

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
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 Re- gion . . . . .	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<sup>Tcr</sup></i> . . . .	14
<b>2 Zielsetzung</b>	<b>17</b>
<b>3 Materialien und Methoden</b>	<b>18</b>
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 Agarosegelelektrophorese . . . . .	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 Ketten- reaktion . . . . .	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</i> 1-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	<b>Ergebnisse</b> . . . . .	<b>51</b>
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 Tg11 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
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>92</b>
5.1	Translationelle Regulation durch die 5'-UTR von <i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> . . . . .	93
5.1.1	Komplexe Translationskontrolle des Respondergens . . . . .	93
5.1.2	Bruno Response Element-ähnliche Sequenz . . . . .	96
5.1.3	<i>Upstream</i> AUGs im <i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> -Transkript . . . . .	97
5.1.4	Beteiligung von microRNAs an der Expression von <i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> .	98
5.1.5	Sekundärstrukturen des Respondertranskripts . . . . .	100
5.2	Einfluss der codierenden Region von <i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> auf die Responderex- pression . . . . .	102
5.2.1	Translationelle Regulation durch die codierende Region von <i>Smok1<sup>Tcr</sup></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
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>114</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>116</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>118</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>119</b>
	<b>Literatur</b>	<b>121</b>
	<b>Veröffentlichte Ergebnisse</b>	<b>132</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>133</b>
	<b>Selbständigkeitserklärung</b>	<b>134</b>