

Architektur meiotischer Chromosomen:

**Eigenschaften und Evolution des
Synaptonemalkomplexproteins SYCP3**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Andrea Baier

aus

Stierhöfstetten

Würzburg 2007

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Ricardo Benavente

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Scharl

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

1 Einleitung	1
1.1 Meiose.....	2
1.1.1 Meiose I	3
1.1.2 Meiose II	5
1.2 Molekulare Architektur des meiotischen Chromosoms	6
1.2.1 Kohäsine und Kondensine	6
1.2.2 Rekombination.....	9
1.2.3 Der Synaptonemalkomplex (SC)	13
1.2.3.1 Proteinkomponenten des Synaptonemalkomplexes	15
1.2.3.2 Organismen ohne Synaptonemalkomplex	23
1.3 Die Funktion des SC und dessen Proteinbestandteile	23
1.4 Struktur und Funktion von Proteinen.....	26
1.5 Modellsystem: Spermatogenese	28
1.5.1 Aufbau des Hodens und Nebenhodens bei Säugern	29
1.5.2 Spermatogenese bei Säugern	29
1.6 Zielsetzung.....	31
2 Abkürzungen	32
3 Materia	35
3.1 Biologisches Material	35
3.1.1 Tiere.....	35
3.1.2 Zelllinien.....	35
3.1.3 Bakterienstämme	35
3.1.4 Antikörper	35
3.2 Molekularbiologisches Material	37
3.2.1 Plasmidvektoren	37
3.2.2 Enzyme	40
3.2.3 Oligonukleotide	40
3.2.4 Größenstandards.....	41
3.2.5 Kits.....	41
3.3 Chemikalien	41
3.4 Geräte	42
3.5 Computerprogramme.....	43
3.6 Rekombinante DNA Konstrukte	43
3.6.1 SYCP3 Konstrukte zur Proteinexpression in eukaryontischen Zellen ..	43
3.6.2 SYCP3 Konstrukte zur Proteinexpression in Bakterien	53
4 Methoden	54
4.1 Mikrobiologische Methoden	54

4.2	Arbeiten mit rekombinanter DNA	57
4.2.1	Isolierung von RNA aus Geweben.....	57
4.2.2	Gewinnung von cDNA aus isolierter RNA.....	57
4.2.3	PCR (polymerase chain reaction).....	58
4.2.4	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese	63
4.2.5	Plasmid-DNA Präparationen.....	65
4.2.6	Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme	67
4.2.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	68
4.2.8	Fällung von Nukleinsäuren	68
4.2.9	DNA-Sequenzierung.....	68
4.2.10	Insertion von DNA-Fragmenten in bakterielle Vektoren	70
4.3	Expression von Proteinen in Bakterien und deren Reinigung	77
4.3.1	Expresion von Proteinen in Bakterien.....	77
4.3.2	GST-Reinigung	77
4.3.3	His-Tag Reinigung	79
4.3.4	Dialyse des gereinigten Fusionsproteins	81
4.4	Affinitätsreinigung von Antikörpern	82
4.4.1	Affinitätsreinigung eines Antiserums über CNBr-aktivierten Sepharose.....	82
4.4.2	Affinitätsreinigung eines Antiserums über „HiTrap NHS-activated HP“	84
4.5	Zellkultur, Gewebe und Isolierung von Spermatozyten.....	88
4.5.1	Zellkultur	88
4.5.2	Gewebspräparationen	89
4.5.3	Gewinnung angereicherter Zellfraktionen mit verschiedenen Spermatogenese- stadien aus den Hoden von Ratten durch zentrifugale Elutriation.....	90
4.6	Mikroskopie	98
4.6.1	Immunfluoreszenzmikroskopie	98
4.6.2	Transmissionselektronenmikroskopie.....	100
4.7	Proteinbiochemische Analyse	104
4.7.1	Proteinfällung.....	104
4.7.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	104
4.7.3	Coomassie Blau-Färbung	107
4.7.4	Western Blot	108
4.7.5	Salzextraktion	111
5	Ergebnisse	113
5.1	Wichtige Domänen für die Polymerisation von SYCP3.....	113
5.1.1	Datenbankvergleich von SYCP3 in Vertebraten.....	113
5.1.2	Schematische Darstellung von SYCP3 und Mutanten	115

5.1.3	Einfluss verschiedener Domänen von SYCP3 auf die Filamentbildung	117
5.1.4	Einfluss des N-Terminus auf die Stabilität der SYCP3-Filamente	121
5.1.5	Elektronenmikroskopische Analyse von SYCP3 und filamentbildenden Mutanten.....	125
5.1.6	SYCP3 aus Ratte wird in zwei Isoformen exprimiert	128
5.1.7	Δ CM2-SYCP3 hat einen dominant-negativen Effekt auf die Filamentbildung von SYCP3	129
5.2	Vergleich der Eigenschaften von SYCP3 zwischen den evolutionär entfernten Vertebraten Ratte und Fisch	131
5.2.1	Sequenzvergleich von SYCP3 aus Ratte und Medaka	131
5.2.2	Charakterisierung des Medaka SYCP3	132
5.2.3	Vergleich der Polymerisationseigenschaften zwischen SYCP3 aus Ratte und Medaka	135
6	Diskussion.....	140
6.1	Polymerisationseigenschaften von SYCP3.....	140
6.1.1	Konservierte Domänen sind notwendig für die Polymerisation von SYCP3	142
6.1.2	Der N-Terminus von SYCP3 ist wichtig für die Stabilität der Polymerstrukturen	145
6.1.3	Es gibt zwei Isoformen von SYCP3	148
6.1.4	Heterozygote Mutationen in SC-Genen können einen Einfluss auf die Fertilität haben	149
6.2	Polymerisationseigenschaften von SYCP3 sind evolutionär konserviert	150
6.2.1	SYCP3 aus Ratte und Medaka haben eine konservierte Domänenorganisation	150
6.2.2	SYCP3 aus Ratte und Medaka haben konservierte Polymerisationseigenschaften	151
6.3	Ausblick.....	153
7	Zusammenfassung	155
7.1	Zusammenfassung.....	155
7.2	Summary.....	156
8	Literaturverzeichnis.....	157
	Erklärung.....	172
	Publikationen	173
	Lebenslauf.....	174
	Danksagung	175

1 Einleitung

Zu den Wesenszügen von Organismen gehört die Fähigkeit sich fortzupflanzen. In der Tierwelt haben sich verschiedene Arten der Fortpflanzung entwickelt, wobei Reproduktion und Sex zwei zentrale Prozesse sind. Reproduktion bedeutet das Hervorbringen eines neuen Individuums. Unter Sex versteht man die Neukombination von Erbmateriale zwischen zwei Organismen was eine sehr frühe und entscheidende Errungenschaft der Evolution war. Reproduktion ohne Sex bringt Organismen hervor, die mit ihren Vorfahren genetisch identisch sind. In dieser asexuellen Reproduktion vermehrt sich ein Organismus durch einfache Zweiteilung (Amoeben) oder durch Knospung (Hydra) wodurch eine potentielle Unsterblichkeit des Organismus erreicht wird. Vorteil dieser Fortpflanzung ist das rasche Wachstum einer Population in guten Zeiten um zeitlich begrenzte Ressourcen optimal zu nutzen. Sex ohne Reproduktion findet man bei Bakterien und z.B. bei Paramecium. Hier kommt es zum Austausch von genetischem Material zwischen zwei Organismen ohne dass sich der Organismus reproduziert. In der Geschichte des Lebens hat sich allerdings die Kombination von Reproduktion und Sex durchgesetzt. Der entscheidende Vorteil der sexuellen Reproduktion ist die bessere Anpassung der Organismen an die sich ständig veränderten Umweltbedingungen. Durch das Zusammenbringen von Fortpflanzung und Neukombination des Erbmateriale sind zwei neue Prozesse entstanden. Zum einen hat sich die Meiose als eine besondere Art der Zellteilung entwickelt, in der spezialisierte Zellen entstehen, die die Hälfte der speziesspezifischen Chromosomenanzahl besitzen. Die Meiose ist ein Prozess in der eine diploide Urkeimzelle zu haploiden Gameten reduziert wird und zugleich das Erbmateriale durch Austausch zwischen den „elterlichen“, den so genannten homologen Chromosomen neu kombiniert wird. Zusätzlich zur Meiose durchlaufen die Keimzellen eine tief greifende Zelldifferenzierung, aus der die reifen Gameten hervorgehen. Innerhalb des Tierreichs besitzen die Arten zwei Typen von Gameten, Eier und Spermien, welche verschiedene Funktionen erfüllen und deshalb völlig unterschiedlich gestaltet sind. Der Zelldifferenzierungsprozess, durch den diese unterschiedlichen Typen der Gameten hervorgehen, wird beim Ei als Oogenese und beim Spermium als Spermatogenese bezeichnet. Da die Chromosomenanzahl der jeweiligen Spezies konstant gehalten werden muss, ist die Befruchtung, als zweiter neuer Prozess entstanden. Bei der Befruchtung fusionieren nun zwei haploide Gameten, Spermium und Eizelle zu einer diploiden Zygote, woraus sich ein neues Individuum entwickelt, in dem der Genbestand beider Eltern in neuartiger Zusammenstellung vereinigt ist.

1.1 Die Meiose

Die Meiose ist ein zentraler Bestandteil des Zelldifferenzierungsprozess der Keimzellentwicklung, die man in allen sexuell reproduzierenden Organismen findet. Die meisten Körperzellen der höheren Lebewesen, sowie auch einzellige Eukaryoten, haben einen diploiden Chromosomensatz, das heißt, sie besitzen von jedem Chromosom zwei homologe Exemplare, eines geerbt von der Mutter und eines vom Vater. Das setzt aber voraus, dass die Gameten der beiden Eltern einen haploiden Chromosomensatz aufweisen, also von jedem Chromosom nur ein Exemplar besitzen. Wäre dies nicht der Fall, würde bei der Fusion der Gameten in der Befruchtung der Chromosomensatz mit jeder weiteren Generation verdoppelt.

Die Halbierung des Chromosomensatz findet in der Meiose (meioo, griech. vermindern, verkleinern) statt. Im Gegensatz zur Mitose bei der genetisch identische Zellen entstehen, kommt es durch die Meiose zu einer Reduktion des Chromosomensatz von diploid zu haploid und Teile der homologen Chromosomen werden durch genetische Rekombination über Kreuz ausgetauscht (vgl. Abbildung 1.1). Vor dem Eintritt in die Meiose wird die vorhandene DNA durch eine Replikationsrunde in der S-Phase verdoppelt. Anschließend finden zwei aufeinander folgende Zellteilungen statt, die als Meiose I und II bezeichnet werden.

In der Meiose I durchlaufen die homologen Chromosomen Paarung, Synapsis und Rekombination und werden anschließend voneinander getrennt. Die erste meiotische Teilung wird somit als Reduktionsteilung bezeichnet, da hier die Trennung der „väterlichen“ und „mütterlichen“ Chromosomen stattfindet.

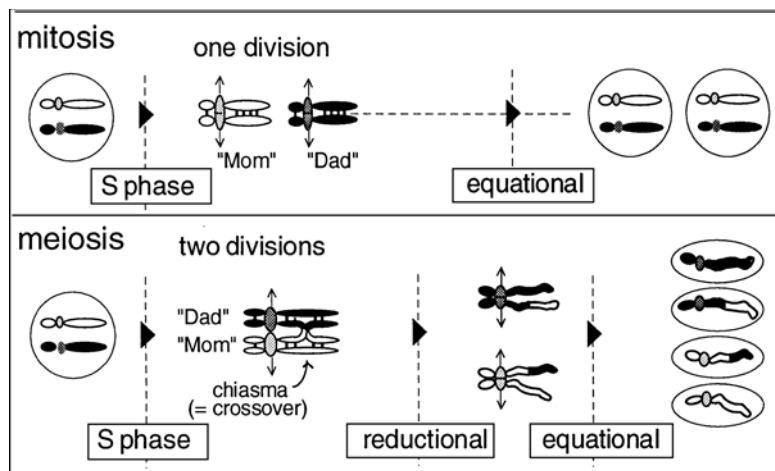


Abbildung 1.1: Vergleich zwischen Mitose und Meiose (aus Zickler und Kleckner, 1998)

In der Meiose II werden die Schwesterchromatiden eines jeden Chromosoms, ähnlich zu den Ereignissen in der Mitose, getrennt und auf die Tochterzellen aufgeteilt.

So entstehen in der Meiose aus einer diploiden Zelle ($2n$) mit doppeltem DNA-Gehalt jeweils vier haploide Zellen ($1n$) mit einfachem DNA-Gehalt wobei (n) für die Chromosomenzahl im haploiden Genom steht.

1.1.1 Meiose I

Die Meiose I lässt sich in verschiedene Phasen unterteilen: **Prophase**, **Prometaphase**, **Metaphase**, **Anaphase** und **Telophase**. In der Prophase der ersten meiotischen Teilung erfolgt die Paarung, Synapse und Rekombination der homologen Chromosomen. Diese **Prophase I** ist charakterisiert durch ihre lange Dauer, die in der Spermatogenese mehrere Tage, und im Fall der Oogenese mehrere Jahre dauern kann. Aufgrund morphologischer Veränderungen des Zellkerns und der Chromosomen wurde die Prophase I in fünf Stadien unterteilt: **Leptotän**, **Zygotän**, **Pachytän**, **Diplotän** und **Diakinese** (Übersicht in Zickler und Kleckner, 1998).

Im **Leptotän** (leptos, griech. dünn) ist die DNA Replikation bereits abgeschlossen und jedes Chromosom besteht aus zwei Schwesterchromatiden, die über Kohäsin- und Kondensinkomplexe miteinander verknüpft werden. Dadurch beginnen die Chromosomen zu kondensieren und werden so im Lichtmikroskop als dünne Fäden erkennbar. Außerdem kommt es zur Bildung einer proteinösen Achse entlang eines jeden Chromosoms, die als Axialelemente (AEs) bezeichnet werden. Weiterhin wurden kleine, proteinöse, elektronendichte Strukturen beschrieben, die als Rekombinationsknoten (RNs) bezeichnet werden. Proteinkomponenten der RNs sind an der Suche homologer Chromosomenabschnitte beteiligt, was auf den Mechanismus der homologen Rekombination zurückgeht (Carpenter, 1975; 1979; Moens et al., 2002). Die Chromosomenenden werden über proteinöse Strukturen den so genannten „Attachment-Plates“ (vgl. Abbildung 1.2) an der inneren Kernhülle verankert (Liebe et al., 2004).

Im **Zygotän** (zygos, griech. Paar) wandern die Telomere entlang der Kernhülle und konzentrieren sich an der Stelle, die dem Zentrosom zugewandt ist. Die Chromosomen strahlen in Form eines Blumenstraußes in das Nukleoplasma weswegen diese Struktur als Bouquet bezeichnet wird (Scherthan et al, 1996; Zickler und Kleckner, 1998). Außerdem kondensieren die Chromosomen weiter und es beginnt die Verknüpfung der homologen Chromosomen durch den sogenannten Synaptonemalkomplex (SC) einer hochkonservierten proteinösen Struktur (Moses, 1956; Fawcett, 1956). Hierbei werden die im Leptotän aufgebauten (AEs) homologer Chromosomen über Transversalfilamente (TFs) miteinander verbunden. Es kommt somit zu einem fortschreitenden Prozess der kompletten Synapse der homologen Chromosomen. Die Geschlechtschromosomen (X und Y) bei der männlichen Meiose in Säugern erfahren keine vollständige Synapse durch den SC, sondern paaren sich nur über einen kleinen homologen Bereich, der pseudoautosomalen Region. Außerdem weisen diese Chromosomen einen höheren Kondensationsgrad als das restliche Chromatin auf, wodurch sie als sogenannter „XY-Body“ im Mikroskop erkannt werden (Solari, 1974; Handel, 2004).

1. Einleitung

Im **Pachytän** (pachus, griech. dick) sind die SCs vollständig zwischen den homologen Chromosomen ausgebildet und die Synapse der homologen Chromosomen ist abgeschlossen. Wie in Abbildung 1.2 zu sehen ist, besitzt nun der SC eine lang gestreckte dreiteilige Struktur bestehend aus:

- Zwei parallel laufenden AEs, die nun als Lateralelemente (LEs) bezeichnet werden,
- einer zentralen Region (CR) zwischen den zwei LEs, die mit den TFs durchzogen sind
- und einem zentralen Element (CE), das parallel zu den LE im Zentrum des SC liegt.

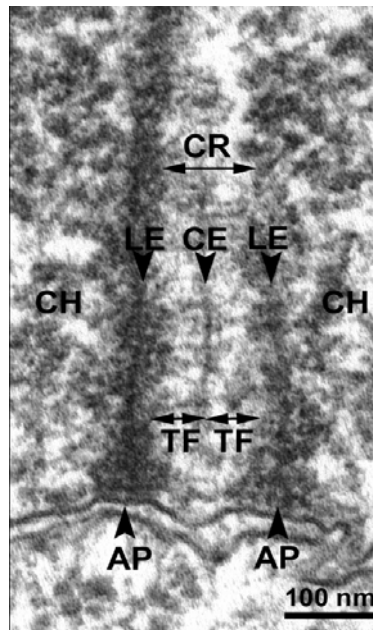


Abbildung 1.2:
Synaptonemalkomplex
aus Medaka Fisch
(eigene Aufnahme).
LE: Lateralelement
CR: zentrale Region
CE: zentrales Element
TF: Transversalfilament
AP: „Attachment-Plate“
CH: Chromatinschleifen

Je ein Chromosom ist über Chromatinschleifen mit je einem LE des SC assoziiert (Roeder, 1997). Die so über den SC verknüpften homologen Chromosomen werden als Bivalente bezeichnet und sind im Lichtmikroskop als kurze dicke Fäden erkennbar. In diesem zeitlich längsten Abschnitt der Prophase I findet die genetische Rekombination statt, in der Teile der homologen Chromosomen über Kreuz ausgetauscht werden. Diese Crossover-Ereignisse finden an bestimmten RNs statt, die mit dem SC assoziiert sind (Zickler und Kleckner, 1999; Carpenter, 2003; Page und Hawley, 2003). Des Weiteren bleiben die Telomere in der inneren Kernmembran verankert, breiten sich aber wieder über die gesamte Kernhülle aus (Scherthan et al., 1996; Zickler und Kleckner, 1998).

Im **Diplotän** (diploos, griech. doppelt) lösen sich die SCs auf und die homologen Chromosomen trennen sich wieder. Sie bleiben nur an den Stellen miteinander verbunden, an denen Crossover-Ereignisse stattgefunden haben. Hier finden sich Überkreuzungsstellen, die als Chiasmata bezeichnet werden, worüber die sich trennenden homologen Chromosomen miteinander verbunden bleiben (Creighton und McClintock, 1931). In diesem Stadium sind die Säuger-Oocyten über mehrere Jahre arretiert und es kommt zu einer vorübergehenden Dekondensation der Chromosomen wodurch aktive Genexpression stattfinden kann.

Diese Genexpression kommt mit der starken Kondensation der Chromosomen in der **Diakinese** (diakinein, griech. Auseinanderbewegung) zum Erliegen. Die Chiasmata und die vier Chromatiden pro Bivalent sind im Lichtmikroskop erkennbar.

1. Einleitung

Die **Prometaphase I**, in der sich die Kernhülle auflöst und sich der meiotische Spindelapparat bildet, stellt einen Übergang in die **Metaphase I** dar. Hier ordnen sich die Bivalenten in der Äquatorialebene an. Da in der Meiose I die Schwesterchromatiden eines Chromosoms nicht getrennt werden dürfen, halten

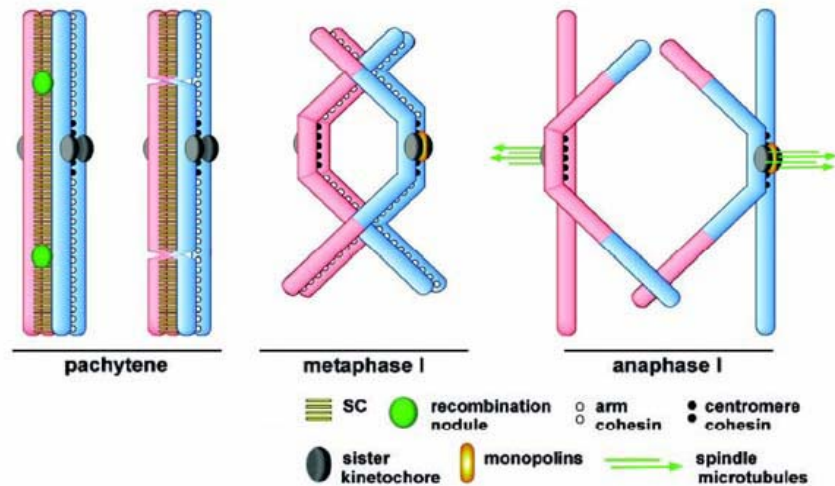


Abbildung 1.3: Verhalten der homologen Chromosomen in der Meiose I: Verknüpfung der Bivalenten während der Prophase I und Metaphase I; Trennung der homologen Chromosomen während der Anaphase I (aus Page und Hawley, 2003)

spezifische Kohäsine diese zusammen. Zudem kommt es nur zu einer einseitigen Anheftung der Spindelfasern an die Kinetochore der Schwesterchromatiden. Zu Beginn der **Anaphase I** lösen sich die Chiasmata zwischen den Bivalenten auf. Somit können die homologen Chromosomen mit dem Spindelapparat zu den unterschiedlichen Polen der Zelle gezogen werden. Das Verhalten der homologen Chromosomen während der ersten meiotischen Teilung ist in Abbildung 1.3 schematisch veranschaulicht. Es folgt die **Telophase I** in der es zur Neubildung der Kernhülle kommt. Das Chromatin dekondensiert und es bilden sich zwei Zellkerne mit je einer Kopie aller autosomalen Chromosomen und ein Geschlechtschromosom (1n) mit je zwei Schwesterchromatiden.

1.1.2 Meiose II

Nach einer kurzen Interphase durchlaufen die Zellen ohne zwischenzeitliche DNA-Synthese die zweite meiotische Teilung, wobei jeweils die Schwesterchromatiden der Chromosomen voneinander getrennt werden. Die Meiose II läuft also ähnlich wie die Mitose ab. Während der Teilungsphasen **Prophase II**, **Metaphase II**, **Anaphase II** und **Telophase II** werden die beiden Schwesterchromatiden jedes Chromosoms voneinander getrennt und auf die Tochterzellen verteilt. Nach Abschluss der Meiose besitzen also alle Gameten den benötigten haploiden Chromosomensatz, mit je einem homologen Chromosom (1n) bestehend aus einem Chromatid.

In der Meiose ergeben sich durch die rein zufällige Verteilung „väterlicher“ und „mütterlicher“ Chromosomen auf die Tochterzellen 2^n Möglichkeiten (n = Chromosomenzahl im haploiden Genom) für die Bildung von genetisch unterschiedlicher Gameten. Diese genetische Variation der Gameten wird durch Rekombinationsereignisse, bei denen Abschnitte zwischen homologen Chromosomen ausgetauscht und Allele neu kombiniert werden, noch stark erhöht.

1.2 Molekulare Architektur des meiotischen Chromosoms

Die grundlegende Funktion der Meiose ist die korrekte Segregation der Chromosomen auf die Tochterzellen um die Chromosomenanzahl zu halbieren. Hierzu müssen zunächst in der ersten meiotischen Teilung die homologen Chromosomen, dann in der zweiten meiotischen Teilung die Schwesterchromatiden voneinander getrennt werden. Außerdem werden Abschnitte zwischen homologen Chromosomen ausgetauscht, wodurch Allele neu kombiniert werden.

Damit diese Prozesse reguliert ablaufen können, musste sich eine spezielle molekulare Architektur der meiotischen Chromosomen entwickeln: Hierzu gehört die meiosespezifische Kohäsion und Kondensation der Schwesterchromatiden eines jeden Chromosoms und die Aneinanderlagerung der homologen Chromosomen. Die Paarung der homologen Chromosomen wird zum einen auf DNA-Ebene vermittelt, was auf den Mechanismus der homologen Rekombination zurückgeht, und zum anderen durch die Synapse über den Synaptonemalkomplex (SC), die auffälligste Struktur des meiotischen Chromosoms. Diese grundlegenden Mechanismen finden in der meiotischen Prophase I statt und sind auf molekularer Ebene miteinander verknüpft.

Im Folgenden sollen zunächst die meiosespezifische Kohäsion- und Kondensinkomplexe und deren Verteilung während der Meiose beschrieben werden (vgl. 1.2.1). Anschließend wird auf die Rekombination (vgl. 1.2.2) und auf die synaptische Paarung der homologen Chromosomen (vgl. 1.2.3) näher eingegangen. Wegen der zentralen Bedeutung des SC für die Meiose, und da bis jetzt nur wenig über den Mechanismus des SC-Aufbaus bekannt ist, soll die Struktur, der molekulare Aufbau und die Funktion des SC zentraler Bestandteil dieser Arbeit sein.

1.2.1 Kohäsine und Kondesine

Sowohl in der Mitose als auch in der Meiose sind die in der S-Phase duplizierten DNA-Stränge von der Replikation bis zur Segregation in der Anaphase über Kohäsion- und Kondensinkomplexe miteinander verknüpft. Diese Proteinkomplexe sind von der einzelligen Hefe bis hin zu den Säugern hochkonserviert und spielen eine wichtige Rolle in der korrekten

Verteilung der Chromatiden auf die Tochterzellen (Nasmyth, 2001; Hearing und Nasmyth, 2003).

Kohäsinkomplexe bestehen aus vier Proteinuntereinheiten (vgl. Abbildung 1.4), den zwei „Structural Maintenance of Chromosome“-Proteinen, SMC1 und SMC3, die mit den zwei „Sister Chromatid Cohesion“-Proteinen SCC1 und SCC3 assoziiert sind (Hirano et al., 2002; Haering und Nasmyth, 2003). Die SMC-Proteine bilden Heterodimere über die ausgedehnte „Coiled-Coil“-Domänen und formen eine Klammer. Die Nicht-SMC-Proteinen SCC1 und SCC3 schließen diese Klammer zu einer ringartigen Struktur um die Schwesterchromatiden eines Chromosoms, wodurch diese zusammengehalten werden. (Hirano et al., 2002; Haering und Nasmyth, 2003; Losoda et al., 2000; Sumara et al., 2000; Gruber et al., 2003; Haering et al., 2004). Die Trennung der Schwesterchromatiden während der Anaphase wird durch die Spaltung von SCC1 durch das Enzym Separase induziert wodurch es zur Auflösung des Kohesinringes kommt (Nasmyth et al., 2001).

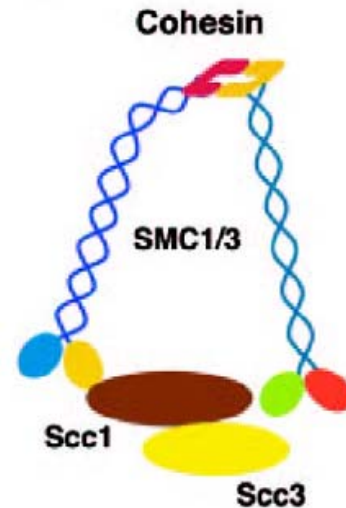


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Kohäsinkomplexes und dessen Untereinheiten (aus Jessberger, 2005)

Kondensinkomplexe bestehen aus fünf Proteinuntereinheiten den zwei SMC-Proteinen SMC2/CAP-E und SMC4/CAP-C, sowie den drei Nicht-SMC-Proteinen CAP-D2, CAP-G und CAP-H (Hirano et al., 1997; Übersicht in Hirano, 2002). Die Aufgabe der Kondensine ist die longitudinale Kompaktierung der Chromosomen in der Mitose und Meiose (Hirano, 2002; Yu und Koshland, 2003).

Funktion der Kohäsinkomplexe in der Meiose:

Die zwei aufeinander folgenden Zellteilungen der Meiose stellen besondere Anforderungen an die Kohäsinveteilung entlang der Chromosomen. Zur Trennung der homologen Chromosomen in der ersten meiotischen Teilung verknüpfen Kohäsinkomplexe die Arme der Schwesterchromatiden bis zur Anaphase I. Die Kohäsion der Chromosomen wird jedoch am Zentromer bis zur Trennung der Schwesterchromatiden in der in der Anaphase II aufrechterhalten (Valdeolmillos et al., 2007). Diese besondere Segregation der Chromosomen wird vermutlich durch zeitlich kontrollierte Synthese bzw. Abbau unterschiedlicher, teils meiosespezifischer, Kohäsинuntereinheiten ermöglicht, wodurch verschiedene Kohäsinkomplexe gebildet werden können (Mc Dougall et al., 2005, Revenkova und Jessberger; 2006; vgl. Abbildung 1.5). So wird in der Meiose neben SMC1,

das im Zusammenhang mit der Meiose als SMC1 α bezeichnet wird, zusätzlich das meiosespezifische SMC1 β exprimiert. Zudem ist das mitotische SCC1-Protein Rad21 in einigen Kohäsinkomplexen durch das meiosespezifische Protein Rec8 ersetzt. Auch das SCC2-Protein, das in der Mitose in den Varianten SA1 und SA2 existiert, ist in manchen Kohäsinkomplexen durch das meiosespezifische Protein STAG3 ausgetauscht (Revenkova und Jessberger; 2006). Außerdem ändern sich das Expressionsmuster und die chromosomale Lokalisation der verschiedenen Kohäsineinheiten im Verlauf der Meiose. So kann Rec8 während der prämeiotischen S-Phase, Rad21, SMC1 β , SMC3 und STAG3 ab dem Leptotän nachgewiesen werden. Diese Proteine lokalisieren an den Armen und im Zentromerbereich und lösen sich in der Metaphase II wieder vom Chromosom (Eijpe et al., 2003; Lee et al., 2003; Kouznetsova et al., 2005; Prieto et al., 2002; 2001; Revenkova et al., 2001). SMC1 α dagegen kann nur an den Chromosomenarmen in der meiotischen Prophase I nachgewiesen werden (Eijpe et al., 2000; Revenkova et al., 2001). Diese spezifisches Expressions- und Verteilungsmuster der verschiedenen Kohäsineinheiten zusammen mit Interaktionsstudien zwischen Kohäsineinheiten deuten darauf hin, dass Rec8/STAG3/SMC1 α Komplexe eine Rolle in der Chromosomenarm-Kohäsion in der Prophase I spielen während die Kohäsinkomplexe Rec8/SMC1 β /SMC3 und Rad21/SMC1 β /SMC3 sowohl an den Chromosomenarmen in der ersten meiotischen Teilung, als auch im Zentromer bis zur Metaphase II lokalisieren (Übersicht in Revenkova und Jessberger; 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es in *rec8* Mutanten der Hefe zu einer frühzeitigen Trennung der Schwesterchromatiden in der Meiose I kommt (Watanabe et al., 1999). Ein weiteres meiosespezifisches Protein der Hefe ist Rec11, welches mit Rec8 Komplexe bildet und hauptsächlich an den Chromosomenarmen lokalisiert. Eine Rec11-Null-Mutation führt dazu, dass Rec8 in der Anaphase I nicht an den Chromosomenarmen abgespalten werden kann, was die Separation der Homologen verhindert (Kitajima et al., 2003). Als Folge dessen wird das Voranschreiten der Meiose II blockiert. Die unterschiedliche Lokalisation und Abspaltung der Kohäsine an den Chromosomenarmen und an den Zentromeren ermöglicht also die zwei aufeinander

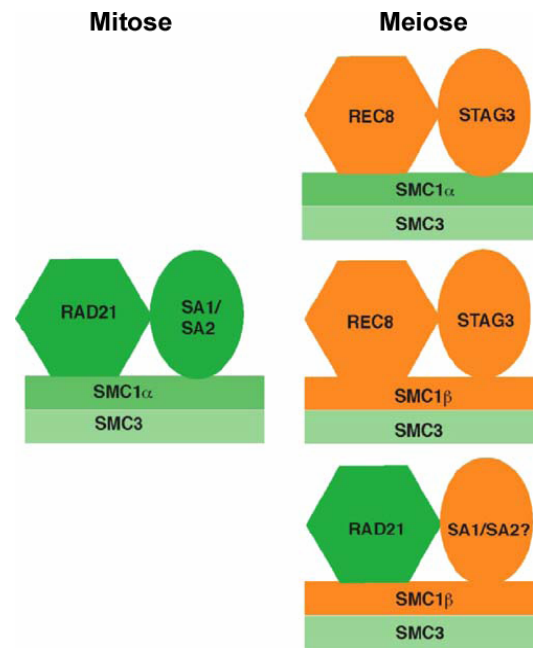


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung verschiedener Typen von Kohäsinkomplexen (aus Revenkova und Jessberger; 2006)

folgenden Zellteilungen der Meiose wobei zunächst die homologen Chromosomen und anschließend die Schwesterchromatiden getrennt werden.

Neben der Verknüpfung der Schwesterchromatiden scheinen die Kohäsine weitere funktionelle Auswirkungen auf das meiotische Chromosom zu haben. So findet in *Rec8* Knockout-Mäusen die Rekombination zwischen den Schwesterchromatiden anstatt zwischen homologen Chromosomen statt (Xu et al., 2005). Außerdem scheint in der SMC1 β Knockout-Maus die Chromosomenkondensation beeinflusst zu sein. Die Chromosomenachsen sind stark verkürzt, was auf eine veränderte Organisation der Chromatinschleifen hinweist (Revenkova et al., 2004). Weiterhin haben Kohäsine eine Bedeutung für den Zusammenbau des SC. In niederen Organismen wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Caenorhabditis elegans* ist das Vorhandensein von Rec8 notwendig für die Bildung der SCs (Klein et al., 1999; Pasierbek et al., 2001). In Vertebraten dagegen wirkt sich das Fehlen einzelner Kohäsineinheiten nicht so stark auf die SC-Bildung aus, was durch die hohe Varietät und Redundanz der Kohäsine zu erklären ist. Sowohl in der SMC1 β als auch in der Rec8 Knockout-Maus kommt es zur Bildung der SCs, diese sind aber verkürzt und weisen zudem Lücken auf (Bannister et al., 2004; Revenkova et al., 2004; Xu et al., 2005).

1.2.2 Rekombination

Homologe Rekombination, die Neukombination von DNA-Abschnitten, findet man im gesamten eukaryontischen Tierreich, wobei die beteiligten Proteinkomponenten zwischen Hefe und Säuger hochkonserviert sind. Bei folgenden Prozessen spielt die homologe Rekombination eine entscheidende Rolle: Reparaturmechanismen der DNA nach Doppelstrangbrüchen in somatischen Zellen, Genumstrukturierungsereignisse in B- und T-Lymphozyten des zellulären Immunsystems und Austausch von Genabschnitten zwischen „mütterlich“ und „väterlichen“ homologen Chromosomen in der Meiose.

Die homologe Rekombination in der Meiose trägt zum einem zur genetischen Vielfalt der Eukaryonten bei und zum anderen ist sie wichtig für die korrekte Paarung und Trennung der homologen Chromosomen. Die Paarung wird durch direkte DNA-DNA-Interaktion vermittelt und für die korrekte Trennung ist eine aus der homologen Rekombination resultierende physikalische Verbindung zwischen den homologen Chromosomen notwendig. Die Daten stammen aus Übersichtsartikel, die das Thema sehr ausführlich abarbeiten (Cohen et al., 2006; de Massy, 2003; Kleckner, 2006; Paques und Haber, 1999; Zickler, 2006; Wang und Höög, 2006).

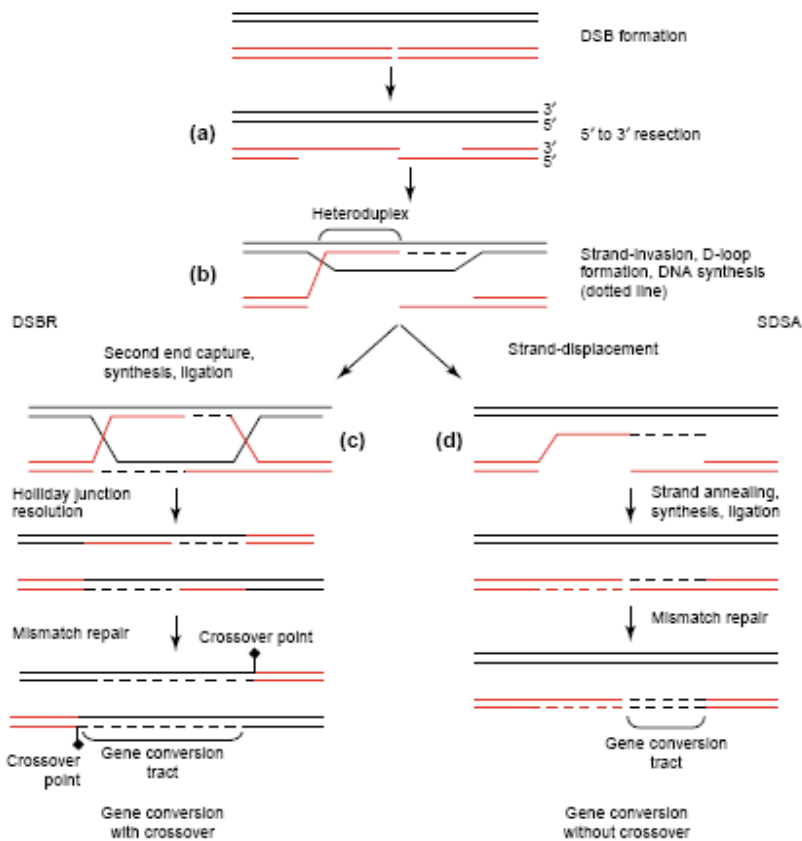


Abbildung 1.6: Mechanismus der homologen Rekombination (aus de Massy, 2003)

Mechanismus der Rekombination (vgl. Abbildung 1.6):

Der Mechanismus der homologen Rekombination beginnt mit der aktiven und kontrollierten Einführung von Doppelstrangbrüchen (DSBs) in das gesamte Genom. Die 5'-Enden, die durch die DSBs entstanden sind, werden durch eine Exonuklease abgebaut, so dass an jedem DSB ein 3'-Überhang der DNA entsteht (vgl. Abbildung 1.6 a). Das Einfügen der DSB wird von der Endonuclease Spo11 katalysiert, die durch die Proteine Rad50 und Mre11 wieder von den DSBs entfernt wird. Weiterhin spielen Rad50, Mre11 zusammen mit Xrs2 eine Rolle im Abbau der 5'-Enden an den DSBs. An die einzelsträngigen 3'-Überhänge lagern sich nun das Proteine Rad51 zusammen mit seinem meiosespezifischem Homolog Dmc1 an, unterstützt von den Rekombinationsmediatoren Rad54, Rad52, Rad55-Rad57 und RPA. Dieses so erzeugte Nukleoproteinfilament ist nun in der Lage doppelsträngige DNA zu binden, sie partiell zu öffnen und auf Homologie zu testen, um so den entsprechenden DNA-Abschnitt auf dem intakten homologen Chromosom zu finden. Wurde die komplementäre Region auf dem homologen Chromosom gefunden, wird in diesem Bereich die DNA-Doppelhelix geöffnet, wodurch ein so genannter D-Loop entsteht, und das 3'-überhängenden DNA-Ende wandert in das intakte Chromosom ein. Um die Paarung zwischen den homologen Chromosomen zu stabilisieren, dehnt sich die Bindung des 3'-überhängenden

DNA-Abschnitts in der DNA-Doppelhelix aus, was als „strand extension“ bezeichnet wird. Dieser so entstandene partielle Paarungsabschnitt zweier homologer DNA-Abschnitte in dem jeweils ein Strang von einem der beiden homologen Chromosomen kommt, und sich durch Fehlpaarungen zwischen den Allelen auszeichnet, nennt sich Heteroduplex. Eine solche Heteroduplex wird von einem komplexen Reparatursystem erkannt, an dem Proteine beteiligt sind, die Fehlpaarungen erkennen und binden (MSH2-MSH6), Proteine mit ATPase-Aktivität, die mit den Proteinen der MSH-Familie Komplexe eingehen (MLH1, MLH2, MLH3, PMS2), die DNA-Helikase BLM und die Topoisomerase TOPOIII α . Weiterhin kommt es zur DNA-Synthese am freien 3'-Ende wobei das ungeschnittene Chromosom als Matrize dient (vgl. Abbildung 1.6 b). Die Verknüpfung der beiden homologen Chromosomen auf DNA Ebene kann nun auf unterschiedliche Weise aufgelöst werden. Dabei können DNA-Abschnitte zwischen homologen Chromosomen ausgetauscht werden (Crossover-Produkte) oder nicht (Nicht-Crossover-Produkte) und es können kleinere DNA-Abschnitte von einem Homologen auf das andere Übertragen werden (Genkonversion) was auf die „Mismatch“-Reparatur einzelner Basen der Heteroduplex-DNA zurückzuführen ist.

Für die meiotische Rekombination gibt es zwei wichtige Modelle, die Doppelstrangbruchreparatur (DSBR) und das syntheseabhängige Einzelstrangannealing (SDSA), mit derer sich die Umwandlung von DSBs in Crossover-Produkte und Nicht-Crossover-Produkte erklären lassen (vgl. Abbildung 1.6 c und d).

Doppelstrangbruch Reparatur (DSBR):

Im DSBR-Mechanismus wird der zweite 3'-überhängende DNA-Abschnitt des geschnittenen Chromosoms in das Intakte aufgenommen und durch DNA-Synthese verlängert. Beide neu synthetisierten 3'-Enden werden mit den 5'-Enden des geschnittenen Chromosoms ligiert und es entsteht eine doppelte „Holliday Junction“ (dHJ), eine 4-Strang Kreuzungsstruktur, in deren Mitte die DNA als Heteroduplex gepaart vorliegt. Die Verzweigungspunkte der dHJ können auf dem Chromosom wandern was als „branch migration“ bezeichnet wird. Die Auflösung der dHJ erfolgt durch Spaltung zweier ssDNA-Stränge mit anschließender Ligation. Je nachdem, welche DNA-Stränge der dHJ gespalten werden, entsteht ein Crossover-Produkt oder ein Nicht-Crossover-Produkt. Werden beide gekreuzte oder beide nicht gekreuzten DNA-Stränge gespalten, entsteht ein Nicht-Crossover-Produkt. Kommt es zur Spaltung des Kreuzungsstranges der einen HJ und des Nichtkreuzungsstranges der anderen HJ, entsteht ein Crossover-Produkt, was zum Austausch der Chromosomenarme zwischen homologen Chromosomen führt. Nun werden noch die Fehlpaarungen der Heteroduplex-DNA von einem Reparatursystem erkannt und je nachdem welcher DNA-Strang repariert wird, kommt es zur Restauration oder Genkonversion des Allels. Dient das

ursprüngliche Allel als Matrize kommt es zur Restauration des DNA-Abschnitts, wird jedoch das Allel des homologen Chromosom als Matrize benutzt, findet eine Genkonversion statt.

Syntheseabhängiges Strang-Annealing (SDSA):

Beim SDSA wird die Rekombinationszwischenstufe aufgelöst, indem sich der neu synthetisierte 3'-DNA-Strang vom homologen Chromosom ablöst und an den anderen 3'-Überhang des DSBs anlagert. Hierbei entsteht eine Heteroduplex-DNA mit Fehlpaarungen zwischen den Allelen. Die Reparatur des DSB wird durch DNA-Synthese und Ligation vervollständigt und es entsteht ein Nicht-Crossover-Produkt bei dem es nicht zum Austausch der Chromosomenarme zwischen den homologen Chromosomen kommt. Die Fehlpaarungen der Basen in der Heteroduplex-DNA werden ebenfalls repariert. Wie oben beschrieben, kann dies zu einer Restauration des Allels führen, wodurch die exakte DNA-Sequenz des Chromosoms nach dem DSB wieder hergestellt wird. Oder es findet Genkonversion statt, wobei ein Allel vom ungeschnittenen auf das homologe Chromosom übertragen wird.

Strukturen der Rekombination auf dem meiotischen Chromosom

Proteine, die für die Prozesse der homologen Rekombination verantwortlich sind, lagern sich an die Stellen der Doppelstrangbrüche (DSBs), die somit ultrastrukturell als elektronendichte Rekombinationsknoten (RNs) sichtbar werden. RNs sind kleine (\emptyset ca. 100-200 nm) proteinöse Strukturen auf dem Chromosom, die mit den Synaptonemalkomplex (SC) assoziiert sind und an der Homologenpaarung und deren Rekombination beteiligt sind. Die Proteinzusammensetzung der RNs ändert sich während des Voranschreitens der homologen Rekombination in der meiotischen Prophase I, weswegen man zwischen frühen, transformierten und späten RNs unterscheidet. Außerdem gibt es Unterschiede in der Qualität von RNs wodurch sich die Umwandlung von DSBs in Crossover-Produkte und Nicht-Crossover-Produkte erklären lässt (Carpenter 1975; Clermont, 1972; Moens et al., 1995; 2007).

Frühe Rekombinationsknoten (EN) entstehen an den Stellen auf dem Chromosom, an denen unmittelbar nach der S-Phase DSBs eingeführt wurden, indem sich die Proteine Rad51 und DMC1 an die einzlsträngige DNA anlagern und die Paarung des 3'-überhängenden DNA-Abschnitte mit der jeweiligen komplementären Region einer DNA-Doppelhelix der homologen Chromosomen katalysieren. Solche ENs können zum ersten Mal im frühen Leptotän nachgewiesen werden, erreichen in der Maus-Spermatocyte eine Anzahl von maximal 250-300 und lokalisieren an den Axialelementen (AEs) des sich aufbauenden SC (vgl. 1.2.3). Im Übergang vom Leptotän zum Zygotän ändert sich die proteinöse Zusammensetzung der ENs. Die Proteine RPA, MSH4, MSH5, BLM und die

Topoisomerasen III sind nun Bestandteil der Rekombinationsknoten, während sich Rad51 und DMC1 vom Chromosom ablösen. Diese so genannten transformierten Rekombinationsknoten (TNs), deren Anzahl sich in der Maus-Spermatocyte auf ca. 200 beläuft, lokalisieren ebenfalls an den AEs und vermitteln eine strukturelle Verbindung zwischen den homologen Chromosomen noch vor der Synapse des SC durch die TF (vgl. 1.2.3). Im Pachytän ist der SC komplett aufgebaut und die TNs lokalisieren in der zentralen Region des SC zwischen den homologen Chromosomen. In einer kleinen Anzahl der TNs (ca. 25 pro Maus-Spermatocyte) ist nun das Reparaturprotein MHL1 nachweisbar. Diese späten Rekombinationsknoten spiegeln die Anzahl und Verteilung der Crossover-Ereignisse entlang der homologen Chromosoms wieder und scheinen somit Orte für die homologe Rekombination zu sein. Alle weiteren TNs lokalisieren nun nicht mehr im Zentrum des SC sondern assoziieren mit den LEs und werden als Nicht-Crossover-Ereignisse aufgelöst (Cohen et al., 2006; Moens et al., 2007).

1.2.3 Der Synaptonemalkomplex (SC)

Der Synaptonemalkomplex (SC) ist ein Proteinkomplex, der zwischen homologen Chromosomen während der meiotischen Prophase I ausgebildet wird. Er ist an der synaptischen Paarung der homologen Chromosomen beteiligt und erstreckt sich über die gesamte Länge der Bivalente. Außerdem hat der SC eine zentrale Bedeutung für die molekulare Architektur des meiotischen Chromosoms, denn er steht in Verbindung mit den Kohäsinen und hat eine entscheidende Bedeutung für die Rekombination der homologen Chromosomen. Der SC ist eine in der Evolution hochkonservierte Struktur, die bereits in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts mit Hilfe der Elektronenmikroskopie in meiotischen Zellen entdeckt wurde (Moses, 1956; Fawcett, 1956). SCs sind Nukleoproteinkomplexe, die aufgrund ihrer Beständigkeit gegenüber Nukleasen, hohen Salzkonzentrationen und hypotonen Detergenzien den Kernstrukturelementen zugeordnet werden (Comings und Okada, 1976; Ierardi et al., 1983; Rislely, 1986).

Der SC kann als leiterartige Struktur angesehen werden und besteht aus zwei parallel angeordneten Lateralelementen (LEs), welche durch eine zentrale Region (CR) getrennt sind. Die CR wird von Transversalfilamenten (TFs) senkrecht zu den LEs durchspannt, welche so miteinander verbunden sind. In der Mitte des SC, parallel zu den beiden LEs, befindet sich das zentrale Element (CE) (vgl. Abbildung 1.7).

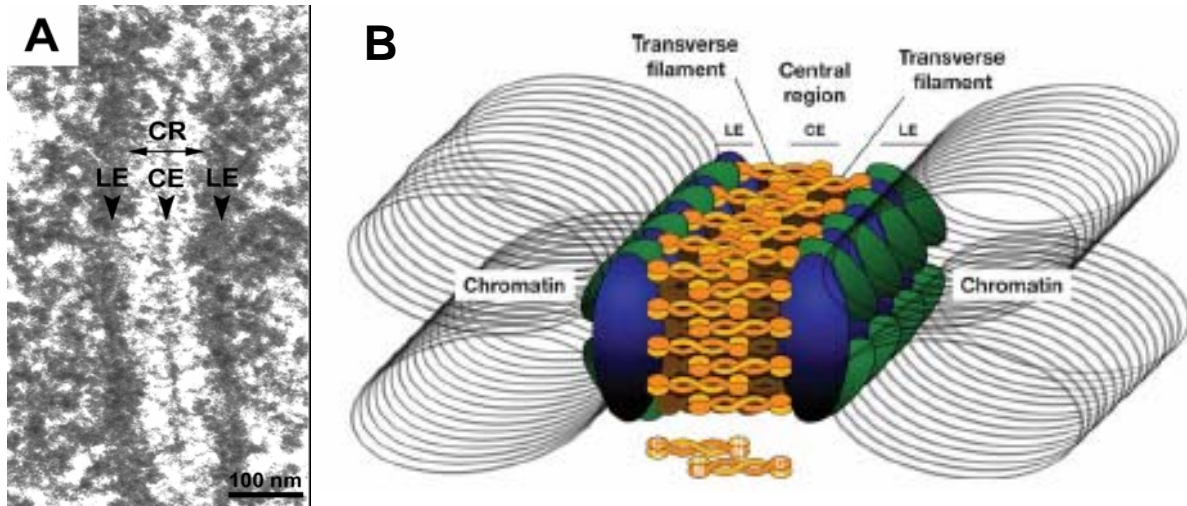


Abbildung 1.7: (A) TEM-Aufnahme eines Synaptonemalkomplexes (SC) von Medaka Fisch (eigene Aufnahme). LE: Lateralelement, CE: zentrales Element, CR: zentrale Region (B) schematische Darstellung der Struktur des SC, unterteilt in LEs und CR, welche sich in Transversalfilamente (TFs) und CE gliedert: auf die Achsen der seitlich gezeichneten Chromatinschleifen sind die Kondensin- und Kohäsinkomplexes (blau) aufgelagert und bilden zusammen mit den SC-Proteinen SYCP2 und SYCP3 (grün) die LEs, die über die TFs (gelb) mit dem CE verbunden sind. Die Anordnung der TF-Proteine, deren C-Termini in den LEs verankert sind und deren N-Termini in die CR ragen, ist unterhalb des SC-Schemas dargestellt (aus Page und Hawley, 2004).

Die Bildung des SC beginnt im Leptotän indem sich proteinöse Strukturen an den Chromosomenachsen bilden. Diese werden im Übergang zum Zygotän zu einer kontinuierlichen Achse verknüpft und als Axialelement (AE) bezeichnet. Die synaptische Paarung beginnt im Zygotän, indem sich zahlreiche Transversalfilamente (TFs) senkrecht an den AEs anlagern und die zwei AEs eines homologen Chromosomenpaares parallel verknüpfen. Die Synapse ist im Pachytän abgeschlossen und der SC ist nun kontinuierlich zwischen den homologen Chromosomen aufgebaut, wobei die AEs nun als Lateralelemente (LEs) bezeichnet werden.

Die Struktur des SC ist zwar bei innerhalb der Eukaryonten hochkonserviert, es gibt aber Unterschiede in der proteinösen Zusammensetzung zwischen den Spezies. (Heyting, 1996; Roeder, 1997; Schmekel und Daneholt, 1995; von Wettstein et al., 1984; Zickler und Kleckner, 1999; Page und Hawley, 2004). Im Folgenden sollen bekannte Proteinkomponenten des SC aus verschiedenen Spezies beschrieben werden.

1.2.3.1 Proteinkomponenten des Synaptonemalkomplexes

Der SC wurde seit seiner Entdeckung als wichtige Struktur für die Funktionen der Paarung und Rekombination der homologen Chromosomen angesehen, weswegen die Proteinzusammensetzung des SC verschiedener Organismen aufgeklärt wurde. Durch die Untersuchung der räumlichen und zeitlichen Verteilung der Proteinkomponenten des SC sowie durch die Herstellung und Charakterisierung von Mutanten dieser Gene konnte der Einfluss des SC auf verschiedene Prozesse in der Meiose näher geklärt werden.

Proteinkomponenten des SC wurden erstmals von C. Heyting und Mitarbeitern in Säugern charakterisiert. Hierzu wurden monoklonale Antikörper gewonnen, die gegen, mit SC-angereicherten Proteinfractionen aus Rattehoden gerichtet waren. Durch diese Antikörper konnten Proteine mit einer molekularen Masse von 190 kDa, 33 kDa, 30 kDa und 125 kDa identifiziert werden, die dann näher charakterisiert wurden (Heyting et al., 1989). Die cDNAs dieser Proteine wurden nach und nach isoliert und die Proteinen auf molekularer Ebene als SYCP1 (125 kDa, Meuwissen et al., 1992) SYCP3 (33 kDa bzw. 30 kDa; Lammers et al., 1994) und SYCP2 (190 kDa; Offenberg et al. 1998) bezeichnet. Mit ähnlichen Ansätzen wurde von der Arbeitsgruppe Moens die homologen Proteine von SYCP1 und SYCP3 in Hamster, Syn1 und Cor1 (Dobson et al., 1994) identifiziert. Kürzlich wurden drei Proteine des CE, SYCE1, SYCE2 und TEX12, aus Säuger (Costa et al., 2005; Hamer et al., 2006), sowie die Lateralelement Proteine SYCP1 und SYCP3 in der Fischart Medaka *Oryzias latipes* beschrieben (Iwai et al., 2006). Weiterhin wurden verschiedene Proteine des SC der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans*, der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und in verschiedenen Pflanzen identifiziert.

Obwohl die Struktur des SC zwischen den verschiedenen Spezies hochkonserviert ist, sind die Proteinkomponenten in den untersuchten Tier-, Pflanzen- und Pilzstämmen auf Aminosäuresequenzebene sehr unterschiedlich und weisen, wenn überhaupt, eine strukturelle Homologie in ihrer Domänenorganisation auf.

In Folgenden soll nun die räumliche und zeitliche Verteilung dieser Verschiedenen SC Proteine sowie deren Funktion, soweit bekannt, beschrieben werden.

Proteinkomponenten der Lateralelemente

Die Lateralelemente (LEs) eines SC sind im Elektronenmikroskop als elektronendichte Strukturen zu erkennen, die beim Nager ca. 50 nm breit sind und sich entlang der homologen Chromosomen erstrecken. Bekannte Proteine der LEs sind SYCP2 und SYCP3 in Säugern, SYCP3 in Medaka sowie Red1 und Hop1 in *Saccharomyces cerevisiae*.

Säuger: **SYCP3 (Cor1)**

SYCP3 wird im Leptotän zum ersten Mal nachweisbar und lokalisiert zunächst an den AE der Chromosomen. Während der Synapse der homologen Chromosomen ist SYCP3 Bestandteil der LE und verbleibt dort bis zur Auflösung des SC im Diplotän. Bis zur Metaphase I ist SYCP3 im Centromerbereich nachweisbar (Dobson et al., 1994; Lammers et al., 1994; Schalk et al., 1998; Pelttari et al., 2001; Eijpe et al., 2003).

SYCP3 (synaptonemal complex protein 3) bzw. Cor1 (meiotic chromosome core protein) sind homologe Proteine aus Ratte, Maus, Mensch (SYCP3) und Hamster (Cor1). Die Proteine bestehen aus 257 (Ratte), 254 (Maus), 236 (Mensch) bzw. 234 Aminosäuren (Hamster) und sind zwischen Säugern konserviert, besitzen aber speziesspezifische Unterschiede (Bothelo et al., 2001). So liefert SYCP3 aus Maus und Ratte zwei Banden im Polyacrylamidgel mit einer molekularen Masse von 30 kDa bzw. 33 kDa (Heyting et al., 1987; Lammers et al., 1994). Die homologen Proteine aus Hamster und Mensch werden als Einzelbande mit einer molekularen Masse von 30 kDa im Immunblot nachgewiesen (Dobson et al., 1994; Miyamoto et al., 2003). Datenbankanalysen zwischen Ratte, Maus und Hamster ergaben für das SYCP3 Gene neun Exons wobei dem Exon 1 in Hamster das Startcodon ATG fehlt, das in Ratte und Maus vorhanden ist. Das Hamster SYCP3 Gen besitzt an der entsprechenden Position ein AAG, wodurch das Exon 1 nicht abgelesen wird. Das Startcodon ATG scheint bei Hamster im Exon 2 zu liegen und zwar an einer Position in der auch das Ratten und Maus SYCP3 Gen ein ATG Codon besitzt (Botelho et al. 2001). Die Analyse des SYCP3/Cor1 Proteins ergab einen hohen Anteil an den Aminosäuren Glutamin und Lysin (Lammers et al., 1994; Dobson et al., 1994). Durch die Analyse der Aminosäuresequenz nach der Methode von A. Lupas (Lupas et al., 1991) konnten in der C-terminalen Hälfte von SYCP3 (Cor1) eine α -helikale Domäne identifiziert werden, die typisch für die Ausbildung von „Coiled-Coil“-Strukturen ist. Über diese C-terminale „Coiled-Coil“-Struktur kann SYCP3 (Cor1) homophile Protein-Protein-Interaktionen eingehen (Yuan et al., 1998; Tarsounas et al., 1997). In der nichthelikalen N-terminalen Hälfte hat SYCP3/Cor1 ein putatives Kernlokalisationssignal (NLS) (Chelsky et al., 1989). Weiterhin wurde in diesem Bereich ein sogenanntes „Motiv-A“ gefunden, was typisch für verschiedene nukleotidbindende Proteine ist (Walker et al., 1982). Die flankierenden Bereiche des „Motiv-A“ lassen auf eine mögliche Purinbindungstelle in SYCP3 (Cor1) schließen. Der Nachweis einer Nukleotidspezifität konnte allerdings noch nicht erbracht werden. Darüber hinaus besitzt das Protein verschiedene potentielle Phosphorylierungsstellen welche über das gesamte Molekül verteilt sind. SYCP3 (Cor1) hat eine Zielsequenz für eine cAMP bzw. cGMP abhängige Protein-Kinase (Feramisco et al., 1980), vier weitere Zielsequenzen für die Protein-Kinase C (Kishimoto et al., 1985) und fünf potentielle Zielsequenzen für die Casein Kinase II (Pinna, 1990). Die Bindung von Phosphatresten an SYCP3 (Cor1) ist wahrscheinlich verantwortlich

für die Dissoziation des Proteins von den Chromosomen am Ende des Pachytäns (Tarsounas et al., 1999).

L. Yuan und Mitarbeiter untersuchten die homophilen Protein-Protein-Interaktionseigenschaften von SYCP3 um dessen Rolle im AE bzw. LE verstehen zu können. Wird SYCP3, das N-terminal einen „FLAG-Tag“ trägt, in somatischen Zellen unabhängig von anderen meiotischen Proteinen exprimiert, bildet SYCP3 dicke Filamente im Zellkern und dünnere Filamente im Cytoplasma, die im Durchmesser variierten und netzwerkartige Strukturen bildeten. Die Filamente erreichten eine Dicke von bis zu 0,5 µm. Die genauere Struktur dieser Filamente wurde im Transmissionselektronenmikroskop untersucht. Die dickeren Filamente erschienen hier als quergestreift, wobei sich dieses Streifenmuster alle 20 nm wiederholte. Diese Filamente bestanden aus mehreren, parallel angeordneten, dünnen Filamenten, die je einen Durchmesser von 5-10 nm hatten. Um Informationen über die Funktion einzelner Domänen für die Protein-Protein-Interaktion von SYCP3 zu erhalten, wurden zwei verkürzte Konstrukte von SYCP3 hergestellt. Ein Teilprotein bestand aus der N-terminalen nicht helikalen Domäne (SYCP3-N, Aminosäuren 2-130), das zweite Teilprotein bestand aus der C-terminalen Hälfte von SYCP3, welche die „Coiled-Coil“-Domäne beinhaltete (SYCP3-C, Aminosäuren 125-257). Da weder SYCP3-N, noch SYCP3-C, exprimiert in Kulturzellen, Filamente bilden konnten, scheinen also beide Domänen für die Filamentbildung notwendig zu sein. Es konnte zudem gezeigt werden, dass SYCP3-C mit SYCP3 interagiert, SYCP3-N dagegen nicht. Daraus ergibt sich, dass die im C-Terminus liegende „Coiled-Coil“-Domäne für die Ausbildung homophiler Protein-Protein-Interaktionen zuständig ist. Zudem wurde je ein Teilprotein mit SYCP3 in Kulturzellen koexprimiert. Wurde SYCP3-C mit SYCP3 koexprimiert konnte SYCP3 keine Filamente mehr bilden. Die „Coiled-Coil“-Domäne von SYCP3-C scheint mit der „Coiled-Coil“-Domäne von SYCP3 zu interagieren wodurch die Filamentbildung gestört wird. Durch die Koexpression von SYCP3-N mit SYCP3 wird die Filamentbildung nicht gestört, die Filamente sind aber dünner als im wildtypischen Protein. Eine Ursache dafür könnte sein, dass die laterale Bündelung der dünneren Filamente zu dickeren Filamenten durch SYCP3-N gestört wird.

SYCP3 hat aber nicht nur die Fähigkeit homophilen Protein-Protein-Interaktionen einzugehen, sondern es interagiert auch mit SYCP2 (siehe unten), einer weiteren Proteinkomponente der LEs (Tarsounas et al., 1999; Peltari et al., 2001), wobei die konservierte „Coiled-Coil“-Domäne in SYCP2 essentiell für die Bindung an SYCP3 ist (Yang et al., 2006). Eine Interaktion von SYCP3 (Cor1) mit SYCP1 (Syn1), einem Protein der TFs, welches in das LE hineinreicht (siehe unten), konnte aber weder in vivo, noch in vitro nachgewiesen werden (Tarsounas et al., 1997; Yuan et al., 1998).

Säuger: **SYCP2**

SYCP2 wird ebenso wie SYCP3 im Leptotän zum ersten Mal nachweisbar und lokalisiert zunächst an den AE der Chromosomen. Während der Synapse der homologen Chromosomen ist SYCP2 Bestandteil der LEs und verbleibt dort bis zur Auflösung des SC im Diplotän. Bis zur Metaphase I ist SYCP2 im Centromerbereich nachweisbar (Dobson et al., 1994; Lammers et al., 1994; Schalk et al., 1998; Pelttari et al., 2001; Eijpe et al., 2003).

SYCP2 (synaptonemal complex protein 2) ist ein meiosespezifisches Protein. Es wurden die homologen Proteine aus Ratte, Maus und Mensch identifiziert, die aus 1505 (Ratte), 1500 (Maus) bzw. 1530 Aminosäuren (Mensch) bestehen (Offenberg et al., 1998; Schalk et al., 1999; Wang et al., 2001). SYCP2 hat ein Molekulargewicht von 190000 bzw. eine molekulare Masse von 173 kDa. Der Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit von SYCP2 im elektrischen Feld (M_r 190000) und der vorhergesagten molekularen Masse von 173 kDa ist durch den hohen Anteil an basischen Prolinresten zu erklären, wobei basische Proteine langsam in Polyacrylamidgelen wandern. Durch Analyse der Aminosäuresequenz (Lupas et al., 1991) konnte im C-Terminus von SYCP2 eine kurze α -helikale Domäne identifiziert werden, die typisch für die Ausbildung von „Coiled-Coil“-Strukturen ist. Dieser kurze „Coiled-Coil“-Bereich ist zwischen SYCP2 aus Ratte, Maus und Mensch konserviert (Yang et al., 2006). Weiterhin hat SYCP2 zwei putative Kernlokalisations-signale, mehrere Zielsequenzen für eine cAMP bzw. cGMP abhängige Proteinkinase, sowie weitere potentielle Zielsequenzen für die $p34^{cdc2}$ -Kinase. Durch Phosphorylierung dieser potentiellen Phosphorylierungsstellen könnte es zu strukturellen Veränderungen von SYCP2 kommen, wodurch der Auf- und Abbau des SC reguliert werden könnte. Weiterhin wurden mehrere DNA-Bindungsmotive identifiziert. Diese Motive bilden „ β -turns“ und könnten sequenzunspezifisch mit der kleinen Furche der DNA interagieren. Sie sind in zwei „Clustern“ angeordnet, die eine basische Domäne von SYCP2 flankieren (Offenberg et al., 1998; Schalk et al., 1999). Die Lokalisation von SYCP2 im AE bzw. LE und die potentielle Fähigkeit DNA zu binden, lässt vermuten, dass dieses Protein an der Organisation des meiotischen Prophasenchromatins beteiligt ist (Offenberg et al., 1998).

Da sowohl SYCP2 als auch SYCP3 an den AE/LE des meiotischen Chromosoms Lokalisieren wurden beiden Proteine auf eine mögliche Interaktion hin untersucht. Zum einen wurden Bindungsexperimente durchgeführt, indem beide Proteine in somatischen Kulturzellen exprimiert wurden. Die ektopische Expression von SYCP2 in Kulturzellen führte zur Aggregation der Moleküle im Zellkern. Diese Aggregate lösen sich allerdings mit koexprimierten SYCP3 auf und die SYCP2-Moleküle kolokalisieren mit SYCP3 in großen filamentähnlichen Strukturen im Zellkern (Pelttari et al., 2001) was auf eine Interaktion beider Proteine hinweist. Neben den Kolokalisationsstudien konnte über weitere in vitro und in vivo Bindungsstudien bestätigt werden, dass SYCP2 und SYCP3 miteinander interagieren

(Pelttari et al., 2001; Tarsounas et al., 1999). Kürzlich wurde beschrieben, dass die konservierte „Coiled-Coil“-Domäne in SYCP2 essentiell für die Bindung an SYCP3 ist (Yang et al., 2006).

Medaka: **SYCP3**

SYCP3 ist ein meiosespezifisches Protein in der Fischart Medaka. Antikörper gegen SYCP3 detektieren ein 27 kDa und ein 30 kDa Protein im Western Blot. Das Protein wird im frühen Leptotän zum ersten Mal nachweisbar, lokalisiert an den AE und ist während der Synapse der homologen Chromosomen Bestandteil der LEs. In der Metaphase I ist SYCP3 nicht nur im Centromerbereich sondern auch an den Chromosomenarmen lokalisiert, wodurch sich die Verteilung des Medaka SYCP3 zu dem homologen Protein in Säugern in der Metaphase I unterscheidet (Iwai et al., 2006).

S. cerevisiae: **Red1 und Hop1**

Red1 ist ein meiosespezifisches 95,5 kDa Protein in *Saccharomyces cerevisiae*, besteht aus 827 Aminosäuren und ist für die Ausbildung von AEs bzw. LEs verantwortlich (Rockmill und Roeder, 1990; Smith und Roeder, 1997). Es hat einen hohen Anteil an Glutamin und Lysin (Thompson und Roeder, 1989). Durch Analyse der Aminosäuresequenz (Lupas et al., 1991) konnten im C-Terminus von Red1 eine α -helikale Domäne identifiziert werden, die typisch für die Ausbildung von „Coiled-Coil“-Strukturen ist. Zudem besitzt Red1 mehrere DNA-Bindungsmotive. Diese Motive bilden „ β -turns“ und könnten sequenzspezifisch mit der kleinen Furche der DNA interagieren (Offenberg et al., 1998). Die Verteilung von Red1 entlang des AE ist diskontinuierlich. Es wird postuliert, dass Red1 die Bildung des AE am Chromosom initiieren kann, indem sich weitere Proteinkomponenten anlagern und ein kontinuierliches lineares Element, das AE, entsteht (Smith und Roeder, 1997). Red1 bildet Homo-Oligomere und interagiert mit dem Protein **Hop1**, einem meiosespezifischen 70 kDa Protein in *Saccharomyces cerevisiae* (Hollingsworth et al., 1990; Woltering et al., 2000). Hop1 und Red1 sind an denselben Stellen auf dem Chromosom lokalisiert. Während Red1 an den Chromosomen verbleibt, dissoziiert Hop1 im Laufe der Synapse. Red1 kann, unabhängig von Hop1, an die chromosomale DNA binden, ist aber wichtig für dessen Rekrutierung an die Chromosomen (Smith & Roeder, 1997).

Red1 hat keine Homologie zu SYCP3 (Smith und Roeder, 1997), es weist aber strukturelle Ähnlichkeiten zu SYCP2 auf (Offenberg et al., 1998).

Proteinkomponenten der zentralen Region

Die zentrale Region (CR) besteht aus dem elektronendichten zentralen Element (CE), welche parallel zu den Lateralelementen (LEs) verläuft, und den Transversalfilamenten (TFs), die die Kluft zwischen den LEs und dem CE überspannen. Bei Nagern hat die CR einen Durchmesser von 80-100 nm. Bekannte Proteine der CR sind SC48, das TF-Protein SYCP1 und die CE-Proteine SYCE1, SYCE2 und TEX12 in Säugern sowie die TF-Proteine SYCP1 in Medaka, Zip1 in *Saccharomyces cerevisiae*, SYP1 und SYP2 in *Caenorhadtitis elegans*, C(3)G in *Drosophila melanogaster* und ZYP1 in *Arabidopsis thaliana*.

Säuger: SYCP1 (Syn1)

SYCP1 kann ab dem Zygotän an gepaarten homologen Chromosomen nachgewiesen werden (Meuwissen et al., 1992; Dobson et al., 1994) und dissoziiert am Ende des Pachytäns von den Chromosomen (Tarsounas et al., 1999).

SYCP1 (synaptonemal complex protein 1) bzw. Syn1 (meiotic chromosome synaptic protein) sind homologe Proteine aus Ratte, Maus, Mensch (SYCP1) und Hamster (Syn1). Die Proteine bestehen aus 997 (Ratte), 993 (Maus), 976 (Mensch) bzw. 845 Aminosäuren (Hamster). SYCP1/Syn1 hat eine molekulare Masse von 125 kDa (Meuwissen et al., 1992, 1997; Sage et al., 1995; Liu et al., 1996; Dobson et al., 1994). Durch die Analyse der Aminosäuresequenz nach der Methode von Chou und Fasman (1978) lässt sich SYCP1/Syn1 in drei Domänen unterteilen, eine N- und eine C-terminale globuläre Domäne, die durch eine zentrale α -helikale Domäne getrennt sind. Die N-terminale Domäne besteht hauptsächlich aus sauren Aminosäureresten und enthält keine strukturellen Motive. Der C-Terminus dagegen ist aus überwiegend basischen Aminosäureresten aufgebaut und weist verschiedene Motive auf. Hier wurden z.B. mehrere DNA-Bindungsmotive identifiziert. Diese Motive bilden „ β -turns“ und könnten sequenzunspezifisch mit der kleinen Furche der DNA interagieren. Außerdem konnte in dieser Domäne eine potentielle Zielsequenz für die p34^{cdc2}Kinase, und ein putatives Kernlokalisierungssignal identifiziert werden. Die lange zentrale α -helikale Domäne kann „Coiled-Coil“-Strukturen ausbilden. Hier konnte ein „Leucinzipper“, ein weiteres DNA-Bindungsmotiv, identifiziert werden. Zudem wurden mehrere Zielsequenzen für eine cAMP bzw. cGMP abhängige Proteinkinase und eine Tyrosinkinase identifiziert. Außerdem liegen 12 potentielle Zielsequenzen der Proteinkinase C über das gesamte Protein verteilt (Meuwissen et al., 1997). Durch Phosphorylierung der potentiellen Phosphorylierungsstellen könnte es zu strukturellen Veränderungen von SYCP1 (Syn1) kommen, wodurch der Auf- und Abbau des SC reguliert werden könnte (Meuwissen et al., 1997). SYCP1/Syn1 bildet Homodimere mit einer stabförmigen zentralen

„Coiled-Coil“-Domäne, die von zwei kleineren globulären Domänen flankiert ist, ähnlich der Struktur von Myosin oder Intermediärfilamenten (Roeder, 1997).

Verschiedene Versuche zeigten, dass ein TF, das von einem LE durch das CE zum anderen LE reicht, aus zwei, Kopf an Kopf angeordneten, SYCP1 Dimeren besteht. Dabei sind die C-terminalen Enden der SYCP1 Dimere in den LEs verankert und die N-Termini lokalisieren im CE (Dobson et al., 1994; Liu et al., 1996; Schmekel et al., 1996). Zudem bildet SYCP1 die Grundstruktur der CR wobei die Weite der CR von der Länge der α -helikalen Domäne von SYCP1 abhängig ist (Öllinger et. al., 2005). Die N-terminalen Bereiche der SYCP1-Dimere scheinen eine Aufgabe in der Rekrutierung von Proteinen des CE, SYCE1 und SYCE2, zu haben (siehe unten; Costa et. al., 2005).

Säuger: **SC48:**

SC48 ist ein meiosespezifisches 48 kDa Protein der Ratte dessen Proteinsequenz nicht bekannt ist. Es wurde über einen monoklonalen Antikörper in der CR des gepaarten SC lokalisiert. Außerdem konnte SC48 durch Zellfraktionierungsexperimente als Kernstrukturprotein charakterisiert werden (Smith und Benavente, 1992).

Säuger: **SYCE1**

SYCE1 (synaptonemal complex central element 1) ist ein meiosespezifisches 329 Aminosäuren großes Protein der Maus. Nach Computerberechnungen besitzt SYCE1 vier potentielle „Coiled-Coil“-Domänen, darüber hinaus wurden aber keine weiteren markanten Motive identifiziert. Über Datenbankanalysen wurden orthologe Proteinsequenzen in Säugern gefunden. SYCE1 lokalisiert am CE des SC. Es konnte gezeigt werden, dass SYCE1 mit sich selbst, mit SYCE2 und mit dem N-Terminus von SYCP1 interagieren kann (Costa et. al., 2005; Bolcun-Filas et. al., 2006)

Säuger: **SYCE2**

SYCE2 (synaptonemal complex central element 2) ist ein meiosespezifisches 171 Aminosäuren großes Protein der Maus. Nach Computerberechnungen besitzt SYCE2 eine potentielle „Coiled-Coil“-Domäne. Außerdem wurde in der Sekundärstruktur des Proteins eine lange Haarnadelschleife (α -hairpin-Struktur) identifiziert, die Teil einer neuen konservierten Domäne ist. Die Haarnadelschleife besteht aus zwei Helices, die durch einen kurzen Loop getrennt sind. Diese Sekundärstrukturen befinden sich häufig an Proteinoberflächen, wo sie eine enge Kurve bilden, mit der sich die Polypeptidkette wieder in das Innere des Proteins zurückwindet (Lodisch 2001). Über die Funktion dieser konservierten Domäne in SYCE2 ist allerdings nichts bekannt. Über Datenbankanalysen wurden orthologe Proteinsequenzen in Säuger, Huhn, Frosch und Fisch gefunden. SYCE2

1. Einleitung

lokalisiert am CE des gepaarten SC. Es konnte gezeigt werden, dass SYCE2 mit sich selbst, mit SYCE1 und mit dem N-Terminus von SYCP1 interagieren kann (Costa et. al., 2005; Bolcun-Filas et. al., 2006).

Säuger: **TEX12**

TEX12 (testis expressed sequence 12) ist ein meiosespezifisches 14 kDa Protein der Maus, das keine markanten Proteindomänen aufweist. Über Datenbankanalysen wurden orthologe Proteinsequenzen in Säuger und Zebrafisch gefunden. TEX12 lokalisiert am CE des gepaarten SC und interagiert mit SYCE2 (Hamer et. al., 2006).

Medaka: **SYCP1**

SYCP1 ist ein meiosespezifisches Protein in Medaka mit einer molekularen Masse von 104 kDa. Es kann an gepaarten Chromosomen nachgewiesen werden und scheint für die Ausbildung von TFs verantwortlich zu sein (Iwai et al., 2006).

S. cerevisiae: **Zip1:**

Zip1 ist ein meiosespezifisches Protein in *Saccharomyces cerevisiae*, besteht aus 875 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 125 kDa. Obwohl Zip1 keine Aminosäuresequenzhomologie zu SYCP1 (Syn1) besitzt, besteht eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen diesen Proteinen (Roeder, 1997). Es lässt sich, ebenso wie SYCP1 (Syn1), in drei Domänen unterteilen: eine kurze N- und eine C-terminale globuläre Domäne die durch eine zentrale α -helikale Domäne, welche „Coiled-Coil“-Strukturen ausbilden kann, getrennt sind (Sym et al., 1993; Sym und Roeder, 1995) Zip1 kann an gepaarten Chromosomen nachgewiesen werden und ist für die Ausbildung von TFs verantwortlich (Sym et al., 1993). Analog zu Säugern bestehen die TFs aus je zwei Zip1-Dimeren, wobei die N-Termini in der CR und die C-Termini im LE lokalisieren (Dong und Roeder, 2000).

C. elegans: **SYP-1; SYP-2**

Syp-1 und Syp-2 sind meiosespezifische Proteine in *Caenorhaditis elegans*. Syp-1 besteht aus 484 Aminosäuren und Syp-2 setzt sich aus 213 Aminosäuren zusammen (MacQueen et al., 2002; Colaiácovo et al., 2003). Beide Proteine bestehen aus einer N- und einer C-terminalen globulären Domäne die durch eine zentrale α -helikale Domäne, welche „Coiled-Coil“-Strukturen ausbilden kann, getrennt sind. Syp-1 und Syp-2 bilden zusammen die strukturelle Einheit der TFs des SC da sowohl in der *syp-1* Mutante als auch in der *syp-2* Mutante keine synaptische Paarung der homologen Chromosomen stattfinden kann (Colaiácovo et al., 2003; Colaiácovo 2006). Die Orientierung der beiden Proteine in der CR und der Mechanismus des TF-Aufbaus konnte allerdings noch nicht geklärt werden.

Drosophila: **C(3)G**

C(3)G ist ein meiosespezifisches Protein in *Drosophila melanogaster* und besteht aus 744 Aminosäuren. Es lässt sich in eine N- und eine C-terminale globuläre Domäne und in eine ausgeprägte, zentrale α -helikale Domäne, welche „Coiled-Coil“-Strukturen ausbilden kann, unterteilen (Page & Hawley, 2001). C(3)G kann an gepaarten Chromosomen nachgewiesen werden und ist für die Ausbildung von TFs verantwortlich (Page und Hawley, 2004)

A. thaliana: **ZYP1 (AAD10695)**

ZYP1, ein meiosepezifisches Protein in *Arabidopsis thaliana*, wurde mittels Computeranalysen aufgrund der strukturellen Homologie zu anderen bekannten TF-Proteinen identifiziert (Bogdanov et al., 2003; Higgins et al., 2005). Dieses Protein kann in der CR an gepaarten Chromosomen nachgewiesen werden und da sich ohne ZYP1 keine SCs ausbilden können wird das Protein als wichtig für die Ausbildung von TFs beschrieben (Osman et al., 2006).

1.2.3.2 Organismen ohne Synaptonemalkomplex

Obwohl der SC in den meisten Spezies eine weit verbreitete Struktur der ersten meiotischen Teilung ist, gibt es einige Organismen, die während der Meiose keinen SC ausbilden. Zu diesen zählen unter anderem die Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe*, der Pilz *Aspergillus nidulans* und männliche Fruchtfliegen *Drosophila melanogaster* (Olson et al., 1978; Egel-Mitani et al., 1982; Meyer, 1960; Rasmussen et al., 1973). In diesen Organismen findet eine Paarung der homologen Chromosomen ohne die Bildung einer SC-Struktur statt. Die Paarung der homologen Chromosomen muss demzufolge durch andere Mechanismen ermöglicht werden. Beispielsweise sind in *Schizosaccharomyces pombe* entlang der Chromosomenachsen „lineare Elemente“ erkennbar (Olson et al., 1978; Bähler et al., 1993), die den AEs bzw. den LEs ähnlich sind. Hier findet zwar homologe Rekombination statt aber Crossover-Produkte entstehen in einer großen Anzahl und unreguliert. *Drosophila* Männchen bilden im Gegensatz zu den Weibchen während der Meiose keine SC-Struktur aus (Meyer, 1960; Rasmussen, 1973) und es findet keinerlei Rekombination statt (Morgan, 1912).

1.3 Die Funktion des SC und dessen Proteinbestandteile

Die Entdeckung neuer Proteinbestandteile des SC in verschiedenen Organismen, sowie deren cytologische Untersuchung und genetische Manipulation waren wichtige Schritte um die Funktion des SC in den unterschiedlichen Vorgängen der Meiose besser einordnen zu können. Weitergehend wurden die wechselseitigen Abhängigkeiten von Paarung, Synapse und Rekombination der homologen Chromosomen besser verstanden. Die Funktion des SC

innerhalb dieser Vorgänge ist die synaptische Paarung der homologen Chromosomen und die Stabilisierung der Homologenpaarung im Pachytän, sowie die fehlerfreie Segregation der Homologen auf die Tochterzellen. Weiterhin ist das korrekte Voranschreiten der homologen Rekombination zu Crossover-Ereignissen vom SC abhängig (Moens et al., 2002; Kleckner 2006).

Um die Funktion der AEs bzw. der LEs in Säugern zu untersuchen, wurden Maus-Mutanten für die beiden Hauptproteinkomponenten SYCP2 und SYCP3 hergestellt. In der SYCP2 „Knockout“-Maus wurde die C-terminale „Coiled-Coil“-Domäne deletiert, die für die Anlagerung von SYCP3 verantwortlich ist. Die SYCP3 „Knockout“-Maus ist eine Nullmutante. In beiden Maus-Mutanten können sich keine AEs bzw. LEs ausbilden. Weibliche Maus-Mutanten sind fruchtbar, haben aber eine geringere Anzahl an Nachkommen. Es entstehen aneuploide Keimzellen, aus denen Embryonen hervorgehen, die bereits im Mutterleib sterben. In männlichen Maus-Mutanten kommt es zum Abbruch der Spermatogenese und die Tiere sind steril. (Pelttari et al., 2001; Yuan et al., 2000; 2002; Yang et al., 2006; Wang und Höög, 2006). Außerdem wurde kürzlich die Identifikation einer Mutation von SYCP3 in Mensch publiziert, die zu einer Verkürzung des C-Terminus führt und schon bei Heterozygoten Azoospermie zur Folge hat (Miyamoto et al., 2003). Es konnte zudem festgestellt werden, dass das Fehlen von AEs bzw. LEs einen Einfluss auf die Reparatur der DSBs und somit auf die homologe Rekombination hat (Wang und Höög, 2006).

Um die Rolle der AEs bzw. der LEs bei der Fertilität und in der homologen Rekombination besser zu verstehen, wurde die Oogenese und Spermatogenese in *SYCP3*^{-/-} Mäusen näher untersucht. Fehlt SYCP3, können keine AEs bzw. LEs ausgebildet werden, und es kommt zu keiner Anlagerung von SYCP2 an Chromosomen. Aber auch ohne diese AEs bzw. LEs kommt es zur Anlagerung von Proteinen, die für die Rekombination zuständig sind, die Bindung dieser Proteine ans Chromosom ist aber nicht so stabil wie im Wildtyp. Ohne AEs bzw. LEs ist die Chromosomenkondensation beeinflusst. Die Chromosomen sind doppelt so lang wie im Wildtyp (Yuan et al., 2002; Liebe et al., 2004). Außerdem ist die Synapse der homologen Chromosomen gestört. Die TFs können sich zwar zwischen den homologen Chromosomen anlagern, sind aber im Gegensatz zur normalerweise kontinuierlichen Verteilung im Wildtyp, lückenhaft angeordnet (Liebe et al., 2004). Die Ausbildung von Crossover-Produkten ist möglich, allerdings ist deren Anzahl im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Wang und Höög (2006) konnten kürzlich zeigen, dass es in *SYCP3*^{-/-} Oocyten zu einer verspäteten Ablösung verschiedener Rekombinationsproteine vom Chromosom in der Prophase I kommt. Die AEs bzw. LEs scheinen demnach eine essentielle Rolle für den Reifungsprozess von DSBs zu Crossover-Produkten im Zeitfenster der Prophase I zu spielen (Liebe et al., 2004; Kleckner, 2006; Wang und Höög, 2006). Weiterhin scheinen die LEs einen Einfluss auf die Ablösung der Kohäsinkomplexe an den Chromosomenarmen im

Diplotän zu haben (Kouznetsova et al., 2005). Die reduzierte Anzahl von Crossover-Produkten und das vorzeitige Auflösen der Armkohäsion könnte die Segregation der homologen Chromosomen beeinflussen, wodurch aneuploide Keimzellen entstehen, womit die Störung der Fertilität zu erklären wäre.

Die Funktion der CR wurde in SYCP1 und SYCE2 „Knockout“-Mäusen sowie in Zip1-Null-Mutanten bei *Saccharomyces cerevisiae* untersucht.

In SYCP1 und SYCE2 Maus-Mutanten können sich zwar die AEs bilden, aber obwohl die Initiation der Homologenpaarung nicht beeinflusst ist, kommt es zu keiner synaptischen Paarung der homologen Chromosomen durch die TFs und es findet kein Crossover-Ereignis statt (de Vries et al., 2005; Bolcun-Filas et al., 2007). Zip1-Mutanten können ebenfalls keinen SC aufbauen. Die Homologenpaarung und die Bildung der AE findet zwar statt, aber es erfolgt keine Synapse (Nag et al., 1995; Rockmill et al., 1995; Sym et al., 1993). Die Anzahl der Nicht-Crossover-Rekombinationsereignisse ist im Vergleich zum Wildtyp unverändert, die Reifung dieser zu Crossover-Produkten ist aber verringert (Sym et al., 1993; Sym und Roeder, 1994). Weiterhin weisen die verbleibenden Crossover-Produkte keine Interferenz auf (Tung und Roeder, 1998). Unter Interferenz versteht man die Regulation der Crossover-Produkte auf dem Chromosom, welche bewirkt, dass ein Crossover an einem Locus die Wahrscheinlichkeit eines Crossovers an einem benachbarten Locus verringert. Die Entscheidung, welcher DSB später zu einem Crossover-Produkt umgewandelt wird, findet schon bei der Bildung des DSB, noch vor der SC Bildung, statt. Da die Synapse der homologen Chromosomen an den DSB beginnt (Keeney, 2001), die zu Crossover-Produkten reifen, könnte der SC eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der zukünftigen Crossover-Produkte haben und den Achsenaustausch bei Crossover zu unterstützen (Bömer et al., 2004). Dazu stimmt auch die Beobachtung, dass Organismen wie *Schizosaccharomyces pombe* und *Aspergillus*, die keine SCs besitzen eine Große Anzahl von unregulierten Crossover-Produkten haben (Egel-Mitani et al., 1982; Kleckner, 2006).

Der SC scheint also eine essentielle Rolle für den Reifungsprozess von DSBs zu Crossover-Produkten zu haben. Hierzu passt auch, dass, im Gegensatz zu *Saccharomyces cerevisiae* und Säugern die Paarung der homologen Chromosomen und die Bildung des SC bei *Caenorhaditis elegans* und *Drosophila melanogaster* unabhängig von DSBs abläuft, deren Reifung zu Crossover-Produkten aber vom SC abhängt. Es wird vermutet, dass bestimmte Chromatinbereiche, so genannte Paarungszentren, für die Aneinanderlagerung der homologen Chromosomen verantwortlich sind (Colaiácovo et al., 2003; MacQueen et al., 2002). Die Einführung von DSBs erfolgt bei beiden Organismen erst nach der SC-Bildung. Bei fehlender SC-Bildung werden DSBs erzeugt, die Reifung von DSBs zu Crossover-Produkten kommt jedoch völlig zum Erliegen (Colaiácovo et al., 2003; MacQueen et al., 2002; Page und Hawley, 2001).

1.4 Struktur und Funktion von Proteinen

Wie unter 1.2.3.1 beschrieben besteht SYCP3 der Ratte aus 257 Aminosäuren und besitzt eine, im C-Terminus liegende, α -helikale Region, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine „Coiled-Coil“-Domäne ausbildet. Umgeben ist die α -helikale Region von zwei nicht-helikalen Domänen. Und obwohl sich die SYCP3-Sequenzen innerhalb der Säuger auf Aminosäureebene unterscheiden weisen die Proteine eine strukturelle Homologie in ihrer Domänenorganisation auf und fungieren als Hauptstrukturkomponente der Lateralelemente (Lammer et al., 1994; Dobson et al., 1994; Tarsounas et al., 1997; Yuan et al., 1998; 2000; Liebe et al., 2004).

Man geht davon aus, dass die Funktion von Proteinen von deren dreidimensionalen Struktur abhängig ist, die wiederum durch die Aminosäuresequenz festgelegt wird. So kann man über die Primärsequenz von Proteinen auf ihre Sekundär- und Tertiärstruktur, ihre Modifikationsfähigkeit und somit auf deren Funktion schließen. Mit Datenbankanalysen kann man Aminosäuresequenzen bekannter Proteinen mit bekannter Funktion mit unbekanntem Proteinen vergleichen und so Rückschlüsse auf die Funktion von Domänen innerhalb eines Proteins ziehen. Außerdem kann man durch den Vergleich von Aminosäuresequenzen aus verschiedenen Organismen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Organismen sehr genau untersuchen. Ähneln sich Proteine in ihrer Aminosäuresequenz spricht man von homologen Proteinen, die in der Evolution aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein hervorgegangen sind. Je größer die Sequenzähnlichkeit zwischen Proteinen ist, desto näher verwandt sind Organismen miteinander.

Proteine sind aus Aminosäuren aufgebaut, welche die monomeren Untereinheiten darstellen. Alle Aminosäuren besitzen ein α -Kohlenstoffatom, das mit einer Aminogruppe ($-\text{NH}_2$), einer Carboxylgruppe ($-\text{COOH}$), einem Wasserstoffatom ($-\text{H}$) und einer variablen Seitenkette, die von Aminosäure zu Aminosäure in Größe, Form, Ladung, Hydrophobizität und Reaktivität unterschiedlich sind, verbunden ist. Man kann die Aminosäuren aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit in hydrophile (wasserlöslich) und hydrophobe (wasserabweisend) unterteilen. Aminosäuren werden über eine Peptidbindung zu linearen, unverzweigten Ketten zusammengefügt, wobei die Abfolge der Aminosäuren als Primärstruktur eines Proteins bezeichnet wird. Als Sekundärstruktur bezeichnet man die lokale Faltung einzelner Teile der Aminosäurekette wie z.B. α -Helices, β -Faltblätter oder Haarnadelschleifen. Die endgültige dreidimensionale Struktur eines Proteins wird als Tertiärstruktur bezeichnet. Bilden mehrere Proteine miteinander einen Komplex spricht man von einer Quartärstruktur. Enthalten Proteine innerhalb einer höhergeordneten Konformation strukturelle und funktionelle Module, spricht man von einer Domäne. Weiterhin können Proteine nach ihrer Synthese auf verschiedene Weise modifiziert werden, sodass sich ihre Struktur und Funktion ändern.

Die „Coiled-Coil“-Domäne

Eine besondere Art der Proteinfaltung ist die „Coiled-Coil“-Organisation, die der Dimerisierung von Proteinen dient. Da auch SYCP3 dieses Strukturmotiv ausbilden kann und die Funktion der „Coiled-Coil“-Domäne die Vermittlung einer homophilen Protein-Protein-Interaktion zwischen den SYCP3-Molekülen zu sein scheint (Yuan et al., 1998; Tarsounas et al., 1997), soll im folgendem näher darauf eingegangen werden.

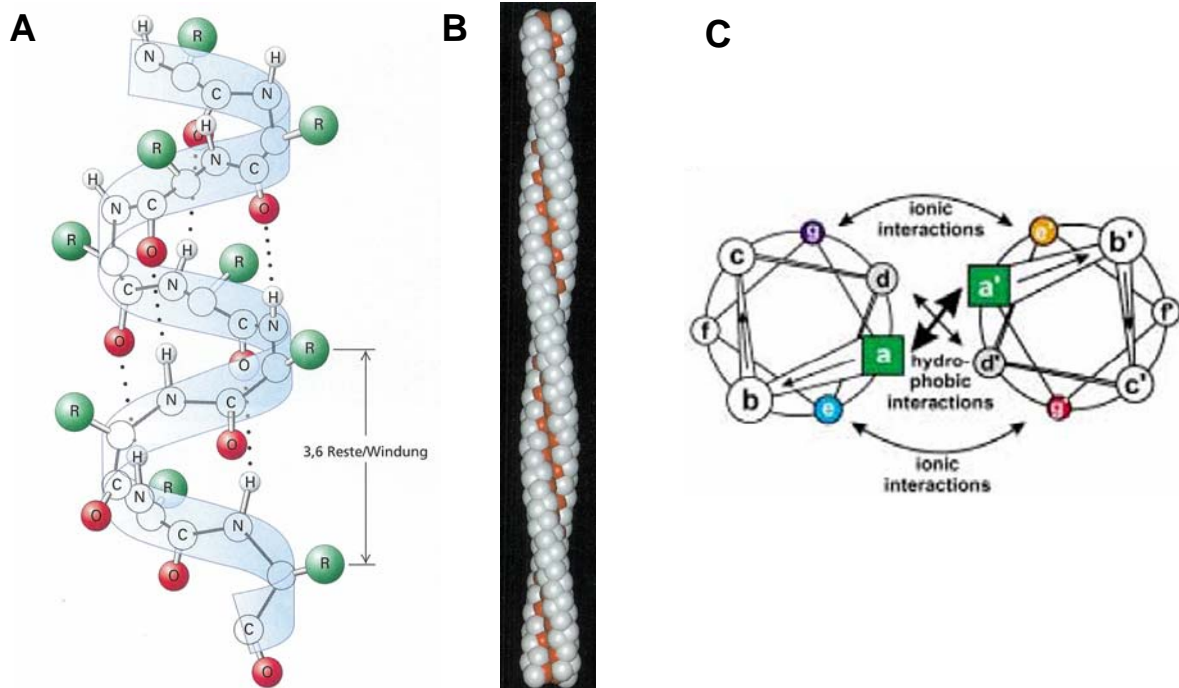


Abbildung 1.8: (A) Modell einer α -Helix; (B) Modell eines „Coiled-Coil“-Dimers, (aus Lodisch 2001), (C) Schema eines parallelen „Coiled-Coil“-Dimers in Aufsicht (aus Mason und Arndt, 2004)

Voraussetzung für die stabile Dimerisierung von Proteinen ist die Ausbildung einer α -helikalen Sekundärstruktur. Als α -Helix bezeichnet man eine gleichmäßige, spiralförmige Konformation in einem Proteinabschnitt. In einer α -Helix geht der Sauerstoff der Carboxylgruppe der einen Peptidbindung eine Wasserstoffbrücke mit dem Wasserstoffatom ein, das sich in der Aminogruppe der viertnächsten Aminosäure befindetet. Auf eine Windung entfallen in einer α -Helix 3,6 Aminosäuren, wobei die Seitenketten auf der Oberfläche des Zylinders nach außen zeigen (vgl. Abbildung.1.8 A). Eine „Coiled-Coil“-Domäne besteht aus zwei α -Helices, die linksgängig umeinander gewunden sind und auf diese Weise eine stäbchenförmige Struktur ausbilden (vgl. Abbildung. 1.8 B). Während reguläre α -Helices eine Windung pro 3,6 Aminosäureresten aufweisen, ist durch die Verwindung zweier α -Helices in einer „Coiled-Coil“-Domäne diese Zahl auf 3,5 Reste pro Windung herabgesetzt. Also bilden sieben Reste einer α -Helices, ein so genanntes Heptad, zwei Windungen in einer „Coiled-Coil“-Domäne. Die Heptaden der α -Helices werden von a bis g durchgezählt wobei die

Aminosäuren an erster (a) und an vierter (d) Position hydrophob sind und entlang der Helixoberfläche einen hydrophoben Streifen bilden. Zwei Helices lagern sich aufgrund der hydrophoben Streifen zusammen und bilden so das Zentrum der stabförmige „Coiled-Coil“-Domäne das vom Wasser abgeschirmt ist (vgl. Abbildung 1.8 B). Die übrigen Reste sind meist polar und ragen in die wässrige Umgebung. Es handelt sich bei der Faltung zur „Coiled-Coil“-Struktur also um einen hydrophoben Kollaps. Zusätzlich können die Reste (e) und (g), Positionen, die oft von geladenen Resten eingenommen werden, die Bindung zwischen den Helices verstärken, indem sie elektrostatische Wechselwirkungen aufbauen (vgl. Abbildung 1.8 C).

Für die Faltung von „Coiled-Coil“-Domänen ist in vielen Proteinen, die dieses Strukturmotiv aufweisen, ein kleiner Bereich ausschlaggebend, von dem aus die Faltung ihren Anfang nimmt. Dieser Bereich wird als „Schaltersequenz“ („trigger sequence“) bezeichnet und wurde unter anderem in Myosin gefunden (Kammerer et al., 1998). Die Zusammensetzung mit einer wiederkehrenden Folge von sieben Aminosäuren mit definierten Eigenschaften lässt es relativ einfach zu, aufgrund der Primärstruktur die Ausbildung einer „Coiled-Coil“-Domäne zwischen zwei Proteinen vorherzusagen. Die Primärsequenz der α -helikalen Domäne und der Übereinstimmung der Heptadabfolge entscheidet darüber, welche Proteine miteinander parallele oder antiparallele Hetero- oder Homodimere bilden. Außerdem ist die Abfolge an Heptaden in vielen Proteinen von so genannten „Linker“-Regionen unterbrochen wodurch ebenso reguliert wird, welche Proteine miteinander Dimerisieren können.

1.5 Modellsystem: Spermatogenese

Die Meiose ist wegen ihrer grundsätzlichen Bedeutung für die geschlechtliche Fortpflanzung schon seit ihrer Entdeckung ein Prozess, der in den verschiedensten Organismen über zytologische Methoden untersucht wurde. Die zunehmende Ausweitung auf molekulare Aspekte und die gezielte Herstellung von Mutanten wurde in einigen wenigen Modellorganismen durchgeführt. Am besten untersucht ist dabei die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* aber auch die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe*. Unter den Metazoa haben sich für die Meiose, wie auch für die verschiedensten Richtungen der Molekularbiologie, der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, das Insekt *Drosophila melanogaster*, die Pflanze *Arabidopsis thaliana* und verschiedene Spezies der Säuger wie Ratte, Maus und Mensch bewährt.

Schwerpunkt dieser Arbeit ist es, ein besseres Verständnis über die Ausbildung von SCs bei Nagern zu erlangen, weswegen im Folgenden auf die Säuger-Spermatogenese näher eingegangen wird.

1.5.1 Aufbau des Hodens und Nebenhodens bei Säugern

Der Hoden ist ein paarig angelegtes männliches Geschlechtsorgan das Spermien und Sexualhormone produziert. Er ist von einer dicken Bindegewebskapsel umgeben (Tunica albuginea), von der sich Septen (Septula testis) in das Innere des Hodens ziehen und diesen in Hodenläppchen (Lobuli testis) unterteilen. Die Hodenläppchen erhalten zahlreiche, stark gewundene Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti) die in das Rete testis münden. Zwischen den Tubuli seminiferi liegt das Hodeninterstitium, welches lockeres Bindegewebe, Gefäße, Nerven und Testosteron-bildende interstitielle Zellen, die Leydig-Zwischenzellen, enthält. Die Wand der Hodenkanälchen besteht aus Bindegewebshaut (Tunica propria), einer Basalmembran und dem Keimepithel. Das Keimepithel enthält Keimzellen in verschiedenen Stadien der Spermatogenese. Die Spermatogonien befinden sich am äußeren Rand und geben die sich differenzierenden Tochterzellen nach innen ab, die während der Differenzierung immer weiter in Richtung eines zentralen Lumens wandern, in welches die Spermatozoen schließlich abgegeben werden. Die somatischen Sertolizellen hüllen die verschiedenen Keimzellstadien ein und erfüllen Schutz- und Versorgungsfunktionen. An der Basalmembran liegen schmale Muskelzellen, die bei Kontraktion dem passiven Transport der Spermien Richtung Nebenhoden dienen. Das Rete testis setzt sich in die Ductuli efferentes fort, welche die Tunica albuginea dort durchbrechen, wo der Hoden mit dem Nebenhoden verwachsen ist. Der Nebenhoden (Epididymis) läßt sich in Kopf, Körper und Schwanz gliedern (Caput-, Corpus-, Cauda epididymidis). Im Nebenhodenkopf gehen die Ductuli efferentes in den Nebenhodengang (Ductus epididymidis) über dessen distales Ende im Nebenhodenschwanz in den Ductus deferens mündet.

1.5.2 Spermatogenese bei Säugern

Die Spermatogenese ist der Prozess, in dessen Verlauf aus diploiden männlichen Stammzellen haploide Spermien hervorgehen. Es handelt sich um einen kontinuierlichen Prozess, der in den Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti) der Hoden wellenförmig abläuft (vgl. Abbildung 1.9).

Frühe Stadien der Spermatogenese bezeichnet man als Stamm-Spermatogonien, welche peripher an der Basalmembran der Samenkanälchen liegen. Während einige der Spermatogonien mehrere mitotische Zellteilungen durchlaufen und aufgrund ihrer weiteren Differenzierung in Spermatogonien des Typs A, intermediäre Spermatogonien und Spermatogonien des Typs B unterteilt werden, verbleiben andere weiterhin im Stammzellstadium. Aus den Spermatogonien des Typs B gehen die primären Spermatozyten hervor, welche in die Prophase I der ersten meiotischen Teilung eintreten. Während des Präleptotäns erfolgt die letzte DNA Replikation der Spermatogenese. In den folgenden

1. Einleitung

Stadien Leptotän, Zygotän und Pachytän, findet die Chromosomenpaarung und Rekombination statt. Nach der ersten Reifeteilung entstehen aus einer primären Spermatozyte zwei haploide sekundäre Spermatozyten, die nach einer kurzen Interkinese die zweite Reifeteilung durchlaufen. Am Ende entstehen vier haploide Spermatisden, die nun in der Nähe des Lumens der Samenkanälchen liegen. Während des gesamten Entwicklungsprozesses sind Gruppen von Keimzellen durch zytoplasmatische Brücken miteinander verbunden, welche die synchrone Entwicklung garantieren.

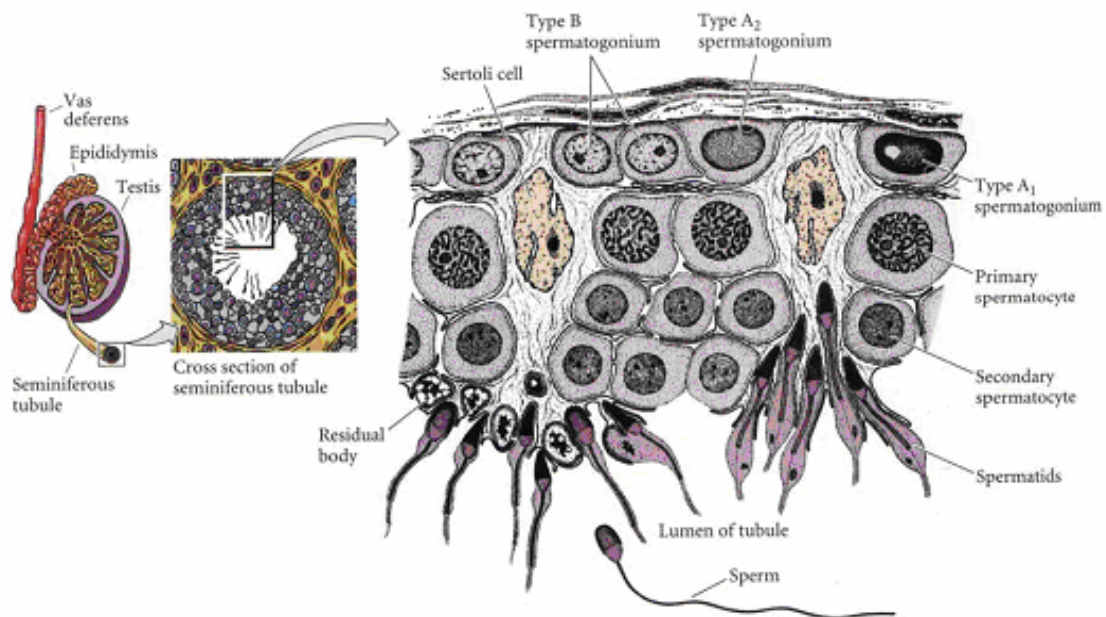


Abbildung 1.9: Aufbau des Hodens. Von links nach rechts sind schematische der Hoden mit Nebenhoden und Samenleiter, ein Querschnitt eines Hodenkanälchens und ein vergrößerter Ausschnitt eines Kanälchens dargestellt (aus Gilbert 2000).

In der letzten Phase der Spermatogenese, der so genannten Spermiogenese, kommt es zu Umgestaltungsvorgängen, in deren Verlauf aus den runden Spermatisden hochdifferenzierte Spermien entstehen. Dieser Prozess beinhaltet eine zunehmende Kondensation und Verdichtung der DNA, die Reduktion des Zytoplasmas, die Bildung des Akrosoms sowie die Ausdifferenzierung des Flagellatums. Die Spermien werden in das Lumen des Samenkanälchens entlassen und beenden ihre Reifung im Nebenhoden.

1.6 Zielsetzung

Die synaptische Paarung der homologen Chromosomen und die Ausbildung der Synaptonemalkomplexe (SCs) sind essentielle Vorgänge während der ersten meiotischen Prophase, damit Rekombination und Segregation der Homologen korrekt ablaufen kann. Um ein besseres Verständnis der Funktion des SC für die Meiose zu erlangen müssen die Eigenschaften der Proteinkomponenten des SC näher analysiert werden.

Ziel dieser Arbeit war es den Auf- und Abbau der Lateralelemente des SC besser zu verstehen. Deswegen sollte SYCP3, die Hauptstrukturkomponente der Lateralelemente in Vertebraten, näher analysiert werden. Um evolutionär konservierte Domänen zu identifizieren sollte zunächst ein Datenbankvergleich homologer SYCP3-Sequenzen in Vertebraten durchgeführt werden. Die Funktion der evolutionär konservierten Domänen auf die Polymerisationseigenschaften sollte in SYCP3 von Säugern analysiert werden, indem verschiedene Teile von SYCP3 deletiert oder punktmutiert wurden und das Verhalten der SYCP3 Teilfragmente bzw. Punktmutanten mit dem Verhalten des wildtypischen SYCP3 verglichen wurde.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Polymerisationseigenschaften von SYCP3 in der Evolution konserviert sind. Hierzu wurden die Eigenschaften der orthologe SYCP3 Proteine aus den taxonomisch entfernten Spezies Ratte und Medaka miteinander verglichen.

2 Abkürzungen

∅	Durchmesser, Durchschnitt
®	registered
™	Trademark
A	Ampere/ Adenin/ Alanin
Abb.	Abbildung
AE	Axiales Element („axial element“)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserum Albumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA („complementary DNA“)
CDK	Cyclin abhängige Proteinkinase („cyclin-dependent kinase“)
CE	zentrales Element („central element“)
CH	Chromatinschleife
CM1/2	konserviertes Motiv 1/2 („conserved motif 1/2“)
CR	zentrale Region („central region“)
CTP	Cytidin-Triphosphat
Da	Dalton
ddATP	Dideoxy-Adenosin-Triphosphat
ddCTG	Dideoxy-Cytidin-Triphosphat
ddGTP	Dideoxy-Guanosin-Triphosphat
ddNTP	Dideoxy-Nukleosid-Triphosphat
ddTTP	Dideoxy-Thymidin-Triphosphat
dHJ	doppelte „Holliday Junction“
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure („desoxiribonucleic acid“)
dNTP	Deoxy-Nukleosid-Triphosphat
DMEM	Dulbecco´s modified eagle´s medium; Eurobio, Biotechnology
ds	double stranded
DSB	Doppelstrangbruch („double strand break“)
DSBR	Doppelstrangbruch-Reparatur („double strand break repair“)
DTT	Dithiotreitol
E	Extinktion/ Glutamat

2. Abkürzungen

E. coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EN	frühe Rekombinationsknoten („early noduls“)
FCS	Fötale Kälberserum
G	Guanosin
g	Gramm, Erdbeschleunigung in m/s^2
GST	Glutathion-S-Transferase
GTE	Glucose, Tris, EDTA
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde
H ₂ O bidest.	doppelt destilliertes Wasser
HRP	Meerrettich-Peroxidase („horse radish peroxidase“)
HA	Hämagglutinin
HJ	„Holliday Junction“
I	Isoleucin
IPTG	Isopropyl β -D-Thiogalactosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase(n)
l	Liter
LB	Luria Bertami
LE	Lateralelement („lateral element“)
M	Methionin
mcs	multiple Klonierungsstelle („multiple kloning site“)
me	Medaka
M/mM	Molar/millimolar
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
M _r	Molekulargewicht
N	Normal
n	Chromosomenzahl im haploiden Genom
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisierungssignal („nuclear localization signal“)
nm	Nanometer
NTP	Nukleosid-Triphosphat
OD	Optische Dichte

2. Abkürzungen

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PFA	Paraformaldehyd
RN	Rekombinationsknoten („rekombination nodule“)
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheit/ Serin
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase
SC	Synaptonemalkomplex („synaptonemal complex“)
SCC	„sister chromatid cohesion“
SDS	Natrium Dodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
SDSA	syntheseabhängige Strang-Annealing („synthesis dependent strand annealing“)
sek	Sekunde
SL	Stammlösung
SMC	„structural maintenance of chromosome“
ss	single stranded
SYCP	Synaptonemalkomplexprotein
T	Tymidin
TBE	Tris-Bor-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	TBS mit Tween
TF	Transversalfilament („transversal filament“)
T _m	Schmelztemperatur
TN	transformierte Rekombinationsknoten („transformed noduls“)
TSS	Transformation and storage solution
TTP	Thymidin-Triphosphat
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat
U	Unit(s)
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
w/v	Gewicht pro Volumen

3 Material

3.1 Biologisches Material

3.1.1 Tiere

Ratte:

Die verwendeten männlichen Ratten waren alle vom Stamm „Wistar“ und wurden über Charles River (Sulzfeld) bezogen.

Fischspezies Medaka, *Oryzias latipes*:

Die verwendeten männlichen Medaka, *Oryzias latipes*, wurden aus der Arbeitsgruppe Manfred Scharl, Physiologische Chemie I (Würzburg) von Nils Klüver bezogen.

3.1.2 Zelllinien

COS-7:

Die COS-7 Zelllinie (ATTC CRL1651) entstammt aus Nierenzellen von *Cercopithecus aethiops* (afrikanischer Grünaffe).

3.1.3 Bakterienstämme

E.coli M15	Qiagen, Hilden
E.coli TOP10 OneShot®	Invitrogen, Karlsruhe
E.coli XL 1-Blue	Stratagene, Heidelberg

3.1.4 Antikörper

α -ratSYCP3

Das polyklonale α -ratSYCP3-Serum, wurde aus einem Meerschweinchen gewonnen, das mit einer SYCP3 spezifischen Polypeptidsequenz der Ratte (27GGRKHSGKSGKP38) immunisiert wurde (Alsheimer und Benavente, 1996).

Im Western Blot wurde das Serum in einer Verdünnung von $1/2000$ in Milch verwendet. Da das Serum in der Immunfluoreszenz eine deutliche Hintergrundfärbung erzeugte, musste der Antikörper affinitätsgereinigt werden. Hierzu wurden die Fusionsproteine GST-n1-130-SYCP3 bzw. His-n1-130-SYCP3 (vgl. 3.6.2) in Bakterien exprimiert (vgl. 4.3.1) und über Glutathion-Sepharose® 4B (Amersham) bzw. über Ni-NTA-Agarose (Qiagen) aufgereinigt (vgl. 4.3.2. bzw. 4.3.3). Anschließend wurden die gereinigten Proteine an eine CNBr-aktivierte Sepharose oder eine HiTrap-Säule gebunden und eine Affinitätsreinigung des SYCP3-Serums durchgeführt (vgl. 4.4). Für Immunfluoreszenzen wurde der gereinigte Antikörper $1/100$ in PBS und für Immungoldlokalisationen $1/20$ in PBS verdünnt.

α -meSYCP3

Um einen spezifischen polyklonalen Antikörper gegen SYCP3 aus Medaka zu gewinnen wurde das Fusionsprotein RGSHis-meSYCP3 (vgl. 3.6.2) in Bakterien exprimiert (vgl. 4.3.1) und über Ni-NTA-Agarose (Qiagen) aufgereinigt (vgl. 4.3.3.). Die Immunisierung eines Kaninchens mit dem aufgereinigten Protein wurde bei der Firma SEQLAB (Göttingen) in Auftrag gegeben. Die von der Firma gesendeten Serumproben wurden in Immunfärbungen auf Gefrierschnitten von Medaka Hoden auf ihre Spezifität überprüft. Die dritte Blutung zeigte eine deutliche Färbung fadenförmiger Strukturen in Spermatocytenkernen, die erfahrungsgemäß den Synaptonemalkomplexen entsprechen.

Da das Serum jedoch eine deutliche Hintergrundfärbung erzeugte, wurde der Antikörper gegen das RGSHis-meSYCP3 Protein über eine HiTrap-Säule affinitätsgereinigt (vgl. 4.4.2). Im Western Blot wurde der gereinigte Antikörper $1/5000$ in Milch, für Immunfluoreszenzen $1/250$ in PBS und für Immungoldlokalisationen $1/50$ in PBS verdünnt.

α -myc

Um ein myc-Fusionsprotein zu detektieren wurde ein monoklonaler Antikörper Maus α -myc (BD Bioscience, Clontech, USA) verwendet.

α -HA

Um ein HA-Fusionsprotein zu detektieren wurde ein polyklonaler Antikörper Ratte α -myc (BD Bioscience, Clontech, USA) verwendet.

α -RGS-His

Um ein RGS-His-Fusionsprotein zu detektieren wurde ein monoklonaler Antikörper Maus α -RGS-His (Qiagen, Hilden) verwendet.

Sekundärantikörper:

Für die Immunfluoreszenz wurden Sekundärantikörper eingesetzt, die an Fluorochrome Texas Red, DTAF oder Cy2 gekoppelt waren. Für Western Blot Analysen waren die Sekundärantikörper an Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt. Die Antikörper wurden über die Firmen Dianova (Hamburg) oder Promega (Mannheim) bezogen. Die Seren wurden aus Ziegen gewonnen und waren entweder gegen Maus, Ratte, Meerschweinchen oder Kaninchen gerichtet.

Für die elektronenmikroskopische Immungoldlokalisation waren die Sekundärantikörper an ein 1,4 nm großes Gold-Partikel gekoppelt. Diese Antikörper wurden über die Firma Nanoprobes (Yaphank) bezogen und waren gegen Kaninchen gerichtet.

3. Material

Ziege IgG anti-Maus	Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	1:5000	Dianova
Ziege IgG anti-Meerschwein	Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	1:5000	Dianova
Ziege IgG anti-Rabbit	Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	1:5000	Promega
Ziege IgG anti-Maus	TexasRed gekoppelt	1:50	Dianova
Ziege IgG anti-Meerschwein	TexasRed gekoppelt	1:50	Dianova
Ziege IgG anti-Meerschwein	DTAF gekoppelt	1:50	Dianova
Ziege IgG anti-Rabbit	Cy2 gekoppelt	1:50	Dianova
Ziege IgG anti-Ratte	Cy2 gekoppelt	1:50	Dianova
Ziege IgG anti-Rabbit	1,4 nm Goldpartikel gekoppelt	1:50	Nanoprobes

3.2 Molekularbiologisches Material

3.2.1 Plasmidvektoren

- **pCR[®]2.1-TOPO[®]**

Dieser Vektor ist Teil des *TOPO TA Cloning[®] Kit* der Firma Invitrogen und wurde für die direkte Klonierung von DNA-Fragmenten verwendet, die durch PCR gewonnen wurden. Der Vektor besitzt eine Ampicillin- und eine Kanamycin-Resistenz und ermöglicht über ein Lac-Operon eine Blau/Weiß-Selektion zum erleichterten Auffinden positiver Klone. Dieser Vektor wurde ausschließlich zur „Zwischen-Klonierung“ von PCR-Produkten verwendet.

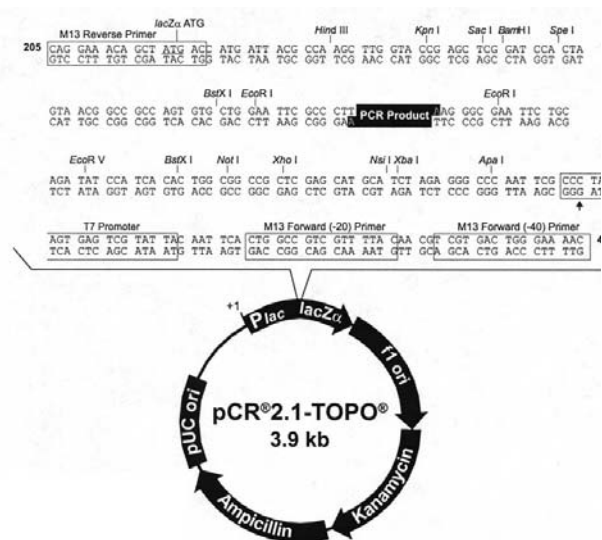


Abbildung. 3.1: pCR[®]2.1-TOPO[®]

3. Material

- **pGEX-5X-2**

Dieser Vektor ist Teil eines bakteriellen Expressionssystems der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Braunschweig). Die inklonierte cDNA wird als Fusionsprotein exprimiert, an das N-terminal das aus *Shistosoma japonicum* stammende Enzym Glutathion-S-Transferase fusioniert ist. Der GST-Anteil ermöglicht die Aufreinigung des Fusionsproteins über eine Matrix aus Glutathion-Sepharose

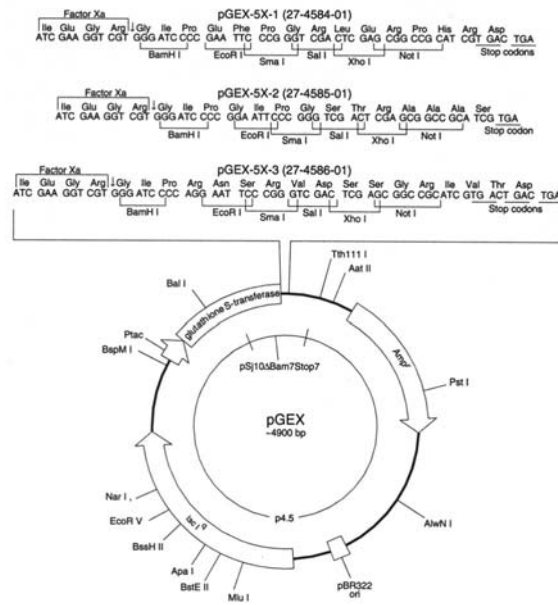


Abbildung. 3.2: pGEX-5X-2

- **pQE-30, -31, -32**

Die Vektoren der pQE-Familie wurden von der Firma Qiagen (Hilden) bezogen und für die Expression von Proteinen in Bakterien verwendet.

Die inklonierte cDNA wird als Fusionsprotein exprimiert, an das N-terminal ein RGSHis-Epitop-Tag fusioniert ist. Dieses sehr kleine Epitop besteht aus 10 Aminosäuren, ist stark immunreaktiv und eignet sich für eine Proteinaufreinigung über eine Ni-NTA-Säule.

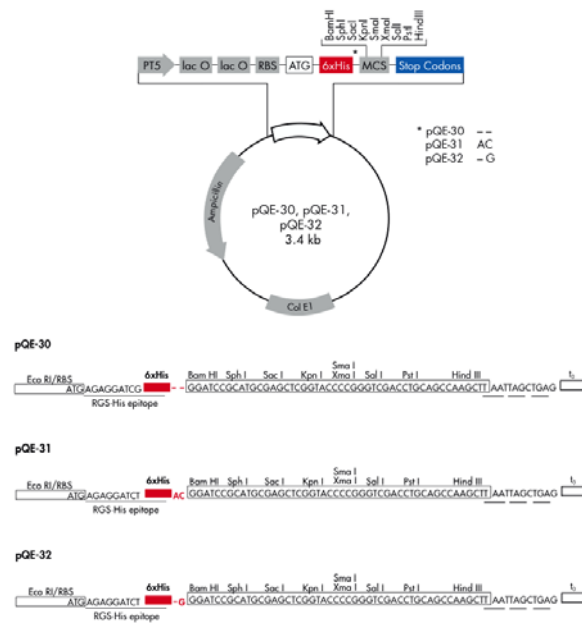


Abbildung. 3.3: pQE-30, -31, -32

- **Vektoren der pEGFP-Familie**

Die Vektoren der pEGFP-Familie wurden von der Firma Clontech (Heidelberg) bezogen und für die Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen verwendet, da sie einen menschlichen CMV (Cytomegalovirus) Promotor enthalten.

3. Material

In den pEGFP-N Vektoren wird das, aus *Aequorea victoria* stammende, fluoreszierende Protein EGFP (enhanced green fluorescent protein), an den C-Terminus des gewünschten Proteins fusioniert. Es können aber auch Proteine ohne EGFP-Fusion exprimiert werden, indem man die einklonierte cDNA durch ein Stoppcodon von EGFP trennt.

In den pEGFP-C Vektoren wird das Protein EGFP an den N-Terminus des gewünschten Proteins fusioniert.

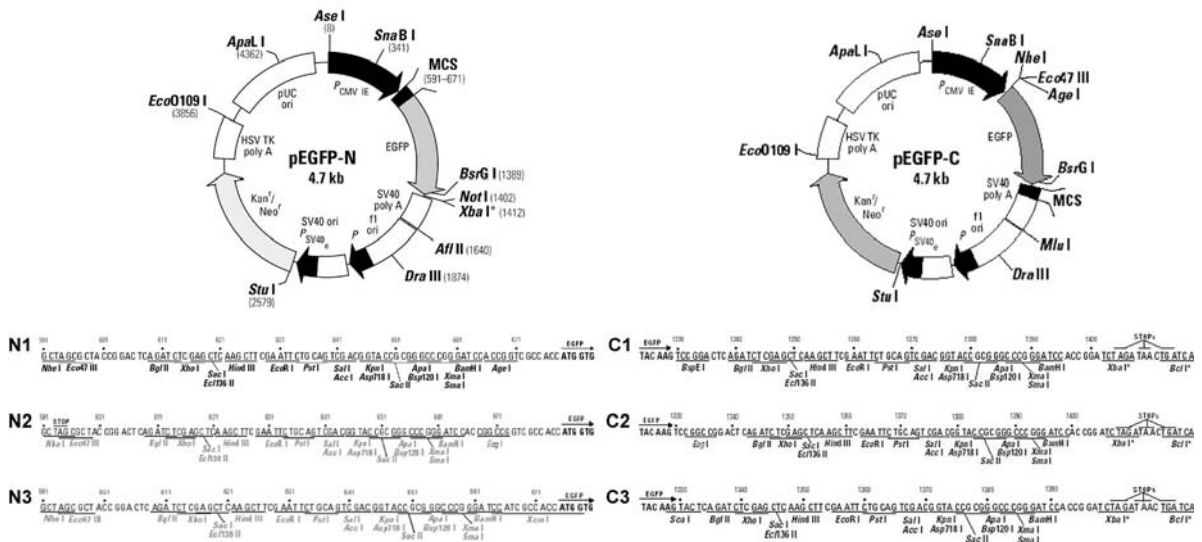


Abbildung. 3.4: Vektoren der pEGFP-Familie

- **pCMV-Myc**

Der pCMV-Myc Expressionsvektor wurde von der Firma Clontech (Heidelberg) bezogen und für die Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen verwendet, da er einen menschlichen CMV (Cytomegalovirus) Promotor enthält. Die einklonierte cDNA wird als Fusionsprotein exprimiert, an das N-terminal ein c-Myc-Epitop-Tag fusioniert ist. Dieses sehr kleine Epitop besteht aus 13 Aminosäuren und ist stark immunreaktiv.

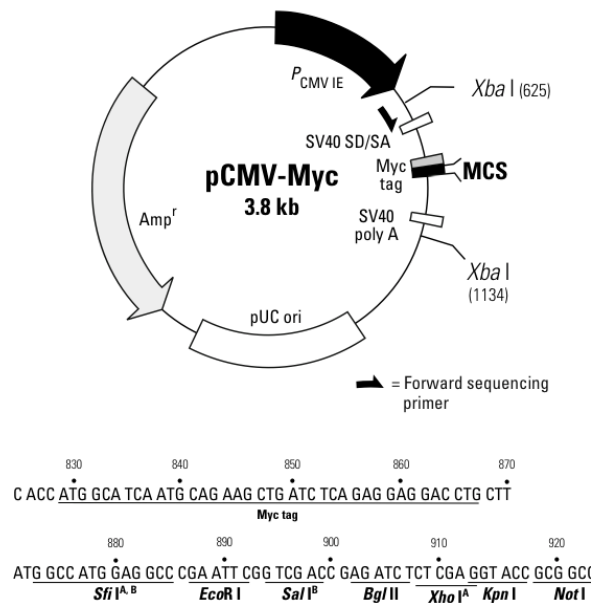


Abbildung. 3.5: pCMV-Myc

3. Material

- **pCMV-HA**

Der pCMV-HA Expressionsvektor wurde von der Firma Clontech (Heidelberg) bezogen und für die Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen verwendet, da er einen menschlichen CMV (Cytomegalovirus) Promotor enthält.

Die einklonierte cDNA wird als Fusionsprotein exprimiert, an das N-terminal ein Hämagglutinin (HA)-Epitop-Tag fusioniert ist. Dieses sehr kleine Epitop besteht aus 10 Aminosäuren und ist stark immunreaktiv.

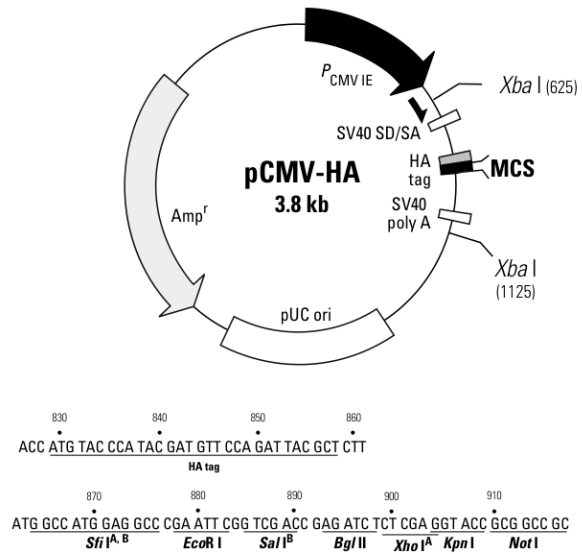


Abbildung. 3.6: pCMV-HA

3.2.2 Enzyme

Alle Restriktionsenzyme und DNA modifizierenden Enzyme wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Roth) bezogen. Andere Enzyme wurden bei verschiedenen Firmen bestellt, was jeweils im Text im Methodenteil vermerkt ist.

3.2.3 Oligonukleotide

Die für die DNA-Amplifikationen verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen ThermoHybaid (Ulm), Biomers (Ulm) oder Invitrogen (Karlsruhe) bestellt. Die Vektorprimer, die für Sequenzierung und Kolonie-PCR eingesetzt wurden, sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Die Primer, die für die Klonierung der SYCP3-Konstrukte verwendet wurden sind unter 3.6 aufgeführt.

Bezeichnung	Sequenz	Annealingtemperatur
M13 Forward	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	48°C
M13 Reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	48°C
pGEX 5'	5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'	50-60°C
pGEX 3'	5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCTCAGAGG-3'	50-60°C
pQE 5'	5'-GAGCGGATAACAATTTACAC-3'	50°C
pQE 3'	5'-AATCCAGATGGAGTTCTGAGG-3'	50°C
pEGFP-N 5'	5'-GCTGGTTTAGTGAACCGTCAGA-3'	50-60°C
pEGFP-N 3'	5'-CGTCGCCGTCAGCTCGACCAG-3'	50-60°C
pEGFP-C 5'	5'-ACATGGTCCTGCTGGAGTTCTG-3'	50-60°C

3. Material

pEGFP-C 3`	5`-CAGGGGGAGGTGGAGG-3`	50-60°C
pCMV-Myc/HA 5`	5`-AGCTGCGGAATTGTACCC-3`	50°C
pCMV-Myc/HA 3`	5`-TGGTTTGTCCAAACTCATCAA-3`	50°C

Tabelle 3.1: Vektorprimer

3.2.4 Größenstandards

Lambda DNA/EcoRI+HindIII, Marker 3	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

3.2.5 Kits

ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Biosystems (Darmstadt)
Bulk GST Purification Module (mit Glutathion Sepharose.® 4B)	Amersham Pharmacia Biotech (Braunschweig)
CNBr-aktivierte Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech (Braunschweig)
E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I	PAQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit	PAQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
ECL™ Detection Kit	Amersham Pharmacia Biotech (Braunschweig)
Effectene™ Transfection Reagent	Qiagen (Hilden)
Lipofectamine™ Reagent	Invitrogen (Karlsruhe)
Ni-NTA-Agarose	Qiagen (Hilden)
peqGOLD Trifast™	PAQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)
Superscript™ One-Step RT-PCR for Long Templates	Invitrogen (Karlsruhe)
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen (Karlsruhe)

3.3 Chemikalien

Chemikalien und Lösungsmittel wurden, wenn im Text nicht anders vermerkt, von den Firmen Applichem (Darmstadt), Calbiochem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Fluka (Berlin) oder Sigma (München) in Analysenqualität bezogen.

3. Material

3.4 Geräte

Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus-Holding, Hanau
Drehtisch Reax 2	Heidolph, über Hartenstein, Würzburg
Drystar Gelrockner	H. Hölzel GmbH
Elutriationseinheit: J2-21M/E Centrifuge JE-6B Rotor	Beckman, München
Feinwaage Mettler AC 100	Mettler, Düsseldorf
Flachbrettscanner Quatographic Xfinity pro 42	LaserSoft Imaging, Kiel
Fluoreszenzmikroskop Axiophot Stereo HB050 mit Quecksilberlampe	Zeiss, Oberkochen
Gefriermikrotom 2800 Frigocut E	Reichert-Jung
Gewebekulturschalen	Greiner Labortechnik
Graphitblotkammer	LMS; bezogen über Hartenstein, Würzburg
Heizblock	Liebisch, über Hartenstein, Würzburg
Heizplatte	Medax Nagel GmbH, Kiel
Kippschüttler WS5	Laborgerätebau Edmund Bühler, Tübingen
Kühlzentrifuge Minifuge T	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments, Bad Homburg
Laborpumpe Varioperpex® II	LKB/Bromma, Schweden
Laborwaage Mettler PJ 3600 DeltaRange®	Mettler, Düsseldorf
Magnetrührer M35	GLW, Würzburg
pH-Meter pH 523	WTW, über Hartenstein, Würzburg
Proteingelkammer Mini V8	Gibco BRL
Schlittenmikrotom	Leitz, Wetzlar
Sequenzierer	ABI PRISM ^{TR} 310 Genetic Analyser Perkin Elmer, Applied Biotems GmbH, Weiterstadt
Sonifier B12	Branson Sonic Power Company, über Gerhard Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Stabilisiertes Netzgerät 500 V 1 A	Dipl. Ing. L. Fischer, Heidelberg
Sterile Bank	Steril GARD Hood Class III Müller Labortechnik, Windhagen über Hartenstein, Würzburg
The Denley Mixer A257, Multi Axle Rotator	über Thermo-Dux, Wertheim
Thermocycler TECHNE PROGENE	über Thermo-Dux, Wertheim
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Transmissionselektronenmikroskop EM 10	Zeiss, Oberkochen
Umkehrmikroskop Labovert	Leitz, Wetzlar
Vortex L24	GLW, Würzburg
Wasserbad WTH 500	über Hartenstein, Würzburg

3.5 Computerprogramme

Adobe Photoshop

EasyControl Version 2.15 (PCO, Kelheim)

Mikrosoft Office Excell

Mikrosoft Office Powerpoint

Mikrosoft Office Word

3.6 Rekombinante DNA Konstrukte

Zur molekularbiologischen Untersuchung eines Proteins können verschiedene Vektoren herangezogen werden, die es erlauben, das Peptid selbst, Teilstücke davon oder mutierte Formen in Bakterien oder eukaryontischen Zellen zu exprimieren. In diesem Kapitel wird die Klonierung aller Konstrukte beschrieben, die für diese Arbeit nötig waren. Die dazu notwendigen Methoden werden im Kapitel 4.2 erklärt. Alle Vektorkarten sind unter 3.2.1 aufgeführt.

3.6.1 SYCP3 Konstrukte zur Proteinexpression in eukaryontischen Zellen

Für die Expression von SYCP3 und Mutanten in eukaryontischen Zellen wurde die entsprechende cDNA in die multiple Klonierungsstelle (MCS) von pEGFP-Vektoren (Clontech, Heidelberg), des pCMV-myc-Vektors (BD Bioscience, Clontech, USA) oder des pCMV-HA-Vektors (BD Bioscience, Clontech, USA) inseriert. Diese Vektoren besitzen einen CMV-Promotor, der konstitutiv in eukaryontischen Zellen exprimiert wird. Die in pEGFP-C bzw. in pEGFP-N Vektoren exprimierten Proteine besitzen ein N-terminal bzw. ein C-terminal fusioniertes EGFP. Die in pCMV-Myc Vektoren bzw. in pCMV-HA Vektoren inklonierte cDNA wird als Fusionsprotein exprimiert, an das N-terminal ein c-Myc-Epitop-Tag bzw. ein HA-Epitop-Tag fusioniert ist. Bei der Konstruktion von Fusionsproteinen war darauf zu achten, dass das Leseraster eingehalten wurde.

Für die Expression von Proteinen und Mutanten ohne ein fusioniertes Tag wurde eine mit einem Startcodon beginnende und mit einem Stopcodon endende cDNA, in einen EGFP-N Vektor kloniert, wodurch das EGFP vom exprimierten Protein abgekoppelt war.

Alle klonierten Konstrukte wurden über Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

SYCP3 Konstrukte der Ratte

Die Sequenz der SYCP3-cDNA von Base 47 bis 837 (NM_013041) war im Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] inseriert und wurde mir von der Arbeitsgruppe Benavente, (Würzburg), zur Verfügung

3. Material

gestellt. Das Konstrukt SYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] war Ausgangspunkt für weitere Klonierungen.

SYCP3wt in EGFP-N2:

Protein-Produkt: SYCP3wt

Aus dem Vektor SYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die SYCP3wt cDNA, die zwischen den *EcoRI*-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit *EcoRI* geöffneten pEGFP-N2 Vektor kloniert.

SYCP3wt in EGFP-C3:

Protein-Produkt: EGFP-SYCP3

Aus dem Vektor SYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die SYCP3wt cDNA, die zwischen den *EcoRI*-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit *EcoRI* geöffneten pEGFP-C3 Vektor kloniert.

SYCP3ΔTGA in EGFP-N2:

Protein-Produkt: SYCP3-EGFP

SYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] diente als Template für die Amplifikation von SYCP3 ohne Stopcodon mit den Primern:

SYCP3 5' ATG: 5'-GGCTTCGTCAGATGCTTCGAG-3'

SYCP3 3' ΔTGA: 5'-GAA TAA CAT GGA TTG AAG AGA CTT TCG-3'

Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert und sequenziert.

Aus dem Vektor SYCP3ΔTGA-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die SYCP3ΔTGA cDNA, die zwischen den *EcoRI*-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit *EcoRI* geöffneten pEGFP-N2 Vektor kloniert.

Δcoil1-SYCP3 in EGFP-N2:

Protein-Produkt: Δcoil1-SYCP3

SYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] diente als Template für die Amplifikation des DNA-Fragments vor der „Coiled-Coil“-Region1 (Base 47-405) und des DNA-Fragments nach der „Coiled-Coil“-Region1 (Base 601- 837) mit den Primern:

DNA-Fragments von Base 47-405:

SYCP3 5' ATG: 5'-GGCTTCGTCAGATGCTTCGAG-3'

Δcoil1 3': 5'-TCTGCTGAAA ATACATTTTCATTTCTTTTCTTCTTGGCC-3'

DNA-Fragments von 601- 837:

Δcoil1 5': 5'-AGAAATGTAT TTTCAGCAGACTAGAAATTGTTTCAGAGC-3'

SYCP3 3' TGA: 5'-GACTCATCAGAATAACATGGATTGAAG-3'

Hierbei war darauf zu achten, dass der 3'-Primer des DNA-Fragments von Base 47-405 einen 10 Nukleotid langen Überhang besaß, der Komplementär zum 5'-Ende des DNA-Fragments von Base 601- 837 war. Umgekehrt musste der 5'-Primer des DNA-Fragments von Base 601- 837 einen 10 Nukleotid langen Überhang besitzen, der Komplementär zum

3. Material

3'-Ende des DNA-Fragments von Base 47-405 war. Die überhängende Primärsequenz ist durch einen Unterstrich gekennzeichnet.

Die PCR-Produkte von Base 47-405 und von Base 601-837 wurden aus dem Gel gereinigt und gemeinsam für eine erneute PCR eingesetzt. Dabei hybridisieren beide PCR-Produkte mit ihren komplementären Überhängen und wurden mit folgenden Primern amplifiziert.

SYCP3 5' ATG: 5'-GGCTTCGTCAGATGCTTCGAG-3'

SYCP3 3' TGA: 5'-GACTCATCAGAATAACATGGATTGAAG-3'

Das PCR-Produkt mit der deletierten „Coiled-Coil“-Region1 wurde in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert und sequenziert.

Aus dem Vektor Δ coil1-SYCP3-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die Δ coil1-SYCP3 cDNA, die zwischen den *Eco*RI-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit *Eco*RI geöffneten pEGFP-N2 Vektor kloniert.

Δ coil2a-SYCP3 in EGFP-N2:

Protein-Produkt: Δ coil2a-SYCP3

SYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] diente als Template für die Amplifikation des DNA-Fragments vor der „Coiled-Coil“-Region2a (47-631) und des DNA-Fragments nach der „Coiled-Coil“-Region2a (714- 837) mit den Primern:

DNA-Fragments von Base 47-631:

SYCP3 5' ATG: 5'-GGCTTCGTCAGATGCTTCGAG-3'

Δ coil2a 3': 5'-TTTGTGTGCC AACAATTCTAGTCTGCTGAAAAATCTTTT-3'

DNA-Fragments von Base 714-837:

Δ coil2a 5': 5'-TAGAATTGTT GGCACACAAAGTGAACTTAAAAAAGA-3'

SYCP3 3' TGA: 5'-GACTCATCAGAATAACATGGATTGAAG-3'

Hierbei war darauf zu achten, dass der 3'-Primer des DNA-Fragments von Base 47-631 einen 10 Nukleotid langen Überhang besaß, der Komplementär zum 5'-Ende des DNA-Fragments von Base 714-837 war. Umgekehrt musste der 5'-Primer des DNA-Fragments von Base 714-837 einen 10 Nukleotid langen Überhang besitzen, der Komplementär zum 3'-Ende des DNA-Fragments von Base 47-631 war. Die überhängende Primärsequenz ist durch einen Unterstrich gekennzeichnet.

Die PCR-Produkte von Base 47-631 und von Base 714-837 wurden aus dem Gel gereinigt und gemeinsam für eine erneute PCR eingesetzt. Dabei hybridisieren beide PCR-Produkte mit ihren komplementären Überhängen und wurden mit folgenden Primern amplifiziert.

SYCP3 5' ATG: 5'-GGCTTCGTCAGATGCTTCGAG-3'

SYCP3 3' TGA: 5'-GACTCATCAGAATAACATGGATTGAAG-3'

Das PCR-Produkt mit der deletierten „Coiled-Coil“-Region2a wurde in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert und sequenziert.

3. Material

Aus dem Vektor Δ coil2a-SYCP3-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die Δ coil2a-SYCP3 cDNA, die zwischen den *Eco*RI-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit *Eco*RI geöffneten pEGFP-N2 Vektor kloniert.

Δ CM1-SYCP3 in EGFP-N2:

Protein-Produkt: Δ CM1-SYCP3

SYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] diente als Template für die Amplifikation des DNA-Fragments vor dem CM1 (Base 47-315) und des DNA-Fragments nach dem CM1 (Base 373-837) mit den Primern:

DNA-Fragments von Base 47-315:

SYCP3 5' ATG: 5'-GGCTTCGTCAGATGCTTCGAG-3'

Δ CM1 3': 5'-TGGCCAGAAG ATCTTCAATTATTCCTGCAGATCTTTTC-3'

DNA-Fragments von Base 373-837:

Δ CM1 5': 5'-AATTGAAGAT CTTCTGGCCAAGAAGAAAAGAATAGA-3'

SYCP3 3' TGA: 5'-GACTCATCAGAATAACATGGATTGAAG-3'

Hierbei war darauf zu achten, dass der 3'-Primer des DNA-Fragments von Base 47-315 einen 10 Nukleotid langen Überhang besaß, der Komplementär zum 5'-Ende des DNA-Fragments von Base 373-837 war. Umgekehrt musste der 5'-Primer des DNA-Fragments von Base 373-837 einen 10 Nukleotid langen Überhang besitzen, der Komplementär zum 3'-Ende des DNA-Fragments von Base 47-315 war. Die überhängende Primärsequenz ist durch einen Unterstrich gekennzeichnet.

Die PCR-Produkte von Base 47-315 und von Base 373-837 wurden aus dem Gel gereinigt und gemeinsam für eine erneute PCR eingesetzt. Dabei hybridisieren beide PCR-Produkte mit ihren komplementären Überhängen und wurden mit folgenden Primern amplifiziert.

SYCP3 5' ATG: 5'-GGCTTCGTCAGATGCTTCGAG-3'

SYCP3 3' TGA: 5'-GACTCATCAGAATAACATGGATTGAAG-3'

Das PCR-Produkt mit dem deletierten CM1 wurde in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert und sequenziert.

Aus dem Vektor Δ CM1-SYCP3-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die Δ CM1-SYCP3 cDNA, die zwischen den *Eco*RI-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit *Eco*RI geöffneten pEGFP-N2 Vektor kloniert.

Δ CM2-SYCP3 in EGFP-N2:

Protein-Produkt: Δ CM2-SYCP3:

SYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] diente als Template für die Amplifikation der Basen 47-810 wodurch das CM2 deletiert wurde.

SYCP3 5' ATG: 5'-GGCTTCGTCAGATGCTTCGAG-3'

Δ CM2 3': 5'-TCATCA AGACTTTCGAACATTTGCCATCTC-3'

3. Material

Der Δ CM2 3' Primer besaß zwei Stoppcodons (TGATGA) als Überhang, hier als unterstrichene Primersequenz dargestellt.

Das PCR-Produkt mit dem deletierten CM2 wurde in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert und sequenziert.

Aus dem Vektor Δ CM2-SYCP3-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die Δ CM2-SYCP3 cDNA, die zwischen den EcoRI-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit EcoRI geöffneten pEGFP-N2 Vektor kloniert.

Δ 2-25-SYCP3 in EGFP-N2:

Protein-Produkt: Δ 2-25-SYCP3

SYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] diente als Template für die Amplifikation der Basen 133-837 wodurch die ersten 25 Aminosäuren des N-Terminus deletiert wurden.

Δ 2-25 5': 5'-ATG CCTGGTGAAGAAAGCATTCTG-3'

SYCP3 3' TGA: 5'-GACTCATCAGAATAACATGGATTGAAG-3'

Der Δ 2-25 5' Primer besaß ein Startcodon ATG als 5'-Überhang, hier als unterstrichene Primersequenz dargestellt.

Das PCR-Produkt mit den, entsprechend der Nukleotidsequenz, deletierten Aminosäuren 2-25 wurde in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert und sequenziert.

Aus dem Vektor Δ 2-25-SYCP3-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die Δ 2-25-SYCP3 cDNA, die zwischen den EcoRI-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit EcoRI geöffneten pEGFP-N2 Vektor kloniert.

Δ 42-86-SYCP3 in EGFP-N2:

Protein-Produkt: Δ 42-86-SYCP3

SYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] diente als Template für die Amplifikation des DNA-Fragments zwischen M13 Forward Primer, der im pCR[®]2.1-TOPO[®] hybridisiert, und der Base 180 in der SYCP3-cDNA (entspricht der Aminosäure 42). Weiterhin wurde ein DNA-Fragment zwischen Base 315 in der SYCP3-cDNA (entspricht der Aminosäure 86) und dem M13 Reverse Primer, der im pCR[®]2.1-TOPO[®] hybridisiert, amplifiziert.

DNA-Fragments vor Base 180

M13 Forward: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'

Δ 42-86 3': 5'-AATCAATGGTGGTTTCCCAGATT-3'

Das PCR-Produkt wurde EcoRI verdaut.

DNA-Fragments nach Base 315

Δ 42-86 5': 5'-GTGGGAGGTGAAGTACAGAATATGCT-3'

M13 Reverse: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Das PCR-Produkt wurde BamHI verdaut.

Beide PCR-Produkte wurden aus dem Gel gereinigt und zusammen in einen mit EcoRI und BamHI geöffneten pEGFP-N2 Vektor kloniert und sequenziert.

Δ27-38-SYCP3 in EGFP-N2:**Protein-Produkt: Δ27-38-SYCP3**

SYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] diente als Template für die Amplifikation von SYCP3 mit einer Deletion der Basen 136-171 was den Aminosäuren 27-38 entspricht.

Zum Einfügen einer internen Deletion benötigte man ein Primerpaar, das den zu deletierenden Bereich flankierte wodurch das gesamte Plasmid mit Insert amplifiziert wurde mit Ausnahme der Nukleotide, die im Bereich der Deletion lagen.

Δ27-38 5': 5'-CCATTGATTGATCAGCCTAAAAAAG-3'

Δ27-38 3': 5'-AGGCACCATCTTTAGATGTTTGTTTC-3'

Man erhielt ein langes lineares PCR-Produkt mit „glatten“ Enden das „blunt end“ ligiert wurde.

Aus dem Vektor Δ27-38-SYCP3-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die Δ27-38-SYCP3 cDNA, die zwischen den *EcoRI*-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit *EcoRI* geöffneten pEGFP-N2 Vektor kloniert.

Δ27-38myc-SYCP3 in EGFP-N2:**Protein-Produkt: Δ27-38myc-SYCP3**

Wie oben beschrieben diente zunächst SYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] als Template für die Amplifikation von SYCP3 mit einer Deletion der Basen 136-171 mit den Primern:

Δ27-38 5': 5'-CCATTGATTGATCAGCCTAAAAAAG-3'

Δ27-38 3': 5'-AGGCACCATCTTTAGATGTTTGTTTC-3'

Zusätzlich wurde ein einzelsträngiges Oligonukleotid bestellt, das für das myc-Epitop codiert sowie das entsprechende komplementäre Oligonukleotid.

myc 5': 5'-GCAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT-3'

myc 3': 5'-ATTCAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTCTGC-3'

Die myc-Oligonukleotide wurden durch einen Annealingprozess zusammengelagert und zur „blunt end“ Ligation des langen linearen PCR-Produkt zugeführt.

Aus dem Vektor Δ27-38myc-SYCP3-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die Δ27-38myc-SYCP3 cDNA, die zwischen den *EcoRI*-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit *EcoRI* geöffneten pEGFP-N2 Vektor kloniert.

Δn86-SYCP3 in EGFP-N2:**Protein-Produkt: Δn86-SYCP3**

SYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] diente als Template für die Amplifikation der Basen 316-837 was einer Deletion der ersten 86 Aminosäuren entspricht.

Δ2-86 5': 5'-ATG GTGGGAGGTGAAGTACAGAATATGCTG-3'

SYCP3 3' TGA: 5'-GACTCATCAGAATAACATGGATTGAAG-3'

Der Δ2-86 5' Primer besaß ein Startcodon ATG als 5'-Überhang, hier als unterstrichene Primersequenz dargestellt.

3. Material

Das PCR-Produkt mit den, entsprechend der Nukleotidsequenz, deletierten Aminosäuren 2-86 wurde in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert und sequenziert.

Aus dem Vektor Δ n86-SYCP3-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die Δ n86-SYCP3 cDNA, die zwischen den *Eco*RI-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit *Eco*RI geöffneten pEGFP-N2 Vektor kloniert.

Δ n86myc-SYCP3 in EGFP-N2:

Protein-Produkt: Δ n86myc-SYCP3

Δ n86-SYCP3 EGFPN2 diene als Template für die Amplifikation von Δ n86myc-SYCP3 dem N-terminal ein myc-Epitop angefügt werden sollte. Da ein 5'-Überhang an einem Primer, der für das gesamte myc-Epitop codiert zu Lang ist erfolgte das Anfügen des myc-Epitop in zwei aufeinander folgenden PCR-Reaktionen. In der ersten PCR-Reaktion wurde Δ n86-SYCP3 ein halbes myc-Epitop über einen 5'-überhängenden Primer angefügt. Die überhängende Primärsequenz ist durch einen Unterstrich gekennzeichnet.

Δ n86 1/2 myc 5': 5'-ATCTCAGAAGAGGATCTGGTGGGAGGTGAAGTACAGAATATG3'
SYCP3 3' TGA: 5'-GACTCATCAGAATAACATGGATTGAAG-3'

Dieses Δ n86-1/2 myc PCR-Produkt wurde aus dem Gel gereinigt und diene als Template für eine weitere PCR-Reaktion, in der die zweite Hälfte des myc-Epitop und ein Startcodon über einen 5'-überhängenden Primer angefügt wurde. Die überhängende Primärsequenz ist durch einen Unterstrich gekennzeichnet.

myc 5' ATG: 5'-ATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG-3'
SYCP3 3' TGA: 5'-GACTCATCAGAATAACATGGATTGAAG-3'

Das PCR-Produkt mit dem N-terminal fusionierten myc-Epitop wurde in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert und sequenziert. Da sich herausstellte, dass das myc-Epitop in diesem Konstrukt vom Maus α -myc-Antikörper nicht erkannt wird, mussten ausgehend von diesem Template noch 6 Basen als Linker zwischen das myc-Epitop und der Δ n86-SYCP3-Sequenz inseriert werden. Das Einfügen der für den Linker codierenden Basen erfolgte mit einem Primerpaar mit 5'-Überhang, welche die zu inserierende Stelle flankiert. So wurde das gesamte Plasmid mit Insert amplifiziert, das um die 6 Basen des Linkers verlängert war. Die überhängende Primärsequenz ist durch einen Unterstrich gekennzeichnet.

Δ n86+Linker 5': 5'-GGA GTGGGAGGTGAAGTACAGAATATGC-3'
myc+Linker 3': 5'-AAI CAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTG-3'

Man erhält ein langes lineares PCR-Produkt mit „glatten“ Enden das „blunt end“ ligiert wurde. Aus dem Vektor Δ n86myc-SYCP3-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die Δ n86myc-SYCP3 cDNA, die zwischen den *Eco*RI-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit *Eco*RI geöffneten pEGFP-N2 Vektor kloniert.

S32A-SYCP3 in EGFP-N2:**Protein-Produkt: S32A-SYCP3**

Die Mutation der Aminosäure an Position 32 (entspricht den Basen 151-153) von Serin (TCT) zu Alanin (GCT) erfolgte mittels PCR mit dem Einsatz von 5'- und 3'-Primern, die denselben Bereich umschließen und im Zentrum die veränderte Base besitzen. SYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] diene als Template für die Mutagenese-PCR.

S32A 5': 5'-GGTGAAGAAAGCATGCTGGGAAATCTGGG-3'

S32A 3': 5'-CCCAGATTTCCCAGCATGCTTTCTTCCACC-3'

Das PCR-Produkt wurde nach einem *DpnI*-Verdau in Bakterien transformiert (vgl. 4.1). Die mutierte Nukleotidsequenz wurde mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

Aus dem Vektor Δ S32A-SYCP3-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die Δ S32A-SYCP3 cDNA, die zwischen den *EcoRI*-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit *EcoRI* geöffneten pEGFP-N2 Vektor kloniert.

S35A-SYCP3 in EGFP-N2:**Protein-Produkt: S35A-SYCP3**

Die Mutation der Aminosäure an Position 35 (entspricht den Basen 160-162) von Serin (TCT) zu Alanin (GCT) erfolgte mittels PCR mit dem Einsatz von 5'- und 3'-Primern, die denselben Bereich umschließen und im Zentrum die veränderte Base besitzen. SYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] diene als Template für die Mutagenese-PCR.

S35A 5': 5'-CATTCTGGGAAAGCTGGGAAACCACCATTG-3'

S35A 3': 5'-CAATGGTGGTTTCCCAGCTTTCCCAGAATG-3'

Das PCR-Produkt wurde nach einem *DpnI*-Verdau in Bakterien transformiert (vgl. 4.1). Die mutierte Nukleotidsequenz wurde mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

Aus dem Vektor Δ S35A-SYCP3-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die Δ S35A-SYCP3 cDNA, die zwischen den *EcoRI*-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit *EcoRI* geöffneten pEGFP-N2 Vektor kloniert.

S32E-SYCP3 in EGFP-N2:**Protein-Produkt: S32E-SYCP3**

Die Mutation der Aminosäure an Position 32 (entspricht den Basen 151-153) von Serin (TCT) zu Glutamat (GAA) erfolgte mittels PCR mit dem Einsatz von 5'- und 3'-Primern, die denselben Bereich umschließen und im Zentrum die veränderten Basen besitzen. SYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] diene als Template für die Mutagenese-PCR.

S32E 5': 5'-CCTGGTGAAGAAAGCATGAAGGGAAATCTGGGAAACC-3'

S32E 3': 5'-GGTTTCCCAGATTTCCCTTCATGCTTTCTTCCACCAGG-3'

Das PCR-Produkt wurde nach einem *DpnI*-Verdau in Bakterien transformiert (vgl. 4.1). Die mutierte Nukleotidsequenz wurde mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

3. Material

Aus dem Vektor $\Delta S32E$ -SYCP3-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die $\Delta S32E$ -SYCP3 cDNA, die zwischen den *EcoRI*-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit *EcoRI* geöffneten pEGFP-N2 Vektor kloniert.

S35E-SYCP3 in EGFP-N2:

Protein-Produkt: S35E-SYCP3

Die Mutation der Aminosäure an Position 35 (entspricht den Basen 160-162) von Serin (TCT) zu Glutamat (GAA) erfolgte mittels PCR mit dem Einsatz von 5`- und 3`-Primern, die denselben Bereich umschließen und im Zentrum die veränderten Basen besitzen. SYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] diene als Template für die Mutagenese-PCR.

S35E 5`: 5`-GGAAGAAAGCATTCTGGGAAAGAAGGGAAACCACCATTGATT-3`

S35E 3`: 5`-AATCAATGGTGGTTTCCCTTCTTCCAGAATGCTTTCTTCC-3`

Das PCR-Produkt wurde nach einem *DpnI*-Verdau in Bakterien transformiert (vgl. 4.1). Die mutierte Nukleotidsequenz wurde mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

Aus dem Vektor $\Delta S35E$ -SYCP3-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die $\Delta S35E$ -SYCP3 cDNA, die zwischen den *EcoRI*-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit *EcoRI* geöffneten pEGFP-N2 Vektor kloniert.

M24I-SYCP3 in EGFP-N2:

Protein-Produkt: M24I-SYCP3

Die Mutation der Aminosäure an Position 24 (entspricht den Basen 127-129) von Methionin (ATG) zu Isoleucin (ATC) erfolgte mittels PCR mit dem Einsatz von 5`- und 3`-Primern, die denselben Bereich umschließen und im Zentrum die veränderte Base besitzen. SYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] diene als Template für die Mutagenese-PCR.

M24I 5`: 5`-GGCAAATGTTCGAAATCTTCAATCATGTTATTCTGATGA-3`

M24I 3`: 5`-TCATCAGAATAACATGATTGAAGAGATTTCGAACATTTGCC-3`

Das PCR-Produkt wurde nach einem *DpnI*-Verdau in Bakterien transformiert (vgl. 4.1). Die mutierte Nukleotidsequenz wurde mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

Aus dem Vektor $\Delta M24I$ -SYCP3-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die $\Delta M24I$ -SYCP3 cDNA, die zwischen den *EcoRI*-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit *EcoRI* geöffneten pEGFP-N2 Vektor kloniert.

SYCP3 in pCMV-Myc :

Protein-Produkt: myc-SYCP3

Aus dem Vektor SYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die SYCP3wt cDNA, die zwischen den *EcoRI*-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit *EcoRI* geöffneten pCMV-Myc Vektor kloniert.

ΔCM2-SYCP3 in pCMV-HA:**Protein-Produkt: HA-ΔCM2-SYCP3**

Aus dem Vektor ΔCM2-SYCP3-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die ΔCM2-SYCP3 cDNA, die zwischen den *EcoRI*-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit *EcoRI* geöffneten pCMV-HA Vektor kloniert.

Medaka SYCP3 Konstrukte

Für die Herstellung verschiedener SYCP3 Konstrukte aus Medaka wurde zunächst die vollständige cDNA von Medaka SYCP3 (Iwai et al., 2006) benötigt. Hierzu wurde RNA aus Medaka Hoden mit Trifast (PEQLAB, Erlangen) isoliert und für die Amplifikation mit dem Superscript[™] One-Step RT-PCR Kit (Invitrogen, Karlsruhe) mit folgenden Primern eingesetzt:

meSYCP3 5`ATG: 5'-ATGGAGTCTGTGAGAAAAGTGGAG-3'

meSYCP3 3`TGA 5'-ACCAGAAGTCTAGAAGAACATGGTCTG-3'

Die Sequenz der Medaka SYCP3 cDNA von Base 90-695 (AB 162905.1) wurde in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert und sequenziert. Das Konstrukt meSYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] war Ausgangspunkt für weitere Klonierungen

meSYCP3wt in EGFP-N2**Protein-Produkt: meSYCP3wt**

Aus dem Vektor meSYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die Medaka SYCP3wt cDNA, die zwischen den *EcoRI*-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit *EcoRI* geöffneten pEGFP-N2 Vektor kloniert.

meΔCM2-SYCP3 in EGFP-N2:**Protein-Produkt: meΔCM2-SYCP3:**

meSYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] diente als Template für die Amplifikation der Basen 90-665 wodurch das CM2 deletiert wurde.

meSYCP3 5`ATG: 5'-ATGGAGTCTGTGAGAAAAGTGGAG-3'

meΔCM2 3`: 5'-CTA GGACTTGCGGACTGTTGCC-3`

Der meΔCM2 3` Primer besaß ein Stoppcodon (TAG) als Überhang, hier als unterstrichene Primersequenz dargestellt.

Das PCR-Produkt mit dem deletierten CM2 wurde in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert und sequenziert.

Aus dem Vektor meΔCM2-SYCP3-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die Medaka ΔCM2-SYCP3 cDNA, die zwischen den *EcoRI*-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit *EcoRI* geöffneten pEGFP-N2 Vektor kloniert.

3.6.2 SYCP3 Konstrukte zur Proteinexpression in Bakterien

Für die Expression von SYCP3 und Mutanten in Bakterien wurde die entsprechende cDNA in die multiple Klonierungsstelle (MCS) von pGEX-Vektoren (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire) oder pQE-Vektoren (Quiagen, Hilden) inseriert. Die in pGEX-Vektoren inklonierte cDNA wird als Fusionsprotein exprimiert, an das N-terminal das Enzym GST fusioniert ist. Die in pQE-Vektoren exprimierten Proteine besitzen ein N-terminal fusioniertes RGSHis-Epitop-Tag. Bei der Konstruktion von Fusionsproteinen war darauf zu achten, dass das Leseraster eingehalten wurde. Die klonierten Konstrukte wurden über Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

SYCP3 Konstrukte der Ratte

n1-130-SYCP3 pGEX-5X-2 Protein-Produkt: GST-n1-130-SYCP3

SYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] diente als Template für die Amplifikation der Basen von 47-448, (entspricht den Aminosäuren von 1-130), mit folgenden Primern.

SYCP3 5` ATG: 5`-GGCTTCGTCAGATGCTTCGAG-3`

Δc127 3`: 5`-TTATTGTTCAATTTTATGGTTACTGGCTTT-3`

Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert und sequenziert.

Aus dem Vektor n1-130-SYCP3-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die n1-130-SYCP3 cDNA, die zwischen den *EcoRI*-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit *EcoRI* geöffneten pGEX-5X-2 Vektor kloniert.

n1-130-SYCP3-pQE-30 Protein-Produkt: RGSHis-n1-130-SYCP3

Aus dem Vektor n1-130-SYCP3-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die n1-130-SYCP3 cDNA, die zwischen den *EcoRI*-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit *EcoRI* geöffneten pQE-30 Vektor kloniert.

Medaka SYCP3 Konstrukt

meSYCP3-pQE-31 Protein-Produkt: RGSHis-meSYCP3

Aus dem Vektor meSYCP3wt-pCR[®]2.1-TOPO[®] wurde die Medaka SYCP3wt cDNA, die zwischen den *EcoRI*-Schnittstellen des Vektors liegt, herausgeschnitten und in einen mit *EcoRI* geöffneten pQE-31 Vektor kloniert.

4 Methoden

4.1 Mikrobiologische Methoden

Flüssigkultur von Bakterien

Lösungen:

- LB-Medium (Luria Bertami) 1 l: 10 g Bacto-Trypton (Gibco)
→ pH 7,4 (NaOH) 5 g Hefeextrakt (Gibco)
10 g NaCl
⇒ autoklavieren
- Antibiotika-Stammlösungen: Ampicillin: 50 mg/ml in H₂O bidest.
Kanamycin: 50 mg/ml in H₂O bidest.
Tetracyclin: 5 mg/ml in Ethanol (100 %, p.a.)

Durchführung:

Für eine Übernachtskultur (ÜNK) wurden ca. 5-20 ml Medium in einem Greinerröhrchen vorgelegt. Zur Selektion wurde je nach verwendetem Bakterienstamm ein Antibiotikum zugesetzt. Ampicillin und Kanamycin wurden in Endkonzentrationen von 50 µg/ml eingesetzt, Tetracyclin wurde mit einer Konzentration von 15 µg/ml verwendet. Das Selektionsmedium wurde mit Bakterienmaterial aus einer Glycerinkultur oder eine Bakterienkolonie von einer Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C über Nacht geschüttelt.

Für Flüssigkulturen größerer Volumina wurde zunächst, wie beschrieben, eine ÜNK angesetzt. Mit 5 ml dieser ÜNK wurde dann am nächsten Tag 200 ml Medium angeimpft.

Photometrische Bestimmung der Bakteriendichte einer Flüssigkultur

Um die Bakteriendichte in einer Flüssigkeit zu bestimmen, misst man die Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm. Hierbei gilt, dass eine OD von 1, bei einer Schichtdicke von 1cm, 8×10^8 Zellen/ml entspricht. Man benötigt dazu einen Nullwert, der mit LB-Medium eingestellt wurde.

Glycerinkultur

Zur Aufbewahrung von Bakterien über einen längeren Zeitraum wurden Glycerinkulturen angesetzt. Hierzu wurden 100-200 µl Glycerin mit 900 µl einer ÜNK vermischt und bei -70°C gelagert. Ausgehend von der Glycerinkultur konnte nun eine neue ÜNK angeimpft werden,

indem mit einer sterilen Pipettenspitze etwas Bakterienmaterial von der Glycerinkultur in die ÜNK übertragen wurde (siehe oben).

Bakterienkultur auf Agarplatten

Lösungen:

- 1,5 % Agar (Select Agar, Gibco) in LB-Medium (siehe oben)
- Antibiotika-Stammlösungen (siehe oben)

Durchführung:

Für die Herstellung von Agarplatten wurde der Agar in LB-Medium eingewogen und autoklaviert. Nachdem sich die Lösung nach dem Autoklavieren auf etwa 50°C abgekühlt hatte, wurde das geeignete Antibiotikum aus einer Stammlösung in der jeweiligen Endkonzentration (siehe oben) zugegeben. Der flüssige Agar wurde anschließend in sterile Petrischalen gegossen, so dass der Boden einer Schale gerade bedeckt war. Nachdem der Agar fest geworden war, wurden die Schalen umgedreht, um ein Auftropfen von Kondenswasser auf den Nährboden zu verhindern. Die Selektionsplatten wurden über Nacht bei RT getrocknet und konnten 3-4 Wochen bei 4°C gelagert werden. Danach verlor das Antibiotikum seine Wirkung.

Um aus einer Flüssigkultur eine Plattenkultur herzustellen wurden ca. 50-100 µl der Kultur auf die Platte pipettiert und mit einem sterilen Drygalski-Spatel ausplattiert. Sterilisiert wurde der Drygalski-Spatel indem er mit 70 % Ethanol abgeflammt wurde. Bakterien konnten auch mit Hilfe einer sterilen Impföse auf die Platte überführt und dort ausgestrichen werden.

Herstellen kompetenter Bakterien

Bakterien, die mit Plasmiden transformiert werden sollen, müssen eine gewisse Kompetenz aufweisen. Das heißt, sie müssen die Fähigkeit besitzen, unter geeigneten Bedingungen DNA aus ihrer Umgebung in sich aufnehmen zu können. Zahlreiche Bakterienstämme besitzen eine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von DNA. Aber auch andere Arten können, durch Modifikation der sie umgebenden Lipiddoppelschicht, chemisch kompetent gemacht werden (Chung et al., 1989).

Lösungen:

- LB-Medium (siehe oben)
- Tetracyclin: 5 mg/ml in Ethanol (100 %, p.a.)

4. Methoden

- TSS (Transformation and Storage Solution): LB-Medium (siehe oben)
→ pH 6,5
+ 10 % (w/v) PEG 3350 oder 8000
+ 5 % (v/v) DMSO
+ 20-50 mM Mg²⁺ (MgSO₄ oder MgCl₂)
→ sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C

Durchführung:

Zunächst wurden 10 ml LB-Medium mit Endkonzentration 15 µg/ml Tetracyclin versehen. Die Flüssigkultur wurde mit einer Einzelkolonie oder aus einer Glycerinkultur des gewünschten Bakterienstammes angeimpft. Standardmäßig wurde der Bakterienstamm E.coli XL1-blue verwendet. Die ÜNK wurde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 100 ml LB-Medium mit einer Endkonzentration von 15 µg/ml Tetracyclin mit 1-5 ml der ÜNK angeimpft. Die Bakterien wurden nun bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 vermehrt, was nach ca. 2 h der Fall war. Dann wurde die Flüssigkultur auf zwei 50 ml-Röhrchen verteilt und bei 1000 g und 4°C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in $\frac{1}{40}$ des Ausgangsvolumens (2,5 ml) eiskaltem TSS aufgenommen und resuspendiert. Die Suspension wurde in Aliquots zu 100 µl auf vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Bakterien wurden bei -70°C gelagert und waren mehrere Wochen haltbar.

Kompetenz-Test:

Die Qualität kompetenter Bakterien lässt sich ausdrücken in „colony forming units“ (cfu) pro eingesetzter Plasmid-DNA. Ein akzeptabler Wert liegt dabei bei 10⁷-10⁹ cfu/µg Plasmid-DNA, bezogen auf den pUC-Vektor.

Zur Ermittlung der Kompetenz wurden die Bakterien mit je 10, 100 und 1000 pg des pUC-Vektors transformiert. Die auf den Platten erscheinenden Bakterienkolonien wurden dann ausgezählt. Dies diente der Bestimmung der Transformationsrate für 1 µg DNA des pUC-Vektors.

Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Die Aufnahme von Fremd-DNA in ein Bakterium wird als Transformation bezeichnet. Damit die Fremd-DNA bei der Transformation in eine Bakterienzelle nicht abgebaut wird, muss sie ringförmig vorliegen (Plasmid-DNA) und benötigt einen Replikationsstartpunkt, der von der Bakterienzelle erkannt werden kann. Zusätzlich trägt die Plasmid-DNA meistens eine Antibiotikaresistenz, um eine Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien zu ermöglichen.

Lösungen:

- LB-Medium (siehe oben)

Durchführung:

Ein Aliquot (100 µl) kompetenter Bakterien wurde langsam auf Eis aufgetaut. Die Bakterien wurden mit dem Ligationsansatz (vgl. 4.2.10) vermischt und 45-60 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dann für 30 sek bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und sofort wieder auf Eis gestellt. Zu den Bakterien wurde 900 µl LB-Medium zugegeben und 1 h bei 37°C geschüttelt. Es wurden zwei Verdünnungen auf entsprechenden Selektionsplatten (siehe oben), je nach Antibiotikaresistenz des transformierten Plasmids, ausplattiert. Zunächst wurden 100 µl des 1 ml Transformationsansatzes entnommen und ausgestrichen, was einer $1/10$ Verdünnung entspricht. Die restlichen Bakterien wurden bei 10000 rpm für 30 sek in einer Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 100 µl abgenommen, in denen das Pellet resuspendiert wurde. Anschließend wurde alles auf einer zweiten Platte ausgestrichen was einer $9/10$ Verdünnung entspricht.

4.2 Arbeiten mit rekombinanter DNA

4.2.1 Isolierung von RNA aus Geweben

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Hodengewebe erfolgte mit *peqGOLD Trifast™* von der Firma PeqLab, Erlangen, nach Herstellerprotokoll. Die RNA wurde für die Gewinnung von spezifischer cDNA (vgl. 4.2.2) über RT-PCR benutzt.

4.2.2 Gewinnung von cDNA aus isolierter RNA

Die Herstellung von cDNA durch reverse Transkription aus mRNA über spezifische Primer ist die Voraussetzung für das Arbeiten mit rekombinanter DNA. Der Vorteil gegenüber genomischer DNA ist ein durchgängiges Leseraster, das nicht von Introns unterbrochen wird. Dabei kann die DNA für exogene Expression in eukaryotischen und prokaryotischen Zellen und *in-vitro* Expressionssystemen eingesetzt werden.

Die cDNA wurde mithilfe der *Superscript™ One-Step RT-PCR for Long Templates* (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerprotokoll hergestellt, wobei in den Ansatz 0,8 U/µl Ribonuklease Inhibitor (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) hinzugefügt wurde.

Die amplifizierte cDNA wurde mittels präparativer DNA Gelelektrophorese (vgl. 4.2.4) isoliert, über Topo-TA Klonierung (vgl. 4.2.10) in einen Vektor inseriert und nach Transformation von Bakterien vervielfältigt (vgl. 4.1). Von hier aus konnte die cDNA durch PCR oder Restriktionsendonukleasen beliebig umkloniert und mutiert werden.

4.2.3 PCR (polymerase chain reaction)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine Technik, mit der man selektiv DNA-Sequenzen vervielfältigen kann. Sie basiert auf der Tatsache, dass ein DNA-Doppelstrang bei Erhitzung denaturiert, sich also in zwei Einzelstränge zerlegt. Mit Hilfe einer hitzebeständigen DNA-Polymerase können die Einzelstränge in Anwesenheit von Primern und den vier Nukleotidtriphosphaten repliziert werden. Als Primer werden DNA-Oligomere zugegeben, die die Zielsequenz flankieren. Man benötigt also zumindest Kenntnis über Teile der Sequenz, oder aber ähnliche Sequenzen, aus der sich die erforderlichen Primer ableiten lassen.

Primer und Primerdesign:

Der Erfolg einer PCR hängt sehr stark von den verwendeten Primern ab, die bestimmte Eigenschaften besitzen sollten. Sie sollten nicht mit sich selbst oder dem anderen Primer hybridisieren können, sie sollten keine Schleifen bilden können und, wenn möglich, sollte ihre komplementäre Sequenz nur einmal auf der eingesetzten DNA vorkommen. Außerdem sollten die Schmelztemperaturen der beiden verwendeten Primer etwa gleich hoch sein und der G/C-Gehalt ihrer Sequenzen zwischen 40 und 60 % liegen. Die Schmelztemperatur gibt an bei wie viel Grad Celsius die Hälfte dieser komplementären Sequenzen in der Lösung als Doppelstrang vorliegen. Diese Temperatur kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$T_m = 2^{\circ}\text{C} \cdot (A + T) + (G + C)$$

Die PCR-Reaktion ist umso spezifischer, je näher die Annealing-Temperatur bei der Schmelztemperatur der beiden Primer liegt. Die Annealing-Temperatur wurde anfangs meist ca. 5°C unter T_m gewählt und bei Misserfolg dann nach oben (unspezifische Amplifikation, erkennbar als Schmier bei der Gelelektrophorese) oder unten (nichts amplifiziert) variiert. Die Primer wurden mit dem Programm „OLIGO“ am Computer entworfen und von den Firmen Interaktiva (Ulm), Biomers (Ulm) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen

Durchführung der PCR

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die im Lehrstuhl selbst isolierte Taq-DNA-Polymerase entsprechend des Herstellerprotokolls von Promega verwendet. Diese fügt an die 3'-Enden der doppelsträngigen DNA-Fragmente Überhänge aus A-Nukleotiden an, besitzt aber keine 3'-5' Exonukleaseaktivität und somit nicht die Fähigkeit zur Fehlerkorrektur. Während der Elongationsphase kann die Taq-DNA-Polymerase ca. 1000 Nukleotide pro Minute verarbeiten.

Sollten die DNA-Fragmente mit sehr hoher Genauigkeit amplifiziert werden wurde entweder die im Lehrstuhl selbst isolierte Pfu-DNA-Polymerase entsprechend des Herstellerprotokolls

4. Methoden

von Promega oder die Phusion™-DNA-Polymerase von Finnzymes (New England BioLabs® Inc.) verwendet. Diese Polymerasen hängen keine überhängenden A-Nukleotiden am 3'-Ende des Produkts an, besitzen aber 3`-5`-Exonukleaseaktivität. Während der Elongationsphase kann die Pfu-DNA-Polymerase ca. 500 Nukleotide pro Minute verarbeiten. Die Phusion™-DNA-Polymerase kann ca. 1000 Nukleotide in 15 bis 30 Sekunden verarbeiten.

Pipettierschema für Taq-Polymerase (50 µl-PCR-Ansatz):

- 20-100 ng DNA
- 3 µl MgCl₂ (25 mM)
- 5 µl Taq-DNA-Polymerase 10x Reaction Buffer
- 1 µl dNTPs (Mix, SL je Nukleotid 10 mM, MBI)
- 1 µl 5'-Primer (SL 100 pmol/µl)
- 1 µl 3'-Primer (SL 100 pmol/µl)
- 1 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl, Lehrstuhl Zoo I)
- auf 50 µl mit H₂O bidest. auffüllen

Pipettierschema für Pfu-Polymerase (50 µl-PCR-Ansatz):

- 20-100 ng DNA
- 5 µl Pfu-DNA-Polymerase 10x Reaction Buffer mit MgSO₄ (Promega)
- 1 µl dNTPs (Mix, SL je Nukleotid 10 mM, MBI)
- 1 µl 5'-Primer (SL 100 pmol/µl)
- 1 µl 3'-Primer (SL 100 pmol/µl)
- 1 µl Pfu-DNA-Polymerase (5 U/µl, Lehrstuhl Zoo I)
- auf 50 µl mit H₂O bidest. auffüllen

Pipettierschema für die Phusion™-DNA-Polymerase (50 µl PCR-Ansatz):

- 1 pg-10 ng Template-DNA
- 10 µl 5x Phusion™ HF Buffer (New England BioLabs® Inc.)
- 1 µl dNTPs (Mix, SL je Nukleotid 10 mM, MBI)
- 1 µl 5'-Primer (SL 100 pmol/µl)
- 1 µl 3'-Primer (SL 100 pmol/µl)
- 1,5 µl DMSO (optional, 3 % Endkonzentration, New England BioLabs® Inc.)
- 0,5 µl Phusion™-DNA-Polymerase (0,02 U/µl, New England BioLabs® Inc.)
- auf 50 µl mit H₂O bidest. auffüllen

4. Methoden

Der Ansatz wurde gut vermischt und im Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert:

Programm für Taq-DNA-Polymerase

initiale Denaturierung:	2 min, 96°C	
Denaturierung:	1 min, 96°C	} 30-35 Zyklen
Primer-Annealing:	1 min, Temperatur je nach Primer	
Elongation:	1 min/1000 Basen+30 sek, 72°C	
finale Elongation	10 min	
Kühlung:	4°C	

Programm für Pfu-DNA-Polymerase

initiale Denaturierung:	2 min, 96°C	
Denaturierung:	1 min, 96°C	} 30-35 Zyklen
Primer-Annealing:	1 min, Temperatur je nach Primer	
Elongation:	1 min/500 Basen+30 sek, 72°C	
finale Elongation	10 min	
Kühlung:	4°C	

Programm für Phusion™-DNA-Polymerase:

initiale Denaturierung:	30 sek, 98°C	
Denaturierung:	10 sek, 98°C	} 30-35 Zyklen
Primer-Annealing:	10 sek, Temperatur je nach Primer	
Elongation:	15-30 sek/1000 Basen, 72°C	
finale Elongation	10 min	
Kühlung:	4°C	

Die Analyse der PCR-Reaktion erfolgte im 1 %igen Agarosegel (vgl. 4.2.4).

Gerichtete Mutagenese mit Hilfe der PCR

Nach der Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR konnten diese in bakterielle Vektoren kloniert werden (vgl. 4.2.10). Codiert das DNA-Fragment für ein bestimmtes Protein konnte es in geeigneten Vektoren in eukaryontische Kulturzellen oder Bakterien exprimiert und seine Eigenschaften analysiert werden. Um nun herauszufinden welche Domänen für die spezifischen Eigenschaften des Proteins verantwortlich sind wurden Teile des Proteins deletiert oder einzelne Aminosäuren verändert, wobei das Verhalten der Mutanten mit den Eigenschaften des wildtypischen Protein verglichen wurde. Deletiert wurden Aminosäuren

4. Methoden

des Carboxyl- und Amino-Endes, es konnten aber auch interne Aminosäuresequenzen deletiert werden. Weiterhin konnten einzelne Aminosäuren des Proteins mutiert werden. Deletionen, und Mutationen von Aminosäuren wurden auf DNA-Ebene durchgeführt, indem man nur bestimmte DNA-Segmente des DNA-Fragments durch PCR amplifizierte oder einzelne Basen des DNA-Fragments veränderte.

Einführung einer Deletion am 5`-Ende des DNA-Fragments:

Zur Einführung einer Deletion am 5`-Ende wurde eine normale PCR mit geeigneten Primern durchgeführt. Je nachdem wie viele Nukleotide deletiert werden sollten wurde der 5`-Primer so gewählt, dass er zu dem neuen 5`-Ende des DNA-Fragments komplementär ist. Da mit der Deletion des 5`-Endes auch das Startcodon, was für die Proteinexpression wichtig ist, entfernt wurde, musste dieses am 5`-Ende des Primers als Überhang konstruiert werden. Das durch die PCR entstandene DNA-Segment beginnt also am 5`-Ende mit einem Startcodon ist aber im Vergleich zu dem ursprünglichen DNA-Fragment am 5`-Bereich um eine gewisse Anzahl von Nukleotiden verkürzt.

Einführung einer Deletion am 3`-Ende des DNA-Fragments:

Zur Einführung einer Deletion am 3`-Ende wurde eine normale PCR mit geeigneten Primern durchgeführt. Je nachdem wie viele Nukleotide deletiert werden sollten wurde der 3`-Primer so gewählt, dass er zu dem neuen 3`-Ende des DNA-Fragments komplementär ist. Da mit der Deletion des 3`-Endes auch das Stoppcodon, was für die Proteinexpression wichtig ist, entfernt wurde musste dieses am 5`-Ende des Primers als Überhang konstruiert werden. Das durch die PCR entstandene DNA-Segment ist im Vergleich zu dem ursprünglichen DNA-Fragment am 3`-Ende um eine gewisse Anzahl von Nukleotiden verkürzt, endet aber mit einem Stoppcodon.

Einführung einer internen Deletion des DNA-Fragments

Zum Einfügen einer internen Deletion benötigt man ein Primerpaar, das den zu deletierenden Bereich flankiert, wobei der 5`-Primer am 3`-Ende der Deletion und der 3`-Primer am 5`-Ende der Deletion bindet. Die PCR wurde mit der Pfu-DNA-Polymerase durchgeführt und es wurde das gesamte Plasmid mit Insert amplifiziert mit Ausnahme der Nukleotide, die im Bereich der Deletion liegen. Man erhält ein langes lineares PCR-Produkt mit „glatten“ Enden. Nach einem Verdau mit *DpnI*, das aufgrund seiner Spezifität für methylierte Schnittstellen nur die Matrizen DNA schneidet und nicht das PCR-Produkt, wurden die „glatten“ Enden des PCR-Produkts phosphoryliert und ligiert (vgl. 4.2.10).

4. Methoden

Eine weitere Möglichkeit eine interne Deletion einzufügen ist, in zwei unabhängigen PCR-Reaktionen mit geeigneten Primern zunächst den Bereich vor der gewünschten Deletion, und den Bereich nach der gewünschten Deletion, zu amplifizieren. Hierbei war darauf zu achten, dass der 3'-Primer des vorderen Bereichs einen ca. 10 Nukleotid langen Überhang besaß, der Komplementär zum 5'-Ende des hinteren Bereichs war. Umgekehrt musste der 5'-Primer des hinteren Bereichs einen ca. 10 Nukleotid langen Überhang besitzen, der Komplementär zum 3'-Ende des vorderen Bereichs war.

Diese zwei PCR-Produkte wurden aus dem Gel gereinigt (vgl. 4.2.4) und für eine erneute PCR mit einem 5'-Primer und einen 3'-Primer eingesetzt. Um nun das DNA-Fragment mit der internen Deletion zu erhalten, mussten die zwei PCR-Produkte mit ihren komplementären Überhängen miteinander hybridisieren.

Mutagenese einzelner Basen des DNA-Fragments

Für die Mutagenese einzelner Basen einer Sequenz in einem Vektor, wurde das Protokoll des *QuikChange® Site-Directed Mutageneses Kit* von Stratagene angewandt. Dies basiert auf einer PCR mit dem Einsatz von 5'- und 3'-Primern, die denselben Bereich umschließen und im Zentrum die veränderten Basen besitzen. Nach *DpnI*-Verdau der Matrizen-DNA wurde das Produkt transformiert (vgl. 4.1) und die resultierenden Bakterienklone konnten auf die gewünschte Sequenz hin untersucht werden.

Kolonie-PCR

Nach der Klonierung von DNA-Fragmenten in bakterielle Vektoren (vgl. 4.2.10) wurden die erhaltenen Klone mittels Kolonie-PCR auf eine erfolgreiche Ligation hin überprüft, und getestet, in welcher Orientierung das inklonierte DNA-Fragment in den Vektor inseriert hatte. Hierzu wurde statt isolierter DNA etwas Bakterienmaterial für die PCR eingesetzt und mit geeigneten Primern überprüft, ob (5'-Primer und 3'-Primer des Inserts) und in welcher Orientierung (5'-Primer des Inserts und 3'-Primer des Vektors) das inklonierte Insert im Bakterienvektor inseriert war.

Pipettierschema für Taq-Polymerase (25 µl-PCR-Ansatz):

- 1,5 µl MgCl₂ (25 mM)
- 2,5 µl Taq-DNA-Polymerase 10x Reaction Buffer
- 0,5 µl dNTPs (Mix, SL je Nukleotid 10 mM, MBI)
- 1 µl 5'-Primer (SL 10^{pmol}/µl)
- 1 µl 3'-Primer (SL 10^{pmol}/µl)
- 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase (5^U/µl, Lehrstuhl Zoo I)
- auf 25 µl mit H₂O bidest. auffüllen

Durchführung:

Zunächst wurde je nach Anzahl der zu testenden Klone ein „Master-Mix“ des 25 µl-PCR-Ansatzes zusammenpipettiert, der auf PCR-Reaktionsgefäße verteilt wurde. Die zu testende Bakterienkolonie wurde von einer Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt. Ein Teil des Bakterienmaterials wurde auf eine neue Agarplatte übertragen, die man bei 37°C inkubieren ließ um am nächsten Tag eine ÜNK animpfen zu können (vgl. 4.1). Der Rest wurde mit dem PCR-Ansatz vermischt.

4.2.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Auftrennung der DNA macht man sich das negativ geladene Phosphoribose-Rückrad zu nutzen. Wird ein elektrisches Feld angelegt bewegen sich die DNA-Moleküle in wässriger Lösung zur positiv geladenen Anode. Lässt man diese Bewegung in einem molekularen Netzwerk ablaufen, wie in einem Agarosegel, so werden die einzelnen DNA-Moleküle je nach Größe und Form aufgetrennt, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit mit der Größe abnimmt. Aber auch die Konformation der DNA beeinflusst die Wanderungsgeschwindigkeit. Ringförmige kovalent geschlossene DNA läuft schneller, je größer ihre Verwindungszahl ist, egal ob die DNA negativ oder positiv superspiralisiert vorliegt. Linearisierte DNA wandert etwas schneller als das entspannte, geschlossene Plasmid.

Die Trennschärfe hängt von der Gesamtlaufweite und der Agarosekonzentration im Gel ab (vgl. Tabelle 4.1). Die Konzentration sollte dem Größenbereich der erwarteten Fragmente angepasst werden.

Um die DNA-Banden im Agarosegel sichtbar zu machen gibt man Ethidiumbromid zu. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert zwischen den Basen der DNA und erzeugt bei Anregung mit UV-Licht eine orange Fluoreszenz.

Agarosekonzentration (%)	Optimaler Trennbereich (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Tabelle 4.1: Abhängigkeit des Trennbereiches von der Agarosekonzentration

4. Methoden

Lösungen:

- 10x TBE (pH 8,2):
890 mM Tris/HCl
890 mM Borsäure
20 mM EDTA
- 20x SB (pH 8,0):
200 mM NaOH
ad Borat bis pH 8,0
- 10x DNA-Probenpuffer:
10x TBE
+ 50 % (v/v) Glycerin
+ 0,4 % (w/v) Bromphenolblau
+ 0,4 % (w/v) Xylencyanol
- Laufpuffer (1x TBE) bzw. (1xSB)
- Ethidiumbromid-Stammlösung (50 mg/ml)

Durchführung:

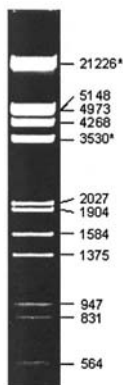


Abbildung 4.1: DNA-Marker III (MBI) im 1%igen Agarosegel. Größenangaben in bp.

Für ein 1 %iges Gel wurden 0,4 g Agarose (low EEO, Applichem oder pEQlab) in 40 ml 1x TBE oder 1x SB gelöst und aufgeköcht. Nachdem die Lösung auf etwa 50°C abgekühlt war, wurde 1 µl der Ethidiumbromid-Stammlösung zugegeben. Die Lösung wurde gut gemischt und in einen Gelschlitten gegossen. Der Gelschlitten wurde vorher mit Tesafilm abgedichtet, und es wurde ein Kamm, zum Auftragen der Proben, eingesteckt. Nach ca. 30 min war das Gel komplett polymerisiert und konnte verwendet werden. Sollte die Polymerisation schneller erfolgen konnte das Gel auch bei 4°C gegossen werden. Das Gel wurde, nach Entfernen des Tesafilms, mit dem Gelschlitten in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt und mit Laufpuffer (1x TBE bzw. 1x SB) überschichtet. Dann wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen und eventuell vorhandene Luftblasen aus den Taschen entfernt. Anschließend wurden die zu analysierenden Proben mit $\frac{1}{10}$ Volumen 10x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Um die Größen der aufgetrennten DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde in einer Spur ein Gemisch aus Fragmenten definierter Größe als Marker mit aufgetragen. Es wurde immer der Marker III (MBI) verwendet, mit EcoRI und HindIII verdaute λ -DNA (vgl. Abbildung 4.1), von dem 1 µg

aufgetragen wurde. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100-130 V durchgeführt, und wurde beendet, wenn das Bromphenolblau aus dem Probenpuffer etwa $\frac{2}{3}$ des Gels durchlaufen hatte. Die durch das Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden wurden mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und über eine Videokamera mit angeschlossenem Drucker oder mit einer Polaroid-Kamera dokumentiert.

Präparative DNA-Gelelektrophorese

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit (PAQLAB, Erlangen) durchgeführt. Die gewünschten Banden wurden mit einer sauberen Skalpellschneide vorsichtig aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA anschließend nach Herstellerprotokoll eluiert. Der finale Elutionsschritt wurde meist mit 30-40 µl, und nicht wie im Protokoll beschrieben mit 50 µl, H₂O bidest. durchgeführt. Um die DNA möglichst verlustarm eluieren zu können, wurde das Wasser auf ca. 60 °C erhitzt.

Es wurden Agarosen (low EEO) der Firmen Applichem oder PEQLAB verwendet, die eine niedrige Bindungsaffinität zu Nukleinsäuren besitzen. Dadurch wurde die Elution der DNA erleichtert und Ausbeuten erhöht. Die eluierte DNA stand sofort ohne weitere Bearbeitungsschritte für Folgeversuche zur Verfügung.

4.2.5 Plasmid-DNA Präparationen

Das Prinzip der Plasmidisolierung basiert auf der Lyse der Bakterien in alkalischem Medium und der nachfolgenden Trennung der Plasmid-DNA von den übrigen Zellbestandteilen. Die DNA kann direkt gefällt werden oder durch Adsorption an ein Silika-Gel unter Hochsalz-Bedingungen isoliert werden.

GTE-System (alkalische Lyse)

Bei dieser Methode (Li et al., 1997) erhält man DNA, die zwar verunreinigt ist, sich aber dazu eignet, Bakterienkolonien auf erfolgreiche Ligation und Transformation zu testen.

Lösungen:

- Lösung 1 (GTE-Puffer):
 - 50 mM Glucose
 - 10 mM EDTA
 - 25 mM Tris/HCl, pH 8,0
 - + 1 Spatelspitze RNase A
 - ⇒ Lagerung bei 4 °C

4. Methoden

- Lösung 2 (Lysispuffer): 0,2 N NaOH
1 % (w/v) SDS
- Lösung 3 (Kaliumacetatlösung): 60 ml Kaliumacetatlösung (SL 5 M)
11,5 ml Eisessig
28,5 ml H₂O bidest.
- 100 % Ethanol p.a. (auf Eis vorkühlen)
- 70 % Ethanol p.a.

Durchführung:

Zunächst wurde das Plasmid in den Bakterien vermehrt. Dazu wurde die betreffende Bakterienkolonie eine 10 ml-ÜNK in geeignetem Selektionsmedium hergestellt (vgl. 4.1). Am nächsten Morgen wurden 1,5 ml dieser ÜNK in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 30 sek bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl GTE-Puffer durch Vortexen resuspendiert. Danach wurden 200 µl Lösung 2 zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt. Zum Schluss wurden 150 µl Lösung 3 zugegeben und der Ansatz kurz kräftig geschüttelt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 13000 rpm zum Pelletieren der Zelltrümmer wurden 400 µl des Überstandes in ein frisches Gefäß überführt und 400 µl eiskaltes 100 %iges Ethanol p.a. zugegeben. Beim Abnehmen des Überstandes war darauf zu achten, dass kein ausgefallenes SDS mit verschleppt wurde, weil dies nachfolgende Reaktionen stören könnte. Anschließend wurde 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand sorgfältig abgenommen und das Pellet 5-10 min luftgetrocknet. Höhere Reinheit der DNA erzielt man durch zweimaliges Waschen des Pellet mit 70 %igem Ethanol p.a. Zum Schluss wurde das Pellet in 30 µl H₂O bidest. aufgenommen. Von der GTE-Plasmid-Präparation wurden 8 µl in einem Restriktionsverdau (vgl. 4.2.10) eingesetzt.

Plasmid Mini-Präp

Diese Methode ist eine Kombination aus alkalischer Lyse und Adsorption der DNA an ein Silika-Gel unter Hochsalz-Bedingungen. Die DNA wird dabei nicht gefällt, sondern an das Gel gebunden und anschließend mit einem Niedrigsalz-Puffer (z.B. H₂O bidest.) bei pH 7,0-8,5 eluiert. Die durch diese Methode gewonnene Plasmid-DNA besitzt eine sehr hohe Reinheit und war somit auch für empfindlichere Reaktionen wie Sequenzierungen und Transfektionen einsetzbar.

Durchgeführt wurde die Plasmid Mini-Präp der Firma PEQLAB (Erlangen) nach Herstellerprotokoll, ausgehend von einer 6-10 ml ÜNK. Eluiert wurde mit 50 µl H₂O bidest, was normalerweise zu Konzentrationen zwischen 250 und 400 ng/µl führte.

4.2.6 Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme

Restriktionsenzymen und DNA-modifizierende Enzyme wurden wenn nicht anders vermerkt von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen und in verschiedenen Schritten bei Klonierungen laut den im Katalog beschriebenen Anweisungen eingesetzt. Wenn mehrere Enzyme gleichzeitig oder nacheinander im selben Ansatz inkubiert wurden, dann wurde der passende Puffer aus dem „five buffer plus system“ ausgewählt.

Restriktionsenzyme: dienen dazu DNA an bestimmten Erkennungssequenzen zu schneiden. Es werden entweder „glatte“ Enden („blunt ends“) oder „klebrige“ Enden („sticky ends“) mit einzelsträngigen Überhängen erzeugt. An den 5'-Enden befinden sich Phosphatreste.

Ligase: „Glatte“ Enden und „klebrige“ Enden mit identischen Überhängen werden mit diesem Enzym ATP-abhängig kovalent verknüpft.

Shrimp Alkaline Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH): entfernt Phosphatreste an 5'-Enden von linearisierter DNA.

T4 Polynukleotide Kinase: fügt an 5'-Enden Phosphatreste an.

Klenow-Fragment: Diese DNA-Polymerase wurde dazu benützt, „klebrige“ Enden mit einzelsträngigen 5'-Überhängen zu „glatten“ Enden aufzufüllen.

Pfu-DNA-Polymerase (Lehrstuhl Zoo I): ist eine DNA-Polymerase mit „proof reading“ Aktivität, die zur Amplifikation von DNA-Sequenzen eingesetzt wurde (vgl. 4.2.3), diese konnte aber auch wie das Klenow-Fragment „klebrige“ Enden zu „glatten“ Enden auffüllen. Deren Exonukleaseaktivität wurde dazu benutzt, einzelsträngige 3'-Überhänge von „klebrigen“ Enden abzuverdauen und so „glatte“ Enden zu erhalten.

Taq-DNA-Polymerase (Lehrstuhl Zoo I): wurde für Screening von Klonen benutzt und um 3'-(A)-Überhänge an PCR-Produkte anzuhängen, die mit der Pfu-Polymerase hergestellt wurden.

Phusion™-DNA-Polymerase (New England BioLabs® Inc.): ist eine DNA-Polymerase mit „proof reading“ Aktivität, die zur Amplifikation von DNA-Sequenzen eingesetzt wurde (vgl. 4.2.3).

4.2.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde photometrisch (Biophotometer, Eppendorf) über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, wo die Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum besitzen. Gemessen wurde eine 1:20-Verdünnung gegen einen entsprechenden Leerwert. Dabei gilt, dass eine OD₂₆₀ von 1 etwa 50 µg/ml DNA entspricht. Aus den Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ und OD₂₆₀/OD₂₃₀ konnten Aussagen über die Reinheit der Probe getroffen werden. Die Absorption bei 280 nm spiegelt die Verunreinigungen durch Proteine wider, während Peptide, aromatische Verbindungen und Kohlenhydrate bei 230 nm ihr Absorptionsmaximum haben. In Tabelle 4.2 ist zusammengefasst, wie von der OD auf die Konzentration geschlossen werden kann und wie die Quotienten ²⁶⁰/₂₈₀ und ²⁶⁰/₂₃₀ bei reinen Proben aussehen sollten.

	OD ₂₆₀ = 1 entspricht	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ ≥	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀ ≥
dsDNA	50 µg/ml	1,8	2,2
ssDNA	37 µg/ml	1,8	2,2
Oligonukleotide	30 µg/ml	1,8	2,2

Tabelle 4.2: Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

4.2.8 Fällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden immer mit Natriumacetat und Ethanol gefällt. Dazu wurde der DNA-Lösung zunächst ¹/₁₀ Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und dann 2,5 Volumina 100 % Ethanol p.a. zugegeben. Standardmäßig wurden Nukleinsäuren in 100 µl-Ansätzen gefällt, kleinere Ansätze wie Sequenzierungen wurden auf 100 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde gemischt und anschließend 20-30 min bei 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Zum Waschen wurde das 70%ige Ethanol auf das Pellet pipettiert und anschließend bei 12000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet wurde 5-10 min luftgetrocknet und schließlich in der gewünschten Menge Puffer gelöst.

4.2.9 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden nach der von Sanger und Coulson (1977) entwickelten Kettenabbruch-Methode durchgeführt. Die Methode beruht darauf, dass bei einer PCR Didesoxynukleosid-Triphosphate (ddNTPs) in stöcheometrischer Menge beigefügt werden. Wird bei der DNA-Polymerisation durch die Polymerase ein solches Nukleotid eingebaut, kommt es zum Abbruch der Polymerisation, da die DNA-Polymerase wegen der fehlenden

4. Methoden

3'-OH-Gruppe an der Ribose des Nukleotids kein weiteres anfügen kann. Auf diese Weise erhält man DNA-Fragmente verschiedenster Längen, die alle an ihren Enden ein ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP oder ddGTP) tragen. Früher mussten 4 parallele Ansätze gefahren werden, jeweils einer für die 4 verschiedenen Nukleotide (A, T, C, G). Die Reaktionen wurden mit Radioisotopen durchgeführt, um die DNA-Fragmente zu markieren, die anschließend über spezielle Sequenziergele aufgetrennt wurden, mit denen dann ein Röntgenfilm belichtet wurde. Aus den Bandenmustern konnte dann die DNA-Sequenz abgelesen werden.

In einer verfeinerten Methode kommen fluoreszenzmarkierte ddNTPs zum Einsatz, wobei jedes Nukleotid mit einem anderen Farbstoff markiert ist (Adenin: R6G, grün; Thymin: ROX, rot; Cytosin: TAMRA, gelb; Guanin: R110, blau). In diesem System wird die zu sequenzierende DNA mit einem entsprechenden Primer und einem Premix (*ABI Prism[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Tectin Kit*), der dNTPs, markierte ddNTPs, Taq-DNA-Polymerase, MgCl₂ und den Puffer enthält, gemischt und in einer PCR amplifiziert. So entstehen DNA-Fragmente verschiedenster Längen, mit jeweils einem markierten Nukleotid an ihren Enden, wobei Fragmente gleicher Länge auch den gleichen Farbstoff als Markierung tragen. Diese Fragmente werden in einem Kapillar-Gelsystem der Größe nach aufgetrennt und mit einem Laser angeregt. Je nach Farbstoff wird ein Licht spezifischer Wellenlänge emittiert, das von einem Photoelement registriert und an einen Computer weitergeleitet wird. Der Computer setzt die einzelnen Meßdaten über eine geeignete Software schließlich zu einer Sequenz zusammen.

Durchführung:

Standardansatz einer Sequenzierreaktion (10 µl):

- 200-500 ng DNA
- 10 pmol Primer
- bis zu einem Volumen von 8 µl mit H₂O bidest. auffüllen
- 2 µl Premix (BigDye[™], PE Applied Biosystems)

4. Methoden

Dieser Ansatz wurde gut vermischt und anschließend in einem Thermocycler bei folgendem Programm inkubiert:

initiale Denaturierung:	1 min, 96°C	
Denaturierung:	30 sek, 96°C	} 25 Zyklen
Primer-Annealing:	15 sek, Temperatur je nach Primer	
Elongation:	4 min, 60°C	
Kühlung:	4°C	

Die Annealing-Temperatur wurde je nach Primer gewählt.

Nach der Reaktion wurde der Ansatz mit Na-Acetat und Ethanol gefällt (vgl. 4.2.8), das Pellet 5-10 min luftgetrocknet und in 25 µl TSR (Template Supression Reagent, PE Applied Biosystems) aufgenommen. Nach einer Inkubation für 2 min bei 90°C wurde der Ansatz gemischt, dann kurz zentrifugiert und anschließend in ein Sequenzier-Reaktionsgefäß mit aufgesetztem Septum überführt.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe von Internet-Datenbanken analysiert.

4.2.10 Insertion von DNA-Fragmenten in bakterielle Vektoren

Zur Insertion von DNA-Fragmenten wurde in einen gewählten Vektor die „multiple cloning site“ (MCS) mit Restriktionsenzymen geöffnet und das gewünschte DNA-Fragment eingefügt. Das zu integrierende DNA-Fragment konnte über PCR (vgl. 4.2.3) gewonnen werden und dann entweder in den pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor (Invitrogen), oder direkt über „glatte“ Enden in einen linearisierten bakterielle Vektoren inseriert werden. Für die Klonierung in den pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor mussten dem PCR-Produkts ein Überhang an A-Nukleotiden, für die „blunt end“ Klonierung 5'-Phosphatreste angehängt werden. Lag das zu integrierende DNA-Fragment bereits in einem anderen Vektor vor, konnte das Insert über einen Restriktionsverdau aus diesem Vektor ausgeschnitten und in einen anderen linearisierten bakteriellen Vektor inseriert werden. Sowohl das erhaltene DNA-Fragment als auch der geöffnete Vektor wurde über Gelelektrophorese aufgetrennt, die spezifischen Banden aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt (vgl. 4.2.4).

Klonierung mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen)

Anfügen des Überhangs aus A-Nukleotiden am 3'-Ende des PCR-Produkts

DNA-Fragmente, die mit der Pfu-DNA-Polymerase oder mit der Phusion[™]-DNA-Polymerase amplifiziert wurden besaßen keinen Überhang aus A-Nukleotiden am 3'-Ende. Diese

überhängenden A-Nukleotiden wurden aber für die Klonierung mit dem *TOPO TA Cloning*[®] Kit (Invitrogen) benötigt. Die überhängenden A-Nukleotiden mussten also nachträglich angefügt werden. Hierzu verwendete man die Taq-DNA-Polymerase, welche die Eigenschaft hat, A-Nukleotiden am 3'-Ende des Produkts anzuhängen.

Pipettierschema für Taq-DNA-Polymerase (50 µl-PCR-Ansatz):

- 40 µl gelextrahiertes PCR-Produkt (vgl. 4.2.3 und 4.2.4)
- 3 µl MgSO₄ (25 mM)
- 5 µl Taq-DNA-Polymerase 10x Reaction Buffer
- 1 µl dNTPs (Mix, SL je Nukleotid 10 mM, MBI)
- 1 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl, Lehrstuhl Zoo I)
- auf 50 µl mit H₂O bidest. auffüllen

Durchführung:

Der Ansatz wurde in ein 0,5 ml-PCR-Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert, wobei die Polymerase zum Schluss zugegeben wurde. Das Ganze wurde gut vermischt und im Thermocycler 10 min bei 72°C inkubiert:

Topo TA Klonierung:

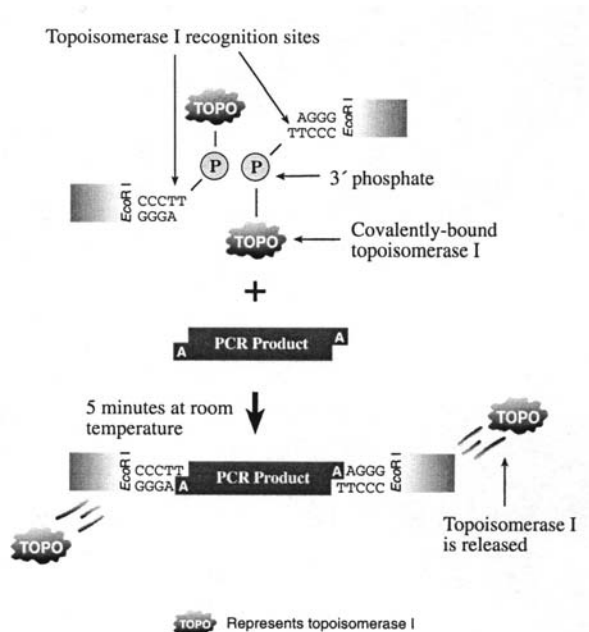


Abbildung. 4.2: Prinzip des TOPO TA Cloning[®] Kit der Firma Invitrogen.

Die Klonierungsmethode des *TOPO TA Cloning*[®] Kit (Invitrogen) macht sich die Tatsache zu Nutze, dass die Taq-DNA-Polymerase durch ihre terminale Transferase-Aktivität einen 3'-Überhang aus Desoxyadenosinen an das PCR-Produkt anfügt. Der Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] liegt in linearisiertem Zustand vor und besitzt einen 3'-Überhang aus Desoxythymidinen. Außerdem ist das Enzym Topoisomerase I kovalent an die offenen 3'-Enden des Vektors gebunden. Durch die Ligationsaktivität der Topoisomerase I wird ein PCR-Produkt mit 3'-(A)-Überhang schnell in den Vektor integriert, wobei das Enzym dissoziiert.

4. Methoden

Das Prinzip ist in Abbildung 4.2 verdeutlicht. Der Vektor enthält sowohl eine Ampizilin-, als auch eine Kanamycin-Resistenz zur Selektion transformierter und nicht transformierter Bakterien. Außerdem erlaubt diese Methode eine Vorauswahl möglicher positiver Klone über Blau/Weiß-Selektion, wobei die positiven Klone, also die Klone mit integriertem PCR-Produkt, weiß bleiben, während die Klone ohne Insert blau werden. Ohne Insert wird das *lacZ*-Gen exprimiert und X-Gal als Substrat der β -Galaktosidase gespalten, wobei ein blauer Farbstoff entsteht. Das PCR-Produkt inseriert zwischen Promotor und *lacZ*-Gen, so dass keine Expression dieses Gens mehr möglich ist. Nach der Ligation wurde der Ansatz in chemisch kompetente *E. coli TOP10* (Invitrogen) transformiert. Die Transformation wurde dann in zwei Verdünnungen auf LB_{Amp}-Platten (mit X-Gal für Blau/Weiß-Selektion) ausgestrichen.

Lösungen:

- SOC-Medium
- X-Gal (Applichem) Stammlösung: 40 mg/ml in DMF

Standardansatz für eine Topo TA Klonierung (6 μ l):

- 0,5-4 μ l PCR-Produkt
- 1 μ l Salt Solution (Invitrogen)
- 1 μ l pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor (Invitrogen)
- auf 6 μ l mit H₂O bidest. auffüllen

Standardprotokoll:

Es wurde ein halber Standardansatz eingesetzt, und 5 min bei RT inkubiert. Dann wurde der Ansatz zu einem Aliquot chemisch kompetenter *E. coli TOP10* geben und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 5-30 min auf Eis werden die Bakterien 30 sek lang einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und anschließend sofort wieder auf Eis gestellt. Zu dem Ansatz wurden 250 μ l SOC-Medium (Invitrogen) gegeben, welches Raumtemperatur haben sollte. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C geschüttelt und dann in zwei Konzentrationen (50 μ l; 250 μ l) auf vorgewärmten LB_{Amp}-Platten bzw. LB_{Kan}-Platten (vgl. 4.1) ausgestrichen. Für die Blau/Weiß-Selektion wurde 1 h vor gebrauch 40 μ l X-Gal ausplattiert. Die angeimpften Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Schnellprotokoll

Die Klonierungszeit des *TOPO TA Cloning[®] Kit* (Invitrogen) ließ sich von 1,5 h auf 10 min verkürzen. Durch diese Zeiteinsparung wurde zwar die Transformationsrate gesenkt, diese war aber immer noch ausreichend.

Es wurde ein halber Standardansatz eingesetzt, und 5 min bei RT inkubiert. Dann wurde der Ansatz zu einem Aliquot chemisch kompetenter *E. coli TOP10* oder geben und vorsichtig gemischt. Die Inkubationszeit auf Eis konnte auf 5 min reduziert werden. Die Bakterien wurden dann sofort auf vorgewärmten LB_{Amp}-Platten ausplattiert (vgl. 4.1). Auf LB_{Kan}-Platten lassen sich die Bakterien bei diesem Protokoll nicht kultivieren.

Die Blau/Weiß-Selektion wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die angeimpften Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau wurde verwendet, zum Ausschneiden von DNA-Fragmenten aus Vektoren, zur Linearisierung von Vektoren und zur Analyse von Klonen, um festzustellen, ob ein Insert in den Vektor ligiert hatte und um die Orientierung des Inserts im Vektor zu testen. Die in der Molekularbiologie verwendeten Restriktionsenzyme sind fast ausschließlich Endonukleasen, die jeweils eine spezifische Nukleotidsequenz erkennen und schneiden. Dabei können je nach verwendeter Restriktionsendonuklease „glatte“ oder „klebrige“ Enden entstehen. Schnittstellen mit überhängenden Enden können effizient mit komplementären Enden ligiert werden, die mit dem selben Enzym geschnitten wurden, was man sich auch bei der Umklonierung von DNA-Fragmenten zu Nutze machen kann.

Standardansatz für einen Restriktionsverdau (10 µl):

- 1 µg Plasmid-DNA
- 1 µl 10x Puffer (MBI, passend zum verwendeten Enzym)
- 1 µl Restriktionsenzym (MBI)
- auf 10 µl mit H₂O bidest. auffüllen

Der Ansatz wurde gemischt und 1-2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde $\frac{1}{10}$ Volumen 10x DNA-Probenpuffer zugegeben und der Verdau im 1%igen Agarosegel analysiert (vgl. 4.2.4).

Dephosphorylierung des Vektors

Bei der Insertion von DNA-Fragmenten in Vektoren kann zum einen das Insert in den linearisierten Vektor integriert werden, es kann aber auch zu einer Autoligation des Vektors kommen. Die Dephosphorylierung wurde durchgeführt, um die Autoligationsrate des Vektors zu vermindern, da die Ligase phosphorylierte 5'-Enden für eine Ligation benötigt.

4. Methoden

Pipettierschema eines Standardansatzes (5 µl):

- 100-150 ng linearisierter Vektor
- 0,5 µl 10x SAP-Puffer (Roche)
- 1 µl Shrimp alkalische Phosphatase (1 U/µl, Roche)
- auf 4 µl mit H₂O bidest. auffüllen

Der Ansatz wurde gemischt und 1-2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym 15 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Der Ansatz wurde bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt, dies war mehrere Wochen möglich.

„blunt end“ Ligation

DNA-Fragmente, die mittels Pfu-DNA-Polymerase hergestellt wurden, besaßen „glatte“ Enden und konnten nach Phosphorylierung der 5'-Enden in Vektoren mit „glaten“ Enden eingefügt werden. Es können aber auch durch die Pfu-DNA-Polymerase „klebrige“ Enden nach einem Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten zu „glaten“ Enden umgewandelt werden.

Phosphorylierung des DNA-Fragments

Die Phusion™-DNA-Polymerase und die Pfu-DNA-Polymerase, die für die Gewinnung von DNA-Fragmenten über PCR eingesetzt wurde, produzierten DNA-Produkte mit „glaten“ Enden ohne 5'-Phosphatgruppen. Daher war es nötig die 5'-Enden des PCR-Produkte zu phosphorylieren, um eine Ligation mit dem gewünschten Vektor möglich zu machen. Zunächst musste das PCR-Produkt über die Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel gereinigt werden (vgl. 4.2.4). Das Enzym T4-Polynukleotid-Kinase (vgl. 4.2.6) katalysiert in einer reversiblen Reaktion den Transfer von Phosphatresten vom ATP an die freien 5'-OH-Gruppen des gereinigten PCR-Fragments.

Pipettierschema eines Standardansatzes (15 µl):

- 11,5µl geextrahiertes PCR-Produkt (vgl. 4.2.3 und 4.2.4)
- 1 µl rATP (25 mM, Stratagene)
- 1,5 µl 10x Puffer (MBI, passend zur T4 Polynukleotid Kinase und zur Ligase)
- 1 µl T4 Polynukleotid Kinase (10 U/µl, MBI Fermentas)

4. Methoden

Durchführung:

Der Ansatz wurde gut vermischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Hitze-Inaktivierung der T4 Polynukleotid Kinase für 10-20 min bei 70°C. Der Ansatz konnte bei -20°C über Wochen gelagert oder direkt für die Ligation eingesetzt werden.

Herstellung „glatter“ Enden aus „kelberigen“ Enden:

Das Klenow-Fragment der Pfu-DNA-Polymerase ermöglicht durch seine 5`-3`-Polymerase-Aktivität den zum 5`-Überhang komplementären Strang aufzufüllen oder einen 3`-Überhang durch seine 3`-5`-Exonuklease-Aktivität zu entfernen wodurch „glatte“ Enden für eine „blunt end“ Ligation entstehen.

Pipettierschema eines Standardansatzes (14 µl):

- 11,6 µl geextrahiertes DNA-Fragment (vgl. 4.2.3 und 4.2.4)
- 0,5 µl dNTPs (Mix, SL je Nukleotid 10 mM, MBI)
- 1,4 µl 10x Puffer (MBI, passend zur Pfu-Polymerase und zur Ligase)
- 0,5 µl Pfu-Polymerase (5 U/µl, Lehrstuhl Zoo I)

Durchführung:

Der Ansatz wurde gut vermischt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz konnte bei -20°C über Wochen gelagert oder direkt für die Ligation eingesetzt werden.

„blunt end“ Ligation

Durch die Methode der Ligation konnten DNA-Fragmente mit „glatten“ Enden kovalent mit einem linearisierten Vektor mit „glatten“ Enden verbunden werden.

Pipettierschema für einen Standard-Ligationsansatz (20 µl):

- 100-150 ng dephosphorylierter Vektor mit „glatten“ Enden (siehe oben)
- 300 ng phosphoryliertes Insert mit „glatten“ Enden
- 1,5 µl 10x T4 DNA-Ligase-Puffer (MBI)
- 1 µl T4 DNA-Ligase (5 U/µl, MBI)
- auf 20 µl mit H₂O bidest. auffüllen

Einfügen eines doppelsträngigen Oligonukleotiden

Für die Insertion von Sequenzen, die für wenige Aminosäuren codieren, können zwei einzelsträngige komplementäre Oligonukleotide bestellt werden, die zuerst zu Doppelsträngen zusammengelagert werden. Dazu werden sie zu gleichen Teilen in 1x Pfu-Puffer gemischt, in einem Thermocycler auf 90°C erhitzt und dann schrittweise auf 50°C

gekühlt. Die doppelsträngigen Oligonukleotide können nun direkt in einen geöffneten Vektor mit „glatten“ Enden ligiert werden.

Ligation über Restriktionsschnittstellen

Durch die Methode der Ligation konnten DNA-Fragmente kovalent verbunden werden, wenn die Fragmente überlappende Enden mit jeweils komplementären Sequenzen, wie sie im Restriktionsverdau erzeugt wurden, besitzen. So ließ sich ein gewünschtes DNA-Fragment mit einem linearisierten Vektor verbinden, sofern beide mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten wurden.

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor sollte das Verhältnis zwischen der Zahl der eingesetzten Fragmentmoleküle und des linearisierten Vektors mindestens 3:1 betragen.

Pipettierschema für einen Standard-Ligationsansatz (20 µl):

- 100-150 ng dephosphorylierter Vektor (siehe oben)
- 300 ng Insert (ca. dreifache Menge im Vergleich zum Vektor)
- 1,5 µl 10x T4 DNA-Ligase-Puffer (MBI)
- 1 µl T4 DNA-Ligase (5 U/µl, MBI)
- auf 20 µl mit H₂O bidest. auffüllen

Der Ansatz wurde vermischt und 20-60 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz für eine Transformation in E. coli-Bakterien vom Stamm XL1-blue eingesetzt (vgl. 4.1).

Kurzprotokoll einer Transformation:

- Ligationsansatz mit einem Aliquot (100 µl) kompetenter Bakterien mischen
→ Inkubation auf Eis für 45-60 min.
- Hitzeschock für 30 sek bei 42°C, dann wieder auf Eis.
- Zugabe von 900 µl LB-Medium und 1 h Schütteln bei 37°C.
- Ausplattieren auf Selektionsplatten.

Test der erhaltenen Klone

Die Klone wurden auf eine erfolgreiche Ligation hin überprüft und getestet, in welcher Orientierung das inklonierte DNA-Fragment in den Vektor inseriert hatte. Dies konnte über GTE-Präparation der Plasmid-DNA (vgl. 4.2.5) mit anschließenden Restriktionsverdau (siehe oben), Kolonie-PCR (vgl. 4.2.3) oder über Sequenzierung (vgl. 4.2.9) erfolgen.

4.3 Expression von Proteinen in Bakterien und deren Reinigung

Um größere Mengen spezifisches Protein zu erhalten, konnte dieses in Bakterien exprimiert und anschliessend aus den lysierten Bakterien gereinigt werden. Die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen basierte auf die Fusion von Glutathion S-Transferase (GST) bzw. von sechs Histidin-Resten an das gewünschte Protein.

4.3.1 Expression von Proteinen in Bakterien

Lösungen:

- LB-Medium (vgl. 4.1)
- Ampicillin-Stammlösung (vgl. 4.1)
- IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactosid, Applichem; SL 1 M in H₂O)

Durchführung:

Zur Expression wurde die codierende Sequenz des gewünschten Polypeptids in einen Expressionsvektor der pGEX- oder pQE-Serie kloniert. Die Expression des Fusionsproteins fand in *E. coli XL 1-Blue* oder in *E. coli M15* statt.

Von den Bakterien wurde eine ÜNK hergestellt, mit der am folgenden Tag eine 200 ml Flüssigkultur angeimpft wurde (vgl. 4.1). Die Kultur wurde bei 37°C geschüttelt und nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4-0,9 (nach ca. 4 h) konnte die Expression des Proteins durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert werden. Nach weiterer 4stündiger Inkubation wurde die Kultur bei 3000 g für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet konnten gleich weiter verarbeitet oder bei -20°C gelagert werden.

4.3.2 GST-Reinigung

Um ein gewünschtes Protein als GST-Fusionsprotein exprimieren lassen zu können, musste zunächst die entsprechende DNA-Sequenz gewonnen und in die Multiple Cloning Site (MCS) des Expressionsvektors pGEX-5X (Amersham Pharmacia Biotech) inkloniert werden (vgl. 4.2.10), wobei darauf zu achten war, das Leseraster einzuhalten. Bei der Expression dieses Konstrukts in Bakterien erhielt man ein rekombinantes Protein, bestehend aus GST, einem Enzym, das ursprünglich aus *Schistosoma japonicum* stammt und eine molekulare Masse von ca. 26 kDa besitzt, und dem gewünschten Protein. Die Reinigung von GST Fusions-Proteinen wurde gemäß der Vorgaben von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) zu „*Bulk and RediPack GST Purification Modules*“ durchgeführt. Die Reinigung beruht darauf, dass der GST-Anteil an Glutathion bindet, das kovalent an Sepharose gebunden

4. Methoden

vorliegt. Nachdem andere Zellbestandteile gewaschen wurden, kann das Fusionsprotein durch einen Überschuss an freiem Glutathion eluiert werden.

Lösungen:

- Glutathion-Sepharose® 4B (Amersham, 75 %ige Suspension in 20 % Ethanol)
- PBS (pH 7,4):
 - 140 mM NaCl
 - 2,6 mM KCl
 - 6,4 mM Na₂HPO₄
 - 1,4 mM KH₂PO₄
- Aufschlusspuffer:
 - 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
 - 50 mM KCl
 - 1 mM PMSF(aus SL: 200 mM in Methanol; kurz vor Gebrauch zugeben)
 - 1 mM DTT (Roth)
 - 1 % (v/v) Triton™ X-100
- Harnstoffpuffer:
 - 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
 - 50 mM KCl
 - 1 mM PMSF(aus SL: 200 mM in Methanol; kurz vor Gebrauch zugeben)
 - 1 mM DTT (Roth)
 - 8 M Harnstoff
- Elutionspuffer (pH 8,0):
 - 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
 - + 10 mM reduziertes Glutathion (Amersham)

Durchführung:

Herstellung der Sepharose-Matrix:

Es wurde $\frac{1}{2000}$ Volumen Sepharose-Matrix, bezogen auf die Ausgangskultur, eingesetzt. Dazu wurde die 1,33fache Menge der 75 %igen Originalsuspension in ein 15 ml Greinerröhrchen pipettiert. Es wurde 5 min bei 500 g und 4°C zentrifugiert, der Ethanolüberstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Es folgten zwei Waschschrirte mit PBS, um restliches Ethanol zu entfernen. Dazu wurde mit dem jeweils 10fachen Säulenvolumen kaltem PBS gut resuspendiert und erneut 5 min bei 500 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde schließlich abgenommen und verworfen. Zum Schluss wurde 1 Säulenvolumen kaltes PBS zugegeben, was zu einer 50 %igen Sepharose-

4. Methoden

Suspension in PBS führte, die später direkt für die Reinigung eingesetzt wurde. In PBS kann die Sepharose bei 4°C etwa einen Monat gelagert werden.

Aufschluß der Bakterien:

Das Bakterienpellet (vgl. 4.3.1) wurde in $\frac{1}{20}$ Volumen Lysispuffer, bezogen auf die Ausgangskultur, resuspendiert und 30 min bei 4°C auf einem Drehtisch inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf Eis sonifiziert (Einstellung 7: Mikro/Mini-Tip; fünf mal kurz) und dann weitere 30 min bei 4°C inkubiert. Die Lösung wurde 20 min bei 10000 g (Sorvall Zentrifuge, HB-6 Rotor) und 4°C zentrifugiert. Enthielt der Überstand 1 das Fusionsprotein, was durch Western Blot (vgl. 4.7.4) nachgewiesen wurde, konnte er direkt für die Reinigung eingesetzt werden. Sollte es sich um ein schwerlösliches Fusionsproteinen handeln, was bei strukturellen Proteinen oft der Fall ist, wurde das Pellet in Harnstoff-Puffer aufgenommen, worin auch schwerlösliche Proteine in Lösung gehen. (Alternativ konnten die Bakterien direkt in Harnstoff-Puffer aufgenommen werden.) Die Lösung wurde 20 min bei 10000 g (Sorvall Zentrifuge, HB-6 Rotor) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand 2 musste gegen PBS dialysiert werden (vgl. 4.3.4) und konnte anschließend für die Reinigung eingesetzt werden.

Reinigung nach der „Batch“-Methode:

Der Überstand mit dem Fusionsprotein wurde auf die vorbereitete Glutathion-Sepharose gegeben und 30 min bei RT unter Rollen inkubiert. Anschließend wurde 5 min bei 500 g und 4°C zentrifugiert. Vom Überstand wurde eine Probe für die SDS-PAGE abgenommen, der Rest wurde verworfen. Es folgten 3 Waschschriffe mit jeweils dem 10fachen Säulenvolumen kaltem PBS. Nach jedem Waschschriff wurde 5 min bei 500 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das an die Sepharose-Matrix gebundene Fusionsprotein eluiert. Dazu wurde pro Elutionsschriff ein Säulenvolumen Elutionspuffer zugegeben und gemischt. Nach einer 10minütigen Inkubation bei RT wurde 5 min bei 500 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand, der das gereinigte Fusionsprotein enthielt, abgenommen. Es wurde 3-5 mal eluiert und die Elutionsfraktionen vereinigt. Zuvor wurden je 10 µl von E1-E5 für die Analyse in der SDS-PAGE (vgl. 4.7.2) abgenommen. Kurzfristig wurden die Proben bei 4°C, längerfristig bei -20°C gelagert.

4.3.3 His-Tag Reinigung

Um ein gewünschtes Protein als His-Fusionsprotein exprimieren lassen zu können, musste zunächst die entsprechende DNA-Sequenz gewonnen und in die Multiple Cloning Site (MCS) des Expressionsvektors pQE (Qiagen, Hilden) inkloniert werden (vgl. 4.2.10), wobei

4. Methoden

darauf zu achten war, das Leseraster einzuhalten. Bei der Expression dieses Konstrukts in Bakterien erhielt man ein rekombinantes Protein, bestehend aus den Aminosäuren R (Arginin), G (Glycin), S (Serin), sechs Histidin-Resten sowie dem gewünschten Protein. Als Protokoll für die His-Tag Reinigung wurde das *Ni-NTA Spin Handbook 02/2003* von Qiagen (Hilden) zugrunde gelegt. Die Reinigung beruht darauf, dass die positiven Ladungen von sechs aufeinanderfolgenden Histidinen bei pH 8.0 an Ni-NT Agarose (Qiagen) binden und bei einem pH von 5,9 bzw. 4,5 eluiert werden können, nachdem andere Zellbestandteile gewegewaschen wurden.

Lösungen:

- Ni-NTA-Agarose (Qiagen)
- Puffer A (Lysispuffer; pH 8,0):
8 M Harnstoff
100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris/HCl
- Puffer B (Waschpuffer; pH 6,3): wie Puffer A
- Puffer C (Waschpuffer; pH 5,9): wie Puffer A
- Puffer D (Elutionspuffer; pH 4,5): wie Puffer A
- Neutralisationspuffer (pH 9,5): 1 M Tris/HCl

Durchführung:

Vorbereitung der Säule:

Die Ni-NTA-Agarose (Qiagen) lag als 50 %ige Suspension in 30% Ethanol vor. Zur Aufreinigung von 200 ml Ausgangskultur wurden 2 ml der Ni-NTA-Agarose verwendet, was ein Säulenvolumen von 1 ml entsprach. Nach dem Waschen mit 20 ml Puffer A war die Säule äquilibriert und fertig zum Gebrauch. Es war darauf zu achten, dass die Säule nicht trocken lief.

Aufschluss der Bakterien:

Die Bakterien, die das Protein exprimiert haben (vgl. 4.3.1), wurden in 5 ml Puffer A pro Gramm Pellet resuspendiert und über Nacht bei 4°C unter Drehen inkubiert. Das Lysat wurde auf Eis sonifiziert (Einstellung 7: Mikro/Mini-Tip; fünf mal kurz) und dann bei 10000 g

4. Methoden

(Sorvall Zentrifuge, HB-6 Rotor) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die vorbereitete Säule gegeben.

Proteinreinigung:

Der Überstand mit dem Fusionsprotein wurde auf die vorbereitete Ni-NTA-Agarose-Säule gegeben. Der Durchlauf der Proteinlösung wurde aufgefangen. Das anschließende Waschen und die Elution des Fusionsproteins erfolgten über einen diskontinuierlichen pH-Gradienten. Die Säule wurde mit 5fachen Säulenvolumen Puffer A (pH 8,0), Puffer B (pH 6,3) und Puffer C (pH 5,9) gewaschen und anschließend mit 3fachen Säulenvolumen Puffer D (pH 4,5) eluiert. Den Fraktion, ab pH 6,3 wurde zusätzlich $\frac{1}{10}$ Volumen Neutralisierungspuffer (pH 9,5) zugesetzt, um eine mögliche saure Hydrolyse zu verhindern. Über SDS-PAGE (vgl. 4.7.2) wurde überprüft, in welchen Elutionsfraktionen sich das gewünschte Proteine befand. Die Aliquots der Elutionsfraktionen können im Harnstoffpuffer mittelfristig bei 4°C und längerfristig bei -20°C aufbewahrt werden. Zum weiteren Gebrauch konnten die Elutionsfraktionen direkt eingesetzt werden, oder sie wurden gegen einen entsprechenden Puffer dialysiert (vgl. 4.3.4).

Kurzprotokoll zur His-Tag-Reinigung über Ni-NTA-Agarose mit 1 ml Säulenvolumen:

5 ml	Probe	Durchlauf aufbewahren
5 ml	Puffer A, pH 8,0	Durchlauf aufbewahren
5 ml	Puffer B, pH 6,3	} Durchlauf in 1,5 mal Aliquats sammeln
5 ml	Puffer C, pH 5,9	
5 ml	Puffer D, pH 4,5	
3 ml	Puffer D, pH 4,5	

4.3.4 Dialyse des gereinigten Fusionsproteins

Lösungen:

- 2 mM EDTA

Durchführung:

Der Dialysierschlauch vom Typ 20/32 (VISKING) wurde 1 h in 2 mM EDTA gekocht. Daraufhin wurde ein Ende zugeknotet, die zu dialysierende Proteinlösung in den Schlauch pipettiert und dann das andere Ende zugeknotet. Diese Anordnung wurde über Nacht im Kühlraum bei 4°C in mehreren Litern des Puffers, gegen den der Elutionspuffer ausgetauscht werden sollte, bei leichtem Rühren inkubiert. Besser war es, öfter gegen kleinere Mengen des Puffers zu dialysieren (Nernst'sches Verteilungsgesetz).

4.4 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Ein Serum, das gegen ein bestimmtes Protein gerichtet ist, kann durch eine Affinitätsreinigung in Bezug auf die Spezifität der Bindung verbessert werden. Dies kann mithilfe einer CNBr-aktivierten Sepharose oder mit einer HiTrap NHS-activated HP auf Bindungsaffinität erreicht werden. An diese wird das Peptid kovalent gebunden, gegen das die Antikörper gerichtet sind, zum Beispiel ein aus Bakterien gereinigtes rekombinantes Protein (vgl. 4.3.2 und 4.3.3). Anschließend wird das Serum zugegeben, die Antikörper binden an die jeweiligen Epitope, andere Bestandteile werden gewaschen und die Antikörper schließlich eluiert.

4.4.1 Affinitätsreinigung eines Antiserums über CNBr-aktivierten Sepharose

Kovalente Bindung des Fusionsproteins an aktivierte CNBr-Sepharose:

Lösungen:

- PBS (vgl. 4.3.2)
- Bindungspuffer (pH 8,8):
500 mM NaCl
250 mM NaHCO₃
→mit Na₂CO₃ pH 8,8 einstellen
- Quellungspuffer: 1 mM HCl
- Absättigungspuffer: Bindungspuffer
+ 200 mM Glycin
- Waschpuffer 2: PBS
+ 0,5 % (v/v) Triton™ X-100
- Waschpuffer 3: PBS
+ 0,1 % (v/v) Triton™ X-100
- Waschpuffer 4: PBS
+ 500 mM NaCl
- Phosphatpuffer (pH 7,4): 10 mM Na₂HPO₄ mit 10 mM NaH₂PO₄ auffüllen, bis der pH-Wert erreicht wird

Durchführung:

Die Sepharose-Matrix mit gebundenem Fusionsprotein wurde mit 1 ml PBS pro 30 mg eingewogenem CNBr-Sepharose-Pulver gewaschen. Daraufhin wurden 100 µl Serum hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde 2 h auf einem Drehtisch bei RT inkubiert und anschließend abzentrifugiert. (Der Überstand wurde für eine Bindungskontrolle zum aufbewahrt.) Das Sepharosepellet wurde dreimal mit PBS gewaschen. Jetzt konnten die spezifisch an das GST-Fusionsprotein gebundenen Antikörper von der Matrix eluiert werden. Dazu wurde die Sepharose jeweils in einem Matrixvolumen Elutionspuffer (~ 75 µl pro 30 mg CNBr-Sepharose) resuspendiert, 5 min bei RT inkubiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit $\frac{1}{10}$ Volumen Neutralisationspuffer neutralisiert. Dies wurde bis zu sechsmal wiederholt.

Um die Antikörper haltbar zu machen, wurde den Elutionsfraktionen Natrium-Azid in einer Endkonzentration von 0,02 % zugefügt.

Die gereinigten Antikörper wurden durch Immunlokalisation an Gefrierschnitten von Rattenhoden getestet (vgl. 4.5.2).

4.4.2 Affinitätsreinigung eines Antiserums über „HiTrap NHS-activated HP“

Lösungen:

- PBS (vgl. 4.3.2)
- PBS: + 350 mM NaCl
- Bindungspuffer (pH 8,3): 0,2 M NaHCO₃
0,5 M NaCl
- Waschpuffer 1: 1mM HCl, (kalt)
- Puffer A (pH 8,3): 0,5 M Ethanolamin (C₂H₇NO)
0,5 M NaCl
- Puffer B (pH 4,0): 0,1 M Essigsäure
0,5 M NaCl
- Waschpuffer 2: 3,5 M MgCl₂
- Elutionspuffer (pH 2,5): 100mM Glycin

4. Methoden

- Neutralisierungspuffer (pH 9,5): 1M Tris/HCl
- Lagerungspuffer (pH 7,0): 0,05M Na₂HPO₄
0,1 % NaN₃

Vorbereitung des gereinigten Fusionsproteins:

Für die Bindung des Antigens musste das gewünschte Protein in Bindepuffer gelöst vorliegen. Dazu wurde das vorher über Ni-NTA-Agarose oder Glutathion-Sepharose gereinigte Protein mittels Methanol/Chloroform (vgl. 4.7.1) gefällt und anschließend in Bindepuffer aufgenommen. Dabei war darauf zu achten, dass das Gesamtvolumen von 1ml für die HiTrap-Säule nicht überschritten wurde. Traten Schwierigkeiten beim Lösen der Proteine auf, konnte SDS in einer Endkonzentration von 0,2 % zugegeben und die Probe auf 95°C erhitzt werden. Vor dem Auftragen auf die Säule wurde die Proteinlösung für 5 min. bei 3000 g zentrifugiert, um restliche ungelöste Partikel zu sedimentieren und ihren Eintrag in die Säule zu verhindern.

Vorbereitung der Apparatur:

Für die Beladung der Säule wurde eine Laborpumpe (Typ Varioperpex[®] II, LKB/Bromma) verwendet. Die Verlängerung und Adaption an verschiedene Schlauchdurchmesser erfolgte über Zusammenstecken der Schlauchenden und Abdichten dieser Verbindungsstellen mit Parafilm. Die Adapter zur Kopplung des Pumpenschlauchs an die Säule wurden am Schlauchende angebracht. Vor Benutzung der Apparatur wurde der Schlauch gründlich mit Ethanol und H₂O bidest. gespült sowie die Eichung auf die Fließgeschwindigkeiten (1 ml/min, 2 ml/min, 3 ml/min.) überprüft. Alle verwendeten Puffer wurden frisch angesetzt und vor Gebrauch sterilfiltriert (0,4 µm), was in erster Linie den Eintrag von Staub in die Säule verhindern sollte. Die Säule wurde in einer Laborklemme an einem Stativ befestigt, die obere Kappe entfernt und sofort, unter Vermeidung von Luftblasen, einige Tropfen kalter Waschpuffer 1 aufgetropft. Dann wurde der bereits mit Waschpuffer 1 gefüllte Pumpenschlauch angekoppelt und der untere Verschluss der Säule geöffnet. Die HiTrap-Säule war nun fertig zum Gebrauch.

Kopplung des gereinigten Fusionsproteins an die Säulenmatrix:

Im ersten Schritt wurde mit 6 ml Waschpuffer 1, bei einer Flussrate von $1 \text{ ml}/\text{min}$, das in der Säule enthaltene Isopropanol ausgewaschen. Im Anschluss wurde die Proteinlösung auf die Säule gegeben und bei verschlossener Säule 1 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Schlauch, der bereits mit Puffer A gefüllt wurde wie oben beschrieben angekoppelt und die Säule mit 6 ml Puffer A gewaschen. Der erste Milliliter, der die Säule verlässt wurde aufgefangen. So konnte mittels SDS-PAGE (vgl. 4.7.2) die Bindung des Proteins an die Säule überprüft werden. Der zweiten Waschschriffe erfolgte mit 6 ml Puffer B und im Anschluss ein dritter mit 6 ml Puffer A. Waren die 6 ml über die Säule gelaufen, wurde die Pumpe gestoppt, der Schlauch abgekoppelt und die Säule verschlossen. Es folgte eine Inkubation der Säule für 1 h bei RT. Dieser Schritt diente der Absättigung der Säulenmatrix um später eine unspezifische Interaktion von Antikörpern mit der Säulenmatrix zu verhindern. Im Anschluss wurde die Säule nochmals mit 6 ml Puffer B und weiteren 6 ml Puffer A und abschließend mit 6 ml Puffer B gewaschen. Die Säule war nun fertig zum Gebrauch oder konnte im Lagerungspuffer bei 4°C gelagert werden.

Affinitätsreinigung des Antiserums:

Vor der ersten Benutzung der Antigen-beladenen Säule wurde diese mit Waschpuffer 2 gewaschen, um noch anhaftende nicht spezifisch gebundene Bestandteile aus der Säule zu entfernen. Dann folgte ein Waschschriffe mit 30 ml PBS, an den sich die Beladung mit dem zu reinigenden Serum anschloss. Es wurden 3 ml Serum im Verhältnis 1:10 in PBS verdünnt und auf die Säule gegeben. Zuvor wurde die Serumprobe 10 min bei 3000 g zentrifugiert, um noch enthaltene Schwebstoffe zu sedimentieren und derer Eintrag in die Säule zu verhindern. Es wurden 30 ml Serum/PBS auf die Säule gegeben, wobei eine Flussrate von $1-2 \text{ ml}/\text{min}$ eingehalten wurde. Es folgten Waschschriffe mit 30 ml PBS, 30 ml PBS + 350 mM NaCl und weiteren 10 ml PBS, die ebenfalls mit einer Flussrate von $1-2 \text{ ml}/\text{min}$ durchgeführt wurden. Eluiert wurde indem 5 min bei $3 \text{ ml}/\text{min}$ der Elutionspuffer über die Säule lief. Das Eluat wurde in 1,5 ml-Fraktionen aufgefangen, wobei den Fraktion zusätzlich $1/10$ Volumen Neutralisierungspuffer (pH 9,5) zugesetzt wurde, um eine mögliche saure Hydrolyse zu verhindern.

Anschließend wurde die Säule mit 20 ml PBS gewaschen und war im Lagerungspuffer bei 4°C langfristig lagerbar.

Dialyse:

Direkt im Anschluss an die Affinitätsreinigung des Serums wurde das Eluat gegen PBS dialysiert. (vgl. 4.3.4), wobei mit einem Verlust von etwa 50 % der gereinigten Antikörper gerechnet werden muss. Dabei handelt es sich hauptsächlich um nicht intakte Moleküle, sie aufgrund ihrer geringeren Größe durch die Poren des Dialyseschlauchs hindurch treten können. Der Verlust dieser Antikörperbruchstücke erhöht somit die Qualität und Spezifität der gereinigten Antikörperlösung.

Aufkonzentrieren des Dialysats:

Das Aufkonzentrieren des Dialysats erfolgte mittels Zentrifugalfilteranlage Centriplus YM 50 (Millipore). Die Ultracel-YM-Membran besitzt eine Abscheidegrenze von 50 kDa, wodurch nur Moleküle, die kleiner als 50 kDa sind durch die Membran hindurch treten können. Intakte Antikörper können so aufkonzentriert, Bruchstücke aber aus der Lösung entfernt werden. Die invertierte Spin-Methode wurde entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt. Dazu wurde das Dialysat in das Sample-Reservoir (max.: 15 ml) gefüllt und die Probe bei 3000 g und 4°C zentrifugiert, bis ein Restvolumen von etwa 800 µl – 500 µl erreicht war. Im Anschluss wurde das Auffanggefäß mit enthaltenem Durchlauf entfernt und der Konzentrator umgedreht, das frische Auffanggefäß aufgesteckt und bei 2000 g und 4°C für 3-4 min zentrifugiert. Das Konzentrat wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Konzentration photometrisch bestimmt. Anschließend wurde das Konzentrat aliquotiert und bei -70°C gelagert.

Die Aliquots der gereinigten Antikörper wurden durch Immunlokalisation an Gefrierschnitten von Rattenhoden (vgl. 4.5.2) und im Western Blot (4.7.4) getestet und geeignete Verdünnungen empirisch ermittelt.

Photometrische Konzentrationsbestimmung:

Die Konzentration der Antikörperlösung kann über die Extinktion der Lösung bei 280 nm bestimmt werden. Es wurde ermittelt, dass eine Extinktion E_{280} von 1,48 einer Konzentration von annähernd 1,0 mg/ml entspricht. Die Ausbeute der Affinitätsreinigung wurde auf diese Weise bestimmt.

4.5 Zellkultur, Gewebe und Isolierung von Spermatozyten

4.5.1 Zellkultur

Eigenschaften von Proteinen können durch die ektopische Expression in Kulturzellen untersucht werden. Das Verhalten von Proteinen und Mutanten in Kulturzellen konnte durch Immunfluoreszenzmikroskopie, Elektronenmikroskopie und biochemische Methoden untersucht werden. Dazu wurden COS-7 Zellen gewählt, adhärenente Kulturzellen, die von „Afrikan Green Monkey“ Nierenzellen abstammen. Diese eignen sich besonders für Transfektionen mit Plasmid DNA.

Kultivierung von COS-7 Zellen

Lösungen:

- DMEM-Medium (Dulbeccos modified Eagle Medium)

Die COS-7 Zelllinie (ATTC CRL1651) entstammt aus Nierenzellen von *Cercopithecus aethiops* (afrikanischer Grünaffe). Die Zellen werden im DMEM Medium im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ Gehalt kultiviert. Aus einer ständig aufrechterhaltenen Kultur am Lehrstuhl wurden für Transfektion und Injektion jeweils Petrischälchen mit 35 mm Durchmesser (Sarstedt, Nürnbrecht) ausgesät, in denen Deckgläschen gelegt wurden. Die Zellen wuchsen auf der Oberseite der Deckgläschen an und konnten am nächsten Tag für Transfektionen verwendet werden.

Transfektion der Kulturzellen

Als Transfektion wird die Einführung von DNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Es gibt dafür mehrere technische Möglichkeiten. Hier wurde für die Transfektion der adhärenenten Kulturzellen COS-7 das System „*Lipofectamin 2000*“ von der Firma Invitrogen, Karlsruhe nach dem Herstellerprotokollen eingesetzt. Die transfizierten Zellen wurden für 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und dann für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie, die Elektronenmikroskopie oder für biochemische Methoden weiterverarbeitet

Mikroinjektion von Kulturzellen

Die Mikroinjektion von adhärenenten Kulturzellen bietet die Möglichkeit DNA in die Zellen einzubringen. Dazu wurden COS-7 Zellen auf Deckgläschen kultiviert, auf denen mit einem Glasschneider eine Markierung geritzt war. Zur Injektion von Plasmid DNA wurden sterile Femtotips (Eppendorf) mit etwa 1,5 µl DNA-Lösung der Konzentration 25 ng/µl bis 200 ng/µl in 1x PBS (vgl. 4.3.2) beladen und in den Microinjector5242 (Eppendorf, Hamburg)

eingespannt. Mit diesem war über einem Auflichtmikroskop die Mikromanipulation möglich, die es erlaubte einzelne Zellen (innerhalb der Markierung) gezielt ins Cytoplasma zu stechen; zusätzlich wurde durch Stickstoff ein leichter Druck aufgebaut, der einen ständigen Flüssigkeitsstrom erzeugte, so dass die Lösung in die angestochenen Zellen floß. Die Zellen wurden anschließend 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und dann für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie oder die Elektronenmikroskopie weiterverarbeitet.

4.5.2 Gewebspräparationen

Schockgefrieren von Gewebe

Um die Verteilung von Proteinen im Gewebe zu untersuchen konnte Tieren verschiedene Gewebstypen entnommen und schockgefroren werden. Für die Analyse von meiosespezifischen Proteinen wurde Hodengewebe aus Ratte und der Fischeart Medaka verwendet.

Lösungen:

- flüssiger Stickstoff
- Methylbutan (Isopentan)

Durchführung:

Ratten wurden mit CO₂ eingeschläfert, Medaka wurde auf Eis betäubt und getötet. Die Hoden wurden entnommen und in Methylbutan, das zuvor mit flüssigem Stickstoff auf -140°C gekühlt worden war, überführt. Diese schockgefrorenen Gewebestücke wurden dann bei -70°C gelagert.

Herstellung von Gefrierschnitten

Gefrierschnitte wurden mit dem 2800 FRIGOCUT E von Reichert-Jung (Heidelberg) hergestellt. Das Gefriermikrotom wurde vorgekühlt bevor das Gewebe in der Apparatur befestigt wurde. Zuerst wurde ein Tropfen Einbettmedium auf den Objektträger gegeben, worauf das Gewebestück gelegt wurde. Das Gewebe wurde nun angeschnitten, bis eine geeignet große Schnittfläche entstand. Nun konnten 5 µm dünne Schnitte durch langsames Schneiden angefertigt werden, die auf einen Objektträger überführt wurden und auf deren Qualität im Mikroskop bei Phasenkontrast kontrolliert wurden. Alternativ dazu wurden Einzelzellen dieses Gewebes auf einen Objektträger übertragen (Abklatsch). Hierzu nahm man den Objektträger mit dem darauf fixierten und angeschnittenen Hodengewebe aus dem Gefriermikrotom. Das Gewebe musste leicht antauen, dann konnte durch leichtes andrücken

des Objektträgers auf das Gewebe eine Schicht von Einzelzellen übertragen werden. Anschließend wurden die Präparate luftgetrocknet und konnten für die Immunfluoreszenzmikroskopie (vgl. 4.6.1) eingesetzt werden.

Spreitungen von Hodensuspensionszellen

Lösungen:

- PBS (vgl. 4.3.2)
- 1 % (v/v) Triton™ X-100 in H₂O bidest.
- Fixierlösung (pH 7,4): PBS
 + 2 % Formaldehyd
- Absättigungslösung (pH 7,4): PBS
 + 100 mM Glycin

Durchführung:

Eine Zellsuspension aus Hodengewebe in PBS wurde auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgetropft. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten wurde das PBS mit einer Wasserstrahlpumpe entfernt und die Zellen wurden für 10 min mit 1 % (v/v) Triton™ X-100 in H₂O überschichtet. Anschließend wurden die Zellen 3 min in der Fixierlösung fixiert, 10 min in PBS gewaschen und restliches Formaldehyd durch eine 10minütige Inkubation in der Absättigungslösung neutralisiert. Nun konnte die Antikörperinkubation wie unter 4.6.1 beschrieben durchgeführt werden.

4.5.3 Gewinnung angereicherter Zellfraktionen mit verschiedenen Spermato-genestadien aus den Hoden von Ratten durch zentrifugale Elutriation

Viele Gewebe, wie auch das Hodengewebe, stellen ein heterogenes Gemisch aus verschiedenen Zelltypen dar. Da aber oftmals nur ein bestimmter Zelltyp aus einem Gewebe benötigt wird, müssen diese Zellen isoliert werden. Dies geschieht durch die zentrifugale Elutriation nach Meistrich (1977). Hier wird eine Suspension aus verschiedenen Zellen in einzelne Zelltypen fraktioniert. Die Trennung beruht dabei auf einem Gleichgewicht zwischen Zentrifugalkraft und der Kraft, mit der ein entgegengesetzter Pufferstrom auf ein Partikel wirkt. Dieses Gleichgewicht ist für jedes Partikel, abhängig von dessen Form, Größe und Dichte, verschieden. Durch die Zentrifugalkraft sedimentiert ein Partikel, wenn dessen Dichte größer ist als die des Puffers. Die Sedimentation des Partikels wird in der Elutriationskammer

4. Methoden

durch einen entgegengesetzten Pufferstrom verhindert. In dieser Kammer wirken also zwei Kräfte: Die Zentrifugalkraft wirkt, in Abhängigkeit von der Zentrifugationsgeschwindigkeit, von der Rotorachse weg; der Druck des Pufferstroms wirkt der Zentrifugalkraft, in Abhängigkeit der Durchflussgeschwindigkeit und der Dichte, entgegen.

Wie Abbildung 4.3 zeigt, hat auch die Form der Elutriationskammer einen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Flüssigkeitsstroms, da sich die Geschwindigkeit mit der Querschnittsfläche ändert. So entsteht in der Kammer ein Geschwindigkeitsgradient durch den sich die Zellen bei geeigneten Kräfteverhältnissen nach Größe, Form und

Dichte trennen. In der Elutriationskammer kommen also die kleineren Zellen nahe der Rotorachse zu liegen, die größeren Zellen sammeln sich weiter von der Rotorachse entfernt. Durch Veränderung der Kräfteverhältnisse im System, wie Verminderung der Zentrifugalkraft oder Erhöhung des Pufferstroms, können nun zunächst die kleineren Zellen, und dann nach und nach größere Zellen, aus der Kammer gedrückt werden. Die Zellen verlassen mit dem Pufferstrom die Kammer und können gesammelt werden. Werden die Parameter in geeigneter Weise verändert, dann entweichen nur Zellen eines Typs.

Durchgeführt wurde die Gewinnung von Zellen der unterschiedlichen Spermatogenesestadien in einer Beckman J2-21M/E Zentrifuge mit dem JE-6B Elutriations-

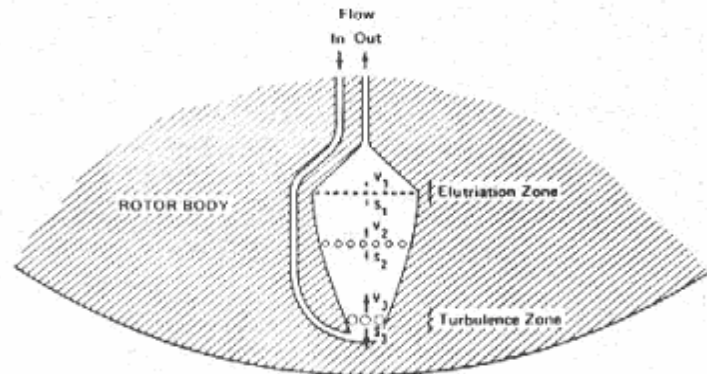


Abbildung. 4.3: Schematischer Aufbau der Elutriationskammer V_1 , V_2 , V_3 geben die Kraft des Pufferstromes in unterschiedlichen Bereichen der Kammer an; S_1 , S_2 , S_3 geben die Sedimentationsraten kleiner, mittlerer und großer Partikel

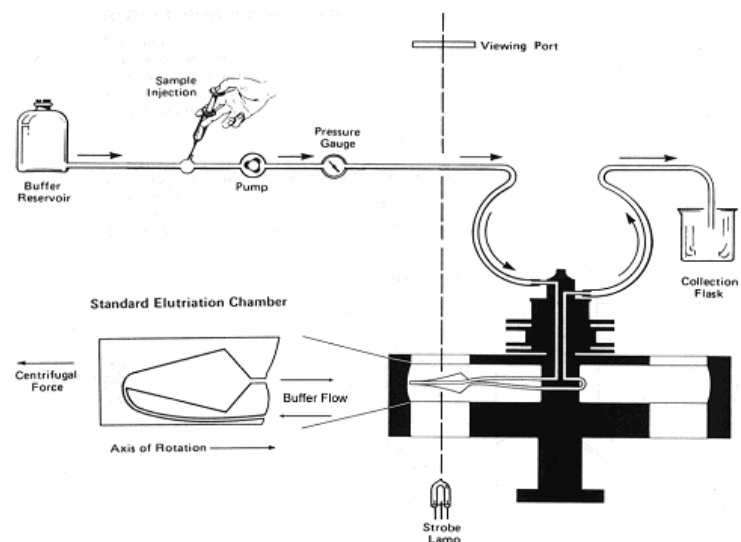


Abbildung. 4.4: Übersicht über den Aufbau des Elutriationssystems JE-6B.

4. Methoden

rotor. Einen schematischen Überblick über den Aufbau des Systems liefert Abbildung 4.4, die außerdem den Weg des Puffers und der Zellen verdeutlicht.

Lösungen:

Alle Lösungen wurden am Tag vor der Elutriation angesetzt und bei 4°C gelagert (außer FCS, Ethanol- und Seifenlösung), so dass sie kühlen und entgasen konnten. Vor allem beim Elutriationspuffer musste die Temperatur konstant auf 4°C gehalten werden, da die Dichte enorm wichtig für die Elutriation ist, wobei die Dichte temperaturabhängig ist. Enzymatische Zusätze der Puffer (Trypsin, Collagenase und DNase I) wurden erst am Tag des Gebrauchs zugegeben.

- PBS (vgl. 4.3.2):
- DPBS (pH 7,2-7,4):
 - PBS
 - + 0,01 % MgCl₂
 - + 0,01 % CaCl₂
 - CaCl₂ in H₂O bidest. vorlösen und dann unter Rühren zugeben, um ein Ausfallen des Calciums als Hydroxid zu verhindern.
- Elutriationspuffer:
 - DPBS
 - + 0,5 % BSA (Sigma)
- Verdaulösung:
 - DPBS
 - + 0,1 % Glucose
 - + 0,1 % Trypsin (Serva, 4 ml 2,5 %ige Lösung pro 100 ml Verdaulösung; am Tag des Gebrauchs)
 - + 2 µg/ml DNase I (Roche, 1 Spatelspitze pro 100 ml; am Tag des Gebrauchs)
 - + Collagenase (Roche, 1 kleiner Löffel pro 100 ml; am Tag des Gebrauchs)
- NDA-Puffer:
 - DPBS
 - + 0,2 % (w/v) NDA (2-Naphtol-6,8-Disulfonsäure als Kaliumsalz, Kodak)
 - + DNase I (Roche, 1 Spatelspitze pro 100 ml)

4. Methoden

- FCS (fötale Kälberserum): 10 ml pro 100 ml Verdaulösung
- H₂O bidest.: 2-3 l;
→ gekühlt und entgast
- 70 % Ethanol: 200-500 ml
- Seifenlösung: 500-1000 ml
→ Handelsübliche Seifenlösung in H₂O bidest.

Die jeweils benötigte Puffermenge richtet sich nach der Anzahl der präparierten Hoden und der Anzahl der Läufe, die durchgeführt werden sollen. Für 2 Ratten benötigt man:

- PBS: 5 l
- DPBS: 3 l
- Elutriationspuffer: 2 l
- Verdaulösung: 100 ml
- NAD-Puffer: 100 ml

Präparation der Hoden und Herstellung der Zellsuspension:

Vor Beginn der Präparation mussten die später benötigten Zentrifugen (Heraeus, Sorvall mit GSA-Rotor und Elutriator) auf 4°C vorgekühlt und ein Wasserbad auf 31°C vorgeheizt werden. Ein Becherglas mit kaltem DPBS wurde für die Aufnahme der entnommenen Hoden auf Eis bereitgestellt. Außerdem wurden noch eine Glas-Petrischale, Rasierklingen und eine Spritze mit Kanüle ($\varnothing_1 = 0,9$ mm) bereitgestellt. Die Puffer mussten mit Collagenase, DNase I und Trypsin vervollständigt werden.

Zur Präparation der Hoden wurden 39-42 Tage alte Ratten („Wistar“, Harlan Winkelmann GmbH) zunächst mit CO₂ eingeschläfert. Anschließend wurde ihnen vor der Präparation noch das Genick gebrochen. Zunächst wurde den toten Ratten die Bauchdecke geöffnet und die Hoden entnommen. Die Hoden sollten möglichst von allen anhaftenden Geweben und Gewebeteilen befreit und dann sofort in das eisgekühlte DPBS überführt werden. Weiterverarbeitet wurden die Hoden in einer Glas-Petrischale mit etwas eiskaltem DPBS. Zunächst wurde die Tunica albuginea, ein den Hoden umschließendes Häutchen, mit zwei Uhrmacherpinzetten aufgerissen und mitsamt dem Rete testis von den Tubuli contorti abgestreift. Dabei war darauf zu achten, dass möglichst viele der anhaftenden Blutgefäße mit entfernt wurden, aber das lockere Hodengewebe in der Struktur erhalten blieb. Nun wurde in der Glas-Petrischale mit wenig eiskaltem DPBS die Tubuli mit Hilfe zweier Rasierklingen zerkleinert und mit einer Spritze ohne Kanüle durch wiederholtes Aufziehen und Ausdrücken feiner in seine Bestandteile zerlegt. Danach wurde die Suspension in die

4. Methoden

Spritze ohne Kanüle aufgezogen und anschließend mit aufgesetzter Kanüle ($\varnothing_i = 0,9 \text{ mm}$) in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen gedrückt. Beim Ausdrücken der Spritze war darauf zu achten, dass nicht zu viel Kraft aufgewandt wurde, um die Zellen nicht zu schädigen. Die Suspension aus Zellen bzw. Gewebsbestandteilen wurde anschließend 10 min bei 450 g und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 ml Verdaulösung pro 10 Hoden resuspendiert. Zum Resuspendieren wurde zunächst eine kleine Menge Medium auf das Zellpellet gegeben und die Zellen durch auf- und abpipettieren mit einer abgeschnittenen blauen Spitze vom Gefäßboden gelöst. Fester anhaftende Zellen wurden nicht mit der Spitze abgeschabt, sondern von der Gefäßwand gelöst, indem die Pipettenspitze knapp über den Zellen gehalten und dann schnell abpipettiert wurde. Die Zellen lösten sich dann durch den Flüssigkeitsstrom ab. Die Suspension wurde mit Verdaulösung aufgefüllt, und die gelösten Zellen wurden in eine verschließbare Kunststoffflasche überführt. Noch vorhandene Gewebsklumpen wurden im 50 ml-Zentrifugenröhrchen zurückgehalten, nochmals resuspendiert und in die Kunststoffflasche überführt. In die Flasche wurde ein Rührfisch gegeben und die Suspension konnte nun 30-40 min bei 31°C im Wasserbad unter sanftem Rühren inkubieren. Durch das Trypsin in der Verdaulösung wurde die extrazelluläre Matrix der Zellen verdaut, und die Zellen somit vereinzelt. Die Verwendung von Kunststoff war ab diesem Schritt wichtig, da Zellen an Glas kleben bleiben und so die Ausbeute an Zellen stark vermindert würde.

Der Verdau wurde durch Zugabe von 10 ml FCS pro 100 ml Verdaulösung gestoppt und die Suspension durch ein Drahtnetz mit 300 μm Maschenweite filtriert. Das Filtrat wurde auf 50 ml-Zentrifugenröhrchen verteilt und 10 min bei 450 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 ml NDA-Puffer pro 10 Hoden aufgenommen. Die Suspension wurde dann durch ein in DPBS eingeweichtes Nylonnetz mit 25-30 μm Maschengröße filtriert und auf 50 ml-Zentrifugenröhrchen verteilt. In den Zentrifugenröhrchen wurde die Suspension bis zur Verwendung bei 4°C auf einem Rollinkubator gelagert.

Vorbereitung des Elutriators:

Zusammenbau und Anschließen des Rotors

Der Rotor wurde zusammgebaut und in die Zentrifuge (J2-21M/E, Beckman) eingesetzt. Das Schlauchsystem wurde angeschlossen, wobei der Einlassschlauch an den oberen, der Auslassschlauch an den unteren Anschluss des Aufsatzes befestigt wurde. Nachdem zusätzlich der Überdruckschlauch an dem Überdruckventil angebracht worden war, wurde der Elutriator auf 4°C vorgekühlt.

4. Methoden

Befüllen des Rotors

Zunächst wurde die Blasenfalle so an die Pumpe angeschlossen, dass die lange Nadel als Auslass und die kurze Nadel als Einlass diente. Das Schlauchsystem wurde nun mit eiskaltem H₂O bidest. luftblasenfrei befüllt. Hierzu wurde zunächst bei einer Pumpeinstellung von 3-4 die Blasenfalle auf den Kopf gedreht und bis ca. $\frac{2}{3}$ mit Wasser gefüllt bevor sie wieder umgedreht und befestigt wurde. Die Blasenfalle verhindert, dass bei späteren Lösungswechsel Luftblasen ins System gelangen. Nachdem das Schlauchsystem und die Elutriationskammer mit Wasser gefüllt waren wurde durch das Abklopfen der Schläuche und das Andrehen des Rotors mit der Hand die meisten Luftblasen entfernt. Weitere Luftblasen wurden durch das Abdrücken des Abflussschlauchs entfernt, wobei der Druck im System 10 bar auf keinen Fall überschreiten durfte. Hierzu wurde die Zentrifuge programmiert (Rotor = 6, Speed = 3000 rpm, Time = 4 h, Temperature = 4°C) und dann gestartet. Beim Abbremsen der Zentrifuge bei einer Umdrehungszahl bei ca. 1200 rpm wurde der Schlauch abgedrückt und bei ca. 750 rpm wieder losgelassen, und umgekehrt. Diese Prozedur wurde so lange wiederholt, bis keine Luftblase mehr aus dem System kam. Nun wurde die Pumpe auf Stufe 0,8 zurückgestellt, der Elutriator geschlossen und das H₂O bidest. durch den eiskalten Elutriationspuffer ersetzt.

Sollte später während eines Laufes eine Luftblase im System auftauchen, müsste der Versuch abgebrochen werden.

Eichen der Pumpe:

Nach 10-15 min war das Wasser im System vollständig durch Elutriationspuffer ausgetauscht, und die Pumpe konnte geeicht werden. Hierzu wurde die Pumpe exakt auf 1,00 eingestellt. Der Abflussschlauch wurde in einem mit Wasser ausgespülten 50 ml-Messzylinder überführt und es wurde gewartet, bis der Flüssigkeitsstand die 10 ml Marke erreicht hatte. Dann wurden genau 2 min abgestoppt und die Flüssigkeitsmenge gemessen. Davon wurden die „vorgelegten“ 10 ml abgezogen, das Ergebnis dann protokolliert (ml_I). Dann wurde die Pumpe auf exakt 2,00 gestellt und die Flüssigkeitsmenge nach genau 1 min, wie oben beschrieben, gemessen und protokolliert (ml_{II}). Aus diesen Werten konnte dann mit der unten angegebenen Gleichung ermittelt werden, welcher Pumpleistung in $\frac{\text{ml}}{\text{min}}$ eine Einheit auf der Pumpenskala entsprochen hat.

$$\left(\frac{\text{ml}_I}{2} + \frac{\text{ml}_{II}}{2} \right) \div 2 = \frac{\text{ml}}{\text{min} \cdot \text{Skaleneinheit}}$$

4. Methoden

Mit diesem Wert konnten jetzt die jeweiligen Pumpeneinstellungen für den Lauf berechnet werden, indem einfach die geforderte Pumpleistung durch diesen ermittelten Wert geteilt wurde.

Durchführung eines Laufes:

Pro Lauf konnten die Zellen aus maximal 10 Hoden getrennt werden, weil sonst die Kammer überladen gewesen wäre. Wurden mehr Ratten präpariert, mussten mehrere Läufe durchgeführt werden. In diesem Fall wurde vor jedem weiteren Lauf die Pumpe neu geeicht. Zuerst wurden GSA-Rotorbecher als Auffangbehälter für die einzelnen Fraktionen auf Eis, und ein großer Erlenmeyer-Kolben für den Abfall bereitgestellt.

Die Zellsuspension wurde vom Rollinkubator aus dem Kühlraum geholt und der Rotor damit beladen. Dazu wurde die Pumpe so eingestellt, dass sie eine Pumpleistung von 31,5 ml/min hatte (vgl. Tabelle 4.3). Die Zentrifuge lief bei 3000 rpm. Der Lauf wurde dann mit den Einstellungen aus Tabelle 4.3 durchgeführt, wobei für die Gewinnung von Fraktion 3 und Fraktion 4+5 bei der errechneten Pumpeinstellung 0,1 abgezogen werden sollte. Dadurch verminderte sich erfahrungsgemäß die Verunreinigung der Fraktionen durch andere Zelltypen.

Fraktion	rpm	ml/min	Zeit
1+2	3000	31,5	bis Blasenfalle klar
3	3000	41,5	4 min
4+5	2000	28,5	5 min
6	2000	40,0	4 min

Tabelle 4.3: Einstellungen für Standardlauf

Fraktion 1+2 wurde nicht gesammelt, sondern gleich ins Abfallgefäß geleitet. Beim Wechsel zwischen den Fraktionen war zu beachten, dass wenn die Pumpleistung erhöht wurde, zuerst der Auslassschlauch in das neue Auffanggefäß überführt wurde, bevor die Pumpe verstellt worden ist. Genauso verfahren wurde bei Verminderung der Rotorumdrehungszahl. Beim Übergang zwischen Fraktion 3 und Fraktion 4+5 wurde zuerst die Pumpe verstellt, dann der Schlauch überführt und erst zum Schluss die Umdrehungszahl der Zentrifuge geändert.

Bei der Gewinnung der verschiedenen Zelltypen durch zentrifugale Elutriation bekommt man keine absolut reinen Zellfraktionen, sondern lediglich Fraktionen, die vorwiegend einen Zelltyp enthalten. Tabelle 4.4 gibt einen Überblick über die einzelnen Fraktionen mit ihren Bestandteilen.

4. Methoden

1	Spermatiden 1-8
2	Spermatiden 1-8 (59 %) und 9-13 (25 %)
3	Spermatiden 1-8 (81 %)
4	Spermatiden 1-8 (47 %)
5	Spermatiden 1-8 (52 %) Pachytän-Spermatocyten (19 %)
6	Pachytän-Spermatocyten (86 %) Spermatogonien (wenige %)

Tabelle 4.4: Bestandteile der einzelnen Fraktionen

Reinigung des Rotors:

Zunächst wurde das Zellpellet, das sich während des Versuches am Kammerboden des Elutriators gebildet hatte, herausgespült. Dazu wurde die Zentrifuge gestoppt, bei ca. 1200 rpm der Abflussschlauch abgedrückt und bei ca. 750 rpm wieder losgelassen. Durch diese Prozedur wurde das Pellet herausgeschwemmt. Die Zentrifuge konnte abgeschaltet werden. Das System wurde mit 0,5-1 l Seifenlösung und anschließend mit etwa 1 l destilliertem Wasser gespült. Zum Schluss wurde noch mit 200-500 ml 70 %igem Ethanol nachgespült.

Nun wurden die Schläuche gelöst, der Rotor entnommen und wieder auseinandergebaut, damit er gut austrocknen konnte. Die Zentrifuge wurde über Nacht zum Austrocknen offen gelassen, ebenso wurden Rotor und Rotorteile erst am nächsten Tag wieder verpackt.

Weiterverarbeitung der Zellen:

Die gewonnenen Fraktionen wurden bei 450 g und 4°C 10 min abzentrifugiert (Sorvall mit GSA-Rotor bei ca. 1600 rpm). Der Überstand wurde dekandiert, das Pellet in insgesamt 10 ml kaltem PBS resuspendiert und die Suspension dann in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen noch zweimal mit je 10 ml kaltem PBS gewaschen. Vor der abschließenden Zentrifugation wurden noch die Zellzahlen der einzelnen Fraktionen bestimmt. Anschließend wurde eine Salzextraktion an Pachytän-Spermatocyten durchgeführt (vgl. 4.7.5).

Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer:

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde aus jeder Fraktion eine Probe entnommen und 1:5 in PBS verdünnt. Die Auszählung erfolgte dann mikroskopisch mit einer Neubauer-Zählkammer. Im Mittelsteg dieser Kammer sind Zählnetze eingraviert. Diese bestehen aus vier Großquadraten, die jeweils in 16 Kleinquadrate unterteilt sind. Der Abstand zwischen dem gravierten Glassteg und dem aufgelegten eingeschliffenen Deckglas beträgt 0,1 mm. Die Fläche eines Großquadrates beträgt 1 mm², somit ist das Volumen eines Großquadrates 0,1 µl. Es wurden stets vier Großquadrate ausgezählt, wobei darauf zu achten war, dass Zellen, die auf den Begrenzungslinien zwischen den Quadraten lagen, nicht doppelt gezählt

wurden. Aus der Anzahl der gezählten Zellen konnte die Zellzahl im Gesamtvolumen mit folgender Gleichung ermittelt werden.

$$16 \cdot \frac{\varnothing \text{ Zellzahl}}{\text{Kleinquadrat}} \cdot 10^4 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Ausgangsvolumen} = \text{Gesamtzellzahl}$$

4.6 Mikroskopie

4.6.1 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Verteilung eines Proteins in Zellen kann mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Meist wird das Verfahren der *indirekten Immunfluoreszenz* angewandt, bei dem der spezifische, gegen das gesuchte Protein gerichtete Antikörper, durch einen sekundären Antikörper visualisiert wird, der eine Markierung trägt, (z. B. einen Fluoreszenzfarbstoff). Dieser Farbstoff erzeugt dann bei Anregung durch ein Licht bestimmter Wellenlänge eine spezifische Fluoreszenz. Das Fluoreszenzmuster unter dem Mikroskop entspricht dann dem Verteilungsmuster des untersuchten Proteins in den Zellen oder Geweben.

Lösungen:

- PBS (vgl. 4.3.2):
- Fixierlösung (pH 7,4):
PBS
+ 1 % Formaldehyd
- Permeabilitätslösung (pH 7,4):
PBS
+ 0,1 % (v/v) Triton™ X-100
- Absättigungslösung (pH 7,4):
PBS
+ 100 mM Glycin
- Antikörperlösung (pH 7,4):
1- 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS
- Hoechst 33258:
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS
- Mowiol:
10 g Mowiol (Hoechst) in 40 ml KH_2PO_4 -freiem PBS (pH 8,0) 16 h rühren; 20 ml Glycerin zugeben und nochmals 16 h rühren; ungelöste Partikel abzentrifugieren und Überstand aliquotiert bei -20°C lagern.

Durchführung:

Kulturzellen auf Deckgläschen oder Gefrierschnitte (vgl. 4.5.1 und 4.5.2) wurden 3 min in der Fixierlösung fixiert und anschließend für 10 min in der Permeabilisierungslösung inkubiert, um sie für die Antikörper zugänglich zu machen. Eine 10minütige Inkubation in der Absättigungslösung sollte restliches Formaldehyd neutralisieren, um eine spätere Fixierung von Antikörpern zu vermeiden. Dann wurde der primäre Antikörper aufgetragen. Die Endkonzentration betrug je nach Güte des Antikörpers etwa 1 bis 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, wobei die tatsächlich eingesetzte Konzentration empirisch ermittelt wurde. Die Inkubationszeit dauerte 20 min. Daraufhin wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch 15 min Waschen in PBS entfernt. Ohne die Zellen bzw. Schnitte austrocknen zu lassen wurde ein zweiter Antikörper, an den die Fluoreszenzfarbstoffe Texas Red, DTAF oder Cy2 gebunden waren, aufgetragen. Dieser war gegen die konstante Region der ersten Antikörper gerichtet, die spezifisch für die Tierart war, aus der der primäre Antikörper gewonnen wurde. Die Inkubationszeit betrug 20 min. Zusätzlich wurde der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 nach 10 min zugegeben (Inkubationszeit 10 min), der spezifisch an DNA bindet. Die Antikörperinkubation fand in einer feuchten Kammer statt, um eine Austrocknung der Zellen zu verhindern. Nach einem erneuten 15minütigen Waschschrift in PBS wurden die Zellen bzw. Schnitte luftblasenfrei in Moviol eingebettet.

Das Moviol bettete die Präparate dauerhaft ein; es eignet sich für die Immunfluoreszenzmikroskopie, da es UV-gängig ist.

Die Auswertung erfolgt am Fluoreszenzmikroskop (Axiophot stereo; Zeiss) und die Ergebnisse konnten direkt über eine auf das Mikroskop aufgebrachte CCD-Kamera (PixelFly; PCO) dokumentiert werden. Die Aufnahmen wurden mit dem Programm Adobe Photoshop nachbearbeitet.

Fluoreszenzmikroskop

Eine sehr effektive Methode der Lichtmikroskopie zur Lokalisierung von Proteinen in einer Zelle ist die Fluoreszenzfärbung von Zellen und deren Beobachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Eigenschaft der Fluoreszenzfarbstoffe ist es, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und es bei einer anderen längeren Wellenlänge zu emittieren. Das Objekt wird nur mit dem zu absorbierenden Licht beleuchtet; alles andere Licht wird herausgefiltert. Das von der Probe emittierte Licht wird durch weitere Filter geleitet, und gelangt so durchs Okular ins Auge des Betrachters. Mit einer digitalen Kamera konnten die Ergebnisse protokolliert werden.

4.6.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Zur Untersuchung von Zellen und Geweben auf ultrastruktureller Ebene wurde die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) eingesetzt. Mit dieser können Strukturen aufgelöst werden, die kleiner als 10 nm sind, und mittels der Immungoldlokalisation können zellulärer Strukturen lokalisiert werden.

Das mit einem Transmissionselektronenmikroskop erzeugte Bild ist abhängig von der unterschiedlichen Streuung der einfallenden Elektronen durch die Probenmoleküle. Ohne vorherige Kontrastierung passieren die Elektronenstrahlen die Zelle gleichförmig, sodass nur eine geringfügige Differenzierung der einzelnen Bestandteile möglich ist. Erst durch verschiedene Kontrastierungsmethoden lassen sich die verschiedenen Zellbestandteile erkennen. Schwermetalle, wie Gold oder Osmium beugen die Mehrzahl der auftreffenden Elektronen, so dass sie auf dem Bildschirm als dunkle Bereiche erscheinen

Lösungen:

- Methanol (100 %) → bei -20°C
- Aceton (100 %) → bei -20°C
- PBS (vgl. 4.3.2):
- Fixierlösung (vgl. 4.6.1):
- Permeabilitätslösung (vgl. 4.6.1):
- Absättigungslösung (pH 7,4):
PBS
+ 50 mM Ammoniumchlorid
- Antikörperlösung (vgl. 4.6.1):
- Nachfixierlösung (pH 7,4)
PBS
+ 2 % Glutaraldehyd
- Silberverstärkungslösung:
Developer und Enhancer (Aurion Silver Enhancement Kit, Aurion, Niederlande)
werden im Verhältnis 1+20 gemischt

4. Methoden

- 2,5 % Glutaraldehydlösung (pH 7,2): 2,5 %iges Glutaraldehyd
50 mM KCl
2,5 mM MgCl
50 mM Cacodylat
- Cadodylatpuffer (pH 7,2): 50 mM Cacodylat
- OsO₄-Lösung: 1 % OsO₄
50 mM Cayodylat
- Uranylacetatlösung: 0,5 % Uranylacetat in dd H₂O
- Ethanolreihe: 50 %, 70 %, 90 %, 96 %, 100 % Ethanol p.a.
- Propylenoxid: 1- 5 µg/ml in PBS
- Epon: Dodecanylsuccinateanhydride
Methylnodicanhydride
Epon 812 (Glycidether 100)
DMP-30 (2,4,6 Triphenol)

Strukturfixierung:

Zur Einbettung mit guter Strukturhaltung wurden Gewebestückchen oder Zellen jeweils 30 min mit der Glutaraldehydlösung fixiert, in Cacodylatpuffer gewaschen und mit der OsO₄-Lösung kontrastiert. Durch Glutaraldehyd kam es zur Vernetzung und Immobilisierung von Proteinen, durch Osmiumtetroxid wurden interne Membranen und Makromoleküle angefärbt. Anschließend wurden die Proben mit Wasser gewaschen, über Nacht in wässriger, 0,5 %iger Uranylacetatlösung inkubiert. Nach drei 5minütigen Waschschritten in Wasser wurden die Proben in einer aufsteigenden, vorgekühlter Ethanolreihe (50 %, 70 %, 90 %, 96 %; je 5 min) dehydriert und dann je zweimal 10 min in 100 % Ethanol und Propylenoxid überführt. Dann wurden die Proben 4 h in einem 50:50 Gemisch aus Epon und Propylenoxid und anschließend über Nacht in Epon inkubiert. Zur Aushärtung wurden die Proben in einen 60°C Inkubationsschrank gegeben, wobei auf die Deckgläschen mit Zellen eine Gelatine kapsel gefüllt mit Epon aufgesetzt wurde (Flacheinbettung) und Gewebestückchen in eine solche gegeben wurden. Nach zwei Tagen konnten die Proben für die Anfertigung von Ultradünnschnitten angetrimmt werden. Dazu wurde bei den Flacheinbettungen das Deckglas abgesprengt und bei den Gewebestückchen das Gewebe freigelegt und eine Pyramide von 1-2 mm Kantenlänge in das gehärtete Epon geschnitten.

Pre-embedding Immungoldlokalisierung

Um bestimmte Protein in Zellen auf elektronenmikroskopischer Ebene zu lokalisieren, wurde die *indirekte Immungoldlokalisierung* angewandt. Ähnlich wie bei der *indirekten Immunfluoreszenz* wurde die Verteilung eines Proteins in der Zelle mit Hilfe derselben Primärantikörper nachgewiesen (vgl. 4.6.1). Der sekundäre Antikörper hingegen war an ein 12 nm-Goldpartikel gekoppelt.

Auf Deckgläschen überführte Gefrierschnitte (vgl. 4.5.2) wurden für 10 min in Methanol und 1 min zur Dehydrierung in Aceton bei jeweils -20°C inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Deckgläschen sofort in PBS überführt, damit die Zellen nicht austrocknen und zwei mal 10 min in PBS gewaschen. Anschließend wurde der erste Antikörper 20 min in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert bevor unspezifisch gebundene Antikörper durch 2maliges waschen für 5 min in PBS entfernt wurden. Die Zellen auf den Deckgläschen wurden dann mit einem zweiten Antikörper für 1-2 h bei RT inkubiert. Dieser war gegen die konstante Region des ersten Antikörpers gerichtet, und an ein 12 nm großes Goldpartikel gekoppelt. Darauf wurde drei mal 5 min mit PBS gewaschen. Nun erfolgte, wie oben beschrieben die Fixierung und Kontrastierung mit 2,5 % Glutaraldehyd- und 1 % OsO_4 -Lösung sowie die Entwässerung und Einbettung der Proben.

Pre-embedding Immungoldlokalisierung: Silberverstärkt

Um Strukturen in Zellen zu lokalisieren, die wegen ihrer Kompaktheit für große Goldpartikel schwer zugänglich sind wurde die *indirekte Immungoldlokalisierung* mit einer angeschlossenen Silberverstärkung angewandt. Wie oben beschrieben wurde die Verteilung eines Proteins in der Zelle mit Hilfe von Primärantikörper nachgewiesen. Der sekundäre Antikörper hingegen war an ein 1,4 nm-Goldpartikel gekoppelt, welches durch Silberverstärkung vergrößert werden konnte. Hierbei wurden über eine Silberverstärkungslösung Silberionen an die Oberfläche des Nano-Gold-Partikels angelagert. Gefrierschnitte (vgl. 4.5.2) wurden 3 min in der Fixierlösung fixiert und anschließend für 10 min in der Permeabilisierungslösung inkubiert, um sie für die Antikörper zugänglich zu machen. Eine 10minütige Inkubation in der Absättigungslösung sollte restliches PFA neutralisieren, um eine spätere Fixierung von Antikörpern zu vermeiden. Nach der Absättigung wurden die Deckgläschen in PBS überführt und drei mal 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurde der erste Antikörper 1 h in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert bevor unspezifisch gebundene Antikörper durch 6maliges waschen für 5 min in PBS entfernt wurden. Die Präparate wurden dann mit einem zweiten Antikörper für 1-2 h bei RT inkubiert. Dieser war gegen die konstante Region des ersten Antikörpers gerichtet, und an ein 1,4 nm großes Goldpartikel gekoppelt. Darauf wurde sechs mal 5 min mit PBS gewaschen. Nun wurden die spezifisch gebundenen Antikörper für 10 min in der

Nachfixierlösung fixiert und anschließend vier mal 5 min in H₂O bidest. gewaschen. Zur Silberverstärkung der Nano-Gold-markierten Zweitantikörper wurden die Präparate für ca. 60 min in einer dunklen, feuchten Kammer mit der Silberverstärkungslösung inkubiert. Um die Reaktion der Silberionen mit den Nano-Gold-Partikeln zu stoppen wurde vier mal 5 min in H₂O bidest. gewaschen. Nun erfolgte, wie oben beschrieben die Entwässerung und Einbettung der Proben.

Transmissionselektronenmikroskopie

Die Grundprinzipien der Elektronenmikroskopie ähneln denen der Lichtmikroskopie. Der wesentliche Unterschied besteht darin, dass elektromagnetische Linsen einen hochbeschleunigten Elektronenstrahl fokussieren, während bei einem Lichtmikroskop optische Linsen Lichtstrahlen bündeln. Da aber Elektronen durch Atome der Luft absorbiert werden, muss im gesamten Strahlengang zwischen Elektronenquelle und Bildschirm ein Hochvakuum bestehen.

Beim Transmissionselektronenmikroskop (EM 10; Zeiss) wird ein Elektronenstrahl auf die Probe gerichtet. Die Elektronen werden von einer beheizten Wolframkathode ausgesandt, deren elektrisches Potential bei 50000-100000 Volt liegt. Sie werden auf dem Weg zur Anode, deren elektrisches Potential am oberen Ende der Mikroskopröhre Null beträgt, aufgrund des Potentialgefälles beschleunigt. Die Kondensorenlinse fokussieren den Elektronenstrahl auf die Probe, von wo aus er durch die Objektiv- und die Projektivlinse auf den Bildschirm oder auf einen fotografischen Film gerichtet wird, der dann entwickelt werden kann.

Unter Optimalen Bedingungen erreicht das Transmissionselektronenmikroskop eine Auflösung von 0,1 nm.

Für die Elektronenmikroskopie wurden Schnitte von etwa 50 nm Dicke an einem Ultramikrotom hergestellt. Diese wurden mit Reynold's Bleicitrat nachkontrastiert und konnten dann am Elektronenmikroskop (Zeiss EM 10; Zeiss) betrachtet werden. Mittels einer integrierten Kamera konnten Negative gemacht werden, die entweder direkt eingescannt wurden (Quatrographic Xfinity pro 42; LaserSoft Imaging) oder von denen zuvor Abzüge angefertigt wurden.

4.7 Proteinbiochemische Analyse

4.7.1 Proteinfällung

Methanol-Chloroform-Fällung

Lösungen:

- Methanol 100 %
- Chloroform

Durchführung:

Zu den Aliquots der zu fällenden Proteine wurde das vierfache Volumen Methanol, ein einfaches Volumen Chloroform sowie das dreifache Volumen H₂O bidest. gegeben, kräftig geschüttelt und für 1 min bei 11000 g zentrifugiert. Es bildeten sich zwei Phasen, an deren Grenze (Interphase) sich die denaturierten Proteine befanden. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Dem verbliebenen Ansatz, der sich aus der chloroformhaltigen unteren Phase und der proteinhaltigen Interphase zusammensetzt, wurde das dreifache Volumen Methanol (bezogen auf die Ausgangslösung) hinzugefügt, wodurch sich das Methanol mit dem Chloroform vermischte und keine Phasengrenzen mehr entstanden. Die Lösung wurde für ca. 10 min bei 11000 g zentrifugiert, wodurch die Proteine sedimentiert wurden. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet luftgetrocknet und in dem gewünschten Puffer in geeigneter Konzentration aufgenommen.

Acetonfällung

Lösungen:

- Aceton (100 %) → bei -20°C
- Aceton (75 %) → bei -20°C

Durchführung:

Proteinproben wurden mit dem 6,5fachen Volumen 100 % Aceton (-20°C) über Nacht bei -20°C gefällt und dann 20 min bei 12000 g (Heraeus, Sorvall HB6) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde zweimal mit 75 % Aceton (-20°C) gewaschen. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in dem gewünschten Puffer in geeigneter Konzentration aufgenommen.

4.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine werden durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit von Molekülen im elektrischen Feld hängt normalerweise

4. Methoden

von drei Faktoren ab: der molekularen Masse, ihrer Form und ihrer elektrischen Ladung. Bei der SDS-PAGE ist jedoch allein die Masse für die Wanderungsgeschwindigkeit ausschlaggebend. Dies erreicht man dadurch, dass dem Gel und dem Laufpuffer Natrium-Dodecylsulfat (SDS), ein Detergenz mit stark amphipatischen Eigenschaften, zugegeben wird. Es zerstört die Tertiärstruktur von Proteinen und wirkt denaturierend. An die entfalteten Peptid-Ketten binden SDS-Moleküle wodurch die Proteine eine starke negative Ladung erhalten. Die Eigenladung der Proteine kann dagegen vernachlässigt werden. Die Moleküle wandern also bei einer Gelelektrophorese zur positiv geladenen Anode und werden nach ihrem Molekulargewicht getrennt.

Zur vollständigen Denaturierung werden den Proteinen im Probenpuffer Thiole zugegeben, die die Disulfidbrücken der Proteine reduzieren.

Zur Schärfung der Proteinbanden wird das Gel in Sammelgel und Trenngel unterteilt. Die Proteinlösung enthält Glycin und Cl⁻-Ionen. Zuerst läuft diese durch das Sammelgel (pH 6,8). Das Glycin ist ein Zwitterion, das bei diesem pH eine negative und eine positive Ladung trägt (⁺NH₃-CH₂-CO₂⁻), insgesamt also ungeladen ist. Die Proteine laufen im Trenngel im Feldstärkegradienten zwischen Cl⁻ und Glycin und werden so durch diesen Käfigeffekt konzentriert. Beim Übergang ins Trenngel (pH 8,8) wird das Glycin deprotoniert, ist somit negativ geladen (NH₂-CH₂-CO₂⁻), und eilt mit dem Cl⁻ voraus. Die Proteine laufen in Abhängigkeit ihrer Masse unterschiedlich schnell.

SDS-PAGE nach Laemmli (1970)

Lösungen:

- Lösung A: 30 % (w/v) Acrylamid
0,8 % (w/v) Bisacrylamid
- Lösung B (Trenngelpuffer): 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
- 20 % (w/v) SDS
- Lösung D (Sammelgelpuffer): 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
- Laufpuffer: 50 mM Tris/HCl
380 mM Glycin
0,1 % SDS
- 10 % (w/v) APS (Ammoniumpersulfat) in H₂O
- TEMED (Roth)

4. Methoden

- SDS-Probenpuffer (pH 6,8):
 - Tris/HCl, pH 6,8
 - 1 % (w/v) SDS
 - 10 % (v/v) Glycerin
 - β -Mercaptoethanol
 - Spatelspitze Bromphenolblau
- 0,5 %ige Agarose-Lösung

	8 %	10 %	12 %	15 %	16 %
Lösung A	2,5 ml	3,125 ml	3,75 ml	4,5 ml	4,8 ml
Lösung B	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
20 % SDS	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
10 % APS	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l
H₂O	2,35 ml	1,7 ml	1,05 ml	0,35 ml	50 μ l

Tabelle 4.5: Pipettierschema für Trenngel bei SDS-PAGE nach Laemmli

	5 %
Lösung A	1,5 ml
Lösung D	2,55 ml
20 % SDS	50 μ l
10 % APS	100 μ l
TEMED	10 μ l
H₂O	5,85 ml

Tabelle 4.6: Pipettierschema Sammelgel

Durchführung:

Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten mit zwei Abstandhaltern (Spacer) gegossen. Zuerst wurde das Trenngel gegossen, wobei je nach der Größe des zu untersuchenden Proteins Trenngele verschiedener Acrylamidkonzentration gegossen wurden (vgl. Tabelle 4.5). Das Sammelgel (vgl. Tabelle 4.6) wurde bis zum Rand des Aufbaus gegossen und mit einem Kamm dafür gesorgt, dass Aussparungen bleiben, wo die Proteinlösungen aufgetragen werden konnten. Dann konnte das Gel in die Elektrophoresekammer gesetzt und mit Laufpuffer überschichtet werden. Nach Entfernen des Kammes konnte das Gel mit den vorbereiteten Proben beladen werden.

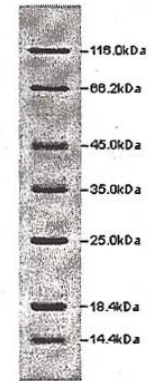
Dazu wurden die Proben, welche aus Geweben oder Zellen, Bakterien oder gereinigten Proteinfractionen stammten direkt in Probenpuffer aufgenommen. Lagen Proteine in nur

4. Methoden

geringen Konzentrationen in Lösung vor, konnten diese zuvor durch Fällung konzentriert werden (vgl. 4.7.1). Die Proteine wurden vor dem Beladen 5 min bei 95°C gekocht und kräftig gevortext. Als zusätzliche Spur wurde ein Proteingrößenmarker (MBI) pipettiert (vgl. Tabelle 4.7).

Protein	Herkunft	Molekulargewicht (kDa)
α -Galaktosidase	E. coli	116,0
Bovines Serum-Albumin	Rinderserum	66,2
Ovalbumin	Hühnereiweiß	45,0
Laktat-Dehydrogenase	Schweinemuskel	35,0
RE Bsp981	E. coli	25,0
β -Laktoglobulin	Kuhmilch	18,4
Lysozym	Hühnereiweiß	14,4

Tabelle 4.7: Zusammensetzung des Proteingrößenmarkers (MBI)



12% SDS-PAGE

Das Gel wurde bei konstant 100-150 Volt auf Eis gefahren. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn das Bromphenolblau die untere Kante des Gels erreicht hatte.

Das Gel konnte nun für die Western Blot Methode (vgl. 4.7.4) eingesetzt werden oder die Proteine wurden mit der Coomassie Blau Färbung sichtbar gemacht (vgl. 4.7.3).

4.7.3 Coomassie Blau-Färbung

Lösungen:

- Coomassie Blau-Färbelösung: 0,25 % (w/v) Brillant Blau R250 (Roth)
40 % (v/v) Methanol
8 % (v/v) Essigsäure
- Entfärbelösung: 25 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure

Durchführung:

Für die Coomassie Blau-Färbung wurde das Gel 1-2 h in der Färbelösung inkubiert und anschließend über Nacht in Entfärber gelegt. Durch Zugabe eines weißen Papiertuches konnte die Entfärbung beschleunigt werden. Coomassie Blau färbt spezifisch Proteine. Das gefärbte Gel konnte auf einer Leuchtplatte (Transilluminator; Hartenstein) photographiert oder in einer Klarsichthülle eingescannt werden.

Trocknen von SDS-Gelen

Um Coomassie Blau-gefärbte Gele längere Zeit aufzubewahren, wurden sie getrocknet. Dazu wurde das Gel mit Hilfe einer flexiblen Folie auf ein Whatman-Papier überführt, so daß zwischen Papier und Gel keine Luftblasen entstehen. Dann wurde das Gel mit Frischhaltefolie bedeckt und in einem Drystar-Geltrockner 90 min bei 75°C und maximaler Vakuumleistung getrocknet. Nach Ablauf der Trockenzeit wurde das Gel zum Abkühlen im Trockner belassen und konnte dann entnommen werden.

4.7.4 Western Blot

Anhand der Western Blot Methode ist es möglich, mithilfe von Antikörpern in Proteingemischen die entsprechenden Proteine nachzuweisen. Die Proteinproben wurden in einer SDS-PAGE (vgl. 4.7.2) aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit den Antikörpern inkubiert. Ein sekundärer Antikörper, an den das Enzym Peroxidase gekoppelt ist, bindet an die konstanten Regionen des primären Antikörpers und konnte durch ECL (*enhanced chemiluminescens*) visualisiert werden.

Lösungen:

- CAPS-Puffer (pH 10):
50 mM CAPS
10 % (v/v) Methanol
1 mM Mercaptopropionsäure
- TBS (pH 7,4):
150 mM NaCl
10 mM Tris/HCl
- TBST (pH 7,4):
TBS mit 0,1 % (v/v) Tween
- 10 % Milchpulver in TBST, pH 7,4
- Ponceau S (Sigma; 0,2 % Ponceau-S in 3 % TCA)

Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran:

Das Gel wurde nach Abschluss der Elektrophorese aus den Glasplatten entnommen und das Sammelgel entfernt. Dem Trenngel wurde die linke untere Ecke entfernt, um die Orientierung zu markieren und anschließend 10 min in CAPS-Puffer inkubiert. Die Membran und 18 Whatman-Papiere wurden auf Gelgröße zugeschnitten und ebenfalls in CAPS äquilibriert. Dann wurde der Blot wie in Abbildung 4.5 dargestellt aufgebaut. Geblottet wurde elektrisch in

4. Methoden

einer Graphit-Blotting-Kammer. Um eventuell vorhandene Luftblasen aus dem System zu entfernen, wurde ein Zentrifugenröhrchen mit sanftem Druck darübergerollt.

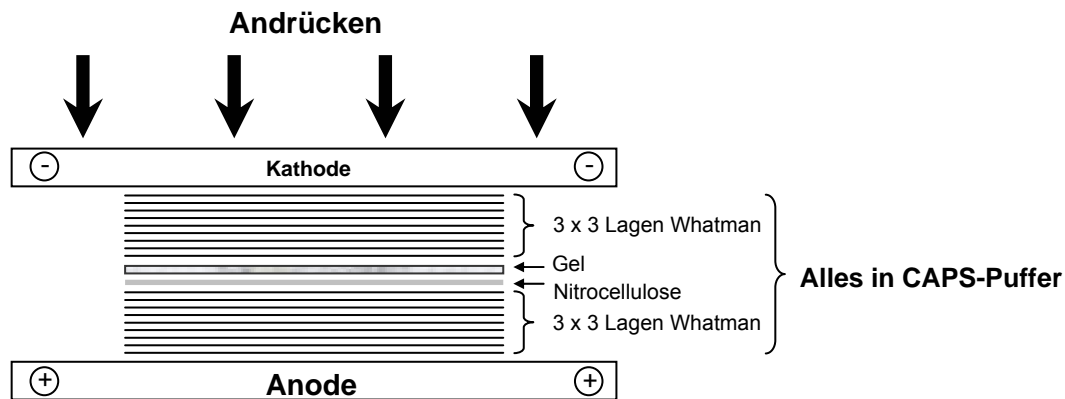


Abbildung 4.5: Aufbau Western Blot

War der Blot soweit aufgebaut, wurde die Kathodenplatte aufgelegt und die Kammer ans Netzgerät angeschlossen. Anschließend wurde 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm^2 geblottet, wobei sich eine Spannung von ca. 6 V einstellen sollte, die sich am Ende des Transfers etwa auf 20 V erhöht hatte. Lag diese Spannung deutlich darüber, befanden sich noch Luftblasen im System.

Nach 1 h wurde der Blot abgebaut und der Transfer durch eine Färbung mit Ponceau S überprüft. Dieser Farbstoff lagert sich über Salzbrücken an die Proteine. Durch Waschen mit H_2O bidest. wurde die Farbe auf der Membran abgewaschen und blieb an den Proteinen haften wodurch der Transfer qualitativ beurteilt werden konnte.

Antikörperbindung

Die Membran wurde in 10 % Milchpulver in TBST für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. In Anschluss daran wurde die Membran mit dem primären Antikörper 1 h bei RT inkubiert. Dann wurde die Membran kurz in TBST gespült, drei mal 10 min in TBST gewaschen und anschließend 1 h bei RT mit dem sekundären, an Peroxidase gekoppelten, Antikörper inkubiert. Nach erneutem dreimaligen waschen der Membran in TBST konnten die Proteinbanden auf der Membran detektiert werden.

Detektion

Zur Detektion dienten die Peroxidase-Enzyme der sekundären Antikörper. Die Peroxidase vermittelte durch Spaltung von Peroxid eine RedOx.-Reaktion zwischen zwei Reagenzien,

wobei Licht freigesetzt wurde. Mit diesem Licht wurde ein Röntgenfilm belichtet, so dass an den Stellen der Peroxidase, also an den Stellen der gesuchten Proteine, Banden entstanden. Die Membran wurde in der Dunkelkammer eine Minute in einem 1:1 Gemisch der ECL-Reagenzien A und B (Amersham, Braunschweig) inkubiert und sofort in eine Zellophanfolie verpackt. Dann wurde ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt und exponiert. Die Belichtungszeit hing von der Menge der vorliegenden Peroxidase ab und konnte zwischen wenigen Sekunden und einer Stunde variieren. Anschließend kam der Film 3 min in einen Entwickler und nach kurzem Spülen in Wasser, 3 min in einen Fixierer. Der Film wurde wieder gewaschen und getrocknet. Die belichteten Stellen erschienen schwarz.

„Strippen“ eines Western Blots

Durch das „Strippen“ werden die gebundenen Antikörper von der Membran entfernt, so dass eine erneute Detektion spezifischer Proteine durch weitere Antikörper durchgeführt werden kann.

Lösungen:

- „Strip“-Puffer 1 (50 ml):
31,25 ml 100 mM Tris/HCl, pH 6,7
5 ml 20 % (w/v) SDS
390 µl β-Mercaptoethanol
- „Strip“-Puffer 2 (pH 2,5): 100 mM Glycin
- TBST (siehe oben)

Durchführung:

Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten einen Western-Blot zu „stripfen“.

Eine Möglichkeit war, den Blot zunächst gut in TBST zu waschen, dann 30 min (nicht länger!) bei 50°C in „Strip“-Puffer 1 h zu inkubieren. Anschließend wurde die Membran gründlich mit TBST gewaschen und konnte dann für eine erneute Detektion von Proteinen abgesättigt werden. Diese „Strip“-Methode entfernt sehr effizient Antikörper von der Membran.

Die zweite Möglichkeit war die Membran mit TBST zu waschen und zwei mal 30 min im „Strip“-Puffer 2 auf einem Wiegetisch zu inkubieren. Anschließend wurde die Membran gründlich mit TBST gewaschen und konnte dann für eine erneute Detektion von Proteinen abgesättigt werden. Bei dieser Methode werden Antikörper zwar ausreichen, aber nicht so effizient von der Membran entfernt.

4.7.5 Salzextraktion

Die Resistenz von Proteinen gegenüber hohen Salzkonzentrationen ist eine charakteristische Eigenschaft vieler Strukturproteine.

Extraktion von Proteinen aus transfizierten Kulturzellen:

Lösungen:

- PBS (vgl. 4.3.2)
- Tritonpuffer (pH 7,4):
 - 10 mM Tris/HCl
 - 1 mM PMSF (aus SL: 200 mM in Methanol)
 - 0,5 mM DTT (Roth)
 - 1 % (v/v) Triton™ X-100
- Trispuffer (pH 7,4):
 - 10 mM Tris/HCl
 - 1 mM PMSF (aus SL: 200 mM in Methanol)
 - 0,5 mM DTT (Roth)
- Salzpuffer (pH 7,8):
 - 10 mM Tris/HCl
 - 1 mM PMSF (aus SL: 200 mM in Methanol)
 - 0,5 mM DTT (Roth)
 - 2 M NaCl
- DNase I SL (pH 7,5):
 - 50 ^{mg}/_{ml} DNase I
 - 20 mM Tris/HCl
 - 1 mM MgCl₂
 - 50 % (v/v) Glycerin
 - Lagerung bei -20 °C

Durchführung:

COS-7 Zellen wurden mit dem zu untersuchenden Proteinkonstrukt mit Lipofektamin transfiziert (vgl. 4.5.1). Die Transfektionsrate wurde durch Immunfluoreszenz überprüft.

Das Zellkulturmedium der transfizierten Zellen wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in PBS mit einem Gummischaber abgelöst und gleichmäßig auf zwei Ansätze aufgeteilt: Ein Ansatz diente als unbehandelte Kontrolle in der die Gesamtmenge des analysierten Proteins abgeschätzt werden konnte. Die Kontrollzellen wurden 5 min bei 500 g und 4°C pelletiert und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Zellen des zweiten Ansatzes wurden 5 min bei 500 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl Tritonpuffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert.

4. Methoden

Das Triton löst die Membranen auf, wodurch leicht lösliche Proteine und integrale Membranproteine in Lösung gehen, während schwer lösliche und komplexe Strukturen wie Kernlamina, filamentöse Proteine und Chromatin ausfallen. Im Anschluss an die Inkubation in Tritonpuffer wurde 10 min bei 4°C und 1600 g zentrifugiert, um die schwerlöslichen Bestandteile zu pelletieren. Der Überstand, der die löslichen Proteine enthielt, wurde abgenommen und bei 4°C aufgehoben. Das Pellet war von einer gelartigen Konsistenz und wurde in 500 µl Trispuffer aufgenommen. Dann zum Ansatz 200 µg DNase I zugegeben, kurz geschüttelt und anschließend 10 min auf einem Drehschüttler bei RT inkubiert. Durch den DNase I-Verdau gingen neben den Nukleotiden einige der DNA-gebundenen Proteine in Lösung. Anschließend wurde 500 µl 2 M Salzpuffer zugegeben, so dass die Salzkonzentration 1 M entsprach, und weitere 10 min bei RT auf einem Drehtisch inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden bei 12000 g und 4°C 10 min pelletiert. Der Überstand wurde gesammelt und das Pellet in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proteine der gesammelten Überstände wurden mit Methanol/Chloroform gefällt (vgl. 4.7.1) und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden nun für die SDS-PAGE vorbereitet (vgl. 4.7.2) und vollständig aufgetragen, was bedeutet, dass in den 3 Fraktionen der Salzextraktion insgesamt die gleiche Menge Protein vorhanden sein muss wie in der Unbehandelten Kontrolle.

Extraktion von Proteinen aus Pacytän-Spermatocyten (Ratte):

Lösungen:

- PBS (vgl. 4.3.2)
- Tritonpuffer (siehe oben): +0,1 mg/ml Trypsin Inhibitor SI (Sigma)
- Trispuffer (siehe oben): +0,1 mg/ml Trypsin Inhibitor SI (Sigma)
- Salzpuffer (siehe oben):
- DNase I SL (siehe oben):

Durchführung:

Die gewonnenen Pacytän-Spermatocyten (vgl. 4.5.3) wurden auf zwei Ansätze verteilt. Der weitere Versuch wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Für eine Western Blot-Analyse wurden die Proben so in SDS-Probenpuffer aufgenommen, dass 1×10^5 Zellen in 1 µl SDS-Probenpuffer enthalten waren und es wurden 1×10^6 Zellen auf das Gel aufgetragen.

5 Ergebnisse

Die Homologenpaarung durch den Synaptonemalkomplex (SC) ist ein essentieller Prozess in der Meiose damit Rekombination und Segregation der homologen Chromosomen korrekt ablaufen können. Ziel dieser Arbeit war es über eine Analyse von SYCP3, der Hauptstrukturkomponente der Lateralelemente (LE) in Vertebraten, ein besseres Verständnis der molekularen Architektur des SC zu erlangen.

5.1 Wichtige Domänen für die Polymerisation von SYCP3

SYCP3 wird als wichtiger struktureller Bestandteil der LEs angesehen und scheint an deren Auf- und Abbau beteiligt zu sein. Weiterhin wurde SYCP3 als Protein beschrieben, das Polymerstrukturen ausbilden kann, weswegen in dieser Arbeit zunächst der Mechanismus der Polymerisation und Depolymerisation von SYCP3 aufgeklärt werden sollte.

Zunächst wurden evolutionär konservierte Domänen von SYCP3 identifiziert und deren mögliche Rolle auf die Polymerstrukturbildung analysiert. Hierzu wurden Teilfragmente bzw. Punktmutanten von SYCP3 der Ratte hergestellt, und deren Verhalten mit dem des wildtypischen SYCP3 verglichen. Da es kein geeignetes meiosespezifisches Zellkultursystem gibt und meiotische Zellen aus Säugern kaum manipuliert werden können, wurde das Verhalten von SYCP3 in transfizierten somatischen Kulturzellen analysiert. Der Vorteil eines solchen heterologen Systems ist es, SYCP3 unabhängig von anderen meiosespezifischen Proteinen untersuchen zu können. Die Verteilung und das Verhalten der, in COS-7 Zellen, transfizierten SYCP3 Konstrukte wurde über Immunfluoreszenz, Transmissionselektronenmikroskopie und biochemische Methoden untersucht.

5.1.1 Datenbankvergleich von SYCP3 in Vertebraten

Die Studien begannen mit einem Datenbankvergleich homologer SYCP3-Sequenzen in Vertebraten um evolutionär konservierte Domänen zu identifizieren, welche für die Polymerisation von SYCP3 wichtig sein könnten. Die Sequenzanalyse und der Sequenzvergleich wurden mit dem frei zugänglichen Online Tool

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) und ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) durchgeführt.

Es konnte festgestellt werden, dass die SYCP3-Proteine aus Vertebraten sich zwar in der Länge zwischen den Spezies unterscheiden, aber eine konservierte Domänenorganisation aufweisen (vgl. Abbildung 5.1). SYCP3 besitzt in allen Spezies drei Domänen, eine im C-Terminus lokalisierte α -helikalen Region, flankiert von zwei nicht helikalen Domänen.

5. Ergebnisse

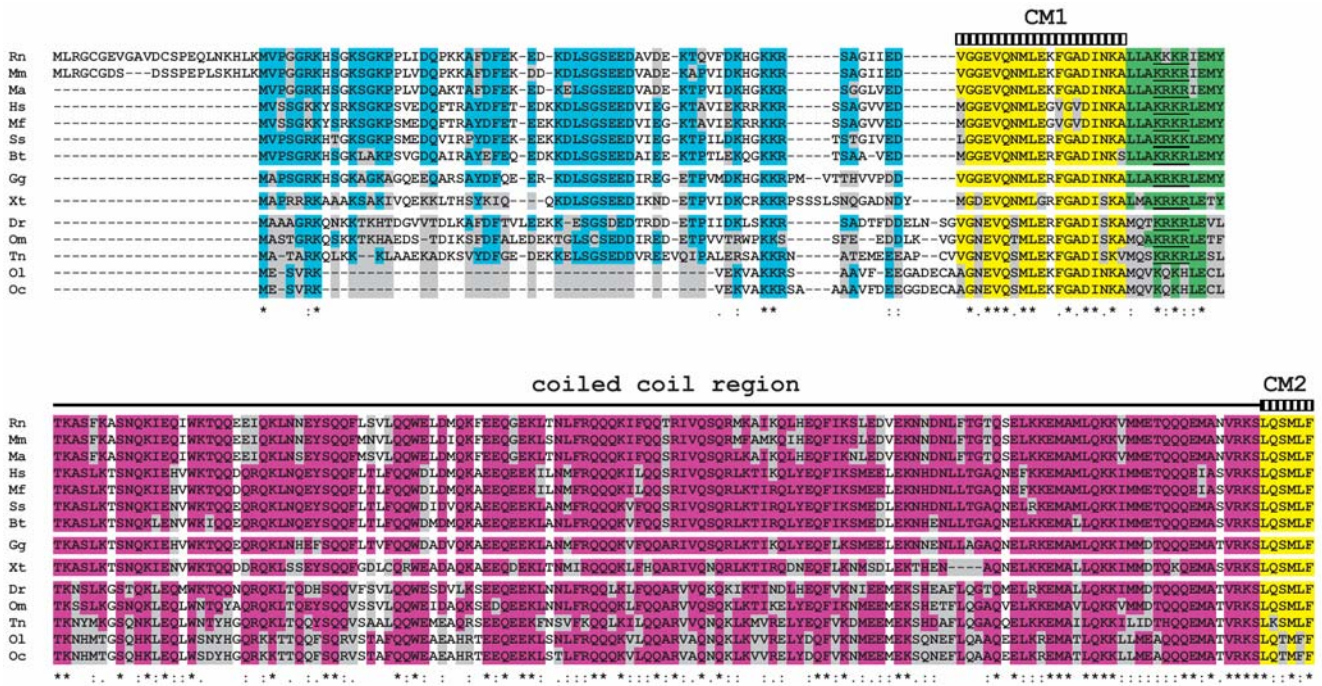


Abbildung 5.1: Aminosäuresequenzvergleich von SYCP3 aus Ratte (Rn: *Rattus norvegicus*, Q63520), Maus (Mm: *Mus musculus*, NP_035647), Hamster (Ma: *Mesocricetus auratus*, CAA54560), Mensch (Hs: *Homo sapiens*, NP_710161), Langschwanzmakak (Mf: *Macaca fascicularis*, BAE01059), Schwein (Ss: *Sus scrofa*, abgeleiteter cDNA-Klone DN100782), Kuh (Bt: *Bos taurus*, abgeleiteter cDNA-Klone DT849406), Huhn (Gg: *Gallus gallus*, XP_416330), Keallenfrosch (Xt: *Xenopus tropicalis*, NP_001072226), Zebrafisch (Dr: *Danio rerio*, NP_001035440), Regenbogenforelle (Om: *Oncorhynchus mykiss*, AAT35600), Kugelfisch (Tn: *Tetraodon nigroviridis*, predicted from cDNA-clone CR715567), Japanischer Medaka (Ol: *Oryzias latipes*, BAD36840) und Hainan Medaka (Oc: *Oryzias curvnotus*, BAE47002). Farbige Spalten kennzeichnen gleiche Aminosäuren in \geq der Hälfte der Spezies. Der schwarze Balken gibt die „Coiled-Coil“-Domäne im rattenspezifischen SYCP3 an. CM1: konserviertes Motiv 1; CM2: konserviertes Motiv 2; “*“: Aminosäurereste in der Spalte sind zwischen allen Spezies identisch; “.”: konservierter Aminosäureaustausch; “.”: halbkonservierter Aminosäureaustausch.

Eine große Übereinstimmung findet man in der α -helikalen Domäne, die nach dem Lupas Algorithmus (Lupas et al., 1991) typisch für die Ausbildung für „Coiled-Coil“-Strukturen ist (Tarsounas et al., 1997; Yuan et al., 1998). Außerdem konnten in der N-terminalen nicht helikalen und in der C-terminalen nicht helikalen Domäne zwei kurze, hoch konservierte Motive identifiziert werden, welche die α -helikalen Domäne flankieren. Diese Motive, CM1 und CM2, sind in allen Spezies 19 bzw. 6 Aminosäuren lang, weisen aber keine Homologie zu bekannten Motiven aus anderen Proteinen auf. Die Länge der „Coiled-Coil“-Strukturen unterscheidet sich dagegen zwischen den Spezies, die Entfernung zwischen CM1 und CM2 ist aber mit 145 Aminosäuren konstant geblieben. Nur in *Xenopus tropicalis* ist diese Sequenz zwischen CM1 und CM2 mit 141 Aminosäuren geringfügig verkürzt. Die

unterschiedliche Länge der SYCP3 Proteine aus verschiedenen Spezies ergibt sich durch den wenig konservierten N-terminus, der in der Länge stark variiert. Sogar innerhalb der Nagergruppe ist die Länge des N-Terminus bis zur CM1 wenig konserviert (Botelho et al., 2001).

5.1.2 Schematische Darstellung von SYCP3 und Mutanten

Für die Analyse der Polymerisationseigenschaften von SYCP3 wurde eine Reihe von Plasmiden hergestellt, welche für das wildtypische Protein kodieren sowie für ausgewählte Proteinmutanten. Die kodierenden Proteinprodukte sind hier schematisch dargestellt (vgl. Abbildung 5.2 und 5.3) und die genaue Vorgehensweise der Klonierung ist in Kapitel 3.6 aufgeführt.

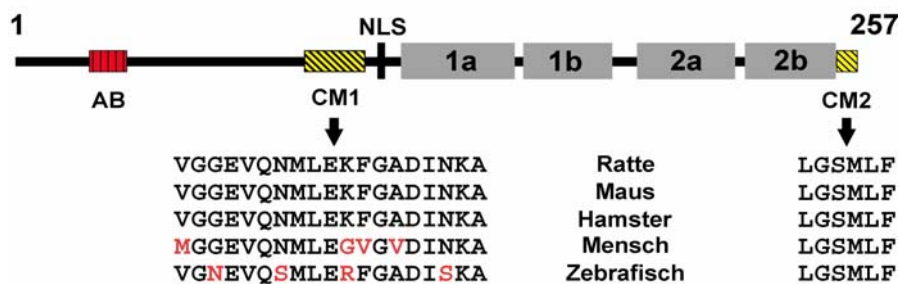


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung des 257 Aminosäure langem SYCP3 aus Ratte (Q63520). Grauer Balken: „Coiled-coil“-Domäne; schwarze Linie: nicht-helikale Bereiche und Linker-Regionen; schwarze Senkrechte: putatives Kernlokalisierungssignal (NLS); roter Balken: Antikörperbindungsepitop (AB); gelbe Balken: konserviertes Motiv 1 und 2 (CM1 und CM2); Die Aminosäuresequenz von CM1 und CM2 sind angegeben und wurden mit den entsprechenden Sequenzen aus Maus (NP_035647), Hamster (CAA54560) Mensch (NP_710161) und Zebrafisch (NP_001035440) verglichen. Ein Aminosäureaustausch ist rot gekennzeichnet.

Das 257 Aminosäuren lange SYCP3 aus Ratte kann in drei Domänen unterteilt werden: eine in der C-terminalen Hälfte liegende α -helikale Domäne, welche typisch ist für die Ausbildung von „Coiled-Coil“-Strukturen, sowie eine nicht helikalen N-terminalen und eine kurzen nicht helikalen C-terminalen Domäne. Bereiche mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von „Coiled-Coil“-Domänen nach Lupas Algorithmus sind als graue Balken gekennzeichnet. Die N- und C-terminalen nicht-helikalen Bereiche und Linker-Regionen zwischen den „Coiled-Coil“-Bereichen sind als schwarze Linie dargestellt. Weiterhin liegt in der nicht-helikalen N-terminalen Hälfte von SYCP3 ein putatives Kernlokalisierungssignal (NLS) (Chelsky et al., 1989) welche hier als schwarzer senkrechter Balken dargestellt ist. Die gelben Balken markieren die zwei konservierte Motive CM1 und CM2, wobei die Aminosäuresequenz der homologen Bereiche in Ratte, Maus, Mensch, Hamster und Zebrafisch angegeben sind.

5. Ergebnisse

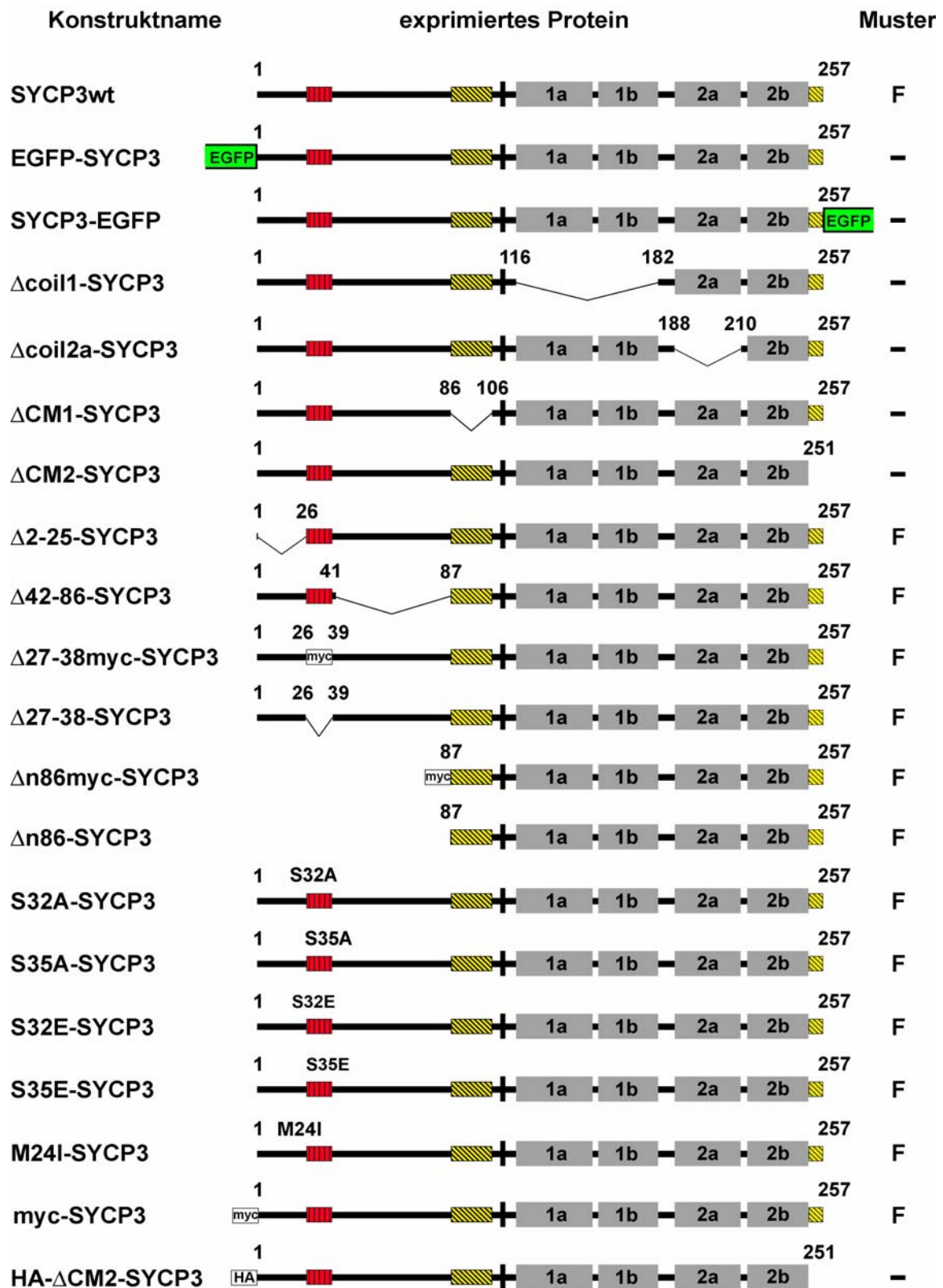


Abbildung 5.3: Schematische Darstellung aller SYCP3-Konstrukte die in COS-7-Zellen exprimiert wurden. F: exprimiertes Protein kann in COS-7-Zellen Filamente bilden; (-): exprimiertes Protein kann keine Filamente in COS-7-Zellen bilden; Fusionsproteine mit EGFP bzw. mit einem myc- oder HA-Epitop sind gekennzeichnet.

Das Antikörperbindungsepitop, AB, von Aminosäure 27 bis 38, gegen das ein spezifischer SYCP3 Antikörper hergestellt wurde (Alzheimer und Benavente, 1996), ist als roter Balken dargestellt. Endständige Deletionen werden durch ein verkürztes Konstrukt ausgedrückt. Interne Deletionen werden als Lücke mit einer dünnen Linie markiert. Die Positionen der flankierenden Aminosäuren einer Deletion sind angegeben. Punktmutationen sind gekennzeichnet durch (X13Y): X steht für die ursprüngliche Aminosäure an Position 13, die zur Aminosäure Y mutiert wurde.

Die jeweiligen Konstrukte wurden darauf hin untersucht, ob sie die Fähigkeit besitzen Filamente zu bilden. Weiterhin sollte die Stabilität und die ultrastrukturelle Erscheinung der Polymerstrukturen analysiert werden.

5.1.3 Einfluss verschiedener Domänen von SYCP3 auf die Filamentbildung

Im Folgenden sollte der Einfluss verschiedener Domänen von SYCP3 auf die Polymerisation herausgefunden werden. Hierzu wurden COS-7 Zellen mit verschiedenen mutierten SYCP3 Konstrukten transfiziert und die Verteilung der jeweiligen Proteine wurde über Immunfluoreszenz mit dem spezifischen SYCP3 bindenden, affinitätsgereinigten Antikörper nachgewiesen.

Die Expression des wildtypischen SYCP3 in COS-7 Zellen führte, wie von L. Yuan und Mitarbeiter beschrieben, zu einer netzartigen Verteilung von Filamenten im Cytoplasma und im Zellkern. Zudem konnte eine nukleoläre Lokalisation von SYCP3 nachgewiesen werden. Die cytoplasmatische Polymerisation von SYCP3, eines meiotischen Kernproteins, ist nicht ungewöhnlich und lässt sich durch die starke Überexpression in COS-7 Zellen erklären (vgl. Abbildung 5.4).

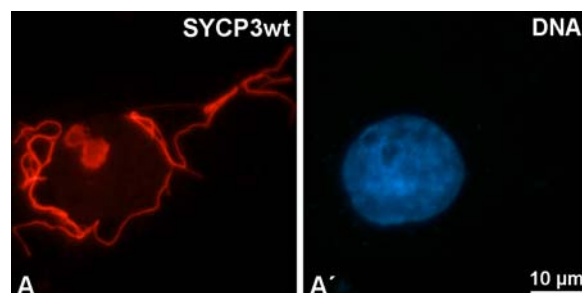


Abbildung 5.4: Expression von wildtypischem SYCP3 in COS-7 Zellen. Der Nachweis von SYCP3wt erfolgte über Immunfluoreszenz mit dem spezifischen Antikörper α -SYCP3 (A). Die DNA wurde mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 visualisiert (A').

5. Ergebnisse

Wurde SYCP3 als EGFP-Fusionsprotein exprimiert, konnten im Vergleich zum wildtypischen SYCP3 keine ausgedehnten filamentösen Strukturen gebildet werden (vgl. Abbildung 5.5).

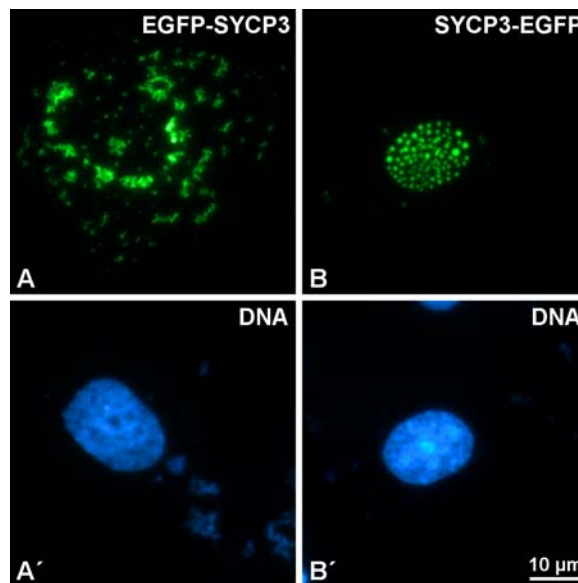


Abbildung 5.5: Expression von (A) EGFP-SYCP3 und (B) SYCP3-EGFP in COS-7 Zellen. Der Nachweis von SYCP3 erfolgte über Immunfluoreszenz durch die Autofluoreszenz von EGFP (A, B). Die DNA wurde mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 visualisiert (A', B').

EGFP-SYCP3, bei dem EGFP an den N-Terminus von SYCP3 fusioniert war, konnte Aggregate bilden, welche vorwiegend im Cytoplasma lokalisierten (vgl. Abbildung 5.6 A und A'). Bei Zellen, die EGFP-SYCP3 stark exprimierten, war auch eine Lokalisation des Proteins im Zellkern zu beobachten. SYCP3-EGFP, bei dem EGFP an den C-Terminus von SYCP3 fusioniert war, bildete kleinere runde Aggregate welche überwiegend im Zellkern lokalisierten (vgl. Abbildung 5.5 B und B'). War SYCP3-EGFP in Zellen stark exprimiert, konnte auch eine Lokalisation dieses Proteins im Cytoplasma beobachtet werden. Das ca. 26 kDa große EGFP-Molekül, scheint also die Filamentbildung, egal ob es am C-Terminus oder am N-Terminus von SYCP3 fusioniert ist, zu beeinträchtigen. Somit konnte nicht auf die Verwendung von EGFP-Fusionsproteinen zurückgegriffen werden, um die Polymerisationseigenschaften von SYCP3 aufzuklären. Stattdessen mussten die Deletions- und Punktmutanten von SYCP3 über Immunlokalisation nachgewiesen werden.

5. Ergebnisse

Um die Rolle verschiedener Domänen von SYCP3 bei dessen Polymerisation zu untersuchen, wurden verschiedene Teile von SYCP3 deletiert, die Mutanten in COS-7 Zellen exprimiert und die Verteilung der Proteine mit den wildtypischen SYCP3 Filamenten verglichen. Da Bereiche eines Proteins, welche essentiell für dessen Funktion sind, häufig evolutionär konserviert sind, wurde zunächst die strukturell konservierte „Coiled-Coil“-Domäne und die konservierten Motive CM1 im N-Terminus und CM2 im C-Terminus von SYCP3 deletiert und die Verteilung dieser Mutanten analysiert.

Wurden Teile der „Coiled-Coil“-Domäne oder die konservierten Motive CM1 und CM2 deletiert konnten keine Filamente mehr gebildet werden (vgl. Abbildung 5.6). Δ coil1-SYCP3 und Δ coil2a-SYCP3 bildeten nicht-filamentöse Aggregate im Zellkern (vgl. Abbildung 5.6 A, A', B und B'). Δ CM1-SYCP3 war mit einer Anreicherung um den Nukleolus homogen im Zellkern verteilt (vgl. Abbildung 5.6 C und C'). Auch Δ CM2-SYCP3 war im Zellkern lokalisiert und bildete dort nicht-filamentöse Aggregate (vgl. Abbildung 5.6 D und D'). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die konservierten Bereiche in SYCP3 eine starke Auswirkung auf die Filamentbildung haben.

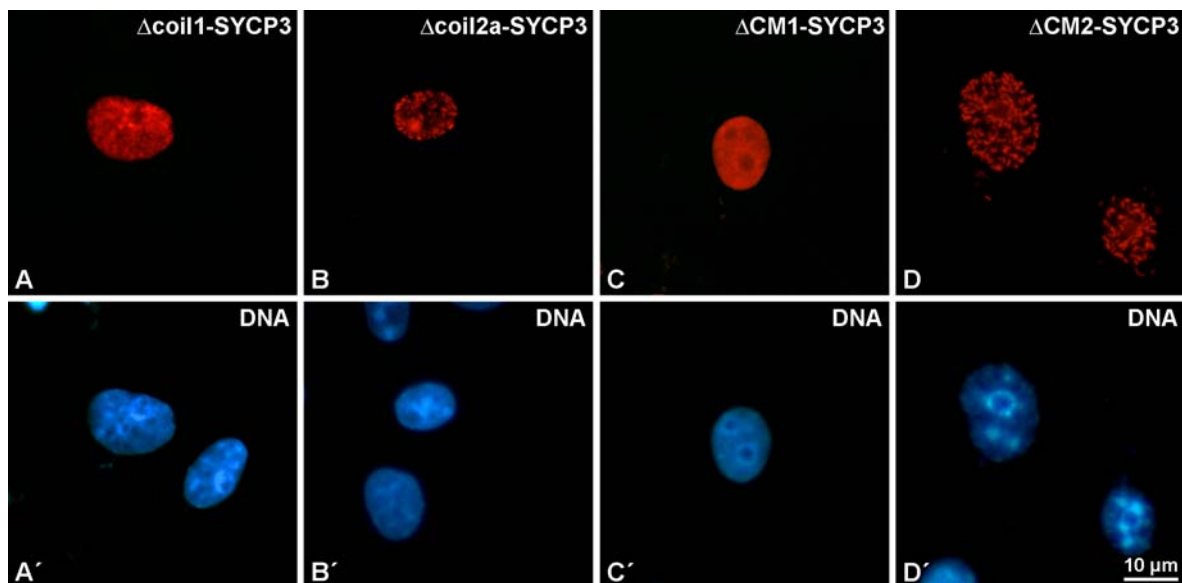


Abbildung 5.6: Expression von SYCP3 Mutanten, denen die Coil1 (A), Coil2a (B), das konservierte Motiv 1 (C) und das konservierte Motiv 2 (D) fehlen in COS-7 Zellen. Der Nachweis der SYCP3 Mutanten erfolgte über Immunfluoreszenz mit dem spezifischen Antikörper α -SYCP3 (A-D). Die DNA wurde mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 visualisiert (A'-D').

5. Ergebnisse

Weiterhin wurde der Einfluss des weniger konservierten N-terminalen Bereiches von SYCP3 auf die Filamentbildung untersucht (vgl. Abbildung 5.7). N-Terminale Mutanten von SYCP3 bei denen das Bindungsepitop des spezifischen SYCP3 Antikörpers deletiert wurde mussten mit einem myc-Epitop fusioniert werden, um das Protein in der Immunfluoreszenz mit dem Antikörper α -myc (Invitrogen, Karlsruhe) nachweisen zu können.

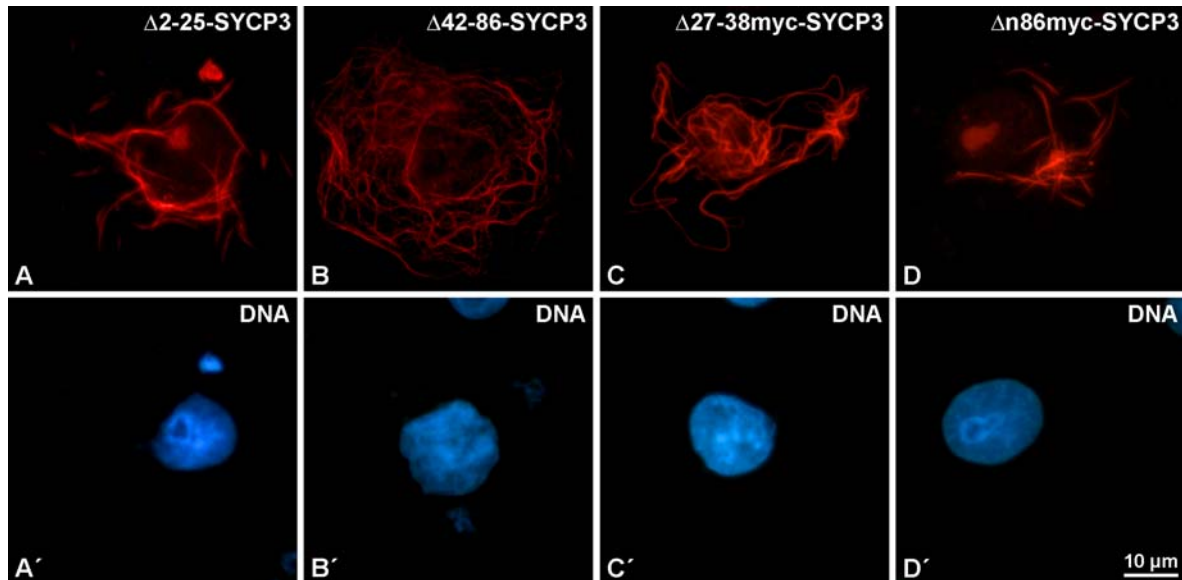


Abbildung 5.7: Expression von SYCP3 Mutanten, denen Teile des weniger konservierten N-Terminus (A-C) bzw. der gesamte weniger konservierten N-Terminus (D) fehlt in COS-7 Zellen. Der Nachweis der SYCP3 Mutanten erfolgte über Immunfluoreszenz mit dem spezifischen Antikörpern α -SYCP3 (A B) und α -myc (C, D). Die DNA wurde mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 visualisiert (A'-D').

Zunächst wurde der Bereich vor dem Antikörperbindungsepitop (Aminosäure 2-25) deletiert, wobei die erste Aminosäure, die als Startcodon ATG fungiert, erhalten blieb. $\Delta 2-25$ -SYCP3 bildet ebenso wie das wildtypische SYCP3 ein filamentöses Netzwerk im Cytoplasma und zum Teil im Zellkern (vgl. Abbildung 5.7 A und A'). Als nächstes wurde das Antikörperbindungsepitop (Aminosäure 27-38) deletiert und durch ein myc-Epitop ersetzt, um diese Mutante in der Immunfluoreszenz nachweisen zu können. $\Delta 27-38$ mycSYCP3 war ebenfalls in der Lage Filamente zu bilden (vgl. Abbildung 5.7 B und B'). Die Deletion der Aminosäuren zwischen Antikörperbindungsepitop und des konservierten Motivs 1, (Aminosäure 42-86), hatte auch keinen Einfluss auf die Filamentbildung. $\Delta 42-86$ -SYCP3 konnte ebenso wie das wildtypische SYCP3 ein filamentöses Netzwerk im Cytoplasma und zum Teil im Zellkern ausbilden (vgl. Abbildung 5.7 C und C'). Zuletzt sollte getestet werden, ob eine Deletion des gesamten weniger konservierten N-Terminus (Aminosäure 1-86) die Filamentbildung beeinflusst. Da durch diese Deletion das Antikörperbindungsepitop verloren geht, musste das N-terminal verkürzte Protein mit einem myc-Epitop fusioniert werden. $\Delta n86$ myc-SYCP3

besaß trotz der Deletion die Fähigkeit Filamente zu bilden, Diese Filamente waren aber geradliniger als die geschwungenen wildtypischen SYCP3 Filamente (vgl. Abbildung 5.7 D und D').

Zusammenfassend kann man sagen, dass die strukturell konservierte „Coiled-Coil“-Domäne und die konservierten Motive CM1 und CM2 wichtig für die Filamentbildung sind, aber der weniger konservierte Bereich des N-Terminus dafür nicht notwendig ist.

5.1.4 Einfluss des N-Terminus auf die Stabilität der SYCP3-Filamente

Es stellte sich die Frage, welchen Einfluss der weniger konservierte N-Terminus für das Verhalten von SYCP3 hat. Um diese Frage zu klären wurde die Stabilität von wildtypischen SYCP3 Filamenten und filamentbildenden SYCP3-Mutanten, exprimiert in COS-7 Zellen, analysiert. Zum Vergleich wurden die Strukturen, die das wildtypische SYCP3 als Bestandteil des SCs in Pachytän-Spermatocyten bildet, auf ihre Stabilität hin untersucht.

Man kann die Löslichkeit bzw. die Stabilität von Strukturen testen indem man Zellen, welche die zu untersuchenden Strukturen exprimieren, mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen behandelt. Fraktioniert man diese Zellen (vgl. 4.7.5) gehen leicht lösliche Proteine bereits nach einer Niedrigsalz/Triton-Behandlung in den Überstand (TÜ). Nach einer Behandlung mit DNase und hoher Salzkonzentration gehen DNA-bindende und schwer lösliche Proteine in den Überstand (HÜ). Weitestgehend unlösliche Strukturen kommen angereichert im Hochsalz-Pellet (HP) vor.

Da SCs, aufgrund ihrer Beständigkeit gegenüber Nukleasen, nicht-ionischen Detergenzien und hohen Salzkonzentrationen, als Kernstrukturelementen klassifiziert werden (Comings und Okada, 1976; Ierardi et al., 1983; Risley, 1986), wurde in dieser Arbeit zunächst gezeigt, dass SYCP3 als Bestandteil des SCs in Ratte ebenso beständig gegenüber Nukleasen, und hohen Salzkonzentrationen ist. Abbildung 5.8 zeigt, dass wildtypisches SYCP3 aus Pachytän-Spermatocyten (SYCP3wt_Hoden) nach Hochsalz-Behandlung zum Teil in den Überstand (HÜ) ging, während ein Teil des Proteins aber unlöslich blieb und im Hochsalzpellet (HP) nachgewiesen werden konnte. Auch die in COS-7-Zellen exprimierten wildtypischen SYCP3 Filamente waren ähnlich resistent gegenüber Nukleasen, und hohen Salzkonzentrationen wie das endogene SYCP3 in SCs der Ratte (vgl. Abbildung 5.8 SYCP3wt).

5. Ergebnisse

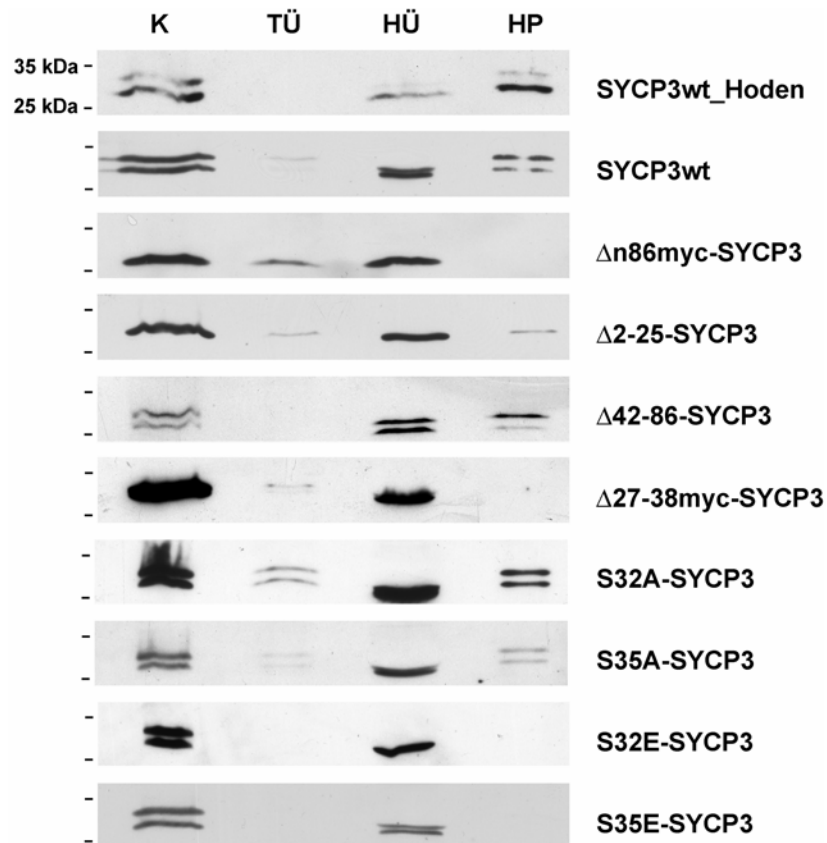


Abbildung 5.8: Analyse der Stabilität von SYCP3 aus Pachytänspermatozyten und in COS-7-Zellen exprimiertes wildtypisches SYCP3 und SYCP3-Mutanten, durch Extraktion der Zellen mit Niedrig- und Hochsalzpuffern. Zur Analyse der Stabilität von Strukturen wurden Suspensionen von transfizierten COS-7-Zellen oder Keimzellen verwendet. Die Hälfte der Zellen wurde als unbehandelte Kontrolle (K) direkt für die Gelelektrophorese eingesetzt, die andere Hälfte wurde zunächst in Niedrigsalzpuffern und Triton™ X-100 extrahiert. Der Überstand wurde als Tritonüberstand (TÜ) gesammelt, das Pellet sukzessiv mit 100 µg DNase I und 1 M NaCl extrahiert. Der resultierende Überstand wurde als Hochsalzüberstand (HÜ), das Pellet, das unlösliche Proteine enthält, als Hochsalz-Pellet (HP) gesammelt. Die Proben wurden für die Gelelektrophorese vorbereitet, in einer 16%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis von SYCP3 und SYCP3-Mutanten erfolgte über Immunblot mit den spezifischen Antikörpern α -SYCP3 bzw. α -myc. SYCP3 aus Ratte liefert eine 30 und eine 33 kDa Bande im Polyacrylamidgel (Heyting et al., 1987; Lammers et al., 1994). Die meisten SYCP3-Mutanten konnten auch als Dopplebände in der SDS-PAGE nachgewiesen werden. Es fällt aber auf, dass, obwohl SYCP3wt, Δ 27-38myc-SYCP3, S32A-SYCP3, S35A-SYCP3, S32E-SYCP3 und S35E-SYCP3 als Dopplebände in K detektiert wurden, im HÜ nur eine Bande nachweisbar war. Eine Erklärung dieser widersprüchlichen Beobachtung ist, dass die DNase I durch die große Menge als sehr breite Bande auf 37 kDa lief und so die 33 kDa-SYCP3 Bande nach unten „drückte“, so dass diese von der 30 kDa Bande nicht mehr zu unterscheiden war.

Der Unterschied der 30 bzw. 33 kDa Bande und die Erklärung, warum Δ 2-25-SYCP3 und Δ n86myc-SYCP3 nur eine Bande im Polyacrylamidgel lieferten wird unter 5.1.6 erklärt.

5. Ergebnisse

Um zu untersuchen ob der N-Terminus von SYCP3 einen Einfluss auf die Stabilität des Proteins hat, wurden die filamentbildenden Deletionsmutanten auf ihre Stabilität hin untersucht (vgl. Abbildung 5.8, $\Delta n86\text{myc-SYCP3}$, $\Delta 2\text{-}25\text{-SYCP3}$, $\Delta 42\text{-}86\text{-SYCP3}$ und $\Delta 27\text{-}38\text{myc-SYCP3}$). Zunächst wurde die Deletionsmutante, $\Delta n86\text{myc-SYCP3}$, der der gesamte weniger konservierte N-Terminus fehlte in COS-7 Zellen exprimiert und das Verhalten mittels Zellfraktionierung analysiert. $\Delta n86\text{myc-SYCP3}$ ging nach der Hochsalz-Behandlung komplett in den Überstand (HÜ) und es konnte kein SYCP3 im Hochsalzpellet (HP) nachgewiesen werden. Die Deletion des gesamten weniger konservierten N-Terminus führte also dazu, dass $\Delta n86\text{myc-SYCP3}$, zwar Filamente bilden konnte (vgl. Abbildung 5.7 D), aber diese wiesen eine geringere Stabilität auf (vgl. Abbildung 5.8 $\Delta n86\text{myc-SYCP3}$). Nun stellte sich die Frage, welcher Bereich im N-Terminus einen Einfluss auf die Stabilität der Filamente hat. Aus diesem Grund wurden COS-7 Zellen, welche die verschiedenen N-terminalen Deletionsmutanten $\Delta 2\text{-}25\text{-SYCP3}$, $\Delta 42\text{-}86\text{-SYCP3}$ und $\Delta 27\text{-}38\text{myc-SYCP3}$ exprimieren, fraktioniert. Die Deletion der Aminosäuren vor dem Antikörperbindungsepitop (Aminosäure 2-25) sowie die Deletion der Aminosäuren zwischen Antikörperbindungsepitop und des konservierten Motivs 1 (Aminosäure 42-86) hatte keinen Einfluss auf die Stabilität der Filamente. Die Proteine $\Delta 2\text{-}25\text{-SYCP3}$ und $\Delta 42\text{-}86\text{-SYCP3}$ gingen, wie das wildtypische SYCP3, nach Hochsalz-Behandlung zum Teil in den Überstand (HÜ), während ein Teil der Proteine aber unlöslich blieb und im Hochsalzpellet (HP) nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 5.8, $\Delta 2\text{-}25\text{-SYCP3}$ und $\Delta 42\text{-}86\text{-SYCP3}$). Die Deletion des Antikörperbindungsepitop (Aminosäure 27-38) führte allerdings dazu, dass das Protein $\Delta 27\text{-}38\text{myc-SYCP3}$ nach der nach Hochsalz-Behandlung komplett in den Überstand (HÜ) ging so dass unlösliches Protein im Hochsalzpellet (HP) nicht nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 5.8, $\Delta 27\text{-}38\text{myc-SYCP3}$). Die 12 Aminosäuren des Antikörperbindungsepitop scheinen also die Stabilität der SYCP3 Filamente zu beeinflussen. Bereits in einer früheren Arbeit wurde beschrieben, dass dieser Bereich die Fähigkeit besitzt eine Loop-Struktur auszubilden welche ein β -Faltblatt und eine α -Helix voneinander trennt. (Lammers et al., 1994). Durch eine Datenbankanalyse mit dem Programm PROSCAN (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/pattern_prosite.pl) konnte in diesem Bereich zwei wichtige Serinreste identifiziert werden, die potentielle Phosphorylierungsstellen darstellen. Das Serin an Position 32 ist eine potentielle Zielstelle der cAMP und cGMP-abhängigen Proteinkinase sowie der Protein Kinase C, das Serin an Position 35 ist eine potentielle Zielstelle der Proteinkinase C. Weiterhin konnte über das Programm NetPhos 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos) für beide Serine eine hohe in vivo phosphorylierungswahrscheinlichkeit vorhergesagt werden.

Um die mögliche Beteiligung der potentiellen Phosphorylierungsstellen an Position 32 und 35 auf die Stabilität der Filamente von SYCP3 zu untersuchen, wurden diese Serine (S) mutiert,

5. Ergebnisse

und zwar zum einen zu Alanin (A), einer nicht phosphorylierbaren Aminosäure, und zum anderen zu Glutamat (E), einer Aminosäure die wegen ihrer negativen Ladung eine Phosphorylierung an dieser Position simuliert. Zunächst wurden die punktmultierten Proteine S32A-SYCP3 und S35A-SYCP3 (das Serin an Position 32 bzw. 35 wurde zu Alanin mutiert) in COS-7-Zellen exprimiert und die Verteilung der Proteine über Immunfluoreszenz nachgewiesen (vgl. Abbildung 5.9). S32A-SYCP3 und S35A-SYCP3 waren, ebenso wie das wildtypische SYCP3, in der Lage Filamente zu bilden (vgl. Abbildung 5.9 A, A', B und B'). Weiterhin wurde mittels Zellfraktionierung untersucht, ob diese Punktmutationen einen Einfluss auf die Stabilität des Polymers haben. Abbildung 5.8 zeigt, dass die Punktmutation der Serine an Position 32 und 35 zu Alanin keinen Einfluss auf die Stabilität der Filamente haben. Beide Punktmutanten konnten ebenso wie das wildtypische SYCP3, nach Hochsalz-Behandlung zum Teil im Überstand (HÜ) nachgewiesen werden, während ein Teil der Proteine unlöslich blieb und im Hochsalzpellet (HP) detektiert werden konnte (vgl. Abbildung 5.8, S32A-SYCP3 und S35A-SYCP3).

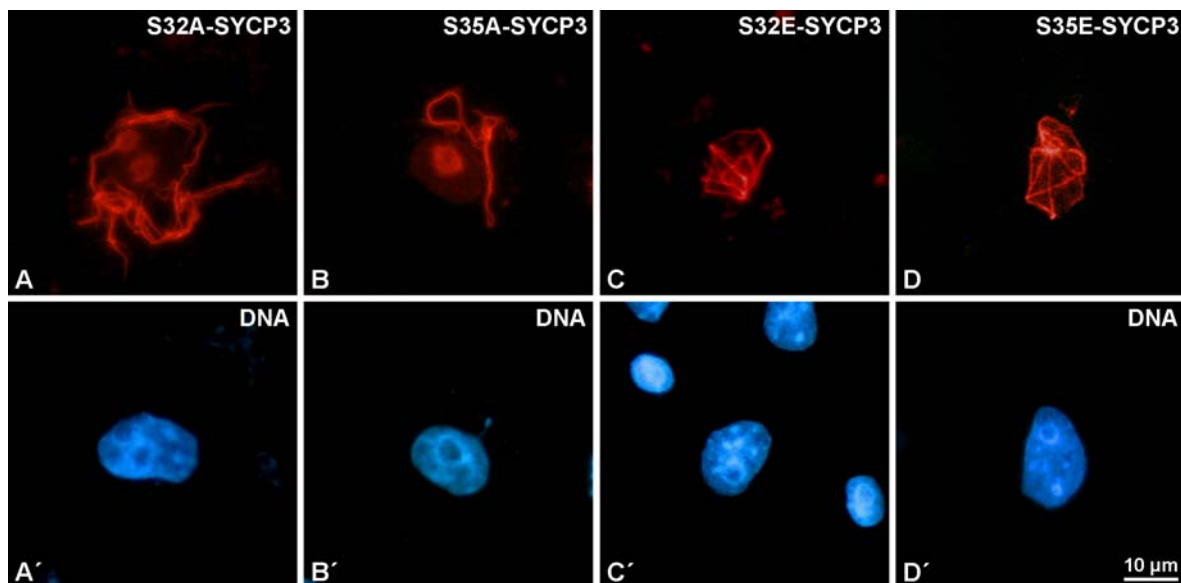


Abbildung 5.9: Expression von SYCP3 Punktmutanten in COS-7-Zellen. Austausch von Serin zu Alanin an Position 32 (A) bzw. 35 (B). Austausch von Serin zu Glutamat an der Position 32 (C) bzw. 35 (D). Der Nachweis der SYCP3 Mutanten erfolgte über Immunfluoreszenz mit dem spezifischen Antikörpern α -SYCP3 (A-D). Die DNA wurde mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 visualisiert (A'-D')

Die punktmultierten Proteine S32E-SYCP3 und S35E-SYCP3 (das Serin an Position 32 bzw. 35 wurde zu Glutamat mutiert) wurden ebenso in COS-7-Zellen exprimiert und die Verteilung der Proteine über Immunfluoreszenz nachgewiesen (vgl. Abbildung 5.9). Beide Punktmutanten waren in der Lage Filamenten zu bilden, diese waren aber im Vergleich zu

den wildtypischen Filamenten häufiger im Zellkern lokalisiert und das filamentöse Netzwerk war weniger stark ausgeprägt (vgl. Abbildung 5.9 C, C', D und D'). Um zu untersuchen ob eine simulierte Phosphorylierung der potentiellen Phosphorylierungsstellen an Position 32 bzw. 35 einen Einfluss auf die Stabilität von SYCP3 hat, wurden COS-7 Zellen, die S32E-SYCP3 und S35E-SYCP3 exprimieren, fraktioniert. Wie in Abbildung 5.8 zu sehen ist, gingen beide Punktmutanten nach der Hochsalz Behandlung komplett in den Überstand (HÜ), und es konnte kein SYCP3 im Hochsalzpellet (HP) nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 5.8, S32E-SYCP3 und S35E-SYCP3). Eine simulierte Phosphorylierung der Serine an Position 32 und 35 führte also dazu, dass die Proteine zwar die Fähigkeit besaßen Filamente zu bilden, diese zeigten aber eine geringere Stabilität. Im Gegensatz dazu wirkte sich eine fehlende Phosphorylierung der Serine 32 und 35 nicht auf die Stabilität der Filamente aus.

5.1.5 Elektronenmikroskopische Analyse von SYCP3 und filamentbildenden Mutanten

Um herauszufinden, ob es auf ultrastruktureller Ebene Unterschiede zwischen stabilen und weniger stabilen Filamenten gibt, wurde die genauere Struktur der Filamente auf elektronenmikroskopischer Ebene untersucht. Hierzu wurden COS-7 Zellen, die wildtypisches SYCP3 sowie filamentbildende Deletionsmutanten exprimieren, am Transmissionselektronenmikroskop analysiert (vgl. Abbildung 5.10).

In früheren Studien (Yuan et al., 1998) wurde bereits gezeigt, dass wildtypisches SYCP3, exprimiert in Kulturzellen, 5-10 nm dünne Filamente bildet, die sich lateral aneinander legen. So entstehen höher geordnete Strukturen mit einem definierten Bänderungsmuster, den so genannten parakristallinen Strukturen (vgl. Abbildung 5.10 A). Die Deletionsmutante Δ n86-SYCP3, welche der gesamte weniger konservierte N-Terminus fehlt, war immer noch in der Lage parakristalline Strukturen mit einem definierten Bänderungsmuster zu bilden (vgl. Abbildung 5.10 B). Die zwei konservierten Motive, CM1 und CM2 scheinen zusammen mit der „Coiled-Coil“-Domäne ausreichend zu sein um Filamente mit einer höher geordneten Struktur zu bilden. Auch hatte eine Deletion der Aminosäuren vor dem Antikörperbindungsepitop (Aminosäure 2-25) und der Aminosäuren zwischen Antikörperbindungsepitop und dem konservierten Motiv 1 (Aminosäure 42-86) keinen Einfluss auf die Organisation der Mutanten zu höher geordneten Strukturen (vgl. Abbildung 5.10 C und D). Die parakristallinen Strukturen von Δ 2-25-SYCP3 waren nicht von den wildtypischen zu unterscheiden. Δ 42-86-SYCP3 bildete auch parakristalline Strukturen, welche aber im Vergleich zu dem wildtypischen SYCP3 etwas weniger dicht wirkten.

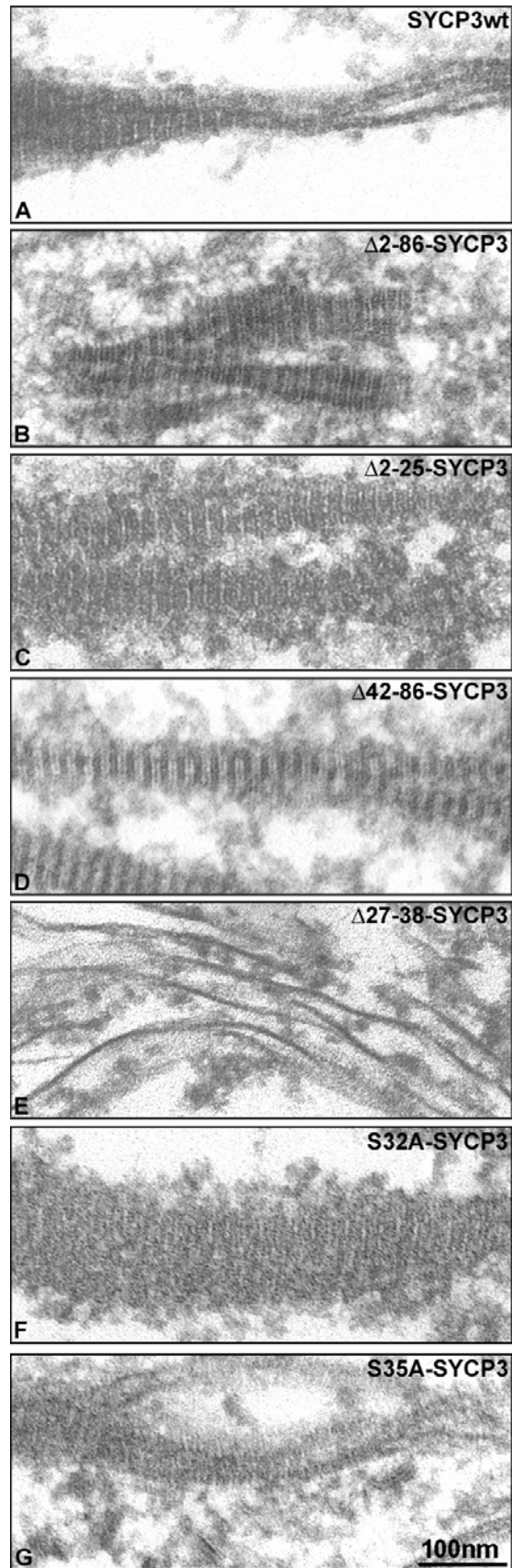


Abbildung 5.10: Elektronenmikroskopische Analyse von SYCP3 (A) und SYCP3-Mutanten (B-G) exprimiert in COS-7-Zellen. Die Proteine bilden höher geordnete parakristalline Strukturen mit einem definierten Bänderungsmuster.

5. Ergebnisse

Die Deletion des Antikörperbindungsepitop (Aminosäure 27- 38) führte allerdings dazu, dass das Protein $\Delta 27-38\text{myc-SYCP3}$ zwar noch dünne Einzelfilamente bilden konnte, jedoch war die laterale Aneinanderlagerung dieser Einzelfilamente zu ausgedehnten parakristallinen Strukturen nicht mehr möglich (vgl. Abbildung 5.10 E). Die 12 Aminosäuren des Antikörperbindungsepitop scheinen also wichtig für die laterale Aneinanderlagerung der Einzelfilamente zu sein. Die punktmutierten Proteine S32A-SYCP3 und S35A-SYCP3, die an Position 32 bzw. 35 nicht mehr phosphoryliert werden können, bilden ebenso wie das wildtypische SYCP3 parakristalline Strukturen aus (vgl. Abbildung 5.10 F und G). Eine fehlende Phosphorylierung hat also keinen Einfluss auf die Bildung von höher geordneten Strukturen.

Im Gegensatz dazu wirkt sich eine simulierte Phosphorylierung an den Positionen 32 und 35 auf die Bildung höher geordneten Strukturen drastisch aus. S35E-SYCP3 und S35E-SYCP3 konnten zwar noch Einzelfilamente bilden, die laterale Aneinanderlagerung dieser Einzelfilamente war aber im Vergleich zum wildtypischen SYCP3 gestört, wodurch die Strukturen weit weniger organisiert erscheinen (vgl. Abbildung 5.11).

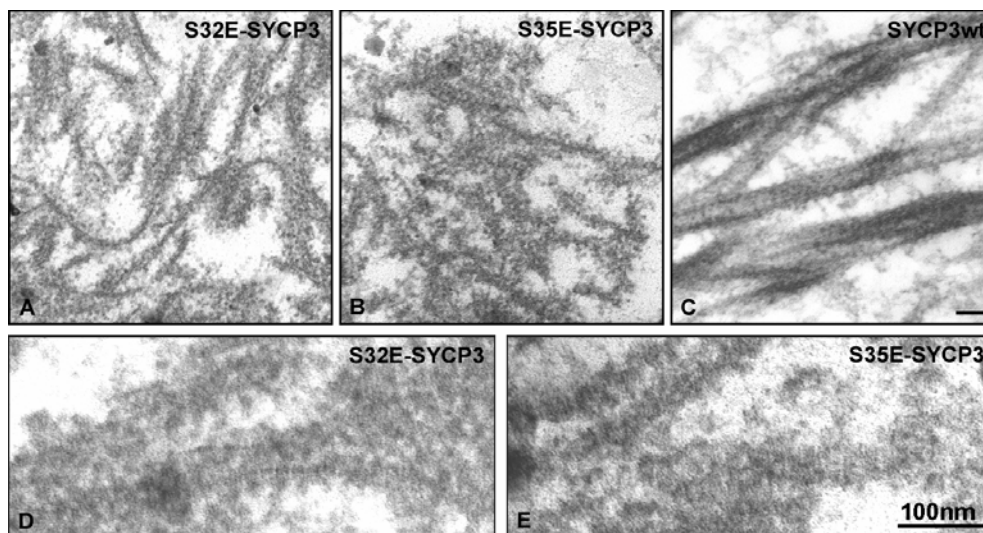


Abbildung 5.11: Elektronenmikroskopische Analyse von SYCP3 und SYCP3-Mutanten exprimiert in COS-7-Zellen. S32E-SYCP3 und S35E-SYCP3 in niedriger Vergrößerung (A, B) und in höherer Vergrößerung (D,E). Zum Vergleich der höher geordneten Strukturen wurde wildtypisches SYCP3 in niedriger Vergrößerung gezeigt (C).

Die elektronenmikroskopischen Analyse der Filamente mit den Zellfraktionierungen deuten darauf hin, dass der Bereich zwischen Aminosäure 26 und 39 wichtig für die laterale Aneinanderlagerung der Einzelfilamente von SYCP3 ist, was wiederum grundlegend ist für die Ausbildung von stabilen, höher geordneten Strukturen. Eine Phosphorylierung in diesem Bereich könnte die Aneinanderlagerung der Einzelfilamente stören, wodurch SYCP3 keine stabilen, höher geordneten Strukturen mehr ausbilden könnte.

5.1.6 SYCP3 aus Ratte wird in zwei Isoformen exprimiert

Wie in der Einleitung (vgl. 1.2.3.1) beschrieben, liefert SYCP3 aus Maus und Ratte eine 30 und eine 33 kDa Bande im Polyacrylamidgel (Heyting et al., 1987; Lammers et al., 1994), das homologe Protein von Hamster und Mensch dagegen wandern nur als eine 30 kDa Einzelbande im Polyacrylamidgel (Dobson et al., 1994; Miyamoto et al., 2003). Im Folgenden soll nun die Frage beleuchtet werden, wo der Unterschied zwischen den beiden 30 kDa bzw. 33 kDa Proteinbanden der Ratte liegt.

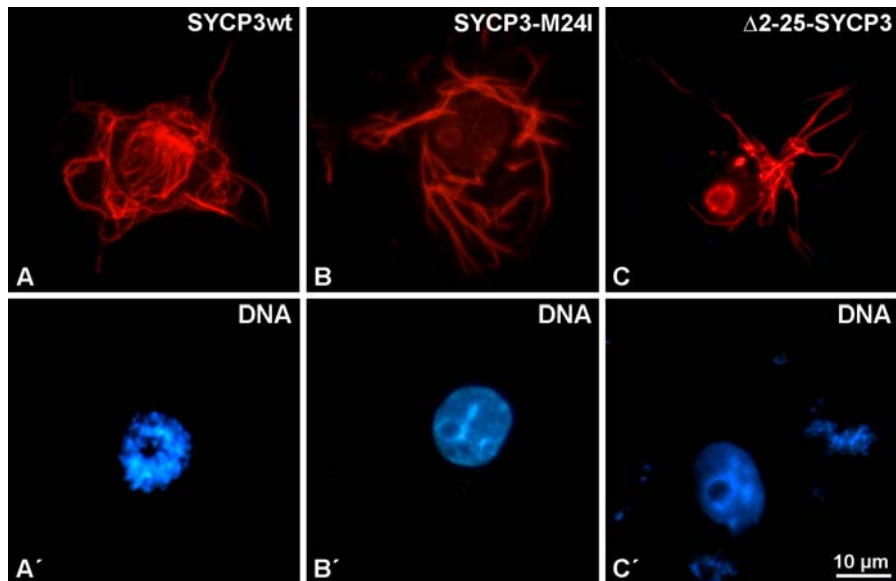


Abbildung 5.12: Expression von wildtypischen SYCP3 (A), der Punktmutante mit einem Austausch des Methionins an Position 24 zu Isoleucin (B) und der N-Terminal verkürzten Mutante (C) in COS-7 Zellen. Der Nachweis der SYCP3 Mutanten erfolgte über Immunfluoreszenz mit dem spezifischen Antikörpern α -SYCP3 (A-C). Die DNA wurde mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 visualisiert (A'-D').

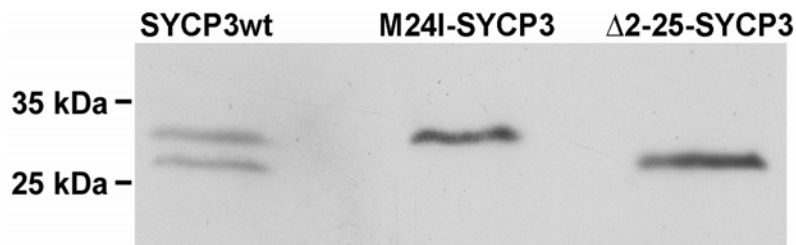


Abbildung 5.13: Immunblot von SYCP3 und SYCP3-Mutanten exprimiert in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen, welche die SYCP3-Konstrukte exprimierten wurden für die Gelelektrophorese vorbereitet und in einer 16%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis von SYCP3wt, M24I-SYCP3 und Δ 2-25-SYCP3 erfolgte mit den spezifischen Antikörpern α -SYCP3

Botelho und Mitarbeiter zeigten durch Datenbankanalysen dass die *SYCP3* Gene in Ratte, Maus und Hamster neun Exons besitzen, wobei beim Hamster das Exon 1 nicht abgelesen wird. In Hamster fehlt das Startcodon ATG im Exon 1, das in Ratte und Maus vorhanden ist. Das Startcodon ATG scheint bei Hamster im Exon 2 zu liegen und zwar an einer Position in der auch das Ratten und Maus *SYCP3* Gen ein ATG-Codon besitzt. Im Vergleich zum ersten ATG in Ratte und Maus ist das ATG in Exon 2 von Fisch bis Mensch konserviert. Dieses ATG liegt bei der Ratte im Leseraster zum ATG in Exon 1 und könnte als alternatives Startcodon fungieren. Um herauszufinden, ob die zwei Proteinbanden in Ratte durch einen alternativen Start am ersten bzw. am zweiten ATG zu erklären sind, wurden zwei Mutanten von *SYCP3* hergestellt. Zum einen wurde das ATG an Position 24 zu ATC mutiert, wodurch das Methionin (ATG) zu einem Isoleucin (ATC) umgewandelt wurde, das nicht mehr als Startcodon fungieren kann (M24I-*SYCP3*). Als zweite Mutante wurde ein N-Terminal verkürztes *SYCP3* hergestellt, das den homologen Proteinen in Hamster und Mensch entsprechen sollte (Δ 2-25-*SYCP3*). In einem parallelen Versuchsansatz wurden COS-7-Zellen, die entweder M24I-*SYCP3*, Δ 2-25-*SYCP3* oder zum Vergleich *SYCP3*wt exprimieren, über Immunfluoreszenz und Immunblot analysiert (vgl. Abbildung 5.12 und 5.13). Beide *SYCP3* Mutanten waren in der Lage, ebenso wie das wildtypische *SYCP3*, Filamente zu bilden (vgl. Abbildung 5.12 A-C). Im Immunblot lieferte *SYCP3*wt wie erwartet zwei Proteinbanden mit der molekularen Masse von 30 und 33 kDa. M24I-*SYCP3* dagegen lief als einzelne Proteinbande, und zwar auf der gleichen Höhe wie die 33 kDa Bande des wildtypischen *SYCP3*. Δ 2-25-*SYCP3* lief ebenfalls als einzelne Proteinbande aber auf der gleichen Höhe wie die 30 kDa Bande des wildtypischen *SYCP3* (vgl. Abbildung 5.13). Dieses Experiment deutet darauf hin, dass das wildtypische *SYCP3* in zwei Isoformen exprimiert wird. Die längere Isoform beginnt mit dem ersten ATG und liefert ein Protein mit 257 Aminosäuren das eine molekulare Masse von 33 kDa hat. Die zweite Isoform beginnt mit dem zweiten ATG, ist somit N-terminal um 24 Aminosäuren verkürzt und hat eine molekulare Masse von 30 kDa.

5.1.7 Δ CM2-*SYCP3* hat einen dominant-negativen Effekt auf die Filamentbildung von *SYCP3*

In einem weiteren Versuchsansatz sollte die Frage geklärt werden, warum eine Mutation von *SYCP3* im Mensch, die zu einer Verkürzung des C-Terminus führt bereits bei Heterozygoten Azoospermie zur Folge hat. Miyamoto und Mitarbeiter zeigten, dass beim Mensch die C-terminale Region von *SYCP3* wichtig für die Filamentbildung ist und dass Patienten, die eine heterozygote Deletion in diesem Bereich von *SYCP3* haben, unfruchtbar sind. Ähnlich konnte für das Ratten *SYCP3* gezeigt werden, dass eine Deletion der letzten sechs

5. Ergebnisse

Aminosäuren keine Filamentbildung von SYCP3, exprimiert in COS-7-Zellen, zulässt (vgl. Abbildung 5.6 D). Im folgenden Versuchsansatz soll gezeigt werden, dass die nicht-filamentbildende Deletionsmutante Δ CM2-SYCP3, der die letzten 6 Aminosäuren fehlen, einen dominant negativen Effekt auf die Filamentbildung von wildtypischen SYCP3 hat. Dies könnte zu einem gestörten SC-Aufbau führen und würde die Unfruchtbarkeit in den oben beschriebenen Patienten erklären. Hierzu wurde eine Kotransfektion des wildtypischen SYCP3 und Δ CM2-SYCP3 aus Ratte in COS-7-Zellen durchgeführt. Das experimentelle Problem, dass der SYCP3-spezifische Antikörper sowohl das Wildtypische als auch die C-terminal verkürzte Mutante, erkennt, wurde gelöst, indem SYCP3 Konstrukte verwendet wurden, welche N-Terminal mit einem myc-Epitop bzw. mit einem HA-Epitop fusioniert waren. Wie bereits L. Yuan und Mitarbeitern zeigen konnten hat die Fusion eines „FLAG“-Epitop, am N-Terminus von SYCP3, keinen Effekt auf die Filamentbildung (Yuan et al., 1998) weswegen die Verwendung des myc- bzw. HA-Epitop keinen Einfluss auf die Lokalisation der SYCP3 Proteine haben sollte. Wie erwartet, bildete das myc-SYCP3 Filamente (vgl. Abbildung 5.14 A), während das HA- Δ CM2-SYCP3 in Aggregat im Zellkern lokalisierte (vgl. Abbildung 5.14 B und B'). Wurden beide Konstrukt in COS-7-Zellen koexprimiert (vgl. Abbildung 5.14 C-C'''), war myc-SYCP3 nicht mehr in der Lage Filamente zu bilden (vgl. Abbildung 5.14 C). Beide Proteine kolokalisierten in Aggregaten im Zellkern (vgl. Abbildung 5.14 C'''), was durch einen dominant negativen Effekt von HA- Δ CM2-SYCP3 auf myc-SYCP3 zu erklären ist.

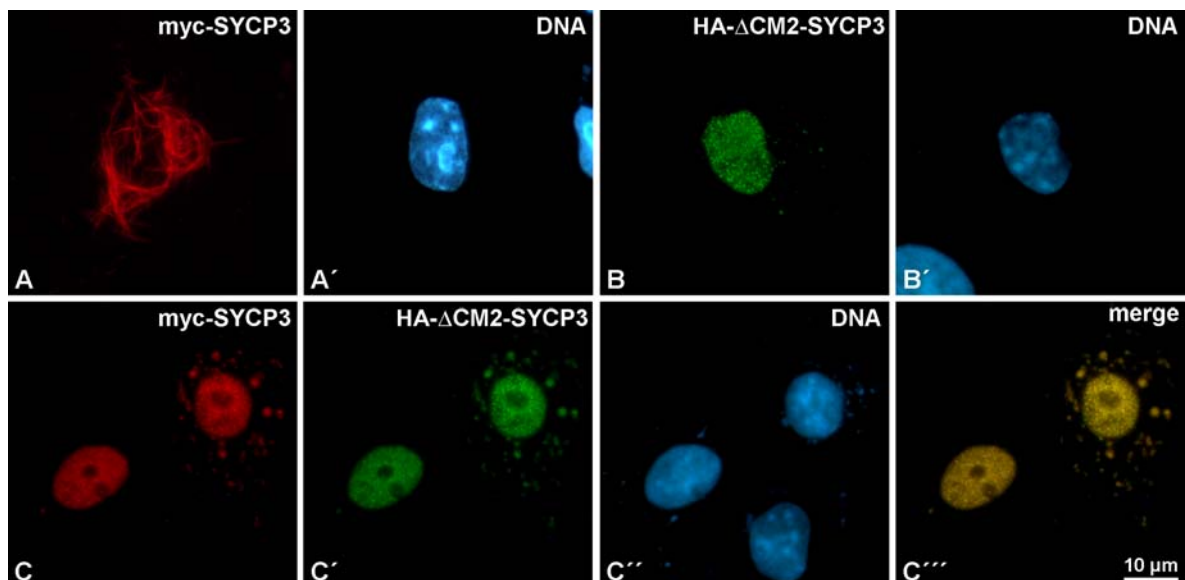


Abbildung 5.14: Expression von myc-SYCP3 (A), HA- Δ CM2-SYCP3 (B) und Koexpression von myc-SYCP3 und HA- Δ CM2-SYCP3 (C, C') in COS-7-Zellen. Der Nachweis der SYCP3-Proteine erfolgte über Immunfluoreszenz mit dem spezifischen Antikörper α -myc (A, C) und α -HA (B, C'). In C''' sind die übereinander gelagerten Signale von myc-SYCP3 und HA- Δ CM2-SYCP3 dargestellt. Die DNA wurde mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 visualisiert (A', B', C'').

5.2 Vergleich der Eigenschaften von SYCP3 zwischen den evolutionär entfernten Vertebraten Ratte und Fisch

Bisher stammen fast alle Informationen über Vertebraten SC-Proteine aus Säugern und da vor allem aus Maus, Ratte und Hamster. Um den SC Aufbau und dessen Funktion besser verstehen zu können ist es aber wichtig orthologe SC Proteine zwischen taxonomisch entfernten Spezies zu vergleichen. Kürzlich wurde das Expressionmuster der SC Proteine SYCP1 und SYCP3 in der Fischart Medaka (*Oryzias latipes*) charakterisiert (Iwai et al., 2006) wodurch es nun möglich ist, Eigenschaften von SC Proteinen von evolutionär entfernten Spezies zu vergleichen. In dieser Arbeit sollte untersucht werden ob und in wie weit die Polymerisationseigenschaften von SYCP3 zwischen Ratte und Medaka konserviert sind.

5.2.1 Sequenzvergleich von SYCP3 aus Ratte und Medaka

Wichtige Informationen über die möglich konservierte Funktion von SYCP3 kann man durch den Vergleich von orthologen Proteinen aus taxonomisch entfernten Spezies ziehen. Man geht davon aus, dass in der Evolution konservierte Domänen eines Proteins essentiell für dessen Funktion sind. Um nun herauszufinden, welche Bereiche von SYCP3 zwischen Ratte und Medaka evolutionär konserviert sind wurden beide Proteine auf Aminosäureebene miteinander verglichen. Die Sequenzanalyse und der Vergleich von SYCP3 aus Ratte (Q63520) und Medaka (BAD36840) wurden mit dem frei zugänglichen Online Tool BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) und ClustalW (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) durchgeführt.

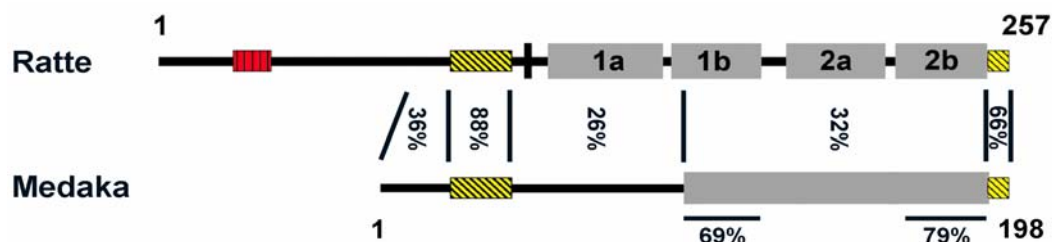


Abbildung 5.15: Schematische Darstellung von SYCP3 aus Ratte (Q63520) und SYCP3 aus Medaka (BAD36840). Grauer Balken: „Coiled-Coil“-Domäne; schwarze Linie: nicht-helikale Bereiche und Linker-Regionen zwischen den α -Helices der „Coiled-Coil“-Domänen; schwarze Senkrechtlinie: putatives Kernlokalisierungssignal (NLS); roter Balken: Antikörperbindungsepitop (AB); gelbe Balken: Konserviertes Motiv 1 (CM1) und konserviertes Motiv 2 (CM2). Die Übereinstimmung beider Proteine auf Aminosäureebene ist in Prozent angegeben.

Wie unter 5.1.2 bereits beschrieben, besteht das SYCP3 der Ratte aus 257 Aminosäuren und kann in drei Domänen unterteilt werden: eine in der C-terminalen Hälfte lokalisierte α -helikale Domäne, die typisch für die Ausbildung von „Coiled-Coil“-Strukturen ist, flankiert von zwei nicht helikalen Domänen. Das Medaka SYCP3 ist mit 198 Aminosäuren deutlich kürzer und weist auf Aminosäureebene deutliche Unterschiede zum SYCP3 der Ratte auf. Die Domänenorganisation ist allerdings mit der α -helikalen Domäne und den zwei flankierenden nicht helikalen Domänen zwischen Medaka und Ratte konserviert (vgl. Abbildung 5.15). Die α -helikale Domäne des Medaka SYCP3 ist zwar kürzer und besitzt mit 32% eine relativ niedrige Übereinstimmung mit der α -helikale Domäne des Ratten SYCP3, jedoch weisen die Randbereiche der α -helikale Domäne zwischen Ratte und Medaka eine hohe Übereinstimmung von 69% und 70% auf. Die zwei konservierten Motive im C- und N-Terminus (CM1 und CM2) besitzen mit 88% bzw. 66% auch eine relativ hohe Übereinstimmung auf Aminosäureebene. Alle weiteren Domänen weisen mit 26-36% eine geringe Übereinstimmung zwischen beiden Proteinen auf.

5.2.2 Charakterisierung des Medaka SYCP3

Zunächst sollte untersucht werden, ob SYCP3 auch in niederen Vertebraten eine grundlegende Komponente des SC Aufbaus ist. Zum einen sollte die Lokalisation des Medaka SYCP3 am meiotischen Chromosom und zum anderen die Eigenschaften des Proteins, exprimiert im heterologen System, untersucht werden.

Um SYCP3 aus Medaka näher charakterisieren zu können, wurde zunächst ein polyklonaler Antikörper im Kaninchen hergestellt (vgl. 3.1.4). Wie erwartet, erkannte der Medaka SYCP3 Antikörper die Lateralelemente der Medaka SCs. In der Immunfluoreszenz konnten die SCs an gespreiteten (vgl. 4.5.2) Pachytän-Spermatocyten nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 5.16 A-A''). Über elektronenmikroskopische Immungoldlokalisierung konnte SYCP3 an den Lateralelementen der Medaka SCs detektiert werden (vgl. Abbildung 5.16 B). Im Immunblot von Medaka Hodengewebe erkannte der Antikörper eine einzelne 27 kDa große Proteinbande, welche spezifisch für das Medaka SYCP3 ist (vgl. Abbildung 5.16 C).

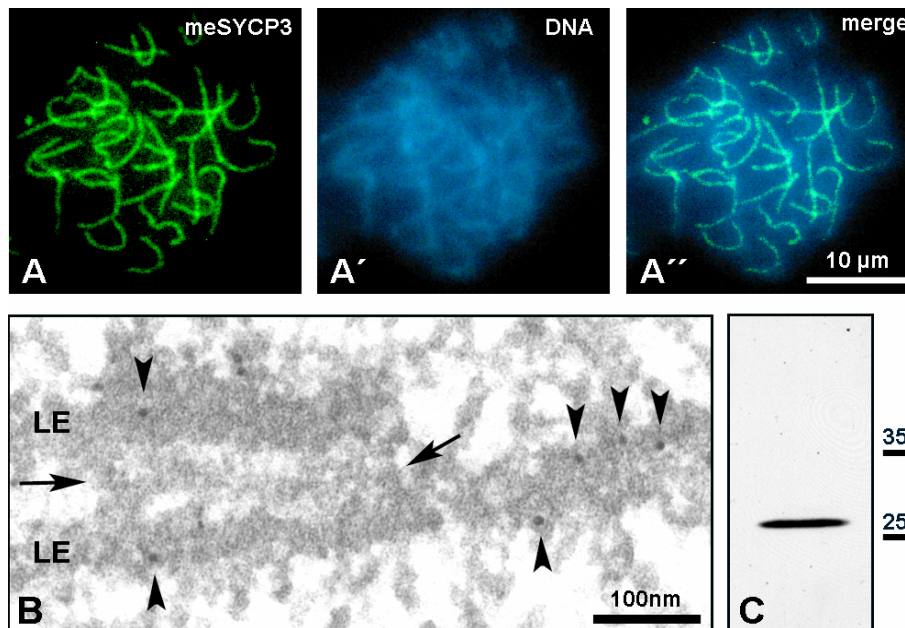


Abbildung 5.16: (A-A'') Immunfluoreszenz auf gespreiteten Pachytänspermatozyten aus Medaka. Der Nachweis von meSYCP3 erfolgte über Immunfluoreszenz mit dem spezifischen Antikörper α -meSYCP3 (A). Die DNA wurde mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 visualisiert (A'). In A'' sind die übereinander gelagerten Signale von meSYCP3 und DNA dargestellt. (B) Immungold-lokalisation von meSYCP3 auf Medaka Synaptonemalkomplexen. Die Goldpartikel (Pfeilköpfe) lokalisieren auf den Lateralelementen (LE). Das zentrale Element ist mit Pfeilen gekennzeichnet. (C) Immunblot von Medaka Hodengewebe. Der Nachweis von meSYCP3 mit dem spezifischen Antikörper α -meSYCP3, der eine einzelne 27 kDa Proteinbande erkennt. Größenstandard ist in kDa angegeben

Um das SYCP3 aus Medaka mit dem der Ratte vergleichen zu können, mussten zunächst die Polymerisationseigenschaften von Medaka SYCP3 analysiert werden. Hierzu wurde ein Plasmid hergestellt, welches es erlaubt das wildtypische Medaka SYCP3 in eukaryontischen Zellen zu exprimieren. Das kodierende Proteinprodukt ist in Abbildung 5.15 schematisch dargestellt und die genaue Vorgehensweise der Klonierung ist in Kapitel 3.6 aufgeführt. Die Verteilung und das Verhalten des, in COS-7-Zellen exprimierten, Medaka SYCP3 wurde über Immunfluoreszenz, Transmissionselektronenmikroskopie und biochemische Methoden untersucht.

Zunächst wurde, in COS-7 Zellen exprimiertes, wildtypischen Medaka SYCP3 (meSYCP3wt) über Immunfluoreszenz nachgewiesen (vgl. Abbildung 5.17). MeSYCP3 bildete Filamente, die netzartig im Cytoplasma und/oder im Zellkern verteilt waren. Die cytoplasmatische Polymerisation von meSYCP3, eines meiotischen Kernproteins, ist nicht ungewöhnlich und lässt sich durch die starke Überexpression in COS-7 Zellen erklären. Wurden diese Filamente am Elektronenmikroskop analysiert, konnten dünne Einzelfilamente identifiziert werden, die sich lateral, zu höher geordneten, parakristallinen Strukturen mit einem

5. Ergebnisse

definierten Bänderungsmuster aneinanderlagerten. Das charakteristische Querstreifenmuster mit einer helleren und einer dunkleren Linie wiederholte sich alle 20 nm (vgl. Abbildung 5.18). Solche parakristallinen Strukturen wurden auch für SYCP3 der Ratte beschrieben (vgl. 6.1.1), obwohl hier die helle Linie deutlich dünner erscheint (vgl. Abbildung 5.10).

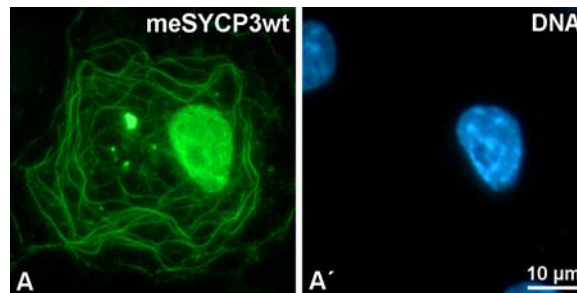


Abbildung 5.17: Expression von wildtypischem SYCP3 in COS-7 Zellen. Der Nachweis von meSYCP3wt erfolgte über Immunfluoreszenz mit dem spezifischen Antikörper α -meSYCP3 (A). Die DNA wurde mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 visualisiert (A').

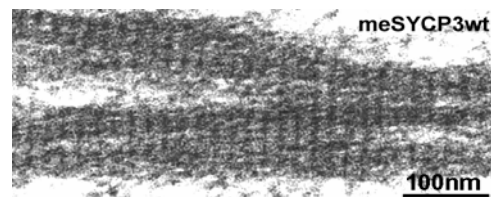


Abbildung 5.18: elektronenmikroskopische Analyse von meSYCP3wt exprimiert in COS-7-Zellen. Die Proteine bilden höher geordnete parakristalline Strukturen mit einem definierten Bänderungsmuster.

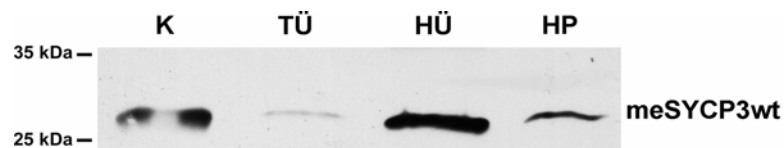


Abbildung 5.19: Analyse der Stabilität von meSYCP3wt, exprimiert in COS-7-Zellen, durch Extraktion der Zellen mit Niedrig- und Hochsalzpuffern. Zur Analyse der Stabilität von Strukturen wurden Suspensionen von transfizierten COS-7-Zellen verwendet. Die Hälfte der Zellen wurde als unbehandelte Kontrolle (K) direkt für die Gelelektrophorese eingesetzt, die andere Hälfte wurde zunächst in Niedrigsalzpuffern und Triton™ X-100 extrahiert. Der Überstand wurde als Tritonüberstand (TÜ) gesammelt, das Pellet sukzessiv mit DNase I und 1 M NaCl extrahiert. Der resultierende Überstand wurde als Hochsalzüberstand (HÜ), das Pellet, das unlösliche Proteine enthält, als Hochsalz-Pellet (HP) gesammelt. Die Proben wurden für die Gelelektrophorese vorbereitet und in einer 16%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis von meSYCP3wt erfolgte über Immunblot mit den spezifischen Antikörpern α -meSYCP3.

Als nächstes wurden COS-7 Zellen, die meSYCP3wt exprimieren, fraktioniert um die Stabilität dieser Filamente zu testen (vgl. 5.1.4). Das meSYCP3wt, ging, ebenso wie das wildtypische SYCP3 der Ratte, nach Hochsalz Behandlung zum Teil in den Überstand (HÜ), während ein Teil des Proteins unlöslich blieb und im Hochsalzpellet (HP) nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 5.19).

Vergleicht man nun die Eigenschaften von SYCP3 aus Medaka und Ratte lässt sich neben einer konservierten Domänenorganisation auch ein ähnliches Verhalten beider Proteine nachweisen. Obwohl die orthologen Proteine aus taxonomisch entfernten Spezies stammen, haben beide Proteine die Fähigkeit Filamente zu bilden. Diese Filamente besitzen eine höher geordnete parakristaline Struktur mit einem definierten quergestreiften Muster. Diese Polymerstrukturen weisen zudem eine ähnlich hohe Stabilität auf. Zusammenfassend kann man sagen, dass das Medaka SYCP3 wegen seiner Verteilung am meiotischen Chromosom und wegen seiner ähnlichen Eigenschaften verglichen mit dem SYCP3 der Ratte, eine grundlegende Komponente des SC Aufbaus in niederen Vertebraten zu sein scheint.

5.2.3 Vergleich der Polymerisationseigenschaften zwischen SYCP3 aus Ratte und Medaka

Da SYCP3 aus Medaka und Ratte eine konservierte Domänenorganisation aufweisen und sich in der Zellfraktionierung ähnlich verhalten, sollte im Folgenden untersucht werden, in wie weit die Polymerisationseigenschaften von SYCP3 in der Evolution konserviert sind. Hierzu wurden Medaka und Ratten SYCP3 Konstrukte zusammen in COS-7-Zellen koexprimiert. Dabei wurde untersucht, ob beide Proteine miteinander interagieren und polymerisieren können.

Für diese Koexpressionsexperimente musste zunächst ausgeschlossen werden, dass es zu einer Kreuzreaktion zwischen den spezifischen Antikörpern gegen das Medaka und Ratten SYCP3 kommt (vgl. Abbildung 5.20). Hierzu wurden einmal COS-7-Zellen, die SYCP3 der Ratte exprimierten, mit dem SYCP3 Antikörpern gegen Ratte und Medaka inkubiert und über Doppel-Immunfluoreszenz (vgl. Abbildung 5.20 A-A´) und Immunblot (vgl. Abbildung 5.20 C und D) gezeigt, dass nur der rattenspezifische SYCP3 Antikörper das SYCP3 aus Ratte erkannte (vgl. Abbildung 5.20 A und C), der medakaspezifische Antikörper dagegen kein Signal lieferte (vgl. Abbildung 5.20 A´ und D). Umgekehrt wurden dann COS-7-Zellen, die das Medaka SYCP3 exprimierten, mit dem SYCP3 Antikörpern gegen Ratte und Medaka inkubiert und über Doppel-Immunfluoreszenz (vgl. Abbildung 5.20 B-B´) und Immunblot (vgl. Abbildung 5.20 C und D) gezeigt, dass nur der medakaspezifische SYCP3 Antikörper das SYCP3 aus Medaka erkannte (vgl. Abbildung 5.20 B´ und D) während der rattenspezifische Antikörper dagegen kein Signal lieferte (vgl. Abbildung 5.20 B und C).

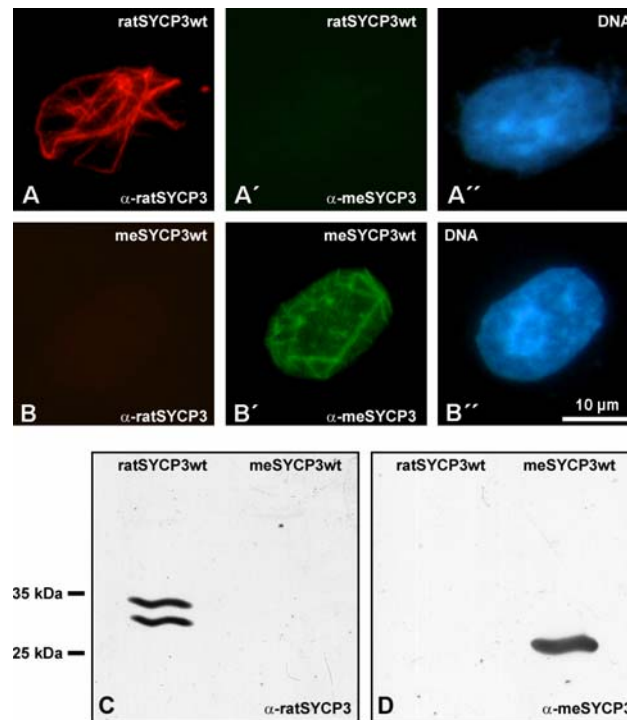


Abbildung 5.20: Expression des rattenspezifischen SYCP3 (A, A') bzw. des Medaka SYCP3 (B, B') in COS-7 Zellen. Der Nachweis von ratSYCP3wt erfolgte über Immunfluoreszenz mit dem spezifischen Antikörper α -ratSYCP3 (A) und α -meSYCP3 (A'). Der Nachweis von meSYCP3wt erfolgte über Immunfluoreszenz mit dem spezifischen Antikörper α -ratSYCP3 (B) und α -meSYCP3 (B'). Die DNA wurde mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 visualisiert (A'', B''). Immunblot von ratSYCP3wt und meSYCP3wt exprimiert in COS-7-Zellen (C, D). COS-7-Zellen, die die SYCP3-Konstrukte exprimierten wurden für die Gelelektrophorese vorbereitet und in einer 16%igen SDS-PAGE aufgetrennt. (C) Der Nachweis von ratSYCP3wt und meSYCP3wt erfolgte mit den spezifischen Antikörpern α -ratSYCP3. (D) Der Nachweis von ratSYCP3wt und meSYCP3wt erfolgte mit den spezifischen Antikörpern α -meSYCP3.

Da keine Kreuzreaktion zwischen dem rattenspezifischen SYCP3 Antikörper aus Meerschweinchen und dem medakaspezifischen Antikörper aus Kaninchen festgestellt werden konnte, war es möglich beide SYCP3-Antikörper für Kotransfektionsexperimente mit SYCP3 aus Medaka und Ratte einzusetzen.

Zunächst wurde das wildtypische SYCP3 aus Medaka und Ratte in COS-7-Zellen koexprimiert und die Zellen gleichzeitig mit beiden SYCP3 Antikörpern inkubiert (vgl. Abbildung 5.21). Die Doppel-Immunfluoreszenz zeigte, dass sowohl das meSYCP3wt (vgl. Abbildung 5.21 A) wie auch das ratSYCP3wt (vgl. Abbildung 5.21 B), eine filamentöse Verteilung aufwies, wobei die Signale beider Proteine kolokalisierten (vgl. Abbildung 5.21 A''').

5. Ergebnisse

Nun stellte sich die Frage, ob diese Kolo­kalisierung der Signale von SYCP3 aus Medaka und Ratte damit zu erklären ist, dass beide Proteine zusammen am Aufbau der Filamente beteiligt sind, oder ob jedes Protein für sich Filamente bildet, die nur an den gleichen Stellen in COS-7-Zellen lokalisieren. Um diese Frage zu klären, wurden die koexprimierten Filamente auf elektronenmikroskopischer Ebene untersucht und mit den Filamenten, die SYCP3 aus Medaka und Ratte in Einzeltransfektionsexperimenten bildet, verglichen (vgl. Abbildung 5.22). Auf elektronenmikroskopischer Ebene konnte nun gezeigt werden, dass die Filamente aus den Koexpressionen höher geordnete, parakristalline Strukturen bilden (vgl. Abbildung 5.22 C), die zwar ähnlich zu den jeweiligen parakristallinen Strukturen von Medaka SYCP3 (vgl. Abbildung 5.22 B) und SYCP3 der Ratte sind, sich aber dennoch im Bänderungsmuster unterscheiden (vgl. Abbildung 5.22 A). Die ultrastrukturelle Analyse der Filamente deutete also darauf hin, dass SYCP3 aus Medaka und Ratte gemeinsam am Aufbau der Filamente beteiligt sind.

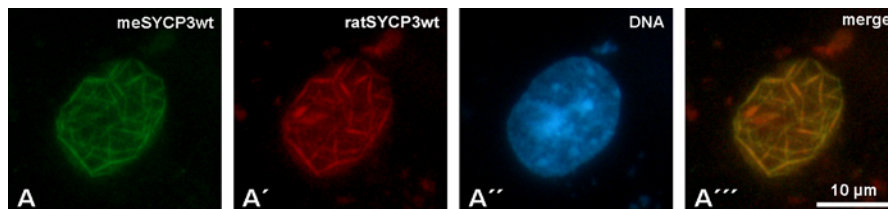


Abbildung 5.21: Koexpression von meSYCP3wt (A) und ratSYCP3wt (A') in COS-7-Zellen. Der Nachweis der SYCP3-Proteine erfolgte über Immunfluoreszenz mit dem spezifischen Antikörper α -meSYCP3 (A) und α -ratSYCP3 (A'). In A''' sind die übereinander gelagerten Signale von meSYCP3wt und ratSYCP3wt dargestellt. Die DNA wurde mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 visualisiert (A'').

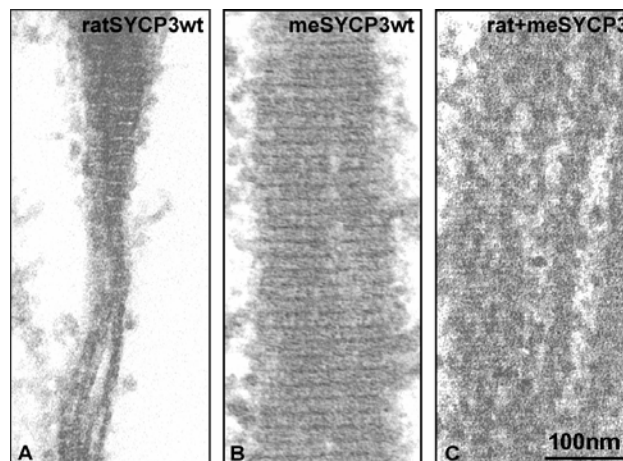


Abbildung 5.22: Elektronenmikroskopische Analyse von ratSYCP3wt (A), meSYCP3wt (B) exprimiert in COS-7-Zellen und von koexprimierten Ratten und Medaka SYCP3 (C). RatSYCP3wt, meSYCP3wt und die Mischfilamente aus beiden Proteinen bilden höher geordnete parakristalline Strukturen mit einem definierten Bänderungsmuster, die sich voneinander unterscheiden.

5. Ergebnisse

In weiteren Experimenten sollte gezeigt werden, dass SYCP3 aus Medaka und Ratte eine Interaktion miteinander eingehen können.

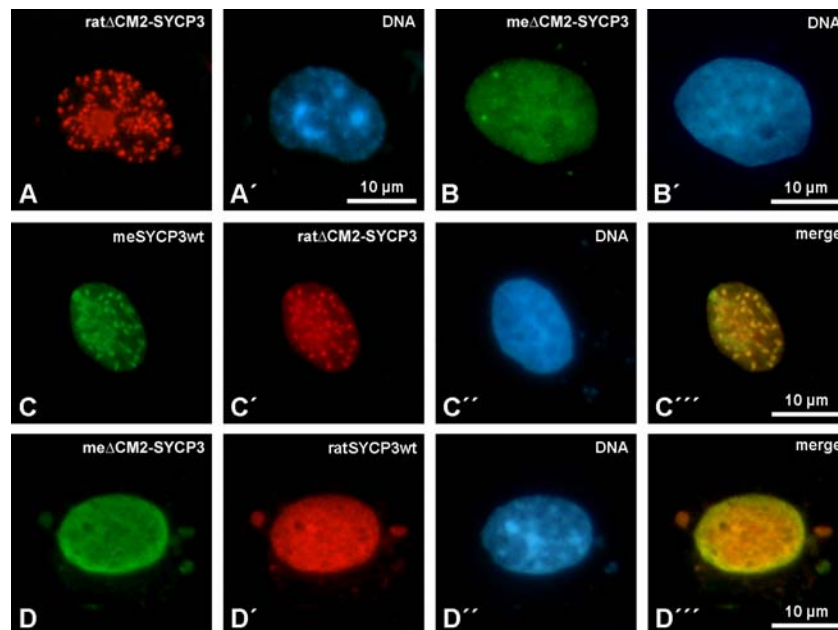


Abbildung 5.23: Expression von rat Δ CM2-SYCP3 (A), me Δ CM2-SYCP3 (B) und Koexpression von meSYCP3wt mit rat Δ CM2-SYCP3 (C, C''') und me Δ CM2-SYCP3 mit ratSYCP3wt (D, D''') in COS-7-Zellen. Der Nachweis der SYCP3-Proteine erfolgte über Immunfluoreszenz mit dem spezifischen Antikörper α -ratSYCP3 (A, C', D') und α -meSYCP3 (B, C, E). In C''' und sind die übereinander gelagerten Signale von meSYCP3 und rat Δ CM2-SYCP3 dargestellt. In D''' und sind die übereinander gelagerten Signale von me Δ CM2-SYCP3 und ratSYCP3 dargestellt. Die DNA wurde mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 visualisiert (A', B', C'', D'').

Hierzu wurde das komplette filamentbildende Medaka SYCP3 mit der C-terminalen SYCP3 Deletionsmutante, Δ CM2-SYCP3, der Ratte in COS-7-Zellen koexprimiert. Wie auch unter 5.1.3 beschrieben wurde, kann rat Δ CM2-SYCP3, keine Filamente bilden sondern lokalisiert aggregatförmig im Zellkern (vgl. Abbildung 5.6 D und D' und 5.23 A und A'). Außerdem wurde bereits erläutert, dass rat Δ CM2-SYCP3 einen dominant-negativen Effekt auf die Filamentbildung von SYCP3wt der Ratte hat (vgl. 5.1.7). Im Folgenden konnte nun gezeigt werden, dass rat Δ CM2-SYCP3 auch einen dominant-negativen Effekt auf die Filamentbildung von meSYCP3wt hatte, denn in Koexpressionsexperimenten war meSYCP3wt nicht mehr in der Lage Filamente zu bilden, sondern kolokalisierte in Aggregaten mit dem rat Δ CM2-SYCP3 im Zellkern (vgl. Abbildung 5.23 C-C'''). Dieser dominant-negative Effekt von rat Δ CM2-SYCP3 auf meSYCP3wt deutet auf eine direkte Interaktion beider Proteine hin. Im umgekehrten Fall, der Koexpression von kompletten filamentbildenden Ratten SYCP3 mit der C-terminalen SYCP3 Deletionsmutante, Δ CM2-SYCP3 aus Medaka, konnte das gleiche

5. Ergebnisse

Ergebnis erzielt werden. Wie in Abbildung 5.23 B und B' zu sehen ist, kann me Δ CM2-SYCP3 keine Filamente mehr bilden sondern lokalisiert aggregatförmig im Zellkern. In den kotransfizierten COS-7 Zellen war das ratSYCP3wt nicht mehr in der Lage Filamente zu bilden, sondern kolokalisierte in Aggregaten mit dem me Δ CM2-SYCP3 im Zellkern (vgl. Abbildung 5.23 D-D''). Dieser dominant-negative Effekt von me Δ CM2-SYCP3 auf das wildtypische SYCP3 der Ratte ist ein weiterer Hinweis auf die Fähigkeit beider Proteine direkt miteinander zu interagieren.

Aus den Kotransfektionsexperimenten von SYCP3 aus Medaka und Ratte kann man folgern, dass die Polymerisationseigenschaften beider SYCP3 Proteine in der Evolution konserviert geblieben sind. Obwohl die orthologen SYCP3 Proteine aus den taxonomisch entfernten Spezies sich auf Aminosäureebene deutlich unterscheiden, können beide Proteine miteinander interagieren und zu höher geordneten Strukturen kopolymerisieren.

6 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Beitrag zum besseren Verständnis des Auf- und Abbaus der Lateralelemente (LEs) des Synaptonemalkomplexes (SC) geleistet werden. Hierzu wurden die Eigenschaften des Proteins SYCP3, eine Hauptstrukturkomponente des SC in Vertebraten, die notwendig für den Aufbau der LEs ist (Yuan et al., 2000; Liebe et al., 2004), näher untersucht. Da der Mechanismus der Polymerisation und Depolymerisation von SYCP3 weitgehend unbekannt war, sollte zum einen die Rolle verschiedener Domänen bei dessen Polymerisation analysiert werden. Weiterhin wurden die Eigenschaften von SYCP3 in den evolutionär entfernten Vertebraten Ratte und Fisch verglichen um herauszufinden inwieweit die Polymerisationseigenschaften von SYCP3 konserviert sind.

6.1 Polymerisationseigenschaften von SYCP3

In einer molekularen phylogenetischen Analyse wurde gezeigt, dass SYCP3 in Säugern, Vögeln, Amphibien und Fischen evolutionär konserviert geblieben ist und eine monophyletische Gruppe von orthologen Sequenzen in Vertebraten bildet (vgl. Abbildung 6.1). Das bedeutet, dass die Proteinsequenz von SYCP3 der Vertebraten von einer gemeinsamen Sequenz abstammt. Diese unterscheidet sich deutlich sowohl von den Proteinsequenzen XLR, SLY und XLR3a/b, welche in Nagern als SYCP3-ähnlichen Proteine beschrieben wurden, als auch von SYCP2, einem weiteren Lateralelementprotein (Baier et al., 2007b).

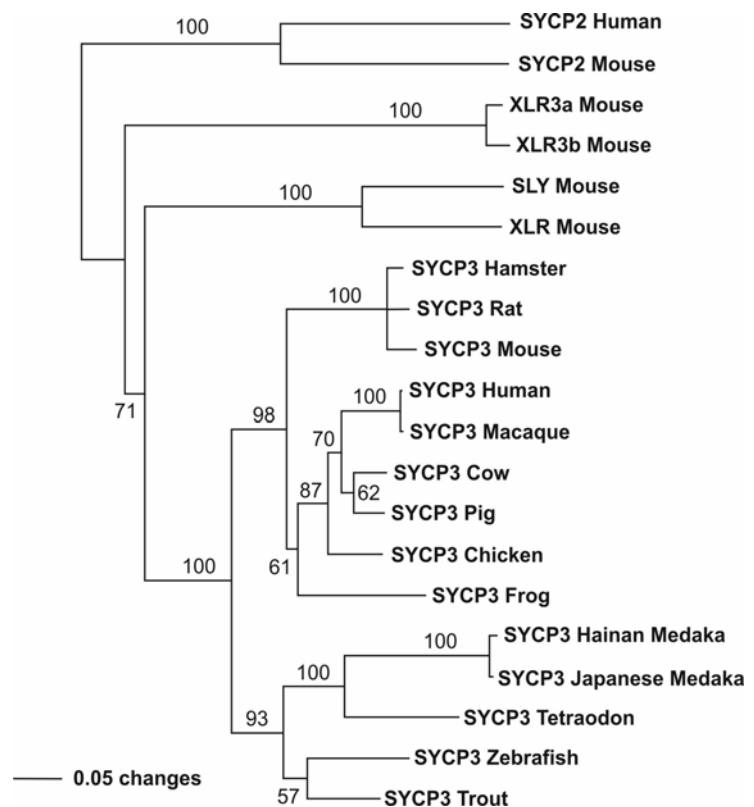


Abbildung 6.1: Molekulare phylogenetische Analyse von SYCP-Proteinen in Vertebraten (aus Baier et al., 2007b). Der Stammbaum wurde durch den Vergleich eines 174 Aminosäure langem Proteinfragmentes, das sich vom CM1 bis einschließlich des CM2 erstreckt, mit der „neighbour joining“ Methode (1000 pseudosamples, Saitou und Nei, 1987) erstellt. Bootstrap Werte sind in Prozent angegeben.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst SYCP3-Sequenzen verschiedener Vertebraten miteinander verglichen um evolutionär konservierte Domänen zu identifizieren (vgl. 5.1.1). Es konnte gezeigt werden, dass die SYCP3-Proteine aus den verschiedenen Spezies eine konservierte Domänenorganisation aufweisen, sich aber in der Länge unterscheiden. SYCP3 besitzt in allen Spezies eine N-terminale sowie eine C-terminale globuläre Domäne und eine, in der C-terminalen Hälfte lokalisierte, α -helikalen Region. Die unterschiedliche Länge der SYCP3-Moleküle ist auf Sequenzunterschiede im wenig konservierten N-Terminus zurückzuführen. Auffällig ist die sehr kurze C-terminale globuläre Domäne, welche zwischen den Spezies stark konserviert ist. Die α -helikale Region weist ebenfalls eine große Sequenzübereinstimmung auf, variiert aber innerhalb der Vertebraten in der Länge. Nach dem Lupas Algorithmus (Lupas et al., 1991) wurde bereits in früheren Arbeiten der α -helikale Bereich von SYCP3 der Säuger als typisch für die Ausbildung von „Coiled-Coil“-Strukturen beschrieben (Tarsounas et al., 1997; Yuan et al., 1998). Diese Fähigkeit kann auch für alle anderen SYCP3-Proteine der Vertebraten beobachtet werden.

Mit der dreigeteilten Domänenorganisation weist SYCP3 eine strukturelle Ähnlichkeit zu Intermediärfilamenten auf (Lammers et al., 1994; Yuan et al., 1998). Als Intermediärfilamente bezeichnet man eine Proteinfamilie von cytoplasmatischen und zellkernspezifischen Strukturproteinen, die ebenso wie SYCP3 aus einer nichthelikalen N-terminalen Kopfdomäne und einer nichthelikalen C-terminalen Schwanzdomäne bestehen, welche die „Coiled-Coil“-Domänen flankieren (Heins und Aebi, 1994; Krohne, 1998; Herrmann und Aebi, 2004). Die Kopfdomäne von SYCP3 der Ratte besteht aus 117, die Schwanzdomäne aus 6 Aminosäuren. Die Heptatensequenz der α -helikalen Region ist, wie auch bei Intermediärfilamenten (Conway und Parry, 1988) in vier Segmente (1a, 1b, 2a, 2b) unterteilt, die durch kurze (2-8 Aminosäuren) nichthelikale Bereiche, den so genannten „Linker“-Regionen getrennt sind. „Linker“-Regionen unterbrechen „Coiled-Coil“-Bereiche wodurch eine große Variabilität der „Coiled-Coil“-Domänen entsteht und so Proteine die unterschiedlichsten Aufgaben erfüllen können (vgl. 1.4). Im Gegensatz zu den cytoplasmatischen Intermediärfilamenten besitzen die Lamine (zellkernspezifische Intermediärfilamente) keine Prolinreste in diesen „Linker“-Regionen (Conway und Parry, 1988). Die Aminosäure Prolin weist eine Ringstruktur auf, wodurch Prolinreste häufig in Knickpunkten gefalteter Proteine vorkommen und auch α -helikale Bereiche unterbrechen. Auch SYCP3 besitzt keine Prolinreste in den „Linker“-Regionen.

Weiterhin konnten in dieser Arbeit erstmals zwei hoch konservierte Motive, CM1 und CM2, identifiziert werden. Diese Motive weisen keine Homologie zu bekannten Motiven aus anderen Proteinen auf weswegen deren Funktion im Protein nicht abgeleitet werden kann. Auffällig ist aber, dass sowohl die Länge als auch die Position dieser Motive im SYCP3-Molekül konserviert sind. CM1 ist 19 Aminosäuren lang und befindet sich in der N-terminalen

globulären Domäne. Als CM2 wird die gesamte, 6 Aminosäuren lange, C-terminale globuläre Domäne definiert. Diese konservierten Motive flankieren die α -helikalen Region und obwohl die Länge der α -Helix zwischen den Spezies stark variiert, ist die Entfernung zwischen CM1 und CM2 mit 145 Aminosäuren (Ausnahme: *Xenopus tropicalis* 141 Aminosäuren) von Fisch zu Mensch konserviert (vgl. 5.1.1). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass CM1 und CM2 eine wichtige Rolle in der Organisation von SYCP3 spielen.

In diesem Kapitel wird schlüssig begründet, warum nach den Erkenntnissen dieser Arbeit davon auszugehen ist, dass die strukturell konservierte „Coiled-Coil“-Domäne und die konservierten Motive CM1 und CM2 wichtig für die Filamentbildung von SYCP3 sind, der weniger konservierten N-Terminus dagegen eine Rolle in der Filamentstabilität zu spielen scheint. Weiterhin konnten zwei Phosphorylierungsstellen im N-terminalen Bereich identifiziert werden, über welche die Stabilität der Filamente reguliert werden könnte. Zudem haben die Ergebnisse eine wichtige Bedeutung für die Reproduktionsbiologie, da sie eine plausible Erklärung liefern, wie heterozygote Mutationen in SC-Genen zu Unfruchtbarkeit führen können.

6.1.1 Konservierte Domänen sind notwendig für die Polymerisation von SYCP3

Um die Rolle verschiedener Domänen von SYCP3 bei dessen Polymerisation genauer zu analysieren, wurde eine in vivo Strategie, nämlich die Expression von wildtypischen SYCP3 und Mutanten in somatischen Kulturzellen, angewandt. Das Verhalten der SYCP3 Teilfragmente wurde auf morphologischer Ebene mit dem des wildtypischen Proteins verglichen. Der Vorteil eines solchen heterologen Systems ist, dass die Polymerisationseigenschaft von SYCP3 unabhängig von anderen meiosespezifischen Proteinen untersucht werden können.

Für die Analyse der Polymerisationseigenschaften von SYCP3 wurde eine Reihe von Plasmiden hergestellt, welche für das wildtypische Protein der Ratte, für EGFP-Fusionsproteine sowie für ausgewählte Proteinmutanten kodieren. Die Deletionen wurden so gewählt, dass durch den Vergleich der jeweiligen Deletionsmutanten mit dem wildtypischen SYCP3 Aussagen über die Rolle der jeweiligen deletierten Domäne bei der Polymerisation getroffen werden konnten. Die verschiedenen SYCP3-Konstrukte wurden hierzu in COS-7 Zellen exprimiert, die Verteilung der Proteine wurde über Immunfluoreszenz und am Elektronenmikroskop analysiert.

Das in COS-7 Zellen exprimierte wildtypische SYCP3 bildet, wie von L. Yuan und Mitarbeiter beschrieben, filamentöse, netzwerkartige Strukturen sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern. Auf ultrasstruktureller Ebene konnte bestätigt werden, dass 5-10 nm dünne SYCP3-

Filamente sich zu höher geordneten, parakristallinen Strukturen organisieren, wobei das Bänderungsmuster eine 20 nm Wiederholungseinheit aufweist (Yuan et al., 1998; vgl. 5.1.5). Solche höher geordneten, parakristallinen Strukturen können zwar nicht in meiotischen Zellen beobachtet werden. Allerdings ist deren Bildung in COS-7 Zellen durch die Überexpression von SYCP3 in Abwesenheit anderer meiosespezifischer Proteine zu erklären. In meiotischen Zellen ist die Polymerisation von SYCP3 durch andere Proteine, wie z.B. SYCP2 (Peltari et al., 2001) beeinflusst. Das Auftreten von parakristallinen Strukturen unter ähnlichen experimentellen Voraussetzungen konnte auch für Lamine gezeigt werden, die zu der Proteinfamilie der Intermediärfilamente gehören. Normalerweise bilden endogene Lamine ein filamentöses Netzwerk auf der nukleoplasmatischen Seite der Kernmembran. Werden diese Proteine aber in somatischen Zellen überexprimiert bilden Lamine sehr ähnliche parakristalline Strukturen mit einer ~20-nm Wiederholungseinheit (Krohne et al., 1998). Somit weist SYCP3 nicht nur eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Intermediärfilamenten auf, sondern es lassen sich auch Parallelen in der Polymerbildung beobachten.

Wurde SYCP3 als EGFP-Fusionsprotein exprimiert, ist das Protein nicht mehr in der Lage Filamente zu bilden. Das EGFP-Molekül beeinträchtigt die Filamentbildung unabhängig davon ob es am C-Terminus oder am N-Terminus von SYCP3 fusioniert ist (vgl. 5.1.3). Eine Erklärung hierfür ist, dass das ca. 26 kDa große EGFP-Molekül die Filamentbildung von SYCP3, das selbst nur eine Größe von ca. 30 kDa hat, sterisch behindert. Somit konnten für die Analyse der Polymerisationseigenschaften von SYCP3 nicht auf die Verwendung von EGFP-Fusionsproteinen zurückgegriffen werden. Die Mutanten von SYCP3 wurden stattdessen über Immunlokalisation mit einem α -ratSYCP3 Antikörper nachgewiesen, der die spezifischen Polypeptidsequenz von Aminosäure 27-38 erkennt (Alzheimer und Benavente, 1996; vgl. 3.1.4). Wurde der Bereich des Antikörperbindungsepitop deletiert, wurden Fusionsproteine mit einem 13 Aminosäuren langen myc-Epitop hergestellt. Diese mutierten Proteine konnten dann in der Immunfluoreszenz mit einem α -myc Antikörper nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die strukturell konservierte „Coiled-Coil“-Domäne und die evolutionär konservierten Motive CM1 und CM2 essentiell für die Filamentbildung von SYCP3 sind. Wurden Teile der α -helikale Region deletiert kann SYCP3 keine Filamente mehr bilden. α -Helikale Regionen sind in vielen Proteinen für deren Dimerisierung verantwortlich. Hierzu winden sich zwei α -Helices, die eine regelmäßige Abfolge von Heptadsequenzen mit hydrophoben Aminosäuren an jeder ersten und vierten Stelle besitzen, umeinander und bilden so eine stäbchenförmige „Coiled-Coil“-Domäne (vgl. 1.4). Die α -helikale Region von SYCP3 besitzt eine solche Heptadsequenz und kann daher mit hoher Wahrscheinlichkeit eine „Coiled-Coil“-Domäne ausbilden (Lupas et al., 1991;

Tarsounas et al., 1997; Yuan et al., 1998). Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass diese Domäne wichtig für die homophile Protein-Protein-Interaktion im SYCP3 Molekül ist (Yuan et al., 1998). Auch in Intermediärfilamentproteinen besitzt die α -helikale Region die Fähigkeit „Coiled-Coil“-Strukturen auszubilden, welche für die Dimerisierung der Moleküle und für den Aufbau von höher geordneten Strukturen verantwortlich ist (Hermann und Aebi, 2004). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass SYCP3 über die α -helikale Region Dimere mit einer „Coiled-Coil“-Domäne bilden kann, welche wichtig für den Aufbau von höher geordneten Strukturen ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Deletion der konservierten Motive, CM1 bzw. CM2, welche die α -helikale Region flankieren, ebenfalls eine negative Auswirkung auf die Filamentbildung hat (vgl. 5.1.3). Die Deletionsmutante Δ CM1-SYCP3 lokalisiert homogen im Zellkern, während das mutierte Protein Δ CM2-SYCP3 zahlreiche intranukleäre Aggregate bildet. Die Relevanz der „Coiled-Coil“-Domäne und des CM2 wird durch die Ergebnisse von Miyamoto und Mitarbeitern unterstrichen, die einen Patienten mit einer heterozygoten SYCP3-Mutation beschrieben. Die Mutation betraf den C-Terminus von SYCP3 wodurch ein Teil der Coiled-Coil“-Domäne und das CM2 deletiert war. Diese Deletion hatte zur Folge, dass die Spermatogenese in der meiotischen Prophase I unterbrochen, und der Patient unfruchtbar war. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dieses C-Terminus verkürzte SYCP3 nicht in der Lage war, exprimiert in somatischen Zellen, Filamente zu bilden (Miyamoto et al., 2003).

Ein weiteres interessantes Ergebnis ist, dass die konservierten Motive, CM1 und CM2 zusammen mit der „Coiled-Coil“-Domäne nicht nur essentiell, sondern nach Deletion des weniger konservierten N-terminalen Bereiches sogar ausreichend sind um Filamente mit einer höher geordneten Struktur zu bilden. Wurden die ersten 86 Aminosäuren deletiert, kann SYCP3 nach wie vor Filamente bilden (vgl. 5.1.3). Auf ultrasruktureller Ebene können, ebenso wie für das wildtypische SYCP3, Einzelfilamente beobachtet werden, die sich lateral zu höher geordneten, parakristallinen Strukturen mit einem regelmäßigen Bänderungsmuster zusammenlagern. Zudem beträgt die Wiederholungseinheit der Querstreifung 20 nm, wie es auch für das wildtypische SYCP3 beschrieben wurde (Yuan et al., 1998; siehe oben). Das Ergebnis, dass die ersten 86 Aminosäuren nicht notwendig für die Organisation zu höher geordneten Strukturen sind, passt zu den Beobachtungen des Sequenzvergleichs von SYCP3 in Vertebraten durch den N-Terminus bis zum CM2 als am wenigsten konserviert identifiziert werden konnte. Dagegen sind die strukturell konservierte „Coiled-Coil“-Domäne und die hoch konservierten Motive CM1 und CM2 wichtig für die Polymerisation von SYCP3.

6.1.2 Der N-Terminus von SYCP3 ist wichtig für die Stabilität der Polymerstrukturen

Als nächstes stellte sich die Frage, ob der N-terminale Teil von SYCP3 für dessen Verhalten eine Funktion haben könnte. Um diese Frage zu klären, wurde die Stabilität der Filamente analysiert. Neben den morphologischen Unterschieden der Filamente, die wildtypisches SYCP3 und Mutanten bilden, kann auf biochemischer Ebene die Stabilität von Strukturen getestet werden. Hierzu behandelte man Zellen, welche die zu untersuchenden Strukturen exprimierten, mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen. Fraktionierte man Zellen (vgl. 4.6.4), gingen leicht lösliche Proteine bereits nach einer Niedrigsalz/Triton-Behandlung in den Überstand. Nach einer Behandlung mit DNase I und hohen Salzkonzentrationen waren DNA-bindende und schwer lösliche Proteine im Überstand zu finden. Die weitestgehend unlöslichen Strukturen konnten angereichert im Hochsalz-Pellet nachgewiesen werden.

In Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst eine Zellfraktionierung von Pachytän-Spermatocyten der Ratte durchgeführt, wodurch gezeigt werden konnte, dass SYCP3 als Bestandteil des SCs beständig gegenüber Nukleasen und hohen Salzkonzentrationen ist. Abbildung 5.8 zeigt, dass wildtypisches SYCP3 aus Pachytän-Spermatocyten (SYCP3wt_Hoden) nach Hochsalz-Behandlung zum Teil in den Überstand (HÜ) geht, während ein Teil des Protein aber unlöslich bleibt und im Hochsalzpellet (HP) nachgewiesen werden kann. Bereits in früheren Arbeiten konnten SCs als Kernstrukturelementen klassifiziert werden, da sie eine ähnliche Beständigkeit gegenüber Nukleasen, nicht-ionischen Detergenzien und hohen Salzkonzentrationen aufweisen (Comings und Okada, 1976; Ierardi et al., 1983; Risley, 1986; Smith und Benavenete 1992). Außerdem wurde SYCP3 als Hauptstrukturkomponente des SC beschrieben, welche für den Aufbau der LEs notwendig ist (Yuan et al., 2000; Liebe et al., 2004). Diese Ergebnisse deuten nun darauf hin, dass SYCP3 eine wichtige Komponente des SC ist und einen Einfluss auf die strukturelle Stabilität der AEs/LEs hat.

Wurden somatische Kulturzellen fraktioniert, die wildtypisches SYCP3 exprimierten, konnte eine ähnlich Resistenz gegenüber Nukleasen, und hohen Salzkonzentrationen festgestellt werden, wie sie für das endogene SYCP3 in SCs der Ratte beschrieben wurde (vgl. Abbildung 5.8 SYCP3wt). SYCP3 kann also auch unabhängig von anderen meiosespezifischen Proteinen, Polymerstrukturen aufbauen, die eine hohe Stabilität aufweisen. Auch andere Proteine des Zellkerns, wie z.B. die Lamine (Kaufmann et al., 1881) bilden schwerlösliche Proteinpolymere aus, weswegen sie in die Klasse der Strukturproteine eingeordnet werden. Die Stabilität, der von SYCP3 ausgebildeten Filamenten, stellt also ein weiteres Kriterium dar, dieses Protein in die Klasse der Karyoskelettproteine einzuordnen. In weiteren Experimenten wurde der Einfluss des N-Terminus von SYCP3 auf die Stabilität der

Polymere untersucht. Hierzu wurden ausgewählte Mutanten in somatischen Kulturzellen exprimiert, auf biochemischer Ebene untersucht und deren Stabilität mit der des wildtypischen SYCP3 verglichen. Ist der gesamte, wenig konservierte Bereich im N-Terminus von SYCP3 deletiert, so hat dies eine gravierende Auswirkung auf die Stabilität der Filamente. Wie unter 6.1.1 beschrieben, kann $\Delta n86\text{myc-SYCP3}$ zwar, ähnlich wie das wildtypische SYCP3, Filamente mit einem parakristalinen Bänderungsmuster aufbauen, diese Polymerstrukturen sind aber nach Hochsalz-Behandlung komplett extrahierbar. Die Bindungsstärke der Polymere, die das N-terminal trunkeierte SYCP3 bildet, ist also im Vergleich zum wildtypischen Protein deutlich reduziert. Diese Ergebnisse zeigen, dass der weniger konservierte Bereich im N-Terminus zwar keinen Einfluss auf die Bildung von höher geordneten Strukturen hat, jedoch scheint dieser eine wichtige Rolle im Aufbau von stabilen Filamenten zu spielen. Nun stellte sich die Frage welche Motive die Resistenz gegenüber Hochsalz-Behandlung vermitteln. Es konnte gezeigt werden, dass die meisten der 86 Aminosäuren keinen Einfluss auf die Bildung und Stabilität von höher geordneten Strukturen haben. Die trunkeierten Proteine $\Delta 2-25\text{-SYCP3}$ und $\Delta 42-86\text{-SYCP3}$ können Filamente mit einem parakristalinen Bänderungsmuster bilden (vgl. Abbildung 5.7 und 5.10) die sich durch Hochsalz-Behandlung nicht extrahieren lassen (vgl. Abbildung 5.8). Die Deletion der Aminosäuren 27-38 dagegen beeinflusst sowohl die Bildung von höher geordneten Strukturen als auch die Stabilität der gebildeten Polymere. Ein unerwartetes Ergebnis war, dass ein trunkeiertes Protein, dem die Aminosäuren 27-38 fehlen, zwar dünne Filamente bilden kann, diese Einzelfilamente sich aber nicht mehr zu höher geordneten Strukturen zusammenlagern können (vgl. Abbildung 5.10). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass das Protein, dem der gesamte weniger konservierte N-Terminus fehlt, höher geordnete, parakristaliner Polymerstrukturen bildet (vgl. 6.1.1). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass zwar das N-Terminus verkürzte Protein (Deletion der ersten 86 Aminosäuren) Einzelfilamente bildet, die sich lateral zu höher geordneten Strukturen zusammenlagern, zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus (Aminosäure 1-26 und 39-86) aber die Einzelfilamente so modulieren, dass keine laterale Aneinanderlagerung mehr möglich ist. Nur zusammen mit dem Bereich zwischen Aminosäure 27-38 können dann diese Einzelfilamente sich wieder zu höher geordneten Strukturen zusammenlagern. Dies stimmt mit den Beobachtungen von L. Yuan und Mitarbeiter überein, die zeigten, dass eine Koexpression von SYCP3-N (Aminosäuren 2-130) mit dem kompletten SYCP3 die Filamentbildung zwar nicht störte, die Filamente aber im Vergleich zu dem wildtypischen Protein dünner waren. Es wurde vermutet, dass die laterale Bündelung der dünneren Filamente zu dickeren Filamenten durch SYCP3-N gestört war (Yuan et al., 1998). Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Bereich zwischen Aminosäure 27 und 38 nicht nur wichtig für die laterale Aneinanderlagerung der Einzelfilamente zu sein

sceint, sondern auch einen Einfluss auf die Stabilität der ausgebildeten Strukturen hat. $\Delta 27-38\text{myc-SYCP3}$ ist nämlich nach Hochsalz-Behandlung komplett extrahierbar. Somit kann der Bereich, welcher die Resistenz gegenüber Hochsalz-Behandlung vermittelt, auf 12 Aminosäuren eingeschränkt werden. In einer früheren Arbeit wurde beschrieben, dass dieser Bereich einen Loop ausbilden kann, der ein β -Faltblatt und eine α -Helix voneinander trennt. Durch eine Datenbankanalyse mit dem Programm PROSCAN konnten in diesem Bereich zwei wichtige Serinreste identifiziert werden, die potentielle Phosphorylierungsstellen darstellen. Das Serin an Position 32 ist eine potentielle Zielstelle der cAMP und cGMP-abhängigen Proteinkinase sowie der Proteinkinase C. Das Serin an Position 35 ist alleinig für die Proteinkinase C eine potentielle Zielstelle. Weiterhin konnte über das Programm NetPhos 2.0 für beide Serine eine hohe in vivo Phosphorylierungswahrscheinlichkeit vorhergesagt werden. Experimentell konnte gezeigt werden, dass eine Substitution dieser Serine zu einem Glutamat, das wegen seiner negativen Ladung eine Phosphorylierung simulieren kann, drastische Auswirkung auf die Bildung und Stabilität von höher geordneten Strukturen hat. S32E-SYCP3 und S35E-SYCP3 können Einzelfilamente bilden, wobei die laterale Aneinanderlagerung dramatisch gestört ist (vgl. Abbildung 5.11). Zudem sind beide punktmutierten Proteine nach Hochsalz-Behandlung komplett extrahierbar (vgl. Abbildung 5.8). Kontrollexperimente in denen die Serinreste durch Alanin, eine Aminosäure die nicht phosphoryliert werden kann, ersetzt wurden, zeigten ein wildtypisches Verhalten der Proteine (vgl. Abbildung 5.7, 5.8 und 5.10). Es kann also postuliert werden, dass der Bereich zwischen Aminosäure 26 und 39 wichtig für die laterale Aneinanderlagerung der Einzelfilamente ist, damit höher geordnete, stabile Polymerstrukturen gebildet werden können. Eine Phosphorylierung der Serinreste 32 oder 35 könnte die Aneinanderlagerung der Einzelfilamente stören, wodurch SYCP3 keine stabilen, höher geordneten Strukturen bilden kann. Interessanterweise wurde von Tarsounas und Mitarbeitern bereits beschrieben, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Phosphorylierungszustand von SYCP3 und der SC-Organisation gibt. Es wurde gezeigt, dass eine Behandlung von Pachytän-Spermatocyten mit Okadasäure, einem Phosphatase-Inhibitor, das rasche Fortschreiten der Zellen in die Anaphase zur Folge hatte. Unter diesen experimentellen Bedingungen werden SYCP3 und SYCP1 phosphoryliert und dissoziieren von den Chromosomen (Tarsounas et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Serinreste an Position 32 und 35 für diese Veränderung verantwortlich sind. So könnte nichtphosphoryliertes SYCP3 in der frühen meiotischen Prophase I polymerisieren und die Stabilität der AEs/LEs vermitteln. Durch die Phosphorylierung der Serinreste 32 und 35 am Ende der meiotischen Prophase I könnte sich die Organisation der Polymere ändern wodurch deren Bindungsstärke vermindert wird, so dass die LE-Komponenten sich vom Chromosom lösen. Ein ähnlicher regulatorischer Mechanismus wurde auch für die nukleären Lamine

beschrieben (Heald und McKean, 1990; Ward und Kirchner, 1990). In diesem Fall sind am Auf- und Abbau Prozess allerdings Serinreste beteiligt, deren Zielstellen Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) sind. Im Fall von SYCP3 scheint jedoch CDK keinen direkten Einfluss auf den Auf- und Abbau der LE zu haben, da keine potentielle Phosphorylierungsstelle für diese Kinase im SYCP3 Molekül vorkommen. Da die SC Bildung aber in einer Maus-Mutante, die keine CDK2 exprimiert, gestört ist, könnten CDKs an übergeordneten Phosphorylierungsereignissen beteiligt sein (Ortega et al., 2003).

6.1.3 Es gibt zwei Isoformen von SYCP3

In früheren Arbeiten wurde beschrieben, dass SYCP3 aus Maus und Ratte eine 30 und eine 33 kDa Bande im Polyacrylamidgel liefert (Heyting et al., 1987; Lammers et al., 1994). Das homologe Protein von Hamster und Mensch dagegen wandert nur als eine 30 kDa Einzelbande im Polyacrylamidgel (Dobson et al., 1994; Miyamoto et al., 2003). In dieser Arbeit wurde nun erstmals Unterschiede zwischen der 30 und 33 kDa Bande von SYCP3 der Ratte aufgezeigt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das wildtypische SYCP3 in zwei verschiedenen Isoformen exprimiert wird, indem die Translation an verschiedenen Startcodons beginnt. Die längere Isoform beginnt mit dem ersten ATG und liefert ein Protein mit 257 Aminosäuren das eine molekulare Masse von 33 kDa hat. Die zweite Isoform ist N-terminal um 24 Aminosäuren verkürzt. Hier dürfte ein weiter N-terminal gelegenes ATG als Startcodon benutzt werden, wodurch ein Protein mit einer molekularen Masse von 30 kDa translatiert wird (vgl. Abbildung 5.12). Die kurze Isoform ist innerhalb der Vertebratengruppe konserviert und die entsprechende Sequenz findet man von Fisch bis hin zum Menschen (vgl. Abbildung 5.1). Im Gegensatz dazu ist die lange Isoform noch nicht einmal innerhalb der Nagergruppe konserviert. Man findet die N-terminal verlängerte Isoform bei Ratte und Maus aber nicht in Hamster (vgl. Abbildung 5.1). Botelho und Mitarbeiter zeigten durch Datenbankanalysen dass die *SYCP3* Gene in Ratte, Maus und Hamster neun Exons besitzen, wobei das Startcodon ATG bei Ratte und Maus im Exon 1, bei Hamster im Exon 2 liegt. Dieses ATG in Exon 2 ist von Fisch bis Mensch konserviert und liegt bei der Ratte im Leseraster zum ATG in Exon 1 weswegen es als alternatives Startcodon fungieren könnte (Botelho et al. 2001). Die längere Isoform ist also nach der Auftrennung von Hamster und den Vorfahren von Maus und Ratte vor ca. 11 Millionen Jahren entstanden. Es könnte also ein ATG in Exon 1 entstanden sein, und zwar an der Position an der das Hamster *SYCP3* Gen ein AAG besitzt. Ob nun die zusätzliche Expression dieser N-terminal verlängerten Isoform eine funktionelle Bedeutung hat ist bisher noch nicht bekannt.

6.1.4 Heterozygote Mutationen in SC-Genen können einen Einfluss auf die Fertilität haben

In dieser Arbeit konnte erstmals eine Erklärung für den gestörten SC-Aufbau und die Unfruchtbarkeit der Patienten mit einer heterozygoten Mutation im C-Terminus von SYCP3 gegeben werden. Wie von Miyamoto und Mitarbeitern beschrieben wurde, führt eine heterozygote Mutation im SYCP3-Gen eines Patienten zu Azoospermie. Die Mutation betraf den C-Terminus von SYCP3 wodurch das Ende der „Coiled-Coil“-Domäne und das CM2 deletiert war. Diese Deletion hatte zur Folge, dass, ähnlich wie bei der *SYCP3^{-/-}* Maus, die Spermatogenese in der meiotischen Prophase I unterbrochen war. Zudem wurde gezeigt, dass die C-terminale Region von SYCP3 des Menschen wichtig für die Filamentbildung ist (Miyamoto et al., 2003; vgl. 6.1.1). Auch für das homologe Protein in Ratte konnte festgestellt werden, dass eine Deletion des C-Terminus (Deletion des CM2) sich negativ auf die Filamentbildung des Proteins auswirkt (vgl. 6.1.1).

Um zu untersuchen, wie sich eine heterozygote Mutation im SYCP3-Gen auswirken könnte, wurde ein Koexpressionsexperiment, mit dem C-terminal trunkierten und dem wildtypische SYCP3 der Ratte, durchgeführt. In diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass die nicht-filamentbildende C-terminale Deletionsmutante, Δ CM2-SYCP3, einen dominant-negativen Effekt auf die Filamentbildung von wildtypischem SYCP3 hat. Beide Proteine sind nicht mehr in der Lage Filamente auszubilden, sondern kolokalisieren aggregatförmig im Zellkern (vgl. 5.1.7). Durch den dominant-negativen Effekt eines mutierten SYCP3-Proteins auf das Verhalten des Wildtypischen kann nun erklärt werden, dass eine heterozygote Mutation in SC-Genen zu Unfruchtbarkeit führen kann. Ein mutiertes SC-Protein wird ebenso, wie das Wildtypische in meiotischen Zellen exprimiert, interagiert dort mit dem intakten Protein, so dass dieses in seiner Funktion gestört wird und nicht mehr seine Aufgabe im korrekten Aufbau des SC erfüllen kann. Fehler im SC-Aufbau haben häufig einen negativen Effekt auf das Voranschreiten der Meiose was zu Fertilitätsproblemen führt (Pelttari et al., 2001; Yuan et al., 2000; 2002; Miyamoto et al., 2003; Yang et al., 2006; Wang und Höög, 2006; de Vries et al., 2005; Bolcun-Filas et al., 2007).

6.2 Polymerisationseigenschaften von SYCP3 sind evolutionär konserviert

Der Vergleich von orthologen SC Proteine aus taxonomisch entfernten Spezies stellt eine weitere wichtige Säule dar, um den SC Aufbau und dessen Funktion besser verstehen zu können. Da es auf der einen Seite eine Fülle von Informationen über die SC Proteine aus Maus, Ratte und Hamster gibt und auf der anderen Seite das Expressionmuster der SC Proteine SYCP1 und SYCP3 in der evolutionär entfernten Fischart Medaka (*Oryzias latipes*) erst seit kurzem bekannt ist (Iwai et al., 2006), wurden in dieser Arbeit die Eigenschaften von SYCP3 zwischen Ratte und Medaka verglichen. Hierzu wurde zunächst ein Sequenzvergleich beider Proteine durchgeführt und anschließend die Polymerisationseigenschaften von SYCP3 aus Ratte und Medaka verglichen.

6.2.1 SYCP3 aus Ratte und Medaka haben eine konservierte Domänenorganisation

Man geht davon aus, dass in der Evolution konservierte Domänen eines Proteins essentiell für seine Funktion sind. Um nun herauszufinden, welche Bereiche von SYCP3 zwischen Ratte und Medaka evolutionär konserviert sind, wurden die Sequenzen beider Proteine analysiert und miteinander verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass obwohl sich SYCP3 aus Ratte und Medaka in der Aminosäuresequenz deutlich voneinander unterscheiden, sie eine konservierte Domänenorganisation aufweisen. Beide Proteine besitzen einen α -helikalen Bereich, welcher die Fähigkeit besitzt „Coiled-Coil“-Strukturen zu organisieren (Lupas et al., 1991) und der von nicht helikalen Domänen flankiert ist. Zudem konnte auch in SYCP3 aus Medaka die im N- und C-Terminus liegenden konservierten Motive (CM1 und CM2) identifiziert werden, wie sie auch für die Proteinsequenz der Ratte beschrieben wurden. Diese Motive weisen eine überdurchschnittliche hohe Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz auf und sind in ihrer Länge und Position innerhalb des Moleküls konserviert, was auf eine wichtige Rolle dieser Motive für die Organisation von SYCP3 hindeutet (vgl. 6.1.1). Weiterhin wurde eine höhere Sequenzübereinstimmung am Kopf- und Schwanzende des α -helikalen Bereichs gefunden. Der restliche Teil der α -helikalen Region, die sich auch in der Länge zwischen Ratte und Medaka stark unterscheidet, weist jedoch eine sehr geringe Übereinstimmung auf Aminosäureebene auf (vgl. Abbildung 5.15). Diese Beobachtung passt zu den Erkenntnissen, welche über die homologen Sequenzen der Intermediärfilamente gewonnen wurden. Auch hier konnten hoch konservierte Bereiche am Kopf- und Schwanzende der α -helikalen Region identifiziert werden, welche sowohl für die longitudinale Aneinanderlagerung der Dimere als auch für die laterale Assoziation der Oligomere notwendig sind (Hermann und Aebi, 2004).

6.2.2 SYCP3 aus Ratte und Medaka haben konservierte Polymerisationseigenschaften

Um die Polymerisationseigenschaften von SYCP3 aus Ratte und Medaka miteinander vergleichen zu können, wurde zuerst das Medaka Protein näher charakterisiert (vgl. 5.2.2). Hierzu wurde zunächst ein polyklonaler Antikörper im Kaninchen hergestellt, welcher das Medaka SYCP3 spezifisch erkennt und keine Kreuzreaktion mit SYCP3 der Ratte aufweist. (vgl. Abbildung 5.20). Wie erwartet, konnte mit dem Medaka SYCP3 Antikörper die Lateralelemente der Medaka SCs sowohl über Immunfluoreszenz als auch im Elektronenmikroskop spezifisch nachgewiesen werden. Im Immunblot mit Hodengewebe erkennt der Antikörper eine einzelne 27 kDa Proteinbande (vgl. Abbildung 5.16; Iwai et al., 2006). Um nun die Polymerisationseigenschaften von SYCP3 aus Medaka genauer zu analysieren wurde das Protein, wie es auch für SYCP3 der Ratte durchgeführt wurde (vgl. 6.1.1), in COS-7 Zellen exprimiert und sein Verhalten auf morphologischer und biochemischer Ebene untersucht. Das wildtypische Medaka SYCP3 ist in der Lage Filamente zu bilden, welche netzartig im Cytoplasma und im Zellkern lokalisieren (vgl. Abbildung 5.17). Auf ultrastruktureller Ebene konnte gezeigt werden, dass diese Filamente sich zu höher geordneten parakristallinen Strukturen, mit einem, sich alle 20 nm wiederholenden, Bänderungsmuster organisieren (vgl. Abbildung 5.18). Die biochemischen Untersuchungen ergaben, dass diese Polymerstrukturen eine gewisse Stabilität aufweisen, da sie resistent gegenüber Nukleasen und hohen Salzkonzentrationen sind (vgl. Abbildung 5.19). Somit konnte gezeigt werden, dass SYCP3 aus Ratte und Medaka nicht nur eine konservierte Domänenorganisation aufweisen und an den LE lokalisieren, sondern auch vergleichbare Polymerisationseigenschaften haben. Beide Proteine besitzen die Fähigkeit höher geordnete, stabile Polymerstrukturen aufzubauen. So kann also Medaka SYCP3, ebenso wie SYCP3 der Ratte, in die Klasse der Karyoskelettproteine zugeordnet werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass SYCP3 auch in niederen Vertebraten eine Hauptstrukturkomponente des SC darstellt, die wichtig für den Aufbau der LE ist.

Ein weiteres interessantes Ergebnis ist, dass trotz der Unterschiede auf Aminosäureebene die Polymerisationseigenschaften von SYCP3 aus Ratte und Medaka evolutionär so stark konserviert sind, dass beide Proteine miteinander interagieren und zu höher geordneten Strukturen kopolymerisieren können. Werden wildtypisches SYCP3 aus Ratte und Medaka in COS-7 Zellen koexprimiert, können, ähnlich wie bei den Einzeltransfektionsexperimenten, Filamente gebildet werden. Über Doppelimmunlokalisation und elektronenmikroskopischer Analyse konnte gezeigt werden, dass das Ratten- und das Medaka-Protein gemeinsam am Aufbau der Polymerstrukturen beteiligt sind. Es wurde festgestellt, dass die Polymere höher geordnete parakristalline Strukturen ausbilden, welche zu den Polymeren der jeweils einzeln

exprimierten SYCP3-Proteine zwar ähnlich aber nicht identisch sind (vgl. Abbildung 5.21 und 5.22). Verglichen mit dem sehr gleichmäßigen Bänderungsmuster der SYCP3-Polymere aus Ratte und Medaka ist die Querstreifung der koexprimierten Filamente deutlich diffuser. Die Ausbildung dieser neuartigen parakristallinen Struktur deutet darauf hin, dass beide Proteine zusammen für den Aufbau der höher geordneten Strukturen verantwortlich sind.

In einer weiteren Serie von Experimenten konnten Hinweise darauf gegeben werden, dass die Zusammenlagerung der SYCP3-Proteine aus Ratte und Medaka zu höhergeordneten Polymerstrukturen eine Interaktion beider Proteine voraussetzt. Dieses Ergebnis wurde durch Koexpressionsexperimente erzielt, in denen gezeigt werden konnte, dass eine nicht-filamentbildende C-terminale Deletionsmutante der einen Spezies einen dominant-negativen Effekt auf die Filamentbildung des wildtypischen Proteins der anderen Spezies hat. So verhindert *rat* Δ CM2-SYCP3, welches in Einzeltransfektionsexperimenten Aggregate im Zellkern bildet (vgl. Abbildung 5.23 A-A''), die Filamentbildung des wildtypischen Medaka SYCP3, wobei beide Proteine aggregatförmig im Zellkern verteilt kolokalisieren (vgl. Abbildung 5.23 C-C''). Auch umgekehrt unterbindet *me* Δ CM2-SYCP3, welches in Einzeltransfektionsexperimenten diffus im Zellkern verteilt vorliegt (vgl. Abbildung 5.23 B-B''), die Filamentbildung des wildtypischen SYCP3 der Ratte, wobei eine nukleäre, diffuse Kolokalisation beider Proteine detektiert wurde (vgl. Abbildung 5.23 D-D''). Der dominant-negativen Effekt eines mutierten SYCP3-Proteins auf das Verhalten eines Wildtypischen, wie es auch unter 6.1.4 für die C-terminale Deletionsmutante Δ CM2-SYCP3 auf das wildtypischen SYCP3 der Ratte beschrieben wurde, deutet auf eine Interaktion beider Proteine hin.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die Polymerisationseigenschaften der orthologen SYCP3 Proteine aus den taxonomisch entfernten Spezies Ratte und Medaka evolutionär konserviert sind. Obwohl sich in 450 Millionen Jahren Evolution deutliche Sequenzunterschiede auf Aminosäureebene angehäuft haben, besitzen beide Proteine die Fähigkeit miteinander zu interagieren und höher geordneten Strukturen aufzubauen.

6.3 Ausblick

Diese Arbeit stellt einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Aufbaus des SC dar. Durch die Erforschung der Eigenschaften von SYCP3 im heterologen System wurde eine evolutionäre Konserviertheit des Proteins in Vertebraten festgestellt. Weiterhin konnte ein besseres Verständnis der Polymerisationseigenschaften von SYCP3 erzielt werden, wobei Funktionen einzelner Domänen auf das Verhalten von SYCP3 analysiert wurden. Wichtige Fragen sind nun, wie sich die Mechanismen der SYCP3-Polymerisation am meiotischen Chromosom darstellen, wie weitere Proteine diese Polymerisationseigenschaften durch Interaktion beeinflussen und welche Funktion SYCP3 für die Anlagerung der AE/LE an das Chromosom hat. Bisher konnte keine direkte Interaktion von SYCP3 mit Chromatinkomponenten der homologen Chromosomen nachgewiesen werden und im Gegensatz zu den anderen Hauptkomponenten des SC, SYCP1 und SYCP2, besitzt das Protein keine putativen DNA-Bindungsmotive (Meuwissen et al., 1992; Lammers et al., 1994 und Dobson et al., 1994). Allerdings wurde eine Interaktion mit SYCP2, einer weiteren Hauptkomponente der AE/LE, beschrieben (Tarsounas et al., 1999; Pelttari et al., 2001 und Yang et al., 2006). Ob dieses Protein allerdings eine Rolle bei der Anlagerung von SYCP3 am meiotischen Chromosom spielt ist bis jetzt noch unklar. Bekannt ist aber, dass es mit Ausnahme der Telomere in *SYCP3^{-/-}* Mäusen zu keiner Anlagerung von SYCP2 an das Chromosom kommt (Yuan et al., 2000; Liebe et al., 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass, in Mäusen, die ein verkürztes SYCP2 exprimieren, welches SYCP3 nicht mehr binden kann, SYCP2 zwar am Chromosom lokalisiert, SYCP3 dagegen aggregatförmig im Zellkern verteilt vorliegt (Yang et al., 2006). SYCP2 scheint also die Polymerisation von SYCP3 zu beeinflussen. Diese Erkenntnisse werden durch die Beobachtung aus Koexpressionsexperimente beider Proteine in somatischen Zellen unterstützt. Hier kolokalisieren beide Proteine und bilden filamentähnliche, kurze Strukturen aus. SYCP3 kann also nicht wie in Einzeltransfektionsexperimenten ausgedehnten filamentösen Netzwerke bilden, sondern ist in seiner Polymerisation beeinträchtigt (Pelttari et al., 2001). Dagegen scheint SYCP1, die Hauptstrukturkomponente der TF, keinen Einfluss auf die Polymerisation von SYCP3 und dessen Anlagerung ans Chromosom zu haben. Es konnte weder eine Interaktion von SYCP1 und SYCP3 nachgewiesen werden und in *SYCP1^{-/-}* Mäusen kommt es zur normalen Ausbildung von AE (de Vries et al., 2005; Yuan et al., 1998).

Um nun den die Mechanismen des Auf- und Abbaus des SC besser verstehen zu können, müssen also noch viele Fragen geklärt werden. Ein wichtiger Aspekt ist die Interaktion der am SC-Aufbau beteiligten Proteine. Experimente, die zur Aufklärung dieser Fragen beitragen können, sind die weitere Suche nach Interaktionspartnern von SYCP3. Dies kann über das Hefe „Two-Hybrid“-System und über Immunpräzipitation erfolgen, wie es auch für die

Interaktion von SYCP1 mit SYCP2 durchgeführt wurde (Karoline, Diplomarbeit). So könnten Domänen in SYCP3 identifiziert werden, welche an der Bindung von SYCP2 beteiligt sind. Ein weiteres interessantes Protein, dessen Bindungsfähigkeit an SYCP3 zu untersuchen wäre, ist die Kohäsinuntereinheit Rad21. Dieses Protein kann zur gleichen Zeit und an den gleichen Stellen wie SYCP3 nachgewiesen werden (Parra et al., 2004).

Einen weiteren Schwerpunkt der Untersuchungen sollte die Erforschung des Mechanismus sein, welcher für den Auf- und Abbau der AE/LE verantwortlich ist. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich eine simulierte Phosphorylierung von SYCP3 auf die Stabilität der Polymerstrukturen auswirkt. Somit könnte der Phosphorylierungszustand von SYCP3 dafür verantwortlich sein, ob sich stabile SC-Strukturen, in der frühen meiotischen Prophase I, ausbilden oder ob es am Ende der meiotischen Prophase I zur Auflösung der AE/LE kommt. Um diese Hypothese zu untermauern, sollten mit Hilfe eines Pachytän-Spermatocyten-Zelllysats solche Phosphorylierungsstellen in SYCP3 identifiziert werden, welche unter diesen experimentellen Bedingungen Zielstellen für Kinasen sind.

Insgesamt bleibt die Meiose ein hochkomplexer Differenzierungsprozess, in dem die Synapse, Rekombination und Segregation der homologen Chromosomen miteinander verknüpft sind. Um diese komplexen Vorgänge richtig verstehen und nachvollziehen zu können, wäre es von Vorteil Kulturzellen aus Säugern, welche die Meiose durchlaufen, zur Verfügung zu haben. Bislang sind jedoch alle Anstrengungen Stammzellen aus Säugern zu kultivieren, die in ausreichenden Mengen zu Keimzellen differenzieren, an technischen Schwierigkeiten gescheitert. Es wurde allerdings eine Spermatogonienzelllinie aus Medaka beschrieben, welche die Spermatogenese durchläuft und beweglichen Spermien hervorbringt (Hong et al., 2004). Wenn die Menge an Zellen, welche diesen Prozess durchläuft, deutlich erhöht werden könnte, wäre diese Zelllinie zur Charakterisierung von SC-Proteinen geeignet, da die Polymerisationseigenschaften von SYCP3 zwischen Säugern und niederen Vertebraten konserviert sind. Weiterhin konnte das homologe Protein SYCP1 in Medaka identifiziert werden, das, ebenso wie in Säugern, an der Ausbildung der TF beteiligt ist (Iwai et al., 2006). Denkbare Experimente wären RNAi Knockdown-Versuche um die Auswirkungen des Funktionsverlustes von einem oder mehreren Proteinen zu analysieren. Weiterhin könnte durch Transfektion der Einfluss von Mutationen bestimmter Proteine simuliert werden.

7 Zusammenfassung

7.1 Zusammenfassung

Die Meiose ist eine besondere Art der Zellteilung, die während der Keimzellreifung stattfindet. Sie umfasst zwei aufeinander folgende Zellteilungen mit nur einer DNA-Replikationsrunde, wodurch aus einer diploiden Ausgangszelle vier haploide Gameten entstehen. In der ersten meiotischen Teilung werden die homologen Chromosomen miteinander rekombiniert und voneinander getrennt, in der Meiose II findet die Trennung der Schwesterchromatiden statt. Für den korrekten Ablauf dieser Prozesse musste sich eine spezielle molekulare Architektur des meiotischen Chromosoms entwickeln welche die Synapse der homologen Chromosomen durch den Synaptonemalkomplex (SC) beinhaltet. SCs sind evolutionär hochkonservierte, meiosespezifische Proteinkomplexe, die eine zentrale Bedeutung für Synapse, Rekombination und Segregation der homologen Chromosomen haben. Ein SC besteht aus zwei lateralen Elementen (LEs), die den Achsen der homologen Chromosomen aufgelagert sind, einer zentralen Region (CR) und einem zentralen Element (CE). Eine Hauptstrukturkomponente der LEs in Vertebraten ist das Synaptonemalkomplexprotein, SYCP3.

Um die molekulare Architektur des SC besser zu verstehen und die Bedeutung von SYCP3 für die Zusammenlagerung der LE aufzudecken, wurden die Polymerisationseigenschaften von SYCP3, exprimiert in somatischen Zellen, erforscht. In diesem experimentellen Ansatz polymerisierte SYCP3 autonom zu stabilen, höher geordneten, filamentösen Strukturen. Die „Coiled-Coil“-Domäne und die flankierenden, evolutionär konservierten Motive sind dabei notwendig, und nach Deletion des weniger konservierten N-terminalen Bereichs auch ausreichend für die Bildung der höher geordneten Strukturen. Der N-Terminus hingegen spielt eine Rolle in der Stabilität der Polymärstrukturen, welche durch Phosphorylierung zweier Serinreste im N-terminalen Bereich beeinflusst werden könnte.

Obwohl die Struktur des SC in der Evolution hochkonserviert ist, sind die Proteinkomponenten auf Aminosäuresequenzebene sehr unterschiedlich und weisen wenn überhaupt eine strukturelle Homologie in ihrer Domänenorganisation auf. Um den SC-Aufbau und dessen Funktion besser verstehen zu können, wurden die orthologen SC-Proteine zwischen taxonomisch entfernten Spezies Ratte und Medaka verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass trotz der Unterschiede in den Aminosäuresequenzen die sich in den letzten 450 Millionen Jahren zwischen Fisch- und Säugern-SYCP3 akkumuliert haben, die Eigenschaften der Proteine vergleichbar sind, und das sie unter experimentellen Bedingungen miteinander interagieren und zu höher geordneten Strukturen kopolymerisieren können.

7.2 Summary

Molecular Architecture of Meiotic Chromosome:

Properties and Evolution of Synaptonemal Complex Protein SYCP3

Meiosis is a germ line specific, special type of cell division which creates haploid daughter cells from a diploid cell in a manner that ensures each daughter cell a complete haploid genome. A meiotic cell undergoes two cell divisions without an intervening DNA replication step. In the first meiotic division the homologous chromosomes get separated and recombination takes place, while the sister chromatids remain associated until the second meiotic division. To align the homologous chromosomes in meiotic prophase I, a specialized structure has evolved the so called synaptonemal complex (SC).

SCs are meiosis-specific nuclear structures that are critically involved in synapsis, recombination and segregation of homologous chromosomes. SYCP3 is a major determinant of axial/lateral element assembly of the mammalian SC. To investigate the contribution of SYCP3 in the assembly of axial/lateral elements, I studied SYCP3 polymerization in a heterologous system where SC proteins are not expressed normally. Under these experimental conditions SYCP3 on its own can form higher order structures that, like SCs, are largely resistant to harsh cell fractionation procedures. I also obtained compelling evidence that the SYCP3 coiled-coil domain together with two flanking, evolutionary conserved motifs (CM) are necessary and also sufficient for higher order structure assembly. Notably, most of the SYCP3 N-terminus appears to be dispensable for polymerization, but plays a key role in the stability of polymer structure. I show that two N-terminal serine residues at positions 32 and 35 are crucial. Their mutation to glutamate residues, whereby phosphate charges are mimicked, leads to the formation of altered higher order structures showing a significantly reduced binding strength. The results are compatible with the notion that SYCP3 provides mechanical stability to SC axial/lateral elements that can be regulated by phosphorylation events.

Although the SC structure is conserved in evolution this is not the case for its protein components. To provide information on SC proteins which would be important for our understanding of the conserved SC structure and function, here I compared ortholog SYCP3 proteins of two evolutionary distant vertebrate species, namely rat and medaka fish. To this end I have investigated the polymerization properties of both proteins by immunocytochemistry, electron microscopy and cell fractionation. I found that despite of the sequence differences that have accumulated over the last 450 million years mammalian and fish SYCP3 have similar properties that allow them to co-assemble higher order structures under experimental conditions.

8 Literaturliste

Alsheimer M. und Benavente R. (1996):

Change of karyoskeleton during mammalian spermatogenesis: expression pattern of meiotic lamin C2 and its regulation.
Exp. Cell Res. 228,181-188

Bähler J., Wyler T., Loidl J. und Kohli J. (1993):

Unusual nuclear structures in meiotic prophase of fission yeast: a cytological analysis.
J. Cell Biol. 121, 241-256

Baier A., Alsheimer M. und Benavente R. (2007a):

Synaptonemal complex protein SYCP3: Conserved polymerization properties among vertebrates.
Biochim. Biophys. Acta 1774, 595-602

Baier A., Alsheimer M., Voff J.-N. und Benavente R. (2007b):

Synaptonemal complex protein SYCP3 of the Rat: Evolutionary Conserved Domains and the Assembly of Higher Order Structures.
Sex. Dev. 1, 161-168

Bannister L.A., Reinholdt L.G., Munroe R.J. und Schimenti J.C. (2004):

Positional cloning and characterization of mouse mei8, a disrupted allele of the meiotic cohesin Rec8.
Genesis 40, 184-194

Bogdanov Y.F., Dadashev S.Y. und Grishaeva T.M. (2003):

In silico search for functionally similar proteins involved in meiosis and recombination in evolutionarily distant organisms.
In Silico Biol. 3, 173-185

Bolcun-Filas E., Costa Y., Speed R., Taggart M., Benavente R., de Rooij D.G. und Cooke H.J. (2007):

SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, DSB repair and homologous recombination.
J. Cell Biol. 176, 741-747

Börner G.V., Kleckner N. und Hunter N. (2004):

Crossover/noncrossover differentiation, synaptonemal complex formation, and regulatory surveillance at the leptotene/zygotene transition of meiosis.
Cell 117, 29-45

Botelho R.J., DiNicolo L., Tsao N., Karaiskakis A., Tarsounas M., Moens P.B. und Pearlman R.E. (2001):

The genomic structure of SYCP3, a meiosis-specific gene encoding a protein of the chromosome core.
Biochim. Biophys. Acta. 1518, 294-299

Carpenter A.T. (2003):

Normal synaptonemal complex and abnormal recombination nodules in two alleles of the *Drosophila* meiotic mutant mei-W68.
Genetics 163, 1337-1356

Carpenter A.T. (1979):

Recombination nodules and synaptonemal complex in recombination-defective females of *Drosophila melanogaster*
Chromosoma 75, 259-292

Carpenter A.T.C. (1975):

Electron microscopy of meiosis in *Drosophila melanogaster* females. II. The recombination nodule—a recombination-associated structure at pachytene?
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3186–3189

Chelsky D., Ralph R. und Jonak G. (1989):

Sequence requirements for synaptic peptide-mediated translocation to the nucleus.
Mol. Cell Biol. 9, 2487-2492

Chou P.Y. und Fasman G.D. (1978):

Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence.
Adv. Enzymol. 47, 45-148

Chung C.T., Niemi S.L. und Miller R.H. (1989):

One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2172-2175

Clermont Y. (1972):

Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal.
Physiol. Rev. 52, 198-236

Cohen P.E., Pollack S.E. und Pollard J.W. (2006):

Genetic analysis of chromosome pairing, recombination and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals.
Endocrine Reviews 27, 398-426

Colaiácovo M.P. (2006):

The many facets of SC function during *C. elegans* meiosis.
Chromosoma 115, 195-211

Colaiácovo M.P., MacQueen A.J., Martinez-Perez E., McDonald K., Adamo A., La Volpe A. und Villeneuve, A.M. (2003):

Synaptonemal complex assembly in *C. elegans* is dispensable for loading strand-exchange proteins but critical for proper completion of recombination.
Dev. Cell 5, 463-474

Comings D.E. und Okada T.A. (1976):

Nuclear proteins. III. The fibrillar nature of the nuclear matrix.
Exp. Cell Res. 103, 341-360

Conway J.F. und Parry D.A.D. (1988):

Intermediate filament structure. 3. Analysis of sequence homologies
Int. J. Biol. Macromol 10, 79-98

Costa Y., Speed R., Öllinger R., Alsheimer M., Semple C.A., Gautier P., Maratou K., Novak I., Höög C., Benavente R. and Cooke, H.J. (2005):

Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis.

J. Cell Sci. 118, 2755-2762

Creighton H.B. und McClintock B. (1931):

A correlation of cytological and genetical crossing-over in zea mays.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 17, 492-497

de Massy B. (2003):

Distribution of meiotic recombination sites.
Trends Genet. 19, 514-522

de Vries F.A., de Boer E., van den Bosch M., Baarends W.M., Ooms M., Yuan L., Liu J.G., van Zeeland A.A., Heyting C. und Pastink A. (2005):

Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation.

Genes Dev. 19, 1376-1389

Dobson J.M., Pearlman E.R., Karaiskakis A., Spyropoulos B. und Moens B.P. (1994):

Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction.
J. Cell Sci. 107, 2749-2760

Dong H. und Roeder G.S. (2000):

Organization of the yeast Zip1 protein within the central region of the synaptonemal complex.
J. Cell Biol. 148, 417-426

Egel-Mitani M., Olson L.W. und Egel R. (1982):

Meiosis in *Aspergillus nidulans*: another example for lacking synaptonemal complexes in the absence of crossover interference.

Hereditas 97, 179-187

Eijpe M., Offenberg H., Jessberger R., Revenkova E. und Heyting C. (2003):

Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3.

J. Cell Biol. 160, 657-670

Fawcett D.W. (1956):

The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 403-406

Feramisco J.R., Glass D.B. und Krebs E.G. (1980):

Optimal space requirements for the location of basic residues in peptide substrates for the cyclic AMP-dependent protein kinase.

J. Biol. Chem. 255, 4240-4245

Gilbert S.F. (2000):

Developmental Biology, third edition

Gruber S., Haering C.H. und Nasmyth K. (2003):

Chromosomal cohesin forms a ring.

Cell 112, 765-777

Haering C.H., Schoffnegger D., Nishino T., Helmhart W., Nasmyth K. und Lowe J. (2004):

Structure and stability of cohesin's Smc1-kleisin interaction.

Mol. Cell 15, 951-964

Haering C.H. und Nasmyth K. (2003)

Building and breaking bridges between sister chromatids.

Bioessays. 25,1178-1191

Hamer G., Gell K., Kouznetsova A., Novak I., Benavente R. und Höög C. (2006):

Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex.

J. Cell Sci. 119, 4025-4032

Handel M.A. (1987):

Genetic control of spermatogenesis in mice

In: Hennig W., Nijmegen und Scheer U. (eds.) „Spermatogenesis Genetic Aspects“

Springer Verlag, Heidelberg

Heald R. und McKeon F. (1990):

Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis.

Cell 61, 579-589

Heins S. und Aebi U. (1994):

Making heads and tails of intermediate filament assembly, dynamics and networks.

Curr. Opin. Cell Biol. 6, 25-33

Herrmann H. und Aebi U. (2004):

Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds.

Annu. Rev. Biochem. 73, 749-789.

Heyting C. (1996):

Synaptonemal complexes: structure and function.

Curr. Opin. Cell Biol. 8, 389-396

Heyting C., Dietrich A.J.J., Moens P.B., Dettmers R.J., Offenberg H.H., Redeker E.J.W. und Vink A.C.G. (1989):
Synaptonemal complex proteins.
Genome 31, 81-87

Heyting C., Moens P.B., van Raamsdonk W., Dietrich A.J.J., Vink A.C.G. und Redeker E.J.W. (1987):
Identification of two major components of the lateral elements of synaptonemal complexes.
Eur. J. Cell Biol. 43, 148-154

Higgins J.D., Sanchez-Moran E., Armstrong S.J., Jones G.H. und Franklin F.C. (2005):
The Arabidopsis synaptonemal complex protein ZYP1 is required for chromosome synapsis and normal fidelity of crossing over.
Genes. Dev. 19, 2488-2500

Hirano T. (2002):
The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair.
Genes Dev. 16, 399-414

Hirano T., Kobayashi R. und Hirano M. (1997):
Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a Xenopus homolog of the Drosophila Barren protein.
Cell 89, 511-521.

Hollingsworth N.M., Goetsch L. und Byers B. (1990):
The HOP1 gene encodes a meiosis-specific component of yeast chromosomes.
Cell 61, 73-84

Hong Y., Liu T., Zhao H., Xu H., Wang W., Liu R., Chen T., Deng J. und Gui J. (2004):
Establishment of a normal medakafish spermatogonial cell line capable of sperm production *in vitro*.
PNAS 101, 8011-8016

Ierardi L.A., Moss A.R. und Bellvé A.R. (1983):
Synaptonemal complex are integral components of the isolated mouse spermatocyte nuclear matrix.
J. Cell Biol. 96, 1717-1726

Iwai T., Yoshii A., Yokota T., Sakai C., Hori H., Kanamori A. und Yamashita M. (2006):
Structural components of the synaptonemal complex, SYCP1 and SYCP3, in the medaka fish *Oryzias latipes*.
Exp. Cell Res. 312, 2528-2537

Jessberger R. (2005):
How to divorce engaged chromosomes?
Mol. Cell Biol. 25, 18-22

Kammerer R. A., Schulthess T., Landwehr R., Lustig A., Engel J., Aebi U. und Steinmetz M. O. (1998):

An autonomous folding unit mediates the assembly of two-stranded coiled coils.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13419-13424

Kaufmann S.H., Coffey D.S. und Shaper J.H. (1981):

Considerations in the isolation of rat liver nuclear matrix, nuclear envelope, and pore complex lamina.
Exp. Cell Re. 132, 105-112

Keeney S. (2001):

Mechanism and control of meiotic recombination initiation.
Curr. Top. Dev. Biol. 52, 1–53

Kishimoto A., Nishiyama K., Nakanishi H., Uratsuji Y., Nomura H., Takeyama Y. und Nishizuka Y. (1985):

Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5' monophosphate-dependent protein kinase.
J. Biol. Chem. 260, 12492-12499

Kitajima T.S., Miyazaki Y., Yamamoto M. und Watanabe Y. (2003):

Rec8 cleavage by separase is required for meiotic nuclear divisions in fission yeast.
EMBO J. 22, 5643-5653

Kleckner N. (2006):

Chiasma formation: chromatin/axis interplay and the role(s) of the synaptonemal complex.
Chromosoma 115, 175-194

Klein F., Mahr P., Galova M., Buonomo S.B., Michaelis C., Nairz K. und Nasmyth K. (1999):

A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis.
Cell 98, 91-103

Kouznetsova A., Novak I., Jessberger R. und Höög C. (2005):

SYCP2 and SYCP3 are required for cohesion core integrity at diplotene but not for centromere cohesion at the first meiotic division.
J. Cell Sci. 118, 2271-2278

Krohne G. (1998):

Lamin assembly in vivo.
Subcell. Biochem. 31, 563-586

Lammers J.H.M., Offenberg H.H., van Aalderen M., Vink A.C.G., Dietrich A.J.J. und Heyting C. (1994):

The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes.
Mol. Cell Biol. 14, 1137-1146

Laemmli U. K. (1970):

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685

Lee J., Iwai T., Yokota T. und Yamashita M. (2003):

Temporally and spatially selective loss of Rec8 protein from meiotic chromosomes during mammalian meiosis.
J. Cell Sci. 116, 2781-2790

Li B., Pilcher K.Y., Wyman T.E. und Machida C.A. (1997):

Rapid preparation and identification of insert-containing recombinant plasmid DNA.
Biotechniques 23, 603-606, 608

Liebe B., Alsheimer M., Höög C., Benavente R. und Scherthan H. (2004):

Telomere attachment, meiotic chromosome condensation, pairing and bouquet stage duration are modified in spermatocytes lacking axial elements.
Mol. Biol. Cell 15, 827-837

Liu J.-G., Yuan L., Brundell E., Björkroth B., Daneholt B. und Höög C. (1996):

Localization of the N-terminus of SCP1 to the central element of the synaptonemal complex and evidence for direct interactions between the N-termini of SCP1 molecules organized head-to-head.
Exp. Cell Res. 226, 11-19

Lodisch H. (2001):

Molekulare Zellbiologie, vierte Auflage

Losada A., Yokochi T., Kobayashi R. und Hirano T. (2000):

Identification and characterization of SA/Scc3p subunits in the Xenopus and human cohesion complexes.
J. Cell Biol. 150, 405-416

Lupas A., van Dyke M. und Stock J (1991):

Predicting coiled-coils from protein sequences.
Science 252, 1162-1164

MacQueen A.J., Colaiacovo M.P., McDonald K. und Villeneuve A.M. (2002):

Synapsis-dependent and -independent mechanisms stabilize homolog pairing during meiotic prophase in *C. elegans*.
Genes Dev. 16, 2428-2442

Mason J. M. und Arndt K. M. (2004):

Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications.
ChemBiochem. 5, 170-176

McDougall, A., Elliott, D.J., und Hunter, N. (2005):

Pairing, connecting, exchanging, pausing and pulling chromosomes.
EMBO Rep. 6, 120-125

Meistrich M. (1977):

Separation of spermatogenic cells and nuclei from rodent testes.
Meth. Cell Biol. 15, 15-54

Meuwissen R.L.J., Meerts I., Hoovers J.M.N., Leschot N.J. und Heyting C. (1997):

Human synaptonemal complex protein 1 (SCP1): Isolation and characterization of the cDNA and chromosomal localization of the gene.
Genomics 39, 377-384

Meuwissen R.L.J., Offenbergh H.H., Dietrich A.J.J., Riesewijk A., van Iersel M. und Heyting C. (1992):

A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes.
EMBO J. 11, 5091-5100

Meyer G.F. (1960):

The fine structure of spermatocyte nuclei of *Drosophila melanogaster*.
Proc. Eur. Reg. Conf. Electron Microsc. 2, 951-954

Miyamoto T., Hasuike M.P., Yogev L., Maduro M.R., Ishikawa M., Westphal H. und Lamb D.J. (2003):

Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3.
Lancet 362, 1714-1719

Moens P.B., Marcon E., Shore J.S., Kochakpour N. und Spyropoulos B. (2007):

Initiation and resolution of interhomolog connections: crossover and non-crossover sites along mouse synaptonemal complexes.
J. Cell Sci. 120, 1017-1027

Moens P.B., Kolas N.K., Tarsounas M., Marcon E., Cohen P.E. und Spyropoulos B. (2002):

The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA-DNA interactions without reciprocal recombination.
J. Cell Sci. 115, 1611-1622

Moens P.B. und Spyropoulos B. (1995):

Immunocytology of chiasmata and chromosomal disjunction at mouse meiosis.
Chromosoma 104, 175-182

Morgan T.H. (1912):

Complete linkage in the second chromosome of the male of *Drosophila*.
Science 36, 719-720

Moses M.J. (1956):

Chromosome structures in crayfish spermatocytes.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 215-218

Nag D.K., Scherthan H., Rockmill B., Bhargava J. und Roeder G.S. (1995):
Heteroduplex DNA formation and homolog pairing in yeast meiotic mutants.
Genetics 137, 837-843

Nasmyth K. (2001):
Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meioses.
Annu. Rev. Genet. 35, 673-745

Nasmyth K., Peters J.M. und Uhlmann F. (2001):
Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids.
Novartis Found Symp. 237, 113-133; discussion 133-138, 158-163. Review

Offenberg H.H., Schalk J.A.C., Meuwissen R.L.J., van Aalderen M., Kester H.A., Dietrich A.J.J. und Heyting C. (1998):
SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat.
Nucleic Acids Res. 26, 2572-2579

Öllinger R., Alsheimer M. und Benavente R. (2005):
Mammalian protein SCP1 forms synaptonemal complex-like structures in the absence of meiotic chromosomes.
Mol. Biol. Cell 16, 212-217

Olson L.W. und Zimmermann F.K. (1978):
Meiotic recombination and synaptonemal complexes in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Gen Genet. 166, 151-159

Olson L.W. und Zimmermann F.K. (1978):
Mitotic recombination in the absence of synaptonemal complexes in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Gen Genet. 166, 161-165

Ortega S., Prieto I., Odajima J., Martin A., Dubus P., Sotillo R., Barbero J.L., Malumbres M. und Barbacid M. (2003):
Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice.
Nat. Genet. 35, 25-31

Osman K., Sanchez-Moran E., D. Higgins J.D., Jones G.H. und Franklin F.C.H. (2006):
Chromosome synapsis in *Arabidopsis*: analysis of the transverse filament protein ZYP1 reveals novel functions for the synaptonemal complex
Chromosoma 115, 212-219

Page S.L. und Hawley R.S. (2004):
The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex.
Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 20, 525-558

Page S.L. und Hawley R.S. (2003):

Chromosome choreography: the meiotic ballet.
Science 301, 785-789

Page S.L., Hawley R.S. (2001):

c(3)G encodes a Drosophila synaptonemal complex protein.
Genes Dev. 15, 3130-3143

Paques F., und Haber J.E. (1999):

Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*.
Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63, 349-404

Parisi S., McKay M.J., Molnar M., Thompson M.A., van der Spek P.J., van Drunen-Schoenmaker E., Kanaar R., Lehmann E., Hoeijmakers J.H. und Kohli J. (1999):

Rec8p, a meiotic recombination and sister chromatid cohesion phosphoprotein of the Rad21p family conserved from fission yeast to humans.
Mol. Cell Biol. 19, 3515-3528

Parra M. T., Viera A., Gomez R., Page J., Benavente R., Santos J. L., Rufas J. S. und Suja J. A. (2004):

Involvement of the cohesin Rad21 and SCP3 in monopolar attachment of sister kinetochores during mouse meiosis I.
J. Cell Sci. 117, 1221-1234

Pasierbek P., Jantsch M., Melcher M., Schleiffer A., Schweizer D. und Loidl J. (2001):

A *Caenorhabditis elegans* cohesion protein with functions in meiotic chromosome pairing and disjunction.
Genes Dev. 15, 1349-1360

Pelttari J., Hoja M.-R., Yuan L., Liu J.-G., Brundell E., Moens P., Santucci-Darmanin S., Jessberger R., Barbero J.L., Heyting C. und Höög C. (2001):

A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells.
Mol. Cell Biol. 21, 5667-5677

Pinna L. (1990):

Casein kinase 2: an „eminence grise“ in cellular regulation?
Biochim. Biophys. Acta 1054, 267-284

Pittman D.L., Cobb J., Schimenti K.J., Wilson L.A., Cooper D.M., Brignull E., Handel M.A. und Schimenti J.C. (1998):

Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog.
Mol. Cell 1, 697-705

Prieto, I., Pezzi, N., Buesa, J.M., Kremer, L., Barthelemy, I., Carreiro, C., Roncal, F., Martinez, A., Gomez, L., Fernandez, R., Martinez, A.C., und Barbero, J.L. (2002):
STAG2 and Rad21 mammalian mitotic cohesins are implicated in meiosis.
EMBO Rep. 3, 543-550

Prieto I., Suja J.A., Pezzi N., Kremer L., Martinez-A.C., Rufas J.S. und Barbero J.L.
(2001):
Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I.
Nat. Cell Biol. 3, 761-766

Rasmussen S.W. (1973):
Ultrastructural studies of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* Meigen.
Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 140, 125-144

Revenkova E. und Jessberger R. (2006):
Shaping meiotic prophase chromosomes: cohesins and synaptonemal complex proteins.
Chromosoma 115, 235-240

Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Hodges, C.A., Hunt, P.A., Liebe, B., Scherthan, H., und Jessberger, R. (2004):
Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination.
Nat. Cell Biol. 6, 555-562

Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Gross, B., und Jessberger, R. (2001):
Novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1.
Mol. Cell Biol. 21, 6984-6998

Risley M.S. (1986):
The organization of meiotic chromosomes and synaptonemal complexes
In: Risley M.S. (ed.) „Chromosome structure and function“, Van Nostrand Reinhold Comp.,
New York

Rockmill B. und Roeder G.S. (1990):
Meiosis in asynaptic yeast.
Genetics 126, 563-574

Roeder G.S. (1997):
Meiotic chromosomes: it takes two to tango.
Genes Dev. 11, 2600-2621

Sage J., Martin L., Cuzin F. und Rassoulzadegan M. (1995):
cDNA sequence of the murine synaptonemal complex protein 1 (SCP1).
Biochim. Biophys. Acta 1263, 258-260

Saitou N, Nei M (1987):
The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.
Mol. Biol. Evol. 4, 406-425

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

Schalk J.A.C., Offenberg H.H., Peters E., Groot N.P.B., Hoovers J.M.N. und Heyting C. (1999):
Isolation and characterization of the human SCP2 cDNA and chromosomal localization of the gene.
Mammalian Genome 10, 642-644

Schalk J.A., Dietrich A.J., Vink A.C., Offenberg H.H., van Aalderen M. und Heyting, C. (1998):
Localization of SCP2 and SCP3 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat.
Chromosoma 107, 540-548

Scherthan H., Weich S., Schwegler H., Heyting C., Härle M. und Cremer T. (1996):
Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing.
J. Cell Biol. 134, 1109-1125

Schmekel K., Meuwissen R.L.J., Dietrich A.J.J., Vink A.C.G., van Marle J., van Veen H. und Heyting C. (1996):
Organization of SCP1 protein molecules within the synaptonemal complexes of the rat.
Exp. Cell Res. 226, 20-30

Schmekel K. und Daneholt B. (1995):
The central region of the synaptonemal complex revealed in three dimensions.
Trends Cell Biol. 5, 239-242

Smith A. und Benavente R. (1992):
Identification of a structural protein component of rat synaptonemal complexes.
Exp. Cell Res. 198, 291-297

Smith A.V. und Roeder G.S. (1997):
The yeast Red1 protein localizes to the cores of meiotic chromosomes.
J. Cell Biol. 136, 957-967

Solari A.J. (1974):
The behaviour of the XY pair in mammals.
Int. Rev. Cytol. 38, 273-317

Storlazzi A., Xu L., Schwacha A. und Kleckner N. (1996):
Synaptonemal complex (SC) component Zip1 plays a role in meiotic recombination independent of SC polymerization along the chromosomes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9043-9048

Sumara I., Vorlaufer E., Gieffers C., Peters B.H. und Peters J.M. (2000):
Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase.
J. Cell Biol. 151, 749-762

Sym M. und Roeder G.S. (1995):

Zip1-induced changes in synaptonemal complex structure and polycomplex assembly.
J. Cell Biol. 128, 455-466

Sym M., Engebrecht J. und Roeder G.S. (1993):

ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis.
Cell 72, 365-378

Tarsounas M., Pearlman R. E. und Moens P.B. (1999):

Meiotic activation of rat pachytene spermatocytes with okadaic acid: the behaviour of synaptonemal complex components SYN1/SCP1 and COR1/SCP3.
J. Cell Sci. 112, 423-434

Tarsounas M., Pearlman R.E., Gasser P. J., Park M.S. und Moens P.B. (1997):

Protein-protein interactions in the synaptonemal complex.
Mol. Biol. Cell 8, 1405-1414

Thompson E.A. und Roeder G.S. (1989):

Expression and DNA sequence of RED1, a gene required for meiosis I chromosome segregation in yeast.
Mol. Gen Genet. 218, 293-301

Tung K.S. und Roeder G.S. (1998):

Meiotic chromosome morphology and behavior in zip1 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.
Genetics 149, 817-832

Valdeolmillos A. M., Viera A., Page J., Prieto I., Santos J.L., Parra M.T., Heck M.M.S., Martinez-A. C., Barbero J.L., Suja J.A. und Rufas J.S. (2007):

Sequential Loading of Cohesin Subunits during the First Meiotic Prophase of Grasshoppers.
Plos. Genetics 3, 204-215

von Wettstein D., Rasmussen S.W. und Holm P.B. (1984):

The synaptonemal complex in genetic segregation.
Annu. Rev. Genet. 18, 331-413

Walker J.M., Saraste M., Runswick M. und Gay N. (1982):

Distantly related sequences in α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold.
EMBO J. 1, 945-951

Wang H. und Höög C. (2006):

Structural damage to meiotic chromosomes impairs DNA recombination and checkpoint control in mammalian oocytes.
J. Cell Biol. 173, 485-495

Ward G.E. und Kirchner M.W. (1990):

Identification of cell cycle-regulated phosphorylation sites on nuclear lamin C.
Cell 61, 561-577

Watanabe Y. und Nurse P. (1999):

Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis.
Nature 400, 461-464

Weiner B.M. und Kleckner N. (1994):

Chromosome pairing via multiple interstitial interactions before and during meiosis in yeast.
Cell 77, 977-991

Winkel K. (2006):

Untersuchung der Interaktion zwischen den Synaptonemalkomplexproteinen SYCP1 und SYCP2.
Diplomarbeit

Woltering D., Baumgartner B., Bagchi S., Larkin B., Loidl J., de los Santos T. und Hollingsworth N.M. (2000):

Meiotic segregation, synapsis, and recombination checkpoint functions require physical interaction between the chromosomal proteins Red1p and Hop1p.
Mol. Cell Biol. 20, 6646-58

Xu H., Beasley M.D., Warren W.D., van der Horst G.T. und McKay M.J. (2005):

Absence of mouse REC8 cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis.
Dev. Cell 8, 949-961

Yang F., De La Fuente R., Leu N.A., Baumann C., McLaughlin K.J. und Wang PJ (2006):

SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis.
J. Cell Biol. 173, 497-507

Yoshida Y., Sadata A., Zhang W., Saito K., Shinoura N. und Hamada, H. (1998):

Generation of fiber-mutant recombinant adenoviruses for gene therapy of malignant glioma.
Hum. Gene Ther. 9, 2503-2515

Yu, H.G., und Koshland, D.E. (2003):

Meiotic condensin is required for proper chromosome compaction, SC assembly, and resolution of recombination-dependent chromosome linkages.
J. Cell Biol. 163, 937-947.

Yuan L., Liu J.-G., Hoja M.-R., Wilbertz J., Nordqvist K. und Höög C. (2002):

Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3.
Science 296, 1115-1118

Yuan L., Liu J.-G., Zhao J., Brundell E., Daneholt B. und Höög C. (2000):

The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility.
Mol. Cell 5, 73-83

Yuan L., Pelttari J., Brundell E., Björkroth B., Zaho J., Liu J.-G., Brismar H., Daneholt B. und Höög C. (1998):

The synaptonemal complex protein SCP3 can form multistranded, cross-striated fibers in vivo.

J. Cell Biol. 142, 331-339

Yuan L., Brundell E. und Höög C. (1996):

Expression of the meiosis-specific synaptonemal complex protein 1 in a heterologous system results in the formation of large protein structures.

Exp. Cell Res. 229, 272-275

Zickler D. (2006):

From early homologue recognition to synaptonemal complex formation.

Chromosoma 115, 158-174

Zickler D. und Kleckner N. (1999):

Meiotic chromosomes: integrating structure and function.

Annu. Rev. Genet. 33, 603-754

Zickler D. und Kleckner N. (1998):

The leptotene-zygotene transition of meiosis.

Annu. Rev. Genet. 32, 619-697

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich,

dass ich die vorliegende Arbeit unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen selbständig angefertigt habe,

dass ich diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen habe,

und dass ich noch keine akademischen Grade erworben habe und früher auch noch nicht versucht habe einen akademischen Grad zu erwerben.

Würzburg, den

.....

Andrea Baier

Publikationen

Veröffentlichte Publikationen als Autor und Koautor

Baier A., Wittek B. und Brembs B. (2002):

Drosophila as a new model organism for the neurobiology of aggression?
J.Exp.Biol. 205, 1233-1240

Geisinger A., Alsheimer M., Baier A., Benavente R. und Wettstein R. (2005):

The mammalian gene *pecanex 1* is differentially expressed during spermatogenesis.
Biochim. Biophys. Acta. 1728, 34-43

Baier A., Alsheimer M. und Benavente R. (2007a):

Synaptonemal complex protein SYCP3: Conserved polymerization properties among vertebrates.
Biochim. Biophys. Acta 1774, 595-602

Baier A., Alsheimer M., Voff J.-N. und Benavente R. (2007b):

Synaptonemal complex protein SYCP3 of the rat: Evolutionary conserved domains and the assembly of higher order structures.
Sex. Dev. 1, 161-168

Beteiligungen an Kongressen mit veröffentlichten Abstracts

Baier A., Benavente R. und Alsheimer M. (2003):

The evolutionary highly conserved short sequences flanking the coiled-coil domain of synaptonemal complex protein SCP3 are essential for polymerization.
6th European Meiosis Meeting, 13-18.September 2003

Baier A., Alsheimer M. und Benavente R. (2004):

Architecture of the mammalian meiotic chromosome: Protein domains of synaptonemal complex protein SCP3 essential for polymerization.
27. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie in Berlin, 24.-27. März 2004

Baier A., Alsheimer M. und Benavente R. (2005):

The structural protein SCP3 of synaptonemal complexes: Protein domains involved in the assembly of higher order structures.
28. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie in Heidelberg, 16.-19. März 2005

Baier A., Alsheimer M. und Benavente R. (2005):

Architecture of meiotic chromosomes: Protein domains of synaptonemal complex protein SYCP3 involved in the assembly of higher order structures.
19. Wilhelm Bernhard Workshop in Münsterschwarzach 1.-5. September 2005

Lebenslauf

Andrea Baier

Geboren am 31. August 1977 in Stierhöfstetten

unverheiratet

Schulbildung

1984-1988 Grundschule Scheinfeld

1988-1997 Gymnasium Scheinfeld

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

1998-2003 **Biologiestudium** an der Bayerischen Julius Maximilians Universität Würzburg

Studienschwerpunkte: Zell- und Entwicklungsbiologie (Hauptfach)

 Biochemie (Nebenfach)

 Humangenetik (Nebenfach)

Abschluss: „mit Auszeichnung“

2002-2003 **Diplomarbeit** am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie an der Bayerischen Julius Maximilians Universität Würzburg bei Prof. Dr. Ricardo Benavente

Thema: Aufbau des synaptonemalen Komplexes:

Polymerisationseigenschaften des Proteins SCP3

2003-2007 **Promotionsstudium** am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie an der Bayerischen Julius Maximilians Universität Würzburg bei Prof. Dr. Ricardo Benavente

Thema: Architektur meiotischer Chromosomen:

Eigenschaften und Evolution des Synaptonemalkomplexproteins SYCP3

Danksagung

Die Zeit in Würzburg hat mich stark geprägt und die Begegnungen mit so vielen verschiedenen Menschen haben mich zu dem gemacht was ich heute bin.

Ich danke meiner großen Familie, denn um mutig nach vorne gehen zu können, ist es wichtig Menschen zu haben, die immer zu einem stehen und einen den Rücken stärken.

Danke Ricardo für deine hervorragenden Chef-Qualitäten. Meine größte Motivation im Labor zu Arbeiten war, zu dir kommen zu dürfen und deine Freude an den Ergebnissen zu sehen.

Herrn Prof. Dr. Manfred Scharl möchte ich für die Übernahme der Zweitkorrektur danken.

Danke Manfred für die ausgezeichnete Betreuung und für dein unendlich großes Wissen, von dem jeder profitieren durfte. Sehr zeitsparend fand ich die Literaturzusammenfassungen, kreativ die Experimentvorschläge, manchmal etwas negativ die Versuchsprognosen, hilfreich die Computerlektionen und amüsant die Laborgeschichten „...ja, früher musste man noch...“

Den außergewöhnlichen Spaß an der Arbeit verdanke ich Wolfgang (unser Häuptling mit dem Motto: In der Ruhe liegt die Kraft), Ruppi (es war mir eine Freude deine ganz besondere Art erlebt haben zu dürfen), Hannes (mein persönlicher Koordinator; ich kenne keinen hilfsbereiteren Menschen), Karoline, Eva, Sabine und Antje. Ihr seid nicht nur Laborkollegen sondern auch Freunde geworden. Außerdem möchte ich meinen Praktikanten Holger, Mandy, Enrique, Sarah und ganz besonders Sascha danken.

Für die erstklassige Stimmung und die sehr gute Zusammenarbeit am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie möchte ich mich bei allen ganz herzlich bedanken. Unsere gemeinsamen Ausflüge in die Fränkische Schweiz haben über das Arbeiten hinaus das Klima doch sehr aufgeheitert. In der EM-Abteilung gab es zudem neben dem Express-Service (Danke Elisabeth) auch immer einen netten Plausch und ein Stück Kuchen.

Außerdem möchte ich der Kletterfamilie, den Standard-Gästen und den Kali-Jungs danken.

Danke Uli für die tolle Zeit. „Wer seinen Doktor mit 30 nicht hat muss ihn halt selbst machen!“

Ein besonderes Dankeschön geht an Matthias mit Albert. Du gibst mir das Gefühl der beste Mensch zu sein.