

**Architektur meiotischer Chromosomen:
Polymerisationseigenschaften des
Synaptonemalkomplexproteins SYCP1
und
Charakterisierung von Bindungspartnern**

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

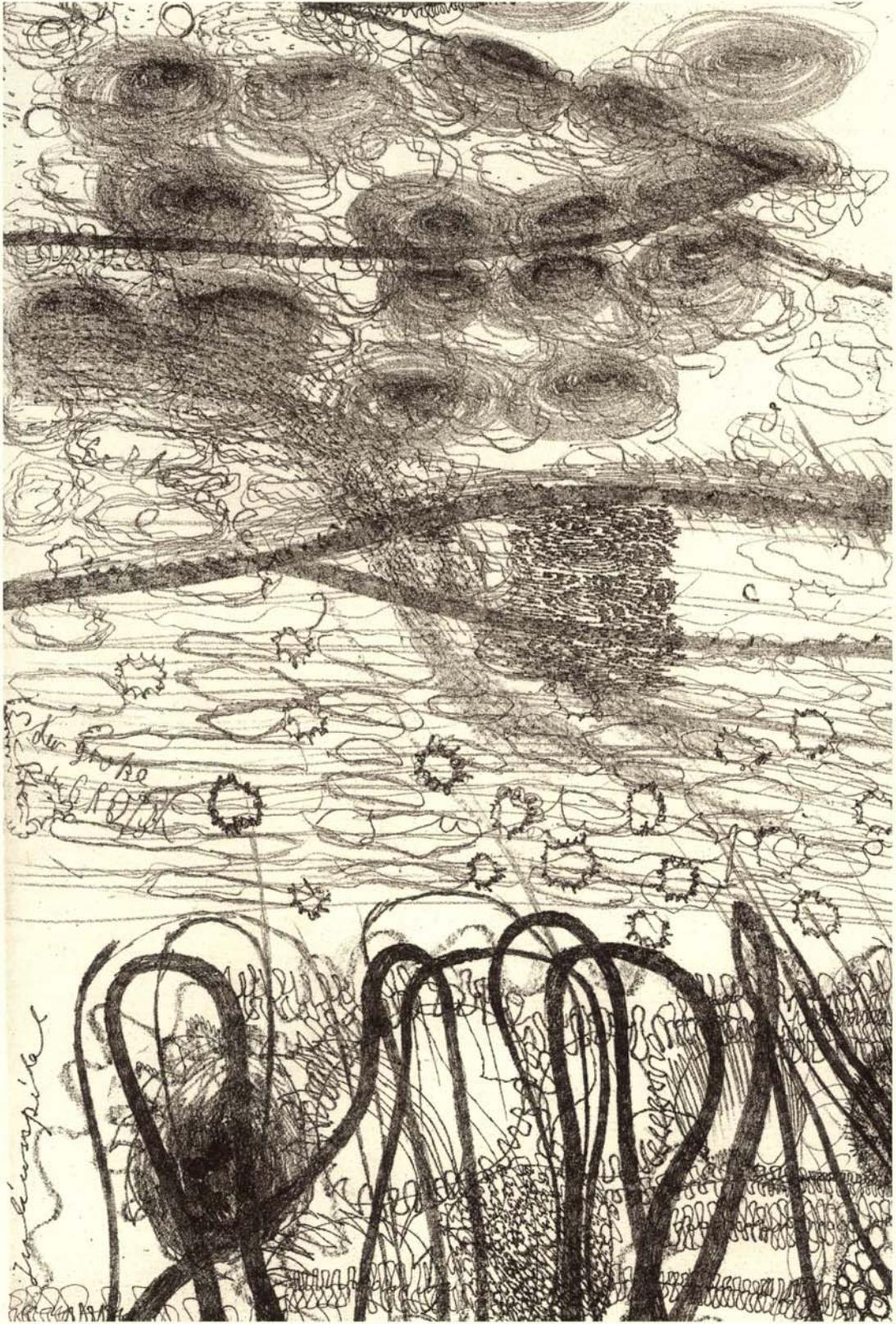
vorgelegt von

Rupert Öllinger

aus

Traunstein

Würzburg 2005



Ausschnitt aus "die Stadt grünt schön" von Kristin Finsterbusch

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Ulrich Scheer

Gutachter : Prof. Dr. Ricardo Benavente

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Scharl

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Gliederung

1. Einführung	1
1.1 Die Meiose	3
1.1.1 Prophase I	5
1.2 Paarung, Synapse und Rekombination meiotischer Chromosomen:	
Molekulare und funktionelle Zusammenhänge	6
1.2.1 Kohäsine und Kondensine	7
1.2.2 Der Synaptonemalkomplex	8
1.2.3 Rekombination	17
1.2.4 Funktion des SC	20
1.3 Polykomplexe (PCs)	23
1.4 Modellsysteme	24
1.4.1 Spermatogenese bei Säugetieren	25
1.5 „Cancer/Testis“-Antigene (CTAs)	28
1.5.1 SYCP1 als CTA	29
1.6 Proteinfaltung von SYCP1	31
1.6.1 Die „Coiled-Coil“-Domäne	31
1.6.2 Bedeutung der Domänen von SYCP1 bei Proteinfaltung und Polymerisation	34
1.7 Ziele	35
2. Abkürzungen	36
3. Methoden	37
3.1 Mikrobiologisches Arbeiten	37
3.2 Zellkultur, Gewebe und Isolierung von Spermatocyten	39
3.2.1 Zellkultur	39
3.2.2 Gewebepreparation	40
3.2.3 Gewinnung angereicherter Zellfraktionen verschiedener Spermatogenesestadien aus	
Maushoden durch zentrifugale Elutriation (Meistrich, 1977)	40
3.3 Arbeiten mit rekombinanter DNA	45
3.3.1 Isolierung von RNA aus Geweben und Zellen	45
3.2.2 Gewinnung von cDNA	45
3.2.3 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	45
3.2.4 DNA-Auftrennung durch Agarose-Gelelektrophorese	47
3.2.5 Plasmid DNA Präparation aus Bakterienkulturen	48
3.2.6 Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme	49

3.2.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	49
3.2.8	Fällung von Nukleinsäuren (DNA und RNA).....	50
3.2.9	DNA-Sequenzierung	50
	Insertion von DNA-Fragmenten in Vektoren.....	51
3.2.10	Umklonierung mittels Restriktionsenzymen	51
3.2.11	Klonierung von PCR-Fragmenten.....	52
3.2.12	Deletion eines DNA-Bereichs durch Rundum-PCR	53
3.2.13	Mutagenese einzelner Basen	53
3.2.14	Transformation von Bakterien und Screening der Klone.....	54
3.3	Expression rekombinanter Proteine in Bakterien und deren Reinigung	55
3.3.1	Expression von Fusionsproteinen in Bakterien	55
3.3.2	GST-Reinigung.....	55
3.3.3	His-Tag Reinigung (denaturierend).....	57
3.3.4	Dialyse.....	58
3.4	Affinitätsreinigung von Antikörpern	58
3.4.1	Kovalente Bindung eines Peptids an aktivierte CNBr-Sepharose	59
3.4.2	Bindung der Antikörper und Elution	60
3.5	Mikroskopische Methoden.....	61
3.5.1	Immunfluoreszenz Mikroskopie.....	61
3.5.2	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)	62
3.5.3	FRAP: "Fluorescence Recovery After Photobleaching"	64
3.6	Proteinbiochemische Analysen.....	66
3.6.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	66
3.6.2	Commassie-Blau Färbung eines Proteingels	68
3.6.3	Western Blot.....	68
4.	Material.....	71
4.1	Biologisches Material	71
4.1.1	Tiere.....	71
4.1.2	Zelllinien.....	71
4.1.3	Bakterienstämme	71
4.2	Geräte.....	72
4.3	Computerprogramme	72
4.4	Molekularbiologisches Material	73
4.4.1	Plasmidvektoren	73
4.4.2	Enzyme	74
4.4.3	Kits und Einzelkomponenten.....	75
4.4.4	Chemikalien.....	75

4.4.5	Primer	76
4.5	rekombinante DNA Konstrukte	78
4.5.1	SYCP1 Konstrukte zur Proteinexpression in eukaryotischen Zellen	78
4.5.2	Syce1 und Cesc1 Konstrukte zur Expression in eukaryotischen Zellen.....	81
4.5.3	SYCP1 Konstrukte zur Proteinexpression in Bakterien	81
4.6	Antikörper.....	82
4.6.1	rabbit α -SYCP1-C	82
4.6.2	Monoklonaler Antikörper VIIIId3	82
4.6.3	Antikörper gegen Syce1 und Cesc1.....	83
4.6.4	α -myc.....	83
5.	Ergebnisse	84
5.1	Klonierung der cDNA von SYCP1	84
5.2	Konstrukte.....	85
	Polymerisationseigenschaften von SYCP1	87
5.3	Polymerisation von SYCP1 in COS-7 Zellen.....	87
5.4	Organisation der SYCP1 Moleküle im Polykomplex	89
5.5	Einfluss der „Coiled-Coil“-Domäne von SYCP1 auf die Polykomplex-Bildung.....	91
5.6	Einfluss des N-terminalen Bereichs von SYCP1 auf die Polymerisation.....	93
5.7	Einfluss der C-terminalen Region von SYCP1 auf die Polymerisation.....	95
5.8	Dynamik von SYCP1 innerhalb von Polykomplexen.....	97
	Bindungspartner von SYCP1	99
5.9	Lokalisation der Proteine Syce1 und Cesc1	101
5.10	Interaktionen von Syce1 und Cesc1	103
5.11	Interaktion von Syce1 und Cesc1 mit SYCP1	105
6.	Diskussion	108
6.1	Proteinfaltung und Polymerisation von SYCP1.....	108
6.2.1	Aufbau der zentralen Region von PCs und SCs	109
6.2.2	Aufbau der dicken elektronendichten Balken von PCs und LEs von SCs	112
6.3	Bindungspartner von SYCP1: Cesc1 und Syce1	114
6.4	SYCP1 spielt eine zentrale Rolle in Synapse und Rekombination	115
6.5	SYCP1 als CTA	117
6.6	Ausblick	119
7.	Referenzen	121
8.	Zusammenfassung	128
8e.	Summary	129

9. Publikationsliste	131
9.1 Veröffentlichte Publikationen als Autor und Koautor	131
9.2 Beteiligungen an Kongressen mit veröffentlichten Abstracts.....	131
10. Erklärung	132
11. Lebenslauf	133

1. Einführung

Während der sexuellen Fortpflanzung verschmelzen eine männliche und weibliche Keimzelle zur Zygote, aus der ein neuer Organismus entsteht. Dabei stellt die Meiose den zentralen Differenzierungsprozess dar, in dem die Haploidisierung und zusätzlich die Neukombination des Erbmaterials durch Austausch zwischen homologen Chromosomen stattfinden. Dies ermöglicht eine unglaubliche Vielfalt der genetischen Ausstattung von einer Generation zur nächsten und ist somit ein Grundelement der Evolution. Die Entstehung der geschlechtlichen Vermehrung wird allgemein als der Grundstein der Entwicklung zu höheren Lebewesen angesehen.

Die Betrachtung von einem weniger übergeordneten Standpunkt eröffnet eine andere Sicht. Für das Individuum ist die sexuelle Fortpflanzung eigentlich unvorteilhaft, da die zusätzlich zu den Weibchen erzeugten Männchen bei partenogenetischer Fortpflanzung nicht nötig wären und nur die Hälfte des eigenen genetischen Materials weitergeben werden kann. Also muss es trotz dieser enormen Kosten einen Vorteil der sexuellen Fortpflanzung geben, der auch auf der Ebene des Individuums greift. Dafür werden unter Anderem folgende Argumente herangezogen. (i) DNA-Schäden führen unweigerlich zur Ansammlung von unvorteilhaften Mutationen. Diese können nur durch Neuzusammenstellung der Chromosomen durch Rekombination aus dem Genpool entfernt werden, da sich selbst bei hohem Selektionsdruck bei parthenogenetischer Fortpflanzung Mutationen wohl kaum zurückbilden und folglich akkumulieren. Hinzu kommt als Vorteil, dass sich vorteilhafte Mutationen über die Population ausbreiten können. (ii) Die Parasiten-Hypothese von Bill Hamilton begründet einen entscheidenden Selektionsvorteil der sexuellen Fortpflanzung, der besagt, dass Parasiten bevorzugt jeweils den häufigsten Typ des Wirts-Immunsystems befallen. Durch sexuelle Neuzusammenstellung können immer wieder neue und seltene Typen von Immunsystemen entstehen.

Dieser zentralen Stellung und nicht zuletzt ihrer Ästhetik verdankt die Meiose bereits früh eine genaue zellbiologische Untersuchung, in der die wichtigsten Prozesse erkannt und zeitlich und räumlich definiert wurden. Dabei war die Entdeckung des Synaptonemalkomplexes im Transmissionselektronenmikroskop vor 50 Jahren ein Schlüsselereignis. Die Segregation der homologen Chromosomen in Kombination mit der Rekombination wurde zudem auf genetischer Ebene genau untersucht, was die Erklärung der mendelschen Gesetze auf mechanistischer Ebene erlaubt und zudem für die Genetik ein äußerst nützliches Werkzeug für Genkartierungen darstellte.

Im Zuge der Entwicklung der biologischen Forschung hin zu molekularen Fragestellungen wurde die Aufklärung von Regulationsprozessen komplexer Differenzierungsprozesse möglich. Dabei hat die Meiose lange eine Randstellung eingenommen, in den letzten zehn Jahren wurden aber gerade in der Hefe zunehmend zentrale Faktoren bekannt und über deren Bearbeitung konnten Vorstellungen über die molekularen Abläufe entwickelt werden. Die Forschung an Säugermodellen macht gerade rapide

Fortschritte und auch an Wirbellosen, wie *C. elegans* und *Drosophila* wie auch Pflanzen wird intensiv gearbeitet.

Diese Bemühungen sind für die Grundlagenforschung vor dem Hintergrund der Bedeutung der Meiose nicht schwer zu rechtfertigen. Heutzutage scheint aber auch zunehmend die Anwendbarkeit der Forschung ins Blickfeld zu geraten. Vor dem Hintergrund einer weltweiten Überbevölkerung, aber auch der Überalterung und zunehmender Kinderlosigkeit in Industrieländern, ist die Familienplanung ein Thema von großer Bedeutung. Dies betrifft einerseits die Verbesserung der Methodik, Paaren zu Kindern zu verhelfen, und andererseits die Entwicklung von Verhütungsmitteln. In beiden Feldern können mit einem tieferen Verständnis der Differenzierung von Keimzellen Fortschritte erzielt werden.

Die nicht unumstrittenen Methode des therapeutischen Klonens, bei der Embryonen erzeugt werden, indem ein Transfer eines somatischen Kerns in eine Eizelle durchgeführt wird, ist hauptsächlich durch die Organisation des Chromatins und der spezifischen epigenetischen Voraussetzungen sehr schwer durchführbar. Diese Modifikationen werden aber gerade während der Keimzellentwicklung etabliert und führen uns wieder darauf zurück, die Meiose besser zu beleuchten.

Nicht zuletzt findet die moderne molekulare Forschung zu einem nicht geringen Teil an gentechnisch veränderten Mäusen statt, deren Generierung die homologe Rekombination zur Grundlage hat und sehr aufwendig ist. Die Etablierung von genetisch veränderbaren Kulturzellen, die gezielt zu Keimzellen differenzieren, würde diese weltweit angewandte Methode beträchtlich erleichtern. Zudem wären sie ein ausgezeichnetes Werkzeug für die Erforschung der Meiose.

Nun ein paar Worte zur Gliederung der Einführung. Um die Funktion von SYCP1 zu verstehen und die Bedeutung dieser Arbeit richtig einschätzen zu können, beginnt diese mit der genauen Darstellung der Abläufe in der Meiose. Dabei werden zuerst die Ereignisse im Überblick abgehandelt und im Anschluss daran die molekularen Zusammenhänge, wobei hier dem Synaptonemalkomplex und dem Protein SYCP1 ein besonderer Stellenwert zugewiesen wird.

Polykomplexe sind eine besondere Struktur, die in meiotischen Zellen entdeckt wurden. Diese werden hier in einem eigenen Abschnitt behandelt, da sich herausstellte, dass sich deren Bildung durch die Überexpression von SYCP1 induzieren lässt (siehe Ergebnisse und Diskussion).

Die Meiose wird in verschiedenen Modellorganismen untersucht, SYCP1 ist allerdings ein Säugerprotein, das in anderen Organismen keine Sequenzhomologe hat. In einem weiteren Kapitel wird also auf die gängigen Modellsysteme eingegangen mit einem besonderen Augenmerk auf das System der Spermatogenese bei Säugern.

Schließlich ist SYCP1 zusätzlich zu seiner Rolle während der Meiose ein „Cancer/Testis“-Antigen (CTA), also ein Protein, das in verschiedenen Tumorzellen exprimiert wird. Der Erkenntnisstand zu diesem Thema wird in einem abschließenden Kapitel abgehandelt.

Der Hauptfokus der Arbeit liegt auf der Fähigkeit von SYCP1 Polymere zu Bilden. Zum Verständnis der Faltung von Proteinen, wird deshalb eine Einführung in die Proteinfaltung von SYCP1 und der Ausbildung der „Coiled-Coil“-Domäne gegeben.

Abschließend möchte ich auf die Ziele meiner Doktorarbeit eingehen.

Doch nun zur Meiose.

1.1 Die Meiose

Die **Meiose** ist der zentrale Differenzierungsprozess der Keimzellentwicklung. Im Gegensatz zur Mitose bei der genetisch identische Zellen entstehen, gehen aus der Meiose haploide Zellen hervor, deren Chromosomen zudem durch Rekombination neu zusammengestellt wurden. Dies erfolgt nach einmaliger Replikation der DNA in einer vorausgehenden S Phase in einem zweistufigen Teilungsprozess, der Meiose I und II. In der Meiose I, der reduktiven Teilung, durchlaufen die homologen Chromosomen Paarung, Synapse und Rekombination und werden schließlich getrennt. Die Meiose II, während der die Schwesterchromatiden der Chromosomen segregieren, schließt sich direkt ohne erneute S Phase an (vgl. Abb. 1.1; Übersicht in Baarends und Grootegoed, 2003; Page und Hawley, 2003; Petronczki *et al.*, 2003; Zickler und Kleckner, 1998).

Die komplexe Dynamik der Chromosomen, die in der Meiose stattfindet, erfordert eine spezielle Architektur meiotischer Chromosomen. Wie in der mitotischen Teilung werden die Chromatiden eines Chromosoms durch Kondensin- und Kohäsinkomplexe verbunden, diese sind jedoch entlang der Arme und am Zentromerbereich unterschiedlich spezifiziert. Zusätzlich zur Kondensation der Chromosomen und der Ausbildung von Kinetochoren kommt es während der Prophase I jedoch im Gegensatz zur Mitose zu engen Interaktionen der jeweils homologen Chromosomen durch Paarung und die Synapse über proteinöse Strukturen, den so genannten Synaptonemalkomplexen. Parallel und mit diesen Ereignissen verknüpft erfolgt die

Rekombination. Diese Prozesse bilden die Voraussetzung für die spätere Trennung der homologen Chromosomen. Da sie sehr komplex sind, wird der Ablauf der Prophase I unten näher beschrieben (vgl. 1.1.1) und den molekularen und strukturellen Zusammenhängen ist ein eigenes Kapitel gewidmet (vgl. 1.2). Am Ende der Prophase I löst sich die Synapse zwischen den homologen

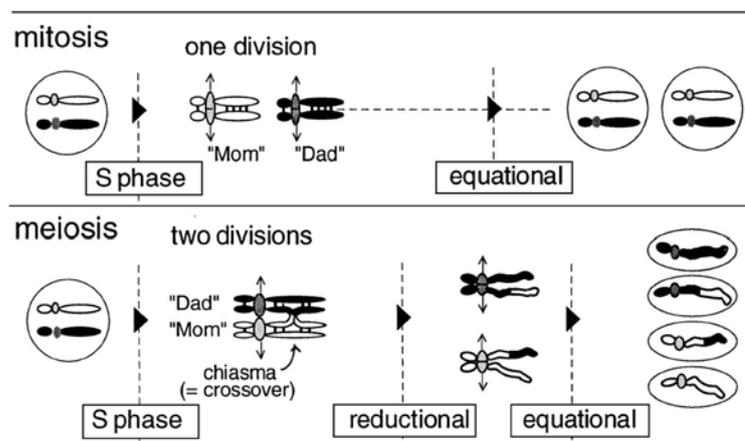


Abbildung 1.1: Vergleich zwischen Mitose und Meiose (aus Zickler und Kleckner, 1998)

Chromosomen, wonach die Bivalente nur noch an den Chiasmata verbunden sind, den Stellen an denen Crossover stattgefunden hat. Nun kommt es zur Anordnung der homologen Chromosomenpaare in der Metaphaseplatte. Dabei müssen die beiden Kinetochore der Chromatiden jedes Chromosoms so angelegt sein, dass die Spindelfasern von nur einem Pol anknüpfen können. Im Gegensatz zur Mitose werden in der Anaphase I der Meiose jetzt nur diejenigen Kohäsinkomplexe gelöst, die die Arme der Chromatiden verknüpfen, und zusätzlich werden die Chiasmata gelöst, die die Bivalente zusammenhalten. Die Verbindungen an den Zentromerregionen, die durch besondere Kohäsinkomplexe erzeugt werden, müssen jedoch beibehalten werden (vgl. Abb. 1.2). Auf diese Art und Weise können sich die Arme der Chromatiden lösen, zwischen denen es durch Crossover zum Austausch kam, und es kann jeweils ein homologes Chromosom mit beiden Schwesternchromatiden zu den zwei Polen der Zelle wandern. Es bilden sich also zwei Tochterzellen mit haploidem Chromosomensatz, die nun eine weitere Teilung ohne erneute S Phase durchlaufen. Während dieser binden bipolare Spindelfasern vergleichbar zur Mitose an die Kinetochore der einzelnen Chromatiden und ziehen diese zu entgegengesetzten Polen der Zelle, nachdem die zentromerischen Verbindungen gelöst wurden. Es sind nun haploide Zellen entstanden, deren einfacher Chromosomensatz aus je einer Chromatide besteht.

Durch die rein zufällige Verteilung paternaler bzw. maternaler Chromatiden auf die Tochterzellen und den Austausch von Teilen dieser Chromatiden durch Rekombination entstehen Tochterzellen, von denen jede eine völlig neuartige genetische Zusammenstellung besitzt. Die Aufklärung des Mechanismus der Meiose lässt demzufolge eine Erklärung der Mendel'schen Gesetze und deren Ausnahmen zu. Nach dem ersten Gesetz werden paternale und maternale Merkmale unabhängig voneinander vererbt, was durch die Trennung der homologen Chromosomen erreicht wird. Das zweite Gesetz fordert, dass zwei verschiedene Merkmale unabhängig voneinander segregieren. Dies trifft bei Allelen zu, die sich auf verschiedenen Chromosomen befinden. Wenn sich die Allele auf dem gleichen Chromosom befinden, nimmt die Wahrscheinlichkeit der unabhängigen Segregation mit der Wahrscheinlichkeit zu, mit der sich ein Crossover zwischen den Genloci ereignet.

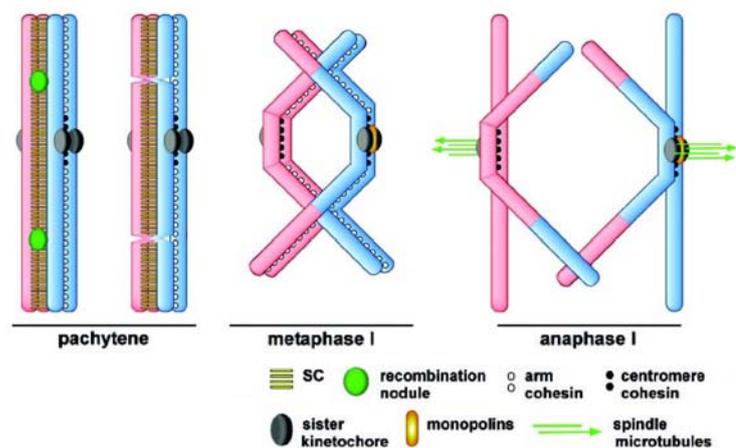


Abbildung 1.2: Verknüpfung der Bivalente während der Prophase I und Metaphase I und Trennung während der Anaphase I (aus Page und Hawley, 2003)

1.1.1 Prophase I

Bemerkenswert ist die Länge der Prophase der ersten meiotischen Teilung (Prophase I), in der die Paarung, Synapse und Rekombination der homologen Chromosomen erfolgen. Diese kann zwischen mehreren Tagen und im Fall der Oogenese mehreren Jahren liegen. Aufgrund lichtmikroskopischer Untersuchungen der morphologischen Veränderungen des Kerns und der Chromosomen wurde die Prophase I in fünf Stadien unterteilt, dem Leptotän, dem Zygotän, dem Pachytän, dem Diplotän und der Diakinese (Übersicht in Zickler und Kleckner, 1998).

Im **Leptotän** (leptos, griech. dünn) beginnen die Chromosomen zu kondensieren und können im Mikroskop als dünne Fäden ausgemacht werden. Die Chromosomenachsen der Chromatiden werden über Kondensin- und Kohäsinkomplexe (vgl. 1.2.1) zusammengehalten und auf diesen Achsen formieren sich die Axialelemente (AEs), proteinöse Strukturen, die später zu den Lateralelementen (LEs) der Synaptonemalkomplexe (SCs) werden. Die Chromosomenenden heften sich an die innere Kernhülle, an der sie über so genannte „Attachment Plaques“, proteinöse Strukturen, die die Telomersequenzen beinhalten, verankert sind (Liebe *et al.*, 2004). Weitere Strukturen, die im Elektronenmikroskop auszumachen sind, sind die Rekombinationsknoten (RNs). Es handelt sich dabei um Proteinkomplexe, die mit der homologen Rekombination in Verbindung gebracht werden (vgl. 1.3).

Im Übergang zum **Zygotän** (zygos, griech. Paar) wandern die Telomere an einen begrenzten Bereich der Kernhülle, der dem Zentrosom zugewandt ist, und von dem aus die Chromosomen sozusagen wie ein Blumenstrauß in das Nukleoplasma ausstrahlen. Deshalb wird diese Struktur als Bouquet bezeichnet. Die Chromosomen kondensieren weiter und die jeweils homologen Chromosomen paaren zu Bivalenten, wonach sie sukzessiv über SCs miteinander verbunden werden (vgl. 1.2.2). Während dieser Synapse wird die SC-Struktur in einem fortschreitenden Prozeß über die volle Länge zwischen je zwei homologen Chromosomen aufgebaut, indem die AEs nun als LEs über Transversalfilamente (TFs) miteinander verbunden werden. Die Geschlechtschromosomen der männlichen Keimzellbildung bei Säugern paaren nicht über die gesamte Länge, sondern in einem kleinen homologen Bereich, der pseudoautosomalen Region, und bilden den sogenannten „XY-body“, der einen stärkeren Kondensationsgrad als das restliche Chromatin aufweist (Übersicht in Baarends und Grootegoed, 2003).

Das **Pachytän** (pakhos, griech. dick) bildet den zeitlich längsten Abschnitt der Meiose. Die Telomere bleiben an der Kernhülle verankert, breiten sich aber wieder über die gesamte Kernhülle aus. Die Synapse ist abgeschlossen und die SCs erstrecken sich über die volle Länge der Bivalente, die mikroskopisch als kurze dicke Fäden erkennbar sind. Es kommt zur genetischen Rekombination, bei der Teile der homologen Chromatiden über Kreuz ausgetauscht werden (Crossover).

Im **Diplotän** (diploos, griech. doppelt) trennen sich die Bivalente wieder, was mit der Auflösung der SCs einhergeht, woraufhin diese nur noch an den Chiasmata zusammengehalten werden, den Stellen an denen Crossover stattgefunden hat. In diesem Stadium werden die Oocyten von Säugern über mehrere Jahre bis zu Jahrzehnten arretiert. Hier findet auch aktive Genexpression statt.

Diese Expression kommt mit der starken Kondensation der Chromosomen in der **Diakinese** (kinesis, griech. Bewegung) zum Erliegen. Die Chiasmata und pro Bivalent jeweils vier Chromatiden sind deutlich sichtbar.

Während der **Prometaphase I** löst sich die Kernhülle auf und die Bivalenten ordnen sich während der **Metaphase I** in der Äquatorialplatte an, wobei die Mikrotubuli an die zusammengelagerten Kinetochore beider Schwesterchromatiden anknüpfen müssen. Anschließend, in der **Anaphase I**, wird die Teilung beendet und aus den Zellen werden zwei sekundären Gametocyten, die die **Teilung II** der Meiose durchlaufen (siehe oben).

1.2 Paarung, Synapse und Rekombination meiotischer Chromosomen:

Molekulare und funktionelle Zusammenhänge

Für die grundlegenden Funktionen der Meiose sind die Mechanismen der Paarung, der Synapse und der Rekombination entscheidend, in der die homologen Chromosomen ihrer Länge nach aneinandergelagert, über den Synaptonemalkomplex (SC) miteinander verbunden und rekombiniert werden. Diese Vorgänge finden nicht nur im gleichen Zeitfenster statt, sondern sind auch auf molekularer Ebene miteinander verknüpft. Voraussetzung ist die meiosespezifische Architektur der Chromosomen, zu der unter anderem meiosespezifische Kohäsine und Kondensine beitragen und deren auffälligste Ausprägung der SC ist, weshalb die Zusammensetzung dieser Strukturen und den aktuellen Forschungsstand hier beschrieben wird. Hier werden die bekannten Proteine dargestellt und besonders ausführlich die Erkenntnisse zu SYCP1, dem Gegenstand dieser Arbeit, und zu dessen strukturellen Homologen anderer Organismen. Daraufhin wird der Mechanismus der Rekombination dargestellt und die Funktion des SC diskutiert.

1.2.1 Kohäsine und Kondensine

Sowohl in der Mitose als auch der Meiose werden im Zuge der vorausgehenden S-Phase die Chromatiden eines Chromosoms über Kohäsin- und Kondensinkomplexe miteinander verknüpft.

Kohäsinkomplexe bestehen aus vier Proteinuntereinheiten (vgl. Abb. 1.3), die von der einzelligen Hefe bis hin zu den Säugern hochkonserviert sind: die SMC-Proteine SMC1 und SMC3 weisen ausgedehnte „Coiled-Coil“-Domänen auf. Diese bilden eine Klammer, die von den Nicht-SMC-Proteinen Scc1 (auch Rad21 und Mcd1 genannt) und Scc3 zu einem Ring geschlossen wird, der sich um die Chromatiden schließt.

Während der Anaphase können die Chromatiden voneinander durch die Auflösung der Ringe getrennt werden, indem die Separase aktiviert wird, eine Protease, die Scc1 an spezifischen Schnittstellen hydrolysiert. (Gruber *et al.*, 2003; Haering *et al.*, 2002; Übersicht in Haering und Nasmyth, 2003; Jessberger, 2005; Nasmyth, 2002).

Kondensinkomplexe spielen eine Rolle in der Kondensation mitotischer und auch meiotischer Chromosomen. Sie bestehen aus zwei SMC-Untereinheiten, SMC2/CAP-E und SMC4/CAP-C und aus drei Nicht-SMC-Untereinheiten, CAP-D2/Ycs4p, CAP-G/Ycg1p und CAP-H/Brn1p (Übersicht in Hirano, 2002).

Funktion der Kohäsinkomplexe in der Meiose:

In der Meiose werden besondere Untereinheiten der Kohäsine exprimiert. Die zeitlich kontrollierte Synthese unterschiedlicher, teils meiosespezifischer Untereinheiten ermöglicht die Bildung wenigstens vier verschiedener Kohäsinkomplexe (McDougall *et al.*, 2005), was die in der Meiose erforderliche besondere Segregation der Chromosomen widerspiegeln könnte (vgl. 1.1 und Abb. 1.2). So wird zusätzlich zu SMC1 das meiosespezifische SMC1 β und zu den Nicht-SMC-Proteinen Scc1 und Scc3 deren Homologe Rec8 bzw. Stag3 gebildet, die sehr spezifische Expressions- und Verteilungsmuster aufweisen (vgl. Abb. 1.5; Eijpe *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2002; Prieto *et al.*, 2001; Revenkova *et al.*, 2001): Rec8 und Stag3 können bereits während der meiotischen S-Phase und SMC1 β ab dem Leptotän, nachgewiesen werden. Die Proteine lokalisieren an den Armen und dem Zentromerbereich der Chromosomen. SMC1 β und SMC3 werden jedoch schon während dem Diplotän, Stag3 während der ersten und Rec8 während der zweiten meiotischen Teilung an den Armen abgebaut; sie verbleiben aber noch an den Zentromeren. Rad21 und Stag2 werden nur kurz zwischen Diplotän und der ersten meiotische Teilung exprimiert.

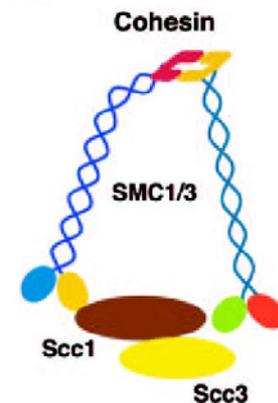


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Kohäsinkomplexes und dessen Untereinheiten (aus Jessberger, 2005)

Diese unterschiedliche Ausprägung der Kohäsion an den Armen und Zentromeren der Chromosomen ermöglicht in den zwei aufeinander folgenden Teilungen der Meiose zunächst die Trennung der homologen Chromosomen und anschließend der Schwesterchromatiden. Dies wird zum Beispiel in *rec8* Mutanten der Hefe deutlich, in denen es in der Meiose I zur Trennung der Schwesterchromatiden und folglich während der Meiose II zur zufälligen Trennung kommt (Watanabe *et al.*, 1999). In *Rec8* Knockout-Mäusen ereignet sich die Rekombination zwischen den Schwesterchromatiden anstatt zwischen den homologen Chromatiden (Xu *et al.*, 2005).

Eine weitere wichtige funktionelle Bedeutung der Kohäsine in der Meiose liegt nach den Ergebnissen der letzten Jahre ihrer Rolle (1) bei der Chromatinkondensation, so sind die Axialelemente in der *SMC1 β* Knockout-Maus stark verkürzt, was auf eine Veränderte Organisation der Chromatinloops hinweist (Revenkova *et al.*, 2004); (2) beim Zusammenbau des SC (siehe unten), indem sie eine chromosomale Struktur etablieren, auf der die AEs aufgelagert werden können. So wurden SYCP2 und SYCP3, Hauptstrukturproteine der axialen/ lateralen Elemente, zugleich mit SMC1 β und SMC3 erst an den Chromosomenachsen nachgewiesen werden, nachdem Rec8 dort assoziiert hat (Eijpe *et al.*, 2000). Dagegen verläuft die Bindung von SMC1, SMC3 und STAG3 unabhängig von der Lokalisation von SYCP2 und SYCP3, wie in *SYCP3^{-/-}*-Mäusen nachgewiesen werden konnte (Pelttari *et al.*, 2001). Bei Spermatozyten der *SMC1 β* Knockout-Maus konnte eine unvollständige Synapse nachgewiesen werden (Revenkova *et al.*, 2004).

1.2.2 Der Synaptonemalkomplex

Der Synaptonemalkomplex (SC) ist eine prägnante überwiegend proteinöse Struktur, die bereits in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts am Elektronenmikroskop entdeckt wurde. Der SC vermittelt die Synpase der gepaarten, homologen Chromosomen und hat eine entscheidende Bedeutung bei der Rekombination. Wie schon im Kaptitel 1.1 beschrieben, bilden sich im Leptotän die Axialelemente (AEs) an den Chromosomenachsen aus. Diese werden im Übergang zum Zygotän sukzessiv verknüpft und formen dann in der resultierenden Struktur die Lateralelemente (LEs). Dazwischen befindet sich die zentrale Region (CR), in der die LEs über Transversalfilamente (TFs) mit dem Zentralelement (CE) lotrecht verbunden sind, einer elektronendichten Struktur in der Mitte der CR (vgl. Abbildung 1.4). Bei Nagern sind die LEs etwa 50 nm und die CR etwa 80-100 nm breit. Die Struktur des SC und deren Dimensionen sind über das gesamte Tier- und Pflanzenreich und im Reich der Pilze hochkonserviert, wenngleich es gewisse Unterschiede im Organisationsgrad und in der Gestalt gibt. Einen sehr guten Überblick über die aktuelle Forschung kann man sich in folgenden Übersichtsartikeln schaffen: Heyting, 1996; Page und Hawley, 2004; Roeder, 1997; Schmekel und Daneholt, 1995; Zickler und Kleckner, 1999.

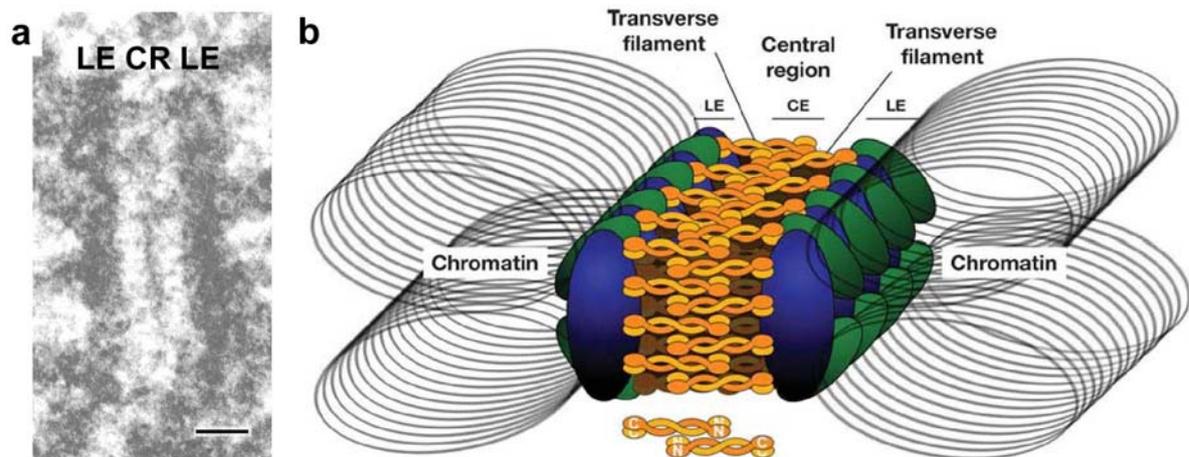


Abbildung 1.4: (a) TEM-Aufnahme eines Synaptonemalkomplexes (SC) der Ratte (eigene Aufnahme). LE, Lateralelement, CR, zentrale Region, Balken entspricht 100 nm. (b) schematische Darstellung der Struktur des SC, unterteilt in LEs und die (CR), die sich in Transversalfilamente (TFs) und Zentralelement (CE) gliedert: auf die Achsen der seitlich gezeichneten Chromatinschleifen sind die Kondensin- und Kohäsinkomplexe (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).

1.2.2.1 Proteinkomponenten des SC

Seit der Entdeckung des SC wurde eine wichtige Rolle dieser Struktur bei Paarung und Rekombination der homologen Chromosomen postuliert. In den vergangenen zwei Jahrzehnten wurden große Anstrengungen unternommen, die Proteinzusammensetzung des SC verschiedener Organismen aufzuklären. Durch die Untersuchung der räumlichen und zeitlichen Verteilung im Vergleich zu anderen bekannten Proteinen und auch durch die Erzeugung und Charakterisierung von spezifischen Mutanten dieser Gene konnte der Einfluss des SC auf die entscheidenden Vorgänge der Meiose näher geklärt werden. Im Gegensatz zur hochkonservierten Struktur des SC sind die bereits bekannten Proteinkomponenten in den untersuchten Tier-, Pflanzen-, und Pilzstämmen in ihrer Aminosäuresequenz völlig unterschiedlich und weisen höchstens eine strukturelle Homologie in ihrer Domänenorganisation auf.

Für die Aufklärung der Proteinzusammensetzung von SCs bei Säugern wurden Vorgehensweisen gewählt, die über die Immunisierung von Mäusen mit SC-angereicherten Proteinfractionen durchgeführt wurden, woraufhin monoklonale Antikörper gewonnen wurden. Mittels solcher Antikörper konnten in der Arbeitsgruppe Heyting Proteine mit einer molekularen Masse von 190 kDa,

33 kDa, 30 kDa und 125 kDa erkannt und näher charakterisiert werden (Heyting *et al.*, 1989). Die cDNAs dieser Proteine wurden später isoliert und die Proteine 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) identifiziert. Mit ähnlichen Ansätzen wurden parallel von der Arbeitsgruppe Moens die Homologe von SYCP1 und SYCP3 in Hamster, Syn1 bzw. Cor1, beschrieben (Dobson *et al.*, 1994) und von der Arbeitsgruppe Benavente ein Protein der CR mit einer molekularen Masse von 48 kDa (SC48; Smith und Benavente, 1992).

Weitere Organismen, in denen vor allem über genetische Wege verschiedene Proteine des SC charakterisiert werden konnten sind die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und verschiedener Pflanzen.

Im diesem Kapitel sollen nun die SC-Proteine der Säuger beschrieben werden und deren Funktion, soweit bekannt. Aufgrund des Fokus der Arbeit möchte ich bei der Beschreibung der Proteine besonders auf das TF-Protein SYCP1 eingehen und in diesem Fall auch die bekannten TF-Proteine anderer Organismen eingehen.

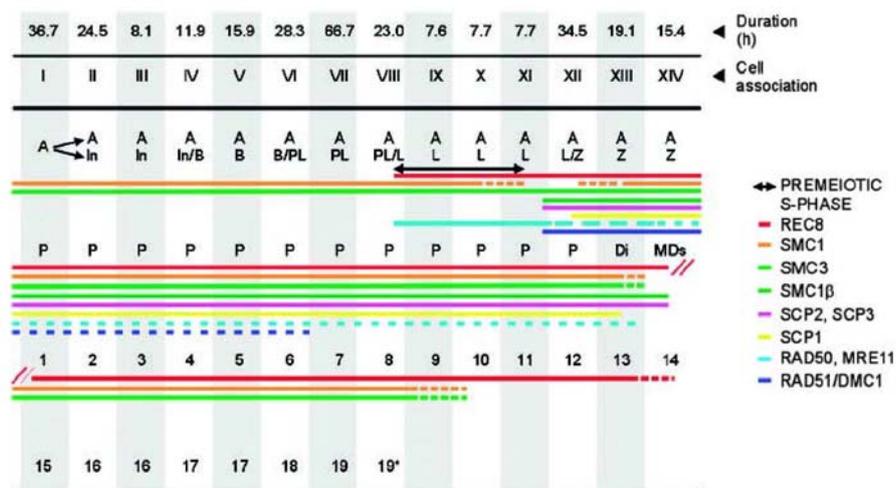


Abbildung 1.5: Expressionmuster verschiedener Proteine des Kohäsinkomplexes (SMC1, SMC1 β , SMC3, Rec8), des Synaptonemalkomplexes (SYCP1, 2 und 3) und der Rekombination (Rad50, Mre11, Rad51/DMC1) während der Spermatogenese der Ratte, wobei jede Säule (I-XIV) eine Zellassoziation im Hodenkanälchen (vgl. 1.4.1) darstellt. A, In und B, A-Typ, intermediäre und B-Typ Spermatogonien, PL, L, Z, P, Di, Präleptotän, Leptotän, Zygotän, Pachytän und Diplotän Spermatocyten, MDs, meiotische Teilungen, 1-19, sukzessive Differenzierungsstadien von Spermatisden. Jede farbige Linie stellt das Erscheinen und verschwinden eines Proteins in einem bestimmten Zelltyp dar. Die gestrichelte Linie bei Rad50 und Mre11 markiert die Zelltypen, wo diese Proteine nur im XY-Körper nachgewiesen werden können. Rec 8 wird während der meiotischen Teilungen nicht exprimiert (aus Eijpe *et al.*, 2003).

1.2.2.2 Proteine des Lateralelements (LE) von Säugern

Die Lateralelemente (LEs) eines SC sind im Elektronenmikroskop als breite elektronendichte Strukturen zu erkennen. Diese bilden sich im Leptotän als axiale Elemente (AEs) entlang der homologen Chromosomen aus, und bilden nach deren Verknüpfung im Zygotän die LEs des SC. In Säugern sind bislang zwei Proteinkomponenten der LEs bekannt, SYCP2 und SYCP3. Dabei wird SYCP3 als Hauptstrukturkomponente angesehen, da es eine ausgedehnte „Coiled-Coil“-Domäne und Homologien zu Intermediärfilamentproteinen aufweist. Im Folgenden werden die publizierten Fakten zu diesen Proteinen dargestellt:

SYCP2 ist ein 190 kDa großes Protein. Computeranalysen haben im C-terminalen Bereich eine kurze „Coiled-Coil“-Struktur ergeben und einen stark basischen Bereich im Zentrum des Proteins, der von zwei Clustern potentieller DNA-Bindungsmotive umgeben ist. Zusätzlich sind putative NLS-Sequenzen, sowie zahlreiche Phosphorylierungsstellen verschiedener Kinasen vorhergesagt, die über die AS-Sequenz verteilt sind (Offenberg *et al.*, 1998; Schalk *et al.*, 1999).

SYCP3 (Cor1 in Hamster) ist ein Protein das in Säugern mit Sequenzen von 234 bzw. 257 Aminosäuren Länge eine molekulare Masse von etwa 30 kDa aufweist, wobei bei Ratte eine zusätzliche Bande bei 33 kDa läuft (Dobson *et al.*, 1994; Lammers *et al.*, 1994). Dem Protein wurde aufgrund seiner ausgeprägten α -helikalen Domäne im C-terminalen Bereich, für die die Ausbildung von Homodimeren in Form einer „Coiled-Coil“-Domäne (vgl. 1.5) vorhergesagt wurde, und seiner Polymerisationseigenschaften eine Rolle als Hauptstrukturprotein der LEs zugesprochen. In Expressionsversuchen in somatischen Zellen polymerisiert SYCP3 zu quergestreiften Parakristallen, wie sie für Intermediärfilamente typisch sind (Yuan *et al.*, 1998). Wie für andere Proteine des SC auch, wurden für SYCP3 ein NLS und verschiedene Phosphorylierungsstellen vorhergesagt.

SYCP2 und **SYCP3** werden im Leptotän synthetisiert (vgl. Abb. 1.5). Beide lokalisieren in den AEs bevor diese paaren und bleiben Bestandteil der LEs bis zum Diplotän. Bis einschließlich der Metaphase verbleibt SYCP3 noch im Zentromer (Dobson *et al.*, 1994; Eijpe *et al.*, 2003; Lammers *et al.*, 1994; Pelttari *et al.*, 2001; Schalk *et al.*, 1998).

Auf der Suche nach Interaktionspartnern von SYCP3 konnten über Hefe „Two-Hybrid“-Experimente eine Bindung von Cor1 an das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc9 nachgewiesen werden; eine Bindung an Syn1, das Hamsterhomolog zu SYCP1, konnte auch hier ausgeschlossen werden (Tarsounas *et al.*, 1997). Bei Immunpräzipitation konnten die Kohäsine Rec8, SMC1 und SMC3 zusammen mit SYCP3 präzipitiert werden, SYCP2 oder SYCP3 präzipitierten aber nicht mit Rec8 (Eijpe *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003).

Kulturzellen von Säugern, die die Meiose durchlaufen, sind bis zu diesem Tag nicht etabliert, was die Erforschung der beteiligten Proteine enorm erschwert (vgl. 1.4). Als geeigneter Ansatz, die Interaktion von meiosespezifischen Proteinen von Säugern zu erforschen, haben sich Koexpressionsstudien in somatischen Zellen erwiesen. Dazu wird die Verteilung der ektopisch exprimierten Proteine in den

Zellen analysiert und eine Kolokalisation als Interaktion gewertet. Diese Methode bildet zudem den Vorteil, dass keine weiteren meiosespezifischen Proteine als mögliche Interaktionspartner anwesend sind. Mit diesem Versuchsansatz konnte die Bindung von SYCP2 an SYCP3 beschrieben werden (Pelttari *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 1998), Kolokalisation von SYCP3 und SYCP1 konnte nicht beobachtet werden.

Der Mangel an einer Zelllinie, die die Meiose durchläuft, erschwert auch die Untersuchung von Effekten bei Funktionsverlusts eines Proteins, das an den Prozessen der Säugermeiose beteiligt ist. Dies kann folglich nur über die Generierung von Knockout-Mäusen erfolgen. Die Herstellung von **SYCP3**^{-/-} Mäusen hat zur Klärung einiger wichtiger Fragen geführt. SYCP3 ist für die Ausbildung der LEs absolut notwendig. Es konnte gezeigt werden, dass SYCP2 ohne SYCP3 nicht an die Chromosomenachsen assoziiert, aber an die Telomere binden kann; die korrekte Anlagerung von SYCP1 findet jedoch zum Teil statt (Liebe *et al.*, 2004; Pelttari *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 2000). Zusätzlich hat SYCP3 eine Funktion bei der Chromatin-Kondensation, da bei Knockout-Mäusen etwa doppelt so lange Chromosomen gemessen werden konnten (Liebe *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2002). Die Spermatozyten der Knockout-Mäuse werden durch Apoptose abgetötet und erreichen nur das Zygotän Stadium; in den Weibchen kann die Meiose jedoch zu Ende geführt werden, wo es aber zur verstärkter Aneuploidie kommt (Yuan *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2000). Kürzlich wurde 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).

Die LEs bilden sich also im Zygotän aus und bekannte strukturellen Komponente sind SYCP2 und SYCP3. Diese Strukturen sind wichtig für die Kondensation der Chromosomen und die Ausbildung des SC. Des weiteren sind sie bei der Rekombination von Bedeutung (vgl. 1.2.4).

1.2.2.3 Proteine der zentralen Region (CR) des SC

Die CR besteht aus dem zentralen Element (CE), einer elektronendichten Struktur im Zentrum des SC, die parallel zu den LEs verläuft, und den Transversalfilamenten (TFs), die die Kluft zwischen Lateralelementen (LEs) und CE überspannen. Die Hauptstrukturproteine der TFs, die bereits von mehreren Organismen kloniert werden konnten, weisen eine ausgedehnte „Coiled-Coil“-Domäne auf (vgl. Abb. 1.6), eine lang gestreckte stäbchenförmige Domäne, die für diese Überbrückung geeignet wäre. Die Assoziation der TF-Proteine an die Bivalente findet zeitlich nach den Proteinen der LEs statt und räumlich nur an die Achsen bereits gepaarter Chromosomen.

Proteine der CR sind also an gepaarten Bivalenten lokalisiert und an ungepaarten Axialelemente (AEs) nicht nachweisbar. Die Identifizierung von Komponenten der CR kann letztlich über die Lokalisation mittels Immungoldverfahren am TEM erfolgen. Für die Säuger wurde das Protein SYCP1 in der CR identifiziert, das mit seiner ausgedehnten „Coiled-Coil“-Domäne die Funktion eines TF-Proteins

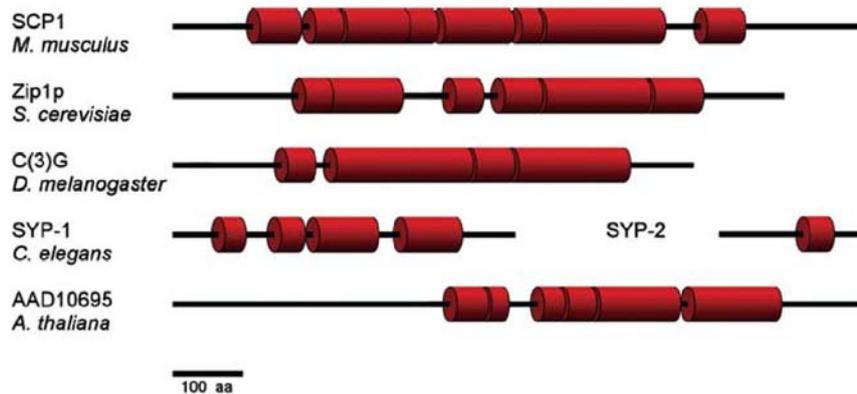


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der bekannten Transversalfilament-Proteine. Alle diese Proteine weisen eine strukturelle Gemeinsamkeit auf, da für sie eine, lang gestreckten zentralen „Coiled-Coil“-Domäne vorhergesagt ist, die von nicht-helikalen Domänen umgeben ist und hier als Zylinder dargestellt ist (aus Page und Hawley, 2004).

übernehmen kann. Es wurde bereits ein weiteres Protein der CR charakterisiert, das an den TFs der Ratte lokalisiert (SC48), dies konnte aber auf der Ebene der Sequenz bislang nicht identifiziert werden.

In diesem Abschnitt sollen nun die publizierten Daten zu SYCP1, dem Gegenstand dieser Arbeit, zusammengefasst werden. Zusätzlich werden die erhältlichen Daten zu den strukturellen Homologen von SYCP1 in anderen Organismen dargestellt.

Säuuger: **SYCP1 (Syn1)**

Das Ratten Protein SYCP1 wurde 1992 von Meuwissen und Kollegen beschrieben und konnte als erstes Protein der zentralen Region (CR) charakterisiert werden; nachfolgend wurden einige seiner Homologen in anderen Säugern publiziert: Syn1 in Hamster (Dobson *et al.*, 1994), SYCP1 in Maus (Sage *et al.*, 1995; eine Arbeit, die auch eine Korrektur der Rattensequenz beinhaltet) und SYCP1 in Mensch (Meuwissen *et al.*, 1997).

Das **SYCP1** der Ratte (125 kDa) hat eine Länge von 997 AS, für die keine Homologien zu anderen Proteinen gefunden werden konnten. Durch Computeranalyse wurde eine zentrale α -helikale Region von etwa 700 AS (121-819) identifiziert, die der Dimerisierung der Moleküle in Form einer „Coiled-Coil“-Domäne dient und von zwei nicht-helikale terminale Domänen flankiert ist (Meuwissen *et al.*, 1992). Für die „Coiled-Coil“-Domäne wird angenommen, dass sie die TFs bildet und so die Kluft zwischen LEs und CE überbrückt. Dabei haben Immungoldlokalisierung der N- bzw. C-terminalen Domänen von SYCP1 gezeigt, dass die C-terminalen Enden jeweils in den LEs verankert sind und die N-Termini im zentralen Element (CE) lokalisieren (Dobson *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1996; Schmekel *et al.*, 1996). Das heißt, die SYCP1 Dimere ragen von beiden LEs aus in die CR hinein und man nimmt an, dass dort die N-Termini im zentralen Element (CE) eine Verknüpfung herstellen. Dabei konnten

für die Interaktion der N-Termini untereinander bereits Beweise über das Hefe „Two-Hybrid“ System erbracht werden (Liu *et al.*, 1996). Für die C-Termini und für ausgewählte zentrale Bereichen von Syn1 konnten im Hefe „Two-Hybrid“ System keine homotypischen Interaktionen festgestellt werden (Tarsounas *et al.*, 1997).

In Bezug auf mögliche Bindungspartner ergaben die Untersuchungen über das Hefe „Two-Hybrid“ System zudem keine Interaktion von Syn1 mit Cor1 (SYCP3), aber eine Bindung beider Proteine an das ubiquitinierende Protein Ubc9 (Tarsounas *et al.*, 1997). Zusätzlich wurden Bindungsexperimente durchgeführt, indem Proteine exogen in somatischen Zellen exprimiert wurden. Eine Kolokalisation der Proteine wird dabei als Interaktion gewertet. Die ektopische Expression von SYCP1 in somatischen Zellen (Swiss-3T3 Fibroblastenzellen) führte zur Aggregation der Moleküle in Cytoplasma und Kern der Zellen (Yuan *et al.*, 1996). Diese Aggregate scheinen weder mit koexprimierten SYCP2 noch mit SYCP3 zu kolokalisieren (Peltari *et al.*, 2001).

Interessanterweise scheint für die korrekte Lokalisation von SYCP1 zwischen den meiotischen Chromosomenachsen nicht unbedingt eine einwandfreie Zusammensetzung der LEs Voraussetzung zu sein, da bei *SYCP3* Knockout-Mäusen kurze Bereiche der CR mit korrekter Organisation von SYCP1 aufgebaut werden können, obwohl die Hauptstrukturproteine der LEs, SYCP2 und SYCP3, an den Chromosomenachsen fehlen und im TEM keine LEs beobachtet werden können (Liebe *et al.*, 2004; Peltari *et al.*, 2001).

Für die Dissoziation von SYCP1 von den Chromosomen am Ende des Pachytäns ist höchstwahrscheinlich die Bindung von Phosphatresten verantwortlich, da eine Behandlung von Pachytän-Spermatocyten mit Okadasäure, einem Phosphatase-Inhibitor, das rasche Fortschreiten der Zelle in die Anaphase zur Folge hat und die Dissoziation von SYCP1 und SYCP3 von den Chromosomen bewirkt (Tarsounas *et al.*, 1999). Zusätzlich dürfte eine Ubiquitinierung von Bedeutung sein, wenn man die oben genannte Interaktion vom Ubc9 in Betracht zieht.

Eine weitere Bedeutung hat SYCP1 in einem völlig anderen Zusammenhang. Die Expression des Proteins konnte außer in meiotischen Zellen auch in den Zellen verschiedenster Krebsarten nachgewiesen werden (Tureci *et al.*, 1998). Keimzellspezifische Proteine, die auch in Tumoren exprimiert werden, nennt man „Cancer/Testis“-Antigene (CTAs, vgl. 1.6).

SC48

Die Immunisierung von Mäusen mit einer Proteinfraction, die mit Karyoskelettproteinen von Spermatocyten angereicherten war, und die anschließende Gewinnung monoklonaler Antikörper durch die Arbeitsgruppe Benavente führte zur Identifizierung eines Proteins der CR einer molekularen Masse von 48 kDa (SC48). Mittels Immungoldanalyse am TEM konnte das Protein im Bereich der TFs lokalisiert werden, die Sequenz des Proteins konnte aber nicht aufgeklärt werden (Smith und Benavente, 1992).

S. cerevisiae: **Zip1p**

Das Protein **Zip1p** der Bäckerhefe wurde über das Screening Meiose-lethaler Mutanten und mittels anschließender Komplementierung des Phänotyps aus einer Genbank kloniert (Sym *et al.*, 1993). Zip1p besitzt die für TF-Proteine typische lange zentrale α -helikale Domäne, für die eine „Coiled-Coil“-Domäne vorhergesagt wurde (AS 180-748 von 875 AS), und konnte tatsächlich als Hauptbestandteil der TFs identifiziert werden (Sym und Roeder, 1995). Weiter wurde gezeigt, dass die Organisation der Moleküle innerhalb des SC mit der Organisation von SYCP1 im SC vergleichbar ist, d.h. die C-Termini sind in den Lateralelementen verankert und die N-Termini lokalisieren im CE (Dong und Roeder, 2000). Durch *in-vitro* Polymerisation und TEM-Analyse konnte die Dimerisierung in Form einer parallelen „Coiled-Coil“-Domäne für Zip1p zum ersten Mal für ein TF-Protein direkt nachgewiesen werden (Dong und Roeder, 2000).

Die *zip1* Mutante von *S. cerevisiae* kann keinen SC aufbauen (Rockmill *et al.*, 1995; Sym *et al.*, 1993). Die homologen Chromosomen paaren zwar, allerdings mit einem weiteren räumlichen Abstand voneinander, und es kommt zur starken Reduktion von Crossover-Ereignissen, von denen die verbleibenden zudem keine Interferenz aufweisen (Sym und Roeder, 1994; Tung und Roeder, 1998).

Durch die Überexpression von Zip1p kann der Phänotyp der *zip1* Mutante komplementiert werden und zusätzlich kommt es zur Zusammenlagerung von Proteinen zu geordneten Strukturen, die in Polykomplexe (PCs; vgl. 1.3) und Netzwerke unterschieden wurden (Sym und Roeder, 1995). Durch Immungoldlokalisierung der N- und C-Termini konnte gezeigt werden, dass die Anordnung der Moleküle innerhalb der PCs, die Stapeln von SCs gleichen, der Anordnung in SCs identisch ist, die Anordnung von Zip1p innerhalb der Netzwerke davon aber abweicht (Dong und Roeder, 2000).

Mit diesem System, der Transfektion von *zip1* Mutanten, können durch die Expression verschiedener Proteinvarianten mit Deletionen und Insertionen weitere interessante Fragen in Bezug auf die Funktion verschiedener Bereiche des Proteins gestellt werden. Konstrukte mit einer Duplikation in der „Coiled-Coil“-Domäne bewirken eine Zusammenlagerung des SC, wie auch der PCs, mit erweiterter CR.

Nach einer Deletion im N-terminalen Bereich der „Coiled-Coil“-Domäne bildet sich kein SC mehr aus; wohingegen die Deletion der nicht-helikalen N-terminalen Region oder des C-terminalen Bereichs nicht zur Unterbindung der SC-Bildung führt (Sym und Roeder, 1995; Tung und Roeder, 1998). Dies legt ein Modell nahe, nachdem in *S. cerevisiae* die antiparallele Interaktion der N-terminalen Bereiche der „Coiled-Coil“-Domäne die Verbindung zwischen den TFs schafft, die von beiden LEs ausgehend in die CR ragen.

Die Deletion eines nur 34 AS langen Bereichs im C-Terminus (AS 791-824) führte dazu, dass dieses Protein nicht mehr an die Chromosomenachsen bindet, es folglich zu keiner SC-Bildung kommt und diese Mutation die gleichen Effekte wie eine Nullmutation nach sich zieht. Auf die Polymerisation zu PCs scheint diese Deletion jedoch keinen Einfluss zu haben. In Bezug auf die Rekombination korreliert bei den Deletionskonstrukten die Fähigkeit SCs auszubilden gut mit der Fähigkeit Crossover zu erzeugen (Sym und Roeder, 1995; Tung und Roeder, 1998).

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

Von der Arbeitsgruppe Villeneuve wurde ein Projekt gestartet, in dem Gene mit keimbahn-spezifischer Expression, die aus Microarray Analysen bekannt waren, mittels der Depletion durch RNAi auf die Funktion in der Meiose untersucht wurden. So konnten die CR-Proteine **SYP-1** (MacQueen *et al.*, 2002) und **SYP-2** (Colaiácovo *et al.*, 2003) kloniert werden. Beide Proteine konnten der CR zugeordnet werden. Wie andere TF-Proteine weist SYP-1 eine lange zentrale Domäne auf, die in Form einer „Coiled-Coil“-Domäne dimerisieren kann; diese ist aber wesentlich kürzer als bei anderen TF-Proteinen (vgl. Abb. 1.6). Trotzdem sind der Abstand der LEs zum CE des SC anderen Organismen vergleichbar, weshalb postuliert wird, dass die Organisation von SYP-1 und SYP-2 innerhalb des SC anders als die anderer TF-Proteine ist, und beide Proteine als strukturelle Einheit die transversale Verknüpfung der Lateralelemente gemeinsam herstellen.

Bei **Mutanten**, denen eines der beiden Proteine fehlt, konnte keine SC-Bildung festgestellt werden. Die homologen Chromosomen paaren entlang ihrer Achsen durch die geordnete Initiation der Rekombination und so genannte Paarungszentren, cis-aktive Chromatinregionen, die in *C. elegans* vorhanden sind. Aber die Paarung geht offensichtlich aufgrund fehlender Stabilisierung durch den SC frühzeitig wieder verloren und es kommt auch zu keiner Reifung der Rekombinationsereignisse zu Crossoverprodukten. Die fehlenden Chiasmata führen zur Misssegregation der Chromosomen und folglich zu aneuploiden Keimzellen (Colaiácovo *et al.*, 2003; MacQueen *et al.*, 2002).

Drosophila: **c(3)G**

Aufgrund der Fähigkeit, den Phänotyp einer lange bekannten *Drosophila*-Muntanten mit Defekten in der Keimzellbildung zu kompensieren, konnte das SC-Protein c(3)G kloniert werden. Das Protein ist 774 Aminosäuren lang und besitzt eine lange, zentrale „Coiled-Coil“-Domäne (AS 158 bis 646), und wurde wegen dieser Domänenstruktur und der Lokalisation zwischen den Bivalenten den TF-Proteinen zugerechnet. Die weiblichen *c(3)G*-Mutanten bilden keinen SC aus und sind auch Defizient für Rekombinationsereignisse, obwohl sie keine Beeinträchtigung der DSB-Bildung zeigen. Interessanterweise konnten in einer Mutante mit der Deletion der Aminosäuren 340 bis 552, die nur zu einer teilweisen Synapse fähig ist, etwa 60% der wildtypischen Crossoverprodukte festgestellt werden. Dies kann man als Indiz dafür werten, dass die Funktion von c(3)G bei der Reifung von DSBs zu Crossover und die Funktion der Verknüpfung der LEs von unabhängigen Bereichen des Proteins ausgeführt wird (Page und Hawley, 2001).

A. thaliana: **AAD10695**

Dieses putative Protein wurde mittels Computeranalysen aufgrund der strukturellen Homologie zu den anderen bekannten TF-Proteine identifiziert (Bogdanov *et al.*, 2003). Es wurden jedoch noch keine experimentellen Beweise für diese Vorhersage erbracht.

1.2.3 Rekombination

Die Mechanismen der homologen Rekombination sind in der gesamten eukaryotischen Welt existent und die dabei involvierten Proteine von Hefe bis zu den Säugern stark konserviert. Die homologe Rekombination erfüllt bei Säugern verschiedene Aufgaben. Sie ist (1) neben anderen DNA-Reparaturmechanismen für die Wiederherstellung der DNA-Struktur nach Doppelstrangbrüchen (DSBs) verantwortlich; und (2) bei Wirbeltieren für die Genumstrukturierungen der B- und T-Zell Entwicklung zuständig. Schließlich bewirkt sie (3) bei der Meiose eine Neuzusammenstellung „mütterlicher“ und „väterlicher“ Allele. Dieser Mechanismus der meiotischen Rekombination erfordert im Vergleich zur DNA-Reparatur die Einbeziehung von zwei Chromatiden homologer Chromosomen und nicht der Schwesterchromatiden und bildet mit den Chiasmata Strukturen, die für die korrekte Segregation der Chromosomen notwendig sind. Übrigens beruht (4) die vielfach angewandte genetische Modifikation eukaryotischer Organismen durch Forscher ebenfalls auf den Mechanismen der Rekombination.

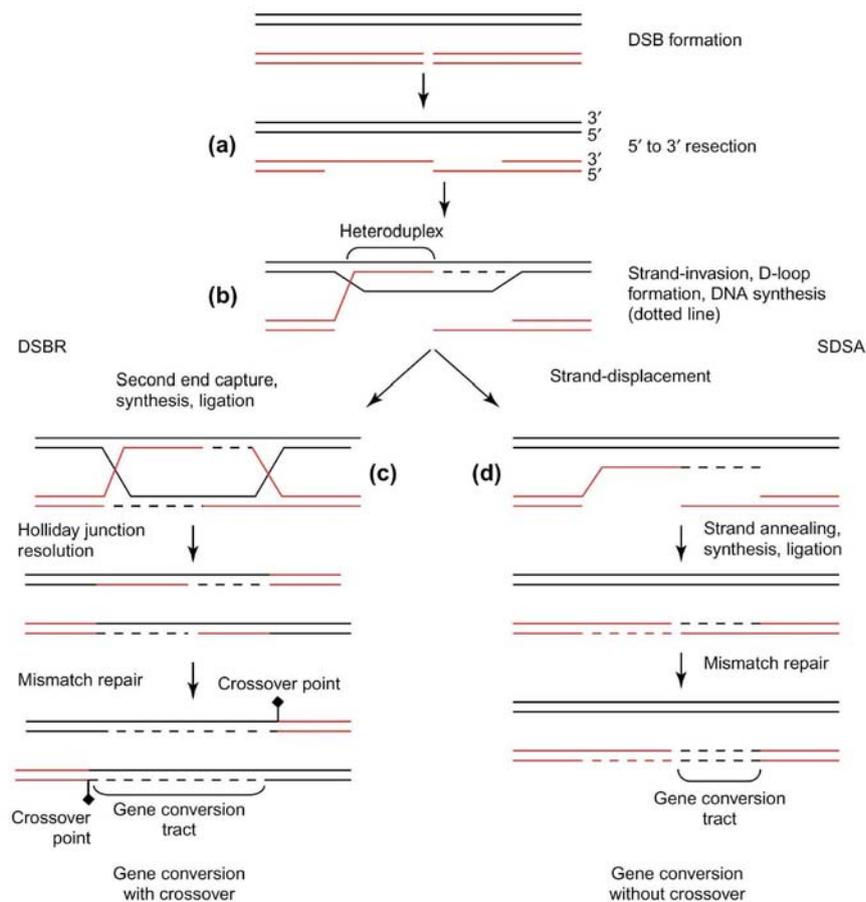


Abbildung 1.7: Zwei Pfade der Auflösung von Doppelstrangbrüchen: Doppelstrangbruch-Reparatur (DSBR) und syntheseabhängiges Einzelstrang-Annealing (SDSA). Erklärung siehe Text (Abbildung aus de Massy, 2003).

Wegen der grundsätzlichen Bedeutung der homologen Rekombination für die Meiose soll hier auf die Mechanismen und die wichtigsten beteiligten Proteine eingegangen werden. In der Meiose bedingen sich Paarung, Synapse über den SC und Rekombination der homologen Chromosomen gegenseitig und der fehlerfreie Ablauf dieser Prozesse und der anschließenden reduktiven Teilung ist in ihrem korrekten Zusammenspiel möglich. Dabei gibt es zwischen den bislang untersuchten Modellorganismen einige entscheidende Unterschiede. Während bei *S. cerevisiae* und Säugern Paarung und Synapse von der DSB-Bildung abhängt, finden Paarung und Synapse in *C. elegans* und *Drosophila* bei vollständigem Fehlen von DSBs statt. Die Daten stammen aus Übersichtsartikel, die das Thema sehr ausführlich abarbeiten (de Massy, 2003; Kleckner *et al.*, 2003; Lynn *et al.*, 2004; McKim *et al.*, 2002; Paques und Haber, 1999; Sung *et al.*, 2003).

Mechanismus und Proteine:

Für die Rekombination in eukaryotischen Zellen wurden mehrere Modellvorstellungen entwickelt. Für uns wichtig sind vor allem die Modelle der Doppelstrangbruchreparatur (DSBR) und des syntheseabhängigen Einzelstrangannealings (SDSA), anhand derer sich die Umwandlung von DSBs in Crossover-Produkte und Nicht-Crossover-Produkte erklären lässt. Diese Modelle sind schematisch in Abbildung 1.7 dargestellt. Dabei ist anzumerken, dass die DSBR auch Nicht-Crossover-Produkte ergeben kann (nicht dargestellt). Unabhängig von der Auflösung zu Crossover- oder Nicht-Crossover-Produkten können beide Mechanismen zu Genkonversion führen, dem nichtreziproken Transfer von genetischer Information eines Moleküls auf sein Homologes durch „Mismatch“-Reparatur von einzelnen Basenpaaren der gepaarten DNA (Heteroduplex-DNA).

(a) Der Mechanismus beginnt mit der DSB-Bildung, enzymatisch von Spo11p katalysiert, und der anschließenden 5'→3' Resektion an den DSB-Enden durch eine Exonuclease. Weitere Proteine, die bei diesem Prozess eine Rolle spielen, sind Rad50p, Mre11p und Xrs2p, Mitglieder der Rad52-Epistase-Gruppe, die den Rad50-Komplex bilden.

(b) Nun folgt die Invasion des gebildeten Einzelstrangs (vgl. Abb. 1.7 und 1.8). Unterstützt von Rekombinationsmediatoren (Rad54p, Rad52p, Rad55p-Rad57p) lagern sich Rad51p und dessen meiosespezifisches Homolog Dmc1p rechtshändig helikal an die einzelsträngige DNA an und bilden auf diese Weise das Rad51-ssDNA Nukleoprotein-

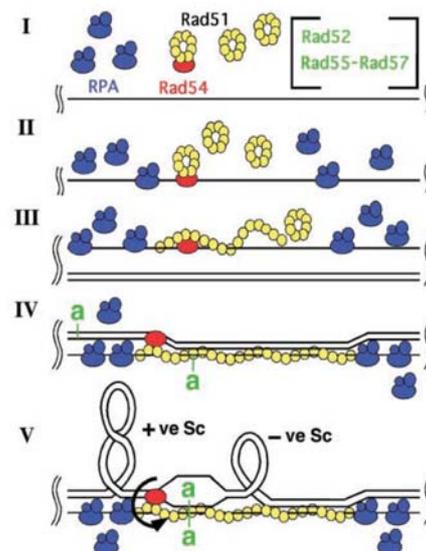


Abbildung 1.8: Bildung des Rad51-ssDNA Nukleoprotein-Filaments, Invasion des Doppelstrangs und D-Loop-Formation (aus Sung *et al.*, 2003)

Filament. Dmc1p scheint dabei wichtig dafür zu sein, dass die Rekombination zwischen homologen Chromosomen und nicht der Schwesterchromatiden stattfindet. Das so erzeugte Filament weist eine Bindungsstelle für doppelsträngige DNA (dsDNA) auf und der eingehende DNA Doppelstrang wird auf Homologie getestet. Hierbei spielt Rad54p als DNA Translokase und Supercoiling-Motor eine Rolle, indem es positiv auf die partielle Öffnung des Doppelstrangs einwirkt (siehe Abb. 1.8). Wenn ein homologer Bereich gefunden wurde, bildet sich ein D-Loop, woraufhin die feste Bindung durch die Wanderung der Verzweigung („branch migration“) ausgedehnt wird und es zu DNA-Synthese am freien 3'-Ende kommt. Nun können nach dem Modell zwei alternative Wege eingeschlagen werden.

(c) Der Mechanismus der Doppelstrangbruch Reparatur (DSBR):

Wenn das zweite einzelsträngige Ende des DSB in den Komplex aufgenommen wird, kommt es zur Ausbildung einer doppelten Holliday Junction (dHJ) und einer nachfolgenden Wanderung der Verzweigungspunkte (branch migration) zwischen denen sich der Genkonversionstrakt befindet. Die Übertragung der Information von einem Strang auf den anderen findet dabei durch „mismatch“ Reparatur der Heteroduplex-DNA statt (bei der in der Meiose die Gene *PMS1*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH3* und *MSH6* eine Rolle spielen). Je nachdem wie die dHJ aufgelöst wird, kommt es zu einem Crossover-Produkt oder zu einem Nicht-Crossover-Produkt (in Abbildung 1.7 nicht dargestellt).

(d) Der Mechanismus des syntheseabhängigen Strang-Annealing (SDSA):

Beim SDSA wird der D-Loop wieder aufgelöst und die jetzt freie neu synthetisierte DNA kann an sich das andere einzelsträngige Ende des DSB anlagern. Die Reparatur des Bruchs wird über DNA-Synthese und Ligation bewirkt. Der Genkonversionstrakt erstreckt sich über die Länge der vorher neu synthetisierten DNA.

Die Rekombination in Zusammenhang mit höheren Strukturen

Die Rekombinationsknoten (recombination nodules, RNs) sind Strukturen, die im TEM zu erkennen sind und als die Orte angesehen werden, wo Doppelstrangbrüche (DSBs) lokalisieren und von denen einige später zu Crossover und Chiasmata reifen. Diese können während der Prophase I der Meiose beobachtet werden und befinden sich auf ultrastruktureller Ebene in Assoziation mit dem SC, der ja die homologen Chromosomen miteinander verbindet. Genetische und cytologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Funktion des SC mit der Rekombination in den verschiedensten Organismen verknüpft ist (vgl. 1.2.5), obwohl es einige Organismen gibt, wie *S. pombe* oder männliche *Drosophila*, die keinen SC ausbilden und bei denen dennoch Rekombinationsereignisse stattfinden.

Die DSBs erscheinen bei *S. cerevisiae* im Leptotän, wo die Chromosomenachsen neu organisiert werden und bis zum Zygotän zu Axialelementen (AEs) werden, die sich entlang der Schwesterchromatiden ziehen. Hier beginnt auch die Synapse. Gleichzeitig werden bereits RNs ausgebildet. Bei diesen handelt es sich um so genannte frühe RNs, von denen bei Maus mehrere Hundert in einer Spermatozyte gezählt wurden. An diesen können zum Beispiel die für frühe Schritte der Rekombination wichtigen Proteine Rad51 und Dmc1 nachgewiesen werden. Sie sind

durchschnittlich 100 nm groß und mit den AEs assoziiert. Im Pachytän ist die Synapse vollständig und der SC über die gesamte Länge der Chromosomen ausgebildet. Parallel dazu sind im frühen Pachytän dHJs nachzuweisen und im späten Pachytän Heteroduplex-DNA und Rekombinationsprodukte. Nun sind späte RNs zu erkennen, deren Anzahl von etwa vierzig Stück in einer Maus-Spermatocyte mit derjenigen von Crossover-Ereignissen übereinstimmt, also wesentlich geringer ist als die der frühen RNs. Die späten RNs weisen zudem Interferenz (s.u.) auf und enthalten Proteine, die bei der Crossover-Reifung von Bedeutung sind. Im Diplotän wird der SC abgebaut und die Chromosomen bleiben an den Chiasmata miteinander verbunden, den Produkten von Crossover-Ereignissen.

Kontrolle von Crossing Over Ereignissen

Bei der Reifung von DSBs zu Genkonversion oder Crossover-Ereignissen – die Anzahl der ursprünglichen DSBs übertrifft die der resultierenden Crossover um ein Vielfaches – kommt es zu Erscheinungen, die nicht sehr gut verstanden sind. Zum einen ist nicht klar, wann die Entscheidung für einen Weg getroffen wird; möglicherweise findet diese bereits bei der Bildung von DSBs statt. Zum anderen gibt es eine spezifische Regulation bei der Verteilung und Anzahl von Crossovern. (1) Die Interferenz ist eine Erscheinung, die bewirkt, dass ein Crossover an einem Locus die Wahrscheinlichkeit eines Crossovers an einem benachbarten Locus verringert. (2) Darüber hinaus tritt eine Erscheinung auf, die obligates Chiasmata genannt wird und besagt, dass mindestens ein Crossover pro Chromosom produziert wird, was später für die korrekte Segregation der Chromosomen wichtig ist. (3) Schließlich gibt es einen Einfluss von Zentromeren und Telomeren auf die Verteilung. Bei Säugern sind Zentromere sogenannte „cold spots“, an denen es kaum zu Crossover kommt. Telomere weisen bei Männchen einen Überschuss, bei Weibchen aber im Verhältnis wenige Crossover auf.

1.2.4 Funktion des SC

Nach der Fülle der Daten, die über die Untersuchung der neu gefundenen Proteinbestandteile des SC und deren Knockout-Mutanten im letzten Jahrzehnt gewonnen wurden, musste die ursprüngliche Meinung revidiert werden, der SC würde die Homologenpaarung über die Synapse bewerkstelligen und durch die resultierende räumliche Nähe die Voraussetzung für Crossover zwischen den Homologen schaffen. Im Gegenzug konnten die Funktionen des SC und dessen struktureller Untereinheiten innerhalb dieser entscheidenden Vorgänge der Meiose neu eingeordnet werden und es wurden die wechselseitigen Abhängigkeiten besser erkannt.

Der bestuntersuchte Organismus in Bezug auf die Meiose ist *S. cerevisiae*, weshalb hier besonders auf die Hefe eingegangen wird. Wie wir sehen werden, ist die Meiose der Säuger bei vielen Vorgängen gut mit der der Hefe vergleichbar.

Man geht heute davon aus, dass in Hefe und Säugern die Paarung der Chromosomen unmittelbar nach der S-Phase durch die Einführung von Doppelstrangbrüchen (DSBs) in die DNA eingeleitet wird,

woraufhin einzelsträngige DNA erzeugt wird, die doppelsträngige DNA nach homologen Bereichen absucht. Die Untersuchung verschiedener Mutanten lässt den Schluss zu, dass bei *S. cerevisiae* die Paarung und die Synapse von der DSB-Bildung abhängt (z.B. bei *spo11* Mutation; Weiner und Kleckner, 1994). Die Rekombination kann jedoch eingeschränkt auch ohne die Ausbildung eines SC stattfinden (Storlazzi *et al.*, 1996). Dies scheint bei Säugern sehr ähnlich zu sein, da auch hier die Synapse von der Rekombination abhängt, was das Fehlen der Synapse bei einer *Dmcl* Nullmutation zeigt (Pittman *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1998).

Die Synapse der homologen Chromosomen nimmt bei *S. cerevisiae* wohl an den so genannten „Axialen Assoziationen“ (AAs) ihren Anfang. AAs sind spezifische DSBs, die später zu Crossover-Produkten reifen. Selbst bei *zip1* Mutanten, die zur Ausbildung des SC nicht mehr fähig sind, können an diesen Stellen Verknüpfungen beobachtet werden (Rockmill *et al.*, 1995; Sym *et al.*, 1993). Es gibt mehrere Indizien, dass die Stellen der AAs mit denen der späteren Crossover identisch sind. Das Auftreten der AAs ist abhängig von *Spo11p*, *Rad51p* und *Dmclp* (Agarwal und Roeder, 2000; Rockmill *et al.*, 1995) und die AAs weisen Interferenz auf (Fung *et al.*, 2004).

Nach aktuellen Modellen (Agarwal und Roeder, 2000; Börner *et al.*, 2004) bilden sich aus den AAs durch Anlagerung der ZMM-Proteine (*Zip1p*, *-2p*, *-3p*, *Msh5p*, *Mer3p*) die Initiationskomplexe der Synapse (SICs). Dabei ermöglicht die Anlagerung von *Zip3p* die Bindung von *Zip2p*, die zur Rekrutierung des TF-Proteins *Zip1p* führt. Von den AA/SIC-Knoten aus verknüpft *Zip1p* durch sukzessive Anlagerung die AEs und sorgt so für den vollständigen Aufbau des SC (Agarwal und Roeder, 2000). Zusätzlich sind die ZMM-Proteine entscheidend für die Reifung der DSBs zu Crossover-Produkten. Mutanten dieser Proteine können diese Reifung nicht durchführen, beeinflussen aber nicht die Reparatur von DSBs zu Genkonversion, den Nicht-Crossover-Produkten. Dieses Modell setzt den Zeitpunkt für die Entscheidung, ob DSBs in Crossover oder Genkonversion differenzieren, sehr früh an. Entweder während oder vor der Bildung der DSBs selbst; in jedem Fall vor der Bildung des SCs und davon unabhängig (Börner *et al.*, 2004).

Bei diesem Prozess spielt **Zip1p** eine entscheidende Rolle: Bei *zip1* Mutanten bilden sich SICs, die auch Interferenz aufweisen, diese reifen aber nicht zu Crossover-Produkten. Die wenigen verbleibenden Crossover zeigen keine Interferenz (Sym und Roeder, 1994; Tung und Roeder, 1998). Da die *zip1*, *red1* Doppelmutante Defekte in der Rekombination aufweist, die etwa die Summe der Effekte der Einzelmutationen entsprechen, die *red1* Mutante aber bereits nicht mehr zum Aufbau eines SC befähigt ist, wird argumentiert, dass *Zip1p* eine Rolle bei der Reifung von DSBs zu Crossover-Produkten spielt, die unabhängig von der vollständigen SC-Bildung ist (Storlazzi *et al.*, 1996). Diese Funktion könnte *Zip1p* über verschiedene Mechanismen erfüllen: Nach einem Modell würde das Protein seine Funktion, die homologen Chromosomen zu verknüpfen, einmal früh an zukünftigen Crossover erfüllen und von hier aus die Zusammenlagerung des SC beginnen. Nach einem anderen Modell könnten verschiedene Bereiche von *Zip1p* für die unterschiedlichen Aufgaben benötigt werden (diskutiert in Page und Hawley, 2004). Die zusätzlichen Crossover, die keine Interferenz zeigen,

scheinen einen alternativen Rekombinationsmechanismus bei *S. cerevisiae* zu repräsentieren, der unabhängig vom SC und dessen Proteinen stattfinden kann.

Säuger sind im Ablauf der DSB- und SC-Bildung der Bäckerhefe sehr ähnlich. In der Arbeit von Lynn und Kollegen (2004) wird diskutiert, dass bei Menschen die ungleiche Verteilung von Crossover-Produkten an den Telomerregionen von Männchen und Weibchen mit der ebenfalls ungleichen Verteilung der Initiation des SC in den Geschlechtern übereinstimmt. Dies deutet auf zwei Punkte hin: Die Synapse beginnt an DSBs, die zu Crossover-Produkten reifen, und die Entscheidung für eine Umwandlung eines DSB in Genkonversion oder Crossover wird in diesem Fall auch sehr früh getroffen, was mit den Daten zu AAs und SICs bei Hefe konsistent ist.

Im Gegensatz zur Bäckerhefe und Säugern läuft die Paarung und die Bildung des SC bei *C. elegans* und *Drosophila* unabhängig von DSBs ab. Es wird vermutet, dass bestimmte Chromatinbereiche, sogenannte 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 Crossovers kommt jedoch völlig zum Erliegen. Dies gilt sowohl für *syp1* und *syp2* Mutanten bei *C. elegans* (Colaiácovo *et al.*, 2003; MacQueen *et al.*, 2002) und *c(3)G* Mutanten bei *Drosophila* (Page und Hawley, 2001). Ein Indiz für die getrennte Funktion von verschiedenen Bereichen von *c(3)G*, dem TF-Protein von *Drosophila*, einerseits bei der Reifung von DSBs zu Crossover und andererseits als TF-Protein bei der Verknüpfung der LEs bietet eine Mutante mit einer Deletion in der „Coiled-Coil“-Domäne, die nur zu einer teilweisen Synapse fähig ist, aber etwa 60% der wildtypischen Crossoverprodukte aufweist (Page und Hawley, 2001).

Weitere wichtige Funktionen des SC in der Prophase I werden bereits von den Axialelementen (AEs) vermittelt. Diese spielen eine Rolle bei der **Chromatinkondensation** (Liebe *et al.*, 2004) und höchstwahrscheinlich bei der Regulation der Crossover-Verteilung. Die **Interferenz** hängt möglicherweise folgendermaßen von den AEs ab: Da bei einem Crossover auch die Chromosomenachsen gebrochen und ausgetauscht werden müssen, kann von diesen Achsen ein Signal übertragen werden, indem Torsionsstress durch einen Bruch lokal reduziert wird (Page und Hawley, 2004).

Im Zuge der Vervollständigung der Synapse wird vermutlich eine Feinabstimmung der Homologen-Paarung durchgeführt, die bereits von Moses und Kollegen als synaptische Angleichung („synaptic adjustment“) diskutiert wurde (1982). Bei der *SYCP3* Knockout-Maus konnte korrekte Paarung und teils auch Synapse über TF-Proteine beobachtet werden; diese erreicht aber nie den wildtypischen Grad und es werden oft nichthomologe Chromosomen verknüpft (Liebe *et al.*, 2004).

Während des Pachytän-Stadiums wirkt der SC stabilisierend. Dies wird zum Beispiel dadurch beleuchtet, dass bei fehlender SC-Ausbildung in *syp1* Mutanten von *C. elegans* die homologen Chromosomen zwar paaren, ihren Zusammenhalt aber im frühen Pachytän verlieren (Colaiácovo *et al.*, 2003).

1.3 Polykomplexe (PCs)

Die Untersuchung meiotischer Zellen am Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) führte zu der Entdeckung von Strukturen, die Polykomplexe (PCs) genannt wurden. Diese Strukturen bestehen aus alternierenden dicken und dünnen elektronendichten Balken, die durch TFs verknüpft sind und ähneln auf diese Weise einem Stapel von parallel aneinander gelagerten Synaptonemalkomplexen (SCs, vgl. 1.2.3). Dabei repräsentieren die dünnen Balken das Zentralelement (CE) und die dicken Balken die Lateralelemente (LEs). Ferner stimmen die Dimensionen der PCs mit denen des SC überein, nur dass die dicken Linien eines PC ebenso breit wie die LEs eines SC sind, was bedeutet, dass eine Einheit eines PC nur halb so breite LEs beinhalten kann. Die Beobachtung von PCs wurde zuerst 1960 für *Blaptica dubia* publiziert (Sotelo und Trujillo-Cenoz, 1960); Polykomplexe wurden aber anschließend in über 70 weiteren Spezies aus dem Reich der Tiere, Pflanzen und Pilze gefunden (Überblick in Goldstein, 1987).

PCs, wegen ihrer Erscheinungsform auch multiple Synaptonemalkomplexe genannt, wurden nur in meiotischen Zellen bzw. deren Vorläufer nachgewiesen. Meist wurden sie in Pachytän und Postpachytän-Spermatocyten selten auch in prämeiotischen Zellen entdeckt; hauptsächlich im Kern aber auch im Cytoplasma, assoziiert mit den verschiedensten Organellen im Gegensatz zum SC aber nicht mit Chromatin.

Man geht davon aus, dass die Proteinzusammensetzung des SC und des PC zumindest teilweise übereinstimmen. Als Erklärung für die Entstehung der PCs wurde die Zusammenlagerung überschüssiger SC-Proteine herangezogen, wenn die Konzentrationen bestimmter Untereinheiten eine kritische Konzentration erreichen, oder die Aneinanderlagerung aufgelöster SC-Fragmente. Es ist nicht klar, ob PCs eine Funktion erfüllen, oder nur zelluläres Beiprodukt sind. Die hohe Konservierung der Struktur in der Evolution deutet allerdings eher auf eine funktionelle Bedeutung hin. Möglicherweise dienen die PCs zur Speicherung von SC-Proteinen oder als Übergangsprodukt zur effizienten Auflösung der SCs.

In den 90ern konnte für *S. cerevisiae* der strukturellen Zusammensetzung von PCs ein spezifisches Protein zugeordnet werden. Die Überexpression des TF-Proteins Zip1p (vgl. 1.2.3.3) führte zu der Bildung von PCs, wobei die Beteiligung weiterer meiotischer Proteine am Aufbau nicht untersucht ist (Dong und Roeder, 2000; Sym und Roeder, 1995).

1.4 Modellsysteme

Die Meiose ist wegen ihrer grundsätzlichen Bedeutung für die geschlechtliche Fortpflanzung schon seit ihrer Entdeckung ein Prozess, der in den verschiedensten Organismen über cytologische 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 *S. cerevisiae* aber auch die Spaltheefe *S. 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 natürlich verschiedene Spezies der Säuger – wie Ratte, Maus und Mensch – bewährt.

Während bei der Hefe die Meiose in Kultur eingeleitet werden kann und auch bei den Invertebraten die meiotischen Zellen gut zugänglich sind und ebenso die genetische Manipulation dieser Organismen mittlerweile weit verbreitet ist, sind bei Säugern hier klare Grenzen gesetzt. Die Meiose der weiblichen Gameten, die Oogenese, findet zum großen Teil während der Embryogenese im Mutterleib statt und ist demzufolge besonders unzugänglich, weshalb sich hauptsächlich die Spermatogenese als Modellsystem durchgesetzt hat, in der durch ihre Kontinuität bedingt alle Differenzierungsstadien vorhanden sind. Da sich die Oogenese nicht nur zeitlich in ihrer Regulation und Ausprägung von der Spermatogenese unterscheidet, ist ihre Untersuchung jedoch notwendig und bringt wichtige Erkenntnisse.

Die Möglichkeiten der genetischen Veränderung gerade bei der Maus sind in der Forschung immer wichtiger geworden. Dies gilt auch für die Meiose und äußert sich zum Beispiel in der Herstellung von Knockout-Mäusen von Proteinen, die an der Rekombination oder Synapse beteiligt sind. Allerdings wäre der Einsatz einer Zelllinie von Spermatogonien, die sich kontrollierbar und folglich gut beobachtbar zu einer Differenzierung zu Spermatiden anregen lässt, ein wichtiger Schritt. Besonders weil diese Zellen wesentlich zugänglicher für Manipulationen wären. Die erfolgreiche Kultivierung von Maus-Spermatogonien wurde bereits gemeldet (Feng *et al.*, 2002), konnte aber anscheinend nicht aufrechterhalten werden. Über die Etablierung einer Spermatogonien-Zellkultur des Medaka-Fisch wurde kürzlich berichtet (Hong *et al.*, 2004). Jedoch können trotz der schlechten Zugänglichkeit in Hoden und Ovar zeitliche und räumliche Verteilung der bekannten Faktoren in Säugern untersucht werden und Interaktionen mit *in-vitro* Systemen nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse im Zusammenhang mit dem Wissen aus Knockout-Mäusen und den zum Teil orthologen Faktoren von Invertebraten haben bereits große Fortschritte im Verständnis der Meiose bewirkt.

Da sich diese Arbeit mit der Ausbildung von SCs bei Nagern beschäftigt, wird hier noch einmal besonders auf das Modellsystem der Spermatogenese bei Säugern eingegangen.

1.4.1 Spermatogenese bei Säugetieren

Aufbau des Hodens

Die Hoden (Testes, vgl. Abb. 1.9) enthalten zahlreiche, stark gewundene Gänge, die sogenannten Hodenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti). Zwischen den Kanälchen befinden sich interstitielle Zellen (Leydig-Zwischenzellen), die für die Produktion männlicher Sexualhormone (Androgene) verantwortlich sind. In den Kanälchen findet die Spermienbildung (Spermatogenese) statt. In deren epithelartigen Auskleidungen befinden sich die Spermatogonien 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 das die Spermatozoen schließlich abgegeben werden. Die somatischen Sertolizellen hüllen die verschiedenen Keimzellstadien ein und erfüllen Schutz- und Versorgungsfunktionen. Aus den Hodenkanälchen gelangen die Spermatozoen in das gewundene Gangsystem des Nebenhodens, die Epididymis, und reifen dort zu Spermien heran. Während des Samenergusses (Ejakulation) werden die Spermien aus den Nebenhoden durch den muskulösen Samenleiter (Vas deferens) getrieben. Die beiden Samenleiter verlaufen vom Skrotum über die Rückseite der Harnblase und vereinigen sich jeweils mit dem Ausführungsgang eines Samenbläschens, der Produktionsstätte der Spermaflüssigkeit, zu einem kurzen Ductus ejaculatorius. Diese beiden Kanäle münden in die Harnröhre (Urethra), die alternativ Urin aus der Harnblase oder Sperma abführt (Harn-Samen-Leiter). Die Harnröhre verläuft durch den Penis und mündet an seiner Spitze nach außen.

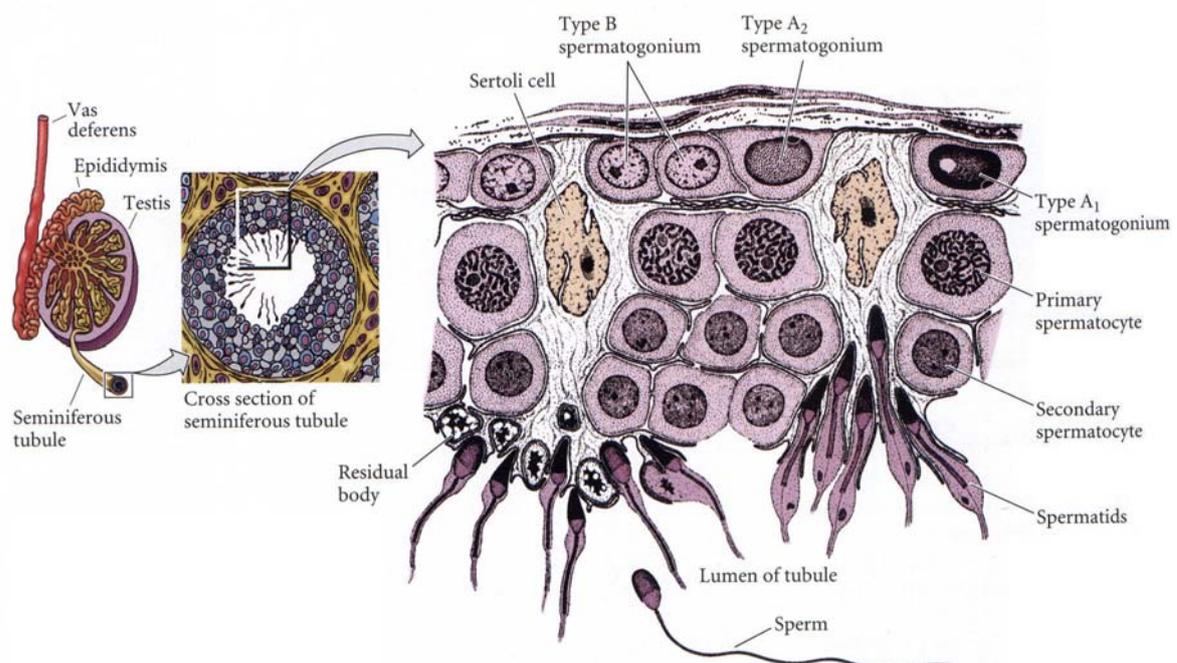


Abbildung 1.9: Aufbau des Hodens. Von links nach rechts sind schematische der Hoden mit Nebenhoden und Samenleiter, ein Querschnitt eines Hodenkanälchens und ein vergrößerter Ausschnitt eines Kanälchens dargestellt (aus Gilbert).

Entstehung der Keimzellen

Die Oogonien teilen sich noch im Embryonalstadium nur für kurze Zeit mitotisch und werden dann nach dem Eintreten in die Meiose in der Prophase arretiert, bis das Weibchen in der Pubertät geschlechtsreif wird. Die Anzahl aller Keimzellen, die sich zu Eiern entwickeln können, steht also hier schon fest.

Spermien können im Gegensatz zu Oocyten zeitlebens produziert werden. Die Urkeimzellen im embryonalen Hoden bleiben im mitotischen Zellzyklus stehen und setzen nach der Geburt die mitotische Proliferation fort. Diese Zellen bilden die Stammzellpopulation der Spermatogonien vom Typ A₁, von denen nach der Pubertät die Spermatogenese ausgeht. Die Spermatogenese kann in die Teilung der Gonien, die Meiose und die Spermiogenese unterteilt werden. Durch die gleichzeitige Teilung der Spermatogonien in einem Abschnitt eines Hodenkanälchens, die unvollständige Zellteilung und die zeitliche Konstanz im Differenzierungsprozess kommt es zu einem Phänomen, das Zellassoziatio n genannt wird. In einem bestimmten Querschnitt eines Tubulus können demzufolge immer dieselben Zusammenstellungen verschiedener Differenzierungsstadien beobachtet werden (vgl. Abb. 1.5).

Die **Teilung der Gonien** beginnt ab der Pubertät mit der fortwährenden Bildung von A₂-Spermatogonien, aus den A₁-Spermatogonien, aus denen wiederum mitotisch A₃- und A₄-Spermatogonien entstehen. Alle A-Typ-Spermatogonien besitzen die Fähigkeit, sich über Mitosen selbst zu erneuern. Aus A₄-Spermatogonien gehen die B-Typ-Spermatogonien hervor, die über mitotische Teilung die primären Spermatozyten hervorbringen.

Während der **Meiose** (vgl. 1.1) werden die homologen Chromosomen (Teilung I) und anschließend ohne erneute Replikation deren Chromatiden (Teilung II) getrennt. Da vor dem Eintritt in die Meiose in der S-Phase die DNA repliziert wurde, entstehen aus diploiden Zellen mit doppeltem Chromosomensatz (2n, 4c) jeweils 4 haploide Zellen mit einfachem Chromosomensatz (1n, 1c), die Spermatozyten.

Spermiogenese: Die Spermatozyten machen eine morphologische Differenzierung zu reifen Spermatozoen durch. Dabei wird zuerst noch aktiv Transkription und Translation betrieben bei der die für die Umgestaltung notwendigen Proteine synthetisiert werden. Im Laufe dieser Differenzierung werden im Kern allerdings die Histone durch stark positiv geladene Protamine, kleine Proteine, die zu 60 % aus Arginin bestehen, ersetzt, die das Chromatin sehr stark kompaktieren. Nach Abschluß dieses Vorgangs ist keine Transkription mehr möglich. Dabei werden die Histone (keimzellspezifische Varianten) zuerst ubiquitiniert, anschließend durch Transitionsproteine ersetzt und schließlich werden die Protamine eingelagert (Übersicht in Govin *et al.*, 2004). Die Form des Kerns verändert sich dabei aus einer runden Gestalt in eine längliche. So können die Spermatozyten je nach Elongationsgrad und der Zellassoziatio n, zu der sie gehören, in spezifische Stadien eingeteilt werden (vgl. Abb. 1.5).

Das Cytoplasma erfährt ebenfalls eine tief greifende Umgestaltung. Dabei werden mit den „residual bodys“ große Bereiche des Cytoplasmas abgetrennt, wobei die Zellen stark verkleinert werden.

Reife Spermien besitzen eine lange Geißel, die sie durch das Medium treibt, und deren zentrales Axonem von dem direkt unterhalb des Kerns gelegenen Basalkörper ausgeht. Aufgebaut ist das Axonem aus zwei zentralen Mikrotubuli, umgeben von neun gleichmäßig verteilten Mikrotubuli-Dubletts (9+2-Struktur). Die Geißeln mancher Spermien werden noch von äußeren dichten Fasern umgeben. Spermien haben keine cytoplasmatischen Organellen mehr, wie Ribosomen, ER oder Golgi-Apparat. Im Mittelsüß am Ansatz der Geißel enthalten sie viele Mitochondrien, die diese spiralg umwinden und effizient mit Energie versorgen können. Dieser Bereich (Geißel und Mittelstück) wird auch als Schwanz des Spermiums bezeichnet. Im Kopf befinden sich der dicht gepackte haploide Kern und davor das Akrosom, das mit hydrolisierenden Enzymen für die Durchdringung der äußeren Hülle des Eies und die Bindung an die Eihülle verantwortlich ist (Akrosomen-Reaktion).

1.5 „Cancer/Testis“-Antigene (CTAs)

Auf der Suche nach Antigenen, die sich für eine Immuntherapie eignen könnten, wurden in menschlichen Tumoren ein weites Spektrum an immunogenen Genprodukten identifiziert, die die Krebszellen vom umgebenden Gewebe unterscheiden (sog. „tumor associated antigens“). Diese wurden in verschiedene Klassen eingeteilt; darunter Differenzierungsantigene, die nur während eines bestimmten Entwicklungsstadiums exprimiert werden, und auch „Cancer/Testis“-Antigene (CTAs), deren Expression nach der Definition außer in Tumoren in normalen Geweben nur in Hoden, Ovar und Plazenta nachweisbar ist. Die CTAs werden als hervorragende Kandidaten für eine Immuntherapie gehandelt, da sie die Krebszellen von gesunden Zellen unterscheiden und nicht in lebenswichtigen Organen exprimiert werden.

Über verschiedene Screening-Methoden wurden mittlerweile 89 individuelle Gene gefunden, die in 44 CTA-Genfamilien eingeteilt wurden (Übersicht in Scanlan *et al.*, 2004); diese sind in einer Datenbank zusammengefasst (www.cancerimmunity.org/CTdatabase), deren Aktualisierung aber scheinbar nicht regelmäßig erfolgt. Eine standardisierte Untersuchung dieser Gene über RT-PCR erbrachte jedoch, dass die strikte Beschränkung der Expression auf Keimzellgewebe und die Plazenta nur auf 19 Genprodukte von 43 zutraf, weitere 19 konnten zusätzlich in ein bis sechs somatischen Geweben nachgewiesen werden (interessanterweise war immer der Pankreas dabei) und die restlichen fünf Gene wurden ubiquitär exprimiert (Scanlan *et al.*, 2004). In Bezug auf die Immunogenität der Genfamilien lässt sich sagen, dass 17 der 44 Genfamilien über die herkömmlichen Methoden der Klonierung von T-Zell-Epitopen oder über SEREX (serologische Untersuchung von cDNA Expressions-Bibliotheken) identifiziert wurden, also über deren Eigenschaft, eine zelluläre bzw. humorale Immunantwort hervorzurufen. Die anderen Genfamilien sind in dieser Hinsicht noch nicht untersucht.

Betrachtet man die Expression von CTAs in Tumoren, findet man oft eine Tendenz zur Häufung, d.h. meist können in Tumoren entweder mehrere verschiedene CTAs nachgewiesen werden oder aber keine, was zu Unterscheidungen der Tumore in Hinblick auf die Häufigkeit der CTA-Expression geführt hat. So sind in Blasenkrebs, nicht-kleinzelligem Lungenkrebs, Melanomen, Brustkrebs, kolorektalen Karzinomen, Prostatakrebs und Nierenkrebs in mindestens 20% der untersuchten Tumorproben nicht weniger als 20 Transkripte der 44 CTA-Familien nachgewiesen worden, bei den ersten drei sogar in mindestens 50% der Proben. In den Tumoren selbst wurden einerseits homogene Expression, d.h. von allen Tumorzellen, bzw. die Expression in nur einem Teil der Zellen detektiert (Übersicht in Scanlan *et al.*, 2004).

Für die Regulation der Expression werden niedriger Methylierungsstatus in Krebszellen und Veränderungen in der Histon-Acetylierung verantwortlich gemacht. Diese Mechanismen können jedoch nicht die Expressionsmuster erklären, die in verschiedenen Tumoren sehr unterschiedlichen sind, weshalb hier sicher noch mehr Forschung nötig ist (Diskutiert in Kalejs und Erenpreisa, 2005; Zendman *et al.*, 2003).

Über die Funktion der CTA-Gene in Tumoren wird noch diskutiert. Einerseits könnte die Expression eine Folge der genomischen Instabilität in Krebszellen sein, also ein sekundärer Effekt ohne Bedeutung für die Tumorgenese. Andererseits wird argumentiert, dass die Expression der CTAs möglicherweise onkogene oder antiapoptotische Effekte haben könnte. So könnte die Expression Teil eines komplexen Programms sein, das mit der Keimzeldifferenzierung in Zusammenhang steht bzw. mit einem frühem ontogenetischem Programm, das für die Regulation der Ploidie wichtig ist. Dies würde einen Zusammenhang zwischen der CTA-Expression von Tumoren und deren genetischen Instabilität und häufige Polyploidisierung herstellen (Kalejs und Erenpreisa, 2005; Old, 2001).

Für viele der Gene sind die Funktionen im ursprünglichen Gewebe unbekannt (Alsheimer *et al.*, 2005). Einigen wird allerdings aufgrund von Homologien zu bekannten Proteinen eine Funktion in der Genregulation als Transkriptionsfaktoren oder als Bestandteile von Signaltransduktionswegen zugesprochen (Kalejs und Erenpreisa, 2005). Die bekannten Gene, Spo11 und SYCP1 (siehe unten) stehen direkt oder indirekt in Zusammenhang mit der Chromosomenpaarung, Synapse und homologer Rekombination. Spo11 vermittelt als Enzym, das Doppelstrangbrüche in DNA einführt, einen der ersten Schritte der homologen Rekombination und ist unabdingbar für die Homologenpaarung (vgl. 1.2.4); SYCP1 ist Bestandteil des Synaptonemalkomplexes (SC, vgl. 1.2.3).

1.5.1 SYCP1 als CTA

Beim Screening einer cDNA-Bank mit dem Serum eines Nierenkrebspatienten (SEREX-Nachweis) ergab unter den positiven cDNAs das Fragment HOM-TES-14, das nach Sequenzierung als SYCP1 identifiziert werden konnte (Türeci *et al.*, 1998).

Die Überprüfung weiterer Tumorproben zeigte eine regelmäßige Expression in verschiedenen Tumoren (Tabelle 1.1). Viele Arbeiten zur Expression von CTAs befassen sich nur mit dem Nachweis auf RNA-Ebene; die Expression von SYCP1 wurde in einigen Arbeiten auch auf Proteinebene untersucht, wobei in den Arbeiten von Luo und Kollegen (2002) und Kubuschok und Kollegen (2004) eine gute Korrelation der Protein-Synthese mit der Synthese der mRNA in Leberzellkarzinomen bzw. Pankreaskarzinomen gefunden wurde. Tammela und Kollegen (2004) konnten hingegen in den Proben von Ovariepithelkrebs (EOC), die die SYCP1 mRNA exprimieren, mittels Immunhistochemie das Protein SYCP1 nicht nachweisen.

Im Zusammenhang mit einer möglichen Immuntherapie ist wichtig, ob die Expression eines CTA tatsächlich zu einer Immunantwort führen kann. Durch die ursprüngliche Identifikation über SEREX wurde die Immunogenität von SYCP1 auf humoraler Ebene bereits gezeigt (Türeci *et al.*, 1998). Desgleichen ist die wirkliche Restriktion der Expression von SYCP1 in normalen Gewebe auf Hoden und Ovar von Bedeutung. Im Gegensatz zum Nachweis der mRNA sowohl im Hoden als auch im Pankreas in der Arbeit von Scanlan und Kollegen (2004), wurde in anderen Arbeiten eine ausschließliche Expression in Hoden gut belegt (Meuwissen *et al.*, 1992; Tammela *et al.*, 2004; Türeci *et al.*, 1998).

Zusätzlich zur Eigenschaft als Antigene wird auch diskutiert, ob sich die Untersuchung der Expression von CTAs auch als diagnostische Maßnahme eignet. Tatsächlich konnte die Expression von SYCP1 mRNA und Protein, die in Pankreaskarzinomen häufig detektiert wurde (48%), schon in einigen Fällen (25%) chronischer Pankreatitis nachgewiesen werden, die als Vorstufe zu Krebs gilt (Kubuschok *et al.*, 2004). In Ovar epithelkrebs wurde eine starke Korrelation der Expression von SYCP1 mRNA mit einer schlechten Prognose festgestellt (Tammela *et al.*, 2004).

Referenzen	Krebsart	SYCP1-Expression/ Gesamt
Tureci <i>et al.</i> , 1998	Melanome	4/28
	Brustkrebs	9/33
	kolorektale Karzinome	0/32
	Prostatakrebs	0/27
	Gliome	6/15
	Magenkarzinome	1/14
	Schilddrüsenkrebs	0/ 5
	Lymphome / Leukämie	0/14
	Lungenkarzinome (NSCLC)	1/14
	Nierenzellkarzinome	3/36
	Ovarkarzinome	0/ 3
	Seminome	0/ 2
	Endometriose	0/ 7
	Sarcome	0/ 4
Sahin <i>et al.</i> , 2000	Gehirnkrebs	39/88
Mashino <i>et al.</i> , 2001	Ösophaguskarzinome	1/46
	Magenkarzinome	24/102
	kolorektale Karzinome	0/98
	Brustkrebs	44/129
Yuasa <i>et al.</i> , 2001	Keimzellkarzinome	6/34
Haffner <i>et al.</i> , 2002	T-Zell-Lymphome (CTCL)	14/36
Eichmüller <i>et al.</i> , 2002	T-Zell-Lymphome (CTCL)	1/24
Jäger <i>et al.</i> , 2002	Brustkrebs	2/13
	Nierenkrebs	4/ 5
	Melanome	1/ 5
	Prostatakrebs	1/ 4
	Übergangszellkarzinom	1/ 4
Luo <i>et al.</i> , 2002	Leberzellkarzinome	6/21
Niemeyer <i>et al.</i> , 2003	Leukämien (ALL und AML)	2/36
Xie <i>et al.</i> , 2003	Non-Hodgkin Lymphome (NHL)	48/93
Kubuschok <i>et al.</i> , 2004	Pankreaskarzinome	29/61
	chronische Pankreatitis	2/ 8
Tammela <i>et al.</i> , 2004	Ovarepithelkrebs (EOC)	15/100
Utsunomiya <i>et al.</i> , 2004	Leberkarzinome (IHCC)	6/20
Peng <i>et al.</i> , 2005	Leberzellkarzinome (HCC)	24/73

Tabelle 1.1: Expression des CTAs SYCP1 in verschiedenen Tumorproben, wie sie seit 1998 veröffentlicht wurden.

1.6 Proteinfaltung von SYCP1

Für das Verständnis der Polymerisationseigenschaften eines Proteins ist das Verständnis der Grundzüge von Proteinfaltung und Zusammenlagerung außerordentlich wichtig. In diesem Kapitel wird die Proteinfaltung besprochen wobei besonderes Gewicht auf die „Coiled-Coil“-Domäne gelegt wird, die für die Faltung von SYCP1 eine entscheidende Rolle spielt.

Proteine bestehen aus einer bis mehreren Aminosäureketten, die eine dreidimensionale Konformation einnehmen. Die lineare Abfolge der Aminosäuren wird Primärstruktur genannt. Die lokale Faltung einzelner Bereiche dieser Abfolge als Sekundärstruktur; dazu gehören zum Beispiel α -Helices und β -Faltblätter. Die entgültige dreidimensionale Faltung eines Proteins wird als Tertiärstruktur und die Bildung von Proteinkomplexen mit anderen Proteinen als Quartärstruktur bezeichnet. Dabei ist es oft schwierig, die unterschiedlichen Ebenen genau zu trennen, da sie sich oft gegenseitig bedingen. Ein abgegrenzter Bereich eines Proteins mit eigener Faltung wird als Domäne bezeichnet.

Die Konformation eines Proteins leitet sich von der Abfolge der verschiedenen Aminosäuren ab und wird von der Polypeptidkette aufgrund der günstigeren Thermodynamik eingenommen. Die Primärsequenz und die entgültige Konformation stehen aber in keiner einfachen Beziehung zueinander. Deshalb ist es zumindest äußerst schwierig die Faltung aus der Aminosäuresequenz vorherzusagen. Dies ist jedoch in bestimmten Strukturmotiven oder ganzen Domänen möglich, wie zum Beispiel bei α -Helices oder bei der „Coiled-Coil“-Domäne, und kann in anderen Proteinen über Homologien zu bereits bekannten Strukturen erfolgen.

Man geht davon aus, dass die Proteinfaltung nach der Synthese über eine fortschreitende Stabilisierung von Zwischenprodukten entsteht. Dabei wird die Faltung von Wechselwirkungen dirigiert, die auch das fertige Protein stabilisieren. Wichtige Motoren der Proteinfaltung sind Elemente der Sekundärstruktur, die sich spontan ausbilden, und auch die hydrophoben Aminosäuren, die in der polaren wässrigen Lösung in den Kern eines Proteins wandern müssen und deren spontane Zusammenlagerung man hydrophoben Kollaps nennt.

Das Hauptstrukturelement von SYCP1 ist eine so genannte „Coiled-Coil“-Domäne. Deshalb soll im nächsten Abschnitt dieses Strukturmotiv genau erklärt werden. Im Anschluss wird auf die Erkenntnisse zu möglichen Faltung von SYCP1 eingegangen, welche Rolle die „Coiled-Coil“-Domäne spielt und welche Eigenschaften für die weiteren Domänen bekannt sind.

1.6.1 Die „Coiled-Coil“-Domäne

Die „Coiled-Coil“-Domäne ist ein Strukturmotiv, das in vielen Proteinen vorliegt, die die unterschiedlichsten Funktionen übernehmen. So findet man diese Domäne in Transkriptionsfaktoren, die eine Leucinreißverschlussdomäne („leucin zipper“) enthalten, in Motorproteinen wie Myosin oder auch in Intermediärfilamentproteinen wie den Laminen. Die „Coiled-Coil“-Domäne dient der

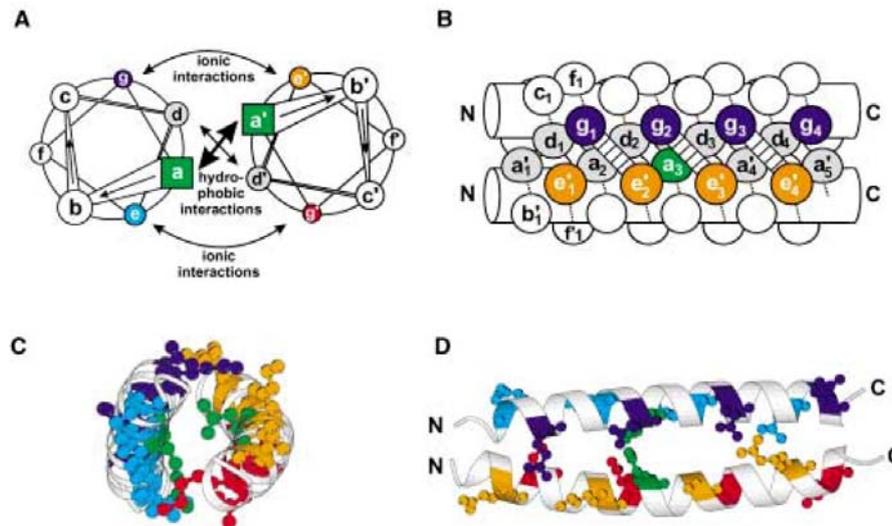


Abbildung 1.10: Schema einer parallelen „Coiled-Coil“-Dimer mit Darstellung der Anordnung der Aminosäuren eines Heptads (A und B) und Darstellung der dreidimensionalen Struktur (C und D) in Aufsicht (A und C) und Seitenansicht (B und D). Die Aminosäurereste in den beiden Helices sind mit a - g bzw. a' - g' bezeichnet. Die hydrophoben Interaktionen zwischen a und a' sind in grün bzw. zwischen d und d' in grau dargestellt. Die hydrophilen Interaktionen zwischen g und e' sind in lila und gelb bzw. zwischen e und g' in blau und rot dargestellt (aus Mason und Arndt, 2004).

Dimerisierung von Proteinen, die sich als Homo- oder Heterodimere zusammenlagern können, und ist zudem thermodynamisch äußerst stabil. (Übersicht in Mason und Arndt, 2004).

Die „Coiled-Coil“-Domäne besteht aus zwei α -helikalen Domänen, die linksgängig umeinander gewunden sind und auf diese Weise eine stäbchenförmige Struktur ausbilden (vgl. Abbildung 1.10). Während reguläre α -Helices eine Windung pro 3,6 Aminosäureresten aufweisen, ist durch die Verwindung zweier α -Helices diese Zahl auf 3,5 Reste herabgesetzt. Also bilden sieben Reste, ein so genanntes *Heptad*, zwei Windungen wie es in Abbildung 1.10B und D dargestellt ist. „Coiled-Coil“-Domänen weisen eine unterschiedlich lange Abfolge dieser Heptaden auf. Der Grund für die Stabilität der Domäne liegt in den Wechselwirkungen der Aminosäuren zwischen den beiden α -Helices. Von den Heptaden, die von a bis g durchgezählt werden, liegen die erste (a) und die vierte (d) Position jeweils im Zentrum des Stabes, das vom Wasser abgeschirmt ist. Die Positionen a und d werden aus diesem Grund in der „Coiled-Coil“-Domäne von hydrophobe Aminosäuren wie Leucin oder Valin eingenommen. Die übrigen Reste sind meist polar; sie sind dem polaren Lösungsmittel zugewandt. Es handelt sich bei der Faltung 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. 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 und ohne den diese nicht zustande kommt. Dieser Bereich wird als „Schaltersequenz“ („trigger sequence“) bezeichnet und

wurde unter anderem in Myosin gefunden (Kammerer *et al.*, 1998). Auch das Lateralelement-Protein SYCP3 scheint eine solche Sequenz am C-terminus aufzuweisen (Baier *et al.*, Manuskript in Arbeit). 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 vorherzusagen. Eine solche Domäne ist Bestandteil von vielen Proteinen. Je nach der Primärsequenz der α -helikalen Domäne werden Hetero- oder Homodimere gebildet; deren Stabilität hängt wiederum von der Übereinstimmung mit der geforderten Heptadabfolge ab. Zusätzlich ist die Abfolge an Heptaden in vielen Proteinen von so genannten „Linker“-Regionen unterbrochen, an denen keine „Coiled-Coil“-Domänen ausgebildet werden. Diese große Variabilität der „Coiled-Coil“-Domänen und natürlich die restlichen Domänen verleihen Proteinen mit diesem Strukturmotiv die weiteren Eigenschaften, die sie zur Erfüllung der unterschiedlichsten Aufgaben benötigen.

So dimerisieren zum Beispiel Transkriptionsfaktoren mit Leucinreißverschluss-Domäne über ihre α -helikalen Bereiche in Form einer „Coiled-Coil“-Domäne. Auf diese Weise werden DNA-bindenden Domänen, die sich an einem Ende der α -Helices befinden, so zueinander in Stellung gebracht, dass sie die Gen-Transkription aktivieren können. Ein weiteres Beispiel für Proteine mit „Coiled-Coil“-Domäne sind Motorproteine. Bei Myosin kommt zusätzlich zur Dimerisierung zweier schwerer Ketten die Ausbildung einer höheren Struktur ins Spiel. Die „Coiled-Coil“-Domänen vieler Dimere lagern sich lateral zu einem Filament zusammen, an dessen Seiten die Köpfe herausragen, die ihrerseits mit Actinfilamenten interagieren um Bewegung zu erzeugen. Diese Form der weiteren Zusammenlagerung von „Coiled-Coil“-Dimeren findet man auch bei den Intermediärfilament-Proteinen (Übersicht in Herrmann und Aebi, 2004). Alle Mitglieder dieser großen Proteinfamilie weisen eine lange, zentrale α -helikale Region auf, die über eine „Coiled-Coil“-Domäne dimerisieren und die von nicht-helikalen Enden flankiert ist. Wiederum sind es die nicht-helikalen Bereiche, die die Spezifität für eine bestimmte Art der Zusammenlagerung ermöglichen. Dimere der cytoplasmatischen Intermediärfilamente lagern sich seitlich versetzt aneinander und können auf diese Weise lange Filamente ausbilden. Die Dimere der nukleären Lamine werden über Motive in den nicht-helikalen Enden an die innere Kernhülle gebunden und bilden über die Interaktion dieser terminalen Domänen ein ausgedehntes Netzwerk.

Zur den vielfältigen Methoden der Untersuchung der Intermediärfilamente zählen die *in-vitro* Polymerisation und die Überexpression der Proteine in somatischen Zellen. Dort bilden die Intermediärfilamentproteine geordnete Strukturen, so genannten Parakristalle. Große Polymere der Intermediärfilamentproteine, die auf ultrastruktureller Ebene ein quergestreiftes Muster offenbaren. Über deren Analyse, wie zum Beispiel den Abstand der Querstreifen, können Aussagen über die Polymerisation getroffen werden. Auch die Untersuchung der Verteilung der Proteine in den Zellen ist für die Charakterisierung wichtig. Zum Beispiel ob die Proteine Filamente bilden oder an die Kernhülle binden, wie es bei den Laminen der Fall ist (Übersicht in Herrmann und Aebi, 2004). Darüber hinaus können in diesen Systemen bestimmte Eigenschaften einzelner Domänen aufgedeckt

werden. Wie eingangs beschrieben sind Domänen Strukturen, die eine eigene Faltung aufweisen und oft eine bestimmte Funktion übernehmen. Diese Funktionen können analysiert werden, indem ausgewählte Mutanten der Proteine erzeugt werden und diese auf ihre jeweiligen Eigenschaften untersucht werden. Zum Beispiel konnte auf diese Weise die Funktion der Myristylierungsstelle des Lamins C2 für die Assoziation an die Kernhülle nachgewiesen und der Einfluss dieses Motivs auf das Membranwachstum aufgedeckt werden (Alsheimer *et al.*, 2000; Prüfert *et al.*, 2005). Lamin B3 wurde durch die Untersuchung der Dynamik, nach ektopischer Expression in Kulturzellen, im Vergleich zu Lamin B2 charakterisiert. Über verschiedene ausgewählte Deletionsmutanten wurde der spezifische Einfluss des nicht-helikalen N-Terminus und bestimmter Bereiche des „Coiled-Coil“-Domäne auf die Dynamik untersucht (Schütz *et al.*, 2005).

1.6.2 Bedeutung der Domänen von SYCP1 im Bezug auf Proteinfaltung und Polymerisation

SYCP1 besteht aus drei großen Domänen. Mittels Computeranalyse der Aminosäuresequenz von SYCP1 wurde eine ausgedehnte zentrale α -helikale Region identifiziert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine „Coiled-Coil“-Domäne (siehe oben) ausbildet und die von nicht-helikalen Domänen umgeben ist. Diese Ausprägung ist, wie es auch für andere Proteine mit diesem Strukturmotiv der Fall ist, an verschiedenen Stellen von den so genannten „Linker“-Regionen unterbrochen (siehe auch Kapitel 6.1 und Abbildung 6.1). Die Domänen-Struktur von SYCP1 mit einer langen zentralen „Coiled-Coil“-Domäne flankiert von nicht-helikalen Domänen ist typisch für Proteine, die in den unterschiedlichsten Organismen den Transversalfilamenten (TFs) des SC zugerechnet werden (vgl. 1.2.2.3). Abgesehen von der Domänen-Struktur weisen diese allerdings keine Homologien auf der Sequenzebene auf.

Die terminalen nicht-helikalen Domänen von SYCP1 weisen keine Sequenzhomologie zu Proteinen bekannter Struktur auf und es gibt keine Motive, aus denen eine Faltung abgeleitet werden kann. Es ist aber anzunehmen, dass es sich um relativ kompakte, also globuläre Strukturen handelt, da diese Konformation in Proteinen vorherrscht um hydrophobe Reste vor der hydrophilen Lösung zu schützen.

Zusätzlich ist es möglich über Sequenzanalyse einzelne Struktur motive innerhalb einer Polypeptidsequenz zu erkennen. Für SYCP1 wurden im C-Terminus zwei Kernlokalisierungssequenzen, und putative DNA-Bindungsmotive identifiziert und über das gesamte Protein verteilt, verschiedene Phosphorylierungsstellen (Meuwissen *et al.*, 1992).

Über die Polymerisation von SYCP1, also eine Strukturbildung die über die Dimerisierung hinausgeht, ist für SYCP1 bislang nur bekannt, dass es als struktureller Bestandteil des Synaptonemalkomplexes (SC) mit anderen Proteinen zusammen eine ausgeprägte höhere Struktur bildet, die Teil des Karyoskeletts ist. Dabei könnte die „Coiled-Coil“-Domäne die Funktion der Transversalfilamente

(TFs) übernehmen. Die nicht-helikalen terminalen Domänen sind Bestandteile verschiedener Struktureinheiten des SC. Der C-Terminus befindet sich im Lateralelement und der N-Terminus im zentralen Element (Liu *et al.*, 1996; Schmekel *et al.*, 1996). Es ist mit Sicherheit anzunehmen, dass diese Domänen dort Bindungen eingehen, die für die Anordnung der Moleküle innerhalb des Synaptonemalkomplexes entscheidend sind. Für den N-Terminus wurde eine homotypische Bindung nachgewiesen (Liu *et al.*, 1996) und es wird vermutet, dass die N-Termini der Moleküle, die von beiden in die zentrale Region des SC ragen, im zentralen Element eine Verbindung herstellen.

1.7 Ziele

Das Ziel dieser Arbeit war es einen Beitrag zum besseren Verständnis des molekularen Aufbaus des Synaptonemalkomplexes (SC) von Säugern zu leisten. Der SC ist eine meiosespezifische Struktur, die die homologen Chromosomen verknüpft und wichtig für deren Rekombination und Segregation ist.

SYCP1 wird als wichtiger struktureller Bestandteil des SC angesehen. Zusätzlich wurde die Expression von SYCP1 in Tumorzellen als „Cancer/Testis“-Antigen entdeckt. Die Funktion, die SYCP1 dabei spielt ist nicht klar.

Als Ziel der Untersuchungen dieser Arbeit sollten die Polymerisationseigenschaften von SYCP1 aufgeklärt werden und darüber hinaus sollten Bindungspartner charakterisiert werden. Diese Erkenntnisse würden ein besseres Verständnis der Zusammenlagerung des SC ermöglichen und der Rolle, die SYCP1 dabei übernimmt. Darauf aufbauend könnten die Prozesse während der Prophase I der Meiose besser verstanden werden. Zugleich würde die Expression in Kulturzellen Aussagen auf die Eigenschaften von SYCP1 als CTA zulassen.

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Charakterisierung der Polymerisationseigenschaft von SYCP1, da es sich, bei SYCP1 um das putative Transversalfilamentprotein des SC handelt, das die Rolle des molekularen Reißverschluss übernehmen soll, der die homologen Chromosomen zusammenhält. Die Untersuchungen sollten aufdecken, ob SYCP1 die prognostizierten Funktionen tatsächlich ausüben kann und welche Domänen des Proteins dabei eine Rolle spielen. Da meiotische Zellen von Säugern experimentell sehr schlecht zugänglich sind und es keine Zelllinie von Säugern in Kultur gibt, die die Meiose durchläuft, sollten die Untersuchungen in einem heterologen System erfolgen, indem somatische Kulturzellen transfiziert werden.

Dieses System ist geeignet, Untersuchungen zur Polymerisationsfähigkeit durchzuführen. Zusätzlich kann in diesem System die Bedeutung einzelner Domänen untersucht werden, indem gezielt Mutationen erzeugt werden. Ferner kann über Kotransfektionsexperimente die Aufklärung von Interaktionen zwischen spezifischen Proteinen erfolgen.

2. Abkürzungen

AA	axiale Association („axial association“)
AE	Axialelement („axial element“)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin Triphosphat
CE	Zentralelement („central element“)
CR	zentrale Region („central region“)
Da (kDa)	Dalton (Kilodalton)
DSB	Doppelstrangbruch („double strand break“)
DSBR	Doppelstrangbruch-Reparatur („double strand break repair“)
DNA	Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“)
cDNA	komplementäre DNA („complementary DNA“)
dsDNA	doppelsträngige DNA („double stranded DNA“)
ssDNA	einzelsträngige DNA („single stranded DNA“)
EGFP	verstärktes, grünes Fluoreszenzprotein („enhanced green fluorescent protein“)
FKS	fötale Kälberserum
FRAP	Fluoreszenzerholung nach Ausbleichen („fluorescence recovery after photobleaching“)
GST	Glutathion S-Transferase
LB-Medium	Luria Bertami Medium
LE	Lateralelement („lateral element“)
MG	Molekulargewicht
NLS	Kernlokalisierungs-Signal („nuclear localization signal“)
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
RN	Rekombinationsknoten („recombination nodule“)
RT	reverse Transkription
SC	Synaptonemalkomplex („synaptonemal complex“)
SDS	Natrium Dodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
SDS-PAGE	Natrium Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese („sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis“)
SDSA	syntheseabhängige Strang-Annealing („synthesis dependent strand annealing“)
SYCP	Synaptonemalkomplexprotein
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TF	Transversalfilament („transversal filament“)
ÜN	Übernacht
ÜNK	Übernachtkultur

3. Methoden

3.1 Mikrobiologisches Arbeiten

Flüssigkultur von Bakterien

LB-Medium (pH 7,4):

10 g/l Bacto-Trypton (Gibco)

5 g/l Hefeextrakt (Gibco)

10 g/l NaCl

→ autoklavieren

Antibiotika-Stammlösungen:

Ampicillin: 50 mg/ml in ddH₂O

Kanamycin: 50 mg/ml in ddH₂O

Tetracyclin: 15 mg/ml in Ethanol

Jeweils 15 ml LB-Medium (Luria Bertani Medium) wurden für eine Übernachtskultur mit dem jeweiligen Antibiotikum, gegen das die Bakterienkultur resistent ist, in einer Endkonzentration von 50 µg/ml versetzt. Dieses Selektionsmedium wurde mit Bakterienmaterial angeimpft, indem mit einer sterilen Pipettenspitze etwas aus einer Glycerinkultur oder einer Kolonie von einer Agarplatte überführt wurde. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C geschüttelt. Als Gefäß wurden bevorzugt 50 ml Greinerröhrchen verwendet, da sie dem Wachstum der Bakterien genügend Sauerstoff boten.

Für Flüssigkulturen größerer Volumina bzw. für Kulturen zur Proteinexpression wurden 100-200 ml Medium mit etwa 5 ml ÜNK angeimpft.

Glycerinkulturen

Zur Aufbewahrung von Bakterienkolonien über längere Zeit, wurden 900 µl einer Übernachtskultur mit 100-200 µl Glycerin vermischt und bei -70°C gelagert.

Bakterienkulturen auf Agarplatten

1,5% Agar in LB-Medium (vgl. 3.1.1)

Die Lösung wurde mit einem Rührfisch autoklaviert und unter Rühren abgekühlt. Wenn die Temperatur auf etwa 50°C gefallen war, wurde bei Selektionsplatten Ampicillin oder Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben und Petrischalen damit ausgegossen.

Bakterienlösungen wurden mithilfe eines Drygalski-Spatels ausgestrichen, der vorher mit 100% Ethanol abgeflammt wurde. Dies konnte auch mit einer Impföse erfolgen.

Herstellen kompetenter Bakterien

TSS (Transformation and Storage Solution):

LB-Medium + 10% PEG 3350 oder 8000
+ 5% DMSO
+ 30 mM Mg²⁺ (MgSO₄ oder MgCl₂)
pH 6,5
→ sterilfiltrieren und bei -20°C lagern

Eine Flüssigkultur von *E.coli* des Stammes XL1-blue, XL10-gold oder BL21Codon⁺ wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 inkubiert, anschließend 10 min bei 1000g und 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 1/40 des Ausgangsvolumens eiskaltem TSS resuspendiert. Die Suspension wurde in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Transformation von Bakterien mit Plasmid DNA

Zur Transformation wurden chemisch kompetente Bakterien (Aliquots von 100 µl, vgl. 3.1.4) entweder mit wenigen ng Vektor-DNA (500 ng bei den wenig kompetenten BL21Codon⁺) oder im Fall von Klonierungen (vgl. 3.3.10) einem ganzen Ligationsansatz vermischt. Dieser Ansatz wurde 30 bis 60 min auf Eis inkubiert und anschließend 30 sec einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Dann wurden 900 µl LB-Medium (vgl. 3.1.1) zugegeben, die Bakterien 1h bei 37°C geschüttelt und daraufhin in zwei Verdünnungen auf Selektionsplatten entsprechend der Resistenz des Vektors ausplattiert.

3.2 Zellkultur, Gewebe und Isolierung von Spermatozyten

3.2.1 Zellkultur

Zu Untersuchungen von Proteineigenschaften eignet sich die ektopische Expression der Proteine oder ausgewählter Mutanten in Kulturellen. 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

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, Nürnberg) 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 von 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, und das System *MATra* von der Firma IBA, Göttingen, nach den jeweiligen Herstellerprotokollen eingesetzt. Dabei mussten die DNA-Konzentrationen je nach Konstrukt variiert werden. Die transfizierten Zellen wurden für 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und dann für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie oder die Elektronenmikroskopie weiterverarbeitet.

Mikroinjektion von Kulturzellen

Die Mikroinjektion von adhärenenten Kulturzellen bietet die Möglichkeit Makromoleküle in die Zellen einzubringen. Dazu wurden COS-7 Zellen auf Deckgläschen wachsen gelassen, 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 0,5x PBS (vgl. 3.2.4) 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.

3.2.2 Gewebepräparation

flüssiger Stickstoff

Methylbutan (Isopentan)

Schockgefrieren von Gewebe:

Zur Untersuchung der Verteilung von Proteinen im Gewebe wurden Hoden schockgefroren. Mäuse bzw. Ratten wurden mit CO₂ eingeschläfert, die Hoden entnommen und in Stücke geschnitten. Diese wurden in Methylbutan überführt, das zuvor mit flüssigem Stickstoff auf -140°C gekühlt worden war. Diese schockgefrorenen Gewebestücke wurden dann bei -70°C gelagert.

Herstellung von Gefrierschnitten:

Gefrierschnitte wurden mit Gerät 2800 FRIGOCUT E von Reichert-Jung (Heidelberg) in einer Dicke von etwa 5 µm hergestellt. Diese wurden auf Objektträger abgeklatscht und konnten für Immunfluoreszenz-Mikroskopie (vgl. 3.6.1) und Immungold-Lokalisation (vgl. 3.6.2) eingesetzt werden.

3.2.3 Gewinnung angereicherter Zellfraktionen verschiedener Spermatogenesestadien aus Maushoden durch zentrifugale Elutriation (Meistrich, 1977)

Einführung:

Mithilfe der Elutriation war es möglich, heterogene Zellgemisch aus einer Suspension von Hodenzellen in einzelne Fraktionen zu trennen. Der Rotor dieser speziellen Zentrifuge ist so gebaut, dass man während der Zentrifugation von außen nach innen einen Pufferstrom durch eine Elutriationskammer leiten kann, die sich im äußeren Bereich des Rotors befindet. Auf ein Teilchen, dessen Dichte höher als die des Puffers ist, wirken in dieser Kammer zwei Kräfte. Die Zentrifugalkraft wirkt in Abhängigkeit von der Zentrifugationsgeschwindigkeit von der Rotorachse weg; der Druck des Pufferstroms wirkt dem in Abhängigkeit von der Durchflussrate und der Dichte entgegen. Ein zusätzlicher Faktor ist die Form der Elutriationskammer. Da sich die Geschwindigkeit eines Flüssigkeitsstroms mit der zur Verfügung stehenden Querschnittsfläche verändert, kann sich in der Kammer ein Geschwindigkeitsgradient ausbilden. Wenn nun Zellen mit dem Pufferstrom in den Elutriator beladen werden, werden sie sich bei geeigneten Kräfteverhältnissen nach Größe, Form und Dichte sammeln. Von außen zur Rotorachse hin werden jeweils größere Zellen bzw. weiter

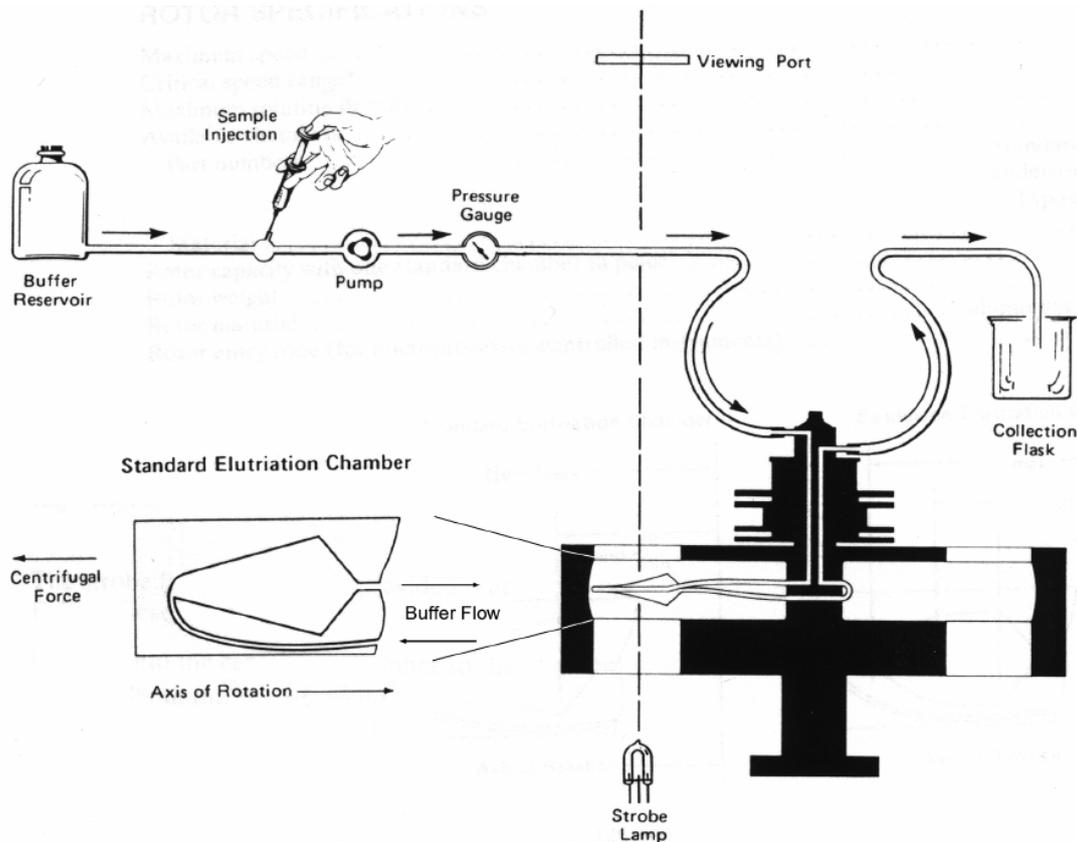


Abbildung 3.1: Übersicht über den Aufbau des Elutriationssystems JE-6B

fortgeschrittene Differenzierungsstadien der Spermatogenese zu liegen kommen. Bei sukzessiver Veränderung der Kräfteverhältnisse durch Verminderung der Zentrifugalkraft oder Erhöhung des Pufferstroms können einzelne Zellfraktionen nun nach und nach aus der Kammer gespült und aufgefangen werden.

Es ist technisch nicht möglich, absolut reine Zellfraktionen zu erhalten; das Protokoll der Elutriation (Tabelle 3.1) ist darauf optimiert, Fraktionen zu erzeugen, die vorwiegend einen Zelltyp enthalten.

Lösungen:

PBS pH 7,4:

140 mM NaCl
2,6 mM KCl
6,4 mM Na₂HPO₄
1,4 mM KH₂PO₄

DPBS pH 7,2 – 7,4:

PBS + 0,01% MgCl₂
+ 0,01% CaCl₂

Elutriations-Puffer:

DPBS + 0,5% BSA (Sigma)

Verdau-Lösung:

DPBS + 0,1% Glucose

Am Tag des Gebrauchs:

+ 0,1% Trypsin (Serva)
+ 2 µg/ml DNase I (Roche)
+ Collagenase (Roche, Spatelspitze)

<u>NDA-Puffer:</u>	<u>ddH₂O</u>
DPBS + 0,2% NDA (2-Naphtol-6,8-Disulfonsäure als Kaliumsalz; Kodak)	2 l gekühlt und entgast
Am Tag des Gebrauchs: + DNase I (Roche; Spatelspitze)	70% Ethanol Seifen-Lösung in ddH ₂ O

Die Lösungen werden schon am Vortag angesetzt (außer FKS, Ethanol- und Seifenlösung) und über Nacht bei 4°C aufbewahrt, so dass sie entgasen konnten. Vor allem beim Elutriationspuffer musste die Temperatur möglichst konstant bei 4°C gehalten werden, da die Dichte temperaturabhängig ist. Enzymatische Zusätze wurden erst am Tag des Gebrauchs zugegeben.

Für die Elutriation von drei bis fünf Rattenhoden wurden jeweils 100 ml Verdaulösung, 100 ml NDA-Puffer und 2 l Elutriationspuffer benötigt.

Präparation der Hoden und Herstellung einer Zellsuspension:

Es wurde eine Einzelzell-Suspension nach dem Trypsin-Protokoll von Meistrich (1977) hergestellt. Zur Präparation der Hoden wurden die Ratten mit CO₂ eingeschläfert und das Genick gebrochen. Den toten Tieren wurde zur Entnahme der Hoden Bauchdecke geöffnet. Diese wurden dann in eine mit kaltem DPBS gefüllte Petrischale überführt, wo die Tunica albuginea entfernt wurde. Daraufhin wurde das DPBS zum großen Teil abgeschüttet und die jetzt freiliegenden Tubuli wurden mit zwei Rasierklingen möglichst klein geschnitten. Zur weiteren Homogenisierung wurde die Gewebesuspension mit einer Spritze ohne Kanüle wiederholt auf und abgezogen und anschließend in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, wobei die Suspension ohne Kanüle aufgezo-gen und durch eine aufgesetzte Kanüle (Ø 0,9 mm) ausgedrückt wurde. Nach Sedimentierung der Zellen und Gewebebestandteile für 10 min bei 450g und 4°C wurde der Überstand vorsichtig dekantiert. Das Pellet wurde nach und nach durch vorsichtiges Pipettieren mit einer abgeschnittenen blauen Spitze in jeweils wenig Verdau-Lösung resuspendiert und in eine verschließbare Kunststoffflasche überführt. Der restliche Puffer wurde zugefügt und die Suspension wurde im Wasserbad bei 31°C 30-45 min unter Rühren inkubiert. Von nun an wurden nur noch Kunststoffgefäße verwendet, da Zellen an Glas haften bleiben und verloren gehen können. Anschließend wurde der Verdau durch die Zugabe von 10 ml FKS gestoppt und die Suspension durch ein Drahtnetz (300 µm Maschenweite) filtriert. Das Filtrat wurde in 50 ml Röhrchen 10 min bei 450g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 ml NDA-Puffer aufgenommen. Die Suspension wurde durch ein Nylonnetz (25-30 µm Maschengröße, in DPBS äquilibriert) filtriert, auf 50 ml Röhrchen verteilt und bei 4°C bis zur Verwendung auf einem Rollinkubator gelagert.

Befüllen des Rotors:

Der Rotor wurde zusammengebaut und in die Zentrifuge (J2-21M/E) eingesetzt, wo er an das Schlauchsystem angeschlossen wurde. Der Elutriator wurde auf 4°C vorgekühlt. Zum Befüllen wurde das Schlauchsystem mit eisgekühltem ddH₂O bei einer Pumpeneinstellung von 2-3 beladen. Die Blasenfalle wurde bis etwa ¾ Höhe befüllt, um bei späteren Lösungswechseln zu gewährleisten, dass keine Blasen eindringen. Das System wurde weitgehend blasenfrei gemacht, indem die zuführenden Schläuche abgeklopft wurden und der Rotor mit der Hand angedreht wurde. Die Zentrifuge wurde programmiert (Rotor: 6; Speed: 3000 rpm; Time: 4 h; Temperature: 4°C) und gestartet. Jetzt mussten die restlichen Blasen entfernt werden. Dazu wurde der Schlauch zum Abfallgefäß abgedrückt (der Druck durfte 10 bar nicht überschreiten) und wieder losgelassen. Dies wurde wiederholt bei Anlaufen und Abbremsen der Zentrifuge bei Umdrehungszahlen zwischen 700 und 1200 rpm durchgeführt. Der Abflussschlauch wurde dabei auf Luftblasen kontrolliert und der Vorgang wurde so oft wiederholt, bis keine Blasen mehr zu beobachten waren. Anschließend wurde das Wasser durch den eisgekühlten Elutriationspuffer bei einer Pumpeneinstellung von 1 ersetzt. Wäre später während eines Laufes eine Luftblase aufgetaucht, hätte der Versuch abgebrochen werden müssen.

Eichen der Pumpe:

Nach etwa 10-15 min (Pumpeneinstellung: 1) war das Wasser vollständig durch den Elutriationspuffer ausgetauscht. Die Pumpe wurde exakt auf 1 gestellt und die Flüssigkeitsmenge gemessen, die innerhalb von 2 min austritt (ml₁). Anschließend wurde die Pumpe exakt auf 2 gestellt, und die durchlaufende Flüssigkeitsmenge bei 1 min bestimmt (ml₂). Mit den Ergebnissen wurde die Pumpleistung x ermittelt, die durchlaufende Flüssigkeitsmenge pro Minute und Einheit (ml/min):

$$\frac{ml_1 + ml_2}{4} = x \cdot \frac{ml}{\text{min} \cdot \text{Skaleneinheit}}$$

Die jeweilige Pumpeneinstellung während des Laufs wurde berechnet, indem die geforderte Pumpleistung durch die gemessene Pumpleistung x geteilt wurde.

Fraktion	rpm	ml/min	Zeit [min]	Zelltypen
1	3000	13,5	bis Blasenfalle klar	verwerfen
2	3000	32,5	4,6	Spermatiden gemischt
3	3000	41,4	3,6	runde Spermatiden 81%
4	2000	23,2	6,4	runde Spermatiden 50%
5	2000	28,2	5,3	Spermatiden gemischt und Pachytän Spermatocyten 19%
6	2000	40	3,75	Pachytän Spermatocyten 85 – 90%

Tabelle 3.1: Elutriationsprotokoll für die Fraktionierung der Spermatogenesestadien der Ratte

Durchführung eines Laufs:

Zuerst wurden als Auffangbehälter GSA-Rotorbecher auf Eis vorbereitet, anschließend die Zellsuspension vom Rollinkubator aus dem Kühlraum geholt und der Rotor damit beladen.

Die Einstellungen und die zelluläre Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen sind untenstehender Tabelle (Tabelle 3.1) zu entnehmen. Beim Wechsel muss Folgendes beachtet werden: Wenn die Pumpleistung erhöht wird, wird zuerst der Auslassschlauch in das neue Auffanggefäß überführt. Beim Übergang zwischen Fraktion 3 und Fraktion 4+5 wird zuerst die Pumpleistung heruntergeregelt, dann der Schlauch überführt und erst zum Schluss die Umdrehungszahl der Zentrifuge geändert.

Reinigung des Rotors:

Zunächst wurde das Zellpellet, das sich während des Versuches am Kammerboden gebildet hatte, herausgespült. Dazu wurde die Zentrifuge gestoppt und der Abflussschlauch zugeedrückt und wieder losgelassen (der Druck darf keinesfalls über 10 bar steigen). Dies wurde wiederholt bei Anlaufen und Abbremsen der Zentrifuge bei Umdrehungszahlen zwischen 700 und 1200 rpm durchgeführt. Dann wurde die Zentrifuge abgeschaltet, und das System wurde zuerst mit 1 l Seifenlösung dann mit 1 l ddH₂O und schließlich mit 500 ml 70%igem Ethanol gespült. Danach wurden die Schläuche gelöst, der Rotor entnommen und wieder auseinandergebaut, damit er gut austrocknen konnte. Die Rotorachse wurde nicht entfernt. Die Zentrifuge wurde über Nacht offen stehengelassen, ebenso wurden Rotor und Rotorteile erst am nächsten Tag wieder verpackt.

3.3 Arbeiten mit rekombinanter DNA

3.3.1 Isolierung von RNA aus Geweben und Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus einer mit Spermatozyten angereicherten Zellfraktion (Fraktion 6; vgl. 3.2.3) erfolgte mit *peqGOLD Trifast*TM von der Firma PeqLab, Erlangen, nach Herstellerprotokoll. Die RNA wurde für die Gewinnung von einer spezifischen cDNA (vgl. 3.3.2) über RT-PCR benutzt.

3.2.2 Gewinnung von cDNA aus isolierter RNA von einer mit Spermatozyten angereicherten Zellfraktion

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*TM *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. 3.3.4) isoliert, über Topo-TA Klonierung (vgl. 3.3.10) in einen Vektor inseriert und nach Transformation von Bakterien (vgl. 3.1.5) vervielfältigt. Von hier aus konnte die DNA durch PCR oder Restriktionsendonukleasen beliebig umkloniert werden.

3.2.3 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine Technik, mit der man selektiv DNA-Sequenzen zwischen spezifischen Primern mit hitzebeständigen DNA-Polymerasen vervielfältigen kann. Diese Methode eignet sich für RT-PCR, Klonierungen und auch für das Screening von Klonen nach der richtigen DNA-Insertion.

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. Wenn möglich, sollte ihre komplementäre Sequenz nur einmal auf der eingesetzten DNA vorkommen; dabei gilt: je länger die Sequenz des Primers ist, desto unwahrscheinlicher wird ein zufälliges zweites Vorkommen. Außerdem sollten die Schmelz-Temperaturen 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 die Hälfte dieser komplementären Sequenzen in der Lösung als Doppelstrang vorliegt. Diese Temperatur kann näherungsweise mit folgender Formel berechnet werden:

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

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 (bei unspezifischer Amplifikation, erkennbar als Schmier bei der Gelelektrophorese) oder unten (kein Produkt) variiert. Die Primer wurden mit dem Programm „OLIGO“ am Computer entworfen und von den Firmen Interaktiva (Ulm), Biomers (Ulm) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Für Amplifikationen mittels PCR wurden die Tfl- und Pfu-Polymerase von Promega (Mannheim) bezogen bzw. im Lehrstuhl selbst isolierte Taq- und Pfu-Polymerasen entsprechend des Herstellerprotokolls von Promega verwendet. Während die Pfu-Polymerase eine $3' \rightarrow 5'$ -Exonukleaseaktivität also „proof reading“ aufweist und deshalb für Klonierungen verwendet wurde, sind die Tfl- und Taq-Polymerasen schneller (1kb/ min) und geeignet für die Amplifikation genomischer DNA.

Tfl- und Taq-PCR:

20-60 ng DNA
 5 μl Tfl-DNA-Polymerase 10x Reaction Buffer
 3 μl MgSO_4 bzw. MgCl_2 (25 mM)
 1 μl dNTPs (Mix, SL je Nukleotid 10 mM, MBI)
 1 μl 5'-Primer (SL 10 μM)
 1 μl 3'-Primer (SL 10 μM)
 auf 50 μl mit ddH₂O auffüllen
 1 μl Tfl- oder Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μl)

Pfu-PCR:

20-60 ng DNA
 5 μl Pfu-DNA-Polymerase 10x Reaction Buffer
 (enthält MgSO_4)
 1 μl dNTPs (Mix, SL je Nukleotid 10 mM, MBI)
 1 μl 5'-Primer (SL 10 μM)
 1 μl 3'-Primer (SL 10 μM)
 auf 50 μl mit ddH₂O auffüllen
 1 μl Tfl- oder Taq DNA-Polymerase (5 U/ μl)

Der Ansatz wurde im Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert und anschließend im Agarosegel (vgl. 3.3.4) analysiert.

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 pro 1000 Basen+30 sec, 7°C	
finale Elongation	10 min	
Kühlung:	4°C	

3.2.4 DNA-Auftrennung durch Agarose-Gelelektrophorese

TBE (pH 8,2):

89 mM Tris/HCl
89 mM Borsäure
2 mM EDTA

DNA-Beladungspuffer:

10x TBE + 50% (w/v) Glycerin
+ 0,4% (w/v) Bromphenolblau
+ 0,4% (w/v) Xylencyanol

Ethidiumbromid-Stammlösung (50 mg/ml)

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten eignete sich die Agarose-Gelelektrophorese, bei der sich die negativ geladene DNA in einem elektrischen Feld zur Anode bewegt und dabei durch das molekulare Netzwerk der Agarose je nach Größe und Form unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit besitzt. Die Trennschärfe der Wanderung hängt hier von der Gesamtlauflänge und der Agarosekonzentration ab. Dem Gel wurde Ethidiumbromid beigemischt, um die DNA-Banden sichtbar zu machen. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert zwischen die Basen der DNA und erzeugt bei Anregung durch UV-Licht eine orange Fluoreszenz.

Es wurden 0,8 – 1,2%ige Agarose-Gele (low EEO Agarose; Appli-chem, Darmstadt) mit 1,25 µg/ml Ethidiumbromid bei etwa 120V gefahren. Um die Größen der aufgetrennten DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde in einer Spur ein Größenmarker (Marker III; MBI Fermentas, St. Leon-Roth; vgl. Abb. 3.2) aufgetragen. Die durch das Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden wurden mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und über eine Videokamera mit angeschlossenem Printer dokumentiert.

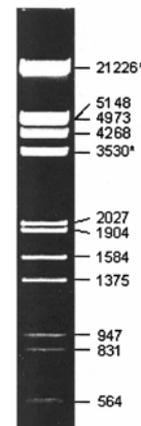


Abbildung 3.2: DNA-Marker III (MBI) im 1%igen Agarose-Gel. Größenangaben in bp

Präparative DNA-Gelelektrophorese

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen, Hilden, durchgeführt. Die gewünschten Banden wurden mit einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend die DNA aus dem Gel eluiert. Vorgegangen wurde dabei nach dem Herstellerprotokoll. Die eluierte DNA stand ohne weitere Reinigung für Folgeversuche zur Verfügung.

3.2.5 Plasmid DNA Präparation aus Bakterienkulturen

GTE-System (alkalische Lyse)

Bei dieser Methode (Li *et al.*, 1997) erhält man verunreinigte DNA, die sich aber gut dazu eignet, Restriktionsfragmentanalysen durchzuführen, um Bakterienklone nach einer Klonierung zu testen.

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

Lösung 3 (Kaliumacetat-Lösung):

60 ml Kaliumacetatlösung (SL 5 M)

11,5 ml Eisessig

28,5 ml ddH₂O

100% Ethanol p.a. (auf Eis vorkühlen)

Lösung 2 (Lysispuffer):

0,2 N NaOH

1% SDS (Natrium Dodecylsulfat)

Das Bakterienpellet von 1,5 ml einer ÜNK wurde in 100 µl GTE-Puffer resuspendiert. Dann wurden 200 µl Lösung 2 zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt. Zum Schluss wurden noch 150 µl Lösung 3 zugegeben und der Ansatz kurz kräftig geschüttelt. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei 12000 rpm wurden 400 µl des Überstandes in einem frischen Gefäß mit 400 µl eiskaltem Ethanol (100%, p.a.) vermischt und der Ansatz wurde dann sofort 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und das luftgetrocknete DNA-Pellet in 30 µl ddH₂O aufgenommen.

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. ddH₂O) bei pH 7,0 - 8,5 eluiert. Die durch diese Methode gewonnene Plasmid-DNA besitzt eine sehr hohe Reinheit und ist somit auch für empfindlichere Reaktionen wie zum Beispiel Sequenzierungen einsetzbar.

Die Durchführung erfolgte mit dem *E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I* (Peqlab, Erlangen) nach dem Herstellerprotokoll.

3.2.6 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 mit einzelsträngigen Überhängen („sticky ends“) 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: 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-Polymerase (Promega) ist eine DNA-Polymerase mit „proof reading“ Aktivität, die zur Amplifikation von DNA-Sequenzen eingesetzt wurde (vgl. 3.3.3), diese konnte aber auch wie das Klenow-Fragment „klebrige“ Enden auffüllen. Deren Exonukleaseaktivität wurde dazu benutzt, einzelsträngige 3'-Überhänge von „klebrigen“ Enden abzuverdauen und so „glatte“ Enden zu erhalten.

Taq-/ Tfl-Polymerase (Promega) wurde für Screening von Klonen benutzt und um 3'-(A)-Überhänge an PCR-Produkte anzuhängen, die mit der Pfu-Polymerase hergestellt wurden.

3.2.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der gewonnenen DNA und RNA kann photometrisch (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg) über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen werden. Dort besitzen die Basen der Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum. Gemessen wurde eine geeignete Verdünnung (1/20 oder 1/100, je nach Konzentration) gegen den entsprechenden Leerwert. Dabei gilt, dass eine OD_{260} von 1 etwa 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA entspricht. Aus den Quotienten OD_{260}/OD_{280} und OD_{260}/OD_{230} können Aussagen über die Reinheit der Probe abgeleitet werden. Die Absorption bei 280 nm zeigt die Verunreinigungen durch Proteine, während Peptide, aromatische Verbindungen und Kohlenhydrate bei 230 nm ihr Absorptionsmaximum haben. In Tabelle 3.2 ist zusammengefasst, wie von der OD auf die Konzentration geschlossen werden kann und welchen Wert die Quotienten 260/280 bzw. 260/230 bei reinen Proben annehmen sollten.

	Konz. bei OD ₂₆₀ = 1	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀
dsDNA	50 µg/ml	1,8	2,2
ssDNA	37 µg/ml	1,8	2,2
RNA	40 µg/ml	2,0	2,2
Oligonukleotide	30 µg/ml	1,8	2,2

Tabelle 3.2: Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

3.2.8 Fällung von Nukleinsäuren (DNA und RNA)

3M Na-Acetat pH 5,2

100 % Ethanol p.a. (auf Eis vorkühlen)

Nukleinsäuren (DNA und RNA) wurden mit Natriumacetat und Ethanol gefällt. Dazu wurde die wässrige DNA-Lösung zunächst mit ddH₂O auf 90 µl aufgefüllt und dann 10 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 250 µl 100% Ethanol (p.a.) zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt (die Ausbeute konnte erhöht werden, indem man die Lösung über Nacht bei -20°C lagerte) und anschließend 20 min bei 12000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und dann das Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Zum Waschen wurde jeweils 10 min bei 12000g zentrifugiert. Der Überstand wurde nun sorgfältig abgenommen, das Pellet luftgetrocknet und in der gewünschten Menge Puffer aufgenommen.

3.2.9 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen werden nach der von Sanger und Coulson (1977) entwickelten Kettenabbruch-Methoden durchgeführt. Die Methode beruht darauf, dass bei einer PCR Didesoxynukleosid-Triphosphate (ddNTPs) in stöchiometrischen Mengen beigelegt werden. Wenn bei der DNA-Polymerisierung durch die Polymerase ein solches Nukleotid eingebaut wird, kommt es zum Abbruch, da kein freies 3'-OH Ende mehr vorliegt. Auf diese Weise bekommt man DNA-Fragmente verschiedenster Längen, die alle an ihren Enden ein ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP oder ddGTP) tragen, die eine Fluoreszenz-Markierung aufweisen; wobei jedes Nukleotid mit einem anderen Farbstoff markiert ist (Adenin: R6G, grün; Thymin: ROX, rot; Cytosin: TAMRA, gelb; Guanin: R110, blau). 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.

Sequenzierreaktion (10 µl):

200 ng DNA

10 pmol Primer

auf 8 µl mit ddH₂O auffüllen

2 µl Premix (BigDye™, PE Applied Biosystems)

Dieser Ansatz wurde in einem Thermocycler bei folgendem Programm inkubiert:

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

Die Annealing-Temperatur wurde je nach Primer gewählt, für die Standard-Sequenzierprimer (T3, T7, M13 forward, M13 reverse) wurden 48°C eingestellt.

Nach der Reaktion wurde der Ansatz mit Na-Acetat und Ethanol gefällt (vgl. 3.3.8) und das Pellet in 25 µl TSR (Template Supression Reagent, PE Applied Biosystems) aufgenommen. Nach einer Inkubation von 2 min bei 90°C wurde der Ansatz gevortext, dann kurz zentrifugiert und anschließend in ein Sequenzier-Gefäß mit aufgesetztem Septum überführt.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Internet-Datenbanken abgeglichen, indem sie mit einem frei zugänglichen Online-Tool auf der NCBI Blast Home Page (<http://www.ncbi.nih.gov>) analysiert wurde.

Insertion von DNA-Fragmenten in Vektoren

Zur Insertion von DNA-Fragmenten wurde in einen gewählten Vektor die „multiple cloning site“ (MCS) mit Restriktionsenzymen geöffnet und die gewünschte DNA-Sequenz eingefügt. Bei Vektoren, die zur Expression dienen wie die der pEGFP-Familie, muss darauf geachtet werden, dass das Leseraster für das gewünschte Proteinprodukt passend ist.

3.2.10 Umklonierung mittels Restriktionsenzymen

DNA-Sequenzen, die in Vektoren vorhanden waren, konnten in Bakterien vermehrt und isoliert werden. Über Restriktionsenzyme konnte ein Bereich zwischen definierten Stellen geschnitten und über präparative DNA Gelelektrophorese gereinigt werden. Dieses Fragment konnte nun in einen Vektor eingefügt werden, der mit denselben Enzymen geöffnet wurde. Wurde ein Enzym für die Umklonierung verwendet, handelte es sich um eine ungerichtete Klonierung, bei der das Fragment in

zwei Orientierungen inserieren konnte. Wurden zwei verschiedene Enzyme verwendet, war nur eine Orientierung möglich, es handelte sich um eine gerichtete Klonierung.

Bei ungerichteter Klonierung wurde der Vektor dephosphoryliert, um eine Religation zu unterdrücken und die Insertion zu begünstigen. Für die Ligation wurde etwa 100 ng Vektor verwendet und etwa die dreifache Menge Insert.

3.2.11 Klonierung von PCR-Fragmenten

Über PCR amplifizierte DNA-Fragmente wurden entweder über Topo-TA Klonierung (Invitrogen) in den Vektor pCR®2.1-Topo inseriert oder über „blunt end“-Ligation bzw. nach Schneiden vorhandener Restriktionsschnittstellen in einen entsprechend vorbereiteten Vektor eingefügt.

Topo TA Klonierung:

Die Klonierungsmethode des *TOPO TA Cloning*® Kits (Invitrogen, Karlsruhe) macht sich die Tatsache zu Nutze, dass Taq- und Tfl-Polymerasen durch ihre terminale Transferase-Aktivität einen 3'-Überhang aus Desoxyadenosin an das PCR-Produkt anfügen. Der Vektor liegt im linearisierten 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 Ligase-Aktivität der Topoisomerase I wurde ein PCR-Produkt mit 3'-(A)-Überhang schnell in den Vektor integriert, wobei das Enzym dissoziiert. Das Prinzip ist in Abbildung 3.3 verdeutlicht.

Da PCR-Fragmente für Umklonierungen mit der Pfu-Polymerase amplifiziert wurden, die keine A-Überhänge erzeugt, wurden vor der Klonierung die Fragmente noch 10 min in einem Taq-Ansatz inkubiert.

„blunt end“ Ligation:

Fragmente, die mittels Pfu-Polymerase hergestellt wurden, besaßen glatte Enden und konnten nach Phosphorylierung der 5'-Enden in Vektoren mit glatten Enden eingefügt werden, die also zum Beispiel mit dem Restriktionsenzym *SmaI* geschnitten wurden.

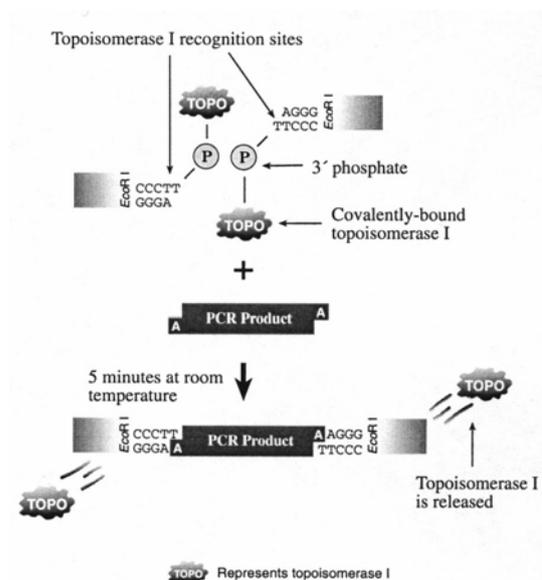


Abbildung 3.3: Schematischer Ablauf der Topo-Klonierung nach dem TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, Karlsruhe)

Ligation über Restriktionsschnittstellen

Für die Insertion eines Fragments mittels vorhandener Restriktionsschnittstellen, die entweder als Überhänge in den Primern enthalten waren oder bereits in der Sequenz der cDNA enthalten waren, wurde das gereinigte PCR-Produkt mit den entsprechenden Restriktionsfragmenten geschnitten und mit einem entsprechend vorbereiteten Vektor, d.h. der mit denselben Enzymen geschnitten wurde, ligiert.

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. Falls die Sequenz in eine Schnittstelle mit klebrigen Enden eingefügt werden soll, müssen beide einzelsträngige Oligonukleotide über den komplementären Bereich hinaus noch einen Überhang haben, der mit den Überhängen der Schnittstelle komplementär ist.

3.2.12 Deletion eines DNA-Bereichs durch Rundum-PCR

Um einen spezifischen Bereich aus einer DNA-Sequenz zu entfernen, die sich bereits in einem Vektor befand, wurde eine Pfu-PCR so durchgeführt, dass der 5'-Primer mit der ersten Base nach der gewünschten Lücke ansetzte und der 3'-Primer mit der letzten Base vor der Lücke abschloss. Das lineare PCR-Produkt enthielt folglich im Zentrum die Vektorsequenz und Außen jeweils einen Teil der inserierten DNA-Sequenz mit glatten Enden. Nach einem Verdau mit *DpnI*, das aufgrund seiner Spezifität für methylierte Schnittstellen nur die bakterielle DNA schneidet, die als Matrizie eingesetzt wurde, und nicht das PCR-Produkt, wurden diese glatten Enden phosphoryliert und ligiert.

3.2.13 Mutagenese einzelner Basen

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 Pfu-PCR mit dem Einsatz von 3'- und 5'-Primern, die denselben Bereich umschließen und im Zentrum die veränderten Basen besitzen. Nach *DpnI*-Verdau der Matrizen-DNA wurde das Produkt transformiert und die resultierenden Bakterienklone konnten auf die gewünschte Sequenz hin untersucht werden.

3.2.14 Transformation von Bakterien und Screening der Klone

Über die Transformation von Konstrukten in Ligationsansätzen und Vektoren in Bakterien (vgl. 3.1.5) konnten die Konstrukte vervielfältigt und für weitere Anwendungen wieder isoliert werden (vgl. 3.3.5).

Ligationen von Inserts in Vektoren lieferten unter Umständen verschiedene Produkte und es kam zu Religationen des eingesetzten Vektors. Die positiv selektierten Bakterien mussten also noch daraufhin überprüft werden, ob sie das richtige Konstrukt enthielten. Dies konnte über die Analyse von Restriktionsfragmenten oder spezifischer PCR-Produkte erfolgen. Eine abschließende Kontrolle positiv getesteter Klone auf die Richtigkeit der Sequenz konnte aber letztlich nur die Sequenzierung bieten (vgl. 3.3.9).

Restriktionsfragmentanalyse

Von den Bakterienklonen wurden Übernachtskulturen gepickt, die DNA präpariert und mit Enzymen geschnitten (vgl. 3.3.6), von deren spezifischer Fragmentlänge man auf die inserierte DNA-Sequenz und deren Orientierung schließen konnte.

Kolonie-PCR

Eine schnellere Möglichkeit die Insertion und Orientierung zu testen, war bei Vorhandensein geeigneter Primer die Kolonie-PCR. Hier wurde eine Pipettenspitze Bakterien einer Kolonie direkt von der Selektionsplatte mit einem halben Taq-Polymerase PCR-Ansatz (vgl. 3.3.3) vermischt und die PCR durchgeführt. Mit einem internen Primerpaar konnte überprüft werden, ob das gewünschte Fragment inseriert hat, und mit einem Primerpaar, von dem einer in der Vektorsequenz band und einer im Fragment, konnte überprüft werden, ob die Orientierung stimmte.

3.3 Expression rekombinanter Proteine 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. Für die Reinigung wurden zwei verschiedene Systeme eingesetzt, die auf der Fusion von sechs Histidin-Resten bzw. Glutathion S-Transferase (GST) an das gewünschte Protein basieren.

3.3.1 Expression von Fusionsproteinen in Bakterien

LB-Medium (vgl. 3.1.1)

Ampicillin (SL 50 mg/ml in ddH₂O)

IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactosid, Applichem; SL 1 M in H₂O)

Zur Expression wurde die codierende Sequenz des gewünschten Polypeptids in einen Expressionsvektor der pGEX- oder pET-Serie kloniert, wobei darauf zu achten war, das Leseraster einzuhalten. Die Expression des Fusionsproteins fand in *E. coli BL21-CodonPlus(DE3)-RIL* statt.

Von den Bakterien wird eine ÜNK hergestellt, mit der am folgenden Tag eine 100-200 ml Flüssigkultur angeimpft wird (vgl. 3.1.1). Die Kultur wurde bei 37°C geschüttelt und nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4-0,9 (nach ca. 4 h) wurde die Expression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Nach weiterer 4stündiger Inkubation wurde die Kultur auf 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und die Bakterien wurden bei 3000g für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen (flüssiger Autoklavierabfall) und die Pellets konnten gleich weiter verarbeitet oder bei -20°C gelagert werden.

3.3.2 GST-Reinigung

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

Lysispuffer pH 8,0

50 mM Tris/HCl

50 mM KCl

1% Triton X-100

1 mM DTT (Dithiothreitol; SL 200 mM)

1 mM PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride;
SL: 200 mM in Methanol)PBS pH 7,4

140 mM NaCl

6 mM KCl

6,4 mM Na₂HPO₄1,4 mM KH₂PO₄Gluthation Sepharose[®] 4B

(Amersham, 75 %ige Suspension in 20 % Ethanol)

8 M Harnstoff Puffer pH 8,0

50 mM Tris/HCl

50 mM KCl

8 M Harnstoff

1 mM DTT (Dithiothreitol; SL 200 mM)

1 mM PMSF (SL: 200 mM in Methanol)

Elutionspuffer pH 8,0

50 mM Tris/HCl

10 mM reduziertes Glutathion (Amersham)

Vorbereitung der Sepharose-Matrix:

Pro 50 ml Flüssigkultur wurden 100 µl Sepharose-Matrix eingesetzt. Dazu wurde die 1,33fache Menge der 75%igen Originalsuspension in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß abzentrifugiert (5 min, 500g, 4°C), der Ethanolüberstand vorsichtig abgenommen und die verbleibende Matrix zweimal in kaltem PBS gewaschen. Es wurde jeweils das 10fache Säulenvolumen PBS eingesetzt und die Matrix darin gut resuspendiert. Abschließend wurde 1 Säulenvolumen kaltes PBS zugegeben, um eine 50%ige Sepharose-Suspension zu erhalten. Diese wurde direkt für die Reinigung eingesetzt. Sie konnte etwa einen Monat bei 4°C gelagert werden.

Aufschluß der Bakterien:

Das Bakterienpellet wurde in 1/20 Volumen Ausgangskultur Lysispuffer 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 10000g (Sorvall Zentrifuge, HB-6 Rotor) und 4°C zentrifugiert. Wenn der Überstand das Fusionsprotein enthielt, was durch Western Blot (vgl. 3.7.2) nachgewiesen werden konnte, konnte er direkt für die Reinigung eingesetzt werden. Wenn sich um ein schwerlösliches Fusionsproteinen handelte, was bei strukturellen Proteinen oft der Fall ist, dann wurde das Pellet in Denaturierungspuffer aufgenommen, worin auch schwerlösliche Proteine in Lösung gehen. (Alternativ konnten die Bakterien direkt in Denaturierungspuffer aufgenommen werden.) Die Lösung wurde 20 min bei 10000g (Sorvall Zentrifuge, HB-6 Rotor) und 4°C zentrifugiert.

Reinigung nach der Batch-Methode:

Der Überstand mit dem Fusionsprotein wurde auf die vorbereitete Glutathion-Sepharose gegeben und 30 min bei RT auf einem Drehtisch inkubiert. Die Suspension wurde 5 min bei 500g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgten drei Waschschrte mit dem jeweils 10fachen Matrixvolumen eisgekühlten PBS bei jeweiligen Zentrifugationen von 5 min bei 500g und 4°C. Nun konnte das gebundene Fusionsprotein von der Matrix eluiert werden. Dazu wurde pro Elutionsschritt ein Matrixvolumen Elutionspuffer zugegeben, 10 min inkubiert und 5 min bei 500g und 4°C zentrifugiert. Dies wurde fünfmal wiederholt. Das gewonnene Protein konnte für weitere Versuche direkt eingesetzt werden, oft war aber ein Austausch des Puffers notwendig, der durch Dialyse erreicht werden konnte (vgl. 3.4.4).

3.3.3 His-Tag Reinigung (denaturierend)

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 gewaschen wurden. Es wurde immer die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, da sich alle Proteine als schwerlöslich erwiesen haben.

Puffer B - E:

8 M Harnstoff

0,1 M NaH₂PO₄

10 mM Tris/HCl

Puffer B pH 8,0

Puffer C pH 6,3

Puffer D pH 5,9

Puffer E pH 4,5

Die Bakterien, die das Protein exprimiert haben (vgl. 3.4.1), wurden in 5 ml Puffer B 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 10000g (Sorvall Zentrifuge, HB-6 Rotor) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die vorbereitete Säule gegeben (~1 ml Ni-NT Agarose pro 200 ml Flüssigkultur; mit Puffer B equilibriert). Der Durchlauf wurde aufbewahrt und die Säule wurde daraufhin mit dem 5fachen Säulenvolumen Puffer B und Puffer C gewaschen und anschließend dreimal mit 1 ml Puffer D und fünfmal mit 1 ml Puffer E eluiert. Über eine Western Blot Analyse (vgl. 3.7.2) wurde überprüft, in welchen Elutionsfraktionen sich die Proteine befanden. Zum weiteren Gebrauch konnten die Elutionsfraktionen direkt eingesetzt werden, oder sie wurden gegen den entsprechenden Puffer dialysiert (vgl. 3.4.4).

3.3.4 Dialyse

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 Puffer ausgetauscht werden sollte, bei leichtem Rühren inkubiert. Besser war es, öfter gegen kleinere Mengen des Puffers zu dialysieren (Nernst'sches Verteilungsgesetz).

3.4 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Proteine können spezifisch mit Antikörpern nachgewiesen werden. Im Wirbeltierorganismus werden diese von B-Lymphozyten zur Immunabwehr erzeugt. Dabei wird die Spezifität der produzierten Antikörper durch die klonale Selektion gewährleistet, d. h. jede Zelle produziert nur einen Antikörper gegen ein Antigen und wird durch den Kontakt mit dem Antigen zur Synthese und zur Proliferation angeregt.

Zu Forschungszwecken werden Tiere mit dem jeweiligen Antigen immunisiert, so dass eine Abwehrreaktion ausgelöst wird. Nach einer gewissen Zeit wird das Serum des Tieres gewonnen und kann direkt für immunologische Nachweismethoden, wie den Western Blot oder die Immunfluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden. Da viele B-Zellen Antikörper gegen verschiedene Bereiche des Peptids mit unterschiedlichen Affinitäten (und auch gegen andere Antigene) erzeugen, spricht man von polyklonalen Antikörpern. "Poly" bedeutet "viel". Der Begriff "Klon" wird für alle Nachkommen einer einzigen Zelle verwandt. Polyklonale Antikörper sind Nachkommen vieler B-Zellen. Eine weitere Möglichkeit ist die Gewinnung von B-Lymphozyten aus dem immunisierten Tier und anschließende Fusion mit Krebszellen. Ein Teil der resultierenden Hybridoma-Zellen sezerniert Antikörper gegen das gewünschte Antigen. Die Antikörper eines Hybridoma-Zellklons werden als monoklonale Antikörper bezeichnet. Der Hybridoma-Zellüberstand kann direkt zum Proteinnachweis eingesetzt werden.

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 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. 3.4). Anschließend wird das Serum zugegeben, die Antikörper binden an die jeweiligen Epitope, andere Bestandteile werden gewaschen und die Antikörper schließlich eluiert.

3.4.1 Kovalente Bindung eines Peptids an aktivierte CNBr-Sepharose

PBS (pH 7,4)

140 mM NaCl
6 mM KCl
6,4 mM Na₂HPO₄
1,4 mM KH₂PO₄

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 1 (pH 4):

100 mM Na-Acetat
500 mM NaCl
→ mit Essigsäure pH 4 einstellen

Waschpuffer 2:

PBS + 0,5% Triton

Waschpuffer 3:

PBS + 0,1% Triton

Waschpuffer 4:

PBS + 500 mM NaCl

Phosphatpuffer (pH 7,4):

10 mM Na₂HPO₄ mit 10 mM NaH₂PO₄ auffüllen,
bis der pH-Wert erreicht wird

Trennpuffer:

Phosphatpuffer (pH 7,4) + 3 M KSCN

Alle Lösungen wurden möglichst frisch angesetzt und bei 4°C gelagert.

Alle Zentrifugationen der Sepharose-Matrix wurden bei 500g und 4°C 5 min durchgeführt.

Jeweils 30 mg abgewogene aktivierte CNBr-Sepharose (Pulver) wurden in 1,5 ml Quellungspuffer resuspendiert. Nach 15 min Inkubationszeit bei RT wurde die Sepharose abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 1,5 ml Bindungspuffer aufgenommen. Nach 10minütiger Inkubation bei RT wurde erneut zentrifugiert, der Überstand abgenommen und zur Sepharose das gereinigte Fusionsprotein gegeben, das übernacht gegen Bindepuffer dialysiert wurde (vgl. 3.4.4). Dieser Ansatz wurde 2 h auf einem Drehtisch bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose-Matrix abzentrifugiert, dem Pellet 1,5 ml Absättigungspuffer hinzugefügt und weitere 2 h auf einem Drehtisch bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Sepharose gewaschen, so dass nur kovalent gebundene Peptide haften blieben. Dazu wurde das Pellet in 1 ml Bindungspuffer resuspendiert, zentrifugiert, in Waschpuffer 1 resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Daraufhin wurde die Matrix nacheinander in jeweils 1 ml Waschpuffer 2, Waschpuffer 3, Waschpuffer 4 gewaschen. Nun wurde 1 ml Trennpuffer zum Pellet hinzugefügt und ohne Verzögerung zentrifugiert. Anschließend wurde die Sepharose zweimal in 1 ml

PBS gewaschen und schließlich in 1 ml PBS aufgenommen, worin sie bei 4°C einige Wochen aufbewahrt werden konnte.

3.4.2 Bindung der Antikörper und Elution

PBS (pH 7,4; vgl. 3.5.1)

Neutralisationspuffer (pH 9,5):

1M Tris/HCl

Elutionspuffer (pH 2,5):

100 mM Glycin

Natrium-Azid (10%ige Stammlösung)

Die Sepharose-Matrix mit gebundenem Fusionsprotein wurde mit 1 ml PBS pro 30 mg eingewogenem CNBr-Sepharose-Pulver gewaschen. Daraufhin wurden 100 µl Serum pro 30 mg hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde 2 h auf einem Drehtisch bei RT inkubiert und anschließend abzentrifugiert. (Der Überstand konnte für eine Bindungskontrolle zum Vergleich aufbewahrt werden.) Das Sepharosepellet wurde drei mal mit PBS gewaschen, woraufhin die Antikörper von der Matrix eluiert wurden. 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 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Volumen Neutralisationspuffer neutralisiert. Dies wurde bis zu sechsmal wiederholt.

Die Elutionsfraktionen wurden 5 min bei 12000g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Bei späteren Einsatz der Elutionsfraktionen bei Immundetektionen sollte jeweils erneut eine Zentrifugation durchgeführt werden. Die ersten Elutionsfraktionen waren erfahrungsgemäß am aktivsten, da gegen Ende die Konzentration nachließ. Um die Antikörper haltbar zu machen, wurde den Elutionsfraktionen Natrium-Azid in einer Endkonzentration von 0,02% zugefügt.

3.5 Mikroskopische Methoden

3.5.1 Immunfluoreszenz Mikroskopie

PBS pH 7,4:

140 mM NaCl

6 mM KCl

6,4 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

1,4 mM KH₂PO₄

Fixierlösung pH 7,4

PBS + 2% PFA

Permeabilisierungslösung pH 7,4

PBS + 0,1% Triton™ X-100

Absättigungslösung pH 7,4

PBS + 0,1 M Glycin

PBT pH 7,4

PBS + 0,1% Tween® 20

+ 0,15% BSA (Sigma)

Antikörperlösungen pH 7,4

~ 1 - 5 µg/ml in PBS

Hoechst 33258 (10 µg/ml in PBS)

Moviol:

10 g Mowiol (Hoechst) in 40 ml KH₂PO₄-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.

Mit dieser Methode war es möglich durch geeignete Antikörper die Expression und die Lokalisation bestimmter Proteine in Kulturzellen oder auf Gefrierschnitten nachzuweisen.

Kulturzellen auf Deckgläschen oder Gefrierschnitte wurden 3 min in der Fixierlösung fixiert und anschließend für 5 min in der Permeabilisierungslösung inkubiert, um sie für die Antikörper zugänglich zu machen. Es musste hier und später unbedingt darauf geachtet werden, dass die Zellen bzw. Schnitte nicht austrocknen! Eine 10minütige Inkubation in der Absättigungslösung sollte restliches PFA neutralisieren, um eine spätere Fixierung von Antikörpern zu vermeiden. Durch eine zusätzliche Absättigung mit PBT für 30 min konnte eine Verminderung des Hintergrundsignals erreicht werden. Dann wurde der primäre Antikörper aufgetragen. Die Endkonzentration betrug je nach Güte des Antikörpers etwa 1 bis 5 µg/ml, wobei die tatsächlich eingesetzte Konzentration empirisch ermittelt wurde. Die Inkubationszeit dauerte etwa 15 bis 30 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 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.

Nach erneutem Waschen in PBS (15 min) wurde die Lösung um die Zellen bzw. Schnitte weitgehend abgesaugt (ohne die Schnitte austrocknen zu lassen!) und ein Tropfen Moviol aufgetragen. Nun wurde ein Deckgläschen vorsichtig aufgelegt, so dass keine Luftblasen über den Präparaten zu liegen kamen.

Das Moviol bettete die Präparate dauerhaft ein; es eignet sich für Immunfluoreszenzen, 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.

3.5.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

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

Einbettung:

2,5% Glutaraldehyd-Lösung pH 7,2

2,5% Glutaraldehyd

50 mM KCl

2,5 mM MgCl₂

50 mM Cacodylat

Cacodylat-Puffer

50 mM Cacodylat

OsO₄-Lösung:

2% OsO₄

50 mM Cacodylat

Uranylacetat-Lösung:

0,5% Uranylacetat in ddH₂O

Ethanolreihe:

50%, 70%, 90%, 96%, 100% Ethanol p.a.

Propylenoxid

Epon:

Dodecanylsuccinateanhydride

Methylnodicanhydride

Epon 812 (Glycidether 100)

DMP-30 (2,4,6 Triphenol)

Zur Einbettung mit guter Strukturhaltung wurden Gewebestückchen oder Zellen jeweils 30 min mit der Glutaraldehyd-Lösung fixiert, in Cacodylat-Puffer gewaschen und mit der OsO₄-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Proben mit Wasser gewaschen, über Nacht in wässriger, 0,5%iger Uranylacetat-Lösung inkubiert. Nach drei 5minütigen Waschrufen in Wasser wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 70%, 90%, 96%; eiskalt; je 5 min) dehydriert und dann je zweimal 10 min in Ethanol und Propylenoxid überführt. Dann wurden die Proben 4h 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.

Herstellung von Ultradünnschnitten und Mikroskopie

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.

Vorlokalisierung von transfizierten Zellen

Da bei manchen Konstrukten die Transfektionsraten sehr schlecht waren und bei der Elektronenmikroskopie nur eine begrenzte Anzahl an Zellen untersucht werden kann, wurden hier die Zellen vorlokalisiert. Dazu wurden Zellen auf CELLocate Deckgläschen (Eppendorf) ausgesät, in die ein nummeriertes Gitternetz eingraviert ist. Bei EGFP-Fusionsproteinen konnte man noch in lebendem Zustand bestimmte Zellen im Fluoreszenz-Mikroskop vorauswählen und nach der Flach-Einbettung den entsprechenden Abschnitt des Gitternetzes zutrimmen. Bei nicht-fluoreszierenden Proteinen wurde diese Vorauswahl nach einem Immunfluoreszenz-Protokoll (vgl. 3.5.1) durchgeführt.

Pre-embedding Immungold-Lokalisation

Um spezifische Epitope innerhalb von zellulären Strukturen lokalisieren zu können wurde Immungold-Lokalisation durchgeführt. Dazu wurden - von Geweben - auf Deckgläschen überführte Gefrierschnitte oder auf Deckgläschen gewachsenen transfizierte Zellen präpariert. Diese wurden wie für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie behandelt (vgl. 3.5.1), nur dass hier der primäre Antikörper in etwa der doppelten Konzentration eingesetzt wurde und dass der sekundäre Antikörper, der an kolloidale Goldpartikel gekoppelt war, bei RT 2 h oder bei 4°C über Nacht inkubiert wurde. Darauf folgten Fixierung und Flach-Einbettung (siehe oben) ohne Uranylacetat und mit verkürzter Nachkontrastierung.

3.5.3 FRAP: “Fluorescence Recovery After Photobleaching”

Die Methode „fluorescence recovery after photobleaching“, kurz FRAP, ist eine Möglichkeit, die Mobilität von Proteinen in lebenden Zellen zu untersuchen. Dafür wurden autofluoreszierende Fusions-Proteine in Kulturzellen exprimiert. In den lebenden Zellen wurde mit einem starken Laserstrahl ein punktförmiger Bereich belichtet, so dass die sich dort befindenden EGFP-Fusionsproteine irreversibel ausbleichten. Bei einer hohen Mobilität der Proteine sollte ein rascher Austausch stattfinden und die Fluoreszenz in diesem Bereich sich schnell wieder erholen. Handelte es sich um relativ immobile Proteine, sollte eine Erholung der Fluoreszenz langsam verlaufen, oder nur zum Teil stattfinden.

Für die Experimente wurden in COS-7 Zellen EGFP-Fusionsproteine von SYCP1 Konstrukten exprimiert und die Zellen in Lebend-Beobachtungskammern eingedeckelt. Innerhalb der folgenden 30-40 min bei RT wurde das FRAP mit einem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop der Firma Leica (TCS-SP) durchgeführt. Die Fluoreszenz der EGFP-Fusionsproteine wurde bei einer Wellenlänge von 488 nm (18 mW nominale Leistung, Pinhole = 1, x 40 Neofluar Ölimmersionsobjektiv, NA = 1,25) mit einem Argon Krypton Laser analysiert. Für das Bleichen wurde ein Laserstrahl mit maximaler Energie und einem Durchmesser von 1 µm eine Sekunde lang auf einen ausgewählten Bereich der Zelle gerichtet. Das Programm erlaubte eine quantitative Bestimmung der Fluoreszenz und deren Erholung. Dafür wurde die Zelle vor dem Laserstrahl („prebleach scan“) und nach dem Strahl in Intervallen von wenigen Sekunden mit jeweils geringer Laserenergie (4% der Bleichintensität) gemessen, wobei zu Beginn der Messung häufiger Bilder erfasst wurden und dann in zunehmenden Abständen. Die Erholung der Fluoreszenz relativ immobiler Proteine wurden 5 Minuten gemessen (jeweils 10 Bilder in Abständen von zuerst 5, anschließend 10 und schließlich 15 Sekunden) und die Erholung von sehr mobilen Proteinen 2,5 Minuten (jeweils 10 Bilder in Abständen von 3,1, dann 5,1 und schließlich 8,1 Sekunden). Die quantitativen Werte repräsentierten den Durchschnitt von zehn gemessenen Zellen.

Die FRAP-Kurven wurden nach Phair und Misteli (2000) mit Hintergrund-bereinigten Bildern bestimmt. Aufgrund der gemessenen und aufgezeichneten Fluoreszenz-Intensitätswerte konnte die relative Intensität nach folgender Formel berechnet werden:

$$I_{\text{rel}} = T_0 \cdot I_t / T_t \cdot I_0$$

T_0 = Fluoreszenz-Intensität des gesamten Zellvolumens vor dem Bleichpuls, korrigiert um den Hintergrundwert

T_t = Fluoreszenz-Intensität des gesamten Zellvolumens zum Zeitpunkt t, korrigiert um den Hintergrundwert

I_0 = Fluoreszenz-Intensität der Akkumulation vor dem Bleichpuls

I_t = Fluoreszenz-Intensität der Akkumulation zum Zeitpunkt t, korrigiert um den Hintergrundwert

Um die statistische Signifikanz der Ergebnisse zu bestimmen, wurde mithilfe des frei zugänglichen Online-Tool „QuickCalcs“ (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>) der ungepaarte Student's t-Test angewendet. Bei diesem Test werden die Mittelwerte der Erholung der Fluoreszenz zweier Gruppen verglichen. Dazu wurden zunächst mit dem Programm Excel von den zehn Messreihen jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung berechnet. Im Programm „QuickCalcs“ wurde unter (1.) das Datenformat „Enter mean, SD and N“ ausgewählt, unter (2.) die Werte der Messreihen eingegeben und unter (3.) der Test „Unpaired t test“ ausgewählt. Daraufhin konnte die Berechnung durchgeführt werden.

Als Ergebnis wurde der p-Wert („p-value“) angegeben. Dieser gibt die Wahrscheinlichkeit wieder, mit der die Mittelwerte zweier Gruppen von Proben der Anzahl n zufällig eine Differenz aufweisen, wenn die Mittelwerte der tatsächlichen Populationen der Werte, von denen die Proben genommen wurden, aber in Wirklichkeit gleich sind. Je kleiner der p-Wert ist, desto wahrscheinlicher ist das beobachtete Ergebnis. Ein p-Wert unter 0,05 wird als signifikant und ein p-Wert unter 0,01 als hochsignifikant bezeichnet. Diese Werte bedeuten, dass die beobachtete Differenz zu 95% bzw. 99% Sicherheit eine tatsächliche Differenz zugrunde liegt. (Im Umkehrschluss bedeutet das, dass von hundert Experimentatoren, deren Ergebnisse signifikant bzw. hochsignifikant sind, fünf bzw. einer falsch liegen.)

3.6 Proteinbiochemische Analysen

3.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Natrium-Dodecylsulfat (SDS, engl.: sodium dodecyl sulfate) ist ein Detergenz, das die Tertiärstruktur eines Proteins durch Einlagerung zerstört. Es wirkt also denaturierend; zusätzlich werden Disulfidbrücken durch Zugabe von β -Merkaptoethanol reduziert, so dass die Polypeptidketten linear vorliegen. Eine weitere Folge der SDS-Einlagerung ist die starke negative Ladung, die das Protein dadurch erhält. Die Eigenladung kann man dagegen vernachlässigen und deshalb werden die Moleküle bei einer Gelelektrophorese zur positiv geladenen Anode wandern und ausschließlich nach dem Molekulargewicht getrennt.

Zur Schärfung der Proteinbanden wird das Gel in Sammelgel und Trenngel unterteilt. Die Proteinlösung enthält Glycin und Cl^- -Ionen (Tris). 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 ($^+\text{NH}_3\text{-CH}_2\text{-CO}_2^-$), 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 ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}_2^-$), und eilt mit dem Cl^- voraus. Die Proteine laufen in Abhängigkeit ihrer Masse unterschiedlich schnell.

SDS-PAGE nach Laemmli (1970)

Es wurde nur SDS-PAGE nach Laemmli (1970) durchgeführt, dazu wurden Minigele mit dem „Mini V8“-Gelsystem der Firma Gibco BRL benutzt.

Lösung A:

30% Acrylamid (AA)

0,8% Bis-AA

Laufpuffer pH 8,8

50 mM Tris/HCl

380 mM Glycin

0,1% SDS

Lösung B (Trenngelpuffer):

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

SDS-Probenpuffer pH 6,8

10 mM Tris/HCL

Lösung D (Sammelgelpuffer):

0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

1% SDS

10% Glycerin

25 mM β -Merkaptoethanol

20% SDS (sodium dodecyl sulfate)

Spatelspitze Bromphenolblau

10% APS (Ammoniumpersulfat) in ddH₂O

TEMED

Trenngel	8%	10%	12%	15%	Sammelgel	5 %
Lösung A	2,5 ml	3,13 ml	3,75 ml	4,5 ml	Lösung A	1,5 ml
Lösung B	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	Lösung D	2,55 ml
20% SDS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	20% SDS	50 µl
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	10% APS	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	TEMED	10 µl
ddH ₂ O	2,35 ml	1,7 ml	1,05 ml	0,35 ml	ddH ₂ O	5,85 ml

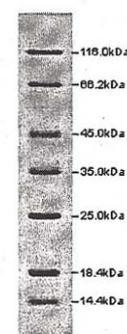
Tabelle 3.3: Pipettierschema für Tren- und Sammelgele der SDS-PAGE nach Laemmli

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 3.3). Darauf wurde das Sammelgel gegossen und mit einem Kamm dafür gesorgt, dass Aussparungen bleiben, wo die Proteinlösungen hineinpipettiert 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, die aus Geweben oder Zellen, Bakterien oder gereinigten Proteinfractionen stammten direkt in Probenpuffer aufgenommen oder zuerst gefällt. Die Proteine werden vor dem Beladen 5 min bei 92°C gekocht und kräftig gevortext. Als zusätzliche Spur wird ein Proteingrößenmarker (MBI) pipettiert (vgl. Tabelle 3.4 und Abbildung 3.4).

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 3.4: Zusammensetzung des Proteingrößenmarkers (MBI)



12% SDS-PAGE

Abbildung 3.4: Proteingrößenmarker (MBI)

Das Gel wird bei konstant bei 100 - 150 Volt auf Eis gefahren. Die Elektrophorese wird gestoppt, wenn das Bromphenolblau die untere Kante des Gels erreicht hat. Das Gel kann nun für Commassie-Blau Färbung oder die Western Blot Methode eingesetzt werden.

3.6.2 Commassie-Blau Färbung eines Proteingels

Commassie-Blau Färbelösung:

0,25% Brillant Blau R50

40% Methanol

8% Essigsäure

Entfärber-Lösung:

40% Methanol

8% Essigsäure

Das Gel wurde 1 - 2 h in der Färbelösung inkubiert und anschließend über Nacht in Entfärber gelegt. Commassie-Blau bindet spezifisch an Proteine. Das gefärbte Gel konnte auf einem Leuchtschirm fotografiert oder in eine Klarsichthülle eingepackt direkt eingescannt werden.

Trocknen von Acrylamid-Gelen

Um Acrylamid-Gele längere Zeit aufbewahren zu können, 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 entstanden. 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.

3.6.3 Western Blot

Anhand der Western Blot Methode ist es möglich, mithilfe von geeigneten Antikörpern in Proteingemischen die entsprechenden Proteine nachzuweisen. Die Proteinproben werden in einer SDS-PAGE (vgl. 3.7.1) 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 der primären Antikörper und kann durch ECL (*enhanced chemiluminescence*) visualisiert werden.

CAPS-Puffer pH 10:

50 mM CAPS

10% Methanol

Absättigungslösung pH 7,4 – 7,6:

TBST mit 10% Milch

Ponceau S (Sigma)

TBS pH 7,4:

150 mM NaCl

10 mM Tris/Cl

Antikörper-Lösungen:

prim. und sec. Ak in Absättigungs-Lösung

TBST pH 7,4:

TBS mit 0,1% Tween-20

ECL-Lösungen A und B

Transfer:

Das Gel wurde nach Abschluß der Elektrophorese aus den Glasplatten entnommen; das Sammelgel und die Agarose wurden entfernt und das Trenngel wurde in CAPS-Puffer äquilibriert. Die Membran und 18 Whatman-Papiere wurden auf Gelgröße zugeschnitten und ebenfalls in CAPS äquilibriert. Dann wurde der Blot, wie in Abbildung 3.5 dargestellt, aufgebaut. Geblottet wurde elektrisch in einer Graphit-Blotting-Kammer. Um eventuelle Luftblasen aus dem System zu entfernen, wurden die Whatman-Papiere zu je drei Stück aufgelegt und es wurde jeweils mit einem Zentrifugenröhrchen sanft darübergestrichen. Beim Gel wurden sichtbare Luftblasen mit angefeuchtetem Finger (behandschuht!) rausgestrichen, die Nitrozellulose wurde lediglich aufgelegt.

Die Kammer wurde nun an das Netzgerät angeschlossen und die Proteine 1 h bei einem mA pro cm² Membran transferiert. Die Spannung sollte sich auf etwa 12 V einstellen, lag sie deutlich darüber, so waren noch Luftblasen im Aufbau. Im Laufe des Transfers stieg die Spannung auf etwa 40 V.

Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran in ddH₂O gelegt und anschließend mit dem Farbstoff Ponceau-Rot eingefärbt. Dieser Farbstoff lagert sich über Salzbrücken an die Proteine. Durch Waschen mit ddH₂O wurde die Farbe auf Membran abgewaschen und blieb an den Proteinen haften. Man konnte daher den Transfer qualitativ beurteilen und auch fotografieren oder (in eine Klarsichtfolie eingepackt) direkt einscannen.

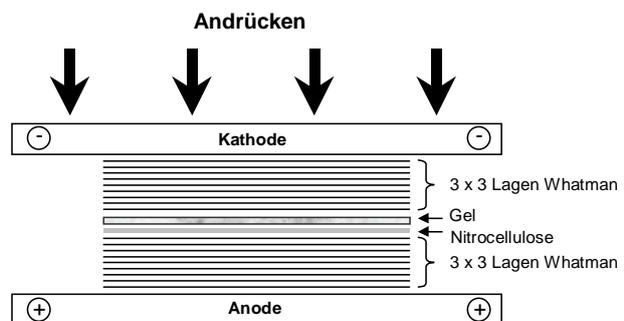


Abbildung. 3.5: Aufbau des Western Blots

Antikörperbindung:

Die Membran wurde in 10% Milchpulver in TBST (pH 7,4) 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 eine Stunde bei RT mit dem sekundären, an Peroxidase gekoppelten Antikörper inkubiert. Daraufhin wurde die Membran erneut in TBST zuerst kurz gespült und dann drei mal 10 min gewaschen.

Detektion:

Zur Detektion dienen die Peroxidase-Enzyme, die mit den sekundären Antikörpern an genau die Stellen der Membran gebunden haben, wo die primären Antikörper die Proteine erkannt hatten. Die Peroxidase vermittelt durch Spaltung von Peroxid eine RedOx.-Reaktion zwischen zwei Reagenzien, wobei Licht freigesetzt wird. Mit diesem Licht wurde ein Röntgenfilm belichtet, so dass an den Stellen der Peroxidase, also auch 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 inkubiert und sofort in eine Zellophanfolie verpackt. Dann wurde ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt und belichtet. Die Belichtungszeit hing von der Menge der vorliegenden Peroxidase ab und konnte zwischen wenigen Sekunden und einer Stunde variieren. Anschließend kam der Film für 3 min in einen Entwickler und nach kurzem Spülen in Wasser für 3 min in einen Fixierer. Der Film wurde wieder gewaschen und getrocknet. Die belichteten Stellen erschienen jetzt schwarz.

Strippen eines Western Blots

Strip-Puffer pH2,5

TBST (siehe oben)

0,1 M Glycin

Durch das Strippen werden die Antikörper von der Membran entfernt und es kann erneut eine Detektion spezifischer Proteine durch Antikörper durchgeführt werden.

Die Membran wurde mit TBST gewaschen und zwei mal 30 min im Strip-Puffer auf einem Wiegetisch inkubiert. Anschließend wurde die Membran gründlich mit TBST gewaschen und konnte dann für eine erneute Detektion von Proteinen abgesättigt werden.

4. Material

4.1 Biologisches Material

4.1.1 Tiere

Wistar Ratten (♂):

Die verwendeten männlichen Ratten waren vom Stamm Wistar und wurden über Charles River in Sulzfeld bezogen.

Balb/c Mäuse (♂):

Die verwendeten männlichen Mäuse waren vom Stamm Balb/c und wurden über Charles River in Sulzfeld bezogen.

4.1.2 Zelllinien

COS-7 Zellen

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

4.1.3 Bakterienstämme

TOP10 One Shot[®] kompetente Zellen:

Zur Transformation von in den pCR[®]2.1-TOPO Vektor klonierten PCR-Produkten wurden die im Kit (Invitrogen) enthaltenen *TOP10 One Shot[®]* kompetenten Zellen verwendet.

Epicurian coli XL1-Blue:

Zur Vermehrung von Plasmidvektoren wurde der Bakterienstamm *Epicurian coli XL1-Blue* der Firma Stratagene eingesetzt.

E. coli BL21 CodonPlus[™](DE3)-RIL:

Der *E. coli BL21 CodonPlus[™](DE3)-RIL* Bakterienstamm von der Firma Stratagene wurde für die Expression von GST-Fusionsproteinen und Proteinen mit His-Tag (vgl. 3.4 und 4.5.3). Dieser Stamm eignet sich besonders für die bakterielle Expression und Reinigung von Proteinen, da er ein Plasmid enthält, das zusätzliche tRNAs codiert, und da er weniger Proteasen exprimiert.

4.2 Geräte

Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank	MWG-BIOTECH, München
Digitalkamera PixelFly	PCO, Kelheim
Drehtisch Reax 2	Heidolph, über Hartenstein, Würzburg
Drystar Gelrockner	H. Hölzel GmbH über Hartenstein, Würzburg
Elutriator: 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, Heidelberg
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
Laborwaage Mettler PJ 3600 DeltaRange®	Mettler, Düsseldorf
Magnetrührer M35	GLW, Würzburg
pH-Meter pH 523	WTW, über Hartenstein, Würzburg
Proteingelkammer Mini V8	Gibco BRL, Eggenstein
Sonifier B12	Branson Sonic Power Company
Stabilisiertes Netzgerät 250 V 1 A	Dipl. Ing. L. Fischer, Heidelberg
The Denley Mixer A257, Multi Axle Rotator	über Hartenstein, Würzburg
Thermocycler TECHNE PROGENE	über Thermo-Dux, Wertheim
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Transmissionselektronenmikroskop Zeiss EM10	Zeiss, Oberkochen
Ultrazentrifuge L7-80	Beckman, München
Umkehrmikroskop Labovert	Leitz, Wetzlar
UV-Stratalinker 1800	Stratagene, Heidelberg
Vortex L24	GLW, Würzburg
Wasserbad	Köttermann, über Hartenstein, Würzburg

4.3 Computerprogramme

Adobe Photoshop
EasyControl Version 2.15 (PCO, Kelheim)
Mikrosoft Office Excell
Mikrosoft Office Powerpoint
Mikrosoft Office Word

4.4 Molekularbiologisches Material

4.4.1 Plasmidvektoren

pCR[®]2.1-TOPO:

Dieser Vektor ist Teil des *Topo TA Cloning[®] Kits* der Firma Invitrogen (Karlsruhe) 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 eine Blau/Weiß-Selektion zu erleichterten Auffinden positiver Klone. Daneben enthält er die Promotor-Sequenz für die T7-RNA-Polymerase, was die Herstellung von RNA-Sonden ermöglicht.

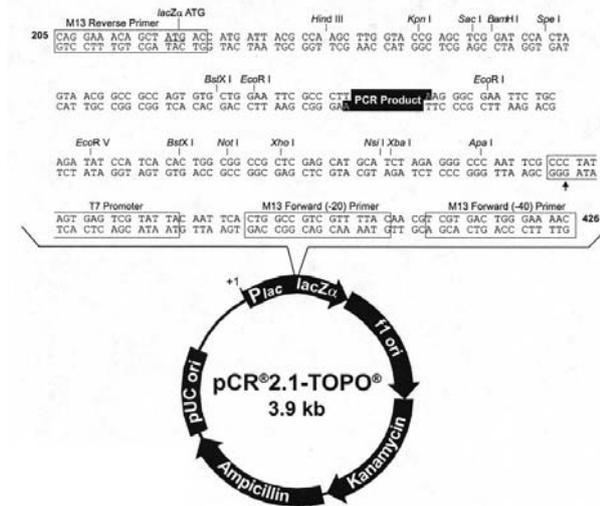


Abbildung 4.1: Der Vektor pCR[®]2.1-TOPO

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 mit oder ohne EGFP-Fusion benutzt, was der CMV-Promotor in N-Vektoren vor der MCS und in C-Vektoren hinter der EGFP Sequenz ermöglicht. Der Vektor besitzt eine Kanamycin-Resistenz.

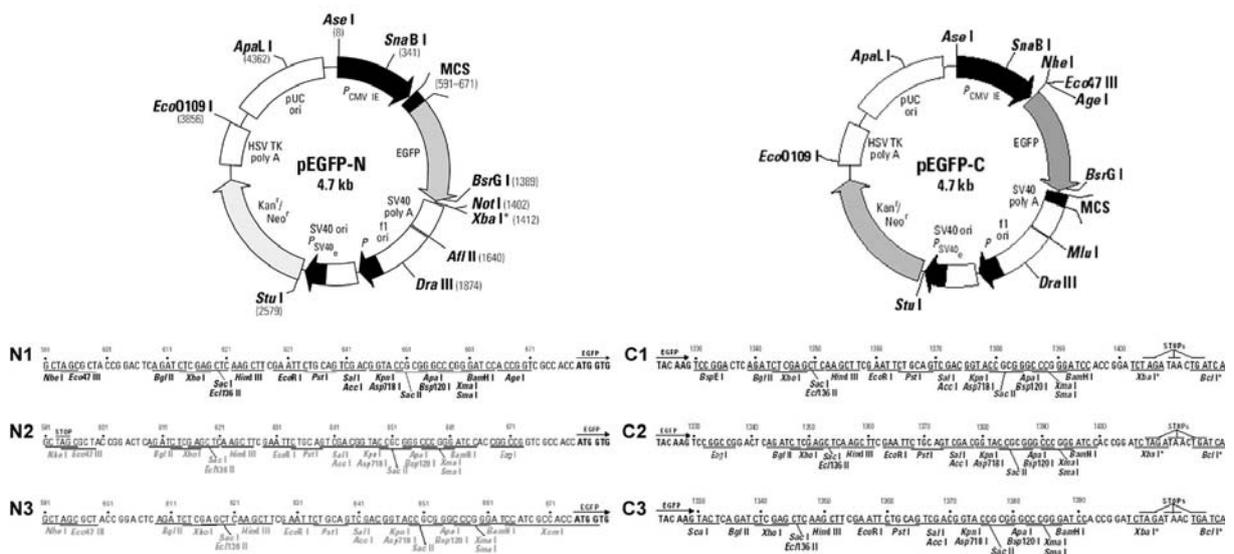


Abbildung 4.2: Die Vektoren der EGFP-Familie

pGEX-5X-1

Dieser Vektor der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) ist Teil eines Expressions-Systems. Die inklonierte cDNA wird als Fusionsprotein exprimiert, an das N-terminal Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert ist, ein Enzym, das aus *Shistosoma japonicum* stammt. Über den GST-Anteil ist eine Aufreinigung des Fusionsproteins möglich.

Der Vektor vermittelt eine Ampicillin-resistenz.

pET-21a

Der Vektor pET-21a (Novagen, Darmstadt) wurde verwendet, um Proteine mit His-Tag in Bakterien zu exprimieren und anschließend mit Ni-NTA Agarose zu reinigen. Der Vektor beinhaltet eine Ampicillin-Resistenz.

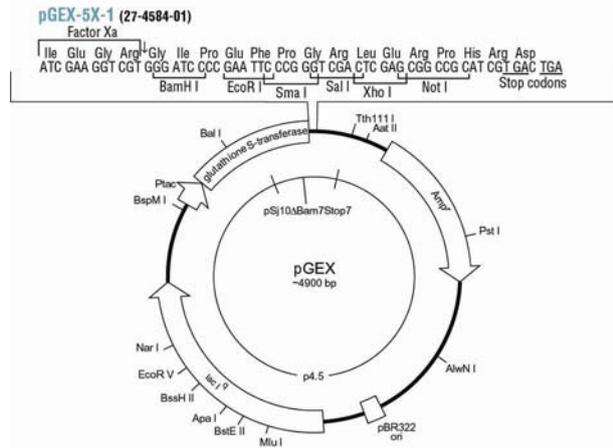


Abbildung 4.3: Der Vektor pGEX-5X-1

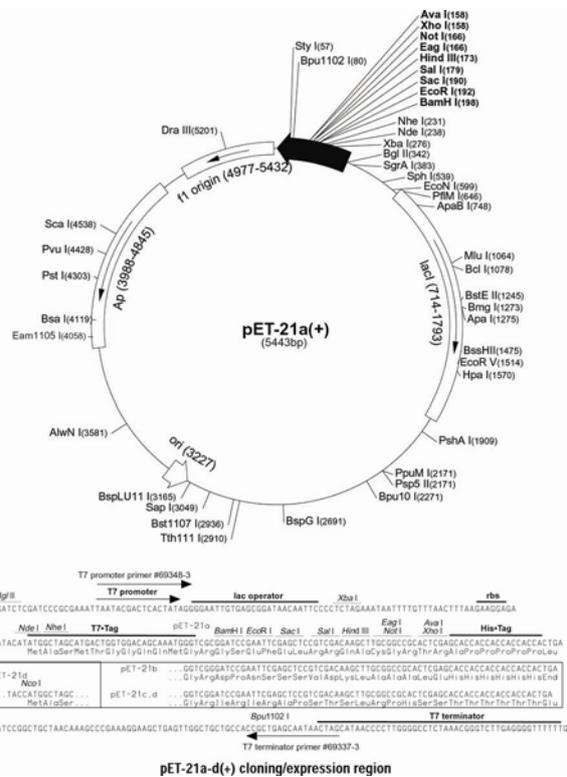


Abbildung 4.4: Der Vektor pET-21a

4.4.2 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.

4.4.3 Kits und Einzelkomponenten

Arbeiten mit rekombinanter DNA

peqGOLD Trifast™ (PeqLab, Erlangen)

Mithilfe dieser Lösung lassen sich RNA, DNA und Protein aus Zellen und Geweben isolieren.

Superscript™ One-Step RT-PCR for Long Templates (Invitrogen, Karlsruhe)

Dieses Kit wurde verwendet, um cDNA aus isolierter RNA zu gewinnen.

E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab, Erlangen)

Dieses Kit wurde für die Isolation von Plasmid DNA aus Bakterien verwendet.

QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden)

Dieses Kit wurde für die Reinigung von DNA aus Agarosegelen eingesetzt.

TOPO®- und Original TA Cloning Kit (Invitrogen Karlsruhe)

Mit diesem Kit konnten PCR Produkte effektiv kloniert werden.

Bulk GST Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Dieses Kit wurde für die Reinigung von bakteriell exprimierten GST-Fusionsproteinen eingesetzt.

Reinigung rekombinanter Proteine

aktivierte CNBr-Sepharose (Sigma, München)

An die aktivierten Stellen dieser Sepharose konnten Peptide kovalent verknüpft werden. Die auf diese Weise modifizierte Sepharose kann in Form einer Säule oder im Patchverfahren zur Affinitäts-Reinigung eingesetzt werden.

Nickel NTA Agarose (Qiagen, Hilden)

Diese Agarose wurde für die Reinigung von bakteriell exprimierten Proteinen mit His-Tag eingesetzt.

4.4.4 Chemikalien

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

4.4.5 Primer

Alle Primer wurden von den Firmen ThermoHybaid (Ulm), Biomers (Ulm) oder Invitrogen (Karlsruhe) bestellt.

Die Primer von SYCP1, Syce1 und Cesc1 sind entsprechend ihrer Anordnung entlang der veröffentlichten cDNA von 5' nach 3' aufgelistet. Die hier hinter dem Namen in Klammer angegebene Zahl gibt jeweils die Position der ersten Base (5') des Primers in der veröffentlichten Sequenz von SYCP1 (Meuwissen *et al.*, 1992; NM_012810) an. Wie von Sage und Kollegen (1995) veröffentlicht, fehlen in dieser Veröffentlichung zwei Cytosin-Reste, eines kurz vor dem Startcodon zwischen Base 106 und 107 und das andere zwischen Base 126 und 127, es vervollständigt das Codon für die sechste Aminosäure (Prolin). Trotz dieser zusätzlichen Basen werden alle Positionen wie in NM_012810 gezählt. Falls in Primern gezielte Mutationen enthalten sind, wie die Einführung einer Schnittstelle, oder 5'-Überhängen, wie z.B. ATG, wurde dies auch in der Klammer angegeben. Die Primer von Syce1 bzw. Cesc1 wurden aufgrund der in Pubmed veröffentlichten Sequenzen konzipiert (AK_016694 bzw. NM_027954).

Name (ab Base; Mutationen)	Sequenz	5'-3'
SYCP1		
SCP1pos605' (60)	CGATGTCTTCATAAAGAAGCGCTCG	5'
SCP1 5'XhoI (75; 85c→g)	GAAGCGCTCGAGGGCACGGAG	5'
SCP1-start (104; Δc106/7)	CGGGCCATGGAGAAGCAGAAG	5'
SCP1_NdeI-ATG (110; 5'-CAT)	CATATGGAGAAGCAGAAGCCCTTCA	5'
SCP1_468-3' (468)	CCACTTTTTTATCTTTTCAGCCTCTTTATACAGC	3'
SCP1_469-5'_KozakATG (469; 5'-GCCGCCACCATG)	GCCGCCACCATGAAAGTGAGCATAGAGTCTGAACTGA	5'
SCP1_655-5' (655)	TGGTGTAAATTTACTCAAGGAAACCTGTG	5'
SCP1_ATG-655-5' (655; 5'-GCCACCATG)	GCCACCATGTGGTGTAAATTTACTCAAGGAAAC	5'
SCP1-seq_d (673)	GTCTGGTTTCTTCTCGCTCATATTC	3'
SCP1-seq_e (934)	TTTGGATCAATAGTAGTGATACCTGG	3'
SCP1-seq_f (1240)	CCACAAGTGAGTGAGTAGTTTTAGC	3'
SCP1-1800bp5' (1315)	GAGGATCAACTGAACTGATTACTATGGAG	5'
SCP1pos16003' (1497)	CCCTTGTAATTCTTCAGCAAGCTTCTC	3'
SCP1-seq_c (1876)	CATCTCCTTGCTGTATGAACTCTTTTC	3'
SCP1-1000bp5' (2100)	GGTCAATAAATTAGAGTTGGAATTAGCAAG	5'
SCP1-seq_b (2169)	CTGGTAGTTGTTAATCATTTCTTCAA	3'
SCP1_h (2444)	GAAACGAACTTGATCCCTTAAGAAGC	5'
SCP1 2517-3' (2517)	TTGTTCCATTTTTAATTTCTTTTTCTTC	3'
SCP1 2517-3'KpnI (2517; 2529-KpnI)	AGCTGTGGTACCTTGTTCCATTTTTAATTTCTC	3'
SCP1_i (2529)	GCTGTGTTTTCTTGTTCCATTTTTAATTTCTC	3'

SCP1_2565stop (2565; 5'-CTA)	CTATGCCTGTATTTTCTTGTCTTTTTTATCTG	3'
SCP1-seq_g (2630)	CCATTGATGAGGAAAGCCG	3'
SCP1_2812-5' (2812)	AAAAAGAGAAAAACTGTCTTTGAATTTGATG	5'
SCP1_2847stop (2847; 5'-CTTA)	CTTAATTAACATCAAATTCAAAGACAGTTT	3'
SCP1-pepklon5' (2872)	CTTTGAGCTTGGTTTCAGAGGAAGA	5'
SCP1-seq_a (2897)	TCTTCCTCTGAAACCAAGCTC	3'
SCP1_3098-3' (3098)	GTAAATAACTTTTCTGCTTCCTTTAGTCTTC	3'
SCP1-3'KpnI (3102; 3114-KpnI)	GATTTTGGTACCTTAAGTAAATAACTTTTCTGCTTC	3'
SCP1_3'nt (3179)	TCCTCAGTAAAGTTTGGCTCTCTGGG	3'
Für myc-tag-annealing mit EcoRI-Überhängen		
SCP1_402myc 5'	AATTCAGAACA AAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG	5'
SCP1_402myc 3'	AATTCAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTCTG	3'
Syc1		
P11_41-5' (41)	ATGGCCACCAGACCGCA	5'
P11_1030-3' (1030)	TTAGGTCCTGCTTGATGGGCG	3'
Ces1		
P8_130-5' (130)	ATGGAGCGCCACGGAGTG	5'
P8_645-3' (645)	TCAGCATTACCATCTTTGTAATTCT	3'

Tabelle 4.1: Primer

4.5 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 eukaryotischen Zellen zu exprimieren. In diesem Kapitel wird die Klonierung aller Konstrukte erklärt, die für diese Arbeit nötig waren. Die dazu notwendigen Methoden werden im Kapitel 3.3 erklärt. Alle Vektorkarten sind unter 4.4.1 und alle Primer unter 4.4.5 aufgeführt.

4.5.1 SYCP1 Konstrukte zur Proteinexpression in eukaryotischen Zellen

Für die Expression von SYCP1 und ausgewählten Mutanten mit oder ohne EGFP-Fusion in eukaryotischen Zellen wurde die entsprechende cDNA in die multiple Klonierungsstelle (MCS) der pEGFP-Vektoren (Clontech, Heidelberg) inseriert. Diese besitzen einen CMV-Promotor, der konstitutiv in eukaryotischen Zellen exprimiert wird. Dabei liegt die MCS in pEGFP-N Vektoren vor dem ORF von EGFP und in pEGFP-C Vektoren dahinter. Wenn man also eine mit einem Startcodon beginnende cDNA, die mit einem Stopcodon endet, in einen N-Vektor kloniert, wird das entsprechende Protein ohne Fusion exprimiert. Fehlt in diesem Fall das Stopcodon, dann ist EGFP an den C-Terminus fusioniert. Kloniert man die cDNA, die nun kein Startcodon benötigt, in einen C-Vektor, ist das EGFP an den N-Terminus des Proteins fusioniert. Natürlich muss man im Fall der Konstruktion von Fusionsproteinen darauf achten, dass das Leseraster eingehalten wird.

Die klonierten Konstrukte wurden über Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

SCP1_84/3102(1) in pEGFP-N3

Protein-Produkt: wtSYCP1

Die Sequenz zwischen Base 84 und 3102 wurde in einer PCR mit Primern amplifiziert, die 5' eine *XhoI*- und 3' eine *KpnI*-Schnittstelle enthielten (SCP1_5'*XhoI*; SCP1_3'*KpnI*). Nach dem Verdau des gereinigten PCR-Produkts mit diesen Enzymen wurde das Fragment in den Vektor pEGFP-N3 inseriert, das mit ebenso mit den Enzymen *XhoI*- und *KpnI* geöffnet wurde.

SCP1s_ΔTGA(5) in pEGFP-C3

Protein-Produkt: EGFP-SYCP1

Die Sequenz zwischen Base 104 und 3102 wurde aus SYCP1(11) amplifiziert und erneut in pCR®2.1-Topo kloniert, da das ATG bei Base 60 der SYCP1 cDNA sich bei einer Umklonierung störend auf die Expression ausgewirkt hätte. Von hier wurde die Sequenz mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *BamHI* in den Vektor pEGFP-C3 umkloniert. Da sich herausstellte, dass sich in dem mitklonierten Bereich der MCS von pCR®2.1-Topo ein Stoppcodon zwischen EGFP und SYCP1 im Leseraster befand, wurde dieses Konstrukt noch einmal mit *EcoRV* und *XhoI* geschnitten, die *XhoI*-Schnittstelle am Vektor aufgefüllt und das gereinigte *EcoRV/EcoRV*-Fragment wieder eingefügt. So konnte der Bereich der MCS des Topo-Vektors zwischen der *EcoRV* und der *XhoI*-Schnittstelle entfernt werden.

SCP1_402myc(2) in pEGFP-N3**Protein-Produkt: mycSYCP1**

Es wurde ein einzelsträngiges Oligonukleotid bestellt, das für das myc-Epitop codiert und einen 5'-Überhang mit AATTCA aufweist. Zusätzlich wurde ein Oligonukleotid bestellt, das zum ersten bis auf das AATT komplementär ist, selbst aber auch einen AATT-Überhang am 5'-Ende besitzt (SCP1_402myc5' und SCP1_402myc3'). Diese wurden durch einen Annealingprozess zusammengelagert und in einem Ligationsansatz in das mit *EcoRI* geöffnete Konstrukt „SCP1_84/3102 in pEGFP-N3“ inseriert.

SCP1_Δ1473/2203 in pEGFP-C3**Protein-Produkt: EGFP-SYCP1_Δ457-699**

Zur Klonierung dieses Konstrukts wurde der Bereich zwischen den *HindIII*-Schnittstellen bei den Basen 1474 und 2203 deletiert. Dazu wurde wegen einer zusätzlichen *HindIII*-Schnittstelle bei Base 585 die Sequenz zwischen 1346 und 3102 mit *SacI* und *KpnI* in den Vektor pEGFP-N3 umkloniert. Dieses Konstrukt wurde mit *HindIII* geschnitten und das größere Fragment, das die Vektorsequenz enthielt, gereinigt und wieder religiert. Daraufhin wurde der Bereich zwischen 1346 und 3102, der jetzt die Deletion beinhaltete, in den mit *SacI* und *KpnI* geöffneten Vektor „SCP1s_ΔTGA(5) in pEGFP-C3“ (EGFP-SYCP1) umkloniert.

SCP1_2x1743/2203 in pEGFP-C3**Protein-Produkt: EGFP-SYCP1_2x457-699**

Das Konstrukt mit der Sequenz zwischen 1346 und 3102 in pEGFP-N3 mit *SacI* und *KpnI* umkloniert (siehe oben) wurde mit *HindIII* an den Stellen 1474 und 2203 geöffnet. Das gewonnene kurze Fragment von 1474 bis 2203 wurde 3 min vorligiert und in das dephosphorylierte größere Fragment, das die Vektorsequenz enthielt, inseriert. Daraufhin wurden die erhaltenen Klone auf eine Doppelinsertion mit richtiger Orientierung getestet. Aus dem erhaltenem Klon konnte der Bereich zwischen 1346 und 3102, der jetzt die Duplikation beinhaltete, in den mit *SacI* und *KpnI* geöffneten Vektor „SCP1s_ΔTGA(5) in pEGFP-C3“ (EGFP-SYCP1) umkloniert werden.

SCP1_ATG469/3102(1) in pEGFP-N3 Protein-Produkt: SYCP1_Δ2-120

Die Sequenz von SYCP1 zwischen Base 469 und 3102 wurde mit einem 5'-Primer, der einen Überhang von ATG und einer Kozak-Sequenz enthielt (SCP1_469-5'_KozakATG), und einem 3'-Primer mit *KpnI*-Überhang (SCP1-3'_*KpnI*) amplifiziert, das PCR-Produkt in den Vektor pCR®2.1-Topo kloniert und aus diesem Vektor mit den Enzymen *EcoRI* und *KpnI* gerichtet in den Vektor pEGFP-N3 umkloniert.

SCP1_ATG469/3102(24) in pEGFP-C2**Protein-Produkt: EGFP-SYCP1_Δ2-120**

Die SYCP1 cDNA von Base 469 bis 3102 mit einem 5'-Überhang mit Kozak-Sequenz und ATG und 3'-*KpnI*-Überhang in pCR®2.1-Topo (siehe oben) wurde mit den Enzymen *EcoRI* und *KpnI* gerichtet in den Vektor pEGFP-N2 umkloniert.

SCP1_Δ469/654(1) in pEGFP-N3**Protein-Produkt: SYCP1_Δ121-182**

Die Deletion der Basen von 469 bis 654 wurde mittels einer PCR mit den Primern SCP1_655-5' und SCP1_468-3' auf dem Template „SCP1_84/3102(1) in pEGFP-N3“ und anschließender Ligation des PCR-Produkts verwirklicht.

SCP1_ATG655/3102(11) in pEGFP-N2**Protein-Produkt: SYCP1_Δ2-182**

Mit den Primern SCP1_ATG-655-5' und SCP1-3'KpnI, die die Sequenz zwischen Base 655 und 3102 umschließen und bei der Amplifikation das PCR-Produkt mit einem 5'ATG- und einem 3'KpnI-Überhang versehen, wurde eine PCR durchgeführt und das Produkt „blunt end“ in den mit *SmaI* geöffneten Vektor pEGFP-N2 eingefügt.

SCP1_84/468(8) in pEGFP-N2**Protein-Produkt: SYCP1_1-120-EGFP**

Die SYCP1 cDNA-Sequenz von Base 84 bis 468 wurde mit den Primern SCP1_5'XhoI und SCP1_468-3' in einer PCR amplifiziert und das Produkt „blunt-end“ in den mit *SmaI* geöffneten Vektor pEGFP-N2 inseriert.

SCP1A_2847stop(3) in pEGFP-N3**Protein-Produkt: mycSYCP1_Δ914-997**

Die Sequenz zwischen Base 84 und 2847 mit den Primern SCP1_5'XhoI und SCP1_2847stop3' mit einem 5'XhoI- und einem 3'TAAG-Überhang amplifiziert und das PCR-Produkt in den Vektor pCR@2.1-Topo kloniert. Von dort wurde der Bereich zwischen der *SacI* Schnittstelle bei Base 1346 der SYCP1 cDNA und der *BamHI* Schnittstelle des Vektors mit den Enzymen *SacI* und *BamHI* in den mit diesen Enzymen geöffneten Vektor für die mycSYCP1 Expression „SCP1_402myc(2) in pEGFP-N3“ umklont.

SCP1A_2565stop(1) in pEGFP-N3**Protein-Produkt: mycSYCP1_Δ820-997**

Für diesen Klon wurde die Sequenz zwischen Base 84 und 2565 mit den Primern SCP1_5'XhoI und SCP1_2565stop3' mit einem 5'XhoI- und einem 3'TAG-Überhang amplifiziert und das PCR-Produkt in den Vektor pCR@2.1-Topo kloniert. Von dort wurde der Bereich zwischen 1346 der SYCP1 cDNA und der *BamHI* Schnittstelle des Vektors mit den Enzymen *SacI* und *BamHI* in den mit diesen Enzymen geöffneten Vektor für die mycSYCP1 Expression „SCP1_402myc(2) in pEGFP-N3“ umklont.

SCP1_2565stop(3) in pEGFP-C3**Protein-Produkt: EGFP-SYCP1_Δ820-997**

Aus dem Vektor pCR@2.1-Topo, in den die SYCP1 cDNA von 84 bis 2565 mit einem 5'XhoI- und einem 3'TAG-Überhang (siehe oben) wurde der Bereich zwischen der *EcoRV*-Schnittstelle bei Base 1752 der SYCP1 cDNA und der *BamHI*-Schnittstelle des Vektors herausgeschnitten und in den mit diesen Enzymen geöffneten Vektor für die EGFP-SYCP1 Expression „SCP1s_ΔTGA(5) in pEGFP-C3“ kloniert.

4.5.2 Syce1 und Cesc1 Konstrukte zur Expression in eukaryotischen Zellen

Für die Expression von Syce1 und Cesc1 mit oder ohne EGFP-Fusion in eukaryotischen Zellen wurde die entsprechende cDNA in die multiple Klonierungsstelle (MCS) der pEGFP-Vektoren (Clontech, Heidelberg) inseriert, die einen CMV-Promotor haben. Die in den Vektor pGEX-4T-1 inserierten cDNAs von Syce1 und Cesc1, die Ausgangspunkt für die Klonierungen waren, wurden von der Arbeitsgruppe Cooke, Edinburgh, zur Verfügung gestellt. Dies war im Fall der cDNA von Syce1 die Sequenz von Base 44 bis 1030 der veröffentlichten Sequenz (AK_016694) und für die cDNA von Cesc1 (NM_027954) die Sequenz von Base 133 bis 645.

Syce1(10) in pEGFP-N2

Protein-Produkt: Syce1

Die Region der cDNA von Syce1 mit der vollständigen kodierenden Sequenz vom ATG bei Base 41-43 bis zum Stopcodon bei Base 1028-1030 wurde mittels PCR mit den Primern P11_41-5' und P11_1030-3' amplifiziert und „blunt end“ in den mit dem Enzym *Eco47III* geöffneten Vektor pEGFP-N2 inseriert.

Syce1(1) in pEGFP-C2

Protein-Produkt: EGFP-Syce1

Die Sequenz von Base 41 bis 1030 wurde mittels PCR mit den Primern P11_41-5' und P11_1030-3' amplifiziert und „blunt end“ in den mit dem Enzym *SmaI* geöffneten Vektor pEGFP-C2 inseriert.

Cesc1(22) in pEGFP-N1

Protein-Produkt: Cesc1

Die cDNA von Cesc1 mit der vollständigen kodierenden Sequenz vom Startcodon bei Base 130-132 einschließlich des Stopcodons bei Base 643-645 wurde mittels PCR mit den Primern P8_30-5' und P8_645-3' amplifiziert und „blunt end“ in den mit dem Enzym *SmaI* geöffneten Vektor pEGFP-N1 inseriert.

Cesc1(1) in pEGFP-C2

Protein-Produkt: EGFP-Cesc11

Die Sequenz einschließlich von Base 130 bis 645 wurde aus dem Konstrukt „Cesc1(22) in pEGFP-N1“ mit den Enzymen *BamHI* und *KpnI* ausgeschnitten und mit in den mit diesen Enzymen geöffneten Vektor pEGFP-C2 inseriert.

4.5.3 SYCP1 Konstrukte zur Proteinexpression in Bakterien

SCP1pk in pGEX-5x-1

Protein-Produkt: GST-SYCP1_922-997

Die Sequenz von Base 2872 bis 3179 wurde mit den Primern SCP1-pepklon5' und SCP1-3' ntr amplifiziert, in den Vektor pCR®2.1-Topo inseriert und anschließend mit *EcoRI* in den Vektor pGEX-5x-1 umkloniert.

SCP1_pk3098 in pET-21a**Protein-Produkt: T7-SYCP1_922-997-6xHis**

Die Sequenz von Base 2872 bis 3098 wurde mit den Primern SCP1-pepklon5' und SCP1_3098-3' amplifiziert, in den Vektor pCR®2.1-Topo inseriert und anschließend mit EcoRI in den Vektor pET-21a (Novagen, Darmstadt) umkloniert. Damit konnte das Leseraster an beiden Seiten 5' zum T7-Tag und 3' zum His-Tag hin eingehalten werden.

4.6 Antikörper

4.6.1 rabbit α -SYCP1-C

Um einen spezifischen polyklonalen Antikörper gegen den C-Terminus von SYCP1 der Ratte zu gewinnen wurde das Fusionsprotein GST-SYCP1_922-997 in Bakterien exprimiert und über Gluthation-Sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg) gereinigt (vgl. 3.4.2). Dieses Peptid wurde zur Firma SEQLAB (Göttingen) eingesandt, wo damit ein Kaninchen immunisiert wurde. Die von der Firma gesendeten Serumproben wurden auf ihre Spezifität überprüft, indem Immunfärbungen auf Gefrierschnitten von Rattenhoden durchgeführt wurden. Die dritte Blutung zeigte eine deutliche Färbung fadenförmiger Strukturen in Spermatocytenkernen, die erfahrungsgemäß den Synaptonemalkomplexen entsprechen.

Da das Serum jedoch auch eine deutliche Hintergrundfärbung erzeugte, wurde für den Einsatz des Antikörpers eine Affinitätsreinigung mit einem His-Tag markierten Peptid der letzten 78 AS (SCP1_pk3098 in pET-21a) durchgeführt (vgl. 3.4.3 und 3.5).

Der affinitätsgereinigte Antikörper konnte in Immunfluoreszenz-Mikroskopie auf Gefrierschnitten von Ratten- und Maushoden und auf mit SYCP1 transfizierten Zellen eingesetzt werden, die bis zu 10 min mit 2% Formaldehyd fixiert waren. Je nach Qualität der Aufreinigung wurden die affinitätsgereinigten Fraktionen in einer Verdünnung von 1:5 – 1:80 eingesetzt. Auf Paraffinschnitten von Ratten- oder Maushoden konnte der Antikörper nicht binden, obwohl ein Demaskierungsprotokoll angewandt wurde, das die Epitope freilegen soll. Im Western Blot erkannte der affinitätsgereinigte Antikörper SYCP1. Hier wurde je nach Güte der affinitätsgereinigten Fraktionen in Verdünnungen von 1:500 – 1:2000 gearbeitet.

4.6.2 Monoklonaler Antikörper VIIIId3

Mit dem monoklonalen Maus-Antikörper VIIIId3 konnte von der Arbeitsgruppe Benavente ein weiterer Antikörper gegen SYCP1 zur Verfügung gestellt werden. Dieser wurde bereits Anfang der 90er gewonnen, indem eine Balb/c Maus mit einer Proteinfraction immunisiert wurde, die aus angereicherten Karyoskelettproteinen von Pachytänspermatocyten der Ratte bestand; anschließend wurden Milzzellen der Maus isoliert und Hybridomazelllinien hergestellt (für eine ausführliche Beschreibung vgl. Smith, 1992; Smith und Benavente, 1992). Die Zelllinie 8d3 produzierte den Antikörper VIIIId3, der Synaptonemalkomplexe auf Schnitten von Maus- und Rattenhoden erkannte. Dabei band er nur das native Protein und funktionierte nicht im Western Blot. Durch die Klonierung der SYCP1 cDNA und Expression in Kulturzellen konnte ich in meiner Arbeit feststellen, dass der Antikörper VIIIId3 das Protein SYCP1 erkannte. Ich konnte weiterhin feststellen, dass es sich bei dem Epitop um einen Bereich der „Coiled-Coil“-Domäne handelt. Dieser Bereich konnte von mir auf die Aminosäuren 457-699 eingegrenzt werden, da der Antikörper die Deletionsmutante EGFP-SYCP1_Δ468-699 nicht mehr erkannte (Ergebnisse nicht gezeigt).

4.6.3 Antikörper gegen Syce1 und Cesc1

Yael Costa der Arbeitsgruppe Cooke, Edinburgh, gewann Antikörper gegen beide Proteine, die sie mir zur Verfügung stellte (Costa *et al.*, 2005). Es handelt sich um polyklonale Antikörper, die durch Immunisierung von Kaninchen jeweils mit dem gesamten Protein als GST-Fusionsprotein und jeweils zusätzlich einem Peptid hergestellt wurden (Aminosäuren 316-329 bei Syce1 und Aminosäuren 71-84 bei Cesc1). Das Serum gegen Syce1 wurde mit dem oben genannten Peptid von Syce1 affinitätsgereinigt. Die affinitätsgereinigte Fraktion konnte in der Immunfluoreszenzmikroskopie in einer Konzentration von 1:700 eingesetzt werden. Aus dem Serum gegen Cesc1 wurde mithilfe von Protein G Sepharose die Immunglobuline der Klasse G isoliert. Diese IgG Fraktion konnte in der Immunfluoreszenzmikroskopie in einer Konzentration von 1:800 eingesetzt werden. Bei „preembedding“ Immungoldlokalisationen wurden beide Antikörper 1:200 eingesetzt.

4.6.4 α -myc

Der monoklonale Antikörper Maus α -myc wurde von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

5. Ergebnisse

5.1 Klonierung der cDNA von SYCP1

Für das molekularbiologische Arbeiten, ist die Verfügbarkeit der cDNA, die für das zu untersuchende Protein kodiert, Voraussetzung. Deshalb wurde diese über reverse Transkription (RT) und anschließender PCR von mRNA aus angereicherten Spermatozyten gewonnen und in den Vektor pCR®2.1-Topo kloniert (vgl. 4.5.1). Da die SYCP1 mRNA mit mehr als dreitausend Nukleotiden relativ lang ist, und die Erzeugung langer RT-Produkte oft schwierig ist, wurden Teilstücke erzeugt. Ein weiteres Problem stellt die relativ hohe Fehlerquote der RT-PCR dar, die auf Fehler in der Transkription und in der RT beruhen können. Nach der Sequenzierung der gewonnenen cDNA-Stücke mit Primern, mit denen überlappende Sequenzen erzielt werden konnten (SCP1_seq-a – SCP1_seq-g; vgl. 4.4.5), wurden diese mit der veröffentlichten Sequenz (Meuwissen *et al.*, 1992; NM_012810) abgeglichen. Dabei waren zwei zusätzlichen Cytosine zwischen den Basen 106/107 und 126/127 in den RT-PCR-Produkten enthalten. Diese wurden für die Sequenz von SYCP1 der Ratte einige Jahre später identifiziert und es wurde daraufhin ein weiter 5'-gelegenes Startcodon bei Base 110 definiert (Sage *et al.*, 1995), weshalb deren Vorhandensein in der klonierten cDNA nicht als Fehler gewertet wurden. Die erhaltenen zum Teil fehlerhaften Bereiche der cDNA wurden im Anschluss über Klonierungsmethoden zusammengesetzt, um eine fehlerfreie SYCP1 cDNA der vollen Länge zu erhalten (vgl. Abbildung 5.1; Sequenzen der Primer vgl. 4.4.5).

Der 5'-Bereich von Base 60 bis 1497 wurde mit den Primern SCP1pos605' und SCP1pos16003' amplifiziert; der resultierende Klon SCP1_125' wies keine Fehler auf. Für den 3'-Bereich wurden ein Bereich von Base 1315 bis 3179 mit den Primern SCP1-1800bp5' und SCP1_3'ntn gewonnen; in zwei unabhängigen Ansätzen einmal der Klon SCP1_193'(1) mit der Deletion der Basen 2328 und 2422 und den Basenaustauschen 2559A>G und 3120C>T und der Klon SCP1_193'(3) mit dem Basenaustausch 1670C>G und der Deletion der Basen 2218 bis 2423. Ein weiterer Ansatz mit den Primern SCP1-1000bp5' und SCP1_3'ntn lieferte mit dem Klon SCP1_103'(1) die Basen 2100 bis 3179 mit dem Basenaustausch 2531T>C.

In einer zweistufigen PCR konnte ein neuer Klon erzeugt werden. Dazu wurde zuerst der Bereich 1315 bis 2169 mit den Primern SCP1_1800bp5' und SCP1-seq_b aus dem Klon SCP1_193'(1) und der Bereich 2100 bis 3179 mit den Primern SCP1_1000bp5' und SCP1-3'ntn aus dem Klon SCP1_103'(1) amplifiziert und mittels präparativer Gelelektrophorese gereinigt. Diese PCR-Produkte wurden jetzt nur mit den äußeren Primern (SCP1-1800bp5' und SCP1-3'ntn) in einer neuen PCR eingesetzt und das Produkt in den Vektor pCR®2.1-Topo ligiert. Der neue Klon, SCP1_193'n(1), enthielt nur noch die Mutation 2531T>C. Aus diesem Klon, in 3'→5'-Orientierung im Vektor pCR®2.1-Topo, wurde mit dem Restriktionsenzym *SacI* der Bereich 1346 bis 3179 in den mit *SacI*

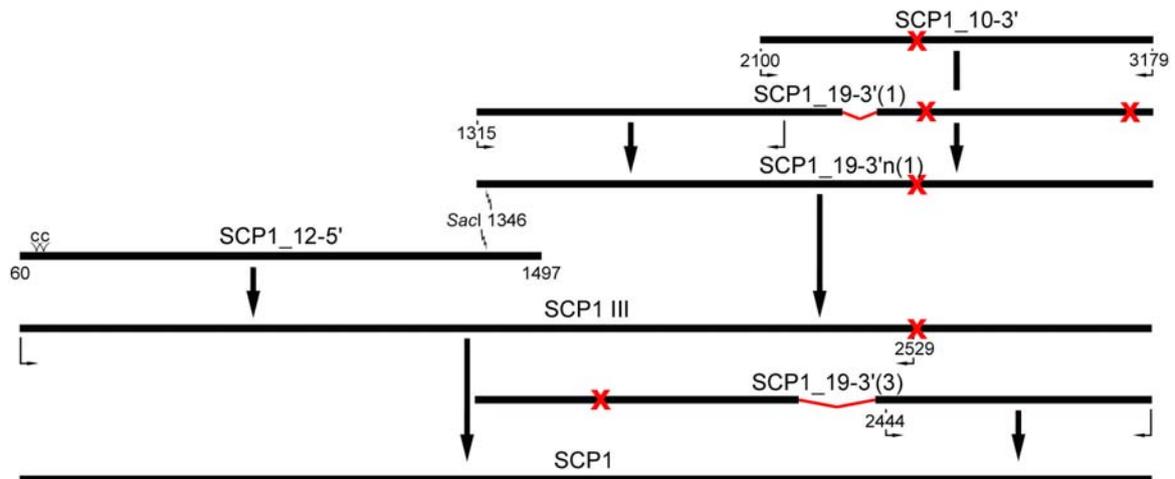


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Klonierungsschritte, die zur vollständigen cDNA von SYCP1 führten - ausgehend von zum Teil fehlerhaften cDNA Teilstücken aus RT-PCR Reaktionen.

geöffneten Klon SCP1_103'(1), der dieselbe Orientierung hatte, eingefügt. Der resultierende Klon SCP1_III(1) umfasste nun erstmals die gesamte kodierende Region von SYCP1, hatte aber noch die Mutation 2531T>C. Um diese auszumerzen, wurden wieder in einer zweistufigen PCR zuerst die Bereiche 60 bis 2529 und 2444 bis 3179 (mit den Primern SCP1pos605' und SCP1_i aus dem Klon SCP1_III(1) und mit den Primern SCP1_h und SCP1-3'nter aus dem Klon SCP1_193'(3)) amplifiziert, in einer weiteren PCR zusammengefügt (mit den Primern SCP1pos605' und SCP1-3'nter) und Topo-TA kloniert. Der resultierende Klon SCP1(11) umfasste die Basen 60 bis 3179, war in 3'→5'-Orientierung im Vektor pCR®2.1-Topo inseriert und eine Sequenzierung des gesamten Inserts zeigte keine Fehler.

Ausgehend von diesem Klon konnten alle weiteren Konstrukte in den verschiedensten Vektoren hergestellt werden.

5.2 Konstrukte

Zur molekularbiologischen Untersuchung eines Proteins können verschiedene Vektoren herangezogen werden, die es erlauben, das Protein selbst, Teilstücke davon oder mutierte Formen in Bakterien oder eukaryotischen Zellen zu exprimieren. Für diese Arbeit wurden Konstrukte für die Expression von SYCP1, Syce1 und Cesc1 in eukaryotischen und bakteriellen Zellen benötigt. Alle Konstrukte und die genaue Vorgehensweise der Klonierung sind in Kapitel 4.5 aufgeführt. Unter 4.4.1 sind die Vektorkarten und unter 4.4.5 alle Primer verzeichnet. Die notwendigen Methoden der Klonierungen werden im Kapitel 3.3 erklärt.

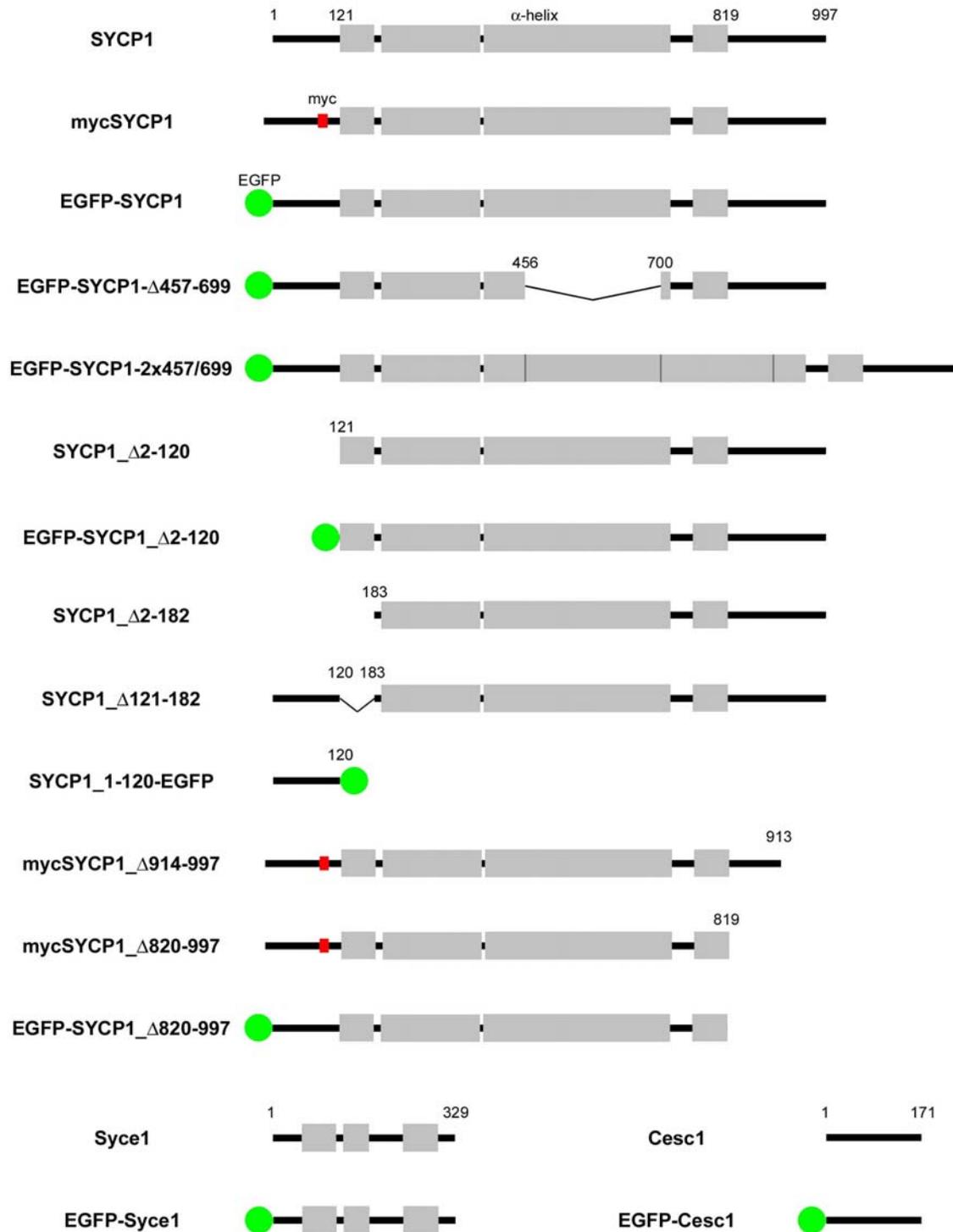


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung aller Konstrukte von SYCP1, Syce1 und Cesc1, die für die Durchführung dieser Arbeit benötigt wurden. Bereiche mit „Coiled-Coil“-Konformation wurden mit breiten grauen Balken dargestellt. Die N- und C-terminalen, nicht-helikalen Bereiche und Linker-Regionen zwischen den α -Helices der „Coiled-Coil“-Domänen wurden mit schwarzen Balken dargestellt. Bei EGFP-Fusionsproteinen wurde das EGFP mit einem grünen Kreis gezeigt und bei Proteinen mit myc-Epitop das myc mit einem roten Kästchen. Terminale Deletionen wurden durch das Weglassen der deletierten Bereiche dargestellt. Interne Deletionen mit einer nach unten gezogenen Linie, die die Bereiche des SYCP1 Konstrukts miteinander verbindet, die nun fusioniert waren.

Hier sind die Produkte der Konstrukte für die Expression in eukaryotischen Zellen schematisch dargestellt (vgl. Abbildung 5.2), wobei α -helikale Bereiche mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von „Coiled-Coil“-Domänen mit breiten grauen Balken dargestellt wurden. Die Berechnung dieser Domänen erfolgte mit einem frei zugänglichen Online Tool „PSort II“ (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>). Dabei ergaben sie für SYCP1 der Ratte mit einer Länge von 997 Aminosäuren (AS) folgende Bereiche mit hoher Wahrscheinlichkeit eine „Coiled-Coil“-Konformation einzunehmen: AS 121-182, AS 195-373, AS 379-716 und AS 757-819. Die N- und C-terminalen nicht-helikalen Bereiche und Linker-Regionen zwischen den α -Helices der „Coiled-Coil“-Domäne wurden mit schwarzen Balken dargestellt. Im Falle von Syce1 (329 AS) ergaben sich auch „Coiled-Coil“-Domänen bei AS 53-115, 128-175 und 236-299. Für Cesc1 (171 AS) wurden bei der Berechnung zwei kleine „Coiled-Coil“-Domänen erhalten (AS 51-88 und 118-145), die aber aufgrund ihrer Kürze im Schema nicht berücksichtigt wurden.

Polymerisationseigenschaften von SYCP1

5.3 Polymerisation von SYCP1 in COS-7 Zellen

Zur Erforschung der Eigenschaften von SYCP1 wurde die Verteilung des Proteins nach Überexpression in Kulturzellen analysiert, die durch die Transfektion von COS-7 Zellen mit der cDNA von SYCP1 im Vektor pEGFP-N3 erreicht wurde. Da die cDNA noch das Stopcodon enthielt, wurde wildtypisches SYCP1 emprimiert, das mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen wurde (vgl. 3.6.1). Wie in Abbildung 5.3 zu sehen, konnten bei der ektopischen Expression von SYCP1 in COS-7 Zellen spezifische Verteilungsmuster beobachtet werden. Einerseits wurde SYCP1, wie für ein Kernprotein zu erwarten, im Nukleus lokalisiert, wo es homogen verteilt war (59%; n = 424). Andererseits zeigte SYCP1 eine ausgeprägte Fähigkeit zur Selbstanordnung und bildete in den restlichen 41% der Zellen (n = 424) runde bis elongierte Aggregate und lang gezogene Fasern, die sich durch das Cytoplasma der Zelle erstreckten. Davon machten die Zellen mit lang gestreckten Fasern 23,3% aus. Die Bildung dieser ausgedehnten Strukturen konnte auch in Zellen beobachtet werden, die mit markierten Konstrukten von SYCP1 transfiziert wurden: EGFP-SYCP1, bei dem EGFP an den N-Terminus von SYCP1 fusioniert war, und mycSYCP1, ein Konstrukt mit einem inseriertem myc-Epitop in der nicht-helikalen N-terminalen Domäne bei Aminosäure 100. Während EGFP-SYCP1 selbst grün fluoreszierte, wurde SYCP1 mit α -SYCP1-C und mycSYCP1 mit dem Antikörper α -myc (Invitrogen, Karlsruhe) nachgewiesen (vgl. Abb. 5.3). Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Expression von SYCP1 in den COS-7 Zellen zur Umorganisation des Chromatins führte und diese Zellen bei längerer Kultivierung abstarben.

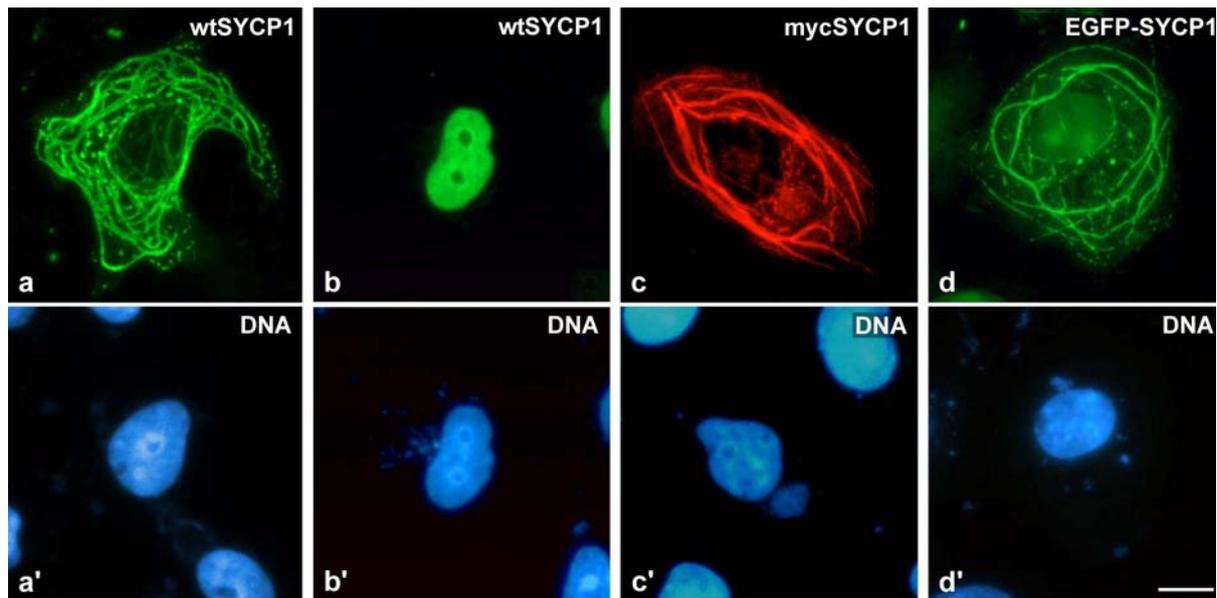


Abbildung 5.3: Transfektion von COS-7 Zellen mit (a, b) SYCP1, (c) mycSYCP1 und (d) EGFP-SYCP1. SYCP1 polymerisierte in 41% der Zellen zu Fasern und/oder Aggregaten (a) und war in den restlichen Zellen homogen im Kern lokalisiert (b). Auch die mit myc-Epitop (c) und EGFP (d) markierten SYCP1-Moleküle polymerisierten zu Fasern und Aggregaten. Der Nachweis von SYCP1 erfolgte über Immunfluoreszenz mit den Antikörpern (a, b) α -SYCP1-C und (c) α -myc bzw. (d) der Autofluoreszenz von EGFP. (a'-d') Die DNA wurde mit dem Fluoreszenz-farbstoff Hoechst 33258 visualisiert. Der Größenstrich entspricht 10 μ m.

Eine genauere Untersuchung der Fasern war mithilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) von Ultradünnschnitten möglich, die von fixierten und in Epon eingebetteten Zellen erstellt wurden (vgl. 3.6.2). Auf ultrastruktureller Ebene enthüllte sich eine klare Strukturierung der Fasern in eine Abfolge von dicken und dünnen elektronendichten Balken, die durch Transversalfilamente (TFs) verbunden waren. Die Strukturen glichen einer Sequenz von Synaptonemalkomplexen (SCs), die parallel gestapelt sind, und waren nicht zu unterscheiden von so genannten Polykomplexen (PCs), die vielfach in meiotischen Zellen verschiedenster Organismen gefunden wurden (vgl. 1.3; Übersicht in Goldstein, 1987). Wie diese hatten die hier beobachteten Strukturen auch dieselben Dimensionen wie SCs. Die Wiederholungseinheit der PCs, die von SYCP1 Molekülen in COS-7 Zellen gebildet wurden, wiesen einen durchschnittlichen Abstand von 120 ± 9 nm ($n = 19$) auf. Die zentrale Region (CR) der PCs hatte dieselbe Weite, wie sie im SC gefunden wird, und die Weite des dicken elektronendichten Balken entsprach circa der Dimension der Lateralelemente (LE) eines SC. D.h. jede Einheit besaß eine CR, die nicht von einer CR eines SCs zu unterscheiden war, wobei in diesem Modell der dünne elektronendichte Balken dem Zentralelement (CE) eines SC entspricht. Gleichzeitig wies jede Einheit ein etwa halb so breites LE auf wie das eines SC. Dies kann auch in natürlich vorkommenden PCs so beobachtet werden, weshalb die durch Überexpression von SYCP1 in somatischen Zellen gebildeten Strukturen von uns ebenfalls Polykomplexe (PCs) genannt wurden.

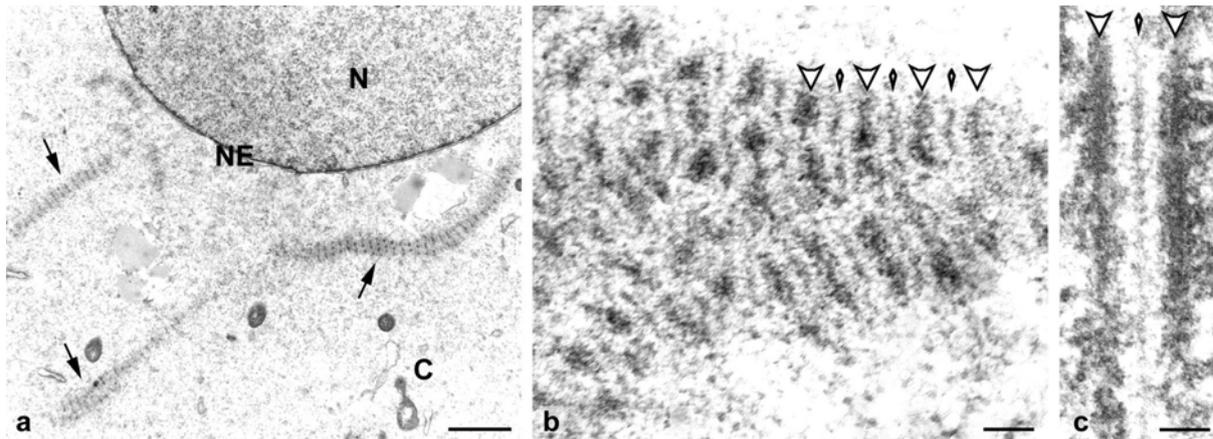


Abbildung 5.4: (a) SYCP1 polymerisierte zu lang gestreckten Fasern im Cytoplasma von COS-7 Zellen (Pfeile). (b) Diese erwiesen sich in höherer Auflösung als Abfolge von dicken und dünnen elektronendichten Balken (breite und dünne Pfeilspitzen). Diese Strukturen wurden als Polykomplexe (PCs) bezeichnet und ähneln einer Serie parallel gestapelter SCs. (c) Zum Vergleich ist ein SC der Ratte dargestellt, dessen LEs mit breiten Pfeilspitzen und dessen CE mit einer dünnen Pfeilspitze markiert sind. N, Nukleus, NE, Kernhülle, C, Cytoplasma. Die Größenstriche entsprechen 1 μm in a und 0,1 μm in b und c.

5.4 Organisation der SYCP1 Moleküle im Polykomplex

Nähere Erkenntnisse der Polymerisation von SYCP1 Molekülen zu PCs konnten erzielt werden, indem die Organisation der SYCP1 Moleküle innerhalb der PCs erforscht wurde. Die Durchführung erfolgte mittels der Immungoldlokalisation der N- und C-Termini von SYCP1 analog zu Experimenten, die die Orientierung von SYCP1 im SC aufgeklärt haben (Liu *et al.*, 1996; Schmekel *et al.*, 1996).

Für die Immungoldlokalisation wurden in COS-7 Zellen mycSYCP1 exprimiert, ein Konstrukt mit einem myc-Epitop im nicht-helikalen N-Terminus, dessen Polymerisationsverhalten mit wtSYCP1 vergleichbar war (vgl. 5.3). Auf diesen Zellen wurde in unabhängigen Experimenten jeweils eine „pre-embedding“ Immungoldlokalisation mit spezifischen Antikörpern durchgeführt (vgl. 3.6.2). Für die Lokalisation des C-Terminus mit Kaninchen α -SYCP1-C (vgl. 4.6.1) und für die Lokalisation des N-Terminus mit Maus α -myc (Invitrogen; vgl. 4.6.4). Als sekundäre Antikörper wurden Esel-Antikörper gegen Kaninchen- bzw. Maus-Antikörper verwendet, an die 6 nm große kolloidale Goldpartikel gekoppelt waren. Anschließend erfolgte die Flacheinbettung, Anfertigung von Ultradünnschnitten und Auswertung am TEM.

Der Nachweis des C-Terminus lieferte eine klare sehr starke Markierung des dicken elektronendichten Balkens (vgl. Abbildung 5.5). Die Gold-Markierung des myc-Epitops im N-Terminus lag weitgehend auf den dünnen Balken, war aber weit weniger stark. Der Grund für die Unterschiede in der Markierungsstärke konnte in der Größe der jeweiligen Epitope liegen; immerhin erkennt das polyklonale Gemisch an Antikörper in Kaninchen α -SYCP1-C vermutlich viele verschiedene Epitope

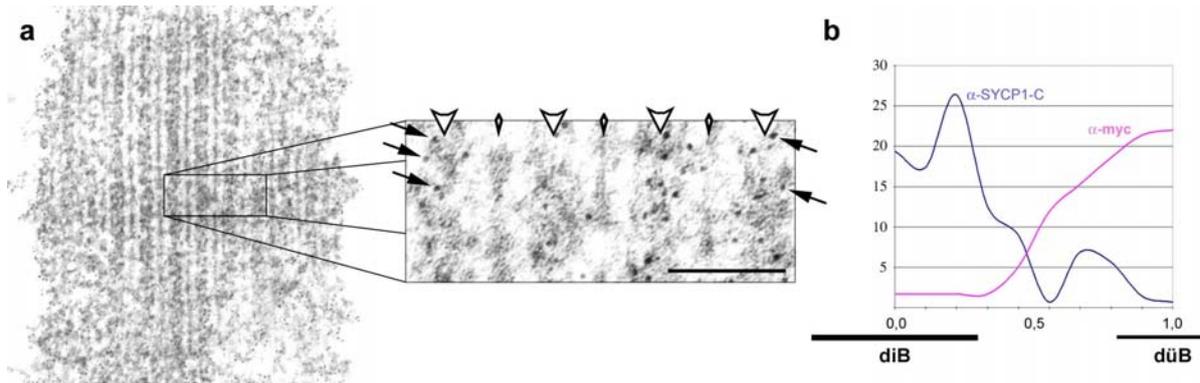


Abbildung 5.5: Nachweis der Lokalisation der N- und C-Termini von SYCP1 in PCs: (a) PC und Ausschnittsvergrößerung der Immungoldlokalisation des C-Terminus mit dem Antikörper α -SYCP1-C. Die dicken elektronendichten Balken sind mit breiten Pfeilen markiert, die dünnen Balken mit dünnen Pfeilspitzen. Auf einige der Goldpartikel weisen Pfeile. Der Größenstrich entspricht 100 nm. (b) Verteilung der Goldkörner auf PCs für den C-Terminus (blaue Kurve; α -SYCP1-C; n = 144) und den N-Terminus (pinke Kurve; α -myc; n = 59). Dabei wurde der Abstand von der Mitte der dicken Balken zur Mitte des dünnen Balkens auf den Wert 1,0 normiert und in zehn Quadranten unterteilt. Die Kurven stellen die prozentuale Verteilung der Goldkörner dar, die in den einzelnen Quadranten gefunden wurden. diB, dicker Balken, düB, dünner Balken

in den C-terminalen 76 AS von SYCP1, während Maus α -myc ein monoklonaler Antikörper ist, der ein einziges Epitop bindet, das möglicherweise teilweise verdeckt war. Die Zugänglichkeit der sehr dichten proteinösen Struktur der PCs für Antikörper dürfte ein weiteres Problem dargestellt haben, vor allem für die Gold-gekoppelten sekundären Antikörper. So waren gute Markierungen mit Kaninchen α -SYCP1-C in gut strukturierten PCs in den Bereichen zu finden, die von einer weniger gut erhaltenen Organisation umgeben war. Beide Antikörper markierten die Randzonen der PCs gut, die aber aufgrund des geringen Organisationsgrades nicht für die Auswertung herangezogen wurden. Um die Ergebnisse zu untermauern, wurden Goldpartikel für eine quantitative Auswertung gezählt. Dafür wurde der Abstand von der Mitte eines dicken Balkens zur Mitte des dünnen Balkens auf 1,0 normiert und dieser Bereich in 10 Quadranten unterteilt. Die Zählung von Goldkörnern innerhalb dieser Quadranten (also eine Messung der relativen Entfernung von der Mitte des dicken bzw. dünnen Balkens) ergab für die C-Termini (n = 144) eine deutliche Lokalisation auf den dicken Balken und für die N-Termini (n = 59) eine vorherrschende Lokalisation auf und um die dünnen Balken (vgl. Abbildung 5.5).

Das Ergebnis ist in jeder Beziehung eindeutig. Die SYCP1 Moleküle weisen einen sehr hohen Organisationsgrad auf und sind im PC so orientiert, dass die C-Termini die dicken und die N-Termini die dünnen Balken bilden. Diese Organisation entspricht der Organisation der SYCP1 Moleküle im SC (Liu *et al.*, 1996; Schmekel *et al.*, 1996) und stützt das Modell, wonach die dicken Balken den LES und die dünnen Balken einem CE entsprechen.

5.5 Einfluss der „Coiled-Coil“-Domäne von SYCP1 auf die Polykomplex-Bildung

Die Organisation der SYCP1 Moleküle in den PCs mit den C-Termini auf den dicken und den N-Termini auf den dünnen Balken legt nahe, dass die Organisation von SYCP1 innerhalb von PCs und SCs identisch sind. Für die „Coiled-Coil“-Domäne wird im SC vermutet, dass sie die Spalte zwischen LE und CE überspannt. Aufgrund der strukturellen Übereinstimmung der PCs, deren Bildung in Kulturzellen durch Transfektion von SYCP1 cDNA induzierbar ist, konnte die Rolle der „Coiled-Coil“-Domäne erstmals für das TF-Protein untersucht werden.

Diese Analyse wurde unternommen, indem Konstrukte hergestellt wurden, in denen ein bestimmter Teil der codierenden Sequenz für die „Coiled-Coil“-Domäne deletiert oder dupliziert wurde. Es handelte sich dabei um die Aminosäuren 457 bis 699, also um eine Verlängerung bzw. Verkürzung um 243 AS.

Als erstes wurde festgestellt, dass die Veränderung der „Coiled-Coil“-Domäne zu einer Einschränkung des Polymerisationsverhaltens führte. Dies ist plausibel, da diese Domäne eine zentrale Stellung bei der Dimerisierung der SYCP1 Moleküle hat und deren Zusammensetzung für die Modulation der Bindungsspezifität und Stabilität wichtig ist (vgl. 1.5.1). Zusammen mit einer sehr geringen erreichbaren Transfektionsrate erschwerte dies eine Auswertung auf ultrastruktureller Ebene. Diese Probleme konnten jedoch durch Vorlokalisierung gelöst werden. Für das Experiment wurden EGFP-Fusionsproteine in Kulturzellen auf CELLocate Deckgläschen (Eppendorf, Hamburg) exprimiert und die noch lebenden Zellen im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Zellen mit autofluoreszierenden Fasern konnten spezifisch ausgewählt werden, wonach die Fixierung, Einbettung und Anfertigung von Ultradünnschnitten ebendieser Zellen mithilfe des eingravierten

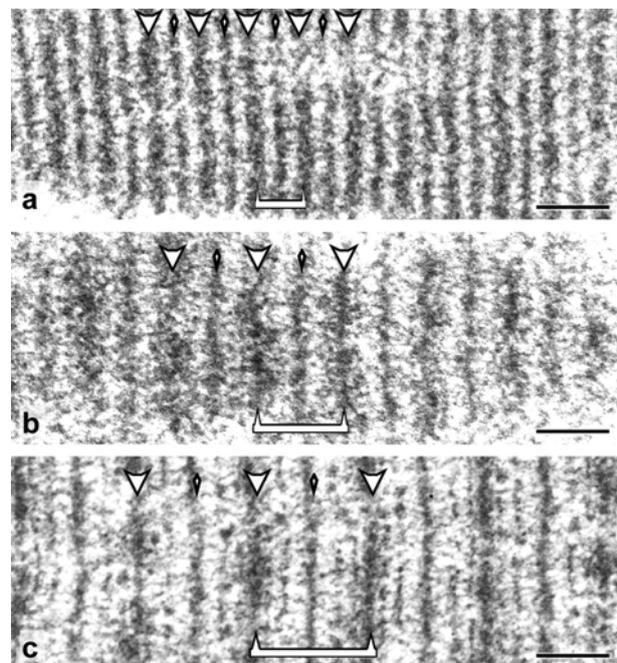


Abbildung 5.6: (a) EGFP-SYCP1_Δ457-699, (b) EGFP-SYCP1 und (c) EGFP-SYCP1_2x457-699 bildeten PCs. Die Verkürzung und Erweiterung der „Coiled-Coil“-Domäne bewirkten eine entsprechende Änderung einer Wiederholungseinheit der PCs. Dicke elektronendichten Balken sind durch weiße Pfeilspitzen und dünne Balken durch schwarze Pfeilspitzen gekennzeichnet. Die Klammern markieren den Abstand zwischen den Mitten der dicken Balken. Die Größenstriche repräsentieren 0,1 µm.

Rasters durchgeführt wurde (vgl. 3.6.2). Diese Methode erlaubte die Auswahl bestimmter Zellen und die größtmögliche Erhaltung der zellulären Strukturen.

Dazu wurden die Konstrukte in EGFP-C Vektoren kloniert (EGFP-SYCP1_Δ457-699 und EGFP-SYCP1_2x457-699); zum Vergleich konnte EGFP-SYCP1 benutzt werden, ein Fusionsprotein mit wildtypischer „Coiled-Coil“-Domäne, das sich in seinem Polymerisationsverhalten nicht von wtSYCP1 unterschied (vgl. Abbildung 5.3).

Wie in Abbildung 5.6 zu erkennen ist, formten alle Konstrukte PCs mit der typischen, alternierenden Abfolge von dicken und dünnen Balken. Die PCs unterschieden sich aber deutlich im Abstand dieser Balken voneinander. Für die statistische Auswertung wurde der Abstand zwischen der Mitte eines dicken Balkens bis zur Mitte des nächsten dicken Balkens, also der Dimension einer Wiederholungseinheit des PC, gemessen (siehe Klammern in Abbildung 5.6). In PCs, die von EGFP-SYCP1 geformt wurden, betrug der Abstand im Mittel 123 ± 17 nm ($n = 30$) was praktisch den wildtypischen PCs entsprach (120 ± 9 nm; $n = 19$). Dahingegen war die Weite für SYCP1_Δ457-699 mit 69 ± 3 nm ($n = 19$) um 54 nm reduziert und die Weite bei SYCP1_2x457-699 mit 164 ± 9 nm ($n = 18$) um 41 nm erhöht (vgl. Tabelle 5.1).

Diese Ergebnisse belegen die Vermutung, dass die „Coiled-Coil“-Domäne die Lücke zwischen dicken und dünnen Balken überbrückt, und zeigen darüber hinaus, dass die Länge der Domäne den Abstand zwischen diesen Strukturen definiert und somit maßgebend für die Breite der CR eines PC ist.

Konstrukt	„Coiled-Coil“-Domäne	PC-Wiederholungseinheit	Veränderung
EGFP-SYCP1_Δ457-699	Deletion von 243 AS	69 ± 3 nm	- 54 nm
EGFP-SYCP1	-.-	123 ± 17 nm	-.-
EGFP-SYCP1_2x457-699	Duplikation von 243 AS	164 ± 9 nm	+ 41 nm

Tabelle 5.1: Dimensionen der PCs, die von SYCP1 mit wildtypischer bzw. mutierter „Coiled-Coil“-Domäne gebildet wurden.

5.6 Einfluss des N-terminalen Bereichs von SYCP1 auf die Polymerisation

Im SC wurde der N-Terminus von SYCP1 im CE lokalisiert und eine Interaktion dieser Domäne konnte über das Hefe „Two-Hybrid“ System nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 1996; Schmekel *et al.*, 1996). Diese Erkenntnisse führten zur Vorstellung, dass im CE die N-Termini von SYCP1 eine Verknüpfung der Moleküle herstellen, die ausgehend von beiden LEs in die CR ragen.

Im PC sind die N-Termini der SYCP1-Moleküle an den dünnen elektronendichten Balken lokalisiert, wie die Immunogoldlokalisierung gezeigt hat (vgl. 5.4). Welchen Einfluss die nicht-helikale N-terminale Domäne und die N-terminale Region der „Coiled-Coil“-Domäne auf die Polymerisation von SYCP1 nehmen, wurde untersucht, indem verschiedene Bereiche entfernt wurden und in Transfektionsexperimenten die Fähigkeit auf PCs-Bildung ausgewertet wurde.

Dazu wurde zuerst ein Konstrukt mit der Deletion des nicht-helikalen N-Terminus (SYCP1 Δ 2-120) hergestellt. Nach Transfektion und Immunfluoreszenzmikroskopie konnte für SYCP1 Δ 2-120 festgestellt werden, dass die Ausbildung von PCs noch möglich war (vgl. Abbildung 5.7). Ein großer Unterschied zu wtSYCP1 bestand bei diesem Konstrukt jedoch in der Häufigkeit, mit der die Zusammenlagerung zu höheren Strukturen erfolgte. Bei Zellen, die wtSYCP1 exprimierten, wurden in 41% der Zellen (n = 424) cytoplasmatische Fasern und/oder Aggregate (PCs), nachgewiesen; lang gestreckte Fasern wurden dabei in 23,3% der Zellen gebildet. In den restlichen 59% der Zellen war wtSYCP1 in Form einer diffusen Kernlokalisierung verteilt (vgl. 5.3). Dahingegen konnten im Fall von SYCP1 Δ 2-120 nur noch 9% der Zellen (n = 666) mit SYCP1-Expression Fasern und/oder Aggregate bilden; lang gestreckte Fasern wurden nur noch in 2,3% der Zellen gefunden (vgl. Tabelle 5.2). Die meisten Zellen (91%; n = 666) zeigten eine homogene Färbung des Zellkerns.

Aufgrund der fortgesetzten Fähigkeit zur PC-Bildung nach Deletion des nicht-helikalen N-Terminus wurden weitere Bereiche des N-Terminus in die Untersuchung mit einbezogen. In einem Konstrukt wurde der erste Bereich der „Coiled-Coil“-Domäne deletiert (SYCP1 Δ 121-182) und in einem weiteren Konstrukt die ersten 182 Aminosäuren, also der nicht-helikale N-Terminus und der erste Bereich der „Coiled-Coil“- Domäne (SYCP1 Δ 2-182). COS-7 Zellen wurden jeweils mit diesen Konstrukten transfiziert und mit Immunfluoreszenzmikroskopie die Bildung cytoplasmatischer Fasern und Aggregate geprüft. Wie man in Abbildung 5.7 sehen kann, sind auch diese beiden Konstrukte in der Lage, PCs zu bilden, wenn auch nicht in dem Ausmaß wie das wildtypische SYCP1. Von den Zellen, die SYCP1 Δ 121-182 exprimierten, konnten in 11,2% (n = 196) lang gestreckte cytoplasmatische Fasern gebildet werden. Dies ist etwa die Hälfte der Zellen als bei wtSYCP1 (23,3%; siehe oben). Dahingegen war im Falle der Expression von SYCP1 Δ 2-182 die Bildung von cytoplasmatischen Fasern stark beeinträchtigt und konnte in kaum einer Zelle beobachtet werden (0,7%, n = 134; vgl. Tabelle 5.2).

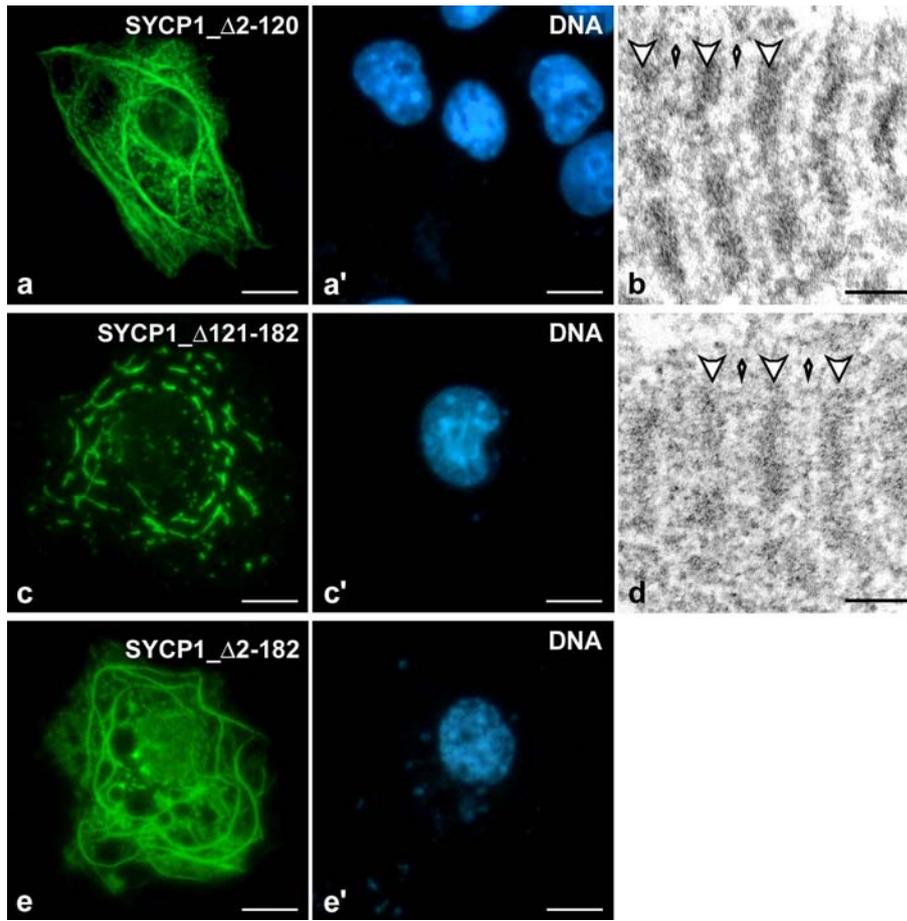


Abbildung 5.7: Die Polymerisationseigenschaften verschiedener SYCP1 Konstrukte mit Deletionen im N-terminalen Bereich. (a) SYCP1_Δ2-120 bildete lange cytoplasmatische Fasern. Auch die Proteine (c) SYCP1_Δ121-182 und (e) SYCP1_Δ2-181 waren fähig, PCs zu bilden. (a', c', e') Zugehörige DNA Färbung der Zellen mit Hoechst 33258. (b, d) TEM Aufnahmen von PCs, die von (b) SYCP1_Δ1-120 bzw. (d) SYCP1_Δ121-182 gebildet wurden. Auf ultrastruktureller Ebene glichen diese den wildtypischen PCs. Die Größenstriche entsprechen in a, a', c, c', e und e' 10 μm und in b und d 100 nm.

Die Bildung von PCs und deren Aufbau wurde für SYCP1_Δ2-120 und SYCP1_Δ121-180 auch auf ultrastruktureller Ebene untersucht (siehe Abbildung 5.7). Um die Strukturen trotz der prozentual wenigen Zellen, die PCs bilden und einer geringen erreichbaren Transfektionsrate untersuchen zu können, wurden die Zellen auf CELLocate® Deckgläschen ausgesät und nach der Transfektion eine Detektion von SYCP1 mittels Immunfluoreszenzmikroskopie mit dem Antikörper α -SYCP1-C durchgeführt. Mithilfe des eingravierten Rasters auf den Deckgläschen konnten gezielt Zellen im TEM untersucht werden, in denen SYCP1 zu Fasern polymerisierte (vgl. 3.6.2). Das Ergebnis der Untersuchung ist eindeutig. Die gebildeten PCs unterschieden sich morphologisch nicht von den PCs, die das wildtypische SYCP1 bildete.

Für die Polymerisation zu PCs war also sowohl der nicht-helikale N-Terminus als auch der Kopf der „Coiled-Coil“-Domäne wichtig, aber nicht absolut notwendig, da im Falle einer Deletion eine Zusammenlagerung zu PCs weiterhin festgestellt werden konnte. Erst durch eine erweiterte Deletion des N-Terminus um den ersten Bereich der „Coiled-Coil“-Domäne kam die Polymerisationsfähigkeit fast vollständig zum Erliegen.

Konstrukt	Zellen mit Fasern
wtSYCP1	23,3%
N-terminale Deletionen	
SYCP1_Δ2-120	2,3%
SYCP1_Δ121-180	11,2%
SYCP1_Δ2-182	0,7%
C-terminale Deletionen	
SYCP1_Δ820-997	0,0%
SYCP1_Δ914-997	11,6%

Tabelle 5.2: Anteil transfizierter Zellen mit Expression von SYCP1 Konstrukten, die lang gestreckte, cytoplasmatische Fasern ausbildeten. Dabei wird wtSYCP1 mit Mutanten mit Deletionen im N- bzw. C-terminalen Bereich verglichen.

5.7 Einfluss der C-terminalen Region von SYCP1 auf die Polymerisation

Im SC ist die C-terminale Region in den LEs verankert (Liu *et al.*, 1996; Schmekel *et al.*, 1996). Dem entspricht die Lokalisation in den PCs auf den dicken elektronendichten Balken (vgl. 5.4); hier sind aber im Vergleich zum SC die C-terminalen Regionen von SYCP1 Molekülen vereint, die nach zwei Seiten wegstreben (vgl. Abbildung 5.4). Im Gegensatz zu den nicht-helikalen N-Termini konnte im Hefe „Two-Hybrid“-System keine Interaktion der C-Termini von Syn1 gezeigt werden, dem SYCP1 Homolog von Hamster (Tarsounas *et al.*, 1997).

Mittels der planvollen Herstellung von Konstrukten von SYCP1 mit Deletionen im C-Terminus konnte der Einfluss dieser Domäne auf die Polymerisation zu PCs untersucht werden.

In einem Konstrukt wurde der vollständige nicht-helikale C-Terminus von SYCP1 entfernt; dies entspricht den letzten 178 Aminosäuren. Da dieses Konstrukt das Epitop des Antikörpers gegen den C-terminalen Bereich (Aminosäuren 922-997) nicht mehr enthielt, wurde in die *EcoRI* Schnittstelle bei Aminosäure 100 ein myc-Epitop eingefügt (mycSYCP1_Δ820-997). Dieses Epitop behindert die Polymerisation zu PCs nicht, wie für das vollständige SYCP1 mit myc-Epitop gezeigt wurde (vgl. Abbildung 5.3). Die Expression von mycSYCP1_Δ820-997 mit der Deletion des C-Terminus in COS-7 Zellen führte jedoch zu einer homogenen Verteilung der Proteine im Cytoplasma der Zellen (vgl. Abbildung 5.8). Es konnte weder eine Zusammenlagerung zu höheren Strukturen noch eine Kernlokalisation beobachtet werden.

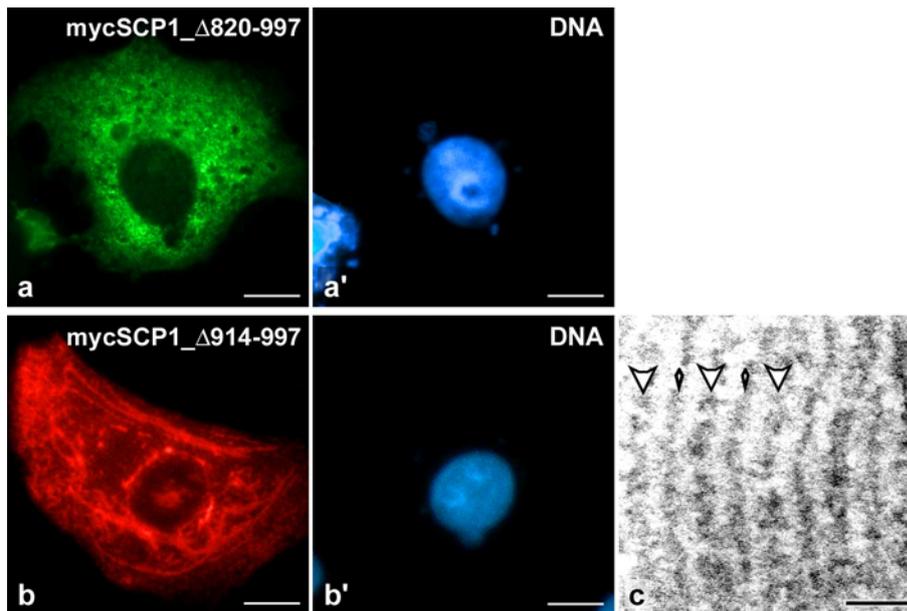


Abbildung 5.8: Polymerisationseigenschaften von SYCP1 Konstrukten mit Deletionen im C-terminalen Bereich nach Expression in Cos7 Zellen. (a) SYCP1_Δ820-997 war homogen im Cytoplasma verteilt. (b) SYCP1_Δ914-997 polymerisierte zu langen cytoplasmatischen Fasern. Die Proteine wurden mit α -myc nachgewiesen. (a', b') Zugehörige DNA Färbung mit Hoechst 33258. (c) Auf ultrastruktureller Ebene gleichen die PCs, die von SYCP1_Δ914-997 gebildet werden wildtypischen PCs. Die Größenstriche entsprechen in a – b' 10 μ m und in c 100 nm.

Im Gegensatz dazu war mycSYCP1_Δ914-997, ein Konstrukt bei dem die letzten 84 Aminosäuren entfernt wurden, noch in der Lage zu PCs zu polymerisieren (vgl. Abbildung 5.8). Bei vielen Zellen wurden allerdings keine Fasern oder Aggregate beobachtet, sondern eine homogene Verteilung der Proteine im Cytoplasma. Der Anteil der Zellen, die cytoplasmatische Fasern bildeten, betrug 11,6% (n = 360), war also im Vergleich zu wtSYCP1 (23,3%, n = 424) auf etwa die Hälfte verringert (vgl. Tabelle 5.2). Der Aufbau der PCs, zu denen sich mycSYCP1_Δ914-997 zusammenlagerte, wurde auf ultrastruktureller Ebene untersucht. Dafür wurden die transfizierten Zellen auf CELLocate® Deckgläschen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht und faserbildende Zellen ausgewählt, wie für die Deletionen N-terminaler Bereiche (vgl. 3.6.2). Auf ultrastruktureller Ebene glichen die PCs, die von mycSYCP1_Δ914-997 gebildet wurden in ihrer Gestalt den PCs, die von wildtypischem SYCP1 gebildet wurden.

Der nicht-helikale C-Terminus, war demnach für die Zusammenlagerung der Moleküle zu PCs essentiell, da eine Deletion die Polymerisation vollständig hemmte. Eine Deletion der letzten 84 Aminosäuren bewirkte eine Einschränkung der Polymerisation, aber die grundsätzliche Fähigkeit blieb erhalten.

5.8 Dynamik von SYCP1 innerhalb von Polykomplexen

Makromoleküle in lebenden Zellen unterliegen einer Dynamik, die von ihrer Bindung an höhere Strukturen abhängt. Die Mobilität von Proteinen hängt von vielen Faktoren ab, wobei die Komplexbildung und die Bindung an strukturellen Zellbestandteilen eine große Rolle spielt. So sind zum Beispiel die Lamine, die in Form eines Netzwerks die innere Kernhülle stabilisieren, höchst immobil (Schütz *et al.*, 2005). Der SC wird dem Karyoskelett zugerechnet, das sich durch eine hohe Stabilität gegenüber Nukleasen, hohen Salzkonzentrationen und hypotonen Detergenz-Lösungen auszeichnet. Messungen der Mobilität von SC-Proteinen innerhalb des SC sind allerdings aufgrund der schlechten experimentellen Zugänglichkeit meiotischer Zellen von Säugern nicht möglich. Nachdem wir zeigen konnten, dass SYCP1 fähig ist, sich bei ektopischer Expression in Kulturzellen zu SC-ähnlichen Strukturen zusammenzulagern, den PCs, bat sich uns die Möglichkeit, die dynamischen Eigenschaften von SYCP1 zu untersuchen.

Die Methode „fluorescence recovery after photobleaching“, kurz FRAP, ist eine etablierte Möglichkeit, die Dynamik von Proteinen in lebenden Zellen zu untersuchen. Dazu werden die zu untersuchenden Proteine als EGFP-Fusionsprotein exprimiert und am konfokalen Laser Scanning Mikroskop unfixiert betrachtet. Mit einem starken Laserstrahl wird ein punktförmiger Bereich belichtet, so dass die EGFP-Fusionsproteine, die sich dort befinden, ausbleichen. Bei Proteinen mit hoher Dynamik erholt sich die Fluoreszenz in diesem Bereich sehr schnell wieder. Handelt es sich um relativ immobile oder um immobile Proteine, verläuft die Erholung der Fluoreszenz langsam, oder bleibt aus. Das Programm, mit dem „FRAP-Experimente“ durchgeführt wurden, erlaubt auch eine quantitative Bestimmung der Fluoreszenz und der Erholung derselben. Dafür wird der zu bleichende Bereich vor dem Laserstrahl und nach dem Strahl in Intervallen von einigen Sekunden gemessen. Gleichzeitig wird jeweils die Gesamtfluoreszenz der ausgewählten Zelle bestimmt. Nach einer Formel wird die verhältnismäßige Erholung der auf 1,0 genormten Ausgangsfluoreszenz bestimmt. Für eine statistische Auswertung wurden jeweils 10 Messreihen durchgeführt und die Mittelwerte berechnet (vgl. 3.6.3).

Zur Bestimmung der Dynamik von SYCP1 in PCs mittels FRAP, wurde das Konstrukt eingesetzt, bei dem EGFP an den N-Terminus von SYCP1 fusioniert war. Wie in Abbildung 5.3 und 5.6 zu sehen, ist dieses Konstrukt in seiner Fähigkeit zu PCs zu polymerisieren nicht beeinträchtigt. Der zu bleichende Punkt wurde auf einer der cytoplasmatischen Fasern ausgewählt und nach dem Bleichstrahl wurde die Zelle 5 Minuten lang gemessen. Ein Beispiel ist in Abbildung 5.9a dargestellt und die graphische Auswertung der Mittelwerte von 10 Messreihen in Abbildung 5.9d. Die Fluoreszenz erholte sich im Schnitt auf 10,8% des Ausgangswertes. Es kam also kaum zu einer Erholung der Fluoreszenz, d.h. einmal polymerisierte SYCP1 Moleküle waren kaum mobil. Folglich stellen die PCs sehr stabile Polymere dar.

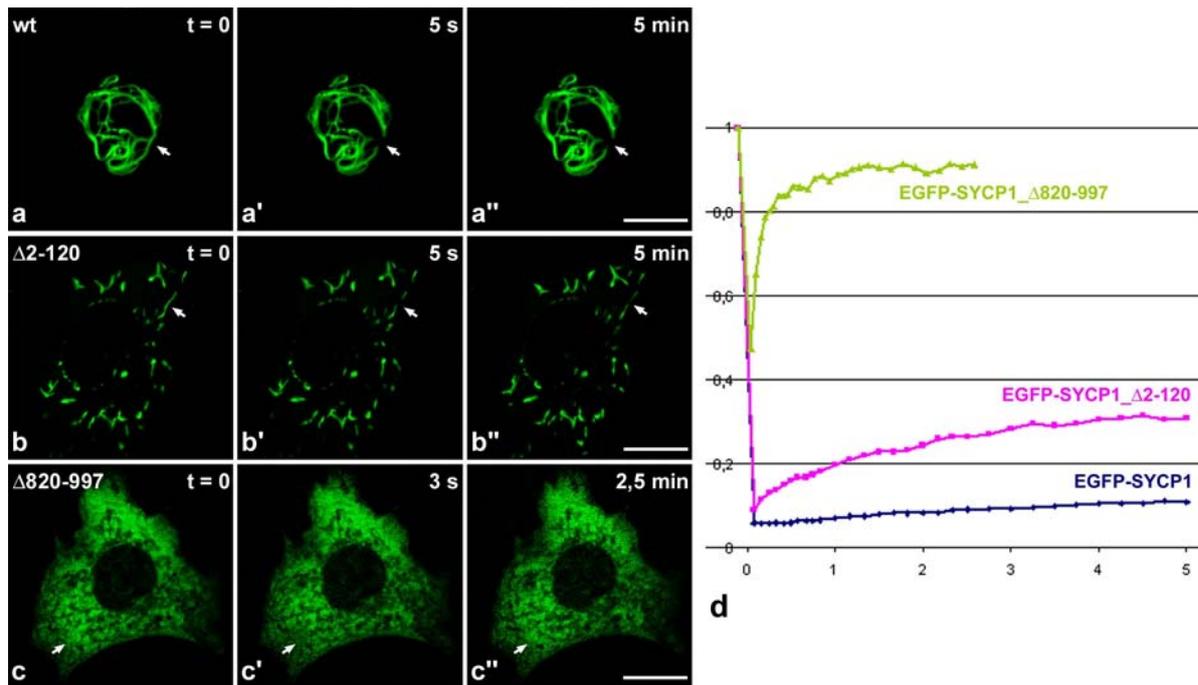


Abbildung 5.9: Frap Experiment zur Untersuchung der Dynamik von (a-a'') EGFP-SYCP1, (b-b'') EGFP-SYCP1_Δ2-120 und (c-c'') EGFP-SYCP1_Δ820-997. Die gebleichten Punkte sind jeweils mit einem Pfeil markiert. Gezeigt wird der Zustand der Zellen jeweils zum Zeitpunkt direkt vor dem Bleichen ($t = 0$; a, b und c), der ersten Messung nach dem Bleichen (5s bzw. 3s; a', b' und c') und am Ende der Messung (5 min bzw. 2,5 min; a'', b'' und c''). Die Größenstriche entsprechen $10 \mu\text{m}$. (d) Graphische Darstellung der Mittelwerte von je 10 Messreihen. Die Fluoreszenzen gebleichter PCs von EGFP-SYCP1 erholten sich zu 10,8% (blaue Kurve), die von EGFP-SYCP1_Δ2-120 zu 30,8% (pinke Kurve). Im Gegensatz dazu erholte sich die Fluoreszenz gebleichte Stellen im homogen verteiltem EGFP-SYCP1_Δ820-997 sehr schnell und erreichte mit 91,3% fast Ausgangsstärke (grüne Kurve).

Da die Deletion der nicht-helikalen Termini sich unterschiedlich auf das Polymerisationsverhalten der Moleküle auswirkte (vgl. 5.6 und 5.7), wurde mittels FRAP untersucht, ob sich die Dynamik dieser Deletionsmutanten vom wildtypischen Protein unterschied.

SYCP1_Δ2-120, die Deletion des nicht-helikalen N-Terminus, ist immer noch fähig PCs zu bilden (wenn auch nicht in dem Maße wie das wildtypische SYCP1, vgl. 5.6), was auch für das entsprechende EGFP-Fusionsprotein gilt (siehe Abbildung 5.9b). Im FRAP-Experiment wurden cytoplasmatische Fasern wie bereits beschrieben gebleicht und die Erholung gemessen. Auch in diesem Falle handelte es sich um ein relativ immobiles Protein, da die Erholung im Mittel nur 30,8% der Ausgangsfluoreszenz betrug, aber im Vergleich zum wildtypischen EGFP-Fusionsprotein (10,8%) konnte doch ein deutlicher Unterschied festgestellt werden. Diese Differenz ist mit einem berechneten p-Wert von 0,0016 hochsignifikant (vgl. 3.6.3). Die Moleküle innerhalb von PCs, die von SYCP1 Molekülen mit fehlendem nicht-helikalem N-Terminus gebildet wurden, waren demnach mobiler als die Wildtypischen, was auf eine geringere Stabilität dieser Polymere schließen läßt.

SYCP1 mit einer Deletion des nicht-helikalen C-Terminus konnte nicht mehr zu höheren Strukturen polymerisieren und lokalisierte ausschließlich homogen im Cytoplasma. Dies galt sowohl für das Protein mit myc-Epitop (mycSYCP1_Δ820-997; vgl. Abbildung 5.8) als auch für das entsprechende EGFP-Fusionsprotein (EGFP-SYCP1_Δ820-997, vgl. Abbildung 5.9c). Im FRAP-Experiment wurde ein Bereich im Cytoplasma gebleicht und die Erholung der Fluoreszenz beobachtet. Diese Erholung verlief sehr schnell und erreichte schon nach weniger als einer Minute ein Plateau bei 91,3% der Ausgangsfluoreszenz. EGFP-SYCP1_Δ820-997 war also sehr mobil, was bereits seine homogene Verteilung im Cytoplasma nahe legte.

Bindungspartner von SYCP1

Einzelne Domänen von SYCP1 sind an jeder der Strukturen des Synaptonemalkomplexes (SC) beteiligt. Der C-Terminus des Proteins ist in den Lateralelementen (LEs) verankert. Und wie wir in den vorangegangenen Abschnitten gesehen haben, ist die „Coiled-Coil“-Domäne Hauptstrukturkomponente der Transversalfilamente (TFs) und zusammen mit dem N-Terminus strukturgebender Bestandteil des zentralen Elements (CE). Die Aufgabe der Verknüpfung der LEs kann SYCP1 nur über die Interaktion mit weiteren Proteinen bewirken. Für diese Interaktionen konnten innerhalb der LEs Evidenzen für die Bindung an SYCP2 von Katrin Bührle erbracht werden (Bührle, 2004; siehe Diskussion). In der zentralen Region waren zu Beginn meiner Arbeit keine weiteren Proteine auf molekularer Ebene bekannt.

Im Zuge der Erforschung der Meiose werden immer neue Proteine mit spezifischen Funktionen entdeckt. In einem Microarray Ansatz wurde von der Arbeitsgruppe Cooke in Edinburgh der Versuch unternommen, meiosespezifische Gene mit noch unbekannter Funktion zu identifizieren. Über die Auswertung von Expressionsprofilen der Hoden von *Dazl*^{h_{gut}m1/h_{gut}m1} Mäusen im Vergleich zu denen wildtypischer Mäusen wurden Gene identifiziert, deren Expressionsmuster sich während der Keimzellendifferenzierung stark änderte (Maratou *et al.*, 2004). Nun wurden verschiedene Kriterien angewandt, um Gene einzugrenzen, die einer näheren Charakterisierung unterzogen werden sollten. Es wurden solche mit ansteigender Expressionsrate zwischen dem siebten und elften Tag nach der Geburt, wo nur Zellen der frühen Meiose zu finden sind, herangezogen und unter diesen diejenigen ausgewählt, die häufig in hodenspezifischen ESTs („expressed sequence tags“) gefunden wurden, deren Funktion unbekannt war und deren spezifische Expression in Spermatozyten über in-situ Hybridisierung und Northern Blot nachgewiesen werden konnte. Proteinprodukte zweier dieser Gene konnte ich in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Cooke charakterisieren. Es handelte sich dabei um das 329 Aminosäure lange Protein **Sycc1** (Synaptonemal Complex Central Element 1, AK_016694) und das Protein **Cesc1** (Central Element Synaptonemal Complex 1, NM_027954) mit einer Länge von 171 Aminosäuren (Costa *et al.*, 2005).

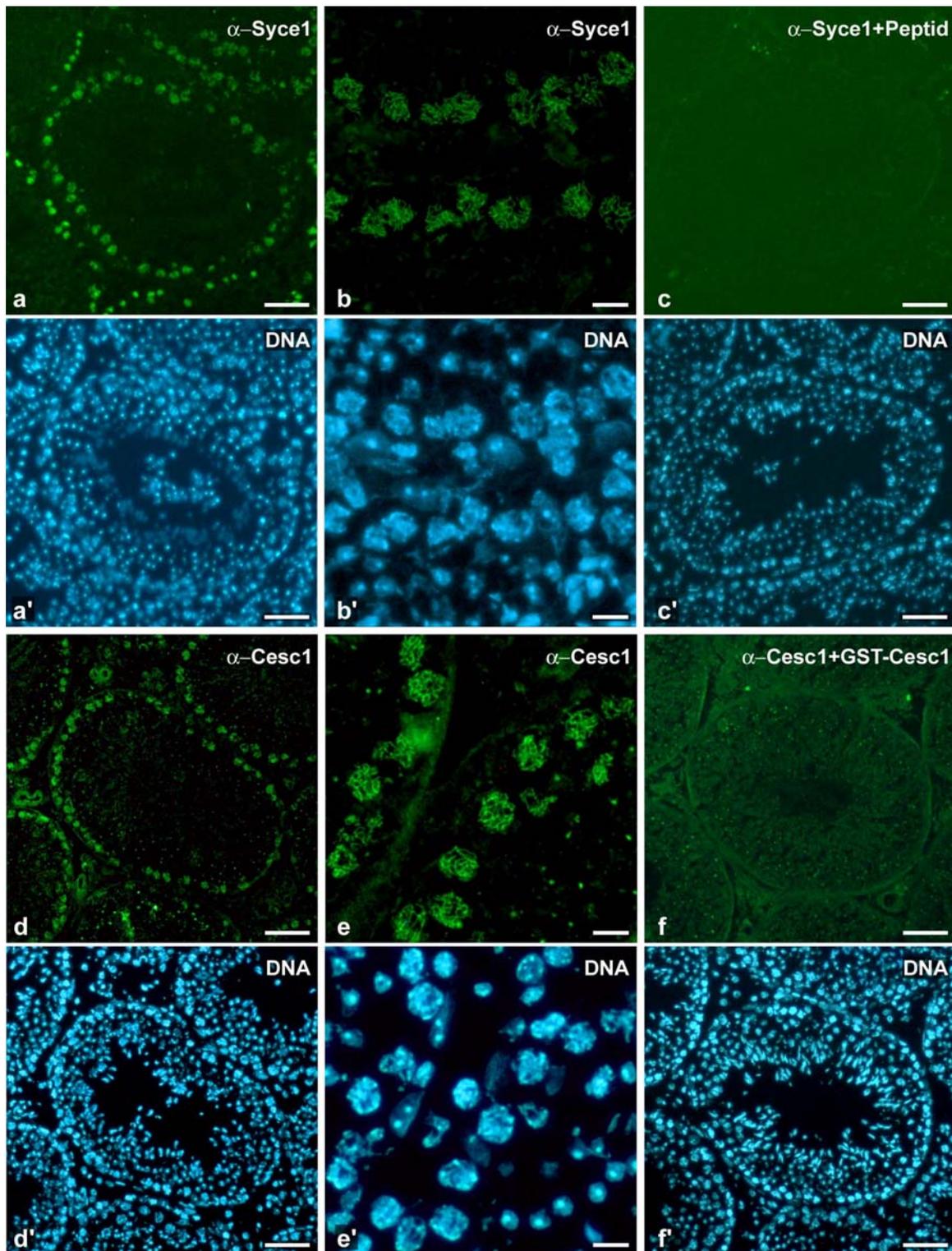


Abbildung 5.10: (a, b) Lokalisation von Syce1 mit affinitätsgereinigtem α -Syce1 und (d, e) Lokalisation von Cesc1 mit der IgG-Fraktion von α -Cesc1 auf Gefrierschnitten von Maushoden. Die Proteine wurden ausschließlich in Spermatozytenkernen an den Synaptonemalkomplexen erkannt. Zur Kontrolle der Spezifität der Signals wurde in einem Kompetitionsansatz (c) α -Syce1 mit dem Peptid inkubiert, gegen das das Serum affinitätsgereinigt wurde und (f) α -Cesc1 mit einem gereinigten GST-Cesc1 Fusionsprotein. a', b', c', d', e' und f' zeigen die dazugehörige DNA-Färbung mit Hoechst 33258. Die Größenstriche entsprechen in a, a', c, c', d, d', f und f' jeweils 50 μ m und in b, b', e und e' je 10 μ m.

5.9 Lokalisation der Proteine Syce1 und Cesc1

Zur Lokalisation von Syce1 und Cesc1 wurden Gefrierschnitte von Maushoden angefertigt und die Verteilung der Protein mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (vgl. 3.6.1). Dazu wurden ein affinitätsgereinigtes Serum gegen Syce1 und die IgG-Fraktion eines Serums gegen Cesc1 eingesetzt (vgl. 4.6.3). Wie in Abbildung 5.10 zu sehen ist, waren sowohl Syce1 als auch Cesc1 in den Spermatozytenkernen in Form fädiger Strukturen lokalisiert, bei denen nahe liegt, dass es sich um SCs handelt. Bei der Cesc1-Lokalisation wurden zusätzlich punktförmige Strukturen im Bereich der Spermatozyten angefärbt, bei denen es sich wahrscheinlich um die „residual bodys“ handelt, Cytoplasmareste, die von den Spermatozyten abgeschnürt werden und die von vielen Seren unspezifisch angefärbt werden. Zur Überprüfung der Spezifität der Signale wurde in einem parallelen Kompetitionsansatz die spezifische Reaktion der Antikörper mit den Antigenen geblockt. Dazu wurde die Inkubation des affinitätsgereinigten α -Syce1 in Gegenwart des Peptids (50 ng/ μ l), gegen das der Antikörper gereinigt wurde, durchgeführt. Zur Inkubation der IgG-Fraktion von α -Cesc1 wurde gereinigtes GST-Cesc1 Fusionsprotein zugegeben (100 ng/ μ l). Als direkte Folge der Zugabe der jeweiligen Antigene zu den Bindungsreaktionen wurde ein Ausbleiben der Färbung von SCs beobachtet. Die Färbung der „residual bodys“ mit α -Cesc1 wurde dadurch aber nicht beeinträchtigt, was bedeutet, dass es sich dabei lediglich um eine unspezifische Markierung handelte.

Bei Syce1 und Cesc1 handelt es sich also um Komponenten des SC.

Um die genaue Lokalisation der Proteine Syce1 und Cesc1 innerhalb des SC feststellen zu können, wurde eine preembedding Immungoldlokalisierung durchgeführt. Die Goldpartikel erscheinen im TEM als schwarze Punkte und können so bestimmten Strukturen zugeordnet werden. Dafür wurden Gefrierschnitte von Maushoden mit etwa 5 μ m Dicke angefertigt und darauf die Inkubation mit Antikörpern durchgeführt; mit den primären Antikörpern α -Syce1 (affinitätsgereinigt; 1:200) bzw. α -Cesc1 (IgG Fraktion; 1:200) und sekundären Antikörpern, an die 6nm große Goldpartikel konjugiert waren. Anschließend wurden die Schnitte für das TEM fixiert, eine Flacheinbettung durchgeführt und Ultradünnschnitte angefertigt (vgl. 3.6.2). Die Auswertung am TEM ergab eine deutliche Markierung des zentralen Elements (CE) sowohl durch die Antikörper, die spezifisch Syce1 erkannten, als auch durch die Antikörper spezifisch für Cesc1 (siehe Abbildung 5.11). Die Verteilung der Goldkörner wurde zusätzlich quantitativ ausgewertet, wobei jeweils der Abstand der Goldkörner im Verhältnis zum Abstand des LE von der Mitte des CE aus gemessen wurde. Dazu wurde dieser Abstand auf 1,0 normiert und der verhältnismäßige Abstand der Goldpartikel von der Mitte des CE ermittelt. Diese Werte wurden in zehn Quadranten aufgeteilt und in einen Graph aufgetragen (siehe Abbildung 5.11c). Zum besseren Verständnis wurden im Graph das CE zwischen zwei LEs platziert, wie es im SC der Fall ist, und die Werte für die Goldkörner an der Mitte des CE gespiegelt (Anderson *et al.*, 2005). Man kann deutlich erkennen, dass die Goldpartikel das CE markieren. Es wurden kaum Goldpartikel im Bereich der TFs und der LEs gezählt.

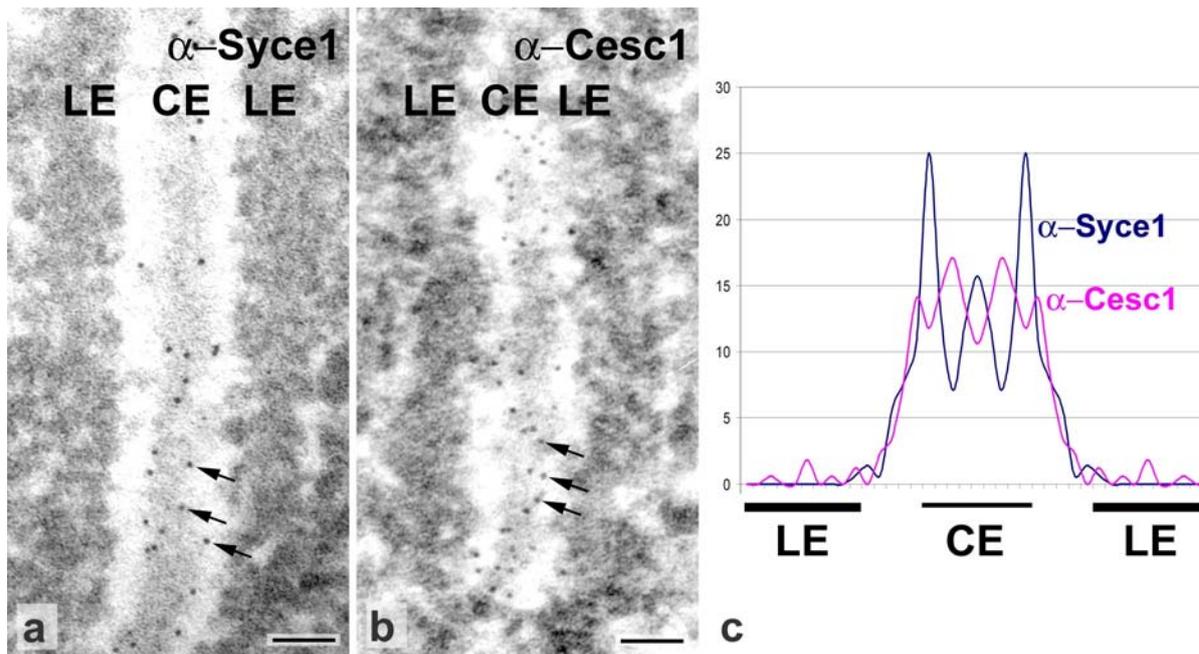


Abbildung 5.11: Immungoldlokalisation von (a) Syce1 und (b) Cesc1. Die Goldpartikel bei beiden Lokalisationen markierten fast ausschließlich das zentrale Element (CE) des SC (Pfeile in a und b).

(c) Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der Goldpartikel für Syce1 (n = 129) und Cesc1 (n = 161). Dabei wurde der verhältnismäßige Abstand der Goldpartikel von der Mitte des CE ermittelt. Die Werte wurden prozentual und um die Mitte des CE gespiegelt aufgetragen (vgl. Text). LE, Lateralelement, CE, zentrales Element. Die Größenstriche in a und b entsprechen 100 nm.

Die beiden neu identifizierten Proteine, Cesc1 und Syce1, sind also SC-Komponenten und die ersten bekannten Proteine, die ausschließlich Bestandteile des CE sind.

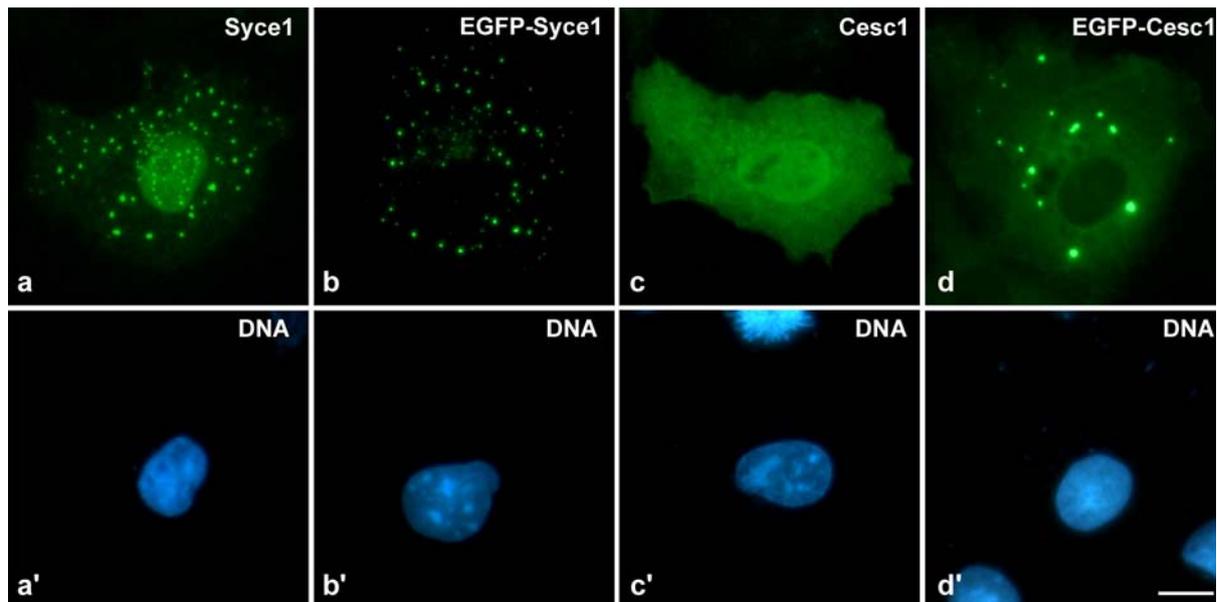


Abbildung. 5.12: Transfektion von Cos7 Zellen (a) Syce1 bildete in Cytoplasma und Nukleus Aggregate. (b) EGFP-Syce1 bildete im Cytoplasma Aggregate, wurde aber nicht mehr in den Nukleus importiert. (c) Cesc1 war homogen im Cytoplasma und Nukleus verteilt, während sich (d) EGFP-Cesc1 nur im Cytoplasma befand und dort zusätzlich zur homogenen Verteilung in den meisten Zellen Aggregate bildete. Syce1 und Cesc1 wurden mit spezifischen Antikörpern und die Fusionsproteine aufgrund ihrer Autofluoreszenz nachgewiesen. In a'-d' sind die dazugehörigen DNA-Färbungen mit Hoechst 33259 dargestellt. Der Größenstrich entspricht 10 μm .

5.10 Interaktionen von Syce1 und Cesc1

Da die Meiose von Säugern nicht in Kultur untersucht werden kann, wurde die mögliche Interaktion von meiotischen Bindungspartnern im heterologen System untersucht. Dazu wurden die Proteine in COS-7 Zellen koexprimiert und die Verteilung am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Eine Kollokalisierung der Proteine wird als mögliche Bindung gewertet. Dabei ist bei meiosespezifischen Proteinen von Vorteil, dass die transfizierten somatischen Zellen diese Proteine nicht endogen exprimieren. Diese Methode ist für die Untersuchung von Interaktionen etabliert und es wurde damit zum Beispiel die Bindung von SYCP2 und SYCP3 nachgewiesen (Pelttari *et al.*, 2001).

Zuerst wurde die Verteilung von Syce1 und Cesc1 bei alleiniger Expression in COS-7 Zellen untersucht. Unter diesen Bedingungen lagerte sich Syce1 in Cytoplasma und Nukleus zu feinen Aggregaten zusammen. Cesc1 war hingegen in beiden Kompartimenten homogen verteilt. Im Falle der Expression als EGFP-Fusionsproteine fand man beide Proteine ausschließlich im Cytoplasma. EGFP-Syce1 bildete dort Aggregate; EGFP-Cesc1 war im Cytoplasma homogen verteilt, bildete aber zusätzlich in den meisten Zellen einige große Aggregate (siehe Abbildung 5.12).

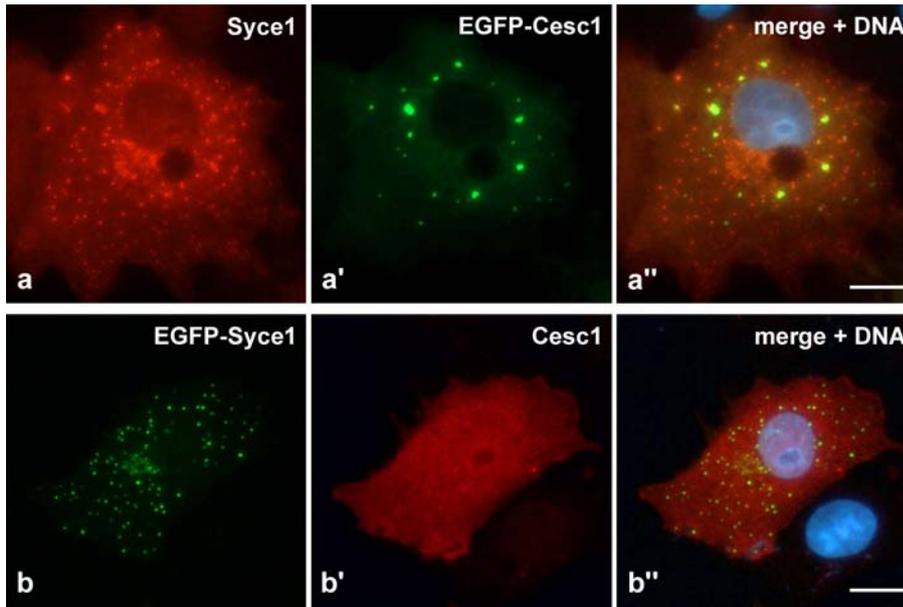


Abbildung 5.13: Kotransfektion von (a-a'') Syce1 und EGFP-Cesc1 bzw. (b-b'') EGFP-Syce1 und Cesc1. Dargestellt sind in der Antikörper-Nachweis von Syce1 in a und von Cesc1 in b', die EGFP-Fluoreszenz von EGFP-Cesc1 in a' und von EGFP-Syce1 in b. In a'' und b'' wurden die beiden Signale verrechnet (merge) und die DNA-Färbung mit Hoechst 33259 hinzugefügt. Bei beiden Varianten der Kotransfektion konnte eindeutig festgestellt werden, dass die beiden Proteine nicht kolokalisierten. Die Größenstriche entsprechen 10 µm.

Um die mögliche Interaktion von Syce1 mit Cesc1 zu untersuchen, wurden jeweils eines der Proteine wildtypisch und das andere als EGFP-Fusionsprotein in COS-7 Zellen koexprimiert, da beide verfügbaren Seren von Kaninchen stammten und deshalb ein gleichzeitiger Nachweis der wildtypischen Proteine mit Antikörper nicht möglich war. Wie man in Abbildung 5.13 deutlich sehen kann, kolokalisierten diese Proteine nicht. Die Aggregate von EGFP-Cesc1 wurden nicht von α -Syce1 erkannt und das Fusionsprotein EGFP-Cesc1 wurden in keinem Fall an Aggregate von Syce1 rekrutiert. Eine erkennbare aber vergleichsweise schwache Markierung der großen Aggregate von EGFP-Cesc1 durch α -Syce1 (vgl. Abbildung 5.13 a-a'') beruhte wahrscheinlich auf einer unspezifischen Bindung des Proteins Syce1 bzw. der primäre bzw. sekundäre Antikörper. Genauso deutlich war das Ergebnis im umgekehrten Fall. Das homogen verteilte Cesc1 wurde nicht an die Aggregate von EGFP-Syce1 rekrutiert. Um einen Einfluss der EGFP-Fusion letztlich auszuschließen, wurden auch beide Proteine in wildtypischer Form exprimiert und die Verteilung von jeweils einem über Immunfluoreszenzmikroskopie überprüft. Es konnte auch hier kein Unterschied der Verteilung im Vergleich zur alleinigen Expression festgestellt werden, wobei eine Interaktion entweder die Syce1 Aggregate auflösen oder die homogen verteilten Cesc1 Proteine an die Aggregate von Syce1 rekrutieren hatte müssen (nicht gezeigt).

Unter diesen experimentellen Bedingungen konnte also keine Interaktion von Cesc1 und Syce1 festgestellt werden.

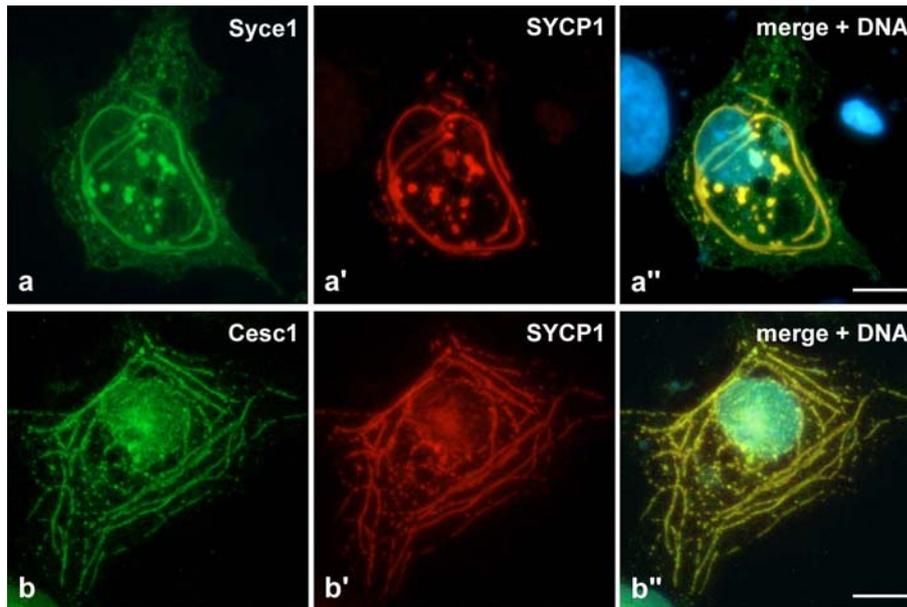


Abbildung 5.14: Koexpression von Syce1 und SYCP1 (a-a'') bzw. Cesc1 und SYCP1 (b-b'') in Cos7 Zellen. Sowohl Syce1 als auch Cesc1 wurden an die von SYCP1 gebildeten Polykomplexe (PCs) rekrutiert. Nachweis von Syce1 (a) mit affinitätsgereinigtem α -Syce1, von Cesc1 (b) mit der IgG-Fraktion von α -Cesc1 und von SYCP1 (a', b') mit VIIIId3. In a'' und b'' werden die zusammengeführten Signale (merge) zusammen mit der DNA-Färbung dargestellt. Die Größenstriche entsprechen 10 μ m.

5.11 Interaktion von Syce1 und Cesc1 mit SYCP1

Die mögliche Interaktion von meiosespezifischen Proteinen von Säugern können über Koexpressionsstudien in somatischen Zellen erforscht werden, wobei eine Kolokalisation, als Interaktion gewertet wird. Damit wurde zum Beispiel die Bindung zwischen SYCP2 und SYCP3 gezeigt (Pelttari *et al.*, 2001; vgl. dazu auch 5.10).

Der Versuchsansatz wurde hier genutzt, um die mögliche Interaktion von Syce1 und Cesc1 mit SYCP1 zu untersuchen. Die Proteine wurden in COS-7 Zellen koexprimiert und die Verteilung der synthetisierten Proteine am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Exprimierte man in COS-7 Zellen Syce1 zusammen mit SYCP1, dann wurde Syce1, das bei alleiniger Expression Aggregate in Kern und Cytoplasma bildet (vgl. Abbildung 5.12), an die cytoplasmatischen Fasern von SYCP1 rekrutiert. Auch Cesc1, das bei alleiniger Expression in COS-7 Zellen homogen in Kern und Cytoplasma verteilt ist (vgl. Abbildung 5.12), wurde bei Koexpression mit SYCP1 umverteilt und konnte an den cytoplasmatischen Fasern und Aggregaten von SYCP1 nachgewiesen werden.

Unter diesen experimentellen Bedingungen fand also eine Interaktion von SYCP1 sowohl mit Syce1 als auch Cesc1 statt.

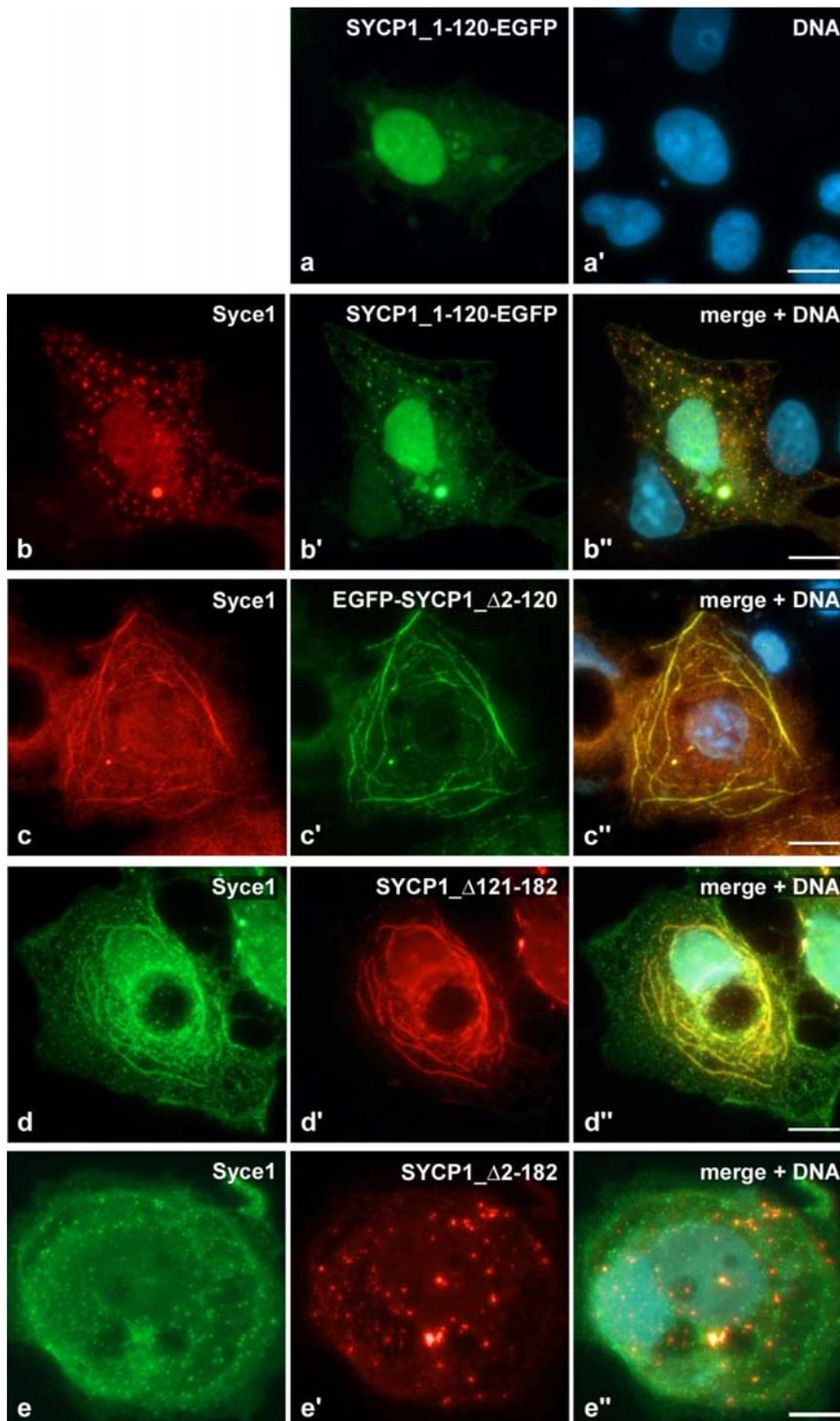


Abbildung 5.15: Transfektionen von COS-7 Zellen. (a) SYCP1_{1-120N}-EGFP war bei alleiniger Expression homogen verteilt, (b-b'') dessen Kotransfektion mit Syce1 bewirkte jedoch eine Bindung an die Aggregate von Syce1. Die Koexpression von Syce1 mit Deletionsmutanten von SYCP1, denen entweder (c-c'') der N-Terminus oder (d-d'') der erste Bereich der „Coiled-Coil“-Domäne fehlte, führt zur Bildung von PCs, an die immer noch Syce1 rekrutiert wurde. (e-e'') Aggregate die von SYCP1_{Δ1-182N} gebildet wurden, konnten Syce1 dagegen nicht mehr rekrutieren. Nachweis von Syce1 (b, c, d, e) mit α-Syce1. Nachweis der SYCP1 Deletionsmutanten mit EGFP-Fusion (a, b', c') über Autofluoreszenz und ohne Fusion (d', e') mit dem Antikörper VIIIId3. (a') DNA Färbung mit Hoechst 33258. (b'', c'', d'' und e'') Darstellung der zusammengeführten Signale der Kotransfektionen und der DNA Färbung. Alle Größenstriche entsprechen 10 µm.

Um den Bereich von SYCP1 einzugrenzen, an den Syce1 bindet, wurde Syce1 einerseits zusammen mit dem N-Terminus von SYCP1 und andererseits mit verschiedenen Konstrukten von SYCP1 koexprimiert, in denen ausgewählte Bereiche deletiert waren (vgl. Abbildung 5.15). Der N-terminale Bereich von SYCP1 wurde dabei gezielt untersucht, da er sich wie Syce1 im CE des SC befindet (Liu *et al.*, 1996; Schmekel *et al.*, 1996). Der Bereich der ersten 120 Aminosäuren von SYCP1 entspricht der nicht-helikalen N-terminalen Domäne. Bei Expression als EGFP-Fusionsprotein in COS-7 Zellen ist diese Domäne von SYCP1 homogen in Cytoplasma und Kern verteilt. Bei der Koexpression von SYCP1_{1-120N}-EGFP mit Syce1 konnte eine deutliche Kolokalisation nachgewiesen werden, da das Fusionsprotein nun an die Aggregate band, die von Syce1 gebildet wurden. Im Falle der Expression eines Konstrukts mit der Deletion des nicht-helikalen N-Terminus von SYCP1 (EGFP-SYCP1_{Δ2-120N}) konnte jedoch noch immer eine Kolokalisation mit Syce1 gezeigt werden. Dasselbe galt für die Deletion des ersten Bereichs der „Coiled-Coil“-Domäne von SYCP1 (SYCP1_{Δ121-181}). Erst bei der Koexpression von Syce1 mit einer weiteren Deletionsmutante von SYCP1 (SYCP1_{Δ1-181}), der sowohl der N-Terminus als auch der erste Bereich der „Coiled-Coil“-Domäne fehlte, konnte keine Kolokalisation mehr festgestellt werden. Diese Deletionsmutante von SYCP1 lagerte sich zu cytoplasmatischen Aggregaten zusammen und auch Syce1 bildete Aggregate im Cytoplasma. Diese Strukturen befanden sich aber völlig unabhängig im Cytoplasma und kolokalisierten nicht.

Als Ergebnis der Koexpression von verschiedenen Konstrukten von SYCP1 zusammen mit Syce1 konnten also mögliche Bereiche der Bindung auf die ersten 182 Aminosäuren eingegrenzt werden. Dabei konnte sowohl bei der Deletion des nicht-helikalen N-Terminus als auch des ersten Bereichs der „Coiled-Coil“-Domäne noch eine Interaktion beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass in beiden Bereichen von SYCP1 Bindungsstellen für Syce1 vorliegen.

6. Diskussion

6.1 Proteinfaltung und Polymerisation von SYCP1

In dieser Arbeit wurde die Fähigkeit von SYCP1 untersucht, geordnete Strukturen auszubilden. Grundlage dieser Annahme war der ausgedehnte zentrale α -helikale Bereich des Proteins, für den die Ausbildung einer „Coiled-Coil“-Domäne vorhergesagt wurde. Wie in Kapitel 1.6 ausgeführt, ist diese Vorhersage wegen der regelmäßigen Abfolge von Heptadsequenzen mit hydrophoben Aminosäuren an jeder ersten und vierten Stelle relativ gut zu treffen. Eine solche Domäne ist Bestandteil von vielen Proteinen und vermittelt deren Dimerisierung, indem sich die α -Helices umeinander winden und eine stäbchenförmige Domäne bilden, die große Stabilität aufweist. Die Abfolge der Heptaden weist in vielen Proteinen so genannte „Linker“-Regionen auf, an denen die „Coiled-Coil“-Domänen unterbrochen sind. Diese große Variabilität der „Coiled-Coil“-Domänen und die natürlich die restlichen Domänen verleihen den Proteinen mit diesem Strukturmotiv die weiteren Eigenschaften, die sie zur Erfüllung der unterschiedlichsten Aufgaben benötigen.

SYCP1 besitzt eine zentrale α -helikaler Region von über 700 Aminosäuren, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine „Coiled-Coil“-Domäne ausbildet und die von nicht-helikalen Domänen umgeben ist. Diese Struktur der Primärsequenz ist typisch für die Proteine, die in den unterschiedlichsten Organismen den Transversalfilamenten (TFs) des SC zugerechnet werden (vgl. 1.2.2.3). Die Proteine der TFs unterschiedlicher Organismen weisen allerdings

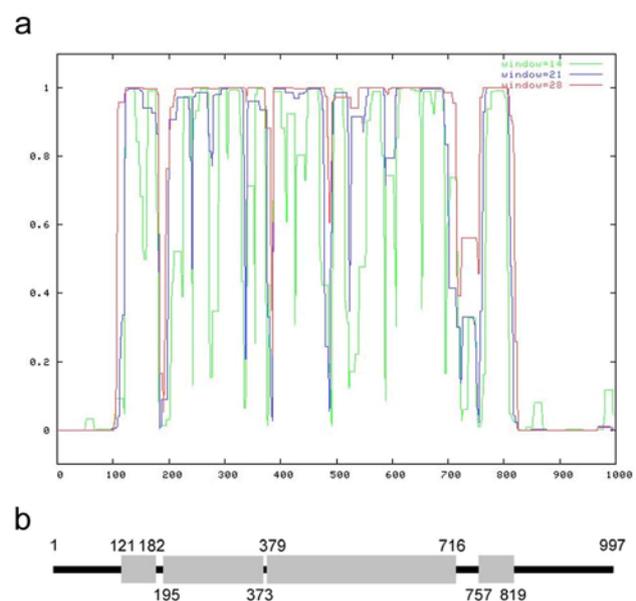


Abbildung 6.1: (a) Wahrscheinlichkeit der zentralen α -helikalen Region, eine „Coiled-Coil“-Domäne auszubilden. Diese ist mit Werten von bis zu 1,0 auf der y-Achse für den Bereich von Aminosäure 121 bis 819 sehr hoch. Dieser Bereich ist an manchen Stellen unterbrochen, wo die Wahrscheinlichkeiten deutlich nach unten gehen (Aminosäuren 183-194, 374-378 und 717-756). Die Graphik wurde mit dem Online-Tool „Paircoil“ (<http://paircoil.lcs.mit.edu/cgi-bin/paircoil>) erstellt. (b) Schematische Darstellung mit Angabe der Aminosäurereste der α -helikalen Bereiche von SYCP1 als graue Balken. Nicht-helikale Termini und Linker-Regionen werden mit schwarzen Balken dargestellt.

keine Homologien auf der Sequenzebene auf.

Bei SYCP1 erstreckt sich der α -helikale Bereich mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer „Coiled-Coil“-Domäne von Aminosäure 121 bis 820, unterbrochen von „Linker“-Regionen bei den Aminosäuren 183-194, 374-378 und 717-756 (vgl. Abbildung 6.1). Die Berechnung der „Coiled-Coil“-Domäne wurde mit dem Programm „PSort II“ durchgeführt (Horton und Nakai, 1997; <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>). Zur graphischen Darstellung wurde das Programm „Paircoil“ benutzt (<http://paircoil.lcs.mit.edu/cgi-bin/paircoil>).

Die terminalen Domänen Proteins zu beiden Seiten der „Coiled-Coil“-Domäne sind nicht-helikal und über deren Faltung liegen keine Daten vor. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass sie globuläre Strukturen ausbilden. Über Sequenzanalyse wurden einzelne Strukturmodule innerhalb des C-Terminus von SYCP1 identifiziert. Dieser enthält zwei mögliche Kernlokalisierungssequenzen und putative DNA-Bindungsmotive. Über das gesamte Protein verteilt sind verschiedene putative Phosphorylierungsstellen (Meuwissen *et al.*, 1992).

Über die Polymerisation von SYCP1 nach der Dimerisierung war nichts bekannt. Es wurde allerdings bereits als struktureller Bestandteil des Synaptonemalkomplexes (SC) charakterisiert. SYCP1 bildet also mit anderen Proteinen zusammen eine ausgeprägte höhere Struktur, die Teil des Karyoskeletts ist. Dabei wurde für die „Coiled-Coil“-Domäne von SYCP1 die Funktion als Transversalfilamente (TFs) prognostiziert. Die nicht-helikalen Bereiche sind Bestandteile verschiedener Struktureinheiten des SC. Der C-Terminus befindet sich in den LEs und der N-Terminus im zentralen Element (Liu *et al.*, 1996; Schmekel *et al.*, 1996). Es ist mit Sicherheit anzunehmen, dass diese Domänen dort Bindungen eingehen, die für die Anordnung der Moleküle innerhalb des Synaptonemalkomplexes entscheidend sind.

6.2 SYCP1 bildet Polykomplexe

In dieser Arbeit konnte durch die Expression von SYCP1 in somatischen Zellen nun erstmals gezeigt werden, dass SYCP1 ohne die Mitwirkung weiterer meiosespezifischer Proteine, insbesondere ohne Komponenten des SC, in der Lage ist, geordnete Strukturen zu bilden, die als lang gestreckte Fasern das Cytoplasma durchziehen. Auf ultrastruktureller Ebene offenbaren sich diese als wechselnde Abfolge von dicken und dünnen elektronendichten Balken, die durch Transversalfilamente (TFs) verknüpft sind. Dieser Aufbau gleicht parallel aneinander gereihten Stapeln von Synaptonemalkomplexen (SCs), in dem die dicken Balken den Lateralelementen (LEs) und die dünnen Balken zentralen Elementen (CE) entsprechen. Strukturen dieser Art waren bereits in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts in meiotischen Zellen identifiziert worden (Sotelo und Trujillo-Cenoz, 1960) und wurden Polykomplexe (PCs) genannt; deren molekulare Zusammensetzung blieb jedoch unbekannt (Überblick in Goldstein, 1987; vgl. Kapitel 1.3). Die Analyse der Organisation der SYCP1 Moleküle innerhalb der PCs zeigte, dass diese hochorganisiert vorliegen, wobei die C-Termini in den

die dicken elektronendichten Balken nachgewiesen wurden und die N-Termini in den dünnen. Die „Coiled-Coil“-Domänen der Moleküle bilden die TFs, die die Spalte zwischen den Balken überbrücken. Dies bedeutet eine klare Entsprechung der Organisation von SYCP1 innerhalb von PCs und SCs.

SYCP1 ist also fähig in Form von PCs zu polymerisieren und somit die Grundstruktureinheiten des SC allein auszubilden. Damit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass SYCP1 tatsächlich das TF-Protein der Säuger ist. Diese Zusammenlagerung ermöglichte uns darüber hinaus, den Einfluss verschiedener Domänen von SYCP1 auf die Polymerisation zu untersuchen. Dies war in dieser Arbeit erstmals für ein TF-Protein eines Säugers möglich, da die SC-Bildung *in vivo* experimentell nicht zugänglich ist (vgl. 1.4). Zuvor konnte die Bildung von PCs nur für Zip1, dem strukturell homologen Protein des Einzellers *S. cerevisiae* gezeigt werden, das keinerlei Homologie auf Sequenzebene aufweist (Sym und Roeder, 1995). Zip1 bildete PCs allerdings in meiotischem Umfeld und so konnte der Beitrag weiterer SC-Proteine nicht ausgeschlossen werden. Für das TF-Protein c(3)G, das strukturelle Homolog von *Drosophila*, das wiederum keine Sequenzhomologien zu SYCP1 oder Zip1 aufweist, wurden erst kürzlich erste vergleichbare Daten veröffentlicht (Anderson *et al.*, 2005). Dort wurde der Nachweis erbracht, dass die N-Termini im CE und die C-Termini in den LEs lokalisieren und dass das Protein PCs bilden kann.

Betrachten wir nun die einzelnen strukturellen Domänen der gebildeten PCs:

6.2.1 Aufbau der zentralen Region von PCs und SCs

Die **Transversalfilamente (TFs) und dünnen elektronendichten Balken** der hier beschriebenen PCs bilden eine Struktur, die morphologisch von der **zentralen Region (CR)** des SC nicht zu unterscheiden ist. In diesem Kapitel wird schlüssig begründet, warum nach den Erkenntnissen dieser Arbeit davon auszugehen ist, dass SYCP1 das strukturgebende Protein der CR also sowohl der TFs als auch der CE von SCs sein muss.

In dieser Arbeit konnte in dem heterologen Expressionssystem transfizierter COS-7 Kulturzellen nachgewiesen werden, dass SYCP1 TFs bildet. Für SYCP1 ist die Dimerisierung über die α -helikale Region in Form einer „Coiled-Coil“-Domäne vorhergesagt (vgl. 6.1) nach Lokalisierung der N-Termini im CE und der C-Termini in den LEs von SCs wurde diese Rolle für SYCP1 vorhergesagt (Liu *et al.*, 1996; Schmekel *et al.*, 1996). In dieser Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass SYCP1 alleine, ohne die Mithilfe weiterer SC-Protein, TFs ausbilden kann, die in den PCs die elektronendichten Balken verknüpft, die morphologisch CE und LEs von SCs gleichen (vgl. 5.3). Mit der Untersuchung des Einflusses der α -helikalen Domäne konnte überdies gezeigt werden, dass der Abstand der Wiederholungseinheit eines PC direkt von der Länge dieser Domäne abhängt (vgl. 5.5), d.h. die Weite der CR eines PCs wird direkt von der Länge der α -helikalen Domäne definiert. Dies

lässt darauf schließen, dass auch der Abstand der CR im SC direkt von der Länge der „Coiled-Coil“-Domäne von SYCP1 bestimmt wird.

Dieser unmittelbare Nachweis der Rolle eines TF-Proteins konnte bisher nur für das Hefeprotein Zip1 geführt werden. Das Protein bildet PCs (siehe oben) und über die Mutation der α -helikalen Domäne wurden ähnliche Untersuchungen unternommen wie in dieser Arbeit. Diese führten zu dem Ergebnis, dass Zip1 mit einer Verlängerung der „Coiled-Coil“-Domäne in Zellen ohne wildtypisches Zip1 verbreiterte PCs und SCs erzeugten und verkürzte „Coiled-Coil“-Domänen zur Bildung von engeren PCs führten, die Bildung von SCs aber nicht mehr möglich war (Dong und Roeder, 2000; Sym und Roeder, 1995).

Die **dünnen elektronendichten Balken** der PCs entsprechen in dem vorgestellten Modell dem **zentralen Element (CE)** des SC. Auf diesen Strukturen wurden in dieser Arbeit die N-Termini von SYCP1 lokalisiert, was der vorangegangenen Lokalisation dieser Domäne im CE entspricht (Liu *et al.*, 1996; Schmekel *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu bisherigen Modellen der Organisation des CE, konnte hier erstmals gezeigt werden, dass SYCP1 ohne die Hilfe anderer Proteine in der Lage ist, Strukturen zu bilden, die auf ultrastruktureller Ebene dem CE entsprechen.

In den Untersuchungen des N-terminalen Bereichs von SYCP1 konnte gezeigt werden, dass selbst nach der Deletion der nicht-helikalen N-Terminalen Domäne (SYCP1 Δ 2-120) die Polymerisation zu PCs noch möglich ist und immer noch ein erkennbarer elektronendichter Balken gebildet wird (vgl. 5.6). Dies ist beachtlich, da wegen der publizierten Interaktion der N-Termini von SYCP1, die über das Hefe „Two-Hybrid“-System nachgewiesen wurde (Liu *et al.*, 1996), ein Modell vorherrschte, nach dem die N-Termini für die Herstellung der Verbindung der SYCP1 Moleküle verantwortlich sind, die ausgehend von beiden LEs in die CR ragen. Allerdings ist die Interaktion der nicht-helikalen N-Termini am dünnen Balken wichtig, da die Polymerisationsfähigkeit dieser Deletionsmutante stark eingeschränkt ist und der Prozentsatz an Zellen, die PCs bilden, um 90% reduziert ist (vgl. 5.6). Zusätzlich weisen die Moleküle, die an ihrem Aufbau beteiligt sind, eine höhere Mobilität auf, wie FRAP-Experimente nachgewiesen haben (vgl. 5.8).

Die nicht-helikale N-terminale Domäne von SYCP1 ist also maßgeblich am Aufbau der dünnen Balken und des CE beteiligt. Da aber selbst nach der Deletion des nicht-helikalen N-Terminus noch die Bildung von erkennbaren Strukturen möglich ist, müssen weiter C-terminal gelegene Bereiche an deren Aufbau beteiligt sein. Die Deletion des α -helikalen Bereiches bis zur ersten „Linker“-Region bei Aminosäure 183 (SYCP1 Δ 121-182) führte tatsächlich zu einer Einschränkung der Polymerisation. Der Prozentsatz der Zellen, die cytoplasmatische Fasern aufwiesen war in dem Fall um 50% reduziert. Wurden nun in einem weiteren Konstrukt der N-Terminus und der erste α -helikale Bereich (SYCP1 Δ 2-182) entfernt, war die Bildung von PCs so stark eingeschränkt, dass kaum noch Zellen mit Fasern beobachtet werden konnten (vgl. 5.6).

Diese Ergebnisse bedeutet, dass die „Coiled-Coil“-Domänen, die von zwei gegenüberliegenden Seiten aus in die dünnen Balken bzw. das CE ragen, zumindest um mehr als den ersten Bereich (von

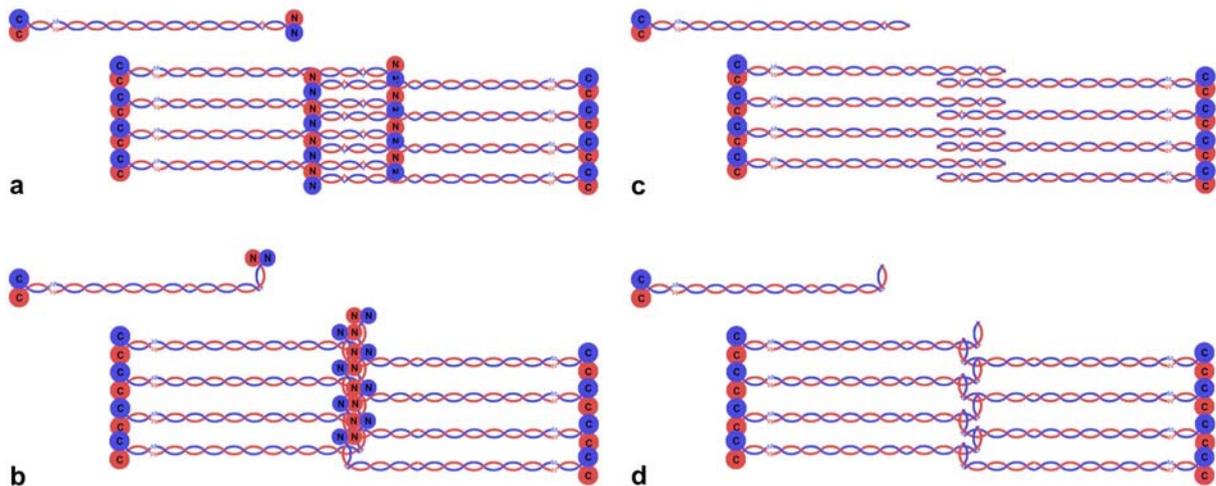


Abbildung 6.2: Schematische Darstellungen der möglichen Zusammenlagerung der N-terminalen Bereiche von SYCP1, um das CE zu bilden. (a) Die „Coiled-Coil“-Domäne ist vollständig gestreckt und überlappt im CE. (b) Die „Coiled-Coil“-Domäne ist im vorderen Bereich geknickt und verläuft dort entlang dem CE. (c, d) Bei einer Deletion des nicht-helikalen N-Terminus befindet sich im Modell mit dem Knick mehr proteinöses Material im CE als bei der „Coiled-Coil“-Domäne (vgl. Text).

Aminosäure 121-182) überlappen müssen und dass eine Interaktion zwischen diesen überlappenden Bereichen stattfindet. Weiterhin wichtig ist, dass bei der Deletion des nicht-helikalen N-Terminus ein erkennbarer dünner Balken ausgeprägt wurde. Da die „Coiled-Coil“-Domäne zwar sehr lang ist, aber mit etwa 2 nm Durchmesser auch sehr dünn, ist schwer vorstellbar, dass eine reine Überlappung dieser Domänen zu einer ultrastrukturell ausgeprägten Struktur führen sollte. Aus diesem Grund postulieren wir, dass sich im N-terminalen Bereich der „Coiled-Coil“-Domäne ein Knick befindet und der vorangehende Bereich entlang der dünnen Balken bzw. entlang des CE orientiert ist. Dies würde an dieser Stelle einen enormen Anstieg an proteinöser Masse bewirken und ließe die Ausbildung einer distinkten Struktur erklären (vgl. Abbildung 6.2). Die „Linker“-Region bei den Aminosäuren 183 bis 194 würde die Ausbildung eines Gelenks, an dem der „Coiled-Coil“-Domäne geknickt ist, wahrscheinlich erlauben, da diese an dieser Stelle unterbrochen ist (vgl. Abbildung 6.1).

6.2.2 Aufbau der dicken elektronendichten Balken von PCs und LEs von SCs

Die **dicken elektronendichten Balken** entsprechen in dem Modell den LEs eines SC und haben auch in etwa dieselbe Dimension. Die C-Termini sind auf den dicken Balken der PCs lokalisiert, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (vgl. 5.4), was der Lokalisation der C-termini durch Immungoldlokalisierung auf den LEs von SCs entspricht (Liu *et al.*, 1996; Schmekel *et al.*, 1996).

Der Vergleich zu den LEs lässt aber einige Fragen offen. Bei Stapel von SCs würden die Aufeinanderlagerung von zwei LEs doppelt so breite Strukturen erwarten lassen. Zusätzlich sind zwei weitere Proteinkomponenten der LEs bekannt, das Protein SYCP3 und das Protein SYCP2 (siehe Kapitel 1.2.3). Der Nachweis, dass diese Proteine die strukturbildenden Komponenten der LEs sind, wurde in *SYCP3* Knockout-Mäusen geführt. Bei diesen Mäusen, wo auch SYCP2 nicht an die Chromosomenachsen bindet, sind ultrastrukturell keine axialen bzw. lateralen Elemente nachzuweisen. An manchen Stellen sind die Achsen der homologen Chromosomen allerdings über SYCP1 verbunden und hier kann eine zentrale Region beobachtet werden; allerdings ohne LEs (Liebe *et al.*, 2004).

Im PC sind die C-Termini von SYCP1 auf den dicken Balken lokalisiert, im Gegensatz zum SC stoßen aber hier zwei Lagen von SYCP1 Molekülen aufeinander. Wie hier durch Untersuchung des Einflusses des C-Terminus auf die Polymerisation gezeigt werden konnte, hebt die Deletion des C-Terminus diese Interaktion auf und es kann zu keiner Zusammenlagerung mehr kommen (vgl. 5.7). Die Moleküle bilden keine höheren Strukturen mehr. Die Dynamik der Moleküle ändert sich entsprechend, wie im FRAP-Experiment nachgewiesen wurde. Nach Deletion des C-Terminus zeigt SYCP1 eine außerordentlich hohe Mobilität, während die wildtypischen Proteine kaum mobil sind (vgl. 5.8). Aus diesen Ergebnissen folgt der Schluss, dass die C-Termini, die hier wahrscheinlich in größerer Dichte als im SC vorkommen, die dicken Balken bilden und eine Verknüpfung von zwei Lagen von SYCP1 Molekülen vermitteln. Dies impliziert, dass die C-Termini untereinander eine Bindung eingehen, die für das Protein SYCP1 noch nicht bekannt war. Der für die Interaktion bedeutsame Bereich des C-Terminus konnten hier auf die Aminosäuren 820 bis 913 eingegrenzt werden, da die Deletion der nachfolgenden Aminosäuren 914 bis 997 die Polymerisationsfähigkeit von SYCP1 zwar einschränkt, aber nicht aufheben kann (vgl. 5.7).

Bisher veröffentlichte Experimente konnten eine Interaktion der C-Termini nicht zeigen. Im Hefe Two-Hybrid System konnte für die C-Termini und ausgewählte zentrale Regionen von Syn1, dem Hamsterhomolog von SYCP1, keine homotypischen Interaktionen nachgewiesen werden (Tarsounas *et al.*, 1997). Es kann aber sein, dass dieses experimentelle System im Falle des C-Terminus versagt hat. Dazu muss man anmerken, dass die Interaktion der zentralen Bereiche in Form einer „Coiled-Coil“-Domäne allgemein anerkannt sind, diese aber in der Arbeit von Tarsounas und Kollegen nicht gezeigt werden konnten. Es liegt also nahe, dass dies auch beim C-Terminus der Fall gewesen sein könnte.

Interaktionen des C-Terminus von SYCP1 mit weiteren Proteinen wurden in der Literatur bislang nicht beschrieben. Die vorhergesagten DNA-Bindungsmotive in dieser Domäne könnten aber im LE an das Chromatin binden und eine Verankerung stabilisieren. Neuere Erkenntnisse bieten Untersuchungen, die hier in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden. Über die Methode der Koexpression in somatischen Kulturzellen Hinweise für die Bindung von SYCP1 und SYCP2 erhalten (Bührle, 2004). Mit dieser Methode konnte bereits die Interaktion von SYCP2 und SYCP3 gezeigt

werden (Peltari *et al.*, 2001). Da der C-Terminus von SYCP1 in den LEs nachgewiesen wurde (Liu *et al.*, 1996; Schmekel *et al.*, 1996) und SYCP2 Bestandteil der LEs ist, ergibt sich folgende putative Beziehung: SYCP2 vermittelt die Bindung von SYCP1 an SYCP3, das zusammen mit den Kohäsinen das Gerüst der LEs aufbaut. Allerdings kann als sicher angesehen werden, dass SYCP1 noch an mindestens eine weitere Komponente der Chromosomenachse binden, da bei *SYCP3* Knockout-Mäusen dort weder SYCP3 noch SYCP2 vorhanden ist, SYCP1 aber dennoch an manchen Stellen eine SC-ähnliche Struktur mit vollständiger CR errichten kann (Liebe *et al.*, 2004).

6.3 Bindungspartner von SYCP1: Cesc1 und Syce1

Bislang wurden drei Proteine des Säuger-SC beschrieben: SYCP1, 2 und 3. SYCP2 und SYCP3 sind strukturelle Bestandteile der LEs. Dort sind die C-Termini von SYCP1 verankert. In der CR bildet SYCP1, wie in dieser Arbeit nun ausführlich gezeigt wurde, die TFs und die Basisstruktur des CE. Dies wirft die Frage auf, ob es noch weitere Proteinbestandteile der CR des SC gibt, oder ob SYCP1 die alleinige Komponente für die Bildung dieser Struktur ist.

In dieser Arbeit wurde nun gezeigt, dass die kürzlich identifizierten meiosespezifischen Proteine Syce1 (Synaptonemal Complex Central Element 1) und Cesc1 (Central Element Synaptonemal Complex 1) SC-Proteine sind. Über Immungoldlokalisierung konnten die Proteine als Bestandteile des CE identifiziert werden (vgl. 5.9). Damit sind Syce1 und Cesc1 die ersten Proteine, die ausschließlich Komponenten des CE darstellen.

Wie oben diskutiert, kann SYCP1 allein die PCs bilden, die eine CR enthalten, die von der CR von SCs morphologisch nicht zu unterscheiden ist. Also bildet SYCP1 die Grundstruktur der CR des SC. Mit hoher Wahrscheinlichkeit kann diese Struktur die Plattform für die Bindung weiterer Proteine bilden. Um diese Annahme für Syce1 und Cesc1 zu klären, musste untersucht werden, ob diese Proteine an SYCP1 binden, ob also SYCP1 nach Ausbildung des CE die weiteren Proteine rekrutiert. Über Koexpressionsexperimente konnte eine Interaktion von SYCP1 sowohl mit Syce1 als auch mit Cesc1 nachgewiesen werden. Im Fall von Syce1 wurde die Interaktion von SYCP1 mit Syce1 auf zwei Bereiche eingrenzen, den nicht-helikalen N-Terminus und den ersten Bereich der „Coiled-Coil“-Domäne, genau diejenigen Bereiche von SYCP1, die das CE bilden.

Biochemische Versuche zur Bindung von SYCP1 und Syce1 wurden im Labor von Howard Cooke durchgeführt. Dazu wurde in einem *in-vitro* Translationssystem die ersten 200 Aminosäuren von SYCP1 -markiert mit radioaktiven Methionin- synthethisiert (³⁵S N-term). Dieses Protein wurde darauf untersucht, ob es an eine Matrix bindet, an die GST-Syce1 bzw. GST-Cesc1 und zur Kontrolle GST gekoppelt war. Das Ergebnis war, dass ³⁵S N-term nicht an GST binden konnte, aber sowohl an GST-Cesc1 als auch an GST-Syce1 (Costa *et al.*, 2005). Diese Daten sind konsistent mit meinen

Ergebnissen. Sie bestätigen diese also, und grenzen zusätzlich den Bereich von SYCP1, an den Cesc1 bindet, auf die ersten 200 Aminosäuren ein.

Syce1 und Cesc1 sind also die ersten ausschließlichen Komponenten des CE, die identifiziert werden konnten, und sie sind Bindungspartner von SYCP1. Dabei binden sie an den N-terminalen Bereich von SYCP1, der die Grundstruktur des CE des SC ausbildet und an den dann vermutlich über Interaktion Syce1 und Cesc1 rekrutiert werden.

6.4 SYCP1 spielt eine zentrale Rolle in Synapse und Rekombination

In diesem Abschnitt soll noch einmal die Abfolge der Zusammenlagerung des SC während der Meiose beschrieben werden. Dabei soll besonders beleuchtet werden, welche Rolle SYCP1 spielt und welche Erkenntnisse aus der vorliegenden Arbeit für diesen Prozess abgeleitet werden können. Weitere Daten, die zum Verständnis der Funktion von SYCP1 wichtig sind, wurden in infolge der Charakterisierung der *SYCP1* Knockout-Maus kürzlich publiziert. Diese waren während der Anfertigung dieser Doktorarbeit noch nicht erhältlich, wie in diesem Kapitel jedoch zum Ausdruck kommt, bestätigen sie die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit.

Während der prä-meiotischen S-Phase wird die DNA repliziert und das Chromatin wird auf die ausschlaggebenden Ereignisse der Meiose vorbereitet, die Paarung, die Synapse und die Rekombination. Diese führen schließlich zur ordnungsgemäßen Segregation zuerst der homologen Chromosomen und anschließend der Chromatiden. Die Prozesse sind sowohl in ihrem zeitlichen Ablauf als auch auf molekularer Ebene miteinander verknüpft und können nicht unabhängig voneinander ablaufen. Wenn einer dieser Prozesse gestört ist, kann die Trennung der homologen Chromosomen nicht fehlerfrei ablaufen und es kommt zum Absterben der Zellen durch Apoptose oder zum Entstehen von aneuploiden Keimzellen.

Die Bindung von Kohäsinen an die Achsen der homologen Chromosomen bereiten diese auf die Ausbildung der LEs vor, wobei das Kohäsin Rec8 die erste meiosespezifische Komponente darstellt, die an die Chromosomenachsen assoziiert. Nach Rec8 binden das Kohäsin Rad21 und das LE-Protein SYCP3 und anschließend das LE-Protein SYCP2 und bilden auf diese Weise die Axialelemente (Eijpe *et al.*, 2003). Der erste Schritt der Rekombination ist die Einführung von Doppelstrangbrüchen (DSBs) durch Spo11, was die Voraussetzung für Paarung und Rekombination bildet. Die Paarung der homologen Chromosomen wird über die DSBs vermittelt, von denen einige zu axialen Assoziationen (AAs) reifen, an denen die Axialelemente (AEs) der homologen Chromosomen verbunden sind. Bei *S. cerevisiae* findet von diesen Stellen aus die Synapse statt, indem sich Zip1 Proteine, die TF-Proteine der Hefe, anheften und sukzessive die homologen Chromosomen verknüpfen, wie Reißverschlüsse, die von diesen Stellen aus zugezogen werden (Börner *et al.*, 2004). Dies läuft wohl bei Säugern

ähnlich ab, wo das Protein SYCP1 als Hauptbestandteil der TFs angesehen wird. Wie bei der Knockout-Maus von SYCP1 beobachtet werden konnte, liegen beim Fehlen von SYCP1 die homologen Chromosomen gepaart vor und es werden AEs gebildet. Die Chromosomen sind über AAs verbunden, aber es bildet sich kein SC aus. D.h. das Fehlen von SYCP1 bewirkt, dass die CR des SC nicht ausgebildet wird (de Vries *et al.*, 2005). Dies entspricht der Rolle von SYCP1 als Hauptstrukturprotein der TFs und der CE, die in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde. In Folge der Bindung an die LEs zu beiden Seiten der AAs sind die SYCP1 Moleküle in unmittelbarer Nähe und können über die N-terminalen Regionen interagieren. Von dort aus kann sich die Synapse über die gesamte Länge der Chromosomenachsen ausdehnen, indem sich SYCP1 sukzessive an die LEs anlagert und diese mit seinen N-Termini verbindet.

SYCP1 bildet in der CR das Grundgerüst der TFs und des CE, an das dann weitere Proteine assoziieren können. Hier wurde gezeigt, dass *Syce1* und *Cesc1* am CE binden. Bei der *SYCP1* Knockout-Maus befinden sich *Syce1* und *Cesc1* in Ermangelung an einer Bindungsstelle homogen verteilt im Cytoplasma (Costa *et al.*, 2005). Eine Bedeutung kommt diesen Proteinen möglicherweise in der Modulation der Bindungsstärke von SYCP1 zu. Schon früh wurde über die Analyse von Serien von Ultradünnschnitten gezeigt, dass der SC keine starre Struktur ist, sondern oft scharfe Knicke macht (Sotelo, 1969; Wettstein und Sotelo, 1971). Man kann argumentieren, dass die zusätzliche Bindung von Faktoren im CE die nötige Stabilität verleiht, um die homologen Chromosome trotz dieser auftretenden Kräfte zusammenzuhalten. Eine alternative Möglichkeit wäre, dass die zusätzlichen Proteine die starre Bindung von SYCP1 Molekülen untereinander auflockern und dem SC auf diese Weise die nötige Flexibilität verleihen würde.

Wie in der *SYCP1* Knockout-Maus nachgewiesen wurde ist SYCP1 auch für die Reifung der DSBs zu Crossover-Produkten notwendig. In Abwesenheit von SYCP1 scheint die Rekombination im Leptotän noch normal, was über den Nachweis von Doppelstrangbrüchen (DSBs) durch die Markierung von γ H2AX gezeigt wurde. Im Gegensatz zu wildtypischer Differenzierung wird die Phosphorylierung von H2AX dagegen nicht aufgelöst. Dasselbe Muster konnte auch für andere Marker von frühen und mittleren Stadien der Bildung von Crossover-Produkten nachgewiesen werden, die in frühen Stadien normal erscheinen, deren Anzahl später aber auch nicht abnimmt. Spätere Differenzierungsstadien der Rekombination konnten mit spezifischen Markern wie MLH1 und MLH3 nicht nachgewiesen werden. Chiasmata wurden in nur sehr wenigen Zellen entdeckt. Für die erfolgreiche Umwandlung von DSBs zu Crossover ist wahrscheinlich die große physische Nähe wichtig, in die die homologen Chromosomen über SYCP1 gebracht werden. Es könnte aber auch sein, dass bestimmte strukturelle Veränderungen eine Rolle spielen, die durch die Bindung von TF-Proteinen erreicht werden. Dies wird in einem aktuellen Modell für die Rekombination von Hefe diskutiert (Börner *et al.*, 2004). Eine weitere Möglichkeit für den Einfluss des SC auf die Rekombination wäre, dass Proteine, die für die Rekombination verantwortlich sind, an SC-Proteine binden. Dies konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden und zudem ist auffallend, dass die Rekombinationsproteine eine starke

evolutive Konservierung aufweisen, während die SC-Proteine offensichtlich in allen untersuchten Modellorganismen keine Sequenzhomologie besitzen. Dies spricht gegen die Konservierung von möglichen Bindungsdomänen zwischen Proteinen des SC und der Rekombination.

Im Übergang vom Pachytän zum Diplotän wird der SC abgebaut, die Chromosomen hängen daraufhin noch an den Chiasmata aneinander, die mikroskopischen Verkörperungen der Crossover-Produkte. Für den Abbau spielen höchstwahrscheinlich Phosphorylierungen eine Rolle, da dieser Prozess durch Okadasäure, einem Proteinphosphatase-Hemmstoff, beschleunigt werden kann. In diesem Stadium wurden am häufigsten Polykomplexe (PCs) in Zellen gefunden und man ging davon aus, dass es sich dabei um Zusammenlagerungen von freigesetzten SC-Komponenten handelt (Goldstein, 1987). Mit den Erkenntnissen dieser Arbeit dürfte klar sein, dass SYCP1 die Hauptkomponente der PCs darstellt. Diese Proteine können sich, wie gezeigt wurde, spontan selbst zu PCs zusammenlagern. Eine mögliche Erklärung für die Konservierung dieser Struktur in den verschiedensten Organismen mit unterschiedlichen TF-Proteinen könnte sein, dass diese Proteine nach dem Abbau des SC durch Selbstzusammenlagerung gebunden werden, in gewisser Weise also inaktiviert werden. So könnten die verschiedenen Domänen mit ihren verschiedenen Eigenschaften keinen Einfluss mehr auf die folgende Segregation der Chromosomen nehmen, der sich möglicherweise schädlich auswirken würde.

6.5 SYCP1 als CTA

Wie in der Einführung beschrieben ist, handelt es sich bei „Cancer/Testis“-Antigenen (CTAs) um Tumorantigene, deren Expression außer in Tumoren in normalen Geweben nur in Hoden, Ovar und Plazenta nachweisbar ist. CTAs werden als hervorragende Kandidaten für Immuntherapien gehandelt, da sie Krebszellen von gesunden Zellen unterscheiden und nicht in lebenswichtigen Organen exprimiert werden (vgl. 1.5).

Über die Funktion der in Tumorzellen exprimierten CTAs gibt es kaum Erkenntnisse. Die Expression könnte einerseits ein sekundärer Effekt der genomischen Instabilität von Krebszellen sein. Andererseits könnte die CTA-Expression gerade diese Instabilität begünstigen, was damit begründet wird, dass einige der bekannten CTAs in Zusammenhang mit Chromosomenpaarung, Synapse und homologer Rekombination stehen (Übersicht zu CTAs in Kalejs und Erenpreisa, 2005).

Zu den CTAs mit einer putativen Rolle in diesen Prozessen gehört SYCP1 als Komponente des Synaptonemalkomplexes. SYCP1 war das erste CTA, das auf molekularer Ebene identifiziert werden konnte. Dessen Expression konnte in den verschiedensten Tumoren nachgewiesen werden (vgl. 1.5.1). Aufgrund seiner Bedeutung für die Synapse der homologen Chromosomen wurde die Expression von SYCP1 in Tumorzellen mit genetischer Instabilität in Verbindung gebracht (Türeci *et al.*, 1998). Kürzlich veröffentlichte Arbeiten haben weitere Hinweise für eine Funktion von SYCP1 in Tumorzellen geliefert. Die Expression von SYCP1, die in Pankreaskarzinomen häufig detektiert

wurde, liegt schon in Fällen chronischer Pankreatitis vor, die als Vorstufe zu Krebs gilt (Kubuschok *et al.*, 2004). In Ovariephithelkrebs wurde eine starke Korrelation der Expression von SYCP1 mRNA mit einer schlechten Prognose festgestellt (Tammela *et al.*, 2004). Diese Befunde deuten darauf hin, dass SYCP1 eine Bedeutung für die Pathogenese der Tumorentwicklung hat und möglicherweise nicht nur eine Begleiterscheinung der Tumorinstabilität ist.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Polymerisation von SYCP1 nach Überexpression in somatischen Kulturzellen. Da hier kein meiotisches Umfeld vorhanden ist, entspricht das experimentelle System in dieser Hinsicht einem Modell der Expression von SYCP1 in somatischen Zellen.

Die SYCP1-Moleküle polymerisieren dabei in etwa der Hälfte der Zellen im Cytoplasma zu Strukturen, die den SCs auf morphologischer Ebene gleichen, den so genannten Polykomplexen. Die restlichen Zellen, die SYCP1 synthetisieren, zeigen eine homogene Verteilung des Proteins in den Zellkernen (vgl. 5.3). Weiter wurde gezeigt, dass in dem experimentellen Umfeld der Koexpression verschiedener meiosespezifischer Proteine mit SYCP1 eine Interaktion nachgewiesen werden kann, d.h. SYCP1 kann auch ohne meiotisches Umfeld weitere Proteine des SC rekrutieren. Allgemein wurde beobachtet, dass es nach Expression von SYCP1 zu Umstrukturierungen des Chromatins kommt und die Zellen bei längerer Kultur relativ früh absterben, was mit den DNA-Bindungsmotiven im C-terminus von SYCP1 zusammenhängen kann. Dies ist ein Zeichen dafür, dass die Expression von SYCP1 für somatische Zellen negative Folgen hat.

Die Beantwortung der Frage, welche Rolle CTAs in Tumorzellen übernehmen könnten, kann erst nach ausreichender Aufklärung der Funktion der einzelnen Proteine angegangen werden. Dies trifft insbesondere zu, da in den Tumorzellen in den meisten Fällen verschiedene CTAs gleichzeitig exprimiert werden. Hypothesen, die ein keimzellspezifisches Programm diskutieren, das möglicherweise in den Tumorzellen für die genetische Instabilität verantwortlich ist, können erst bei Bekanntsein der Beziehungen dieser CTAs zueinander verifiziert oder falsifiziert werden. Dieser Weg ist allerdings mühsam. Die Erkenntnisse die bei der Charakterisierung von SYCP1 und seiner Domänen für seine Polymerisationsfähigkeiten in somatischen Zellen gemacht wurden und die Schlussfolgerungen, die sich daraus für die Bildung des SC ergeben, liefern ein erweitertes und fundiertes Bild der möglichen Rollen von SYCP1. Die Bildung von SC-ähnlichen Strukturen und die Befähigung des Proteins weitere Proteine des SC zu rekrutieren, zeigen darüber hinaus, dass SYCP1 zumindest einen Teil seiner Funktionen auch ohne meiotisches Umfeld erfüllen kann.

6.6 Ausblick

Diese Arbeit stellt einen wichtigen Beitrag zur Erforschung der Zusammenlagerung des SC dar, lässt aber zwangsläufig viele Fragen offen.

Einen wichtigen Aspekt, der noch beantwortet werden muss, stellen die Interaktionen der am Aufbau des SC beteiligten Proteine dar. Wie bindet SYCP1 an das LE? Welche Bereiche von SYCP1 sind für die Assoziation an SYCP2 wichtig? Gibt es weitere Interaktionspartner in dieser Struktur? Welche Proteine gibt es nach *Syce1* und *Cesc1* neben SYCP1 in der CR des SC? Hier bleibt noch die molekulare Identifizierung und die Charakterisierung des Proteins SC48 offen, einer Komponente der TFs (Smith und Benavente, 1992). Binden noch weitere Protein im CE an das Gerüst von SYCP1 binden? Welche Rolle spielen diese Proteine beim Aufbau eines funktionsfähigen SC?

Experimente, die zur Aufklärung dieser Fragen beitragen können, sind die weitere Suche nach Interaktionspartnern von SYCP1. Dies kann über das Hefe „Two-Hybrid“-System und Immunpräzipitation erfolgen. Diese Vorgehensweise wird in der Arbeitsgruppe verfolgt und resultiert hoffentlich in der Aufklärung von Interaktionen von SYCP1 mit weiteren Proteinen, seien sie nun bekannt oder neu zu identifizieren.

Bereits bekannte und neu identifizierte Proteine müssen weiterhin auf gegenseitige Interaktionen untersucht werden. Die Analyse von Knockout-Mäusen der bekannten Proteine war bislang äußerst hilfreich bei der Aufklärung der jeweiligen Proteinfunktionen und der Vernetzung der einzelnen Prozesse während der Meiose. Nach der Herstellung und Untersuchung der *SYCP1* Knockout-Maus sollte jetzt derselbe Ansatz für die Proteine *Syce1* und *Cesc1* durchgeführt werden. Dadurch wäre ein Einblick in die Rolle dieser Proteine bei SC-Bildung und Rekombination möglich.

Insgesamt bleibt die Meiose eine hochkomplexe Differenzierungsleistung, in der verschiedene Prozesse miteinander verschränkt werden, um die homologen Chromosomen zu rekombinieren und schließlich zu segregieren. Ein methodisches System, das für die Erforschung der Meiose von Säugern äußerst viel versprechend wäre, aber dessen technische Umsetzung noch im Ungewissen bleibt, ist die Verfügbarkeit von Kulturzellen aus Säugern, die die Meiose durchlaufen. An diesen könnte mit wesentlich größerer Effizienz die Charakterisierung von Proteinen vorgenommen werden, indem zum Beispiel durch RNAi Knockdown der Funktionsverlust von einem und mehreren Proteine verhindert werden könnte. Dabei könnten mit zusätzlicher Expression durch Transfektion auch leichter Untersuchungen von gezielten Mutationen bestimmter Proteine vorgenommen werden. Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit, wo diese Methode zur Untersuchung der Polymerisation von SYCP1 zu SC-ähnlichen Strukturen erfolgte. Anstrengungen Stammzellen aus Säugern zu kultivieren, die zu Keimzellen differenzieren, sind bislang aber an technischen Schwierigkeiten gescheitert.

Einen weiteren Schwerpunkt der Untersuchungen sollte die Erforschung der Auswirkungen der Expression von SYCP1 auf die Kulturzellen bzw. auf Tumorzellen bilden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich SYCP1 zu höheren Strukturen zusammenlagern kann, aber im Kern homogen verteilt vorliegt. Zusätzlich wurde eine Veränderung der Organisation des Chromatins beobachtet. Es ist nicht bekannt, über welche Mechanismen dies geschieht. Einerseits könnten dabei die DNA-Bindungsmotive von SYCP1 eine Rolle spielen. Andererseits werden die Achsen meiotischer Chromosomen, an denen der C-Terminus von SYCP1 verankert ist, durch die Bindung von Kohäsinen und Kondensinen ausgeprägt, deren richtige Zusammensetzung wichtig für die korrekte Segregation ist. Es ist bekannt, dass dies auch bei mitotischen Chromosomen der Fall, wobei die Komplexe hier eine andere Zusammensetzung aufweisen. Dennoch wäre vorstellbar, dass die Expression von SYCP1 zur Störung der Chromosomensegregation in der Mitose führt. In diesem Zusammenhang müsste die Chromatinorganisation, der Zellzyklus und die Ploidie von Tumorzellen untersucht werden, die SYCP1 exprimieren. Erkenntnisse in dieser Richtung würden für ein besseres Verständnis von SYCP1 und seiner möglichen Rolle bei der Tumorgenese sehr wertvoll sein.

Es ist auch nicht bekannt, mit welchen Proteinen der Tumorzelle SYCP1 interagieren könnte. Die Charakterisierung möglicher Bindungspartner von SYCP1 sollte also nicht nur in meiotischen Zellen sondern auch in Tumorzellen ermittelt werden. Dazu können Immunpräzipitation, „gel overlays“ und auch das oben genannte Hefe „Two-Hybrid“-System angewandt werden. Die Identität der mit SYCP1 interagierenden Proteine könnte dann mittels Massenspektrometrie bestimmt werden, woraufhin die mögliche Relevanz der ermittelten Bindungspartner bei der Pathogenese von Tumoren ebenfalls untersucht würde.

7. Referenzen.

- Agarwal, S., and Roeder, G.S. (2000). Zip3 provides a link between recombination enzymes and synaptonemal complex proteins. *Cell* *102*, 245-255.
- Alsheimer, M., Drewes, T., Schütz, W., and Benavente, R. (2005). The cancer/testis antigen CAGE-1 is a component of the acrosome of spermatids and spermatozoa. *Eur J Cell Biol* *84*, 445-452.
- Alsheimer, M., von Glasenapp, E., Schnolzer, M., Heid, H., and Benavente, R. (2000). Meiotic lamin C2: the unique amino-terminal hexapeptide GNAEGR is essential for nuclear envelope association. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 13120-13125.
- Anderson, L.K., Royer, S.M., Page, S.L., McKim, K.S., Lai, A., Lilly, M.A., and Hawley, R.S. (2005). Juxtaposition of C(2)M and the transverse filament protein C(3)G within the central region of *Drosophila* synaptonemal complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 4482-4487.
- Aravind, L., and Koonin, E.V. (1998). The HORMA domain: a common structural denominator in mitotic checkpoints, chromosome synapsis and DNA repair. *Trends Biochem Sci* *23*, 284-286.
- Armstrong, S.J., Caryl, A.P., Jones, G.H., and Franklin, F.C. (2002). Asy1, a protein required for meiotic chromosome synapsis, localizes to axis-associated chromatin in *Arabidopsis* and *Brassica*. *J Cell Sci* *115*, 3645-3655.
- Baarends, W.M., and Grootegoed, J.A. (2003). Chromatin dynamics in the male meiotic prophase. *Cytogenet Genome Res* *103*, 225-234.
- Baier, A., Alsheimer, M., und Benavente, R. Manuskript zur Polymerisation von SYCP3 in Arbeit.
- Bailis, J.M., and Roeder, G.S. (1998). Synaptonemal complex morphogenesis and sister-chromatid cohesion require Mek1-dependent phosphorylation of a meiotic chromosomal protein. *Genes Dev* *12*, 3551-3563.
- Bogdanov, Y.F., Dadashev, S.Y., and 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.
- Börner, G.V., Kleckner, N., and Hunter, N. (2004). Crossover/noncrossover differentiation, synaptonemal complex formation, and regulatory surveillance at the leptotene/zygotene transition of meiosis. *Cell* *117*, 29-45.
- Bührle, K. (2004). Molekulare Eigenschaften des Synaptonemalkomplexproteins 2. Diplomarbeit, Universität Würzburg, Würzburg.
- Colaiácovo, M.P., MacQueen, A.J., Martinez-Perez, E., McDonald, K., Adamo, A., La Volpe, A., and 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.
- 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.
- Couteau, F., Nabeshima, K., Villeneuve, A., and Zetka, M. (2004). A component of *C. elegans* meiotic chromosome axes at the interface of homolog alignment, synapsis, nuclear reorganization, and recombination. *Curr Biol* *14*, 585-592.
- 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., and Pastink, A. (2005). Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev* *19*, 1376-1389.

- Dobson, M.J., Pearlman, R.E., Karaiskakis, A., Spyropoulos, B., and Moens, P.B. (1994). Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J Cell Sci* *107*, 2749-2760.
- Dong, H., and Roeder, G.S. (2000). Organization of the yeast Zip1 protein within the central region of the synaptonemal complex. *J Cell Biol* *148*, 417-426.
- Eichmuller, S., Usener, D., Jochim, A., and Schadendorf, D. (2002). mRNA expression of tumor-associated antigens in melanoma tissues and cell lines. *Exp Dermatol* *11*, 292-301.
- Eijpe, M., Heyting, C., Gross, B., and Jessberger, R. (2000). Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes. *J Cell Sci* *113*, 673-682.
- Eijpe, M., Offenberg, H., Jessberger, R., Revenkova, E., and 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.
- Feng, L.X., Chen, Y., Dettin, L., Pera, R.A., Herr, J.C., Goldberg, E., and Dym, M. (2002). Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line. *Science* *297*, 392-395.
- Fung, J.C., Rockmill, B., Odell, M., and Roeder, G.S. (2004). Imposition of crossover interference through the nonrandom distribution of synapsis initiation complexes. *Cell* *116*, 795-802.
- Gilbert, S. F. *Developmental Biology*, third edition
- Goldstein, P. (1987). Multiple synaptonemal complexes (polycomplexes): origin, structure and function. *Cell Biol Int Rep* *11*, 759-796.
- Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2004). The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* *271*, 3459-3469.
- Gruber, S., Haering, C.H., and Nasmyth, K. (2003). Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell* *112*, 765-777.
- Haering, C.H., Lowe, J., Hochwagen, A., and Nasmyth, K. (2002). Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol Cell* *9*, 773-788.
- Haering, C.H., and Nasmyth, K. (2003). Building and breaking bridges between sister chromatids. *Bioessays* *25*, 1178-1191.
- Haffner, A.C., Tassis, A., Zepter, K., Storz, M., Türeci, O., Burg, G., and Nestle, F.O. (2002). Expression of cancer/testis antigens in cutaneous T cell lymphomas. *Int J Cancer* *97*, 668-670.
- Herrmann, H., and 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., Moens, P.B., Dettmers, R.J., Offenberg, H.H., Redeker, E.J., and Vink, A.C. (1989). Synaptonemal complex proteins. *Genome* *31*, 81-87.
- Hirano, T. (2002). The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes Dev* *16*, 399-414.
- Hollingsworth, N.M., and Byers, B. (1989). HOP1: a yeast meiotic pairing gene. *Genetics* *121*, 445-462.
- Hong, Y., Liu, T., Zhao, H., Xu, H., Wang, W., Liu, R., Chen, T., Deng, J., and Gui, J. (2004). Establishment of a normal medakafish spermatogonial cell line capable of sperm production in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* *101*, 8011-8016.
- Horton, P., and Nakai, K. (1997). Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* *5*, 147-152.

- Jager, D., Unkelbach, M., Frei, C., Bert, F., Scanlan, M.J., Jager, E., Old, L.J., Chen, Y.T., and Knuth, A. (2002). Identification of tumor-restricted antigens NY-BR-1, SCP-1, and a new cancer/testis-like antigen NW-BR-3 by serological screening of a testicular library with breast cancer serum. *Cancer Immun* 2, 5.
- Jessberger, R. (2005). How to divorce engaged chromosomes? *Mol Cell Biol* 25, 18-22.
- Kalejs, M., and Erenpreisa, J. (2005). Cancer/testis antigens and gametogenesis: a review and "brain-storming" session. *Cancer Cell Int* 5, 4.
- Kammerer, R. A., Schulthess, T., Landwehr, R., Lustig, A., Engel, J., Aebi, U., and Steinmetz, M. O. (1998). An autonomous folding unit mediates the assembly of two-stranded coiled coils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13419-13424.
- Kleckner, N., Storlazzi, A., and Zickler, D. (2003). Coordinate variation in meiotic pachytene SC length and total crossover/chiasma frequency under conditions of constant DNA length. *Trends Genet* 19, 623-628.
- Kubuschok, B., Xie, X., Jesnowski, R., Preuss, K.D., Romeike, B.F., Neumann, F., Regitz, E., Pistorius, G., Schilling, M., Scheunemann, P., Izbicki, J.R., Lohr, J.M., and Pfreundschuh, M. (2004). Expression of cancer testis antigens in pancreatic carcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Int J Cancer* 109, 568-575.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lammers, J.H., Offenberg, H.H., van Aalderen, M., Vink, A.C., Dietrich, A.J., and 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.
- Lee, J., Iwai, T., Yokota, T., and 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., and 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., and 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., Bjorkroth, B., Daneholt, B., and 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.
- Loidl, J., Klein, F., and Scherthan, H. (1994). Homologous pairing is reduced but not abolished in asynaptic mutants of yeast. *J Cell Biol* 125, 1191-1200.
- Luo, G., Huang, S., Xie, X., Stockert, E., Chen, Y.T., Kubuschok, B., and Pfreundschuh, M. (2002). Expression of cancer-testis genes in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Immun* 2, 11.
- Lynn, A., Ashley, T., and Hassold, T. (2004). Variation in human meiotic recombination. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5, 317-349.
- MacQueen, A.J., Colaiácovo, M.P., McDonald, K., and Villeneuve, A.M. (2002). Synapsis-dependent and -independent mechanisms stabilize homolog pairing during meiotic prophase in *C. elegans*. *Genes Dev* 16, 2428-2442.
- Maratou, K., Forster, T., Costa, Y., Taggart, M., Speed, R.M., Ireland, J., Teague, P., Roy, D., and Cooke, H.J. (2004). Expression profiling of the developing testis in wild-type and Dazl knockout mice. *Mol Reprod Dev* 67, 26-54.

- Mashino, K., Sadanaga, N., Tanaka, F., Yamaguchi, H., Nagashima, H., Inoue, H., Sugimachi, K., and Mori, M. (2001). Expression of multiple cancer-testis antigen genes in gastrointestinal and breast carcinomas. *Br J Cancer* *85*, 713-720.
- Mason, J. M., and Arndt, K. M. (2004). Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem* *5*, 170-176.
- McDougall, A., Elliott, D.J., and Hunter, N. (2005). Pairing, connecting, exchanging, pausing and pulling chromosomes. *EMBO Rep* *6*, 120-125.
- McKim, K.S., Jang, J.K., and Manheim, E.A. (2002). Meiotic recombination and chromosome segregation in *Drosophila* females. *Annu Rev Genet* *36*, 205-232.
- Meistrich, M. L. (1977). Separation of spermatogenic cells and nuclei from rodent testes. *Methods Cell Biol* *15*, 15-54.
- Meuwissen, R.L., Meerts, I., Hoovers, J.M., Leschot, N.J., and 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., Offenberg, H.H., Dietrich, A.J., Riesewijk, A., van Iersel, M., and Heyting, C. (1992). A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J* *11*, 5091-5100.
- Miyamoto, T., Hasuike, S., Yogev, L., Maduro, M.R., Ishikawa, M., Westphal, H., and Lamb, D.J. (2003). Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *Lancet* *362*, 1714-1719.
- Moses, M. J., Poorman, P. A., Roderick, T. H., and Davisson, M. T. (1982). Synaptonemal complex analysis of mouse chromosomal rearrangements. IV. Synapsis and synaptic adjustment in two paracentric inversions. *Chromosoma* *84*, 457-474
- Nasmyth, K. (2002). Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* *297*, 559-565.
- Niemeyer, P., Türeci, O., Eberle, T., Graf, N., Pfreundschuh, M., and Sahin, U. (2003). Expression of serologically identified tumor antigens in acute leukemias. *Leuk Res* *27*, 655-660.
- Offenberg, H.H., Schalk, J.A., Meuwissen, R.L., van Aalderen, M., Kester, H.A., Dietrich, A.J., and Heyting, C. (1998). SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nuc Acids Res* *26*, 2572-2579.
- Old, L.J. (2001). Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer Immun* *1*, 1.
- Page, S.L., and Hawley, R.S. (2001). c(3)G encodes a *Drosophila* synaptonemal complex protein. *Genes Dev* *15*, 3130-3143.
- Page, S.L., and Hawley, R.S. (2003). Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* *301*, 785-789.
- Page, S.L., and Hawley, R.S. (2004). The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol* *20*, 525-558.
- Paques, F., and Haber, J.E. (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* *63*, 349-404.
- Pelttari, J., Hoja, M.R., Yuan, L., Liu, J.G., Brundell, E., Moens, P., Santucci-Darmanin, S., Jessberger, R., Barbero, J.L., Heyting, C., and 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.

- Peng, J.R., Chen, H.S., Mou, D.C., Cao, J., Cong, X., Qin, L.L., Wei, L., Leng, X.S., Wang, Y., and Chen, W.F. (2005). Expression of cancer/testis (CT) antigens in Chinese hepatocellular carcinoma and its correlation with clinical parameters. *Cancer Lett* 219, 223-232.
- Petronczki, M., Siomos, M.F., and Nasmyth, K. (2003). Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112, 423-440.
- Phair, R. D., and Misteli, T. (2000). High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature* 404, 604-609.
- Pittman, D.L., Cobb, J., Schimenti, K.J., Wilson, L.A., Cooper, D.M., Brignull, E., Handel, M.A., and 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., and 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., and Barbero, J.L. (2001). Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat Cell Biol* 3, 761-766.
- Prüfert, K., Alsheimer, M., Benavente, R., and Krohne, G. (2005). The myristoylation site of meiotic lamin C2 promotes local nuclear membrane growth and the formation of intranuclear membranes in somatic cultured cells. *Eur J Cell Biol* 84, 637-646.
- Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Gross, B., and Jessberger, R. (2001). Novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1. *Mol Cell Biol* 21, 6984-6998.
- Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Hodges, C.A., Hunt, P.A., Liebe, B., Scherthan, H., and Jessberger, R. (2004). Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat Cell Biol* 6, 555-562.
- Rockmill, B., and Roeder, G.S. (1988). RED1: a yeast gene required for the segregation of chromosomes during the reductional division of meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 6057-6061.
- Rockmill, B., and Roeder, G.S. (1990). Meiosis in asynaptic yeast. *Genetics* 126, 563-574.
- Rockmill, B., Sym, M., Scherthan, H., and Roeder, G.S. (1995). Roles for two RecA homologs in promoting meiotic chromosome synapsis. *Genes Dev* 9, 2684-2695.
- Roeder, G.S. (1997). Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev* 11, 2600-2621.
- Sage, J., Martin, L., Cuzin, F., and Rassoulzadegan, M. (1995). cDNA sequence of the murine synaptonemal complex protein 1 (SCP1). *Biochimica et Biophysica Acta* 1263, 258-260.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Sahin, U., Koslowski, M., Türeci, O., Eberle, T., Zwick, C., Romeike, B., Moringlane, J.R., Schwechheimer, K., Feiden, W., and Pfreundschuh, M. (2000). Expression of cancer testis genes in human brain tumors. *Clin Cancer Res* 6, 3916-3922.
- Scanlan, M.J., Simpson, A.J., and Old, L.J. (2004). The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun* 4, 1.
- Schalk, J.A., Dietrich, A.J., Vink, A.C., Offenber, H.H., van Aalderen, M., and Heyting, C. (1998). Localization of SCP2 and SCP3 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Chromosoma* 107, 540-548.
- Schalk, J.A., Offenber, H.H., Peters, E., Groot, N.P., Hoovers, J.M., and Heyting, C. (1999). Isolation and characterization of the human SCP2 cDNA and chromosomal localization of the gene. *Mamm Genome* 10, 642-644.

- Schmekel, K., and Daneholt, B. (1995). The central region of the synaptonemal complex revealed in three dimensions. *Trends Cell Biol* 5, 239-242.
- Schmekel, K., Meuwissen, R.L., Dietrich, A.J., Vink, A.C., van Marle, J., van Veen, H., and Heyting, C. (1996). Organization of SCP1 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Exp Cell Res* 226, 20-30.
- Schütz, W., Alsheimer, M., Öllinger, R., and Benavente, R. (2005). Nuclear envelope remodeling during mouse spermiogenesis: postmeiotic expression and redistribution of germline lamin B3. *Exp Cell Res* 307, 285-291.
- Smith, A. (1992) Identifizierung und Charakterisierung von Meiose-spezifischen Zellkern-Proteinen, Universität Würzburg, Würzburg.
- Smith, A., and Benavente, R. (1992). Identification of a structural protein component of rat synaptonemal complexes. *Exp Cell Res* 198, 291-297.
- Sotelo, J.R. (1969). Ultrastructure of the chromosomes at meiosis. In: *Handbook of Molecular Cytology*, ed. Lima-de-Faria, Amsterdam and London: North-Holland Publishing Company, 412-433.
- Sotelo, J.R., and Trujillo-Cenoz, O. (1960). Electron microscope study on spermatogenesis. Chromosome morphogenesis at the onset of meiosis (cyte I) and nuclear structure of early and late spermatids. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 51, 243-277.
- Storlazzi, A., Xu, L., Schwacha, A., and 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.
- Sung, P., Krejci, L., Van Komen, S., and Sehorn, M.G. (2003). Rad51 recombinase and recombination mediators. *J Biol Chem* 278, 42729-42732.
- Sym, M., Engebrecht, J.A., and Roeder, G.S. (1993). ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis. *Cell* 72, 365-378.
- Sym, M., and Roeder, G.S. (1994). Crossover interference is abolished in the absence of a synaptonemal complex protein. *Cell* 79, 283-292.
- Sym, M., and Roeder, G.S. (1995). Zip1-induced changes in synaptonemal complex structure and polycomplex assembly. *J Cell Biol* 128, 455-466.
- Tammela, J., Jungbluth, A.A., Qian, F., Santiago, D., Scanlan, M.J., Keitz, B., Driscoll, D., Rodabaugh, K., Lele, S., Old, L.J., and Odunsi, K. (2004). SCP-1 cancer/testis antigen is a prognostic indicator and a candidate target for immunotherapy in epithelial ovarian cancer. *Cancer Immun* 4, 10.
- Tarsounas, M., Pearlman, R.E., Gasser, P.J., Park, M.S., and Moens, P.B. (1997). Protein-protein interactions in the synaptonemal complex. *Mol Biol Cell* 8, 1405-1414.
- Tarsounas, M., Pearlman, R.E., and 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.
- Tung, K.S., and Roeder, G.S. (1998). Meiotic chromosome morphology and behavior in zip1 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 149, 817-832.
- Türeci, O., Sahin, U., Zwick, C., Koslowski, M., Seitz, G., and Pfreundschuh, M. (1998). Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 5211-5216.
- Utsunomiya, T., Inoue, H., Tanaka, F., Yamaguchi, H., Ohta, M., Okamoto, M., Mimori, K., and Mori, M. (2004). Expression of cancer-testis antigen (CTA) genes in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 11, 934-940.

- Watanabe, Y., and Nurse, P. (1999). Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* *400*, 461-464.
- Webber, H.A., Howard, L., and Bickel, S.E. (2004). The cohesion protein ORD is required for homologue bias during meiotic recombination. *J Cell Biol* *164*, 819-829.
- Weiner, B.M., and Kleckner, N. (1994). Chromosome pairing via multiple interstitial interactions before and during meiosis in yeast. *Cell* *77*, 977-991.
- Wettstein, R., and Sotelo, J.R. (1971). The Molecular Architecture of Synaptonemal Complexes. In: *Advances in Cell and Molecular Biology*, vol. Vol. 1, New York and London: Academic Press, Inc., 109-152.
- Xie, X., Wacker, H.H., Huang, S., Regitz, E., Preuss, K.D., Romeike, B., Parwaresch, R., Tiemann, M., and Pfreundschuh, M. (2003). Differential expression of cancer testis genes in histological subtypes of non-Hodgkin's lymphomas. *Clin Cancer Res* *9*, 167-173.
- Xu, H., Beasley, M. D., Warren, W. D., van der Horst, G. T., and McKay, M. J. (2005). Absence of mouse REC8 cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis. *Dev Cell* *8*, 949-961.
- Yoshida, Y., Sadata, A., Zhang, W., Saito, K., Shinoura, N., and Hamada, H. (1998). Generation of fiber-mutant recombinant adenoviruses for gene therapy of malignant glioma. *Hum Gene Ther* *9*, 2503-2515.
- Yu, H.G., and 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., Brundell, E., and 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.
- Yuan, L., Liu, J.G., Hoja, M.R., Wilbertz, J., Nordqvist, K., and 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., and 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., Bjorkroth, B., Zhao, J., Liu, J.G., Brismar, H., Daneholt, B., and Höög, C. (1998). The synaptonemal complex protein SCP3 can form multistranded, cross-striated fibers in vivo. *J Cell Biol* *142*, 331-339.
- Yuasa, T., Okamoto, K., Kawakami, T., Mishina, M., Ogawa, O., and Okada, Y. (2001). Expression patterns of cancer testis antigens in testicular germ cell tumors and adjacent testicular tissue. *J Urol* *165*, 1790-1794.
- Zendman, A.J., Ruiters, D.J., and Van Muijen, G.N. (2003). Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function. *J Cell Physiol* *194*, 272-288.
- Zetka, M.C., Kawasaki, I., Strome, S., and Muller, F. (1999). Synapsis and chiasma formation in *Caenorhabditis elegans* require HIM-3, a meiotic chromosome core component that functions in chromosome segregation. *Genes Dev* *13*, 2258-2270.
- Zickler, D., and Kleckner, N. (1998). The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu Rev Genet* *32*, 619-697.
- Zickler, D., and Kleckner, N. (1999). Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet* *33*, 603-754.

8. Zusammenfassung

Das Synaptonemalkomplexprotein SYCP1 ist eine Strukturkomponente des Synaptonemalkomplexes (SC) von Säugern, einer meiosespezifischen Struktur, die wesentlich für die Synapse, Rekombination und Segregation homologer Chromosomen ist. Der SC besteht aus zwei lateralen Elementen (LEs) und einer zentralen Region (CR), in deren Mitte das zentrale Element (CE) liegt. Dabei sind die LEs den Achsen der homologen Chromosomen aufgelagert und werden in der CR durch Transversalfilamente (TFs) mit dem CE verbunden. Im Protein SYCP1 (125 kDa) flankieren zwei nicht-helikale terminale Domänen eine ausgedehnte zentrale „Coiled-Coil“-Domäne. Für diese Domäne wird angenommen, dass sie die Kluft zwischen LEs und CE überbrückt, wobei die C-Termini in den LEs verankert sind und die N-Termini im CE lokalisiert wurden.

Um die molekulare Architektur des SC besser zu verstehen und die Bedeutung von SYCP1 für die Zusammenlagerung des SC aufzudecken, wurden die Polymerisationseigenschaften von SYCP1 erforscht. Dazu wurde das Protein in somatischen Zellen exprimiert. In diesem experimentellem Ansatz polymerisierte SYCP1 autonom zu filamentösen Strukturen, welche sich auf ultrastruktureller Ebene als alternierende elektronendichte Balken offenbarten, die über TFs verbunden waren. Dieser Aufbau glich parallel aneinander gereihten Stapeln von SCs, so genannten Polykomplexen (PCs). Die Analyse der Orientierung der SYCP1 Moleküle innerhalb der PCs erwies, dass diese hochorganisiert vorliegen und die Organisation von SYCP1 innerhalb von PCs und SCs identisch ist. Folglich kann sich SYCP1 sogar in Abwesenheit anderer SC-Proteine zu Strukturen zusammenlagern, die der CR entsprechen und muss dementsprechend beim Aufbau der CR des SC den grundlegenden Faktor darstellen.

Für eine genauere Analyse wurden ausgewählte Mutanten von SYCP1 exprimiert. Moleküle mit modifizierter Länge der zentralen α -helikalen Domäne resultierten in der Bildung von PCs mit veränderter Weite der CR. Dies beweist, dass die „Coiled-Coil“-Domäne den Abstand der CR eines PC bestimmt und impliziert dieselbe Funktion in der SC-Bildung. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass SYCP1 Moleküle mit Deletion des nicht-helikalen N-Terminus immer noch in der Lage sind, PCs zu bilden, diese Eigenschaft aber stark eingeschränkt ist. Das bezeugt die Bedeutung des N-Terminus sowohl in der PC-Bildung als auch im Aufbau des CE von SCs, weist aber dabei auch dem vorderen Teil der „Coiled-Coil“-Domäne eine wichtige Rolle zu. Im Gegensatz dazu war bei Mutanten mit Deletion des nicht-helikalen C-Terminus die PC-Bildung vollständig blockiert, was auf eine große Bedeutung dieser Domäne für die Polymerisation hinweist.

Ein weiterer Hauptgegenstand der Arbeit war die Charakterisierung von Bindungspartnern von SYCP1. Über Immungoldlokalisation auf Mäushoden konnten die Proteine Syce1 und Cesc1 als erste ausschließliche Komponenten des CE des SC bestimmt werden. Zusätzlich wurde die Interaktion dieser Proteine mit dem N-Terminus von SYCP1 verifiziert. SYCP1 bildet also die Grundstruktur des CE aus und rekrutiert Syce1 und Cesc1.

8e. Summary

Architecture of Meiotic Chromosomes: Polymerization Properties of the Synaptonemal Complex Protein SYCP1 and Characterization of Binding Partners

The synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) is a structural component of the mammalian synaptonemal complex (SC), a meiosis-specific nuclear structure essential for synapsis, recombination and segregation of homologous chromosomes. The SC is a tripartite structure consisting of two lateral elements (LEs) and the central region (CR) with a central element (CE) in its middle. The LEs are attached to the axes of homologous chromosomes and are connected with the CE by transversal filaments (TFs). The protein SYCP1 (125 kDa) contains a long central α -helical domain, which is predicted to mediate dimerization in a parallel coiled-coil structure, flanked by two non-helical ends. The coiled-coil is thought to cross the gap between the LEs and the CE, the C-termini are anchored in the LEs and the N-termini have been localized to the CE.

In order to better understand the molecular architecture of the SC and the role of SYCP1 in SC-assembly the polymerization properties of SYCP1 were investigated. To this end the protein was expressed in somatic cells. In this approach SYCP1 is able to form stable filamentous structures autonomously, which on the ultrastructural level represent alternating lines connected by TFs. This composition resembles multimeric SC-like complexes arranged in parallel, so called polycomplexes (PCs). By determining the orientation of SYCP1 molecules it was proven that PCs are highly ordered structures with the same arrangement of SYCP1 molecules as in SCs. These results demonstrate that SYCP1 is able to assemble into structures closely resembling the CR of SCs even in the absence of other SC-proteins, which signifies that SYCP1 is the primary determinant of SC assembly which in turn plays a key role in synapsis of homologous chromosomes.

For a more detailed analysis, selected mutated constructs of SYCP1 were expressed. Mutations that modified the length of the central α -helical domain resulted in the formation of PCs consisting of repeat units of altered width, verifying that the coiled-coil domain determines the distance between the lines of the PC. This result implies the same function of this domain in SC assembly. Moreover, it was observed that SYCP1 molecules lacking the non-helical N-terminus are still able to form PCs, albeit at a strongly reduced level. This shows the importance of the N-terminus both in SYCP1 autoassembly and in the formation of the CE of SCs, but also implies a significant role of the N-terminal part of the coiled-coil domain. In contrast, when the non-helical C-terminus was deleted, filament formation was eliminated indicating a major role of the C-terminus in SYCP1 autoassembly.

Another major topic of this work was the characterization of SYCP1 binding partners. By immunogold localization on mouse testis the proteins Syce1 and Cesc1 could be identified as the first exclusive components of the CE of SCs. Furthermore, the interaction of these proteins with the N-terminal region of SYCP1 was validated. Hence, SYCP1 forms the basic structure of the CE and recruits Syce1 and Cesc1.

9. Publikationsliste

9.1 Veröffentlichte Publikationen als Autor und Koautor

Öllinger, R., Alsheimer, M., and Benavente, R. (2005). Mammalian protein SCP1 forms synaptonemal complex-like structures in the absence of meiotic chromosomes. *Mol Biol Cell* *16*, 212-217.

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.

Schütz, W., Alsheimer, M., **Öllinger, R.**, and Benavente, R. (2005). Nuclear envelope remodeling during mouse spermiogenesis: Postmeiotic expression and redistribution of germline lamin B3. *Exp Cell Res* *307*, 285-291.

Montaner, B., Castillo-Avila, W., Martinell, M., **Öllinger, R.**, Aymami, J., Giralt, E., and Perez-Tomas, R. (2005). DNA interaction and dual topoisomerase I and II inhibition properties of the anti-tumor drug prodigiosin. *Toxicol Sci* *85*, 870-879

9.2 Beteiligungen an Kongressen mit veröffentlichten Abstracts

- 12th AEK Congress Würzburg, 25. – 28. März 2003
Titel: “Polymerization Properties of the Cancer/Testis Antigen SCP1”
- 27. DGZ-Jahrestagung in Berlin, 24. – 27. März 2004
Titel: “Polymerization Properties of the Synaptonemal Complex Protein 1”
- 13th International AEK/AIO Cancer Congress, 13. – 16. März 2005
Titel: “Polymerization Properties of the Cancer/Testis Antigen SCP1”

10. Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich,

dass ich die Dissertation selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe,

dass die Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat,

und dass ich noch keine akademischen Grade erworben habe und früher auch noch nicht versucht habe einen akademischen Grad zu erwerben.

Würzburg, den 12. August, 2005

Rupert Öllinger

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Rupert Öllinger
Geburtsdatum: 02.04.1974
Geburtsort: Traunstein
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1981 - 1983 Grundschule St. Leonhardt
1983 - 1984 Grundschule Otting
1984 - 1994 Chiemgau-Gymnasium Traunstein
Jun 1994 Allgemeine Hochschulreife

Ersatzdienst

Okt 1994 bis Dez 1995 Zivildienst in Bayerisch Gmain

Studium

1997 – 2002 Biologiestudium an der Bayerischen Julius Maximilians Universität Würzburg
Studienschwerpunkte: Zell- und Entwicklungsbiologie
Biochemie
Pflanzenphysiologie

2002 – 2002 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie an der Bayerischen Julius Maximilians Universität Würzburg bei Prof. Dr. Ricardo Benavente
Thema: „Das zeitliche Expressionsmuster von Lamin B3 während der Spermatogenese der Maus“

2002 – 2005 Promotionsstudium am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie an der Bayerischen Julius Maximilians Universität Würzburg bei Prof. Dr. Ricardo Benavente
Titel: „Architektur meiotischer Chromosomen: Polymerisationseigenschaften des Synaptonemalkomplexproteins SYCP1 und Charakterisierung von Bindungspartnern“

... For small erections may be finished by their first architects; grand ones, true ones ever leave the capstone to posterity. God keep me from ever completing anything. This whole book is but a draught - nay, but the draught of a draught. Oh, Time, Strength, Cash, and Patience.

Moby Dick, Herman Melville

Danksagung

Als erstes möchte ich meinen Eltern Antonie und Hans danken. Wie schon im ersten Satz der Einführung deutlich wird, wäre die vorliegende Arbeit ohne sie nie und ohne ihre drängenden Fragen wohl auch nicht so schnell entstanden. Ich möchte nun auch gleich meine ganze Familie Katharina, Evi, Wolfgang, Bernhard, Susanne, Tobias und Sophia und ihre Unterstützung würdigen. Danke

Als Nächstes hat diese Arbeit natürlich maßgeblich die Arbeitsgruppe ermöglicht. Ich betrachte es nach wie vor als Glücksfall, hier gelandet zu sein. Ihr seid mir alle gute Freunde geworden.

Ricardo und Manfred: Ihr beide an der Spitze unserer Gruppe seid ein super Team, das nicht nur jedes Projekt eurer Mitarbeiterschar im Blick hat sondern mit super theoretischen und praktischen Vorgaben und Hilfestellungen am laufen haltet. Mit Sicherheit habt ihr meine Sicht auf die Forschung in einer Art und Weise geprägt, die mich noch lange staunen lassen wird.

Alle meine lieben Doktorandenkollegen habt vielen Dank: Wolfgang, du hast mir von Anfang an beigestanden und mir so vieles gelernt. Andrea und Hannes ihr kommt jetzt erst als zweites, aber das traf ja auch irgendwie zeitlich zu. Hilfe und vor allem moralische Stütze wart ihr mir nicht minder. Auch bei meinen Praktikantinnen Pia, Hannah, Karoline und Maite möchte ich mich bedanken, ich habe gerade mit euch viel gelernt. Vielleicht sogar ein wenig zuhören.

Alle Unterstützung von den Leuten des Lehrstuhls war unschätzbar. Natalia, Reinhild, Antje, Claudia, Ellen, Elisabeth und Daniela: Habt nicht nur vielen Dank für die Zellen, die Sequenzen und die Ultradünnschnitte. Und noch was Lehrstuhl, habt ihr euch mal für den Stickstoff bedankt, den ich euch immer so lieb gebracht habe? Nein, verarscht habt ihr mich!

Und wenn ich schon beim Rundumschlag bin, viele Leute hier im Lehrstuhl, in Würzburg und anderswo waren mir gute Freund und haben mich trotz meiner Art unterstützt. Vielen Dank

und schließlich bin ich unendlich froh dir begegnet zu sein, danke Juliane,

ruppi