untereinheiten einen Komplex ausbilden, wenn sie zu einer Interaktion in der Lage sind. Dies resultiert in einem hohen BRET²-Signal. Mithilfe von IBMX und Forskolin wird der intrazelluläre cAMP-Level erhöht. IBMX inhibiert die cAMP degradierenden Phosphodiesterasen (PDEs) und Forskolin stimuliert die cAMP-produzierenden Adenylzyklen. Auf diesem Wege soll die Auflösung des Holoenzymkomplexes und die damit verbundene Aktivierung der katalytischen Untereinheiten provoziert werden. Dies resultiert in einem niedrigen BRET²-Signal. Die Erstellung der Graphen und Errechnung der Signifikanzen (*one-way ANOVA*) erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 4.0. Die Prozentzahlen zur Bewertung der Aktivierbarkeiten der katalytischen Untereinheiten bei cAMP-Überschuss beziehen sich auf den Mittelwert aus den Daten der Einzelmessungen.

PKA-C1 wurde zunächst auf mögliche Interaktionen mit PKA-R1 (DmR1) und PKA-R2 (DmR2) untersucht (Abb. 16 links). Sie war in der Lage, mit beiden einen Holoenzymkomplex

auszubilden (DmR1 - und DmR2 -). Das BRET²-Signal für die Interaktion mit R2 war dabei höher als das für die Interaktion mit R1. Bei cAMP-Überschuss ließen sich diese Komplexe lösen, was mit einer Aktivierung von C1 gleichzusetzen ist (DmR1 + und DmR2 +). Das Signal für die Messung mit R1 verringerte sich um 42,6 %, das für die Messung mit R2 um 66,8 %. Dementsprechend ist die Aktivierbarkeit von C1 aus einem Komplex mit R2 höher als aus einem Komplex mit R1. Zusätzlich wurde C1 daraufhin untersucht, ob es mit einer der folgenden regulatorischen Untereinheiten aus dem Menschen (humRs) interagieren kann: hRI α , hRII α , hRI β und hRII β (Abb. 16 rechts). Sie konnte in unterschiedlichem Maße mit allen vier humanen R-Untereinheiten Komplexe ausbilden. Das BRET²-Signal für die Interaktion mit hRI α ist nicht signifikant über dem Hintergrund (hRI α -). In diesem Fall sieht es so aus, als ob es dennoch zu einer Interaktion kam, denn in Anwesenheit von cAMP war das Signal reduziert (hRI α +). Das ist nur möglich, wenn ein funktioneller PKA-Komplex vorliegt. Die Signale für die Interaktion von C1 mit den anderen humanen Untereinheiten hRII α , hRI β und hRII β liegen dagegen signifikant über dem Hintergrund (hRII α -, hRI β - und hRII β -). Das Signal für die Interaktion mit hRI β ist am höchsten. Das Signal für die Interaktion mit hRII β ist ebenfalls sehr hoch, allerdings sind die Werte aus den einzelnen Messungen sehr variabel, so dass eine hohe Standardabweichung zustande kam. Das Signal für die Interaktion mit hRII α war nur etwas höher als das bei der Interaktion mit hRI α . Die Aktivierbarkeit von C1 durch cAMP fiel für die Messungen mit den humanen R-Untereinheiten sehr unterschiedlich aus (hRI α +, hRII α +, hRI β + und hRII β +). Nach Interaktion mit hRI β ließen sich nur 16,1 % der C-Untereinheiten aus den Holoenzymkomplexen lösen. Für die Messungen mit hRI α , hRII α und hRII β waren es 58 %, 48,8 % bzw. 59,1 %.

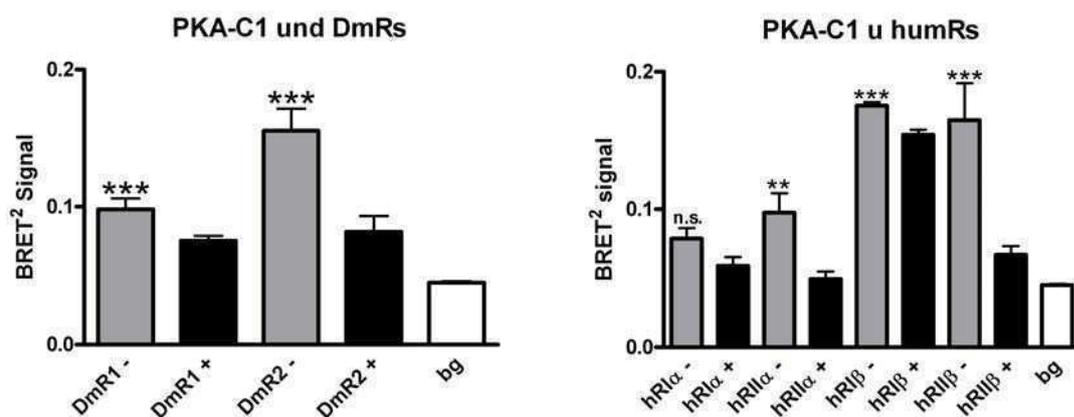


Abbildung 16: Darstellung der Ergebnisse aus den BRET²-Messungen für PKA-C1 mit den regulatorischen Untereinheiten aus *Drosophila* (DmRs) und Mensch (humRs). Das BRET² Signal ist der Quotient aus den Aktivitäten der *Renilla* Luciferase und des GFP². Das Minus und der graue Balken stehen für die Inkubation der transfizierten Zellen mit D-PBS, das Plus und der schwarze Balken dagegen für die 30-minütige Inkubation mit IBMX und Forskolin. Bg und der weiße Balken stehen für das Hintergrund-Signal. Die Sterne zeigen, dass das Signal signifikant höher ist als der Hintergrund: zwei Sterne = $p < 0,01$; drei Sterne $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant. Wiederholungen: DmR1 $n = 5$; DmR2, hRI α , hRII α und hRII β $n = 4$; hRI β $n = 2$.

3.3.5 Western Blot Analysen zum Nachweis der Expression der Fusionsproteine bei den BRET²-Messungen

Zur Überprüfung, ob die Überexpression der jeweiligen C- und R-Untereinheiten stattgefunden hat, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Dies soll hier beispielhaft für die Messungen von C1 mit der *Drosophila* R2 gezeigt werden. Die Zellen wurden dazu nach dem Auslesen in Lyse-Puffer 30 min schüttelnd lysiert und anschließend vereinigt, mit der entsprechenden Menge an Proteinauftragspuffer versetzt und auf ein Gel zur SDS-PAGE aufgetragen. Neben den Proben, die jeweils eine katalytische und eine regulatorische Untereinheit enthielten, wurden auch die Proben aufgetragen, die nur das unfusionierte Rluc enthielten, sowie als Negativkontrolle (NK) Proben, die von nicht transfizierten Zellen stammten. Für die Western Blot Analysen wurden immer zwei gleiche Membranen parallel hergestellt. Die eine wurde mit einem anti-GFP-Antikörper und die andere mit einem anti-Rluc-Antikörper behandelt. Mit dem anti-GFP-Antikörper war es möglich, die an GFP² fusionierten C-Untereinheiten und mit dem anti-Rluc-Antikörper die an Rluc fusionierten R-Untereinheiten nachzuweisen. In Abbildung 17 sind exemplarisch zwei entsprechende Exponate aufgeführt.

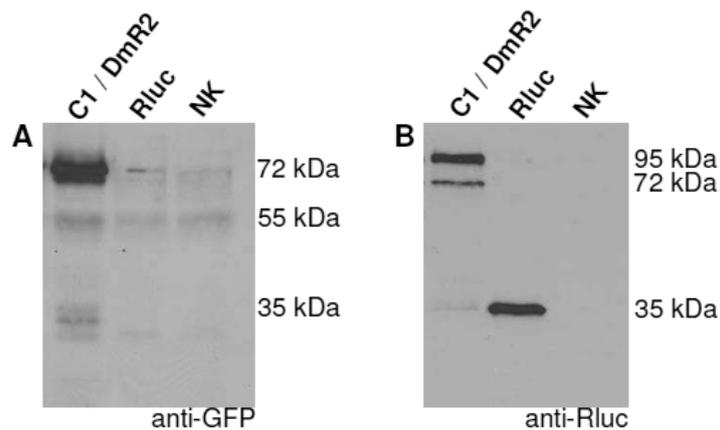


Abbildung 17: Nachweis der GFP²- und Rluc-Fusionsproteine mittels Western Blot. Autoradiogramme; Rluc = Lysat aus Zellen, die mit dem Leervektor pRluc-N2 transfiziert wurden; NK = Lysat aus nicht transfizierten Zellen. A: Nachweis der Fusion aus C1 (40,8 kDa) und GFP² (27 kDa) mit dem Erstantikörper Maus-anti-GFP und dem Zweitantikörper anti-Maus HRP. B: Nachweis der Fusion aus DmR2 (42,7 kDa) und Rluc (35 kDa) sowie der unfusionierten Rluc mit dem Erstantikörper Maus-anti-Rluc und dem Zweitantikörper anti-Maus HRP.

In A wurde GFP²-C1 nachgewiesen. Das Fusionsprotein hat ein nominelles Molekulargewicht von 67,8 kDa, läuft bei der SDS-PAGE allerdings auf einer Höhe von etwa 72 kDa. Bei den schwächeren Banden bei etwa 55 kDa und unterhalb von 35 kDa handelte es sich um Hintergrund. Sie traten auch in der Rluc-Spur sowie in der NK-Spur auf. Die Hybridisierung mit dem anti-Rluc-Antikörper führte zu keinem Hintergrund (Abb. 17 B). In der Rluc-Spur konnte das unfusionierte Rluc mit einem Molekulargewicht von 35 kDa nachgewiesen werden. In der Spur mit dem Fusionsprotein R2-Rluc sind drei Banden zu erkennen. R2-Rluc hat ein nominelles Molekulargewicht von 77,7 kDa. Die obere Bande bei ca. 95 kDa entsprach

wahrscheinlich dem Fusionsprotein. Die beiden niedrigeren Banden bei ca. 72 kDa und 35 kDa entsprachen Degradationsprodukten des Fusionsproteins, die nach wie vor Rluc enthielten. Die starke Abgrenzung der Banden weist darauf hin, dass die Fusionsprodukte bevorzugt an bestimmten Stellen gespalten wurden, so zum Beispiel zwischen der R-Untereinheit und Rluc, was zu der Bande bei 35 kDa in der C1 / DmR2-Spur in Abbildung 17 B führte.

3.4 Die katalytische Untereinheit PKA-C3

3.4.1 Für PKA-C3 existieren zwei hodenspezifische Transkripte

Für C3 sind bei FlyBase zwei Transkripte angegeben, die durch alternatives Splicing zu Proteinen mit unterschiedlichen N-Termini führen. Für die Auswahl der Primer wurde das Transkript *B* (Nomenklatur laut FlyBase, Januar 2010) genutzt, das auf einem Hoden-cDNA-Klon basiert.

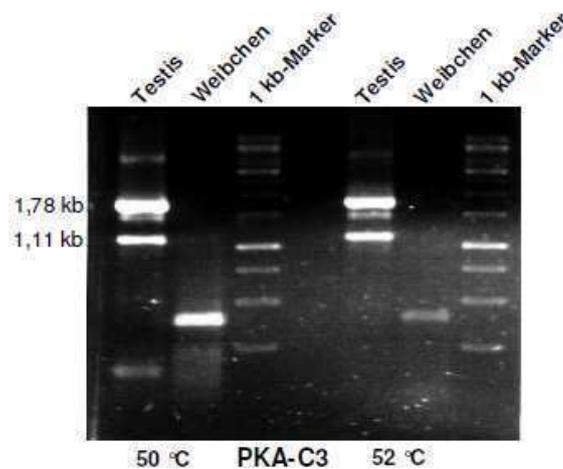


Abbildung 18: Darstellung der PCR-Produkte PKA-C3 auf einem 0,7% Agarose-Gel. Die RT-PCR für C3 wurde mit den Primern *C3-BRET-GFP5* und *C3-BRET-GFP3* zunächst bei einer Annealing-Temperatur von 50 °C und anschließend von 52 °C durchgeführt. Die nominelle Größe für C3-B beträgt 1783 bp, die für C3-B' 1111 bp.

Die RT-PCR ergab neben zwei spezifischen Produkten (ca. 1,8 kb und 1,1 kb in der Testis-Spur) einige unspezifische Produkte (z.B. bei ca. 4 kb und unter 250 bp in der Testis-Spur; bei ca. 400 bp in der Weibchen-Spur), die auf Fehlhybridisierungen der Primer zurückzuführen sind (Abb. 18). Durch Anheben der Annealing-Temperatur von 50 °C auf 52 °C konnten die beiden unspezifischen Produkte bei 4 kb und 400 bp vermindert werden. Die heterogenen Produkte unterhalb der 400 bp-Bande in der Weibchen-Spur waren ebenfalls stark reduziert. Die Bande unter 250 bp in der Testis-Spur war nicht mehr sichtbar. Die zwei spezifischen PCR-Produkte blieben in ihrer Konzentration dagegen unverändert. Das eine wies

eine Länge von etwa 1,8 kb auf und entsprach damit dem bei FlyBase beschriebenen Transkript *B*, dessen PCR-Produkt eine nominelle Länge von 1,78 kb aufweisen sollte. Da es nur durch die RT-PCR auf Hoden-mRNA entstand, handelt es sich um ein hodenspezifisches Transkript. Das zweite Produkt kam ebenfalls nur durch die RT-PCR auf Hoden-mRNA zustande und wies eine Länge von etwa 1,1 kb auf. Es stellte sich nun die Frage, ob dieses PCR-Produkt möglicherweise auf ein weiteres hodenspezifisches Transkript hinwies, das bisher nicht bei FlyBase beschrieben wurde. Beide Produkte wurden daraufhin in pGem-T kloniert und durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung miteinander verglichen. Daraus ging hervor, dass es sich bei dem kürzeren Transkript tatsächlich um eine C3-Isoform handelt, der im Vergleich zu *c3-B* das 672 bp-lange Exon 3 fehlt. Es wird nachfolgend als Transkript *c3-B'* bezeichnet. In Abbildung 19 ist die Organisation der drei *c3*-Transkripte aufgeführt.

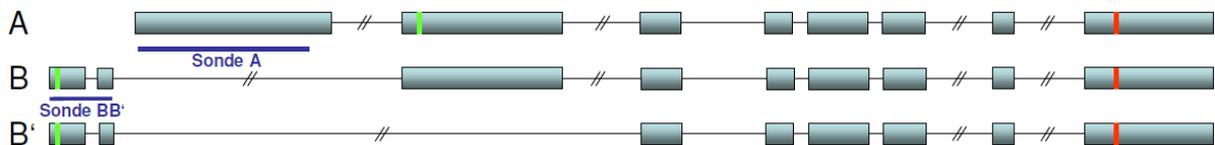


Abbildung 19: Graphische Übersicht über die Organisation der Introns und Exons des *pka-C3*-Gens in den verschiedenen Transkripten. A, B und B' sind die Bezeichnungen der Transkripte. Die grauen Balken stellen die Exons, die schwarzen Linien die Introns dar. Die grünen Markierungen kennzeichnen den Beginn und die roten Markierungen das Ende der jeweiligen Kodierregion. Die mit Sonde A und Sonde BB' bezeichneten blauen Linien zeigen die Längen der transkriptspezifischen Sonden und die Position ihrer Hybridisierung an.

3.4.2 Mit Northern-Analysen konnte mindestens eines der hodenspezifischen *c3*-Transkripte nachgewiesen werden

Die Northern-Hybridisierungen für C3 sollten zeigen, ob die Transkripte *B* und *B'* auch auf diesem Weg nachgewiesen werden können und ob sie tatsächlich hodenspezifisch sind. Die Sonde FG964 bindet an den gesamten kodierenden Bereich des Transkripts B. Da die drei Transkripte den 3'-Bereich des offenen Leserasters gemein haben, sollte die Sonde alle C3-Transkripte erkennen. Die Hybridisierung mit der C3 gesamt-Sonde führte zu mindestens zwei unterschiedlichen spezifischen Signalen (Abb. 20). Das größere Transkript (3,3 kb) könnte dem Transkript A entsprechen (2802 bp). Es befand sich nur in den Restkörpern von Männchen und Weibchen sowie in den Ovarien, nicht in den Testes. In den Testes war eine breitere Bande (2,3 kb) zu sehen, die sich nicht in den anderen drei Spuren zeigte. Es könnte sich dabei um die Transkripte *B* (2200 bp) oder *B'* (1528 bp) handeln. Auffällig ist die unterschiedliche Qualität der beiden Signale. Bei dem höheren Signal handelte es sich jeweils um eine klare Bande, wohingegen sich die Hybridisierung in der Testis-Spur über einen breiteren Bereich erstreckte.

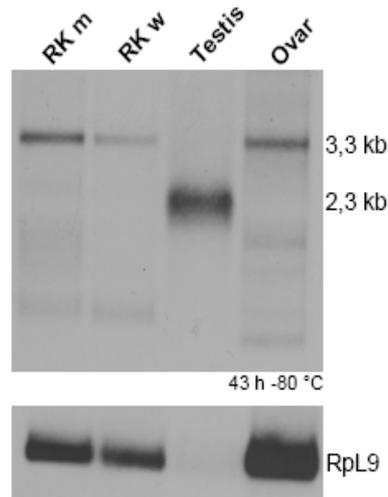


Abbildung 20: Northern-Hybridisierung mit der Sonde PKA-C3 gesamt (FG964). Das 1,78 kb-PCR-Produkt der RT-PCR aus 3.4.1 wurde in den Vektor pGem-T kloniert. Die Sequenz liegt in 77-Orientierung vor. Für die *in vitro*-Transkription wurde der Klon mit *NcoI* linearisiert und die *Sp6*-Polymerase verwendet. Die Hybridisierung wurde auf einer Membran mit mRNA aus den Restkörpern von Männchen (RK m) und Weibchen (RK w), sowie aus Testes und Ovarien durchgeführt. Die Exposition erfolgte für 43 h bei -80 °C. Als Ladekontrolle diente die Hybridisierung mit der Sonde Rpl9 (Schmidt *et al.*, 1996; linearisiert mit *SacII*).

Um die Signale genauer zuzuordnen zu können, wurden zwei neue Sonden hergestellt. Die eine erkannte spezifisch das Transkript *A* (Sonde C3-A) und die andere die Transkripte *B* und *B'* (Sonde C3-BB'; Abb. 19). Die Hybridisierung erfolgte auf Membranen, die jeweils die mRNA von Wildtyp-Männchen und -Weibchen enthielten. Für einen besseren Vergleich wurde die mRNA auf demselben Gel aufgetrennt und die Membran nach dem Blotting geteilt. Eine der Membranen wurde anschließend erneut mit der C3 gesamt-Sonde hybridisiert. Die zweite wurde mit der Sonde C3-A hybridisiert und die dritte mit der Sonde C3-BB'. Die Hybridisierung mit der C3 gesamt-Sonde reproduzierte das Ergebnis in Abbildung 20. Die Hybridisierung mit der spezifischen C3-A-Sonde führte zu zwei unterschiedlichen Signalen (Abb. 21 A). Das Exponat zeigte für beide Geschlechter eine Bande bei 3,5 kb und eine bei 0,8 kb. Das 3,5 kb-Transkript entsprach dem 3,3 kb-Transkript aus Abbildung 20. Bei dem kleineren Signal handelte es sich wahrscheinlich um eine Fehlhybridisierung der Sonde, da dieses Signal bei der vorangegangenen Hybridisierung mit der C3 gesamt-Sonde nicht auftrat (Abb. 20). Die Hybridisierung mit der spezifischen Sonde C3-BB' zeigte lediglich ein Signal im Männchen, das auf ein 2,6 kb-Transkript hinweist. Dies entsprach in seiner Größe dem 2,3 kb-Signal in der Testis-Spur in Abbildung 20. Die Bande in Abbildung 21 B sah allerdings weniger heterogen aus als die Bande in Abbildung 20. Eventuell wirkte die Bande hier weniger heterogen, weil es sich um eine schwächere Hybridisierung handelte. Es wäre auch möglich, dass die C3 gesamt-Sonde in Abbildung 20 unspezifisch an ein weiteres Transkript direkt unterhalb der C3-spezifischen Bande in der Testis-Spur gebunden hat und somit die Heterogenität verursachte. Eine dritte Möglichkeit wäre, dass die mRNA an sich in der Testis-Spur in Abbildung 20 degradiert war. Da die Ladekontrolle nur sehr schwach zu

sehen war, konnte mit ihrer Hilfe keine Aussage über die mRNA-Qualität gemacht werden. Die Größenunterschiede zwischen den verschiedenen Hybridisierungen kamen durch kleine Abweichungen in der Versuchsdurchführung und bei der Erstellung der Eichkurve zustande. Sie sind somit nicht weiter zu beachten. Die Hybridisierungen mit den spezifischen Sonden bestätigte die Identität der Signale. Das größere Transkript *A* wird in den Restkörpern von Männchen und Weibchen sowie in den Ovarien exprimiert und wenigstens eines der beiden kleineren Transkripte, *B* oder *B'*, wird testisspezifisch exprimiert.

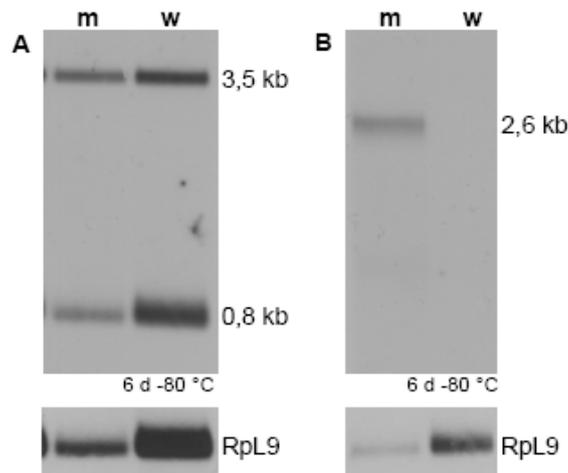


Abbildung 21: Northern-Hybridisierung zum spezifischen Nachweis der *c3*-Transkripte *A* (A; Sonden FG1179) sowie *B* und *B'* (B; FG1152). Zur Erzeugung der Sonden wurde jeweils eine PCR auf genomischer DNA durchgeführt und das Produkt in *Sp6*-Orientierung in pGem-T kloniert. Für eine *in vitro*-Transkription wurden die Klone mit *PstI* linearisiert. Die Transkription erfolgte jeweils mit der *T7*-RNA-Polymerase. Die Hybridisierung erfolgte auf Membranen mit mRNA aus Männchen (m) und Weibchen (w). Die Exposition erfolgte für 6 d bei -80 °C. Als Ladekontrolle diente die Hybridisierung mit der Sonde Rpl9 (Schmidt *et al.*, 1996; linearisiert mit *SacII*).

Um die Frage zu klären, ob es sich bei diesem um Transkript *B* oder *B'* handelte, wurde ein RNase H-Experiment durchgeführt. Die entsprechende Membran enthielt die mRNA von Wildtyp-Männchen und Weibchen, wobei die Proben als Kontrolle unbehandelt blieben. Eine weitere Wildtyp-Männchen-Probe wurde vor dem Auftrag auf das Formaldehyd-Gel mit einem oligo d(T)-Primer gemischt und einer RNase H-Behandlung unterzogen. Dies sollte zu dem Abbau der Poly(A)-Schwänze der mRNAs führen, so dass die beiden Transkripte *B* und *B'* unabhängig von möglichen extremen Polyadenylierungsunterschieden mit ihren tatsächlichen Längen von 2200 bp (*B*) und 1528 bp (*B'*) nach der Hybridisierung mit der C3 BB'-Sonde eindeutig zu identifizieren sein müssten.

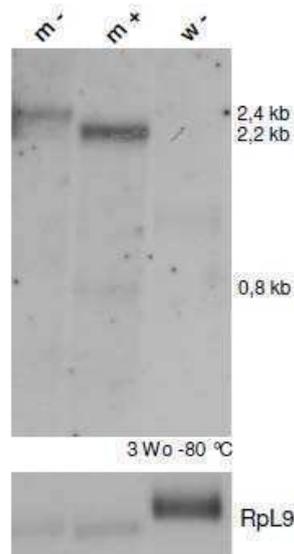


Abbildung 22: RNase H-Experiment zur Identifizierung der Transkripte *c3-B* und *c3-B'*. Die Membran enthielt die mit einem oligo d(T)-Primer und RNase H-behandelten mRNA von Männchen (m+), sowie die unbehandelte mRNA von Männchen (m-) und Weibchen (w-). Die Hybridisierung erfolgte mit der für die Transkripte *B* und *B'* spezifischen Sonde FG1152. Für eine *in vitro*-Transkription wurde die Sonde mit *Pst*I linearisiert. Die Transkription erfolgte mit der T7-RNA-Polymerase. Die Exposition erfolgte für 3 Wo bei -80 °C. Als Ladekontrolle diente die Hybridisierung mit der Sonde Rpl9 (Schmidt *et al.*, 1996; linearisiert mit *Sac*II).

In der Abbildung 22 ist das entsprechende Exponat aufgeführt. In der Spur mit der behandelten Männchen-mRNA (m+) waren zwei Banden zu erkennen. Bei der in der Abbildung höher gelegenen Bande handelte es sich wahrscheinlich um das 2,2 kb-lange *c3*-Transkript *B*. Es ist um etwa 200 bp kleiner als das Transkript, das in der Spur mit der unbehandelten Männchen-mRNA (m-) zu sehen ist. Letztere erschien erneut heterogen. Die wesentlich schwächere Bande bei etwa 0,8 kb konnte nicht zugeordnet werden. Das Transkript *B'*, das auf einer Höhe von etwa 1,5 kb laufen müsste, konnte hier nicht nachgewiesen werden. Da es mithilfe der RT-PCR auf Hoden-mDNA identifiziert wurde, kann das Ergebnis des RNase H-Experiments nur bedeuten, dass die Menge an *c3 B'*-mRNA so gering ist, dass es unter der Nachweisgrenze für Northern-Hybridisierungen liegt.

3.4.3 Die PKA-C3-Isoformen *B* und *B'* lokalisieren während der Spermatogenese in den Keimzellen

Für *C3* wurde wie zuvor für *R1* und *C1* ein *C3-GFP-Reporter*-Konstrukt hergestellt. Dazu wurde mit den Primern *C3-GFP-pro 5'* und *C3-GFP-pro 3'* der entsprechende Promotorbereich und die 5' UTR mit der *Taq*-Polymerase auf genomischer DNA amplifiziert. Das 3234-bp-lange Produkt wurde anschließend zunächst in den Vektor pGem-T und schließlich über die per PCR angefügten Schnittstellen *Xho*I und *Kpn*I in den P-Elementvektor pUASTgreen kloniert.

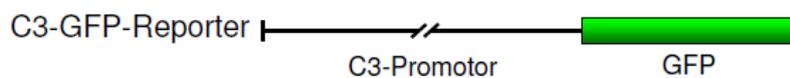
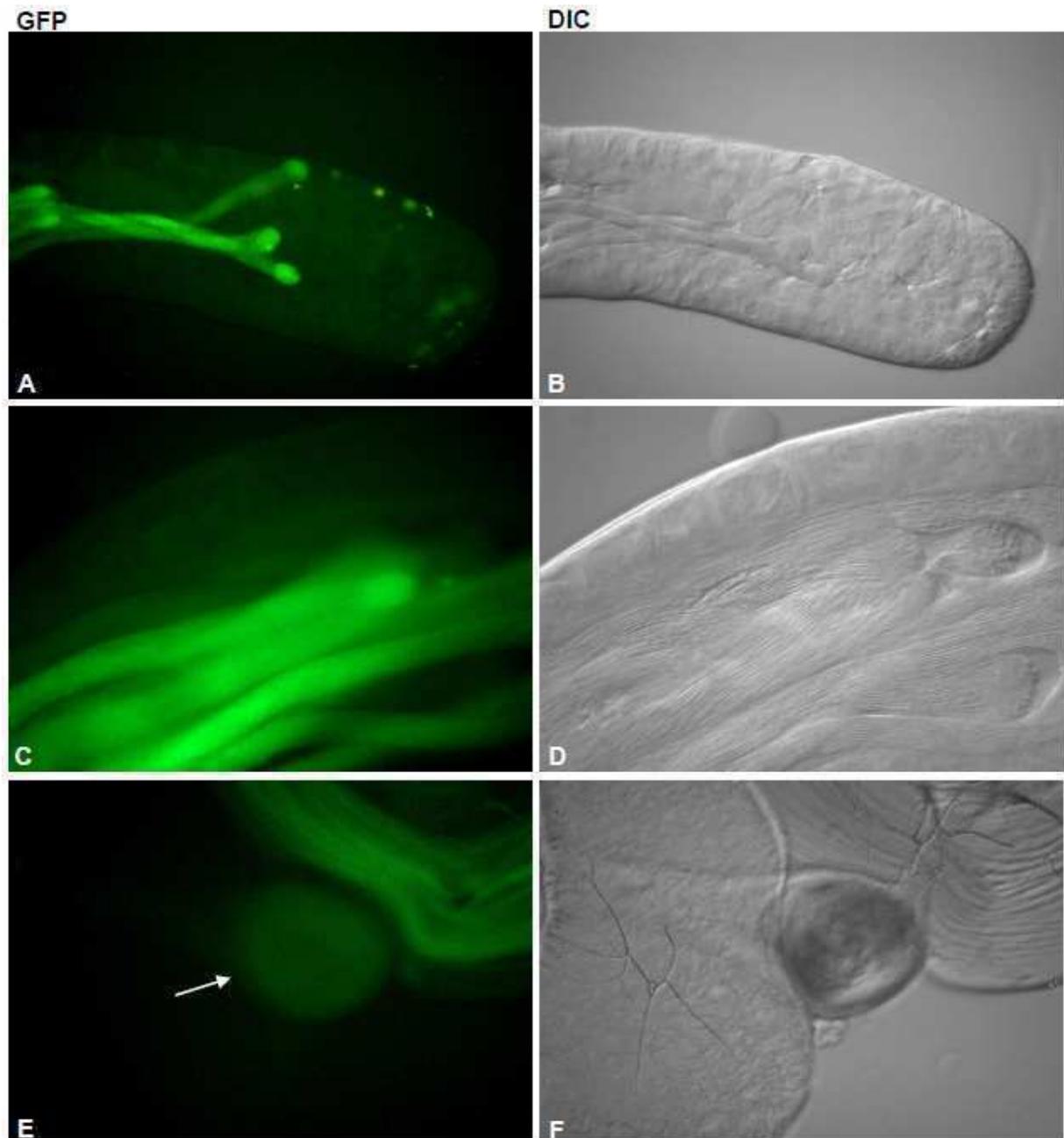


Abbildung 23: Fluoreszenz von GFP unter *pka-c3*-Promotorkontrolle. A und B: Hodenspitze mit GFP-Fluoreszenz in den Keimzellen. C und D: Mittlerer Teil eines Hodenschlauchs mit schwacher Fluoreszenz in den Spermatocyten und starker Fluoreszenz in den elongierten Spermatiden. E und F: Samenblase. Der Pfeil weist auf die fluoreszierenden reifen Spermien.

Die durch Keimbahntransformation erzeugten Linien waren leider homozygot letal. Die Hoden der heterozygoten *C3-GFP-Reporter*-Männchen zeigten eine schwache, gleichmäßig im Cytoplasma verteilte Fluoreszenz in den runden Stadien der Spermatogenese (Abb. 23 A). Die Intensität der Fluoreszenz in den elongierten Spermatiden war um ein Vielfaches stärker (Abb. 23 A und C). Die reifen Spermien in der Samenblase zeigten ebenfalls GFP-Fluoreszenz (Pfeil in Abb.23 E). Da die Fluoreszenz von dem GFP alleine stammt und nicht von ei-

nem Fusionsprotein, könnte diese Fluoreszenz auf das GFP-haltige Restcytoplasma in den reifen Spermien zurückzuführen sein.

Mit diesem Konstrukt konnte lediglich die *c3*-Promotor-Aktivität und nicht etwa die intrazelluläre Lokalisierung der beiden hodenspezifischen Isoformen C3 B und B' untersucht werden. Es wurden daher zusätzlich *GFP-C3 B*- und *GFP-C3 B'*-Konstrukte hergestellt. Diese führten zur Expression von Fusionsproteinen, bei denen das GFP jeweils an den N-Terminus der beiden katalytischen Untereinheiten fusioniert ist. Die Erzeugung eines Konstrukts zur C-terminalen Fusion des GFP an das Zielprotein ist an sich weniger aufwändig, als die eines Konstruktes zur N-terminalen Fusion, da hier der Vektor pUASTgreen genutzt werden kann, in den der geeignete Promotor, die 5' UTR und das Leseraster des zu untersuchenden Gens einkloniert werden. Diese Art der GFP-Konstrukte wurde für C2, C2-like und R2 genutzt (Gustke, 2006). Bei einer C-terminalen Fusion ist es allerdings möglich, dass die korrekte intrazelluläre Lokalisierung durch die Fusion des GFP an den C-Terminus der katalytischen Untereinheit gestört wird. Hinweise, dass die Fusionsstelle Einfluss auf das Verhalten der katalytischen Untereinheit hat, ergaben sich aus den BRET²-Analysen, die in Prinz *et al.* (2006b) zusammengefasst wurden. Daher wurden hier die N-terminalen Fusionen *GFP-C3 B* und *GFP-C3 B'* hergestellt. Dabei lag das Gen für GFP zwischen dem Promotorbereich mit der 5' UTR und dem offenen Leseraster der entsprechenden Untereinheit. Als P-Element-Vektor diente hier pCaSpeR 2.

Für die Klonierung des *GFP-C3 B*-Konstrukts wurde zunächst das *egfp*-Gen mit den Primern *EGFP forw* und *eGFP 3' C3 C2* amplifiziert, wobei die Schnittstellen für *Bgl*II (5') und *Xho*I (3') angefügt wurden. Die PCR wurde mit der *Pfu*-Polymerase auf dem Vektor pUASTgreen durchgeführt. Das Produkt wurde in *Sp6*-Orientierung in pGem-T kloniert und anschließend über die Schnittstellen für *Pst*I und *Xho*I in pBluescript KS (-) gebracht. Der 603bp-lange Promotorbereich von C3 wurde mit der *Taq*-Polymerase und den Primern *C3 pro short 5'* und *C3 pro short 3'* auf genomischer DNA amplifiziert. Das Produkt wurde in pGem-T kloniert und anschließend über die durch die PCR angehängten Schnittstellen für *Pst*I (5') und *Bgl*II (3') vor das eGFP in pBluescript KS (-) ligiert. Das offene Leseraster von *c3 B* lag bereits als cDNA in dem BRET²-Vektor pGFP-C1 vor. Es wurde über *Xho*I und *Apa*I aus diesem ausgeschnitten und hinter das eGFP in pBluescript KS (-) kloniert. Das gesamte Konstrukt wurde anschließend über *Pst*I und *Sac*II in pCaSpeR2 gebracht. Nach erfolgreicher Keimbahntransformation und Etablierung einiger stabiler Fliegenlinien wurden die Hoden transgener Männchen präpariert und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Leider war die Fluoreszenz auch bei Hoden homozygoter Männchen so schwach, dass sie nicht dokumentiert werden konnte. Es wurden Kreuzungen durchgeführt, die zu Männchen führen sollten, wel-

che für zwei Integrationen des Transgens homozygot sind. Da die Integration einer der beiden Ausgangslinien allerdings homozygot letal war, konnten nur Männchen erzeugt werden, die drei Kopien des Transgens enthielten. Die Aufnahmen in Abbildung 24 stammen von einem Hoden dieser Männchen.

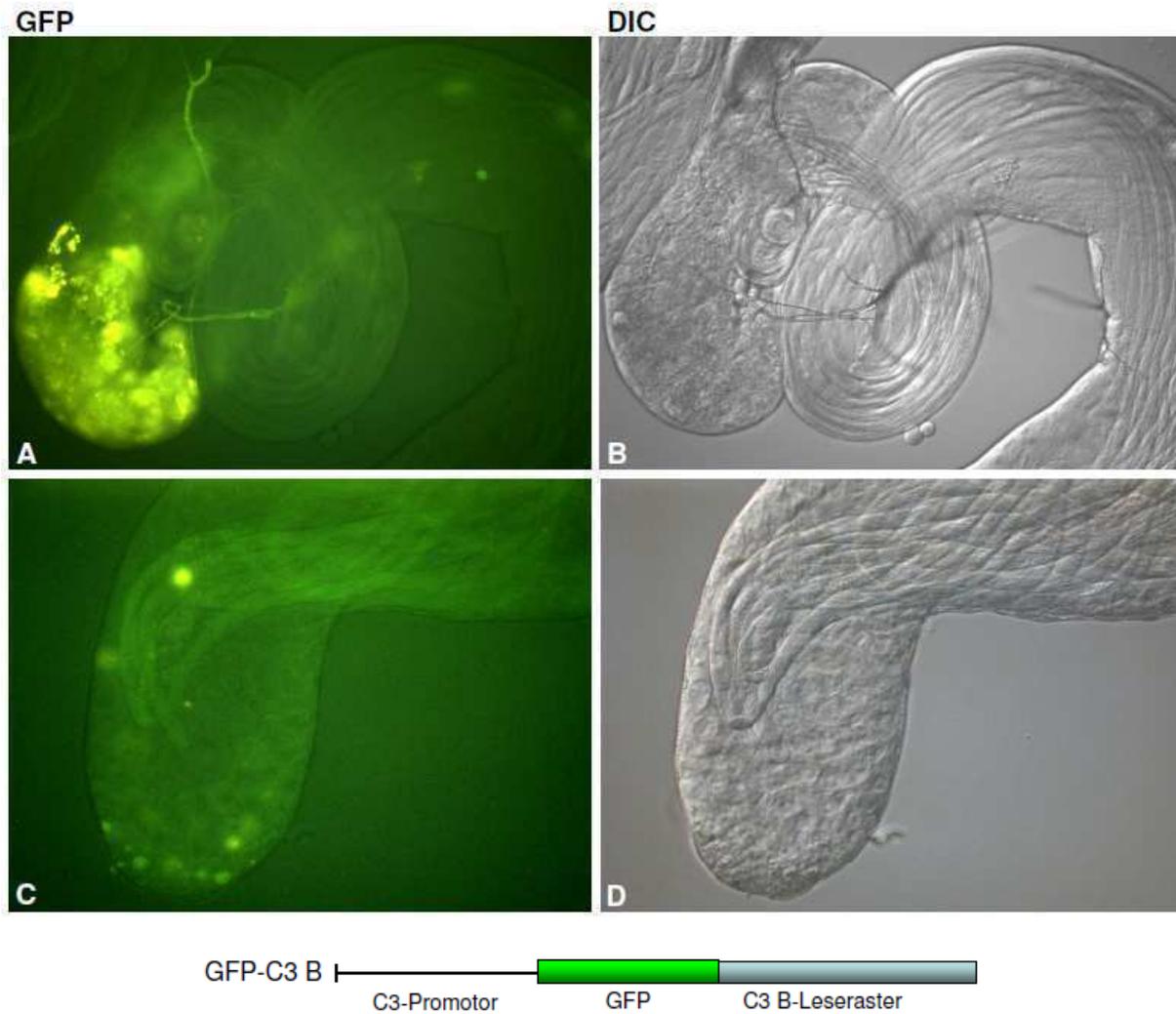


Abbildung 24: Fluoreszenz des GFP-C3 B-Fusionsproteins. A und B: terminale Region des Hodenschlauchs mit schwacher Fluoreszenz in den elongierten Spermatiden. C und D: Hodenspitze mit Fluoreszenz in den frühen Spermatogenese-Stadien und elongierten Spermatiden.

In den Abbildungen 24 A und B ist das basale Ende eines Hodenschlauchs zu erkennen, in dem sich hauptsächlich elongierte Spermatiden befinden. Die entsprechende Aufnahme der Fluoreszenz zeigt, dass diese elongierten Spermatiden schwach leuchteten. Bei der auffälligen eher gelblichen Fluoreszenz rechts im Bild 24 A handelt es sich um Eigenfluoreszenz von degradierenden Strukturen in der Region des Terminalepithels, wie sie in älteren Männchen häufig zu finden sind. Die Abbildungen 24 C und D zeigen die Spitze eines Hodenschlauchs. Die Fluoreszenz erschien hier in den frühen runden Stadien der Spermatogenese – den Spermatogonien und den Spermatozyten – sowie etwas stärker in den elongierten Spermatiden. Die Ursache der wesentlich schwächeren Fluoreszenz des GFP-C3 B-Fu-

sionsproteins im Vergleich zu dem *C3-GFP-Reporter*-Konstrukt könnte zum einen in der wesentlich kürzeren Promotorregion liegen, die für dieses Konstrukt verwendet wurde, und zum anderen an den Eigenschaften des Fusionsproteins selbst. Die Promotorregion wurde hier kürzer gewählt, weil bekannt ist, dass zumindest spermatogesespezifische Promotoren relativ kurz sind (zusammengefasst in White-Cooper, 2010) und eine kürzere Promotorregion auch aus klonierungstechnischen Gründen günstiger war. Die Erfahrungen mit den R2-GFP einmal unter Kontrolle einer 1 kb-langen Promotorsequenz und einmal unter Kontrolle einer 3 kb-langen Promotorbereichs zeigten, dass die Länge des für das Konstrukt verwendeten Promotorbereichs durchaus Einfluss auf das Expressionsmuster hat. Dementsprechend könnten auch hier die schwächere Fluoreszenz auf den Verlust von regulatorischen Elementen zurückzuführen sein.

Auch für die Klonierung des *GFP-C3 B'*-Konstrukts wurde das *egfp*-Gen mit den angehängten Schnittstellen für *Bgl*II (5') und *Xho*I (3') verwendet. Es wurde über *Pst*I und *Sac*II in pBluescript KS(-) ligiert. Der C3-Promotorbereich wurde, wie bereits oben beschrieben, über *Pst*I und *Bgl*II vor das eGFP kloniert. *C3 B'* lag als cDNA in dem BRET²-Vektor pGFP²-C3 vor. Es wurde über *Sac*II und *Sac*I ausgeschnitten und hinter das eGFP in pBluescript KS(-) kloniert. Anschließend wurde das gesamte Konstrukt über *Pst*I in pCaSpeR2 ligiert.

Der Hoden eines Männchens mit dem *GFP-C3 B'*-Transgen ist in Abbildung 25 dargestellt. Die Abbildungen 25 A und B zeigen eine Übersicht des apikalen Teils des Hodenschlauchs. Die Fluoreszenz von *GFP-C3 B'* war in allen Stadien der Spermatogenese gut zu erkennen. Die Konzentration des Fusionsproteins war im Bereich der Spermatogonien und in den elongierten Spermatischen am höchsten. Dazwischen war die Fluoreszenz drastisch reduziert. In Abbildungen 25 C und D ist eine Hodenspitze gezeigt. Es ist zu erkennen, dass sich die hohe Konzentration des Fusionsproteins auf nur wenige Spermatogonienzyklen beschränkt. Auch die Fluoreszenz in den elongierten Spermatischen zeigte nicht die gleiche Intensität in allen Keimzellen dieses Stadiums. Sie war in den dickeren Bündeln, in denen die Spermatischen noch nicht individualisiert worden sind, wesentlich stärker als in den dünneren Bündeln, die auf eine abgeschlossene Individualisierung hinweisen (Abb. 25 A und E). In der Abbildung 25 E ist neben der terminalen Region des Hodenschlauchs auch die mit Spermien angefüllte Samenblase gezeigt (Pfeil). Die Spermien zeigten nur eine schwache Fluoreszenz. Bei der gelblich-grünlichen Fluoreszenz in Abbildung 25 E handelt es sich, wie auch schon für Abbildung 24 A beschrieben, um die Eigenfluoreszenz degradierender Strukturen. Auch hier ist im Großen und Ganzen die Fluoreszenz schwächer als bei dem *C3-GFP-Reporter*-Konstrukt.



Abbildung 25: Fluoreszenz des GFP-C3 B'-Fusionsproteins. A und B: Übersicht über den apikalen Teil eines Hodenschlauchs mit Fluoreszenz des Fusionsproteins in allen Keimzellen. C und D: Vergrößerung einer Hodenspitze mit intensiver Fluoreszenz in den Spermatogonien. E und F: basale Region und Samenblase des Hodenschlauchs (Pfeil) mit starker Fluoreszenz in den elongierten Spermatiden. Die reifen Spermien zeigen keine Fluoreszenz.

3.4.4 C3 as-Mutanten zeigen keinen Defekt in der Spermatogenese

Zur Erzeugung eines mutanten Phänotyps wurden für *PKA-C3 as*- und *RNAi*-Konstrukte hergestellt, die zu einer Reduktion der entsprechenden endogenen Transkripte und damit zur Reduktion der Proteinlevel der beiden Isoformen C3 B und C3 B' führen sollten. Das *C3 as*-Konstrukt basierte auf der Northern-Sonde, die selektiv die hodenspezifischen Transkripte *B* und *B'* erkennt. Die entsprechende *C3*-Sequenz lag in *Sp6*-Orientierung in dem Vektor pGem-T vor. Für das Antisense Konstrukt musste sie über die Schnittstellen für *Apal* und *SpeI* in den Zwischenvektor pBluescript KS (-) kloniert werden, um dann gerichtet über die Schnittstellen für *KpnI* und *XbaI* aus der *MCS* des Zwischenvektors in den TEV^{TCE} ligiert werden zu können. Es konnten sieben transgene Linien etabliert werden. Die homozygoten Männchen aus diesen Linien zeigten keinen Effekt auf die Spermatogenese. Um die Wirkung des Antisense zu erhöhen und somit doch noch einen Phänotyp hervorzurufen, wurde die Konzentration der Antisense-mRNA erhöht. Dazu wurden die Linien *C3 as 2.11* und *13.2* so miteinander gekreuzt, dass Tiere entstanden, die für beide Integrationen homozygot waren. Aber auch die Männchen aus dieser Kreuzung waren fertil. Die Überprüfung der Effizienz des Antisensekonstrukts erfolgte per Northern-Hybridisierung. Die Membranen enthielten die mRNA von Männchen der Linien *C3 as 2.11*, *2.12*, *12.1*, *12.3*, *13.1*, *13.2* und *13.4* sowie von Wildtyp-Männchen. Die entsprechenden Membranen sind in Abbildung 26 dargestellt.

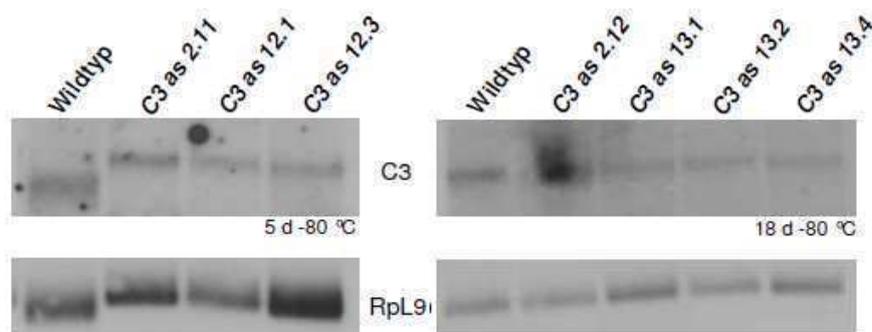


Abbildung 26: Northern-Hybridisierung mit der Sonde FG1152 (C3-BB') zur Überprüfung der Effizienz des C3 as-Konstrukts. Die für die *in vitro*-Transkription erforderliche Linearisierung von FG1152 erfolgte mit *PstI*. Zur Transkription wurde die *T7*-RNA-Polymerase verwendet. Die Hybridisierung erfolgte auf einer Membran mit der mRNA von homozygoten Männchen der unterschiedlichen *C3 as*-Linien. Die Exposition erfolgte für 5 d bzw. 18 d bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Als Ladekontrolle diente die Hybridisierung mit der Sonde RpL9 (Schmidt *et al.*, 1996; mit *SacII* linearisiert).

Bei der Bande in der jeweiligen Wildtyp-Spur handelte es sich um das hodenspezifische Transkript *B*. Dieses war auch in den transgenen Linien nachweisbar. Betrachtet man die Signalstärke im Vergleich zu der Ladekontrolle, wird deutlich, dass das Transkript in den mutanten Linien leicht reduziert war. Dies reichte jedoch nicht aus, um den korrekten Ablauf der Spermatogenese zu stören.

Auch das *C3 RNAi*-Konstrukt basierte auf der für die *c3*-Transkripte *B* und *B'* spezifischen Northern-Sonde. Da diese in *Sp6*-Orientierung in dem Vektor pGem-T vorlag, konnte die bereits für das *R2 RNAi*-Konstrukt beschriebene Klonierungsstrategie angewendet werden (siehe 3.2.2). Nach erfolgter Keimbahntransformation konnten 5 transgene *C3 RNAi*-Linien etabliert werden. Die homozygoten Männchen wurden auf ihre Fertilität hin überprüft. Sie zeigten ebenfalls keinen mutanten Phänotyp. Auch hier wurde die Effizienz des Konstrukts mithilfe einer Northern-Hybridisierung überprüft und wie schon zuvor bei den *C3 as*-Linien konnte für die transgenen Linien *C3 RNAi 1.1*, *1.2*, *3.12*, *3.2* und *3.3* nur eine leichte Reduktion des Transkripts *B* nachgewiesen werden (Abbildung 27). Während im Wildtyp die Bande des *c3*-Transkripts stärker hybridisiert hat als die Kontrolle Rpl9, war dies bei den RNAi-Linien – bis auf *C3 RNAi 3.2* – nicht der Fall. In der Linie *C3 RNAi 3.3* war die Bande des *c3*-Transkripts sogar schwächer.

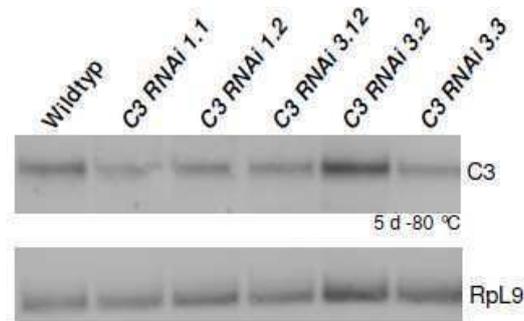


Abbildung 27: Northern-Hybridisierung mit der Sonde FG1152 (C3-BB') zur Überprüfung der Effizienz des C3 RNAi-Konstrukts. Für die *in vitro*-Transkription wurde FG1152 mit *Pst*I linearisiert. Für die Transkription wurde die T7-RNA-Polymerase verwendet. Die Hybridisierung erfolgte auf einer Membran mit der mRNA von Männchen, die homozygot für das *C3 RNAi*-Transgen waren sowie von Wildtyp-Männchen. Die Exposition erfolgte für 5 d bei -80°C . Als Ladekontrolle diente die Hybridisierung mit der Sonde Rpl9 (Schmidt *et al.*, 1996; mit *Sac*II linearisiert).

3.4.5 Die verkürzte Form von PKA-C3 B ist wahrscheinlich in der Lage, sowohl mit PKA-R1 als auch –R2 zu interagieren

Im folgenden Abschnitt werden die BRET-Analysen für PKA-C3 erläutert. Für die Messungen wurde C3 B mithilfe von *Xho*I und *Hind*III in den Vektor pGFP²-C1 und C3 B' mithilfe von *Sac*I und *Hind*III in den Vektor pGFP-C3 kloniert. In Abbildung 28 (links) sind die Ergebnisse der Messungen von der Isoform C3 B mit den *Drosophila*-R-Untereinheiten zusammengefasst. Es kam weder mit der einen noch mit der anderen R-Untereinheit zu einer Interaktion. Für R2 stieg das Signal zwar signifikant über den Hintergrund (DmR2 -), allerdings ließ sich C3 B unter cAMP-Überschuss nicht aus diesem Komplex lösen (DmR2 +) und war dementsprechend nicht aktivierbar. Dass in diesem Fall keine Interaktion nachgewiesen werden konnte, könnte an der Größe von C3 B liegen. Sie ist mit 65,4 kDa um etwa 25 kDa größer

als PKA-C1. So wäre es möglich, dass selbst, wenn C3 B mit R1 oder R2 interagiert, der Abstand zwischen aktiviertem Rluc und GFP² für einen Energietransfer zu groß ist. Mandy Diskar hat daher ein GFP²-Δ C3 B-Konstrukt erzeugt. In dem Fusionsprotein fehlen die ersten 277 Aminosäuren von C3 B (Diskar *et al.*, 2010).

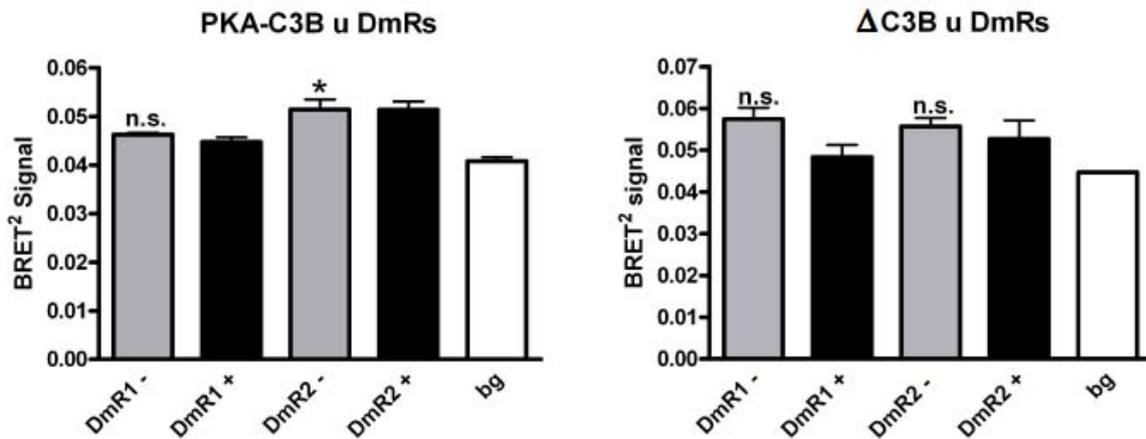


Abb. 28: Darstellung der Ergebnisse aus den BRET²-Messungen für PKA-C3B und der verkürzten Version Δ PKA-C3B mit den regulatorischen Untereinheiten aus *Drosophila* (DmRs). Analog zu Abbildung 16. Signifikanzen: ein Stern = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant. Wiederholungen: für C3B und Δ C3B mit DmR1 und DmR2 $n = 2$.

Abbildung 28 (rechts) zeigt die graphische Darstellung der Messungen mit R1 und R2. Die BRET²-Signale für die Messungen unter physiologischen Bedingungen waren nicht signifikant über dem Hintergrund (DmR1 - und DmR2 -). Dennoch konnte eine Reduktion der Signale bei cAMP-Überschuss beobachtet werden (DmR1 + und DmR2 +). Demnach wäre es möglich, dass C3 B in einem geringen Ausmaß in der Lage ist, sowohl an R1 als auch an R2 zu binden. Der jeweilige Komplex ließ sich für R1 zu 72 % und für R2 zu 31,8 % lösen.

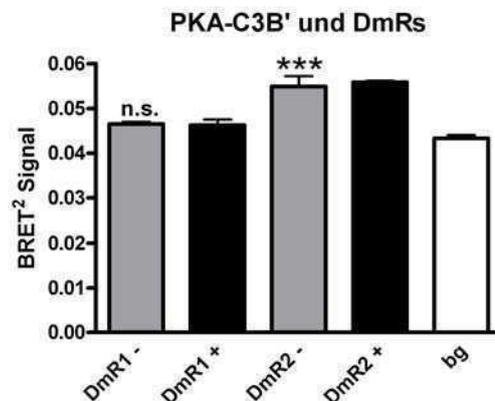


Abb. 29: Darstellung der Ergebnisse aus den BRET²-Messungen für PKA-C3B' mit den regulatorischen Untereinheiten aus *Drosophila* (DmRs). Analog zu Abbildung 16. Signifikanzen: drei Sterne $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant. Wiederholungen: DmR1 und DmR2 $n = 3$.

Die Messungen für die Interaktion der Isoform C3 B' mit R1 und R2 sind in der Abbildung 29 graphisch dargestellt. C3 B' war nicht in der Lage, mit R1 zu interagieren (DmR1 - und DmR1 +). Das BRET²-Signal für die Messungen mit R2 war dagegen signifikant über dem Hintergrund (DmR2 -). Allerdings reagierte der Komplex nicht auf den erhöhten cAMP-Level und somit konnte keine Aktivierung der katalytischen Untereinheit stattfinden (DmR2 +). Es ist daher zweifelhaft, ob C3 B' und R2 *in vivo* einen funktionellen PKA-Komplex ausbilden könnten.

3.5 Die katalytische Untereinheit PKA-C2

3.5.1 GFP-PKA-C2 zeigt ein anderes Expressionsmuster als PKA-C2-GFP

Bei dem für die katalytische Untereinheit C2 in Gustke (2006) bereits erzeugten Fusionskonstrukt handelte es sich um eine C-terminale Fusion des GFP an das Zielprotein. Die Fluoreszenz des als C2-GFP benannten Fusionsproteins erschien ab dem Stadium der Spermato gonien während der gesamten Spermatogenese (Abb. 30 A). Sie erschien weitestgehend cytoplasmatisch. Ihre Intensität nahm in den Spermatozyten leicht zu. C2-GFP wurde während der Individualisierung teilweise abgestreift, was an der höheren Intensität der Fluoreszenz im Bereich der *waste bags* zu erkennen war (Pfeil in Abb. 30 A). Die Spermien in der Samenblase zeigten ebenfalls Fluoreszenz (Pfeil in Abb. 30 C).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein zweites Konstrukt hergestellt, das zur Fusion des GFP an den N-Terminus von C2 (GFP-C2) führte. Damit sollte geprüft werden, ob die cytoplasmatische Lokalisierung von C2-GFP darauf zurückgeht, dass das GFP die tatsächliche intrazelluläre Lokalisierung stört oder ob sie der Lokalisierung des endogenen C2 entspricht. Das für dieses Konstrukt verwendete *egfp*-Gen entsprach dem der *GFP-C3 B-* und *GFP-C3 B'*-Konstrukte. Der etwa 1 kb-lange Promotorbereich wurde mithilfe der *Taq*-Polymerase und den Primern *C2 pro 5'* und *C2 pro 3'* auf genomischer DNA amplifiziert und in pGem-T kloniert. Anschließend wurde er über *NotI* und *BglII*, die durch die PCR an das Produkt angehängt wurden, vor das eGFP in pBluescript KS (-) kloniert. Das offene Leseraster wurde mit den Primern *C2 ORF 5'* und *C2 ORF 3'* und der *Pfu*-Polymerase auf Hoden-cDNA amplifiziert. Durch die PCR wurden die Schnittstellen für *XhoI* (5') und *EcoRI* (3') an das Produkt angefügt. Es wurde in *Sp6*-Orientierung in pGem-T kloniert. Nach Überprüfung der Sequenz wurde das offene Leseraster mithilfe von *XhoI* und *Apal* hinter das eGFP in den Vektor pBluescript KS (-) kloniert. Das gesamte Konstrukt wurde dann über *NotI* und *EcoRI* in pCaSpeR2 gebracht. Nach erfolgreicher Keimbahntransformation wurden elf Linien etabliert.

Die Hoden homozygoter Männchen wurden auf ihre Fluoreszenz hin untersucht. Sie war zu schwach, um sie zu dokumentieren. So wurden, wie zuvor auch schon für das *C2-GFP*-Fusionskonstrukt, Fliegen erzeugt, die jeweils homozygot für zwei Integrationen des *GFP-C2*-Transgens waren.

Die Verteilung der Fluoreszenz von GFP-C2 in den Hoden der entsprechenden Männchen ist in den Abbildungen 30 E und G dargestellt. Die Fluoreszenz war im Vergleich zu der Fluoreszenz des C2-GFP-Fusionsproteins wesentlich schwächer (Abb. 30 E verglichen mit A). In den runden Spermatogenese-Stadien konnte gar keine Fluoreszenz ausgemacht werden, was daran gelegen haben könnte, dass entweder die GFP-Fluoreszenz aufgrund einer geringen Expression nicht nachweisbar war oder dass der Einschub des *egfp*-Gens zwischen der 5' UTR und dem offenen Leseraster des *c2*-Gens zu einer Störung der korrekten Expression des Fusionsproteins führte. Eine mögliche intrazelluläre Lokalisierung war dementsprechend mit diesem Konstrukt nicht nachweisbar. In den elongierten Spermatiden war gleichmäßig verteilte GFP-C2-Fluoreszenz zu erkennen. An den in der Hodenspitze liegenden Enden der elongierten Spermatiden, an denen sich die *waste bags* ausbilden, hatte die Fluoreszenz die gleiche Intensität wie in den restlichen elongierten Spermatiden (Pfeil in Abb. 30 E). Das deutete darauf hin, dass der größte Anteil an GFP-C2 in den reifen Spermien verbleibt. Die Aufnahme einer Samenblase zeigte, dass die Spermien der *GFP-C2*-transgenen Männchen wesentlich stärker fluoreszieren als die der *C2-GFP*-transgenen Männchen (Pfeile in Abb. 30 G und C). Dies weist darauf hin, dass C2 eine Funktion in den reifen Spermien besitzen könnte.

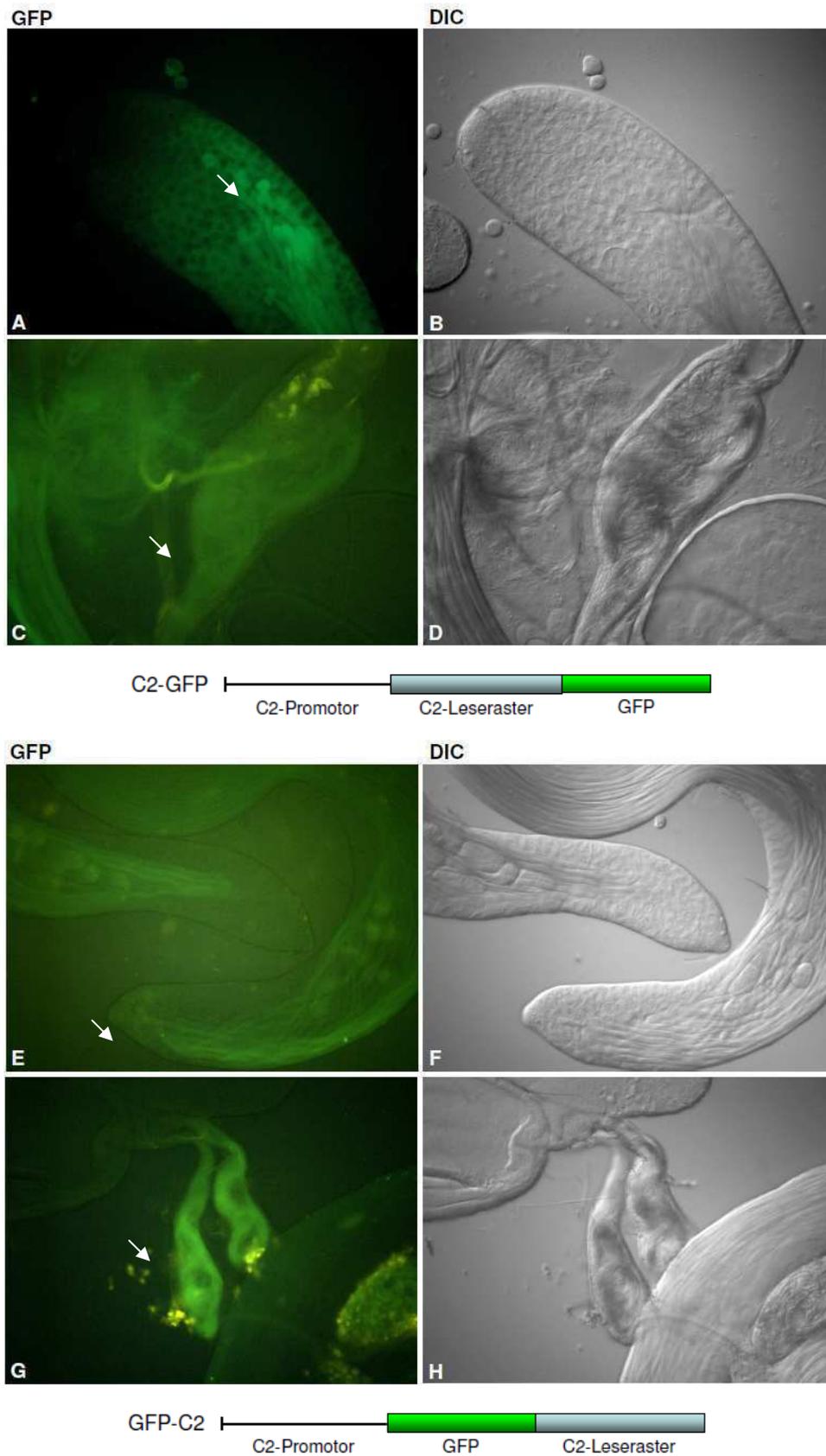


Abbildung 30: Fluoreszenz von C2-GFP(A - D) und GFP-C2 (E - F) im *Drosophila*-Hoden. A und B: Hodenschlauchspitze mit Fluoreszenz in allen Spermatogenese-Stadien ab den Spermatogonien. Pfeil in A weist auf einen *waste bag*. C und D: Samenblase mit fluoreszierenden Spermien. Pfeil in C weist auf die Samenblase. E und F: apikale Enden zweier Hodenschläuche mit Fluoreszenz in den elongierten Spermatischen. Pfeil in E weist auf einen *waste bag*. G und H: zwei Samenblasen mit fluoreszierenden Spermien. Pfeil in G weist auf eine Samenblase.

3.5.2 C2-Mutanten zeigen keinen Phänotyp

Das erste Antisense-Konstrukt wurde bereits in Gustke (2006) beschrieben. Es deckt das gesamte Leseraster der *pka-c2*-mRNA ab. Bei der in der oben genannten Arbeit erzeugten Fliegenlinie erfolgte die Integration auf dem X-Chromosom. Acht von zehn getesteten Männchen zeigten Sterilität. Die Hodenmorphologie und die verschiedenen Stadien der Spermatogenese erschienen allerdings wie beim Wildtyp. Um diesen Effekt eindeutig auf die Reduktion der endogenen *c2*-mRNA zurückzuführen, wurden weitere transgene Linien mit diesem Konstrukt erzeugt. Es konnten 13 Linien etabliert werden, deren homozygote Männchen anschließend auf ihre Fertilität hin überprüft wurden. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse dieser Fertilitätstests zusammengefasst. Zunächst wurden jeweils drei Tests durchgeführt. Zeigte sich bei einem oder mehreren Männchen Sterilität wurden bis zu sieben weitere Tests angesetzt.

Tabelle 2: Fertilitätstests für die C2 as-Linien

C2 as -Linie	Anteil fertiler ♂
3.1	9 von 10
3.2	7 von 8
6.1	0 von 10
6.4	3 von 3
8.3	0 von 10
8.6	8 von 10
9.1	3 von 3
13.1	8 von 9
19.2	3 von 3
21.2	7 von 10
32.1	3 von 3
32.2	9 von 10
32.3	3 von 3

Bei elf der 13 C2 as-Linien zeigte sich keine nennenswerte Sterilität. Dass wenige Männchen keine Nachkommen erzeugen können, kommt in dem Umfang auch beim Wildtyp vor. Von den Linien C2 as 6.1 und 8.3 war jedoch keines der Männchen fertil. Als Nachweis, dass der Effekt von einer Reduktion der endogenen mRNA stammt und nicht durch die Integration in eine für die männliche Fertilität wichtige Region des Genoms entstanden ist, wurden transheterozygote Tiere erzeugt. Bei der Linie 6.1 liegt das Konstrukt auf dem zweiten Chromosom

und bei der Linie 8.3 auf dem dritten. Sie wurden nach dem folgenden Schema gekreuzt, wobei die Geschlechtschromosomen nicht mit einbezogen wurden und + für ein Wildtyp-Chromosom steht.

$6.1 / Cy ; + / + \quad \times \quad + / + ; 8.3 / Sb$

F1: $6.1 / + ; 8.3 / +$
 $6.1 / + ; + / Sb$
 $+ / Cy ; 8.3 / +$
 $+ / Cy ; + / Sb$

Die Nachkommen, die keines der beiden Balancer-Chromosomen (erkennbar an den Markern *Cy* oder *Sb*) tragen, sind sowohl für 6.1 als auch 8.3 heterozygot. Sie sollten dementsprechend eine ähnlich hohe Dosis an Antisense-RNA produzieren, wie die homozygoten Männchen der beiden Ausgangslinien. Durch Fertilitätstests wurde ermittelt, dass die männlichen Nachkommen fertil sind. Das heißt, dass die Sterilität der homozygoten Männchen der Ausgangslinien nicht durch die Wirkung des Antisense-Konstrukts auf die endogene *c2*-mRNA sondern durch den Integrationsort des Konstrukts hervorgerufen wurde. Auch Männchen, die für die beiden Integrationen 3.1 und 13.1 homozygot waren, zeigten keine Sterilität.

Wie zuvor für R2 wurde auch für C2 ein zweites verkürztes Antisense-Konstrukt hergestellt, um möglicherweise die *c2*-mRNA weiter zu reduzieren. Ausgehend von der Northern-Sonde TM468 wurde ein weiteres Antisense-Konstrukt, *C2 as short*, erstellt, welches an die letzten 121 nt des ersten Exons, das gesamte zweite Exon und die ersten 122 nt des dritten Exons bindet. Die Sonde wurde von Tim Meyer (TM) erzeugt. Sie liegt in *Sp6*-Orientierung im Vektor pGem-T vor. Für das Antisense-Konstrukt wurde sie über die Schnittstellen für *Apal* und *Sall* in den TEV^{TCE} kloniert. Durch Keimbahntransformation mit dem *C2 as short*-Konstrukt konnten zwei Linien erzeugt werden. Die homozygoten Männchen dieser beiden Linien wurden auf ihre Fertilität hin untersucht. Sie zeigten keinen mutanten Phänotyp, der auf eine Störung der Spermatogenese hinweisen könnte.

Die Effizienz der Antisense-Konstrukte wurde mithilfe von Northern-Analysen überprüft. Es wurde eine Membran mit der mRNA von Wildtyp-Männchen, sowie von Männchen der Linien *C2 as 6.1*, *8.3*, *3.1* und *13.1* benutzt. Eine weitere Membran enthält ebenfalls die mRNA von Wildtyp-Männchen und dazu die von Männchen der beiden Linien *C2 as short 1.1* und *2.1*. Nachgewiesen wurde die endogene *c2*-mRNA. In Abbildung 31 A und B sind die entsprechenden Autoradiogramme zu sehen.

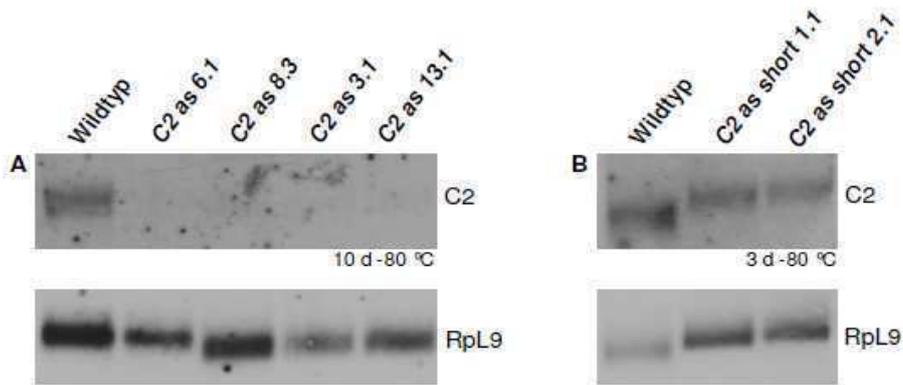


Abbildung 31: Northern-Hybridisierung mit der Sonde TM468 (PKA-C2) zur Überprüfung der Effizienz der Konstrukte *C2 as* (A) und *C2 as short* (B). Die für die *in vitro*-Transkription erforderliche Linearisierung von TM468 erfolgte mit *Sall*. Zur Transkription wurde die T7-RNA-Polymerase verwendet. Die Hybridisierungen wurden auf Membranen mit der mRNA von homozygoten Männchen der unterschiedlichen *C2 as*- (A) und *C2 as short*-Linien (B) durchgeführt. Die Exposition erfolgte für 10 d (A) und 3 d (B) bei -80 °C. Als Ladekontrolle diente die Hybridisierung mit der Sonde *RpL9* (Schmidt *et al.*, 1996; mit *SacII* linearisiert).

Bei der Bande in der Wildtyp-Spur der beiden Exponate handelte es sich um das *c2*-Transkript (Abb. 31 A und B). Für alle vier der für diese Analyse verwendeten *C2 as*-Linien war das Transkript soweit reduziert, dass es mit dieser Methode nicht nachweisbar war. Damit ist das *C2 as*-Konstrukt funktionell (Abb. 31 A). Die starke Reduktion der *c2*-mRNA führte jedoch zu keinem Phänotyp. Für die beiden *C2 as short*-Linien konnte das Transkript nachgewiesen werden (Abb. 31 B). Vergleicht man allerdings die Intensität der *C2*-Signale für die drei Proben mit den entsprechenden *RpL9*-Signalen, so zeichnet sich eine deutliche Reduktion des *c2*-Transkripts in den mutanten Fliegenlinien ab. Die Reduktion durch die *C2 as short*-RNA war nicht so stark wie die durch die längere *C2 as*-RNA. Für beide Antisense-Konstrukte wurde somit gezeigt, dass trotz Reduktion des Transkripts kein mutanter Phänotyp entstanden ist.

Als Alternative zu den Antisense-Konstrukten wurde ein *RNAi*-Konstrukt hergestellt. Es basiert ebenso wie das *C2 as short*-Konstrukt auf der *C2*-Northern-Sonde. Die Klonierung erfolgte wiederum nach dem Schema, wie es bereits für das *R2 RNAi*-Konstrukt beschrieben wurde (siehe 3.2.2). Im Anschluss an die Keimbahntransformation des *C2 RNAi*-Konstrukts konnten sieben mutante Fliegenlinien etabliert werden. Die homozygoten Männchen aus diesen *C2 RNAi*-Linien wurden auf ihre Fertilität hin untersucht. Sie zeigten keinen sterilen Phänotyp.

Auch hier wurde die Effizienz des Konstrukts mithilfe einer Northern-Hybridisierung überprüft. Die mRNA von Männchen der Linien *C2 RNAi 1.2, 4.1, 4.2, 5.1, 6.1, 6.2* und *22.1* wurde auf zwei Membranen aufgeteilt. Zum Vergleich wurde auf jeder Membran einmal die mRNA von Wildtyp-Männchen aufgetragen.

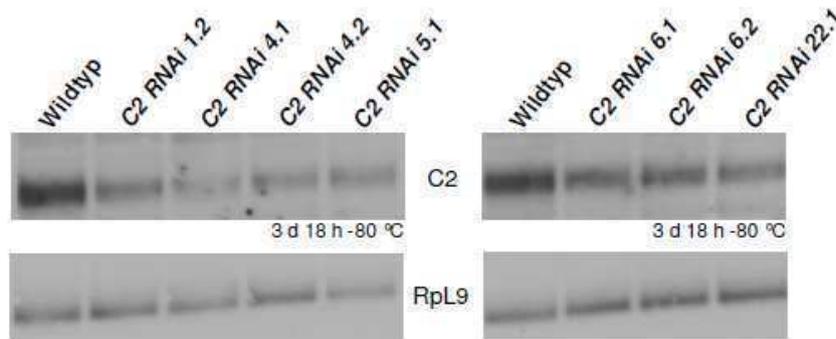


Abbildung 32: Northern-Hybridisierung mit der Sonde TM468 (PKA-C2) zur Überprüfung der Effizienz des C2 RNAi-Konstrukts. Die Sonde TM468 wurde mit *Sall* linearisiert. Zur Transkription wurde die T7-RNA-Polymerase verwendet. Die Hybridisierung wurde auf zwei Membranen mit der mRNA homozygoter Männchen der unterschiedlichen C2 RNAi-Linien durchgeführt. Die Exposition erfolgte jeweils für 3 d (B) bei -80 °C. Als Ladekontrolle diente die Hybridisierung mit der Sonde *Rpl9* (Schmidt *et al.*, 1996; mit *SacII* linearisiert).

In Abbildung 32 sind die entsprechenden Exponate gezeigt. Wie zuvor schon die Antisense-Konstrukte bewirkte auch das RNAi-Konstrukt eine Reduktion der endogenen *c2*-mRNA. Die Reduktion ist in etwa mit der des *C2 as short*-Konstrukts zu vergleichen, was daran liegen könnte, dass die beiden auf demselben Sequenzabschnitt basieren.

3.5.3 Keine der PKA-C2-Isoformen zeigte eine Interaktion mit PKA-R1 oder -R2

Für die BRET-Analysen wurde die C2-cDNA über die Schnittstellen für *XhoI* und *HindIII* in den Vektor pGFP²-C1 kloniert. Bei der Herstellung des Konstrukts konnte durch Sequenzierung ein zweites *c2*-Transkript, nachfolgend als *c2 (-5)* bezeichnet, identifiziert werden. Bei dieser Isoform handelt es sich um eine Splice-Variante, der durch Nutzung einer alternativen Splice-Stelle fünf Nukleotide am Beginn des fünften Exons fehlen. Dieses Transkript wurde schon von Kalderon und Rubin (1988) beschrieben und bis zu der Version FB 2007_1 (vom 2.8.2007) auch bei FlyBase postuliert, wurde dann aber in den nachfolgenden Versionen herausgenommen. Durch die fehlenden fünf Nukleotide kommt es zu einer anschließenden Leserasterverschiebung und das entsprechende Protein hat im Vergleich zu PKA-C2 einen alternativen und um 39 AS längeren C-Terminus. Die Proteinkinase-Domäne ist in der *C2 (-5)*-Isoform verkürzt. *C2 (-5)* wurde in die BRET-Analysen mit eingeschlossen und genauso wie *C2* in den Vektor pGFP²-C1 kloniert. Dabei handelt es sich allerdings nicht um das vollständige *c2 (-5)*-Transkript, sondern um eine bis zu dem für das *C2*-Transkript vorausgesagten Stopp-Codon verkürzte Version. Die graphische Darstellung der Ergebnisse für PKA-C2 und den regulatorischen Untereinheiten aus *Drosophila* ist in Abbildung 33 (links) gezeigt. PKA-C2 interagiert weder mit der PKA-R1 noch mit PKA-R2. Die BRET²-Signale für beide Messungen stiegen nicht signifikant über den Hintergrund an (DmR1 - und DmR2 -). Die Signale für die Messungen bei cAMP-Überschuss (DmR1 + und DmR2 +)

waren sogar höher als die unter physiologischen Bedingungen. Diese Werte kamen wahrscheinlich durch das zufällige Aneinanderlagern der überexprimierten PKA-Untereinheiten zustande. Ähnlich stellte sich die Situation für die Messungen der C2 (-5)-Isoform dar (Abb. 33 rechts). Hier war das Signal für die Interaktion mit R1 nicht signifikant über dem Hintergrund (DmR1 -) und das Signal nach Inkubation mit IBMX und Forskolin war erneut geringfügig höher. Das Signal für die Messung mit R2 war zwar über dem Hintergrund, allerdings ließ sich der Komplex nicht lösen (DmR2 - und DmR2 +). Dies ließ ebenfalls den Schluss zu, dass es sich hier nur um eine zufällige Aneinanderlagerung von C2 (-5) mit R2 handelte.

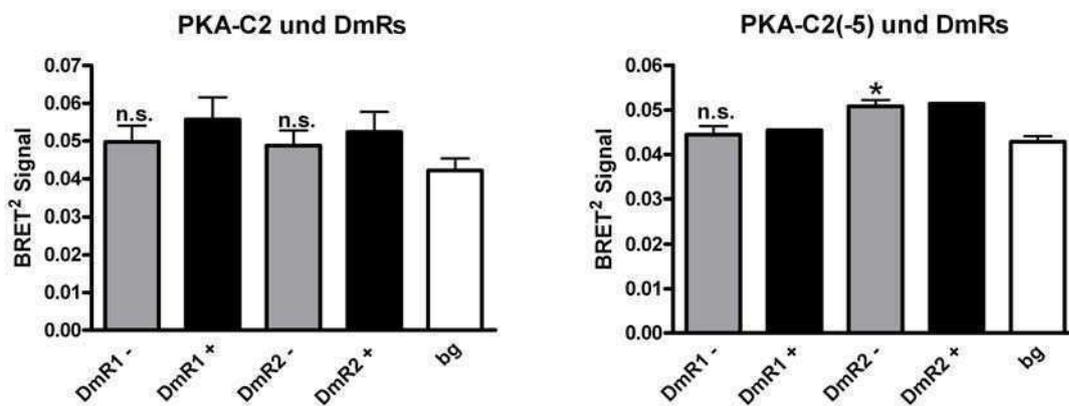


Abbildung 33: Darstellung der Ergebnisse aus den BRET²-Messungen für PKA-C2 und der alternativen Isoform PKA-C2(-5) mit den regulatorischen Untereinheiten aus *Drosophila* (DmRs). Analog zu Abbildung 16. Signifikanzen: ein Stern = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant. Wiederholungen: für C2 mit DmR1 und DmR2 $n = 7$; für C2(-5) mit DmR1 und DmR2 $n = 2$.

3.6 Die katalytische Untereinheit PKA-C2-like

3.6.1 Analog zu PKA-C2 zeigt auch GFP-C2-like zeigt ein anderes Expressionsmuster als C2-like-GFP

Analog zu dem *GFP-C2*-Konstrukt wurde auch ein *GFP-C2-like*-Konstrukt hergestellt, um die Fluoreszenz einer N-terminalen Fusion mit der einer C-terminalen Fusion zu vergleichen, welche auch für dieses Gen bereits in der Diplomarbeit erzeugt wurde (Gustke, 2006). Das eGFP für dieses Konstrukt wurde analog zu dem für die *GFP-C3*- und *GFP-C2*-Konstrukte aus dem Vektor pUASTgreen amplifiziert. Durch die Primer *eGFP 5' C2-like* und *eGFP 3' C2-like* wurden die Schnittstellen für *EcoRI* (5') und *XhoI* (3') angefügt. Das Produkt wurde in pGem-T kloniert, anschließend über *EcoRI* und *XhoI* wieder ausgeschnitten und in pBluescript KS (-) eingebracht. Der 1176 bp-lange Promotorbereich wurde mit den Primern *C2 like pro 5'* und *C2 like pro 3'* sowie der *Taq*-Polymerase auf genomischer DNA amplifiziert und in pGem-T kloniert. Durch die PCR wurden die Schnittstellen für *StuI* (5') und *EcoRI* (3') angehängt. Der Promotorbereich lag in *Sp6*-Orientierung in pGem-T vor und wurde über *PstI* und *EcoRI* vor das eGFP in pBluescript KS (-) ligiert. Das offene Leseraster von *c2-like* lag bereits in geeigneter Form in dem Vektor BRET²-Vektor pGFP²-C1 vor. Es wurde über *XhoI* und *ApaI* hinter das eGFP kloniert. Das gesamte Konstrukt wurde anschließend über *StuI* und *SacII* in pCaSpeR2 eingebracht.

In Abbildung 34 sind vergleichend Hoden von *C2-like-GFP*- (A bis D) und *GFP-C2-like*-Männchen (E bis H) abgebildet. Beide zeigten starke Fluoreszenz in den elongierten Spermatischen. Abgesehen davon variierten die Expressionsmuster der beiden Fusionsproteine. Die Fluoreszenz von *C2-like-GFP* war schon sehr gut ab dem Stadium der Spermatogonien zu sehen (Abb. 34 A). Sie war dabei gleichmäßig im Cytoplasma verteilt und die Kerne waren frei. Die Intensität nahm allmählich von den frühesten Stadien an zu und war schließlich in den elongierten Spermatischen am stärksten. Die Fluoreszenz von *GFP-C2-like* hingegen war in den frühen Stadien schwächer (Abb. 34 E). Auch hier nahm die Intensität der Fluoreszenz mit dem Voranschreiten der Spermatogenese zu. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Fusionsproteinen war, dass die Spermien der *C2-like-GFP*-transgenen Männchen kaum Fluoreszenz zeigten im Gegensatz zu denen der *GFP-C2-like*-transgenen Männchen (Vergleich Abb. 34 C und G). Die Unterschiede in den Expressionsmustern entsprechen in etwa denen, die schon bei den beiden analogen *C2*-Fusionskonstrukten beobachtet wurden. Auch bei *C2-like* könnte die Fluoreszenz in den reifen Spermien auf eine Funktion von *C2-like* in diesen hinweisen. So könnten zum Beispiel einzelne Schritte während des Befruchtungsvorgangs von Phosphorylierungsprozessen abhängig sein.

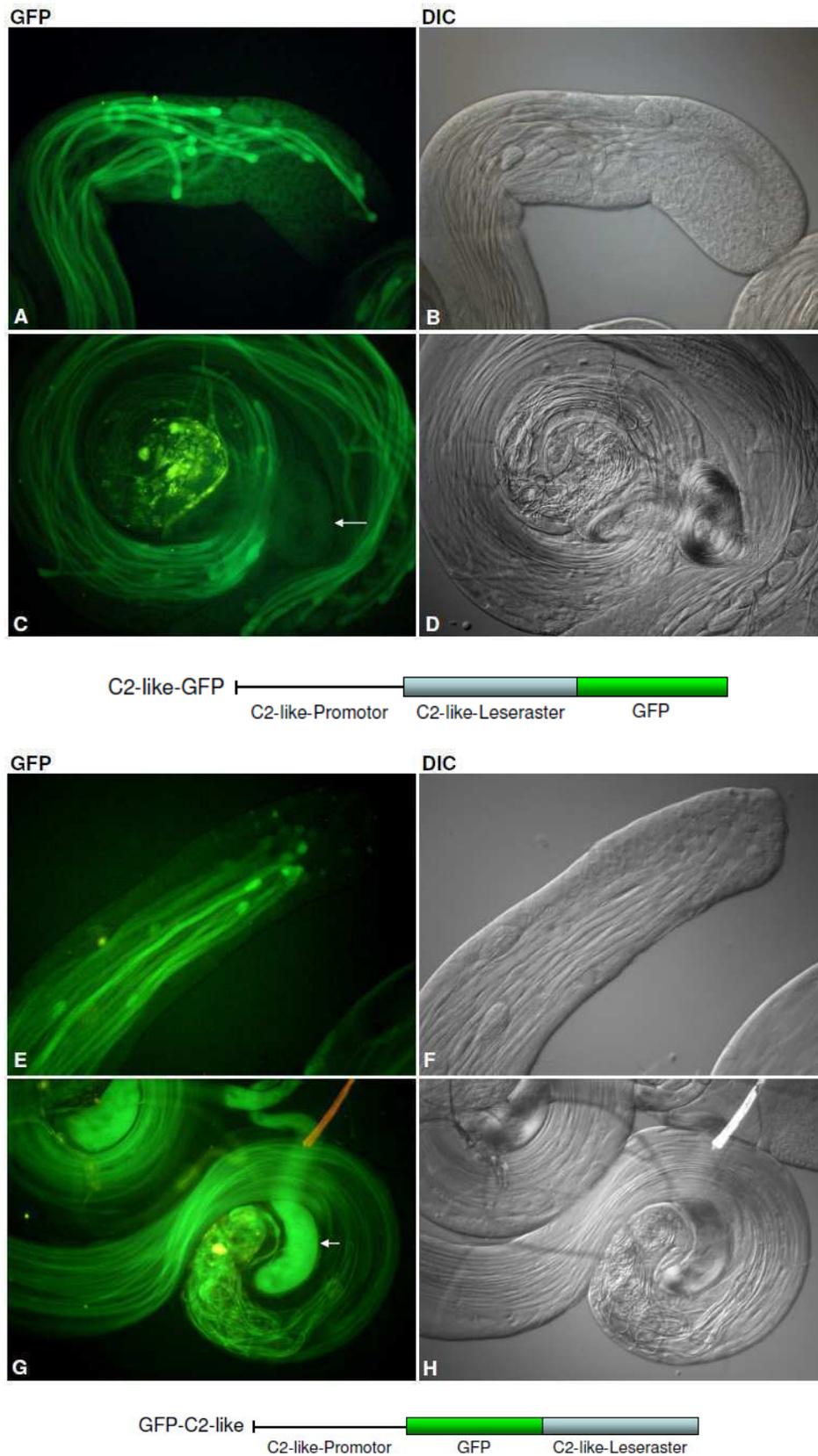


Abbildung 34: Vergleich der Fluoreszenzen von C2-like-GFP (A - D) und GFP-C2-like (E - H). A und B: apikaler Bereich eines Hodenschlauchs mit Fluoreszenz von C2-like-GFP in den Keimzellen. C und D: Terminale Region und Samenblase mit starker C2-like-GFP-Fluoreszenz in den elongierten Spermiden und schwacher C2-like-GFP-Fluoreszenz in den Spermien. Pfeil in C weist auf die Samenblase. E und F: apikaler Bereich eines Hodenschlauchs mit GFP-C2-like in den Keimzellen. G und H: Terminaler Bereich und Samenblase mit starker Fluoreszenz von GFP-C2 in den elongierten Spermiden und Spermien. Pfeil in G weist auf die Samenblase.

3.6.2 C2-like as-Mutanten zeigen Defekte in der Spermiogenese

Das *C2-like as*-Konstrukt basierte analog zu dem *C2 as short*-Konstrukt auf der *C2-like*-Northern-Sonde TM477. Die Sequenz deckt die letzten 428 nt des ersten Exons und die ersten 48 nt des zweiten Exons ab. Sie lag in *Sp6*-Orientierung in dem Vektor pGem-T vor und wurde für das Antisense-Konstrukt über die Schnittstellen für *Apal* und *PstI* gerichtet in den Vektor TEV^{TCE} kloniert. Es konnten sieben transgene Fliegenlinien etabliert werden. Während der Etablierung dieser Fliegenlinien traten Probleme bei den Vermehrungs- und den Balancerkreuzungen auf. Die Männchen, die heterozygot für das Antisense-Konstrukt waren, waren bereits stark in ihrer Fertilität beeinträchtigt. Die Stämme werden wie die *R2 RNAi*-Stämme über *w¹¹¹⁸* gehalten. Die für das Transgen heterozygoten und einige homozygote Männchen wurden für Fertilitätstests eingesetzt. Pro Linie wurden acht bis zehn Tests durchgeführt. Um einen Vergleich zu Wildtyp-Männchen zu erhalten, wurden parallel Fertilitätstests von *w¹¹¹⁸*-Männchen analysiert. Sieben Tage, nachdem die ersten Nachkommen geschlüpft waren, wurde die gesamte Nachkommenschaft jeweils eines Männchens gezählt. Die Anzahl der Nachkommen von den Männchen aus den mutanten Linien wurde ins Verhältnis zu der Anzahl der Nachkommen von den *w¹¹¹⁸*-Männchen gesetzt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Fertilitätstests der *C2-like as*-Linien.

<i>C2-like as</i> -Linie	Nachkommen im Vergleich zum Wildtyp
4.1; +	4 ♂: 5 % 6 ♂: 75,3 %
4.1; 4.1	0 %
10.1; +	12,3 %
14.11; +	12,8 %
14.2; +	6,6 %
14.2; 14.2	0 %
16.1; +	7 %
16.1; 16.1	0 %
36.1; +	18,5 %
45.2; +	83 %

Die homozygoten Männchen aus den Linien *C2-like as 4.1*, *14.2* und *16.1* erzeugten gar keine Nachkommen. Die Ergebnisse für die heterozygoten Männchen waren zum Teil sehr unterschiedlich. Sechs der zehn getesteten heterozygoten Männchen der Linie *4.1* erbrach-

ten 75,3 % der Nachkommen eines w^{1118} -Männchens, die vier anderen Männchen dagegen nur 5%. Die Männchen der Linie 45.2 erzeugten etwa 83 % der Nachkommenschaft eines w^{1118} -Männchens. Bei den beiden Linien schien es sich jedoch um Ausnahmen zu handeln, bei denen das Antisense-Konstrukt wahrscheinlich aufgrund der Integrationsstelle weniger transkribiert wurde, als das bei den restlichen Linien der Fall ist. Die Fertilität der restlichen Linien bewegte sich in einem Bereich von 6,6 % bis 18,5 % der Nachkommenschaft eines w^{1118} -Männchens.

Um die Auswirkungen des *C2-like as*-Konstrukts auf die endogene *c2-like*-mRNA zu untersuchen, wurde eine Northern-Hybridisierung durchgeführt. Dazu wurde die mRNA von heterozygoten oder, wenn sie in der benötigten Anzahl vorhanden waren, von homozygoten Männchen präpariert. Die Hybridisierung der Membran erfolgte mit einer *C2-like*-spezifischen Sonde. In Abbildung 35 ist das entsprechende Exponat gezeigt.

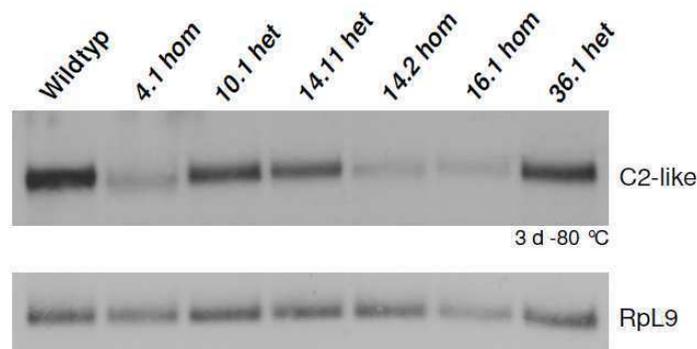


Abbildung 35: Northern-Hybridisierung mit der Sonde TM477 (*C2-like*) zur Überprüfung der Effizienz des *C2-like as*-Konstrukts. Die für die *in vitro*-Transkription erforderliche Linearisierung von TM468 erfolgte mit *Pst*I. Zur Transkription wurde die *T7*-RNA-Polymerase verwendet. Die Hybridisierung wurde auf einer Membran mit der mRNA von heterozygoten (het) bzw. homozygoten (hom) Männchen der unterschiedlichen *C2-like as*-Linien durchgeführt. Die Exposition erfolgte für 3 d bei -80 °C. Als Ladekontrolle diente die Hybridisierung mit der Sonde Rpl9 (Schmidt *et al.*, 1996; mit *Sac*II linearisiert).

Es ist zu erkennen, dass in den heterozygoten Männchen im Vergleich zum Wildtyp die *c2-like*-mRNA nur wenig reduziert war. Diese Reduktion war allerdings ausreichend, um die Fertilität der entsprechenden Männchen zu beeinflussen. Die Reduktion des Transkripts in den homozygoten Männchen war wesentlich stärker, es war aber noch ausreichend Transkript vorhanden, um es in einer Northern-Analyse nachzuweisen.

Die Frage war nun, wie sich die Reduktion des *c2-like*-Transkripts auf die Hoden-Morphologie und die unterschiedlichen Spermatogenese-Stadien auswirkt. Dazu wurde ein Hoden eines homozygoten *C2-like as 4.1*-Männchens unter dem Lichtmikroskop betrachtet (Abb. 36).

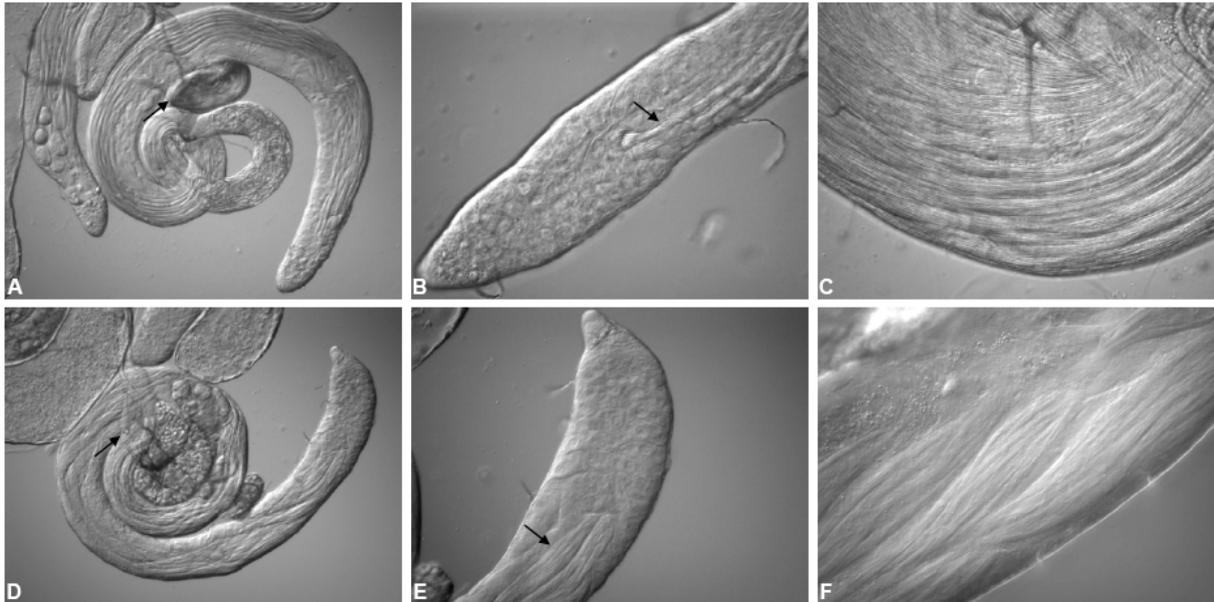


Abbildung 36: Hoden-Morphologie der *C2-like as*-Mutante 4.1 (D-F) im Vergleich zu w^{118} (A-C). A: Übersicht über einen w^{118} -Hodenschlauch. Der Pfeil deutet auf eine gefüllte Samenblase. B: Hodenspitze eines w^{118} -Hodens. Der Pfeil deutet auf ein maximal elongiertes Spermatidenbündel mit einem *waste bag* am Ende. C: Großaufnahme parallel verlaufender Spermatidenbündel in einem w^{118} -Hoden. D: Übersicht über einen mutanten Hodenschlauch. Der Pfeil deutet auf die unter dem Hodenschlauch gelegene leere Samenblase. E: Hodenspitze eines mutanten Hodens. Der Pfeil deutet auf die im Vergleich zu w^{118} deutlich breiteren Spermatidenbündel ohne *waste bags* an den Enden. F: Großaufnahme der sehr breiten Spermatidenbündel.

Vergleicht man die Übersicht eines w^{118} -Hodens (Abb. 36 A) und die des mutanten Hodens (Abb. 36 D), so fällt auf, dass der Hodenschlauch des mutanten Männchens zwar seine normale Gestalt hatte und alle Stadien von den runden Spermatogonien in der Spitze zu den elongierten Spermatiden entlang des gesamten Hodenschlauchs enthielt, die Samenblase aber vollkommen leer war (Pfeile in Abb. 36 A und D). Betrachtete man die elongierten Spermatiden genauer (Pfeile in Abb. 36 B und E), so waren die Bündel der Mutanten wesentlich breiter und die Spermatiden erschienen in ihren Zysten nicht so fest verpackt, wie das bei dem Wildtyp der Fall war. Außerdem konnten an den Enden der elongierten Spermatiden im Gegensatz zum Wildtyp keine für dieses Stadium typischen sackartigen *waste bags* beobachtet werden. Bei einer stärkeren Vergrößerung der Spermatidenbündel wurde ihre unterschiedliche Strukturierung noch deutlicher (Abb. 36 C und E). Weiterhin war auffällig, dass sich in dem mutanten Hoden wesentlich weniger Spermatidenbündel befanden. Dies alles und die Tatsache, dass die frühen, runden Stadien der Spermatogenese der Mutanten wie die im Wildtyp erschienen, deuten darauf hin, dass sich der durch die Reduktion der *C2-like-mRNA* verursachte Defekt auf die postmeiotischen Stadien beschränkt.

Dies sollte nun mit Hoechst-Phalloidin-Färbungen genauer untersucht werden. Die Hoechst 33258-Färbung, bei der die DNA markiert wurde, ließ erkennen, dass die Kerne in den frühen Spermatogenese-Stadien ihre typische runde Form aufweisen (Vergleich Pfeil in Abb. 37 B mit E). Im Gegensatz dazu, weicht der mutante Phänotyp des *C2-like as 4.1*-transge-

nenen Männchens am Ende der Differenzierungsphase vom Wildtyp ab. Die in dieser Phase zu pfeilförmigen Strukturen zusammen gelagerten Kerne sind in der Mutante nicht zu erkennen (Vergleich Pfeil in Abb. 37 H mit K). Die Fülle an runden Kernen in diesen Aufnahmen stammte nicht etwa von runden Spermatogenese-Stadien, sondern von den Kernen der Hodenschlauchhülle. Da die pfeilförmigen Strukturen nicht vorhanden waren, fiel das Fokussieren auf die Spermatoziden schwer.

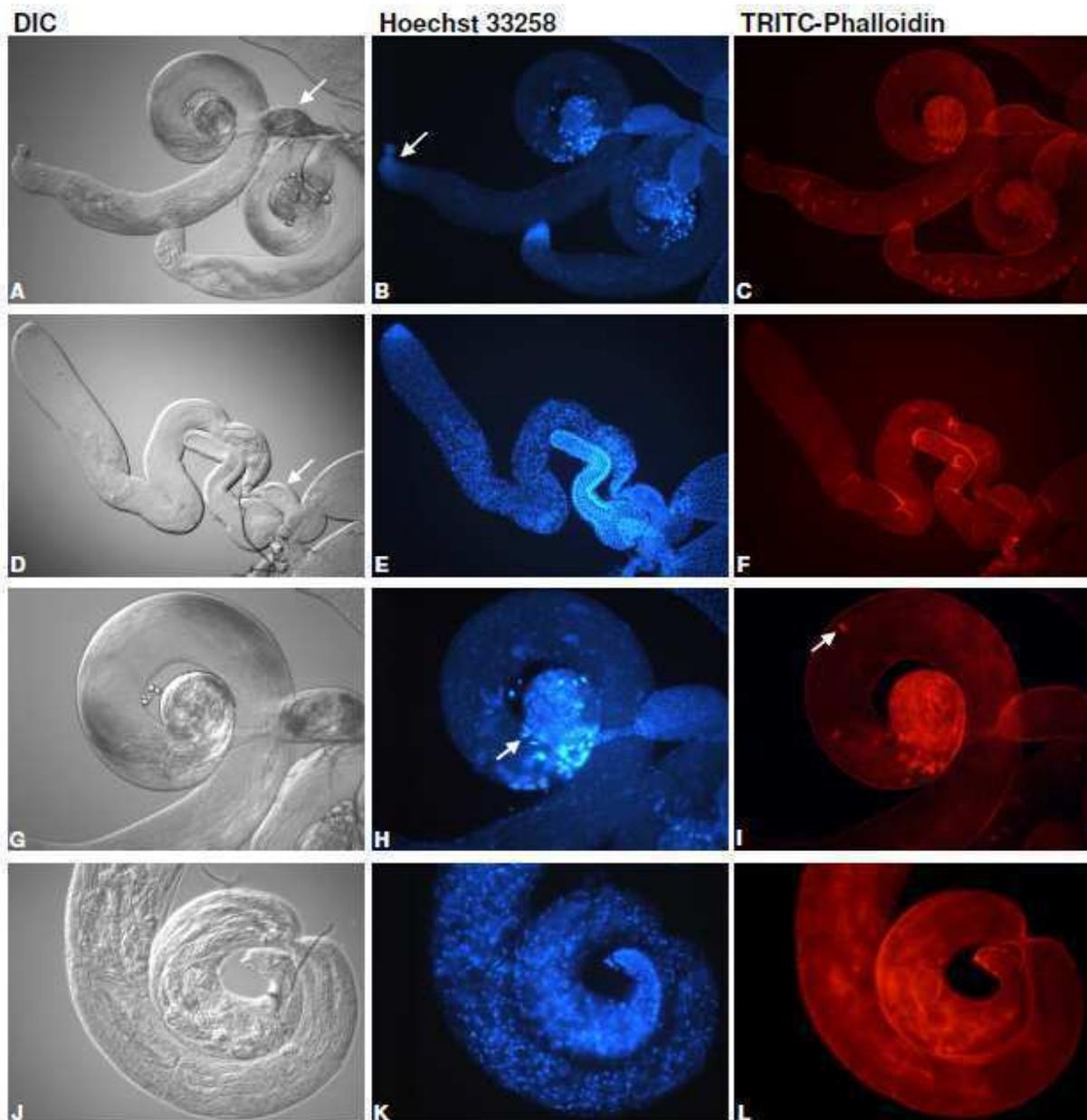


Abbildung 37: Hoechst- und Phalloidin-Färbungen von *C2-like*-mutanten Hoden im Vergleich zu *w¹¹⁸*-Hoden. A-C: Übersicht über einen *w¹¹⁸*-Hoden. A: Pfeil weist auf die volle Samenblase. B: Pfeil zeigt auf die runden Spermatogonienkerne. D-F: Übersicht über einen Hoden der Linie *C2-like as 4.1*. D: Pfeil zeigt auf die leere Samenblase. G-I: Vergrößerung der terminalen Region des *w¹¹⁸*-Hodens. H: Pfeil weist auf die nadelförmigen Kerne der elongierten Spermatoziden. I: Pfeil zeigt auf einen Individualisierungskomplex. J-L: Vergrößerung der terminalen Region des *C2-like as*-Hodens.

Des Weiteren konnten weder in der Übersicht (Vergleich Abb. 37 C und F) noch in der Vergrößerung des terminalen Bereichs des Hodens (Vergleich Pfeil in Abb. 37 I mit L) mit TRITC-Phalloidin markierte Individualisierungskomplexe ausgemacht werden. Wie bereits oben beschrieben, waren außerdem die Samenblasen leer (Vergleich Abb. 37 A und D, Pfeile). Die Ergebnisse der Hoechst-Phalloidin-Färbungen bestätigen also, dass sich der Defekt, der zu männlicher Sterilität führt, erst in der Spermiogenese manifestiert.

Das Einkreuzen des *C2-like-GFP*-Fusionskonstrukts in die *C2-like as*-Linien 4.1 und 16.1 sollte zeigen, ob sich der mutante Phänotyp wenigstens teilweise retten lässt. Das Einbringen des *C2-like-GFP*-Konstrukts führte dabei zu einer Überexpression an *C2-like*, die dem Antisense-Effekt des *C2-like as*-Konstrukts entgegenstand. Die Kreuzung erfolgte so, dass die Nachkommenschaft jeweils eine Kopie der beiden Konstrukte trug. Die Männchen, die aus dieser Kreuzung hervorgingen, wurden auf ihre Fertilität hin überprüft. Analog zu den Tests zur Charakterisierung des mutanten Phänotyps der *C2-like as*-transgenen Männchen wurde die Nachkommenschaft eines jeden Männchens ausgezählt und mit der durchschnittlichen Nachkommenschaft eines *w¹¹⁸*-Männchens verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Fertilitätstest für Männchen, die heterozygot sowohl für *C2-like-GFP* als auch *C2-like as* sind.

♂ aus Kreuzung	Nachkommen im Vergleich zum Wildtyp
<i>C2-like-GFP; C2-like as 4.1</i>	3 ♂: 7,8 %
	2 ♂: 55,7 %
	5 ♂: 100 %
<i>C2-like-GFP; C2like as 16.1</i>	5 ♂: 11,1 %
	5 ♂: 77,7 %

Die Auswirkungen des Einkreuzens des *C2-like-GFP*-Konstrukts auf den mutanten Phänotyp waren sehr heterogen. Für *C2-like-GFP; C2-like as 4.1* zeigten drei der zehn getesteten Männchen annähernd den mutanten Phänotyp, zwei Männchen waren in der Lage 55,7 % der Nachkommenschaft eines Wildtyp-Männchens zu erzeugen und bei fünf Männchen konnte der Phänotyp vollständig gerettet werden. Für *C2-like-GFP; C2-like as 16.1* zeigten fünf Männchen annähernd den mutanten Phänotyp und die anderen fünf Männchen waren in der Lage 77,7 % der Nachkommenschaft eines Wildtyp-Männchens zu erzeugen. Das Ergebnis zeigt auf jeden Fall, dass der ursprüngliche mutante Phänotyp eindeutig auf das Antisense-Konstrukt zurückzuführen ist. Die Heterogenität könnte durch folgenden Sachverhalt zustande kommen: In dem Fall, dass das *C2-like-GFP*-Fusionsprotein nicht funktionell ist,

wird durch das *C2-like-GFP*-Konstrukt aber immerhin die Konzentration an *c2-like*-mRNA erhöht. Wird nun bevorzugt die endogene *c2-like*-mRNA von dem Antisense-Konstrukt abgebaut, bleibt der mutante Phänotyp bestehen. Wird dagegen hauptsächlich die *c2-like-gfp*-mRNA abgebaut, kann genügend endogenes C2-like synthetisiert werden, um den mutanten Phänotyp zu retten. Dabei kann allerdings nicht erklärt werden, warum eine der beiden mRNA-Spezies vorrangig abgebaut werden sollte.

3.6.3 PKA-C2-like interagiert mit PKA-R2 jedoch nicht mit PKA-R1

Für die BRET-Analysen wurde C2-like über die Schnittstellen für *XhoI* und *HindIII* in den Vektor pGFP²-C1 kloniert. Die Ergebnisse für die Messungen von C2-like mit den R-Untereinheiten aus *Drosophila* sind in Abbildung 38 (links) graphisch dargestellt. C2-like war nicht in der Lage, mit R1 zu interagieren (DmR1 - und DmR1 +). Dagegen kam es mit R2 zu der Ausbildung eines Komplexes (DmR2 -). Dieser Komplex ließ sich unter Überschuss von cAMP zu 92,5 % lösen (DmR2 +). Die BRET²-Signale für die Messungen mit den humanen R-Untereinheiten hRI α , hRII α , hRI β und hRII β waren alle nicht signifikant über dem Hintergrund (Abb. 38 rechts). Bei näherer Betrachtung der Signale für die Messungen einer möglichen Interaktion von C2-like mit hRI β (hRI β - und hRI β +) wäre es dennoch möglich, dass sie in geringem Maße einen Komplex ausbilden, der sich unter cAMP-Überschuss lösen lässt.

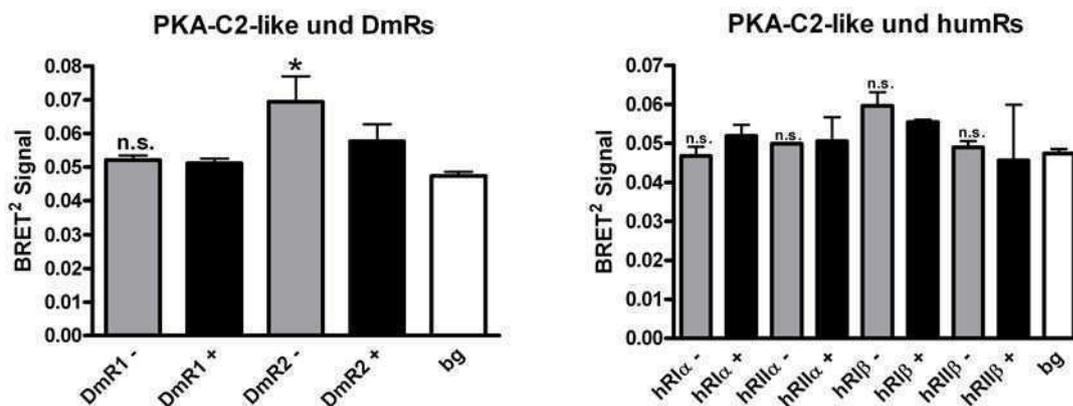


Abbildung 38: Darstellung der Ergebnisse aus den BRET²-Messungen für PKA-C2-like mit den regulatorischen Untereinheiten aus *Drosophila* (DmRs) und Mensch (humRs). Analog zu Abbildung 16. Signifikanzen: ein Stern = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant. Wiederholungen: DmR1 $n = 5$; DmR2 $n = 7$; hRI α , hRII α , hRI β und hRII β $n = 1$.

3.7 Die C2-like Substrat-Kandidaten CG9222 und CG14305

Für die Auswahl möglicher Substrate von C2-like wurde eine Veröffentlichung von Gao *et al.* aus dem Jahre 2008 herangezogen. Unter anderem enthielt dieser Artikel Listen von potentiellen Substraten für alle bekannten katalytischen PKA-Untereinheiten und C2-like aus *Drosophila melanogaster*. Diese Listen basieren auf ihrem *kiss and farewell*-Modell. Dieses sagt aus, dass ein Substrat von einer katalytischen Untereinheit gebunden werden muss, damit es von ihr phosphoryliert werden kann. Diese Interaktionen sind dabei teilweise nur von kurzer Dauer und von unterschiedlicher Affinität. Basierend auf diesem Modell wählte die Gruppe PKA-bindende Proteine aus einer Protein-Protein-Interaktions-Datenbank aus. Sie analysierten diese Proteine mithilfe des Programms GPS (Zhou *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2005) auf mögliche Phosphorylierungsstellen. Zusätzlich erstellten sie ein Modell, um die maximale Anzahl von Falschpositiven zu errechnen und waren so in der Lage, die Rate der Falschpositiven auf unter ein Prozent zu reduzieren. Ob es sich bei diesen Kandidaten tatsächlich um PKA-Substrate handelt, muss noch experimentell verifiziert werden.

Als ersten Schritt, um aus der Liste geeignete Kandidaten für C2-like herauszufiltern, wurden diese auf die bei FlyBase angegebenen ESTs (*expressed sequence tags*) hin untersucht. Bei ESTs handelt es sich um cDNA-Sequenzen, die auf der mRNA aus einzelnen Entwicklungsstadien, einzelnen Geweben oder Gemischen aus diesen basieren. Da C2-like spezifisch für die männliche Keimbahn ist, müssten die Kandidaten ESTs aus Hodenmaterial oder Gemischen mit Hodenmaterial aufweisen. Nur zwei der 20 Kandidaten erfüllten diese Bedingung zufrieden stellend: CG9222 und CG14305. Das heißt nicht, dass die anderen auf der Liste stehenden Proteine keine Substrate von C2-like sein können, nur dass die Wahrscheinlichkeit für CG9222 und CG14305 (basierend auf den aufgelisteten ESTs) am höchsten ist. Für CG9222 existieren 16 ESTs. Zehn davon stammen aus dem Hoden. Fünf weitere stammen aus dem Fettkörper des dritten Larvenstadiums. In den Fettkörper sind die runden larvalen Hoden eingebettet, die bereits stark transkriptionsaktive Spermatogenese-Stadien enthalten. Es ist daher wahrscheinlich, dass bei der Präparation der Fettkörper Hodenmaterial und damit hodenspezifische Transkripte mit in die Probe gelangt sind. Nur ein EST stammt eindeutig nicht aus dem Hoden, sondern aus dem adulten Kopf. Für CG14305 sieht die Situation ähnlich aus: 14 von 19 ESTs stammen aus dem adulten Hoden, vier weitere aus dem Fettkörper des dritten Larvenstadiums. Ein EST stammt aus Embryonen, bei denen noch keine Spermatogenese stattfindet. Für beide Proteine wird von FlyBase vorausgesagt, dass sie Protein-Serin/Threonin-Kinase-Aktivität besitzen. Das *PANTHER classification system* (*Protein Analysis THrough Evolutionary Relationships*; www.pantherdb.org) stuft CG9222 und CG14305 in die Familie der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase-Verwandten

und in die Unterfamilie der testisspezifischen Serin/Threonin-Kinasen (TSSK) ein. Laut PANTHER sollen die beiden Proteine eine Rolle in der Spermatogenese und in der Spermienbewegung spielen. Die Datenbank *InParanoid* (www.ensembl.org) gibt an, dass sowohl CG9222 als auch CG14305 Homologe von TSSK 1B und TSSK 2 aus dem Menschen sind.

3.7.1 CG9222 und CG14305 werden hodenspezifisch transkribiert

Zunächst sollte mit PCR auf cDNA von Hoden und von Weibchen überprüft werden, ob die Gene *CG9222* und *CG14305* Transkripte im Hoden aufweisen. Die PCR mit den *CG9222*-Primern auf Hoden-cDNA führte zu einem 296 bp-langen Produkt (Abb. 39), die PCR mit den gleichen Primern auf der Weibchen-cDNA dagegen nicht. Das Gleiche ist der Fall für die PCRs mit den *CG14305*-Primern: Auf Hoden-cDNA ergab die PCR ein 269 bp-langes Produkt, auf Weibchen-cDNA auch hier nicht. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass sowohl *CG9222* als auch *CG14305* hodenspezifisch sein könnten.

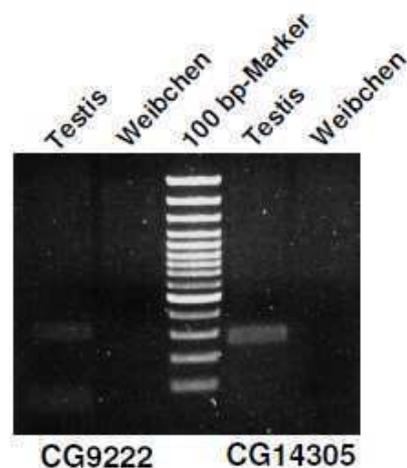


Abbildung 39: Darstellung der PCR-Produkte für CG9222 und CG14305 auf einem 0,7% Agarose-Gel. Die PCRs wurden jeweils auf cDNA aus Hoden und Weibchen durchgeführt. Die PCR für *CG9222* wurde mit den Primern *CG9222-1* und *CG9222-2* bei einer Annealing-Temperatur von 52 °C und einer Elongationszeit von 1 min durchgeführt. Das Produkt hat eine Größe von 296 bp. Die PCR für *CG14305* wurde mit den Primern *CG14305-1* und *CG14305-2* ebenfalls bei einer Annealing-Temperatur von 52 °C und einer Elongationszeit von 1 min durchgeführt. Das Produkt hat eine Größe von 269 bp.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden Northern-Hybridisierungen auf Membranen mit der mRNA von den Restkörpern von Männchen und Weibchen, sowie von Hoden und Ovarien durchgeführt. Die Exponate sind in Abbildung 40 gezeigt. A zeigt die Hybridisierung mit einer Sonde, die spezifisch das *CG9222*-Transkript erkennt. Die bei FlyBase angegebene Transkriptlänge von *CG9222* beträgt 1290 bp. Das Exponat zeigte zwei unterschiedlich lange Transkripte: Eines in der Hodenspur bei 1,6 kb und eines in den Spuren Restkörper Weibchen (RK w) und Ovar bei 1,85 kb. Bei dem Vergleich des mRNA-Gehalts der einzelnen

Spuren anhand der Beladungskontrolle fiel auf, dass die Hodenspur wesentlich weniger mRNA enthielt als zum Beispiel die Ovar-Spur. Dementsprechend war das markierte Transkript in der Hodenspur wesentlich stärker konzentriert als die anderen beiden. Letztere beruhen wahrscheinlich auf einer Fehlhybridisierung. Das eigentliche CG9222-Transkript ist dementsprechend hodenspezifisch. In B ist das Exponat nach der Hybridisierung mit einer Sonde abgebildet, die spezifisch die beiden CG14305-Transkripte erkennt. Die bei FlyBase angegebenen Transkriptlängen betragen 1281 bp und 1291 bp. Es ist davon auszugehen, dass dieser geringe Größenunterschied auf einem Northern nicht nachzuweisen ist. Auf dem Exponat war nur ein starkes Signal in der Hoden-Spur zu erkennen, das auf ein hodenspezifisches Transkript mit einer Länge von 1,7 bis 2,4 kb hinweist.

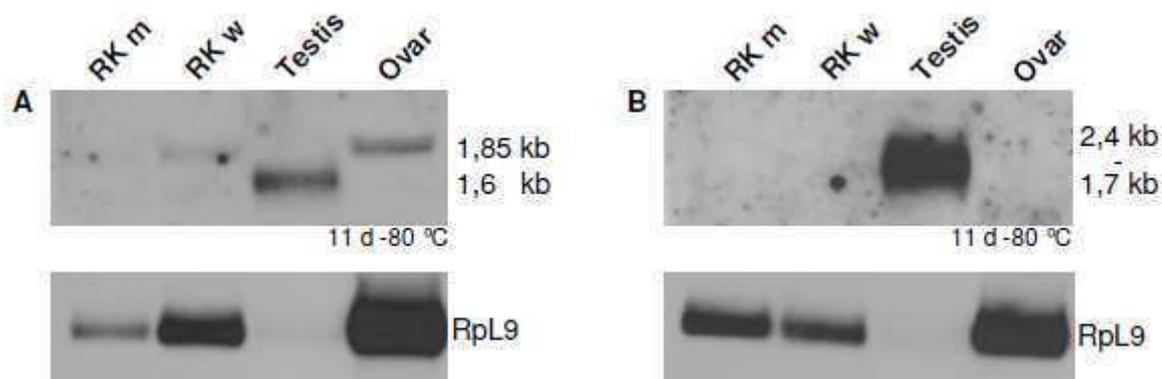


Abbildung 40: Northern-Hybridisierung zum Nachweis der CG9222- (A; Sonde FG2113) bzw. CG14305-Transkripte (B; Sonde FG2114). Für die CG9222-Northern-Sonde FG2113 wurde das PCR-Produkt aus der in 3.7.1 beschriebenen PCR auf Hoden-cDNA in T7-Orientierung in den Vektor pGem-T kloniert. Die für die *in vitro*-Transkription erforderliche Linearisierung erfolgte mit *Nco*I. Zur Transkription wurde die *Sp6*-RNA-Polymerase verwendet. Für die CG14305-Northern-Sonde FG2114 wurde das PCR-Produkt aus der in 3.7.1 beschriebenen PCR auf Hoden-cDNA in *Sp6*-Orientierung in den Vektor pGem-T kloniert. Die für die *in vitro*-Transkription erforderliche Linearisierung erfolgte mit *Sal*I. Zur Transkription wurde die *T7*-RNA-Polymerase verwendet. Die Hybridisierungen erfolgten auf Membranen mit mRNA aus den Restkörpern von Männchen (RK m) und Weibchen (RK w), sowie aus Testes und Ovarien. Die Exposition beider Membranen erfolgte für 11d bei -80 °C. Als Ladekontrolle diente die Hybridisierung mit der Sonde RpL9 (Schmidt *et al.*, 1996; mit *Sac*II linearisiert).

3.7.2 CG9222 lokalisiert an die Individualisierungskomplexe

Für die Lokalisierung von CG9222 im *Drosophila*-Hoden wurde ein GFP-Fusionskonstrukt hergestellt. Das Konstrukt führt zu einem Fusionsprotein, in dem das GFP C-terminal an CG9222 fusioniert ist. Für seine Herstellung wurde eine PCR mit den Primern CG9222 *pro 1* und CG9222 *mod STOPP* sowie der Phusion-Polymerase auf genomischer DNA durchgeführt. Das 2344 bp-lange Produkt, das einen etwa 1 kb-langen Promotor-Bereich, die 5' UTR und das Leseraster des CG9222-Gens enthält, wurde in den Zwischenvektor pGem-T kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung bei GATC (Konstanz) überprüft. Anschließend wurde das Fragment über die mit den Primern angehängten Schnittstellen *Xho*I und *Sac*II gerichtet vor das GFP in den P-Element-Vektor pUASTgreen kloniert.

Durch Keimbahntransformation wurde das Konstrukt in die Fliege gebaut. Die Hoden der für das Transgen homozygoten Fliegen wurden unter dem Mikroskop betrachtet und die Fluoreszenz dokumentiert.

Das Fusionsprotein CG9222-GFP wird erst in den elongierten Spermatiden exprimiert (Abb. 40). Die Fluoreszenz hat ihre höchste Intensität im Bereich der Individualisierungskomplexe in der terminalen Region des Hodenschlauchs und in den *waste bags* in der Hodenspitze (Abb. 41 A und B: Blockpfeil weist auf die Individualisierungskomplexe, Pfeil weist auf die *waste bags*). In Abbildung 41 C und D ist ein Bereich des Hodenschlauchs mit elongierten Spermatiden vergrößert. Eines dieser Spermatidenbündel weist einen Individualisierungskomplex auf, der sich auf seiner Wanderung entlang der Spermatiden in Richtung der Hodenspitze befindet (Pfeil). Die Abbildungen 41 E und F zeigen die Vergrößerung einer Hodenspitze mit den *waste bags* an den Enden der Spermatidenbündel. In die *waste bags* gelangt das Material, das während der Individualisierung von den Spermatidenschwänzen durch die Komplexe abgestreift wird. Am Ende der Individualisierung zerfallen die Komplexe und ihre Bestandteile gelangen ebenfalls in die *waste bags*. Der Pfeil weist auf einen dieser zerfallenden Komplexe. Das Fusionsprotein scheint zum größten Teil, aber nicht komplett während der Individualisierung abgestreift zu werden. Die reifen Spermien in der Samenblase zeigten nur noch eine leichte Fluoreszenz (Pfeil in Abbildung 41 G).

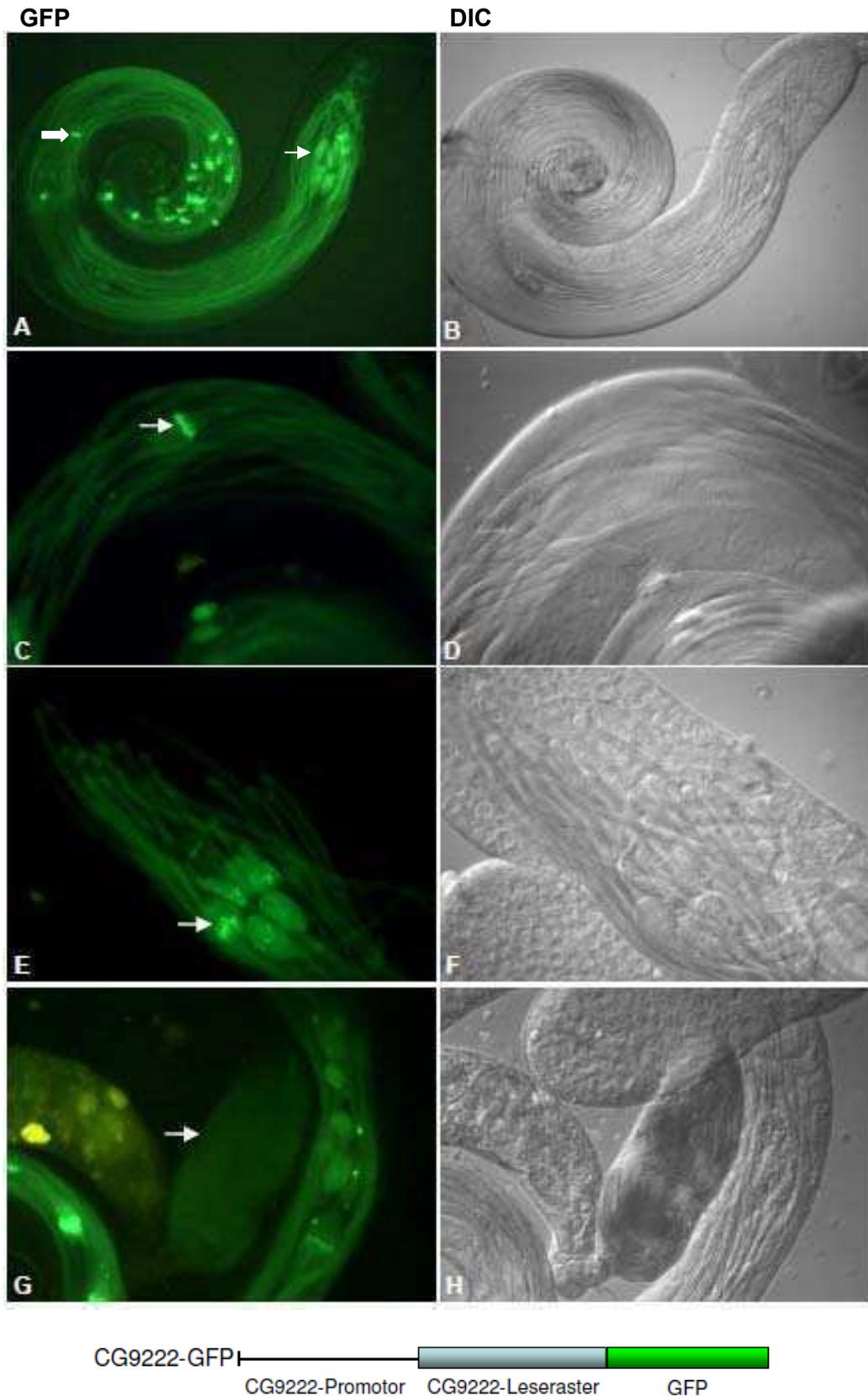


Abbildung 41: Fluoreszenz des CG9222-GFP-Fusionproteins im *Drosophila*-Hoden. A und B: Übersicht über einen Hodenschlauch der Linie *CG9222-GFP 20.1*. A: Der Pfeil zeigt auf die *waste bags* in der Hodenspitze. Der Blockpfeil weist auf wandernde Individualisierungskomplexe. B: Der Pfeil weist auf die *waste bags*. C und D: Vergrößerung eines Bereichs des Hodenschlauchs mit elongierten Spermatiden. C: Der Pfeil weist auf einen Individualisierungskomplex. E und F: Vergrößerung eines Bereichs des Hodenschlauchs mit *waste bags*. E: Der Pfeil weist auf einen zerfallenden Individualisierungskomplex am Schwanzende des Spermatidenbündels. G und H: Samenblase. Der Pfeil in G weist auf die fluoreszierenden Spermien.

Die Fluoreszenz des CG9222-GFP-Fusionsproteins gibt einen Hinweis darauf, dass CG9222 eine Rolle während der Individualisierung spielt. Um zu untersuchen, wo genau CG9222-GFP in den Komplexen lokalisiert, wurden die transgenen Hoden mit TRITC-Phalloidin angefärbt, welches das in den Individualisierungskomplexen vorhandene F-Aktin anfärbt. Die Färbung und die Fluoreszenz des Fusionsproteins wurden mithilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie dokumentiert.

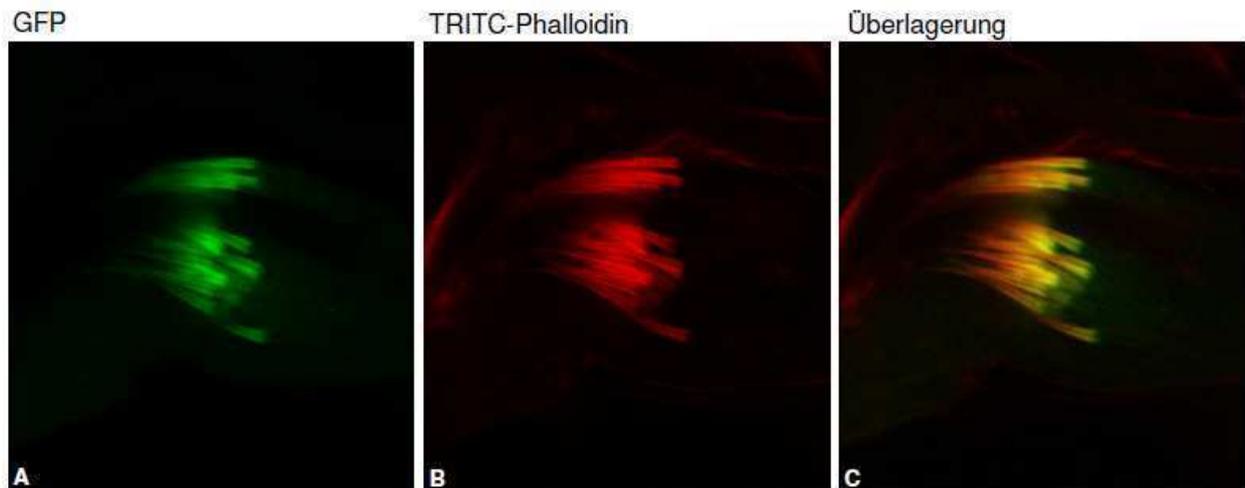


Abbildung 42: Fluoreszenz des CG9222-GFP-Fusionsproteins (A) und des durch Phalloidin angefärbten F-Aktins (B) in einem Individualisierungskomplex. C: Überlagerung der GFP- und Phalloidin-Fluoreszenz. Der Individualisierungskomplex bewegt sich von links nach rechts im Bild. Das CG9222-GFP-Fusionsprotein colokalisiert zum größten Teil mit F-Aktin. Die Aufnahmen stammen von einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop der Abteilung Zellbiologie, Universität Kassel.

Bei dem Ausschnitt in Abbildung 42 handelt es sich um einen der F-Aktin-haltigen Individualisierungskomplexe. Links im Bild befindet sich der Anteil der Spermatiden, der bereits individualisiert wurde. Die einzelnen *investment cones* sind gut erkennbar. Die Fluoreszenz des Fusionsproteins ist schwach in dem noch nicht prozessierten Spermatidenabschnitt (rechts in 42 A und C) erkennbar, nimmt in ihrer Intensität dann aber stark in den *investment cones* zu. Dort lokalisiert es zum größten Teil mit F-Aktin (in Abbildung 42 C gelb bis orange). An den Spitzen der Komplexe liegt ein Teil des Fusionsproteins vor dem nachweisbaren F-Aktin. Zu den Enden der *investment cones* hin wird die Intensität der Fluoreszenz von CG9222-GFP schwächer. In diesen Aufnahmen erscheint es, als wenn die individualisierten Spermatiden keine Fluoreszenz des Fusionsproteins mehr zeigen. Dies steht im Kontrast zu den Aufnahmen in Abbildung 41 (A und G). Es ist vorstellbar, dass die Konzentration des Fusionsproteins hier zu gering war, um sie sie mit der konfokalen Lasermikroskopie nachzuweisen.

3.7.3 Die Lokalisierung von CG9222-GFP bleibt in dem *C2-like as*-mutanten Hintergrund unverändert

Da es sich bei CG9222 vermutlich um ein Substrat der katalytischen Untereinheit C2-like handelt, wurde überprüft, ob sich die Verteilung von CG9222-GFP in den Spermatisiden in dem *C2-like as*-mutanten Hintergrund im Vergleich zum Wildtyp ändert. Im Prinzip sollte so überprüft werden, ob der mutante Phänotyp, der sich schon heterozygot manifestiert, durch eine Fehllokalisierung von CG9222 bedingt ist bzw. eine Fehllokalisierung von CG9222 auslöst. Dazu wurden durch Kreuzung Fliegen erzeugt, die jeweils heterozygot für die Integrationen *CG9222-GFP 20.1* und *C2-like as 16.1* sind. Die Hoden der entsprechenden Männchen zeigen die korrekte Lokalisierung von CG9222-GFP, wie sie in Abbildung 41 zu sehen ist. Die Überprüfung der Verteilung von CG9222-GFP in dem homozygoten *C2-like as*-Hintergrund war aufgrund der eingeschränkten Fertilität der heterozygoten *C2-like as*-Männchen nicht möglich.

3.7.4 CG14305 lokalisiert in den elongierten Spermatisiden

Für CG14305 wurde ebenfalls ein Fusionskonstrukt hergestellt. Da sich die Amplifizierung des entsprechenden Leserasters als schwierig erwies, wurde für dieses Konstrukt der cDNA-Klon AT25266 genutzt (Stapleton *et al.*, 2002). Er enthält das gesamte offene Leseraster von *CG14305*, sowie die 5' und die 3' UTR. Zunächst wurde ein etwa 1 kb großer Promotorbereich und die 208 nt lange 5' UTR mit den Primern *CG14305 pro 1* und *CG14305 pro 2* sowie der Phusion-Polymerase auf genomischer DNA amplifiziert und in den Vektor pGem-T kloniert. Diese Sequenz wurde anschließend gerichtet über die Schnittstellen für *SacI* und *SacII* in den Vektor pBluescript KS (-) kloniert. Über interne Schnittstellen für die Enzyme *AflIII* und *PstI* wurde ein Ausschnitt von AT25266 hinter den Promotor kloniert. Dabei durfte der Klon mit der Promotorsequenz nur teilweise gespalten werden, da diese eine weitere *PstI*-Schnittstelle enthielt. Die gesamte Sequenz wurde anschließend über *SacI* und *PstI* aus pBluescript KS (-) ausgeschnitten und ungerichtet in den mit *PstI* geöffneten P-Element-Vektor pUASTgreen kloniert. Die Richtigkeit des Konstruktes wurde durch Sequenzierung überprüft. Da die Klonierung nur über eine der internen *PstI*-Schnittstellen möglich war, fehlen dem Protein die letzten 50 AS des Leserasters. Nach der Keimbahntransformation und der Etablierung transgener Linien wurden die Hoden aus transgenen Männchen präpariert und unter dem Mikroskop betrachtet.

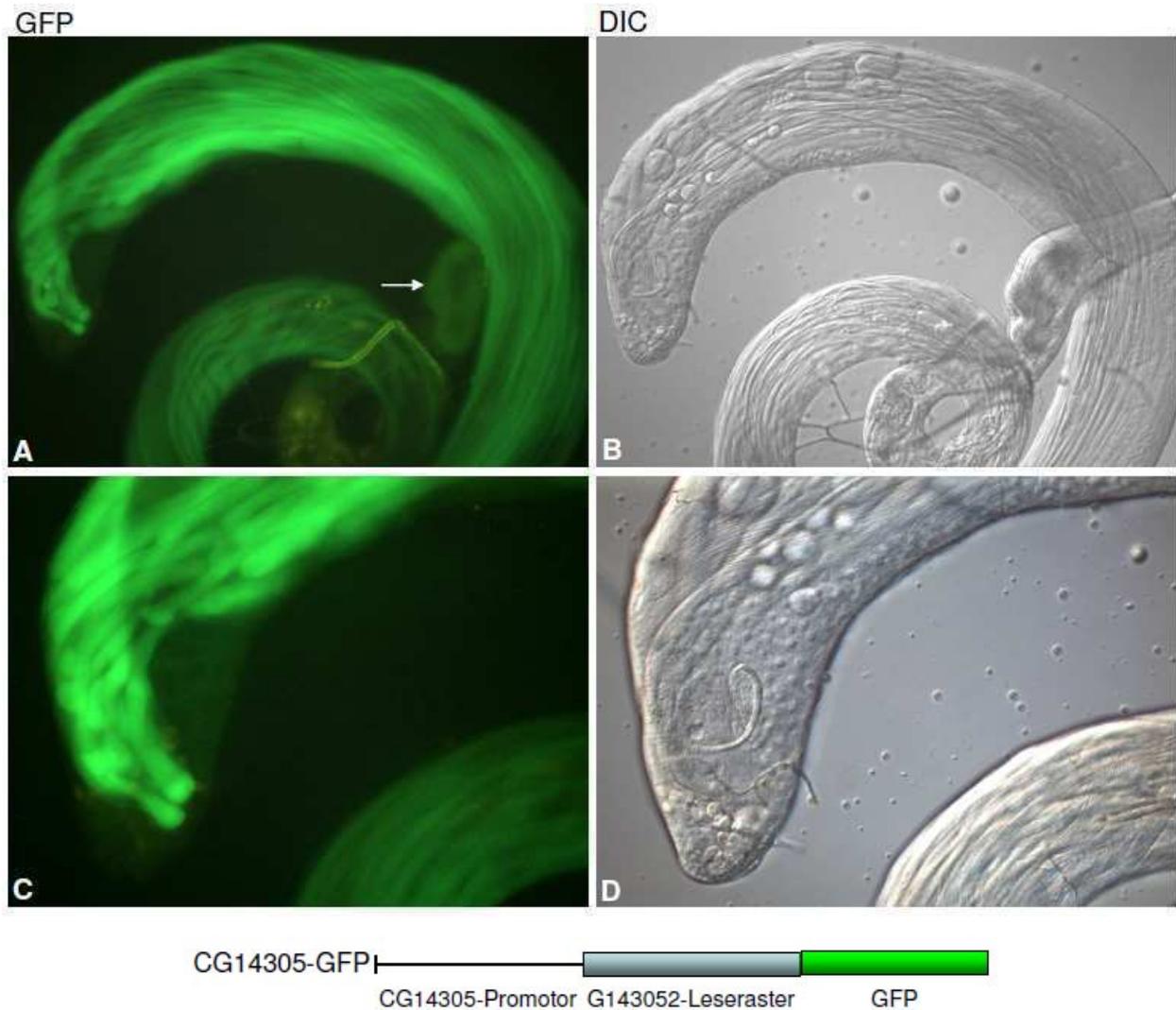


Abbildung 43: Fluoreszenz des CG14305-GFP-Fusionsproteins im *Drosophila*-Hoden. A und B: Übersicht über einen Hodenschlauch. Fluoreszenz hauptsächlich in den elongierten Spermatisden und den Spermien in der Samenblase. Der Pfeil weist auf die Samenblase. C und D: Vergrößerung der Hodenspitze zeigt, dass auch die frühen Spermatogenese-Stadien Fluoreszenz aufweisen.

In der Abbildung 43 sind die entsprechenden Aufnahmen gezeigt. In Abbildung 43 A ist zu erkennen, dass das Fusionsprotein hauptsächlich in den elongierten Spermatisden exprimiert wurde. Dabei erschien die Fluoreszenz in den jüngeren elongierenden Spermatisden, die sich in der inneren Kurve des Hodenschlauchs befinden am intensivsten. Die älteren Stadien zeigten dann eine ähnlich starke Fluoreszenz wie die reifen Spermien in der Samenblase (Pfeil in Abb. 43 A), was darauf hindeuten könnte, dass CG14305 für die Funktion des Spermiums eine Rolle spielt. In Abbildung 43 C ist darüber hinaus zu erkennen, dass auch schon die frühen Stadien eine schwache Fluoreszenz aufwiesen. Es ist möglich, dass das Expressionsmuster des Fusionsproteins nicht vollständig mit dem des endogenen Proteins übereinstimmt, da sich in den fehlenden 50 AS Elemente befinden können, die eine weitere intrazelluläre Lokalisierung vermitteln.

3.7.5 Sowohl *CG9222*- als auch *CG14305-RNAi* führt zu Sterilität der mutanten Männchen

Zur Erzeugung eines mutanten Phänotyps wurde das GAL4/UAS-System herangezogen (siehe 6.3.6). Als Effektorlinien wurden UAS-*CG9222-RNAi* und UAS-*CG14305-RNAi* und als Treiberlinien *orb*-, *otu*-, *nos*- und *bam*-GAL4 ausgewählt. Die Promotoren aus den Treiberlinien sind unterschiedlich stark und zu unterschiedlichen Phasen der Spermatogenese aktiv. Das Ausmaß der Aktivität der Promotoren während der Spermatogenese wurde durch Kreuzung mit der Linie UAS-GFP 28 (x) untersucht (Daten nicht gezeigt). *Orb* steht für *oo18 RNA binding protein* und der entsprechende Promotor ist in der Spermatogenese während des Spermatozytenstadiums aktiv (Lantz *et al.*, 1992). Von den vier verwendeten Promotoren ist dieser der stärkste. *Otu* steht für *ovarian tumor* (Mulligan *et al.*, 1988). Dieser Promotor ist in der Spermatogenese sehr schwach und ab dem Stadium der Spermatogonien aktiv. *Nos* steht für *nanos*. Für dieses Protein wurde in Bhat (1999) eine Rolle während der Spermatogenese beschrieben. Die Fluoreszenz des GFP unter *nos*-Promotor-Kontrolle zeigt sich schwach in der Hodenspitze im Bereich der Spermatogonien. *Bam* steht für *bag of marbles* (Gönczy *et al.*, 1997). Das GFP unter Kontrolle des *bam*-Promotors wurde, wie es auch schon bei dem *orb*-Promotor der Fall war, in den Spermatozyten exprimiert. Die Fluoreszenz erschien hier allerdings schwächer.

Im Anschluss an die entsprechenden Kreuzungen wurden die männlichen Nachkommen, die jeweils eine Kopie des Treiber- und des Effektor-Konstrukts trugen, auf ihre Fertilität hin untersucht. Das Ergebnis ist in der Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Ergebnisse der Fertilitätstests für *CG9222-RNAi* und *CG14305-RNAi* unter der Kontrolle verschiedener spezifischer Promotoren.

spezifischer Promotor	<i>CG9222-RNAi</i> : fertile ♂	<i>CG14305-RNAi</i> : fertile ♂
<i>orb</i>	0 von 10	0 von 10
<i>otu</i>	8 von 10	7 von 10
<i>nos</i>	3 von 10	6 von 10
<i>bam</i>	5 von 5	5 von 5

Überraschenderweise führten die Promotoren von *orb* und *bam* zu ganz unterschiedlichen Effekten. Während die Expression von sowohl *CG9222*- als auch *CG14305-RNAi* unter *orb*-Promotor-Kontrolle in absoluter Sterilität der Männchen resultierte, zeigten die gleichen RNAi-Konstrukte unter *bam*-Promotor-Kontrolle keinen Effekt auf die Spermatogenese.

CG9222- und CG14305-RNAi unter der Kontrolle der Promotoren für *nos* und *otu* führten nur bei einem Teil der Männchen zu Sterilität.

Für den Nachweis einer Reduktion der mRNA von CG9222 bzw. CG14305 wurden Northern-Analysen durchgeführt. Die Membranen enthielten die mRNA von Wildtyp-Männchen sowie den männlichen Nachkommen aus den GAL4/UAS-Kreuzungen.

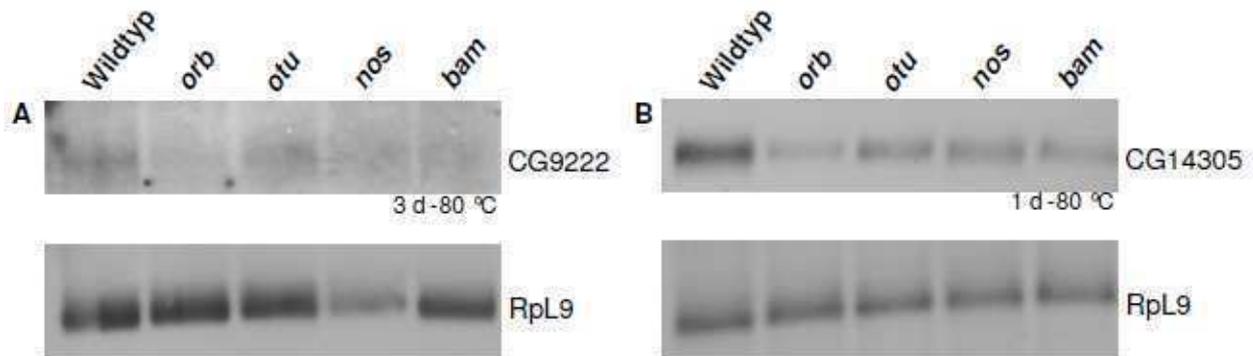


Abbildung 44: Northern-Hybridisierung mit den Sonden FG2207 (CG9222; A) und FG2114 (CG14305; B). Für die CG9222-Northern-Sonde FG2207 (siehe Abb. 40) wurde die entsprechende Sequenz aus FG2103 über die Schnittstellen für *Apal* und *PstI* gerichtet in *T3*-Orientierung in den Vektor pBluescript KS (-) kloniert. Die für die *in vitro*-Transkription erforderliche Linearisierung erfolgte mit *Apal*. Bei Transkription wurde die *T7*-RNA-Polymerase verwendet. Sonde FG2114: siehe Abb. 40. Die Hybridisierungen erfolgten auf Membranen mit mRNA aus *OregonR*-Männchen sowie männlichen Nachkommen aus den Kreuzungen der Treiberlinien *orb*-, *otu*-, *nos*- und *bam*-*GAL4* mit *UAS*-CG9222-RNAi (A) bzw. *UAS*-CG14305-RNAi Linien (B). Die Exposition erfolgte für 3 d (A) bzw. 1 d (B) bei -80 °C. Als Ladekontrolle diente die Hybridisierung mit der Sonde Rpl9 (Schmidt *et al.*, 1996; mit *SacII* linearisiert).

In der jeweiligen Wildtypspur sind die Transkripte für CG9222 bzw. CG14305 zu erkennen (Abb. 44). Die Expression von CG9222-RNAi unter *orb*-Promotor-Kontrolle führte zu der stärksten Reduktion, die unter *otu*-Promotor-Kontrolle zur geringsten Reduktion des CG9222-Transkripts (Abb. 44 A). Das Signal in der *otu*-Spur entsprach in seiner Stärke in etwa dem Wildtyp. Die Reduktion des Transkripts für die Kreuzungen mit *nos*-GAL4 schien ebenfalls nicht so stark zu sein, wenn man die Beladungskontrollen miteinander vergleicht.

Die Reduktion des Transkripts in *bam*-GAL4; *UAS*-CG9222-RNAi-Männchen war nur etwas schwächer als in den *orb*-GAL4; *UAS*-CG9222-RNAi-Männchen. Dies ist überraschend, da erstere vollkommen fertil, letztere alle steril waren. Wie schon zuvor bei den Fertilitätstests entsprach auch das Ergebnis der Northern-Hybridisierungen für die Kreuzungen der *UAS*-CG14305-RNAi-Linie mit den vier Treiberlinien in etwa dem der Kreuzungen mit der *UAS*-CG9222-RNAi-Linie (Abb. 44 B).

Nach den Fertilitätstests und Northern-Hybridisierungen sind zwei Dinge sehr auffällig. Das erste ist, dass die Expression von *UAS*-CG9222-RNAi und *UAS*-CG14305-RNAi abhängig von dem jeweiligen Treiber genau das gleiche Verhalten zeigen. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass beide Gene zur gleichen Zeit und in dem gleichen Ausmaß transkribiert

werden. Das zweite ist, dass die beiden Promotoren *orb* und *bam* zwar zur gleichen Zeit während der Spermatogenese aktiv sind, aber zu gegenteiligen Effekten führen. Die Expression der beiden RNAi-Sequenzen unter *orb*-Promotorkontrolle bewirkt komplette Sterilität, unter *bam*-Promotorkontrolle jedoch beobachtet man gar keinen Effekt. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Promotoren ist, dass *orb* stärker ist als *bam*. Somit könnte es sein, dass einer der Prozesse, an dem CG9222 oder CG14305 beteiligt ist, eine bestimmte Konzentration des jeweiligen Proteins benötigt, um korrekt abzulaufen. Sobald dieser Schwellenwert nicht erreicht ist, führt das zu Sterilität. In welchen Stadien der Promotor aktiv ist, wurde, wie bereits oben erwähnt, durch Kreuzung der jeweiligen Treiberlinie mit *UAS-GFP 28 (x)* ermittelt. Dabei konnte aber nur der Startpunkt der Transkription zweifelsfrei identifiziert werden. Wie lange seine Aktivität anhält, kann nicht bestimmt werden. Neben dem Startpunkt der Transkription spielt aber auch die Stabilität der RNAi-Sequenz eine Rolle. Die Transkription der entsprechenden Sequenzen unter *otu*- und *nos*-Promotorkontrolle beginnt schon in den Spermatogonien. Dass bei diesen Männchen nur zum Teil Sterilität auftritt, könnte damit zusammenhängen, dass das RNAi zu früh transkribiert wurde. Zu dem Zeitpunkt, an dem dann die Transkription von CG9222 und CG14305 beginnt, ist nur noch wenig von der RNAi-Sequenz intakt, so dass es nur zu einer geringen Reduktion der entsprechenden mRNA und somit zu einem schwach ausgeprägten mutanten Phänotyp kommt.

Einige Hoden von *orb-GAL4; UAS-CG9222-RNAi*- und *orb-GAL4; UAS-CG14305-RNAi*-Männchen wurden präpariert und nachfolgend die DNA mit Hoechst 33258 und F-Aktin mit TRITC-Phalloidin gefärbt. Sowohl die durch die Hoechst-Färbung markierten Kerne als auch die durch Phalloidin markierten Individualisierungskomplexe entsprechen dem Wildtyp. Damit scheint die Reduktion keinen Effekt auf diese Aspekte der Spermiogenese zu haben. Überraschend ist, dass obwohl CG9222-GFP an den Individualisierungskomplexen lokalisiert, diese nach der Reduktion des Proteinlevels weiterhin intakt sind. Die in Abbildung 45 gezeigten *orb-GAL4; UAS-CG14305-RNAi*-Hoden hingegen zeigen einen Effekt auf die Bildung der Individualisierungskomplexe. In den Abbildungen 45 A bis C ist die Übersicht über einen Wildtyp-Hoden, in D bis F über einen mutanten Hoden gezeigt. Die Hoechst-Färbung der Mutante (E) entspricht der des Wildtyps (B). Die Phalloidin-Färbung hingegen offenbart, dass in der Mutante (F) im Gegensatz zu dem Wildtyp (C) die Individualisierungskomplexe fehlen. Bei Vergrößerungen des terminalen Bereichs der Hodenschläuche der Wildtyps (Abb. 45 G bis I) und der Mutante (Abb. 45 J bis L) weisen Pfeile auf die typischen pfeilförmig angeordneten Kerne der elongierten Spermatiden (H, Wildtyp und K, Mutante) sowie auf einen, nur im Wildtyp vorhandenen Individualisierungskomplex (I). Die Reduktion der CG14305-Protein-Konzentration bewirkt also, dass diese Komplexe nicht ausgebildet werden können.

Es findet keine Individualisierung statt. Dementsprechend liegen in der Mutante keine reifen Spermien in der Samenblase vor (Pfeile in A, Wildtyp und D, Mutante).

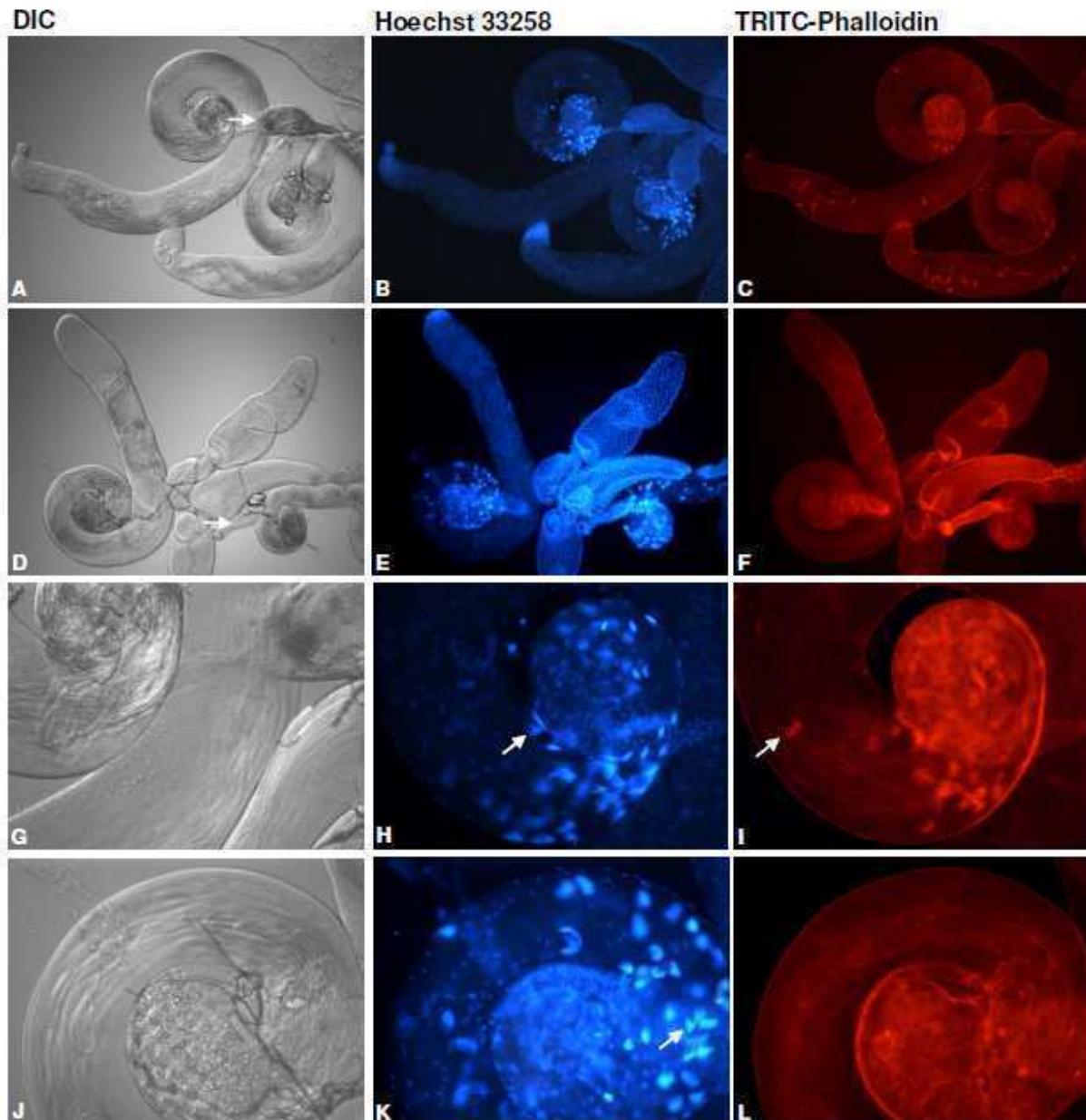


Abbildung 45: Hoechst- und Phalloidin-Färbungen von *orb-GAL4; UAS-CG14305-RNAi*-Hoden im Vergleich zu *w¹¹⁸*-Hoden. A-C: Übersicht über einen *w¹¹⁸*-Hoden. D-F: Übersicht über den Hoden eines *orb-GAL4; UAS-CG14305-RNAi*-Männchens. G-I: Vergrößerung der terminalen Region des *w¹¹⁸*-Hodens. H: Pfeil zeigt auf die nadelförmigen Kerne der elongierten Spermatisden. I: Pfeil zeigt auf einen Individualisierungskomplex. J-L: Vergrößerung der terminalen Region des Hodens eines *orb-GAL4; UAS-CG14305-RNAi*-Männchens. K: Der Pfeil verweist erneut auf die in einer pfeilförmigen Struktur zusammen gelagerten Spermatisdenkerne. L: Es sind keine Individualisierungskomplexe vorhanden.

4. Diskussion

4.1 C3-Isoformen zeigen ein differenziertes Expressionsmuster in der Spermatogenese

Neben den bereits bekannten C3-Isoformen C3 A und C3 B konnte in dieser Arbeit eine weitere identifiziert werden, der das dritte Exon von C3 B fehlt und die als C3 B' bezeichnet wird. Von diesen drei Isoformen werden nur C3 B' und C3 B hodenspezifisch exprimiert. Dabei weisen die beiden Isoformen unterschiedliche Expressionsmuster auf. GFP-C3 B wurde schwach in den frühen Stadien der Spermatogenese exprimiert. Die Fluoreszenz erschien in den elongierten Spermatiden etwas intensiver, was wahrscheinlich von einer Akkumulation des bis dahin exprimierten Fusionsproteins herrührte. GFP-C3 B' dagegen zeigte ein zweipfeliges Expressionsmuster. Die Konzentration des Fusionsproteins war sowohl während einer kurzen Phase des Spermatogonien-Stadiums als auch spät in den elongierten Spermatiden, die noch nicht individualisiert wurden, stark erhöht. In den Stadien dazwischen war nur eine schwache Fluoreszenz auszumachen. Dies weist darauf hin, dass C3 B' eventuell zu zwei verschiedenen Zeitpunkten in der Spermatogenese eine Rolle spielt. Mit der Individualisierung wurde das Fusionsprotein entweder zum größten Teil abgestreift oder aber es wurde schnell abgebaut, sodass die reifen Spermien in der Samenblase nur noch eine schwache Fluoreszenz zeigten. Letzteres war aber auch für das Reporter-Konstrukt der Fall, bei dem GFP allein unter Kontrolle des *c3*-Promotors exprimiert wurde. Die geringe Fluoreszenz reflektiert entweder einfach die geringe Menge an verbleibendem Cytoplasma oder eine mögliche Funktion von C3 B' zu einem späteren Zeitpunkt.

Gesetzt den Fall, dass die *c3 B'*-mRNA langlebig ist und über die Meiose erhalten bleibt, können die variierenden Proteinniveaus entweder durch Modifikationen in der Translations-effizienz oder in der Proteinstabilität zustande kommen. Sollte die mRNA jedoch vor der Meiose abgebaut werden, müsste es für die zweite Translationswelle postmeiotisch zu einer *de novo*-Transkription kommen. Welche der beiden Möglichkeiten zutrifft, könnte mit einer *in situ*-Hybridisierung untersucht werden. Im ersten Fall würde man erwarten, dass alle Stadien von den Spermatogonien an gefärbt sind. Für den zweiten Fall könnte analog zu der GFP-Fluoreszenz eine Färbung in Spermatogonien und dann erst wieder in Spermatiden beobachtet werden. Der zweite Fall ist der weitaus seltenere. Mit Ausnahme von *hsr-omega*, *Hsp70* und der *comets and cups*-Gene werden alle Transkripte, die nach Beginn der Meiose benötigt werden, in den Spermatogonien und Spermatocyten transkribiert und anschließend unter Translationskontrolle gestellt (Barreau *et al.*, 2008; White-Cooper 2010). Die Gruppe um Timothy L. Karr wies 2010 direkt nach, dass es *de novo*-Transkription in Spermatiden gibt (Vibrantovski *et al.*, 2010).

Es ist bekannt, dass während der Spermatogenese und Oogenese komplexe Genregulationsphänomene zur Wirkung kommen, die Transkriptions- und Translationsaktivität entkoppeln und damit die Korrelation von RNA- und Proteinmenge aufheben (Kuersten und Goodwin, 2003; Hempel *et al.*, 2006). Ein besonders extremes Beispiel ist das der negativen Translationskontrolle, bei dem Transkriptionszeitpunkt und Translationszeitpunkt komplett voneinander getrennt sind. Für viele testisspezifische Gene konnte negative Translationskontrolle bereits nachgewiesen werden. Darunter zum Beispiel die Mitglieder der *Mst(3)CGP*-Genfamilie, das Gen *Mst77F* und die Gene für die Protamine A und B (Schäfer *et al.*, 1990; Schäfer *et al.*, 1993; Gigliotti *et al.*, 1997; Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Das Gen *Mst87F*, welches für ein Strukturprotein des Spermienschwanzes kodiert, ist ein Mitglied der *Mst(3)CGP*-Familie. Die 5' UTR des Transkripts enthält das Translationskontrollelement TCE. Dies bewirkt, dass die entsprechende mRNA nach der Transkription von einem dynamischen Proteinkomplex eingebunden wird, der die Translation bis hinein in das Spermatidenstadium verhindert (Kempe *et al.*, 1993). Im Gegensatz dazu konnte für C3 B' eine mehrfache Veränderung des Proteinniveaus über die gesamte Spermatogenese beobachtet werden, bei der negative Translationskontrolle nicht beteiligt zu sein scheint. Die Kontrolle muss dabei ebenfalls von einem Element aus der 5' UTR vermittelt werden, da die 3' UTR nicht in dem *GFP-C3 B'*-Transgen enthalten ist.

Ein weiterer Aspekt der Entkopplung von Translation und Transkription wurde aus dem RNase H- Experiment ersichtlich, bei dem durch Zugabe eines oligo d(T)-Primers das Poly(A)-Ende der mRNA entfernt wurde. Es zeigte, dass das *c3 B*-Transkript in wesentlich höherer Konzentration vorlag als das *c3 B'*-Transkript. Letzteres konnte mithilfe einer Northern-Hybridisierung überhaupt nicht nachgewiesen werden. Da die Ergebnisse der GFP-Fusionen darauf hinweisen, dass C3 B' stärker exprimiert wird als C3 B, wird das *c3 B*-Transkript wahrscheinlich schlechter zugänglich für die Translation sein als das *c3 B'*-Transkript. Der Unterschied der beiden Transkripte besteht darin, dass *c3 B'* das dritte Exon von *c3 B* fehlt. So könnte es möglich sein, dass dieses Exon die Effizienz der Translation von C3 B herabsetzt, indem es zum Beispiel die Bindung an einen entsprechenden Proteinkomplex vermittelt. In diesem Fall wird Translation nicht auf zeitlicher Ebene kontrolliert, wie es bei der negativen Translationskontrolle der Fall ist, sondern auf der Ebene der Effizienz. Eine andere Möglichkeit wäre, dass das zusätzliche Exon auf der Proteinebene eine verminderte Stabilität von C3 B hervorruft.

Das zweigipfelige Expressionsmuster der *GFP-C3 B'*-Fusion gibt einen Hinweis darauf, dass C3 B' möglicherweise zwei unterschiedliche Funktionen in der Spermatogenese hat. Diese

wären dann zeitlich voneinander getrennt, indem C3 B' einen Prozess während des Spermatogonien-Stadiums, zum Beispiel die Anzahl der mitotischen Teilungen, und einen anderen während der Spermiogenese in den elongierten Spermatiden mit reguliert. Eine andere Möglichkeit ist, dass zwei unterschiedliche Funktionen durch Kompartimentalisierung voneinander getrennt sind, wie es für das 24,5 kDa schwere Linker-Histon-ähnliche Protein Mst77F nachgewiesen werden konnte. Eine Mst77F-GFP-Fusion zeigte, dass es ab dem Kanu-Stadium sowohl im Kern als auch in den Flagellen der elongierten Spermatiden exprimiert wird. Die Bezeichnung Kanu-Stadium bezieht sich auf die Kernmorphologie. Während der Spermiogenese wird der bis dahin runde Kern durch mikrotubuli-abhängige Prozesse in einen nadelförmigen umgebildet. Während einer Phase der Kernumformung erscheint der Kern kanu- oder auch bananenförmig. Diese Phase ist außerdem dadurch charakterisiert, dass hier die Histone gegen Transitionsproteine und anschließend gegen die Protamine A und B ausgetauscht werden, um so eine maximale Chromatin-Kondensierung zu erreichen (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005; Rathke *et al.*, 2007). Die Fluoreszenz von Mst77F-GFP ist ab diesem Stadium bis nach der Befruchtung in den Kernen sichtbar, wohingegen die Fluoreszenz in den Flagellen bis kurz vor der Individualisierung der Spermatiden beobachtet werden kann (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Darüber hinaus zeigten entsprechende Antikörper-Färbungen, dass Mst77F sowohl eine Chromatin-Komponente darstellt als auch mit den Mikrotubuli während der Kernumformung assoziiert ist (Rathke *et al.*, 2010). Mutanten zeigen eine fehlerhafte Kernumformung, instabile perinukleäre Mikrotubuli aber keinen Defekt bei der Chromatin-kondensierung (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005; Rathke *et al.*, 2010). Damit ist gezeigt, dass Mst77F zumindest bei zwei verschiedenen spezifischen Prozessen eine Rolle spielt.

4.2 Mögliche Paarungen der verschiedenen PKA-Untereinheiten in Keim- und Zystenzellen während der Spermatogenese

In Gustke (2006) wurde bereits gezeigt, dass die PKA-Untereinheiten R2, C2 und C2-like im Hoden exprimiert werden. Dabei werden C2 und C2-like ab einem frühen Stadium der Spermatogenese in den Keimzellen synthetisiert. R2 wird sowohl schwach in den Keimzellen als auch etwas stärker in den die Keimzellen umschließenden Zystenzellen exprimiert. Wie bereits oben erwähnt, sind die beiden hodenspezifischen C3-Isoformen in den Keimzellen aktiv. Daneben konnten auch die zweite regulatorische Untereinheit R1 sowie die verbleibende katalytische Untereinheit C1 im Hodengewebe nachgewiesen werden. Für C1 konnte gezeigt werden, dass sie zum einen in den Spermatogonien und zum anderen in den die elongierten

Spermatiden umgebenden Zystenzellen exprimiert wird. Das deutet darauf hin, dass auch C1 in der Spermatogenese an mindestens zwei Prozessen beteiligt ist. Das *R1-GFP*-Reporter-Konstrukt bewies, dass der *r1*-Promotor in den prämeiotischen Stadien in den Keimzellen aktiv ist. R1 kommt somit als Interaktionspartner für alle während der Spermatogenese exprimierten katalytischen Untereinheiten infrage. Durch die BRET-Analysen kann eine Holoenzym-Ausbildung mit C2, C3 B' und C2-like ausgeschlossen werden. Für C1 ist eine Interaktion in den Spermatogonien, sowie mit C3 B während der gesamten Spermatogenese in den Keimzellen möglich. Auch R2 wird schon in den Spermatogonien exprimiert und könnte dort, wie ebenfalls durch die BRET-Analysen bestätigt, mit C1, C2-like und C3 B interagieren. Daneben spielt R2 zusammen mit C1 eine Rolle in den Zystenzellen, die die elongierten Spermatiden umgeben.

Die Reduktion von R2 durch das spermatogenesespezifisch exprimierte *R2 RNAi*-Transgen führte schon bei den für das Transgen heterozygoten Männchen zu einer stark eingeschränkten Fertilität. Die Reduktion einer regulatorischen Untereinheit führt dazu, dass ein Teil der von dieser regulierten katalytischen Untereinheiten nicht mehr inhibiert werden kann. Die so frei vorliegenden C-Untereinheiten sind zum einen weniger vor dem Abbau geschützt und zum anderen ständig katalytisch aktiv. Die Ursache für die eingeschränkte Fertilität der *R2 RNAi*-transgenen Männchen konnte auf zytologischer Ebene nicht gefunden werden. Die Kernmorphologie, sowie die Ausbildung der Individualisierungskomplexe erschienen wie im Wildtyp und auch die reifen Spermien, die sich in den weiblichen Speicherorganen befanden, entsprachen in ihrer Beweglichkeit und in ihrer Haltbarkeit dem Wildtyp. Da R2 in den Keimzellen sowohl mit C1, C2-like, als auch C3 B interagieren könnte, ist es nicht möglich zu bestimmen, welche der drei katalytischen Untereinheiten zu dem mutanten Phänotyp beiträgt. Möglicherweise ist es eine Kombination aus allen dreien. In den Zystenzellen kommt nur eine Komplexbildung von R2 mit C1 infrage. Sollte bei einer zystenzellspezifischen Expression des *R2 RNAi*-Konstrukts, zum Beispiel mit Hilfe des GAL4-UAS-Systems und einem PPY-Treiber, ebenfalls eine Beeinträchtigung der männlichen Fertilität zu beobachten sein, wäre das ein Nachweis dafür, dass R2 tatsächlich mit C1 interagiert und dass beide eine Funktion während der Spermiogenese in den Zystenzellen haben.

Wenn man die beiden katalytischen Untereinheiten, C2 und C3 B', außer Acht lässt, da diese bei den BRET-Analysen mit keiner der beiden regulatorischen Untereinheiten interagieren konnten, so gibt es lediglich zwei hodenspezifische Untereinheiten: C2-like und C3 B. Für kein anderes Gewebe in *Drosophila* sind spezifische Untereinheiten bekannt. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die C3 A sowohl in den Restkörpern von Männchen und Weibchen, so wie in den Ovarien exprimiert wird, C3 B hingegen nur im Testis. Analog dazu wird

die Ca Isoform in Säugern ubiquitär exprimiert, die Splicevariante Ca-s aber nur während der Spermatogenese und in reifen Spermien (Uhler *et al.*, 1986; San Agustin *et al.*, 1998). Das gleiche gilt auch für die aus Säugern bekannte spermien-spezifische R-Untereinheit R1 α 1c (Dahle *et al.*, 2001). Die Untersuchungen, die in Gustke (2006) und in dieser Arbeit zu den *Drosophila* PKA-Untereinheiten R1 und R2 durchgeführt wurden, können keinen Aufschluss darüber geben, ob es sich bei den im Hoden exprimierten Isoformen um hodenspezifische oder um ubiquitär exprimierte Splicevarianten handelt. Die GFP-Fusionskonstrukte für R2 enthielten die Sequenz der drei längsten R2-Transkripte, die alle zu ein und derselben Isoform führen und das *R1-GFP*-Reporterkonstrukt enthält lediglich den Promotorbereich des entsprechenden Gens. Mithilfe der RT-PCR mit transkriptspezifischen Primern, von Northern-Hybridisierung oder von *in situ*-Hybridisierungen mit transkriptspezifischen Sonden könnte man untersuchen, in welchen Geweben die einzelnen Isoformen exprimiert werden.

4.3 C2-like, aber nicht C2, ist eine katalytische Untereinheit der PKA

Sowohl die BRET-Analysen mit den beiden katalytischen Untereinheiten C2 und C2-like als auch die entsprechenden Antisense- und RNAi-Konstrukte wiesen darauf hin, dass es sich bei C2-like um eine katalytische Untereinheit der PKA handelt, bei C2 jedoch nicht. C2-like war nämlich in der Lage, mit R2 zu interagieren, C2 dagegen interagiert weder mit R1 noch mit R2. Auch C2 (-5), eine Isoform von C2, die in Folge alternativen Splicens einen anderen C-Terminus als C2 aufweist, konnte mit keiner der beiden regulatorischen Untereinheiten einen Komplex ausbilden.

Die Reduktion der *c2-like*-mRNA durch das *C2-like as*-Konstrukt führte zu männlicher Sterilität. Diese wurde durch schwerwiegende Defekte während der Differenzierungsphase am Ende der Spermatogenese verursacht. Die Kerne der elongierten Spermatozoen erlangen nicht ihre typische nadelförmige Struktur und es findet keine Individualisierung statt. Durch das *C2-like as*-Konstrukt wurde nicht die gesamte Menge an *C2-like*-Transkript abgebaut. Das heißt, dass auf jeden Fall noch funktionelles C2-like-Protein im Hoden der transgenen Männchen vorliegt. Die verbleibende Menge ist aber offenbar nicht ausreichend für eine korrekt ablaufende Spermatogenese. Demnach muss die Funktion der C2-like enthaltenden PKA dosisabhängig sein und für die männliche Fertilität relevant. Die BRET-Analysen deuten stark darauf hin, dass C2-like eine aktive katalytische Untereinheit der PKA ist. Für den Beweis, dass es auch seine Substrate phosphorylieren kann, muss das Protein aufgereinigt und anschließend in Aktivitätstests eingesetzt werden.

Die Auswirkungen des C2 as-Konstrukts auf die c2-mRNA waren im Vergleich zu dem C2-like as-Konstrukt wesentlich stärker. Das c2-Transkript konnte durch eine Northern-Hybridisierung nicht mehr nachgewiesen werden. Dennoch konnte keine Beeinträchtigung der Spermatogenese beobachtet werden. Dass die Verringerung des Transkripts zu keinem Phänotyp führt, heißt aber nicht zwangsläufig, dass C2 keine Funktion hat. Es ist möglich, dass noch eine geringe Konzentration an mRNA vorlag und dass die daraus hervorgehende geringe Proteinmenge ausreichend war, um eine normale Spermatogenese aufrecht zu erhalten. Die andere Möglichkeit ist, dass C2 zwar eine Funktion während der Spermatogenese hat, diese aber nicht essentiell ist.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei C2-like, jedoch nicht bei C2 um eine katalytische Untereinheit der PKA handelt, ergibt sich aus Sequenzanalysen der bei FlyBase angegebenen Orthologen aus den anderen bisher vollständig sequenzierten *Drosophila*-Arten *D. simulans*, *D. sechellia*, *D. yakuba*, *D. erecta*, *D. ananassae*, *D. pseudoobscura*, *D. persimilis*, *D. willistoni*, *D. mojavensis*, *D. virilis* und *D. grimshawi*. Generell liegen die beiden entsprechenden Gene wie bei *D. melanogaster* hintereinander in den Genomen vor. Die Intron/Exon-Organisation sowie die Transkript- und Proteinlängen sind für die Orthologen allerdings nur sehr provisorisch analysiert und deswegen nicht mit den deutlich besser abgesicherten Daten bei *D. melanogaster* gleichzusetzen. So sind zum Beispiel die Transkripte jeweils nur von Translationsstart bis -stopp angegeben. Es gibt keine entsprechenden ESTs, die die Transkripte stützen und Hinweise auf das Ausmaß der 5' bzw. 3' UTR geben könnten. Bei der Datenbankanalyse konnten jeweils Poly (A)-Signale entsprechend denen für C2 bzw. C2-like aus *D. melanogaster*, sowie das C2-like-Transkript B identifiziert werden. Keines der Orthologen wurde bisher auf eine Funktion hin untersucht. Ob sie in ihrer Funktion C2 und C2-like aus *D. melanogaster* entsprechen, könnte man mit folgendem Ansatz überprüfen. Ein Konstrukt, das das Gen für eines der C2-like-Orthologen enthält, wird in einen C2-like-defizienten Hintergrund gekreuzt. Wird der mutante Phänotyp dadurch gerettet, ist das Orthologe sowohl in der Lage mit der entsprechenden R-Untereinheit in den Keimzellen zu interagieren, als auch die C2-like-Substrate zu phosphorylieren.

Die Proteinsequenzen der Orthologen weisen darauf hin, dass C2-like innerhalb der *Drosophila*-Arten höher konserviert ist als C2. C2-like aus *D. melanogaster* ist mit seinen Orthologen der nächst verwandten Arten *D. simulans* und *D. sechellia* identisch, während die C2-Orthologen dort schon Abweichungen von einem bzw. zwei Prozent aufweisen. Die Orthologen aus der von *D. melanogaster* am weitesten entfernten Art *D. grimshawi* zeigen für C2-like noch eine Übereinstimmung von 79 % für C2 aber nur noch von 71 %. Die Daten für die restlichen Arten befinden sich im Anhang. Die höhere Variabilität weist neben den fehlen-

den mutanten Phänotypen der *C2 as-* und *C2 as short*-transgenen Fliegen darauf hin, dass C2 möglicherweise keine essentielle Rolle für die Spermatogenese hat.

Dass C2 trotz alledem eine Funktion haben könnte, zeigt sowohl die Analyse der GFP-Fusionskonstrukte, die eine deutliche Fluoreszenz über die gesamte Spermatogenese hinweg aufweisen, als auch die Veröffentlichung von Gao *et al.* (2008), die neben den erfolgversprechenden Kandidaten für C2-like (siehe unten) auch zahlreiche potentielle Substrate für C2 auflistet. Außerdem konnte gezeigt werden, dass C2 einen Einfluss auf den Zellzyklus von *Drosophila* S2-Zellen hat (Bettencourt-Dias *et al.*, 2004).

4.4 PKA-C2-Isoformen und PKA-C3 B' könnten Pseudokinasen sein

Obwohl die BRET-Analysen C2, C2 (-5) und C3 B' als funktionelle katalytische Untereinheiten der PKA ausschließen, könnte es sich dennoch um funktionelle Proteine handeln. Proteine mit einer Proteinkinasedomäne, die Mutationen in den für die Phosphorylierung notwendigen Motiven aufweisen, werden als Pseudokinasen bezeichnet. Man hat inzwischen einige Pseudokinasen gefunden, die trotz dieser Mutationen in der Lage sind, ihre Substrate zu phosphorylieren. So zum Beispiel die membran-assoziierte Guanylatkinase (MAGUK) CASK, die neben den typischen MAGUK-Domänen N-terminal eine Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaM)-Kinasedomäne hat. Das DFG-Motiv der Kinasedomäne, welches die Bindung von Mg^{2+} vermittelt und damit für die Aktivität essentiell ist, weist eine Mutation auf. Normalerweise spielt das Magnesium eine Rolle bei der Positionierung des ATP, so dass das γ -Phosphat auf das Substrat übertragen werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass CASK trotz der Mutation im DFG Motiv in der Lage ist, seine Substrate, wie zum Beispiel das Protein Neurexin-1, mithilfe eines Mg^{2+} -unabhängigen Mechanismus zu phosphorylieren (Mukherjee *et al.*, 2008).

Andere Pseudokinasen haben ihre eigentliche Funktion, ihre Substrate zu phosphorylieren, verloren, sind aber dennoch als Regulatoren in der Signaltransduktion unerlässlich. So reguliert die Pseudokinase STRADalpha (STe-20 Related Adaptor) die katalytische Funktion des Tumorrepressors LBK1. Dabei bildet STRADalpha mit LBK1 und dem Gerüstprotein MO25alpha einen heterotrimerischen Komplex aus, der zusätzlich durch ATP stabilisiert wird. Auch hier wird die ATP-Bindung auf eine Mg^{2+} -unabhängige Weise vermittelt. STRADalpha nimmt eine für aktive Proteinkinasen typische geschlossene Konformation ein, bindet LBK1 als Pseudosubstrat und vermittelt so seine Aktivierung. ATP und MO25alpha

sind nötig, damit STRADalpha seine "aktive" geschlossene Konformation beibehält (Zeqiraj *et al.*, 2009a; Zeqiraj *et al.*, 2009b).

In Meléndez *et al.* (1995) wurden bereits Aktivitätstests für C2 durchgeführt. Dazu wurde das Protein in *Sf 21*-Insektenzellen exprimiert und aufgereinigt. Die Tests zeigten, dass C2 nicht in der Lage war, die Substrate Kemptide oder Histon H2B zu phosphorylieren. Falls es sich bei C2 um eine funktionelle Pseudokinase handelt, wäre es denkbar, dass seine Funktion ähnlich wie bei STRADalpha vermittelt wird. Falls C2 eine Komponente eines Proteinkomplexes ist, könnten die anderen Komponenten sowie die potentiellen Substrate in der von Gao *et al.* (2008) herausgegebenen Liste zu finden sein. Ob C3 B' als Pseudokinase noch die Fähigkeit besitzt, seine Substrate zu phosphorylieren, müsste zunächst mithilfe von Aktivitätstests überprüft werden.

4.5 CG9222 und CG14305 stellen potentielle Substrate von C2-like dar und haben eine Funktion in der Spermiogenese.

Die beiden potentiellen Substrate für C2-like, CG9222 und CG14305, gehören zu der Familie der testisspezifischen Serin/Threonin-Kinasen (TSSK). Die Kinasen dieser Familie werden entgegen ihres Namens im Säuger nicht ausschließlich im Hoden exprimiert. So wurden für TSSK 1 und TSSK 2 geringe Mengen an mRNA auch in der Bauchspeicheldrüse, im Herz, im Gehirn und in der Plazenta gefunden, für TSSK 5 sogar größere Mengen in Herz und Milz (Hao *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2007). Die beiden Homologen aus *Drosophila* sind jedoch hodenspezifisch, wie Northern- und PCR-Daten belegen. Die Expression der GFP-Fusionsproteine lässt vermuten, dass beide Proteine eine Rolle in der Spermiogenese haben. Die Fluoreszenz von CG9222-GFP ist erst ab dem Stadium der elongierten Spermatiden sichtbar. Da eine postmeiotische Transkription eher selten ist, steht das CG9222-Transkript wahrscheinlich unter negativer Translationskontrolle, die, wie oben für *Mst87F* bereits beschrieben, dadurch charakterisiert ist, dass die Transkription ausschließlich in den prämeiotischen Stadien und die Translation ausschließlich in den postmeiotischen Stadien stattfindet. In welchen Stadien die Transkription tatsächlich stattfindet und wie lange die mRNA dann stabil bleibt, könnte mit *in situ*-Hybridisierung überprüft werden. Die Translationskontrolle müsste dabei in jedem Fall von der 5' UTR des Transkripts aus vermittelt werden, da die 3' UTR nicht in dem Konstrukt integriert ist. Bekannte Elemente, wie zum Beispiel das TCE (Schäfer *et al.*, 1990) konnten nicht gefunden werden. Das lässt darauf schließen, dass ein bisher unbekanntes Element an der entsprechenden Regulierung beteiligt ist. Mit GFP-Konstrukten, die nur jeweils einen Teil der 5' UTR enthalten, könnte der Sequenzbereich eingegrenzt werden, der

die Kontrolle vermittelt. Die Erzeugung von Punktmutationen, in diesem Sequenzbereich könnte dann Aufschluss über die Nukleotide geben, die essentiell für die Kontrolle sind.

Die Masse des Fusionsproteins lokalisiert an die Individualisierungskomplexe, die sich am Ende der Spermiogenese an den Kopfenden der elongierten Spermatiden bilden, um die Cytoplasmabrücken zwischen den Spermatiden zu schließen und das überflüssige Cytoplasma abzustreifen. Das Anfärben mit dem F-Aktin-Marker TRITC-Phalloidin zeigt, dass CG9222-GFP größtenteils mit dem F-Aktin der Komplexe kolokalisiert. Diese präzise Lokalisierung lässt den Schluss zu, dass CG9222 eine Komponente des Individualisierungskomplexes ist. Der mutante Phänotyp, der durch das Zusammenkreuzen der *orb-GAL4* und *UAS-CG9222-RNAi*-Konstrukte entstand, wies trotz Sterilität allerdings noch die mit TRITC-Phalloidin-markierten Komplexe auf. Es könnte daher möglich sein, dass CG9222 an sich gar keine Komponente des ICs ist, sondern nur für Umsetzungsprozesse benötigt wird, die während der Individualisierung an den Komplexen stattfinden. Damit würden sich zwar F-Aktin-haltige ICs ausbilden und an den elongierten Spermatiden entlang wandern, ohne CG9222 würde aber mindestens ein essentieller Aspekt während der Individualisierung nicht ausgeführt werden. Das könnte darin resultieren, dass keine reifen Spermien produziert werden können und die Samenblasen der transgenen Männchen leer bleiben. Ebenfalls denkbar wäre, dass die Anhäufung von CG9222-GFP an den ICs nur eine Folge des Abstreifens dieses in hoher Konzentration vorhandenen Fusionsproteins ist. Gegen letztere Theorie spricht allerdings, dass zum Beispiel GFP unter *c3*-Promotorkontrolle sowie CG14305-GFP, die ähnlich stark oder sogar noch stärker exprimiert werden und von denen ebenfalls wenigstens ein großer Teil während der Individualisierung abgestreift wird, keine solche Lokalisierung aufweisen. Die weitere Möglichkeit ist, dass CG9222 nicht nur eine sondern mehrere Funktionen hat. So ist das Fusionsprotein schon vor der Individualisierung in den elongierten Spermatiden zu sehen, entweder weil es dort für seine spätere Funktion in den ICs gesammelt wird, oder weil es auch zu diesem Zeitpunkt schon eine Rolle spielt. Da die *CG9222*-mRNA durch die *RNAi*-Sequenz nicht vollständig reduziert wurde, könnte der Phänotyp durch eine dosisabhängige Wirkung von CG9222 erklärt werden. So könnte in den transgenen Männchen für den Aufbau der ICs noch genügend Protein zur Verfügung stehen, für eine der möglichen weiteren Funktionen aber nicht.

Im Gegensatz zu CG9222-GFP war die Fluoreszenz von CG14305-GFP schon in den prämeiotischen Stadien der Spermatogenese schwach zu erkennen. Ihre Intensität nahm in den elongierten Spermatiden stark zu. Somit unterliegt das entsprechende Transkript augenscheinlich nicht der negativen Translationskontrolle. Die höhere Konzentration könnte, wie schon zuvor für C3 B' besprochen wurde, durch eine einfache Akkumulation des Fusions-

proteins zustande gekommen sein. Oder aber, falls das Protein nicht so langlebig ist, könnten die unterschiedlichen Proteinlevels über die Translationseffizienz reguliert worden sein. In beiden Fällen hätte CG14305 im Gegensatz zu CG9222 wahrscheinlich schon mindestens eine Funktion in den frühen Stadien der Spermatogenese. Allerdings fehlen dem Fusionsprotein 50 AS des C-Terminus von CG14305. Dies könnte Einfluss auf das Expressionsmuster haben, so dass dieses Muster von dem des endogenen CG14305-Proteins abweichen könnte. So könnten die fehlenden Aminosäuren eine subzelluläre Lokalisierung des endogenen Proteins, zum Beispiel an die ICs der elongierten Spermatiden, vermitteln. Der Phänotyp, der in den *orb-GAL4; UAS-CG14305-RNAi*-transgenen Hoden beobachtet werden konnte, weist darauf hin, dass CG14305 eine Rolle während der Individualisierung spielt. Bei einer Färbung mit TRITC-Phalloidin konnten keine ICs gefunden werden. So ist es denkbar, dass das endogene Protein an die ICs lokalisiert und an ihrem Aufbau beteiligt ist. Eine zweite Möglichkeit ist, dass es nicht selbst eine Komponente des ICs ist, sondern mindestens eines der an dem Aufbau des ICs beteiligten Proteine phosphoryliert, und es diesem dadurch erst möglich ist, eingebaut zu werden. In diesem Fall ist eine Lokalisierung an den ICs selbst nicht dringend erforderlich. Die auf F-Aktin und Myosin VI basierenden Komplexe enthalten eine Reihe von Proteinen, die für die Prozesse der Individualisierung benötigt werden (Rogat und Miller, 2002; Bader *et al.*, 2010). Zwei dieser Proteine sind die 65 kDa-Isoform von Yuri gagarin und Tropomyosin 1. Dabei handelt es sich um Interaktionspartner, die zusammen die Bildung der Komplexe in der Kernregion vermitteln (Texada *et al.*, 2008; Texada *et al.*, 2010). Für Tropomyosin aus Säugern konnte gezeigt werden, dass es mindestens zwei Phosphorylierungsstellen hat, von denen eine von der Proteinkinase C phosphoryliert wird (Mak *et al.*, 1978, Wu *et al.*, 2007). Somit wäre es möglich, dass auch die Funktion des Tropomyosin 1 während der Individualisierung durch Phosphorylierung vermittelt wird und dass es andere Komponenten in den ICs gibt, die von dem TSSK-Homologen CG14305 phosphoryliert werden. Erkenntnisse über weitere Funktionen von CG14305 konnten durch den mutanten Phänotyp nicht gewonnen werden.

Für TSSK 1 und 2 sowie ihr Substrat TSKS aus Säugern wurde eine Rolle bei den umfangreichen Differenzierungsprozessen am Ende der Spermatogenese beschrieben. Xu *et al.* zeigten 2008, dass TSKS an die Centriolen postmeiotischer Spermatiden lokalisiert. Die höchste Konzentration erreicht es dabei während der Flagellogenese. Es behält diese Lokalisierung auch in reifen Spermien aus dem Menschen bei, nicht aber in denen aus der Maus. Letztere besitzen in diesem Stadium keine Centriolen mehr. Zusätzlich lokalisieren TSKS und TSSK 2 im Schwanz und in der Akrosomenregion von murinen Spermien. In humanen Spermien kann TSSK 2 in Äquatoralsegment, Hals und Mittelstück nachgewiesen werden (Xu *et al.*, 2008a). Shang *et al.* fanden bei weiteren Untersuchungen, dass es sich bei den

Organellen, an die TSKS, TSSK 1 und TSSK 2 lokalisieren, nicht um Centriolen, sondern um chromatinhaltige Körperchen handelt. Dieses befindet sich zu Beginn der Elongation der Spermatiden in unmittelbarer Nähe der Centriole, wo sich dann zwei spezifische Strukturen, ein Ring und ein Satellit, ausbilden. In späteren Stadien der Spermatogenese verkleinert sich der Ring und wandert an das Ende des Mittelstücks. Die Autoren vermuten, dass der Ring an dem Aufbau der mitochondrialen Scheide im Mittelstück des Spermiums beteiligt ist (Shang *et al.*, 2010). Beiden Gruppen gelang die Erzeugung eines mutanten Phänotyps durch Deletion der Gene für *tssk 1* und *tssk 2* in der Maus. Xu *et al.* beschrieben, dass diese Deletion schon bei heterozygoten Männchen zu Sterilität führt und die Funktion der beiden Proteine dementsprechend dosisabhängig zu sein scheint. Die mutanten Männchen bilden keine elongierten Spermatiden, Spermatozyten und Spermatiden degradieren (Xu *et al.*, 2008b). Shang *et al.* hingegen zeigten einen weniger stark ausgeprägten Phänotyp, der nur die für die Deletion homozygoten Männchen betraf. Sie waren steril, die Histologie der Hoden war aber weitgehend unauffällig. Nur zum Ende der Spermatogenese konnten Störungen beobachtet werden. Die mitochondriale Scheide war schwer geschädigt, da scheinbar Probleme bei der Zusammensetzung aufgetreten waren. Außerdem verblieb mehr Cytoplasma in den reifen Spermien als bei dem Wildtyp. Dies führte dazu, dass die Anzahl und die Beweglichkeit der Spermien stark reduziert waren. Den auffälligen Unterschied der mutanten Phänotypen der beiden Gruppen erklärten Shang *et al.* mit dem unterschiedlichen genetischen Hintergrund der für den Versuch verwendeten Mausstämme (Shang *et al.*, 2010).

Auch in *Drosophila* gibt es diese chromatinhaltigen Körperchen, an die jedoch keine der beiden TSSK-Homologen CG9222 und CG14305 zu lokalisieren scheinen (Parvinen, 2005). Gemein haben die Homologen aus Säugern und *Drosophila* jedoch, dass sie während der Differenzierungsprozesse während der letzten Phase der Spermatogenese essentiell sind und dass die Defekte, die durch Reduktion des jeweiligen Proteinlevels hervorgerufen wurden, zytologisch weniger schwer waren, dafür aber immer zur Sterilität der Männchen führten.

Vergleicht man die CG9222- und CG14305-RNAi-mutanten Phänotypen mit dem C2-like Antisense-Phänotyp, so ist erkennbar, dass die Reduktion von C2-like mehrere Prozesse während der Spermio-genese betrifft. So zeigen die Kerne der elongierten Spermatiden nicht ihre typische nadelförmige Struktur, die bei den 64 aneinander gelagerten Spermatiden einer Zyste pfeilförmig angeordnet sind, und es können keine ICs nachgewiesen werden. Die Reduktion von CG14305 führt dazu, dass keine ICs ausgebildet werden können, aber die Kernmorphologie ist nicht betroffen. Die Prozesse, die zur Sterilität durch die Reduktion von CG9222 führen, konnten nicht bestimmt werden. Da es sich bei CG9222 und CG14305

wahrscheinlich um zwei Substrate von C2-like handelt, sollte ihr Wirkungsspektrum eingeschränkter sein als das von C2-like und die entsprechenden mutanten Phänotypen damit spezifischer sein als die von C2-like. Das ist für den Kandidaten CG14305 der Fall, dessen Reduktion nur die Ausbildung der ICs betrifft. Folgendes wäre vorstellbar: CG14305 wird von C2-like phosphoryliert und somit aktiviert. In dem C2-like mutanten Hoden findet diese Phosphorylierung nicht statt und daher kann CG14305 seine Funktion nicht erfüllen. Diese Funktion könnte in der Phosphorylierung weiterer Proteine bestehen, die erst in phosphoryliertem Zustand in den IC lokalisieren können. Somit könnten unter diesen Bedingungen keine ICs ausgebildet werden. Das Substrat von C2-like, das Einfluss auf die Kernmorphologie der elongierten Spermatiden hat, konnte noch nicht identifiziert werden.

Ob es sich bei CG9222 und CG14305 tatsächlich um Substrate von C2-like handelt, muss noch nachgewiesen werden. Folgende Versuchsreihe könnte Hinweise dafür oder dagegen liefern. Zunächst müsste überprüft werden, ob CG9222 und CG14305 überhaupt erkennbar phosphoryliert werden. Hierfür könnte man einen Hodenextrakt von CG9222- bzw. CG14305-GFP-transgenen Männchen herstellen. Ein Teil des Hodenextrakts wird mit alkalischer Phosphatase behandelt, um möglicherweise vorhandene Phosphorylierung zu entfernen. Diese beiden Proben werden für einen Western-Blot mit einem GFP-spezifischen Antikörper eingesetzt. Sollte sich das dephosphorylierte Protein von dem unbehandelten Protein in seiner Laufhöhe in dem PAA-Gel unterscheiden, könnte man folgenden Versuch anschließen. Die CG9222- und CG14305-GFP-Fusionskonstrukte werden jeweils in den C2-like-as-Hintergrund gekreuzt. Von Männchen, die homozygot für beide Transgene sind, wird wiederum ein Hodenextrakt hergestellt. Dieser wird zusammen mit den oben beschriebenen Proben als Kontrollen für einen Western-Blot mit dem GFP-spezifischen Antikörper verwendet. Im Vergleich mit den Kontrollen kann nun überprüft werden, ob das jeweilige Fusionsprotein im C2-like-mutanten Hintergrund phosphoryliert vorliegt oder nicht. Ist das Fusionsprotein im mutanten Hintergrund nicht phosphoryliert, geht die Phosphorylierung in der Wildtypsituation wahrscheinlich auf C2-like zurück. Liegt es jedoch wie im Wildtyp phosphoryliert vor, könnte das bedeuten, dass entweder die in den *C2-like as*-transgenen Tieren verbleibende Konzentration an C2-like für die Phosphorylierung von CG9222 und CG14305 ausreicht oder dass C2-like nicht die Kinase ist, die für die Phosphorylierung von CG9222- bzw. CG14305-GFP verantwortlich ist. Der Erfolg von dieser Versuchsreihe hängt davon ab, wie stark die beiden Proteine phosphoryliert werden und ob C2-like die einzige Proteinkinase ist, der sie als Substrate dienen.

5. Material

5.1 Vektoren

Allgemeine Vektoren:

pGem-T (Promega)

pBluescript KS(-) (Stratagene)

P-Vektoren:

P{UAST}green (U. Renner, 2001)

pTEV 87F^{TCE} (pers. Mitteilung M. Hollmann)

pCaSpeR 2 (Thummel und Pirrotta, 1991)

pUAST (Brand und Perimon, 1993)

p221-Gal4 (erhalten von C. Klämbt)

BRET-Vektoren:

pGFP²-C1, -C2 und -C3 (BioSignal Packard)

pRluc-N1 und -N2 (BioSignal Packard)

5.2 Fliegenstämme

(Details in Lindsley und Zimm, 1992 oder in FlyBase)

OreR

OregonR, ein Wildtypstamm

*w*¹¹¹⁸

weißäugige Mutante mit einer Mutation in dem *white*-Gen

Gla/CyO

Fliegenstamm mit den Balancerchromosomen *Curly derivative of Oster* (*CyO*, 2. Chromosom, homozygot letal, dominanter Marker *Cy*) und *Glazed* (*Gla*, 2. Chromosom, homozygot letal, dominanter Marker *Gla*)

MKRS/TM3

Fliegenstamm mit den Balancerchromosomen *MKRS* (3. Chromosom, homozygot letal; dominante Marker: *Minute* (*M(3)76A*), *Stubble* (*Sb*), rezessive Marker: *karmoisin* (*kar*), *rosy*

(ry^2) und *Third Multiple 3 (TM3)*, 3. Chromosom, homozygot letal; dominanter Marker *Serrate (Ser)*

5.3 Bakterienstämme

E. coli DH5 α (Hanahan, 1983)

E. coli NovaBlue GigaSingles™ (Novagen)

5.4 Gelelektrophorese-Standards

DNA

Lambda/*Hind*III (Fermentas);

Fragmentlängen in kb: 23,1 / 9,5 / 6,6 / 4,3 / 2,3 / 2,0 / 0,6

Generuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas);

Fragmentlängen in kb: 10 / 8 / 6 / 5 / 4 / 3,5 / 3 / 2,5 / 2 / 1,5 / 1 / 0,75 / 0,5 / 0,25

Generuler 100 bp Ladder Plus (Fermentas);

Fragmentlängen in kb: 3 / 2 / 1,5 / 1,2 / 1,031 / 0,9 / 0,8 / 0,7 / 0,6 / 0,5 / 0,4 / 0,3 / 0,2 / 0,1

RNA

0,2-10 kb (Novagen);

Fragmentlängen in kb: 10 / 6 / 4 / 3 / 2 / 1,5 / 1 / 0,5 / 0,2

Protein

peqGOLD Protein-Marker IV, prestained (PEQLAB);

Proteingewicht in kDa: 170 / 130 / 95 / 72 / 55 / 43 / 34 / 26 / 17 / 4

6. Methoden

6.1 DNA-Klonierung

6.1.1 Isolierung genomischer DNA aus einzelnen Fliegen

(Jowett, 1986)

Für diese Methode wird nur eine Fliege als Ausgangsmaterial benötigt. Soll die DNA aus mehreren Fliegen isoliert werden, müssen die Puffermengen entsprechend angepasst werden. Die Fliege wird in ein Eppendorf-Reaktions-Gefäß mit 100 µl Puffer 1 gegeben und mit einem Pistill zermörsert. Auf die Suspension werden 100 µl Puffer 2 und 1,5 µl frisches DEPC gegeben. Das Gemisch wird in einem 60 °C warmen Wasserbad für 35 min inkubiert. Während dieser Zeit sollen sich die Zellkerne auflösen. Die Reaktionsgefäße werden auf Eis gestellt. Wenn die Lösungen Raumtemperatur erreicht haben, werden 30 µl 8 M Kaliumacetat zugegeben. Das bewirkt, dass während der folgenden 45 min auf Eis die Proteine ausfallen. Anschließend wird 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert und der Überstand möglichst ohne Fett abgenommen. Er wird in einem neuen Reaktionsgefäß mit doppeltem Volumen 100% Ethanol gemischt und 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Nach dem Waschen mit 70% Ethanol wird erneut 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert, das Pellet kurz getrocknet und in 25 µl TE⁻⁴ aufgenommen.

Puffer 1:

10 mM Tris/HCl (pH 7,5); 60 mM NaCl; 50 mM EDTA; nach dem Autoklavieren: 0,15 mM Spermidin

Puffer 2:

0,3 M Tris/HCl (pH 9,0); 1,25% SDS; 0,1 M EDTA; 5% Saccharose; sterilfiltrieren

TE⁻⁴:

10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 0,1 mM EDTA

6.1.2 RNase A-Behandlung von genomischer DNA

Da die bei der DNA-Isolierung mitgeführte RNA sich negativ auf die weitere Behandlung der DNA auswirken könnte, wird die DNA-Lösung mithilfe der RNase A-Behandlung von ihr befreit. Dafür werden zu einer 25 µl DNA-Lösung 3 µl des Restriktionspuffers Yellow, 1,8 µl

dH₂O und 0,2 µl RNase-Lösung (10 mg/ml) zugegeben. Für eine bessere Handhabung der geringen Volumina wird für mehrere Proben ein Mastermix angefertigt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C wird die DNA mit 15 µl 7,5M Ammoniumacetat und 90 µl 100% Ethanol für 20 min bei -80 °C gefällt. Anschließend wird 15 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Nach dem Waschen mit 70% Ethanol wird erneut für 15 min bei 12000 rpm zentrifugiert, das Pellet kurz getrocknet und in 25 µl TE⁻⁴ aufgenommen.

6.1.3 Phenol/Chloroform-Extraktion von Plasmid-DNA

Diese Methode dient dem Entfernen von Proteinen (z.B. Enzymen) und anderen Verunreinigungen aus DNA-Lösungen. Für dieses Aufreinigungsverfahren ist ein Mindestvolumen von 100 µl notwendig. Der DNA-Lösung wird das gleiche Volumen an Phenol/Chloroform (im Verhältnis 1:1 gemischt; mit TE⁻⁴ überschichtet) zugesetzt. Nach gründlichem Vortexen wird das Gemisch für 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, die die DNA enthält, wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kann nun unter anderem einer Salz-Alkohol-Fällung unterzogen werden.

6.1.4 Salz-Alkohol-Fällung von Plasmid-DNA

Mithilfe der Salz-Alkohol-Fällung kann DNA von unerwünschten Salzen befreit werden. Die DNA-Lösung wird dazu mit 1/5 Vol. 2 M NaAc und doppeltem Volumen eisgekühlten 100 % Ethanol gemischt, gründlich gevortext und für 15 min bei -80 °C gefällt. Anschließend wird 15 min bei 12000 rpm zentrifugiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird nach dem Trocknen an der Luft oder bei 42 °C in dem Heizblock in 10 bis 30 µl TE⁻⁴ aufgenommen.

6.1.5 Agarosegelelektrophorese

In einem Agarosegel können doppelsträngige DNA-Moleküle entsprechend ihrer Länge aufgetrennt werden. Das Gel besteht in der Regel aus 0,7% Agarose in 1x TBE. Zum Nachweis der DNA werden 5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml, Roth) pro 100 ml Gellösung eingesetzt. Die Elektrophorese wird mit 1x TBE als Laufpuffer in horizontalen Kammern durchgeführt. Die Proben werden vor dem Auftragen auf das Gel mit jeweils 0,2 Vol. Probenpuffer (6x Loading Dye Solution, Fermentas) vermischt. Die Stromstärke, mit der die

Elektrophorese durchgeführt wird, variiert mit den Elektrodenabständen der unterschiedlichen Kammern. Als Richtlinie gilt: [Elektrodenabstand (cm) x 5] mA.

10x TBE :

890 mM Tris/HCl (pH 8,2), 890 mM Borsäure; 20 mM EDTA; autoklavieren

6.1.6 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

(Weichenhan, 1991)

Unter UV-Bestrahlung wird die Bande mit dem gewünschten DNA-Molekül mit einer Rasierklinge aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Das Gelstück wird in ein aus Filterpapier gefaltetes Tütchen überführt, das in einem an der Spitze durchlöcherten Eppendorf-Reaktionsgefäß steckt. Dieses wird in ein weiteres Reaktionsgefäß gesteckt. Durch einminütige Zentrifugation bei 12000 rpm wird die DNA-Lösung durch den Filter in das untere Eppendorf-Reaktionsgefäß gedrückt und somit von der Gelmatrix getrennt. Die Fragmente werden nun mithilfe einer Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 6.1.3) und einer Salz-Alkohol-Fällung (siehe 6.1.4) aufgereinigt. Das Pellet wird in der Regel in 10 µl TE⁻⁴ aufgenommen.

6.1.7 Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen

Für die Spaltung von DNA stehen Enzyme und entsprechende Puffer (10x konzentriert) der Firmen Roche, MBI Fermentas und New England BioLabs zur Verfügung. Das Volumen des Reaktionsansatzes variiert mit seiner Funktion.

Für das Testen von Klonen nach einer Plasmid-DNA-Präparation:

- 1 µl DNA-Lösung (< 200 ng)
- 1 µl 10x Puffer
- 0,5 µl Enzym (10 u/µl)
- ad 10 µl dH₂O

Für die Erzeugung von Fragmenten für Klonierungen (präparativer Ansatz):

- 1,5 µl 10x Puffer
- 1 µl Enzym (10 u/µl)
- ad 15 µl DNA-Lösung (> 200 ng)

Die Inkubationsdauer kann von 1 h bis über Nacht betragen. Stammt die zu schneidende DNA aus einer Minipräparation, wird dem Ansatz 0,5 µl RNase A (10 mg/ml) zugegeben. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen oder zur Isolierung eines Fragments wird der gesamte Ansatz in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Soll die Plasmid-DNA von zwei Enzymen verdaut werden, kann der optimale Puffer für die Enzymkombination mit Hilfe des Programms "Support: Double Digest" von Fermentas (<http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html>) ermittelt werden. Gibt es keinen geeigneten Puffer für die Enzymkombination, sind zwei Schritte notwendig. Nach Ablauf der Inkubationszeit für das erste Enzym wird die DNA mit Hilfe einer Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 6.1.3) und einer darauf folgenden Salz-Alkohol-Fällung (siehe 6.1.4) von dem Enzym und den Salzen des Puffers befreit. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem zweiten Enzym in dem entsprechenden Puffer.

6.1.8 Dephosphorylierung von Plasmiden

Zur Verhinderung der Religation eines Vektors kann dieser dephosphoryliert werden. Dabei werden die 5'-Phosphatgruppen mit dem Enzym alkalische Phosphatase (CIAP, Promega; FastAP, Fermentas) entfernt. Die Behandlung erfolgt nach den Angaben des jeweiligen Herstellers. Um die linearisierte Plasmid-DNA von den Enzymen und ihren Puffern zu befreien, wird das Enzym zunächst nach Angaben des Herstellers hitzeinaktiviert und die DNA anschließend mithilfe einer Salz-Alkohol-Fällung (siehe 6.1.4) aufgereinigt. Das Pellet wird in 10 bis 15 µl TE⁻⁴ aufgenommen.

6.1.9 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der Konzentration wird 1 µl der DNA-Lösung mit 4 µl eines 1x Ladepuffers gemischt und auf ein 0,7% Agarosegel aufgetragen. Als Marker werden 2,5 µl Lambda-

DNA/*Hind*III (0,1 µg/ µl; Fermentas) aufgetragen. Bei diesem Marker handelt es sich um die DNA des Phagen λ, die mit dem Restriktionsenzym *Hind*III geschnitten wurde. Jede der nach einer Auftrennung in einem Agarosegel sichtbaren Banden enthält eine definierte Menge DNA (entsprechend den Angaben von Fermentas). Über einen Vergleich der Intensitäten der Bande der DNA-Lösung und den Banden des Markers kann die Konzentration abgeschätzt werden. Bei hochkonzentrierten Lösungen sollte neben 1 µl der unverdünnten Probe 1 µl einer 1:10- und eventuell 1 µl einer 1:100-Verdünnung aufgetragen werden.

6.1.10 Ligation

Die für die Ligation bestimmten Fragmente werden in einem äquimolaren Verhältnis eingesetzt. Die verwendete T4-Ligase stammt entweder von Fermentas oder aus dem Kit *pGem-T Vector System* von Promega. Der Ligationsansatz beträgt in der Regel 10 µl und enthält in etwa 50 bis 100 ng DNA. Er wird weitestgehend nach Angaben des jeweiligen Herstellers angesetzt. Bei der Verwendung des Promega-Kits ist jedoch zu beachten, dass 0,5 µl pGem-T für eine erfolgreiche Ligation vollkommen ausreichend sind. Die Inkubation erfolgt von 1 bis 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C.

6.1.11 Transformation von NovaBlue GigaSingles™ (Novagen) durch Hitzeschock

Für eine Transformation werden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und auf den Ligationsansatz pipettiert. Nach vorsichtigem Mischen erfolgt eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Die Zellen werden dann in einem 42 °C warmen Wasserbad für 30 sec geschockt, wodurch die Aufnahme der DNA provoziert wird. Zur Abkühlung werden die Zellen 2 min auf Eis gestellt. Anschließend werden sie mit 250 µl SOC-Medium gemischt und für 45 bis 60 min auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit wird die Antibiotikaresistenz, für die das Plasmid kodiert, ausgeprägt. Auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum werden jeweils 25 µl und 250 µl ausplattiert.

SOC-Medium:

20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0,58 g NaCl (10mM); 0,19 g KCl (2,5 mM); ad 1 l; nach dem Autoklavieren 10 ml 2M Glukose zugeben

LB-Medium:

10 g Trypton; 10 g NaCl; 5 g Hefeextrakt; ad 1 l dH₂O

LB-Agar:

LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar

Zugabe des Antibiotikums nach dem Autoklavieren, wenn die Temperatur unter 50 °C liegt.

6.1.12 Transformation von *E. coli DH5α* durch Elektroporation

Für eine Transformation durch Elektroporation muss die DNA-Lösung frei von Salzen sein. Dementsprechend muss der Ligationsansatz zunächst gefällt werden. Dies geschieht, indem die Ligation mit dH₂O auf 45 µl aufgefüllt und dann mit 5 µl 2M Na-Acetat und 100 µl 100 % Ethanol versetzt wird. Die DNA wird 5 min bei -80 °C gefällt und bei 12000 rpm für 15 min zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und 7 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Nach dem Trocknen wird das Pellet in 10 µl dH₂O aufgenommen.

Für die Elektroporation werden 50 µl elektrokompetente *E. coli DH5α*-Zellen auf Eis aufgetaut. Die DNA-Lösung und die 2 mm Elektroporationsküvetten (Eurogentec) werden auf Eis vorgekühlt. Die DNA wird zu den Zellen gegeben. Das Gemisch wird für 30 bis 60 sec auf Eis inkubiert und anschließend ganz unten in die Küvette pipettiert. Dabei ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen bilden. Die gut abgetrocknete Küvette wird nun in den Pulser (Easyject Optima, EquiBio) gestellt und es wird ein Puls (2500 V; 15 µF; 335 R) ausgelöst. Anschließend wird die Küvette sofort wieder auf Eis gestellt. Dort werden die Zellen mit 1 ml SOC-Medium aufgespült und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend werden sie 45 bis 60 min bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. In dieser Zeit prägen die Bakterien die Antibiotikaresistenz aus, die mithilfe des Vektors eingeschleust wurde. Auf LB-Platten mit dem entsprechendem Antibiotikum werden jeweils 25 µl und 250 µl ausplattiert. Sollten sich auf diesen beiden Platten nur wenige Kolonien zeigen, kann der Rest ebenfalls ausplattiert werden.

6.1.13 Blau-Weiß-Selektion

Mithilfe der Blau-Weiß-Selektion ist eine schnelle Identifizierung von Klonen mit Insert möglich. Die entsprechenden Vektoren sind so aufgebaut, dass sich die *Multiple Cloning Site* (MCS) in dem *lacZ*-Gen befindet. Die Induktion der Expression des *lacZ*-Gens erfolgt durch IPTG. Es wird die β-Galaktosidase exprimiert. Als ihr Substrat dient hier X-Gal, welches durch die enzymatische Reaktion in einen blauen Farbstoff umgesetzt wird. War eine Klo-

nierung erfolgreich, so wird das *lacZ*-Gen unterbrochen, so dass keine β -Galaktosidase produziert werden kann und die Kolonien weiß bleiben. Enthält der Vektor kein Insert, ist das *lacZ*-Gen intakt und die Kolonie färbt sich blau. Für die Blau-Weiß-Selektion werden zusammen mit den transformierten Zellen pro Platte 50 μ l 2% X-Gal in Dimethylformamid und 100 mM IPTG in dH₂O ausplattiert.

6.1.14 Colony Blot Analysen

Herstellung der Membranen

Diese Methode dient der Identifizierung von Kolonien, die Klone mit dem gewünschten Insert enthalten. Die Kolonien dürfen für diesen Versuch nicht zu eng auf der Agarplatte beieinander liegen. Es wird ein Stück Nylonmembran entsprechend der Platte zurechtgeschnitten. Durch Auflegen der Membran auf die Platte, werden die Kolonien auf die Membran übertragen. Damit die Signale nach Abschluss des Versuches den richtigen Klonen zugeordnet werden können, werden die Membran und die Platte markiert. Die Membran wird mit einer Pinzette von der Platte genommen und mit den Kolonien nach oben 1-2 min auf ein mit der Denaturierungslösung getränktes Filterpapier gelegt. Anschließend wird es für 5 min auf ein Filterpapier gelegt, das mit der Neutralisierungslösung getränkt wurde. Um die DNA kovalent an die Membran zu binden, wird die behandelte Membran mit UV-Licht bestrahlt (Stratalinker 2400, 254 nm, 1200 J).

Denaturierungslösung:

1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH

Neutralisierungslösung:

1,5 M NaCl; 1 M Tris/HCl pH 7,0

Herstellung der Digoxigenin-markierten Sonde

Bei Digoxigenin handelt es sich um ein Steroid aus dem Fingerhut *Digitalis purpurea*, das für die Herstellung einer mit Digoxigenin-markierten Sonde an dUTP gekoppelt wurde. Die Synthese der Sonde erfolgt mit dem *DIG DNA Labeling and Detection Kit* der Firma Roche nach Angaben des Herstellers. Nach dem Abstoppen der Reaktion erfolgt die Fällung der Sonde durch Zugabe von 2,5 μ l 4 M LiCl und 75 μ l gekühltem 100% Ethanol, Vortexen und Inkubation für 15 min bei -80 °C. Anschließend wird 15 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert,

das Pellet mit 70% Ethanol versetzt und letztlich 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird nach kurzem Trocknen in 50 µl TE⁻⁴ aufgenommen. Die Überprüfung der Effizienz der Markierung wird ebenfalls nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

TE⁻⁴:

10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 0,1 mM EDTA

Vorhybridisierung, Hybridisierung und Waschungen der Membran

Für die folgenden Schritte wird die Membran in ein Hybridisierungsröhrchen überführt. Dabei sollte die zu hybridisierende Seite nach innen gerichtet sein. Die Membran wird für 2 bis 4 h vorhybridisiert und anschließend über Nacht hybridisiert. Die Inkubationstemperatur beträgt 42 °C. Nach der Hybridisierung wird zweimal für 15 min mit 20 bis 40 ml 2xSSPE / 0,1% SDS und viermal für 15 min mit 20 bis 40 ml 0,1xSSPE / 0,1 % SDS gewaschen.

Vorhybridisierungslösung:

10 ml 1M Natriumphosphatpuffer (pH 6,5); 7 ml 20 % SDS; 3 ml DEPC-dH₂O

Hybridisierungslösung:

2,5 ml deionisiertes Formamid; 1,25 ml 20 x SSPE; 250 µl 1 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,5; bestehend aus 1 M Na₂HPO₄ und 1 M NaH₂PO₄); 50 µl DIG-markierte Sonde; 950 µl DEPC-dH₂O

20x SSPE:

3,6 M NaCl; 0,2 M NaH₂PO₄; 20 mM EDTA; pH 7,4 mit NaOH einstellen und autoklavieren

Nachweis der Digoxigenin-markierten Sonde

Für den Nachweis des Digoxigenins wird ein anti-Dig-Antikörper (Roche) verwendet, der an die alkalische Phosphatase gekoppelt wird. Die Durchführung des Nachweises und die Herstellung der benötigten Lösungen erfolgen entsprechend der Beschreibung zum *DIG DNA Labeling and Detection Kit* von Roche.

6.1.15 Plasmid-Minipräparation durch alkalische Lyse

(Birnboim und Doly, 1979)

Durch diese Art der Minipräparation lassen sich schnell kleine Mengen an Plasmid-DNA isolieren. Die DNA eignet sich aufgrund starker Verunreinigungen mit RNA, Proteinen und Salzen nur für Restriktionsverdau, mit denen überprüft werden soll, ob der jeweilige Klon positiv sein könnte. Der Vorteil dieser Methode ist, dass mit ihr eine große Anzahl von Klonen überprüft werden kann.

Für die Präparation werden 2 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 120 rpm und 37 °C inkubiert. Etwa 1,5 ml der Bakteriensuspension werden in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Bakterien werden 4 min bei 4000 rpm pelletiert und das überschüssige Medium wird möglichst vollständig abgenommen. Die Bakterien werden anschließend in 100 µl Lösung I durch Vortexen resuspendiert und durch Zugabe von 200 µl Lösung II lysiert. Die Lyse erfolgt nach langsamem Invertieren des Reaktionsgefäßes für maximal 5 min bei Raumtemperatur. Durch Zugabe von 150 µl Lösung III, erneutem Invertieren der Ansätze und 5 minütiger Inkubation auf Eis erfolgt die Ausfällung der genomischen DNA und Proteine der Bakterien. Anschließend wird 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wird in ein neues mit 500 µl Isopropanol befülltes Reaktionsgefäß überführt. Das Gemisch wird gevortext und erneut 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wird der Überstand verworfen und das Plasmid-DNA-Pellet in 30 µl TE⁻⁴ gelöst.

Lösung I:

50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A; bei 4 °C lagern

Lösung II:

200 mM NaOH; 1 % SDS

Lösung III:

3 M Kaliumacetat/Essigsäure (pH 5,5); bei 4 °C lagern

TE⁻⁴:

10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 0,1 mM EDTA

6.1.16 Plasmid-Minipräparation mit einem Kit der Firma PeqLab

Mit Hilfe des *peqGold Plasmid Miniprep Kits II* der Firma PeqLab können größere Mengen Plasmid-DNA isoliert werden. Die isolierte DNA ist dabei wesentlich reiner als nach einer Minipräparation durch alkalische Lyse. Für die Präparation werden 10 ml Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die Isolierung der DNA erfolgt nach dem Protokoll der Firma. Die Elution erfolgt mit 100 µl dH₂O.

6.1.17 Plasmid-Midipräparationen mit Kits der Firmen Qiagen und Machery-Nagel

Für eine Injektion in Fliegen-Embryonen wird sehr sauber aufgereinigte Plasmid-DNA benötigt. Diese wurde zunächst mit dem *Plasmid Midi Kit* von Qiagen isoliert. Im Verlaufe der Arbeit wurde zu dem Kit *NucleoBond Xtra Midi* der Firma Machery-Nagel gewechselt, da die Aufreinigung der Plasmid-DNA weniger Zeit in Anspruch nimmt und die Ausbeute an transgenen Fliegen mit der nach dieser Methode aufgereinigten DNA höher ist. Die jeweilige Isolierung erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Die Aufnahme des Pellets aus aufgereinigter Plasmid-DNA erfolgte je nach Größe in 50 bis 150 µl TE⁻⁴.

TE⁻⁴:

10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 0,1 mM EDTA

6.1.18 PCR-Techniken

(Mullis and Faloona, 1987)

Die PCRs dieser Arbeit wurden in einem Thermocycler der Firma Biometra durchgeführt. Ansatz und PCR-Programm wurden entsprechend den Angaben des jeweiligen Enzym-Herstellers gewählt. So wurden hauptsächlich verwendet: die *Taq*-Polymerase (Biolabs), die *Pfu*-Polymerase (Fermentas) und die *Phusion* (Finnzymes).

Die Herstellung von cDNA erfolgte mit dem Kit *total script-OLS* von Omni Life Science. Für RT-PCRs wurde das *1-step RT-PCR Kit* von Thermo Scientific verwendet.

Alternativ zu Minipräparation und Colony Blot Analysen wurden Colony PCRs für die Suche nach positiven Klonen eingesetzt. Dafür wurde die *Taq*-Polymerase verwendet. Statt genomischer DNA oder cDNA wurde hier als Template Bakterien (direkt von der Agarplatte ge-

pickt) verwendet. Zum Aufschließen der Bakterien wurde der erste Denaturierungsschritt auf 10 min ausgedehnt.

Zur Kontrolle des PCR-Erfolges werden 5 bis 10 µl des Reaktionsansatzes mit 2 µl 6x Probenpuffer gemischt und auf ein 0,7% Agarosegel aufgetragen.

Die Aufreinigung des PCR-Produkts erfolgt mit dem *my-Budget PCR-Aufreinigungskit* von Bio-Budget. Sind neben der Zielsequenz auch andere DNA-Abschnitte durch unspezifische Bindung der Primer amplifiziert worden, werden die restlichen 40 µl des Ansatzes auf ein 0,7 % Agarosegel aufgetragen und das Amplifikat aus dem Gel isoliert.

6.2 P-Element-vermittelte Keimbahntransformation

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

Bei der P-Element vermittelten Keimbahntransformation wird das P-Element-Konstrukt in das posteriore Ende von jungen w^{1118} -Embryonen injiziert, die noch nicht die Polzellen ausgebildet haben. So ist es möglich, dass die Plasmid-DNA zufällig in die Urkeimzellen gerät und dort mithilfe des Enzyms Transposase in das Genom integriert. Es wird hier mit dem w^{1118} -Stamm gearbeitet, da die verwendeten P-Element-Konstrukte als Marker das *mini-white*-Gen tragen. Somit kann eine erfolgreiche Integration über die rote Augenfarbe der Tiere verfolgt werden.

6.2.1 Vorbereitung der DNA

Für eine P-Element-vermittelte Keimbahntransformation muss das durch eine Plasmid-Midipräparation (siehe 6.1.17) isolierte Konstrukt mit dem Helferplasmid Turbo (pUC hs π Δ 2-3) gemischt werden. Dieses enthält ein P-Element, das für die Transposase kodiert. Gleichzeitig ist das 3' Inverted Repeat defekt, so dass dieses P-Element nicht in der Lage ist, in das Genom der transformierten Fliegen zu integrieren. Somit dient dieses Helferplasmid zur Expression der Transposase, die die Integration des eigentlichen Konstrukts in das *Drosophila*-Genom ermöglicht. Das Helferplasmid selbst wird im Laufe der Embryonalentwicklung ausgedünnt und geht verloren. Auf diesem Wege können stabile transgene Fliegenlinien erzeugt werden. Die Endkonzentration der beiden Bestandteile im Injektionsgemisch betragen für das Konstrukt 0,5 µg/µl und für das Helferplasmid 0,1 µg/µl. Nach dem Mischen wird eine Salz-Alkohol-Fällung (siehe 6.1.4) durchgeführt. Der Waschschrift wird

dabei zweimal durchgeführt und das Pellet anschließend in 50 µl dH₂O aufgenommen. Direkt vor der Injektion wird die DNA-Lösung nochmals für 30 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand letztendlich für die Injektion eingesetzt.

Die Mikroinjektion erfolgt mit einer Nadel, die zuvor mithilfe des Pul-1 der Firma WPI aus einer an beiden Seiten offenen Glaskapillare (Sodaglas, 100 mm lang, 1 mm im Durchmesser) der Firma Hilgenberg gezogen wurde. Die Spitzen sind nach dem Ziehen zunächst geschlossen und werden unmittelbar vor dem Befüllen mit 5 µl des DNA-Gemisches durch Schleifen mit einem Kapillarschleifgerät der Firma Bachofer geöffnet. Nach dem Befüllen der Nadel wird diese in einen Mikromanipulator eingespannt. Die Nadel ist über einen Schlauch mit dem Gerät FemtoJet der Firma Eppendorf verbunden, mit dessen Hilfe die Injektion durchgeführt wird.

6.2.2 Apfelsaftagarplatten

Die Ablage der für die Keimbahntransformation benötigten Embryonen erfolgt auf Apfelsaftagarplatten.

Für ca. 30 Platten werden benötigt:

7,2 g Agar; 3,34 g Saccharose; 67 ml Apfelsaft; 200 ml dH₂O

Der Apfelsaft wird erwärmt und die Saccharose dazugegeben. Der Agar wird zusammen mit dem Wasser aufgekocht, bis er vollständig gelöst ist. Das Apfelsaft-Saccharose-Gemisch wird nun unter ständigem Rühren mit dem gelösten Agar gemischt. Gleich im Anschluss werden die Platten möglichst blasenfrei gegossen. Direkt vor der Eiablage werden die Platten mit etwas Hefebrei (bestehend aus Trockenhefe und Wasser) versehen.

6.2.3 Die Injektion des P-Konstrukt-Gemisches in *w*¹¹⁸-Embryonen

Zwei bis drei Tage vor der Injektion werden *w*¹¹⁸-Fliegen auf mit reichlich Hefe bestreute Zuchtflaschen gesetzt und bis zur Injektion bei Raumtemperatur gehalten. Das soll die Bereitschaft der Weibchen zur Eiablage erhöhen. Für die Eiablage auf den Apfelsaftagarplatten werden die Fliegen dann in eine leere Zuchtflasche umgeschüttelt, die mit Löchern am Boden versehen ist. Diese Zuchtflasche wird mit der Öffnung nach unten auf eine Apfelsaftagarplatte gestellt. Die Eiablage erfolgt im Dunkeln (unter einem Karton) für 15 min. Die

ersten drei Eiablagen werden verworfen, da sie mit hoher Wahrscheinlichkeit viele ältere Embryonalstadien enthalten. Für die Injektion werden die Embryonen von der Apfelsaftagarplatte gekratzt und in eine 50% Klorix-Lösung (handelsüblicher Haushaltsreiniger mit 2,8 g Natriumhypochlorid pro 100 g Lösung) überführt. Mithilfe des Chlors wird das Chorion mit den gut sichtbaren dorsalen Anhängen entfernt. Das Chorion ist sehr hart und würde bei einer Injektion das Eindringen der Nadel erschweren. Die chorionfreien Embryonen werden gründlich mit Wasser gespült und anschließend auf einem Apfelsaftagarblöckchen unter dem Binokular sortiert. Sie werden so in einer Reihe ausgerichtet, dass das posteriore Ende aller Embryonen in eine Richtung weist. Für die Injektion müssen die Embryonen auf ein Deckgläschen überführt werden. Damit sie an diesem Deckgläschen haften bleiben, ist es mit einem Klebstoff versehen. Der Klebstoff wurde zuvor mithilfe von n-Heptan von Tesa-Paketklebeband gelöst. Anschließend werden die Embryonen für einige Minuten an der Luft getrocknet. Das soll verhindern, dass sie aufgrund einer zu hohen Oberflächenspannung beim Injizieren platzen. Das Trocknen wird mit einem Tropfen 10S-Öl (Elf Atochem) abgestoppt. Das Deckgläschen wird mit einem weiteren Tropfen Öl auf einem Objektträger befestigt und unter dem Mikroskop platziert, an dem die Injektion mithilfe des Mikromanipulators stattfindet. Dabei werden möglichst geringe Mengen der DNA-Lösung in das posteriore Ende des Embryos injiziert. Anschließend wird das Deckgläschen in ein Wägeschälchen mit den Maßen 4,5 x 4,5 cm gelegt und mit etwas 3S-Öl (Elf Atochem) überschichtet. Das Wägeschälchen wird in eine so genannte Feuchtkammer gestellt. Dabei handelt es sich um eine Petrischale, die mit feuchtem Filterpapier ausgelegt ist. Anschließend können sich die Embryonen bei 16 °C entwickeln.

6.2.4 Etablierung stabiler transgener Fliegenlinien

Nach drei bis vier Tagen bei 16 °C schlüpfen die Larven. Sie werden mit einer Präpariernadel aus dem Öl gehoben und auf Hefebrei (aus Trockenhefe und Wasser angerührt) in einem mit Nährbrei gefüllten Zuchtröhrchen (siehe 6.3) gesetzt. Die daraus schlüpfenden Fliegen werden als G_0 -Tiere bezeichnet und in Einzelpaarzuchten (ein G_0 -Tier mit 3 Tieren des anderen Geschlechts) mit w^{1118} -Tieren verpaart. Unter der Nachkommenschaft wird eine erfolgreiche Integration durch das Auftreten von Fliegen mit gelben, orange-farbenen oder roten Augen angezeigt. Jedes individuelle Integrationsereignis wird zunächst durch erneute Kreuzung mit w^{1118} -Tieren vermehrt. Um zu ermitteln, auf welchem Chromosom die Integration stattgefunden hat und zur anschließenden Erzeugung stabiler Fliegenlinien, werden im nächsten Schritt die Balancer-Chromosomen *Gla/CyO* und *MKRS/TM3* eingekreuzt. Im Folgenden sind die entsprechenden Kreuzungen für ein Integrationsereignis auf dem zweiten

Chromosom dargestellt. Die Geschlechtschromosomen wurden dabei nicht berücksichtigt. Außerdem wurden nur die zur Weiterkreuzung verwendeten Genotypen dargestellt.

1. Einkreuzung des Balancers für das 2. Chromosom

$P\{w^+\} / + ; + / +$ x $Gla / CyO ; + / +$

F1: $P\{w^+\} / CyO ; + / +$ x $P\{w^+\} / CyO ; + / +$

F2: $P\{w^+\} / P\{w^+\} ; + / +$ oder $P\{w^+\} / CyO ; + / +$

2. Einkreuzung des Balancers für das 3. Chromosom

$P\{w^+\} / + ; + / +$ x $+ / + ; MKRS / TM3$

F1: $P\{w^+\} / + ; MKRS / +$ x $P\{w^+\} / + ; MKRS / +$

F2: $P\{w^+\} / P\{w^+\} ; MKRS / +$ oder $P\{w^+\} / P\{w^+\} ; + / +$ oder
 $P\{w^+\} / + ; MKRS / +$ oder $P\{w^+\} / + ; + / +$ oder
 $+ / + ; MKRS / +$ oder $+ / + ; + / +$

Treten in der F2-Generation nur Tiere mit roten Augen auf, so erfolgte die Integration auf dem dem eingekreuzten Balancer entsprechenden Chromosom. In dem hier dargestellten Falle ist es das zweite Chromosom. Ist der Integrationsort bestimmt, kann die Fliegenlinie entweder über Homozygote oder mit dem entsprechenden Balancer-Chromosom gehalten werden.

6.3 Fliegenzucht

Die Fliegen werden bei 25 °C in so genannten Zuchtröhrchen oder -flaschen gehalten. Dabei handelt es sich um Plastikröhrchen der Firma Greiner in zwei verschiedenen Größen, die mit einem Fliegennährbrei befüllt und mit einem Schaumstoffstopfen verschlossen sind. Die Generationszeit bei 25 °C beträgt in etwa 10 Tage. Um die Vermischung der Eltern- und Tochtergeneration zu verhindern, werden Stämme und Kreuzungen alle sieben Tage auf frische, mit etwas Hefe bestreute Zuchtröhrchen oder -flaschen umgesetzt.

6.3.1 Herstellung des Fliegennährbreis

(Hess, 1976)

Für 50 Zuchtröhrchen werden benötigt:

1,65 l dH₂O; 9 g Agar; 18 g Bierhefe; 10 g Sojamehl; 82 g Zuckerrübensirup; 41 g Malzextrakt; 77 g Maismehl; 5 ml Propionsäure; ¼ EL Nipagin (para-Hydroxybenzolsäuremethylester)

Das Wasser wird mit dem Agar aufgeköcht. Ist der Agar vollständig gelöst, werden Bierhefe, Sojamehl, Sirup und Malz zugegeben. Dieser Brei wird nochmals kurz aufgeköcht und anschließend das Maismehl untergerührt. Nach kurzem Abkühlen werden dem Brei zum Schutz vor Pilzbefall Propionsäure und Nipagin zugesetzt.

6.3.2 Präparation von Gonaden

Die mit CO₂ betäubten Fliegen werden bis zur Präparation auf Eis aufbewahrt, um so die Betäubung zu verlängern. Die Präparation findet in mit 1x PBS gefüllten Blockschälchen statt. Die Tiere werden mit einer Pinzette am Thorax gegriffen. Mit einer zweiten Pinzette wird das Abdomen geöffnet und die Gonaden entnommen. Diese werden in 1x PBS auf Eis gesammelt.

1x PBS:

140 mM NaCl; 10 mM NaH₂PO₄; pH 7,4 mit NaOH einstellen und autoklavieren

6.3.3 Färbungen von Hodengewebe mit Hoechst 33258 und TRITC-Phalloidin

Hoechst 33258 färbt die DNA an und fluoresziert blau. TRITC-Phalloidin färbt F-Aktin an und fluoresziert rot. Für die Färbungen werden 20 Hoden in 1x PBS präpariert und anschließend 10 min in 4 % Formaldehyd/1x PBS fixiert. Es folgen drei 10-minütige Waschschrte mit 1x PBT, die 10-minütige Färbung mit Hochst 33258 und TRITC-Phalloidin und weiteren drei 10-minütigen Waschschrten mit 1x PBS. Die angefärbten Hoden können für einige Tage bei 4° C aufbewahrt werden.

Sollen die Färbungen vergleichend mit dem Expressionsmuster eines GFP-Fusionsproteins betrachtet werden, wird die Fixierung, die Färbung und die Waschschrte mit 1x PBS auf je 5

min verkürzt. Außerdem wird die Hoechst 33258- und der TRITC-Phalloidin-Konzentration auf die Hälfte herabgesetzt.

1x PBS:

140 mM NaCl; 10 mM NaH₂PO₄; pH 7,4 mit NaOH einstellen und autoklavieren

1x PBT:

0,1 % Triton-X-100 in 1x PBS

Hochst 33258/TRITC-Phalloidin:

50 µl Hoechst 33258 (20 µg/ml); 10 µl TRITC-Phalloidin (10 µg/ml); ad 1ml dH₂O

6.3.4 Fertilitätstest

Die Fertilität von Männchen wird überprüft, indem sie mit drei Jungfrauen auf frische Zuchtröhrchen gesetzt werden. Nach einer Woche werden die Elterntiere entfernt und das Röhrchen über die nächsten zwei Wochen regelmäßig auf Nachkommen hin untersucht.

6.3.5 Erzeugung von Fliegen, die homozygot für zwei Integrationen sind

Sollen Fliegen erzeugt werden, die homozygot sowohl für eine Integration auf dem zweiten als auch für eine auf dem dritten Chromosom sind, lässt sich das folgende Kreuzungsschema anwenden. Die Geschlechtschromosomen wurden bei diesem Schema nicht berücksichtigt.

1. + / + ; MKRS / TM3 x Gla / CyO ; + / +
2. + / + ; P{w⁺} 1 / P{w⁺} 1 x Gla / + ; TM3 / + (aus 1.)
3. P{w⁺} 2 / P{w⁺} 2 ; + / + x CyO / + ; MKRS / + (aus 1.)
4. CyO / P{w⁺} 2 ; MKRS / + (aus 3.) x Gla / + ; TM3 / P{w⁺} 1 (aus 2.)
5. Gla / P{w⁺} 2 ; MKRS / P{w⁺} 1 x Gla / P{w⁺} 2 ; MKRS / P{w⁺} 1
(beides aus 4.)

6. $P\{w^+\}_2 / P\{w^+\}_2 ; P\{w^+\}_1 / P\{w^+\}_1 \times P\{w^+\}_2 / P\{w^+\}_2 ; P\{w^+\}_1 / P\{w^+\}_1$
 (beides aus 5.)

6.3.6 GAL4/UAS-Kreuzungen

(zusammengefasst in Duffy, 2002)

Das aus der Hefe stammende GAL4/UAS-System wird zur zelltypspezifischen Expression einer Zielsequenz genutzt. Bei der Zielsequenz kann es sich zum Beispiel um ein Gen handeln, das ektopisch exprimiert werden soll, oder auch um eine RNAi-Sequenz, die ihre Wirkung nur in einem bestimmten Zelltyp entfalten soll. Für das GAL4/UAS-System ist zum einen eine Treiberlinie notwendig, die ein Konstrukt mit einem spezifischen Promotor und daran anschließend dem Gen für den Transkriptionsfaktor GAL4 trägt (Abb. 46). Zum anderen wird eine Effektorlinie benötigt, die ein Konstrukt aus mehreren aufeinander folgenden *upstream activating sequences* (UAS) und der Zielsequenz trägt. Bringt man durch Kreuzung beide Konstrukte in eine Fliege, kann der Transkriptionsfaktor GAL4, dessen Expression durch den spezifischen Promotor gesteuert wird, an die UAS des Effektorkonstrukts binden. Dadurch wird die Expression der Zielsequenz aktiviert.

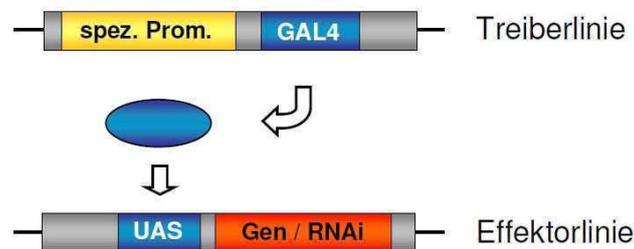


Abbildung 46: schematische Darstellung des GAL4/UAS-Systems. spez. Prom.: spezifischer Promotor; GAL4: Gen für GAL4; blaue Sphäre: Transkriptionsfaktor GAL4; UAS: *upstream activating sequence*.

Die Effektivität des Systems ist abhängig von der Temperatur, bei der die entsprechenden Kreuzungen stattfinden. Es stellte sich heraus, dass 29 °C die Temperatur ist, bei der eine hohe GAL4-Aktivität besteht, aber gleichzeitig die Folgen der erhöhten Temperatur auf die Fertilität und Lebensfähigkeit der Fliegen sich noch in Grenzen halten. Alle entsprechenden Kreuzungen in dieser Arbeit werden daher knapp unter dieser Temperatur bei 28 °C durchgeführt.

6.4 Methoden zur RNA-Analyse

6.4.1 Poly(A)-Isolierung mit oligo(dT)-gekoppelten Partikeln aus Geweben (Novagen)

Mithilfe dieser Methode werden mRNAs über die Hybridisierung ihres Poly(A)-Schwanzes mit den an die magnetischen Partikel gekoppelten oligo(dT)-Molekülen (Magnetight Oligo(dT) Particles von Novagen) isoliert. Zur Vermeidung von RNase-Kontamination wird während des gesamten Versuchs mit Handschuhen gearbeitet. Alle Lösungen werden mit DEPC-dH₂O angesetzt und bei 4 °C aufbewahrt.

Zur Vorbereitung der magnetischen Partikel müssen diese von dem Lagerpuffer in den Lyse-Binde-Puffer überführt werden. Dazu werden 200 µl der Partikelsuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und für 1 min in einem magnetischen Halter an der Gefäßwand konzentriert. Der Überstand wird entfernt und die Partikel werden mit 200 µl des Lyse-Binde-Puffers gemischt. Bis zur Zugabe des mRNA-haltigen Überstands werden die Magnetpartikel in dem magnetischen Halter konzentriert.

Für einen vergleichbaren mRNA-Gehalt der Proben werden die Mengen der eingesetzten Tiere bzw. des eingesetzten Gewebes variiert (Tabelle 6).

Tabelle 6: Anzahl der Gewebe für eine poly(A)-mRNA-Isolierung. Karkassen = Fliegen ohne Gonaden

Gewebe	Hoden	Ovar	Karkasse ♂	Karkasse ♀	Männchen	Weibchen
Anzahl	50	15	30	25	30	20

Das Material wird zusammen mit 200 µl Lyse-Binde-Puffer in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und mit einem Pistill zermörsert. Das Homogenat wird mit Lyse-Binde-Puffer auf 1 ml aufgefüllt, gemischt und für 1 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der mRNA-haltige Überstand wird auf die Magnetpartikel gegeben. Das Gemisch wird 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt, wobei die Hybridisierung des Poly(A)-Schwanzes der mRNA an die oligo(dT)-Moleküle der Partikel erfolgt. Anschließend wird das Reaktionsgefäß zur Konzentrierung der Partikel für 5 min in den magnetischen Halter gestellt. Der Überstand wird abpipettiert und verworfen. Die mit der mRNA beladenen Partikel werden zweimal mit je 200 µl Waschpuffer mit LiDS und einmal mit 200 µl Waschpuffer ohne LiDS gewaschen. Die Elution der mRNA erfolgt durch Zugabe von 20 µl 2 mM EDTA, pH 8,0 und zweiminütiger Inkubation bei 65 °C. Danach werden die Magnetpartikel ankonzentriert. Das Eluat wird in ein vorgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf

Eis gelagert.

DEPC-dH₂O:

0,1% DEPC 60 min in dH₂O rühren lassen, anschließend autoklavieren

Lyse-Binde-Puffer:

100 mM Tris/HCl (pH 8,0); 500 mM LiCl; 10 mM EDTA; 5 mM DTT; 1% LiDS

Waschpuffer mit LiDS:

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

Waschpuffer ohne LiDS:

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

6.4.2 Regenerierung der oligo(dT)-Partikel

Zur Wiederverwendung der Magnetpartikel müssen diese von noch gebundenen mRNA-Molekülen befreit werden. Dazu werden die Partikel nach der Entnahme des Eluats mit 100 mM NaOH versetzt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Gemisch wird 2 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend werden die Partikel in dem magnetischen Halter konzentriert und der Überstand wird abgenommen. Danach werden die Partikel weitere zwei Male mit 100 mM NaOH und viermal mit Lagerpuffer gewaschen. Der pH-Wert des Gemisches sollte nun unter pH 8 sein. Die Magnetpartikel werden bei 4 °C gelagert.

Lagerpuffer:

250 mM Tris/HCl (pH 8,0); 20 mM EDTA; 0,1 % Tween-20; 0,02 % Na-azid

6.4.3 RNase H-Behandlung von mRNA

RNase H erkennt RNA-DNA-Duplexe und schneidet die RNA innerhalb dieser. So kann mRNA zum Beispiel mit einem oligo(dT)-Primer hybridisiert und mit RNase H behandelt werden, um die Poly(A)-Schwänze zu entfernen. Damit lässt sich die tatsächliche Länge eines Transkripts durch die Northern-Analyse nachweisen.

Die für die RNase H-Behandlung eingesetzte mRNA wird, wie in 6.4.1 beschrieben, isoliert. Anschließend erfolgt die Behandlung. Der Ansatz besteht aus folgenden Komponenten und wird auf Eis zusammenpipettiert.

- 20 µl mRNA
- 5 µl Primer (1 µg/µl)
- 2 µl RNase H (1 µg/µl; Thermo Scientific)
- 10 µl 5x RNase H-Puffer
- 13 µl DEPC-dH₂O

Die Inkubation erfolgt 30 min bei 37 °C. Einer weiteren Probe, die als Negativkontrolle dient, wird statt dem Primer und der RNase H die entsprechende Menge DEPC-dH₂O zugegeben. Die Reaktion wird abgestoppt, indem die Proben in Eiswasser abgekühlt werden. Anschließend werden sie jeweils auf 200 µl mit DEPC-dH₂O aufgefüllt, mit dem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform gemischt und 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Jeweils die obere Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 80 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 600 µl 100 % Ethanol 20 min bei -80 °C gefällt. Dann werden die Proben 15 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 20 µl DEPC-dH₂O aufgenommen.

5x RNase H-Puffer:

100 mM Tris/HCl (pH 7,5); 500 mM KCl; 50 mM MgCl₂; 5 mM DTT

6.4.4 Auftrennung der mRNA in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel

Die Auftrennung der mRNA erfolgt in einem Formaldehyd-Agarosegel. Die denaturierende Wirkung des Formaldehyds führt zur Aufspaltung eventuell gebildeter Sekundärstrukturen der mRNA. Somit wird eine einheitliche, der mRNA-Länge entsprechende Auftrennung ermöglicht. Die Gelelektrophorese wird in einer horizontalen Kammer durchgeführt, die eine Zirkulation des Laufpuffers ermöglicht. Für ein Formaldehydgel der Größe 12 cm x 14 cm werden 1,5 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 10 ml 10x MOPS und 85 ml dH₂O aufgekocht, um die Agarose zu lösen. Der durch das Aufkochen verursachte Wasserverlust wird ausgeglichen und die Gellösung auf etwa 70 °C abgekühlt. Anschließend werden 5 ml Formaldehyd zugegeben. Die Lösung wird durch Schwenken gemischt und luftblasenfrei in den Gelschlitten gegossen. Die Endkonzentrationen der einzelnen Komponenten im Gel betragen: 1,5 % Agarose, 1,85 % Formaldehyd und 1x MOPS-Puffer. Als

Laufpuffer dient 1x MOPS.

Neben den mRNA-Proben wird der 0,2-10 kb-RNA-Längenstandard der Firma Novagen in dem Gel aufgetrennt. Entsprechend den Angaben der Firma werden 2 µl des Markers eingesetzt. Diese werden mit 18 µl dH₂O versetzt und wie die mRNA-Proben für den Auftrag auf das Formaldehyd-Agarosegel vorbereitet. Zur Vorbereitung der Proben werden sie auf Eis mit folgenden Komponenten gemischt:

- 20 µl deionisiertes Formamid
- 8 µl Formaldehyd-Lösung (37%)
- 6 µl 10x MOPS-Puffer
- 2 µl Ethidiumbromidlösung (500 ng/µl dH₂O)

Die Proben und der RNA-Längenstandard werden für 5 min bei 65 °C auf dem Heizblock inkubiert und anschließend sofort wieder auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 6 µl RNA-Probenpuffer werden die Proben auf das Formaldehyd-Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgt unter dem Abzug für 2 bis 3 h bei 120V. Die mRNA ist ausreichend aufgetrennt, wenn das Bromphenolblau des RNA-Probenpuffers bis zur unteren Kante des Gels gelaufen ist.

10x MOPS:

200 mM 3-Morpholinopropansulfonsäure; 50 mM Natriumacetat ; 10 mM EDTA ; pH 7,0 mit NaOH einstellen und autoklavieren

RNA-Probenpuffer:

70 % Glycerin; 0,1 % Bromphenolblau; 0,1 % Xylencyanol FF

6.4.5 Northern Transfer

Vor dem Transfer der mRNA auf eine Nylonmembran wird das Formaldehyd-Agarosegel photographiert. Für das Foto wird ein Zentimetermaß so angelegt, dass die Nulllinie genau am unteren Ende der Geltaschen verläuft. So kann mithilfe des Fotos ermittelt werden, wie weit die RNA-Fragmente des Markers gelaufen sind. Eine entsprechende Eichkurve macht es möglich, die Größen der nachgewiesenen Transkripte zu bestimmen. Leere Spuren und die Spur, in der der RNA-Längenstandard aufgetrennt wurde, werden entfernt. Die Transferwanne wird etwa 3 cm hoch mit 20x SSPE gefüllt. Eine Glasplatte wird so auf die Wanne

gelegt, dass an zwei gegenüberliegenden Seiten ein Zugang zur Wanne frei bleibt. Zwei übereinander liegende Filterpapierstreifen (Roth), deren Breite der des Gels entspricht, werden mit 20x SSPE angefeuchtet und so über die Glasplatte gelegt, dass beide Enden in das 20x SSPE in der Wanne tauchen. Mit einer Glaspipette werden eventuell vorhandene Luftblasen entfernt. Anschließend wird das Gel auf den Filterpapierstreifen gelegt. Auch hier ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen entstanden sind. Das an den Seiten überstehende Filterpapier wird mit Frischhaltefolie abgedeckt, damit die Flüssigkeit nur durch das Gel nach oben gesaugt werden kann. Eine der Gelgröße entsprechende Nylonmembran (Amersham Hybond-N, GE Healthcare) wird vorsichtig auf das Gel gelegt. Auf die Membran werden zwei Filterpapiere, die die gleiche Größe wie die Membran haben, und ein Stapel Papierhandtücher gelegt. Der Aufbau wird gleichmäßig mit einem Gewicht von maximal 1 kg beschwert. Der Transfer erfolgt über Nacht.

Beim Abbau werden zunächst die Papiertücher und die Filterpapiere abgehoben. Die Membran wird zusammen mit dem Gel umgedreht und auf eine Frischhaltefolie gelegt. Die Taschen des Gels werden mit einem weichen Bleistift durchstoßen und nachgezeichnet. Für eine eindeutige Zuordnung der Signale wird die obere Ecke der Membran an der Seite abgeschnitten, an der sich die erste Spur des Gels befindet. Die Fixierung der mRNA auf der Membran erfolgt mit dem Stratalinker 2400 (Stratagene) bei 254 nm und 1200 J.

20x SSPE:

3,6 M NaCl; 0,2 M NaH₂PO₄; 20 mM EDTA; pH 7,4 mit NaOH einstellen und autoklavieren

6.4.6 Erzeugung einer radioaktiv markierten Sonde durch *in vitro*-Transkription

(Melton *et al.*, 1984)

Zur Herstellung einer radioaktiven Sonde, die anschließend zur Hybridisierung auf eine Northern-Membran verwendet werden soll, wird die Methode der *in vitro*-Transkription herangezogen. Die DNA, die als Matrize für die *in vitro*-Transkription dient, wird im Vorfeld mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert, so dass nur die spezifische Sequenz und nicht die darauf folgende Vektorsequenz transkribiert. *In vitro*-Transkripte mit Vektorsequenz könnten zu Fehlhybridisierungen führen.

Der Reaktionsansatz von insgesamt 20 µl wird auf Eis zusammenpipettiert und besteht aus folgenden Komponenten:

- 0,5-1 µg linearisierte Plasmid-DNA
- 4 µl 5x Transkriptionspuffer
- 2 µl 0,1 M DTT
- 3 µl AGC-Ribonukleotid-Mix (je 3,3 mM)
- 1 µl RNase-Inhibitor (25 u/µl)
- 1 µl nicht-radioaktiv-markiertes UTP (200 µM)
- 1 µl RNA-Polymerase
- 2 µl α-32 P-UTP (10 µCi/µl)
- ad 20 µl dH₂O

Die Wahl der RNA-Polymerase (Fermentas) hängt von der Orientierung der entsprechenden Sequenz in pGem-T oder pBluescript KS(-) ab. Die Inkubation erfolgt 1,5 h bei 37 °C. Die Plasmid-DNA wird dann bei einer 15 minütigen Inkubation mit 1 µl RQ1 DNase (1 u/µl; Promega) bei 37 °C abgebaut. Zur Fällung des Transkripts werden dem Ansatz 20 µl tRNA als Fällhilfe, 170 µl dH₂O und 200 µl Phenol/Chloroform zugeben. Das Gemisch wird gevortext und anschließend 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der transkripthaltige Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 80 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 600 µl gekühltem 100 % Ethanol versetzt. Nach gründlichem Vortexen erfolgt eine 30 minütige Inkubation bei – 20 °C. Im Anschluss wird der Ansatz 15 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wird dann mit gekühltem 70 % Ethanol gewaschen und 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Nach kurzem Trocknen wird es schließlich in 100 µl TE⁻⁴ aufgenommen und gelöst. Die Radioaktivität des Transkripts wird mithilfe eines Szintillisationszählers ermittelt.

TE⁻⁴:

10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 0,1 mM EDTA

6.4.7 Northern Blot Hybridisierung und Exposition gegen einen Röntgenfilm

Die Membran wird in ein Hybridisierungsröhrchen der Firma Biometra überführt und 2 bis 4 h mit 20 ml Vorhybridisierungslösung bei 62 °C inkubiert, um die verbleibenden freien Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Für die anschließende Hybridisierung werden 4,9 ml der Hybridisierungslösung in das Hybridisierungsröhrchen gegeben und die radioaktive Sonde in die Lösung pipettiert. Die Hybridisierung erfolgt in der Regel für 21 bis 24 h bei 62 °C. Anschließend wird einmal 30 min mit 2x SSPE, 0,2% SDS und zweimal je 20 min mit 0,1x SSPE, 0,2% SDS gewaschen. Die Waschungen erfolgen ebenfalls bei 62 °C.

Für die Exposition wird die Membran in Frischhaltefolie verpackt und auf einen Röntgenfilm in eine mit Verstärkerfolie versehene Kassette gelegt. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgt je nach Stärke des Signals bei Raumtemperatur oder $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für einen Tag bis mehrere Wochen. Der Röntgenfilm wird entwickelt, indem er 3 min lang in Entwickler und anschließend 3 min in Fixierer getaucht wird. Vor und nach der Inkubation im Fixierer wird der Film gründlich mit Wasser abgespült.

Vorhybridisierungslösung:

10 ml 1M Natriumphosphatpuffer (pH 6,5); 7 ml 20 % SDS; 3 ml DEPC-dH₂O

Hybridisierungslösung:

2,5 ml deionisiertes Formamid; 1,25 ml 20x SSPE; 250 μl 1 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,5; bestehend aus 1 M Na₂HPO₄ und 1 M NaH₂PO₄); 100 μl radioaktive Probe; 900 μl DEPC-dH₂O

6.4.8 Entfernen von Signalen von einer Northern Blot Membran

Für das Entfernen von unspezifischen Signalen von einer Membran wird diese 1 h bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit Waschlösung mit Denhardt's gewaschen und anschließend erneut gegen einen Röntgenfilm exponiert.

Für das Entfernen von Signalen für eine anschließende Neuhybridisierung einer Membran wird diese 2 h bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit Waschlösung mit Denhardt's gewaschen. Anschließend kann die Membran erneut vorhybridisiert und mit einer weiteren Sonde hybridisiert werden.

100 x Denhardt's-Lösung:

2 % Ficoll; 2 % Polyvinylpyrrolidon (PVP); 2 % Rinderserumalbumin (BSA); in dH₂O

Waschlösung mit Denhardt's:

5 mM Tris/HCl (pH 8,0); 2 mM EDTA; 0,1x Denhardt's

6.5 Biochemische Verfahren

6.5.1 BRET²-Assay

(übernommen aus Gustke, 2006)

Zelllinie und Kulturbedingungen

Die Interaktionsstudien sollen in eukaryotischen COS-7-Zellen (Gluzman, 1981; ATCC-Nummer: CRL-1651) durchgeführt werden. Dabei handelt es sich um Fibroblasten aus der Niere der grünen Meerkatze (Zelllinie CV-1 aus *Cercopithecus aethiops*), die mit einer Mutante des SV40-Virus transfiziert wurden, die wegen einer Deletion im Replikationsursprung nicht mehr replikationsfähig ist. Das Virus codiert für das *large T Antigene*, welches dazu führt, dass die Zellen nicht absterben. Die Zellen werden in Kulturflaschen (250 ml, Cellstar Greiner BioOne) mit einem Vollmedium, bestehend aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma) und 10% fötalem Kälberserum (FCS, Fetal Calf Serum Gold, PAA Laboratories), kultiviert. Sie werden bei 37 °C und 7,5% CO₂ in einem Brutschrank gehalten. Alle Zellkulturarbeiten werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

DNA-Transfer in die COS-7-Zellen

Für den Transfer der DNA in die eukaryotischen Zellen wird die Methode der Lipofektion angewandt (Felgner *et al.*, 1987). Dabei bilden kationische Lipide, in diesem Fall das PolyFect[®] Transfektionsreagenz von Qiagen, zusammen mit der DNA einen Liposomen-DNA-Komplex. Dieser fusioniert mit der Plasmamembran der Zelle und die DNA gelangt in das Innere. Die Transfektion erfolgte in 96well-Mikrotiterplatten. Die Aussaat der COS-7-Zellen erfolgt 24 Stunden vor der Transfektion. Dabei werden 2×10^4 Zellen in 150 µl Medium in die jeweiligen Vertiefungen pipettiert und bis zur Transfektion bei 37 °C inkubiert. Für ein aussagekräftiges Ergebnis werden jeweils 6 oder 12 Vertiefungen mit der gleichen DNA transfiziert. Die folgenden Angaben beziehen sich immer auf eine Vertiefung. In der Regel wird jedoch für die Vertiefungen, die mit der gleichen DNA transfiziert werden, ein Mastermix angesetzt. Es werden 0,5 – 1 µg reine Plasmid-DNA benötigt (stammt von einer Plasmid-Midipräparation, siehe 6.1.17). Die DNA-Lösung wird mit serumfreiem Medium (DMEM ohne FCS) auf ein Volumen von 30 µl gebracht. Außerdem werden 4 µl des Polyfect Reagenz zu 16 µl serumfreiem Medium gegeben. Beide Lösungen werden gut miteinander vermischt und 5 – 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit werden die Zellen, die sich am Boden der einzelnen Vertiefungen der 96well-Platte befinden, mit je 150 µl 1x PBS gewaschen. Der Transfektionsansatz (50 µl) wird mit 100 µl Vollmedium gemischt und in die

Vertiefung pipettiert. Anschließend wird für 2 Stunden in dem Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wird der Transfektionsansatz abpipettiert und eine Kotransfektion durchgeführt, das heißt die Zellen werden mit anderer Plasmid-DNA ein weiteres Mal transfiziert. Nach den 2 Stunden Inkubation der zweiten Transfektion wird der Transfektionsansatz durch frisches Vollmedium ersetzt. Es schließt sich eine Inkubation von 48 – 72 Stunden im Brutschrank an.

BRET²-Interaktionsmessungen

Die Messungen erfolgen in der Regel 48 Stunden nach der Transfektion am *Fusion α -FP* (Universal Microplate Analyzer, Packard Bio Sciences GmbH). Dazu wird das Medium von den Zellen abgezogen, und die Zellen werden zweimal mit 1xPBS gewaschen. Anschließend wird ein 25 μ l-Aliquot des DeepBlueC (Coelenterazine, Perkin Elmer) aufgetaut und mit 5 ml 1x D-PBS (Invitrogen /GIBCO) verdünnt. Direkt vor der Messung wird der Puffer möglichst vollständig von den Zellen entfernt und 50 μ l der DeepBlueC-Verdünnung dazu pipettiert. Danach wird die Mikrotiterplatte sofort in den *Fusion α -FP* eingeführt und die Messungen gestartet. Die letzten Schritte sollten zügig erfolgen, da die Halbwertszeit des DeepBlueC mit nur 15 min sehr kurz ist. Für die Herstellung der DeepBlueC-Aliquots werden 200 μ g DeepBlueC langsam aufgetaut und 500 μ l absolutes Ethanol dazugegeben. Von diesem Gemisch werden 25 μ l Aliquots in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und lichtgeschützt bei -20 °C gelagert.

Parameter-Einstellungen am *Fusion α -FP*

BRET²-Filter

Luciferase Emissionsfilter 410 nm, 80 nm Bandbreite

GFP² Emissionsfilter 515 nm, 30 nm Bandbreite

PMT Spannung 1100 V

Gain Setting 25.0

Lesedauer pro Well und Filter 1 sec

Temperatur Raumtemperatur

Auswertung der BRET²-Messungen

Die Auswertung der BRET²-Daten erfolgt mit der Software GraphPad Prism 4.0. Mit jeder der Säulen im Diagramm sind n x 6 Messpunkte zusammengefasst, dabei entspricht n der Anzahl der Wiederholungen dieses Experiments. Die Messwerte, die bei den Zellen ermittelt werden, die nicht transfiziert, aber mit DeepBlueC behandelt wurden, werden gemittelt und von den eigentlichen Messwerten vor der Berechnung abgezogen. Das BRET²-Signal ist das Verhältnis der GFP²-Emission zu der Luciferase-Emission. Die Gleichung zu der Berechnung des BRET²Signals lautet:

$$\text{BRET}^2\text{-Signal} = \frac{\text{GFP}^2\text{-Emission (515 nm)} - \text{GFP}^2\text{-Emission nicht transfizierter Zellen (515 nm)}}{\text{RLuc-Emission (410 nm)} - \text{RLuc-Emission nicht transfizierter Zellen (410 nm)}}$$

Probenvorbereitung für eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zum Nachweis der Proteinexpression kann eine Western Blot Analyse (siehe 6.5.3) durchgeführt werden. Dazu werden 20 µl Lyse-Puffer in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte pipetiert und die darin enthaltenen Zellen für 30 min auf dem Schüttler lysiert. Die Proben aus den Vertiefungen eines Mess-Sets werden vereinigt und mit dem gleichen Volumen an SDS-Probenpuffer versetzt. Anschließend erfolgen die Denaturierung der Proteine für 5 min in kochendem Wasser und der Auftrag von 20 µl auf ein Polyacrylamid-Gel (siehe 6.5.2).

Lyse-Puffer:

20 mM Tris/HCl (pH 7,5); 100 mM NaCl; 10 mg/ml Lysozym frisch dazu

SDS-Probenpuffer:

0,1 M DTT; 5 % SDS; 10 % Glycerin; 0,06 M Tris; pH 6,8

6.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(Laemmli, 1970)

Mit diesem Verfahren können Proteine ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden. SDS denaturiert Proteine und verhindert Protein-Protein-Wechselwirkungen. Die SDS-Protein-Komplexe sind negativ geladen und zeichnen sich durch ein relativ konstantes Ladungs- und Massen-Verhältnis aus. Die SDS-PAGEs werden mit den Gel-Kammern des *Mini-PROTEAN Tetra Cell*-System von BIO-RAD durchgeführt. Alle Angaben zur Zusammensetzung der ver-

schiedenen Puffer und Gellösungen können der Gebrauchsanweisung entnommen werden. In der Regel wurden für diese Arbeit 8 % Polyacrylamid-Gele verwendet. Zunächst wird das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Ist das Gel auspolymerisiert, wird das Isopropanol vollständig abgezogen, das Sammelgel darauf gegossen und mit einem Kamm versehen. Das polymerisierte Gel wird in eine Gelelektrophoresekammer eingespannt. Der Lauf erfolgt in 1x Laufpuffer bei 200 V für etwa 1 h. Anschließend können die Proteinbanden mithilfe von Coomassie Brilliant blue G-250 sichtbar gemacht werden. Dazu wird das Gel in der Coomassie-Färbelösung über Nacht schwenkend inkubiert. Die Entfärbung erfolgt über einige Stunden durch schwenken in Entfärbelösung. Die Lösung wird dabei mehrfach gewechselt.

Coomassie-Färbelösung:

50 % Methanol; 10 % Essigsäure; 0,05 % Coomassie

Entfärbelösung:

70 % Essigsäure; 30 % Methanol

6.5.3 Western Blot Analysen

Mithilfe des Western Blot werden die Proteine eines ungefärbten Polyacrylamid-Gels auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Diese kann genutzt werden um einzelne Proteine durch Antikörperfärbung nachzuweisen.

Western Transfer

Der Transfer erfolgt mit der Fast Blot-Apparatur von Biometra. Zur Vorbereitung werden 10 Filterpapiere (Roth), die das Gel an jeder Seite um etwa 0,5 cm überragen, sowie eine Nitrozellulose-Membran (Optitran BA-S85, Whatman/Schleicher & Schuell) in Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Graphitplatten der Blot-Apparatur werden mit dH₂O befeuchtet. Auf die untere Platte werden fünf in Anodenpuffer getränkte Filterpapiere gelegt. Die Membran wird nun auf das Gel gelegt, beides zusammen vorsichtig von der Glasplatte der Gel-Apparatur abgehoben und mit der Membran nach unten auf die mit Anodenpuffer getränkten Filterpapiere gelegt. Auf das Gel werden nun fünf in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere gelegt. Eventuell entstandene Luftblasen müssen vor Verschließen der Blot-Apparatur entfernt werden. Dazu wird eine Glaspipette vorsichtig über den Stapel aus Filterpapieren, Membran und

Gel gerollt. Die Stromstärke, die für den Transfer benötigt wird beträgt 0,8 mA pro cm². Der Transfer erfolgt für 90 min bei der entsprechenden Stromstärke und maximal 10 W.

Anodenpuffer:

200 mM Tris/HCl (pH 10,4); 20 % Methanol

Kathodenpuffer:

25 mM Tris/HCl (pH 9,4); 40 mM ϵ -Aminocapronsäure; 20 % Methanol

Antikörper-Nachweis

Die Membran wird für 1 h in Blockierlösung geschwenkt und anschließend mit dem in Blockierlösung verdünnten Erstantikörper in einer Plastikfolie inkubiert. Die Inkubation kann entweder für 1 bis 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C erfolgen. Danach wird die Membran viermal 15 min in Waschpuffer geschwenkt. Die Inkubation mit dem ebenfalls in Blockierlösung verdünnten Zweitantikörper erfolgt wieder in einer Plastiktüte für 1 bis 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Anschließend wird die Membran viermal 5 min in Waschpuffer geschwenkt und mit Filterpapier etwas getrocknet. Dann wird sie mit einem Gemisch aus 9,2 ml dH₂O, 0,4 ml Lumiglo und 0,4 ml H₂O₂ in eine Plastikfolie eingeschweißt. Diese wird wenige Minuten geschwenkt. Anschließend wird die Membran erneut mit Filterpapier getrocknet, in Frischhaltefolie gewickelt und schließlich gegen einen Röntgenfilm exponiert. Die erste und zweite Exposition erfolgt für 30 sec bzw. 90 sec. Ob weitere Expositionen nötig sind und über welchen Zeitraum diese erfolgen, richtet sich nach dem Ergebnis der ersten beiden.

10x TBS:

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

Waschpuffer:

1x TBS (pH 7,5); 0,1 % Tween 20

Blockierlösung:

1x TBS (pH 7,5); 0,1 % Tween 20; 5 % Magermilchpulver

7. Literaturverzeichnis

Arama, E., J. Agapite, H. Steller (2003): Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Dev Cell* 4, 687-697.

Armstrong, C.G., D.J. Mann, N. Berndt, P.T. Cohen (1995): *Drosophila* PPY, a novel male specific protein serine/threonine phosphatase localised in somatic cells of the testis. *J Cell Sci* 108, 3367-3375.

Aza-Blanc, P., F.A. Ramírez-Weber, M.P. Laget, C. Schwartz, T.B. Kornberg (1997): Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* 89, 1043-1053.

Bader, M., E. Arama, H. Steller (2010): A novel F-box protein is required for caspase activation during cellular remodeling in *Drosophila*. *Development* 137, 1679-1688.

Barreau, C., E. Benson, H. White-Cooper (2008): Comet and cup genes in *Drosophila* spermatogenesis: the first demonstration of post-meiotic transcription. *Biochem Soc Trans* 36, 540-542.

Bettencourt-Dias, M., R. Giet, R. Sinka, A. Mazumdar, W.G. Lock, F. Balloux, P.J. Zafiroopoulos, S. Yamaguchi, S. Winter, R.W. Carthew, M. Cooper, D. Jones, L. Frenz, D.M. Glover (2004): Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression. *Nature* 432, 980-987.

Bettencourt da Cruz, A., J. Wentzell, D. Kretzschmar (2008): Swiss Cheese, a protein involved in progressive neurodegeneration, acts as a noncanonical regulatory subunit for PKA-C3. *J Neurosci* 28, 10885-10892.

Bhat, K.M. (1999): The posterior determinant gene nanos is required for the maintenance of the adult germline stem cells during *Drosophila* oogenesis. *Genetics* 151, 1479-92.

Bielke, W., R.J. Blaschke, G.C. Miescher, G. Zürcher, A.-C. Andres, A. Ziemiecki (1994): Characterization of a novel murine testis-specific serine/threonine kinase. *Gene (Amst.)* 139, 235-239.

Birnboim H.C., J. Doly (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.

Brand A.H., N. Perrimon (1993): Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.

Braun R.E., R.R. Behringer, J.J. Peschon, R.L. Brinster, R.D. Palmiter (1989): Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature* 337, 373-376.

Briggs, L.J., D. Stein, J. Goltz, V.C. Corrigan, A. Efthymiadis, S. Hübner, D.A. Jans (1998): The cAMP-dependent Protein Kinase Site (Ser312) Enhances Dorsal Nuclear Import through Facilitating Nuclear Localization Sequence/Importin Interaction. *J Biol Chem* 273, 22745-22752.

Caldwell, K.A., M.A. Handel (1991): Protamine transcript sharing among postmeiotic spermatids. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 2407-2411.

Caro, I., J.A. Low (2010): The role of the hedgehog signaling pathway in the development of basal cell carcinoma and opportunities for treatment. *Clin Cancer Res* 16, 3335-3339.

Chen, X., G. Lin, Y. Wei, S. Hexige, Y. Niu, L. Liu, C. Yang, L. Yu (2005): TSSK5, a novel member of the testis-specific serine/threonine kinase family, phosphorylates CREB at Ser-133, and stimulates the CRE/CREB responsive pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 742-749.

Cohen, P.T., N.D. Brewis, V. Hughes, D.J. Mann (1990): Protein serine/threonine phosphatases; an expanding family. *FEBS Lett* 268, 355-359.

Cormack, B.P., R.H. Valdivia, S. Falkow (1996): FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38.

Dahle, M.K., N. Reinton, S. Orstavik, K.A. Taskén, K. Taskén (2001): Novel alternatively spliced mRNA (1c) of the protein kinase A R1alpha; subunit is implicated in haploid germ cell specific expression. *Mol Reprod Dev* 59, 11-16.

Demerec, M. (1950): *Biology of Drosophila*. John Wiley & Sons, New York.

Diskar M., H.M. Zenn, A. Kaupisch, M. Kaufholz, S. Brockmeyer, D. Sohmen, M. Berrera, M. Zaccolo, M. Boshart, F.W. Herberg, A. Prinz (2010): Regulation of cAMP-dependent protein kinases: the human protein kinase X (PrKX) reveals the role of the catalytic subunit alphaH-alpha loop. *J Biol Chem* 285, 35910-8. Epub 2010 Sep 6.

Duffy J.B. (2002): GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34,1-15.

Felgner P.L., T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringol, M. Danielsen (1987): Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 7413-7417.

Felsenfeld, A.L., J.A. Kennison (1995): Positional signaling by hedgehog in *Drosophila* imaginal disc development. *Development* 121, 1-10.

Fuller, M.T. (1998): Genetic control of cell proliferation and differentiation in *Drosophila* spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 9, 433-444.

Gao, X., C. Jin, J. Ren, X. Yao, Y. Xue (2008): Proteome-wide prediction of PKA phosphorylation sites in eukaryotic kingdom. *Genomics* 92, 457-463.

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

Gluzman Y. (1981): SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175-182.

Gönczy, P., E. Matunis, S. DiNardo (1997): bag-of-marbles and benign gonial cell neoplasm act in the germline to restrict proliferation during *Drosophila* spermatogenesis. *Development* 124, 4361-4371.

Goodwin, S.F., M. Del Vecchio, K. Velinzon, C. Hogel, S.R. Russel, T. Tully, K. Kaiser (1997): Defective learning in mutants of the *Drosophila* gene for a regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci* 17, 8817-8827.

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

Gustke, F. (2006): Untersuchungen zur Funktion von PKA während der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit Universität Kassel

Hackstein, J.H., R. Hochstenbach (1995): The elusive fertility genes of *Drosophila*: the ultimate haven for selfish genetic elements. Trends Genet 11, 195-200.

Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. J Mol Biol 166, 557-580.

Hao, Z., K.N. Jha, Y.H. Kim, S. Vemuganti, V.A. Westbrook, O. Chertihin, K. Markgraf, C.J. Flickinger, M. Coppola, J.C. Herr, P.E. Visconti (2004): Expression analysis of the human testis-specific serine/threonine kinase (TSSK) homologues. A TSSK member is present in the equatorial segment of human sperm. Mol Hum Reprod 10, 433-44.

Hempel, L.U., C. Rathke, S.J. Raja, R. Renkawitz-Pohl (2006): In *Drosophila*, *don juan* and *don juan like* encode proteins of the spermatid nucleus and the flagellum and both are regulated at the transcriptional level by the TAF II80 cannonball while translational repression is achieved by distinct elements. Dev Dyn 235, 1053-1064.

Herberg, F.W., S.S. Taylor, W.R.G. Dostmann (1996): Active site mutations define the pathway for the cooperative of cAMP-dependent protein kinase. Biochemistry 35, 2934-2942.

Hess, O. (1976): Genetics of *Drosophila hydei* Sturtevant. In Novitsky E. and Ashburner M. (Hrsg.): The genetics and biology of *Drosophila*. Band 1c, S 1342-1363. Academic Press, New York.

Hrdlicka, L., M. Gibson, A. Kiger, C. Micchelli, M. Schober, F. Schöck, N. Perrimon (2002): Analysis of twenty-four Gal4 lines in *Drosophila melanogaster*. Genesis 34, 51-57.

Inoue, H., T. Yoshioka (1997): Purification of a regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase from *Drosophila* heads. Biochem Biophys Res Comm 235, 223-226.

Jackson, S.M., C.A. Berg (2002): An A-kinase anchoring protein is required for protein kinase A regulatory subunit localization and morphology of actin structures during oogenesis in *Drosophila*. *Development* 129, 4423-4433.

Jayaramaiah Raja, S. , R. Renkawitz-Pohl (2005): Replacement by *Drosophila melanogaster* protamines and Mst77F of histones during chromatin condensation in late spermatids and role of sesame in the removal of these proteins from the male pronucleus. *Mol Cell Biol* 25, 6165-6177.

Jowett T. (1986): *Drosophila* a practical approach (Roberts D., Hrsg.): 275-286. IRL Press Oxford

Jia, J., K. Amanai, G. Wang, J. Tang, B. Wang, J. Jiang (2002): Shaggy/GSK3 antagonizes Hedgehog signalling by regulating Cubitus interruptus. *Nature* 416, 548-52.

Jia, J., L. Zhang, Q. Zhang, C. Tong, B. Wang, F. Hou, K. Amanai, J. Jiang (2005): Phosphorylation by double-time/CKIepsilon and CKIalpha targets cubitus interruptus for Slimb/beta-TRCP-mediated proteolytic processing. *Dev Cell* 9, 819-830.

Jung, A., M. Hollmann, M.A. Schäfer (2007): The fatty acid elongase NOA is necessary for viability and has a somatic role in *Drosophila* sperm development. *J Cell Sci* 120, 2924-2934.

Kalderon, D., G.M. Rubin (1988): Isolation and characterization of *Drosophila* cAMP-dependent protein kinase genes. *Genes Dev* 2, 1539-1556.

Kaplan, Y., L. Gibbs-Bar, Y. Kalifa, Y. Feinstein-Rotkopf, E. Arama (2010): Gradients of a ubiquitin E3 ligase inhibitor and a caspase inhibitor determine differentiation or death in spermatids. *Dev Cell* 19, 160-73.

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

Kueng, P., Z. Nikolova, V. Djonov, A. Hemphill, V. Rohrbach, D. Boehlen, G. Zuercher, A.C. Andres, A. Ziemiecki (1997): A novel family of serine/threonine kinases participating in spermiogenesis. *J Cell Biol* 139, 1851-1859.

Kuersten, S., E.B. Goodwin (2003): The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat Rev Genet* 4, 626-637.

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

Lane, M.E., D. Kalderon (1994): RNA localization along the anteroposterior axis of the *Drosophila* oocyte requires PKA-mediated signal transduction to direct normal microtubule organization. *Genes Dev* 8, 2986-2995.

Lantz, V., L. Ambrosio, P. Schedl (1992): The *Drosophila orb* gene is predicted to encode sex-specific germline RNA-binding proteins and has localized transcripts in ovaries and early embryos. *Development* 1992 115, 75-88.

Lefkowitz, R.J., S.K. Shenoy (2005): Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308, 512-517.

Lindsley, D.L., K.T. Tokuyasu (1980): Spermatogenesis. In Ashburner M. and Wright T.R.F. (Hrsg.): *Genetics and biology of Drosophila*. 2. Aufl., Band 2D, S. 225-294; Academic Press, New York

Lindsley, D.L., G.G. Zimm (1992): *Genetic variations of Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego.

Mak, A., L.B. Smillie, M. Bárány (1978): Specific phosphorylation at serine-283 of alpha tropomyosin from frog skeletal and rabbit skeletal and cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 3588-3592.

Martin, J., J.M. Donnelly, J. Houghton, Y. Zavros (2010): The role of sonic hedgehog reemergence during gastric cancer. *Dig Dis Sci* 55, 1516-1524.

Meléndez, A., W. Li, D. Kalderon (1993): Activity, expression and function of a second *Drosophila* protein kinase A catalytic subunit gene. *Genetics* 141, 1507-1520.

Melton, D.A., P.A. Krieg, M.R. Rebagliati, T. Maniatis, K. Tinn, M.R. Green (1984): Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res* 12, 7035-7056.

Mohler, J., K. Vani (1992): Molecular organization and embryonic expression of the hedgehog gene involved in cell-cell communication in segmental patterning of *Drosophila*. *Development* 115, 957-971.

Monnier, V., K.S. Ho, M. Sanial, M.P. Scott, A. Plessis (2002): Hedgehog signal transduction proteins: contacts of the Fused kinase and Ci transcription factor with the kinesin-related protein Costal2. *BMC Dev Biol* 2, 4.

Mukherjee, K., M. Sharma, H. Urlaub, G.P. Bourenkov, R. Jahn, T.C. Südhof, M.C. Wahl (2008): CASK Functions as a Mg²⁺-independent neurexin kinase. *Cell* 133, 328-339.

Mulligan, P.K., J.D. Mohler, L.J. Kalfayan (1988): Molecular localization and developmental expression of the *otu* locus of *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 8, 1481-8.

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

Nolan, M.A., D.F. Babcock, G. Wennemuth, W. Brown, K.A. Burton, G.S. McKnight (2004): Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit Calpha2 orchestrates cAMP signaling for male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13483-13488. Epub 2004 Aug 31.

Norris, J.L., J.L. Manley (1992): Selective nuclear transport of the *Drosophila* morphogen dorsal can be established by a signaling pathway involving the transmembrane protein Toll and protein kinase A. *Genes Dev* 6, 1654-1667.

Ogden, S.K., M. Ascano Jr., M.A. Stegman, D.J. Robbins (2004): Regulation of Hedgehog signaling: a complex story. *Biochem Pharmacol* 67, 805-814.

Ogden, S.K., D.L. Fei, N.S. Schilling, Y.F. Ahmed, J. Hwa, D.J. Robbins (2008): G protein Galphai functions immediately downstream of Smoothed in Hedgehog signalling. *Nature* 456, 967-970.

Park, S.K., S.A. Sedore, C. Cronmiller, J. Hirsh (2000): Type II cAMP-dependent protein kinase-deficient *Drosophila* are viable but show developmental, circadian, and drug response phenotypes. *J. Biol Chem* 275, 20588-20596.

Parvinen, M. (2005): The chromatoid body in spermatogenesis. *Int J Androl* 28, 189-201.

Perrimon, N., A.P. Mahowald (1987): Multiple functions of segment polarity genes in *Drosophila*. *Dev Biol* 119, 587-600.

Philipp, M., M.G. Caron (2009): Hedgehog signaling: is Smo a G protein-coupled receptor? *Curr Biol* 19, R125-R127.

Pidoux, G., K. Taskén (2010): Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. *J Mol Endocrinol* 44, 271-284.

Price, M.A., D. Kalderon (2002): Proteolysis of the Hedgehog signaling effector Cubitus interruptus requires phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase 3 and Casein Kinase 1. *Cell* 108, 823-835.

Prinz, A., M. Diskar, A. Erlbruch, F.W. Herberg (2006a): Novel, isotype-specific sensors for protein kinase A subunit interaction based on bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Cell Signal* 18, 1616-25. Epub 2006 Mar 9.

Prinz, A., M. Diskar, F.W. Herberg (2006b): Application of bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for biomolecular interaction studies. *Chembiochem* 7, 1007-1012.

Rathke, C., W.M. Baarends, S. Jayaramaiah-Raja, M. Bartkuhn, R. Renkawitz, R. Renkawitz-Pohl (2007): Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*. *J Cell Sci* 120, 1689-1700.

Rathke, C., B. Barckmann, S. Burkhard, S. Jayaramaiah-Raja, J. Roote, R. Renkawitz-Pohl (2010): Distinct functions of Mst77F and protamines in nuclear shaping and chromatin condensation during *Drosophila* spermiogenesis. *Eur J Cell Biol* 89, 326-338.

Reinton, N., S. Orstavik, T.B. Haugen, T. Jahnsen, K. Taskén, B.S. Skalhegg (2000): A novel isoform of human cyclic 3',5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase, α -s, localizes to sperm midpiece. *Biol Reprod* 63, 607-611.

Renner U. (2001): FARINELLI: ein testisspezifisches VAP-Protein und seine Funktion in der *Drosophila*-Spermatogenese. Dissertation, Georg-August-Universität, Göttingen.

Renkawitz-Pohl, R., L. Hempel, M. Hollmann, M.A. Schäfer (2005): Spermatogenesis. In L.I. Gilbert, K. Iatrou and S.S. Gill (Hrsg.): Comprehensive Molecular Insect Science Band 1, p 157-178. Elsevier BV.

Rogat, A.D., K.G. Miller (2002): A role for myosin VI in actin dynamics at sites of membrane remodeling during *Drosophila* spermatogenesis. J Cell Sci 115, 4855-4865.

Rubin, G.M., A.C. Spradling (1982): Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. Science 218, 348-353.

San Agustin, J.T., L.D. Leszyk, L.M. Nuwaysir, G.B. Witman (1998): The catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase of ovine sperm flagella has a unique amino-terminal sequence. J Biol Chem 273, 24874-24883.

Schäfer C. (2003): Charakterisierung eines Gens, das einen potentiellen Interaktionspartner für Fan in der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster* kodiert. Diplomarbeit Universität Kassel.

Schäfer, M., R. Kuhn, F. Bosse, U. Schäfer (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., D. Börsch, A. Hülster, U. Schäfer (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., K. Nayernia, W. Engel, U. Schäfer (1995): Translational control in spermatogenesis. Dev Biol 172, 344-352.

Schmidt, A., M. Hollmann, U. Schäfer (1996): A newly identified Minute locus, *M(2)32D*, encodes the ribosomal protein L9 in *Drosophila melanogaster*. Mol Gen Genet 251, 381-387.

Shabb, J.B. (2001): Physiological Substrates of cAMP-Dependent Protein Kinase. Chem. Rev 101, 2381-2411

Shang, P., W.M. Baarends, J. Hoogerbrugge, M.P. Ooms, W.A. van Cappellen, A.A. de Jong, G.R. Dohle, H. van Eenennaam, J.A. Gossen, J.A. Grootegoed (2010): Functional transformation of the chromatoid body in mouse spermatids requires testis-specific serine/threonine kinases. *J Cell Sci* 123, 331-339.

Skalhegg, B.S., Y. Huang, T. Su, R.L. Idzerda, D.S. McKnight, K.A. Burton (2002): Mutation of the Calpha subunit of PKA leads to growth retardation and sperm dysfunction. *Mol Endocrinol* 16, 630-639.

Skoulakis, E.M., D. Kalderon, R.L. Davis (1993): Preferential expression in mushroom bodies of the catalytic subunit of protein kinase A and its role in learning and memory. *Neuron* 11, 197-208.

Smelkinson, M.G., D. Kalderon (2006): Processing of the *Drosophila* hedgehog signaling effector Ci-155 to the repressor Ci-75 is mediated by direct binding to the SCF component Slimb. *Curr Biol* 16, 110-116.

Sosnik, J., P.V. Miranda, N.A. Spiridonov, S.Y. Yoon, R.A. Fissore, G.R. Johnson, P.E. Visconti (2009): Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse. *J. Cell Sci* 122, 2741-2749.

Spiridonov, N.A., L. Wong, P.M. Zerfas, M.F. Starost, S.D. Pack, C.P. Paweletz, G.R. Johnson (2005): Identification and characterization of SSTK, a serine/threonine protein kinase essential for male fertility. *Mol Cell Biol* 25, 4250-4261.

Spradling, A.C., G.M. Rubin (1982): Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218, 341-347.

Stapleton, M., G. Liao, P. Brokstein, L. Hong, P. Carninci, T. Shiraki, Y. Hayashizaki, M. Champe, J. Pacleb, K. Wan, C. Yu, J. Carlson, R. George, S. Celniker, G.M. Rubin (2002): The *Drosophila* gene collection: identification of putative full-length cDNAs for 70% of *D. melanogaster* genes. *Genome Res* 12,1294-300.

Steinhauer, J., D. Kalderon (2005): The RNA-binding protein Squid is required for the establishment of anteroposterior polarity in the *Drosophila* oocyte. *Development* 132, 5515-5525.

Stryer, L., H.R. Bourne (1986): G proteins: a family of signal transducers. *Annu Rev Cell Biol* 2, 391-419.

Su, D., W. Zhang, Y. Yang, Y. Deng, Y. Ma, H. Song, S. Zhang (2008): Mutation screening and association study of the TSSK4 Gene in Chinese infertile men with impaired spermatogenesis. *J. Androl* 29, 374-378.

Su, D., W. Zhang, Y. Yang, H. Zhang, Y.Q. Liu, G. Bai, Y.X. Ma, Y. Peng, S.Z. Zhang (2010): c.822+126T>G/C: a novel triallelic polymorphism of the TSSK6 gene associated with spermatogenic impairment in a Chinese population. *Asian J Androl* 12, 234-9. Epub 2009 Dec 28.

Taskén, K., E.M. Aandahl (2004): Localized Effects of cAMP Mediated by Distinct Routes of Protein Kinase A. *Physiol Rev* 84, 137-167.

Tates A.D. (1971): Cytodifferentiation during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. An electron microscope study. Dissertation, Rijksuniversiteit, Leiden.

Taylor, S.S., J. Yang, J. Wu, N.M. Haste, E. Radzio-Andzelm, G. Anand (2004): PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1697, 259-269.

Taylor, S.S., C. Kim, C.Y. Cheng, S.H. Brown, J. Wu, N. Kannan (2008): Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. *Biochim Biophys Acta* 1784, 16-26.

Texada, M.J., R.A. Simonette, C.B. Johnson, W.J. Deery, K.M. Beckingham (2008): Yuri gagarin is required for actin, tubulin and basal body functions in *Drosophila* spermatogenesis. *J Cell Sci* 121, 1926-36.

Texada, M.J., R.A. Simonette, W.J. Deery, K.M. Beckingham (2010): Tropomyosin is an interaction partner of the *Drosophila* coiled coil protein Yuri Gagarin. *Exp Cell Res*. 2010 Nov 29.

Thummel, C.S., V. Pirrotta (1992): Technical notes: new pCasper P-element vectors. *D. I. S.* 71, 150.

Tian, L., R.A. Holmgren, A. Matouschek (2005): A conserved processing mechanism regulates the activity of transcription factors *Cubitus interruptus* and NF-kappaB. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1045-1053. Epub 2005 Nov 20.

Tokuyasu, K.T. (1974): Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*, III. Relation between axoneme and mitochondrial derivatives. *Exp Cell Res* 84, 239- 250.

Tokuyasu, K.T., W.J. Peacock, R.W. Hardy (1972): Dynamics in spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. I. Individualization process. *Z Zellforsch* 124, 479-506.

Tweedie, S., M. Ashburner, K. Falls, P. Leyland, P. McQuilton, S. Marygold, G. Millburn, D. Osumi-Sutherland, A. Schroeder, R. Seal, H. Zhang, The FlyBase Consortium (2009): FlyBase: enhancing *Drosophila* Gene Ontology annotations. *Nucleic Acids Res* 37, D555-D559.

Uhler, M.D., D.F. Carmichael, D.C. Lee, J.C. Chrivia, E.G. Krebs, G.S. McKnight (1986): Isolation of cDNA clones coding for the catalytic subunit of mouse cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 1300-1304.

Vibrantovski, M.D., D.S. Chalopin, H.F. Lopes, M. Long, T.L. Karr (2010): Direct evidence for postmeiotic transcription during *Drosophila melanogaster* spermatogenesis. *Genetics* 186, 431-433. Epub 2010 Jul 6.

Visconti, P.E., Z. Hao, M.A. Purdon, P. Stein, B.R. Balsara, J.R. Testa, J.C. Herr, S.B. Moss, G.S. Kopf (2001): Cloning and chromosomal localization of a gene encoding a novel serine/threonine kinase belonging to the subfamily of testis-specific kinases. *Genomics* 77, 163-170.

Wei, Y., G. Fu, H. Hu, G. Lin, J. Yang, J. Guo, Q. Zhu, L. Yu (2007): Isolation and characterization of mouse testis specific serine/threonine kinase 5 possessing four alternatively spliced variants. *J Biochem Mol Biol* 40, 749-756.

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

White-Cooper, H. (2010): Molecular mechanisms of gene regulation during *Drosophila* spermatogenesis. *Reproduction* 139, 11-21.

Wu, S.C., R.J. Solaro (2007): Protein kinase C zeta. A novel regulator of both phosphorylation and de-phosphorylation of cardiac sarcomeric proteins. *J Biol Chem* 282, 30691-30698. Epub 2007 Aug 27.

Wu, L., J.G. Belasco (2008): Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 29, 1-7.

Xu, B., Z. Hao, K.N. Jha, Z. Zhang, C. Urekar, L. Digilio, S. Pulido, J.F. Strauss 3rd, C.J. Flickinger, J.C. Herr (2008a): TSKS concentrates in spermatid centrioles during flagellogenesis. *Dev Biol* 319, 201-10. Epub 2008 Apr 11.

Xu, B., Z. Hao, K.N. Jha, Z. Zhang, C. Urekar, L. Digilio, S. Pulido, J.F. Strauss 3rd, C.J. Flickinger, J.C. Herr (2008b): Targeted deletion of Tssk1 and 2 causes male infertility due to haploinsufficiency. *Dev Biol* 319, 211-222. Epub 2008 Apr 23.

Xue, Y., F. Zhou, M. Zhu, K. Ahmed, G. Chen, X. Yao (2005): GPS: a comprehensive www server for phosphorylation sites prediction. *Nucleic Acids Res* 33 (Web Server issue), W184-187.

Yamashita, Y.M., M.T. Fuller, D.L. Jones (2005): Signaling in stem cell niches: lessons from the *Drosophila* germline. *J. Cell Sci* 118, 665-672.

Yoshida, S., H.A. Müller, A. Wodarz, A. Ephrussi (2004): PKA-R1 spatially restricts Oskar expression for *Drosophila* embryonic patterning. *Development* 131, 1401-1410.

Zeqiraj, E., B.M. Filippi, S. Goldie, I. Navratilova, J. Boudeau, M. Deak, D.R. Alessi, D.M. van Aalten (2009a): ATP and MO25alpha regulate the conformational state of the STRADalpha pseudokinase and activation of the LKB1 tumour suppressor. *PLoS Biol* 7, e1000126.

Zeqiraj, E., B.M. Filippi, M. Deak, D.R. Alessi, D.M. van Aalten (2009b): Structure of the LKB1-STRAD-MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation. *Science* 326, 1707-1711.

Zhang, Z., X. Shen, B.H. Jones, B. Xu, J.C. Herr, J.F. Strauss 3rd (2008): Phosphorylation of mouse sperm axoneme central apparatus protein SPAG16L by a testis-specific kinase, TSSK2. *Biol Reprod* 79, 75-83.

Zhao, Y., C. Tong, J. Jiang (2007): Transducing the Hedgehog signal across the plasma membrane. *Fly (Austin)*1, 333-336.

Zhou, F.F., Y. Xue, G.L. Chen, X. Yao (2004): GPS: a novel group-based phosphorylation predicting and scoring method. *Biochem Biophys Res Commun* 325, 1443-1448.

Zuercher, G., V. Rohrbach, A.C. Andres, A. Ziemiecki (2000): A novel member of the testis specific serine kinase family, tssk-3, expressed in the Leydig cells of sexually mature mice. *Mech Dev* 93, 175-177.

8. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AKAP	A-Kinase-Anker-Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
as	antisense
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-Phosphat
bp	Basenpaar(e)
BRET	Biolumineszenz Resonanz Energietransfer
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
cpm	<i>counts per minute</i>
d	Tag(e)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EL	Esslöffel
EST	<i>expressed sequence tag</i>
F-Aktin	filamentöses Aktin
FG	Franziska Gustke
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein

Abkürzungsverzeichnis

GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IC	Individualisierungskomplex
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
J	Joule
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani (-Medium)
LiDS	Lithiumdodecylsulfat
M	Molar (Mol pro Liter)
m	Männchen
mA	Milliampere
MCS	<i>multiple cloning site</i>
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mm	Millimeter
mM	Millimolar (Millimol pro Liter)
MOPS	3-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
Mst	<i>male specific transcript</i>
NBT	p-Nitrotetrazoliumblausulfat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDE	Phosphodiesterase
pers.	persönlich
Pi	anorganisches Phosphat
PKA	Proteinkinase A; cAMP-abhängige Proteinkinase
PKA-C	katalytische Untereinheit der Proteinkinase A
PKA-R	regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A
pro/Prom	Promotor

Abkürzungsverzeichnis

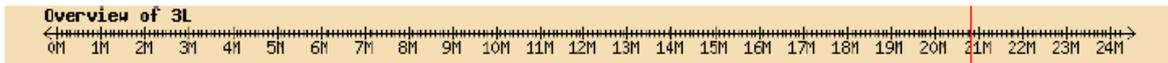
R	Widerstand
RK	Restkörper
Rluc	<i>Renilla Luciferase</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i>
RpL9	ribosomales Protein L9
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Reverse Transkriptase
sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	<i>super optimal broth</i> mit 20 mM Glucose
SSPE	<i>saline sodium phosphate EDTA</i>
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCE	Translationskontrollelement
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N-N-N'-N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin Isothiocyanat
u	<i>units</i>
UAS	<i>upstream activation sequence</i>
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w	Weibchen
W	Watt
Wo	Woche(n)
w/v	Gewicht/Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galctosid

9. Anhang

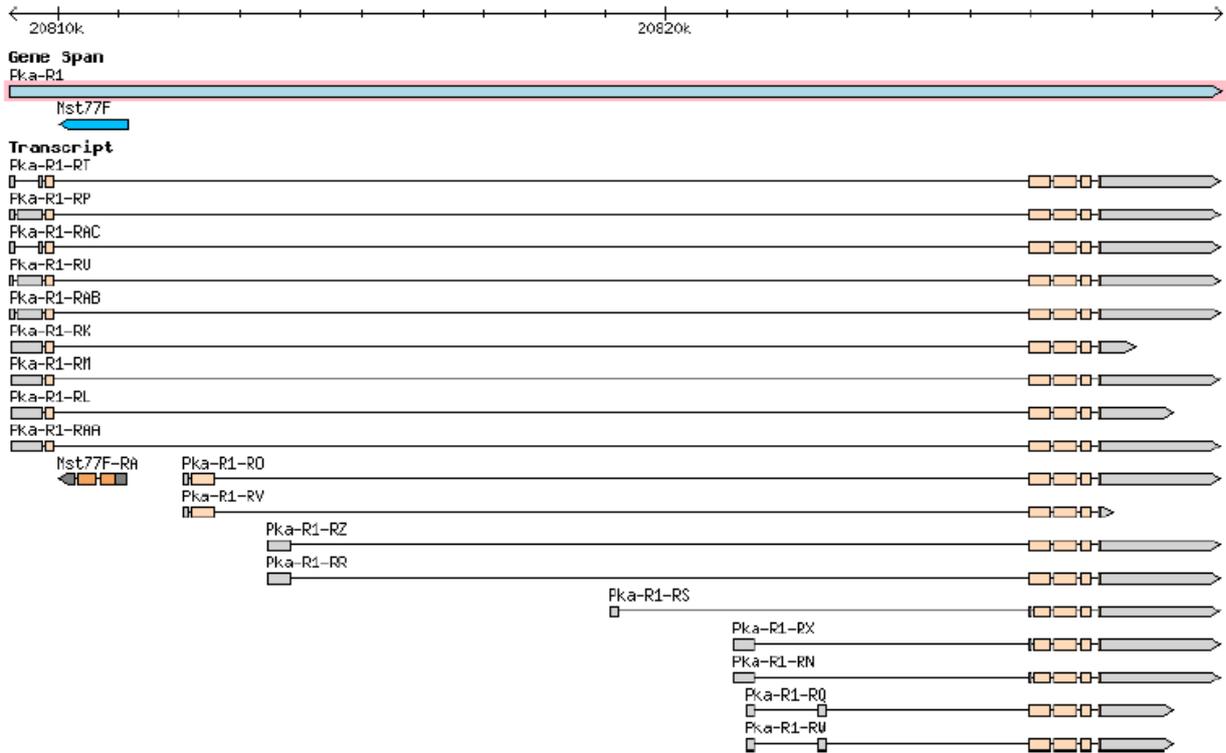
9.1 Übersicht zu den Transkripten des *pk-a-r1*-Gens

Die folgende Übersicht über die *pk-a-r1*-Transkripte stammt von FlyBase GBrowse (<http://flybase.org/cgi-bin/gbrowse/dmel/>; Tweedie *et al.*, 2009).

Overview



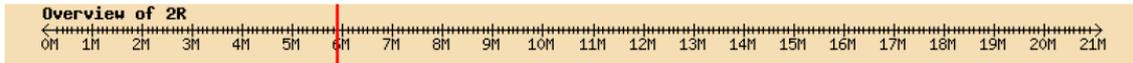
Details



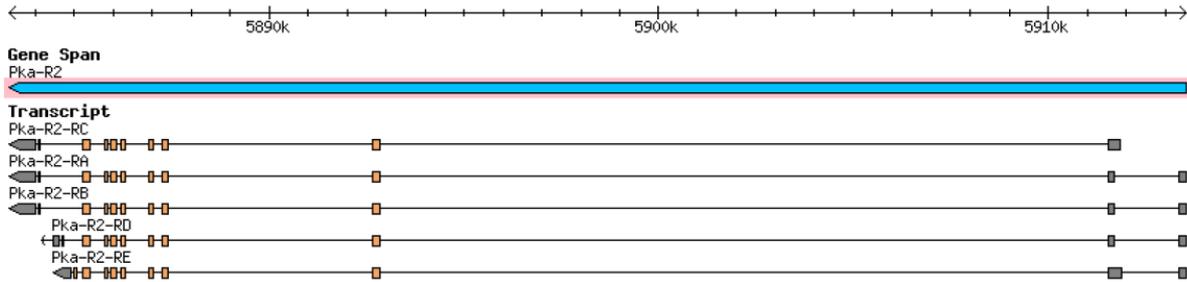
9.2 Übersicht zu den Transkripten des *pka-r2*-Gens

Die folgende Übersicht über die *pka-r2*-Transkripte stammt von FlyBase GBrowse (<http://flybase.org/cgi-bin/gbrowse/dmel/>; Tweedie *et al.*, 2009).

Overview



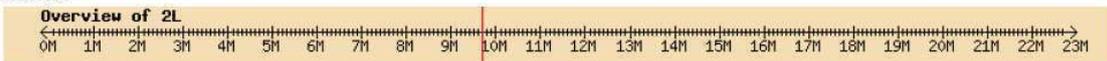
Details



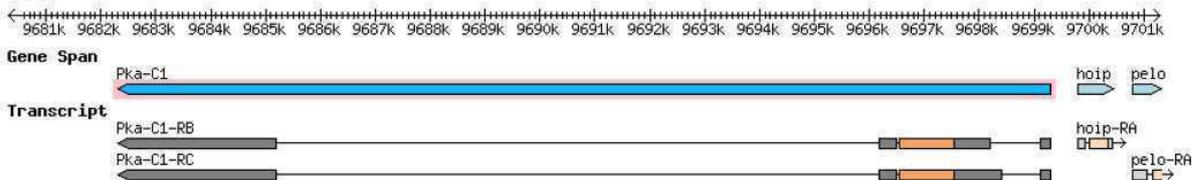
9.3 Übersicht zu den Transkripten des *pka-c1*-Gens

Die folgende Übersicht über die *pka-r2*-Transkripte stammt von FlyBase GBrowse (<http://flybase.org/cgi-bin/gbrowse/dmel/>; Tweedie *et al.*, 2009).

Overview

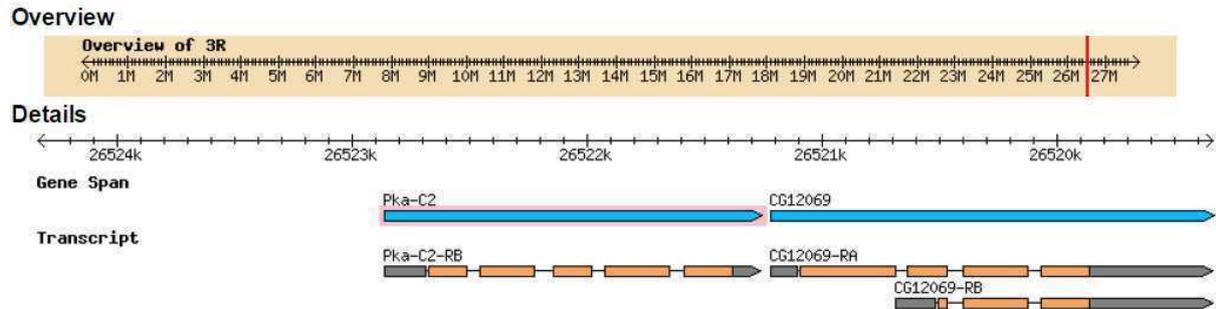


Details



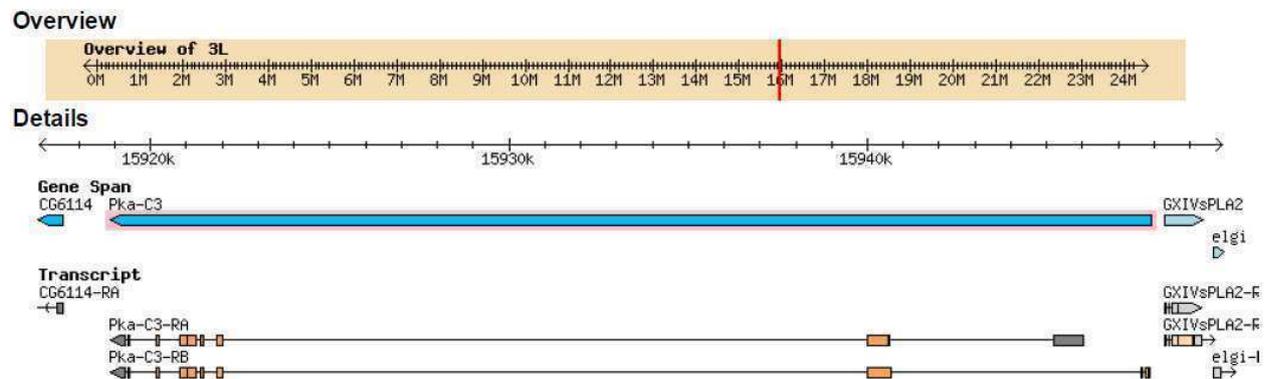
9.4 Übersicht zu den Transkripten der Gene *pka-c2* und *CG12069*

Die folgende Übersicht über die *pka-r2*-Transkripte stammt von FlyBase GBrowse (<http://flybase.org/cgi-bin/gbrowse/dmel/>; Tweedie *et al.*, 2009).



9.5 Übersicht zu den Transkripten des *pka-c3*-Gens

Die folgende Übersicht über die *pka-r2*-Transkripte stammt von FlyBase GBrowse (<http://flybase.org/cgi-bin/gbrowse/dmel/>; Tweedie *et al.*, 2009).



9.6 Liste der Primer

Primer	Schnittstelle	Sequenz (5' > 3')
C1-BRET-GFP3	<i>Bam</i> HI	AAA GGA TCC TCT AGA ATT CAG CAA ACT C
C1-BRET-GFP5	<i>Hind</i> III	AAA AAG CTT TCC AAG ATG GGC AAC AAC GC
C1-GFP-31	0	GTG TTC TCT GCA GCC CTA GC
C1-GFP-32	<i>Age</i> I	TTT ACC GGT ATC GAC GTG GTG GCG TTG TTG
C1-GFP-51	<i>Kpn</i> I	AAA GGT ACC GCA CGG CGG GAT CCT GTA G
C1-GFP-52	0	ACG TTG TAT TAT GAA GTA AGT TTA G
C2 like pro 3'	<i>Eco</i> RI	TTT GAA TTC TTG CGA CAA CAA CTC GCG
C2 like pro 5'	<i>Stu</i> I	AAA AGG CCT TCA ATG GAG GAG AGC TGT TC
C2 ORF 3'	<i>Eco</i> RI	TTT GAA TTC CGA TTT CGA AGG ACA CAT TGA C
C2 ORF 5'	<i>Xho</i> I	AAA CTC GAG TGC TGT TAT GAG CCA GCA CAC
C2 pro 3'	<i>Bgl</i> II	TTT AGA TCT AAC AGC ATA ACA TCC GGC C
C2 pro 5'	<i>Not</i> I	AAA GCG GCC GCG AAC TCG ACA GGA CAC TCA AC
C3-A-3'	0	GTT GGT GAG TTC TGA TTC T
C3-A-5'	0	ACA TGG GTC TTC AGA CTA G
C3-BB'-3'	0	CAC TGC ATG CAC TCA CCT CTT
C3-BB'-5'	0	CAT ATA CAT CGA TAT TTC GAG GG
C3-BRET-GFP3	<i>Hind</i> III	AAA AAG CTT CGG CTC TTA TTT AGA AAT CA
C3-BRET-GFP5	<i>Xho</i> I	AAA CTC GAG AAT GGA TTT GTG GCA TAT ATT
C3-GFP-pro3'	<i>Kpn</i> I	AAA GGT ACC TCG CTG ACT CTG CAA GCC ACT
C3-GFP-pro5'	<i>Xho</i> I	AAA CTC GAG CTC AGT CAT GTG GAG GTT GTC
C3 pro short 3'	<i>Bgl</i> II	TTT AGA TCT CCC CCT CGA AAT ATC GAT GT
C3 pro short 5'	<i>Pst</i> I	AAA CTG CAG CCG GGG AGA GAA GAT ACA G
CG14305-1	0	AGC GTA ACC GCA AGT TTG
CG14305-2	0	CAT ATC TGT GAA ACC AAC GC
CG14305 pro 1	<i>Eco</i> RI	AAA GAA TTC AAG GAG AGT GGA TAG GTA TCC
CG14305 pro 2	<i>Not</i> I	TTT GCG GCC GCC TCT TGT TTC CTC GGC GTG
CG9222-1	0	GCG TCG CCT ATG ATC CTT
CG9222-2	0	TCA GCT TTG TTG CAC TGC
CG9222 mod Sopp	<i>Sac</i> I	TTT CCG CGG CAA GTA TTT GCT AGG CGA ATA CC
CG9222 pro 1	<i>Xho</i> I	AAA CTC GAG CCG AGT AGA GCA GAT CCG

eGFP 3' C2-like	<i>XhoI</i>	TTT CTC GAG CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC
eGFP 5' C2-like	<i>EcoRI</i>	AAA GAA TTC ATG GTG AGC AAG GGC GAG
EGFP forw	<i>BglII</i>	AAA AGA TCT ATG GTG AGC AAG GGC GAG
GFP 3' C3 C2	<i>XhoI</i>	TTT CTC GAG TAC TTG TAC AGC TCG TCC ATG
PKA-R2-Ex1	<i>EcoRI</i>	AAA TCT AGA GCC TGA CAC GGA ATT CGG AAT AC
PKA-R2-fus	<i>KpnI, AgeI</i>	AAA GGT ACC GGT TCT CGT GTA TCG GTG ATA TGG
PKA-R2-Pro3'	<i>EcoRI</i>	AAA TCT AGA CCT CTG TAT TCC GAA TTC CGT G
R1-BRET-Rluc3	<i>ApaI</i>	AAA GGG CCC ACC GGA CAA CGA TAC GAA ACT G
R1-BRET-Rluc5	<i>KpnI</i>	AAA GGT ACC CAC CGT ACC ACA TGT CCT AC
R1-GFP-pro3'	<i>AgeI</i>	AAA ACC GGT ATG TAG GAC ATG TGG TAC GGT G
R1-GFP-pro3'-2	0	AAC CAG TTG TGG GTC TTT ATC C
R1-GFP-pro5'	<i>PstI</i>	AAA CTG CAG CGG AGG CAG GAG TTA TAT CC
R1-GFP-pro5'-2	0	TGC CCT GCG GTA ATC CTG AT
R2-3kb-pro	<i>KpnI</i>	AAA GGT ACC CCG ATT CGA CAT ATG GAA GAG G
R2 as 5	<i>BglII</i>	AAA AGA TCT CCA TCA ACA GCT AGA ACA CAC
R2 as 3	<i>XhoI</i>	TTT CTC GAG CGC TTA TCA GTA ACT AGC AGC

9.7 Sequenzvergleiche der C2-like-Orthologen aus verschiedenen *Drosophila*-Arten

In der folgenden Tabelle sind einige Eckdaten zu den drosophiliden C2-like-Orthologen aufgeführt.

<i>Drosophila</i>	Gen-Nummer	Annotierte Funktion	Anzahl der Transkripte (Längen)	Introns	Anzahl der Proteine (Längen)
ana <i>ananassae</i>	GF23315	unbekannt	1 (1071 nt)	4	1 (356 AS)
ere <i>erecta</i>	GG11917	unbekannt	1 (1071 nt)	4	1 (356 AS)
gri <i>grimshawi</i>	GH14104	unbekannt	1 (1074 nt)	4	1 (357 AS)
moj <i>mojavensis</i>	GI10636	unbekannt	1 (1056 nt)	4	1 (351 AS)
per <i>persimilis</i>	GL13993	unbekannt	1 (1071 nt)	4	1 (356 AS)
pse <i>pseudoobscura</i>	GA11372	Protein S/T kinase activity	1 (1071 nt)	4	1 (365 AS)
sec <i>sechellia</i>	GM12138	unbekannt	1 (1071 nt)	4	1 (356 AS)
sim <i>simulans</i>	GD16891	unbekannt	1 (1071 nt)	4	1 (356 AS)
vir <i>virilis</i>	GJ22992	unbekannt	1 (1074 nt)	4	1 (357 AS)
wil <i>willistoni</i>	GK13114	unbekannt	1 (1065 nt)	3	1 (354 AS)
yak <i>yakuba</i>	GE23367	unbekannt	1 (1071 nt)	4	1 (356 AS)
mel <i>melanogaster</i>	CG12069	Protein S/T kinase activity	2 (1750 nt; 1272 nt)	4 3	2 (A: 356 AS; B: 180 AS)

Es folgen die Proteinsequenzen, die im Anschluss mit dem Programm ClustalW 2 verglichen wurden (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>; EMBL-EBI).

>ana

```
MGPQPEQPQMHSFKVDYILILDKLRDDFNKKFATNTPSPSTGLDDYDVKATLGSGSFGKVQLVRERETGAYYAS
KQLSKDQIVKTKQVAHVMSEKNVLRSMFPNTVHLIASYKDNDLSLYLVLPLIGGGELFTYHRKVRKFTEKQARFY
AAQVFLALEYLHHCSSLRYRDLKPENIMMDKNGYLKVTDFGFAKKVETRMTLTCGTPEYLPPEIIQSKPYGTSVDW
WAFGVLVFEFVAGHSPFSAHNRDVMSMYNKICEGEYKMPSYFSGALRHLVDHLLQVDLSKRYGNLINGNRDIKEH
EWFKEVEWIPLLNQTVNAPYVPNISNPEDISNFDKVNDAKPKAKTMRHEDAFQDF
```

>ere

```
MGPQPEQAHMHSFKVDYILILDKLREDFNKKFATNTPSPSTGLDDYEIKATLGSGSFGKVQLVRERESGVYYAS
KQLSKDQIIKTKQVSHVMSEKNVLRSMFPNTVNLIASYKDFDSLVLVLPLIGGGELFTYHRKVRKFTEKQARFY
AAQVFLALEYLHHCSSLRYRDLKPENIMMDKNGYLKVTDFGFAKKVETRMTLTCGTPEYLPPEIIQSKPYGTSVDW
WAFGVLVFEFVAGHSPFSAHNRDVMSMYNKICEADYKMPSYFSGSLRHLVDHLLQVDLSKRFGNLINGNRDIKEH
EWFKDVEWIPLLNQTVNAPYVPNISNPEDISNFDKVS DKPRPKAKTMRHEEAFADF
```

>gri

```
MGRQSTGEPQYFSPKIEYAVVLDKMKDEFNKKFTRNTPSPTCGLDNFLVKATLGSGSFGKVQLVKELESDNFYAS
KQLSKEQIIKTKQVSHVMSEKRVLNSIRFPFTVHLIISFKDTSLYLILPLILGGELFTYHRKVRKFGKQARFY
AAQVFLALEYLHHCSSLRYRDLKPENIMLDKNGYIKVTDFGFAKKVETRMTLTCGTPEYLPPEIIQSKPYGTSVDW
WAFGVLIIYEFVAGHSPFSAHNRDVMIMYTKICEADYKLPGSFSSALRHLVDHLLQVDLSKRFGNLIGGTDKIDH
EWFKEVDWTTMLNQTIQAPYVPTISNAEDISNFDKQSEGRKPKAKTVRHEEAFADF
```

>moj

```
MDPQYFSPKVDYGVILDKLDEFNKKFVRNTPSPSCGLDNFIKATLGAGSFGKVQLVKEKDGENYASKQLSKD
QIIKTKQVSHVMSEKKNVLSMCFPFTVNLISFKDNDLSLYLVLPLIMGGELFTYHRKVRKFSKQARFYAAQVFL
ALEYLHYCSSLLRYRDLKPENIMLDKNGYLKVTDFGFAKKVETRMTLTCGTPEYLPPEIIQSKPYGTSVDWWAFGVL
IYEFVAGHSPFATHSRDVMVMYNKICEGDYKMPSAFSGPLRHLVDHLLQVDLSKRFGNLIGGNKDIKNHEWFKEV
EWIPLLNQTIQPPYTPTISNAEDISNFDKHNDKQKPKSKTVKHHEEAFVDF
```

>per

```
MGPPPGETPMHSFKTDYLLILDKLREDFNKKFAQNVPSPGTGLDTFEVKSTLGAGSFGKVQLVRERESGQYFAS
KQLSKDQIVKTKQVMHVMSEKNVLRSIHFPNTVYLIASFKDFDSLVLILPLIAGGELFSYHRKVRKFTEKQARFY
AAQVFLALEYLHHCSSLRYRDLKPENIMIDKNGYLKVTDFGFAKKVETRMTLTCGTPEYLPPEIIQSKPYGTSVDW
WAFGVLIFEFVAGSSPFSAHNRDVMAMYNKICEADYKMPSYFSGSLRHLVDHLLQVDLSKRYGNLINGNKDIKEH
EWFKDVEWIPLLNQTVHAPYVPNLANSEDTHFDKINEKPRSKAKNMRHEEAFADF
```

>pse

MGPPPGETPMHFSPKTDYLLILDKLRDFNKKFAQNVPSPGTGLDTFEIKSTLGAGSFGKVQLVRERESGQYFAS
KQLSKDQIVKTKQVMHVMSEKNVLRSIHFPNTVYLIASFKDFDSLVLPLIAGGELFSYHRKVRKFTEKQARFY
AAQVFLALEYLLHHCSSLYRDLKPENIMIDKNGYLKVTDGFAKKVETRMTLTCGTPEYLPPEIIQSKPYGTSVDW
WAFGVLIFEVAGSSPFSAHNRDVMAMYNKICEADYKMPSYFSGSLRHLVDHLLQVDLSKRYGNLINGNKDIKEH
EWFKDVEWIPLLNQTVHAPYVPNLANSEDTHFDKINEKPRSKAKNMRHEEIFADF

>sec

MGPQPEQTQMHFSPKVDYILILDKLRDFNKKFATNTPSPSTGLDDYEIKATLGSGSFGKVQLVRERESGIYYAS
KQLSKDQIVKTKQVSHVMSEKNVLRSMTFPNTVNLIASYKDFDSLVLPLIIGGELFTYHRKVRKFTEKQARFY
AAQVFLALEYLLHHCSSLYRDLKPENIMMDKNGYLKVTDGFAKKVETRMTLTCGTPEYLPPEIIQSKPYGTSVDW
WAFGVLVFEFVAGHSPFSAHNRDVMVMYNKICEADYKMPSYFSGALRHLVDHLLQVDLSKRFGNLINGNRDIKEH
EWFKDVEWIPLLNQTVNAPYVPNISNPEDISNFDKVS DKPRPKAKTMRHEEAFADF

>sim

MGPQPEQAQMHFSPKVDYILILDKLRDFNKKFATNTPSPSTGLDDYEIKATLGSGSFGKVQLVRERESGIYYAS
KQLSKDQIVKTKQVSHVMSEKNVLRSMTFPNTVNLIASYKDFDSLVLPLIIGGELFTYHRKVRKFTEKQARFY
AAQVFLALEYLLHHCSSLYRDLKPENIMMDKNGYLKVTDGFAKKVETRMTLTCGTPEYLPPEIIQSKPYGTSVDW
WAFGVLVFEFVAGHSPFSAHNRDVMVMYNKICEADYKMPSYFSGALRHLVDHLLQVDLSKRFGNLINGNRDIKEH
EWFKDVEWIPLLNQTVNAPYVPNISNPEDISNFDKVS DKPRPKAKTMRHEEAFADF

>vir

MGRQSVLEPQYFSPKVDYGVILDKLKDEFNKRFSRNTSPSPSCGLDNYIIKATLGAGSFGKVQLVKEKDTEEYYAS
KQLSKDQIVKTKQVMHVMSEKRVLNAIHFPFTVNLIASFKDNDSLYLILPLLLGGELFTYHRRVRKFSEKQARFY
AAQVFLALEYLLHHCSSLYRDLKPENIIDKNGYLKVTDGFAKKVETRMTLTCGTPEYLPPEIIQSKPYGTSVDW
WAFGVLIIYEFVTGHSPFASHNRDVMVMYNKICEGDYKMPSAFTGALRHLVDHLLQVDLSKRYGNLIGGNKDIKNH
EWFKEVEWIALLNQTIAPPYLPPTISNAEDISNFDKHPEGKHKPKAKTMRHEEAFAEF

>wil

MGVYEQQSFSKVDYKLLILDKLRDEFNKKFSQNTPSLAIGLDNYEIKATLGAGSFGKVQMVKEKSSGNYYASKQL
SKDQIMKTKQVAHVMSEKRVLRSIFFPFTVYLVASFKDNDSLYLILPIVPGGELFTYHRKVRKFSEKQARFYAAQ
VFLALEYLLHHCSSLYRDLKPENIMIDKNGYLKVTDGFAKKVETRMTLTCGTPEYLPPEIIQSKPYGTSVDWWAF
GVLVYEFVAGHSPFSSHNRDMMVMYNKICECDYKMPSYFSGSLRHLVDHLLQVDLSKRYGNLINGNKDIKDHEWF
KEIDWIPLLNQTI SPPYIPTISNPEDISHFDKISEGPKTKAKTMRHEEAFADF

>yak

MGPQPEQGHMHFSPKVDYILILDKLRDFNKKFATNTPSPCTGLDDYEIKATLGSGSFGKVQLVRERESGIYYAS
KQLSKDQIVKTKQVSHVMSEKNVLRSMTFPNTVNLIASYKDFDSLVLPLIIGGELFTYHRKVRKFTEKQARFY
AAQVFLALEYLLHHCSSLYRDLKPENIMMDKNGYLKVTDGFAKKVETRMTLTCGTPEYLPPEIIQSKPYGTSVDW
WAFGVLVFEFVAGHSPFSAHNRDVMVMYNKICEADYKMPSYFSGSLRHLVDHLLQVDLSKRFGNLINGNRDIKEH
EWFKDVEWIPLLNQTVNAPYVPNISNPEDISNFDKVS DKPRPKAKTMRHEEAFADF

>mela

MGPQPEQAQMHFSPKVDYILILDKLREDFNKKFATNTPSSTGLDDYEIKATLGSGSFGKQVLRERESGVYYAS
 KQLSKDQIVKTKQVSHVMSEKNVLRSMTFPNTVNLIASYKDFDSLVLVPLIGGGELFTYHRKVRKFTEKQARFY
 AAQVFLALEYLHHCSSLYRDLKPENIMMDKNGYLKVTDFGFAKKVETRMTLTCGTPEYLPPEIIQSKPYGTSVDW
 WAFGVLVFEFVAGHSPFSAHNRDVMSMYNKICEADYKMPSYFSGALRHLVDHLLQVDLSKRFGNLINGNRDIKEH
 EWFKDVEWIPLLNTVNPYVPNISNPEDISNFDKVS DKPRPKAKTMRHEEAFADF

>melB

MMDKNGYLKVTDFGFAKKVETRMTLTCGTPEYLPPEIIQSKPYGTSVDWAFGVLVFEFVAGHSPFSAHNRDVMS
 MYNKICEADYKMPSYFSGALRHLVDHLLQVDLSKRFGNLINGNRDIKEHEWFKDVEWIPLLNTVNPYVPNISN
 PEDISNFDKVS DKPRPKAKTMRHEEAFADF

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

sec      MGPQPEQTQMHFSPKVDYILILDKLREDFNKKFATNTPSSTGLDDYEIKATLGSGSFGK 60
sim      MGPQPEQAQMHFSPKVDYILILDKLREDFNKKFATNTPSSTGLDDYEIKATLGSGSFGK 60
mela     MGPQPEQAQMHFSPKVDYILILDKLREDFNKKFATNTPSSTGLDDYEIKATLGSGSFGK 60
ere      MGPQPEQAQMHFSPKVDYILILDKLREDFNKKFATNTPSSTGLDDYEIKATLGSGSFGK 60
yak      MGPQPEQGHMHFSPKVDYILILDKLREDFNKKFATNTPSCTGLDDYEIKATLGSGSFGK 60
melB     -----
ana      MGPQPEQPQMHFSPKVDYILILDKLRDDFNKKFATNTPSSTGLDDYDVKATLGSGSFGK 60
per      MGPPPGETPMHFSPKTDYLLILDKLREDFNKKFAQNVPSPGTGLDTFEVKSTLGAGSFGK 60
pse      MGPPPGETPMHFSPKTDYLLILDKLREDFNKKFAQNVPSPGTGLDTFEIKSTLGAGSFGK 60
wil      MGVEEQQS---FSSKVDYKLILDKLREDFNKKFSQNTPLAIGLDNYEIKATLGAGSFGK 57
moj      -----MDPQYFSPKVDYGVILDKLDFNKKFVRNTPSPSCGLDNFIKATLGAGSFGK 54
vir      MGRQSVLEPQYFSPKVDYGVILDKLDFNKKFRNTPSPSCGLDNYI KATLGAGSFGK 60
gri      MGRQSTGEPQYFSPKIEYAVVLDKMKDFNKKFRNTPSPTCGLDNFLVKATLGSGSFGK 60
    
```

```

sec      VQLVRRERESGIYYASKQLSKDQIVKTKQVSHVMSEKNVLRSMTFPNTVNLIASYKDFDSL 120
sim      VQLVRRERESGIYYASKQLSKDQIVKTKQVSHVMSEKNVLRSMTFPNTVNLIASYKDFDSL 120
mela     VQLVRRERESGVYYASKQLSKDQIVKTKQVSHVMSEKNVLRSMTFPNTVNLIASYKDFDSL 120
ere      VQLVRRERESGIYYASKQLSKDQIVKTKQVSHVMSEKNVLRSMTFPNTVNLIASYKDFDSL 120
yak      VQLVRRERESGIYYASKQLSKDQIVKTKQVSHVMSEKNVLRSMTFPNTVNLIASYKDFDSL 120
melB     -----
ana      VQLVRRERETGAYYASKQLSKDQIVKTKQVAHVMSSEKNVLRSMFPNTVHLIASYKDNDL 120
per      VQLVRRERESGQYFASKQLSKDQIVKTKQVMHVMSEKNVLRSHFPNTVYLIASFKDFDSL 120
pse      VQLVRRERESGQYFASKQLSKDQIVKTKQVMHVMSEKNVLRSHFPNTVYLIASFKDFDSL 120
wil      VQMVKEKSSGNYYASKQLSKDQIMKTKQVAHVMSSEKNVLRSHFPNTVYLVASFKDNDSL 117
moj      VQLVKEKDGENYYASKQLSKDQIIKTKQVSHVMSEKRVLNSMCFPFTVNLISSFKDNDSL 114
vir      VQLVKEKDT EYYASKQLSKDQIVKTKQVMHVMSEKRVLNAIHFPFTVNLIASFKDNDSL 120
gri      VQLVKELESDFYASKQLSKEQIIKTKQVSHVMSEKRVLNSIRFPFTVHLISSFKDSDL 120
    
```

```

sec      YLVLPPLIGGGELFTYHRKVRKFTEKQARFYAAQVFLALEYLHHCSSLYRDLKPENIMMDK 180
sim      YLVLPPLIGGGELFTYHRKVRKFTEKQARFYAAQVFLALEYLHHCSSLYRDLKPENIMMDK 180
mela     YLVLPPLIGGGELFTYHRKVRKFTEKQARFYAAQVFLALEYLHHCSSLYRDLKPENIMMDK 180
ere      YLVLPPLIGGGELFTYHRKVRKFTEKQARFYAAQVFLALEYLHHCSSLYRDLKPENIMMDK 180
yak      YLVLPPLIGGGELFTYHRKVRKFTEKQARFYAAQVFLALEYLHHCSSLYRDLKPENIMMDK 180
melB     -----MMDK 4
ana      YLVLPPLIGGGELFTYHRKVRKFTEKQARFYAAQVFLALEYLHHCSSLYRDLKPENIMMDK 180
per      YLILPLIAGGELFSYHRKVRKFTEKQARFYAAQVFLALEYLHHCSSLYRDLKPENIMIDK 180
pse      YLILPLIAGGELFSYHRKVRKFTEKQARFYAAQVFLALEYLHHCSSLYRDLKPENIMIDK 180
wil      YLILPLIVP GGELFTYHRKVRKFSEKQARFYAAQVFLALEYLHHCSSLYRDLKPENIMIDK 177
moj      YLVLPPLIMGGELFTYHRKVRKFSEKQARFYAAQVFLALEYLHYSLLYRDLKPENIMLDK 174
vir      YLILPLLLGGELFTYHRKVRKFSEKQARFYAAQVFLALEYLHHCSSLYRDLKPENI I IDK 180
gri      YLILPLIILGGELFTYHRKVRKFGEKQARFYAAQVFLALEYLHHCSSLYRDLKPENIMLDK 180
    
```

: : **

9.8 Liste potentieller C2-like-Substrate

Die folgende Tabelle fasst einige Fakten der in der Liste von Gao *et al.* (2008) aufgeführten potentiellen Substrate von C2-like zusammen. Diese Fakten stammen aus FlyBase (Tweedie *et al.*, 2009).

CG-Nummer	Name	Hoden-ESTs	Andere mögliche ESTs	annotierte Funktion
5072	Cdk4	1 von 23	16 von 23	<p>molekulare Funktion: Serin/Threonin-Kinaseaktivität, Cyclin-abhängige Kinaseaktivität, Cyclin-Bindung, ATP-Bindung</p> <p>biologische Prozesse: Aminosäuren-Phosphorylierung, Zellproliferation, Zellwachstum, Zellzyklus, JAK-STAT-Kaskade, Organisation und Biogenese von Mitochondrien, Blastoderm-Segmentierung, Entwicklung des offenen trachealen Systems</p>
7393	p38b	-	21 von 26	<p>molekulare Funktion: MAP Kinaseaktivität, Serin/Threonin-Kinaseaktivität, SAP Kinaseaktivität; ATP-Bindung</p> <p>biologische Prozesse: Regulierung des BMP Signalwegs, Flügel-Morphogenese, MAPKKK-Kaskade, Aminosäuren-Phosphorylierung, Verteidigung, Reaktion auf Salzstress, Reaktion auf Stress, Regulierung der angeborenen Immunantwort</p>

8203	Cdk5	-	10 von 16	<p>molekulare Funktion: Serin/Threonin-Kinaseaktivität, Cyclin-abhängige Kinaseaktivität, Cyclin-Bindung, ATP-Bindung</p> <p>biologische Prozesse: Aminosäuren-Phosphorylierung, Ausschüttung von Neurotransmittern, Zellzyklus, Axonausbildung</p>
3319	Cdk7	-	7 von 7	<p>molekulare Funktion: Serin/Threonin-Kinaseaktivität, Cyclin-abhängige Kinaseaktivität, generelle RNA Polymerase II Transkriptionsfaktor-Aktivität, ATP-Bindung</p> <p>biologische Prozesse: Mitose, Aminosäure-Phosphorylierung, Regulierung der Cyclin-abhängige Kinaseaktivität, Transkriptionsinitiation</p>
5680	basket	-	21 von 25	<p>molekulare Funktion: JUN Kinaseaktivität, Serin/Threonin-Kinaseaktivität, Proteinbindung, MAP Kinaseaktivität, ATP-Bindung, Phosphorylase Kinaseaktivität; Calmodulin-Bindung</p> <p>biologische Prozesse: u.a. Follikelzellenentwicklung im Ovar, Immunantwort, Verteidigung, Zellbewegung, Proteinmodifizierung, Wundheilung</p>

7236	-	-	3 von 3	<p>molekulare Funktion: Serin/Threonin-Kinaseaktivität, Cyclin-abhängige Kinaseaktivität, ATP-Bindung</p> <p>biologische Prozesse: Aminosäuren-Phosphorylierung, Zytokinese</p>
10895	loki	-	35 von 47	<p>molekulare Funktion: Serin/Threonin-Kinaseaktivität, Proteinkinaseaktivität, ATP-Bindung</p> <p>biologische Prozesse: Keimzellentwicklung, Aminosäuren-Phosphorylierung, Reaktion auf DNA-Schäden, Induktion von Apoptose, Zellzyklus-Checkpoint, Kaspase-Aktivierung</p>
8866	-	1 von 19	14 von 19	<p>molekulare Funktion: Serin/Threonin-Kinaseaktivität, Proteinkinaseaktivität, ATP-Bindung</p> <p>biologische Prozesse: Aminosäuren-Phosphorylierung</p>
5365	cdc2	-	44 von 45	<p>molekulare Funktion: Serin/Threonin-Kinaseaktivität, Cyclin-abhängige Kinaseaktivität, Protein-Bindung, ATP-Bindung</p> <p>biologische Prozesse: Zellzyklus, Zellteilung, Gametenentwicklung, Meiose, Genexpression</p>

10498	cdc2c	-	15 von 16	<p>molekulare Funktion: Serin/Threonin-Kinaseaktivität, Cyclin-abhängige Kinaseaktivität, ATP-Bindung</p> <p>biologische Prozesse: mitotischer Zellzyklus, Aminosäuren-Phosphorylierung, JAK-STAT-Kaskade</p>
9222	-	9 von 15	5 von 15	<p>molekulare Funktion: Serin/Threonin-Kinaseaktivität, Proteinkinaseaktivität, ATP-Bindung</p> <p>biologische Prozesse: Aminosäuren-Phosphorylierung</p>
18069	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II	-	ca. 280 von 310	<p>molekulare Funktion: Serin/Threonin-Kinaseaktivität, Calmodulin-abhängige Kinaseaktivität, Calmodulin-Bindung, ATP-Bindung</p> <p>biologische Prozesse: männliches Paarungsverhalten, Lernen und Gedächtnis, synaptische Übertragung, Aminosäuren-Phosphorylierung, Langzeitgedächtnis</p>
31421	Tak1-like1	-	5 von 6	<p>molekulare Funktion: MAPKKK-Aktivität, ATP-Bindung; protein Tyrosin-Kinaseaktivität.</p> <p>biologische Prozesse: Aminosäuren-Phosphorylierung</p>
4629	-	2 von 25	17 von 25	<p>molekulare Funktion: Serin/Threonin-Kinaseaktivität, ATP-Bindung</p>

				<p>biologische Prozesse: Aminosäuren-Phosphorylierung, Zell-Adhäsion, Regulierung der Zellform</p>
1776	-	-	14 von 16	<p>molekulare Funktion: Serin/Threonin-Kinaseaktivität, ATP-Bindung</p> <p>biologische Prozesse: Aminosäuren-Phosphorylierung, Aktinfilamentorganisation, Regulierung der Zellform</p>
15793	Downstream of raf 1	-	15 von 17	<p>molekulare Funktion: MAPKK-Aktivität, MAPK-Aktivität, Serin/Threonin-Kinaseaktivität, ATP-Bindung</p> <p>biologische Prozesse: Signaltransduktion, Wanderung der Border-Zellen, Festlegung der anterior/posterior-Achse, Aminosäuren-Phosphorylierung, MAPKKK-Kaskade, Regulierung des Toll Signalwegs, sevenlessSignalweg, torso Signalweg</p>
14305	-	13 von 17	4 von 17	<p>molekulare Funktion: Serin/Threonin-Kinaseaktivität, Proteinkinaseaktivität, ATP-Bindung</p> <p>biologische Prozesse: Aminosäuren-Phosphorylierung.</p>
1362	cdc2-related-kinase	1 von 12	11 von 12	<p>molekulare Funktion: Serin/Threonin-Kinaseaktivität, Cyclin-abhängige Kinaseaktivität, ATP-Bindung</p>

				<p>biologische Prozesse: Aminosäuren-Phosphorylierung</p>
12559	rolled	-	1 von 3	<p>molekulare Funktion: Serin/Threonin-Kinaseaktivität, JUN Kinaseaktivität, Protein-Bindung, ATP- Bindung, MAPK-Aktivität</p> <p>biologische Prozesse: u.a. Organogenese, Sinnesorganentwicklung, Zellzyklus, Apoptose, Spezifizierung der anterior/posterior-Achse</p>
11420	Pan gu	-	5 von 5	<p>molekulare Funktion: Serin/Threonin-Kinaseaktivität, ATP- Bindung</p> <p>biologische Prozesse: mitotischer Zellzyklus, Ei-Aktivierung, Aminosäuren-Phosphorylierung</p>

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Mireille Schäfer bedanken, unter deren Leitung ich fünf Jahre lang an diesem tollen Thema arbeiten durfte. Sie stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite und ich konnte stets von ihrem großen Erfahrungsschatz profitieren. Ebenfalls nicht zu vergessen sind ihre Bemühungen, das gesamte Labor stetig mit Nervennahrung und neuerdings auch mit Kaffee zu versorgen. Vielen Dank auch dafür!

Meinen ehemaligen und aktuellen Mit-Doktoranden Dr. Holger Starck, Dr. Caroline Schäfer, Katrin Stinski und Ilka Pfurr danke ich für ihre Freundschaft und das äußerst angenehme und konstruktive Arbeitsklima. Aus dem gleichen Grund möchte ich mich auch bei Ivonne Brüstle, Bärbel Heydenreich, Indra Windhof, Diana Rubel und Elena Akulova bedanken. Dafür, dass sie sich so hervorragend um meine kleinen Fliegen kümmern und immer zur Stelle waren, wenn es gebrannt hat, danke ich Nicole Schleinschok, Tanja Wilhelm und Christine Otto. Außerdem bedanke ich mich natürlich auch bei Anke Eberhardt, Lydia Sand und Birgit Simon, ohne die der Laborbetrieb bestimmt so manches Mal zusammengebrochen wäre. Weiterhin danke ich Martin Hollmann, der mir gerade beim Einstieg in den Laboralltag sehr geholfen hat und den zahlreichen Großpraktikanten, die mich bei meiner Arbeit mehr oder weniger erfolgreich unterstützt haben. Die Betreuung hat auf jeden Fall Spaß gemacht und ich konnte viel dabei lernen.

Herrn Prof Dr. Friedrich Herberg danke ich dafür, dass er das Koreferat übernommen hat und dass er für alle PKA-relevanten Fragen, auch mal nur zwischen Tür und Angel, zur Verfügung stand. Für die Hilfe bei der Durchführung der BRET-Analysen und den damit verbundenen konstruktiven Diskussionen danke ich Dr. Anke Prinz, Dr. Mandy Diskar, Stefanie Brockmeyer und Carmen Demme. Außerdem danke ich für die mehr oder minder gelungenen Überexpressions- und Aufreinigungsversuche Dr. Alexandra Kaupisch und für die massenspektrometrischen Untersuchungen Susanne Hanke und Oliver Bertinetti.

Für den anti-GFP-Antikörper und die Möglichkeit, Aufnahmen am konfokalen Mikroskop machen zu können bedanke ich mich bei Prof. Dr. Markus Maniak und Harald Rühling.

Mein Dank geht auch an Dr. Ulrich Schäfer, der mich gerade in der letzten Phase dieser Arbeit fleißig mit Literatur etc. versorgt hat. Herzlichen Dank auch an Dr. Daniel Calderon für den anti-R2-Antikörper und an Dr. Bernard Mechler für die Zystenzelltreiber.

Danksagung

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich ganz besonders bei der Universität Kassel, die mir über drei Jahre hinweg ein Promotionsstipendium bewilligt hat.

Ein besonders herzlicher Dank geht an meine Eltern Wolfgang und Birgit Gustke, sowie an meinen Bruder Tobias Gustke für die nie endende Unterstützung und den Rückhalt in allen Lebenslagen. Für den nötigen Ausgleich in der Freizeit und die schöne Zeit in Kassel bedanke ich mich bei meinen liebsten Freundinnen Christine Niemeyer und Meike Felzmann.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und andere als in der Dissertation angegebene Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Kein Teil der Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Kassel, Januar 2011

Franziska Gustke