

Funktionelle Analyse von Geminin und TIPT während der Spermatogenese

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Alexander Klimke
geboren am 27.02.1979 in Hannover

2012

Referent: Prof. Dr. Jörg Schmidtke

Korreferent: Prof. Dr. Michael Kessel

Drittreferent: Prof. Dr. Bernhard Huchzermeyer

Tag der Promotion: 23.05.2012

“The capacity to blunder slightly is the real marvel of DNA. Without this special attribute, we would still be anaerobic bacteria and there would be no music.”

~Lewis Thomas (1913-1993)

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Funktion von Geminin und TIPT während der Spermatogenese *in vivo* anhand von Funktionsverlustmutanten im Mausmodell. Geminin ist an der Regulation von DNA Replikation und zellulärer Differenzierung beteiligt, zwei Prozesse, die auch bei der Meiose und Keimzellendifferenzierung zentrale Rollen spielen. Da eine globale Geminin-Deletion früh embryonal lethal ist, wurde für dieses Gen ein konditioneller Ansatz sowohl mit einer testisspezifischen Cre-Linie, Stra8-Cre, sowie einer durch Tamoxifen global induzierbaren Cre-Linie, CAGGCre-ERTM, gewählt. Während eine testisspezifische Deletion von Geminin mit der Stra8-Cre Linie nicht erreicht werden konnte, zeigte die globale Cre-Induktion durch Tamoxifeninjektion bei neonatalen Mäusen eine Geminin-Deletion mit sehr hoher Effizienz. Trotz einer nahezu vollständigen Ablation des Proteins in den Testes differenzierten die Keimzellen auch in Abwesenheit des Proteins zu postmeiotischen Spermatiden und es war keine erhöhte Apoptose zu beobachten, welche auf eine Aktivierung von meiotischen Kontrollpunkten hindeuten würde. Jedoch führte der globale Knockout zu drastischen Auswirkungen auf den gesamten Organismus. Die Mäuse zeigten ein retardiertes Wachstum und eine geringe Gewichtszunahme, waren kränklich und starben oft innerhalb der ersten zwei Wochen. Dieser Phänotyp ist wahrscheinlich auf eine Anämie zurückzuführen, welche bei Deletion von Geminin im Knochenmark entsteht.

TIPT wurde als Interaktionspartner von Geminin identifiziert. Bereits veröffentlichte *in vitro* Daten zur transkriptionellen Aktivierung durch TIPT und die hohe Expression während der Spermatogenese deuteten eine potentielle Funktion dieses Proteins während der keimzellspezifischen Transkription an. Die funktionelle *in vivo* Analyse von TIPT umfasste die Generierung einer Knockout Mauslinie, die phänotypische Charakterisierung, die Identifikation potentieller Interaktionspartner und daraus abgeleitete Untersuchungen der hyperthermen Stressantwort.

Die globale Deletion von TIPT in Mäusen zeigt keinen Phänotyp unter standardisierten Tierhaltungsbedingungen. Die Tiere sind lebensfähig, fertil, ohne morphologische und verhaltensbiologische Auffälligkeiten und zeigen eine effiziente Spermatogenese mit normalen Wurfgrößen. Es sind keine Defekte in der Motilität der Spermatozoen sowie der Histontfernung und Chromatinkondensation in Spermatiden zu beobachten. Die Analyse von TIPT-Interaktionspartnern in Testes durch differentielle, massenspektrometrische Analyse ergab Kandidaten, welche auf eine Regulation von Stressantworten hindeuten. Nach Hitzschock verändert TIPT, im Gegensatz zu Geminin, seine subzelluläre Lokalisation und ist

in einzelnen, überwiegend perinukleär lokalisierten Foci konzentriert. Nach Hyperthermie *in vivo* zeigen die *Tipt*^{-/-} Testes eine verstärkte Apoptoseantwort bei prämeiotischen Spermatozyten, eine erhöhte Anzahl von multinukleären Riesenzellen bei postmeiotischen Spermatischen und eine disorganisierte Zellstruktur innerhalb der Tubuli seminiferi. Die Resultate deuten auf eine Funktion von TIPT in der testikulären Stressantwort nach Hyperthermie hin.

Schlagwörter: Spermatogenese, Geminin, TIPT

Keywords: Spermatogenesis, Geminin, TIPT

Abstract

The aim of this study was the functional analysis of the two proteins Geminin and TIPT during spermatogenesis *in vivo* using loss-of-function mutants in the mouse model.

Geminin is involved in the regulation of DNA replication and cellular differentiation, therefore the role of this protein during meiosis and germ cell differentiation was studied. Since a global Geminin deletion is early embryonic lethal, a conditional approach with a testis-specific cre-line (Stra8-Cre) and a tamoxifen-inducible, global cre-line (CAGGCre-ERTM) was chosen. While the testis-specific deletion of Geminin could not be achieved with the Stra8-Cre line, the global induction of Cre-recombinase via tamoxifen-injection resulted in an efficient deletion of Geminin. Despite an almost complete ablation of the protein in testes, spermatocytes differentiated efficiently into postmeiotic spermatids and no increase in apoptotic cells could be detected which would indicate the activation of meiotic checkpoints. Instead, the global knockout of Geminin resulted in dramatic consequences on the organism. The mice showed retarded growth, appeared sickly and died during the first two weeks postnatally. This phenotype is most probably due to severe anemia, which occurs after the deletion of Geminin in the bone marrow.

TIPT was identified as an interaction partner of Geminin. TIPT was shown to activate transcription *in vitro* and the high levels of this protein during spermatogenesis point to a potential function during germ cell - specific transcriptional processes. The functional *in vivo* analysis of TIPT comprised the generation of a knockout mouse line, the phenotypic characterization, the identification of potential interaction partners and, based on these findings, studies on the testicular, hyperthermal stress response in knockout mice.

The global deletion of TIPT in mice does not result in any obvious phenotype. The animals are viable, fertile, do not exhibit morphological or behavioral abnormalities and show efficient and robust spermatogenesis with normal litter sizes. No defects in sperm motility, histone removal and chromatin condensation can be observed in sperm cells from knockout animals. The screening for TIPT interaction partners in testes via differential mass-spectrometric analysis revealed candidates, which point to a role in the regulation of stress responses. After heat shock, TIPT changes its subcellular localization and accumulates in distinct perinuclear foci. After hyperthermia *in vivo*, the *Tipt*^{-/-} testes show an increased apoptotic response in premeiotic spermatocytes, an elevated number of multinucleated giant cells in postmeiotic spermatids and a disorganized cellular organization in the seminiferous tubuli. These results point to a function of TIPT in the regulation of the testicular stress response after hyperthermia.

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	4
TABELLENVERZEICHNIS	5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	6
1. EINLEITUNG	10
1.1. Die männliche Keimzeldifferenzierung in der Maus	10
1.1.1. Tubuli seminiferi – Aufbau und Struktur	11
1.1.2. Phasen der Spermatogenese	12
1.1.3. Der Zyklus des Keimepithels	14
1.1.4. Transkription während der Spermatogenese	15
1.1.5. Temperatur und Spermatogenese	17
1.2. Das bifunktionale Protein Geminin	18
1.2.1. Die Funktion von Geminin während der DNA Replikation	19
1.2.2. Geminin in der Entwicklung	20
1.2.3. Geminin-Depletion in verschiedenen Modellsystemen	21
1.2.4. Geminin in der Spermatogenese	23
1.3. Das spermatogenese-assoziierte Protein TIPT	23
1.3.1. <i>Tipt</i> : genomische Organisation, Isoformen und Proteinstruktur in der Maus	24
1.3.2. Subzelluläre Lokalisation und Expression von TIPT	25
1.3.3. TIPT2 aktiviert Transkription zusammen mit Geminin und TBP oder TRF2	25
1.4. ZIELSETZUNG	26
2. MATERIALIEN UND METHODEN	27
2.1. Molekularbiologische Methoden.....	27
2.1.1. Extraktion genomischer DNA aus Geweben	27
2.1.2. Isolation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	27
2.1.3. Polymerase – Kettenreaktion	28
2.1.4. RNA Isolation und Reverse Transkriptase – Polymerase - Kettenreaktion	30
2.1.5. Aufreinigung von PCR Fragmenten.....	30
2.1.6. Agarosegel - Elektrophorese	31
2.1.7. DNA Restriktionsverdau	31
2.1.8. Dephosphorylierung von DNA Enden	32
2.1.9. Ligation	32
2.1.10 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	32
2.1.11. Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> durch Hitzeschock.....	33
2.1.12. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
2.1.13. Sequenzierungen	33
2.1.14. Phenol – Chloroform Extraktion von Plasmiden	34

2.2. Generation eines konditionellen Knockout-Vektors und transgener Mäuse	34
2.2.1. Identifikation von PAC Klonen mit dem genomischen <i>Tipt</i> Lokus.....	35
2.2.2. Elektroporation der PAC - DNA in SW102.....	35
2.2.3. Konstruktion des Retrieval Vektors	36
2.2.4. Retrieval - Reaktion	37
2.2.5. Konstruktion der Minitargeting Vektoren.....	37
2.2.6. Einbringen der loxP Motive	39
2.2.7. Deletion der Neo-Kassette	39
2.2.8. <i>In vitro</i> Rekombinations - Funktionstest des konditionellen Targeting -Vektors.....	40
2.2.9. Homologe Rekombination in murinen ES Zellen.....	40
2.2.10. Analyse der ES Zell-Klone: PCR.....	40
2.2.11. Analyse der ES Zell-Klone: Southern Blot.....	41
2.2.12. Kreuzvernetzung der DNA auf der Membran durch UV Licht	42
2.2.13. Prähybridisierung und Hybridisierung.....	42
2.2.14. Generation und radioaktive Markierung der Southern-Proben.....	43
2.2.15. Generation von chimären Mäusen und Keimbahntransmission.....	43
2.3. Proteinbiochemische Methoden	43
2.3.1. Erstellung von Testis-Proteinextrakten.....	43
2.3.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
2.3.3. Western Blot Analyse	45
2.3.4. Ponceau-Färbung der Proteine	45
2.3.5. Behandlung der Membran mit primären und sekundären Antikörpern	45
2.3.6. Chemilumineszente Detektion der Proteine.....	46
2.4. Histologische Methoden.....	47
2.4.1. Einbetten der Gewebe in Kryomatrix	47
2.4.2. Anfertigung von Gefrierschnitten	47
2.4.3. Immunfluoreszenzfärbung auf Gefrierschnitten	47
2.4.4. ABC Färbung auf Gefrierschnitten	48
2.4.5. Alkaline Phosphatase Färbung.....	49
2.4.6. Einbetten der Gewebe in Paraffin	49
2.4.7. Anfertigung von Paraffinschnitten.....	50
2.4.8. Hämatoxylin- Eosin (HE) Färbung von Paraffin- und Kryoschnitten	50
2.4.9. TUNEL-Test	51
2.5. Analyse der Mauslinien	52
2.5.1. Tamoxifeninjektion	52
2.5.2. Spermienzahlbestimmung und Motilitätsanalyse	52
2.5.3. Ultrastrukturanalyse	52
2.5.4. Modifizierte Quetschpräparate von Tubuli seminiferi.....	53
2.5.5. Akridinorange-Färbung der Spermatozoen.....	53
2.5.6. Interaktionsanalyse.....	54
2.5.7. Induzierter Hitzeschock <i>in vitro</i>	56
2.5.8. Testikuläre Hyperthermie <i>in vivo</i>	56
3. ERGEBNISSE	57
3.1. TIPT und Geminin während der Spermatogenese in der Maus.....	57
3.1.1. Expression von TIPT während der murinen Spermatogenese	57
3.1.2. Expression von Geminin während der murinen Spermatogenese.....	58

3.2. Generierung von Mäusen mit testisspezifischer Geminin-Deletion mittels der Stra8-Cre Linie	60
3.2.1. Analyse der Stra8-Cre Expression mittels Z/AP - Reporter-mäusen	61
3.2.2. <i>Gmn</i> und Stra8-Cre werden gekoppelt vererbt.....	64
3.3. Generierung von Geminin-defizienten Mäusen mittels induzierbarer Cre-Rekombinase.....	65
3.4. Generierung eines konditionellen <i>Tipt</i> Targetingvektors.....	69
3.5. Generierung einer konditionellen <i>Tipt</i> Knockout Mauslinie	71
3.6. Analyse von <i>Tipt</i>^{-/-} Mäusen	72
3.6.1. Verifikation der TIPT Deletion auf DNA-, RNA- und Proteinebene	72
3.6.2. <i>Tipt</i> ^{-/-} Mäuse zeigen keinen offensichtlichen morphologischen und verhaltensbiologischen Phänotyp.....	73
3.6.3. Fertilitätsanalyse von männlichen und weiblichen <i>Tipt</i> ^{-/-} Mäusen.....	73
3.6.4. Analyse der Spermatogenese von <i>Tipt</i> ^{-/-} Mäusen.....	73
3.7. Identifikation von TIPT-Interaktionspartnern in Testes.....	83
3.8. Analyse von TIPT in Testes während Hyperthermie	85
3.8.1. TIPT translokiert nach Hyperthermie in perinukleäre Regionen	85
3.8.2. Analyse von testikulärer Hyperthermie bei <i>Tipt</i> ^{-/-} Mäusen	87
4. DISKUSSION	90
4.1. Expression von TIPT während der Spermatogenese.....	90
4.2. Expression von Geminin während der Spermatogenese	91
4.3. Generierung von Mäusen mit testisspezifischer Geminin-Deletion mittels der Stra8-Cre Linie	93
4.4. Generierung von Geminin-defizienten Mäusen mittels induzierbarer Cre-Rekombinase.....	95
4.5. Funktionelle Analyse von <i>Tipt</i>^{-/-} Mäusen.....	97
4.5.1. Analyse der Spermatogenese und genetischer Hintergrund der <i>Tipt</i> ^{-/-} Mäuse.....	98
4.5.2. Analyse der Transkription während der Spermatogenese in <i>Tipt</i> ^{-/-} Mäusen.....	99
4.5.3. Formation des Chromozentrums und Chromatinkondensation in <i>Tipt</i> ^{-/-} Mäusen....	100
4.5.4. Entfernung des Residualkörpers in <i>Tipt</i> ^{-/-} Mäusen.....	101
4.5.5. Identifizierung von TIPT Interaktionspartnern in Testes.....	102
4.5.6. Untersuchungen zur Rolle von TIPT in testikulärer Hyperthermie	103
5. REFERENZEN	108
6. ANHANG	119
6.1. Curriculum Vitae	119
6.2. Danksagungen	121

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Hodens.....	10
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Tubuli seminiferi.....	11
Abbildung 3: Die Stadien im Zyklus des Keimepithels der Maus.....	15
Abbildung 4: Genomische Organisation von <i>Tipt</i>	24
Abbildung 5: Schematische Darstellung der TIPT Isoformen.....	25
Abbildung 6: Retrieval Reaktion mit dem PL253 Vektor	36
Abbildung 7: Schematischer Ablauf der Konstruktion des Targeting Vektors.	39
Abbildung 8: TIPT Expression im adulten, murinen Testis	57
Abbildung 9: TIPT Färbung in Spermatisden	58
Abbildung 10: Geminin Expression während der Spermatogenese.....	59
Abbildung 11: TIPT und Geminin werden in prämeiotischen Spermatozyten koexprimiert ..	60
Abbildung 12: Alkalische Phosphatase-Färbung in Stra8-Cre ⁺ ; Z/AP ⁺ Reportermausen	61
Abbildung 13: Stra8-Cre Rekombinase wird spezifisch in Testis exprimiert.....	62
Abbildung 14: Stra8-Cre vermittelt testisspezifische Rekombination.....	63
Abbildung 15: Zeitlicher Ablauf der induzierten <i>Gmnn</i> -Deletion.....	65
Abbildung 16: Geminin ist essentiell für die postnatale Entwicklung.....	66
Abbildung 17: Induzierbare Deletion von <i>Gmnn</i> mittels der CAGGCre-ER TM Linie.....	67
Abbildung 18: Induzierte Geminin-Deletion in Testis.....	68
Abbildung 19: Schematischer Ablauf des Gen-Targetings für <i>Tipt</i>	70
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Southern Blot Strategie	71
Abbildung 21: Verifikation der <i>Tipt</i> Deletion auf DNA, RNA und Protein Ebene.....	72
Abbildung 22: Größe und Morphologie der <i>Tipt</i> ^{-/-} Testes ist unverändert.....	74
Abbildung 23: Spermienzahlbestimmung von <i>Tipt</i> ^{+/+} und <i>Tipt</i> ^{-/-} Tieren.	75
Abbildung 24: <i>Tipt</i> ^{-/-} Testes zeigen keine Erhöhung der Apoptose	75
Abbildung 25: <i>Tipt</i> ^{-/-} Spermatozoen weisen keine morphologischen Defekte auf	76
Abbildung 26: Motilitätsanalyse von <i>Tipt</i> ^{+/+} and <i>Tipt</i> ^{-/-} Spermatozoen.	77
Abbildung 27: RT-PCR Analyse von spermatogeneserelevanten Transkripten.....	79
Abbildung 28: Analyse von <i>Tipt</i> Interaktionspartnern auf Proteinebene	80
Abbildung 29: Analyse der Chromozentren in <i>Tipt</i> ^{+/+} und <i>Tipt</i> ^{-/-} Testes	80
Abbildung 30: Die Expression von Geminin ist nicht verändert in <i>Tipt</i> ^{-/-} Testes.....	81
Abbildung 31: Histon 3 wird in <i>Tipt</i> ^{-/-} Spermatisden entfernt.....	82
Abbildung 32: Akridinorange-Färbung von Spermatozoen aus dem Nebenhoden	83

Abbildung 33: Ergebnis der Interaktionsanalyse	84
Abbildung 34: Analyse von TIPT nach Hitzeschock.....	86
Abbildung 35: <i>Tipt</i> ^{-/-} Testes zeigen eine veränderte Morphologie nach Hyperthermie.....	88
Abbildung 36: <i>Tipt</i> ^{-/-} Testes zeigen eine verstärkte Aggregation von runden Spermatiden nach Hyperthermie.....	88
Abbildung 37: TUNEL Färbung von <i>Tipt</i> ^{+/-} und <i>Tipt</i> ^{-/-} Testes nach Hyperthermie.....	89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Standardprogramm für PCR Reaktionen.	28
Tabelle 2: Verwendete Primer.	30
Tabelle 3: Verwendete Agarosekonzentration für die jeweiligen DNA Fragmentlängen	31
Tabelle 4: Verwendete Bakterienstämme und ihre Herkunft.....	33
Tabelle 5: Die verschiedenen Mischungsverhältnisse von SDS Gelen	44
Tabelle 6: Primäre und sekundäre Antikörper.	46
Tabelle 7: Protokoll für die HE-Färbung von Paraffinschnitten.....	50
Tabelle 8: Protokoll für die HE-Färbung von Kryoschnitten.....	51
Tabelle 9: Stra8-Cre wird nur in Testis, nicht in Ovarien exprimiert.	64
Tabelle 10: Die Vererbung der <i>Gmn</i> und Stra8-Cre Allele folgt nicht den Mendelschen Regeln.	64
Tabelle 11: <i>Tipt</i> ^{-/-} Tiere sind fertil.....	73
Tabelle 12: Auflistung der potentiellen Interaktionspartner	84

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammonium Persulfat
B	Typ B Spermatogonia
Bax	(engl.) „ <i>bcl-2-associated X protein</i> “
bp	Basenpaar (engl. „ <i>basepair</i> “)
BrdU	5'-Bromo-2'-deoxyuridin
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
Brg1	(engl.) „ <i>brahma-related gene 1</i> “
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celcius
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Cep72	(engl.) „ <i>centrosomal protein 72</i> “
Cdt1	(engl.) „ <i>cdc10-dependent transcript 1</i> “
cDNA	komplementäre DNA (engl. „ <i>complementary DNA</i> “)
cKO	konditionaler Knockout (engl. „ <i>conditional knockout</i> “)
CMV	Cytomegalovirus
cpm	Zerfälle pro Minute (engl. „ <i>counts per minute</i> “)
COXIV	(engl.) „ <i>cytochrome c oxidase IV</i> “
CREB	(engl.) „ <i>cAMP response element-binding</i> “
CREM	(engl.) „ <i>cAMP-responsive element modulator</i> “
D	Diplotän
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>D. rerio</i>	<i>Danio rerio</i>
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DIG	Digoxigenin-11-UTP
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. „ <i>deoxyribonucleic acid</i> “)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dH ₂ O	Millipore-Wasser
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonales Stadium
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
Et al.	(lat.) „ <i>Et alterae</i> “ (und andere)
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum (engl. „ <i>fetal calf serum</i> “)
FGF	(engl.) <i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluorescein 5'-Isothiocyanat
fl	heterozygot gefloxt
fl/fl	homozygot gefloxt
Frt	(engl.) <i>Flpe recognition targets</i>
g	Gramm
mg	Milligramm
G1	„Gap“ (engl. für „ <i>Lücke</i> “) 1-Phase
G2	„Gap“ (engl. für „ <i>Lücke</i> “) 2-Phase
GM130	(engl.) „ <i>golgi matrix protein 130</i> “
GRASP55	(engl.) „ <i>golgi reassembly stacking protein of 55 kDa</i> “
HSF1	(engl.) „ <i>heat shock factor protein 1</i> “
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl.) „ <i>horseradish peroxidase</i> “
IHC	Immunhistochemie
In	Intermediäre Spermatogonia
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Leptotän
LoxP	(engl.) „ <i>locus of crossing over in P1</i> “
ml	Milliliter
M	Molar
mM	Millimolar
mA	Milliampere
MCM	(engl.) „ <i>Minichromosome Maintenance</i> “
MGC	(engl.) „ <i>multinucleated giant cells</i> “
Min	Minute
M-Phase	Mitose-Phase
mRNA	(engl.) „ <i>messenger ribonucleic acid</i> “
NBT	(engl.) „ <i>Nitro blue tetrazolium chloride</i> “
NP-40	Nonyl phenoxypolyethoxyethanol

NaDoc	Natrium Desoxycholat
Neo	Neomycin
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
OD600	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
p	Pachytän
P	Postnatales Stadium
p53	(engl.) „ <i>protein 53</i> “
PAC	P1 Phagen Artifizielles Chromosom
Pex14	(engl.) „ <i>peroxisomal membrane protein 14</i> “
PBS	(engl.) „ <i>Phosphat Buffered Saline</i> “
PBT	PBS mit Tween 20
PCR	(engl.) „ <i>Polymerase Chain Reaction</i> “
PFA	Paraformaldehyd
PHGPx	(engl.) „ <i>phospholipid-hydroperoxide glutathionperoxidase</i> “
Pl	Präleptotän
RNA	Ribonukleinsäure (engl. „ <i>ribonucleic acid</i> “)
RPCI	Roswell Park Cancer Institute
RPM	Umdrehungen pro Minute (engl. „ <i>rounds per minute</i> “)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. „ <i>Sodium dodecyl sulfate</i> “)
Six3	(engl.) „ <i>sine oculis homeobox homolog 3</i> “
S-Phase	Synthese-Phase
SSC	(engl.) „ <i>sodium chloride/ sodium citrate</i> “
Swi/Snf	(engl.) „ <i>switch/sucrose non fermentable</i> “
TAF	(engl.) „ <i>TATA box binding protein-associated factor</i> “
TBPL1	(engl.) „ <i>TATA box binding protein-like protein 1</i> “
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBP	(engl.) „ <i>TATA box binding protein</i> “
Tdag51	(engl.) „ <i>T-cell death-associated gene 51</i> “
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylenediamin
TFIID	(engl.) „ <i>transcription factor II D</i> “
TIPT	(engl.) „ <i>TBPL1 interacting protein in testis</i> “
TK	Thymidin-Kinase

TM	Schmelztemperatur (engl. „ <i>Melting temperature</i> “)
TRF2	(engl.) „ <i>TATA box binding protein-related factor 2</i> “
TRiC	(engl.) „ <i>TCP1 ring complex</i> “
Trim27	(engl.) „ <i>tripartite motif-containing 27</i> “
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
TUNEL	(engl.) „ <i>Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i> “
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
WB	Western Blot
w/v	Masse/Volumen (engl. „ <i>weight/volume</i> “)
Z	Zygotän

1. Einleitung

1.1. Die männliche Keimzellendifferenzierung in der Maus

Die Entwicklung von männlichen Keimzellen in Säugetieren ist ein komplexer Differenzierungsprozess, welcher tief greifende Änderungen der zellulären Morphologie, der Zellorganellen, des Chromatins sowie der transkriptionellen Mechanismen und der daran beteiligten Komponenten beinhaltet. Die Entwicklung von spermatogonischen Stammzellen zu reifen Spermatozoen dauert in der Maus 35 Tage (Bellve et al., 1977; Nebel et al., 1961) und ist unterteilt in verschiedene, aufeinander folgende Phasen, auf die später in diesem Kapitel näher eingegangen wird. Die Organe, in denen die männliche Keimzellreifung abläuft, sind die Testes. Diese paarweise angelegten Organe sind Teil sowohl des reproduktiven als auch des endokrinen Systems. Die Primärfunktionen der Testes sind zum einen die Produktion von Spermien, zum anderen die von Androgenen, wie zum Beispiel Testosteron. Im Inneren der Testes werden durch Septen aus Bindegewebe einzelne Kompartimente gebildet, sogenannte Lobules. In diesen liegen die Tubuli seminiferi, lange, röhrenförmige Strukturen, in denen die Keimzellendifferenzierung von spermatogonischen Stammzellen zu Spermatozoen stattfindet. Abbildung 1 zeigt schematisch den Aufbau des Testis.

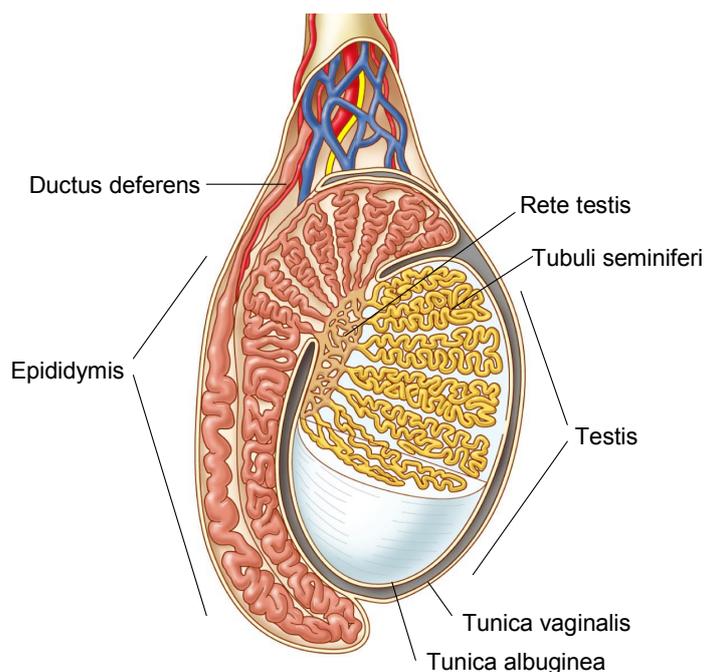


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Hodens. Die Testes sind umgeben von einer fibrösen Membran (Tunica albuginea), welche dem Organ Festigkeit verleiht. Die Tunica vaginalis testis umschließt Testis und Epididymis und hält die testikulären Strukturen zusammen. Die Keimzellendifferenzierung findet in den Tubuli seminiferi statt. Über das Rete testis werden die Spermien in den Epididymis transportiert, wo die weitere Maturierung stattfindet. Über den Ductus deferens werden die Spermatozoen ins Ejakulat abgegeben. Modifiziert nach *Essentials of Human Anatomy and Physiology* (Marieb, 2008).

1.1.1. Tubuli seminiferi – Aufbau und Struktur

Die Tubuli seminiferi besitzen eine charakteristische, zelluläre Organisation. Durch die runde Form der Tubuli ergeben sich zwei räumlich voneinander getrennte Bereiche: die basale und die lumenale Region. Die Differenzierung der Keimzellen vollzieht sich von den basalen, äußeren Bereichen, in dem die spermatogonischen Stammzellen lokalisiert sind, in Richtung des inneren Lumens. Hier werden die fertig ausgebildeten Spermatozoen in das Innere der Tubuli seminiferi entlassen und über die Rete testis in die Epididymis transportiert. Die Tubuli seminiferi sind umgeben von der Lamina propria, welche aus einer äußeren und einer inneren Basallamina besteht, separiert durch eine Schicht myoider Zellen. Letztere besitzen eine große Anzahl von Actinfilamenten und tragen durch kontraktile Bewegungen zum Transport der Spermatozoen und der testikulären Flüssigkeit in den Tubuli seminiferi bei (Maekawa et al., 1996). Die innere und äußere Basallamina besteht aus Komponenten der extrazellulären Matrix und enthält unter anderem Laminin, Kollagene und Fibronectin (Lian and Enders, 1994). Die Sertolizellen befinden sich direkt an der inneren Basallamina und bilden die Blut-Testis-Barriere. Sie erzeugen dadurch eine abgeschlossene Mikroumgebung für die in den Tubulis ablaufende Spermatogenese. Sertolizellen sind essentiell für diesen Prozess und stehen zu jeder Zeit in engem Kontakt mit den Keimzellen. Sie versorgen diese mit Nährstoffen und Signalen für die Differenzierung. Die Keimzellen wiederum bleiben während des gesamten Prozesses über zytoplasmatische Brücken miteinander verbunden und können somit Nährstoffe und Moleküle austauschen. Zwischen den Tubuli seminiferi befindet sich das Hodeninterstitium, welches lockeres Bindegewebe, Gefäße, Nerven und Testosteron produzierende Leydig-Zellen enthält. Abbildung 2 stellt schematisch den Aufbau der Tubuli seminiferi dar.

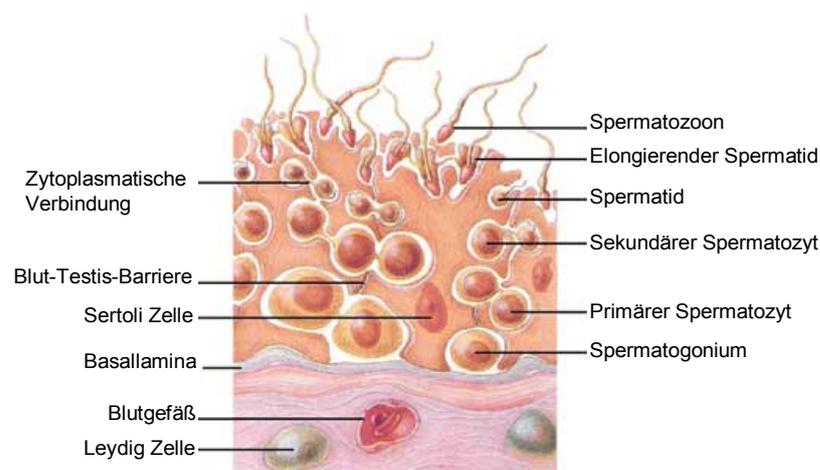


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Tubuli seminiferi. Die einzelnen Zelltypen während der Spermatogenese sind gekennzeichnet, nähere Erläuterungen im Text. Modifiziert nach *Principles of Anatomy & Physiology* (Tortora and Grabowski, 2000).

1.1.2. Phasen der Spermatogenese

Der Differenzierungsprozess der Keimzellen, die Spermatogenese, kann unterteilt werden in verschiedene, sequentiell aufeinander folgende Phasen:

1. Spermatozytogenese: mitotische Teilung der Spermatogonien, resultiert in der Genese von Spermatozyten.
2. Meiose: meiotische Teilung der Spermatozyten, resultiert in der Genese von haploiden Spermatiden.
3. Spermiogenese: Zytodifferenzierung der Spermatiden, resultiert in der Genese von Spermatozoen.

1.1.2.1. Spermatozytogenese

Die spermatogonischen Stammzellen, die undifferenzierten Ausgangszellen für die Spermatogenese, werden als A_s Spermatogonia bezeichnet (s für *single*). Diese Zellen teilen sich mitotisch, und produzieren nach der Zytokinese entweder zwei weitere A_s , oder aber zwei A_{pr} (pr für *paired*) Spermatogonia. Die A_{pr} sind über zytoplasmatische Brücken verbunden und teilen sich einige Male erneut mitotisch, dabei entstehen die A_{al} (al für *aligned*) Spermatogonia. Diese Zellen werden allgemein als das undifferenziert, proliferierende Kompartiment der Tubuli seminiferi bezeichnet, wobei jedoch nur die A_s Spermatogonia als spermatogonische Stammzelle gesehen wird. A_{al} Spermatogonia differenzieren anschließend zu Spermatogonia der Kategorie A1, A2, A3, A4, In (In für *intermediate*) und B, welche alle als differenzierende Spermatogonia definiert sind. Viele der Keimzellen sind apoptotisch während der Differenzierungsvorgänge, sodass sich das Schicksal der Spermatogonia in drei Wege definiert: Selbsterneuerung ($A_s \rightarrow$ zwei A_s), Differenzierung in weiter maturierte Spermatogonia ($A_s \rightarrow$ zwei A_{pr}) oder Apoptose (De Rooij, 1998; Hermo et al., 2010a; Oakberg, 1971).

1.1.2.2. Meiose

Die diploiden Spermatogonia erfahren in dem Prozess der Meiose eine Reduktion des Chromosomensatzes auf 1N. Nur die daraus resultierenden, haploiden Gameten sind in der Lage, bei der Verschmelzung von männlicher und weiblicher Keimzelle einen lebensfähigen Embryo mit diploidem Chromosomensatz zu bilden. Die Meiose besteht aus einer DNA

Replikation, gefolgt von zwei sequentiellen Zellteilungen. Der meiotischen Teilung vorgehend ist eine lange Prophase, welche zeitlich ungefähr 90% der Meiose ausmacht. Die Prophase ist unterteilt in mehrere Subphasen, welche im Folgenden näher erläutert werden. Die Keimzellen beginnen die Prophase als präleptotäne Spermatozyten. Diese befinden sich noch an der Basallamina und sind charakterisiert durch aktive DNA Replikation. Sie gehen dann über in das Stadium der leptotänen Spermatozyten, in welchem die Chromosomen kondensieren. In der nächsten Phase, dem Zygotän, ordnen sich die homologen Chromosomen paarweise an und in der darauf folgenden Phase, dem Pachytän, findet die Rekombination (*crossing over*) zwischen den homologen Chromosomen statt. Dieser Prozess wird durch die Bildung von Chiasmata ermöglicht, in denen sich die homologen Bereiche der Chromosomen paaren. Es folgt das Diplotän, wobei sich die Chromosomen etwas voneinander lösen, jedoch immer noch über die Chiasmata miteinander verbunden bleiben. Daraufhin beginnt sich die nukleäre Membran in der diakinetischen Phase aufzulösen, dies ist das Ende der meiotischen Prophase. Es folgen die Meta-, Ana- und Telophase, in welchen die homologen Chromosomen getrennt werden, sodass zwei haploide Tochterzellen entstehen. An die erste meiotische Teilung schließt sich die zweite Teilung an, welche die beiden Chromatiden der Chromosomen auf zwei weitere Tochterzellen verteilt. Damit ist die Meiose abgeschlossen, und die resultierenden haploiden Zellen werden als runde Spermatiden bezeichnet (Hermo et al., 2010a).

1.1.2.3. Spermiogenese

Die runden Spermatiden differenzieren weiter zu Spermatozoen, ein Prozess, welcher als Spermiogenese bezeichnet wird und gravierende Änderungen der zellulären Morphologie beinhaltet. Die Spermiogenese ist in vier Phasen unterteilt, die Golgi-, Kappen-, Akrosom- und Reifungsphase. In diesen Stadien werden spezifische Zellorganellen der Spermatozoen, wie das Akrosomen und das Flagellum, gebildet. Die Golgi Phase ist charakterisiert durch die Entstehung des Akrosombläschens aus der Fusion von proakrosomalen Vesikeln. In der Kappenphase vergrößert sich das Akrosom und bedeckt bis zu zwei Drittel des Nukleus. Im Akrosom sind Enzyme gespeichert, welche bei der Fertilisation freigesetzt werden und es dem Spermium ermöglichen, die Eizelle zu penetrieren. In der darauf folgenden Akrosomenphase der elongierenden Spermatiden kondensiert die DNA zunehmend. Histone werden hierbei erst durch Transitionsproteine, später durch Protamine ersetzt, welche eine enorm dichte DNA-Kondensation ermöglichen. Weiterhin bildet sich in dieser Phase das Flagellum aus. In der

Reifungsphase ist die morphologische Veränderung sehr offensichtlich, der Nukleus nimmt nun die charakteristische, sichelförmige Form an und ein Großteil des Zytoplasmas wird als zytoplasmatisches Vesikel, der Residualkörper, von den Spermatischen entfernt. Der nächste Schritt in der Spermogenese ist die Spermiation, bei der die nun fertig differenzierten Spermatozoen in das tubuläre Lumen abgestoßen werden. Dazu werden die Verbindungen von Sertolizelle zu Spermatozoen gelöst, die zytoplasmatischen Residualkörper daraufhin von den Sertolizellen phagozytiert (Hermo et al., 2010b, c). Die Funktion des zytoplasmatischen Tropfens, einem kleinen Überrest des Zytoplasmas, welcher am Spermatozoon verbleibt, ist bis heute nicht geklärt. Möglicherweise spielt er eine Rolle beim weiteren Reifungsprozess der Spermien in den Epididymis (Cooper and Yeung, 2003). Erst beim Durchwandern der Epididymis erlangen die Spermien ihr volles Fertilisationspotential und ihre Motilität. Die Reifungsschritte beinhalten eine Kreuzvernetzung der Protamine, was in einem noch höheren Kondensationsgrad der DNA resultiert, und weitere Modifikationen des Akrosoms (Cooper, 2007).

1.1.3. Der Zyklus des Keimepithels

Die Spermatogenese der Maus kann aufgrund der zellulären Assoziationen in einem bestimmten Segment der Tubuli seminiferi in 12 verschiedene Stadien eingeteilt werden. Ein Stadium enthält immer die gleiche Kombination verschiedener Zelltypen. Es sind entweder jeweils drei (Stadium X-XII und III) oder 4 Keimzelltypen unterschiedlicher Differenzierungsschritte (Stadium II-VIII) gleichzeitig in einem Segment zu finden. Diese definierten, zellulären Assoziationen ermöglichen ein Klassifizieren der Tubuli seminiferi, was eine vereinfachte Bestimmung der vorhandenen Zelltypen und deren Differenzierungsstatus in der Spermatogenese ermöglicht. Abbildung 3 zeigt die Stadien I-XII im Zyklus des murinen Keimepithels (Russell et al., 1990).

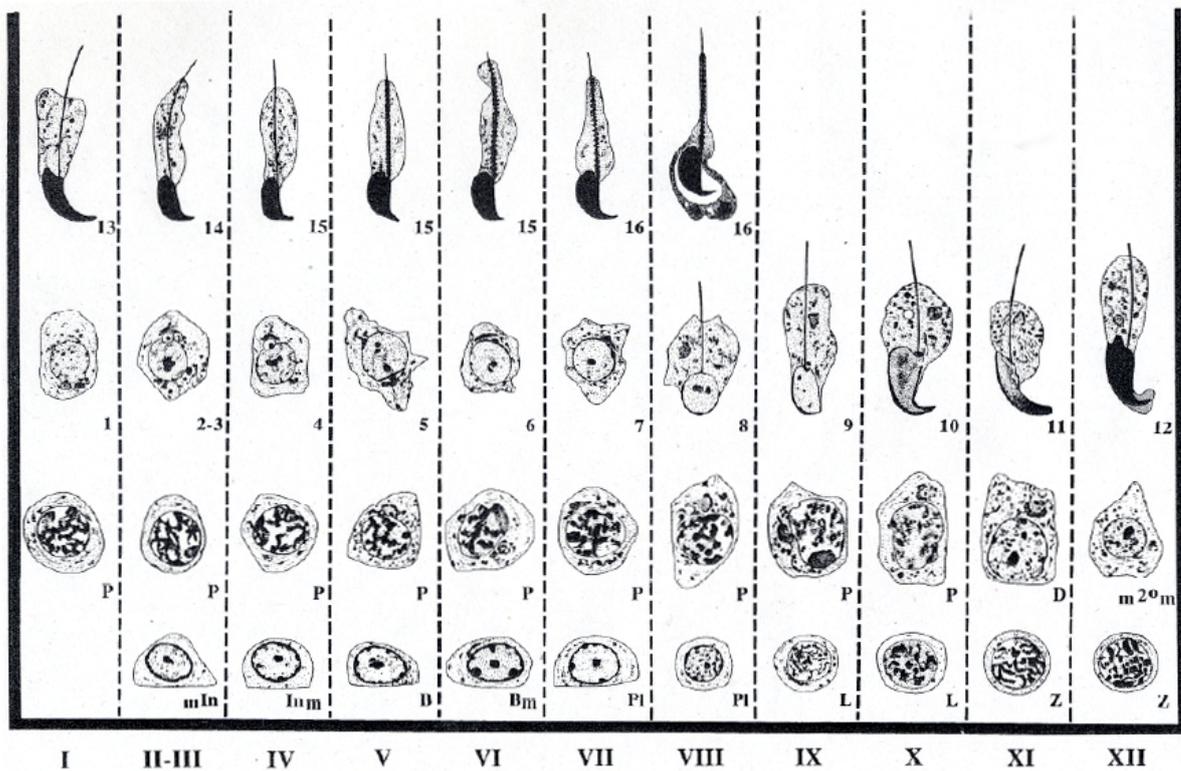


Abbildung 3: Die Stadien im Zyklus des Keimepithels der Maus. Stadium II und III sind zu einem Stadium zusammengefasst. In: Intermediäre Spermatogonia, B: Typ B Spermatogonia, Pl: Präleptotän, L: Leptotän, Z: Zygotän, P: Pachytän, D: Diplotän, 2°: sekundäre Spermatozyten, 1-16: Spermatischenstadium während der Spermiogenese, m: Meiose oder Mitose. Aus „Histological and Histopathological Evaluation of the Testis“ (Russell et al., 1990)

1.1.4. Transkription während der Spermatogenese

Während des Austausches von Histonen gegen Transitionsproteine und Protamine findet eine Abnahme der transkriptionellen Aktivität bei Zunahme der Chromatinkondensation statt. Während und direkt nach der Meiose ist in den Spermatischen jedoch eine sehr hohe Transkriptionsaktivität zu beobachten. Es werden in dieser Phase viele Gene transkribiert, deren Genprodukte in den späten Differenzierungsstadien eine Funktion haben, wenn das Chromatin schon kondensiert und transkriptionell inaktiv ist. Hinzu kommt, dass viele Gene in einer testisspezifischen Isoform exprimiert werden, was oft durch testisspezifische Promotorelemente und cis-gelegene, regulatorische Einheiten bedingt ist. Zu diesen speziellen Sequenzen, welche in somatischen Zellen nicht transkriptionell aktiv sind, werden testisspezifische Transkriptionsfaktoren und mit ihnen assoziierte Proteine rekrutiert. Daher unterscheiden sich die Mechanismen der Transkription in Keimzellen der Testis von denen der somatischen Zellen. Die basale Transkriptionsmaschinerie, welche in Keimzellen aktiv ist,

besteht teilweise aus testisspezifischen Komponenten, welche in somatischen Zellen nicht exprimiert werden. Zum Beispiel wird statt des Transkriptionsfaktors *TATA box binding protein associated factor 7* (TAF7), einem Bestandteil des *transcription factor II D* (TFIID) Transkriptionsinitiationskomplexes, die keimzellspezifische Isoform TAF7L rekrutiert (Pointud et al., 2003) und statt des *cAMP response element binding protein* (CREB), welches nur schwach in Testis exprimiert ist, wird ein anderes Protein der CREB Familie auf die Promoterelemente rekrutiert: *cAMP responsive element modulator* (CREM). Dieses Protein ist für die Expression mehrerer postmeiotischer Gene, wie Transitionsproteine 1 und 2, Protamin 1 und 2 und Proacrosin, erforderlich (Fimia et al., 1999). Die CREM-Knockout-Mäuse zeigen eine fehlende Induktion dieser Gene in postmeiotischen Zellen und differenzieren nicht über das Stadium der runden Spermatiden hinaus (Blendy et al., 1996; Nantel and SassoneCorsi, 1996). Ein weiterer testisspezifischer Transkriptionsfaktor in Mäusen ist *TATA box binding protein (TBP)-related factor 2* (TRF2 oder auch TBPL1). Während der *Trf2*-Knockout in *Xenopus*, *D. rerio* und *C.elegans* in früher, embryonaler Letalität resultiert, sind die *Trf2*^{-/-} Mäuse lebensfähig, jedoch zeigen die Keimzellen dieser Tiere einen Differenzierungsstopp im Stadium der elongierenden Spermatiden (Dantonel et al., 2000; Martianov et al., 2002; Martianov et al., 2001; Muller et al., 2001; Veenstra et al., 2000; Zhang et al., 2001). Offenbar ist im Säugetier die Funktion von TRF2 speziell in der postmeiotischen Transkription wichtig. Dabei sind zusätzlich Defekte in der Akrosomenbildung zu beobachten sowie eine Fragmentierung des Chromozentrums. Letzteres ist eine Struktur, welche sich in den runden Spermatiden ausbildet. Im Chromozentrum ist das gesamte, zentromerische Heterochromatin der Zelle lokalisiert. Normalerweise besitzen runde Spermatiden nur ein einzelnes Chromozentrum, welches in DNA Färbungen durch ein punktuell Signal visualisiert werden kann. In den TRF2- Mutanten sind mehrere dieser Zentren in runden Spermatiden zu erkennen, was vermutlich zu dem beobachteten Arrest und der Apoptose von Keimzellen im späten Spermatidenstadium beiträgt (Martianov et al., 2001; Zhang et al., 2001). Auf welche Weise TRF2 die Etablierung und Erhaltung des Chromozentrums reguliert, ist bis heute nicht bekannt. Es wird jedoch angenommen, dass entweder TRF2 direkt durch Interaktion mit weiteren Faktoren zur Heterochromatinbildung beiträgt oder das Zielgene von TRF2 in diesen Prozess involviert sind.

1.1.5. Temperatur und Spermatogenese

Eine Gruppe innerhalb der plazentaren Säugetiere sind die Boreoeutheria. Alle männlichen Tiere dieser Gruppe, mit Ausnahme der Rhinocerotidae und der marinen Säuger, besitzen ausgelagerte Testes (Gross, 2006; Kleisner et al., 2010). Die Spermatogenese in diesen Tieren funktioniert am effizientesten bei einigen Grad unterhalb der Körpertemperatur (Kleisner et al., 2010; Moore, 1926; Short, 1997). Aus diesem Grund ist auch das Absinken der Testes, ein Prozess, welcher normalerweise vor dem Beginn der Spermatogenese abgeschlossen ist, essentiell für die Fertilität innerhalb dieser Gruppe. Verbleiben die Testes im Körper (Kryptorchidismus), findet eine kontinuierliche Atrophie der Keimzellen statt und resultiert in Infertilität. Auch bei kurzzeitiger Hyperthermie wird ein Mechanismus aktiviert, welcher die gezielte Apoptose von pachytänen und diplotänen Spermatozyten sowie frühen postmeiotischen, runden Spermatiden induziert. Die molekularen Ursachen hierfür sind noch nicht genau aufgeklärt, es scheint der Hitzeschockfaktor 1 (HSF1) involviert zu sein. HSF1 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher bei niedrigen Temperaturen von Hitzeschockproteinen gebunden wird und dadurch inaktiv im Zytoplasma lokalisiert ist. Bei testikulärer Hyperthermie lösen sich diese Proteinbindungen und HSF1 transloziert in den Nukleus. Hierbei assoziiert das Protein mit den Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie und aktiviert proapoptotische Gene wie *T-cell death associated gene 51* (Tdag51) (Hayashida et al., 2006; Nakai et al., 2000). Weiterhin scheint p53 in die hyperthermale Apoptose involviert zu sein. Es ist in Keimzellen an der nukleären Hülle lokalisiert und transloziert bei Hyperthermie in den Nukleus (Yin et al., 1997). In p53 defizienten Mäusen setzt die Apoptoseantwort bei operativ induziertem Kryptorchidismus 3 Tage später als in Wildtyp-Tieren ein und in Transplantationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die p53 abhängige Apoptose speziell prämeiotische Zellen betrifft. In postmeiotischen Spermatiden wird der Zelltod p53-unabhängig induziert (Ohta et al., 2003; Yin et al., 1998a; Yin et al., 1998b). Ein weiteres Phänomen sind die nach Hitzeschock und induziertem Kryptorchidismus auftretenden, multinukleären Riesenzellen (Chaki et al., 2005; Rockett et al., 2001). Der Mechanismus ihrer Entstehung ist bis heute noch völlig ungeklärt, jedoch scheint das Aggregieren von Keimzellen eine Möglichkeit zur schnellen Entfernung von großen Zellmassen in kurzer Zeit darzustellen (Chaki et al., 2005).

1.2. Das bifunktionale Protein Geminin

Die Regulation von Proliferation und Differenzierung in der Embryonalentwicklung ist essentiell, um die koordinierte Entstehung von Körper und Organsystemen in ihrer Komplexität zu gewährleisten. Proteine, welche diese Prozesse funktionell steuern und miteinander verknüpfen, sind Schlüsselproteine beim Verständnis der molekularen Grundlagen von Differenzierungsvorgängen in der Entwicklungsbiologie. Geminin ist solch ein Protein, welches durch seine multiplen Funktionen als molekularer Schalter zwischen Proliferation und Differenzierung agiert.

Erstmals beschrieben wurde Geminin von McGarry und Kirschner in einem Screen für Proteine, welche abhängig vom Zellzyklus degradiert werden (McGarry and Kirschner, 1998). In dieser Studie wurde Geminin als Inhibitor der DNA Replikation in der G2- und M-Phase identifiziert, welcher beim Übergang von Meta- zu Anaphase degradiert wird.

Kurz darauf wurde eine weitere Studie veröffentlicht, welche Geminin in einem anderen Kontext charakterisierte (Kroll et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass Geminin bei Überexpression in *Xenopus* die Formation des Nervensystems entscheidend beeinflusst und eine Expansion der Neuralplatte bewirkt. Daher wurde Geminin als essentieller Faktor für die Etablierung der neuralen Domäne während der Gastrulation vorgeschlagen.

Geminin besitzt mehrere Proteinregionen, welche durch spezifische Protein-Protein-Bindungen je nach Bindungspartner differenzierte, biologische Funktionen ausüben. Der N-terminale Bereich des Proteins ist essentiell für die in *Xenopus* gezeigte Aktivität als neuralisierendes Molekül. Hingegen vermittelt die mittlere bis C-terminal gelegene coiled-coil Region die Dimerisierung von Geminin und die Interaktion mit dem Protein *cdc10-dependent transcript 1* (Cdt1), einem wichtigen Faktor für die Regulation der DNA-Lizensierung (Ferenbach et al., 2005; Lee et al., 2004). Überlappend mit dem Cdt1-Bindemotiv sind auch die Interaktionsbereiche von Homeodomänen-Proteinen wie Hoxd11 und *sine oculis homeobox homolog 3* (Six3) (Del Bene et al., 2004; Luo et al., 2004).

Auch die N-terminal lokalisierte Destruktionsbox ist für die biologische Funktion von Geminin essentiell (McGarry and Kirschner, 1998). Dieses Motiv wird vom *Anaphase-Promoting-Complex* (APC Komplex) erkannt, welcher die Degradation des Proteins über den Ubiquitin-Proteasom-Weg vermittelt. Im *Xenopus* - Geminin befindet sich weiterhin eine zweigeteilte Signalsequenz etwas weiter C-terminal, welche den nukleären Import vermittelt. Diese Signalsequenz scheint für die vollständige Degradierung von Geminin notwendig zu sein, wie Mutationsstudien zeigten (Benjamin et al., 2004). Im humanen Geminin wird eine alternative Sequenz für den nukleären Import genutzt und der Transfer zwischen dem

nukleären und zytoplasmatischen Kompartiment ist offenbar essentiell für die Funktion von Geminin (Benjamin et al., 2004; Boos et al., 2006; Luo et al., 2007). Im C-terminalen Bereich des Proteins wurde weiterhin eine Interaktionsdomäne identifiziert, welche mit der katalytischen Untereinheit *brahma protein-like 1* (Brg1) des *switch/sucrose nonfermentable* (SWI/SNF) Chromatin Remodulierungskomplexes assoziiert (Seo et al., 2005).

1.2.1. Die Funktion von Geminin während der DNA Replikation

Die Replikation des Genoms in der S – Phase des Zellzyklus ist ein zentrales Element für die Weitergabe der genetischen Information an die nächste Zellgeneration. Sie unterliegt daher präzisen Kontrollmechanismen und Regulationsprozessen, um die fehlerfreie Duplikation des Erbgutes zu gewährleisten. Geminin spielt in diesem Prozess eine wichtige Rolle. Zu Beginn der S-Phase akkumuliert das Protein im Nukleus, wo es durch Bindung an Cdt1 die erneute Lizenzierung der Replikationsursprünge verhindert (Tada et al., 2001; Wohlschlegel et al., 2000). Den gesamten Verlauf der S- und G2-Phase verbleibt Geminin im Kern, während beim Übergang von der Ana- zur Metaphase die Degradierung des Proteins durch den APC-Komplex erfolgt. Geminin ist infolgedessen während der gesamten G1-Phase nicht im Nukleus, während Cdt1 zur Initiierung der DNA-Synthese die Assemblierung des Prä-Replikationskomplexes reguliert. Dieser Komplex wird aus sechs *minichromosome maintenance* (MCM) Proteinen gebildet, welche ohne Cdt1 nicht auf dem Chromatin der Replikationsursprünge binden können (Nishitani et al., 2000). Daher kann die Lizenzierung für die DNA-Replikation durch Cdt1 nur in der G1-Phase erfolgen, wenn Geminin degradiert ist, und wird in allen anderen Zellzyklusphasen durch die Präsenz von Geminin unterbunden. Dieser Mechanismus verhindert die unkontrollierte Lizenzierung und damit die Replikation der DNA in anderen Phasen des Zellzyklus außer der S-Phase.

Arbeiten mit *Xenopus* zeigen, dass die Degradation von Geminin nicht vollständig stattfindet, sondern dass ein Teil des Proteins durch Ubiquitinierung inaktiviert wird (Li and Blow, 2004). Weitere Studien belegen, dass Geminin zunächst im Komplex mit Cdt1 die Lizenzierung der DNA vermittelt. Bei ansteigender Geminin-Proteinmenge am Ende der G1-Phase und der damit verbundenen Veränderung des stöchiometrischen Verhältnisses von Cdt1:Geminin wird Cdt1 zunehmend inhibiert und die Lizenzierung verhindert (Lutzmann et al., 2006). Weiterführende Kristallographiestudien konnten diesem Mechanismus zwei Formen des Cdt1:Geminin Komplexes zugrunde legen, einen “permissiven” Heterotrimer und einen „inhibitorischen“ Heterohexamer (De Marco et al., 2009).

1.2.2. Geminin in der Entwicklung

Die Koordination zwischen DNA-Replikation und der Regulation von entwicklungsrelevanten Genen ist ein zentrales Element in der Embryogenese. Die Differenzierung von schnell proliferierenden, pluripotenten Stammzellen zu postmitotischen, terminal differenzierten, somatischen Zellen erfordert eine präzise Kontrolle des Zellzyklus und eine gezielte Aktivierung sowie Repression von Genen, welche das zelluläre Schicksal beeinflussen. Geminin reguliert einerseits durch die Inhibition von Cdt1 die DNA-Replikation, es kann andererseits aber auch durch Protein-Protein Interaktion mit den Homeodomänen von einigen Homeobox-Transkriptionsfaktoren (Hoxa11, Hoxd10 und Six3) deren DNA-Bindung inhibieren (Del Bene et al., 2004; Luo, 2004; Luo et al., 2004). Hox Gene sind in Clustern organisiert und werden während der Embryonalentwicklung spatio-temporal kolinear exprimiert. Dabei werden 3' gelegene Hox Gene früher und mehr anterior, die 5' lokalisierten Hox Gene dagegen später und eher posterior exprimiert. Dadurch vermitteln Homeobox Gene in Zellen entlang der embryonalen Körperachsen positionale Identität. Durch eine kombinatorische Expression verschiedener Hox Gene, dem sogenannten „Hox-Code“, wird die anterior-posteriore Achse im Embryo determiniert. Geminin reguliert die Hox Funktion nicht nur durch direkte Protein-Protein Interaktion, sondern auch durch transkriptionelle Repression. Es konnte gezeigt werden, dass Geminin ein transienter Bestandteil des *polycomb group (PcG)* Komplexes durch Interaktion mit *sex comb on midleg homolog 1 (Scmh1)* ist und auf diese Weise in regulatorischen Regionen des Hoxd11 Lokus bindet. Bei Überexpression von Geminin im Huhn konnte somit die Expression von Hoxb9 reprimiert werden, während die Hoxb9 Domäne bei Überexpression eines dominant-negativen Scmh1 ohne Geminin-bindendes Proteinmotiv expandiert wurde (Luo et al., 2004).

Ein direkter Einfluss von Geminin auf die frühe, neurale Induktion wurde bereits in verschiedenen Modellsystemen beschrieben. Es wurde in *Xenopus* Embryonen gezeigt, dass bei einer Überexpression von Geminin die Expansion der Neuralplatte unter Verlust der angrenzenden Epidermis und des Neuralkammes auftritt. Bei einer frühen Überexpression im Zwei-Zell-Stadium konnte so eine Hypertrophie des neuralen Gewebes, bei Überexpression im Gastrula-Stadium eine ektopische Bildung von Neuralgewebe beobachtet werden (Kroll et al., 1998).

Bei ektopischer Überexpression von Geminin im Hühnerembryo wurde die Induktion von Sox2 gezeigt, einem der frühen Faktoren der Neuralplattenbildung. Diese Studie demonstrierte eine Interaktion von Geminin mit dem N2 Enhancer des Sox2 Gens, welche durch den Faktor *brahma (Brm)* aktiviert, neben Brg1 eine weitere katalytische Untereinheit

des SWI/SNF Komplexes, und hingegen durch *heterochromatin protein 1* (HP1) Proteine inhibiert werden kann (Papanayotou et al., 2008). Die Interaktion von Geminin mit Brg1 wurde in *Xenopus* und murinen P19 Zellen gezeigt. Die Ergebnisse belegen eine Rolle für beide Proteine in der Aufrechterhaltung eines undifferenzierten Zellstatus von neuronalen Vorläuferzellen, indem durch die Interaktion von Geminin mit Brg1 die proneuralen Transkriptionsfaktoren *neurogenin* (Ngn) und NeuroD in ihrer Funktion inhibiert werden. Diese Wirkung von Geminin wird durch den C-terminalen Bereich des Proteins vermittelt und ist damit unabhängig von der frühen, neuronalen Induktion durch die N-terminale Region (Seo et al., 2005). Die Koordination zwischen Zellzyklusregulation und Zellschicksalsentscheidung unterstreicht die Funktion von Geminin als molekularer Schalter, welcher durch seine vielfältigen Bindungen zu anderen Proteinen mehrere zelluläre Prozesse miteinander verknüpft. Es sind jedoch genetische Funktionsverluststudien notwendig, um die Rolle von Geminin bei diesen zellulären Prozessen eindeutig verstehen zu können. Die bisher publizierten Studien in dieser Richtung sollen im Folgenden kurz zusammengefasst werden.

1.2.3. Geminin-Depletion in verschiedenen Modellsystemen

Zur Analyse der replikativen Prozesse in Abwesenheit von Geminin wurden Studien in humanen Zellkultursystemen sowie in *Drosophila* durchgeführt. Sie zeigten eine Zunahme der Zellkerngröße und einen erhöhten DNA Gehalt von mehr als 4N nach siRNA Behandlung gegen Geminin, gleichzeitig war eine Anreicherung der Zellen in der S-Phase zu beobachten. Diese Ergebnisse deuten auf eine unkontrollierte Rereplikation in diesen Zellen hin (Melixetian et al., 2004; Mihaylov et al., 2002; Quinn et al., 2001; Zhu et al., 2004).

In einer Vielzahl verschiedener Krebszelllinien führte Geminin-Knockdown zu Rereplikation und Apoptose. Im Gegensatz dazu konnte dieser Effekt in untransformierten Zelllinien nur erzielt werden, wenn Geminin zusammen mit Cyclin A durch siRNA herunterreguliert wurde (Zhu and Depamphilis, 2009). Diese Ergebnisse belegen eine funktionelle Redundanz für Geminin bei der Replikationskontrolle und zeigen, dass zellspezifische Ersatzmechanismen, zumindest in untransformierten Zellen, existieren.

Die globale Geminin-Deletion in der Maus führte zu einer frühen, embryonalen Letalität. Die Embryonen im 8-Zell Stadium bildeten keine innere Zellmasse, sondern bestanden ausschließlich aus trophoblastischen Riesenzellen, welche charakteristischerweise große Zellkerne und einen, durch Endoreplikation entstandenen, polyploiden Chromosomensatz besitzen (Gonzalez et al., 2006; Hara et al., 2006).

In konditionalen Knockout-Studien konnte gezeigt werden, dass die Deletion von Geminin in den neuralen Stammzellen unter Verwendung einer Nestin-Cre Linie ohne jegliche Auswirkungen auf die Neurogenese bleibt (Schultz et al., 2011), obwohl die spezifische, hohe Expression von Geminin in diesen Zellen eine Funktion in der Regulation der neuralen Stammzellpopulation nahe gelegt hatte (Spella et al., 2007). Kürzlich ist eine weitere Studie veröffentlicht worden, in welcher ebenfalls mit einer Nestin-Cre Linie eine Vermehrung der neuralen Vorläuferzellen in Abwesenheit von Geminin beobachtet wurde. Diese erhöhte Zellpopulation zeigte eine verlängerte S-Phase und die Anzahl der früh differenzierenden Neurone war daraufhin reduziert. Diese Resultate deuten eine erhöhte Tendenz zur Selbsterneuerung in den Knockout-Zellen an, der Effekt ist jedoch beschränkt auf den rostralen Kortex (Spella et al., 2011). Der neuronale Phänotyp ist jedoch subtil, und resultiert in keiner morphologisch auffälligen Änderung der Hirnstrukturen. Dies mag ein möglicher Grund sein, warum Schultz et al. diesen Phänotyp nicht berichteten. Ein weiterer Grund für die Diskrepanz der beiden Publikationen mag in der unterschiedlichen Knockout-Strategie beider Gruppen begründet sein. Während Schultz et al. Exon 5 – 7 mit loxP Motiven flankierten, deletierten Spella et al. Exon 3 - 4. Möglicherweise wird im ersten Fall ein trunkiertes Restprotein mit dem N-terminalen, neuralisierenden Bereich von Geminin exprimiert.

Ein spezifischer Knockout in lymphoiden Zellen der Maus, bei dem Geminin spezifisch in T-Zellen deletiert wurde, zeigte ebenfalls einen sehr milden Phänotyp. Die T-Zellen differenzierten und proliferierten normal, nur nach induzierter Stimulation *in vitro* konnte ein Proliferationsdefekt beobachtet werden (Karamitros et al., 2010). Diese Ergebnisse deuten an, dass die Funktion von Geminin in der frühen Entwicklung des Organismus essentiell ist, in späteren Stadien jedoch an Bedeutung verliert und redundant ist. Aktuellere Studien haben daher die Rolle von Geminin in murinen, embryonale Stammzellen in den Fokus genommen. Hier beschränken sich die Funktionsverluststudien auf siRNA-vermittelten Geminin-Knockdown. Die kürzlich publizierten Ergebnisse sind jedoch widersprüchlich. Yang et al. beobachten bei Geminin-Knockdown in ES- und P19-Zellen eine Induktion von Markern der trophoblastischen Linie bei einer gleichzeitigen Vergrößerung des Zellkernes und einer Herunterregulation der Pluripotenz-Marker Oct4, Sox2 und Nanog. In dieser Studie wird Geminin als wichtiger Faktor für die Erhaltung der Pluripotenz beschrieben (Yang et al., 2011). Hingegen beschreiben Lim et al. bei einem Geminin-Knockdown nur marginale Effekte auf die Pluripotenz und Proliferation in ES Zellen, und definieren eine Schlüsselrolle von Geminin bei der Aquirierung von neuralem Schicksal. Bei Kulturbedingungen, welche

eine neurale Differenzierung der ES Zellen induzieren, findet in Geminin-depletierten Stammzellen keine Aktivierung von proneuralen Genen wie *SRY-related HMG-box 1* (Sox1) und *paired box gene 6* (Pax6) statt. Die Promotorregionen dieser Gene sind hypoacetyliert im Vergleich zu Kontrollzellen, und somit für die transkriptionelle Maschinerie nur schwer zugänglich. Offenbar besitzt Geminin eine Funktion in der Etablierung und Erhaltung von acetyliertem Histon 3 und Histon 4 und der damit verbundenen Zugänglichkeit des Chromatins für transkriptionelle Komponenten (Lim et al., 2011).

1.2.4. Geminin in der Spermatogenese

Die Expression von Geminin während der Spermatogenese wurde bisher nur in humanen Testis untersucht (Eward et al., 2004). Hierbei wurde ein Signal für das Protein in einigen wenigen Spermatogonien, dann aber vermehrt in frühen Spermatozyten detektiert mit weiter zunehmender Expression bis zur Meiose. In postmitotischen Keimzellen wurde Geminin nicht beobachtet. Die Autoren der Studie schlugen eine Funktion von Geminin in der Inhibition der DNA Replikation in prämeiotischen, männlichen Keimzellen vor. Nach der letzten DNA Verdoppelung in den leptotänen Spermatozyten ist die Unterbindung einer erneuten, replikativen Aktivität essentiell, da ansonsten die meiotische Teilung defekte, nicht-haploiden Gameten hervorbringen könnte. Es wurde jedoch bislang keine funktionelle Analyse von Geminin in den Spermatozyten veröffentlicht, welche diese Hypothese stützt.

1.3. Das spermatogenese-assoziierte Protein TIPT

Das Protein TIPT (TBPL1 interacting protein in testis), auch bekannt als „Spermatogenesis Associated Protein 24“ (Spata24) und „Coiled-Coil Domain Containing 161“ (Ccdc161) sowie T6441, wurde in zwei unabhängigen Yeast-Two-Hybrid Interaktionsstudien identifiziert. Hierbei zeigte das Protein eine Interaktion mit Geminin bei Verwendung einer embryonalen, murinen E8,5 cDNA-Bibliothek (Luo et al., 2004). In der zweiten Studie konnte eine Interaktion mit TRF2 bei Verwendung einer murinen, testikulären cDNA-Bibliothek gezeigt werden (Brancorsini et al., 2008). Beide Interaktionen konnten auch in GST-Pulldown Experimenten demonstriert werden (Brancorsini et al., 2008; Pitulescu et al., 2009). Die Funktion dieses Proteins war bis zu diesem Zeitpunkt unbekannt, daher zielten die ersten

Untersuchungen auf die grundlegende Charakterisierung des Proteins ab, auf die im Folgenden eingegangen werden soll.

1.3.1. *Tipt*: genomische Organisation, Isoformen und Proteinstruktur in der Maus

Das *Tipt*-Gen ist auf dem Minus-Strang der DNA auf Chromosom 18 der Maus lokalisiert. Die proteinkodierende Sequenz ist in sechs Exone unterteilt, welche in zwei Isoformen exprimiert werden. Diese sind TIPT1 (GenBank:AAV97890) und TIPT2 (GenBank:AAH60950). Eine dritte, hypothetische Isoform ist in der NCBI Datenbank aufgeführt, konnte aber bisher nicht nachgewiesen werden. Abbildung 4 zeigt die genomische Organisation von *Tipt* in der Maus.

Die beiden Isoformen TIPT1 und TIPT2 unterscheiden sich im C-terminalen Teil des Proteins. TIPT1 fehlt durch alternatives Spleißen im Gegensatz zu TIPT2 Exon 5 und 6, dagegen ist Exon 4 länger.



Abbildung 4: Genomische Organisation von *Tipt*. Die kürzere Isoform (TIPT1) besitzt nicht Exon 5 und 6, dagegen ist Exon 4 länger. *Tipt* ist auf dem Minusstrang von Chromosom 18 der Maus lokalisiert. Modifiziert von www.ensembl.org.

Tipt ist konserviert in Mammalia, jedoch nicht in anderen Eukaryoten. Es konnten keine konservierten Proteindomänen und Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen identifiziert werden, welche auf eine Funktion von TIPT hindeuten würden. Zwei (TIPT1) bzw. drei (TIPT2) sogenannte „coiled-coil“ Regionen sind nach der Aminosäuresequenzanalyse *in silico* vorhergesagt worden. Coiled-coils sind bekannte Regionen für Protein-Protein-Interaktionen. Des Weiteren wurde mehrere potentielle Phosphoakzeptor-Stellen für Proteinkinase C, Proteinkinase B, GSK3- β sowie Kaseinkinase I und II in TIPT vorhergesagt (Brancorsini et al., 2008; Pitulescu, 2006). Eine davon, Serin 28, konnte bisher experimentell bestätigt werden und wird, zumindest *in vitro*, durch Kaseinkinase II phosphoryliert (Pitulescu, 2006). Abbildung 5 zeigt die Proteinstruktur von TIPT1 und TIPT2.

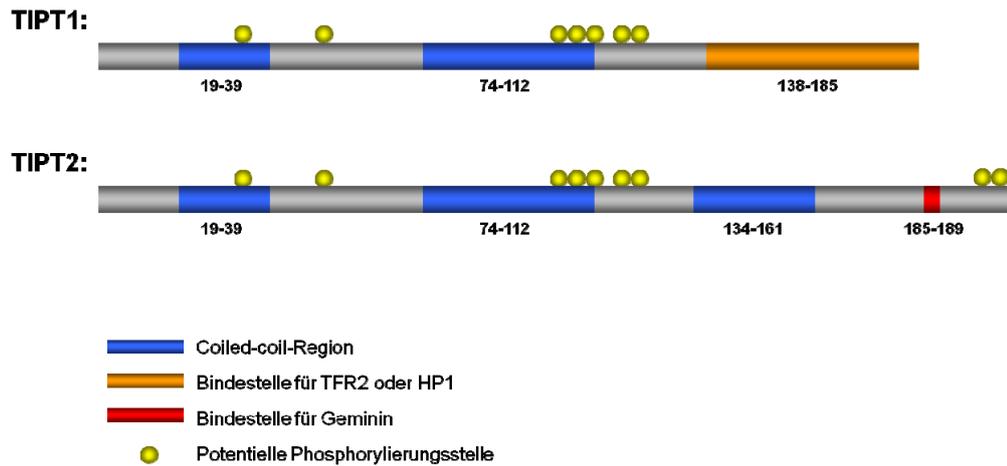


Abbildung 5: Schematische Darstellung der TIPT Isoformen. Die Coiled-coil-Regionen sind in blau dargestellt, die Bindestelle für TRF2/HP1 und Geminin in orange bzw. rot. Gelbe Punkte markieren potentielle Phosphorylierungsstellen (NetPhos 2.0).

Wie in Abbildung 5 dargestellt, besitzen TIPT1 und TIPT2 verschiedene C-Termini. Während *in vitro* TIPT1 mit TRF2, HP1 α und HP1 γ interagieren kann (Brancorsini et al., 2008), wurde für TIPT2 eine Interaktion mit Geminin gezeigt. Die Bindungsstelle für Geminin, das Aminosäuremotiv KRKK, ist spezifisch für TIPT2 (Pitulescu et al., 2009).

1.3.2. Subzelluläre Lokalisation und Expression von TIPT

TIPT ist je nach Zelltyp in unterschiedlichen, subzellulären Kompartimenten lokalisiert. In verschiedenen Zelllinien wie NIH3T3, U2OS und HeLa-Zellen konnte das Protein zytoplasmatisch, aber auch im Nukleus und in Nukleoli nachgewiesen werden (Pitulescu et al., 2009). In testikulären Schnitten der Ratte wurde TIPT zytoplasmatisch beobachtet (Song et al., 2006). In testikulären Quetschpräparaten der Maus dagegen wurde eine nukleäre Lokalisation beschrieben (Brancorsini et al., 2008). Die mRNA von TIPT ist sehr hoch in Testes exprimiert, sie ist aber auch schwach im gesamten Organismus detektierbar (Pitulescu et al., 2009; Song et al., 2006).

1.3.3. TIPT2 aktiviert Transkription zusammen mit Geminin und TBP oder TRF2

In vitro Studien haben gezeigt, dass TIPT2 an sogenannten BRE-Motiven der DNA binden kann, welche einigen TATA-Box Motiven vorgeschaltet sind, und Reportergene unter dem TATA-Box enthaltenden Promoterelement *Adenovirus Major Late Promoter Sequence* (AdMLP) im Zusammenspiel mit Geminin und dem *TATA-Binding Protein* (TBP) aktivieren

kann. Den TATA-losten Promoter des Neurofibromatosis 1 (*Nf1*) Gens kann TIPT2 zusammen mit Geminin und TRF2 aktivieren. In beiden Fällen sind jeweils diese drei Proteine notwendig, um die synergistische, transkriptionelle Aktivierung zu vermitteln. Bei Abwesenheit von einem der Proteine tritt der Effekt nicht ein. *In vitro* kann also durch TIPT2 in Kombination mit Geminin und TBP eine transkriptionelle Aktivierung von TATA Box enthaltenden Promotoren vermittelt werden. TATA-lose Promotoren können hingegen durch TIPT2, Geminin und TRF2 aktiviert werden. Eine *in vivo* Funktion für TIPT1 und TIPT2 konnte jedoch bislang nicht gezeigt werden.

1.4. Zielsetzung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Funktion von Geminin und TIPT während der Spermatogenese *in vivo*. Hierbei war ein Ziel, die zellspezifische Expression von beiden Proteinen während der murinen Spermatogenese zu untersuchen und Funktionsverlustmutanten im Mausmodell zu generieren. Da die globale Deletion von Geminin früh embryonal letal ist, wurde für dieses Gen ein konditioneller Knockout sowohl mit einer testisspezifischen Cre-Linie (Stra8-Cre) sowie einer durch Tamoxifen global induzierbaren Cre-Linie (CAGGCre-ERTM) gewählt. Da Geminin eine essentielle Funktion in der Regulation von DNA Replikation und zellulärer Differenzierung besitzt, sollte eine potentielle Rolle von Geminin in diesen Prozessen in den männlichen Keimzellen analysiert werden.

Für TIPT wurden bislang keine funktionellen *in vivo* Daten gezeigt. Daher war ein Ziel dieser Arbeit, eine TIPT-defiziente Mausmutante zu etablieren, welche die Überprüfung der *in vivo* Relevanz von bisher gefundenen *in vitro* Funktionen dieses Proteins ermöglicht.

Die Analyse der Mauslinie sollte sich speziell auf die Spermatogenese fokussieren, da TIPT in diesem Prozess zellspezifisch sehr hoch exprimiert wird. Die phänotypische Analyse der Mausmutante sollte dabei durch einen Interaktionspartner-Screen in testikulären Zellen komplettiert werden, welcher weitere Aufschlüsse über die *in vivo* Funktion dieses Proteins geben sollte. Schwerpunkte der Analyse sollten dabei die keimzellspezifische Transkription, Spermatozoendifferenzierung und -funktionalität, sowie Heterochromatinformation und Chromatinkondensation während der Spermatogenese bilden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Molekularbiologische Methoden

2.1.1. Extraktion genomischer DNA aus Geweben

Die Gewebe wurden in 475 µl Lysis-Puffer (100 mM TrisCl, pH 8,0, 5 mM EDTA, 0,2% SDS, 200 mM NaCl) aufgenommen, dazu wurden 25 µl Proteinase K (100 µg/ml) pipettiert. Die Gewebe wurden bei 55°C und Schüttelbewegung mindestens vier Stunden bis zur Lyse inkubiert. Die unlysierten Überreste wurden 5 Minuten bei 14000 RPM abzentrifugiert und verworfen, während der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt wurde. Es wurden 700 µl Isopropanol hinzupipettiert, dann das Eppendorfgefäß geschlossen und stark geschüttelt um die DNA zu fällen. Die Eppendorfgefäße wurden fünf Minuten bei 14000 RPM zentrifugiert um die DNA zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen und das DNA Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, drei Minuten bei 14000 RPM abzentrifugiert, das Ethanol vorsichtig abgenommen und das Pellet bei 37°C im Thermoblock getrocknet. Die DNA wurde mit ddH₂O resuspendiert, wobei die eingesetzte Menge dabei zwischen 30 µl und 500 µl variierte, je nach Größe des DNA Pellets.

2.1.2. Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Die Plasmid wurde auf Grundlage der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) aus *E. coli* isoliert. Hierzu wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur in ein Eppendorfgefäß überführt und eine Minute bei 4000 RPM abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Bakterienpellet mit 250 µl P1 Puffer (50 mM Tris - HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 250 µl P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) hinzupipettiert und die Eppendorfgefäße fünf- bis sechsmal invertiert. Danach wurde mit 350 µl P3 Puffer (3 M Kaliumazetat, pH 5,5) neutralisiert und die Eppendorfgefäße erneut fünf- bis sechsmal invertiert. Um die Plasmid - DNA von den ausgefallenen Proteinen und der genomischen DNA sowie der RNA zu trennen, wurden die Eppendorf Gefäße bei 14000 RPM für fünf Minuten abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Plasmid - DNA nach Zugabe von 600 µl Isopropanol und kräftigem Schütteln ausgefällt, bei 14000 RPM für fünf Minuten abzentrifugiert, dann das Isopropanol abgenommen und verworfen. Das DNA - Pellet wurde mit 1 ml 70% Ethanol überschichtet

und drei Minuten bei 14000 RPM zentrifugiert, der Überstand vorsichtig entfernt und die Plasmid DNA bei 37°C im Thermoblock getrocknet. Das trockene, glasige Pellet wurde mit ddH₂O resuspendiert, wobei das Volumen, je nach Größe des Pellets, zwischen 20 µl und 100 µl variierte.

2.1.3. Polymerase – Kettenreaktion

Zur Amplifikation von DNA Fragmenten wurde die Polymerase – Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) verwendet (Saiki et al., 1988). Die Primer wurden dabei nach Möglichkeit so gewählt, dass der Schmelzpunkt (T_m) bei 63°C lag. Der Hybridisierungsschritt in der PCR Reaktion war deshalb meistens auf 58°C eingestellt (T_m – 5°C). Der Elongationsschritt wurde je nach Länge des erwarteten Fragmentes variabel gewählt. Es galt dabei der Richtwert von einer Minute pro 1000 Basenpaare. Für Genotypisierungen wurde die GoTaq® DNA Polymerase (Promega) eingesetzt. Um Punktmutationen bei Klonierungs-PCRs zu vermeiden, wurde *PfuUltra*® High-Fidelity DNA Polymerase (Stratagene) verwendet. Die PCR Reaktionen wurden dabei jeweils nach den Herstellerangaben ausgerichtet, nur die Hybridisierungstemperatur und Elongationszeit wurden angepasst. Alle PCR Reaktionen wurden auf einem Mastercycler® (Eppendorf) mit einer Deckeltemperatur von mindestens 105°C ausgeführt. Tabelle 1 zeigt das Standard-PCR Programm, welches für die jeweiligen Anwendungen modifiziert wurde, Tabelle 2 alle in dieser Arbeit verwendeten Primer.

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
1	94°C	5 Minuten	1
2	94°C	30 Sekunden	
3	55°C - 68°C	35 Sekunden	25 - 31
4	72°C	30 - 90 Sekunden	
5	72°C	10 Minuten	1
6	4°C	unbegrenzt	

Tabelle 1: Standardprogramm für PCR Reaktionen. Die Deckeltemperatur betrug jeweils 105°C – 110°C, die Hybridisierungstemperatur wurde entsprechend der verwendeten Primer angepasst (jeweils 5°C unter der der Schmelztemperatur der Primer). Genotypisierungen wurden immer mit 30 Zyklen ausgeführt.

Name des Primers	Sequenz (5' - 3')	Verwendungszweck
Left Arm forward (NotI)	AGACAGACAGTGGCCGCTCATGGA	Retrieval Vektor Konstruktion
Left Arm reverse (HindIII)	TCAACTCAGAAGCTTGAGGGTGGGAA	Retrieval Vektor Konstruktion
Right Arm forward (HindIII)	TCAATGATTCTAAGCTTGGTCTACAGA	Retrieval Vektor Konstruktion
Right Arm reverse (SpeI)	TTCACCCTCTTGACTAGTTATTTTCAG	Retrieval Vektor Konstruktion
452 SalI forward (SalI)	ACGCGTCGACGTCTGTGTATATAGTT	Konstruktion des 452 Vektors
452 EcoRI reverse (EcoRI)	TTAGAATTCAGTACGGGGCATGGCTGG	Konstruktion des 452 Vektors
452 BamHI forward (BamHI)	TTAGGATCCACAGGCAGGACTGAG	Konstruktion des 452 Vektors
452 SacII reverse (SacII)	ATACCGCGGAACAGTTCAGCTTTAG	Konstruktion des 452 Vektors
451 HindIII forward (HindIII)	CCCAAGCTTTAACCTTGCTCAAGAGG	Konstruktion des 451 Vektors
451 EcoRI reverse (EcoRI)	CCGGAATTCAGTACGTGACTTACATATAAT	Konstruktion des 451 Vektors
451 BamHI forward (BamHI)	CGCGGATCCTAGCTGTCTTCAGACAC	Konstruktion des 451 Vektors
451 SacII reverse (SacII)	ATACCGCGGATGTCCACAACATCTG	Konstruktion des 451 Vektors
3' Probe forward	GGACAGCAGAGAAGAATGAAC	3' Southern Blot Probe
3' Probe reverse	CATGTCTCCCAAAGGGTT	3' Southern Blot Probe
5' Probe forward	GTAGGCAGACAGCCATTTGC	5' Southern Blot Probe
5' Probe reverse	CGTGGAAGTACTGCTGCCAC	5' Southern Blot Probe
A1 reverse	CCTCTATGCTGAACCTTTCTAGC	Sequenzierung des Konstruktes
A2 forward	GGCTACTCTGCTGACATTG	Sequenzierung des Konstruktes
A3 forward	CCTTCTTAGTCCACCTTTTGT	Sequenzierung/Genotypisierung
A3 reverse	TCGACGACCTGCAGCCAAG	Sequenzierung des Konstruktes
A4 forward	GCTCTATGGCTTCTGAGG	Sequenzierung des Konstruktes
A4 reverse	CTCTATCTCTGAATGCTGG	Sequenzierung/Genotypisierung
Neo_ raus	CAGCGCATCGCCTTCTATC	Genotypisierung
KO forward	AGTGAGGGGAAACCCAG	Genotypisierung
Cre forward	ATGCTTCTGTCCGTTTGCCG	Genotypisierung
Cre reverse	CCTGTTTTGCACGTTACCCG	Genotypisierung
LacZ forward	TTGGCGTAAGTGAAGCGAC	Genotypisierung
LacZ reverse	AGCGGCTGATCTTGAACCTG	Genotypisierung
gem 87	GAAAAGCGACAGGCAGTTGAG	Genotypisierung
gem 88	GTCCCAAGGAGAACGCTGAAG	Genotypisierung
gem 92	CAGCGCATCGCCTTCTATC	Genotypisierung
gem 100	GTACCAGGAAGTGAAGCTGAG	Genotypisierung
Stra8-Cre forward	GCGCTCCTAGTGTCCAGTTTGAT	Genotypisierung
Stra8-Cre reverse	AGTGAAACAGCATTGCTGTCA	Genotypisierung
hPLAP/06	AGAACCCGGACTTCTGGAACC	Genotypisierung
hPLAP/07	TTCATCACGGAGATGACCTC	Genotypisierung
HSV-TK 5'	CTTCCGGAGGACAGACACATCG	ES-Zell-Screen
HSV-TK 3'	GTCGTAATCCAGGATAAAGACGTGC	ES-Zell-Screen
TIPT_for_Intron	GAAGAACTGGTGGAGGAGAAAAG	RT PCR
TIPT1 reverse	CTGCTTTTGGCACCGTCATTG	RT PCR
TIPT2 reverse	CATTCTGTGGCTTTCTTACGC	RT PCR
mGmn_RT_PCR_for	GCAGAGAAAATGAGTTGCCAA	RT PCR
mGmn_RT_PCR_rev	ACTCAGCCTCTCGATTACC	RT PCR
Acrosin_for	CGGAGTCTACACAGCCACCT	RT PCR
Acrosin_rev	GCATGAGTGATGAGGAGGTT	RT PCR
Haprin_for	CCAGAACATGAGACAGAGAG	RT PCR
Haprin_rev	AGCAACTTCCTGAGCATAACC	RT PCR
MIS_for	TTGGTGCTAACCGTGGACTT	RT PCR
MIS_rev	GACGAGCACGAACCAAGCGA	RT PCR
Dazl_for	GCCAGCACTCAGTCTTCATC	RT PCR
Dazl_rev	GTTGGAGGCTGCATGTAAGT	RT PCR
Rnf17_for	GACACACAGTCTAACAGAGG	RT PCR
Rnf17_rev	AGGACAGCAGCATCTACCTT	RT PCR
Tex14_for	GAAGCTTGAGCAGGAGGTAG	RT PCR
Tex14_rev	TTCAGAAGACACAGACGCCA	RT PCR
NF1 forward	CGCAGCAGCACCCACATTTAC	RT PCR
NF1 reverse	ACTGTGGCGGGACTCCTCA	RT PCR
TRF2 forward	GGTGCCAGACGTTTAGCC	RT PCR

TRF2 reverse	GGTGGAGACTAACCAACCAAG	RT PCR
Bbs2 forward	ATCGGTGGAAACTGTGCTCT	RT PCR
Bbs2 reverse	AGCATGGATGCTCATGGC	RT PCR
Bbs4 forward	GCCATCGAGATCTACAAGAAAG	RT PCR
Bbs4 reverse	TGATGCATACTGCTGCATAGTC	RT PCR
Mkks forward	CTTAGGGTGGCACTCTTCTGTAC	RT PCR
Mkks reverse	CTGCAGAGAAGCAAGGTGC	RT PCR
Tekt2 forward	GAGACGCTGGACAAGTGTCT	RT PCR
Tekt2 reverse	CCTGTCGATCTCCAGTGTCTC	RT PCR
Spag6 forward	GATGCAGGAGCAATTCCTC	RT PCR
Spag6 reverse	GGCGTGTGTTTTGCAATC	RT PCR
Akap4 forward	GGACAACAAGATCAGGACCG	RT PCR
Akap4 reverse	GCACACAGATCCCTCCG	RT PCR
Sept4 forward	GTTTCGTGAAGGATTTCCAG	RT PCR
Sept4 reverse	GTTGCAAAGCCCACATACTC	RT PCR
Sepp1 forward	GAGGGCAAAGTGACAGTGG	RT PCR
Sepp1 reverse	GAAGGAGTAAGGCAAACCAAG	RT PCR
Gopc forward	GATGGCTTGAGGTGCTGG	RT PCR
Gopc reverse	GGCCCCAGAGTCAACACT	RT PCR
Ube2b forward	GGTCATGCGGGATT	RT PCR
Ube2b reverse	GATTCGGTTCATCCAGCAG	RT PCR

Tabelle 2: Verwendete Primer. Die Tabelle enthält alle in dieser Arbeit verwendeten Primer, falls Restriktionsschnittstellen vorhanden sind, sind diese in Klammern angegeben.

2.1.4. RNA Isolation und Reverse Transkriptase – Polymerase - Kettenreaktion

Die RNA wurde aus den Testis unter Verwendung des RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) nach den Vorgaben des Herstellers isoliert. Zur Homogenisierung wurden die Organe grob mit einer Schere zerteilt, dann mit einer sterilen Spritze mehrmals durch eine 21G Nadel, dann durch eine 22G Nadel gepresst. Die RNA wurde dann mit Hilfe des Omniscript® Reverse Transcription Kits (QIAGEN) nach den Anweisungen des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Hierbei wurde jeweils 1 µg RNA und ein Gemisch aus randomisierten Hexameren (10 µM finale Konzentration) sowie Oligo-dT Primern (1 µM finale Konzentration) eingesetzt. Es wurde 1 µl der RT Reaktion für nachfolgende PCR Reaktionen eingesetzt und RT-PCR Reaktionen mit maximal 28 Zyklen ausgeführt.

2.1.5. Aufreinigung von PCR Fragmenten

Für Klonierungen wurden die amplifizierten Fragmente mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN) nach den Vorgaben des Herstellers aufgereinigt. Die Fragmente wurden letztlich immer mit 20 µl EB Puffer von den Säulen eluiert und weiter prozessiert.

2.1.6. Agarosegel - Elektrophorese

Agarosegele wurden verwendet, um DNA Fragmente nach Restriktionsverdauen und PCRs aufzutrennen und zu visualisieren. Je nach Fragmentgröße wurden 0,7% - 2% Gele in 0,5% TBE Puffer (89 mM TRIS Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0) aufgekocht, mit Ethidiumbromid versetzt (finale Konzentration von 0,3 µg/ml) und im Kühlraum in Gelkammern gegossen. Die DNA wurde jeweils mit der nötigen Menge 6x Ladepuffer versetzt (0,25% (w/v) Bromophenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol FF, 30% (v/v) Glycerol in dH₂O) und mit circa 80 – 90 Volt in 0,5% TBE Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Das zwischen die Basen der DNA interkalierende Ethidiumbromid wurde mit UV – Licht der Wellenlänge 258 nm visualisiert, das Programm AlphaEaseTMFC wurde zur Dokumentation der Gele verwendet. Für präparative Gele wurde UV – Licht mit der Wellenlänge von 366 nm benutzt. Die Isolation und Aufreinigung von DNA Fragmenten aus Gelen wurde unter Verwendung des QIAquick® Gel Purification Kits (QIAGEN) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Agarose-Konzentration [% w/v]	DNA Fragmentlänge [kb]
0,7	0,8 - 12
1	0,5 - 7
1,2	0,4 - 6
1,5	0,2 - 3
2	0,1 – 2

Tabelle 3: Verwendete Agarosekonzentration für die jeweiligen DNA Fragmentlängen. Die Auftrennung von DNA Fragmenten einer spezifischen Länge ist in den angegebenen Agarosekonzentrationen am effizientesten möglich (Mülhardt, 2000).

2.1.7. DNA Restriktionsverdau

Die Restriktionsverdau wurden jeweils nach den Vorgaben des Herstellers angesetzt (New England Biolabs, Roche, Fermentas, Promega). Bei analytischen Restriktionsansätzen wurde pro µg DNA 10 Units Enzym im jeweils spezifischen Enzympuffer eingesetzt. Falls erforderlich, wurde BSA in einer Endkonzentration von 100 µg/ml hinzupipettiert. Analytische Restriktionsansätze wurden in 30 µl Gesamtvolumen angesetzt und mindestens zwei Stunden bei 37°C inkubiert, dann auf einem Agarosegel analysiert. Präparative Verdau wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl angesetzt und über Nacht inkubiert. Die Fragmente wurden dann entweder über ein Agarosegel oder direkt mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN) über Säulen aufgereinigt und weiter prozessiert.

2.1.8. Dephosphorylierung von DNA Enden

Bei Klonierungen wurden die 5'-Phosphatgruppen der Vektoren stets nach dem Öffnen durch Restriktionsenzyme mit Alkalischer Phosphatase, der *Antarctic Phosphatase* (New England Biolabs), dephosphoryliert, um eine Religation zu verhindern. Hierzu wurde direkt zum Restriktionsansatz das entsprechende Volumen 10x Phosphatase-Puffer pipettiert, dann 10 Units Phosphatase. Die Dephosphorylierungsreaktion wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert, danach folgte eine Aufreinigung mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN).

2.1.9. Ligation

Die Ligationsreaktion wurde nach den Vorgaben des Herstellers des Ligase – Enzyms angesetzt (T4 DNA Ligase, New England Biolabs oder Roche) und entweder über Nacht bei 16°C oder für zwei Stunden bei 23°C inkubiert. Es wurden maximal 30 ng des Vektors eingesetzt. Die Menge des eingesetzten Inserts berechnete sich aus der folgenden Formel (Mülhardt, 2000):

$$\text{Masse}_{\text{Insert}} [\text{ng}] = 5 \times \text{Masse}_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Insert}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]$$

2.1.10 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Eine Kolonie von *E. coli* Bakterien wurde über Nacht in LB – Medium (1% (w/v) Bacto-Agar, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl in dH₂O) bei 37°C unter starker Agitation (220 RPM) inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine neue, 50 ml Kultur angeimpft und bis zur optischen Dichte von 0,6 – 0,7 inkubiert. Die Bakterien wurden bei 2000 RPM und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert und in 25 ml eiskaltem CaCl₂ (50 mM) resuspendiert. Nach erneutem Abzentrifugieren der Zellen für 10 Minuten bei 4°C und 2000 RPM wurde das Pellet in 3 ml eiskaltem CaCl₂/Glycerol (50 mM CaCl₂, 10% Glycerol) resuspendiert und jeweils 50 µl der Bakteriensuspension in vorgekühlte Eppendorfgefäße pipettiert. Die Eppendorfgefäße wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und zur weiteren Lagerung auf -80°C gehalten.

2.1.11. Transformation chemisch kompetenter *E. coli* durch Hitzeschock

Die chemisch kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, die Plasmid – DNA hinzu pipettiert, vermischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C im Thermoblock, dann wurden das Eppendorfgefäß kurz auf Eis abgekühlt und die Bakterien in 1 ml LB Medium resuspendiert. Die Suspension wurden 30 - 40 Minuten bei 37°C unter Schüttelbewegungen im Thermoblock inkubiert, dann eine Minute bei 4000 RPM abzentrifugiert, 900 µl des Überstandes abgenommen und das Bakterienpellet im verbleibenden Medium resuspendiert und ausplattiert. In Abhängigkeit vom verwendeten Plasmid und dem darauf vorhandenen Resistenzgen wurde das entsprechende Antibiotikum auf den Agar-Platten verwendet (100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin oder 25 µg/ml Chloramphenicol).

Name	Verwendung	Herkunft
DH5α	Amplifikation von Plasmid - DNA	Invitrogen
DH10B	Amplifikation von Plasmid - DNA	E. Herzog
SW102	Recombineering	(Warming et al., 2005)
SW105	Recombineering (Induzierbare FLP – Rekombinase)	(Warming et al., 2005)
SW106	Recombineering (Induzierbare Cre – Rekombinase)	(Warming et al., 2005)

Tabelle 4: Verwendete Bakterienstämme und ihre Herkunft. DH5α wurden für die Klonierung von Plasmiden normaler Größe benutzt, DH10B und SW102 für die Klonierung großer Plasmide (> 12 kb) und PAC DNA. SW105 und SW106 wurden für die *in vitro* Rekombination verwendet.

2.1.12. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen wurde das NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer (Peqlab) gemäß den Vorgaben des Herstellers benutzt. Die nukleinsäurehaltigen Proben wurden bei 260 nm gemessen. Weiterhin wurde zur Determinierung des Reinheitsgrades einer Probe auch die Absorption bei 280 nm gemessen, da dieser Wert Hinweise über die Höhe des Proteinanteils in der Probe liefert. Eine nukleinsäurehaltige Probe sollte einen 260/280 Quotienten von 1,8 – 2,0 aufweisen.

2.1.13. Sequenzierungen

Die Sequenzierung aller Klonierungsprodukte wurde in der Abteilung Molekulare Zellbiologie von Herrn Sigurd Hille ausgeführt. Die Sequenzierungsreaktionen wurden unter

Verwendung des Taq Dye Deoxy Terminator Kits (Perkin Elmer) auf dem ABI Prism 377 DNA Sequenziergerät (Applied Biosystems) durchgeführt. Die generierten Sequenzierungsergebnisse wurden mit dem Programm „ApE“ (V1.12, M. Wayne Davis) analysiert und abgeglichen.

2.1.14. Phenol – Chloroform Extraktion von Plasmiden

Zur DNA wurde das gleiche Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol gegeben, das Eppendorfggefäß kräftig geschüttelt und für zwei Minuten bei 14000 RPM zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfggefäß überführt, die untere Phase wurde verworfen. Es wurde ein Volumen Chloroform-Isoamylalkohol hinzupipettiert, das Eppendorfggefäß erneut kräftig geschüttelt und für zwei Minuten bei 14000 RPM abzentrifugiert. Wieder wurde die obere Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfggefäß überführt. Es wurde nun erst ein Zehntel des Gesamtvolumens 3 M Natriumacetat (pH5,2) in die Flüssigkeit pipettiert, gemischt und dann ein Volumen 100% Ethanol hinzugegeben. Nach kräftigem Schütteln wurde das Gemisch zur Fällung für 30 Minuten bei -20°C gelagert, dann 15 Minuten bei 4°C und 14000 RPM abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das DNA Pellet wurde mit 1000 µl 70% Ethanol gewaschen, dann 2 Minuten bei 14000 RPM abzentrifugiert. Die nächsten Arbeitsschritte wurden alle unter der sterilen Zellkultur-Bank ausgeführt. Das Ethanol wurde abgenommen, das Pellet mit geöffnetem Deckel kurz getrocknet und in sterilem, autoklaviertem Wasser resuspendiert.

2.2. Generation eines konditionellen Knockout-Vektors und transgener Mäuse

Die Konstruktion von Targeting Vektoren mit konventionellen Klonierungsstrategien ist oft limitiert durch die Verfügbarkeit von geeigneten Restriktionsschnittstellen in der gewünschten genomischen Region. Die Methode des „*Recombineerings*“ umgeht diese Limitierung durch das gezielte Einbringen von loxP Motiven und Neomycin – Kassetten durch Rekombination in Bakterien. Hierbei wird ein spezieller Bakterienstamm verwendet, SW102, welcher von DH10B abgeleitet ist und einen der wenigen *E. coli* Stämme darstellt, welche effizient mit großen Plasmiden, wie zum Beispiel BAC – DNA, transformierbar sind. Der SW102 Stamm kodiert in seinem Genom die *Red* Gene *exo*, *bet* und *gam* des λ Bakteriophagen, welche unter der Kontrolle des temperatursensitiven λ *cI857* Repressors stehen. Bei Inkubation der Bakterien bei 42°C werden diese drei Gene induziert und vermitteln eine effiziente homologe

Rekombination in den *E. coli* Zellen. Durch diese Technik kann DNA modifiziert werden, ohne auf Restriktionsschnittstellen angewiesen zu sein, und bietet daher gerade für das Konstruieren von Vektoren für das konditionelle Targeting große Vorteile gegenüber der konventionellen Klonierungsmethodik, da keine Einschränkungen mehr in der Positionierung der loxP Motive bestehen (Lee et al., 2001; Liu et al., 2003).

2.2.1. Identifikation von PAC Klonen mit dem genomischen *Tipt* Lokus

Um den genomischen *Tipt* - Lokus in den SW102 Zellen durch Rekombination in einen „Retrieval“ Vektor zu klonieren, benötigt man einen BAC oder PAC mit der genomischen Region von Interesse. Daher wurde eine PAC Bibliothek (imaGenes, früher RZPD, Maus PAC-Bank (RPCI-21) Nr.711, Stamm: 129S6/SvEvTac) mit einer radioaktiv markierten *Tipt* cDNA Probe analysiert. Die Hybridisierung der Bibliothek wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt (Osoegawa et al., 2000). Die positiven Klone wurden bestellt, die PAC DNA in einem Restriktionsverdau auf Integrität überprüft und anschließend in SW102 Bakterien elektroporiert.

2.2.2. Elektroporation der PAC - DNA in SW102

Die Erstellung von elektrokompenten *E. coli* wurde ähnlich durchgeführt wie von Liu et al. beschrieben (Liu et al., 2003). Es wurden 5 ml Vorkulturen über Nacht bei 32°C wachsen gelassen, diese wurden am nächsten Morgen bei 4000 RPM und 4°C abzentrifugiert, mit 1 ml eiskaltem ddH₂O resuspendiert und in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt. Der Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt und die Bakterien dann in 50 µl eiskaltem Milli-Q H₂O resuspendiert und in eine vorgekühlte Elektroporations – Küvette (Biorad *E. coli* Pulser™ Cuvette Nr.1652089) pipettiert. Es wurden 100 ng PAC DNA hinzugegeben und die Küvette in einem Elektroporationsgerät (Genepulser™, BioRad) platziert. Die Elektroporation wurde bei 1,75 kV, 25 µF und 200 Ω durchgeführt, die Zeitkonstante lag zwischen 4,1 und 4,4. Die Bakterien wurden mit 1 ml LB Medium aufgenommen und bei 32°C für 30 Minuten unter Schütteln inkubiert. Dann wurden sie abzentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 100 µl entfernt, das Pellet im Restmedium resuspendiert und auf kanamycinhaltigen Agar-Platten ausplattiert. Die PAC Klone enthalten im pPAC4 Vektor ein Kanamycin - Resistenzgen (Osoegawa et al., 2000).

2.2.3. Konstruktion des Retrieval Vektors

Um die gewünschte, genomische Region aus dem PAC Klon zu isolieren, muss der Retrieval Vektor mit homologen Sequenzbereichen konstruiert werden. Diese Sequenzbereiche stellen später das 5' und 3' Ende des Targeting Vektors dar. Das Verfahren der „Retrieval“-Prozedur ist in Abbildung 6 dargestellt. Alle benutzten Primer mit den enthaltenen Restriktionsschnittstellen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Zur homologen Rekombination in den Retrieval – Vektor wurden zwei Bereiche mit einer Länge von ungefähr 500 Basenpaaren von der PAC - DNA mit *PfuUltra*® High-Fidelity DNA Polymerase (Stratagene) amplifiziert und in den mit *NotI* und *SpeI* geöffneten Retrieval – Vektor ligiert. Das resultierende Plasmid wurde mit *HindIII* für das Retrieving linearisiert.

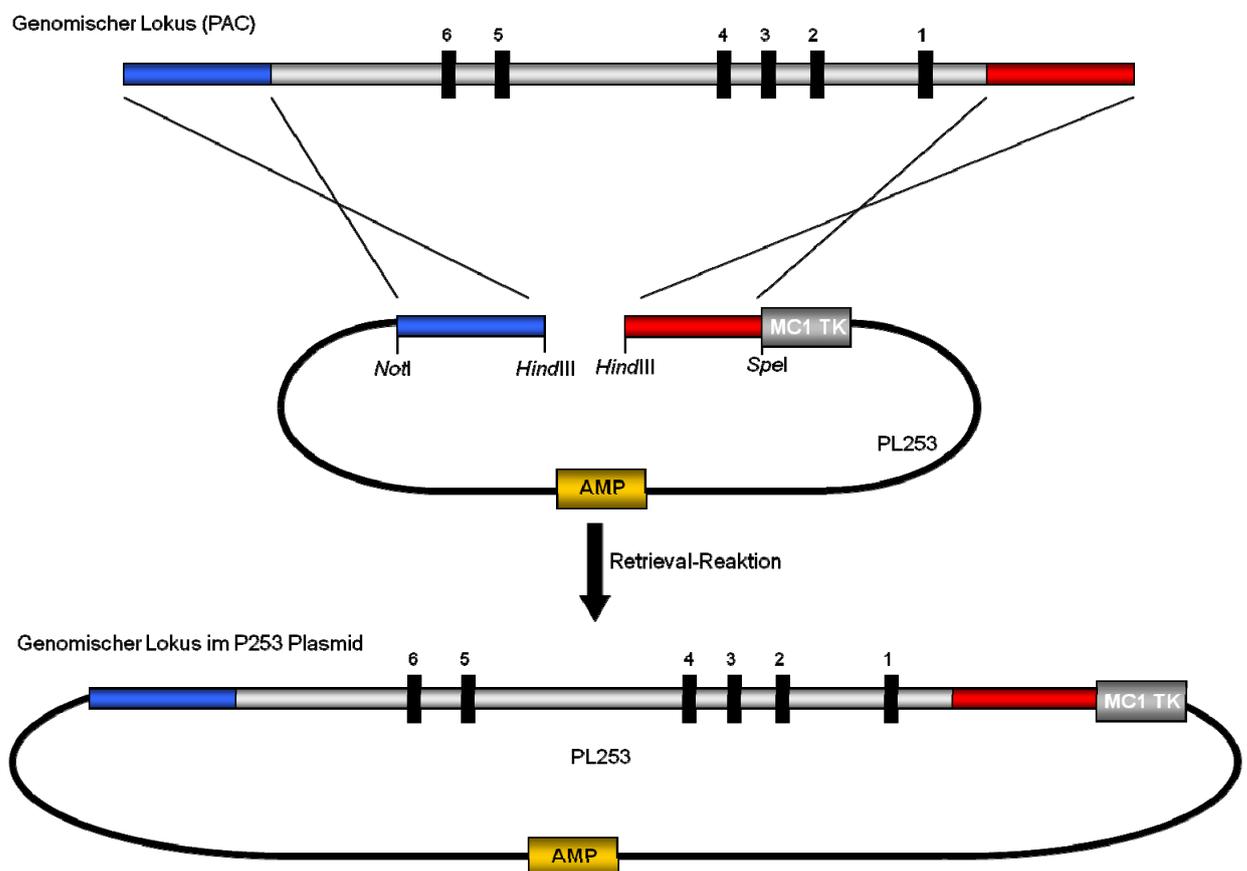


Abbildung 6: Retrieval Reaktion mit dem PL253 Vektor. In den PL253 Vektor wurden zwei homologe Bereiche ligiert (blau und rot dargestellt), welche zu dem 5' und 3' Grenzbereich der gewünschten, genomischen Region homolog sind. In hitzeinduzierten SW102 Bakterien wurde dann die Retrieval-Reaktion ausgeführt.

2.2.4. Retrieval - Reaktion

Die SW102 Bakterien, welche bereits die PAC – DNA enthielten, wurden über Nacht bei 32°C und 220 RPM in einer Vorkultur in 5 ml LB Medium mit Kanamycin wachsen gelassen. Am nächsten Morgen wurde 1 ml in 20 ml LB verdünnt und erneut bei 32°C inkubiert, bis eine optische Dichte von 0,6 erreicht wurde. Währenddessen wurden zwei Erlmeyerkolben in einem 42°C Schüttelinkubator vorgewärmt. Sobald die Bakterien eine optische Dichte von 0,6 erreicht hatten, wurden jeweils 10 ml der Suspension in die 42°C warmen Erlmeyerkolben pipetiert, um die *Red* Gene zu induzieren, und bei 42°C für 15 Minuten inkubiert. Danach wurden die SW102 sofort auf Eis abgekühlt und 5 Minuten bei 4000 RPM abzentrifugiert. Es folgte die unter 2.2.2. beschriebene Prozedur zur Generierung elektrokompetenter Bakterien. Nach dem Überführen der 50 µl Bakteriensuspension in Elektroporationsküvetten wurden 50 ng des linearisierten Retrieval – Vektors hinzupipetiert und die Elektroporation wie beschrieben durchgeführt. Die SW102 Zellen wurden nach der Elektroporation in 1 ml LB Medium aufgenommen und bei 32°C für 30 Minuten inkubiert, dann abzentrifugiert und das Pellet in ca. 100 µl resuspendiert und auf amplicillinhaltigen Agarplatten ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien enthalten sehr häufig eine gemischte Plasmidpopulation aus rekombinierten und nicht-rekombinierten Vektoren, daher wurde nach der Isolation und Verifikation der Plasmide durch Restriktionsanalyse eine Retransformation in verschiedenen Verdünnungen durchgeführt, um eine reine Plasmidpopulation zu erhalten.

2.2.5. Konstruktion der Minitargeting Vektoren

Mit dem Begriff „Minitargeting Vektor“ werden die Plasmide bezeichnet, welche die loxP Motive sowie die Neomycin-Resistenzkassette durch homologe Rekombination in spezifischen Regionen des Targeting – Konstruktes platzieren. Hierzu werden zwei Minitargeting - Vektoren konstruiert, welche sequentiell in die SW102 Zellen elektroporiert werden. Die Abfolge des Verfahrens ist in Abbildung 7 dargestellt. Durch das Einbringen des Kanamycin-Resistenzgens ist eine Selektion auf die rekombinierten Plasmide möglich. Die Ligation der beiden homologen Bereiche (die sogenannten Mini-Arme) in die Minitargeting – Vektoren wurde jeweils sequentiell in zwei Schritten durchgeführt.

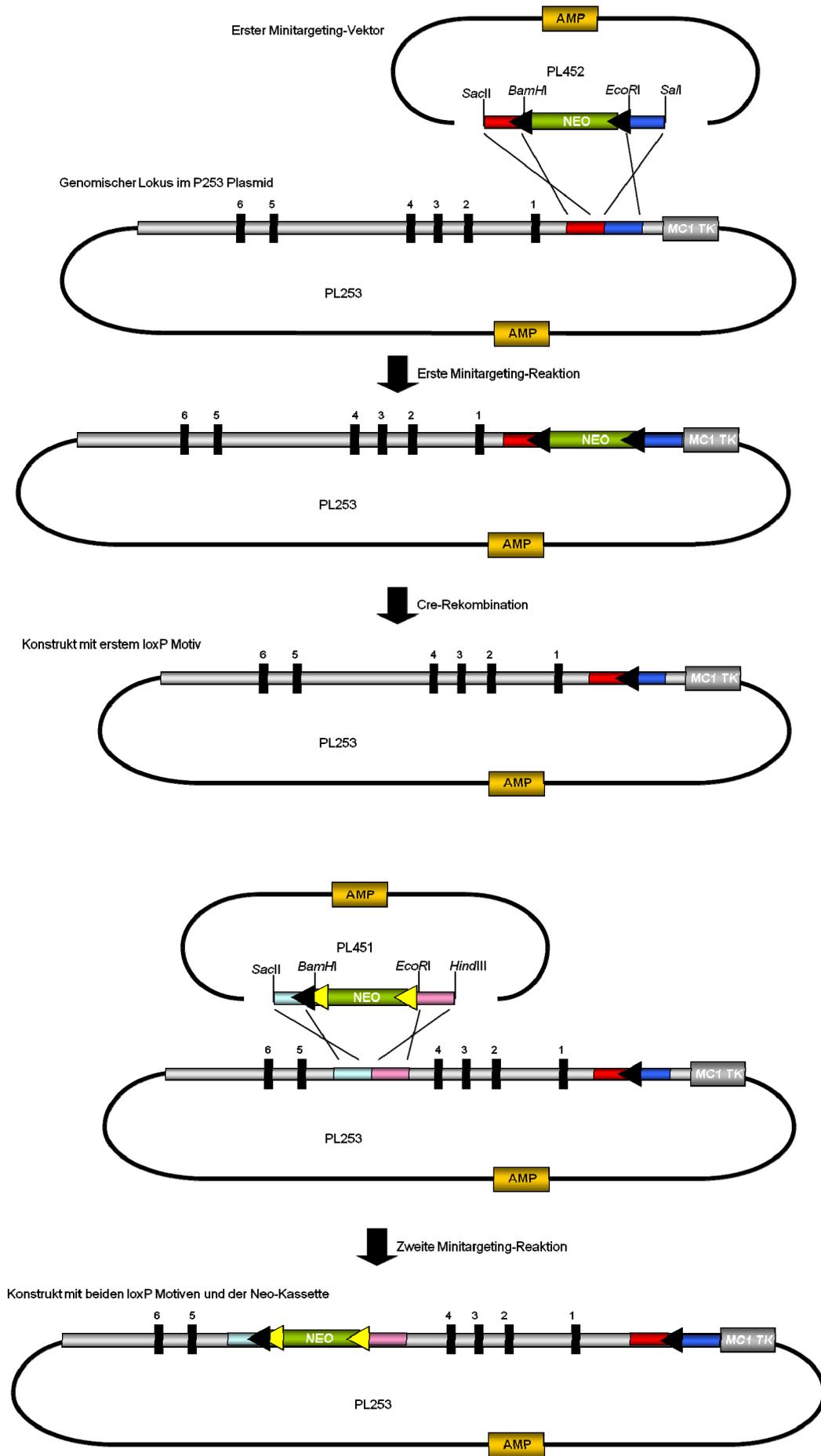


Abbildung 7: Schematischer Ablauf der Konstruktion des Targeting Vektors. Schwarze Pfeilspitzen stellen loxP-Motive dar, gelbe Pfeilspitzen FRT-Motive. Nach der Elektroporation der geflochten Neo-Kassette in SW102 Bakterien, welche den Retrieval Vektor enthielten, konnte auf die erfolgreich rekombinierten Klone durch Kanamycin selektiert werden. Dem Neomycin ist ein PGK-EK7 Hybridpromotor vorgeschaltet, welcher in Bakterien sowie mammalischen Zellen aktiv ist. Weitere Erklärungen im Text.

2.2.6. Einbringen der loxP Motive

Für beide Minitargeting – Reaktionen wurden die geflochten Neo-Kassetten, flankiert von den beiden homologen Bereichen, mit *SalI* und *SacII* im Falle des ersten, und *HindIII* und *SacII* im Falle des zweiten Minitargeting Vektors, ausgeschnitten und zur Konzentrationsbestimmung mit dem NanoDrop gemessen. Die SW102 Bakterien, welche den genomischen *Tipt* Locus im Retrieval Vektor beherbergen, wurden für die Expression der *Red* Gene durch Inkubation bei 42°C induziert und für die Elektroporation gewaschen wie oben beschrieben. Es wurden 500 ng der geflochten Neo-Kassette elektroporiert und die Bakterien letztlich auf kanamycinhaltigen Agarplatten ausplattiert. Durch eine anschließende Retransformation konnte jeweils eine reine Plasmidpopulation erhalten werden.

2.2.7. Deletion der Neo-Kassette

Um die geflochte Neo-Kassette nach der Integration des ersten Minitargeting-Konstruktes auszuschneiden und nur ein einzelnes loxP Motiv zu behalten, wurde das Plasmid in die SW106 Bakterien elektroporiert, welche zuvor in Arabinose zur Expression von Cre-Rekombinase induziert wurden. Die Prozedur war ähnlich der Induktion der *Red* Gene, aber statt der 15 Minuten Wärmeinduktion bei 42°C wurden 10 ml der SW106 bei einer optischen Dichte von circa 0,5 – 0,6 eine Stunde nach Zugabe von 100 µl 10% L(+) Arabinose (Sigma A-3256) in dH₂O (finale Konzentration in der Suspension 0,1%) bei 32°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf Eis gewaschen und zur Elektroporation vorbereitet wie bereits beschrieben. Es wurden 100 ng Plasmid in die Zellen elektroporiert, die SW106 wurden dann auf ampicillinhaltigen Platten ausgestrichen. Auch nach diesem Schritt ist eine Retransformation zwingend erforderlich, da ansonsten Rückstände von unrekombiniertem Plasmid in der Plasmidpopulation verbleiben.

2.2.8. *In vitro* Rekombinations - Funktionstest des konditionellen Targeting -Vektors

Nach der Integration der zweiten Minitargeting – Sequenz und Retransformation wurden alle kritischen Stellen des Konstruktes (loxP und *frt* Motive) sequenziert und ein *in vitro* Funktionalitätstest durchgeführt. Hierzu wurde das Konstrukt in SW106 (Cre-Rekombination) und SW105 (FLP-Rekombination) Bakterien elektroporiert, welche vorher mit vorher mit Arabinose induziert wurden. Die Vektoren wurden nach der Präparation aus den Bakterien auf korrekte Rekombination durch Restriktionsanalysen geprüft.

2.2.9. Homologe Rekombination in murinen ES Zellen

Nach der Linearisierung des Konstruktes mit *NotI* und anschließender Phenol-Chloroform Extraktion wurden 30 µg des Vektors in ES Zellen elektroporiert. Die negative Selektion erfolgte unter Zugabe von 250 µg/ml Geneticin (G418), gegen welches eine Resistenz durch die Neomycin-Kassette vermittelt wird. Positive Selektion erfolgte über die Zugabe von 2 mM Ganciclovir, welches in Kombination mit der im Rückgrat des Targeting - Vektors kodierten Tymidinkinase zytotoxisch wirkt. Da bei einer zufälligen Insertion des Vektors häufig die Tymidinkinase - Kassette integriert und intakt bleibt, können durch diese Strategie viele ES Zellen mit zufälligen Insertionsereignissen eliminiert werden. Die überlebenden ES Zell-Kolonien wurden nach 10 Tagen der Selektion einzeln isoliert und klonal expandiert, dann auf zwei verschiedene Zellkulturplatten auf inaktivierte murine, embryonale Fibroblastenzellen, sogenannte „Feeder Zellen“, gesplittet. Eine Platte wurde zur weiteren Verwendung eingefroren, die andere wurde zu Lyse und DNA Isolation benutzt, um die korrekte Integration des Konstruktes näher zu analysieren. Die ES-Zellkultur wurde von Sharif Mansur (Abteilung Molekulare Zellbiologie, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie) durchgeführt.

2.2.10. Analyse der ES Zell-Klone: PCR

Die Analyse der korrekten Integration wurde in zwei Schritten vollzogen. Eine Vorselektion der Klone fand mit einem PCR-Screen statt, die verbleibenden Klone wurden mittels Southern Blot untersucht. Die zufällige Integration des Konstruktes in Heterochromatin oder transkriptionell stille Bereiche des Genoms kann dazu führen, dass die Tymidinkinase nicht exprimiert wird. Solche ES Klone überleben die Selektion in G418 und sind von der

negativen Selektion mit Ganciclovir unbetroffen. Daher können durch Durchführung eines geeigneten PCR-Screenings mit Primern, welche in der TK-Kassette binden, alle diese Klone identifiziert werden. Gleichzeitig wird eine zweite PCR Reaktion mit Primern, welche in der Neomycinkassette binden, durchgeführt, um eine Positivkontrolle für jeden Klon zu erzielen. Von den ursprünglich expandierten 255 ES-Klonen wurden 33 Klone identifiziert, welche in der PCR Reaktion negativ für die TK Kassette waren und positiv für die Neo-Kassette. Die DNA dieser Klone wurde mittels Southern Blot Verfahren analysiert.

2.2.11. Analyse der ES Zell-Klone: Southern Blot

Die DNA wurde wie beschrieben aus dem Zelllysat präpariert und jeweils 5 – 10 µg DNA mit *SpeI* in 50 µl Ansätzen über Nacht verdaut. Die Proben wurden mit 10 µl Ladepuffer versetzt und auf einem großen 0,7% Agarosegel über Nacht elektrophoretisch aufgetrennt. Der Lamda-DNA/*HindIII* Marker (NEB) wurde benutzt, um am nächsten Tag unter UV Licht zu überprüfen, ob die Auftrennung ausreichend ist. Ein fluoreszierendes Lineal wurde neben dem Gel fotografiert, um später die Fragment-Banden dem Marker zuordnen zu können.

Nach der Elektrophorese wurden überflüssige Bereiche des Gels abgetrennt, die obere, rechte Ecke abgeschnitten und das Gel in eine Plastikschaale überführt. Auf einem Wippschüttler wurde das Gel 20 Minuten in 0,25 M HCl depuriniert, danach kurz in dH₂O abgespült. Es folgte eine Inkubation in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) für 30 Minuten. Durch die alkalische Denaturierung der DNA bricht diese an den depurinierten Stellen in kleinere Fragmente. Dies sorgt für einen effizienteren DNA Transfer. Das Gel wurde nun erneut kurz mit dH₂O gespült und für 40 Minuten neutralisiert (1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, pH 7,2), dann in 20× SSC Puffer (0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7,0) equilibriert. Die Nylonmembran (Genescreen™ Hybridization Transfer Membrane, PerkinElmer™ Life Sciences) wurde zwischenzeitlich erst in dH₂O befeuchtet, dann in 20x SSC Puffer inkubiert. Es wurde mit einem Kapillarsystem geblottet. Dieses erzeugt aufgrund von Kapillarkräften einen Flüssigkeitsstrom, welcher DNA aus dem Gel auf die angrenzende Nylonmembran befördert. Hierzu wurde eine Glasplatte quer über eine Plastikschaale gelegt, welche mit 20x SSC Puffer gefüllt war. Ein großes Stück Whatman®-Papier wurde zurechtgeschnitten und auf die Glasplatte gelegt, die überstehenden Enden tauchten auf beiden Seiten in den Puffer ein. Das Gel wurde invertiert auf dem Whatman®-Papier positioniert, sodass die geschlossene Seite der Geltaschen nach oben zeigte. Auf das Gel wurde blasenfrei die Nylonmembran gelegt und überstehende Ränder entfernt. Auf die Membranoberseite wurden passgenau zwei

weitere Lagen Whatman®-Papier gelegt. Alle Lagen wurden vor dem Übereinanderschichten mit 20x SSC Puffer durchtränkt, um Blasenbildung zu vermeiden. Nach dem Auflegen der letzten Whatman®-Schicht wurden mit einer befeuchteten 25 ml Pipette durch Rollbewegungen mit leichtem Druck alle Luftblasen entfernt. Zur Generierung der Kapillarkraft wurden zwei Stapel trockener Papiertücher nebeneinander auf den Aufbau gelegt und beschwert. Die Blot-Dauer lag zwischen 24 und 48 Stunden.

2.2.12. Kreuzvernetzung der DNA auf der Membran durch UV Licht

Nach dem Abbau des Kapillarsystems wurde die Membran mit dem unterliegenden Gel gewendet und mit einem weichen Bleistift die Position der Geltaschen auf der Membran markiert. Diese wurde dann auf einem Stück Whatman®-Papier bei $0,5 \text{ J/cm}^2$ unter UV-Licht (Fluo Link) an der Membran kreuzvernetzt und für 30 Minuten bei 80°C gebacken.

2.2.13. Prähybridisierung und Hybridisierung

Die Membranen wurden in Hybridisierungsröhren platziert und zweimal jeweils 30 Minuten mit vorgewärmtem $2\times$ SSC, 0.5% SDS bei 65°C in einem Hybridisierungsofen unter konstanter Rotation inkubiert. Die Prähybridisierung wurde 2 Stunden bei 65°C mit $0,1 \text{ ml/cm}^2$ Membran Prähyb-Mix ($5\times$ Denhardt's Lösung, $5\times$ SSPE, 0,5% SDS, $100 \mu\text{g/ml}$ Hering-Testis-DNA (Sigma, Nr. D6898); $100\times$ Denhardt's Lösung (2% (w/v) Ficoll 400, 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon, 2% (w/v) Kälberserum (Sigma, Fraktion V); $20\times$ SSPE (3 M NaCl, 0,2 M NaH_2PO_4 , 20 mM EDTA, pH 7.0)) durchgeführt. Dann wurde zu frischem, vorgewärmtem Prähyb-Mix die radioaktiv markierte Sonde pipettiert (10^6 cpm/ml) und über Nacht bei 65°C unter Rotation hybridisiert. Am nächsten Tag folgten zwei jeweils 30 minütige Waschschrte mit vorgewärmtem $2\times$ SSC, 0.5% SDS bei 65°C , dann wurde ein letztes Mal mit vorgewärmten $0,1\times$ SSC, 0,5% SDS gewaschen und die Membran an der Luft getrocknet. Die Membran wurde dann auf Whatman-Papier mit Klebestreifen fixiert, in Frischhaltefolie eingeschlagen und in einer lichtundurchlässigen Kassette platziert. Es wurde ein Röntgenfilm (Biomax MR Film, Kodak) aufgelegt und bei -80°C für 4 – 8 Tage belichtet, dann mit einer Curix 60 Entwicklermaschine (Agfa) entwickelt.

2.2.14. Generation und radioaktive Markierung der Southern-Proben

Sequenzen in der Größenordnung von 500 Basenpaaren wurden 5' und 3' außerhalb der homologen Arme ausgewählt und im BLAST Programm geprüft. Wichtig hierbei ist das Deaktivieren der automatischen Maskierung und Ausfilterung von repetitiven Elementen (zu finden unter dem Menüpunkt "Algorithm Parameters"). Für die passenden Regionen wurden Primer generiert und die 5' und 3' Proben von der PAC – DNA amplifiziert. Die über Säulen aufgereinigten Proben wurden dann mit dem Rediprime II Random Prime Labelling Kit (GE Healthcare) unter Verwendung von [α - 32 P]-dCTP (PerkinElmer) gemäß den Herstellervorgaben markiert. Nach der Markierungsreaktion wurden die Proben über Probe-Quant G-50 Sephadex Micro Columns (GE Healthcare) aufgereinigt und die radioaktive Markierungseffizienz mit einem LS1701 Scintillation Counter (BeckMan) gemessen. Proben mit mehr als 600 000 cpm/ μ l wurden eingesetzt.

2.2.15. Generation von chimären Mäusen und Keimbahntransmission

Drei der im Southern-Blot als positiv identifizierten ES-Zell Klone wurden mit CD1[®]/ICR Embryonen im Morula-Stadium aggregiert. Die Embryonen wurden bis zum Blastozystenstadium im Brutschrank inkubiert und in die Ovidukte von scheinsschwangeren Weibchen implantiert. Die Aggregation wurde von Ulrich Franke (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie) durchgeführt. Männliche Nachkommen mit einem Chimärismus von 70% wurden mit CD1[®] Weibchen weiterverpaart und Keimbahntransmission anhand der dunklen Fellfarbe der Jungen überprüft. Dunkle Tiere wurden mit DNA aus Schwanzbiopsien genotypisiert. Die *Tipt*^{fl/+} Tiere wurden mit CMV-Cre Mäusen weiterverpaart um heterozygote Tiere zu generieren.

2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.3.1. Erstellung von Testis-Proteinextrakten

Ein Testikel wurde isoliert und zu 1 ml RIPA-Puffer (50 mM Tris (pH 7,4), 50 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 mM EDTA, 0,25 % NaDoc) unter Zugabe von Proteinase-Inhibitor Cocktail (1:50, Roche) in ein Eppendorfgefäß gegeben. Die Testes wurden mit einer Präparierschere grob im Puffer zerkleinert, dann mit einer 1 ml Einwegspritze unter Verwendung von einer 21G

Kanüle auf und ab durch die Nadel gepresst. Die zerkleinerten Gewebe wurden unter Wiederholung des Vorganges mit einer 27G Kanüle homogenisiert. Das Eppendorfgefäß wurde 10 Minuten bei 4°C und 13000 RPM zentrifugiert und das unlösliche Pellet verworfen. Der Überstand wurde bei -80°C eingefroren.

2.3.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS Gele wurden mit dem Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell (BIORAD) System gegossen. Alle Komponenten wurden vor der Benutzung gründlich gereinigt, dann wurden die Teile gemäß den Herstellerangaben assembliert. Das Trenngel wurde zwischen die Glasplatten gegossen und sofort mit 500 µl Isopropanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren des Gels wurde das Isopropanol mit Whatman-Papier aufgesaugt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Sofort wurde der Kamm aufgesteckt. Tabelle X zeigt die verschiedenen Mischverhältnisse je nach benötigtem Gel.

Die Gele wurden im Blotting-Tank arretiert und dieser mit Elektrophoresepuffer (12,5 mM Tris, 96 mM Glycin, 0,05% SDS) befüllt. Mit einer Hamilton Microliter Spritze wurden die Taschen ausgespült. Die Proben wurden mit 6x Protein-Ladepuffer versetzt (350 mM Tris (pH 6,8), 30% Glycerol, 0,012% Bromphenolblau, 0,6 M DTT, 10% SDS) und vor dem Beladen des Gels für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Neben den Proben wurden auch jeweils 10 µl des „Invitrogen Benchmark“ Proteingrößenstandards geladen. Pro Gel wurden 20 mA zur Elektrophorese verwendet.

Trenngel	7,5%	10%	12%	15%		Sammelgel	
4x Trenngelpuffer	2,5	2,5	2,5	2,5	ml	4x Sammelgelpuffer	1,3 ml
Acrylamid 30%	2,5	3,3	4,0	5,0	ml	Acrylamid 30%	0,8 ml
ddH ₂ O	4,9	4,1	3,9	2,4	ml	ddH ₂ O	2,9 ml
APS 10%	100	100	100	100	µl	APS 10%	30 µl
TEMED	20	20	20	20	µl	TEMED	10 µl

Tabelle 5: Die verschiedenen Mischungsverhältnisse von SDS Gelen. Die Volumina von 4x Trenngelpuffer (1,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 8,8) sowie Ammonium Persulfat (APS, 10% (w/v)) und TEMED (Fluka, Buchs, Schweiz) bleiben dabei konstant. Das Sammelgel wird immer gleich gegossen (4x Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 6,8). Angaben für jeweils zwei Gele.

2.3.3. Western Blot Analyse

Zum Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran wurde die Methode des Western Blot angewendet (Burnette, 1981; Kyhse-Andersen, 1984). Es wurde in einem mit Transferpuffer (3,9 mM Glycerine, 48 mM Tris, 0,037% SDS, 20% Methanol) gefüllten Tank unter Anlegung eines elektrischen Feldes geblottet. Alle Komponenten zum Proteintransfer wurden vorher gründlich in Transferpuffer durchtränkt, um die Assemblierung zu erleichtern und Blasenbildung zu vermeiden. Vom SDS-Gel wurde zunächst das Sammelgel entfernt. Die Blot-Kassette wurde geöffnet und zwei Lagen Whatman®-Papier auf einen der beiden enthaltenen Schwämme gelegt. Das Gel wurde blasenfrei auf dem Whatman-Papier positioniert und eine passgenaue Nitrocellulosemembran auf dem Gel platziert, darüber zwei weitere Lagen Whatman-Papier. Mit einer 25 ml Pipette wurden durch Rollbewegungen über die Blotschichten unter leichtem Druck die Luftblasen entfernt. Ein weiterer Schwamm wurde über dem Aufbau platziert, die Kassette verschlossen und in den Blot-Tank inseriert. Dabei war stets die Gelseite zur Anode, die Membranseite zu Katode orientiert. Dann wurde der Kühlblock in dem Tank platziert und der Transfer für eine Stunde bei 100 V ausgeführt.

2.3.4. Ponceau-Färbung der Proteine

Um die Effizienz des Proteintransfers, eventuelle Blasenbildung und die Proteinmengen auf der Membran zu kontrollieren, wurde nach dem Blot die Membran für einige Sekunden in Ponceau S (2% (w/v) Ponceau S in 30% (w/v) Trichloressigsäure und 30% (w/v) Salicylsulfonsäure (2-Hydroxy-5-sulfobenzoesäure)) angefärbt und dann mit PBT Puffer (PBS, 0,1% Tween-20) entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich auf der Membran zu erkennen waren. Danach wurde die Färbung mit PBT auf einem Wippschüttler weitgehend abgewaschen.

2.3.5. Behandlung der Membran mit primären und sekundären Antikörpern

Die Membran wurde mit Blocklösung (5% Milch/PBS/0,1% Tween-20) für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler geblockt. Dann wurde der Primärantikörper in frischer Blocklösung in der entsprechenden Verdünnung hinzu gegeben und über Nacht auf einem Wippschüttler bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für jeweils fünf Minuten mit PBT gewaschen und der Sekundärantikörper in Blocklösung auf die

Membran gegeben. Die Inkubationszeit war eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler, dann wurde die Membran wieder dreimal mit PBT gewaschen. Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Primärantikörper	Firma/Referenz	Spezies	Konzentration	Anwendung
TIPT	Pitulescu et al., 2009	Kaninchen	1:500	WB, IHC
Geminis (FL-209)	Santa Cruz sc-13015	Kaninchen	1:200	WB, IHC
TBP	von M. Teichmann	Kaninchen	1:500	WB
AF10	Abcam ab16968	Maus	1:400	WB
HP1gamma	Millipore MAB3450	Maus	1:800	WB
PCNA (P-10)	Santa Cruz sc-56	Maus	1:200	WB
H3K9me(3)	Abcam ab8898	Kaninchen	1:500	IHC
H3	Abcam ab1791	Kaninchen	1:800	IHC
Tubulin	SIGMA T9026	Maus	1:2000	WB
SCP3	Abcam ab15093	Kaninchen	1:500	IHC

Sekundärantikörper	Firma/Referenz	Spezies	Konzentration	Anwendung
anti-Kaninchen (HRP)	Abcam ab6741	Ziege	1:5000	WB
anti-Maus (HRP)	Jackson Immuno Research #115-035-003	Ziege	1:10000	WB
anti-Kaninchen (Alexa 488)	Invitrogen Alexa Fluor 488	Ziege	1:1000	IHC
anti-Kaninchen (Alexa 594)	MoBiTec #A11012	Ziege	1:1000	IHC
anti-Maus (Alexa 594) IgG	Invitrogen Alexa Fluor 594	Ziege	1:1000	IHC
anti-Maus (Alexa 568) IgM	Invitrogen Alexa Fluor 568	Ziege	1:1000	IHC

Tabelle 6: Primäre und sekundäre Antikörper. Die Tabelle zeigt alle in der Arbeit verwendeten Antikörper. WB: Western Blot, ICH: Immunohistochemie. 488, 594 und 568 geben die Wellenlängen zur Exzitation des Fluorochroms an.

2.3.6. Chemilumineszente Detektion der Proteine

Die in dieser Arbeit für Western Blots verwendeten Sekundärantikörper sind an Peroxidase gebunden. Bei Behandlung der Membran mit den Flüssigkeiten des SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (Pierce, Nr. 34080) oder des SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce) wird das enthaltene Luminol durch eine von der

Peroxidase katalysierten Reaktion oxidiert und in einen angeregten Zustand versetzt. Beim Übergang in den Grundzustand sendet es eine chemische Lumineszenz aus, die von lichtempfindlichen Filmen (CL-XPosure™ Filmen, Pierce) detektiert werden kann. Die Entwicklung erfolgte mit der Curix 60 Entwicklertaschine (Agfa). Die Membranen wurden mit den Flüssigkeiten des SuperSignal Kits für 5 Minuten unter Lichausschluss inkubiert, dann in Plastikfolie eingeschlagen und in Entwicklungskassetten positioniert. In der Dunkelkammer wurden die Filme zur Detektion für variable Zeiten, je nach Signalstärke, aufgelegt.

2.4. Histologische Methoden

2.4.1. Einbetten der Gewebe in Kryomatrix

Die Testes wurden nach der Präparation aus dem Tier kurz in PBS gewaschen, dann in 4% PFA bei 4°C für 90 Minuten unter leichter Agitation fixiert. Dann wurden die Testikel mit einem Scherenschnitt in der Mitte zerteilt und weitere 60 Minuten bei 4°C nachfixiert. Die Gewebe wurden 3x 10 Minuten in PBS bei 4°C gewaschen, in 30% Sukrose (gelöst in PBS) überführt und über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Testes für 30 Minuten in einem 1:1 Gemisch aus 30% Sukroselösung und Kryomatrix (Tissue Freezing Medium® Einbettmedium, Leica) unter leichter Agitation inkubiert, dann für jeweils 2x 30 Minuten in reiner Kryomatrix geschwenkt und dann auf Trockeneis eingebettet.

2.4.2. Anfertigung von Gefrierschnitten

Die Kryomatrixblöcke mit dem eingebetteten Gewebe wurden mit einem Kryotom in 10µm dünne Sektionen geschnitten und auf Objektträger aufgezogen. Die Gewebeschnitte wurden für 20-30 Minuten auf einer Wärmeplatte bei 32°C getrocknet und bei -20°C oder -80°C gelagert.

2.4.3. Immunfluoreszenzfärbung auf Gefrierschnitten

Die Gewebeschnitte auf den Objektträgern wurden mit dem „ImmEdge™ Pen“ - Fettstift (Vector Laboratories) umrandet, welcher kurz bei Raumtemperatur getrocknet wurde. Die

Objektträger wurden dreimal für jeweils 5 Minuten in PBS gewaschen und mit Blockierungslösung (PBS, 0,1% Triton-X-100, 10% FCS) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Flüssigkeit vom Objektträger abgesaugt und der Primärantikörper, verdünnt in Blockierungslösung, auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte immer über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Am nächsten Tag wurde dreimal jeweils fünf Minuten mit PBS gewaschen und 45 Minuten mit Sekundärantikörper, verdünnt in Blockierungslösung, bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem, dreimaligem Waschen in PBS (jeweils fünf Minuten) wurde ein Tropfen Vectashield® Mounting Medium mit 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, Vector Laboratories) auf die Schnitte gegeben und diese mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Ränder wurden mit farblosem Nagellack versiegelt, um ein schnelles Austrocknen der Gewebe zu verhindern. Die Aufnahmen wurden mit einem BX-60 Fluoreszenzmikroskop und der Cell[^]P Software (beides Olympus), sowie mit dem Leica TCS SP5 Konfokalen Mikroskop und der Leica LAS AF Software gemacht.

2.4.4. ABC Färbung auf Gefrierschnitten

Die Färbung von Gefrierschnitten wurde nach den Anweisungen des Herstellers mit dem ABC-Färbesystem der Firma Santa Cruz für Primärantikörper aus dem Kaninchen (Artikelnummer sc-2018) durchgeführt. Hierbei wurde der erste optionale Schritt im Herstellerprotokoll, das Inkubieren der Schnitte in Wasserstoffperoxidlösung, Wasser oder Methanol zur Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität, vernachlässigt.

Zusammenfassend wurden die Schnitte mit Fettstift umrandet, eine Stunde in 1,5% Blockierungslösung behandelt, und dann über Nacht mit dem Primärantikörper in Blockierungslösung bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 Minuten in PBS wurde der Sekundärantikörper auf die Schnitte gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem erneuten, dreimaligen Waschen in PBS (5 Minuten jeweils) wurde das Peroxidase-Substrat auf die Schnitte gegeben und bis zur gewünschten Signalstärke bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden die Objektträger in Wasser gewaschen, um die Färbereaktion zu stoppen. Die Schnitte wurden in Mowiol® 4-88 (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland) eingebettet.

2.4.5. Alkaline Phosphatase Färbung

Zum Nachweis der humanen, plazentalen alkalischen Phosphatase in murinen Geweben wurden die E14,5 Embryonen und Testisgefrierschnitte für 90 Minuten in frischem AP-Fixativ (50 ml 4% PFA, 800 µl 25% Glutaraldehyd, 200 µl 10% NP-40, 1 ml 1% Natriumdesoxycholat in 100 ml PBS) auf Eis fixiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS für jeweils 5 Minuten wurden die Proben bei 72°C für 30 Minuten inkubiert um die endogene Peroxidase zu inhibieren. Danach wurden die Embryonen und Schnitte zum Abkühlen einmal für 5 Minuten in PBS, danach viermal in frisch angesetztem NTMT Puffer (100 mM Tris/HCl (pH 9, 5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl, 0,1% Tween 20, 2 mM Levamisol, finaler pH Wert \geq 9, 4) gewaschen. Über Nacht wurden die Proben bei 4°C unter leichter Agitation in NBT/BCIP Lösung (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland) gefärbt. Die Proben wurden dabei vor Lichteinfall geschützt. Die Färbung wurde am nächsten Tag mit Stop-Puffer (PBS, 0, 1 % Tween-20, 2 mM MgCl₂) beendet.

2.4.6. Einbetten der Gewebe in Paraffin

Die Testes wurden nach der Präparation aus dem Tier kurz in PBS gewaschen und dann über Nacht in 4% PFA bei 4°C fixiert. Am nächsten Tag wurde das PFA in drei Waschschritten mit PBS ausgewaschen, jeweils eine Stunde. Die Salzkristalle wurden anschließend dreimal jeweils eine Stunde mit 0,86% NaCl ausgewaschen. Es folgte die Dehydrierung über eine aufsteigende Alkoholreihe bei 4°C. Hierzu wurden die Gewebe zweimal 15 Minuten in 50% Ethanol geschwenkt, dann zweimal 15 Minuten in 70% Ethanol, gefolgt von dreimal 20 Minuten in 80% Ethanol, dreimal 30 Minuten in 90% Ethanol, viermal 30 Minuten in 96% Ethanol, fünfmal 20 Minuten 100% Ethanol und abschließend über Nacht in Isopropanol. Am nächsten Tag folgte die Infiltration des Gewebes bei Raumtemperatur. Hierzu wurden die Proben für 30 Minuten in 25% Toluol : 75% Isopropanol geschwenkt, dann 30 Minuten in 50% Toluol : 50% Isopropanol, gefolgt von 30 Minuten in 75% Toluol : 25% Isopropanol. Es folgte das Schwenken der Proben in 100% Toluol, dreimal jeweils eine Stunde, und eine dreitägige Inkubation in Paraffin bei 60°C, wobei das Paraffin täglich gewechselt wurde. Die Proben wurden dann in Plastikformen in Paraffin eingebettet und bei 4°C bis zur weiteren Prozessierung aufbewahrt.

2.4.7. Anfertigung von Paraffinschnitten

Die in Paraffin eingebetteten Testes wurden mit einem Mikrotom in 10 µm dicke Schnitte geschnitten und in einem handwarmen Wasserbad gestreckt. Die Schnitte wurden auf Objekträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet, dann bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.4.8. Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung von Paraffin- und Kryoschnitten

Benutzt wurde fertige Hämatoxylinlösung nach Harris (Sigma HHS16), welche vor Gebrauch filtriert wurde. Zur Erstellung einer Eosin Stammlösung wurde 1 Gramm Eosin in 100 ml H₂O gelöst und filtriert. Die Eosin Gebrauchslösung wurde erstellt, indem 50 ml der Stammlösung mit 450 ml H₂O gemischt wurden und 150 µl konzentrierte Essigsäure hinzu gegeben wurde. Paraffinschnitte wurden nach folgendem Protokoll gefärbt:

Schritt	Reagenz	Zeit
1	Histoclear	5 Minuten
2	Histoclear	5 Minuten
3	Histoclear	3 Minuten
4	100% Ethanol	4 Minuten
5	90% Ethanol	4 Minuten
6	70% Ethanol	4 Minuten
7	50% Ethanol	4 Minuten
8	Wasser	2 Minuten
9	Hämatoxylin	10 Minuten
10	Wasser	3 Minuten
11	Wasser	3 Minuten
12	Wasser	2 Minuten
13	HCl-Alkohol	12 Sekunden
14	Wasser	1 Minuten
15	Wasser	7 Minuten
16	Eosin	5 Minuten
17	50% Ethanol	40 Sekunden
18	70% Ethanol	1 Minuten
19	90% Ethanol	2 Minuten
20	100% Ethanol	2 Minuten
21	100% Ethanol	2 Minuten
22	Histoclear	3 Minuten
23	Histoclear	3 Minuten
24	Histoclear	2 Minuten

Tabelle 7: Protokoll für die HE-Färbung von Paraffinschnitten.

Schritt	Reagenz	Zeit
1	4% PFA	5 Minuten
2	PBS	5 Minuten
3	PBS	5 Minuten
4	Wasser	2 Minuten
5	Hämatoxylin	8 Minuten
6	Wasser	3 Minuten
7	Wasser	3 Minuten
8	Wasser	2 Minuten
9	HCl-Alkohol	7 Sekunden
10	Wasser	1 Minuten
11	Wasser	7 Minuten
12	Eosin	5 Minuten
13	50% Ethanol	40 Sekunden
14	70% Ethanol	1 Minuten
15	90% Ethanol	2 Minuten
16	100% Ethanol	2 Minuten
17	100% Ethanol	2 Minuten

Tabelle 8: Protokoll für die HE-Färbung von Kryoschnitten.

Paraffin- und Kryoschnitte wurden mit Eukitt[®] Einbettungsmedium (Kindler) und einem Deckgläschen bedeckt und über Nacht unter dem Abzug getrocknet.

2.4.9. TUNEL-Test

Zur Detektion von apoptotischen Zellen auf Gewebeschnitten wurde der TUNEL – Test (engl. „*Terminal deoxynucleotidyltransferase - mediated dUTP - biotin nick end labeling*“) angewandt. Diese Methode ermöglicht das Visualisieren von fragmentierter DNA durch die Markierung der freien 3'-OH Termini mit modifizierten Nukleotiden in apoptotischen Zellen. Es wurde das ApopTag[®] Red In Situ Apoptosis Detection Kit (CHEMICON[®] International) nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. Die Schnitte auf den Objektträgern wurden zum Abschluss mit einem Tropfen Vectashield[®] Mounting Medium inklusive DAPI (Vector Laboratories) versehen, mit einem Deckgläschen abgedeckt und mit farblosem Nagellack versiegelt. Die Visualisierung erfolgte mit einem BX-60 Fluoreszenzmikroskop (Olympus) und der cell[^]P Software (Olympus).

2.5. Analyse der Mauslinien

2.5.1. Tamoxifeninjektion

100 mg Tamoxifen (T5648, Sigma-Aldrich) wurden in 10 ml Maiskeimöl (C8267, Sigma-Aldrich) bei 37°C unter ständiger Invertierung und lichtgeschützt gelöst. Bei adulten Mäusen wurden 100 µl pro 10 Gramm Körpergewicht intraperitoneal injiziert, bei neugeborenen Tieren 50 µl pro Tag und Tier.

2.5.2. Spermienzahlbestimmung und Motilitätsanalyse

Die Spermienzahlbestimmung wurde mit geringen Änderungen durchgeführt wie von Burnicka-Turek et al. beschrieben (Burnicka-Turek et al., 2009). Zusammenfassend wurde die Cauda Epididymis aus den Wildtyp- und Mutanten-Tieren entnommen und in 400 µl *in vitro* Fertilisationsmedium (Medicult) mit einer Kanüle punktiert. Die Spermatozoen wurden für 20 Minuten bei 37°C ausschwimmen gelassen, dann eine Probe 1:10 verdünnt und in einer Neubauer Kammer gezählt.

Zur Motilitätsanalyse wurden die Spermatozoen nach dem Ausschwimmen 90 Minuten in IVF Medium bei 37°C inkubiert. 13 µl der Spermatozoen-Suspension wurde in einer Einweg-Zählkammer transferiert und die Spermienmotilität bei 37°C mit dem "computer-assisted semen analysis system (CEROS version 10; Hamilton Thorne Research, Beverly, MA) analysiert. Die Rohdaten wurden mit dem Programm „Statistica“ (StatSoft) ausgewertet und graphisch dargestellt. Die Arbeiten wurden zusammen mit Janine Ulrich und Dr. Adham am Institut für Humangenetik, Göttingen, durchgeführt.

2.5.3. Ultrastrukturanalyse

Für die Ultrastrukturanalyse der Spermatozoen wurden die Epididymis von adulten *Tipt*^{+/+} und *Tipt*^{-/-} Tieren entnommen, kurz in PBS gewaschen und dann über Nacht bei 4°C in Fixativ inkubiert (2,5% Glutaraldehyd, 0,1 M Kakodylat-Puffer, pH 7,5). Die weitere Prozessierung der Proben wurde durchgeführt wie beschrieben (Riedel et al., 2002). Zusammenfassend wurden die Proben am nächsten Tag drei mal jeweils fünf Minuten in Kakodylat-Puffer gewaschen, in 1% OsO₄ für eine Stunde auf Eis inkubiert, mehrfach mit H₂O gewaschen und in 1% Uranylacetat für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln kontrastiert. Dann erfolgte die Dehydrierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe. Die

Gewebe wurden jeweils fünf Minuten zweimal in 30%, 50%, 70%, 100% Ethanol dehydriert, gefolgt von zwei Inkubationen für 10 Minuten in 100% Ethanol. Dann wurden die Proben zweimal für 5 Minuten in Propylenoxid, 30 Minuten in einem 1:1 v/v Gemisch von Propylenoxid und Epon inkubiert, und letztlich über Nacht in Epon bei Raumtemperatur eingebettet.

Mit einem Ultramikrotom wurden 90 nm Ultradünnschnitte angefertigt, mit 2% Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert und mit einem CM120 Philips Elektronenmikroskop sowie einer TemCam 224A CCD Kamera (TVIPS, Gauting, Germany) analysiert. Die Ultrastrukturanalyse wurde zusammen mit Dr. Riedel (Abteilung Elektronenmikroskopie, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie) durchgeführt.

2.5.4. Modifizierte Quetschpräparate von Tubuli seminiferi

Die modifizierte Quetschmethode wurde ausgeführt wie beschrieben (Kotaja et al., 2004). Tubuli seminiferi wurden in PBS aus den Testes präpariert und unter einem Stereomikroskop in kleine Stücke von 0,5 mm Länge geschnitten. Einzelne Tubuli - Stücke wurden mit einer Pipette aufgenommen und in einen 15 µl Tropfen Sukrose (100 mM) überführt. In diesem wurden die Tubuli seminiferi ruptiert und die Keimzellen aus dem Inneren durch auf- und abpipettieren in der Sukrose verteilt. Der Sukrosetropfen wurde aufgenommen und auf einen Objektträger pipettiert, welcher vorher mit einem Fettstift in kleine Bereiche unterteilt und mit 10 µl 1% PFA / 0, 15% Triton-X Lösung pro Parzelle vorbereitet war. Die Keimzellen wurden in die Fixierungslösung pipettiert und in einer feuchten Kammer auf dem Objektträger angetrocknet. Anschließend wurden die Proben direkt in einer Antikörperfärbung weiterverarbeitet.

2.5.5. Akridinorange-Färbung der Spermatozoen

Es wurde die modifizierte Rigler-Roschlau-Methode angewandt wie bereits beschrieben (Conrad et al., 2005; Erenpreiss et al., 2001). Bei dieser Methode werden die Spermatozoen kurz in HCl denaturiert und danach mit dem Farbstoff Akridinorange angefärbt. Bei vollständig kondensiertem Chromatin bleibt die DNA intakt, der Akridinorange-Farbstoff interkaliert als Monomer in die DNA und emittiert nach Anregung durch UV Strahlung ein grün-gelbliches Fluoreszenzsignal. Bei einer unvollständigen Kondensierung denaturiert die

DNA, der Farbstoff bindet als Aggregat an die denaturierte DNA und emittiert ein oranges Fluoreszenzsignal nach UV Anregung (Chohan et al., 2004; Erenpreiss et al., 2001).

Zusammenfassend wurden die Epididymis in PBS zerkleinert und 200 μ l der Suspension auf einen Objektträger pipettiert, dieser wurde getrocknet und in Küvetten mit 96% Ethanol-Azetongemisch (1:1) für 30 Minuten bei 4°C fixiert, dann über eine absteigende Ethanolreihe rehydriert: 96% Ethanol (5 Minuten), 70% Ethanol (5 Minuten) und 30% Ethanol für 3 Minuten bei Raumtemperatur. Die Objektträger wurden für 5 Minuten in PBS gewaschen, dann für eine Minute in 1 N HCl bei 60°C, dreimal in destilliertem Wasser für jeweils 2 Minuten gewaschen und 5 Minuten in McIlvain Phosphatpuffer (pH 4,0) inkubiert. Zum Ansetzen von 20 ml McIlvain pH 4,0 wurden 7,71 ml 0,2 M Na₂HPO₄ und 12,29 ml 0,1 M Zitronensäure gemischt. Die Färbung erfolgte dann für 15 Minuten mit Akridinorange (0.038 mg/mL; 10⁻⁴ M, Sigma-Aldrich, 235474) verdünnt in McIlvain Puffer (pH 4,0). Die Objektträger wurden dreimal für 5 Minuten mit Akridinorange (10⁻⁶ M in McIlvain Puffer) gewaschen, dann in Moviol eingebettet und mit einem Deckgläschen überdeckt. Die Ränder wurden mit Nagellack versiegelt. Die Färbung wurde mit UV Licht bei 488nm visualisiert.

2.5.6. Interaktionsanalyse

Die TIPT-Interaktionsanalyse wurde mit Testis-Zellysat durchgeführt. Hierzu wurden Testikel aus adulten *Tipt*^{+/+} und *Tipt*^{-/-} Mäusen in 1 ml RIPA Puffer inklusive eines Proteinase-Inhibitor Cocktails (Roche) gegeben und mit einer Präparierschere grob zerkleinert. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt um eine Degradierung der Proteine zu vermeiden. Es wurde mit einer 21G, danach mit einer 27G Kanüle das Lysat einige Male in eine Spritze aufgezogen und somit weitgehend homogenisiert. Das Lysat wurde für 10 Minuten bei 13000 RPM abzentrifugiert und das unlösliche Pellet verworfen. Der Überstand wurde daraufhin zum „preclearing“ mit 80 μ l Protein-G Agarose Beads versetzt und für eine Stunde unter konstanter Invertierung in einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Beads wurden bei 4000 RPM für 2 Minuten abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Inkubation mit dem α TIPT Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C unter konstanter Invertierung der Eppendorfgefäße in einem Überkopfschüttler. Am nächsten Tag wurden 80 μ l Protein-G Beads hinzugegeben und für eine Stunde erneut im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Proben für zwei Minuten bei 4000 RPM abzentrifugiert, der Überstand verworfen, die Beads dreimal für fünf Minuten mit jeweils 500 μ l RIPA Puffer gewaschen und jedes Mal bei 4000 RPM für zwei

Minuten pelletiert. Die Beads wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 40 μ l Elutionspuffer (2,5 μ l 20% SDS, 5 μ l 1 M NaHCO_3 und 42,5 μ l ddH_2O) inkubiert, 2 Minuten bei 4000 RPM pelletiert und der Überstand abgenommen. Der Vorgang wurde wiederholt, sodass zwei Eluate mit jeweils 40 μ l von jeder Präzipitation vorlagen.

Die Proben wurden mit NuPage - Ladepuffer versetzt und über ein kommerzielles SDS-Gel aufgetrennt (NuPage Novex Bis-Tris Gel, 4-12% Gradient, Invitrogen), die einzelnen Spalten wurden dann in sechs Quadrate geschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse in die Abteilung Prof. Dr. Henning Urlaub gegeben. Die weitere Prozessierung der Proben wurde unter leichten Änderungen durchgeführt wie bereits beschrieben (Kühn-Hölsken, 2006; Schmidt, 2010; Shevchenko et al., 1996). Um die Proteine nach der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese massenspektrometrisch über den Peptidmassen-„Fingerabdruck“ identifizieren zu können, müssen sie erst mit Endoproteinasen im Gel hydrolysiert werden. Für diese „In-Gel-Hydrolyse“ wurden die Gelstückchen mit 150 μ l Acetonitril für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 1200 RPM dehydriert, der Überstand verworfen und die Gelstücke 5 Minuten in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Dann wurde 100 μ l DTT (10 mM in 100 mM NH_4HCO_3 , pH 8,0) hinzupipettiert und die Gelstücke 50 Minuten bei 56°C inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und nach erneuter Dehydrierung mit Acetonitril wurden die Gelstücke mit 100 μ l Iodoacetamid (55 mM in 100 mM NH_4HCO_3 , pH 8,0) für 20 Minuten bei 26°C im Dunkeln inkubiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und die Gelstücke mit 150 μ l NH_4HCO_3 (100 mM, pH 8,0) für 15 Minuten inkubiert, dann 150 μ l Acetonitril hinzupipettiert. Nach erneuter Inkubation für 15 Minuten wurde der Überstand verworfen, die Gelstücke im Vakuum getrocknet und mit einem minimalen Volumen von Hydrolysepuffer (50 mM NH_4HCO_3 , 5 mM CaCl_2 , Trypsin mit einer finalen Konzentration von 15 $\mu\text{g/ml}$) auf Eis resuspendiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Peptide wurden über eine „reversed-phase nanoflow chromatography“, gekoppelt an ein Massenspektrometer (LTQ-Orbitrap XL, Thermo Scientific), analysiert wie beschrieben (Schmidt, 2010). Die identifizierten Peptide wurden über die Mascot Datenbank abgeglichen und mit dem Programm „Scaffold 3“ weiterverarbeitet. Dazu wurden die Filter auf „abwesend in L2 und L4, anwesend in L3“ gesetzt, wobei L2 und L4 jeweils *Tipt*^{-/-} Lysate darstellen, L3 *Tipt*^{+/+} Lysat. Die Parameter für die Proteinidentifizierung wurden auf folgende Werte gesetzt: Grenzwert für Erkennungswahrscheinlichkeit = 95%, Grenzwert für erkannte einzigartige Peptide = 1, Grenzwert für Erkennungswahrscheinlichkeit der Peptide = 80%.

2.5.7. Induzierter Hitzeschock *in vitro*

Testes wurden aus den Tieren präpariert und in PBS in einem Eppendorf-Gefäß für 15 Minuten entweder auf Raumtemperatur oder im Wasserbad bei 42°C inkubiert. Die Testes wurden sofort bei 4°C in 4% PFA fixiert und wie vorher beschrieben in Kryomatrix eingebettet.

2.5.8. Testikuläre Hyperthermie *in vivo*

Adulte Mäuse wurden in einem Restrainer fixiert und mit dem unteren Körperdrittel in ein 42°C warmes Wasserbad für 15 Minuten eingetaucht. Nach der hyperthermen Induktion wurden die Tiere wieder in den Käfig entlassen und nach einer Erholungsphase von 24 Stunden getötet. Die Testes wurden entnommen und in Kryomatrix eingebettet. Die hyperthermale Behandlung wurde in enger Zusammenarbeit mit Dr. vet. med. Ulrike Teichmann durchgeführt und war im Einklang mit den deutschen Tierschutz- und Versuchstierbestimmungen.

3. Ergebnisse

3.1. TIPT und Geminin während der Spermatogenese in der Maus

3.1.1. Expression von TIPT während der murinen Spermatogenese

Tipt und *Geminin* sind hochgradig exprimierte Gene während der Spermatogenese (Brancorsini et al., 2008; Eward et al., 2004; Pitulescu et al., 2009). Um die exprimierenden Zellpopulationen im murinen Testisgewebe exakt zu identifizieren, wurden immunhistochemische Analysen auf testikulären Gefrierschnitten durchgeführt.

Abbildung 8 zeigt die Expression von TIPT in primären Spermatozyten sowie runden und elongierenden Spermatiden. Die Expressionsstärke ist am höchsten im Zytoplasma der elongierenden Spermatiden (Abb. 8C und D) und in späten pachytänen sowie diplotänen Spermatozyten (Abb. 8B), in runden Spermatiden etwas niedriger. Ein schwächeres Signal kann jedoch auch im Zytoplasma und Nukleus der runden Spermatiden detektiert werden (Abb. 8D). Im Flagellum ist ebenfalls ein Signal für TIPT zu erkennen (Abbildung 9). In den spermatogonischen Zellen im basalen Kompartiment ist TIPT nicht exprimiert.

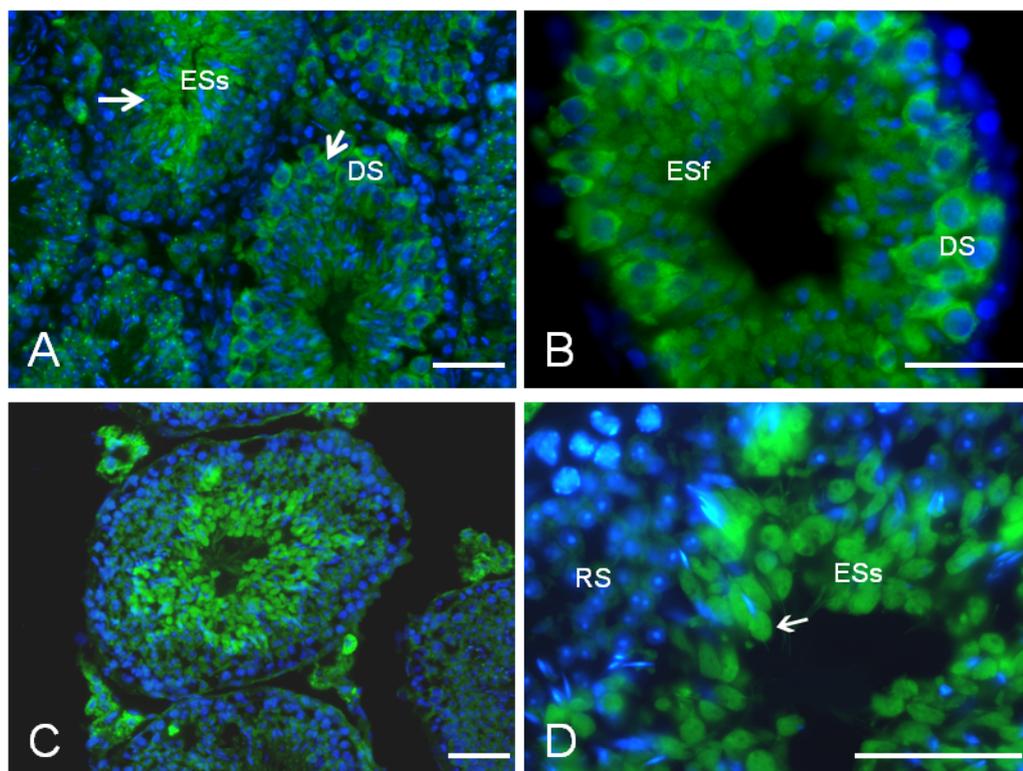


Abbildung 8: TIPT Expression im adulten, murinen Testis. Gefrierschnittpräparate mit TIPT - (grün) und DAPI - Kernfärbung (blau). TIPT wird nicht im basalen Kompartiment, jedoch in allen nachfolgenden Keimzellpopulationen exprimiert. **A:** Übersichtsdarstellung

von adulten Testis. TIPT ist besonders hoch in pachytänen und diplotänen Spermatozyten sowie elongierenden Spermatiden exprimiert (Pfeile). **B:** Vergrößerte Darstellung von primären Spermatozyten und frühen, elongierenden Spermatiden (Stadium IX). **C und D:** TIPT Expression in elongierenden Spermatiden. TIPT ist besonders hoch im Zytoplasma der späten Spermatidenstadien exprimiert (Pfeil), in runden Spermatiden dagegen schwächer, sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär. ESs: späte, elongierende Spermatiden, ESf: frühe elongierende Spermatiden, RS: runde Spermatiden, DS: diplotäne Spermatozyten. Maßstab: 50 μm

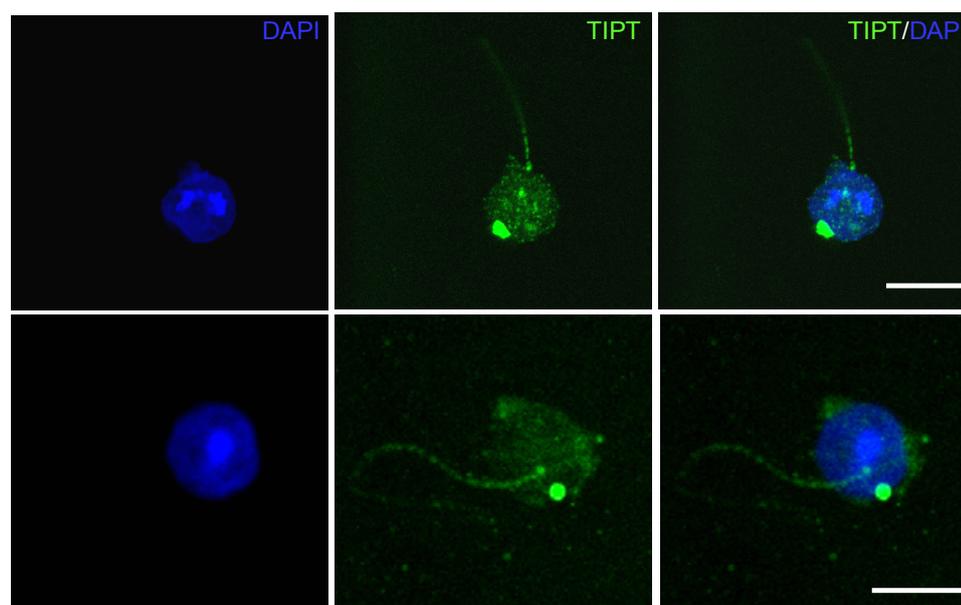


Abbildung 9: TIPT Färbung in Spermatiden. TIPT (grün) lokalisiert mit perinukleären und flagellaren Strukturen in maturierenden Spermatiden. TIPT ist auch im Nukleoplasma detektierbar. Maßstab: 5 μm

3.1.2. Expression von Geminin während der murinen Spermatogenese

Geminin wird in prämeiotischen und meiotischen Spermatozyten exprimiert. Auch einige Zellen im basalen, spermatogonischen Kompartiment exprimieren Geminin (Abbildung 10A). Es ist kein Signal in postmeiotischen Zellen, den runden und elongierenden Spermatiden sowie maturierten Spermatozoa detektierbar (Abb. 10A, B, C). Die subzelluläre Lokalisation von Geminin ist in den frühen, prämeiotischen Keimzellen sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär (Abb. 10A), in diplotänen Spermatozyten verstärkt zytoplasmatisch (Abb. 10B). Während der meiotischen Teilung ist das Protein in der gesamten Zelle detektierbar (Abb. 10C). Geminin und TIPT sind beide im Zytoplasma diplotäner Spermatozyten koexprimiert, wie auf sequentiellen Schnitten zu erkennen ist (Abb. 11). Ein simultanes Detektieren beider

Proteine auf dem gleichen Gefrierschnitt ist nicht möglich, da beide Antikörper in der gleichen Spezies generiert wurden.

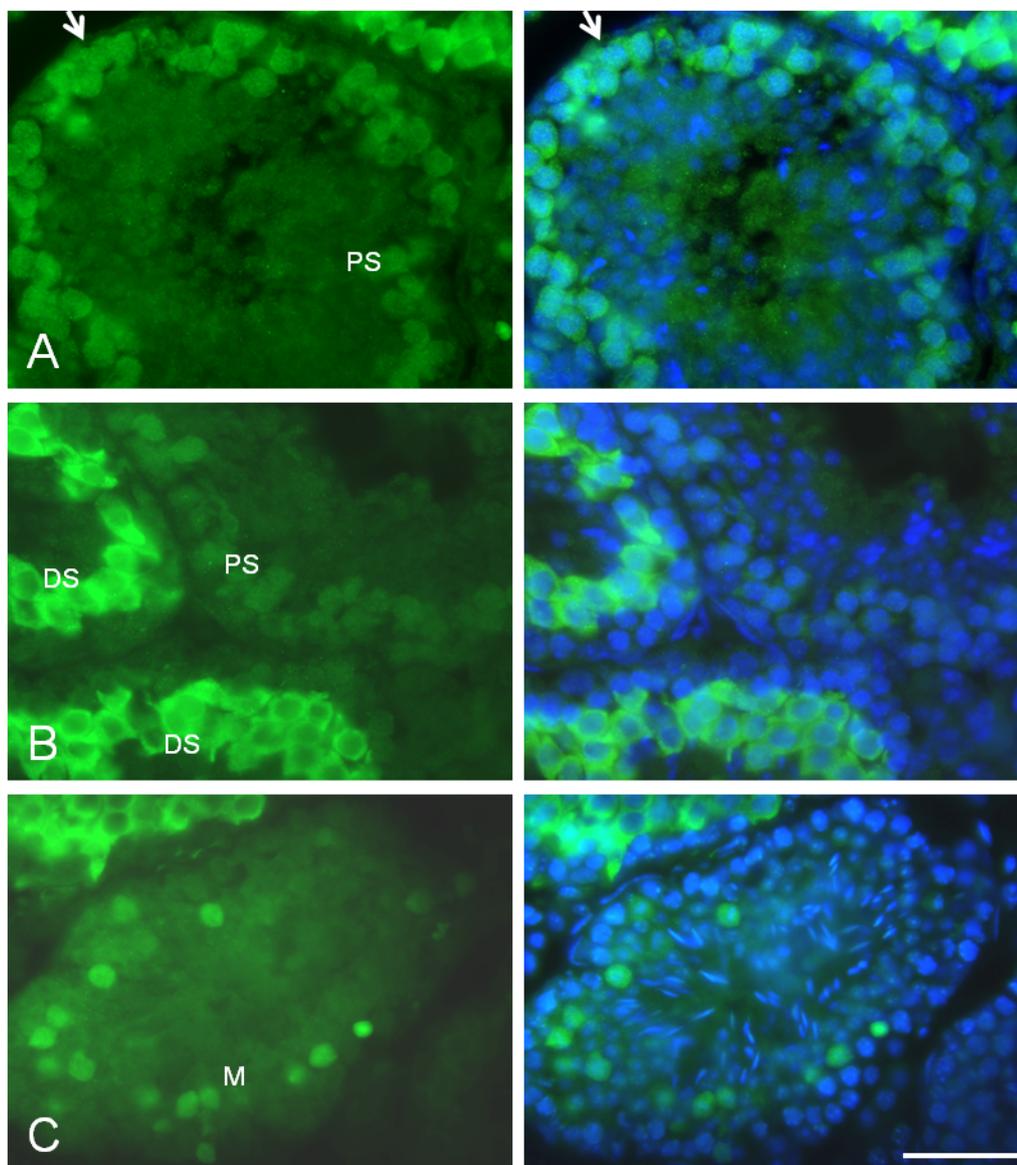


Abbildung 10: Geminin Expression während der Spermatogenese. A: pachytäne Spermatozyten weisen ein nukleäres und zytoplasmatisches Geminin-Signal auf. Vereinzelt sind auch Zellen im basalen, spermatogonischen Kompartiment der Tubuli seminiferi positiv für Geminin (Pfeil). B: Diplotäne Spermatozyten zeigen ein starkes, zytoplasmatisches Signal, während pachytäne Zellen im angrenzenden Tubulus ein schwaches Signal in Nukleus und Zytoplasma zeigen. C: Geminin ist in meiotischen Keimzellen in der gesamten Zelle detektierbar. Postmeiotische Zellen exprimieren kein Geminin. PS: pachytäne Spermatozyten, DS: diplotäne Spermatozyten, M: meiotische Zellen. Maßstab: 50 μm

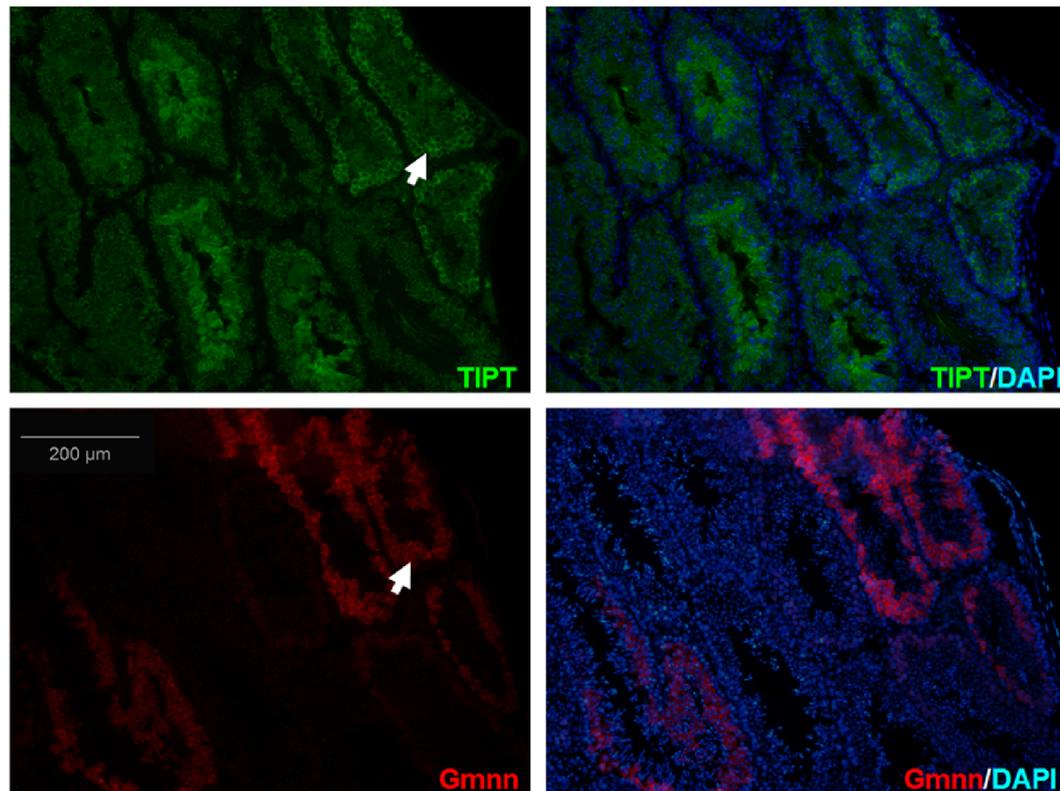


Abbildung 11: TIPT und Geminin werden in prämeiotischen Spermatozyten koexprimiert. Sequentielle Schnitte von adulten Testes. Die Pfeile zeigen auf doppelt positive Zellen (diplotäne Spermatozyten). Im Gegensatz dazu sind die elongierenden Spermatiden nur positiv für TIPT. Maßstab: 200 µm

3.2. Generierung von Mäusen mit testisspezifischer Geminin–Deletion mittels der Stra8-Cre Linie

Die Expression von Geminin ist besonders in prämeiotischen und meiotischen Spermatozyten sehr hoch. Da dies auf eine Funktion von Geminin während der meiotischen Teilung der Keimzellen hindeutet, war ein Ziel der vorliegenden Arbeit, eine testisspezifische Geminin Knockout Mauslinie zu generieren. Die verwendeten Mauslinien waren zum einen die in unserer Gruppe generierte *Gmnn*^{fl/fl} – Linie (Uerlings, 2008) und zum anderen eine testisspezifische Cre-Linie, welche Cre-Rekombinase unter dem Promoter des Stra8-Gens exprimiert. Diese Cre-Linie wurde in der Abteilung Humangenetik der Universität Göttingen, Prof. Dr. Dr. W. Engel, generiert (Nolte et al., unveröffentlicht) und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Um die Expression der Cre-Rekombinase zu charakterisieren, wurde die Linie mit einer Z/AP-Reporterlinie verpaart (Lobe et al., 1999). Diese Mäuse exprimieren nach Rekombination die humane, plazentale, alkaline Phosphatase unter dem Huhn-β-Actin Promoter und lassen somit nach dem Anfärben der Gewebe mit NBT/BCIP eine Analyse der Expression von Cre-Rekombinase auf zellulärer Ebene zu.

3.2.1. Analyse der Stra8-Cre Expression mittels Z/AP - Reporter-mäusen

Um zu analysieren, ob eine früh embryonale Expression von Stra8-Cre stattfindet, was bei den *Gmnn*^{fl/fl} Tieren in einer embryonalen Letalität resultieren würde, wurde die Z/AP-Reporterlinie in die Stra8-Cre Linie eingekreuzt und ein Wurf im Stadium E14,5 präpariert und gefärbt. Jeweils eine embryonale Extremitätenknospe wurde zur DNA-Präparation und Genotypisierung verwendet. Im Falle einer frühen Cre-Expression sollten Embryonen ganz oder teilweise gefärbt auftreten. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 12). Bei 2 von 5 doppelt transgenen Embryos war jedoch ein punktuell Muster gefärbter Zellen zu beobachten. Die markierten Zellen scheinen von der Region des Neuralrohres aus migriert zu sein, ein Muster, welches auf Neuralleistenzellen schließen lässt. Die Zellen, vermutlich Melanozyten, sind ausschließlich in der Dermis lokalisiert. Da dieses Expressionsmuster jedoch nicht auf eine frühe, globale Expression hindeutet, wurde die Arbeit mit der Stra8-Cre Linie fortgesetzt.

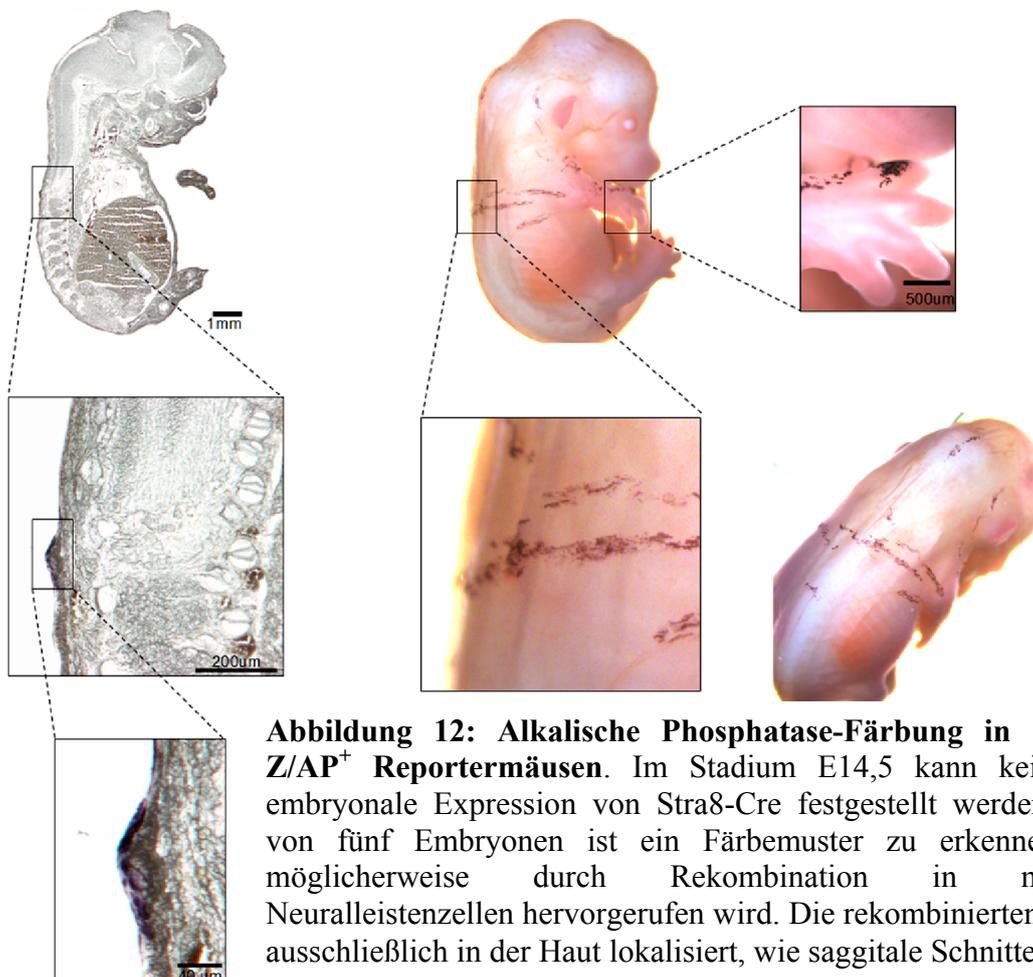


Abbildung 12: Alkalische Phosphatase-Färbung in Stra8-Cre⁺; Z/AP⁺ Reporter-mäusen. Im Stadium E14,5 kann keine globale, embryonale Expression von Stra8-Cre festgestellt werden. Bei zwei von fünf Embryonen ist ein Färbemuster zu erkennen, welches möglicherweise durch Rekombination in migrierenden Neuralleistenzellen hervorgerufen wird. Die rekombinierten Zellen sind ausschließlich in der Haut lokalisiert, wie sagittale Schnitte zeigen.

Es wurde eine Analyse der Stra8-Cre Expression in Testes mittels der Z/AP-Reporterlinie vorgenommen. 6 Wochen alte, doppeltransgene Z/AP^+ , $Stra8-Cre^+$ Testis zeigten eine homogene Färbung von nahezu allen testikulären Zellen in den Tubuli seminiferi nach der alkalinen Phosphatase Färbereaktion (Abbildung 13). Das basale Kompartiment zeigt eine schwache Färbung, ist jedoch auch positiv. Die Epididymis sind aufgrund endogener, alkalischer Phosphatase Expression positiv gefärbt (Allen and Slater, 1957). Diese Resultate bestätigten, dass die Stra8-Cre Linie geeignet für eine testisspezifische Geminin - Deletion ist. Es ist keine frühe, globale, sondern eine testisspezifische Cre-Expression zu beobachten, welche alle Keimzellpopulationen betrifft. Die Cre-Expression in Neuralleistenzellen bei zwei von fünf doppelt transgenen Reportermausen ist für eine Analyse der Testis nicht problematisch.

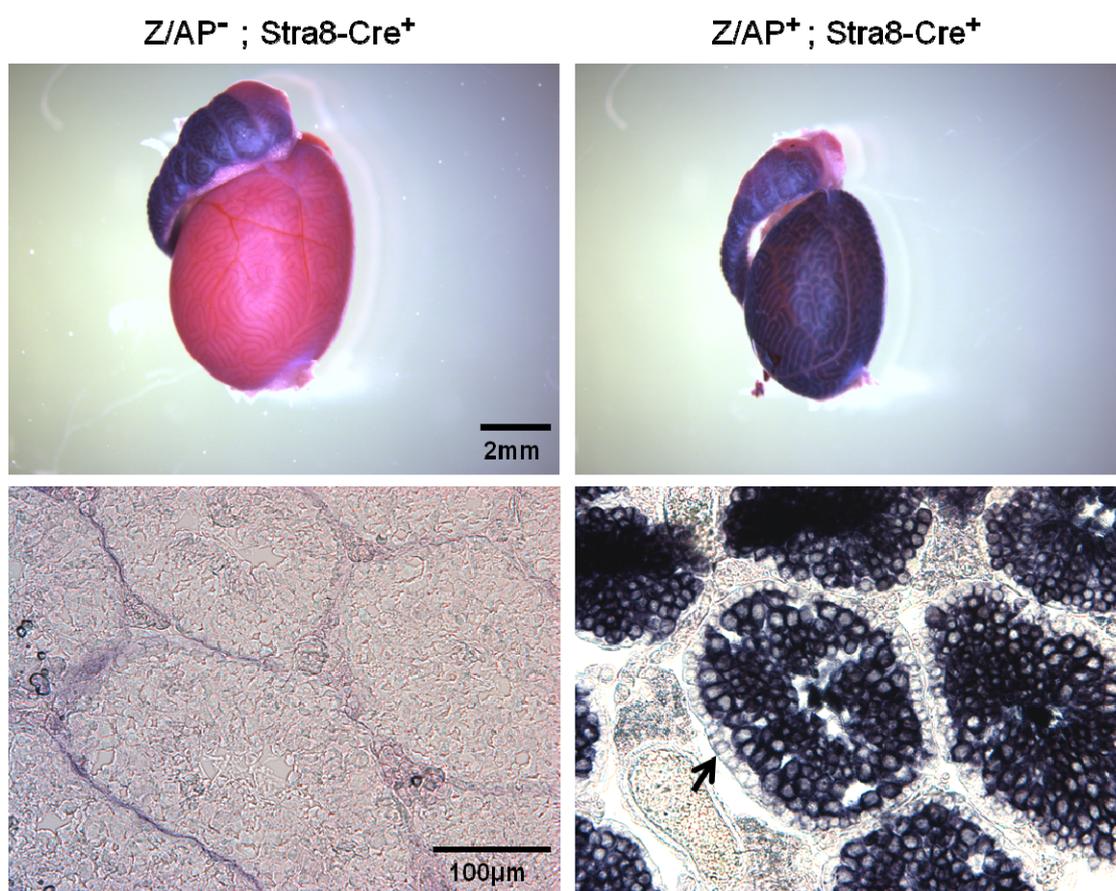


Abbildung 13: Stra8-Cre Rekombinase wird spezifisch in Testis exprimiert. Dargestellt ist die alkaline Phosphatase Färbung von Testes aus 5 Wochen alten $Stra8-Cre^+$; Z/AP^+ und $Stra8-Cre^+$; Z/AP^- Mäusen. Die Tubuli seminiferi bestehen größtenteils aus rekombinierten Zellen (blau). Die basale Zellpopulation ist in vielen Tubuli nur sehr schwach gefärbt (Pfeil).

Die Verpaarung von *Gmnn*^{fl/fl} Mäusen mit Stra8-Cre⁺ Tieren resultierte in *Gmnn*^{fl/+}; Stra8-Cre⁺ Nachkommen. Die Rekombinationseffizienz einer geflochten, genomischen Sequenz hängt von mehreren Parametern ab. Zum einen ist der Abstand der beiden loxP Motive zueinander ein entscheidender Faktor, welcher mit zunehmender Entfernung in abnehmender Rekombinationseffizienz resultiert. Weiterhin kann die Zugänglichkeit des Chromatins für Cre-Rekombinase durch Kondensation in Heterochromatin eine effiziente Rekombination verhindern. Daher wurde untersucht, ob heterozygote *Gmnn*^{fl/+}; Stra8-Cre⁺ Tiere eine testisspezifische Rekombination des Geminin-Lokus aufweisen (Abbildung 14). Durch Genotypisierung der testikulären DNA konnte gezeigt werden, dass eine Rekombination im testikulären Gewebe auftritt. Daher wurden die heterozygoten *Gmnn*^{fl/+}; Stra8-Cre⁺ Tiere mit *Gmnn*^{fl/fl} Mäusen weiterverpaart, um homozygot geflochte, Stra8-Cre positive Nachkommen zu erhalten.

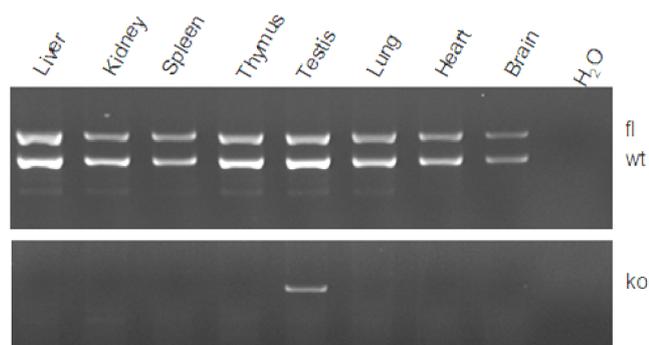


Abbildung 14: Stra8-Cre vermittelt testisspezifische Rekombination. Genotypisierung verschiedener Gewebe aus *Gmnn*^{fl/+}; Stra8-Cre⁺ Mäusen. Männliche Mäuse zeigen die Knockout-Bande nur im Hodengewebe.

Da heterozygote Tiere eine Rekombination in den Keimzellen aufweisen, kann durch eine Genotypisierung der Nachkommen eine Analyse der Rekombinationseffizienz in männlichen und weiblichen Keimzellen erfolgen. Wie in Tabelle 7 dargestellt, wird das Knockout-Allel nur von männlichen, nicht aber von weiblichen Tieren, weitergegeben. Dieses Resultat zeigt, dass Stra8-Cre ausschließlich in männlichen Keimzellen exprimiert wird. Ein geringer Prozentsatz der Nachkommen (2%) von Stra8-Cre positiven Männchen weist jedoch den Genotyp *Gmnn*^{fl/fl} auf. Dies ist auf eine unvollständige Rekombination in einigen der männlichen Keimzellen zurückzuführen und zeigt, dass die Rekombinationseffizienz nicht bei 100% liegt.

	♂: $Gmn^{fl/fl}$ X ♀: $Gmn^{fl/+};Stra8-Cre^+$	♂: $Gmn^{fl/+};Stra8-Cre^+$ X ♀: $Gmn^{fl/fl}$
$Gmnn^{fl/fl}$	11/26 (42%)	2/34 (2%)
$Gmnn^{fl/+}$	15/26 (58%)	21/34 (62%)
$Gmnn^{fl/-}$	0/26 (0%)	11/34 (32%)

Tabelle 9: Stra8-Cre wird nur in Testis, nicht in Ovarien exprimiert. Oben ist der Genotyp der jeweils verpaarten Elterntiere, links die möglichen Allelkombinationen der Nachkommen angegeben. Nur die männlichen, Stra8-Cre-positiven Tiere geben ein rekombiniertes Knockout Allel weiter. Ein kleiner Prozentsatz der Nachkommen zeigt jedoch keine Rekombination (2%).

3.2.2. *Gmnn* und Stra8-Cre werden gekoppelt vererbt

Bei einem mendelschen Vererbungsgang sollten 25% der Nachkommen den Genotyp $Gmnn^{fl/fl}$; Stra8-Cre⁺ aufweisen. Wie in Tabelle 8 dargestellt war dies jedoch nicht der Fall. Es wird deutlich, dass jeweils 50% der Nachkommen den Genotyp $Gmnn^{fl/fl}$ und $Gmnn^{fl/+}$; Stra8-Cre⁺ besitzen. Dies spiegelt eine gekoppelte Vererbung wieder und bedeutet, dass *Gmnn* und Stra8-Cre auf dem gleichen Chromosom (Chromosom 13) liegen müssen. Stra8-Cre wird daher immer zusammen mit dem Wildtyp-*Gmnn* Allel weitervererbt, was die Generierung von $Gmnn^{fl/fl}$; Stra8-Cre⁺ Nachkommen verhindert.

Verpaarung: $Gmnn^{fl/fl}$ x $Gmnn^{fl/+};Stra8-Cre^+$

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	Summe	Prozent
$Gmnn^{fl/+}$	0	0	0	2	1	0	0	3	3,3
$Gmnn^{fl/+}$ Stra8-Cre ⁺	5	8	8	7	8	5	4	45	49,45
$Gmnn^{fl/fl}$	4	3	6	7	4	8	9	41	45,05
$Gmnn^{fl/fl}$ Stra8-Cre ⁺	0	1	0	0	0	1	0	2	2,2
Wurfgröße	9	12	14	16	13	14	13	91	100

Tabelle 10: Die Vererbung der *Gmnn* und Stra8-Cre Allele folgt nicht den Mendelschen Regeln. Die Verpaarung sollte bei unabhängig segregierenden Allelen in einer gleichmäßigen Aufteilung der vier möglichen Allelkombinationen resultieren (25%). Stra8-Cre tritt jedoch immer gekoppelt mit dem Wildtyp-*Gmnn* Allel auf. In ca. 3% der Nachkommen ist durch homologe Rekombination ein Wechsel eines Allels auf das andere Chromosom aufgetreten.

Die wenigen Tiere, welche jedoch einen von diesem Erbgang abweichenden Genotyp aufweisen (Tabelle 8), müssen daher durch meiotische Rekombination entstanden sein. Die so erhaltenen Männchen mit dem Genotyp $Gmnn^{fl/fl}$; Stra8-Cre⁺ wurden daraufhin bezüglich ihrer testikulären Rekombination des Geminin Allels analysiert. Diese konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Es konnte weder eine Rekombination des *Gmnn*-Lokus

in PCR Reaktionen, noch eine Verringerung des Geminin Proteins in Immunfärbungen auf Testis Kryoschnitten beobachtet werden. Offenbar ist durch die Rekombination der transgene Cre-Lokus stillgelegt oder beschädigt worden. Die Stra8-Cre Linie ist daher für die Generierung eines testisspezifischen *Gmnn*-Knockouts nicht geeignet, könnte jedoch möglicherweise in Kombination mit einer anderen, konditionellen Mauslinie für einen testisspezifischen Knockout verwendet werden.

3.3. Generierung von Geminin-defizienten Mäusen mittels induzierbarer Cre-Rekombinase

Da die Stra8-Cre Linie aufgrund der gekoppelten Vererbung von *Gmnn* und Stra8-Cre nicht einsetzbar war, wurde ein Tamoxifen-induzierbares Cre-System verwendet. Die „iCre“-Linie CAGGCre-ERTM (Hayashi and McMahon, 2002) exprimiert ubiquitär Cre-Rekombinase, welche jedoch in einem inaktiven Zustand im Zytoplasma der Zellen lokalisiert ist. Nach Tamoxifeninjektion transloziert Cre in den Nukleus und vermittelt die Rekombination von geflochten DNA Sequenzen. *Gmnn*^{fl/fl} Mäuse wurden mit *Gmnn*^{fl/fl}; iCre⁺ Tieren verpaart, sodass die Hälfte der Nachkommen den gewünschten Genotyp *Gmnn*^{fl/fl}; iCre⁺ aufwies. Zwei unterschiedliche Injektionszeitpunkte wurden gewählt, um die Effizienz der Geminin Deletion in den Testes und den daraus resultierenden Phänotyp zu analysieren. Die Injektion wurde zum einen in adulten Tieren vorgenommen (6 Wochen alte Tiere, 5 Tage sequentielle Injektion), zum anderen in neugeborenen Mäusen (3 Tage sequentielle Injektion von P1-P3). Der zeitliche Ablauf des experimentellen Ansatzes ist schematisch in Abbildung 15 dargestellt.

Adulte Injektion:



Neonatale Injektion:



Abbildung 15: Zeitlicher Ablauf der induzierten *Gmnn*-Deletion. Die Tamoxifeninjektionen wurden entweder an adulten Tieren für 5 sequentielle Tage oder in den postnatalen Stadien P1 bis P3 durchgeführt. Es wurde jeweils ganze Würfe injiziert und 40 bzw. 23 Tage nach den Injektionen eine Analyse der Testes vorgenommen.

Die adulten Tiere wurden 40 Tage nach intraperitonealer Tamoxifen-Injektion getötet und Testis-Gefrierschnitte angefertigt. Es konnte zwar eine partielle Rekombination auf genomischer Ebene in PCR Reaktionen gezeigt werden, jedoch keine Reduktion des Geminin Proteins in immunhistochemischen Färbungen (Daten nicht gezeigt). Offenbar ist die Rekombinationseffizienz in den adulten Tieren gering, daher wurde dieser experimentelle Ansatz nicht weiterverfolgt.

Die Injektion von früh postnatalen Tieren erfolgte von P1 bis P3. Auffällig dabei war, dass einige Tiere aus dem Wurf in der subsequenten Entwicklung retardiert waren und kleiner blieben als die restlichen Tiere. Eine Analyse der Genotypen ergab, dass in fast allen Fällen die Knockout-Tiere von der Retardierung betroffen waren. Diese Tiere waren kränklich, schwach und starben innerhalb der ersten 14 Tage postnatal. Die $Gmnn^{fl/fl}$ Kontrolltiere hingegen entwickelten sich in der Mehrzahl der Versuche trotz Tamoxifeinjektion normal (Abbildung 16). Diese Ergebnisse waren unerwartet, denn sie deuten auf eine Rolle von Geminin in der frühen, postnatalen Entwicklung hin.

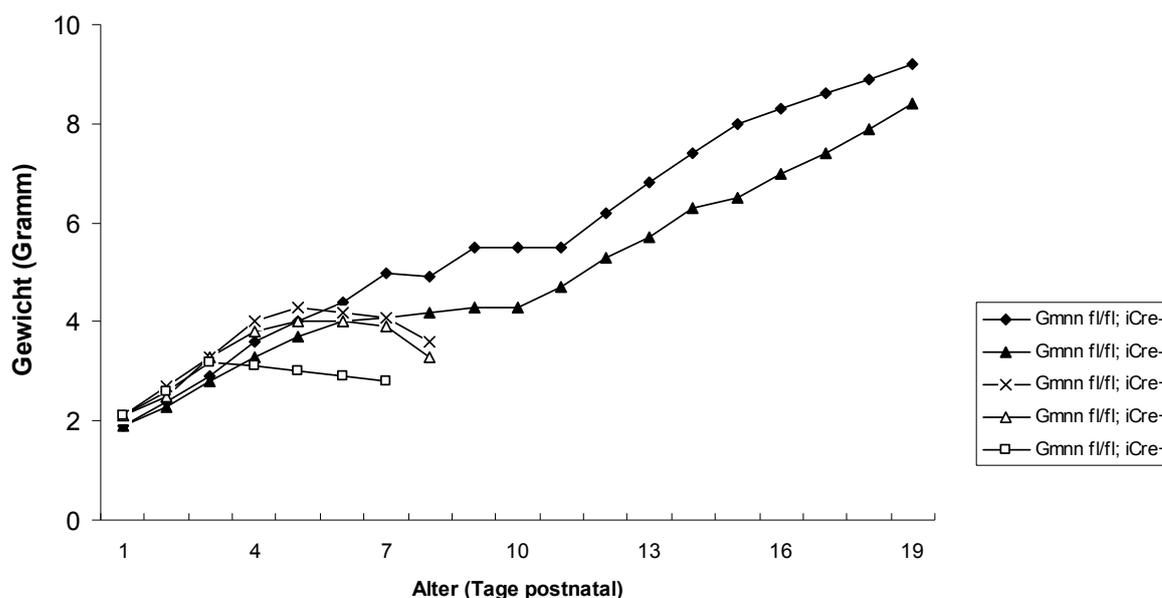


Abbildung 16: Geminin ist essentiell für die postnatale Entwicklung. $Gmnn^{fl/fl}; iCre^+$ Tiere starben innerhalb der ersten 10 Tage postnatal. Sie zeigten eine starke Retardierung im Größenwachstum und waren kränklich. Die $Gmnn^{fl/fl}$ Geschwistertiere zeigten trotz Tamoxifeninjektion keine auffälligen Beeinträchtigungen.

Durch gesonderte Ernährung der retardierten Tiere mit Breifutter war es möglich, drei der Tiere bis Tag 23 am Leben zu erhalten. Zwei der Tiere erreichten zum Tötungszeitpunkt 50% (Tier #6) und 70% (Tier #5) der Körpergröße der Geschwistertiere. Tier #4 hingegen war normal groß. Wie in Abbildung 17 dargestellt, korreliert die Retardierung mit der Knockout-

Effizienz und der Abnahme des Geminin-Proteins. Eine Größenretardierung zeigte sich auch in der Größe der Testis (Abbildung 17C). Die Tamoxifeninjektion in den adulten Tieren resultierte hingegen in keinerlei Auffälligkeiten der Mäuse, der Effekt ist also speziell in der postnatalen Wachstumsphase deutlich.

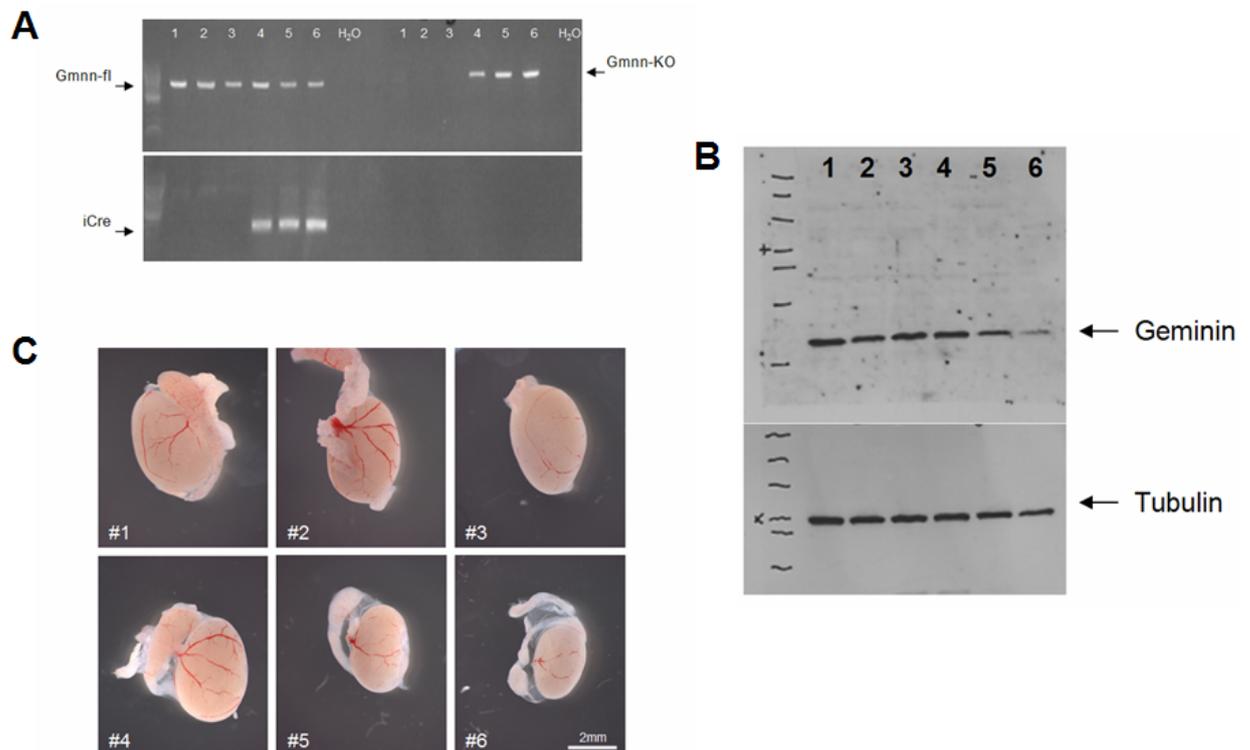


Abbildung 17: Induzierbare Deletion von *Gmnn* mittels der CAGGCre-ERTM Linie. A: Die drei Cre-positiven Tiere zeigen den rekombinierten *Gmnn*-Lokus auf genomischer DNA Ebene (Testis-DNA). B: Die erfolgte Rekombination ist an einer deutlichen Abnahme der Geminin Proteinmenge in den Testes zu sehen. C: Bei zwei von drei Cre-positiven Tieren ist an P23 eine Größenreduktion der Testis von etwa 50% festzustellen.

Eine Analyse der Testes ergab eine nahezu komplette Abwesenheit des Geminin-Proteins in den Tubuli seminiferi der retardierten Tiere (Abbildung 18A,B). Während Geminin im Kontrolltier sehr hoch in den Spermatozyten exprimiert war, konnten in *Gmnn*^{fl/fl}; *iCre*⁺ Testis nur vereinzelt Geminin-positive Zellen beobachtet werden. Die Morphologie der Tubuli seminiferi war jedoch in beiden Gruppen normal, es waren alle prämeiotischen Zelltypen zu beobachten. Die Testes beider Gruppen zeigten an P23 bereits die ersten postmeiotischen Keimzellen, die runden Spermatozyten (Abb. 18C und D), allerdings sind diese in den Knockout-Testes nicht so zahlreich wie in den Wildtyp-Tieren. Es ist jedoch keine Zunahme von apoptotischen Zellen in den Geminin-defizienten Testes zu erkennen, was auf einen Defekt der Meiose aufgrund der Abwesenheit von Geminin hindeuten würde (Abbildung E

und F). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Geminin für die Meiose nicht essentiell erforderlich ist, und die geringere Anzahl der postmeiotischen Keimzellen in den Knockout Tieren auf die allgemeine Retardierung der Tiere zurückzuführen ist, welche möglicherweise eine ebenso verzögerte Spermatogenese bedingt.

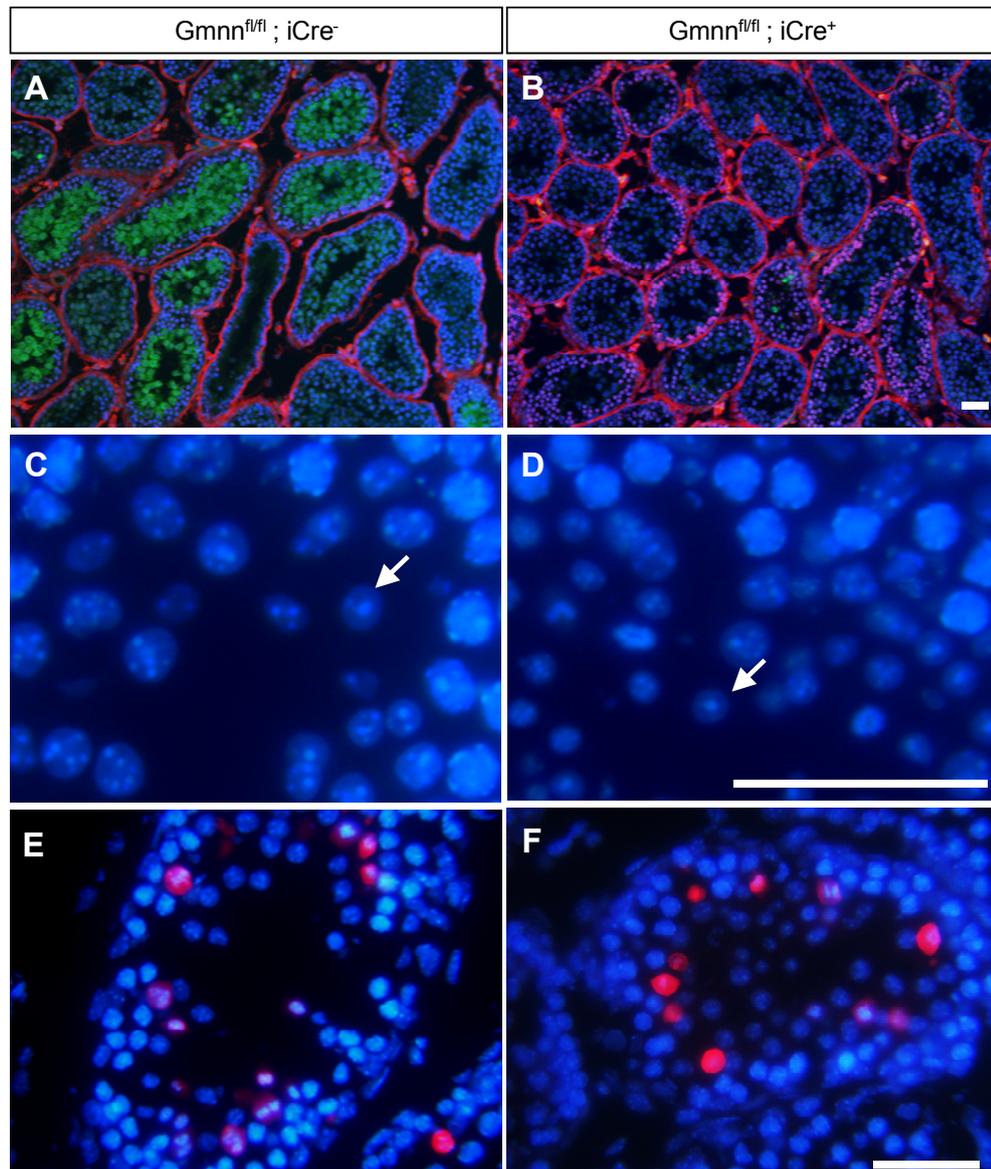


Abbildung 18: Induzierte Geminin-Deletion in Testis. Die Rekombination ist effizient, resultiert jedoch in keiner erhöhten Apoptose. (A, B) Färbung von Geminin (grün) und SCP3 (rot) in Cre-negativen und Cre-positiven Testis, Kernfärbung mit DAPI (blau). Die Rekombination ist sehr effizient, bis auf wenige, positive Zellen ist kein Geminin-Signal detektierbar. Das Anfärben der Basallamina durch SCP3 ist unspezifisch. (C, D) Die ersten runden Spermatiden (Pfeil) sind in beiden Gruppen erkennbar (DAPI, blau). In den Cre positiven Tieren sind sie jedoch in weniger Tubuli als in den Kontrolltieren beobachtbar. (E, F) TUNEL Färbung (rot) von Cre-negativen und Cre-positiven Testes nach postnataler Tamoxifen-Injektion. Es findet keine erhöhte Apoptose in diesem Stadium der Spermatogenese nach *Gmnn*-Deletion statt. DAPI markiert Zellkerne (blau). Maßstab: 50 µm.

Noch während des Experimentes wurde eine Studie veröffentlicht, in welcher ebenfalls eine globale, induzierbare Cre-Linie (Mx1-Cre) verwendet wurde um Geminin postnatal in Mäusen zu deletieren, jedoch zu etwas späteren Zeitpunkten (P11 und P35) (Shinnick et al., 2010). Die Autoren stellten hierbei den gleichen Phänotyp fest, die Tiere zeigten ein retardiertes Größenwachstum, waren kränklich und starben im Verlauf der Studie. Wie in der Veröffentlichung gezeigt, hat die Deletion von *Gmnn* einen gravierenden Effekt auf die Proliferation von hematopoietischen Zellen, sodass die Mäuse unter starker Anämie und gleichzeitiger Thrombozytose litten. Da ein Phänotyp im hematopoietischen System Auswirkungen auf den gesamten Organismus und damit auch einen Effekt auf die Entwicklung der Testes hat, wurde die Studie an dieser Stelle eingestellt.

3.4. Generierung eines konditionellen *Tipt* Targetingvektors

Um die *in vivo* Funktion von TIPT näher untersuchen zu können, wurde eine Funktionsverlustmutation in Mäusen generiert. Dazu wurde ein konditioneller Targetingvektor (cKO Vektor) konstruiert, welcher dann durch homologe Rekombination in murinen, embryonalen Stammzellen den genomischen Lokus von TIPT ersetzt. Da die Auswirkungen einer *Tipt*-Deletion nicht abzusehen waren und durchaus mit einem letalen Phänotyp gerechnet werden musste, wurde eine konditionelle Strategie ausgearbeitet. Dies bietet die Möglichkeit, sowohl den vollen Knockout mit dem Einkreuzen der global Cre-exprimierenden CMV-Cre Linie („Deleter“-Linie) zu generieren, als auch im Falle eines lethalen Phänotyps eine konditionelle Deletion durch eine testisspezifische Cre-Linie in den Keimzellen zu erzielen.

Die Erstellung des Targetingvektors wurde mithilfe des Recombineering-Systems durchgeführt (Liu et al., 2003). Hierbei wird ein bakterielles Rekombinationssystem genutzt, um LoxP Sequenzen in den gewünschten genomischen Bereich zu integrieren.

Der Ablauf des Konstruktionsprozesses gliederte sich in folgende Teilabschnitte:

1. Identifikation eines PAC-Klones mit der gewünschten genomischen DNA Region
2. die Isolation des genomischen Fragmentes aus dem PAC Klon („Retrieval“)
3. Insertion der LoxP Elemente in das isolierte, genomische Fragment
4. Überprüfung der Funktionalität der LoxP- und FLP- Elemente *in vitro*

Einzelheiten zur Konstruktion des cKO Vektors sind unter 2.2. beschrieben. Die Strategie zur Generierung eines konditionellen *Tipt* Knockout-Allels wird schematisch in Abbildung 19 dargestellt. Eines der beiden loxP Motive musste vor dem ersten Exon platziert werden, da dieses für einen relativ großen Bereich des TIPT Proteins kodiert (39 Aminosäuren). Daher wurde die stromaufwärts gelegene Sequenz *in silico* auf konservierte, genomische Elemente hin analysiert (www.ensembl.org) und putative Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen detektiert (www.genomatix.de). 891 bp stromaufwärts der transkriptionellen Startstelle wurde eine geeignete, genomische Region identifiziert, welche außerhalb der vorhergesagten Promoterregion lag und keine signifikanten, konservierten regulatorischen Elemente und Transkriptionsfaktor-Bindestellen zu enthalten schien. Hier wurde das loxP Motiv inseriert. Das zweite Motiv, zusammen mit der FRT-Neo-FRT Kasette, wurde stromabwärts von Exon 4 platziert, und zwar 243 bp stromabwärts der 3'-untranslatierten Region (UTR) von TIPT1.

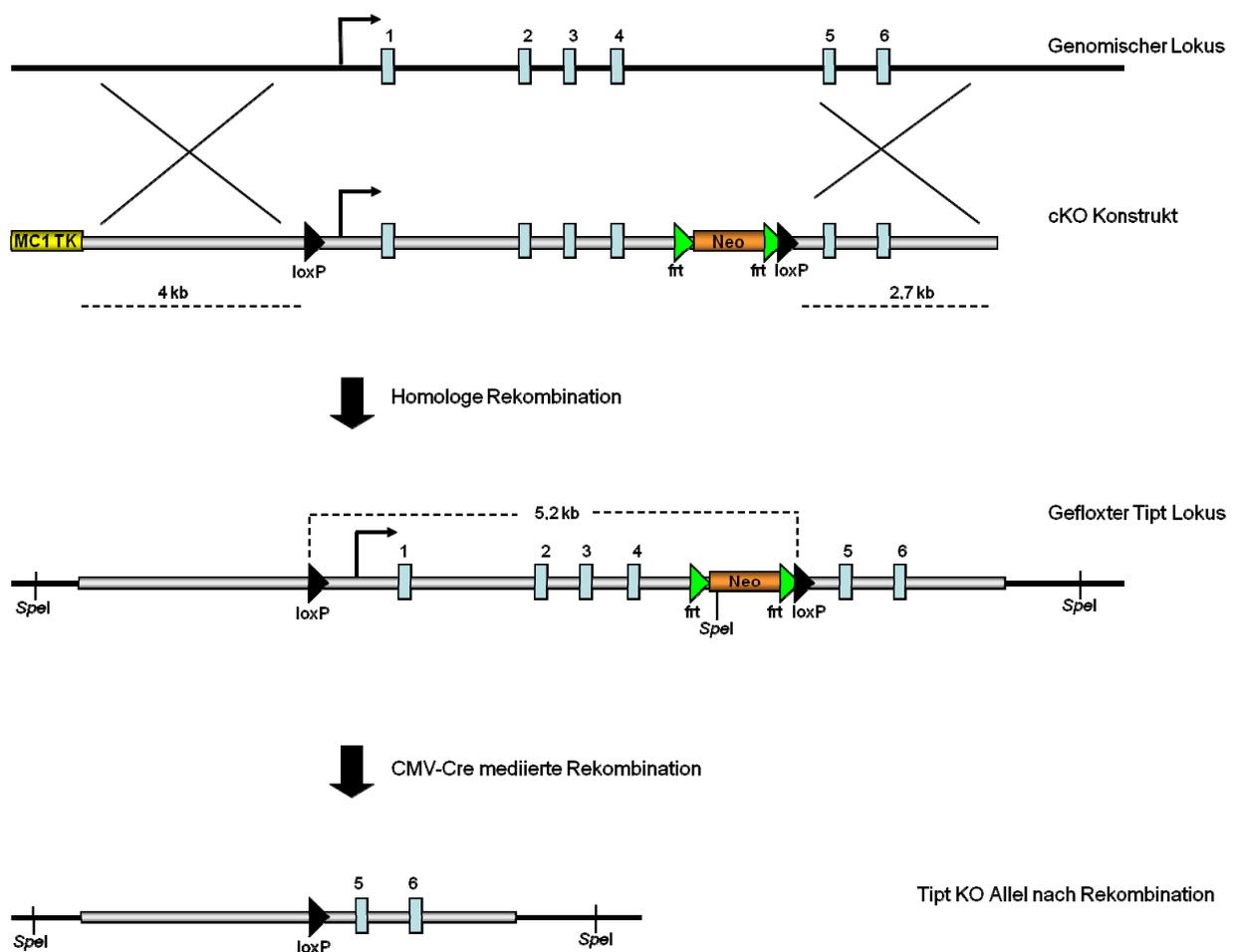


Abbildung 19: Schematischer Ablauf des Gen-Targetings für *Tipt*. Da *Tipt* auf dem Minusstrang codiert wird, ist zur vereinfachten Darstellung der Lokus in 3' - 5' Orientierung dargestellt. Nach Rekombination durch Cre- Rekombinase verbleiben nur noch Exon 5 und 6 im Genom, beide Isoformen werden deletiert.

3.5. Generierung einer konditionalen *Tipt* Knockout Mauslinie

Der Targetingvektor wurde mit *NotI* linearisiert und in murine, embryonale Stammzellen elektroporiert. Überlebende Klone nach G418 und Ganciclovir Selektion wurden mittels PCR auf das Vorhandensein der TK-Kassette analysiert. Negative Klone wurden mittels Southern Blot Analyse nach *SpeI* Verdau auf die korrekte Integration des Vektors hin untersucht. Vier der Klone zeigten die erwarteten Banden mit der 3' und 5' Probe, drei wurden daraufhin für die Aggregation mit frühen CD1[®]-Mausembryonen verwendet (Abbildung 20). Nach Inkubation bis ins Blastozystenstadium wurden die aggregierten Embryonen in scheinsschwangere CD1[®]-Weibchen reimplantiert und die chimären Nachkommen aufgrund ihrer Fellfarbe für die Keimbahntransmission ausgewählt. Ein Chimärismus von 70% wurde bevorzugt für die Keimbahntransmission ausgewählt, die Tiere wurden mit weißen CD1[®] Mäusen verpaart. Die heterozygot geflochten, agoutifarbenen Nachkommen wurden einerseits untereinander verpaart um homozygot geflochte Tiere zu erhalten, andererseits mit den CMV-Cre Tieren (Schwenk et al., 1995) um die heterozygoten Mutanten zu generieren. Die *Tipt*^{+/-} Tiere zeigten keine morphologischen- oder Verhaltensauffälligkeiten und waren fertil.

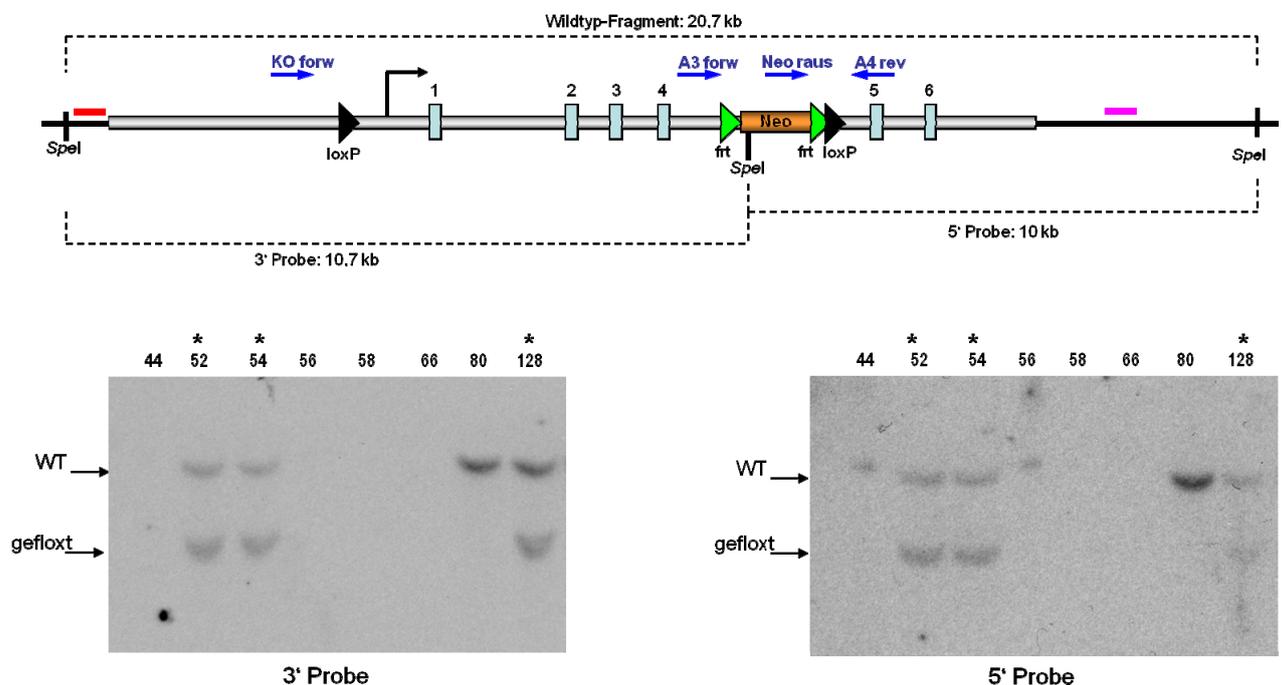


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Southern Blot Strategie. Oberer Teil: Bindestellen der Southern Blot Proben (3' Probe: rot, 5' Probe: pink) und der erwarteten Banden nach dem Verdau mit *SpeI*. Die blauen Pfeile markieren die zur Genotypisierung eingesetzten Primer. Das Primerpaar „A3 forw/A4 rev“ amplifiziert das Wildtyp-Allel, „Neo raus/A4 rev“ amplifiziert das geflochte Allel, „KO forw/A4 rev“ amplifiziert das KO Allel. Unterer Teil: Southern Blot Ergebnisse. Die mit einem Stern gekennzeichneten ES-Klone wurden zur Aggregation verwendet.

3.6. Analyse von *Tipt*^{-/-} Mäusen

3.6.1. Verifikation der TIPT Deletion auf DNA-, RNA- und Proteinebene

Die Verpaarung der *Tipt*^{+/-} Mäuse untereinander resultierte in normaler Nachkommenzahl mit einer mendelschen Verteilung der Genotypen. Der Knockout in den *Tipt*^{-/-} Mäusen wurde auf DNA, RNA und Proteinebene verifiziert (Abbildung 21). Weder auf RNA noch auf Proteinebene in Testislysaten konnte TIPT nachgewiesen werden, beide Isoformen waren vollständig deletiert. Eine Hintergrundbande bei 27 kDa konnte jedoch sowohl in *Tipt*^{fl/+} als auch *Tipt*^{-/-} Proben detektiert werden.

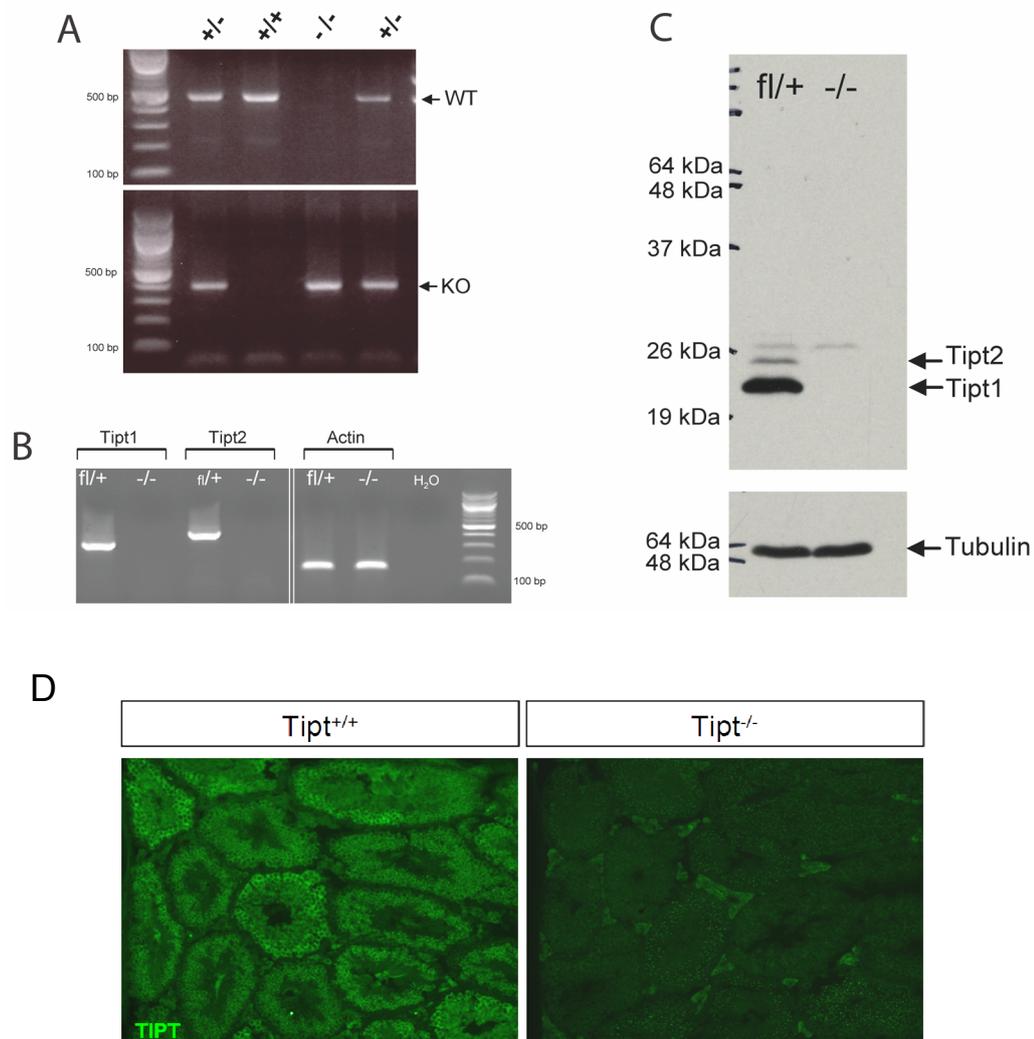


Abbildung 21: Verifikation der Tipt Deletion auf DNA, RNA und Protein Ebene.

A: Genotypisierung eines Wurfes, **B:** RT-PCR von Testis-RNA, **C:** Western Blot mit Testis Proteinlysaten, **D:** Immunohistochemie auf Tipt^{+/+} und Tipt^{-/-} Testes-Gefrierschnitten.

3.6.2. *Tipt*^{-/-} Mäuse zeigen keinen offensichtlichen morphologischen und verhaltensbiologischen Phänotyp

Die *Tipt*^{-/-} Mäuse sind äußerlich nicht von den *Tipt*^{+/+} Tieren zu unterscheiden. Es sind keine morphologischen Differenzen wie Kleinwüchsigkeit, Untergewicht, Zahn- oder Krallendeformationen zu erkennen. Die Mäuse zeigen keine Verhaltensauffälligkeiten. Eine Analyse der wichtigsten inneren Organe zeigen ebenfalls keine Abberationen.

3.6.3. Fertilitätsanalyse von männlichen und weiblichen *Tipt*^{-/-} Mäusen

Um die Fertilität der *Tipt*^{-/-} Tiere zu überprüfen, wurden Verpaarungen von Knockout Tieren mit CD1[®] Wildtyp-Tieren angesetzt. Es zeigte sich, dass sowohl *Tipt*^{-/-} Männchen als auch Weibchen fertil sind und vitale, fertile Nachkommen haben. Um zu überprüfen ob die Fertilität der Knockout-Tiere reduziert ist, wurden die Wurfgrößen mit denen der Kontrollgruppen verglichen. Wie in Tabelle 9 dargestellt, weichen die Wurfgrößen bei Verpaarung von *Tipt*^{-/-} Tieren mit CD1[®]-Wildtyp-Mäusen nicht drastisch von denen der heterozygoten *Tipt*^{+/-} Tiere oder den *Tipt*^{-/-} Tieren untereinander ab. Die Fertilität der *Tipt*^{-/-} Männchen und Weibchen ist also nicht eingeschränkt.

♂ x ♀	Verpaarungen	Anzahl der Würfe/Verpaarung	Wurfgröße
<i>Tipt</i> ^{-/-} x CD1 [®]	3	6	10,72
<i>Tipt</i> ^{+/-} x <i>Tipt</i> ^{+/-}	4	6	10,54
<i>Tipt</i> ^{-/-} x <i>Tipt</i> ^{-/-}	4	6	9,17

Tabelle 11: *Tipt*^{-/-} Tiere sind fertil. Die Wurfgrößen bei Verpaarung der KO-Tiere mit CD1[®] Wildtyp-Tieren unterscheidet sich nicht von den Wurfgrößen bei Verpaarung der heterozygoten Tiere untereinander. Auch die Verpaarung von KO-Tieren untereinander resultiert in keiner drastischen Reduktion der Wurfgrößen.

3.6.4. Analyse der Spermatogenese von *Tipt*^{-/-} Mäusen

3.6.4.1. Testikuläre Morphologie

Die Testes der Knockout Mäuse zeigten keine Größenreduktion im Vergleich zu denen der Wildtyp-Tiere, weder an P21 (Abb. 22) noch im adulten Stadium (nicht gezeigt). In Hematoxylin/Eosin Färbungen von Testes beider Genotypen sind keine morphologischen

Defekte oder Abnormalitäten zu erkennen. Alle Zelltypen der spermiogenen Differenzierung sind gleichermaßen vorhanden. Anzahl, Morphologie und Lokalisation der spermatogonischen Stammzellen, Spermatozyten, Spermatischen und Spermatozoen sind unverändert in Abwesenheit von TIPT, ebenso die Größe und Anzahl der Tubuli seminiferi (Abb. 22).

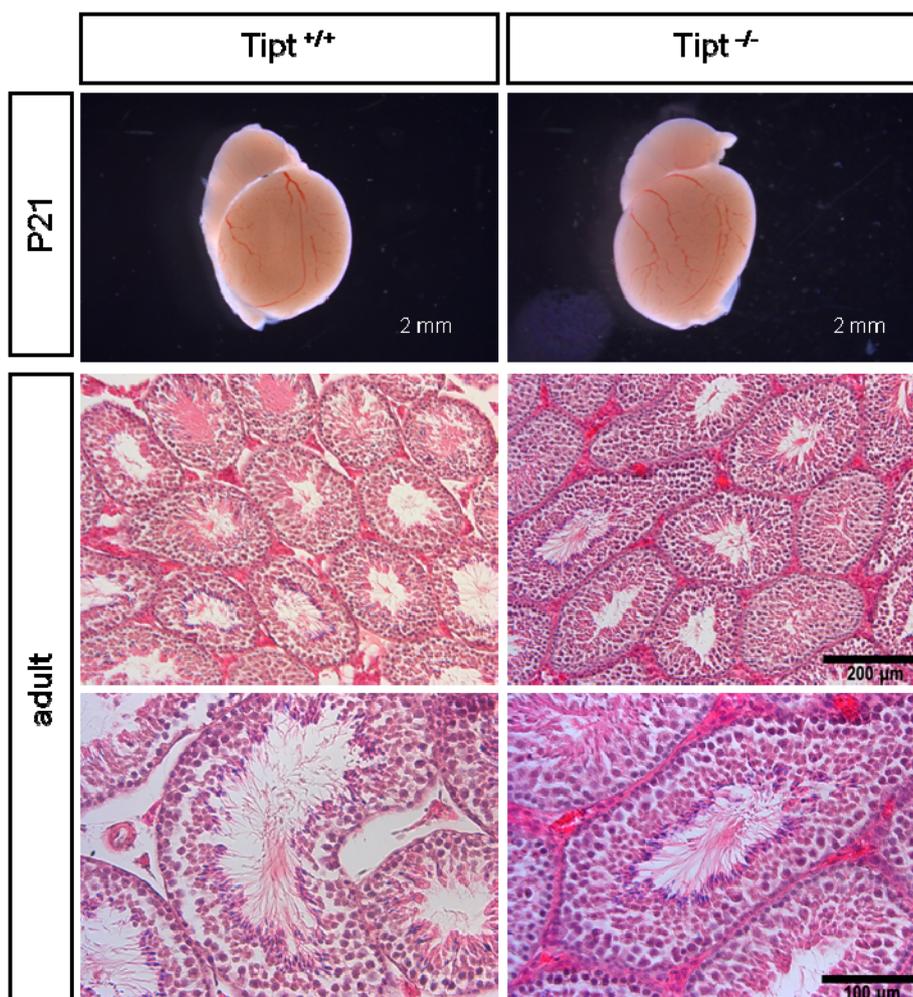


Abbildung 22: Größe und Morphologie der *Tipt^{-/-}* Testes ist unverändert. Sowohl testikuläre Morphologie, als auch zelluläre Komposition innerhalb der Tubuli seminiferi ist in den Knockout-Testes unverändert.

3.6.4.2. Spermienzahlbestimmung

Um die Anzahl der Spermatozoen zu bestimmen, wurden Epididymis von *Tipt^{+/+}* und *Tipt^{-/-}* Tieren isoliert und in *in vitro* Fertilisationsmedium inkubiert, um ein Ausschwimmen der Spermatozoen zu bewirken. Die ausgeschwommenen Spermien wurden in einer Neubauerkammer gezählt. Obwohl die mittlere Anzahl der Spermien der *Tipt^{-/-}* Mäuse eine Tendenz zur Reduktion zeigte, besteht durch die hohe Variation zwischen den einzelnen Proben kein signifikanter Unterschied zwischen *Tipt^{-/-}* und *Tipt^{+/+}* Tieren (Abbildung 23).

Eine Reduktion der Spermienzahl in dieser geringen Größenordnung manifestiert sich aufgrund der generell hohen Spermatozoenzahl auch nicht in einem subfertilen Phänotyp.

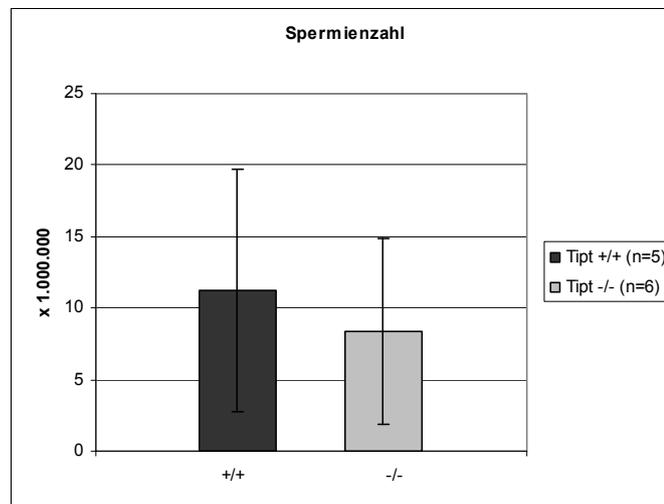


Abbildung 23: Spermienzahlbestimmung von *Tipt*^{+/+} und *Tipt*^{-/-} Tieren. Die Cauda epididymidis wurde in *in vitro* Fertilisationsmedium mit einer Kanüle mehrmals punktiert, die ausgeschwommenen Spermien in einer Neubauerkammer gezählt. Es wurden 5 Wildtyp- und 6 Knockout-Tiere analysiert.

3.6.4.3. Analyse der Apoptose

Die Tendenz zu einer Reduktion der Spermienzahl in den *Tipt*^{-/-} Tieren gab Anlass zur Analyse der Apoptose während der Spermatogenese. Eine erhöhte Apoptose in den Mutanten konnte durch TUNEL Färbung jedoch nicht festgestellt werden (Abbildung 24).

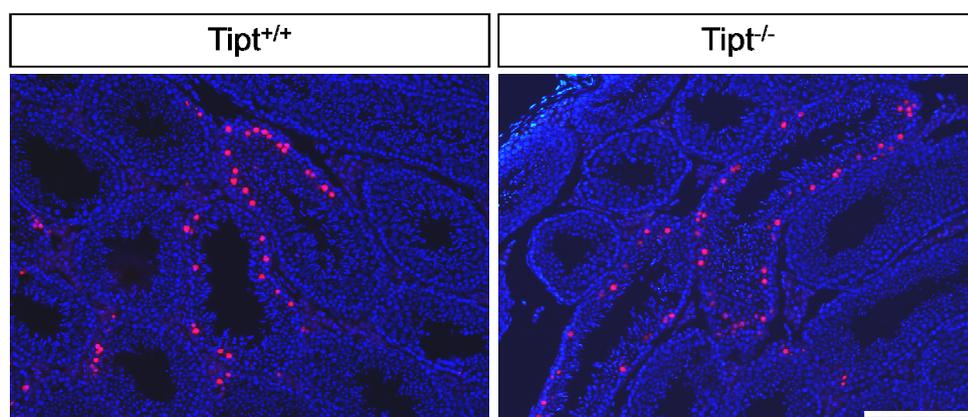


Abbildung 24: *Tipt*^{-/-} Testes zeigen keine Erhöhung der Apoptose. Dargestellt ist eine TUNEL-Färbung (rot) auf Paraffinschnitten von adulten (12 Wochen) *Tipt*^{+/+} und *Tipt*^{-/-} Testes. DAPI (blau) dient als Kernfärbung. Maßstab: 200 µm

3.6.4.4. Analyse der Spermatozoen

Da TIPT in den Flagellen der Spermatozoen lokalisiert ist, wurde eine Analyse der Spermatozoen durchgeführt. TIPT war in den Knockout-Spermien nicht mehr im Flagellum detektierbar (Abb. 25 A) und morphologisch stellte sich keine offensichtliche Veränderung der Spermien und Flagellen dar (Abb. 25 B). Die Querschnitte durch die Flagellen zeigten auch in der Ultrastrukturanalyse keine strukturellen Abnormalitäten. Die 9+2 Struktur war unverändert in Wildtyp- und Knockout-Proben und auch die Anordnung der Mitochondrien und „outer dense fibres“ im proximalen Teil der Flagellen war nicht verändert (Abbildung 25 C).

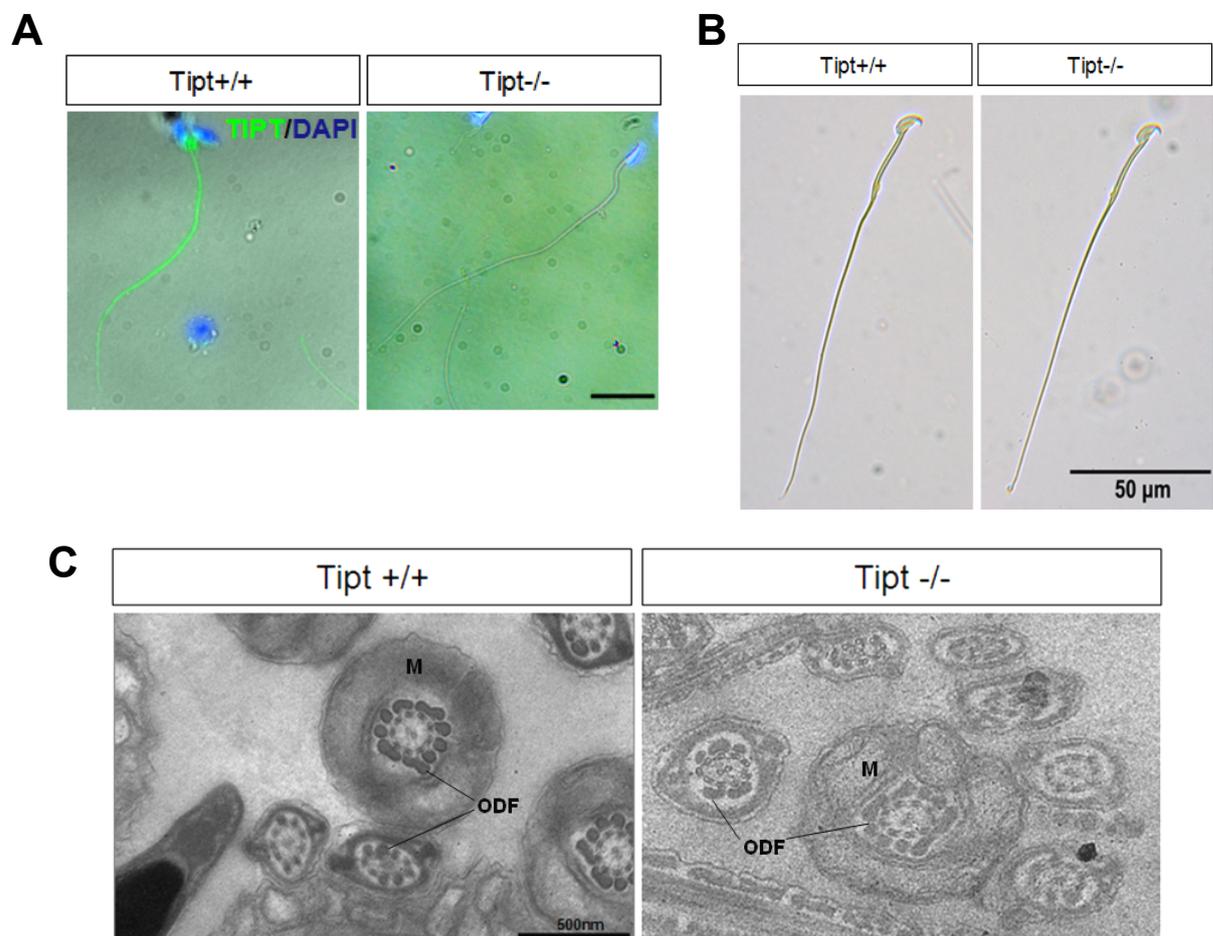
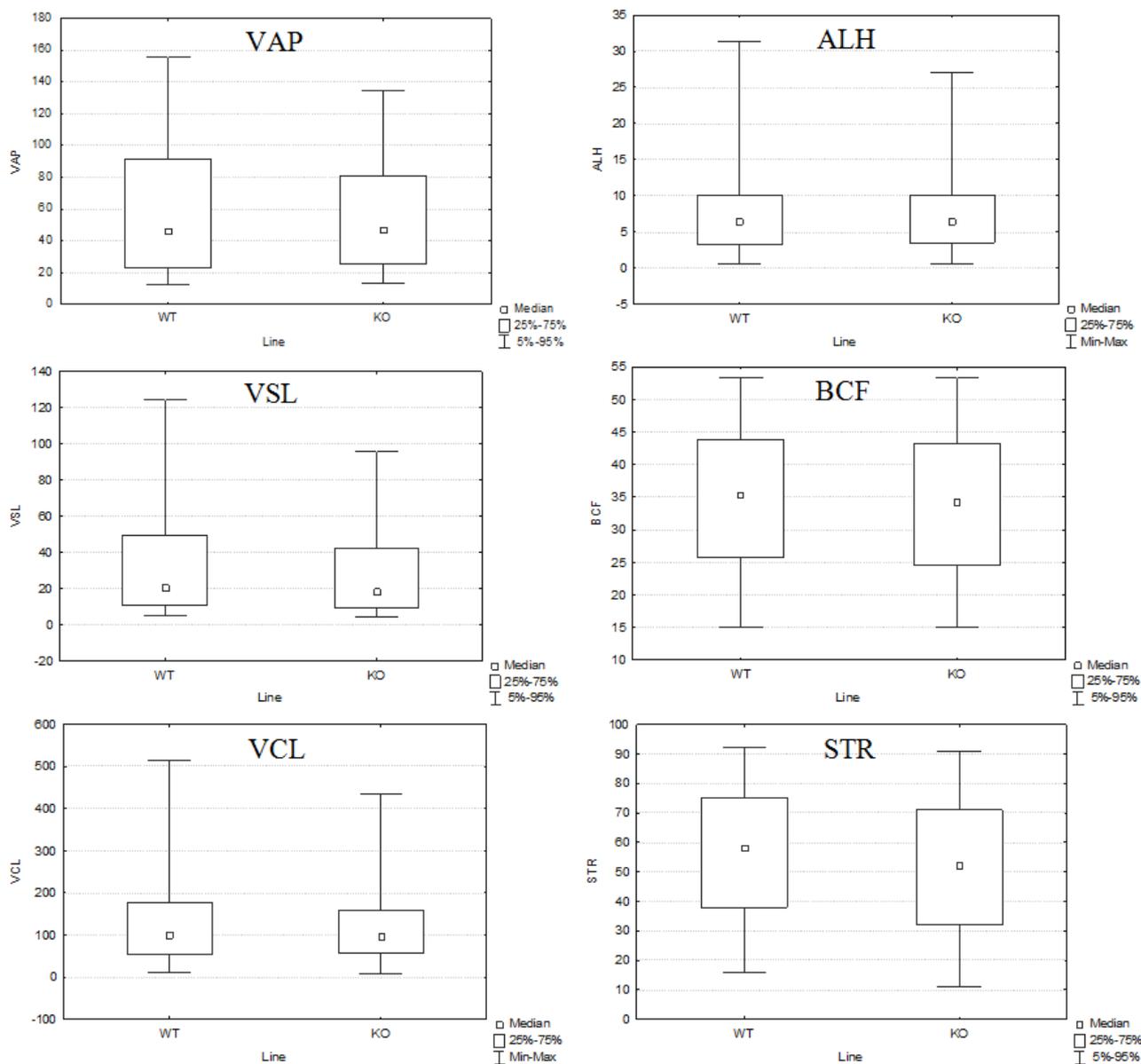


Abbildung 25: *Tipt*^{-/-} Spermatozoen weisen keine morphologischen Defekte auf. (A) TIPT ist in den Knockout-Spermien nicht mehr in den Flagellen detektierbar. (B) Die Spermien der Mutanten zeigen eine normale Morphologie, es sind keine Veränderungen des Flagellums, des Mittelstückes oder des Spermienkopfes erkennbar. (C) Ultrastrukturanalyse der Flagellen. Dargestellt sind Querschnitte durch verschiedene Abschnitte des Flagellums. Die Anordnung der Mitochondrien (M), der „outer dense fibres“ (ODF) sowie die 9+2 Microtubulistruktur im Zentrum der Flagellen ist unverändert. Maßstab: 50 µm

3.6.4.5. Motilitätsanalyse

Zwar zeigte die morphologische Analyse der Spermatozoa keine Auffälligkeiten, dies impliziert jedoch nicht zwangsläufig eine unveränderte Funktionalität. Daher wurde die Motilität der *Tipt*^{-/-} Spermien untersucht. Die ausgeschwommenen Spermatozoen wurden in einer computergestützten Spermienanalyse (*computer assisted semen analysis* - CASA) untersucht. Dabei wird das Schwimmverhalten von individuellen Spermien mit einem Kamerasystem aufgezeichnet und computergestützt ausgewertet (CEROS CASA). Die gemessenen Parameter erfassen die durchschnittliche Geschwindigkeit der Spermien in Mikrometer pro Sekunde (*velocity curvilinear*, VCL), die Amplitude der lateralen Kopfpendingbewegung der Spermien in Mikrometern (*amplitude of lateral head displacement*, ALH), die Frequenz, mit welcher der Spermienkopf den Weg des Spermatozoons kreuzt in Herz (*beat cross frequency*, BCF), die Geschwindigkeit des Spermiums auf dem gemittelten Weg in Mikrometer pro Sekunde (*velocity average path*, VAP), die geradlinige Geschwindigkeit des Spermiums in Mikrometern pro Sekunde (*velocity straight line*, VSL) und die Geradlinigkeit in Prozent (*straightness*, STR), welche dem gemittelten Quotienten von VSL/VAP entspricht, wobei 100% eine gerade Linie darstellen. Die Rohdaten wurden in dem Programm „Statistica“ weiterverarbeitet und graphisch dargestellt (Abb. 26). Die Analyse zeigte, dass das Schwimmverhalten in allen gemessenen Parametern dem Wildtyp entspricht. Es konnte somit eine Relevanz von TIPT in der Spermienmotilität ausgeschlossen werden.

Abbildung 26: Motilitätsanalyse von *Tipt*^{+/+} and *Tipt*^{-/-} Spermatozoen. Dargestellt als Rechteck sind die 50 Prozentränge zwischen dem 25. und dem 75. Perzentil, der Median ist jeweils als kleines Quadrat darin angegeben. Die Balken nach oben und unten entsprechen dem 5. und 95. Perzentil. Die Werte für VCL, VSL und VAP sind Mikrometer pro Sekunde, BCF ist Herz, ALH ist Mikrometer und STR ist Prozent. Die Messungen erfolgten 1,5 Stunden nach Extraktion aus den Epididymis bei 37°C, wobei n=3 (*Tipt*^{+/+}) und n=4 (*Tipt*^{-/-}).



3.6.4.7. Analyse von spermatogeneserelevanten Markern

Eine Analyse von bekannten Markern der Spermiogenese auf mRNA Ebene wurde durchgeführt um eine eventuelle Änderung von Expressionsniveaus zu ermitteln. Dies würde auf eine Rolle von TIPT bei der spermatogenen Transkription hindeuten. Eine dramatische Änderung der Transkription insbesondere von postmeiotischen Genen wurde in CREM und TRF2 Knockout Mäusen gezeigt. Daher wurden die Transkripte mehrerer, in Keimzellen exprimierter Gene, analysiert. Sowohl prämeiotische (Oct4, Sox2, Nanog) als auch meiotische und postmeiotische Gene (Dazl, Tex14, Rnf17, MIS, Rex1, Vasa) sowie akrosomale Marker (Acrosin, Haprin) und Gene mit Funktionen in der flagellaren Entwicklung (Bbs2, Bbs4,

Mkks, Tekt2, Spag6, Akap4, Sept3, Sepp1, Gopc, Ube2b) (Hermo et al., 2010a; Hermo et al., 2010b, c, d, e) wurden in die Analyse mit einbezogen. Es wurde weiterhin Nf1 untersucht, welches *in vitro* durch TIPT/Geminin/TRF2 aktiviert wird. Wie in Abbildung 27 dargestellt, wurden keine deutlichen Expressionsunterschiede von testisspezifischen Transkripten in Wildtyp- und *Tipt*^{-/-}-Testis festgestellt. Auch die Expression von TRF2 und Geminin ist nicht verändert, was bei einer funktionellen Redundanz eventuell zu erwarten wäre, um den Verlust von TIPT zu kompensieren.

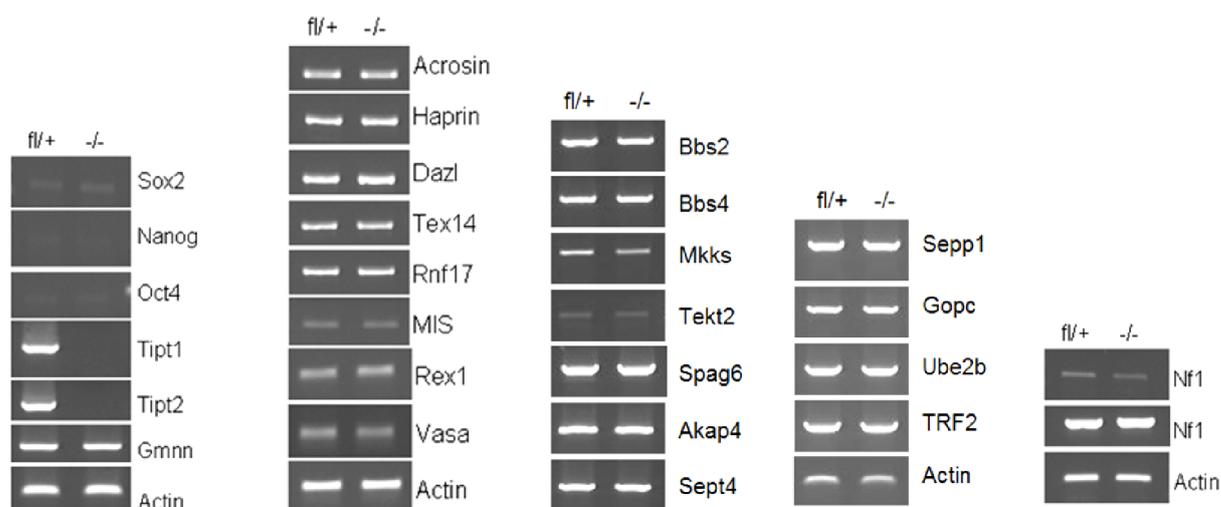


Abbildung 27: RT-PCR Analyse von spermatogeneserelevanten Transkripten. Weder Stammzellmarker (Sox2, Nanog, Oct4) noch akrosomale (Acrosin, Haprin) oder flagellare Marker (Bbs2, Bbs4, Mkks, Tekt2, Spag6, Akap4, Sept4, Sapp1, Gopc, Ube2b) sind in ihrer Transkriptionsstärke gravierend verändert. Auch Geminin, TRF2 und NF1 zeigen keine Alterierung. Dazl, Tex14, Rnf17, MIS, Rex und Vasa sind wichtige Proteine mit diversen Funktionen in der Spermatogenese (Hermo et al., 2010a; Hermo et al., 2010b, c, d, e).

Weiterhin wurde die Proteinexpression von bekannten TIPT-Interaktionspartnern (Geminin, TBP, AF10, HP1 γ) (Brancorsini et al., 2008; Pitulescu, 2006) und ein zumindest in *D. melanogaster* transkriptionell durch TRF2 reguliertes Protein (PCNA) (Hochheimer et al., 2002) anhand von Western-Blot Analysen untersucht, um zu überprüfen, ob eine Veränderung der Expression in der Abwesenheit von TIPT auftritt (Abb. 28). Für keines der analysierten Proteine konnten jedoch veränderte Proteinniveaus festgestellt werden.

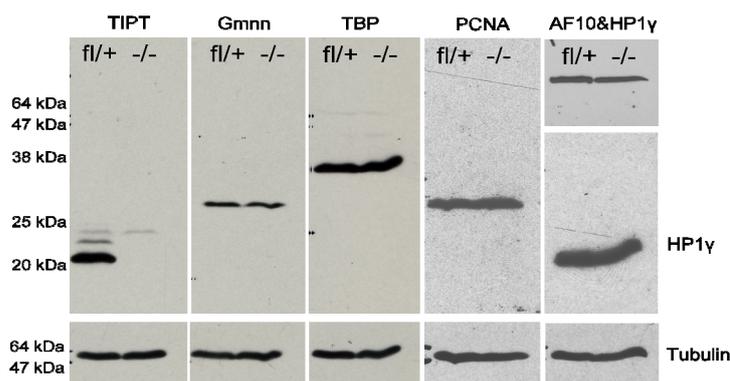


Abbildung 28:
Analyse von Tipt Interaktionspartnern auf Proteinebene. Weder Geminin, noch TBP, PCNA, AF10 oder HP1 gamma zeigen eine veränderte Expressionsstärke in Testis-Proteinextrakten.

3.6.4.8. Analyse des Chromozentrums während der Spermatogenese

Der Phänotyp der *Trf2*^{-/-} Mäuse ist ein später Arrest der Spermiogenese in elongierenden Spermatiden mit einer Fragmentierung des Chromozentrums. Die Interaktion von TRF2 und TIPT1 wurde bereits gezeigt (Brancorsini et al., 2008). Daher lag die Vermutung nahe, dass TIPT in der Formation des Chromozentrums oder allgemein in der Kondensation von Chromatin im Spermatidenstadium eine Funktion besitzt. Um diese Frage zu klären, wurde das Chromozentrum mit DAPI visualisiert. Da Histon 3 im Heterochromatin dreifach an Lysin 9 methyliert ist (Bannister et al., 2001), eignet sich diese Histonmodifikation ebenfalls als Marker und wurde mit einem α H3K9(me)3 Antikörper angefärbt. Es wurde kein Unterschied in den Chromozentren zwischen Mutanten und Wildtyp-Tieren festgestellt, in beiden ist jeweils ein einzelnes Signal in den runden Spermatiden detektierbar (Abb. 29). TIPT ist also nicht relevant für die Formierung und Erhaltung des Chromozentrums in Kooperation mit TRF2.

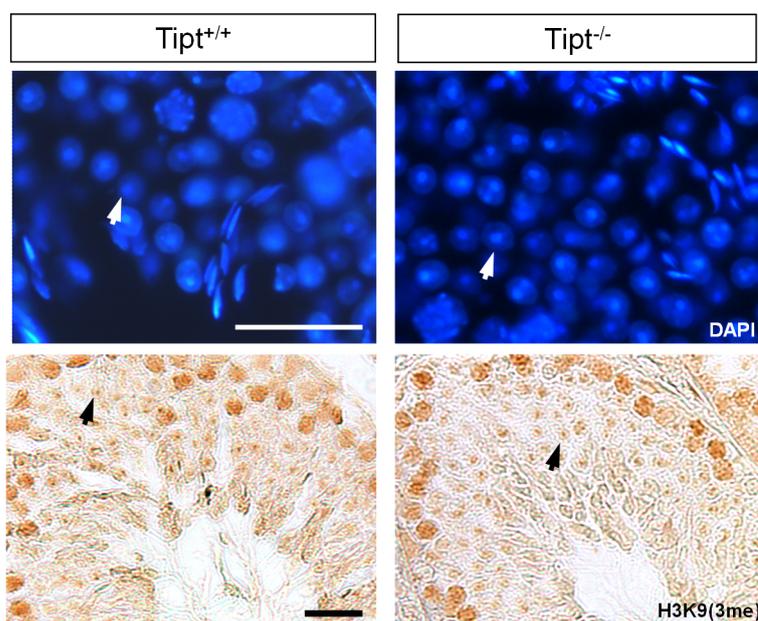


Abbildung 29: Analyse der Chromozentren in *Tipt*^{+/+} und *Tipt*^{-/-} Testes.

Das durch DAPI (oben) und α H3K9(me)3 (unten) angefärbte Chromozentrum der runden Spermatiden zeigt in den Knockout-Mäusen keine Auffälligkeiten. Maßstab: 25 μ m

3.6.4.9. Analyse der Expression von Geminin in den *Tipt*^{-/-} Testes

Da Geminin als Interaktionspartner von TIPT2 identifiziert wurde (Pitulescu et al., 2009), wurde die Expression und das Expressionsmuster von Geminin in den *Tipt*^{-/-} Mäusen analysiert. Wie in Abbildung 30 dargestellt, ist weder die zelluläre Lokalisation oder das Expressionsmuster in den Mutanten verändert. Die Deletion von TIPT führt also nicht zu einer abberanten Expression von Geminin.

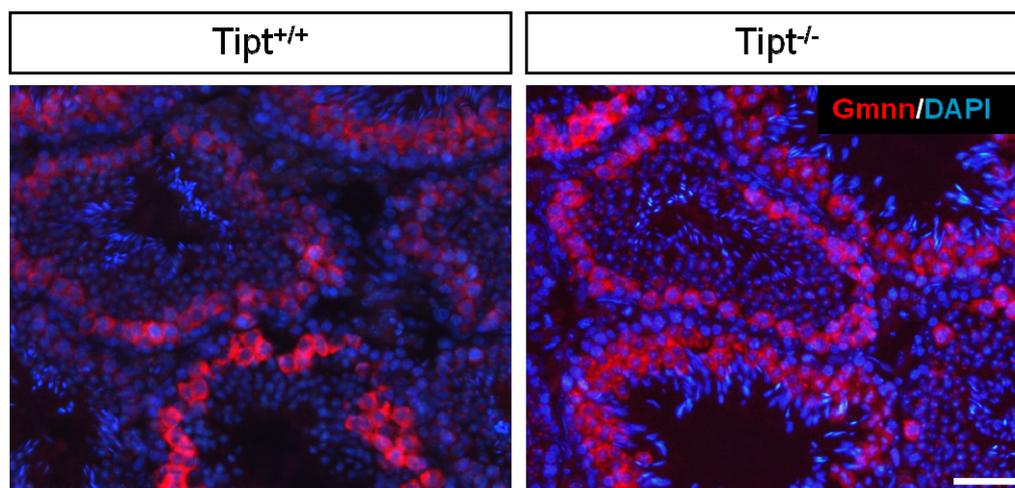


Abbildung 30: Die Expression von Geminin ist nicht verändert in *Tipt*^{-/-} Testes. Das Expressionsmuster und die subzelluläre Lokalisation von Geminin sind in Abwesenheit von TIPT unverändert. Maßstab: 50 µm

3.6.4.10. Untersuchung der Spermatogenese-assoziierten Histonentfernung in *Tipt*^{-/-}

Mäusen

Die höchste Expression von TIPT tritt während der Elongationsphase der Spermatiden auf. Charakteristisch für diese Phase ist das Ersetzen der Histone durch Transitionsproteine und später Protamine. Daher wurde analysiert, ob die Entfernung von Histonproteinen in der Mutante beeinträchtigt ist. Im Falle einer beeinträchtigten Histonentfernung würden sich in maturierten Spermatozoen noch Histonproteine anfärben lassen. Dies ist jedoch, zumindest für Histon 3, nicht der Fall. Alle *Tipt*^{-/-} Spermien zeigen kein Histon 3 Signal im Chromatin, wie in Abbildung 31 dargestellt.

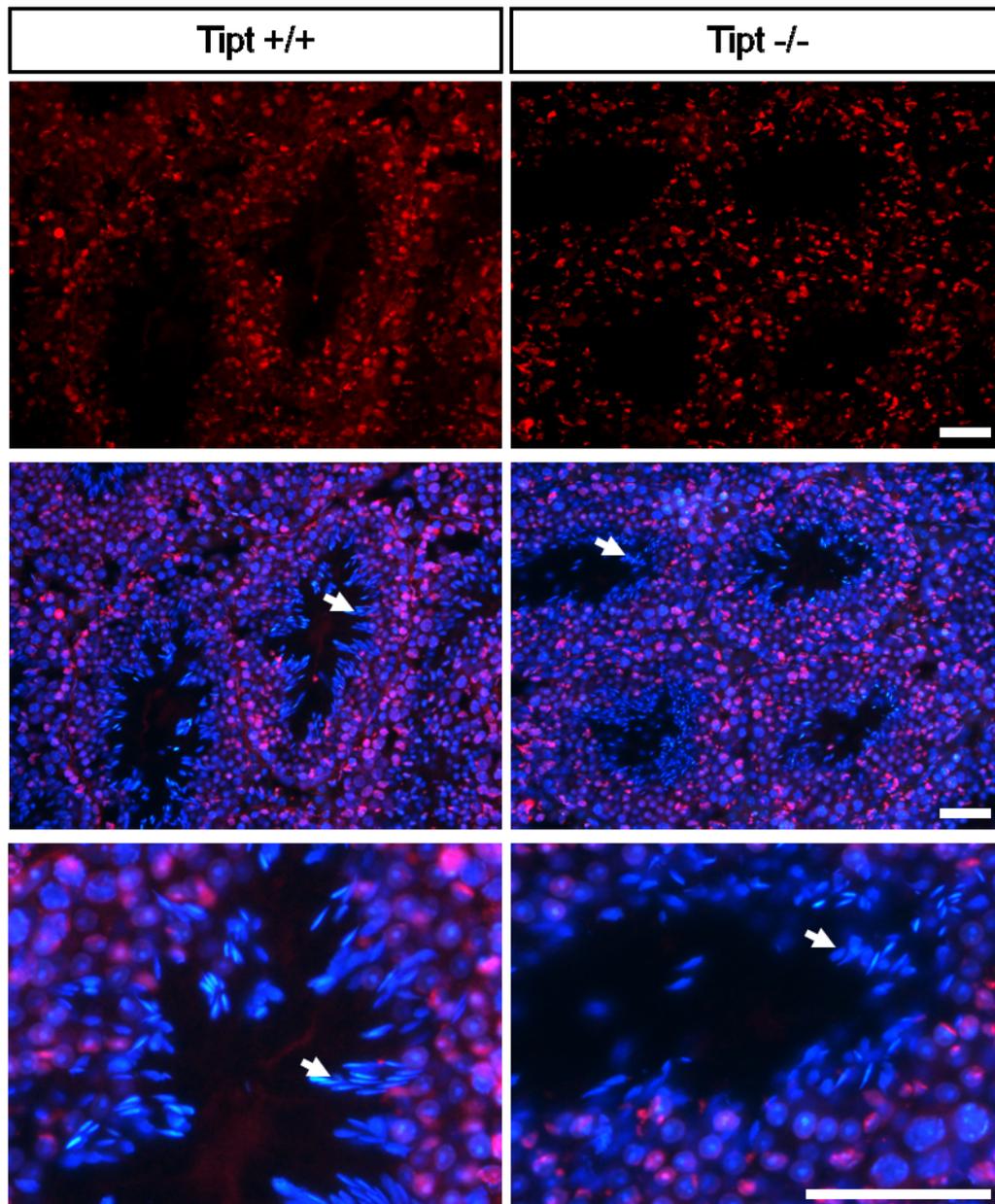


Abbildung 31: Histon 3 wird in *Tipt*^{-/-} Spermatiden entfernt. In Testis Kryoschnitten von *Tipt*^{+/+} sowie *Tipt*^{-/-} Spermatozoen kann kein Signal für Histon 3 (rot) im Nucleus (DAPI, blau) detektiert werden. Die im Mittelteil durch Pfeile markierten Spermien sind im unteren Teil vergrößert dargestellt. Maßstab: 50µm

Eine unvollständige Kondensierung der Spermien-DNA kann weiterhin durch die Färbung mit Akridinorange nach Denaturierung in HCl nachgewiesen werden (Erenpreiss et al., 2001). Eine korrekt kondensierte DNA emittiert nach der Färbung bei Exzitation mit UV Licht ein grün-gelbliches Signal, bei unvollständig kondensierter DNA verschiebt sich die Emission in den orangen Bereich. Wie in Abbildung 32 dargestellt, ist das Chromatin von Spermien der Wildtyp- und Knockout-Mäuse kondensiert und emittiert ein grün-gelbliches Signal.

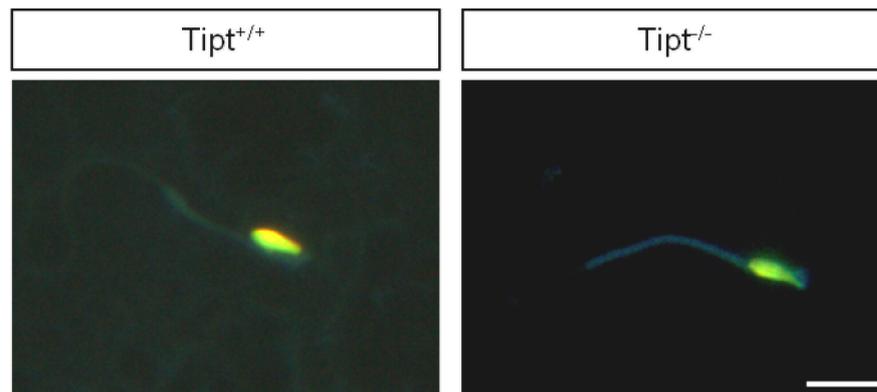


Abbildung 32: Akridinorange-Färbung von Spermatozoen aus dem Nebenhoden. Bei unvollständig kondensiertem Chromatin emittiert die gefärbte DNA ein oranges Signal. Dies ist weder bei Wildtyp- noch *Tipt*^{-/-}-Spermien zu beobachten. Maßstab: 10 µm

3.7. Identifikation von TIPT-Interaktionspartnern in Testes

Um Aufschluss über die *in vivo* Funktion von TIPT während der Spermatogenese zu erhalten, ist die Identifikation von TIPT-Interaktionspartnern in testikulären Zellen erforderlich. Hierzu wurde eine differentielle, massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Bei diesem Ansatz wird mit α TIPT-Antikörpern eine Immunpräzipitation in Wildtyp- und Knockout-Testisextrakt durchgeführt. Die eluierten Proteine wurden dann auf einem SDS-Gel separiert und massenspektrometrisch analysiert. Hierbei wurden alle Proteine, welche durch unspezifische Bindung des Antikörpers an Proteine im Zelllysate resultieren, durch die vergleichende Analyse zwischen Wildtyp- und Knockout-Lysat eliminiert. Es werden also alle Proteine, welche in Wildtyp- und Knockout-Lysat identifiziert werden, als falsch positive Proteine kategorisiert. Nur die Proteine, welche ausschließlich im Wildtyp- und nicht im Knockout-Lysat präzipitiert werden, werden als potentielle Kandidaten eingestuft. Abbildung 33 zeigt die identifizierten Proteine nach Abgleich über die MASCOT Datenbank im Programm Scaffold 3 (Proteome Software).

#	Starred?	Visible?	Protein Name	Accession Number	Molecular Weight	A_Kli...	A_Kli...	A_Kli...	A_Kli...
Bio View: Identified Proteins (7/125) Probability Legend: over 95% (green) 80% to 94% (yellow) 50% to 79% (orange) 20% to 49% (red) 0% to 19% (grey)									
1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	centrosomal protein of 72 kDa [Mus musculus]	gi 187960077	72 kDa	100%			100%
2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Tripartite motif-containing 27 [Mus musculus]	gi 47122750	68 kDa				100%
3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	mKIAA0098 protein [Mus musculus]	gi 37359776 (+6)	60 kDa	99%			98%
4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide, isoform CRA_b [Mus musculus]	gi 148676868 (+5)	29 kDa	★			98%
5	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta [Mus musculus]	gi 123240357 (+7)	18 kDa				100%
6	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	unnamed protein product [Mus musculus]	gi 12855032 (+1)	18 kDa	★			100%
7	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	mCG3431 [Mus musculus], gi 148699659 gb EDL31606.1 mCG13421, isoform CRA_a [Mus musculus], gi 148699660 gb EDL3... gi 148673102 (+8)		14 kDa	98%			96%

Abbildung 33: Ergebnis der Interaktionsanalyse. Die mit α TIPT-Antikörpern präzipitierten Proteine wurden massenspektrometrisch analysiert und Proteine ausgefiltert, welche in sowohl *Tipt*^{+/+}- (L1 und L3) als auch *Tipt*^{-/-}- Lysat (L2 und L4) identifiziert wurden. Die Filtereinstellungen sind unter 2.5.6. beschrieben. Zwischen der 14-3-3 ζ und 14-3-3 β Isoform konnte nicht differenziert werden (roter Stern bei „Protein Group Ambiguity“).

Die ursprünglich 125 Proteine umfassende Liste wurde durch den differentiellen Abgleich auf 7 Kandidaten verringert. Diese 7 Proteine präzipitierten ausschließlich in den Wildtyp-Testislysaten mit dem TIPT-Antikörper und sind in Tabelle 10 zusammenfassend dargestellt.

Name	Identifizierte Proteine nach Subtraktion der unspezifischen Bindungen (8/125)	Zugriffsnummer	Molekulargewicht
CeP72	centrosomal protein of 72 kDa [Mus musculus]	gi 187960077	72 kDa
TIPT	unnamed protein product [Mus musculus]	gi 12855032	18 kDa
Trim27	Tripartite motif-containing 27 [Mus musculus]	gi 47122750	68 kDa
TrIC epsilon	mKIAA0098 protein [Mus musculus]	gi 37359776	60 kDa
14-3-3 β	tyrosine 3-monooxyg./tryptophan 5-monooxyg. activation protein, beta [Mus musculus]	gi 123240357	18 kDa
14-3-3 ζ	tyrosine 3-monooxyg./tryptophan 5-monooxyg. activation protein, zeta [Mus musculus]	gi 148676868	29 kDa
PHGPx	mCG3431 [Mus musculus]	gi 148673102	14 kDa

Tabelle 12: Auflistung der potentiellen Interaktionspartner. Durch differentielle massenspektrometrische Analyse konnten die hier dargestellten Proteine nach Subtraktion von 118 unspezifischen Bindungen identifiziert werden. TIPT wurde nur im Wildtyp-Lysat identifiziert und zeigt daher, dass die Immunpräzipitation funktioniert. Die Identifikation von 14-3-3 β und ζ ist nicht eindeutig.

Auffallend hierbei ist, dass weder TRF2, Geminin oder HP1 in dieser Analyse identifiziert werden konnten.

Die neu identifizierten, potentiellen Interaktionspartner umfassen TRiC ϵ , welches eine Untereinheit des Chaperonin-Komplexes *TCP1 ring complex* (TRiC) ist, sowie 14-3-3 ζ und/oder β . Weiterhin *tripartite motif-containing 27* (Trim27), und *phospholipid-hydroperoxide glutathionperoxidase* (PHGPx) sowie *centrosomal protein 72* (Cep72). Diese ergeben einen neuen Kontext für die potentielle Funktion von TIPT.

Während der TrIC Proteinkomplex eine Vielzahl von Proteinen faltet und so zur Proteostase beiträgt (Seo et al., 2010; Yam et al., 2008), sind 14-3-3 Proteine in verschiedene, zelluläre Prozesse involviert. Der siRNA vermittelte Knockdown von 14-3-3 ζ sensibilisiert die Zellen für Apoptose und bewirkt die verstärkte Expression von Zell-Zell-Kontakt-Proteinen (Niemantsverdriet et al., 2008). Trim27 hat drei beschriebene Funktionen. Es kann durch die

Bindung an *Enhancer of Polycomb* reprimierend auf Transkription wirken, es hat eine Ubiquitinligase-Funktion und ist somit in die Protein-Degradation involviert und es kann Apoptose induzieren (Chu and Yang, 2010; Dho and Kwon, 2003; Gillot et al., 2009; Shimono et al., 2000). PGHPx ist ein Enzym, welches die Reduktion von Peroxiden katalysieren kann, und schützt Zellen vor oxidativem Stress (Mauri et al., 2003; Roveri et al., 2001; Ursini et al., 1997).

Die hier identifizierten Interaktionspartner besitzen also Funktionen in der Proteinfaltung, Proteindegradierung, oxidativem Stress, Transkription und Apoptose. Dies legt die Vermutung nahe, dass TIPT eine Funktion in der zellulären Stressantwort besitzt. Die Tatsache, dass die Deletion von TIPT in der Maus keinen Phänotyp unter standardisierten Zuchtbedingungen zeigt, unterstützt diese Hypothese.

3.8. Analyse von TIPT in Testes während Hyperthermie

3.8.1. TIPT translokiert nach Hyperthermie in perinukleäre Regionen

Um die Rolle von TIPT bei Hyperthermie in Testes zu untersuchen, wurde ein Hitzeschockexperiment mit isolierten Testes durchgeführt. Die Testes wurden aus Wildtypmäusen präpariert und in 43°C warmem PBS für 15 Minuten inkubiert. Der zweite Testis wurde jeweils für die gleiche Zeitspanne in PBS bei Raumtemperatur belassen und diente als Kontrolle. Nach 15 Minuten Wärmebehandlung schien das TIPT Signal im Vergleich zu der Kontrolle verringert zu sein. Die normalerweise homogene Verteilung von TIPT im Zytoplasma ist nicht mehr zu erkennen, stattdessen lokalisiert das Protein in perinukleäre Regionen der Zelle (Abb. 34) und ist in punktuellen Foci konzentriert. Im Gegensatz dazu ist das Geminin-Signal unverändert stark und homogen vor und nach Hyperthermie. TIPT verändert also schon nach kurzzeitiger Hitzeeinwirkung seine subzelluläre Lokalisation und akkumuliert in perinukleären Regionen, jedoch nicht im Nukleus.

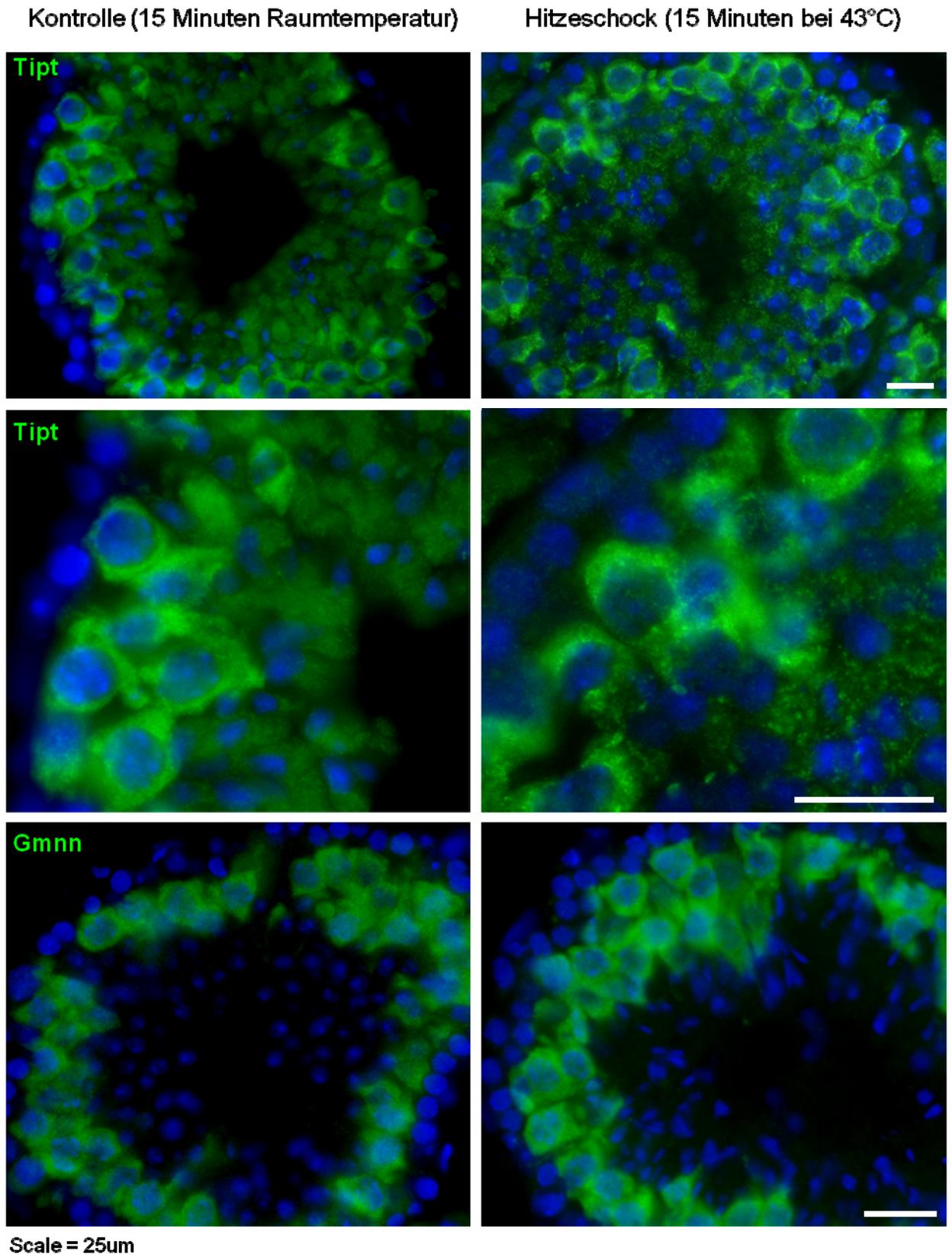


Abbildung 34: Analyse von TIPT nach Hitzeschock. Die intrazelluläre Lokalisation von TIPT ändert sich innerhalb von 15 Minuten nach Hitzeschock. Die bei Raumtemperatur homogene, zytoplasmatische Verteilung des Proteins wird zunehmend punktuell. TIPT sammelt sich in einzelnen Foki, vermehrt im perinukleären Bereich. Geminin hingegen verändert seine subzelluläre Verteilung nicht. Maßstab: 25 µm

3.8.2. Analyse von testikulärer Hyperthermie bei *Tipt*^{-/-} Mäusen *in vivo*

Um die Auswirkungen von TIPT Defizienz auf die Hitzeschock-Antwort der testikulären Zellen *in vivo* zu analysieren, wurden die Mäuse in Restrainern für 15 Minuten mit dem hinterem Körperviertel in 43°C warmes Wasser gebadet. Nach 24 Stunden wurden die Tiere getötet und die Testes in Gefrierschnitten analysiert.

Die Morphologie der Knockout-Testes war dramatisch verändert. Während in den Wildtyp-Tieren die grundlegende Struktur der Tubuli seminiferi und die Lokalisation der entsprechenden Zelltypen im luminalen und basalen Kompartiment 24 Stunden nach Hyperthermie weitgehend unverändert blieb, sind bei den Mutanten vermehrt Disruptionen der zellulären Organisation zu beobachten. Weiterhin treten eine erhöhte Vakuolisierung und große, multinukleäre Riesenzellen auf (Abbildung 35 oben). Diese multinukleären Riesenzellen sind in *Tipt*^{-/-} Testes in dem Großteil der Tubuli seminiferi, in den Kontrolltieren dagegen nur vereinzelt und vergleichsweise klein zu beobachten. Um auszuschließen, dass dieser Effekt durch die experimentellen Bedingungen ausgelöst wird, wurde eine Kontrollgruppe einem 24°C warmen Wasserbad ausgesetzt. Diese Tiere zeigten eine unveränderte Testismorphologie (Abb. 35 unten).

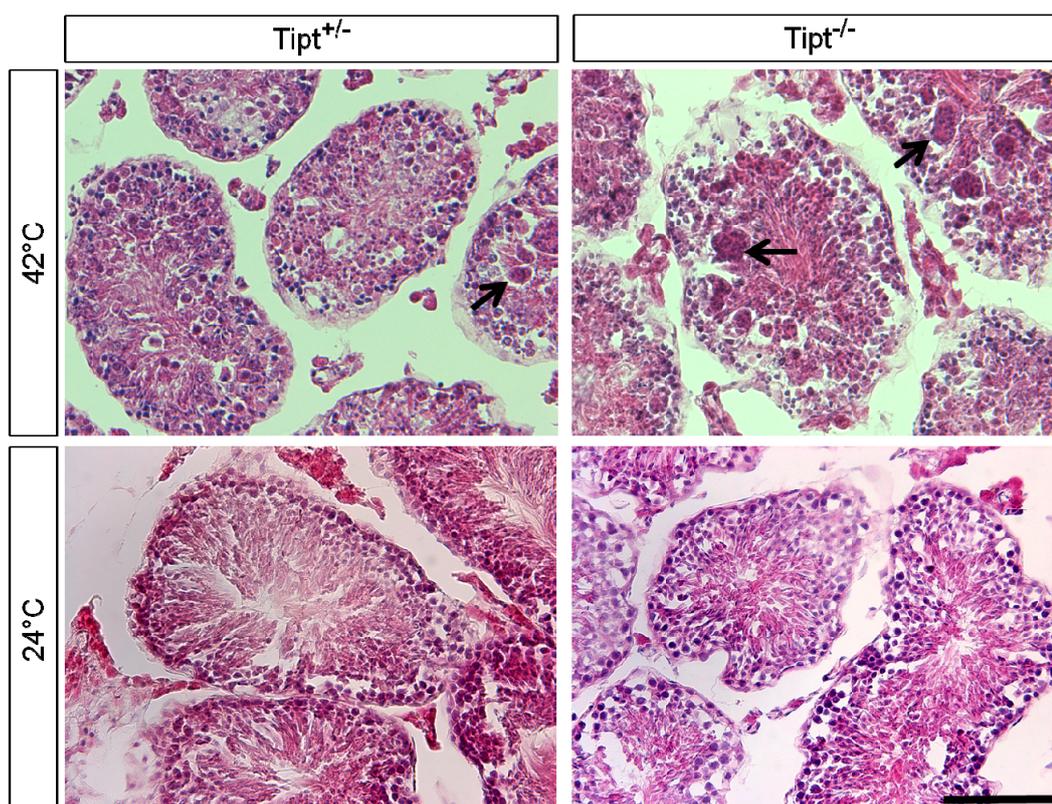


Abbildung 35: *Tipt*^{-/-} Testes zeigen eine veränderte Morphologie nach Hyperthermie. Oben: In den TIPT-defizienten Geweben bilden sich stark vergrößerte, multinukleäre Riesenzellen 24 Stunden nach testikulärer Hyperthermie (42°C für 15 Minuten). Diese treten auch bei den heterozygoten Tieren auf, sie sind jedoch nicht so groß und weniger zahlreich (Pfeile). Weiterhin ist die zelluläre Organisation in den *Tipt*^{-/-} Testes weitgehend zerstört. Unten: Bei den Kontrolltieren im 24°C Wasserbad sind keine Änderungen zu beobachten. Maßstab: 100 µm.

Um die auftretenden Zellaggregate und Morphologieänderungen näher zu charakterisieren, wurden die Gewebe mit Antikörpern gegen Aktin gefärbt. Wie in Abbildung 36 dargestellt, sind leere, vakuolisierte Bereiche (Abbildung 36, Pfeilspitze) sowie mehrere Zellkernaggregate von runden Spermatisden (Abbildung 36, Rechteck), welche von einer einzelnen Zellmembran umgeben sind, vermehrt in den *Tipt*^{-/-} Testes zu erkennen.

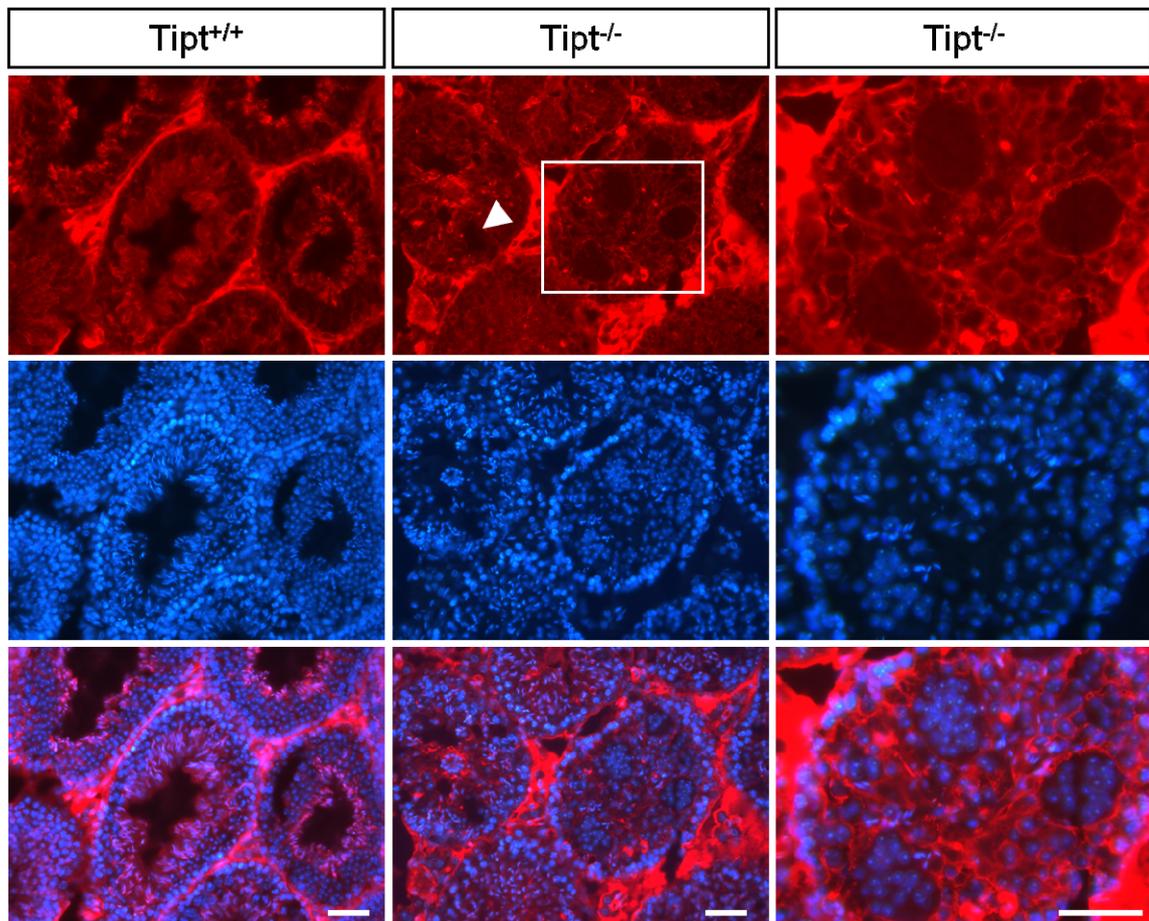


Abbildung 36: *Tipt*^{-/-} Testes zeigen eine verstärkte Aggregation von runden Spermatisden nach Hyperthermie. Aktin (rot) markiert das Zytoskelett der Zellen. In der Mutante sind vermehrt leere, vakuolisierte Bereiche (Pfeilspitze) sowie aggregierte, runde Spermatisdenkerne (DAPI, blau), umgeben von einer einzelnen Zellmembran, zu erkennen (Rechteck). Die rechte Spalte stellt eine Vergrößerung des Bereiches im Rechteck dar. Maßstab: 50 µm

Die Anzahl der apoptotischen Zellen war in den Tubuli seminiferi der *Tipt*^{-/-} Testis stark erhöht (Abbildung 37). Dabei waren vermehrt TUNEL-positive Signale in der Zellpopulation der prämeiotischen Spermatozyten zu beobachten. Die aggregierten Spermatischen Kerne waren hauptsächlich negativ für die TUNEL-Färbung (Abbildung 37, Einsatz).

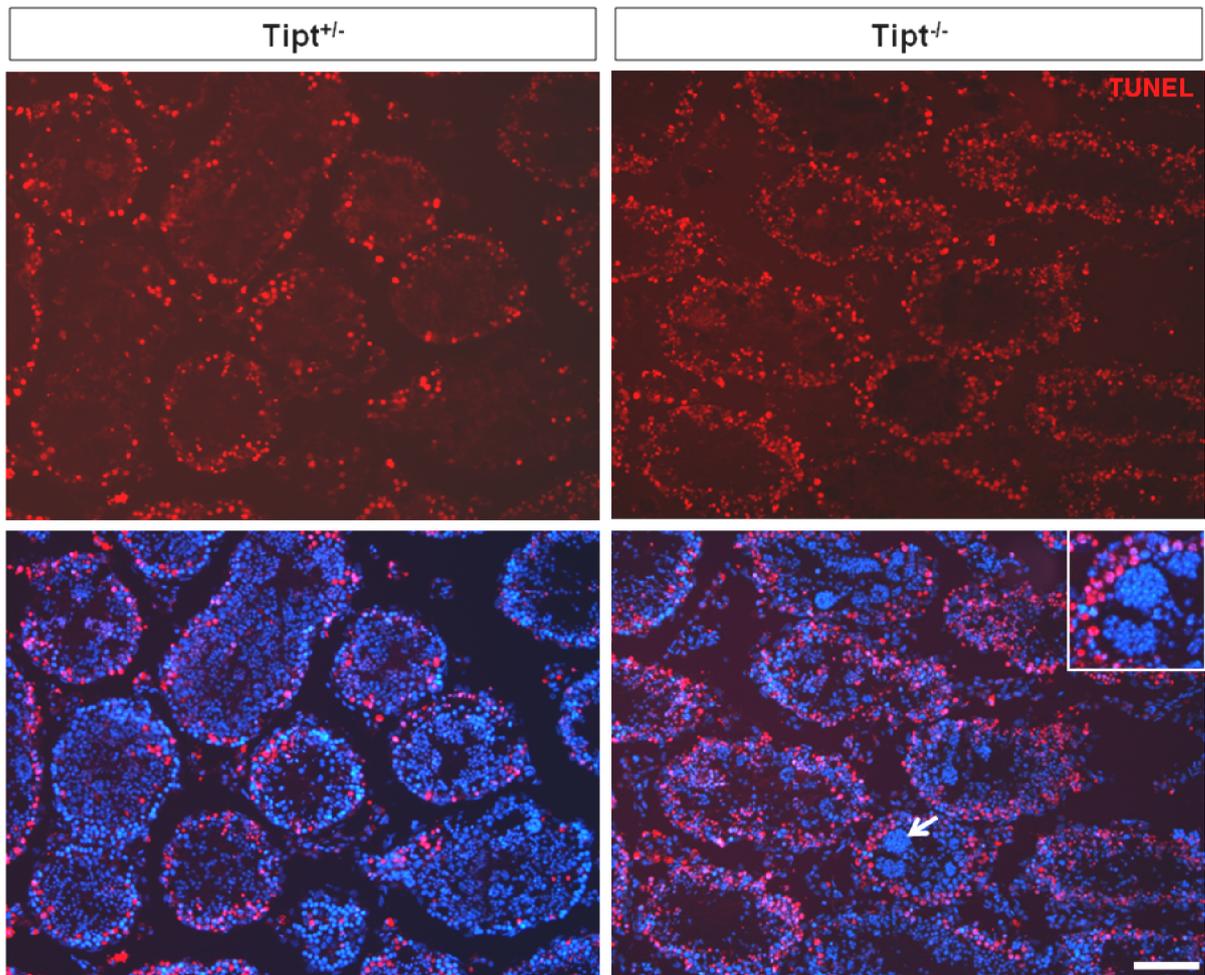


Abbildung 37: TUNEL Färbung von *Tipt*^{+/-} und *Tipt*^{-/-} Testes nach Hyperthermie. 24 Stunden nach der Wärmebehandlung (15 Minuten bei 42°C) wurden die Tiere getötet. Die Tubuli seminiferi der *Tipt*^{-/-} Mäuse zeigen nach Hitzeschock eine verstärkte Apoptoseantwort im Vergleich zum heterozygoten Geschwistertier. Die Kerne der multinukleären Riesenzellen (Pfeil und Einsatz) in *Tipt*^{-/-} Testis sind größtenteils negativ in der TUNEL-Färbung. DAPI (blau) färbt die Kerne an. Maßstab: 100 µm.

Die Abwesenheit von TIPT bewirkt nach der induzierten, testikulären Hyperthermie eine deregulierte Apoptoseantwort in den prämeiotischen Spermatozyten sowie eine Zunahme von multinukleären Riesenzellen unter den postmeiotischen Spermatischen. Diese Resultate belegen eine Funktion von TIPT in der Regulation von zellulären Stressantworten in den Testis nach induzierter Hyperthermie.

4. Diskussion

4.1. Expression von TIPT während der Spermatogenese

TIPT Protein ist erstmalig im Spermatozytenstadium während der Spermatogenese detektierbar. In diesen prämeiotischen Zellen beginnt die Expression in den pachytänen Spermatozyten und wird mit zunehmendem Differenzierungsverlauf stärker. In den prämeiotischen Zellen erreicht das TIPT Protein das höchste Signal in den diplotänen Spermatozyten. Dabei ist auffällig, dass der Großteil des Proteins im Zytoplasma lokalisiert ist. In den postmeiotischen Zellen ist TIPT ebenfalls exprimiert. In runden Spermatisden ist das Protein relativ schwach detektierbar, jedoch erhöht sich die Signalstärke in den elongierenden Spermatisden kontinuierlich bis zur Signalspitze in den zytoplasmatischen Lobi der elongierenden Spermatisden. Diese Daten bestätigen teilweise die Befunde von bereits publizierten Studien. Song et al. analysierten TIPT während der Spermatogenese der Ratte (Song et al., 2006). In dieser Publikation wurde die Expression ab dem frühen, runden Spermatisdenstadium beobachtet und als zunehmend in den späteren, elongierenden Stadien beschrieben. Die Lokalisation des Proteins wurde hierbei als primär zytoplasmatisch dargestellt, was den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit entspricht. Es wurde jedoch keine Expression von TIPT in Spermatozyten festgestellt. Die im Rattenmodell gewonnen Ergebnisse sind in diesem Punkt nicht deckungsgleich mit den Arbeiten im Mausmodell. Brancorsini et al. konnte in murinen Expressionsstudien von TIPT zeigen, dass das Protein erstmals in den pachytänen Spermatozyten detektierbar ist und dann in allen folgenden Stadien der Spermatogenese exprimiert bleibt. Interessanterweise ist jedoch das detektierte TIPT-Signal in dieser Publikation primär nukleär, während in der vorliegenden Arbeit eine primär zytoplasmatische Lokalisation des Proteins evident war. Diese Diskrepanz zwischen der Lokalisation ist möglicherweise auf die verschiedenen Methoden bei der Immunfluoreszenzfärbung zurückzuführen. Zum einen verwendeten Brancorsini et al. keine Gefrierschnitte, um das Protein direkt *in situ* anzufärben. Es wurden stattdessen diverse Stadien der Spermatogenese durch eine Dissektionsmethode mit Hilfe eines Phasenkontrast-Mikroskopes präpariert. Die isolierten Zellen wurden auf Objektträgern schockgefroren, fixiert und dann immunzytochemisch gefärbt. Möglicherweise kann durch diese Behandlung im Gegensatz zur Detektion auf Gewebsschnitten die zelluläre Lokalisation des Proteins verändert werden. Zum anderen wurden in allen Studien verschiedene Antikörper verwendet. Brancosini et al. benutzten zur Generierung eines polyklonalen TIPT-Antikörpers nur eine relativ kleine Sequenz von 16 Aminosäuren (Aminosäuren 49 bis 65). Diese zeigte in einer

eigens durchgeführten BLASTP-Suche außer TIPT1 und TIPT2 noch eine Vielzahl weiterer signifikanter Sequenzähnlichkeiten in anderen Proteinen, darunter auch einige nukleär lokalisierte wie zum Beispiel „arginine and glutamate-rich protein 1“. Weiterhin liegt in der von Brancorsini verwendeten Aminosäuresequenz eine potentielle Phosphorylierungsstelle (Serin 49). *In vitro* Experimente aus unserer Arbeitsgruppe deuten auf eine phosphospezifische, subzelluläre Lokalisation von TIPT hin. Bei Inkubation von U2OS Zellen mit dem Phosphataseinhibitor Okadainsäure lässt sich TIPT zytoplasmatisch detektieren. Im Gegensatz dazu ist das Protein nach Inkubation mit 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB), einem Inhibitor von Kaseinkinase II, nukleolär detektierbar. Kaseinkinase II phosphoryliert TIPT an Serin 28 *in vitro* (Pitulescu, 2006). Diese Experimente deuteten eine vornehmlich zytoplasmatische Lokalisation von phosphoryliertem TIPT an. Der von Brancorsini verwendete Antikörper ist jedoch nicht phosphospezifisch, daher könnte unter Umständen eine Phosphorylierung an dieser Stelle das Epitop maskieren und dazu führen, dass nur eine Teilmenge des TIPT Proteins vom Antikörper detektiert wird. Weiterhin wurde die Spezifität des Antikörpers in der erwähnten Publikation nicht gezeigt. Die verlässlichste Methode, um die Spezifität eines Antikörpers zu demonstrieren, ist die Kontrolle in Knockout-Gewebe. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die zytoplasmatischen TIPT Signale nur in Wildtyp-Geweben detektierbar sind, nicht aber in *Tipt*^{-/-} Testes. Dies lässt den Schluss zu, dass das TIPT-Signal spezifisch und die Lokalisation des Proteins primär zytoplasmatisch ist. Dieses Resultat geht konform mit den Ergebnissen von Song et al., welcher ebenfalls die zytoplasmatische Lokalisation von TIPT beschreibt. Der in dieser Studie verwendete Antikörper, sowie der von Song et al., wurden gegen das komplette TIPT Protein generiert. Die Tatsache, dass der Antikörper das zytoplasmatische Signal spezifisch nur in Wildtyp-, nicht aber in *Tipt*^{-/-}-Testis detektiert sowie die von Song et al. beschriebene, zytoplasmatische Lokalisation in Rattentestikeln, sprechen für eine primär zytoplasmatische Lokalisation von TIPT in testikulären Zellen.

4.2. Expression von Geminin während der Spermatogenese

Die zelltypspezifische Expression von Geminin während der Spermatogenese wurde bislang noch nicht im murinen Modell analysiert. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Geminin in einigen Zellen des basalen, spermatogonischen Kompartimentes exprimiert wird und durchweg in den frühen, pachytänen Spermatozyten detektierbar ist. Die

subzelluläre Lokalisation hierbei ist gleichmäßig zytoplasmatisch und nukleär verteilt. Während des weiteren Verlaufes der Differenzierung erhöht sich das Geminin-Signal stark, in den diplotänen Spermatozyten erreicht die Expression ihren Höhepunkt. Geminin ist hierbei überwiegend zytoplasmatisch lokalisiert. Während der meiotischen Teilung ist Geminin in der gesamten Zelle zu beobachten, die nukleäre Membran ist in dieser Phase abgebaut. Eine Expression in postmeiotischen Keimzellen konnte nicht detektiert werden. Bis auf die vorliegende Arbeit wurde die Expression von Geminin während der Spermatogenese bislang nur in humanen Testisschnitten untersucht (Eward et al., 2004). Hierbei ergab sich die gleiche Expressionsdynamik für das Protein, ein kontinuierlicher Anstieg der Signalstärke bis zur meiotischen Teilung gefolgt von Abwesenheit des Signals in postmeiotischen Zellen. Jedoch wurde in dieser Studie keine Aussage über die subzelluläre Lokalisation von Geminin während der Spermatozytendifferenzierung getroffen, während es in der Maus sehr deutlich von einer gleichermaßen zytoplasmatisch und nukleären Verteilung in den pachytänen Spermatozyten zu einer stark zytoplasmatischen Lokalisation in diplotänen Spermatozyten kommt. Nach dem Abbau der Kernmembran während der meiotischen Teilung ist Geminin in der gesamten Zelle verteilt, hingegen ist das Protein in den postmeiotischen Spermatischen überhaupt nicht detektierbar. Eward et al. haben in humanen Testisschnitten einen geringen Anteil von Geminin-positiven, spermatogonischen Stammzellen identifizieren können. Dieses Resultat geht konform mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Einige Zellen des basalen Kompartimentes sind eindeutig Geminin-positiv. Um welche Zellen es sich hierbei genau handelt, müsste mit geeigneten Markern analysiert werden. Aufgrund der bekannten Funktion von Geminin in der Replikationslizenzierung ist es aber wahrscheinlich, dass es sich bei den positiven Zellen um mitotisch proliferierende Spermatogonia handelt.

Geminin und TIPT weisen ein teilweise überlappendes Expressionsmuster in prämeiotischen Keimzellen während der murinen Spermatogenese auf. Während Geminin allein in einigen spermatogonischen Zellen exprimiert ist, sind beide Proteine in den pachytänen Spermatozyten koexprimiert. Hierbei erhöht sich das Signal beider Proteine bis zum diplotänen Spermatozytenstadium, wobei beide Proteine hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert sind. Geminin ist nach der meiotischen Teilung nicht mehr detektierbar, die TIPT Expression bleibt jedoch in postmeiotischen Zellen vorhanden und erreicht das stärkste Signal im zytoplasmatischen Lobus der elongierenden Spermatischen und im Flagellum, wo es auch nach dem Abstreifen des Zytoplasmas vom Spermatozoon detektierbar bleibt.

4.3. Generierung von Mäusen mit testisspezifischer Geminin-Deletion

mittels der Stra8-Cre Linie

Das oben beschriebene Expressionsmuster von Geminin während der Spermatogenese lässt auf eine Funktion dieses Proteins in zellulären Vorgängen vor und im Verlauf der Meiose schließen. Die bekannten Funktionen von Geminin in der Zellzyklusregulation und zellulärer Differenzierung lässt gerade im Hinblick auf die prämeiotische DNA- Replikation und Keimzellendifferenzierung eine Rolle dieses Proteins während dieser Prozesse vermuten. Um die Funktion von Geminin während der Spermatogenese zu analysieren, liefert eine Funktionsverluststudie wertvolle Informationen. Der in dieser Arbeit gewählte Ansatz zielte auf die gerichtete Deletion von Geminin in den prämeiotischen, männlichen Keimzellen der Maus. Die hierzu verwendete Strategie bediente sich des Cre/Lox Verfahrens unter Verwendung zweier bereits zu Beginn der Arbeit etablierten Mauslinien: *Gmnn*^{fl/fl} und Stra8-Cre. Da die Stra8-Cre Linie bis dato nicht publiziert wurde, musste vor dem Einkreuzen das Expressionsprofil von Cre-Rekombinase mittels der Z/AP-Reporterlinie überprüft werden. Hierbei standen zwei grundlegende Fragen im Mittelpunkt:

1. Wird die Cre-Rekombinase früh embryonal exprimiert?
2. Lässt sich mit dieser Cre-Linie eine effiziente Geminin-Deletion in den gewünschten Zellen, den prämeiotischen Spermatozyten und nachfolgenden Stadien, erzielen?

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass beim Einsatz der Z/AP Reporterlinie eine spezifische Expression in den Testes erfolgt. In den adulten Tieren sind Spermatogonia, Spermatozyten, Spermatisden und Spermatozoa positiv in der alkalischen Phosphatasefärbung. Dieser Befund ist übereinstimmend mit der publizierten, endogenen Stra8 Expression in männlichen Keimzellen (Zhou et al., 2008) und impliziert, dass die Cre-Rekombinase schon in den spermatogonischen Stammzellen exprimiert ist, da alle folgenden Differenzierungsstadien Rekombinationsereignisse zeigen. Dies ist eine Voraussetzung für die Eignung dieser Cre-Linie im Zusammenhang mit Geminin oder im Allgemeinen mit konditionellen Knockout-Linien für Gene, welche in prämeiotischen Spermatozyten exprimiert werden. Es ist für eine Funktionsverluststudie essentiell erforderlich, dass die Cre-Rekombinase zeitlich vor dem Zielgen exprimiert wird, um jegliche Proteintranslation des Zielgens zu unterbinden. Das starke Signal nach der alkalischen Phosphatase Färbereaktion in den Epididymis ist auch in den Stra8-Cre-negativen Kontrolltieren zu beobachten und

resultiert aus der endogenen, hohen alkalinen Phosphataseaktivität in diesem Gewebe (Allen and Slater, 1957).

Das 1,4 kb Promotorelement, welches der Cre-Rekombinase in diesem Fall vorgeschaltet ist, wurde bereits von einer anderen Gruppe für eine Cre-Linie verwendet und die spatiotemporale Cre-Expression analysiert (Sadate-Ngatchou et al., 2008). Es wurde gezeigt, dass die Cre-Expression nur in männlichen Keimzellen stattfindet, im Gegensatz zur endogenen Stra8 Expression in weiblichen Gonaden, welche zur Zeit der Meiose zwischen E12.5 und E16.5 hochgradig aktiv ist (Menke et al., 2003). Die Analyse von Sadate-Ngatchou et al. basiert jedoch auf einer Transgenlinie, welche aus einer einzigen Gründermaus gezüchtet wurde. Gerade bei Mauslinien, welche durch zufällige genomische Integration des Transgens generiert wurden, kann die Position des Integrationsortes und sein genomischer Kontext starke Variationen auf die Expressionsstärke und Gewebsspezifität der Transgen-Expression auslösen (Rulicke and Hubscher, 2000). Daher blieb unklar, ob die Spezifität der Stra8-Cre Expression für prämeiotische, männliche Keimzellen in der Mauslinie von Sadate-Ngatchou et al. auf dem 1,4 kb Promotorelement allein oder in Kombination mit dem genomischen Integrationsort basiert. Durch die Analyse der in dieser Studie verwendeten, unabhängig generierten Stra8-Cre Linie wurde deutlich, dass das 1,4 kb Promotorelement tatsächlich eine spezifische Cre-Expression in den männlichen Keimzellen der Maus und eine effiziente Rekombination des geflochtenen Lokus in allen Differenzierungsstadien der Spermatogenese der Reporterlinie bewirkt. Weiterhin wurde durch Einkreuzen der *Gmnn*^{fl/fl} Linie festgestellt, dass auch der geflochte *Gmnn*-Lokus relativ effizient in männlichen Keimzellen deletiert wird und dass in weiblichen Gonaden keine Rekombination stattfindet. Diese Befunde gehen konform mit den bereits publizierten Ergebnissen der Stra8-Cre Linie von Sadate-Ngatchou et al. (Sadate-Ngatchou et al., 2008).

Durch Verpaarung der Stra8-Cre Linie mit den *Gmnn*^{fl/fl} Mäusen wurde jedoch auch festgestellt, dass *Gmnn* und Stra8-Cre auf dem gleichen Chromosom lokalisiert sind, da sie immer gekoppelt vererbt wurden. Diese Tatsache verhinderte die Generation von *Gmnn*^{fl/fl}; Stra8-Cre⁺ Tieren, da Stra8-Cre zusammen mit dem Geminin-Wildtyp Allel an die *Gmnn*^{fl/+} Nachkommen weitergegeben wurde. Aus diesem Grund wurde im Verlauf dieser Arbeit versucht, Tiere zu selektionieren, bei welchen während der meiotischen Rekombination durch *crossing over*-Ereignisse das Stra8-Cre Allel auf das homologe Chromosom mit dem geflochtenen *Gmnn* Allel gewechselt hat (oder umgekehrt). Diese Tiere (n=4) ließen jedoch ausnahmslos keine *Gmnn*-Deletion in den Testis feststellen, weder auf Protein-, noch auf DNA Ebene, was den Schluss zulässt, dass in diesen Tieren keine Cre-Rekombinase mehr

exprimiert wird. Mögliche Ursachen hierfür könnte eine Beschädigung des Stra8-Cre Locus beim meiotischen Rekombinationsprozess, zum Beispiel durch ungleiches *crossing over* aufgrund von fehlerhafter Paarung der homologen Chromosomen oder eine epigenetische Stilllegung des Transgen-Lokus während oder nach dem Austausch der genomischen DNA. Die Tiere waren daher für eine weitere Verwendung nicht geeignet, könnten aber im Zusammenhang mit anderen, konditionellen Mauslinien verwendet werden.

4.4. Generierung von Geminin-defizienten Mäusen mittels induzierbarer

Cre-Rekombinase

Geminin ist essentiell erforderlich während des schnellen Zellzyklus der frühen embryonalen Entwicklung (Gonzalez et al., 2006; Hara et al., 2006). In langsamer proliferierenden Zellen scheint die Funktion von Geminin eher redundant zu sein, da Cdt1 selbst auch über das Ubiquitin-Proteosomensystem abgebaut wird (Arias and Walter, 2005). Die Deletion von Geminin in murinen, embryonalen Fibroblastenzellen beispielsweise hat keine phänotypischen Konsequenzen (Aghazadeh Tabrizi, 2009) und auch der Geminin-Knockout im murinen, embryonalen Telencephalon und in lymphoiden Zellen resultierte in milden, phänotypischen Auswirkungen (Karamitros et al., 2010; Schultz et al., 2011; Spella et al., 2011; Uerlings, 2008). Daher wurde eine weitere Cre-Linie eingesetzt, CAGGCre-ERTM, welche die Cre-Rekombinase ubiquitär exprimiert (Hayashi and McMahon, 2002). Das Protein ist durch die Fusion zu einer mutierten Form der ligandenbindenden Domäne des Östrogenrezeptors im Zytoplasma an Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) gebunden. Erst durch die Gabe von Tamoxifen, welches an die mutierte Domäne des Östrogenrezeptors bindet, löst sich das Protein vom Hsp90 und transloziert in den Nukleus (Danielian et al., 1993; Fawell et al., 1990; Littlewood et al., 1995; Mattioni et al., 1994; Picard, 1994). Durch dieses induzierbare, genetische Modell wird eine Deletion von Geminin im gesamten Organismus erreicht. Da bis zu dem Beginn dieser Studie keine essentielle, postnatale Funktion von Geminin *in vivo* gezeigt werden konnte, erschien dieser Ansatz legitim.

Zwei verschiedene Injektionszeitpunkte wurden gewählt, um Geminin in verschiedenen postnatalen Stadien der Mausentwicklung zu deletieren. Zur Maximierung der Rekombinationseffizienz wurde in den früh postnatalen Stadien an drei sequentiellen Tagen injiziert (P1 bis P3) und in den adulten Mäusen an fünf sequentiellen Tagen. Die adulten Männchen wurden nach 40 Tagen, einer Zeitspanne, die etwas länger ist als die Differenzierung von Spermatogonium zu Spermatozoon, analysiert. Die Tiere zeigten

keinerlei phänotypische Auffälligkeiten und obwohl auf genomischer Ebene eine Rekombination mittels PCR nachgewiesen werden konnte, zeigte die Immunhistochemie keine signifikante Reduktion des Geminin-Proteins. Dieser Befund könnte zwei mögliche Ursachen haben. Eine Erklärung wäre, dass die Rekombination bei adulten Mäusen aufgrund der hohen Zellzahl und Gewebsdichte relativ ineffizient und die beobachtete, hohe Proteinmenge von Geminin das Resultat der ineffizienten Deletion ist. Es bestünde aber ebenso die Möglichkeit, dass die Geminin-defizienten Zellen durch Apoptose verlorengehen und die Tubuli seminiferi mit unrekombinierten Zellen repopuliert werden. Dies würde eine essentielle Funktion von Geminin während der Spermatogenese implizieren. Jedoch deuten andere Arbeiten mit der CAGGCre-ERTM Mauslinie auf eine eher geringe Rekombinationseffizienz in einigen Geweben adulter Tiere hin. So wurde schon in der Originalpublikation dieser Cre-Linie eine geringe Rekombinationseffizienz in der Leber adulter Tiere beschrieben (Hayashi and McMahon, 2002) und auch im Darmgewebe kann nur eine mosaikhafte Rekombination beobachtet werden (persönliche Kommunikation mit G. Aghazadeh Tabrizi). Daher sind adulte Tiere für eine genetische Funktionsverluststudie in Testes als ungeeignet zu bewerten.

Die Injektion von P1 bis P3 hatte im Gegensatz dazu deutliche Konsequenzen auf den gesamten Organismus der Maus. Die Hälfte der Tiere in den Würfen zeigte eine Retardierung im Wachstum mit allgemein schwachem und kränklichem Habitus. Nach Genotypisierung wiesen alle retadierten Tiere den Genotyp *Gmn*^{fl/fl}; iCre⁺ auf und starben innerhalb von 14 Tagen postnatal. Bei besonderer Breifütterung war die Erhaltung von drei der zurückgebliebenen Tiere bis P23 möglich, wobei ihre Körpergröße zwischen 50% und 70% der der Kontrolltiere aufwies. Da alle Tiere in dem Wurf mit Tamoxifen injiziert wurden, kann dieser Effekt nicht an dem Injektionsagens liegen. Diese Ergebnisse waren unerwartet, denn sie ließen zum ersten Mal auf eine essentielle Funktion von Geminin in postnatalen Stadien schließen. Durch den Verlust der Erythrozyten bei Geminin-Deletion während der frühen, postnatalen Wachstumsperiode ist der Phänotyp jedoch erklärbar (Shinnick et al., 2010). Da Mäuse in den ersten drei Wochen nach der Geburt eine Reduzierung des Hämoglobins zeigen, ein Phänomen, welches als „Physiologische Anämie“ bekannt ist (Rugh and Somogyi, 1968), resultiert die Geminin-Deletion und die dadurch bedingt Verringerung der Erythrozyten offenbar in einem letalen Phänotyp. Auch Shinnick et al. führten an, dass die Tiere ein schlechtes Wachstum im Vergleich mit den Kontrolltieren zeigen, kränklich aussehen und ein Großteil der Tiere starb ebenfalls im Verlauf des Experiments. Shinnick et al. benutzten zur Deletion von *Gmn* die Mx1-Cre Linie, welche nicht durch Tamoxifen, sondern

Interferongabe induziert wird. Die Rekombination wird jedoch, ähnlich wie durch die in der vorliegenden Arbeit benutzte CAGGCre-ERTM - Cre Linie, in allen Geweben induziert, mit unterschiedlicher Effizienz (Kuhn et al., 1995).

An P23 sind in den Kontrolltieren bereits eine Vielzahl von runden Spermatozoen zu beobachten, in den *Gmnn*^{fl/fl}; iCre⁺ Tieren ist diese Zellpopulation reduziert. Die Apoptoserate ist in diesem Stadium zwischen beiden Gruppen jedoch unverändert, was darauf hindeutet, dass keine meiotischen Kontrollpunkte aktiviert wurden. Dieser Befund lässt vermuten, dass Geminin nicht essentiell erforderlich ist für die meiotische Teilung, sondern dass die Spermatogenese durch die allgemeine Retardierung der Tiere noch nicht so weit fortgeschritten ist wie in den Kontrolltieren. Es lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass sich ein Phänotyp erst in späteren Zeitpunkten nach mehreren Keimzepithelzyklen manifestiert. Dies könnte bei einer Funktion von Geminin in Zellen der mitotisch proliferierenden Stammzellpopulation der Tubuli seminiferi der Fall sein, welche dann im Laufe der Zeit ausdünnen und schließlich in einer Atrophy des Keimzellepithels münden. Eine saubere, genetische Analyse sollte hier mit einer testisspezifischen Cre-Linie durchgeführt werden, da eine globale Geminin-Deletion in postnatalen Mäusen offensichtlich weitreichende, systemische Auswirkungen hat und die Resultate eines Keimzellphänotyps dadurch nicht mehr interpretierbar sind. Für eine weiterführende Analyse eines testisspezifischen Geminin-Knockouts wäre die Verwendung einer charakterisierten, testisspezifischen Cre Linie, wie zum Beispiel Vasa-Cre (Gallardo et al., 2007), die geeignete Vorgehensweise zur Klärung dieser Frage. Mit dieser Cre-Linie wäre neben der Geminin-Deletion in Testes letztendlich auch die Analyse der Spermatogenese in *Gmnn/Tipt*-Doppelmutanten möglich.

4.5. Funktionelle Analyse von *Tipt*^{-/-} Mäusen

Die hohe Expression von TIPT in definierten Zelltypen während der Spermatogenese sowie die leichte, ubiquitäre Expression im gesamten Organismus und die Interaktion mit Proteinen der basalen Transkriptionsmaschinerie deuten auf eine potentielle Funktion in transkriptionellen Prozessen während der Keimzellentwicklung oder sogar im gesamten Organismus hin. Die *in vivo* Relevanz dieser auf *in vitro*-Daten basierenden, postulierten Funktion kann jedoch nur in einem Tiermodell analysiert werden. Daher war ein Ziel der vorliegenden Arbeit, in einem *Tipt*^{-/-} Mausmodell die Konsequenzen der Abwesenheit von TIPT zu untersuchen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass die Abwesenheit von TIPT in keinem offensichtlichen Phänotyp resultiert. Die *Tipt*^{-/-} Tiere sind

normal lebensfähig, fertil, haben keine verkürzte Lebensspanne und zeigen auch sonst keine offensichtlichen Abnormalitäten. TIPT ist also nicht erforderlich für die Entwicklung und Lebensfähigkeit von Mäusen. Eine Redundanz ist leicht erklärbar im Falle von Genfamilien mit verwandter Struktur, in denen die Funktion durch ähnliche Genprodukte aus der gleichen Familie substituiert werden kann. Im Falle von TIPT ist jedoch kein anderes Protein mit einer ähnlichen Sequenz bekannt. Es ist jedoch denkbar, dass ein anderes Genprodukt mit ähnlicher Proteinstruktur die Funktion von TIPT übernehmen kann.

Eine weitere Möglichkeit bei ausbleibenden, phänotypischen Auffälligkeiten der Mutante kann die exklusive Funktion eines Genproduktes in Stresssituationen darstellen. Da ein lebender Organismus ständig mit wechselnden Umweltbedingungen konfrontiert wird, ist es für das Überleben essentiell, auf verschiedenartige Reize adäquat reagieren zu können. Dieses Prinzip gilt für alle Ebenen, von der Verhaltensänderung des Tieres bis zur molekularen Stressantwort in der einzelnen Zelle. Viele Gene, wie zum Beispiel HSF1, sind konstant expremiert, um für den Fall eines eintreffenden Stimulus eine spezifische Reaktion in der Zelle zu vermitteln. Daher ist es in der Analyse einer Mutante ohne offensichtlichen Phänotyp wichtig, die Reaktion unter abnormen Bedingungen zu untersuchen. Die Analyse der Interaktionspartner des Proteins kann dabei evetuell Aufschluss über die Art und Weise der Stimulation geben. Diese Vorgehensweise wurde auch in der vorliegenden Arbeit verfolgt, um eine Funktion von TIPT aufzuklären, welche unter Normalbedingungen verborgen bleibt. Die bisher in der Literatur postulierten Funktionen von TIPT waren weitreichend: von einer Involvierung in die Entfernung des Spermatidenzytoplasmas von den maturierenden Spermien (Song et al., 2006) über die Etablierung des Heterochromatins im Chromozentrum der Spermiden (Brancorsini et al., 2008) bis zur transkriptionellen Stimulation der basalen Transkriptionsmaschinerie (Pitulescu et al., 2009). Die Resultate der phänotypischen Analyse belegen jedoch, dass TIPT für keine dieser Funktionen essentiell erforderlich ist. Die phänotypische Beschreibung der *Tipt*^{-/-} Mauslinie, in Relation mit den oben postulierten Funktionen von TIPT, soll im Folgenden anhand der *in vivo* Daten diskutiert werden.

4.5.1. Analyse der Spermatogenese und genetischer Hintergrund der *Tipt*^{-/-} Mäuse

Die *Tipt*^{-/-} Männchen und Weibchen sind fertil und auch das Paarungsverhalten zeigt im Vergleich mit Kontrolltieren keinerlei Abweichungen. Dieses Ergebnis zeigt, dass sowohl die Spermatogenese in den Männchen, als auch die Follikulogenese der Weibchen in Abwesenheit von TIPT effizient abläuft. Das Schwimmverhalten, Bewegungsmuster und die

Geschwindigkeit der *Tipt^{-/-}* Spermien ist unverändert und die flagellaren Strukturen sind in ihrem Aufbau normal.

Es sind bereits mehrere Mausmodelle in der Literatur beschrieben worden, bei denen eine gezielte Deletion keimzellexprimierter Gene nur einen subtilen Spermatogenese-Phänotyp zeigte oder auch überhaupt keine Auswirkungen auf die Fertilität unter standardisierten Versuchstier-Haltungsbedingungen zeigte (Conrad et al., 2005; Sacher et al., 2007). Es ist weiterhin bekannt, dass eine Reduktion der Spermienzahl bis zu einem Schwellenwert von circa 10% der normalen Spermatozoenzahl keinen Einfluss auf die Fertilität hat (Santti et al., 2005; Zhang et al., 2006). Es wurde schon in mehreren Veröffentlichungen über die verschiedenartige Ausprägung von Phänotypen einzelner Gen-Deletionen in unterschiedlichen genetischen Hintergründen berichtet, insbesondere bei Fertilitäts-Phänotypen. So sind zum Beispiel die Transitionsprotein 2 (*Tnp2*) Knockout Tiere im gemischten Hintergrund C57BL/6Jx129/Sv normal fertil, im reinen 129/Sv Hintergrund jedoch völlig steril (Adham et al., 2001; Cook et al.). Alle Analysen der vorliegenden Arbeit wurden in Mäusen mit einem gemischten, genetischen Hintergrund der Linien 129/Sv x CD1[®] x C57BL/6N durchgeführt. Eine Rückkreuzung in den reinen C57BL/6N Hintergrund findet momentan statt. Die erste Analyse einer Knockout Mauslinie kann oft nur in einem gemischten Hintergrund erfolgen, da ein annähernd reiner, genetischer Hintergrund erst bei 10 Rückkreuzungsgenerationen erreicht ist, was einem Zeitrahmen von ungefähr zwei Jahren entspricht. Daher sollte nach Erreichen der zehnten Generation eine erneute Überprüfung des Phänotyps erfolgen. Es ist auch durchaus möglich, dass die *Tipt^{-/-}* Mauslinie im reinen C57BL/6N Hintergrund einen Defekt in der Spermatogenese und Infertilität unter Normalbedingungen zeigt.

4.5.2. Analyse der Transkription während der Spermatogenese in *Tipt^{-/-}* Mäusen

Eine RNA Analyse von Genen mit bekannter Funktion in der Spermatogenese wurde durchgeführt, um eine potentielle Veränderung in der testisspezifischen Transkription durch die Abwesenheit von TIPT zu detektieren. In keinem der getesteten mRNAs konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Auch *Nfl* zeigt eine unveränderte Expression. Dies ist interessant, da der *Nfl* Promoter *in vitro* transkriptionell stark durch die drei synergistisch wirkenden Proteine TIPT2, Geminin und TRF2 aktiviert wird (Pitulescu et al., 2009). Offenbar hat das Fehlen von TIPT1 und TIPT2 auf die transkriptionelle Regulation dieses Promoters, zumindest in den Testes, unter standardisierten Tierhaltungsmethoden *in vivo* keinen Einfluss. Auch konnten keine veränderten mRNA Mengen für Geminin und

TRF2 festgestellt werden. Dies hätte auf einen kompensatorischen Mechanismus bei der Abwesenheit von TIPT hingedeutet. Wie auf RNA Ebene sind auch die Proteinmengen von Geminin und TBP unverändert. Auch zeigt PCNA, ein in *D. melanogaster* beschriebenes Zielgen von TRF2, keine Deregulation, ebenso die beiden TIPT Interaktionspartner AF10 und HP1 γ (Brancorsini et al., 2008; Pitulescu, 2006). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Verlust von TIPT1 und TIPT2 nicht in einer deutlichen Änderung der Transkription testisspezifischer Gene resultiert und dies wird nicht durch eine kompensatorische Hochregulation von TRF2, TBP oder Geminin ausgeglichen. Dass die Transkription nicht signifikant dereguliert sein kann, zeigt auch die robust ablaufende Spermatogenese und die Fertilität der Mäuse. Eine funktionelle Relevanz von TIPT in der basalen oder testisspezifischen Transkriptionsmaschinerie hätte einen deutlichen Phänotyp in der Entwicklung des Tieres oder in der Keimzellendifferenzierung zur Folge. Es sind bereits diverse Knockout-Mäuse für testisspezifisch hochexprimierte Gene mit mildem oder abwesendem Phänotyp publiziert worden, jedoch ist oft eine funktionelle Redundanz durch verwandte Proteine, zum Beispiel innerhalb der Multiproteinfamilie der CREB/ATF Transkriptionsfaktoren oder der Familie der Dyk Proteinkinasen, wahrscheinlich (Adham et al., 2005; Sacher et al., 2007). Im Falle von TIPT ist jedoch, wie bereits erwähnt, kein weiteres Protein mit einer ähnlicher Aminosäuresequenz bekannt (Brancorsini et al., 2008; Pitulescu et al., 2009; Song et al., 2006).

4.5.3. Formation des Chromozentrums und Chromatinkondensation in *Tipt*^{-/-} Mäusen

In den *Trf2*^{-/-} Testes ist der Arrest in der Spermio-genese in den elongierenden Spermatischen mit zwei deutlichen, morphologischen Defekten assoziiert: Die Fragmentierung des Chromozentrums und die Deformation des Akrosomens (Martianov et al., 2002; Martianov et al., 2001; Zhang et al., 2001). Eine mögliche Erklärung für diesen Phänotyp ist der transkriptionelle Defekt in runden Spermatischen durch den Verlust von TRF2, welcher eine besonders gravierende Auswirkung auf die Transkription von postmeiotisch exprimierten Genen offenbart (Martianov et al., 2001; Zhang et al., 2001). Möglicherweise sind von diesem Defekt auch bisher unidentifizierte Gene betroffen, welche essentielle Funktionen in diesen beiden Prozessen besitzen. Es ist jedoch auch denkbar, dass TRF2 direkt in der Heterochromatin- und Chromozentrumsformation beteiligt ist. Diese Hypothese ist jedoch bisher experimentell noch völlig ungestützt. Brancorsini et al. hatten TIPT als das Protein vorgeschlagen, welches diese Funktion mediiere könnte (Brancorsini et al., 2008). In dem

hierbei formulierten Modell könnte TIPT als molekularer Schalter fungieren, um entweder an TRF2 oder HP1 zu binden und somit funktional zwischen Heterochromatininformation und Transkription zu koordinieren. Diese Hypothese impliziert, dass ein Verlust von TIPT entweder einen transkriptionellen Defekt oder eine abberante Formation des Chromozentrums zur Folge hat oder beides. Da die Transkription von spermatogeneserelevanten Genen in den Mutanten nicht affektiert ist, wurde die Integrität des Chromozentrums in den *Tipt^{-/-}* Spermatiden untersucht. Es konnte keine Fragmentierung dieser nukleären Struktur festgestellt werden, weder in der DAPI Färbung, noch in der Markierung mit Antikörpern gegen H3K9(me)₃. Alle runden Spermatiden zeigten nur ein einzelnes Chromozentrum und waren nicht von den Wildtyp-Spermatiden zu unterscheiden. Dieser Befund zeigt, dass TIPT für beide Prozesse nicht essentiell benötigt wird. Die Knockout-Tiere zeigen keine Phänokopie der *Trf2^{-/-}*-Mäuse, sondern sind fertil, mit normaler Spermatogenese und Wurfgrößen. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Analyse der Spermatogenese in HP1-defizienten Tieren, jedoch existieren dazu keine Studien aus Ermangelung der passenden Mausmodelle (Aucott et al., 2008). Konditionelle Knockout-Linien für HP1 α , β und γ würden weitere Informationen über die Rolle von HP1 Proteinen in der Etablierung und Erhaltung des heterochromatischen Chromozentrums und der Chromatinkondensation während der Spermatogenese sowie deren Auswirkungen auf die Fertilität erbringen.

Das temporale Expressionsfenster von TIPT während der Spermatogenese geht mit der Kondensation des Spermatidenchromatins durch den Austausch von Histonen gegen Transitionsproteine, und später gegen Protamine, einher. Involvierung in diese Prozesse ist durchaus denkbar und würde zur DNA-Bindungsfähigkeit des Proteins passen. Eine reduzierte Kondensation würde jedoch in einer Akridinorange-Färbung nachweisbar sein (Erenpreiss et al., 2001). Dies war jedoch nicht der Fall. Weder Wildtyp- noch *Tipt^{-/-}* -Spermatozoen aus den Epididymis zeigen eine Verschiebung der Emissionswellenlänge in das orange Spektrum nach Exzitation mit UV Licht.

4.5.4. Entfernung des Residualkörpers in *Tipt^{-/-}* Mäusen

Song et al. hatten eine Involvierung von TIPT in die Entfernung des zytoplasmatischen Lobus von den elongierenden Spermatiden in den späten Spermio-genese-stadien postuliert. Obwohl diese Hypothese aufgrund der sehr hohen Konzentration des Proteins im Zytoplasma der elongierenden Spermatiden berechtigt scheint, hielt sie den Befunden in der Funktionsverlustmutante nicht stand. Die Entfernung des zytoplasmatischen Lobus läuft auch

in den *Tipt*^{-/-} Tieren völlig normal ab, es sind in den maturierten Spermien keine Überreste des Zytoplasmas oder vergrößerte, zytoplasmatische Tropfen zu erkennen. Ein Mausmodell, welches einen Defekt in diesem Prozess der Spermiogenese zeigt, ist die Spem1 Mutante (Zheng et al., 2007). In diesen Mäusen sind die Spermien durch das unvollständig entfernte Zytoplasma verformt, was in einer Infertilität der Männchen resultiert. Die Lokalisation von Spem1 ist, genau wie TIPT, sehr hoch im Zytoplasma der elongierenden Spermatiden, im Unterschied dazu jedoch nicht in den Spermatozyten exprimiert. Eine Funktion von TIPT in diesem Prozess hätte also durchaus Auswirkungen auf die Fertilität gehabt, was in den *Tipt*^{-/-}-Mäusen jedoch nicht zu beobachten ist.

4.5.5. Identifizierung von TIPT Interaktionspartnern in Testes

Um Hinweise auf die Funktion von TIPT in der Spermatogenese zu erhalten, wurde eine differentielle Immunpräzipitation durchgeführt. Dabei repräsentierte das massenspektrometrische Profil der *Tipt*^{-/-}-Immunpräzipitation den unspezifischen Hintergrund und wurde vom Profil der *Tipt*^{+/+}-Präzipitation subtrahiert. Somit konnten die ursprünglich 125 identifizierten Proteine auf 7 Interaktionspartner eingegrenzt werden. Unter den 7 Proteinen waren weder TRF2, noch Geminin und keine Isoform von HP1, dafür aber TIPT, was verdeutlicht, dass die Immunpräzipitation funktioniert hat. Es gibt mehrere Möglichkeiten für die Abwesenheit dieser Proteine. Zum einen können gerade schwache Interaktionen durch die Waschschrte nach einer Immunpräzipitation ruptiert werden. Durch die Wahl milderer Waschpuffer könnte man möglicherweise solche Bindungen intakt erhalten, man erhöht damit jedoch auch den unspezifischen Hintergrund. Gerade bei einer massenspektroskopischen Analyse ist dies nicht vorteilhaft, da man sonst eine Maskierung der eigentlichen Interaktionspartner durch die hohen Hintergrundsignale riskiert. Daher sind stringente Waschschrte unter Verlust etwaiger schwacher Bindungspartner vorzuziehen. Ein zweiter Punkt ist die Aussagekraft einer *in vitro* Interaktionsanalyse, wie in der Publikation von Brancorsini et al. gezeigt. Ein Yeast-Two-Hybrid und GST-Pulldown Versuch gibt zwar Auskunft über potentielle Interaktionspartner *in vitro*, die Ergebnisse sind jedoch nicht zwingend auf das physiologische System übertragbar. Im zellulären Kontext existieren komplexe Regulationsmechanismen, posttranslationelle Modifikationen und räumliche Trennung zellulärer Strukturen durch Kompartimentalisierung.

Die in dieser Arbeit identifizierten, potentiellen Interaktionspartner von TIPT lassen sich grob in folgende funktionelle Bereiche kategorisieren:

Chaperon/Proteinfaltungsfunktion (TrIC ϵ , 14-3-3 ζ), Oxidativer Stress (PHGPx), Zentrosomale Funktion (Cep72), Zelluläre Signaltransduktion (14-3-3 ζ), Transkriptionelle Repression (TRIM27), Ubiquitinierung und SUMOylierung (TRIM27).

Die Mehrheit dieser funktionellen Klassen spielt eine Rolle bei zellulären Stressantworten und deutet daher eine Funktion von TIPT in diesen Prozessen an.

4.5.6. Untersuchungen zur Rolle von TIPT in testikulärer Hyperthermie

Um diese Hypothese *in vivo* zu testen, wurde die intrazelluläre Lokalisation von TIPT nach Hitzeschock untersucht. Es wurde nach 15 Minuten keine Translokation in den Nukleus festgestellt, welche auf eine transkriptionelle Aktivierung von Stressgenen hingedeutet hätte. Dieser Mechanismus wurde für HSF1 beschrieben (Satyal and Morimoto, 1998). HSF1 ist unter normalen Bedingungen im Zytoplasma lokalisiert und ist dort durch Bindung an Hitzeschockproteine sequestriert. Bei thermalem Stress wird HSF1 freigesetzt und transloziert in den Nukleus, wo das Protein, je nach physiologischem Kontext, verschiedene Zielgene aktiviert. Speziell in den Testes aktiviert HSF1 nach thermalem Stress proapoptotische Gene (Hayashida et al., 2006; Nakai et al., 2000). Es konnte zwar kein nukleärer Import von TIPT nach Hitzeschock festgestellt werden, jedoch veränderte das Protein deutlich seine zytoplasmatische Verteilung. Während bei Raumtemperatur ein relativ homogenes Signal im Zytoplasma zu sehen ist, akkumuliert TIPT bereits nach 15 Minuten in punktuellen Foci. Besonders deutlich ist dies in den runden Spermatozyten zu beobachten. Die allgemeine Verteilung des Proteins ist auch nicht mehr homogen im gesamten Zytoplasma, sondern eher perinukleär konzentriert. Eine ähnliche Relokalisation nach thermalem Stress in die nukleäre Peripherie ist auch für das proapoptotische *Bcl-2-associated X protein* (Bax) Protein in Spermatozyten beobachtet worden (Yamamoto et al., 2000). Ob TIPT in diesen punktuellen Foci mit bestimmten, zellulären Organellen kolokalisiert, wie zum Beispiel Mitochondrien, ist zu dem jetzigen Zeitpunkt noch unklar. Eine Doppelfärbung für TIPT und Zellorganell-Markern würde Aufschluss über eine mögliche Kolokalisationen nach Hitzeschock geben.

Da thermaler Stress einen Effekt auf die subzelluläre Lokalisation von TIPT hat, wurde *in vivo* die testikuläre Stressantwort 24 Stunden nach Hyperthermie in zwei verschiedenen Wildtyp-Linien, CD1[®]- und C57/B6N (Daten nicht gezeigt) sowie den *Tipt*^{-/-} und *Tipt*^{+/+} Tieren analysiert. Die *Tipt*^{-/-} Tiere zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren eine erhöhte Anzahl von TUNEL-positiven, apoptotischen Zellen, multinukleären Riesenzellen und

disorganisierten, ruptierten Tubuli seminiferi nach Hyperthermie. Offenbar hat die TIPT-Deletion einen Effekt auf die Stressantwort der testikulären Zellen nach Hitzeeinwirkung. Experimente in Ratten- und Mausmodellen, die entweder einer transienten, testikulären Hyperthermie ausgesetzt waren oder bei denen operativ Kryptorchismus induziert wurde, zeigten eine testikuläre Apoptoseantwort in frühen und späten Spermatozyten (pachytän und diplotän) sowie in frühen, runden Spermatiden (Lue et al., 1999). Es wurde zusätzlich die Formation von multinukleären Riesenzellen beobachtet, welche in frühen Zeitpunkten nach Hitzeschock keine apoptotischen Marker zeigten, also TUNEL-negativ waren (Chaki et al., 2005), bei länger andauernder Hyperthermie jedoch auch TUNEL-positive Zellkerne in den Aggregaten enthielten (Kumar et al.). Die Daten lassen die Hypothese zu, dass die Formation von multinukleären Riesenzellen ein schneller, apoptoseunabhängiger Mechanismus zur Entsorgung großer Zellmengen darstellt, welche entweder phagozytiert oder ins Innere der Tubuli seminiferi geleitet und abtransportiert werden. Die Mechanismen, welche zur Entstehung der Riesenzellen führen, sind bis heute ungeklärt. Frühe Beobachtungen beschreiben sie in p53-hypomorphen Mauslinien, wo sie spontan und ohne Hyperthermie auftreten, was durch Defekte in der Meiose in diesen Tieren ausgelöst werden könnte (Rotter et al., 1993). Interessanterweise zeigen die p53^{-/-} Tiere eine verzögerte Stressantwort bei Kryptorchidismus im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Yin et al. konnten im kryptorchiden Mausmodell eine Verzögerung von 3 Tagen in der Apoptoseantwort und Riesenzellformation demonstrieren, was einen p53 unabhängigen, später aktivierten Mechanismus in den Testis nach längerer Stresseinwirkung offenbart (Yin et al., 1998a). Die Arbeit von Ohta et al. konnte durch Transplantationsstudien demonstrieren, dass die p53-abhängige Apoptose speziell prämeiotische und meiotische Zellen betrifft. In postmeiotischen Spermatiden wird der Zelltod offenbar weitgehend p53-unabhängig induziert (Ohta et al., 2003). Da p53 ein zentrales Protein in der stressinduzierten, zellulären Antwort ist, sollten weitere Analysen den p53-Status in den *Tipt*^{-/-} Mäusen nach Hyperthermie untersuchen. Die offensichtliche Deregulation der zellulären Antwort könnte auf einer fehlerhaften p53 Regulation beruhen, welche in einer verstärkten Aktivierung verschiedener apoptotischer Signalwege resultiert und möglicherweise auch die Bildung von Riesenzellen induziert. Ein möglicher Mechanismus hierfür könnte auf den Funktionen von TRIM27 begründet sein. Dieses Protein ist in mehrere zelluläre Prozesse involviert. Während es als transkriptioneller Repressor agieren kann, ist eine weitere Funktion dieses Proteins, als E3 Ubiquitin- und E3 SUMO-Ligase zu fungieren. Es wurde gezeigt, dass TRIM27 in der Lage ist, p53 zu ubiquitinieren und Mdm2 zu SUMOylieren, was eine schnelle Degradierung von p53 zur Folge hat (Chu and Yang, ; Gillot

et al., 2009). Daher wäre ein denkbare Szenario, dass TIPT durch Bindung an TRIM27 diesen Vorgang steuert, und somit die Degradierungskinetik und die zelluläre Proteinmenge von stressrelevanten Faktoren, wie zum Beispiel p53, in Abwesenheit von TIPT dereguliert ist.

Möglicherweise ist jedoch die allgemeine, zelluläre Antwort bei proteotoxischem Stress dereguliert. Dies ist möglicherweise durch die weiteren identifizierten Interaktionskandidaten erklärbar.

Die Bindung von TIPT an Cep72 deutet auf die Kolokalisation von TIPT mit dem Zentrosom hin. Wigley et al. beschrieben eine zentrosomenassoziierte, subzelluläre, perinukleäre Struktur, welche Komponenten der proteosomalen Degradierungsmaschinerie sowie Ubiquitin und Chaperone/Hitzeschockproteine beinhaltet. Diese Struktur schien sich bei proteotoxischem Stress durch missgefaltete Proteine zu vergrößern und weitere, zelluläre Komponenten, welche zur Proteindegredierung benötigt werden, zu rekrutieren. In dieser Arbeit schlugen die Autoren das Zentrosom als zentrale Steuereinheit der Protein-Degradierungsmaschinerie bei zellulärem Stress vor (Wigley et al., 1999). Auch CCT/TrIC ist ein Chaperonin, welches mit diesem Zellorganell assoziiert (Brown et al., 1996) und die Proteinfaltung von einer Vielzahl von Proteinen ermöglicht (Amit et al., 2010; Yam et al., 2008). Daher ist eine Rolle von TIPT bei der proteotoxischen Stressantwort denkbar.

Ein weiterer TIPT-Interaktionskandidat, das Protein 14-3-3 ζ , ist ein bekannter Modulator von stressinduzierten Zellantworten. Es wurden verschiedene Funktionen für dieses Protein berichtet, welche 14-3-3 ζ eine Rolle in der Apoptoseinduktion und Regulation von Zell-Zell-Kontakten (Niemantsverdriet et al., 2008), oxidativer Stressantwort (Zhou et al., 2009) und chaperon-ähnlichen Eigenschaften zuschrieben (Yano et al., 2006). Es könnte ebenfalls in der zellulären, proteotoxischen Stressantwort mit TIPT interagieren. So wurde bei Depletion von 14-3-3 ζ mit siRNA eine Hochregulation von endoplasmatischen Stressproteinen und vermehrter Zelltod in murinen Zellkulturen aus dem Hippokampus beschrieben (Murphy et al., 2008). Da viele 14-3-3 Isoformen während der Spermatogenese exprimiert werden, ist auch eine Funktion in der Stressantwort von Keimzellen denkbar. Ein Zusammenhang zwischen der Regulation von Zell-Zell-Kontakten durch 14-3-3 Proteine während der Keimzellentwicklung scheint zu bestehen (Sun et al., 2009). Dies würde die Spekulation erlauben, dass 14-3-3 Proteine möglicherweise auch in der Formation von multinukleären Riesenzellen involviert sind. In weiteren Studien sollte daher die subzelluläre Lokalisation und die zelltypspezifische Expression von 14-3-3 ζ nach Hyperthermie analysiert werden.

Eine Interaktion von TIPT mit 14-3-3 β ist vernachlässigbar, da diese Isoform nur in Sertoli- und Leydigzellen exprimiert wird (Graf et al., 2011).

PHGPx ist ein weiteres Protein, welches in zelluläre Stressantworten involviert ist. Dieses Selenoprotein wird in drei Isoformen exprimiert: mitochondriales (mPHGPX), zytosolisches (cPHGPx) und nukleäres PHGPx (nPHGPx). Alle drei Isoformen sind in der Lage, die Reduktion von Hydroperoxiden, Lipidhydroperoxiden und Phospholipidhydroperoxide zu katalysieren. Somit ist dieses Enzym ein wichtiges Antioxidant und schützt Zellen vor oxidativem Stress (Mauri et al., 2003; Roveri et al., 2001; Ursini et al., 1997). Die Expression von PHGPx beginnt in den pachytänen Spermatozyten und besitzt das gleiche temporale Expressionsmuster wie TIPT (Puglisi et al., 2005). Weiterhin generiert testikuläre Hyperthermie massiven, oxidativen Stress (Chaki et al., 2005). Möglicherweise hat die Abwesenheit von TIPT einen negativen Einfluss auf die Aktivität von PHGPx und induziert somit eine erhöhte Apoptoseantwort in den testikulären Zellen. Zumindest im Mittelstück des Spermatozoenflagellums wurde die Kollokalisierung von TIPT mit PHGPx bereits gezeigt (Pitulescu, 2006). Der globale Knockout von PHGPx ist früh embryonal letal, eine spezifische Deletion mit einer spermatozytischen Cre-Linie resultiert in Infertilität aufgrund einer starken Reduktion der Spermatozoen (Imai, 2010). Leider ist in der letzten Studie nicht näher beschrieben, wie genau die Spermatogenese gestört ist und ob es zur Induktion von multinukleären Riesenzellen kommt. Eine genauere Analyse des Phänotyps würde wertvolle Einblicke diesbezüglich bringen und eine potentielle Rolle von TIPT in der Funktion von PHGPx aufdecken.

Die Assoziation von TIPT mit verschiedenen Faktoren der zellulären Stressantwort sowie der *in vivo* induzierbare Phänotyp nach Hyperthermie lassen auf eine Funktion von TIPT in stressinduzierten Prozessen schließen. Ob TIPT nur auf Protein-Protein Ebene oder auch durch transkriptionelle Regulation nach Stressinduktion wirkt, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. TIPT transloziert nach Hitzeschock zwar nicht vollständig in den Nukleus, es sind jedoch teilweise nukleäre Signale zu beobachten. Um diesen Sachverhalt zu klären, müssen weitere Studien auf RNA Ebene vor und nach Hitzeschock erfolgen, um die transkriptionelle Antwort von bekannten, stressinduzierten Gene, wie zum Beispiel *Tdag51*, zu untersuchen (Hayashida et al., 2006). Weiterhin sollten in einer erneuten, massenspektrometrischen Analyse die TIPT-Interaktionspartner vor und nach Hitzeschock untersucht werden. Dies würde wertvolle Informationen über die Protein-Protein-Interaktionen von TIPT nach Stressinduktion geben und tiefere Einblicke in den Mechanismus zulassen. Weiterhin wären Studien über die Reaktion auf andere Arten von

Stress im *Tipt*^{-/-}-Mausmodell von Interesse. Die Auswirkungen von ionisierender Strahlung, genotoxischen Agenzien und direkter, oxidativer Stress könnten analysiert werden. Auch TRF2 wurde als stressinduzierter Transkriptionsfaktor beschrieben (Tamura et al., 2006). Eine Ausweitung der Analyse auf den gesamten Organismus könnte zeigen, ob es sich um einen generellen Mechanismus oder eine testisspezifische Funktion von TIPT handelt.

5. Referenzen

- Adham, I.M., Eck, T.J., Mierau, K., Muller, N., Sallam, M.A., Paprotta, I., Schubert, S., Hoyer-Fender, S., and Engel, W. (2005). Reduction of spermatogenesis but not fertility in Creb3l4-deficient mice. *Mol Cell Biol* 25, 7657-7664.
- Adham, I.M., Nayernia, K., Burkhardt-Gottges, E., Topaloglu, O., Dixkens, C., Holstein, A.F., and Engel, W. (2001). Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2). *Mol Hum Reprod* 7, 513-520.
- Aghazadeh Tabrizi, G. (2009). The Role of Geminin in the Mouse Embryonic Fibroblast (Göttingen, Georg-August-University).
- Allen, J.M., and Slater, J.J. (1957). A Chemical and Histochemical Study of Alkaline Phosphatase and Aliesterase in the Epididymis of Normal and Castrate Mice. *Anatomical Record* 129, 255-&.
- Amit, M., Weisberg, S.J., Nadler-Holly, M., McCormack, E.A., Feldmesser, E., Kaganovich, D., Willison, K.R., and Horovitz, A. Equivalent mutations in the eight subunits of the chaperonin CCT produce dramatically different cellular and gene expression phenotypes. *J Mol Biol* 401, 532-543.
- Arias, E.E., and Walter, J.C. (2005). Replication-dependent destruction of Cdt1 limits DNA replication to a single round per cell cycle in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev* 19, 114-126.
- Aucott, R., Bullwinkel, J., Yu, Y., Shi, W., Billur, M., Brown, J.P., Menzel, U., Kioussis, D., Wang, G.Z., Reisert, I., *et al.* (2008). HP1-beta is required for development of the cerebral neocortex and neuromuscular junctions. *Journal of Cell Biology* 183, 597-606.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410, 120-124.
- Bellve, A.R., Cavicchia, J.C., Millette, C.F., O'Brien, D.A., Bhatnagar, Y.M., and Dym, M. (1977). Spermatogenic Cells of Prepuberal Mouse - Isolation and Morphological Characterization. *Journal of Cell Biology* 74, 68-85.
- Benjamin, J.M., Torke, S.J., Demeler, B., and McGarry, T.J. (2004). Geminin has dimerization, Cdt1-binding, and destruction domains that are required for biological activity. *J Biol Chem* 279, 45957-45968.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Blendy, J.A., Kaestner, K.H., Weinbauer, G.F., Nieschlag, E., and Schutz, G. (1996). Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. *Nature* 380, 162-165.
- Boos, A., Lee, A., Thompson, D.M., and Kroll, K.L. (2006). Subcellular translocation signals regulate Geminin activity during embryonic development. *Biol Cell* 98, 363-375.
- Brancorsini, S., Davidson, I., and Sassone-Corsi, P. (2008). TIPT, a male germ cell-specific partner of TRF2, is chromatin-associated and interacts with HP1. *Cell Cycle* 7, 1415-1422.

- Brown, C.R., Doxsey, S.J., Hong-Brown, L.Q., Martin, R.L., and Welch, W.J. (1996). Molecular chaperones and the centrosome. A role for TCP-1 in microtubule nucleation. *J Biol Chem* 271, 824-832.
- Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195-203.
- Burnicka-Turek, O., Shirneshan, K., Paprotta, I., Grzmil, P., Meinhardt, A., Engel, W., and Adham, I.M. (2009). Inactivation of insulin-like factor 6 disrupts the progression of spermatogenesis at late meiotic prophase. *Endocrinology* 150, 4348-4357.
- Chaki, S.P., Misro, M.M., Ghosh, D., Gautam, D.K., and Srinivas, M. (2005). Apoptosis and cell removal in the cryptorchid rat testis. *Apoptosis* 10, 395-405.
- Chohan, K.R., Griffin, J.T., and Carrell, D.T. (2004). Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. *Andrologia* 36, 321-326.
- Chu, Y., and Yang, X. SUMO E3 ligase activity of TRIM proteins. *Oncogene* 30, 1108-1116.
- Chu, Y., and Yang, X. (2010). SUMO E3 ligase activity of TRIM proteins. *Oncogene* 30, 1108-1116.
- Conrad, M., Moreno, S.G., Sinowatz, F., Ursini, F., Kolle, S., Roveri, A., Brielmeier, M., Wurst, W., Maiorino, M., and Bornkamm, G.W. (2005). The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Molecular and Cellular Biology* 25, 7637-7644.
- Cook, M.S., Munger, S.C., Nadeau, J.H., and Capel, B. Regulation of male germ cell cycle arrest and differentiation by DND1 is modulated by genetic background. *Development* 138, 23-32.
- Cooper, T.G. (2007). Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian J Androl* 9, 533-539.
- Cooper, T.G., and Yeung, C.H. (2003). Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microscopy Research and Technique* 61, 28-38.
- Danielian, P.S., White, R., Hoare, S.A., Fawell, S.E., and Parker, M.G. (1993). Identification of residues in the estrogen receptor that confer differential sensitivity to estrogen and hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol* 7, 232-240.
- Dantonel, J.C., Quintin, S., Lakatos, L., Labouesse, M., and Tora, L. (2000). TBP-like factor is required for embryonic RNA polymerase II transcription in *C. elegans*. *Mol Cell* 6, 715-722.
- De Marco, V., Gillespie, P.J., Li, A., Karantzelis, N., Christodoulou, E., Klompmaker, R., van Gerwen, S., Fish, A., Petoukhov, M.V., Iliou, M.S., *et al.* (2009). Quaternary structure of the human Cdt1-Geminin complex regulates DNA replication licensing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19807-19812.

- De Rooij, D.G. (1998). Stem cells in the testis. *International Journal of Experimental Pathology* 79, 67-80.
- Del Bene, F., Tessmar-Raible, K., and Wittbrodt, J. (2004). Direct interaction of geminin and Six3 in eye development. *Nature* 427, 745-749.
- Dho, S.H., and Kwon, K.S. (2003). The ret finger protein induces apoptosis via its RING finger-B box-coiled-coil motif. *Journal of Biological Chemistry* 278, 31902-31908.
- Erenpreiss, J., Bars, J., Lipatnikova, V., Erenpreisa, J., and Zalkalns, J. (2001). Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. *Journal of Andrology* 22, 45-53.
- Eward, K.L., Obermann, E.C., Shreeram, S., Loddo, M., Fanshawe, T., Williams, C., Jung, H.I., Prevost, A.T., Blow, J.J., Stoeber, K., *et al.* (2004). DNA replication licensing in somatic and germ cells. *Journal of Cell Science* 117, 5875-5886.
- Fawell, S.E., Lees, J.A., White, R., and Parker, M.G. (1990). Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. *Cell* 60, 953-962.
- Ferenbach, A., Li, A., Brito-Martins, M., and Blow, J.J. (2005). Functional domains of the *Xenopus* replication licensing factor Cdt1. *Nucleic Acids Res* 33, 316-324.
- Fimia, F.M., De Cesare, D., Morlon, A., and Corsi, P.S. (1999). The LIM-only protein ACT activates CREM. *M S-Med Sci* 15, 440-441.
- Gallardo, T., Shirley, L., John, G.B., and Castrillon, D.H. (2007). Generation of a germ cell-specific mouse transgenic Cre line, Vasa-Cre. *Genesis* 45, 413-417.
- Gillot, I., Matthews, C., Puel, D., Vidal, F., and Lopez, P. (2009). Ret Finger Protein: An E3 Ubiquitin Ligase Juxtaposed to the XY Body in Meiosis. *Int J Cell Biol* 2009, 524858.
- Gonzalez, M.A., Tachibana, K.E., Adams, D.J., van der Weyden, L., Hemberger, M., Coleman, N., Bradley, A., and Laskey, R.A. (2006). Geminin is essential to prevent endoreduplication and to form pluripotent cells during mammalian development. *Genes Dev* 20, 1880-1884.
- Graf, M., Brobeil, A., Sturm, K., Steger, K., and Wimmer, M. (2011). 14-3-3 beta in the healthy and diseased male reproductive system. *Human Reproduction* 26, 59-66.
- Gross, L. (2006). Resolving the family tree of placental mammals. *PLoS Biol* 4, e111.
- Hara, K., Nakayama, K.I., and Nakayama, K. (2006). Geminin is essential for the development of preimplantation mouse embryos. *Genes Cells* 11, 1281-1293.
- Hayashi, S., and McMahon, A.P. (2002). Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: A tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Developmental Biology* 244, 305-318.
- Hayashida, N., Inouye, S., Fujimoto, M., Tanaka, Y., Izu, H., Takaki, E., Ichikawa, H., Rho, J., and Nakai, A. (2006). A novel HSF1-mediated death pathway that is suppressed by heat shock proteins. *Embo Journal* 25, 4773-4783.

- Hermo, L., Pelletier, R.M., Cyr, D.C., and Smith, C.E. (2010a). Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by Testicular Germ Cells. Part 1: Background to Spermatogenesis, Spermatogonia, and Spermatocytes. *Microscopy Research and Technique* 73, 243-278.
- Hermo, L., Pelletier, R.M., Cyr, D.G., and Smith, C.E. (2010b). Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by Testicular Germ Cells. Part 2: Changes in Spermatid Organelles Associated With Development of Spermatozoa. *Microscopy Research and Technique* 73, 279-319.
- Hermo, L., Pelletier, R.M., Cyr, D.G., and Smith, C.E. (2010c). Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by Testicular Germ Cells. Part 3: Developmental Changes in Spermatid Flagellum and Cytoplasmic Droplet and Interaction of Sperm With the Zona Pellucida and Egg Plasma Membrane. *Microscopy Research and Technique* 73, 320-363.
- Hermo, L., Pelletier, R.M., Cyr, D.G., and Smith, C.E. (2010d). Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by Testicular Germ Cells. Part 4: Intercellular Bridges, Mitochondria, Nuclear Envelope, Apoptosis, Ubiquitination, Membrane/Voltage-Gated Channels, Methylation/Acetylation, and Transcription Factors. *Microscopy Research and Technique* 73, 364-408.
- Hermo, L., Pelletier, R.M., Cyr, D.G., and Smith, C.E. (2010e). Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by Testicular Germ Cells. Part 5: Intercellular Junctions and Contacts Between Germs Cells and Sertoli Cells and Their Regulatory Interactions, Testicular Cholesterol, and Genes/Proteins Associated With More Than One Germ Cell Generation. *Microscopy Research and Technique* 73, 409-494.
- Hochheimer, A., Zhou, S., Zheng, S., Holmes, M.C., and Tjian, R. (2002). TRF2 associates with DREF and directs promoter-selective gene expression in *Drosophila*. *Nature* 420, 439-445.
- Imai, H. New Strategy of Functional Analysis of PHGPx Knockout Mice Model Using Transgenic Rescue Method and Cre-LoxP System. *J Clin Biochem Nutr* 46, 1-13.
- Imai, H. (2010). New Strategy of Functional Analysis of PHGPx Knockout Mice Model Using Transgenic Rescue Method and Cre-LoxP System. *J Clin Biochem Nutr* 46, 1-13.
- Karamitros, D., Kotantaki, P., Lygerou, Z., Veiga-Fernandes, H., Pachnis, V., Kioussis, D., and Taraviras, S. Differential geminin requirement for proliferation of thymocytes and mature T cells. *J Immunol* 184, 2432-2441.
- Kleisner, K., Ivell, R., and Flegr, J. (2010). The evolutionary history of testicular externalization and the origin of the scrotum. *J Biosciences* 35, 27-37.
- Kotaja, N., Kimmins, S., Brancorsini, S., Hentsch, D., Vonesch, J.L., Davidson, I., Parvinen, M., and Sassone-Corsi, P. (2004). Preparation, isolation and characterization of stage-specific spermatogenic cells for cellular and molecular analysis. *Nature Methods* 1, 249-254.
- Kroll, K.L., Salic, A.N., Evans, L.M., and Kirschner, M.W. (1998). Geminin, a neuralizing molecule that demarcates the future neural plate at the onset of gastrulation. *Development* 125, 3247-3258.

- Kühn-Hölsken, E. (2006). Massenspektrometrische Charakterisierung von Protein-Protein und Protein-RNA-Wechselwirkungen im humanen Spleißosom (Marburg, Philipps-Universität).
- Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M., and Rajewsky, K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science* 269, 1427-1429.
- Kumar, V., Misro, M.M., and Datta, K. Simultaneous Accumulation of Hyaluronan Binding Protein 1 (HABP1/p32/gC1qR) and Apoptotic Induction of Germ Cells in Cryptorchid Testis. *J Androl*.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10, 203-209.
- Lee, C., Hong, B., Choi, J.M., Kim, Y., Watanabe, S., Ishimi, Y., Enomoto, T., Tada, S., and Cho, Y. (2004). Structural basis for inhibition of the replication licensing factor Cdt1 by geminin. *Nature* 430, 913-917.
- Lee, E.C., Yu, D., Martinez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D.A., Court, D.L., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2001). A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* 73, 56-65.
- Li, A., and Blow, J.J. (2004). Non-proteolytic inactivation of geminin requires CDK-dependent ubiquitination. *Nat Cell Biol* 6, 260-267.
- Lian, G., and Enders, G.C. (1994). Entactin ultrastructural immunolocalization in the basal laminae of mouse seminiferous tubules and with only subtle changes following hypophysectomy. *J Androl* 15, 52-60.
- Lim, J.W., Hummert, P., Mills, J.C., and Kroll, K.L. (2011). Geminin cooperates with Polycomb to restrain multi-lineage commitment in the early embryo. *Development* 138, 33-44.
- Littlewood, T.D., Hancock, D.C., Danielian, P.S., Parker, M.G., and Evan, G.I. (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res* 23, 1686-1690.
- Liu, P., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2003). A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res* 13, 476-484.
- Lobe, C.G., Koop, K.E., Kreppner, W., Lomeli, H., Gertsenstein, M., and Nagy, A. (1999). Z/AP, a double reporter for Cre-mediated recombination. *Developmental Biology* 208, 281-292.
- Lue, Y.H., Hikim, A.P.S., Swerdloff, R.S., Im, P., Taing, K.S., Bui, T., Leung, A., and Wang, C. (1999). Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: Role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology* 140, 1709-1717.
- Luo, L. (2004). Inhibition of Hox Function by the Cell Cycle Regulator Geminin (Göttingen, Georg-August Universität).

- Luo, L., Uerlings, Y., Happel, N., Asli, N.S., Knoetgen, H., and Kessel, M. (2007). Regulation of geminin functions by cell cycle-dependent nuclear-cytoplasmic shuttling. *Mol Cell Biol* 27, 4737-4744.
- Luo, L.F., Yang, X.P., Takihara, Y., Knoetgen, H., and Kessel, M. (2004). The cell-cycle regulator geminin inhibits Hox function through direct and polycomb-mediated interactions. *Nature* 427, 749-753.
- Lutzmann, M., Maiorano, D., and Mechali, M. (2006). A Cdt1-geminin complex licenses chromatin for DNA replication and prevents rereplication during S phase in *Xenopus*. *EMBO J* 25, 5764-5774.
- Maekawa, M., Kamimura, K., and Nagano, T. (1996). Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol* 59, 1-13.
- Marieb, E. (2008). *Essentials of Human Anatomy and Physiology*, 9th edn (Benjamin Cummings).
- Martianov, I., Brancorsini, S., Gansmuller, A., Parvinen, M., Davidson, I., and Sassone-Corsi, P. (2002). Distinct functions of TBP and TLF/TRF2 during spermatogenesis: requirement of TLF for heterochromatic chromocenter formation in haploid round spermatids. *Development* 129, 945-955.
- Martianov, I., Fimia, G.M., Dierich, A., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P., and Davidson, I. (2001). Late arrest of spermiogenesis and germ cell apoptosis in mice lacking the TBP-like TLF/TRF2 gene. *Mol Cell* 7, 509-515.
- Mattioni, T., Louvion, J.F., and Picard, D. (1994). Regulation of protein activities by fusion to steroid binding domains. *Methods Cell Biol* 43 Pt A, 335-352.
- Mauri, P., Benazzi, L., Flohe, L., Maiorino, M., Pietta, P.G., Pilawa, S., Roveri, A., and Ursini, F. (2003). Versatility of selenium catalysis in PHGPx unraveled by LC/ESI-MS/MS. *Biol Chem* 384, 575-588.
- McGarry, T.J., and Kirschner, M.W. (1998). Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell* 93, 1043-1053.
- Melixetian, M., Ballabeni, A., Masiero, L., Gasparini, P., Zamponi, R., Bartek, J., Lukas, J., and Helin, K. (2004). Loss of Geminin induces rereplication in the presence of functional p53. *J Cell Biol* 165, 473-482.
- Menke, D.B., Koubova, J., and Page, D.C. (2003). Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. *Developmental Biology* 262, 303-312.
- Mihaylov, I.S., Kondo, T., Jones, L., Ryzhikov, S., Tanaka, J., Zheng, J., Higa, L.A., Minamino, N., Cooley, L., and Zhang, H. (2002). Control of DNA replication and chromosome ploidy by geminin and cyclin A. *Mol Cell Biol* 22, 1868-1880.
- Moore, C.R. (1926). The biology of the mammalian testis and scrotum. *Q Rev Biol* 1, 4-50.
- Mülhardt, C. (2000). *Der Experimentator: Molekularbiologie* (Spektrum Akademischer Verlag).

- Muller, F., Lakatos, L., Dantonel, J., Strahle, U., and Tora, L. (2001). TBP is not universally required for zygotic RNA polymerase II transcription in zebrafish. *Curr Biol* *11*, 282-287.
- Murphy, N., Bonner, H.P., Ward, M.W., Murphy, B.M., Prehn, J.H., and Henshall, D.C. (2008). Depletion of 14-3-3 zeta elicits endoplasmic reticulum stress and cell death, and increases vulnerability to kainate-induced injury in mouse hippocampal cultures. *J Neurochem* *106*, 978-988.
- Nakai, A., Suzuki, M., and Tanabe, M. (2000). Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1. *Embo Journal* *19*, 1545-1554.
- Nantel, F., and SassoneCorsi, P. (1996). A major role for CREM in spermatogenesis. *M S-Med Sci* *12*, 840-841.
- Nebel, B.R., Hackett, E.M., and Amarose, A.P. (1961). Calendar of Gametogenic Development in Prepuberal Male Mouse. *Science* *134*, 832-&.
- Niemantsverdriet, M., Wagner, K., Visser, M., and Backendorf, C. (2008). Cellular functions of 14-3-3 zeta in apoptosis and cell adhesion emphasize its oncogenic character. *Oncogene* *27*, 1315-1319.
- Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T., and Nurse, P. (2000). The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature* *404*, 625-628.
- Oakberg, E.F. (1971). Spermatogonial Stem-Cell Renewal in Mouse. *Anatomical Record* *169*, 515-&.
- Ohta, H., Aizawa, S., and Nishimune, Y. (2003). Functional analysis of the p53 gene in apoptosis induced by heat stress or loss of stem cell factor signaling in mouse male germ cells. *Biology of Reproduction* *68*, 2249-2254.
- Osoegawa, K., Tateno, M., Woon, P.Y., Frengen, E., Mammoser, A.G., Catanese, J.J., Hayashizaki, Y., and de Jong, P.J. (2000). Bacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis. *Genome Res* *10*, 116-128.
- Papanayotou, C., Mey, A., Birot, A.M., Saka, Y., Boast, S., Smith, J.C., Samarut, J., and Stern, C.D. (2008). A mechanism regulating the onset of Sox2 expression in the embryonic neural plate. *PLoS Biol* *6*, e2.
- Picard, D. (1994). Regulation of protein function through expression of chimaeric proteins. *Curr Opin Biotechnol* *5*, 511-515.
- Pitulescu, M.E. (2006). Regulation of the Basic Transcriptional Machinery by the Interacting Proteins TIPT and Geminin (Göttingen, Georg-August-Universität).
- Pitulescu, M.E., Teichmann, M., Luo, L., and Kessel, M. (2009). TIPT2 and geminin interact with basal transcription factors to synergize in transcriptional regulation. *BMC Biochem* *10*, 16.
- Pointud, J.C., Mengus, G., Brancorsini, S., Monaco, L., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P., and Davidson, I. (2003). The intracellular localisation of TAF7L, a paralogue of transcription factor TRID subunit TAF7, is developmentally regulated during male germ-cell differentiation. *Journal of Cell Science* *116*, 1847-1858.

- Puglisi, R., Tramer, F., Carlomagno, G., Gandini, L., Panfili, E., Stefanini, M., Lenzi, A., Mangia, F., and Boitani, C. (2005). PHGPx in spermatogenesis: how many functions? *Contraception* 72, 291-293.
- Quinn, L.M., Herr, A., McGarry, T.J., and Richardson, H. (2001). The *Drosophila* Geminin homolog: roles for Geminin in limiting DNA replication, in anaphase and in neurogenesis. *Genes Dev* 15, 2741-2754.
- Riedel, D., Antonin, W., Fernandez-Chacon, R., de Toledo, G.A., Jo, T., Geppert, M., Valentijn, J.A., Valentijn, K., Jamieson, J.D., Sudhof, T.C., *et al.* (2002). Rab3D is not required for exocrine exocytosis but for maintenance of normally sized secretory granules. *Molecular and Cellular Biology* 22, 6487-6497.
- Rockett, J.C., Mapp, F.L., Garges, J.B., Luft, J.C., Mori, C., and Dix, D.J. (2001). Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biology of Reproduction* 65, 229-239.
- Rotter, V., Schwartz, D., Almon, E., Goldfinger, N., Kapon, A., Meshorer, A., Donehower, L.A., and Levine, A.J. (1993). Mice with Reduced Levels of P53 Protein Exhibit the Testicular Giant-Cell Degenerative Syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 9075-9079.
- Roveri, A., Ursini, F., Flohe, L., and Maiorino, M. (2001). PHGPx and spermatogenesis. *Biofactors* 14, 213-222.
- Rugh, R., and Somogyi, C. (1968). Pre- and Postnatal Normal Mouse Blood Cell Counts. *P Soc Exp Biol Med* 127, 1267-&.
- Rulicke, T., and Hubscher, U. (2000). Germ line transformation of mammals by pronuclear microinjection. *Experimental Physiology* 85, 589-601.
- Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha Hikim, A.P., and Clegg, E.D. (1990). *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis* (Clearwater, Fl . , Cache River Press).
- Sacher, F., Moller, C., Bone, W., Gottwald, U., and Fritsch, M. (2007). The expression of the testis-specific Dyrk4 kinase is highly restricted to step 8 spermatids but is not required for male fertility in mice. *Molecular and Cellular Endocrinology* 267, 80-88.
- Sadate-Ngatchou, P.I., Payne, C.J., Dearth, A.T., and Braun, R.E. (2008). Cre Recombinase Activity Specific to Postnatal, Premeiotic Male Germ Cells in Transgenic Mice. *Genesis* 46, 738-742.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Santti, H., Mikkonen, L., Anand, A., Hirvonen-Santti, S., Toppari, J., Panhuysen, M., Vauti, F., Perera, M., Corte, G., Wurst, W., *et al.* (2005). Disruption of the murine PIASx gene results in reduced testis weight. *J Mol Endocrinol* 34, 645-654.
- Satyral, S.H., and Morimoto, R.I. (1998). Biochemical events in the activation and attenuation of the heat shock transcriptional response. *Journal of Biosciences* 23, 303-311.

- Schmidt, C. (2010). Absolute and relative quantification of proteins in large protein-RNA assemblies by mass spectrometry (Göttingen, Georg-August Universität).
- Schultz, K.M., Banisadr, G., Lastra, R.O., McGuire, T., Kessler, J.A., Miller, R.J., and McGarry, T.J. (2011). Geminin-deficient neural stem cells exhibit normal cell division and normal neurogenesis. *PLoS One* 6, e17736.
- Schwenk, F., Baron, U., and Rajewsky, K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res* 23, 5080-5081.
- Seo, S., Baye, L.M., Schulz, N.P., Beck, J.S., Zhang, Q., Slusarski, D.C., and Sheffield, V.C. (2010). BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1488-1493.
- Seo, S., Herr, A., Lim, J.W., Richardson, G.A., Richardson, H., and Kroll, K.L. (2005). Geminin regulates neuronal differentiation by antagonizing Brg1 activity. *Genes Dev* 19, 1723-1734.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858.
- Shimono, Y., Murakami, H., Hasegawa, Y., and Takahashi, M. (2000). RET finger protein is a transcriptional repressor and interacts with enhancer of polycomb that has dual transcriptional functions. *Journal of Biological Chemistry* 275, 39411-39419.
- Shinnick, K.M., Eklund, E.A., and McGarry, T.J. (2010). Geminin deletion from hematopoietic cells causes anemia and thrombocytosis in mice. *J Clin Invest* 120, 4303-4315.
- Short, R.V. (1997). The testis: the witness of the mating system, the site of mutation and the engine of desire. *Acta Paediatr* 86, 3-7.
- Song, X.X., Li, Y.C., Shi, Y.Q., Hu, X.Q., Hu, Z.Y., Han, C.S., and Liu, Y.X. (2006). Cloning and characterization of a novel spermiogenesis-related gene, T6441, in rat testis. *Front Biosci* 11, 143-150.
- Spella, M., Britz, O., Kotantaki, P., Lygerou, Z., Nishitani, H., Ramsay, R.G., Flordellis, C., Guillemot, F., Mantamadiotis, T., and Taraviras, S. (2007). Licensing regulators Geminin and Cdt1 identify progenitor cells of the mouse CNS in a specific phase of the cell cycle. *Neuroscience* 147, 373-387.
- Spella, M., Kyrousi, C., Kritikou, E., Stathopoulou, A., Guillemot, F., Kioussis, D., Pachnis, V., Lygerou, Z., and Taraviras, S. (2011). Geminin Regulates Cortical Progenitor Proliferation and Differentiation. *Stem Cells*.
- Sun, S., Wong, E.W., Li, M.W., Lee, W.M., and Cheng, C.Y. (2009). 14-3-3 and its binding partners are regulators of protein-protein interactions during spermatogenesis. *J Endocrinol* 202, 327-336.
- Tada, S., Li, A., Maiorano, D., Mechali, M., and Blow, J.J. (2001). Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin. *Nat Cell Biol* 3, 107-113.

- Tamura, T.A., Park, K.A., Tanaka, Y., and Suenaga, Y. (2006). TATA-Binding protein-related factor 2 is localized in the cytoplasm of mammalian cells and much of it migrates to the nucleus in response to genotoxic agents. *Mol Cells* 22, 203-209.
- Tortora, G.J., and Grabowski, S.R. (2000). *Principles of Anatomy & Physiology* (John Wiley & Sons Inc).
- Uerlings, Y. (2008). Die Funktion von Geminin beim Übergang von Neuro- zu Gliogenese in der Maus (Göttingen, Georg-August Universität).
- Ursini, F., Maiorino, M., and Roveri, A. (1997). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx): more than an antioxidant enzyme? *Biomed Environ Sci* 10, 327-332.
- Veenstra, G.J., Weeks, D.L., and Wolffe, A.P. (2000). Distinct roles for TBP and TBP-like factor in early embryonic gene transcription in *Xenopus*. *Science* 290, 2312-2315.
- Warming, S., Costantino, N., Court, D.L., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2005). Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res* 33, e36.
- Wigley, W.C., Fabunmi, R.P., Lee, M.G., Marino, C.R., Muallem, S., DeMartino, G.N., and Thomas, P.J. (1999). Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *J Cell Biol* 145, 481-490.
- Wohlschlegel, J.A., Dwyer, B.T., Dhar, S.K., Cvetic, C., Walter, J.C., and Dutta, A. (2000). Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1. *Science* 290, 2309-2312.
- Yam, A.Y., Xia, Y., Lin, H.T., Burlingame, A., Gerstein, M., and Frydman, J. (2008). Defining the TRiC/CCT interactome links chaperonin function to stabilization of newly made proteins with complex topologies. *Nat Struct Mol Biol* 15, 1255-1262.
- Yamamoto, C.M., Hikim, A.P.S., Shapiro, B., Huynh, P.N., Lue, Y., Salameh, W.A., Wang, C., and Swerdloff, R.S. (2000). Redistribution of Bax is an early step in an apoptotic pathway leading to germ cell death triggered by mild testicular hyperthermia. *Journal of Investigative Medicine* 48, 13a-13a.
- Yang, V.S., Carter, S.A., Hyland, S.J., Tachibana-Konwalski, K., Laskey, R.A., and Gonzalez, M.A. (2011). Geminin escapes degradation in G1 of mouse pluripotent cells and mediates the expression of Oct4, Sox2, and Nanog. *Curr Biol* 21, 692-699.
- Yano, M., Nakamuta, S., Wu, X., Okumura, Y., and Kido, H. (2006). A novel function of 14-3-3 protein: 14-3-3zeta is a heat-shock-related molecular chaperone that dissolves thermal-aggregated proteins. *Mol Biol Cell* 17, 4769-4779.
- Yin, Y., DeWolf, W.C., and Morgentaler, A. (1998a). Experimental cryptorchidism induces testicular germ cell apoptosis by p53-dependent and -independent pathways in mice. *Biol Reprod* 58, 492-496.
- Yin, Y.H., DeWolf, W.C., and Morgentaler, A. (1997). p53 is associated with the nuclear envelope in mouse testis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 235, 689-694.

- Yin, Y.Z., Stahl, B.C., DeWolf, W.C., and Morgentaler, A. (1998b). p53-mediated germ cell quality control in spermatogenesis. *Developmental Biology* 204, 165-171.
- Zhang, C., Yeh, S., Chen, Y.T., Wu, C.C., Chuang, K.H., Lin, H.Y., Wang, R.S., Chang, Y.J., Mendis-Handagama, C., Hu, L., *et al.* (2006). Oligozoospermia with normal fertility in male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17718-17723.
- Zhang, D., Penttila, T.L., Morris, P.L., Teichmann, M., and Roeder, R.G. (2001). Spermiogenesis deficiency in mice lacking the Trf2 gene. *Science* 292, 1153-1155.
- Zheng, H.L., Stratton, C.J., Morozumi, K., Jin, J.L., Yanagimachi, R., and Yan, W. (2007). Lack of Spem1 causes aberrant cytoplasm removal, sperm deformation, and male infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 6852-6857.
- Zhou, J., Shao, Z., Kerkela, R., Ichijo, H., Muslin, A.J., Pombo, C., and Force, T. (2009). Serine 58 of 14-3-3zeta is a molecular switch regulating ASK1 and oxidant stress-induced cell death. *Mol Cell Biol* 29, 4167-4176.
- Zhou, Q., Nie, R., Li, Y., Friel, P., Mitchell, D., Hess, R.A., Small, C., and Griswold, M.D. (2008). Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) in spermatogenic cells induced by retinoic acid: An in vivo study in vitamin A-sufficient postnatal murine testes. *Biology of Reproduction* 79, 35-42.
- Zhu, W., Chen, Y., and Dutta, A. (2004). Rereplication by depletion of geminin is seen regardless of p53 status and activates a G2/M checkpoint. *Mol Cell Biol* 24, 7140-7150.
- Zhu, W., and Depamphilis, M.L. (2009). Selective killing of cancer cells by suppression of geminin activity. *Cancer Res* 69, 4870-4877.

7. Anhang

7.1. Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name: Alexander Klimke
Anschrift: Görlitzer Str. 47
37085 Göttingen
Deutschland
E-Mail: aklimke@gwdg.de
Geburtsdatum/-ort: 27.02.1979 in Hannover
Familienstand: ledig

Schulbildung

1985-1989 Grundschule Bennigsen
1989-1991 Orientierungsstufe Springe
1991-1999 Otto-Hahn-Gymnasium Springe
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

1999-2000 Grundwehrdienst

Akademische Ausbildung

2000-2003 Grundstudium der Biologie, Universität Hannover
2003-2004 Stipendiat an der Northeastern University, Boston, USA
2004-2005 Hauptstudiums an der Universität Hannover
(Fächer: Zellbiologie, Genetik und Biochemie)
2005-2006 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für experimentelle
Endokrinologie
2006 Diplom, Note „Sehr gut“
seit 05/2007 Arbeit an der Dissertation am Max-Planck-Institut für
biophysikalische Chemie, Göttingen

Veröffentlichungen:

Pirouz, M., **Klimke, A.**, and Kessel, M. 2012. The reciprocal relationship between primordial germ cells and pluripotent stem cells. *J Mol Med (Berl)* **90**(7): 753-761.

Lize, M., **Klimke, A.**, and Dobbelstein, M. 2011. MicroRNA-449 in cell fate determination. *Cell Cycle* **10**(17): 2874-2882.

Lize, M., Herr, C., **Klimke, A.**, Bals, R., and Dobbelstein, M. 2010. MicroRNA-449a levels increase by several orders of magnitude during mucociliary differentiation of airway epithelia. *Cell Cycle* **9**(22): 4579-4583.

Klimke, A., Zeddies, S., Uerlings, Y., Pilarski, S., and Kessel, M. 2009. Cell-cycle regulators connected to developmental decisions. *MPIbpc News 11*, 1-5.

Posterpräsentationen:

Uerlings, Y., Klimke, A., Zeddies, S., and Kessel, M. (2009). Loss of Geminin in murine cortex cells results in increased astrocyte numbers. *Poster präsentiert bei der 18. Tagung der Gesellschaft für Entwicklungsbiologie (GfE, Hannover)*.

7.2. Danksagungen

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Michael Kessel, der mir die Möglichkeit für diese Arbeit gegeben hat und von dem ich nicht nur wissenschaftlich, sondern auch persönlich viele Dinge gelernt habe. Die tolle Atmosphäre im Labor ist zu einem Großteil durch seinen kompetenten und dabei so freundlichen Führungsstil entstanden.

Herrn Prof. Schmidtke und Herrn Prof. Huchzermeyer möchte ich ganz herzlich für die Übernahme der Referate und für das tolle Engagement sowie die freundliche Hilfe bei allerlei bürokratischen Problemen danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei den Leuten bedanken, die mir am Anfang intensiv mit Rat und Tat zur Seite standen und mir über so manche Hürde hinweggeholfen haben: Yvonne Uerlings, Naisana Asli und Mara Pitulescu.

Ganz herzlichen Dank auch an Golnaz Aghazadeh Tabrizi und Mehdi Pirouz, die immer mit intellektuellem Input beigetragen haben und mir die Welt der iranischen Küche eröffneten. Auch Kerstin Böse, die mir mit ihrer weitreichenden Postdoc-Erfahrung immer aushelfen konnte, wenn es Klonierungsprobleme gab, sei gedankt.

Großer Dank geht an Petra Rus, die mir mit unermüdlichem Einsatz und fachlicher Kompetenz stets unter die Arme gegriffen hat und auch mit ihrer fröhlichen Art den Laboralltag verschönt hat.

Daniela Wollrad, Kirsten Kiel, Ulrike Teichmann, Ulli Franke und Kirsten Backs sei gedankt für die tolle Mausearbeit und dafür, dass sie immer mit Rat und Tat in allen Belangen zur Seite standen.

Sven Pilarski und Stephen Blanke möchte ich danken für die fachlich kompetenten Ratschläge und insbesondere für die großartigen, legendären Grillabende. Das war wirklich einzigartig und wird sich hoffentlich noch viele Jahre fortsetzen.

Simon, Tamara, Vanessa und Marco möchte ich für die schönen, gemeinsamen Aktivitäten außerhalb der Abteilung danken. Epische Rockband- und Brettspielabende, sowie die eine oder andere Nacht in der Tangente, werden unvergessen bleiben.

Auch allen anderen Leuten aus der Abteilung Molekulare Zellbiologie möchte ich danken: Anastassia Stoykova, Ahmed Mansouri und Kamal Chowdhury für ihre kompetenten Antworten bei Fragen, Sigurd Hille für die exzellente Sequenzierarbeit, Ralf Altschäffel für die Fotodrucke, Sharif Masur für die große Hilfe in der Zellkultur und allen anderen Mitgliedern der Abteilung 109.