

Inhaltsverzeichnis

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

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

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