

**Synaptonemalkomplexprotein SYCP1:  
Bindungspartner, Polymerisationseigenschaften und  
evolutionäre Aspekte**

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

vorgelegt von  
Karoline Winkel  
aus  
Kieselbach

Berlin 2009

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

Gutachter: Prof. Dr. Ricardo Benavente

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Scharl

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

## Inhaltsverzeichnis

1.1	MEIOSE.....	7
1.1.1	<i>Meiose I</i> .....	9
1.1.2	<i>Meiose II</i> .....	13
1.1.3	<i>Geschlechtsdimorphismus im Hinblick auf die Meiose der Säuger</i> .....	13
1.2	KOHÄSINE UND KONDENSINE.....	15
1.2.1	<i>Kohäsine während der Meiose</i> .....	15
1.3	DER SYNAPTONEMALKOMPLEX.....	19
1.3.1	<i>Proteinkomponenten des Synaptonemalkomplexes</i> .....	20
1.3.2	<i>Proteine der Lateralelemente verschiedener Modellorganismen</i> .....	21
1.3.3	<i>Proteine der Zentralen Region</i> .....	27
1.3.4	<i>Organismen ohne SC</i> .....	33
1.3.5	<i>Bildung und Auflösung des SC am Beispiel der Säuger</i> .....	34
1.3.6	<i>Bedeutung des SC</i> .....	36
1.4	SPERMATOGENESE AM BEISPIEL DER SÄUGER.....	37
1.5	ZIELSETZUNG.....	41
<b>2.</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>43</b>
2.1	BIOLOGISCHES MATERIAL.....	43
2.1.1	<i>Tiere</i> .....	43
2.1.2	<i>Zelllinien</i> .....	43
2.1.3	<i>Bakterienstämme</i> .....	43
2.1.4	<i>Hefestämme</i> .....	43
2.1.5	<i>Antikörper</i> .....	44
2.2	MIKROBIOLOGISCHES MATERIAL.....	45
2.2.1	<i>Plasmidvektoren für Klonierungen in E. coli</i> .....	45
2.2.2	<i>„Shuttle“-Plasmidvektoren für Klonierungen in E. coli und S. cerevisiae</i> .....	47
2.2.3	<i>Enzyme</i> .....	48
2.2.4	<i>Oligonukleotide</i> .....	50
2.2.5	<i>Kits und Einzelkomponenten</i> .....	53
2.2.6	<i>Chemikalien</i> .....	55
2.3	REKOMBINANTE DNA-KONSTRUKTE.....	55
2.3.1	<i>SYCP1 Konstrukte der Ratte</i> .....	55
2.3.1.1	<i>SYCP1-Konstrukte für Transfektionen in COS-7 Zellen</i> .....	55
2.3.1.2	<i>SYCP1-Konstrukte im Yeast-Two-Hybrid-System</i> .....	56
2.3.1.3	<i>SYCP1-Konstrukte für Bindungstests im TNT®-System und Pull-Down</i> .....	56
2.3.2	<i>SYCP2-Konstrukte der Ratte</i> .....	57
2.3.2.1	<i>Konstrukte zur Expression in COS-7 Zellen</i> .....	57
2.3.2.2	<i>SYCP2-Konstrukte im Yeast-Two-Hybrid-System</i> .....	57
2.3.2.3	<i>Konstrukte für Interaktionsstudien im TNT®-System</i> 58	

2.3.3	<i>SYCPI-Konstrukte von Medaka</i> .....	60
2.3.4	<i>SYCPI-Konstrukte von Hydra</i> .....	61
2.4	GERÄTE .....	62
2.5	COMPUTERPROGRAMME.....	64
<b>3.</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>65</b>
3.1	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN.....	65
3.1.1	<i>Kultivierung von Bakterien</i> .....	65
3.1.2	<i>Glycerinkulturen</i> .....	65
3.1.3	<i>Bakterienkulturen auf Agarplatten</i> .....	66
3.1.4	<i>Photometrische Bestimmung der Bakteriendichte in Flüssigkulturen</i> .....	66
3.1.5	<i>Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien</i> .....	66
3.1.6	<i>Herstellung kompetenter Bakterien</i> .....	67
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	68
3.2.1	<i>RNA-Isolierung aus Geweben</i> .....	68
3.2.2	<i>Gewinnung von cDNA durch Reverse Transkription (RT-PCR)</i> .....	68
3.2.3	<i>Polymerase Kette Reaktion (polymerase chain reaction, PCR)</i> .....	69
3.2.4	<i>Kolonie-PCR</i> .....	70
3.2.5	<i>Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese</i> .....	71
3.2.6	<i>Gelextraktion von DNA-Fragmenten</i> .....	72
3.2.7	<i>Präparation von Plasmid-DNA</i> .....	72
3.2.8	<i>Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren</i> .....	73
3.2.9	<i>Reinigung von Nukleinsäuren</i> .....	73
3.2.10	<i>Fällung von Nukleinsäuren</i> .....	74
3.2.11	<i>Sequenzierung von DNA</i> .....	75
3.2.12	<i>Restriktionsverdau</i> .....	76
3.2.13	<i>Klonierungen von DNA-Fragmenten mit dem TOPO TA CLONING® Kit</i> .....	77
3.2.14	<i>Klonierung von DNA-Fragmenten</i> .....	77
3.2.15	<i>Dephosphorylierung des Vektors</i> .....	78
3.2.16	<i>Phosphorylierung des zu integrierenden DNA-Fragments</i> .....	79
3.2.17	<i>Ligation</i> .....	79
3.2.18	<i>Test der erhaltenen Klone</i> .....	80
3.3	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN .....	80
3.3.1	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i> .....	80
3.3.2	<i>Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen</i> .....	83
3.3.3	<i>Western Blot in der Graphit-Blot-Kammer</i> .....	83
3.3.4	<i>Western Blot nach dem Tank-Blot-Verfahren</i> .....	86
3.3.5	<i>Strippen eines Western Blots</i> .....	86
3.3.6	<i>Expression von Fusionsproteinen mit His<sub>6</sub>-Epitop in Bakterien</i> .....	87
3.3.7	<i>Aufeinigung eines Proteins mit His<sub>6</sub>-Epitop (denaturierend)</i> .....	88
3.3.8	<i>Affinitätsreinigung von Antisera</i> .....	89
3.3.9	<i>Dialyse</i> .....	94

3.3.10	<i>Expression rekombinanter Proteine mit dem TNT® System (Promega)</i> .....	95
3.3.11	<i>Interaktionsstudien mithilfe des TNT® Systems</i> .....	95
3.3.12	<i>Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen des Rattenhodens</i> .....	96
3.3.13	<i>Ko-Immunpräzipitation</i> .....	97
3.3.14	<i>Pull-Down</i> .....	99
3.4	LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE METHODEN .....	100
3.4.1	<i>Immunfluoreszenzmikroskopie von Kulturzellen</i> .....	100
3.4.2	<i>Epon-Einbettung der Präparate für Elektronenmikroskopie</i> .....	101
3.4.3	<i>Herstellung von Ultradünnschnitten und Elektronenmikroskopie</i> .....	102
3.5	ZELLKULTUR .....	103
3.5.1	<i>Kultivierung von COS-7 Zellen</i> .....	103
3.5.2	<i>Transfektion der Kulturzellen</i> .....	103
3.6	YEAST-TWO-HYBRID SYSTEM .....	103
3.6.1	<i>Kultivierung von S. cerevisiae des Stammes EGY 48</i> .....	104
3.6.2	<i>Glycerinkulturen von S. cerevisiae</i> .....	106
3.6.3	<i>Plattenkulturen von S. cerevisiae</i> .....	106
3.6.4	<i>Transformation von S. cerevisiae (nach Gietz &amp; Woods, 1994)</i> .....	107
3.6.5	<i>Charakterisierung des Köderproteins</i> .....	108
3.6.6	<i>Nachweis der Interaktion zwischen Köder und Beute im 5-Platten-Test</i> .....	110
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>112</b>
4.1	BINDUNGSSTUDIEN MIT SYCP1 UND SYCP2 .....	112
4.1.1	<i>SYCP1 interagiert mit SYCP2 im Yeast-Two-Hybrid-System</i> .....	112
4.1.2	<i>Der C-Terminus von SYCP1 bindet an die C-terminale Region von SYCP2</i> .....	114
4.1.3	<i>Endogenes SYCP2 bindet an den C-Terminus von SYCP1</i> .....	115
4.1.4	<i>SYCP2 ko-immunpräzipitiert mit SYCP1 im Hodenextrakt der Ratte</i> .....	116
4.1.5	<i>SYCP2 kolokalisiert mit SYCP1-Polykomplexen im heterologen System</i> .....	116
4.2	VERGLEICH DER POLYMERISATIONSEIGENSCHAFTEN VON SYCP1 ZWISCHEN DEN EVOLUTIONÄR ENTFERNTEN SPEZIES RATTE UND MEDAKA .....	119
4.2.1	<i>Klonierung der cDNA von Medaka-SYCP1 (MeSYCP1)</i> .....	119
4.2.2	<i>Sequenzvergleich von SYCP1 zwischen Ratte und Medaka</i> .....	122
4.2.3	<i>Herstellung eines MeSYCP1-spezifischen Antikörpers</i> .....	123
4.2.4	<i>Charakterisierung der Polymerisationseigenschaften von Medaka-SYCP1</i> .....	125
4.2.5	<i>Koexpression der homologen Proteine (SYCP1) aus Ratte und Medaka</i> .....	128
4.2.6	<i>Der Einfluss einer Deletion des C-Terminus von SYCP1 bei der Koexpression mit wildtypischen bzw. EGFP-Fusionsproteinen</i> .....	130
4.3	VERGLEICH DER POLYMERISATIONSEIGENSCHAFTEN VON SYCP1 ZWISCHEN DEN EVOLUTIONÄR ENTFERNTEN SPEZIES RATTE UND HYDRA .....	133
4.3.1	<i>Klonierung der cDNA von Hydra-SYCP1 (HySYCP1)</i> .....	134
4.3.2	<i>Sequenzvergleich von SYCP1 zwischen Ratte und Hydra</i> .....	136
4.3.3	<i>Charakterisierung der Polymerisationseigenschaften von Hydra-SYCP1</i> .....	138

<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>140</b>
5.1 DIE INTERAKTION VON SYCP1 UND SYCP2 – DAS MÖGLICHE BINDEGLIED ZWISCHEN DEN TRANSVERSALFILAMENTEN UND DEN LATERALELEMENTEN DES SC .....	141
5.2 EIN VERGLEICH VON SYCP1 AUS RATTE, MEDAKA UND HYDRA – DIE PROTEINE WEISEN EINE KONSERVIERTE DOMÄNENORGANISATION UND POLYMERBILDUNG AUF, BESITZEN EVOLUTIONÄR ERHALTENE MOTIVE UND KÖNNEN SPEZIESÜBERGREIFEND INTERAGIEREN .....	146
5.2.1 <i>Die homologen Proteine SYCP1 aus Ratte, Medaka und Hydra besitzen evolutionär erhaltene Sequenzmotive, eine hoch konservierte Domänenorganisation und zeigen gleiche Polymerisationseigenschaften .....</i>	147
5.2.2 <i>Die Proteine SYCP1 aus Ratte und Medaka können speziesübergreifend interagieren und bilden dabei höher geordnete Strukturen aus .....</i>	151
<b>6. AUSBLICK .....</b>	<b>154</b>
<b>7. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>156</b>
7.1 ZUSAMMENFASSUNG .....	156
7.2 SUMMARY .....	157
<b>8. LITERATURLISTE .....</b>	<b>158</b>
<b>9. ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>171</b>
<b>10. PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>175</b>
10.1 VERÖFFENTLICHTE PUBLIKATIONEN ALS AUTOR .....	175
10.2 BETEILIGUNG AN KONGRESSSEN MIT VERÖFFENTLICHTEN ABSTRACTS .....	175
<b>11. LEBENSLAUF .....</b>	<b>176</b>
<b>12. DANKSAGUNG .....</b>	<b>178</b>
<b>13. ERKLÄRUNG .....</b>	<b>179</b>

# 1. Einleitung

Die Reproduktion gehört zu den Grundeigenschaften aller lebenden Organismen. Im Gegensatz zur asexuellen Fortpflanzung, bei der aus der Ursprungsgeneration durch mitotische Teilungen genetisch weitgehend identische Nachkommen hervorgehen, ermöglicht die sexuelle Reproduktion eine optimale Anpassung an sich ständig verändernde Umweltbedingungen. Dies ist zum einen auf die Rekombination des Erbmaterials zwischen den homologen Chromosomen und zum anderen auf die zufällige Kombination mütterlicher und väterlicher Gene bei der Segregation auf die Tochterzellen zurückzuführen. Während der Befruchtung verschmelzen schließlich eine männliche und eine weibliche Keimzelle zu einer Zygote, aus der ein neuer Organismus hervorgeht.

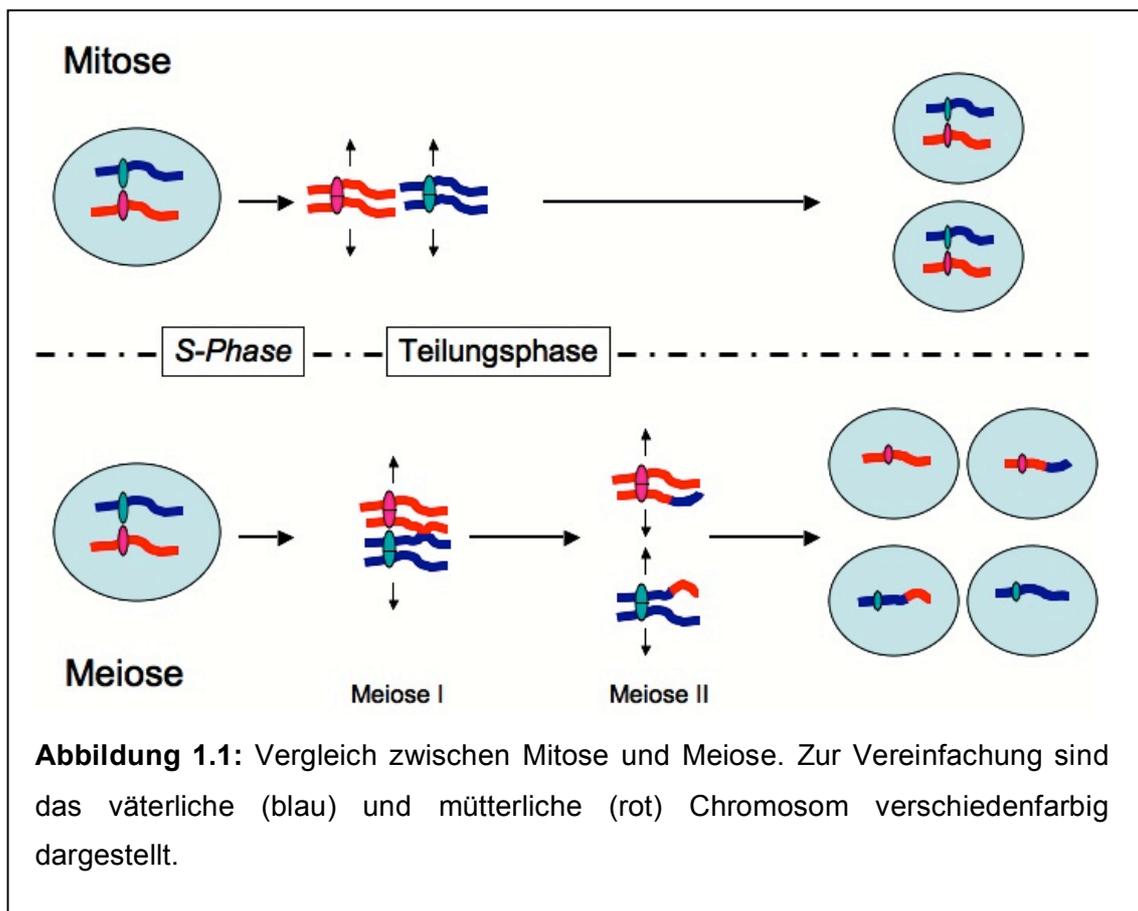
In den folgenden Teilabschnitten werden der Ablauf der Meiose und die damit verbundenen Besonderheiten in der Architektur der Chromosomen detailliert beschrieben. Dabei wird der Schwerpunkt auf dem Synaptonemalkomplex (SC) liegen, einer proteinösen Struktur, die sich während der Prophase I der Meiose strickleiterartig entlang der Achsen der gepaarten, homologen Chromosomen erstreckt.

## 1.1 Meiose

Für die Entstehung der Keimzellen aller sexuell reproduktiven Organismen ist eine spezielle Form der Zellteilung notwendig, die Meiose. Sie wird auch als Reifeteilung bezeichnet. Im Gegensatz zur Mitose, der einfachen Zellteilung, bei der sich an eine Replikationsphase (S-Phase) eine Teilungsphase anschließt, folgen bei der Meiose zwei Teilungsschritte auf eine Replikationsrunde. Dabei entstehen aus einer diploiden Keimzelle ( $2n$ ,  $4c$ ) vier haploide Tochterzellen ( $1n$ ,  $1c$ ). Die Meiose I schließt sich an die DNA-Replikation in der S-Phase an und umfasst mehrere Prozesse, die Synapsis, die Rekombination und die Segregation der homologen Chromosomen auf zwei Tochterzellen. Dabei kommt zur Trennung der homologen Chromosomen. Die entstehenden Tochterzellen besitzen jeweils nur noch einen einfachen Chromosomensatz, der zwei Chromatiden umfasst ( $1n$ ,  $2c$ ). Im zweiten Teilungsschritt, der sich direkt, ohne eine erneute S-Phase an die Meiose I anschließt, werden die Schwesterchromatiden voneinander getrennt. Diese Phase wird auch als Meiose II oder Äquationsteilung bezeichnet und gleicht in ihren

Grundprinzipien einer mitotischen Teilung. Die Chromosomen ordnen sich entlang der Äquatorialebene an und die Schwesterchromatiden werden schließlich voneinander getrennt und zu den gegenüberliegenden Spindelpolen gezogen. Am Ende der Meiose II entstehen vier Tochterzellen mit einem einfachen Chromosomensatz. Dann bestehen die Chromosomen jeweils nur noch aus einer Chromatide ( $1n, 1c$ ).

Der Unterschied zwischen der Mitose und Meiose besteht also darin, dass aus der Mitose haploide Zellen hervorgehen und die Meiose, durch die zwei aufeinander folgenden Teilungen, haploide Tochterzellen hervorbringt. Ein Vergleich zwischen den beiden Teilungsmechanismen ist in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt.

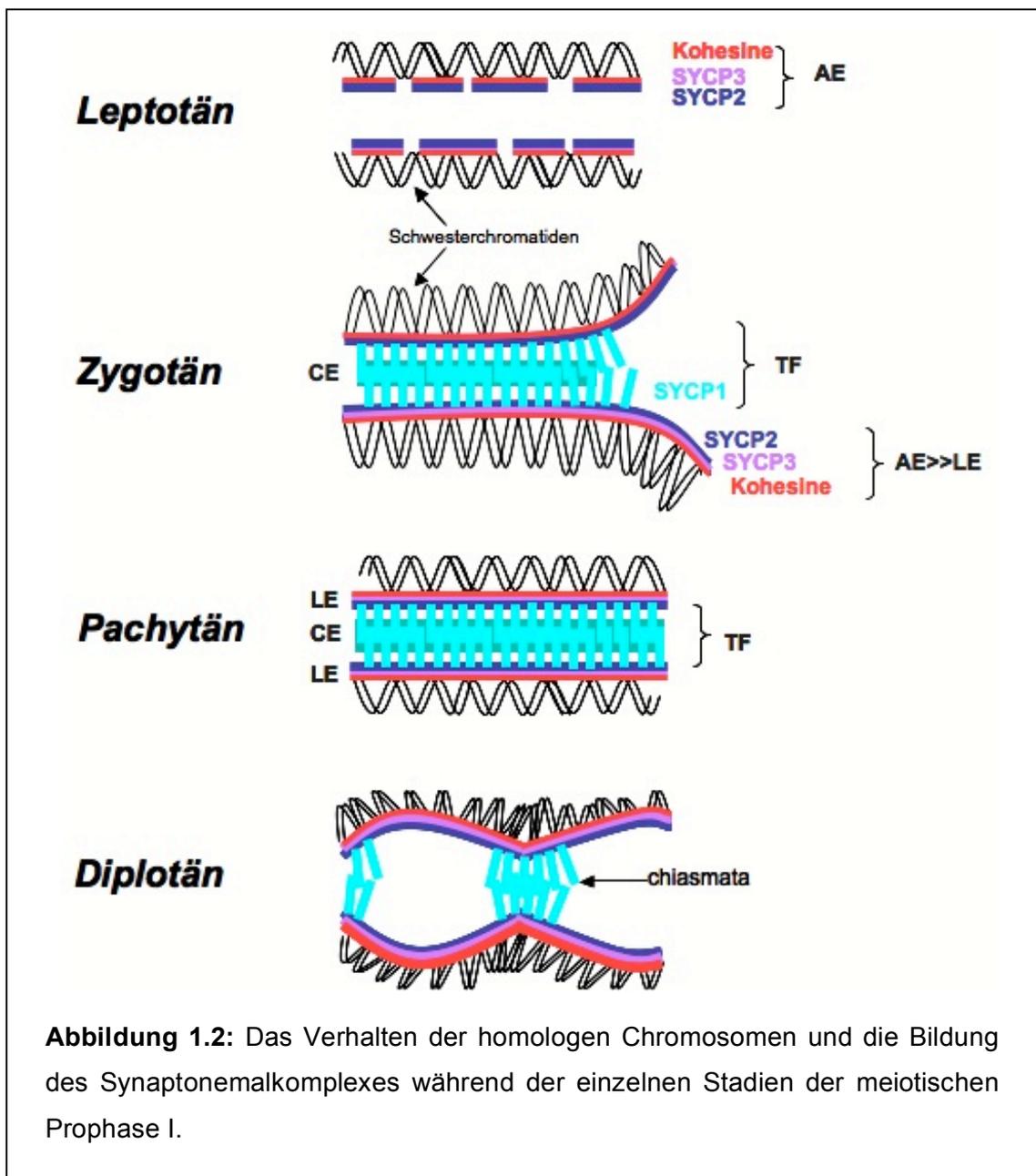


Für die nötige Dynamik der Chromosomen während der meiotischen Teilungsprozesse spielt deren spezifische Architektur eine grundlegende Rolle. Dabei bedarf es dem Einsatz verschiedenster Proteine und Proteinkomplexe, die in den folgenden Abschnitten explizit beschrieben werden.

### 1.1.1 Meiose I

Die Meiose I kann in vier einzelne Phasen gegliedert werden: Prophase I, Metaphase I, Anaphase I und Telophase I.

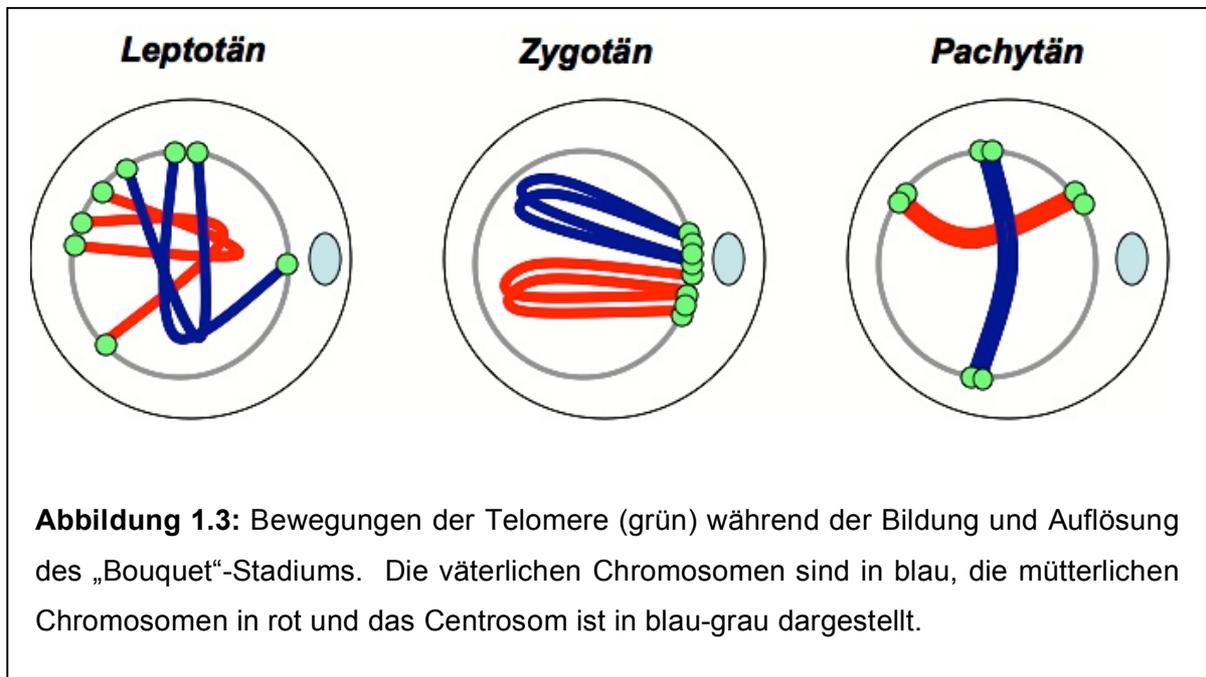
Nach abgeschlossener DNA-Replikation in der S-Phase treten die Zellen in die Prophase I ein. Diese ist gekennzeichnet durch ihre lange Dauer, die einige Tage bis hin zu mehreren Jahren umfassen kann. Sie beinhaltet dabei all die Prozesse, welche die Meiose grundsätzlich von der Mitose unterscheiden. Man kann die Prophase I wiederum in fünf einzelne Stadien unterteilen. Vier dieser Stadien (Leptotän bis Diplotän) sind aufgrund ihrer Besonderheiten in der Chromosomen-Architektur in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt.



Im **Leptotän** (von *leptos*, griech. dünn), dem ersten Stadium der Prophase I, kommt es zur Kondensation der Chromosomen durch die Bindung von meiosespezifischen Kondensin- und Kohäsinkomplexen (ausführlich beschrieben in 1.2). Dabei werden die Chromosomen im Mikroskop als dünne, fädige Strukturen sichtbar. Die Centromere bilden die Kinetochore aus, die später, in der Metaphase I, als Anheftungspunkte für die Spindelfasern dienen. Entlang der Chromosomenachsen formieren sich die Axialelemente (AE), Strukturen aus SC-Proteinen und Kohäsinen (de Boer & Heyting, 2006; Jessberger & Revenkova, 2006), aus denen schließlich die Lateralelemente des Synaptonemalkomplexes hervorgehen werden (siehe Abbildung 1.2). Die Telomere der Chromosomen heften sich über spezifische proteinöse Strukturen, die als „Attachment plates“ bezeichnet werden, an die innere Membran der Kernhülle an (Liebe *et al.*, 2004). Des Weiteren wird die Rekombination eingeleitet. Katalysiert durch das Enzym Spo11 (Keeney, 1997), werden dabei Doppelstrangbrüche (DSBs) in den Chromosomen induziert. Zwischen den Axialelementen der gepaarten Homologen kommt es zur Ausbildung von DNA-Brücken. Diese Interaktionen werden als „Axiale Assoziationen“ bezeichnet (AA) und erscheinen als ca. 400 nm große Verbindungen zwischen den Chromosomen (Albini und Jones, 1984; Tesse *et al.*, 2003).

Beim Übergang zur nächsten Phase, dem **Zygotän** (von *zygos*, griech. Paar), bildet sich das so genannte „Bouquet-Stadium“ (Scherthan *et al.*, 1996; Zickler & Kleckner, 1998). Dabei bewegen sich alle Telomere zu einem begrenzten Bereich der Kernhülle, der dem Centrosom zugewandt ist. Dabei scheint es, als würden die Chromosomen blumenstraußartig ins Innere des Nukleoplasmas ragen. Die Bewegungen der Chromosomen vor Beginn, während und nach Beendigung des Bouquet-Stadiums sollen in Abbildung 1.3, stark vereinfacht, verdeutlicht werden. Im weiteren Verlauf des Zygotäns schreitet die Kondensation der Chromosomen voran und die Ausbildung des Synaptonemalkomplexes beginnt. Hierbei werden die Axialelemente zwischen den Homologen durch in sich greifende Transversalfilamente reißverschlussähnlich miteinander verknüpft. Die Geschlechtschromosomen, am Beispiel der männlichen Säuger (XY), werden nicht vollständig über einen SC miteinander verbunden, sondern paaren sich nur über kleine homologe Bereiche, die als „pseudoautosomale Regionen“ bezeichnet werden. Im Mikroskop heben sich die männlichen Geschlechtschromosomen der Säuger

aufgrund ihrer stärker ausgeprägten Kondensation deutlich vom restlichen Chromatin ab. Sie werden als „XY-Body“ bezeichnet (Solari, 1974; Handel, 2004).



An das Zygotän schließt sich das **Pachytän** (von *pakhus*, griech. dick) an. Diese Phase bildet den zeitlich längsten Abschnitt der Meiose. Das Bouquet-Stadium wird aufgelöst und die Telomere verteilen sich wieder an der gesamten Kernhülle (siehe Abb. 1.3). Die Bildung des Synaptonemalkomplexes ist abgeschlossen und die homologen Chromosomenpaare sind in ihrer kompletten Länge über den SC miteinander verbunden. In diesem Zustand bezeichnet man die homolog gepaarten Chromosomen auch als Bivalente. Im Mikroskop erscheinen diese als kurze, dicke, fädige Strukturen. In Abbildung 1.4 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Synaptonemalkomplexes der Ratte aufgeführt. Man erkennt darauf deutlich die beiden Lateralelemente, die sich entlang der Chromosomenachsen erstrecken. In der Zentralen Region bildet sich parallel zu den LE das Zentrale Element (CE) aus. Dieses entsteht durch die Überlappung der Transversalfilamente und der Einlagerung verschiedener anderer Proteine. Neben der Bildung der Synapse schreitet die Rekombination weiter voran. Zwischen den Bivalenten findet dabei ein überkreuzter Austausch von homologen Sequenzen statt, der als „Crossover“ bezeichnet wird.

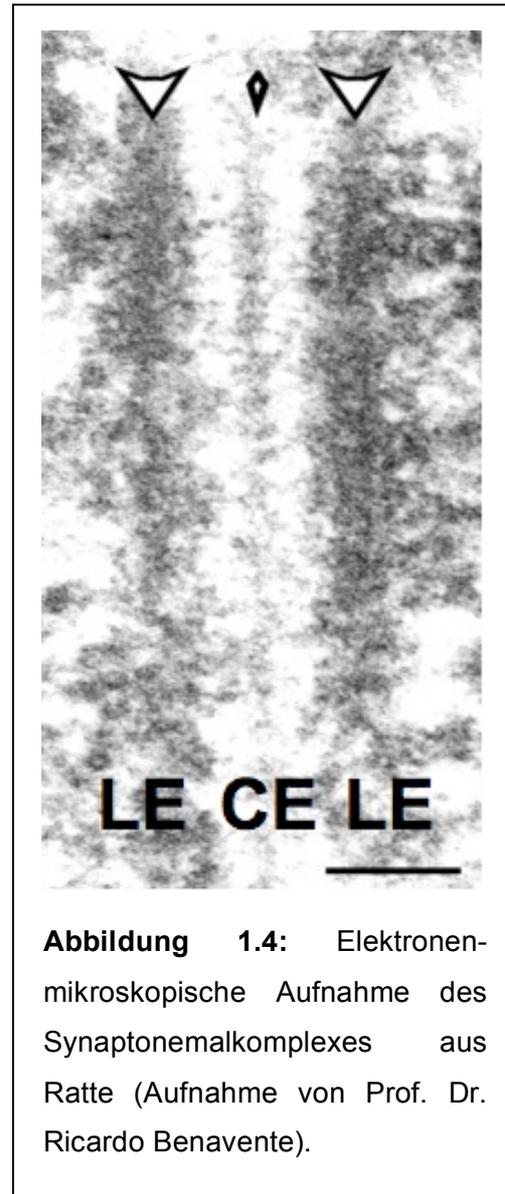
Das anschließende **Diplotän** (von *diploos*, griech. doppelt) ist durch eine kurzzeitige Dekondensation der Chromosomen gekennzeichnet. Die Bivalente trennen sich

unter Auflösung der Synaptonemalkomplexe. Sie bleiben bis in die Metaphase I nur noch an den Chiasmata miteinander verbunden, jenen Stellen, an denen „Crossover“ erfolgte (siehe Abb. 1.2). Im Diplotän-Stadium verbleiben Säuger-Oocyten teilweise über Jahrzehnte lang arretiert. Durch eine vorübergehende Aufhebung der Kondensation kann aktive Genexpression stattfinden.

In der darauf folgenden **Diakinese** (von *diakinein*, griech. auseinander bewegen) kommt es erneut zu einer starken Kondensation des Chromatins. Als Folge dessen kommt die Genexpression wieder zum Stillstand. Die Chiasmata und sogar die einzelnen Chromatiden werden im Lichtmikroskop deutlich sichtbar. Diese Phase stellt den Übergang zur Metaphase I dar.

Am Ende der Prophase I löst sich die Kernhülle auf und es kommt zur Ausbildung des meiotischen Spindelapparates. In der **Metapase I** ordnen sich die Homologen, die noch immer an

den Chiasmata verbunden sind, in der Äquatorialebene an. Hierbei ist es wichtig, dass jedes homologe Chromosom nur mit jeweils einem Spindelpol in Kontakt tritt, so dass zu diesem Zeitpunkt der Meiose die Chromatiden noch nicht voneinander getrennt werden. Die Spindelfasern dürfen sich demzufolge nur einseitig an das Kinetochor eines Chromosoms anheften. Für die spezielle Architektur der Chromosomen während dieser Phase sind spezifische Kohäsine notwendig, die den Zusammenhalt der Schwesterchromatiden ermöglichen. Diese werden ausführlich in Abschnitt 1.2 beschrieben. Zu Beginn der **Anaphase I** kommt es zwischen den Homologen zur Auflösung der Chiasmata. Außerdem heften sich die Spindelfasern einseitig an die Kinetochore an und trennen schließlich die homologen Chromosomen voneinander, indem sie diese zu den gegenüberliegenden Spindelpolen ziehen. Da es dem Zufall überlassen ist, welches der beiden



**Abbildung 1.4:** Elektronenmikroskopische Aufnahme des Synaptonemalkomplexes aus Ratte (Aufnahme von Prof. Dr. Ricardo Benavente).

homologen Chromosomen Kontakt zu welchem Spindelpol aufnimmt, erfolgt die Segregation der väterlichen und mütterlichen Chromosomen während der Anaphase I unwillkürlich. In der sich anschließenden **Telophase I** erfolgt die Neubildung der Kernhülle. Das Chromatin dekondensiert und es bilden sich zwei Zellkerne aus. Dabei beinhaltet jeder dieser Kerne einen vollständigen Chromosomensatz, bestehend aus je zwei Chromatiden ( $1n, 2c$ ).

### 1.1.2 Meiose II

Auf die Telophase I folgt eine kurze Interphase, jedoch keine DNA-Replikation. Die Meiose II schließt sich also direkt an die Meiose I an. In der **Prophase II** bilden sich die Kinetochore aus, an die sich beim Übergang zur **Metaphase II** die Spindelfasern anheften. Dadurch werden die Chromosomen in der Metaphaseplatte ausgerichtet. In der darauf folgenden **Anaphase II** kommt es zur Spaltung der Kohäsinkomplexe in der Centromerregion und damit zur Trennung der Schwesterchromatiden. Diese werden zu den gegenüberliegenden Spindelpolen gezogen. In der **Telophase II** erfolgt die Neubildung der Kernhülle und letztendlich entstehen vier Gameten mit einem jeweils haploiden Chromosomensatz. Dabei besteht jedes Chromosom aus nur einer Chromatide ( $1n, 1c$ ). Diese Gameten sind genetisch unterschiedlich, einerseits aufgrund der Rekombination zwischen den Homologen während der Prophase I und andererseits aufgrund der zufälligen Segregation väterlicher und mütterlicher Chromosomen während der Anaphase I.

### 1.1.3 Geschlechtsdimorphismus im Hinblick auf die Meiose der Säuger

In Säugern existieren zahlreiche Unterschiede zwischen der männlichen und weiblichen Meiose. Diese sollen im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

Ein großer Unterschied liegt beispielsweise in der **zeitlichen Regulation**. Im Falle der Weibchen beginnt die Meiose schon während der embryonalen Entwicklung. Dabei durchlaufen alle Keimzellen synchron die Prophase I bis zum Diplotän. In diesem Stadium verbleiben dann bis zum Beginn der geschlechtlichen Reife arretiert. Bei den männlichen Säugern hingegen, beginnt die Meiose erst mit dem Eintreten der Pubertät und wird von diesem Zeitpunkt an kontinuierlich durchlaufen.

Ein weiterer Dimorphismus liegt in der **Synchronität**. Wie bereits erwähnt, treten bei den weiblichen Säugern während der Embryonalentwicklung alle Keimzellen synchron in die Meiose I ein. Nach Beginn der Pubertät setzen dann kleinere Gruppen von Oocyten zyklusbedingt asynchron die Meiose fort. Bei den Männchen

hingegen erfolgt der Eintritt in die Meiose in kontinuierlichen Wellen während der gesamten geschlechtsreifen Phase. Dabei werden für jeden Schub neue Spermatozyten durch mitotische Teilungen der Spermatogonien (Stammzellen) nachgeliefert.

Des Weiteren unterscheiden sich die Geschlechter hinsichtlich der **Gametenproduktion**. Während bei der männlichen Meiose aus einer diploiden Keimzelle vier haploide Gameten hervorgehen, liefert die weibliche Reduktionsteilung nur einen Gameten. Die drei anderen haploiden Zellen, die bei der weiblichen Meiose entstehen, werden als Polkörperchen bezeichnet. Diese sind aufgrund inäqualer Teilungen häufig sehr klein und werden schließlich abgebaut.

Der vierte Unterschied besteht in den **Ruhephasen**. Davon treten bei den Weibchen zwei auf. Eine in der Embryonalentwicklung nach Erreichen des Diplotäns. Diese Ruhephase wird bis zur zyklusbedingten Wiederaufnahme während der Geschlechtsreife aufrechterhalten. Die zweite Ruhephase tritt dann in der Metaphase II ein und bleibt erhalten bis zum Zeitpunkt der Befruchtung. Derartige Ruhephasen kommen bei den Männchen nicht vor.

Auch hinsichtlich der **Morphologie** unterscheiden sich die Keimzellen der Geschlechter. Jede einzelne Oocyte liegt isoliert von anderen Oocyten im Ovar vor und ist von versorgenden Granulosazellen umgeben. Die sekundären Spermatozyten und die Spermatisden im Hoden der Männchen hingegen, stehen über cytoplasmatische Brücken direkt miteinander in Verbindung und sind von versorgenden Sertolizellen umgeben.

Ein weiterer Geschlechtsdimorphismus besteht im Hinblick auf die Auswirkungen von Mutationen meiosespezifischer Gene. So haben Untersuchungen an verschiedenen Knock-out-Mäusen gezeigt, dass sich Weibchen und Männchen im Phänotyp deutlich unterscheiden können. Beispielsweise sind weibliche *Sycp3* Knock-out Mäuse subfertil, die männlichen Mäuse hingegen sind steril (Yuan *et al.*, 2000; Kolas *et al.*, 2004). Beim Betrachten vieler der bisher generierten Knock-out-Mäuse (Übersicht in Morelli und Cohen, 2005), bei denen Gene betroffen sind, die eine Rolle in der Meiose spielen, ist es auffällig, dass die Sterilität bei den Männchen viel häufiger auftritt, als bei den weiblichen Mäusen. Oocyten scheinen demnach die fehlenden Genprodukte besser kompensieren zu können als Spermatozyten.

## 1.2 Kohäsine und Kondensine

Sowohl in der Mitose als auch in der Meiose vermitteln spezifische Kohäsin- und Kondensinkomplexe den Zusammenhalt der Schwesterchromatiden während der DNA-Replikation in der S-Phase bis hin zum Übergang von Metaphase zu Anaphase. Diese proteinösen Komplexe sind von der Hefe bis zu den Säugern evolutionär hochkonserviert.

**Kondensine** dienen, wie der Name schon vermuten lässt, der Kondensierung des Chromatins während der Mitose und Meiose. Kondensinkomplexe wurden erstmals im südafrikanischen Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) identifiziert, konnten aber auch in zahlreichen anderen Organismen, bis hin zum Menschen (Schmiesing *et al.*, 2000; Kimura *et al.*, 2001) detektiert werden. Sie setzen sich aus fünf Proteinuntereinheiten zusammen: SMC2/CAP-E und SMC4/CAP-C aus der SMC-Proteinfamilie (**s**tructural **m**aintenance of **c**hromosome) und den Nicht-SMC-Proteinen CAP-D2, CAP-G und CAP-H (Hirano *et al.*, 1997).

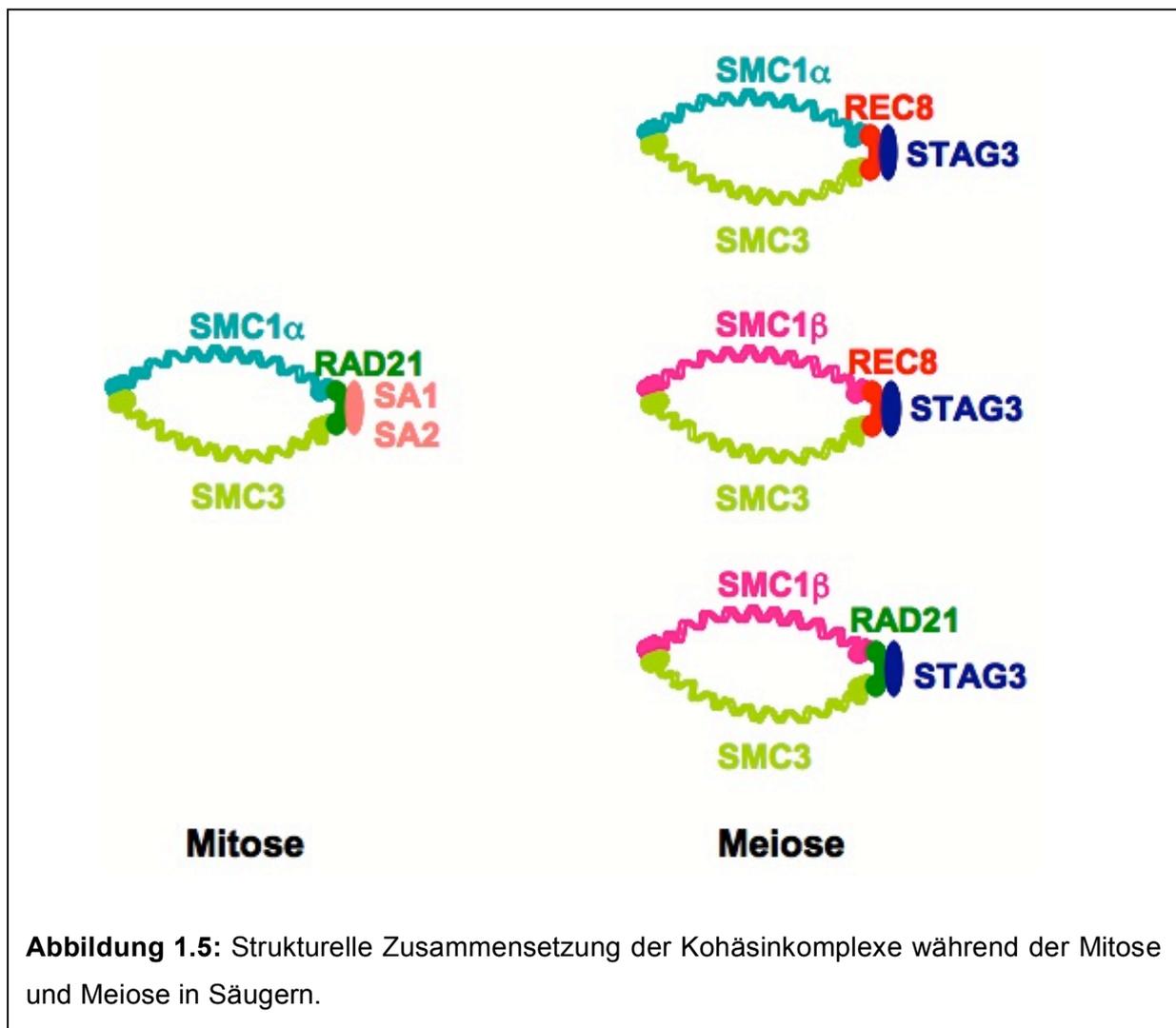
Die **Kohäsine** mitotischer Säugerzellen bestehen aus vier Protein-Untereinheiten: SMC1 und SMC3, sowie den beiden Nicht-Strukturproteinen RAD21 und einer SA-Isoform (SA1 oder SA2; Losada *et al.*, 2000; Sumara *et al.*, 2000). Die beiden SMC-Proteine SMC1 und SMC3 weisen ausgedehnte Regionen mit Coiled-Coil-Charakter auf. Sie bilden Dimere aus, die sich dann als ringartige Strukturen um die Chromatinfasern der Schwesterchromatiden legen (Gruber *et al.*, 2003; Haering *et al.*, 2004). Die Ringe werden schließlich von RAD21 und SA1 bzw. SA2 geschlossen (siehe Abbildung 1.5). Die Öffnung des Ringes während der Anaphase und somit die Trennung der Schwesterchromatiden wird durch das Enzym Separase induziert. Dabei kommt es zu einer proteolytischen Spaltung von RAD21 (Nasmyth *et al.*, 2001).

### 1.2.1 Kohäsine während der Meiose

Zwei aufeinander folgende Teilungsphasen während der Meiose stellen natürlich eine Herausforderung für die Zellen dar. Denn die Segregation der Chromosomen auf die entstehenden Tochterzellen muss korrekt erfolgen. Bei der Trennung der Homologen während der Meiose I darf es nur zur Auflösung der Kohäsion zwischen den Chromosomenarmen der Schwesterchromatiden kommen, während die Kohäsion an den Centromeren bis zum Übergang von Metaphase II zu Anaphase II aufrechterhalten werden muss. Erst dann darf es zu einer Trennung der Chromatiden

kommen. Während der Meiose konnten besondere Kohäsinkomplexproteine identifiziert werden, die innerhalb der Mitose nicht vorkommen. In meiotischen Säugerzellen wird SMC1 durch SMC1 $\beta$  ergänzt (Revenkova *et al.*, 2001), RAD21 durch REC8 (Parisi *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 1999) und STAG3 kann die beiden SA-Isoformen ersetzen (Prieto *et al.*, 2001). Während die drei hier benannten meiose-spezifischen Proteinkomponenten ausschließlich in Keimzellen vorkommen, konnten die Komponenten SMC1 $\alpha$ , RAD21 (Prieto *et al.*, 2002; Parra *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004) und SA2 (Prieto *et al.*, 2002) sowohl in mitotischen als auch in meiotischen Zellen nachgewiesen werden. Aufgrund dieser gleichzeitigen Präsenz der Proteine wird angenommen, dass in der Meiose mehrere Komplexvarianten parallel existieren (Mc Dougall *et al.*, 2005; Revenkova and Jessberger, 2006) und unter Umständen verschiedene Aufgaben übernehmen können. Beispielsweise gibt es solche Zellen, die entweder REC8 oder RAD21 enthalten, oder andere bei denen SMC1 $\alpha$  durch SMC1 $\beta$  ersetzt ist (Suja und Barbero, 2009) und wieder andere, die SA2 oder STAG3 enthalten. Zum besseren Verständnis sind die verschiedenen Varianten in Abbildung 1.5 schematisch dargestellt. Die Kohäsine SMC1 $\alpha$ , SMC1 $\beta$ , SMC3, STAG3, sowie REC8 sind während der kompletten Prophase I nachweisbar. Im späten Leptotän sind SMC1 $\alpha$ , SMC1 $\beta$  und SMC3 punktförmig an den Axialelementen und später, während der Synapse im Pachytän und bei der Desynapse im Diplotän, an den Lateralelementen lokalisiert. Alle drei können zusammen mit SYCP2 und SYCP3 ko-immunpräzipitiert werden, was für eine bestehende Interaktion zwischen den Proteinen spricht (Eijpe *et al.*, 2000; Revenkova *et al.*, 2001, Lee *et al.*, 2003). Jedoch nur SMC1 $\beta$  und SMC3 verbleiben auch nach der Auflösung der Synapse im Diplotän an den LE. Danach verschwinden beide von den Chromosomenarmen und akkumulieren während der Diakinese bis hin zur Metaphase I an den Centromeren. SMC1 $\alpha$  hingegen ist nach dem Diplotän nicht mehr detektierbar (Revenkova *et al.*, 2001). STAG3 ist an den AE/LE vom Leptotän bis zum Diplotän nachweisbar. Während der Diakinese liegt es dann ebenfalls akkumuliert an den Centromeren vor, ist aber auch in der so genannten „Interchromatid-Region“ zwischen den Schwesterchromatiden detektierbar (Suja *et al.*, 1999; Prieto *et al.*, 2001). REC8 ist in den Kernen schon vor der prä-meiotischen S-Phase nachweisbar und ist noch vor SMC1 $\beta$ , SMC3, SYCP2 und SYCP3 an den Axialelementen vorhanden. Dort ist es dann bis zur Diakinese, und somit vor, während und nach der Synapse, nachweisbar. Genau wie STAG3 ist auch REC8 bis

hin zur Metaphase I an den Bivalenten im Centromer und entlang der Interchromatid-Region nachweisbar. REC8 interagiert mit SMC1 $\beta$ , nicht aber mit SMC1 $\alpha$  (Eijpe *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003). RAD21 findet man in meiotischen Zellen auch vom Leptotän bis hin zum Diplotän entlang der AE/LE. Im späten Diplotän kolokalisiert es mit SYCP3 an Akkumulationen entlang der Lateralelemente des aufgelösten SC. Beide lösen sich während der Diakinese von den Chromosomenarmen ab. Ein Teil von RAD21 ist während der Diakinese auch an den Centromeren nachweisbar (Suja and Barbero, 2009).



Fasst man alle Expressions- und Verteilungsmuster zusammen, so kommt man zu dem Schluss dass der Komplex SMC1 $\alpha$ /SMC3/REC8/STAG3 aufgrund der SMC1 $\alpha$ -Komponente nur bis zum Diplotän zu existieren scheint. Somit könnte dieser Komplex eine spezielle Rolle in der Meiose I, und demnach im Zusammenhalt der Schwesterchromatiden, bei der Trennung der Homologen übernehmen. Die beiden

Kohäsinkomplexe SMC1 $\beta$ /SMC3/REC8/STAG3 und SMC1 $\beta$ /SMC3/RAD21/STAG3 (Abbildung 1.5) sind in der Meiose I an den Chromosomenarmen und bis zur Metaphase II an den Centromer-Regionen möglich. Sie könnten demzufolge in beiden Teilungsphasen der Meiose eine wichtige Rolle übernehmen. Neben den hier genannten Komplexen, sind auch noch weitere Kombinationen der einzelnen Komponenten möglich, die bisher jedoch nicht bestätigt werden konnten.

Die Kohäsion der Chromosomenarme wird zwischen der Metaphase I und der Anaphase I durch eine Separase-vermittelte Aufspaltung der REC8-Untereinheit gelöst (Buonomo et al., 2000). In der Spalthefe wurde eine Proteinfamilie namens Shugoshin identifiziert, die auch in Säugern bis hin zum Menschen vorkommt. Diese Proteine schützen die Kohäsinkomplexe im Centromer-Bereich bis zur Metaphase II vor dem Separase-vermittelten Abbau. Dabei rekrutieren sie PP2A, eine spezifische Serin/Threonin-Protein-Phosphatase, und verhindern somit die für die Separase notwendige Phosphorylierung der Kohäsinkomponenten an den Centromeren (Kitajima et al., 2004; Kitajima et al., 2006; Riedel et al., 2006).

Trotz des Vorkommens mehrerer Kohäsinkomplexe in der Meiose, scheint jede einzelne Komponente eine wichtige Rolle zu übernehmen. Dies zeigen Untersuchungen an verschiedenen Knock-out-Mäusen. In *Smc1 $\beta$ <sup>-/-</sup>*-Mäusen konnten erhebliche Probleme in der SC-Bildung festgestellt werden. Außerdem sind die betreffenden Tiere in beiden Geschlechtern infertil (Revenkova et al., 2004). Bei den männlichen *Smc1 $\beta$ <sup>-/-</sup>*-Tieren wird die Meiose bereits im Pachytän gestoppt. Dabei liegen die Axialelemente in verkürzter Form vor. Die Synapse erfolgt unvollständig und die Kohäsion an den Chromosomenarmen und den Centromeren löst sich frühzeitig auf. In den *Smc1 $\beta$ <sup>-/-</sup>* Weibchen wird die Meiose bis zur Metaphase II durchlaufen. Durch die Probleme in der SC-Bildung und der Kohäsion kommt es zu massiver Aneuploidie. Den Phänotypen zu Folge übernimmt SMC1 $\beta$  nicht nur eine wichtige Funktion in der Kohäsion an sich, sondern ist auch maßgeblich an der Bildung der Axial- bzw. Lateralelemente der SC beteiligt.

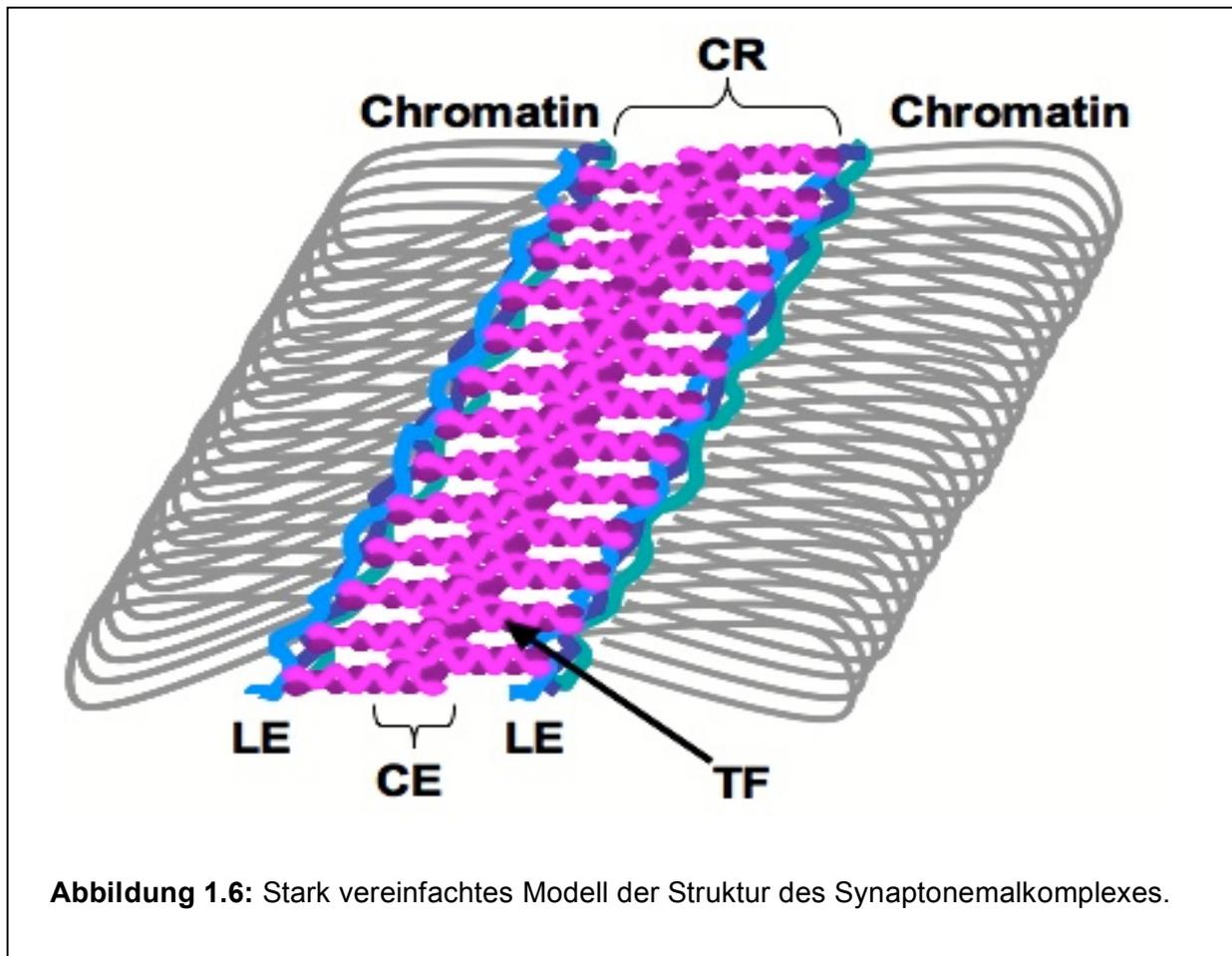
Eine Infertilität bei beiden Geschlechtern konnte auch in Mäusen beobachtet werden, bei denen alle codierenden *Rec8*-Exons gezielt deletiert wurden (Xu et al., 2005). In den meiotischen Zellen dieser Tiere sind Axialelement-ähnliche Strukturen vorhanden, in denen auch SYCP2 und SYCP3 nachgewiesen werden konnten. Eine Synaptonemalkomplexbildung erfolgt jedoch nicht, wie normal, zwischen den homologen Chromosomen, sondern findet zwischen den Schwesterchromatiden

statt. Dabei haben RAD21 und SMC3 die gleichen Verteilungsmuster wie in wildtypischen meiotischen Zellen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die einzelnen Kohäsinkomplexe während der Meiose tatsächlich unterschiedliche Funktionen zu übernehmen scheinen. In einer weiteren mutanten Mauslinie (*mei8*) mit einem zerstörten *Rec8*-Allel, sind die homozygoten Männchen und Weibchen steril (Bannister *et al.*, 2004). Während der Meiose übernimmt REC8 demnach wichtige Funktionen in Kohäsion, Synapsis und Rekombination.

### 1.3 Der Synaptonemalkomplex

Die evolutionär konservierte Struktur des Synaptonemalkomplexes wurde in den 50er Jahren erstmals durch elektronenmikroskopische Untersuchungen an meiotischen Zellen in Krebs-Hoden entdeckt (Moses, 1956; Fawcett, 1956). Der SC setzt sich aus verschiedenen meiosespezifischen Proteinkomponenten zusammen und kann während der Prophase I in meiotischen Zellen detektiert werden. Die proteinöse Struktur verknüpft die gepaarten, homologen Chromosomen und erstreckt sich dabei strickleiterartig entlang der Chromosomenachsen. Er ist maßgeblich an Synapsis, Rekombination und korrekter Segregation der Homologen während der ersten meiotischen Teilungsphase beteiligt.

Der vollständige SC, so wie er im Pachytän meiotischer Zellen vorkommt, besteht aus zwei Lateralelementen (LE), die sich parallel entlang der kompletten Chromosomenachsen der gepaarten Homologen erstrecken. Diese werden von zahlreichen Transversalfilamenten (TF) reißverschlussartig miteinander verknüpft. In der mittleren Region zwischen den gepaarten Homologen überlappen die Transversalfilamente und bilden dabei eine elektronendichte Struktur aus, die als Zentrales Element (Central Element, CE) bezeichnet wird. Zusätzlich lagern in sich im CE noch weitere Proteine ein, die ebenfalls zur elektronendichten Erscheinung dieser Region beitragen. Der Raum zwischen den beiden Lateralelementen hat bei Nagern eine Dimension von ca. 80-100 nm. Dieser Zwischenraum wird als Zentrale Region (CR) bezeichnet. Der Aufbau eines Synaptonemalkomplexes wurde bereits in Abbildung 1.4 anhand einer elektronenmikroskopischen Aufnahme am Beispiel der Ratte gezeigt. In Abbildung 1.6 soll der Aufbau der Struktur nochmals schematisch verdeutlicht werden. Dabei handelt es sich um ein stark vereinfachtes Modell, welches die einzelnen Proteinkomponenten an sich nicht berücksichtigt, aber dennoch die SC-Struktur sehr anschaulich wiedergibt.



**Abbildung 1.6:** Stark vereinfachtes Modell der Struktur des Synaptonemalkomplexes.

### 1.3.1 Proteinkomponenten des Synaptonemalkomplexes

In der Maus konnten unter Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper die drei Hauptproteinkomponenten SYCP1 (synaptonemal complex protein 1; 125 kDa), SYCP2 (190 kDa) und SYCP3 (30 und 33 kDa) identifiziert werden. Die cDNA dieser drei Proteine konnte isoliert werden und es erfolgte eine nähere Charakterisierung der Proteineigenschaften (Heyting *et al.*, 1985, 1987, 1989). In weiteren Studien konnten auch im Hamster homologe Proteine von SYCP1 und SYCP3 gefunden werden. Sie werden als Syn1 und Cor1 bezeichnet (Dobson *et al.*, 1994). Im Synaptonemalkomplex der Säuger stellt SYCP1 die Hauptproteinkomponente der Transversalfilamente dar (Meuwissen *et al.*, 1992). SYCP2 ist zusammen mit SYCP3 eine der Hauptproteinkomponenten der Axial- beziehungsweise Lateralelemente (Dobson *et al.*, 1994; Lammers *et al.*, 1994, Schalk *et al.*, 1998. Im elektronendichten Zentralen Element des Säuger-SC konnten weitere Proteine identifiziert werden: SYCE1, SYCE2 und TEX12 (Costa *et al.*, 2005; Hamer *et al.*, 2006).

Während die Struktur des Synaptonemalkomplexes und dessen Dimension innerhalb der Eukaryoten hochkonserviert sind, treten zwischen den einzelnen Spezies einige

Unterschiede auf. Diese beziehen sich vor allem auf die Primärstruktur der Proteinkomponenten und auf die proteinöse Zusammensetzung des SC (Page und Hawley, 2004). In zahlreichen anderen Modellorganismen konnten SC-Proteinkomponenten gefunden werden. Beispielsweise wurden Transversalfilamentbildende, und damit funktionell homologe Proteine zu SYCP1 identifiziert. Dazu zählen unter anderem das Zip1 in der Bäckerhefe (Sym et al., 1993), das C(3)G in der Fruchtfliege (Page und Hawley, 2001), SYP-1, SYP-2, SYP-3, SYP-4 im Fadenwurm (MacQueen et al., 2002; Colaiácovo et al., 2003; Smolikov et al., 2007;; Smolikov et al., 2009) oder SYCP1 in der Fischart Medaka (Iwai et al., 2006). Aber auch Proteine der Lateralelemente konnten in anderen Spezies identifiziert werden. So zum Beispiel die Proteine Red1 und Hop1 der Bäckerhefe (Hollingsworth et al., 1990; Smith und Roeder., 1997), HTP-1, HTP-2, HTP-3 und HIM-3 des Fadenwurms (Zetka et al., 1999; Couteau und Zetka, 2005) oder das SYCP3 in Medaka (Iwai et al., 2006, Baier et al., 2007a und b).

Im folgenden Abschnitt sollen einige der bisher bekannten SC-Proteinkomponenten verschiedener und beliebter Modellsysteme näher erläutert werden.

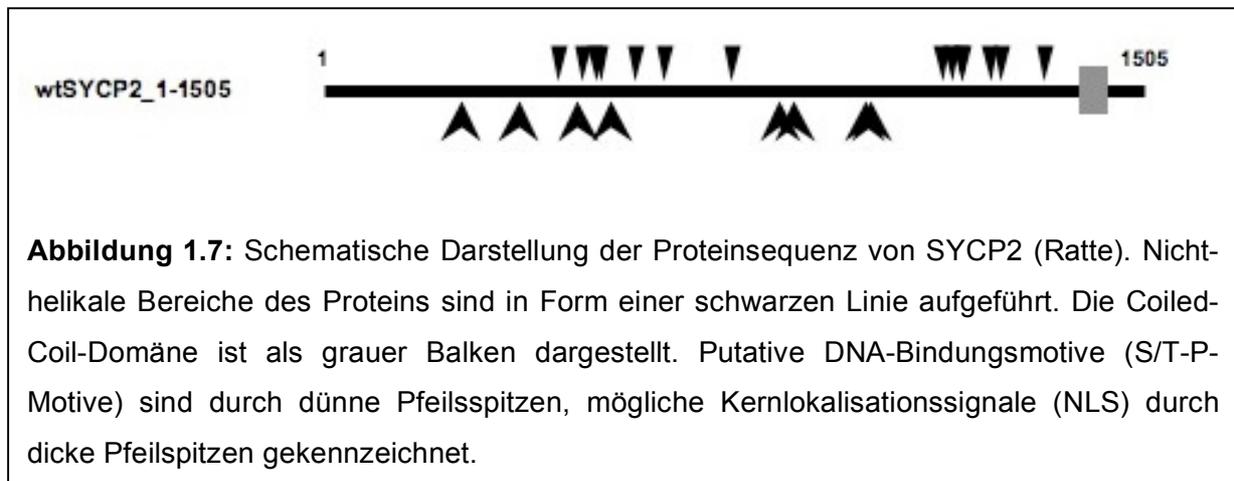
### 1.3.2 Proteine der Lateralelemente verschiedener Modellorganismen

#### Säuger:

Wie bereits erwähnt wurde, setzen sich die Lateralelemente des SC in Säugern hauptsächlich aus den Proteinen SYCP2 und SYCP3 zusammen. Bisher konnte gezeigt werden, dass diese Proteine untereinander binden können (Tarsounas et al., 1997; Yuan et al., 1998; Yang et al., 2006), sowie zusätzlich mit dem Chromatin und verschiedenen Kohäsinen (siehe 1.2.; Eijpe et al., 2000; Revenkova et al., 2001, Lee et al., 2003) in Verbindung treten.

Das **SYCP2** der Ratte umfasst 1505 Aminosäuren, das der Maus 1500 Aminosäuren und das des Menschen vergleichsweise 1530 Aminosäuren (Offenberg et al., 1998; Schalk et al., 1998; Yang et al., 2006). Es besitzt dabei eine molekulare Masse von 173 kDa. Aufgrund einer Vielzahl von Prolin-Resten im zentralen Bereich der Proteinsequenz hat SYCP2 einen basischen Charakter, was zu einer Veränderung der Wanderungseigenschaften in der Gelelektrophorese führt. Somit lässt sich das Molekulargewicht von 190000 erklären, dass man bei der Auftrennung des Proteins im SDS-PAGE erhält. In Abbildung 1.7 ist die Proteinsequenz von SYCP2 mit ihren verschiedenen Motiven und Besonderheiten schematisch dargestellt. Neben 15 S/T-P-Motiven, die eine unspezifische DNA-Bindung ermöglichen, gibt es zusätzlich 40 S/T-

S/T-Motive, welche die Konformation der ersteren Motive nachahmen können. Drei der S/T-P-Motive stellen potentielle Bindungsepitope für p34<sup>cdc2</sup>-Proteinkinasen dar. Zudem gibt es acht Erkennungsstellen für cAMP/cGMP-abhängige Proteinkinasen.



Die Phosphorylierung einer oder mehrerer dieser Erkennungssequenzen könnte beim Auf- und Abbau des SC während der Prophase I eine Rolle spielen (Offenberg *et al.*, 1998). In der Aminosäuresequenz des Proteins sind außerdem acht putative Kernlokalisierungssignale enthalten (NLS, nuclear location signal). Nach einer Analyse der Proteinsequenz und den Berechnungen nach Lupas *et al.* (1991) konnte im C-terminalen Bereich des Proteins eine konservierte  $\alpha$ -helikale Domäne mit Coiled-Coil-Charakter identifiziert werden (Offenberg *et al.*, 1998). Diese Region scheint für die Bindung an SYCP3 erforderlich zu sein (Tarsounas *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2006). Durch gezielte Mutagenese wurde eine Mauslinie generiert, die eine Deletion des Coiled-Coil-Bereiches von SYCP2 aufweist (Yang *et al.*, 2006). Bei der Betrachtung der Phänotypen dieser Mauslinie fällt ein Geschlechtsdimorphismus auf. Die Männchen sind steril, während die Weibchen Nachkommen erzeugen können, aber eine deutlich reduzierte Wurfgröße haben. In den männlichen Tieren kann kein SC ausgebildet werden und die Meiose wird bereits im Zygotän gestoppt. In den Weibchen hingegen, werden SC-ähnliche Strukturen detektiert, die jedoch lückenhaft erscheinen. Dabei verknüpft SYCP1 die Axialelemente über längere Distanzen. Das durch die Deletion verkürzte Protein (SYCP2t) kann nicht mehr mit SYCP3 interagieren. Es ist in an den Axialelementen detektierbar, diese sind jedoch abnormal und enthalten kein SYCP3. SYCP3 liegt stattdessen in Form großer Aggregate im Nukleoplasma vor. Demzufolge scheint die

Bindung an SYCP2 notwendig zu sein, damit SYCP3 in die Axialelemente integriert werden kann (Yang *et al.*, 2006; Yang und Wang, 2009).

**SYCP3** ist, wie schon mehrfach erwähnt, neben SYCP2 die zweite Hauptprotein-komponente der Axial- bzw. Lateralelemente der Säuger. Im Hamster wird das Protein auch als **COR1** bezeichnet. SYCP3 ist zwischen den Säugern konserviert, weist aber speziesspezifische Unterschiede auf (Botelho *et al.*, 2001). Bei der Ratte besteht das Protein aus 257 Aminosäuren, im Vergleich dazu umfasst es in der Maus 254 Aminosäuren, im Hamster 234 Aminosäuren und im Menschen setzt es sich aus 236 Aminosäuren zusammen (Dobson *et al.*, 1994; Lammers *et al.*, 1994). Beispielsweise erhält man in Ratte und Maus zwei Proteinbanden (30 kDa und 33 kDa) bei der Auftrennung durch Gelelektrophorese, während bei Hamster und Mensch nur eine SYCP3-spezifische Bande (30 kDa) detektierbar ist (Dobson *et al.*, 1994; Miyamoto *et al.*, 2003). In der Arbeit von Botelho *et al.* (2001) wurde gezeigt, dass im Hamster das Startcodon für COR1 nicht wie bei Ratte und Maus im 1. Exon liegt, sondern im Exon 2 lokalisiert werden kann. Im direkten Vergleich der Säugerproteine zeigt sich eine konservierte Domänenorganisation von SYCP3. Die zentrale  $\alpha$ -helikale Domäne wird im N- und C-Terminus von zwei nicht-helikalen Regionen flankiert (Dobson *et al.*, 1994; Lammers *et al.*, 1994). Im N-terminalen Bereich des Proteins (AS 1-116) befindet sich ein Kernlokalisierungssignal (AS 109-112; Chelsky *et al.*, 1989). Sequenzanalysen nach Lupas *et al.* (1991) haben ergeben, dass sich in der C-terminalen Region von SYCP3 eine Coiled-Coil-Domäne befindet. Diese befähigt das Protein mit sich selbst zu interagieren und dabei Dimere oder Oligomere zu formen (Tarsounas *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 1998). Wird SYCP3 unabhängig von anderen meiotischen Proteinen im heterologen System, also in nicht-meiotischen Säuger-Kulturzellen, exprimiert, so bildet es im Kern dickere und im Cytoplasma etwas feinere, faserartige Komplexe mit einer Dicke von 5-10 nm. Diese Strukturen weisen netzartige Verzweigungen auf (Yuan *et al.*, 1998, Baier *et al.*, 2007a). Yeast-Two-Hybrid Experimente haben gezeigt, dass SYCP3 neben der Bindung an sich selbst auch in der Lage ist mit SYCP2 zu interagieren (Tarsounas *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2006). Beim Vergleich der SYCP3-Sequenzen verschiedener Vertebraten konnten zwei hochkonservierte Motive, CM1 und CM2, identifiziert werden. Das erste Motiv (CM1) besteht aus 19 Aminosäuren und befindet sich im N-terminalen nicht-helikalen Bereich der Proteinsequenz. Das zweite konservierte Motiv (CM2) umfasst die sechs Aminosäuren, die sich C-terminal direkt an die

Coiled-Coil-Region anschließen (Baier *et al.*, 2007a, b). Nach den Berechnungen von Lupas *et al.* (1991) zeigt sich im Vergleich zwischen den verschiedenen Spezies eine Varianz hinsichtlich der Länge der Coiled-Coil-Domänen. Interessanterweise ist dabei der Abstand der beiden Motive CM1 und CM2 hochkonserviert und beträgt von Mensch bis hin zur Fischart Medaka exakt 145 Aminosäuren (Baier *et al.*, 2007a, b). Eine Ausnahme bildet dabei der Frosch *Xenopus tropicalis*, dessen konservierte Motive nur 141 Aminosäuren voneinander entfernt sind. Weitere Studien haben gezeigt, dass diese beiden Motive zusammen mit der Coiled-Coil-Region notwendig und sogar ausreichend für die Ausbildung höher geordneter SYCP3-Strukturen sind (Baier *et al.*, 2007a). SYCP3 besitzt zahlreiche potentielle Erkennungssequenzen für Proteinkinasen: zwei für die Proteinkinase A (PKA), vier für die Proteinkinase C (PKC; Kishimoto *et al.*, 1985), sowie fünf Erkennungsmotive für die Casein Kinase II (Pinna *et al.*, 1990). Die Phosphorylierung einer oder mehrerer dieser Sequenzen könnte zu strukturellen Veränderungen des Proteins führen und möglicherweise für den Auf- und Abbau des Synaptonemalkomplexes während der Prophase I von Bedeutung sein.

In *Sycp3* Knock-out-Mäusen zeigen sich Geschlechtsdimorphismen. In Spermatozyten resultiert die SYCP3-Defizienz in einer Abwesenheit von Axialelementstrukturen. Als Folge dessen werden die Zellen nach Erreichen des Zygotäns apoptotisch (Yuan *et al.*, 2000, Liebe *et al.*, 2004). Die Meiose der *Sycp3* Knock-out-Weibchen hingegen wird vollendet, führt jedoch sehr häufig zu Aneuploidie der Keimzellen und folglich zu einer deutlichen Reduktion der Wurfgrößen (Yuan *et al.*, 2002). In den mutanten Tieren kann SYCP2 nicht mehr in die Axialelemente integriert werden. Ähnlich wie bei der mutanten SYCP2t-Maus findet man in den Weibchen SC-ähnliche Strukturen, die jedoch zahlreiche Lücken aufweisen (Liebe *et al.*, 2004). SYCP3 scheint folglich essentiell zu sein, damit SYCP2 in die Axialelemente eingebaut wird und ein vollständiger SC gebildet werden kann. Somit muss durch die Deletion der Coiled-Coil-Domäne von SYCP2 in der bereits beschriebenen mutanten Maus (Yang *et al.*, 2006) ein Protein (SYCP2t) entstanden sein, welches so stark verändert ist, dass es auch ohne SYCP3 an den AE binden kann. Eine *Sycp2* Knock-out-Maus würde mehr Aufschlüsse über die Notwendigkeit des Proteins beim Aufbau der Axial- bzw. Lateralelemente bringen.

**Medaka:**

**MeSYCP3** wurde als homologes Protein des Säuger-SYCP3 aus Hodengewebe der Fischart Medaka (*Oryzias latipes*) isoliert (Iwai *et al.*, 2006). Ähnlich wie im Säuger konnte innerhalb der Hoden eine Expression in primären Spermatozyten detektiert werden, während das Protein in Spermatogonien, Spermatisden, elongierten Spermien oder somatischen Zellen nicht nachgewiesen werden konnte. Im Ovar von Medaka-Weibchen konnte MeSYCP3 ausschließlich in den Oocyten nachgewiesen werden (Iwai *et al.*, 2006). Dies lässt auf eine meiosespezifische Expression des Proteins schließen. Die MeSYCP3-Expression beginnt im Leptotän, und das Protein ist im späteren Zygotän und in der Prophase an den Axial- bzw. Lateralelementen lokalisierbar. In der Metaphase I ist es, anders als das homologe Protein der Säuger, nicht nur im Bereich der Centromere, sondern auch an den Chromosomenarmen detektierbar (Iwai *et al.*, 2006). In Immunblot-Analysen von Medaka-Hodenmaterial erhält man eine MeSYCP3-spezifische Bande bei einer molekularen Masse von 27 kDa (Iwai *et al.*, 2006; Baier *et al.*, 2007b). Das Protein ist mit nur 198 Aminosäuren deutlich kleiner als das SYCP3 der Säuger. Die Coiled-Coil-Domäne ist ebenfalls kleiner als die der Ratte und zeigt insgesamt auch nur 32%-Sequenzidentität. Dennoch konnten bei einem Vergleich der Anfangs- und Endbereiche dieser Domäne einen hohen Grad an Konservierung festgestellt werden. Es konnte eine Identität von 69% bzw. 79% berechnet werden. Eine zusätzliche hohe Sequenzübereinstimmung zwischen den homologen Proteinen von Ratte und Medaka zeigt sich auch in den beiden konservierten Motiven (CM1: 88%, CM2: 66%; Baier *et al.*, 2007b). Eine derartige Konservierung der Domänenorganisation und die hochgradige Erhaltung einzelner Sequenzmotive zwischen zwei evolutionär entfernten Spezies, wie Säuger und Fisch, lassen erahnen, dass diese Proteinsequenzeigenschaften für die Funktion der Proteine essentiell sein müssen. Die Länge der Aminosäuresequenz an sich, scheint hingegen variabel sein zu können.

In zusätzlichen Experimenten wurden die Polymerisationseigenschaften der SYCP3-Proteine aus Medaka und Ratte miteinander verglichen. Ähnlich wie das homologe Protein der Säuger, ist auch MeSYCP3 dazu in der Lage mit sich selbst zu interagieren. Wird es unabhängig von anderen meiotischen Proteinen in somatischen Kulturzellen exprimiert, bildet es höher geordnete Strukturen im Kern und im Cytoplasma aus (Iwai *et al.*, 2006; Baier *et al.*, 2007b). Demnach ist auch die

Fähigkeit zur Polymerisation zwischen den weit entfernten Spezies hochkonserviert (Baier *et al.*, 2007b). Koexpressionstudien von SYCP3 der Ratte und MeSYCP3 in COS-7 Zellen haben gezeigt, dass die beiden Proteine sogar in der Lage sind untereinander filamentartige Strukturen auszubilden (Baier *et al.*, 2007b).

In 450 Millionen Jahren Evolution haben sich zwischen SYCP3 der Ratte und dem homologen Protein aus Medaka zwar deutliche Sequenzunterschiede angehäuft, dennoch zeigen die Proteine eine konservierte Domänenorganisation, besitzen hochgradig erhaltene Sequenzmotive und sind zudem fähig speziesübergreifende polymere Strukturen zu bilden. Die Konserviertheit des Proteins geht sogar soweit, dass eine Deletion des konservierten Motivs 2 (CM2) im Protein der einen Spezies negative Effekte auf die Polymerisationseigenschaften der jeweils anderen Spezies hatte (Baier *et al.*, 2007b). Einer solch hoher Grad an Erhaltung der Domänenstruktur und konservierten Bereiche eines Proteins, deutet auf dessen enorme Notwendigkeit und Funktionalität während der Meiose hin.

#### **Fadenwurm:**

Im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* wurden **HIM-3** und seine Paralogen **HTP-1**, **HTP-2** und **HTP-3** als Proteine der AE bzw. LE beschrieben. HIM-3 wird als homologes Protein zu Hop1 der Hefe angesehen (Zetka *et al.*, 1999). Es ist während der Prophase an den sich bildenden Axial- bzw. Lateralelementen lokalisiert und verbleibt bis zum Übergang von Metaphase I zu Anaphase I an den Chromosomen. Studien an *him-3*-mutanten haben gezeigt, dass das Protein notwendig ist, um weitere SC-Proteinkomponenten, wie SYP-1, SYP-2, SYP-3 und SYP-4 an die Chromosomenachsen zu rekrutieren. In Abwesenheit von HIM-3 kommt es zu Beeinträchtigungen bei der Paarung und der Synapsis der homologen Chromosomen (Zetka *et al.*, 1999; Couteau *et al.*, 2004; Smolikov *et al.*, 2009). HTP-3 bildet Komplexe mit HIM-3 und ist dabei essentiell für die Bindung von HIM-3 an die Axialelemente (Goodyer *et al.*, 2008). HTP-1 scheint die Paarung von homologen Chromosomen zu regulieren, indem es die Bindung des Zentralelement-Proteins SYP-1 an ungepaarte Chromosomenachsen im Leptotän bzw. Zygotän verhindert (Couteau und Zetka, 2005; Martinez-Perez und Villeneuve, 2005). HTP-2 hingegen scheint Synapsis-fördernd zu wirken, wobei bisher noch ungeklärt ist, ob es dabei allein als Antagonist zu HTP-1 wirkt oder mit diesem zusammen die Einlagerung der Proteine der Zentralen Region zwischen den AE/LE der gepaarten Homologen

fördert (Couteau und Zetka, 2005).

### **Bäckerhefe:**

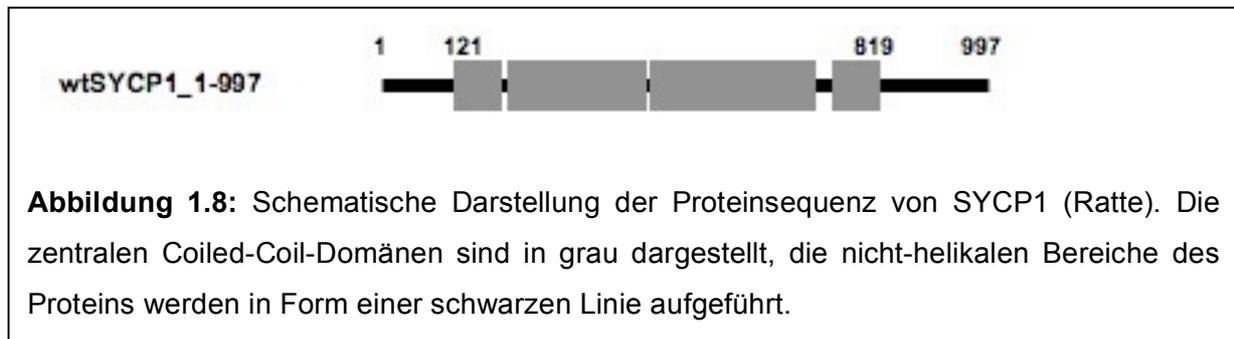
In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden die beiden meiosespezifischen Proteine **Red1** und **Hop1** identifiziert. Diese spielen eine bedeutende Rolle im Aufbau der Axial- bzw. Lateralelemente des SC der Hefe (Hollingsworth *et al.*, 1990; Smith und Roeder., 1997). Hop1 hat eine molekulare Masse von 70 kDa und gehört einer Proteinfamilie an, die sich durch eine so genannte HORMA-Domäne auszeichnet. HOP1 benötigt eine Bindung an Red1, um sich an das Chromatin anlagern zu können. Red1 hat eine molekulare Masse von 95,5 kDa und weist strukturelle Ähnlichkeiten zu SYCP2 der Säuger auf (Offenberg *et al.*, 1998). Seine Proteinsequenz umfasst 827 Aminosäuren (Thompson and Roeder, 1989). Red1 besitzt mit 6 S/T-P- und 20 S/T-S/T-Motiven zahlreiche DNA-Bindungsmotive (Thompson und Roeder, 1989). Durch weitere Analysen der Proteinsequenz nach Lupas *et al.* (1991) konnte auch eine Coiled-Coil-Domäne im C-terminalen Bereich von Red1 identifiziert werden. Die Verteilung des Proteins entlang der Chromosomenachsen ist lückenhaft, daher wird angenommen das Red1 die Bildung der Axialelemente initiiert. Für die Vervollständigung der AEs müssen jedoch noch weitere Proteine binden (Smith und Roeder, 1997). Red1 bildet Homo-Oligomere aus, und bindet zusätzlich die Proteine Hop1 und Mek1. Beim letzteren handelt es sich um eine Kinase, deren Anwesenheit für die Ausbildung einer normalen Synapsis essentiell ist (Rockmill und Roeder, 1990; Bailis und Roeder 1998; de los Santos und Hollingsworth, 1999). Hop1 dissoziiert im Laufe der Synapse, während Red1 bis zum Ende des Pachytäns an den Chromosomen verbleibt.

### **1.3.3 Proteine der Zentralen Region**

Die Zentrale Region des SC umfasst den Raum zwischen den Lateralelementen gepaarter homologer Chromosomen. Sie setzt sich aus den Proteinen der Transversalfilamente und des Zentralen Elements zusammen. Bei Nagern hat die CR eine Breite von circa 80-100 nm.

### **Säuger:**

Das **SYCP1** der Säuger bildet die Transversalfilamente aus und stellt dabei die Hauptproteinkomponente der Zentralen Region des SC dar. Wie bereits erwähnt, wird das homologe Protein im Hamster als **Syn1** bezeichnet (Dobson *et al.*, 1994).



**Abbildung 1.8:** Schematische Darstellung der Proteinsequenz von SYCP1 (Ratte). Die zentralen Coiled-Coil-Domänen sind in grau dargestellt, die nicht-helikalen Bereiche des Proteins werden in Form einer schwarzen Linie aufgeführt.

Es spielt eine zentrale Rolle bei der Verknüpfung der Lateralelemente der gepaarten Homologen (Meuwissen *et al.*, 1992; Dobson *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1996; Schmekel *et al.*, 1996; de Vries *et al.*, 2005). In Abbildung 1.8 wird eine schematische Darstellung vom SYCP1 der Ratte gezeigt. Es umfasst 997 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 120 kDa. Im C-Terminus des Proteins befinden sich Kernlokalisierungssignale (NLS), eine potentielle Erkennungssequenz für die p34<sup>cdc2</sup>-Kinase und mehrere Erkennungsmotive für cAMP- bzw. cGMP-abhängige Proteinkinasen (Meuwissen *et al.*, 1992). Weitere Bindungsmotive für die Proteinkinase C (PKC) finden sich über die gesamte Proteinsequenz verteilt. Eine oder mehrere dieser Phosphorylierungsstellen könnten beim Auf- und Abbau des SC eine Rolle spielen. Die Sequenzanalyse nach Lupas *et al.* (1991) hat eine zentrale  $\alpha$ -helikale Domäne (AS 121-819) hervorgebracht, die von N- und C-terminalen nicht-helikalen Regionen flankiert wird (Meuwissen *et al.*, 1992). Sie weist einen Coiled-Coil-Charakter auf und ermöglicht die Homo-Dimerisierung der SYCP1-Moleküle. In Immungold-Lokalisierungen am Elektronenmikroskop konnte gezeigt werden, dass die SYCP1-Moleküle innerhalb der Dimere die gleiche Polarität besitzen. Die C-Termini sind innerhalb der SC-Struktur in die Lateralelemente eingebettet, während die N-Termini der Dimere in die zentrale Region ragen. Dort interagieren die gegenüberliegenden Dimere in einer Kopf-an-Kopf-Anordnung und verknüpfen so die beiden Lateralelemente des SC (Dobson *et al.*, 1994; Schmekel *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996; de Vries *et al.*, 2005). Im heterologen System, in Abwesenheit anderer meiotischer Proteine, bildet SYCP1 Netzwerke aus filamentösen Strukturen aus, so genannte Polykomplexe (Öllinger *et al.*, 2005). Bei näherer Betrachtung der Polykomplexe im Elektronenmikroskop wird deutlich, dass die SYCP1-Moleküle innerhalb dieser Strukturen in einer SC-ähnlichen Anordnung vorliegen. Das heißt, die N-Termini interagieren in einer Zentralelement-ähnlichen Region, während die C-Termini nach außen gerichtet sind. Dabei scheinen die C-Termini bei der

Aneinanderlagerung der SC-ähnlichen Strukturen zu Polykomplexen eine zentrale Rolle zu spielen. Denn eine Deletion des C-Terminus hat den Verlust der Fähigkeit zur Polykomplexbildung zur Folge (Öllinger *et al.*, 2005).

Der Verlust des Proteins in *Sycp1* Knock-out-Mäusen verursacht Sterilität in beiden Geschlechtern. Dabei findet zwar eine Aneinanderlagerung homologer Autosomen statt, die Ausbildung einer Synapse kann jedoch nicht erfolgen. In den Männchen kann keine Paarung der X-Y-Chromosomen beobachtet werden. Die meisten Spermatozyten arretieren im Zygotän und zeigen Probleme bei der Rekombination und der Crossover-Bildung (de Vries *et al.*, 2005). Demzufolge scheint SYCP1 für die Homologenpaarung an sich nicht notwendig sein. Bei der Paarung kleinerer homologer Bereiche, wie im Falle der pseudoautosomalen Regionen der X- und Y-Chromosomen, scheint es jedoch essentiell zu sein (de Boer und Heyting, 2006).

Drei weitere Säugerproteine, **SYCE1**, **SYCE2** (**s**ynaptonemal complex **c**entral **e**lement) und **TEX12** (**t**estis **e**xpressed sequence **12**) konnten als Komponenten des Zentralen Elements identifiziert werden (Costa *et al.*, 2005; Hamer *et al.*, 2006). Die meiosespezifischen Proteine SYCE1 und SYCE2 sind in Vertebraten konserviert. Sie binden an sich selbst, untereinander und an den N-Terminus von SYCP1 (Costa *et al.*, 2005). *Syce1*<sup>-/-</sup>-Mäuse sind in beiden Geschlechtern unfruchtbar (Bolcun-Filas *et al.*, 2009). Die Meiose wird in der Prophase I gestoppt und die Zellen werden daraufhin apoptotisch. In den Weibchen gibt es keine Follikelbildung und in den Hoden der Knock-out-Männchen existieren keine postmeiotischen Zellen. Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass weder die Homologen-Paarung der Autosomen, noch die Bildung der Axialelemente und die Initiierung von DSBs normal erfolgen können. Eine Paarung der pseudoautosomalen Regionen zwischen X- und Y-Chromosom im Männchen kann nicht detektiert werden. Außerdem wird keine SC-Struktur ausgebildet (Bolcun-Filas *et al.*, 2009). Als Folge dessen treten Probleme bei der Reparatur der DSBs auf und es werden die Crossover-Bildung bleibt aus. Strukturen aus SYCP1-Dimeren, sowie Komplexe aus SYCE2 und TEX12 können zwischen den AE lokalisiert werden. Eine Interaktion der N-Termini von SYCP1-Dimeren und die Rekrutierung von SYCE2 und TEX12 an die Chromosomenachsen können folglich auch ohne die Anwesenheit von SYCE1 erfolgen. Das Protein ist jedoch notwendig für die Stabilisierung und Formierung der TF und somit für die Ausbildung eines vollständigen SC. Außerdem scheint es essentiell für die Reparatur

von DSBs und für deren Reifung zu Crossover-Ereignissen zu sein (Bolcun-Filas *et al.*, 2009).

Der Phänotyp der *Syce2* Knock-out-Maus ist dem der *Sycp1*<sup>-/-</sup>-Maus sehr ähnlich. Die Homologen können sich zwar paaren, es erfolgt jedoch keine vollständige Synapse, obwohl SYCP1 vereinzelt zusammen mit SYCE1 an den AE nachweisbar ist. Die Knock-out-Tiere sind in beiden Geschlechtern unfruchtbar. Demnach benötigt SYCP1 die Bindung an SYCE1 und SYCE2 um eine durchgängige Verknüpfung der beiden Lateralelemente zum SC zu vermitteln. Dabei scheint die Bildung des Zentralen Elements essentiell zu sein, damit sich die C-Termini in den Axialelementen verankern können (Bolcun-Filas *et al.*, 2007; Costa und Cooke, 2007).

Auch TEX12 wird spezifisch in meiotischen Zellen exprimiert und ist in Vertebraten konserviert (Hamer *et al.*, 2006). Es konnte als Protein des Zentralen Elements identifiziert werden und ist in *Sycp1*<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht mehr an den Chromosomen lokalisierbar. Es bindet an SYCE2 und ist dabei essentiell für dessen Rekrutierung an die CE-Struktur. Während SYCP1 und SYCE1 noch lückenhaft an den Chromosomenachsen vorhanden sind, ist SYCE2 in *Tex12*<sup>-/-</sup>-Mäusen dort nicht mehr lokalisierbar. Die Synapsis kann in diesen Tieren zwar bruchstückhaft erfolgen, erstreckt sich jedoch nicht über die gesamte Länge der Chromosomenachsen. Außerdem treten Probleme bei der Crossover-Bildung auf. Nach einer Initiierung der Rekombination können die Rekombinationsproteine DMC1 und RPA in *Tex12*<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht mehr von den betreffenden Chromosomenstellen entfernt werden, was eine Reifung zu Crossover-Ereignissen verhindert (Hamer *et al.*, 2008). Demzufolge scheinen alle drei Proteine des Zentralen Elements und deren Zusammenspiel innerhalb der SC-Struktur für eine vollständige Verknüpfung der Lateralelemente essentiell zu sein.

Ein weiteres Protein der Zentralen Region ist **FKBP6**. Dieses tritt in Extrakten von Maus-Hoden als Teil eines Komplexes mit SYCP1 auf (Crackower *et al.*, 2003). Im Phänotyp von *Fkbp6*<sup>-/-</sup>-Mäusen tritt ein geschlechtsspezifischer Dimorphismus auf. Während die Weibchen keinerlei Abnormalitäten zeigen, sind die Männchen unfruchtbar. Dabei kommt es zu Falschpaarungen der Chromosomen, so dass keine normalen Pachytän-Spermatozyten gebildet werden können (Crackower *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Phänotypen wurde FKBP6 mehrfach in Menschen untersucht und wird mit Unfruchtbarkeit in Verbindung gebracht (Zhang *et al.*, 2007).

**Medaka:**

Zusammen mit dem Lateralelement-Protein MeSYCP3 konnte auch **MeSYCP1** als Proteinkomponente des Synaptonemalkomplexes im Fisch identifiziert werden (Iwai *et al.*, 2006). MeSYCP1 hat eine molekulare Masse von 104 kDa und besteht aus 895 Aminosäuren. Das Expressionsmuster von MeSYCP1 ist vergleichbar mit dem des homologen Säugerproteins. Im Medaka-Hoden konnte das Protein ausschließlich in primären Spermatozyten und in den Ovarien der Weibchen nur in den Oocyten nachgewiesen werden (Iwai *et al.*, 2006). Folglich kann angenommen werden, dass MeSYCP1 ein meiosespezifisches Protein ist. Ähnlich wie beim homologen Protein der Säuger, beginnt die Expression von MeSYCP1 im späten Leptotän und steigt im Zygotän stark an. Während des darauf folgenden Pachytäns ist MeSYCP1 kontinuierlich entlang der gepaarten Homologenachsen lokalisierbar. Es fungiert dabei als Hauptproteinkomponente der Transversalfilamente und verknüpft die homologen Chromosomen miteinander. Im Diplotän ist das Protein limitiert nur noch an den Stellen der Chromosomen detektierbar, an denen noch keine Desynapse stattgefunden hat. In der anschließenden Metaphase I, nach vollständiger Auflösung des SC, ist MeSYCP1 nicht mehr detektierbar (Iwai *et al.*, 2006).

Im Gegensatz zum homologen Protein der Säuger ist MeSYCP1 kontinuierlich entlang der Achsen der gepaarten XY-Chromosomen detektierbar. In der Fischspezies konnte jedoch gezeigt werden, dass keine morphologischen Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtschromosomen festgestellt werden konnten und sie sich daher über ihre gesamte Länge paaren können (Uwa und Ojima, 1981; Iwai *et al.*, 2006). Wie bereits erwähnt, erfolgt die Paarung der XY-Chromosomen bei Säugern nur über kurze pseudoautosomale Bereiche, was die lückenhafte Lokalisation der SYCP1-Moleküle erklärt.

**Fadenwurm:**

**SYP-1, SYP-2, SYP-3** und **SYP-4** sind essentielle Proteinkomponenten der Zentralen Region im SC von *Caenorhabditis elegans* (MacQueen *et al.*, 2002; Colaiácovo *et al.*, 2003; Smolikov *et al.*, 2007; Smolikov *et al.*, 2009). Sie benötigen das AE/LE-Protein HIM-3 an den Chromosomenachsen um die Synapsis einleiten zu können (Colaiácovo *et al.*, 2003; Couteau *et al.*, 2004; Smolikov *et al.*, 2007, Smolikov *et al.*, 2009). Ähnlich wie das SYCP1 der Säuger besitzen auch SYP-1, SYP-2, SYP-3 und

SYP-4 zentrale Coiled-Coil-Motive (Mac Queen *et al.*, 2002; Colaiácovo *et al.*, 2003; Smolikov *et al.*, 2009). Jedoch ist jedes dieser Proteine deutlich kleiner als SYCP1. Dennoch besteht kaum ein Unterschied in der Dimension der SC zwischen Säuger und *C. elegans* (Goldstein und Slaton, 1982, Dernburg *et al.*, 1998). Demzufolge müssen die TF-Proteine im Fadenwurm innerhalb der SC-Struktur anders organisiert sein. Da sich die Proteine für den Aufbau der Synapsis gegenseitig benötigen, wird postuliert, dass sie vielleicht unter Bildung einer strukturellen Einheit die beiden LEs miteinander verknüpfen (Mac Queen *et al.*, 2002; Colaiácovo *et al.*, 2003). Analysen an SYP-1-, SYP-2-, SYP-3- oder SYP-4-Mutanten haben gezeigt, dass Chromosomenpaarung an den so genannten Paarungszentren (PC, cis-aktive Chromatinregionen in *C. elegans*), erfolgen kann, diese geht jedoch frühzeitig wieder verloren. Demnach scheinen die Proteine für die Bildung der PCs nicht essentiell zu sein. In den Mutanten kommt es jedoch nicht zur Ausbildung einer stabilisierenden Synapsis und auch nicht zur Reifung der Rekombinationsereignisse zu Crossover. Dies führt letztendlich zu fehlerhafter Segregation und Aneuploidie der Keimzellen (Mac Queen *et al.*, 2002; Colaiácovo *et al.*, 2003, Smolikov *et al.*, 2007; Smolikov *et al.*, 2009).

### **Fruchtfliege:**

In der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) wurde das Protein **C(3)G** (crossover supressor on 3 of Gowen) als Komponente der Transversalfilamente des SC identifiziert (Page und Hawley, 2001). Es wird angenommen, dass die C(3)G-Moleküle innerhalb der SC-Struktur ähnlich organisiert sind wie die SYCP1-Moleküle der Säuger. Beide Proteine besitzen eine konservierte Domänenstruktur, mit einer zentralen  $\alpha$ -helikalen Coiled-Coil-Domäne, und flankierenden nicht-helikalen Bereichen. Dennoch besteht keine Ähnlichkeit der beiden Proteine auf Aminosäuresequenz-Ebene (Page und Hawley, 2001). In elektronenmikroskopischen Studien an den Ovarien mutanter Fliegen konnte gezeigt werden, dass in der Abwesenheit von C(3)G weder SC noch Crossover-Ereignisse zwischen den homologen Chromosomen detektiert werden können (Meyer, 1960; Smith und King, 1968; Rasmussen, 1975). Demnach scheint das Protein für die Verknüpfung der homologen Chromosomen essentiell zu sein.

**Bäckerhefe:**

Das Protein **Zip1** der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) weist zwar keinerlei Sequenzhomologien mit SYCP1 auf, erfüllt aber dennoch eine ähnliche Funktion bei der Ausbildung der SC-Struktur. Und auch hier ist die Domänenorganisation vergleichbar mit dem homologen Protein der Säuger. Neben einer zentralen Coiled-Coil-Domäne, die eine Homo-Dimerisierung der Proteine ermöglicht (Sym *et al.*, 1993, Sym und Roeder, 1995) besitzt Zip1 flankierende nicht-helikale N- und C-terminale Bereiche. Mutationen, welche die Länge der Coiled-Coil-Domäne verändern, führen zu entsprechenden Veränderungen in der SC-Dimension (Sym und Roeder, 1995, Tung und Roeder, 1998). Demzufolge muss Zip1 die strukturgebende Proteinkomponente der Transversalfilamente in *S. cerevisiae* sein. Analog zum Säuger bildet Zip1 Homodimere aus, die innerhalb des SC mit ihren C-Termini in den LEs verankert sind und durch eine Kopf-an-Kopf-Anordnung der N-Termini im Zentralen Element die Chromosomen reißverschlussartig miteinander verknüpfen (Dong und Roeder, 2000). In *Zip1*-null-Mutanten findet keine Synapsis statt. Es kommt zwar zu einer Paarung der Homologen, der Abstand zwischen diesen ist jedoch zu groß. Als Folge kommt es zu einer erheblichen Reduktion von Crossover-Ereignissen (Sym *et al.*, 1993; Sym und Roeder, 1994; Rockmill *et al.*, 1995; Tung und Roeder, 1998). Ähnlich wie das homologe SYCP1 der Säuger, kann auch Zip1 höher geordnete Polykomplex-Strukturen ausbilden (Sym und Roeder, 1995).

**1.3.4 Organismen ohne SC**

Obwohl der Synaptonemalkomplex eine in den meisten Spezies verbreitete, und hochkonservierte Struktur ist, gibt es dennoch Organismen, die während der Prophase I keinen SC ausbilden. Dazu zählen beispielsweise die Bierhefe (*Saccharomyces pombe*) und der Pilz *Aspergillus nidulans*. Bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* findet man sogar einen Geschlechtsdimorphismus hinsichtlich der SC-Bildung. Denn während weibliche Fruchtfliegen in der Meiose I einen SC ausbilden, kommt diese Struktur in den männlichen Fliegen nicht vor (Meyer, 1960; Rasmussen, 1973). Zudem findet in *Drosophila*-Männchen keine Rekombination statt (Morgan 1912).

### 1.3.5 Bildung und Auflösung des SC am Beispiel der Säuger

Die Bildung der Axialelemente wird bereits im so genannten Prä-Leptotän, schon vor der meiotischen S-Phase und Prophase eingeleitet. Dabei beginnt die Anlagerung der Kohäsine an die Schwesterchromatiden. Das meiosespezifische Kohäsin REC8 ist in dieser Phase als erstes an den Chromosomen nachweisbar und legt wahrscheinlich den Grundstein für die Bindung weiterer Kohäsinkomplexkomponenten und die Einlagerung der SC-Proteine SYCP2 und SYCP3 (Eijpe *et al.*, 2003). In der Hefe ist REC8, bzw. sein homologes Protein Scc3, notwendig für die Bildung der Axialelemente (Klein *et al.*, 1999). In *Rec8*-mutanten Mäusen können sich SYCP2 und SYCP3 zwar in AE-ähnliche Strukturen integrieren. Im Gegensatz zum Wildtyp jedoch, erfolgt die Ausbildung von SC-Strukturen zwischen den Schwesterchromatiden und nicht zwischen den homologen Chromosomen (Bannister *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2005). Demnach scheint REC8 in den Säugern nicht zwingend notwendig für eine AE-Integration der SC-Proteinkomponenten SYCP2 und SYCP3, wird aber dennoch für eine korrekte Ausbildung des SC zwischen den homologen Chromosomen benötigt.

Nachdem REC8 gebunden hat, lagern sich im Leptotän weitere Proteine an die Chromosomenachsen an, darunter die Kohäsinkomplexkomponenten SMC1 $\beta$ , SMC3 und die SC-Proteine SYCP2 und SYCP3. Diese bilden schließlich die Axialelemente aus (Eijpe *et al.*, 2003). Dabei wird angenommen, dass die Kohäsinkomplexe eine rudimentäre Axialelement-Grundlage bilden. Diese kann sich scheinbar unabhängig von SYCP2 und SYCP3 ausbilden. Doch nur durch die Einlagerung der beiden LE-Proteine bilden sich schließlich die „echten“ Axialelemente aus. (Nasmyth, 2001; Pelttari *et al.*, 2001; Eijpe *et al.*, 2003; Page und Hawley., 2004). Im Zygotän erfolgt die Verknüpfung der Axial bzw. Lateralelemente durch die Transversalfilamente. Nach dem bisher vermuteten Modell kommt es dabei zu weniger stabilen Kopf-an-Kopf-Bindungen zwischen den N-Termini der SYCP1-Homodimere. Die Stabilisierung wird erst durch die Bindung von SYCE1 erreicht. Diese wiederum scheint notwendig zu sein, damit die C-Termini der SYCP1-Dimere an die Lateralelemente binden können. Der vollständige SC, wie man ihn während des Pachytäns findet, kann erst dann entstehen, wenn im Zentralen Element SYCE2-Moleküle an die Komplexe aus SYCE1 und den SYCP1-N-Termini binden (Bolcun-Filas *et al.*, 2007; Costa und Cooke, 2007). Für die Rekrutierung von SYCE2 an das Zentrale Element ist wiederum TEX12 notwendig (Hamer *et al.*, 2006). Demnach

scheint die Stabilisierung des SC von SYCE2 und TEX12 vermittelt zu werden. Nach dem Pachytän, am Übergang zum Diplotän, kommt es zur Auflösung des SC. Dabei lösen sich die Verknüpfungen über die Transversalfilamente weitgehend wieder auf, abgesehen von den Stellen, an denen Crossover erfolgte. SYCP2 und SYCP3 sind noch bis zur Metaphase an den Centromer-Regionen der Chromosomen nachweisbar (Lammers *et al.*, 1994; Schalk *et al.*, 1998). Welche Faktoren den Abbau des SC initiieren und wie dieser im Detail abläuft, ist bisher weitgehend ungeklärt. Wie bereits beschrieben wurde, besitzen die drei Hauptproteinkomponenten des SC SYCP1, 2 und 3 in ihren Aminosäuresequenzen zahlreiche Phosphorylierungsstellen. Diese könnten unter Umständen eine Rolle beim Auf- und Abbau des SC spielen (Meuwissen *et al.*, 1992; Lammers *et al.*, 1994; Offenberg *et al.*, 1998).

Am Beispiel von SYCP3 wurde gezeigt, dass sich der Phosphorylierungszustand des Proteins im Laufe der Prophase I verändert. Experimente haben ergeben, dass während der einzelnen Prophase-Stadien mehrere verschiedene Phosphorylierungsvarianten des Proteins koexistieren (Lammers *et al.*, 1995). Weitere Versuche mit vorübergehend kultivierten Pachytän-Spermatozyten haben gezeigt, dass diese meiotischen Zellen in der Lage sind rekombinantes SYCP1 und SYCP3 zu phosphorylieren. Demnach könnten SYCP3 und SYCP1 während des Pachytäns zu einem bestimmten Grad phosphoryliert sein. In einem ähnlichen Experiment wurden die kultivierten Pachytän-Spermatozyten über einen Zeitraum von sechs Stunden mit Okadasäure inkubiert. Okadasäure induziert in den betreffenden Zellen das Fortschreiten der Meiose bis hin zur Metaphase I. Den Spermatozyten ging dabei die Fähigkeit zur Phosphorylierung von SYCP1 und SYCP3 weitgehend verloren. Dies könnte im Zusammenhang mit der Tatsache stehen, dass *in vivo* zum Zeitpunkt der Metaphase I SYCP1 und SYCP3 bereits abgebaut sind. Denn einige Studien haben gezeigt, dass SYCP1 und SYCP3 nach Auflösung der Synapse nicht mehr an den Chromosomen detektierbar sind und deren Expression kurze Zeit später, zu Beginn der Metaphase I, nicht mehr nachgewiesen werden kann, was für einen Abbau der Proteine spricht (Meuwissen *et al.*, 1992, Dobson *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1996). Ausgehend von diesen Beobachtungen, kann angenommen werden, dass durch die künstlich eingeleitete Metaphase I, ein Umfeld geschaffen wurde, in dem die entsprechenden Kinasen eigentlich nicht mehr notwendig wären und folglich nicht mehr synthetisiert werden (Tarsounas *et al.*, 1999). Zwar konnten bisher keine

Kinasen identifiziert werden, die am Auf- und Abbau des SC beteiligt sind, aber die Wahrscheinlichkeit, dass dieser Prozess mit verschiedenen Phosphorylierungsschritten einhergeht, ist relativ groß.

Der Abbau der SC-Komponenten im Anschluss an das Diplotän wird vermutlich durch Ubiquitinierung vermittelt. In Yeast-Two-Hybrid-Experimenten konnte gezeigt werden, dass SYCP1 und SYCP3 mit Ubc9 interagieren können. Dabei handelt es sich um ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym, welches die betreffenden Proteine für einen Zell-Zyklus-abhängigen Abbau markiert (Tarsounas *et al.*, 1997).

### 1.3.6 Bedeutung des SC

Wie der Name schon vermuten lässt, ist der SC ein Komplex aus mehreren Proteinkomponenten. Studien an mehreren Mutanten in verschiedenen Organismen haben gezeigt, dass diese Struktur nur dann vollständig funktionell ist, wenn alle Komponenten vorhanden sind. Zwar gibt es einige strukturelle Untereinheiten, die recht unabhängig voneinander zu sein scheinen, wie beispielsweise die Axialelemente und das Zentrale Element. Aber für den Zusammenbau eines kontinuierlichen SC, der die homologen Chromosomen im Pachytän der Prophase I über ihre gesamte Länge reißverschlussartig miteinander verknüpft, bedarf es dem Zusammenspiel aller Komponenten. Studien an all den bisher besprochenen Knock-out-Mutanten haben gezeigt, dass der SC eine wichtige Rolle bei der Rekombination und der Reifung von DSBs zu Crossover-Ereignissen übernimmt (Yuan *et al.*, 2000; Crackower *et al.*, 2003; de Vries *et al.*, 2005; Hamer *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Bolcun-Filas *et al.*, 2007, 2009). Die SC-Struktur an sich scheint für eine Paarung der Homologen während der Prophase I nicht essentiell zu sein. Es hat sich jedoch gezeigt, dass ein fehlender oder unvollständiger SC die Crossover-Bildung stark reduziert, obwohl es innerhalb der Chromosomen zu Initiierung zahlreicher DSBs kommt. Ein vollständig ausgebildeter stabiler SC bringt die Homologen so eng zueinander, dass Rekombination zwischen den Chromosomen und die Reparatur der Bruchstellen problemlos erfolgen kann. Die Einzelstrang-Invasionen der Homologen reifen an einigen Stellen zu doppelten Holidaystrukturen aus (Hunter und Kleckner; 2001), was zu stabilen Chiasmata (Crossover) führt. Diese sind für den Zusammenhalt der Homologen nach Auflösung des SC im Diplotän und später für eine korrekte Segregation der Chromosomen nötig. Somit hat der SC auch eine Bedeutung für die Aufteilung der homologen Chromosomen auf die Tochterzellen. Dies kann auch durch die Phänotypen der mutanten Mäuse belegt werden. Denn

diese zeigen oftmals einen Geschlechtsdimorphismus. Während die Meiose der Männchen meist im Zygotän oder Pachytän unterbrochen wird und die Zellen apoptotisch werden, resultiert das Fehlen eines SC-Proteins in den Weibchen meist in einer deutlichen Reduktion der Wurfgröße. Dies wiederum ist eine Folge falscher Segregation der Chromosomen auf die Tochterzellen (Aneuploidie). Demnach scheinen die Kontrollmechanismen in den männlichen Tieren strenger abzulaufen (Hunt und Hassold, 2002). Außerdem kann in den Männchen ohne Ausbildung eines SC auch keine Paarung der Geschlechtschromosomen erfolgen.

Welche Bedeutung der SC für den Ablauf der Meiose hat, wird auch anhand von Patientenstudien deutlich. Unfruchtbarkeit bei Männern konnte in einigen Fällen auf Mutationen im *Sycp3*-Gen zurückgeführt werden (Miyamoto *et al.*, 2003, Judis *et al.*, 2004). Auch Mutationen im *Fkbp6*-Gen werden mit Unfruchtbarkeit in Verbindung gebracht (Wersterveld *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007). Aneuploidie, hervorgerufen durch fehlerhafte Segregation der Chromosomen auf die Tochterzellen während der Meiose, tritt in ca. 5% aller Schwangerschaften auf und ist zudem der häufigste Grund für Schwangerschaftsabbrüche beim Menschen (Hassold und Hunt, 2001; Bolor *et al.*, 2009). In einigen Frauen, mit wiederholten Schwangerschaftsabbrüchen, konnten Veränderungen in der Nukleotidsequenz der *Sycp3*-Gene identifiziert werden. Diese Mutationen könnten die Ursache für die Schwangerschaftsabbrüche sein. Während in der *Sycp3*<sup>-/-</sup>-Maus ca. 2/3 der Nachkommen gesund sind und sich die Mutation nur in der Wurfgröße bemerkbar macht, scheint eine Mutation im *Sycp3*-Gen beim Menschen fatalere Folgen zu haben, denn die Frauen bringen nur Totgeburten zur Welt (Bolor *et al.*, 2009).

Diese Beispiele zeigen, wie wichtig der SC für einen korrekten Ablauf der Meiose zu sein scheint. Zudem wird deutlich, dass die Untersuchung der SC-Struktur und der einzelnen SC-Proteinkomponenten von Bedeutung für ein besseres Verständnis von Unfruchtbarkeitsursachen beim Menschen sind.

#### **1.4 Spermatogenese am Beispiel der Säuger**

Während der Keimzellentwicklung, der Gametogenese, finden neben der Meiose zahlreiche weitere Prozesse statt, die der Spezialisierung der Gameten dienen sollen. Die befruchtungsfähigen weiblichen Gameten, auch Eizellen genannt, werden in der Oogenese gebildet. Diese findet größtenteils im Ovar statt. Im geschlechts-

reifen Tier ist die Eizelle in der Metaphase II arretiert. In diesem Zustand verlassen die Eier in zyklischen Abständen das Ovar und treten erst mit der Befruchtung, durch den Eintritt des Spermiums, die Vollendung der Meiose II an. Durch diesen entscheidenden Schritt wird schließlich die Entwicklung der Zygote und somit die Entstehung eines neuen Organismus eingeleitet. Während der Spermatogenese werden aus Spermatogonien befruchtungsfähige, männliche Gameten gebildet, die als Spermien bezeichnet werden. Diese sind darauf spezialisiert ihr Erbgut zu einer immobilen weiblichen Eizelle zu transportieren.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der Architektur meiotischer Chromosomen während der Prophase I. Da ein Großteil der Oogenese während der Embryonalentwicklung im Mutterleib stattfindet und demzufolge für Experimente schwer zugänglich ist, hat sich die Spermatogenese als Modellsystem etabliert. Für einen Teil der später beschriebenen Experimente wurden Rattenhoden verwendet. Daher soll eine nähere Erläuterung der Spermatogenese am Beispiel der Säuger zu einem besseren Verständnis beitragen.

Die Spermatogenese umfasst den Prozess, bei dem aus einer Stammzelle, auch Spermatogonie genannt, ein reifes Spermium entsteht. Sie kann funktionell in drei Phasen unterteilt werden: (i) die Proliferationsphase, in der die Spermatogonien schnell aufeinander folgende mitotische Teilungen durchlaufen, (ii) die Meiose zur Reduktion und Rekombination des Chromosomensatzes, und (iii) die Spermio-genese, die Phase, in der sich aus den entstandenen haploiden Zellen reife Spermien differenzieren. Die Spermatogenese ist ein vektorieller Prozess, der in den Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti) der Hoden (Testes) stattfindet.

Der Beginn des Prozesses liegt bereits in der Embryonalentwicklung, wenn die Urkeimzellen in die sich ausprägende Gonadenanlage einwandern. Dort angekommen werden diese Zellen von den sich entwickelnden Sertolizellen eingeschlossen und differenzieren sich dann zu Gonozyten. Diese wiederum durchlaufen mehrere Mitosen und stellen schließlich ihre Teilung vorerst ein. Kurz vor bzw. kurz nach der Geburt beenden die Gonozyten diese Ruhephase. Sie beginnen sich erneut mitotisch zu teilen und differenzieren sich schließlich zu einer Stammzellpopulation (Spermatogonien) vom Typ  $A_s$  (s=single).

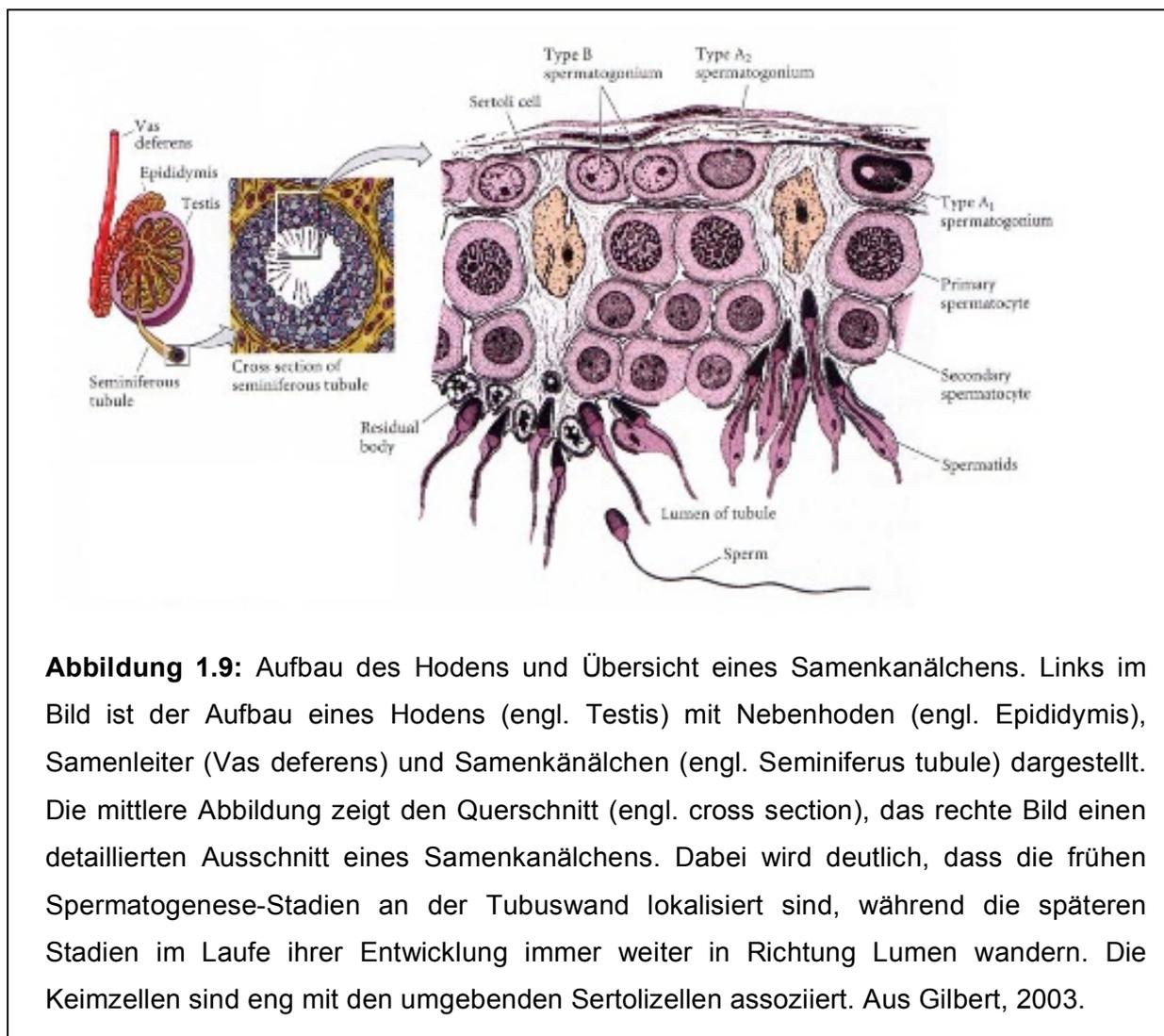
Die Gonozyten und die Sertolizellen bilden zusammen die Samenstränge aus, welche beim Einsetzen der Geschlechtsreife (Pubertät) ein Lumen ausbilden und dann als Samenkanälchen bezeichnet werden. Die Typ  $A_s$  Spermatogonien sind an

der Basalmembran der Hodenkanälchen lokalisiert und stellen ab dem Zeitpunkt der Pubertät den Startpunkt der Spermatogenese dar (de Rooij, 1998). Sie sind zum einen fähig, sich durch vollständige Mitosen ständig selbst zu erneuern und erhalten damit das Stammzellreservoir aufrecht. Zum anderen können sie sich durch unvollständige Mitosen zu Spermatogonien vom Typ  $A_{pr}$  (pr=paired) differenzieren. Diese Zellen bleiben durch Cytoplasmabrücken miteinander verbunden. Typ  $A_{pr}$  Spermatogonien teilen sich weiter durch unvollständige Mitosen. Die daraus entstehen Gruppen aus 4, 8, 16 oder selten auch 32 Zellen bleiben untereinander verbunden und werden als Typ  $A_{al}$  Spermatogonien (al=aligned) bezeichnet. Diese differenzieren sich schließlich zu Spermatogonien vom Typ  $A_1$ , deren festgelegtes Schicksal es ist, sich zu Spermien zu entwickeln (de Rooij und Groodegoed, 1998; de Rooij, 2001). Die Teilung und Differenzierung von Spermatogonien des Typs  $A_s$  zum Typ  $A_{al}$  verläuft asynchron und findet nur zu bestimmten Zeitpunkten statt. Die weitere Differenzierung zum Typ  $A_1$  erfolgt dann synchron und in Schüben. Dies bedeutet, dass erst dann mit der Produktion neuer  $A_1$  Spermatogonien begonnen wird, wenn die vorhergehende Gruppe (Kohorte) das Stadium des Prä-Leptotän erreicht hat (de Rooij, 1998; 2001). In einer Reihe mitotischer Teilungen differenzieren sich die Typ  $A_1$  Spermatogonien schließlich zu Spermatogonien des Typs B ( $A_1 \rightarrow A_2 \rightarrow A_3 \rightarrow A_4 \rightarrow B$ ). Diese wiederum teilen sich nochmals mitotisch und die hervorgehenden Tochterzellen differenzieren sich primären Spermatozyten (de Rooij, 2001). Während all dieser Teilungsphasen wandern die sich differenzierenden Zellen weiter in Richtung des Lumen des Samenkanälchens.

Die primären Spermatozyten treten dann in die 2. Phase der Spermatogenese ein und durchlaufen die Meiose. Somit gehen aus jeder primären Spermatozyte schließlich vier haploide Spermatisden hervor. Bei allen Zellteilungen vom Typ  $A_{al}$  bis hin zur Spermatisde, bleiben die Zellen über Cytoplasmabrücken miteinander in Verbindung (Dym und Fawcett, 1971). Diese Kontaktstellen, die einen Durchmesser von ca. 1  $\mu\text{m}$  haben, dienen dem Austausch von Cytoplasmabestandteilen und sogar Genprodukten, was eine synchron ablaufende Reifung der Zellen ermöglicht (Braun *et al.*, 1989).

Aus der Meiose gehen letztlich runde Spermatisden hervor, die sich in der letzten Phase, der so genannten Spermio-genese, schließlich zu reifen Spermatozoa differenzieren. Innerhalb dieses Prozesses wird das Chromatin dicht verpackt und überschüssiges Cytoplasma wird durch eine Abschnürung abgestoßen. Außerdem

bildet sich das Akrosom aus, welches für die Befruchtung der Eizelle benötigt wird. Bei all diesen Veränderungen kommt es zu einer Umformung des Spermienkopfes. Um die Mobilität des Spermiums zu ermöglichen wird das Flagellum gebildet. Am Ende der Spermatogenese, nach zahlreichen Differenzierungsschritten und der parallel ablaufenden Wanderung von der Tubuswand ins Innere, kommen die reifen Spermatozoa an der Grenze zum Lumen an. Während des gesamten Wanderungsprozess der Keimzellen bleiben diese mit den stützenden und versorgenden Sertolizellen in Kontakt. Die elongierten Spermien werden schließlich ins Lumen des Samenkanälchens entlassen (Russell, 1977). Von dort aus gelangen sie zur weiteren Reifung und Speicherung in den Nebenhoden (*Epididymis*) und werden schließlich in den Samenleiter (*Vas deferens*) befördert (Yanagimachi, 1994). Der Entwicklungsprozess zu befruchtungsfähigen Spermien wird erst im Genitaltrakt des Weibchens vollständig abgeschlossen (Chang, 1951, Austin, 1952; Gilbert



**Abbildung 1.9:** Aufbau des Hodens und Übersicht eines Samenkanälchens. Links im Bild ist der Aufbau eines Hodens (engl. Testis) mit Nebenhoden (engl. Epididymis), Samenleiter (Vas deferens) und Samenkanälchen (engl. Seminiferus tubule) dargestellt. Die mittlere Abbildung zeigt den Querschnitt (engl. cross section), das rechte Bild einen detaillierten Ausschnitt eines Samenkanälchens. Dabei wird deutlich, dass die frühen Spermatogenese-Stadien an der Tubuswand lokalisiert sind, während die späteren Stadien im Laufe ihrer Entwicklung immer weiter in Richtung Lumen wandern. Die Keimzellen sind eng mit den umgebenden Sertolizellen assoziiert. Aus Gilbert, 2003.

2003). Zum besseren Verständnis zeigt Abbildung 1.9 schematisch den Aufbau des Säugerhodens und die Wanderung der Keimzellen während der Spermatogenese.

## 1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit bestand hauptsächlich darin, den molekularen Aufbau des SC der Säuger besser zu verstehen. Bisher konnte eine Vielzahl von Proteinen identifiziert werden, die an der Bildung der SC-Struktur beteiligt sind. Die drei Hauptproteinkomponenten SYCP1, 2 und 3 scheinen dabei eine zentrale Rolle zu spielen. SYCP2 und 3 sind die Komponenten der Axial bzw. Lateralelemente und interagieren miteinander. SYCP1 bildet hauptsächlich die Transversalfilamente aus. SYCP1 und SYCP3 werden aufgrund ihrer Polymerisationseigenschaften als wichtige strukturgebende Proteine angesehen. Dennoch ist zwischen diesen beiden Proteinen keine direkte Interaktion nachweisbar (Liu *et al.*, 1996; Tarsounas *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 1998; Pelttari *et al.*, 2001). Bisher ist völlig ungeklärt, wie der SC zusammengehalten wird, denn es konnte noch keinerlei Bindung zwischen dem Transversalfilamentprotein SYCP1 und den Lateralelementproteinen SYCP2 und SYCP3 bzw. den Kohäsinen gezeigt werden (Tarsounas *et al.*, 1999). Daher sollte die Interaktionsfähigkeit der beiden SC-Hauptproteinkomponenten SYCP1 und SYCP2 in verschiedenen Bindungssystemen untersucht werden.

Die Struktur des SC ist evolutionär hochkonserviert, Unterschiede zwischen den Spezies treten vor allem hinsichtlich der Primärstrukturen der Proteinkomponenten auf. Für SYCP3 konnten im Speziesvergleich zwischen Ratte und Medaka hochgradige Konservierungen in einzelnen Sequenzmotiven, in der Domänenorganisation und in den Polymerisationseigenschaften festgestellt werden (Baier *et al.*, 2007 a und b). Bei den Transversalfilamentbildenden Proteinen der einzelnen Modellorganismen zeigen alle bisher identifizierten Proteine eine ähnliche Domänenorganisation. Sie besitzen eine zentrale Coiled-Coil-Domäne, die von nicht-helikalen Sequenzbereichen flankiert wird. Auf Aminosäureebene hingegen zeigen sich sehr große Unterschiede, wodurch bisher vermutet wurde, dass die Proteine nicht homolog sind, sondern nur Homologien in ihrer Funktion zeigen (Page und Hawley, 2004). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, einen Vergleich der homologen SYCP1-Proteine der taxonomisch weit entfernten Spezies Ratte und Medaka durchzuführen. Ein derartiger Vergleich sollte zeigen, ob die SYCP1-

Proteine, ähnlich wie SYCP3, evolutionär konserviert sind, oder ob nur eine funktionelle Homologie besteht. Dafür musste MeSYCP1 zunächst aus dem Hodengewebe der Fischart *Oryzias latipes* isoliert und kloniert werden. Daraufhin sollten eine Sequenzanalyse und ein direkter Vergleich mit der rattenspezifischen Sequenz erfolgen. Desweiteren wurden Polymerisationsstudien im heterologen System durchgeführt, um zu untersuchen, ob das Verhalten der homologen Proteine in somatischen Kulturzellen konserviert ist.

Bei Untersuchungen der Spermatogenese von *Hydra viridissima*, einer Artengruppe der Hydrozoa, konnten in den Gonadenähnlichen Strukturen der männlichen Phase Spermatozyten mit Synaptonemalkomplexen identifiziert werden (Schriftliche Hausarbeit, Lange, 2001). Einzelne SC-Proteinkomponenten der Hydrozoa waren nicht bekannt. Nach den bisherigen Erkenntnissen über die Transversalfilamentbildenden Proteine verschiedenster Modellorganismen (Page und Hawley, 2004) war nicht zu erwarten, dass in Invertebraten ein homologes Protein zu SYCP1 existiert. Bei den Proteinen C(3)G in *Drosophila* (MacQueen *et al.*, 2002; Colaiácovo *et al.*, 2003) und SYP-1, SYP-2, SYP-3 und SYP-4 in *C. elegans* (MacQueen *et al.*, 2002; Colaiácovo *et al.*, 2003, Smolikov *et al.*, 2007; Smolikov *et al.*, 2009) handelt es sich nach den scheinbar nur um funktionelle Homologien zum SYCP1 der Säuger. In Sequenzanalysen der EST-Datenbanken von *Hydra vulgaris*, einer weiteren Artengruppe der Hydrozoa, konnte jedoch eine mögliche SYCP1-Sequenz ermittelt werden (Alzheimer, unpublizierte Daten). Diese zeigte innerhalb zweier konservierter Sequenzmotive deutliche Übereinstimmungen mit dem SYCP1 der Ratte. Das betreffende Hydra-Protein sollte daraufhin hinsichtlich seiner Aminosäuresequenz, Domänenorganisation und Polymerisationseigenschaften mit dem SYCP1 der Ratte verglichen werden. Dabei sollte ermittelt werden, ob SYCP1 in der Evolution der Metazoa nicht nur innerhalb der Vertebraten, sondern auch bis hin zu den einfach gebauten Cnidaria, also niederen Invertebraten konserviert ist.

## 2. Material

### 2.1 Biologisches Material

#### 2.1.1 Tiere

##### Ratte

Alle verwendeten männlichen Ratten gehörten dem Stamm WISTAR an und wurden von der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld) bezogen. Sie waren durchschnittlich 19-21 Tage alt und befanden sich folglich in der Pubertät, genauer gesagt im 1. Schub der Spermatogenese. Dies gewährleistete einen hohen Anteil an Pachytän-Spermatozyten im Hodenmaterial.

##### Medaka

Die männlichen Tiere der Fischart *Oryzias latipes* wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Dr. Manfred Scharl in der Physiologischen Chemie I der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

##### Hydra

Die verwendeten Tiere der Spezies *Hydra vulgaris* wurden aus der Zucht der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Georg Krohne aus der Zentralen Abteilung für Elektronenmikroskopie (Universität Würzburg) entnommen.

#### 2.1.2 Zelllinien

##### COS-7

Die Zelllinie COS-7 (ATTC CRL 1651) stammt aus Nierenzellen der grünen Meerkatze, *Cercopithecus aethiops*.

#### 2.1.3 Bakterienstämme

<i>Epicurian coli</i> Rosetta Blue	Novagen (Darmstadt)
<i>Epicurian coli</i> XL1-Blue	Stratagene (Heidelberg)
<i>Epicurian coli</i> Top10 One Shot®	Invitrogen (Karlsruhe)

#### 2.1.4 Hefestämme

Der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* EGY48 (ura3, trp1, his3, 3LexA-operator-LEU2) der Firma Origene (Rockville) ist auxotroph für die Aminosäuren Uracil, Tryptophan, Histidin und Leucin. Die Auxotrophie der ersten Aminosäuren kann

durch eine Transformation von Plasmiden ausgeglichen werden, wenn diese für die entsprechenden Gene codieren. Das ursprüngliche Leucin-Gen wurde im EGY48-Hefestamm durch ein chromosomal integriertes Konstrukt ersetzt. Dieses besteht aus drei LexA-Operatoren und einem nachgeschalteten *LEU2*-Gen. Besteht eine Interaktion zwischen Köder- und Beutefusionsprotein so bildet sich ein aktiver Transkriptionsfaktor aus, dessen Wirkung dann schließlich auch die Leucin-Auxotrophie ausgleichen kann.

### 2.1.5 Antikörper

In der nachfolgenden Tabelle 2.1 sind alle Antikörper aufgeführt die innerhalb dieser Arbeit verwendet wurden. In den einzelnen Spalten sind neben der Bezeichnung und dem Antigen, auch Angaben zum Herkunftstier, zur Herstellung und zu den verwendeten Verdünnungen zu finden. Alle Antikörper, die aus eigener Herstellung (e.H.) stammten, wurden vor der Verwendung affinitätsgereinigt.

Im Western Blot (WB) wurden die Antikörper in 5-10% Milch in TBST verdünnt. In den verschiedenen Immunfluoreszenzen (IF) erfolgte die Verdünnung in PBS. Für Ko-Immunpräzipitationen (Ko-IP) wurden ca. 10 µg des jeweiligen Antikörpers eingesetzt.

Bezeichnung	Antigen	Herkunfts-Tier	Hersteller	WB	IF	Ko-IP
<b>Primärantikörper</b>						
α-SYCP2 Ct (guinea pig)	AS 1092-1505 SYCP2 (Ratte)	Meerschwein	e.H. (Seqlab)	1:1000	1:200	---
α-SYCP2 Ct (rabbit)	AS 1092-1505 SYCP2 (Ratte)	Kaninchen	e.H. (Seqlab)	1:2000	1:500	10µg
α-SYCP3 Serum #13 (guinea pig)	AS 27-38 SYCP3 (Ratte)	Meerschwein	Alzheimer <i>et. al.</i> , 1996	1:5000	1:150	---
α-SYCP1 Ct (rabbit)	AS 922-997 SYCP1 (Ratte)	Kaninchen	Öllinger <i>et al.</i> , 2005	---	1:300	---
α-SYCP1 Nt (guinea pig)	AS 1-120 SYCP1 (Ratte)	Meerschwein	e. H. (Seqlab)	1:1000	1:100	---
α-myc- monoklonal (mouse)	Myc-Tag	Maus	Invitrogen	1:5000	1:200	---
α-pentaHis (mouse) #34660	His-Tag	Maus	Qiagen	1:5000	---	---
α-MeSYCP1Ct (guinea pig)	AS 874-888 SYCP1 (Medaka)	Meerschwein	e.H. (Seqlab)	---	1:300	---
IgG rabbit	Unspezifisch	Kaninchen	Dianova	---	---	10µg
<b>Sekundärantikörper</b>						

$\alpha$ -rabbit Texas Red (goat)	IgG Kaninchen	Ziege	Dianova	---	1:50	---
$\alpha$ -guinea pig Texas Red (goat)	IgG Meerschwein	Ziege	Dianova	---	1:50	---
$\alpha$ -mouse Texas Red (goat)	IgG Maus	Ziege	Dianova	---	1:50	---
$\alpha$ -rabbit Cy2 (goat)	IgG Kaninchen	Ziege	Dianova	---	1:50	---
$\alpha$ -rabbit Peroxidase (goat)	IgG Kaninchen	Ziege	Dianova	1:10000	---	---
$\alpha$ -guinea pig Peroxidase (goat)	IgG Meerschwein	Ziege	Dianova	1:10000	---	---
$\alpha$ -mouse Peroxidase (goat)	IgG Maus	Ziege	Dianova	1:10000	---	---

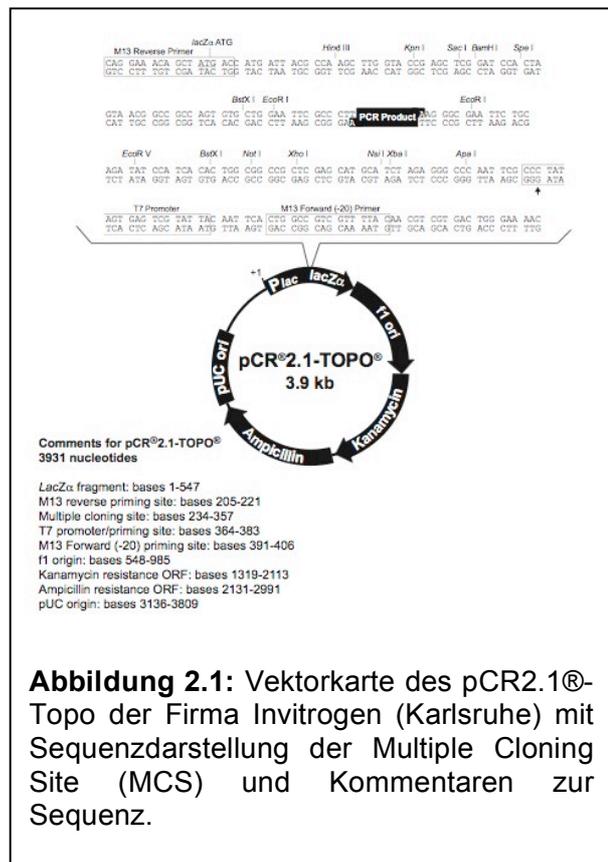
Tabelle 2.1: Verwendete Antikörper

## 2.2 Mikrobiologisches Material

### 2.2.1 Plasmidvektoren für Klonierungen in *E. coli*

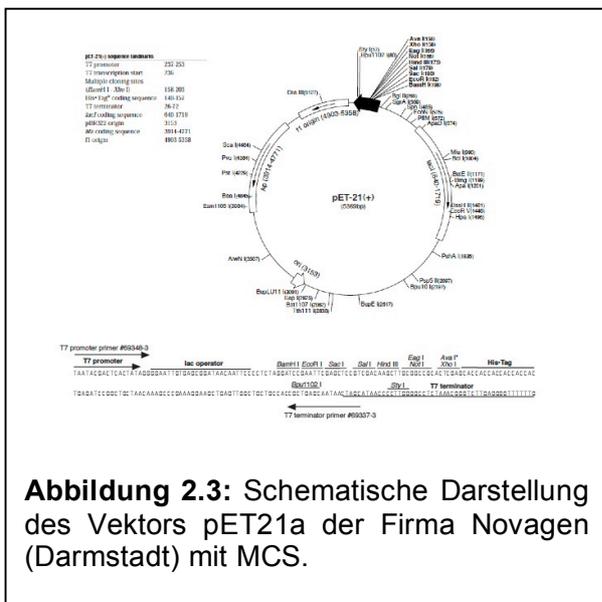
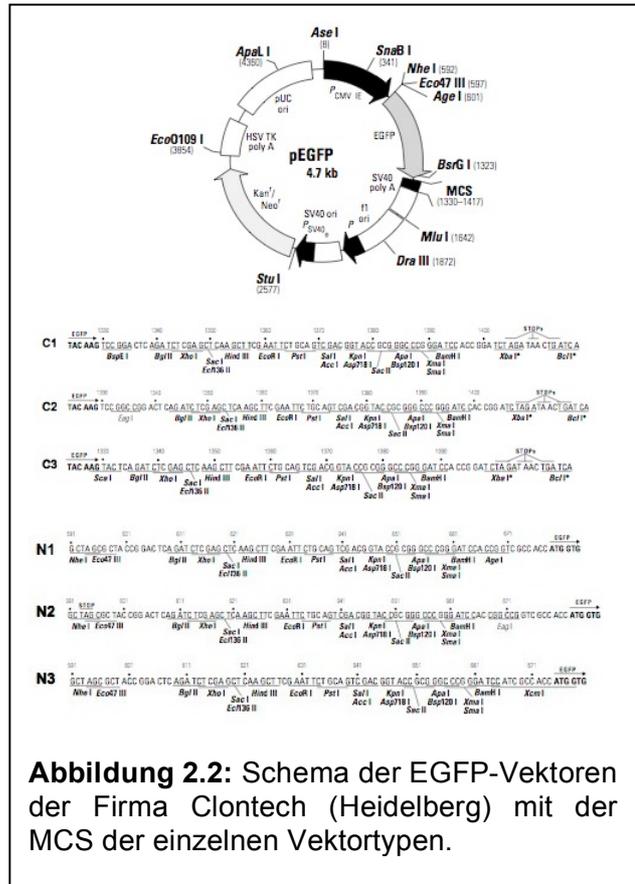
#### pCR2.1®-Topo

Der pCR2.1®-TOPO-Vektor (Abb. 2.1) ist ein Bestandteil des TOPO TA Cloning® Kit der Firma Invitrogen (Karlsruhe). Er eignet sich für die direkte Klonierung von DNA-Fragmenten die durch PCR amplifiziert wurden. Neben den Resistenzgenen für Kanamycin und Ampicillin enthält dieser Vektor ein *LacZ*-Gen, das eine zusätzliche Selektion positiver Klone über eine Blau-Weiß-Färbung der jeweiligen Kolonien ermöglicht. Außerdem ist im pCR2.1®-Topo-Vektor eine Promotorsequenz für die T7-RNA-Polymerase enthalten, die zur Herstellung von RNA-Sonden benötigt wird.



**pEGFP -Vektoren**

Die Vektoren pEGFP-C1-C3 und pEGFP-N1-N3 (Abb. 2.2) wurden von der Firma Clontech (Heidelberg) bezogen. Die DNA-Sequenzen gewünschter Proteine oder Deletionsmutanten wurden über die MCS (Multiple Cloning Site) in den betreffenden Vektor inseriert. Die Sequenz der pEGFP-Vektoren beinhaltet einen CMV-Promotor, der eine Expression der jeweiligen Proteine mit oder ohne EGFP-Fusion (enhanced green fluorescent protein) in eukaryotischen Kulturzellen ermöglicht.



**pET21a**

Der Vektor pET21a (Abb. 2.3) der Firma Novagen (Darmstadt) wurde verwendet um Proteine an eine His<sub>6</sub>-Markierung zu koppeln und sie anschließend in Bakterien zu exprimieren. Die entsprechenden Proteine konnten dann aufgrund ihrer Markierung über Ni-NTA-Agarose gereinigt werden. Die Sequenz des Vektors beinhaltet zu Selektionszwecken ein Ampicillin-Resistenzgen.

### pET21a-myc

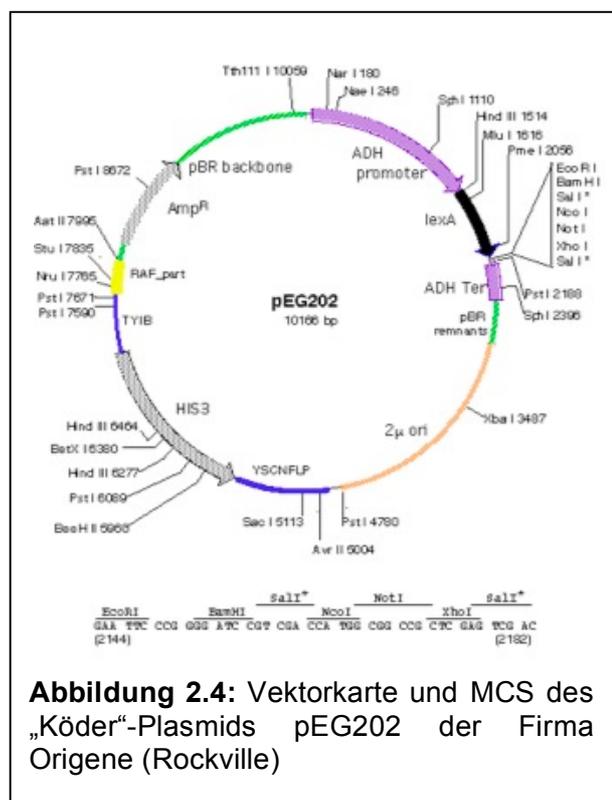
Hierbei handelte es sich um einen modifizierten pET21a-Vektor (Abb. 2.3). Der Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym NdeI geöffnet. Die überhängenden Enden der NdeI-Schnittstelle wurden mit dem Enzym Klenow-Fragment aufgefüllt. Anschließend wurde der Vektor mit BamHI verdaut und auch hier wurden die Schnittstellen aufgefüllt (Klenow-Fragment). Durch diesen zweiten Schritt wurde das T7-Tag aus dem Vektor entfernt. Zwischen die modifizierten NdeI- und BamHI-Schnittstellen wurde schließlich eine über PCR amplifizierte Myc-Sequenz inseriert. Der Vektor wurde verwendet um Proteine und Deletionsmutanten mit einer Myc-Sequenz zu markieren und in Bakterien oder im TNT®-System zu exprimieren.

### 2.2.2 „Shuttle“-Plasmidvektoren für Klonierungen in *E. coli* und *S. cerevisiae*

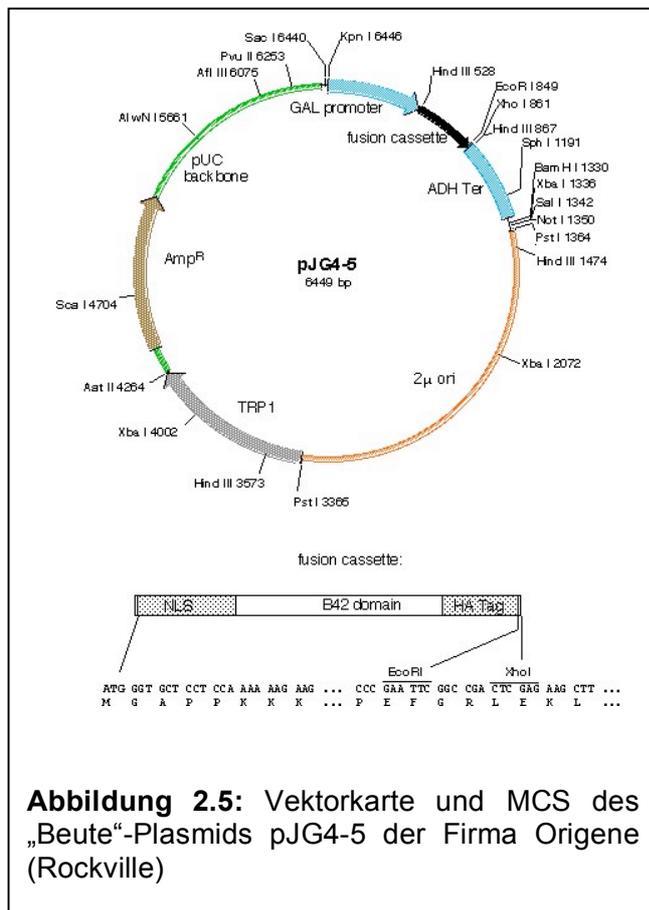
Die so genannten „Shuttle“-Plasmidvektoren besitzen neben einem pBR Replikationsursprung („origin of replication“) zur Vermehrung in Bakterien, einen zusätzlichen hefespezifischen Ursprung (2  $\mu$  ori). Dies ermöglicht eine Vermehrung in beiden Systemen. Die verwendeten Vektoren sind Bestandteile DupLEX-A™ Yeast-Two-Hybrid Systems der Firma ORIGENE (Rockville).

### pEG202

Der Vektor pEG202 (Abb. 2.4) wurde als Köder-Expressionsvektor eingesetzt. Das Plasmid kodiert unter anderem für ein Fusionsprotein, das die DNA-bindende Domäne des LexA-Proteins enthält. Über Restriktionsstellen der MCS wurde das gewünschte Köderprotein an den C-Terminus dieser Domäne fusioniert. Die Expression des Fusionsproteins steht unter der Kontrolle des Alkoholdehydrogenase-Promotors ( $ADH_{pro}$ ) und erfolgt konstitutiv. Die Transkriptionseinheit schließt mit einer



hefespezifischen Terminationssequenz ( $ADH_{\text{ter}}$ ) ab. Zudem enthält das Plasmid den HIS3-Marker. Dieser ermöglicht eine Selektion positiv transformierter Hefeklonen in Histidin-Mangelmedien.



### pJG4-5

Der Vektor pJG4-5 (Abb. 2.5) diente der Expression des Beute-Fusionsproteins in der Hefe. Zur Selektion positiv transformierter Klone ist in der Plasmidsequenz ein *TRP1*-Gen enthalten, womit die Tryptophan-Auxotrophie des Hefestammes EGY48 aufgehoben werden kann. Das gewünschte Protein wurde über Schnittstellen der MCS an die Fusionskassette gekoppelt. Diese besteht aus einem Kernlokalisations-signal (NLS), der sauren Aktivierungsdomäne (B4-domain) des Transkriptionsfaktors, sowie einem Hämagglutinin-Epitop (HA-Tag). Die

Expression des jeweiligen Fusionsproteins steht unter der Kontrolle eines induzierbaren GAL1-Promotors ( $GAL_{\text{pro}}$ ).

## 2.2.3 Enzyme

### Restriktionsenzyme

Mithilfe von Restriktionsenzymen kann die DNA an spezifischen Erkennungssequenzen geschnitten werden. Dabei können entweder klebrige („sticky“) oder glatte („blunt“) Enden erzeugt werden. Die entsprechenden Enzyme wurden größtenteils von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Vereinzelt wurden jedoch auch Restriktionsenzyme der Firma NEB (New England BioLabs, Höchst) verwendet. Wenn im Methodenteil nicht anders vermerkt, wurden bei der Verwendung die vom Hersteller empfohlenen Protokolle befolgt.

**Ligase**

Das Enzym T4 DNA Ligase wurde von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Es katalysiert unter ATP-Verbrauch die Verknüpfung von 5' Phosphat- und 3'Hydroxyltermini doppelsträngiger DNA oder RNA mit „sticky“ oder „blunt ends“.

**Shrimp Alkaline Phosphatase**

Dieses Enzym (Fermentas) wird auch kurz als SAP bezeichnet und entfernt die 5' Phosphatreste von linearisierter DNA.

**T4 Polynukleotid Kinase**

Die PNK (Fermentas) ist eine Polynukleotid 5'-Hydroxyl-Kinase. Sie transferiert Phosphate vom ATP an die 5' OH-Gruppen einzel- oder doppelsträngiger DNA, RNA, oder Oligonukleotide.

**Klenow-Fragment**

Dieses große Fragment der DNA-Polymerase I besitzt eine 3'-5' DNA-Polymerase-Aktivität und eine 5'-3' Exonuklease-Aktivität. Das Klenow-Fragment der Firma Fermentas wurde dazu verwendet, die 5'-Überhänge der „sticky ends“ aufzufüllen und somit „blunt ends“ zu erzeugen.

**Taq DNA-Polymerase**

Diese Polymerase wurde im Lehrstuhl Zoologie I (Universität Würzburg) selbst hergestellt. Sie wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten in der Kolonie-PCR oder zum anfügen von 3' (A)-Überhängen an PCR-Produkte für die Topo-Klonierung verwendet. Die Taq DNA-Polymerase hat eine 3'-5' DNA-Polymeraseaktivität, besitzt jedoch keine 5'-3'-Exonuklease-Funktion, die zur Fehlerüberprüfung („proof reading“) notwendig ist. Sie besitzt eine Effektivität von 1 kb/min.

**Phusion™ DNA-Polymerase**

Die Phusion™ wurde von der Firma Finnzymes bezogen und zur Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendet. Sie besitzt sowohl eine 3'-5' DNA-Polymerase-Aktivität, als auch 5'-3' Exonuklease-Aktivität. Dies resultiert in einer sehr niedrigen Fehlerquote bei der DNA-Amplifikation. Außerdem arbeitet die Phusion™ mit 1kb/15 sek. deutlich schneller als die Taq DNA-Polymerase.

## 2.2.4 Oligonukleotide

Die für DNA-Amplifikationen verwendeten Oligonukleotide wurden von der Thermo Fisher Scientific GmbH (Ulm) bezogen.

Primerbezeichnung	Sequenz	T <sub>m</sub>	Notizen
<b>Allgemeine Vektorprimer</b>			
M13 Reverse pCR2.1TOPO	5'_CAGGAAACAGCTATGAC_3'	36°C	5'Vektorprimer pCR2.1@Topo
M13 Forward pCR@2.1TOPO®	5'_GTAAAACGACGGCCAG_3'	44°C	3'Vektorprimer pCR2.1@Topo
pEGFP-C Seq._5'	5'_ACATGGTCCTGCTGGAGTTGGT_3'	57°C	5'Vektorprimer pEGFP-C1-3
pEGFP-C Seq._3'	5'_CAGGGGGAGGTGTGGGAGG_3'	58°C	3'Vektorprimer pEGFP-C1-3
pEGFP-N Seq._5'	5'_GCTGGTTTAGTGAACCGTGAGA_3'	53°C	5'Vektorprimer pEGFP-N1-3
pEGFP-N Seq._3'	5'_CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG_3'	67°C	3'Vektorprimer pEGFP-N1-3
pEGFP-N Seq._5'	5'_GCTGGTTTAGTGAACCGTCAGA_3'	53,5°C	5'Vektorprimer pEGFP-N1-3
pEGFP-N Seq._3'	5'_CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG_3'	67,6°C	5'Vektorprimer pEGFP-N1-3
pEG202_5'	5'_CATTGAAGGGCTGGCGGTTG_3'	54,1°C	5'Vektorprimer pEG202
pEG202_3'	5'_AATCATAAGAAATTCGCCCG_3'	54,8°C	3'Vektorprimer pEG202
pET21a Seq._5'	5'_CGATCCCGCGAAATTAATACG_3'	56°C	5'Vektorprimer pET21a
pET21a Seq._3'	5'_GCAGCAGCCAACTCAGCTTC_3'	55°C	3'Vektorprimer pET21a
pJG4-5_5'	5'_ATACCAGCCTCTTGCTGAGTGG_3'	55°C	5'Vektorprimer pJG4-5
pJG4-5_3'	5'_AAGCCGACAACCTTGATTGG_3'	54°C	5'Vektorprimer pJG4-5
<b>Allgemeine RT-Primer</b>			
CDSIII/3'PCR_ohne_ Oligo-dT	5'_GCCGAGGCGCCGACATG_3'	64,2°C	RT-PCR- Primer
<b>Primer Ratte-SYCP1</b>			
SYCP1-start (104; Δc 106/7)	5'_CGGGCCATGGAGAAGCAGAAG_5'	60,5°C	RaSYCP1- 5'ATG-Primer
SYCP1_110_5'+XhoI	5'_CTCGAGATGGAGAAGCAGAAGCCCTTC_3'	64,4°C (54,1)	RaSYCP1- 5'ATG-Primer
SYCP1_468-3'	5'_CCACTTTTTTATCTTTTCAGCCTCTTTATAC AGC_3'	56,0°C	Sequenzier- Primer
SYCP1_470_3'+XhoI	5'_CTCGAGCCACTTTTTTATCTTTTCAGCCTC _3'	63,4°C (52,8)	RaSYCP1- 3' (AS120)
SYCP1-seq_d (673_3')	5'_GTCTGGTTTCTTCTCGCTCATATTC_3'	54,6°C	Sequenzier- Primer
SYCP1-seq_e (934_3')	5'_TTTGGATCAATAGTAGTACCTGG_3'	52,8°C	Sequenzier- Primer
SYCP1-1800bp_5' (Pos.1315)	5'_GAGGATCAACTGAACTGATTACTATGGA G_3'	57,4°C	Sequenzier- Primer
SYCP1_1600_3' (Pos1497)	5'_CCCTTGTAATTCTTCAGCAAGCTTCTC_3'	59°C	Sequenzier- Primer

SYCP1_seq_c (1876_3')	5'_CATCTCCTTGCTGTATGAACTCTTTTC_3'	56°C	Sequenzier-Primer
SYCP1_1800bp_5' (Pos.2100)	5'_GGTCAATAAATTAGAGTTGGAATTAGCAA G_3'	58,8°C	Sequenzier-Primer
SYCP1-seq_h (Pos.2444_5')	5'_GAAACGAACTTGTATCCCTTAAGAAGC_3'	56,4°C	Sequenzier-Primer
SYCP1_2440_5'	5'_ATCAGAAACGAACTTGTATCCCTT_3'	52,3°C	RaSYCP1-5' (AS777)
4+NdeI+SYCP1_2566_5'	5'_TATACATATGTCTTTGCTGGAATCACCTGA _3'	59,3°C	RaSYCP1-5' (AS819)
SYCP1_2566_5' (+EcoRI ÜH)	5'_GAATTCTCTTTGCTGGAATCACCTGAA_3'	59,9°C	RaSYCP1-5' (AS819)
SYCP1_5'-His-Ct	5'_CACCATCACCATCACCATCCATCTTTGCTG GAATCA_3'	74,7°C	His <sub>6</sub> +Ra SYCP1_AS819
SYCP1-seq_g (Pos.2630_3')	5'_CCATTGATGAGGAAAGCCG_3'	52,9°C	Sequenzier-Primer
SYCP1_3099_3'	5'_AGTAAATAACTTTTCTGCTTCCTTTAGTC_3 ,	52,8°C	RaSYCP1-3' ohne Stop
SYCP1_3099_3'+XhoI +4	5'_TATACTCGAGAGTAAATAACTTTTCTGCTT CCTT_3'	59,6°C	RaSYCP1-3' ohne Stop
SYCP1_delstop (Pos.3100_3')	5'_AAGTAAATAACTTTTCTGCTTCCTTTAGTC TTC_3'	57°C	RaSYCP1-3' ohne Stop
SYCP1_3'TAA	5'_TTAAGTAAATAACTTTTCTGCTTCCTTTAGT CTTC_3'	58°C	RaSYCP1-3' mit Stop
<b>Primer Ratte-SYCP2</b>			
SYCP2-5'ATG	5'_GTCAAATGCCAGTGAGACCAGACC_3'	59,8	SYCP2-5'ATG-Primer
SYCP2_XHOI_5'ATG (Pos.148)	5'_CTCGAGGTCAAATGCCAGTGAGACCAGA C_3'	67,2°C	SYCP2-5'ATG-Primer
SYCP2_CG_+5'ATG	5'_CGATGCCAGTGAGACCAGACC_3'	56,7°C (47,2)	SYCP2-5'ATG-Primer
4+NdeI+SYCP2_154_5'	5'_TATACATATGCCAGTGAGACCAGACCC_3'	58,4°C (53,8)	SYCP2-5'ATG-Primer
SYCP2_seq_d (Pos.748_3')	5'_CCTTTCTCCATATTACTCATGAGA_3'	52,7°C	Sequenzier-Primer
SYCP2_771_3'+XhoI+4	5'_TATACTCGAGCCTTTTCTCCCATATTACTC ATGA_3'	62,3°C (49,7)	SYCP2_3' (AS206)
SYCP2_CGATG_+1060	5'_CGATGGAATTCTGGATTGATTTAATCTC_3'	59,5°C (48,1)	SYCP2_5' (ATG+AS303)
SYCP2_1065_3'+TGA	5'_TCAGAATTCCTCAAGTTTTTCATCTG_3'	55,0°C (49,4)	SYCP2_3' (AS304+Stop)
SYCP2_seq_e (Pos.1070_3')	5'_GGCTCCCCGAGATTAATCAA_3'	52,7°C	Sequenzier-Primer
SYCP2_seq_f (Pos. 1389_3')	5'_CTGTGATCCACTTGCATCAAAA_3'	52,7	Sequenzier-Primer
SYCP2_1500_5' (PSO. 1650_5')	5'_CAACACATCAACCCGCGAAG_3'	59,8°C	Sequenzier-Primer
SYCP2_seq_g (Pos. 1689_3')	5'_GAAACAGCCTTCTCAGCAGAA_3'	51,4°C	Sequenzier-Primer
SYCP2_seq_h (Pos.2297_3')	5'_TCTTCAGTTGTCTTATTTAGGAGTACTG_3'	51,4°C	Sequenzier-Primer
SYCP2_CGATG_+2571	5'_CGATGATATCAACAAGAAAAGTGAAGGAG _3'	58,8°C (48,6)	SYCP2_5' (ATG+AS807)
SYCP2_EcoRI+GG +2573	5'_GAATTCGGGATATCAACAAGAAAAGTGAAG GGAG_3'	64,5°C (50,0)	SYCP2_5' (AS808)
SYCP2_2573_3'_ +ATGA	5'_TCATGATATCATGTCATCACTTGAGTTATA C_3'	55,3°C (50,8)	SYCP2_3' (AS808+Stop)
SYCP2_seq_i (Pos.2600_3')	5'_AAAACCCACTGCCATCCC_3'	51,8°C	Sequenzier-Primer

SYCP2_1800bp5' (Pos.2823_3')	5'_GGTAGATGTAAGGAACCGTGATGAACG_3'	59,9°C	Sequenzier-Primer
SYCP2_seq_c (Pos.3313_3')	5'_GGCTGTCCTTTCAGCGCT_3'	52,7°C	Sequenzier-Primer
SYCP2_C-Term_5' (Pos.3428)	5'_GGGAGCTCGTCATCTGTGGAA_3'	56,4°C	SYCP2_5' (AS1091)
SYCP2_3433+EcoRI	5'_GAATTCGAGCTCCCAGACACAGATGC_3'	63,0°C (51,9)	SYCP2_5' (AS1093)
SYCP2_3436_5'	5'_TCATCTGTGGAAGTGATGAGATGTACA_3'	56,5°C	SYCP2_5' (AS1094)
SYCP2_CGATG_+3436	5'_CGATGTCATCTGTGGAAGTGATGAGA_3'	59,1°C (47,4)	SYCP2_5' (ATG+AS1094)
SYCP2_XhoI_3436_5'	5'_CTCGAGTCATCTGTGGAAGTGATGAGATG T_3'	62,7°C (52,7)	SYCP2_5' (AS1094)
SYCP2_3436_3'+TGA	5'_TCACGAGCTCCCAGACACAGAT_3'	56,0°C	SYCP2_3' (AS1094+Stop)
SYCP2_CGATG_+3547	5'_CGATGGAATTCTTAAACAGAAGCAATAGA_ 3'	58,5°C (47,0)	SYCP2_5' (ATG+AS1132)
SYCP2_3547_3'+TGA	5'_TCAGAATTCAGGTGATGCAGCTT_3'	55,5°C (49,2)	SYCP2_3' (AS1132+Stop)
SYCP2_1000bp_5' (Pos.3662_5')	5'_CGCCCAGACACACAACCAAGA_3'	58,1°C	Sequenzier-Primer
SYCP2_seq_b (Pos. 3724_3')	5'_GAATAGCTGTTACAATGTTGGGTTTC_3'	53,1°C	Sequenzier-Primer
SYCP2_4277_5'	5'_TGTCAAGCTCGGGGACACAGG_3'	59,5°C	SYCP2_5' (AS1375)
SYCP2_CGATG+4279	5'_CGATGTGTCAAGCTCGGGGACA_3'	61,7°C (49,3)	SYCP2_5' (ATG+AS1376)
SYCP2_4278_3'+TGA	5'_TCAGGCCATTGCCAACAGATG_3'	58,1°C (51,8)	SYCP2_3' (AS1376+Stop)
SYCP2_4278_3'+XhoI	5'_CTCGAGGGCCATTGCCAACAGATG_3'	65,2°C (51,8)	SYCP2_3' (AS1376)
SYCP2_4671_3'+XhoI +4	5'_TATACTCGAGTCATGCATTGTTTCCTTCAT G_3'	62,3°C (50,9)	SYCP2_3' Stop
SYCP2_XhoI_TGA+3'	5'_CTCGAGTCATGCATTGTTTCCTTCATGATC 3'	64,5°C (55,5)	SYCP2_3' Stop
SYCP2_BamHI_3'TAA+	5'_GGATCCTCATGCATTGTTTCCTTCATGATC 3'	65,1°C	SYCP2_3' Stop
SYCP2_BamHI_3'TAA-	5'_GGATCCTGCATTGTTTCCTTCATGATCCT_ 3'	64,8°C	SYCP2_3' Ohne Stop
SYCP2_3'TGA	5'_TCATGCATTGTTTCCTTCATGATC_3'	58,8°C	SYCP2_3'Stop
<b>Primer Medaka-SYCP1</b>			
XhoI+medaka_SYCP1_5'ATG	5'_CTCGAGATGGAGAGAGATCATGGCTTTAA 3'	62,0°C	MeSYCP1-RT-Primer
Medaka_SYCP1_5'Coil	5'_AAAGTTGAGTCAGAGACAATGCAG_3'	52,2°C	MeSYCP1-RT-Primer
Medaka_SYCP1_3'Coil (aa717)	5'_TTTCACTTGAGAGGACTGGCTC_3'	52,7°C	MeSYCP1-RT-Primer
Medaka_SYCP1_2269_5'+NdeI (aa755)	5'_CATATGTCCAGGAGCAGTGGTGGG_3'	61,2°C (53,8)	MeSYCP1-RT-Primer
Medaka_SYCP1_2689_3'+XhoI (aa895)	5'_CTCGAGTGCAAAGATCTTGCCTGGGT_3'	63,5°C (53,6)	MeSYCP1-RT-Primer
Medaka_SYCP1_3'TAA+XhoI	5'_CTCGAGTTATGCAAAGATCTTGCCTGG_3'	61,3°C	MeSYCP1-RT-Primer
<b>Primer Hydra-SYCP1</b>			
Hym_SYCP1_5'	5'_GGTATTCACCTACTACTAAATAATGGAAAG TTTTCGAATG_3'	63,5°C	HymSYCP1-RT-Primer
Hym_SYCP1_5'ATG	5'_ATGGAAAGTTTTCGAATGAATACTACTAAC	63,1°C	HymSYCP1-

	AAGCAA_3'		RT-Primer
4+XhoI+HymSYCP1_5' ATG	5'_TATACTCGAGATGGAAAGTTTTCGAATGAA TACTACTAAC_3'	63°C (54°C)	HymSYCP1-5' (XhoI+ATG)
Hym_SYCP1_619_5'	5'_AGTCTAGAGTCAGGTATTCATCATCTTGAA AATCAAGTAG_3'	63,3°C	HymSYCP1- RT-Primer
Hym_SYCP1_619_3'	5'_CTACTTGATTTTCAAGATGATGAATACCTG ACTCTAGACT_3'	63,3°C	HymSYCP1- RT-Primer
Hym_SYCP1_934_5'	5'_GATGCCAAAGATATTCATGCTAAAGAAGT GG_3'	62,2°C	Sequenzier- Primer
Hym_SYCP1_1012_5'	5'_CTTTCTTTGACTCTTAATCAAACCAAAT GAA_3'	60,6°C	HymSYCP1- RT-Primer
Hym_SYCP1_1012_3'	5'_TCCAATTTTGGTTTGATTAAGAGTCAAAGA AAGATT_3'	62,5°C	HymSYCP1- RT-Primer
Hym_SYCP1_5'coil- intern	5'_GCCGAGGCGGCCGACATG_3'	64,2°C	Sequenzier- Primer
Hym_SYCP1_3'coil- intern	5'_CATTAAACCTAACTCCTTCTCAGCAGTCTC AAG_3'	62,1°C	Sequenzier- Primer
Hym_SYCP1_5'coil- ende	5'_CTCTAATTCTCATCAAATTCAGCTGAATA TGAACAA_3'	63,5°C	HymSYCP1- RT-Primer
Hym_SYCP1_3'coil	5'_TTGTTTCATATTCAGCTTGAATTTGATGAGA ATTAGAG_3'	63,5°C	HymSYCP1- RT-Primer
HymSYCP1_3'coil_+ SmaI+4	5'_TATACCCGGGTTGTTTCATATTCAGCTTGAA TTTGATG_3'	68,7°C (55°C)	HymSYCP1_3' (Coil+SmaI)
HymSYCP1_3'TGA Neu	5'_GCAGACGTTCAACTATCAAATCCAAAGAC ACT_3'	53,5°C	HymSYCP1- RT-Primer
HymSYCP1_3'TGA+ SmaI+4	5'_TATACCCGGGTCAACTATCAAATCCAAAG ACACTGTC_3'	68,4°C (54°C)	HymSYCP1_3' (TGA+SmaI)

Tabelle 2.2: Verwendete Oligonukleotide

### 2.2.5 Kits und Einzelkomponenten

#### ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

Dieses Kit wurde für die Sequenzierung im Lehrstuhl für Zoologie I der Universität Würzburg verwendet. Es enthält alle Komponenten, die für eine Sequenzier-Reaktion nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger und Coulson (1977) notwendig sind.

#### ECL™ Detection Kit

Das Kit der Firma Amersham Bioscience (Braunschweig) enthielt die Lösung A und B, die zur Detektion von an Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpern auf Western Blots verwendet wurden.

#### Effectene™ Transfection Reagent

Effectene™ ist ein nicht-liposomales Lipid, das unter spontaner Micellen-Bildung die DNA in Lipidmoleküle hüllt. Es wurde nach dem Herstellerprotokoll (Qiagen, Hilden) zur Transfektion von COS-7 Zellen eingesetzt.

### **E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I**

Dieses Kit der Firma Peqlab (Erlangen) wurde zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen verwendet.

### **Dynabeads Protein G**

Die Beads der Firma Invitrogen (Karlsruhe) benutzte man zur Bindung von Antikörpern der Klasse IgG in der Ko-Immunitätspräzipitation.

### **HiTrap™-Säulensystem**

Auch dieses Kit wurde von der Firma Amersham Bioscience (Braunschweig) bezogen. Es wurde zur Affinitätsreinigung von Antikörpern aus Seren verwendet.

### **Ni-NTA-Agarose**

Die Ni-NTA-Agarose der Firma Qiagen (Hilden) wurde zur Aufreinigung von Proteinen mit einer His<sub>6</sub>-Markierung (His<sub>6</sub>-Epitop) aus Bakterien verwendet.

### **Ni-NTA-Magnetic-Agarose Beads**

Die Ni-NTA-Agarose Beads der Firma Qiagen (Hilden) benutzte man zur Bindung His<sub>6</sub>-markierter Proteine in Interaktionsstudien und im Pull-Down-Assay.

### **NucleoSpin® Plasmid**

Das Kit wurde von der Firma Macherey Nagel (Düren) bezogen und diente der Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen.

### **peqGOLD Trifast™**

Mit dieser Lösung (Peqlab, Erlangen) wurde RNA aus Zellen und Geweben isoliert.

### **Protein G Sepharose**

Die Sepharose wurde von der Firma GE Healthcare (Fairfield, USA) bezogen und diente der Isolierung unspezifischer Antikörpern der Klasse IgG aus Hodenextrakten.

### **TNT® in vitro transcription/translation Kit**

Dieses Kit der Firma Promega (Mannheim) diente der *in vitro* Synthese rekombinanter Proteine im Reticulozyten-Lysat.

### **TOPO TA CLONING® Kit**

Dieses Kit wurde von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Es diente der effektiven Klonierung von PCR-Produkten.

### **Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System**

Das Kit der Firma Promega (Mannheim) wurde zur Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen verwendet. Außerdem diente es der Aufreinigung von PCR-Produkten oder von DNA aus Restriktionsverdauansätzen.

### **2.2.6 Chemikalien**

Chemikalien und Lösungsmittel wurden von den Firmen Applichem (Darmstadt), Becton Dickinson Microbiology Systems (Sparks), Calbiochem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) oder Sigma (München) in Analysenqualität bezogen.

## **2.3 Rekombinante DNA-Konstrukte**

Zur molekurbioologischen Untersuchung von Proteinen bzw. entsprechenden Deletionsmutanten können verschiedenste Vektorsysteme (siehe 2.2.1) verwendet werden, die eine Expression der jeweiligen Peptide in Bakterien oder eukaryotischen Systemen erlauben. Im folgenden Abschnitt werden die Klonierungen aller Konstrukte erläutert, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

### **2.3.1 SYCP1 Konstrukte der Ratte**

Die Sequenz der SYCP1-cDNA der Ratte von Base 60 bis 3179 lag in 3'-5'-Orientierung im Vektor pCR2.1® Topo vor (Öllinger *et al.*, 2005). Dieses Konstrukt wurde von der Arbeitsgruppe Benavente (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt und diente als Ausgangsprodukt für einen Großteil der Klonierungen.

#### **2.3.1.1 SYCP1-Konstrukte für Transfektionen in COS-7 Zellen**

##### **SYCP1\_84/3102 in pEGFP-N3 (Klon1)**

**Produkt: wt-SYCP1**

Die Sequenz zwischen Base 84 und 3102 wurde mittels PCR und spezifischen Primern (SCP1\_5'XhoI; SCP1\_3'KpnI; Tabelle 2.2) amplifiziert. Nach dem Restriktionsverdau des gereinigten PCR-Produkts mit den Enzymen XhoI und KpnI,

wurde dieses in einen entsprechend linearisierten pEGFP-N3-Vektor inseriert (Dissertation Öllinger, 2005; Öllinger *et al.*, 2005). Da die SYCP1-Sequenz ein Stop-Codon beinhaltet wurde das Protein ohne EGFP-Fusion exprimiert.

**SCP1A\_2847stop(3) in pEGFP-N3                      Produkt: mycSYCP1\_AS914-997**

Dieses Konstrukt wurde von der Arbeitsgruppe Benavente zur Verfügung gestellt (Dissertation Öllinger, 2005) Es enthielt die Sequenz zwischen der Base 84 und 2847 und eine interne myc-Sequenz (402).

### 2.3.1.2 SYCP1-Konstrukte im Yeast-Two-Hybrid-System

**SYCP1\_His\_Nt (110-468) in pEG202 (Klon11)                      Produkt: SYCP1\_1-120-His**

Die Amplifikation der Sequenz von Base 110 bis 468 erfolgte innerhalb einer PCR mit den spezifischen Primern (SYCP1\_110\_5'+XhoI; SYCP1\_468\_3'+XhoI; siehe Tabelle 2.2). Das resultierende PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR2.1® Topo zwischenkloniert und dann über BamHI ausgeschnitten. Der Vektor pEG202 wurde über BamHI geöffnet und mit dem Insert ligiert. Das resultierende Konstrukt wurde vollständig sequenziert und diente als Köderprotein.

**SYCP1\_HisCt (2578-3102) in pEG202 (Klon13)                      Produkt: SYCP1\_819-996-His**

Ausgangspunkt für diese Klonierung war eine verfügbare DNA (SYCP1\_2578-3102 in pEGFP-C2, Klon1) der AG Benavente (Dissertation Öllinger, 2005). Das Konstrukt wurde über einen zweistufigen Verdau mit den Enzymen BamHI und EcoRI ausgeschnitten. Der Zielvektor pEG202 wurde auf die gleiche Weise geschnitten und das Insert konnte somit gezielt inseriert werden. Die Sequenz wurde vollständig überprüft. Das resultierende Produkt diente als Köder-Konstrukt.

### 2.3.1.3 SYCP1-Konstrukte für Bindungstests im TNT®-System und Pull-Down

**SYCP1\_His\_Nt (AS1-120) in pET21a (Klon1)                      Produkt: SYCP1\_1-120-His**

Dieses Konstrukt wurde von der Arbeitsgruppe Benavente zur Verfügung gestellt und vollständig sequenziert.

**SYCP1\_His\_Ct (AS819-996) in pET21a (Klon10)                      Produkt: SYCP1\_819-996-His**

Die Sequenz von Base 2566-3099 wurde über eine PCR mit den Primern 4+NdeI+SYCP1\_2566\_5' und SYCP1\_3099\_3'+XhoI+4 (Tabelle 2.2) amplifiziert. Als Grundlage (Template) für diese Reaktion diente die DNA SYCP1\_84/3102 in pEGFP-N3 (Klon1, siehe oben). Aufgrund der Überhänge von jeweils vier Nukleotiden konnte das gereinigte PCR-Produkt direkt mit den Enzymen NdeI und XhoI verdaut werden. Das Produkt wurde anschließend nochmals gereinigt und über

die gleichen Schnittstellen in den geöffneten Vektor pET21a inseriert und vollständig sequenziert.

### **2.3.2 SYCP2-Konstrukte der Ratte**

Als Ausgangsprodukt für nahezu alle folgenden Klonierungen mit SYCP2 wurde das Konstrukt SYCP2ges in pCR2.1® Topo (Klon3) verwendet (siehe Diplomarbeit Winkel, 2006). Es umfasste die gesamte codierende Sequenz von Base 154-4671, inklusive dem Stopcodon.

#### **2.3.2.1 Konstrukte zur Expression in COS-7 Zellen**

##### **SYCP2ges in pEGFP-N3 (Klon32)                      Produkt: SYCP2-EGFP**

Der Vektor pCR2.1® Topo wurde bei der Insertgewinnung in einem zusätzlichen Verdauungsschritt mit EaeI mehrfach geschnitten. Die gesamte codierende Sequenz (Base 154-4669), jedoch ohne Stopcodon, wurde über die Schnittstellen BamHI und XhoI aus dem Vektor pCR2.1® Topo ausgeschnitten und in den Vektor pEGFP-N3 inseriert (Diplomarbeit Bühler, 2004). Das resultierende Produkt ist ein Fusionsprotein aus EGFP und SYCP2 und wurde in COS-7 Zellen exprimiert.

#### **2.3.2.2 SYCP2-Konstrukte im Yeast-Two-Hybrid-System**

##### **SYCP2ges in pJG4-5 (Klon13)                      Produkt: wt-SYCP2**

Um das Gesamtkonstrukt aus dem Vektor pCR2.1® Topo ausschneiden zu können, war auch hier ein zweistufiger Prozess notwendig, um eine Verschleppung des Vektors zu vermeiden. Das Insert wurde mit dem Enzym XhoI ausgeschnitten und der Vektor mit einem weiteren Enzym (EaeI) verdaut. EaeI schneidet den Vektor pCR2.1® Topo mehrfach und ermöglichte somit eine Unterscheidung zwischen Vektor- und Insertbanden im Gel. Über die XhoI-Schnittstelle wurde das Insert schließlich in den entsprechend geöffneten Vektor pJG4-5 inseriert. Die Übergänge zwischen Vektor und Insert wurde durch Sequenzierung überprüft (Diplomarbeit Winkel, 2006).

##### **SYCP2\_154-1060 in pJG4-5 (Klon15)                      Produkt: SYCP2\_AS1-304**

Das N-terminale Konstrukt von SYCP2 umfasst die ersten 304 Aminosäuren der SYCP2-Sequenz. Da sich innerhalb der Sequenz an Base 1060-1065 eine EcoRI-Schnittstelle befindet, wurde diese genutzt, um das gewünschte Konstrukt aus der Gesamtsequenz (SYCP2ges in pCR2.1® Topo, Klon3) auszuschneiden. Die Integration in den Vektor pJG4-5 wurde ebenfalls über die EcoRI-Schnittstelle

durchgeführt. Die Kontrolle der Sequenz erfolgte über Sequenzierung (Diplomarbeit Winkel, 2006).

**SYCP2\_1060-3547 in pJG4-5 (Klon3)                      Produkt: SYCP2\_AS303-1133**

Dieses Konstrukt umfasst den kompletten mittleren Teil der SYCP2-Aminosäuresequenz. Zur Insertgewinnung wurde die DNA von SYCP2ges in pEGFP-N3 (Klon32, Diplomarbeit Bührlé, 2004) mit EcoRI verdaut. Dabei wurden die beiden SYCP2-internen EcoRI-Schnittstellen von Base 1060-1065 und 3547-3552 genutzt. Dieses Konstrukt wurde dann in den mit EcoRI geöffneten Vektor pJG4-5 inseriert und über Sequenzierung überprüft (Diplomarbeit Winkel, 2006).

**SYCP3\_3436-4278 in pJG4-5 (Klon18)                      Produkt: SYCP2\_AS1095-1375**

Die Amplifikation dieses Konstruktes erfolgte über eine PCR mit den spezifischen Primern SYCP2\_XhoI\_3436\_5' und SYCP2\_4278\_3'-XhoI (Tabelle 2.2) und dem Template SYCP2ges in pCR2.1® Topo (Klon3). Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR2.1® Topo zwischenkloniert und vollständig sequenziert. Durch einen Verdau mit XhoI konnte es ausgeschnitten und anschließend in den entsprechend geöffneten Vektor pJG4-5 inseriert werden.

**SYCP2\_3547-4671 in pJG4-5 (Klon2)                      Produkt: SYCP2\_AS1132-1505**

Auch hier wurde die interne EcoRI-Schnittstelle von Base 3547-3552 genutzt um das Konstrukt aus dem pEGFP-Vektor auszuschneiden und in den Vektor pJG4-5 zu inserieren. Die Sequenz wurde auf Fehler und Leseraster überprüft (Diplomarbeit Winkel, 2006).

**SYCP2\_4277-4771 in pJG4-5 (Klon23)                      Produkt: SYCP2\_AS1376-1505**

Ein entsprechendes EGFP-Fusions-Konstrukt (SYCP2\_4277-4671 in pEGFP-C2, Klon1) war bereits vorhanden und wurde von der Arbeitsgruppe Benavente zur Verfügung gestellt. Die Insertgewinnung und pJG4-5-Vektoröffnung erfolgte über mehrere Schritte. Zunächst wurden beide mit BamHI geschnitten. Die Schnittstelle wurde mithilfe des Klenow-Fragments aufgefüllt, so dass glatte Enden (blunt ends) entstanden. Anschließend erfolgte ein EcoRI-Verdau, um das Insert vollständig auszuschneiden und den Zielvektor so zu öffnen, dass dieses in gezielter Orientierung inseriert werden konnte. Über eine Sequenzierung wurde der Erfolg der Integration überprüft.

### **2.3.2.3 Konstrukte für Interaktionsstudien im TNT®-System**

Alle folgenden Konstrukte wurden über den gleichen mehrstufigen Prozess in den Zielvektor pET21a-myc inseriert. Dabei erfolgte zunächst eine Zwischenklonierung in

den Vektor pCR2.1® Topo. Anschließend wurde die DNA mit BamHI geschnitten, die Schnittstellen mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt und ein zusätzlicher Verdau mit EcoRI durchgeführt. Das resultierende Konstrukt wurde in den Vektor pET21a-myc inseriert. Dieser wurde zuvor mit Sall geöffnet. Die Schnittstellen wurden ebenfalls mithilfe des Klenow-Fragments aufgefüllt und schließlich erfolgte ein EcoRI-Verdau. Erst dann konnte eine Ligation mit dem jeweiligen Insert erfolgen. Dieser mehrstufige Klonierungsprozess ermöglichte eine gerichtete Integration des Konstrukts in den Zielvektor.

**SYCP2\_154-1065 in pET21a-myc**

**Produkt: SYCP2\_1-304-myc**

Die Amplifikation des Konstruktes erfolgte mit den Primern SYCP2\_CG+5'ATG, SYCP2\_1065\_3'TGA (Tabelle 2.2) und dem Template SYCP2ges in pCR2.1® Topo (Klon3). Das PCR-Produkt wurde in pCR2.1® Topo zwischenklont und vollständig sequenziert. Danach erfolgte die Integration in den Vektor pET21a-myc.

**SYCP2\_3436-4278 in pET21a-myc**

Zur Insertgewinnung wurde eine PCR mit der Template-DNA SYCP2ges in pCR2.1® Topo (Klon3) und den spezifischen Primern SYCP2\_CGATG\_+3436 und SYCP2\_4278\_3'+TGA (Tabelle 2.2) durchgeführt. Das Produkt dieser Reaktion wurde in den Vektor pCR2.1® Topo zwischenklont und sequenziert. Im Anschluss erfolgte die Ligation mit dem Zielvektor pET21a-myc.

**SYCP2\_3547-4671 in pET21a-myc**

Das Konstrukt wurde über eine Amplifikation mit den spezifischen Primern SYCP2\_CGATG\_+3547 und SYCP2\_3'TGA (Tabelle 2.2) in einer PCR hergestellt. Als Template diente SYCP2ges in pCR2.1® Topo (Klon3). Das Produkt wurde zunächst in den Vektor pCR2.1® Topo zwischenklont und schließlich, wie oben beschrieben, in pET21a-myc inseriert.

**SYCP2\_4279-4671 in pET21a-myc (Klon1) Produkt: SYCP2\_1376-1505-myc**

Die Gewinnung des Konstrukts erfolgte über eine PCR mit spezifischen Primern (SYCP2\_CGATG\_+4279, SYCP2\_3'TGA; Tabelle 2.2) und dem Template SYCP2ges in pCR2.1® Topo (Klon3). Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR2.1® Topo zwischenklont und über eine Sequenzierungsreaktion überprüft. Danach erfolgte die Integration in den Vektor pET21a-myc und somit die Fusion mit der myc-Sequenz.

### 2.3.3 SYCP1-Konstrukte von Medaka

Die Gesamt-cDNA wurde über Reverse Transkription (RT-PCR) aus Medaka-Hoden gewonnen und diente als Template für die Klonierung der cDNA von MeSYCP1. Das Gesamtkonstrukt wurde mit den spezifischen Primern XhoI+Medaka\_SYCP1\_5'ATG und Medaka\_SYCP1\_3'TAA+XhoI über eine PCR amplifiziert und in den pCR2.1®-Topo-Vektor zwischenkloniert. Die Sequenz des erhaltenen Klons (MeSYCP1 in pCR2.1®-Topo, Klon5) wurde vollständig überprüft (siehe 4.2.1) und diente als Ausgangspunkt für weitere Klonierungen.

#### **MeSYCP1\_ges(5-2692) in pEGFP-N1 (Klon7)      Produkt: MeSYCP1-wt**

Für die Herstellung dieses Konstrukts wurde die Sequenz von Base 5-2692 über die angefügten XhoI-Schnittstellen aus dem pCR2.1®-Topo-Vektor (MeSYCP1 in pCR2.1®-Topo, Klon5, siehe oben und 4.3.1) ausgeschnitten und in einen entsprechend geöffneten pEGFP-N1-Vektor inseriert. Da die Sequenz schon im Ausgangskonstrukt vollständig überprüft wurde, wurden hier nur noch die Übergänge zwischen Vektor und Insert sequenziert. Durch das Stopcodon konnte die sich an die MeSYCP1-Sequenz anschließende EGFP-Sequenz nicht mehr gelesen werden. Das Konstrukt wurde zur Expression des wildtypischen MeSYCP1 in somatischen Kulturzellen (COS-7) verwendet.

#### **MeSYCP1\_ges(5-2692) in pEGFP-C3 (Klon19)      Produkt: MeSYCP1-EGFP**

Auch dieses Konstrukt wurde für die Expression in COS-7 Zellen verwendet. Es wurde nach dem gleichen Prinzip wie das wildtypische Konstrukt in den mit XhoI linearisierten Vektor pEGFP-C3 inseriert. Da sich die EGFP-Sequenz in diesem Vektor vor dem Insert befindet, wurde das Konstrukt als MeSYCP1-EGFP-Fusionsprotein exprimiert. Auch hier wurden die Übergänge von Vektor und Insert über Sequenzierung überprüft.

#### **MeSYCP1\_delCt in pEGFP-N3 (Klon1)      Produkt: MeSYCP1\_delCt\_EGFP**

Die Sequenz von Base 5 bis 2155 (AS1-717) wurde über eine PCR mit spezifischen Primern (XhoI+Medaka\_SYCP1\_5'ATG, Medaka\_SYCP1\_3'Coil (aa717); siehe Tabelle 2.2) und der DNA MeSYCP1\_ges(5-2692) in pEGFP-C3 (Klon19) als Grundlage amplifiziert und in den Vektor pCR2.1® zwischenkloniert. Die Sequenz des erhaltenen Klons (MeSYCP1\_delCt in pCR2.1® Topo, Klon2) wurde vollständig überprüft. Das Insert wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym XhoI ausgeschnitten und in einen entsprechend linearisierten pEGFP-C3 inseriert. Die Übergänge zwischen Vektor und Insert, sowie die Leseraster von EGFP- und

Insertsequenzen wurden überprüft. Das resultierende Produkt wurde zur Expression in COS-7 Zellen verwendet.

### 2.3.4 SYCP1-Konstrukte von Hydra

Zur Gewinnung der cDNA über Reverse Transkription wurden die Gastralregionen, mit anhaftenden Gonaden-ähnlichen Strukturen und Knospungszonen, von circa 30 Hydren verwendet. Diese cDNA diente dann als Template für die Gewinnung der cDNA von HySYCP1. Die vollständige Protein-Sequenz wurde über zahlreiche Zwischenstufen zusammengestellt (siehe 4.3.1) und schließlich in den Vektor pCR2.1® Topo inseriert. Das Konstrukt wurde vollständig sequenziert und diente schließlich als Template für alle weiteren Hydra-SYCP1-Klonierungen (HymSYCP1\_ges\_inpCR2.1®Topo, Klon 7a1-7).

#### **HymSYCP1ges in pEGFP-C3 (Klon 16)      Produkt: HySYCP1-EGFP**

An die vollständige Nukleotidsequenz des Proteins, von Base 1 bis 3051, wurde zunächst direkt vor dem Startcodon eine XhoI-Schnittstelle und direkt nach dem Stopcodon eine SmaI-Schnittstelle angefügt. Dies erfolgte über eine PCR mit den spezifischen Primern 4+XhoI+HymSYCP1\_5'ATG und HymSYCP1\_3'TGA+SmaI+4. Das PCR-Produkt wurde anschließend in einem zweistufigen Restriktionsverdau mit XhoI und SmaI geschnitten und in einen entsprechend geöffneten pEGFP-C3-Vektor inseriert. Die Kontrolle des Konstruktes erfolgte über Sequenzierung. An Position 714 der Nukleotidsequenz fand ein Basenaustausch von Thymin zu Cytosin statt, dieser verursachte eine stille Mutation und konnte aufgrund dessen vernachlässigt werden.

#### **HymSYCP1\_delCt in pEGFP-C2      Produkt: HySYCP1\_delCt-EGFP**

Dieses Konstrukt umfasst die Nukleotide vom Startcodon bis zur letzten Base der Coiled-Coil-Domäne (Berechnung nach Lupas *et al.*, 1991) und wird daher als C-Terminus-Deletionsmutante bezeichnet. Um die Nukleotidsequenz gezielt in den Vektor pEGFP-C3 inserieren zu können, mussten vor dem Startcodon eine XhoI-Schnittstelle und im Anschluss an die letzte Base eine SmaI-Schnittstelle angefügt werden. Hierzu wurden die spezifischen Primer 4+XhoI+HymSYCP1\_5'ATG und HymSYCP1\_3'TGA+SmaI+4 in einer PCR eingesetzt. Das resultierende Produkt wurde dann mit den besagten Enzymen geschnitten und mit dem XhoI-SmaI-geöffneten Vektor ligiert. Das Leseraster und die Sequenz wurden schließlich in einer Sequenzanalyse überprüft.

## 2.4 Geräte

Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank (Bakterienkultur, 37°C) TypB15	Memmert, über Hartenstein, Würzburg
Brutschrank (Hefekultur, 30°C)	Memmert, über Hartenstein, Würzburg
Brutschrank (Zellkultur, 37°C)	MWG-BIOTECH, München
CO <sub>2</sub> Inkubator 300 Compact QMI300S	NUNC, Wiesbaden
Digitalkamera AxioCam MRm	Zeiss, Oberkochen
Digitalkamera Pixelfly	PCO, Kelheim
Drehtisch Reax 2	Heydolph, über Hartenstein, Würzburg
Elutriationseinheit	Beckmann, München
J2-21M/E Centrifuge	
JE-6B Rotor	
Feinwaage Mettler AC 100	Mettler, Düsseldorf
Flachbett-Scanner	Epson, Meerbusch
Epson Perfection V700 Photo	
Flachbett-Scanner	Quatographic Technology GmbH, Braunschweig
Quatographic X-Finity Pro 42	
Fluoreszenzmikroskop Axiophot Stereo	Zeiss, Oberkochen
HB050 mit Quecksilberlampe	
Gefriermikrotom 2800 Frigocut E	Reichert-Jung
Gewebekulturschalen	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Graphit-Blot-Kammer	LMS, über Hartenstein, Würzburg
Heizblock	Liebisch, über Hartenstein, Würzburg
Heizplatte	Medax Nagel GmbH, Kiel
Homogenisator RW20	Janke & Kunkel, über Hartenstein, Würzburg
Hybridisierungsöfen MINI 10	Thermo Hybaid, Ulm
Kippschüttler WS5	Laborgerätebau Edmund Bühler, Tübingen
Kühlzentrifuge Minifuge T	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments (Bad Homburg)
Laborpumpe Typ Varioperpex®II	LKB Bromma, über Hartenstein, Würzburg
Laborwaage DeltaRange® Mettler PJ3600	Mettler, Düsseldorf

Magnetrührer	M35 GLW, Würzburg
Magnetic Stirrer Model L-71	über Hartenstein, Würzburg
Magnetic Separator für 1,5-2 ml Reaktions- Gefäße	Invitrogen (Karlsruhe)
Magnetic Separator DynaMag™50-magnet	Invitrogen (Karlsruhe)
Mini TransBlot-System	BioRad (München)
pH-Meter pH523	WTW, über Hartenstein, Würzburg
Proteingelkammer Mini V8	Gibco BRL, Eggenstein
Rollinkubator RM5	über Hartenstein, Würzburg
Schlittenmikrotom	Leitz, Wetzlar
Sequenzierer ABI PRISM™ 310	Genetic Analyser Perkin Elmer, Applied Biotems GmbH, Weiterstadt
Sonifier B12	Branson Sonic Power Company, über Gerhard Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Stabilisiertes Netzgerät EV261	PEGLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Stabilisiertes Netzgerät 250V 1 A	Dipl. Ing. L. Fischer, Heidelberg
Thermocycler Cyclone® 25	PEGLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermocycler Cyclone® Gradient	PEGLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermocycler Mastercycler® personal	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler Primus 25 advanced®	PEGLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermohaube Certomat® H	B. Braun, über Hartenstein, Würzburg
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Mikro 200	Hettich, über Hartenstein, Würzburg
Tischzentrifuge Mikro 200R mit Kühlfunktion	Hettich, über Hartenstein, Würzburg
Transmissionselektronenmikroskop EM 10	Zeiss, Oberkochen
UV-Sratalinker 1800	Stratagene, Heidelberg
Vortex L24	GLW, Würzburg
Wasserbad WTH 500	über Hartenstein, Würzburg

## 2.5 Computerprogramme

Adobe Photoshop CS3	Bildbearbeitung und Erstellung schematischer Darstellungen
Avio Vision Release 4.7.1 (08-2008)	Bildaufnahme am Fluoreszenz-Mikroskop
BioEdit 7.0.9	Analyse von DNA-Sequenzen
EasyControl Version 2.15 (PCO, Kelheim)	Bildaufnahme am Fluoreszenz-Mikroskop
Microsoft Powerpoint	Erstellung schematischer Darstellungen
Microsoft Office Word 2007	Erstellung der Dissertation

## 3. Methoden

### 3.1 Mikrobiologische Methoden

#### 3.1.1 Kultivierung von Bakterien

*Lösungen:*

LB-Medium (Luria Bertami) pH 7,4:	10 g/l Bacto-Trypton (AppliChem)
	5 g/l Hefeextrakt (AppliChem)
	10 g/l NaCl
	→ autoklavieren
Antibiotika-Stammlösungen:	Ampicillin: 50 mg/ml in H <sub>2</sub> O
	Kanamycin: 50 mg/ml in H <sub>2</sub> O
	Chloramphenicol: 34 mg/ml in Ethanol

*Durchführung:*

Für eine Übernachtkultur (ÜNK) wurden circa 7-15 ml LB-Medium mit der entsprechenden Antibiotika-Stammlösung in einer Endkonzentration von 50 µg/ml versetzt. Dabei richtete sich die Wahl des Antibiotikums nach der jeweiligen zu kultivierenden Bakterienkolonie bzw. dem darin enthaltenen Plasmidvektor. Zum animpfen der Bakterienkultur wurde eine sterile Pipettenspitze verwendet, die entweder mit Bakterienmaterial direkt von der Agarplatte oder aus einer Glycerinkultur versehen wurde. Die Kultur wurde anschließend über Nacht bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Die Kultivierung erfolgte in einem 50 ml Greiner-Röhrchen, weil diese eine ausreichende Sauerstoffzufuhr ermöglichten.

Flüssigkulturen größerer Volumina (50-200 ml) wurden in autoklavierten Kolben inkubiert und mit circa 5-10ml ÜNK angeimpft. Solche Kulturen wurden beispielsweise zur Proteinexpression verwendet.

#### 3.1.2 Glycerinkulturen

Die Herstellung von Glycerinkulturen diente der Aufbewahrung und längeren Erhaltung von einzelnen Bakterienkolonien. Hierzu wurden 900 µl einer ÜNK mit 100 µl sterilem Glycerin vermischt und bei -70°C eingefroren. In diesem Zustand konnten die Kulturen über mehrere Jahre gelagert werden.

### 3.1.3 Bakterienkulturen auf Agarplatten

#### *Lösungen und Chemikalien:*

1,5% Select –Agar (Gibco) in LB-Medium (vgl. 3.1.1) → autoklavieren

Antibiotika-Stammlösungen (siehe 3.1.1)

#### *Durchführung:*

Das Gemisch aus 1,5% Select-Agar und LB-Medium wurde entweder direkt nach dem autoklavieren verwendet oder vor Gebrauch in der Mikrowelle erhitzt. Nach einer Abkühlung auf circa 50°C wurden die jeweiligen Antibiotika-Stammlösungen in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt. Die Lösung wurde dann auf sterile Petrischalen so verteilt, dass der Schalenboden ausreichend bedeckt war. Nach Aushärten des Agars konnten die Platten ca. 2 Wochen bei 4°C gelagert werden.

Zur Kultivierung von Bakterien wurden 100-200 µl Kultur auf den entsprechenden Platten mit einem sterilen Drygalski-Spatel gleichmäßig verteilt. Alternativ können Kulturen oder einzelne Kolonien auch mit einer sterilen Impföse oder einer Pipettenspitze auf die Selektionsplatten übertragen werden. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

### 3.1.4 Photometrische Bestimmung der Bakteriendichte in Flüssigkulturen

Die Bakteriendichte in Flüssigkulturen wurde mithilfe der optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) am Photometer bestimmt. Hierbei wurde die Extinktion der jeweiligen Flüssigkultur bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Dabei entspricht ein  $OD_{600}$ -Wert von 1,0 circa  $8 \times 10^8$  Bakterienzellen/ml. Der entsprechende Nullwert wurde mit LB-Medium (siehe 3.1.1) eingestellt.

### 3.1.5 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien

Die Aufnahme von Fremd-DNA in ein Bakterium wird auch als Transformation bezeichnet. Dabei muss die entsprechende DNA in Ringform (Plasmid-DNA) vorliegen, da sie in dieser Form nicht vom Bakterium abgebaut werden kann. Außerdem muss die DNA einen Replikationsursprung enthalten, der vom jeweiligen Bakterium erkannt werden kann. Zu Selektionszwecken sollte die Plasmid-DNA ein Antibiotika-Resistenzgen tragen.

#### *Lösungen:*

LB-Medium (vgl. 3.1.1)

Antibiotika-Stammlösungen (vgl. 3.1.1)

Selektionsplatten (siehe 3.1.3)

**Durchführung:**

Ein 100 µl Aliquot kompetenter Bakterien (siehe 3.1.5) wurde auf Eis aufgetaut und entweder mit 50-150 ng DNA oder einem Ligations-Ansatz vermischt. Dieser Ansatz wurde für 30-60 Minuten auf Eis inkubiert. Ein anschließender Hitzeschock bei 42°C (30-70 sek.) machte die Lipiddoppelschicht der Bakterien für kurze Zeit durchlässig und bewirkte somit eine Aufnahme der Plasmid-DNA. Nach diesem Schritt wurden die Bakterien kurzzeitig zurück auf Eis gestellt und dann mit 900 µl LB-Medium versetzt. Dieser Ansatz für 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert und schließlich auf Selektionsplatten ausplattiert. Diese wurden wiederum über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

**3.1.6 Herstellung kompetenter Bakterien****Lösungen:**

LB-Medium (vgl. 3.1.1)

TSS (Transformation and Storage Solution) → pH 6,5

LB-Medium + 10% (w/v) PEG 3350

+ 5% (v/v) DMSO

+ 50-70 mM Mg<sup>2+</sup> (MgCl<sub>2</sub>)

→ steril filtrieren; Lagerung bei -20°C

**Durchführung:**

Eine Flüssigkultur von 100-200 ml wurde mit 5-10 ml einer ÜNK des entsprechenden Bakterienstammes *E.coli* XL1-Blue oder *E. coli* Rosetta Blue (siehe 3.3.1) angeimpft und bei 37°C inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,3-0,4 wurde die Inkubation gestoppt und die Kultur bei 900g und 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Ab diesem Zeitpunkt wurde nur noch bei 4°C gearbeitet. Das Bakterienpellet wurde in eiskaltem TSS (1/40 des Ausgangsvolumens) resuspendiert und anschließend in 100 µl Aliquots auf vorgekühlte, sterile 1,5 ml-Eppendorf-Caps aufgeteilt. Diese Aliquots wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und schließlich bei -70°C gelagert.

Zur Ermittlung der Kompetenz wurden die Bakterien mit jeweils 10, 100 und 1000 pg des Plasmidvektors pUC transformiert und über Nacht auf Selektionsplatten kultiviert. Anschließend wurden die Kolonien ausgezählt. Die Effizienz der Transformation definiert sich als die Anzahl der Transformanten pro µg DNA. Ein akzeptabler Sollwert lag dabei bei 1x10<sup>7</sup>-1x10<sup>9</sup>.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 RNA-Isolierung aus Geweben

*Lösungen:*

- pegGOLD Trifast™ (vgl. 2.2.4)
- Chloroform (frei von Zusätzen, wie Isoamylalkohol)
- Isopropanol (p.A.)
- 80% Ethanol (p.A.)
- RNase-freies Wasser
- RiboLock™ Ribonuklease Inhibitor (Fermentas)

*Durchführung:*

Die Isolierung von Gesamt-mRNA aus Hodengewebe von Medaka (*Oryzias latipes*) und aus dem Rumpf von *Hydra vulgaris* erfolgte nach dem Herstellerprotokoll der Firma Peqlab (Erlangen). Die RNA wurde für die Gewinnung spezifischer cDNA durch RT-PCR (siehe 3.2.2) verwendet. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch (siehe 3.2.8)

### 3.2.2 Gewinnung von cDNA durch Reverse Transkription (RT-PCR)

Die Herstellung von cDNA durch die reverse Transkription von gewebespezifischer mRNA ist eine Grundvoraussetzung für das Arbeiten mit rekombinanter DNA. Der Vorteil gegenüber genomischer DNA sind die durchgängigen Leseraster der cDNAs. Genomische DNA hingegen ist von Intronsequenzen unterbrochen. Die cDNA kann für die exogene Expression in eukaryotischen und prokaryotischen, sowie in *in vitro*-Expressionssystemen eingesetzt werden.

*Durchführung:*

Die RT-PCR (rreverse transcriptase polymerase chain reaction) gliedert sich in zwei Abschnitte. Zunächst wird die mRNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in DNA übersetzt. Das Pipettierschema für diese Reaktion ist im Folgenden dargestellt:

20 µl RT-PCR-Ansatz:

- 1 µg RNA
- 1 µl RiboLock™ Ribonuklease Inhibitor (40 Units/µl, Fermentas)
- 4 µl RT-Reaktionspuffer (5x)
- 1 µl dNTPs (10mM je Nukleotid, Fermentas)
- 1 µl Oligo(dT)<sub>18</sub>Primer #SO131 (500 µg/ml, Fermentas)
- 1 µl Reverse Transkriptase MMULV (200 Units/µl, Promega)
- auf 20 µl mit H<sub>2</sub>O bidest. auffüllen

Der Ansatz wurde im Thermocycler für eine Stunde bei 37°C inkubiert und 5 Minuten bei 95°C hitzeinaktiviert. Die daraus resultierende DNA bezeichnet man als cDNA (complementary DNA). Die Lagerung der cDNA erfolgte bei 4°C bis -20°C. Mit spezifischen Primern konnte daraufhin eine gewünschte cDNA eines Proteins amplifiziert und schließlich über DNA-Gelelektrophorese isoliert (*Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*, vgl. 2.2.4) werden. Für solch eine PCR wurden 1-2 µl der cDNA eingesetzt (siehe 3.2.3). Über das *Topo TA Cloning® Kit* (vgl. 2.2.4) wurde die jeweilige cDNA dann in den pCR2.1® Topo-Vektor inseriert und durch die Transformation in kompetente *E. coli* Top10 One Shot® (siehe 2.1.3 und 3.1.5) vervielfältigt. Ausgehend von diesem Vektor konnte die cDNA zunächst über eine Sequenzierung überprüft werden. Über Restriktionsverdau oder PCR konnte nun eine Umklonierung in andere Vektorsysteme erfolgen.

### 3.2.3 Polymerase Kette Reaktion (*polymerase chain reaction, PCR*)

Die PCR ist eine Methode zur selektiven Amplifikation von DNA-Fragmenten. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Tatsache, dass DNA-Doppelstränge bei einer Erhitzung denaturieren. Die dabei entstehenden Einzelstränge lassen sich mithilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase wieder verdoppeln. Hierzu bedarf es spezifischer Oligonukleotide (Primer), welche die Zielsequenz flankieren. Um die spezifischen Primer ableiten zu können, müssen mindestens Kenntnisse über Teile der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz bestehen. Außerdem benötigt die Polymerase für die Replikation der DNA die vier Nukleotidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP).

#### *Primerdesign:*

Der Erfolg einer PCR ist stark abhängig von der Wahl der jeweiligen Oligonukleotide. Dabei sollten die Primer bestimmte Voraussetzungen erfüllen. Zum einen sollten sie nicht mit sich selber hybridisieren oder interne Schleifen ausbilden. Die Primersequenz sollte so gewählt werden, dass der G/C-Gehalt zwischen 40 und 60% liegt. Des Weiteren ist zu beachten, dass die komplementäre Sequenz in der DNA nur einmal vorkommen sollte. Um ideale Reaktionsbedingungen zu schaffen, sollten die Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide möglichst ähnlich sein. Denn die Spezifität der Primer erhöht sich, je näher die Annealing- und Schmelztemperaturen beieinander liegen.

Die Schmelztemperatur eines Primers gibt an, bei welcher Temperatur (in °C), die Hälfte der komplementären Sequenzen in der Lösung als Doppelstrang vorliegen. Sie kann nach folgender Formel bestimmt werden:

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

#### *Durchführung:*

Für DNA-Amplifikation über PCR wurden die Phusion<sup>TM</sup>-DNA-Polymerase, da sie eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität besitzt und demzufolge eine „proof reading“-Funktion hat. Für die Kolonie-PCR (siehe 3.2.4) und zum Anhängen der (A)-Überhänge für die pCR2.1®-Topo-Klonierung (siehe 3.2.13) wurde die Taq DNA-Polymerase eingesetzt. Die Pipettierschemata der einzelnen Reaktionen und die dazugehörigen Programme für die PCR-Maschinen werden im Folgenden beschrieben. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte im 0,8-1% Agarosegel (siehe 3.2.5).

#### Phusion<sup>TM</sup>-PCR (50 µl-Ansatz)

1-10 ng Plasmid-DNA oder 1-2 µl cDNA  
 10 µl Phusion<sup>TM</sup> Puffer HF (5x)  
 1,5 µl DMSO (optional, 3% Endkonz.)  
 1 µl dNTPs (10mM je Nukleotid, Fermentas)  
 1 µl 5'Primer (SL 100 pmol/µl)  
 1 µl 3'Primer (SL 100 pmol/µl)  
 0,5 µl Phusion<sup>TM</sup> DNA-Polymerase (0,2 Units/µl)  
 auf 50 µl mit H<sub>2</sub>O bidest. auffüllen

#### Taq-PCR (25 µl-Ansatz-Kolonie-PCR)

1 Pipettenspitze Bakterienkolonie-Material  
 2,5 µl Taq DNA-Polymerase-Puffer (10x)  
 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
 0,5 µl dNTPs (10mM je Nukleotid, Fermentas)  
 1 µl 5'Primer (SL 100 pmol/µl)  
 1 µl 3'Primer (SL 100 pmol/µl)  
 0,5 µl Taq DNA-Polymerase  
 auf 25 µl mit H<sub>2</sub>O bidest. auffüllen

#### Programm für Phusion<sup>TM</sup>-PCR

Initiale Denaturierung: 2 min, 98°C  
 30 Zyklen:  
 →Denaturierung: 10 sek, 98°C  
 →Primer-Annealing: 10 sek, T (spezifisch)  
 →Elongation: 15 sek/100bp, 72°C  
 Finale Elongation: 10 min, 72°C  
 Kühlung: 4°C

#### Programm für Taq-PCR (Kolonie-PCR)

Initiale Denaturierung: 2 min, 98°C  
 25 Zyklen:  
 →Denaturierung: 10 sek, 98°C  
 →Primer-Annealing: 10 sek, T (spezifisch)  
 →Elongation: 15 sek/100bp, 72°C  
 Finale Elongation: 10 min, 72°C  
 Kühlung: 4°C

### **3.2.4 Kolonie-PCR**

Nach der Klonierung von DNA-Fragmenten in bakterielle Vektoren wurden die erhaltenen Bakterienkolonien auf eine erfolgreiche Ligation und Integration der gewünschten DNA überprüft. Mit diesem System konnte außerdem festgestellt werden in welcher Orientierung sich das Insert innerhalb des Vektors befindet. Anstelle von gereinigter DNA wurde hier Bakterienmaterial der einzelnen Kolonien

als Template für die PCR eingesetzt. Wählt man nun zwei Fragment-interne Primer, so konnte man die Insertion der DNA allgemein überprüfen. Setze man hingegen einen DNA-internen Primern und einen Vektor-Primer ein, so konnte man gezielt eine Auskunft über die Orientierung des Inserts erhalten.

*Durchführung:*

Zunächst wurde ein so genannter „*Mastermix*“ der 25 µl-Ansätze (Pipettierschema und PCR-Programm, siehe 3.2.3) für die gewünschte Anzahl an Kolonien angefertigt und auf die einzelnen PCR-Gefäße verteilt. Eine geringe Menge Bakterienmaterial der zu testenden Kolonie wurde jeweils mit einer sterilen Pipettenspitze direkt von der Selektionsplatte aufgenommen. Zunächst wurde ein Teil des Bakterienmaterials auf eine Replika-Selektionsplatte übertragen und der Rest wurde mit dem PCR-Ansatz vermischt. Durch die initiale Denaturierung innerhalb der Reaktion werden die Bakterien aufgebrochen und die DNA wird für die DNA-Polymerase zugänglich.

### **3.2.5 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten eignete sich die Agarose-Gelelektrophorese. Wegen der vielen Phosphatgruppen besitzen Nukleinsäuren eine negative Nettoladung und wandern folglich in einem elektrischen Feld zur Anode. Je nach Fragmentgröße und Form besitzt die DNA bei der Bewegung durch das molekulare Netzwerk der Agarose unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten und kann so aufgetrennt werden. Die Trennschärfe ist dabei abhängig von der Gesamtlaufweite und der Agarose-Konzentration des Gels. Um die DNA sichtbar zu machen wurde dem Gel Ethidiumbromid zugegeben. Dabei handelt es sich um einen Farbstoff, der mit den Basen der DNA interkaliert und bei Anregung mit UV-Licht orange fluoresziert.

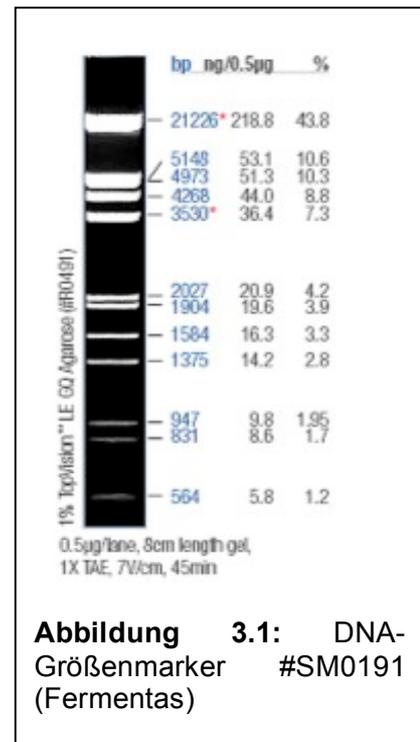
*Lösungen und Chemikalien:*

Agarose Low EEO (Applichem, Darmstadt)	
Ethidiumbromid-Stammlösung:	50 mg/ml
20x SB-Puffer (pH 8,0):	200 mM NaOH
	Borsäure zugeben bis pH 8,0
1x SB-Puffer:	20x SB mit H <sub>2</sub> O bidest. verdünnen
6x Beladungspuffer:	60% Glycerin (Applichem)
	30% 0,2 M EDTA
	1 Spatelspitze Orange G
6x Beladungspuffer:	LoadingDye #R0611 (Fermentas)

DNA-Größenmarker:

Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, 3  
#SM0191 (Fermentas)*Durchführung:*

Es wurden 0,6-1,0%ige Agarosegele mit einer Endkonzentration von circa 1 µg/ml Ethidiumbromid bei einer Spannung von etwa 100-250 V gefahren. Die zu analysierenden Proben wurden vor der Beladung mit einem Beladungspuffer vermischt. Um die Größen der einzelnen DNA-Fragmente abschätzen zu können, wurde in einer Spur des Gels ein DNA-Größenmarker (Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, 3; Abb. 3.1) mit aufgetragen. Durch die Interkalation des Ethidiumbromids konnte die DNA durch Anregung mit UV-Licht am UV-Transilluminator sichtbar gemacht werden. Durch eine Videokamera konnten die Ergebnisse der Gelelektrophorese schließlich dokumentiert werden.

**3.2.6 Gelextraktion von DNA-Fragmenten**

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus DNA-Agarosegelen wurde mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System der Firma Promega durchgeführt. Die gewünschten DNA-Banden wurden mit einem sauberen Skalpell aus dem jeweiligen Gel ausgeschnitten und die DNA anschließend nach Angaben des Herstellerprotokolls extrahiert. Der finale Elutionsschritt wurde mit Wasser (H<sub>2</sub>O bidest.) durchgeführt. Die für die Gelelektrophorese verwendete Agarose Low EEO der Firma Applichem besitzt eine extrem niedrige Bindungsaffinität für Nukleinsäuren. Dies ermöglichte eine relativ verlustarme Reinigung der DNA-Fragmente.

**3.2.7 Präparation von Plasmid-DNA**

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen erfolgt mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I der Firma Peqlab oder mit dem Kit NucleoSpin® Plasmid der Firma Macherey Nagel. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben in den jeweiligen Herstellerprotokollen. Das Prinzip beider Kits basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterien und einer anschließenden reversiblen Adsorption der DNA an eine Silikat-Gel-Membran unter Hochsalz-Bedingungen. Dabei wird die DNA von

allen weiteren Zellbestandteilen getrennt. In einem abschließenden Elutionsschritt wurde die DNA unter Niedrigsalz-Bedingungen mit Wasser (H<sub>2</sub>O bidest.) von der Membran gelöst.

### 3.2.8 Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentrationen gereinigter DNA (siehe 3.7.7) oder gewonnener RNA (siehe 3.2.1) erfolgte am Biophotometer (Eppendorf, Hamburg). Dabei wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD<sub>260</sub>) gemessen. Dort besitzen Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum. Die Messung erfolgte an gereinigte Verdünnungen von 1/20 bis 1/100 in Wasser (H<sub>2</sub>O bidest.) gegen einen entsprechenden Leerwert. Eine OD<sub>260</sub> von 1,0 entspricht dabei einer DNA-Konzentration von ca. 50 µg/ml und einer RNA-Konzentration von circa 40 µg/ml. Aus den zusätzlich angegebenen Quotienten OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> und OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> lassen sich Verunreinigungen durch Proteine (OD<sub>280</sub>) bzw. Peptide, aromatische Verbindungen und Kohlenhydrate (OD<sub>230</sub>) abschätzen. Die Tabelle 3.1 zeigt die empfohlenen Sollwerte der photometrischen Messung.

Nukleinsäure	Konz. bei OD <sub>260</sub> = 1,0	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> /OD <sub>230</sub>
dsDNA	50 µg/ml	1,8	2,0-2,2
ssDNA	37 µg/ml	1,8	2,2
RNA	40 µg/ml	2,0	2,2

**Tabelle 3.1:** Photometrische Sollwerte der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

### 3.2.9 Reinigung von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren von Restriktionsenzymen, DNA-Polymerasen, anderen Proteinanteilen und Pufferbestandteilen aus Reaktionsansätzen zu isolieren wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Standardmäßig wurde das Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System der Firma Promega verwendet. In einigen Fällen war jedoch eine andere Methode notwendig, da bestimmte Enzyme sich nicht problemlos von den DNA-Fragmenten entfernen ließen. Dann musste die Reinigung mit der Phenol-Chloroform-Methode durchgeführt werden. Die Proteine werden durch das Phenol denaturiert und in der Interphase zwischen wässriger und organischer Phase angereichert.

*Lösungen:*

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Phenol (Applichem)

### Chloroform (Applichem)

#### *Durchführung:*

Der jeweilige Reaktionsansatz wurde auf ein Volumen von 100 µl mit Wasser (H<sub>2</sub>O bidest.) aufgefüllt und mit einem Volumen der Phenol-Lösung versetzt. Durch mehrmaliges Invertieren wurde der Ansatz gut vermischt. Zur besseren der einzelnen Phasen erfolgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 14000 rpm. Die obere DNA-haltige wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Um die Phenolreste von der DNA zu entfernen, wurde der Ansatz mit einem Volumen der Chloroform-Lösung versetzt und durch kräftiges Schütteln gut gemischt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für eine Minute bei 14000 rpm. Anschließend wurde die wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um das Phenol möglichst vollständig zu entfernen, musste dieser Waschschrift mindestens fünf Mal wiederholt werden. Im Anschluss daran wurde die DNA der wässrigen Phase über das Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) gereinigt oder mit der Natriumacetat-Ethanol-Methode gefällt (siehe 3.2.10).

### **3.2.10 Fällung von Nukleinsäuren**

Nukleinsäuren wurden mit der Natriumacetat-Ethanol-Methode gefällt.

#### *Lösungen:*

3 M Natriumacetat (pH 5,2)

100% Ethanol (p.A., Applichem)

70% Ethanol (p.A.) verdünnt mit H<sub>2</sub>O bidest.

#### *Durchführung:*

Standardmäßig wurden Fällungen mit einem Lösungsvolumen von 100 µl durchgeführt. Hierfür wurde die DNA-Lösung gegebenenfalls mit Wasser (H<sub>2</sub>O bidest.) aufgefüllt. Anschließend wurde 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetat und ein 2,5-faches Volumen 100%igen Ethanol zugegen. Der Ansatz wurde gut durchmischt und anschließend 30 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, um eine Präzipitation der DNA zu ermöglichen. Die Reinheit des DNA-Pellets konnte durch 2-3maliges Waschen mit 70%-igem Ethanol erhöht werden. Hierbei wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet durch vorsichtige Zugabe von frischem 70%-igem Ethanol gewaschen. Dabei musste darauf geachtet werden, dass das Präzipitat nicht gelöst wurde. Dieser Ansatz wurde wiederum 10 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss an den letzten Waschschrift wurde der

Überstand sorgfältig abgenommen und das Pellet bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Nach vollständiger Verdampfung des Ethanol konnte das Pellet in einer gewünschten Menge H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen werden.

### 3.2.11 Sequenzierung von DNA

Durch eine Sequenzierung kann die genaue Nukleotidabfolge einer bestimmten DNA bestimmt werden. Die etablierte Methode von Sanger und Coulson (1977) basiert darauf, dass innerhalb einer PCR Didesoxy-Nukleosidtriphosphate (ddNTPs) in stöchiometrischen Mengen beigefügt werden. Wird innerhalb der Polymerisierung durch die DNA-Polymerase ein solches Nukleotid integriert kommt es zum Kettenabbruch, da kein freies 3'-OH Ende mehr vorliegt, an dem die Polymerisation fortgeführt werden kann. Somit bekommt man DNA-Fragmente verschiedener Länge, die an ihren Enden jeweils eines der markierten Nukleotide tragen. Die DNA wird mit einem spezifischen Primer und einem so genannten Premix (ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Tecton Kit) gemischt. Dieser enthält alle Komponenten: dNTPs, sowie markierte ddNTPs, die Taq DNA-Polymerase (vgl. 2.4.3.), Taq DNA-Polymerase-Puffer und MgCl<sub>2</sub>, die für die Amplifikation von DNA-Fragmenten innerhalb einer PCR-Reaktion nötig sind. Jedes ddNTP (A, T, C, G) ist dabei mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Fragmente gleicher Länge tragen demzufolge die gleiche markierte Base am Ende. Die Fragmente werden in einem Kapillar-Gelsystem entsprechend ihrer Länge aufgetrennt und mit einem Laser angeregt. Abhängig von der Markierung des letzten Nukleotids in der Kette wird ein Licht spezifischer Wellenlänge emittiert und von einem Photoelement registriert. Der Computer setzt die erhaltenen Messdaten über eine geeignete Software zu einer Sequenz zusammen.

Die Sequenzierung wurde teilweise im Lehrstuhl für Zoologie I der Universität Würzburg durchgeführt oder der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) in Auftrag gegeben. Bei einer Lehrstuhl-internen Sequenzierung wurde folgendes Protokoll verwendet:

#### Pipettierschema für Sequenzierung (20 µl-Ansatz)

200-300 ng Plasmid-DNA

5 µl Premix (ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Tecton Kit)

1 µl Primer (100 pmol/µl)

auf 20 µl mit H<sub>2</sub>O bidest. auffüllen

Programm für Sequenzier-Reaktion

Initiale Denaturierung: 2 min, 94°C

25 Zyklen:

→Denaturierung: 30 sek, 94°C

→Primer-Annealing: 15 sek, T (spezifisch)

→Elongation: 4 min, 60°C

Kühlung: 4°C

Im Anschluss an die Reaktion wurde der Ansatz mit der Natriumacetat-Ethanol-Methode gefällt und das Pellet in 25 µl HiDi-Lösung der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) resuspendiert. Nach kurzem Vortexen wurde der Ansatz in spezielle Sequenzier-Gefäße überführt und konnte bei 4°C bis zur Sequenzierung gelagert werden. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit dem frei zugänglichen Online-Tool BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

**3.2.12 Restriktionsverdau**

Die Fähigkeit spezifischer Enzyme (Restriktionsendonukleasen), die DNA an bestimmten Erkennungssequenzen zu schneiden oder anderweitig zu verändern, wurde vielseitig genutzt. Ein Restriktionsverdau diente einerseits der Linearisierung von Plasmidvektoren, oder der Umklonierung von gewünschten DNA-Fragmenten, andererseits auch der Restriktionsfragmentanalyse von ausgewählten Bakterienklonen zum Test der Insertion spezifischer DNA-Fragmente.

Je nach Restriktionsenzym entstehen bei einem solchen Verdau Schnittstellen mit glatten („blunt“) oder kohäsiven („sticky“) Enden. Einer Verknüpfung solcher Schnittstellen kann nur dann erfolgen, wenn diese von gleicher Beschaffenheit (blunt-blunt oder sticky-sticky) und bei kohäsiven Enden zusätzlich komplementär zueinander sind. Kohäsive Schnittstellen passen folglich nur dann zusammen, wenn sie vom gleichen Enzym geschnitten wurden.

Die Verwendung der Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den Angaben in den Hersteller-Protokollen.

Standard-Restriktion (20 µl-Ansatz)

1-2 µg Plasmid-DNA

2 µl Restriktions-Puffer (10x)

1 µl Restriktionsenzym (10 Units/ µl)

auf 20 µl mit H<sub>2</sub>O bidest. auffüllen

Die Restriktion erfolgte bei den meisten Enzymen durch eine Inkubation bei 37°C für mindestens eine Stunde. Eine Vielzahl der Restriktionsendonukleasen musste durch eine zusätzliche Inkubation bei 65-80°C für 5-20 Minuten inaktiviert werden.

### 3.2.13 Klonierungen von DNA-Fragmenten mit dem TOPO TA CLONING® Kit

Das Arbeiten mit dem TOPO TA CLONING® Kit der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bietet die Möglichkeit der direkten Insertion eines beliebigen PCR-Produktes. Ausgehend vom Vektor pCR2.1® Topo kann eine Umklonierung in jedes andere Vektorsystem erfolgen.

Der pCR2.1® Topo-Vektor liegt in einem bereits linearisierten Zustand vor und besitzt 3'(T)-Überhänge, die kovalent an die Topoisomerase I gebunden sind. Wird ein PCR-Produkt in einer zusätzlichen Reaktion mit 3'(A)-Überhängen versehen, so kann dieses durch komplementäre Basenpaarung in den Vektor inseriert werden. Dabei fungiert die Topoisomerase I als Ligase und dissoziiert schließlich vom Vektor. Die TOPO TA CLONING® Reaktion wurde nach den Angaben im Hersteller Protokoll durchgeführt. Im Kit waren alle dafür notwendigen Komponenten enthalten.

Das zu klonierende PCR-Produkt wurde, wie unten beschrieben, mit 3'(A)-Überhängen versehen. Zum Reaktionsansatz wurden dNTPs gegeben, denn statistisch gesehen wurden präferenziell 3'(A)-Überhänge erzeugt.

#### Pipettierschema zum Anhängen von 3'(A)-Überhängen (50 µl-Ansatz)

40 µl gereinigtes PCR-Produkt  
 5 µl Taq DNA-Polymerase-Puffer (10x)  
 3 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
 1 µl dNTPs (10mM je Nukleotid, Fermentas)  
 0,5 µl Taq DNA-Polymerase  
 auf 50 µl mit H<sub>2</sub>O bidest. auffüllen

Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei 72°C im Thermocycler inkubiert und war danach einsatzbereit für die Topo-Klonierung. Die Lagerung konnte bei -20°C erfolgen.

### 3.2.14 Klonierung von DNA-Fragmenten

Zur Insertion von DNA-Fragmenten in einen beliebigen Vektor, wurde dieser zunächst an ausgewählten Schnittstellen der MCS durch einen Restriktionsverdau geöffnet. Das Insert wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen aus einem anderen

Vektor, beispielsweise dem pCR2.1® Topo, ausgeschnitten und mit dem Zielvektor ligiert. Waren keine passenden Schnittstellen vorhanden, so musste das Insert in mehreren Schritten auf die Integration vorbereitet werden. Zum einen bestand die Möglichkeit Primer mit den gewünschten Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme herzustellen. Die Insertgewinnung erfolgte dann über PCR mit anschließendem Restriktionsverdau des PCR-Produkts. In solch einem Fall musste darauf geachtet werden, dass am jeweiligen Primer ein zusätzlicher Überhang von mindestens vier Nukleotiden erzeugt wurde, denn nur so können die Restriktionsenzyme am DNA-Fragment angreifen. Eine weitere Möglichkeit war die direkte Klonierung des PCR-Produkts in einen „blunt“ geöffneten Vektor. Zusätzlich gab es auch die Möglichkeit der Modifikation von Schnittstellen, zum Beispiel durch das Enzym Klenow-Fragment (siehe 2.3.3). Dieses wurde dazu verwendet, die 5'-Überhänge der „sticky ends“ aufzufüllen und somit „blunt ends“ zu erzeugen.

### **3.2.15 Dephosphorylierung des Vektors**

Wurde ein Vektor in Vorbereitung auf eine DNA-Fragment-Insertion mit nur einem Restriktionsenzym geöffnet, so bestand bei einer anschließenden Ligation eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass das Plasmid ohne eine Insertion des DNA-Fragments autoligiert. Aufgrund dessen wurde bei einem einfachen Restriktionsverdau oder einer einfachen „blunt-end“-Ligation eine Dephosphorylierung des Vektors vorgenommen. Durch die Entfernung der Phosphatgruppen an den 5'-Enden kann der Vektor nicht mehr mit sich selbst ligieren, sondern nur mit den phosphorylierten (siehe 3.2.16) 5'-Enden des jeweiligen DNA-Fragments.

#### Dephosphorylierungs-Standardansatz (5µl)

100-150 ng DNA eines linearisierten Vektors

0,5 µl SAP-Reaktionspuffer (10x, Fermentas)

2 µl Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, 1 Unit/µl, Fermentas)

auf 5 µl mit H<sub>2</sub>O bidest. auffüllen

Der Ansatz wurde für 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend 20 Minuten bei 70°C hitzeinaktiviert. Die Proben konnten direkt zur Ligation (siehe 3.2.17) eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

### 3.2.16 Phosphorylierung des zu integrierenden DNA-Fragments

Die Phusion™ DNA-Polymerase, die zur Amplifikation der DNA-Fragmente in der PCR verwendet wurde, produziert glatte 5'-Enden ohne Phosphatgruppen. Wurde ein Vektor in Vorbereitung auf die Ligation dephosphoryliert (vgl. 3.2.15), so musste das zu inserierende PCR-Produkt phosphoryliert werden. Das DNA-Fragment wurde im Anschluss an die PCR zunächst aufgereinigt. Dies erfolgte entweder über die Gelelektrophorese (3.2.5) mit anschließender Gelextraktion (3.2.6) oder direkt über die das Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System der Firma Promega. Anschließend wurde der Reaktionsansatz nach den folgenden Angaben pipettiert:

#### Phosphorylierungs-Standardansatz (15 µl)

- 11,5 µl PCR-Produkt (Eluat nach Aufreinigung)
- 1,5 µl PNK-Reaktionspuffer A (10x, Fermentas)
- 1 µl ATP (10 mM, Fermentas)
- 1 µl T4 Polynukleotid Kinase (PNK, 10 Units/µl, Fermentas)

Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37°C mit anschließender Hitze-Inaktivierung für 20 Minuten bei 70°C. Um die PNK und Pufferbestandteile aus dem Ansatz zu entfernen, musste dieser erneut über die Säulenmembran des Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systems gereinigt werden. Das Eluat konnte dann für die Ligation eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

### 3.2.17 Ligation

Um ein DNA-Fragment kovalent mit einem entsprechend geöffneten Vektor zu verknüpfen, wurde die T4 DNA Ligase (Fermentas) verwendet. Diese ist in der Lage sowohl „blunt“ als auch „sticky ends“ miteinander zu verbinden (siehe 2.2.3). Für Standard-Ligationen wurde ein Molekülverhältnis von 3:1 (Insert:Vektor) eingesetzt. Dieses Verhältnis musste bei einigen Klonierungen variiert werden. Die Ligations-Ansätze wurden nach den folgenden Schemen pipettiert:

#### Ligations-Standardansatz (20 µl)

- 100-150 ng DNA eines linearisierten Vektors
- 3 fache Molekülmenge der Insert-DNA
- 2 µl T4 DNA Ligase-Reaktionspuffer (10x, Fermentas)
- 1 µl ATP (10 mM, Fermentas)
- 1 µl T4 DNA Ligase (5 Units/µl, Fermentas)
- auf 20 µl mit H<sub>2</sub>O bidest. auffüllen

Ligations-Ansatz nach der Dephosphorylierung (20 µl)

5 µl SAP-Ansatz (siehe 3.2.15, enthält 0,5 µl 10xPuffer)  
 11,5 µl PNK-Eluat (siehe 3.2.16) oder 3 fache Molekülmenge der Insert-DNA  
 1,5 µl T4 DNA Ligase-Reaktionspuffer (10x, Fermentas)  
 1 µl ATP (10 mM, Fermentas)  
 1 µl T4 DNA Ligase (5 Units/µl, Fermentas)  
 auf 20 µl mit H<sub>2</sub>O bidest. auffüllen

Der jeweilige Ligations-Ansatz wurde gut gemischt und für circa eine Stunde bei 11°C-Raumtemperatur inkubiert. Erfolgte eine „blunt end“-Ligation so wurden dem Ansatz nach der eigentlichen Inkubationszeit nochmals 1 µl T4 DNA Ligase zugegeben und die Inkubation wiederholt. Im Anschluss wurde direkt die Transformation in kompetente Bakterien durchgeführt (siehe 3.1.5).

**3.2.18 Test der erhaltenen Klone**

Die erhaltenen Klone wurden hinsichtlich der Integration des DNA-Fragments und teilweise auch im Bezug auf die Orientierung des Inserts innerhalb des Zielvektors getestet. Dies erfolgte entweder über eine Kolonie-PCR (siehe 3.2.4), über eine Restriktionsfragmentanalyse (siehe 3.2.14) oder über Sequenzierung (siehe 3.2.11). Über PCR gewonnene DNA-Fragmente wurden in jedem Fall sequenziert, um mögliche Fehler der Phusion<sup>TM</sup> DNA-Polymerase ausschließen zu können.

**3.3 Proteinbiochemische Methoden****3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE nach Laemmli (1970) ist ein gebräuchliches Verfahren für die Auftrennung, Reinheitskontrolle und Konzentrationsbestimmung von Proteinen. Das Laufverhalten im elektrischen Feld ist oftmals sehr unregelmäßig und abhängig von Größe, Form und Ladung des jeweiligen Proteinmoleküls. Bei der SDS-PAGE hingegen richtet sich das Laufverhalten ausschließlich nach dem Molekulargewicht des Proteins. Das dem Laufpuffer und Gel zugegebene SDS hat stark amphiphatische Eigenschaften. Es denaturiert oligomere Proteine und zerlegt sie in ihre Untereinheiten. Die SDS-Moleküle binden an die entfalteten Peptidketten und verleihen ihnen eine stark negative Gesamtladung. Die Eigenladung der Proteine wird somit vernachlässigt und die Peptidketten bewegen sich durch das

Maschenwerk des Polyacrylamidgels in Richtung der positiv geladenen Anode. Zur vollständigen Denaturierung werden die Disulfidbrücken durch den zusätzlichen Einsatz von Thiolen, wie  $\beta$ -Mercaptoethanol, bereits im Probenpuffer gespalten. Um eine Schärfung der Proteinbanden zu erreichen, wurde das Gel in Sammelgel und Trenngel unterteilt.

*Lösungen:*

Lösung A (Applichem):	29,22 % Acrylamid
	0,8 % Bis-Acrylamid
Lösung B (pH 8,7):	1M Tris/HCl (Roth)
Lösung C (pH 6,8):	1M Tris/HCl (Roth)
20% SDS	
TEMED (Applichem)	
10% APS (Applichem)	in H <sub>2</sub> O bidest. lösen
Laufpuffer (pH8,5):	25mM Tris/HCl (Roth)
	112 mM Glycin (Roth)
	0,1% SDS (Applichem)
	→ 10x Stammlösung herstellen
Probenpuffer (pH 6,8):	0,06 M Tris/HCl (Roth)
	5% SDS (Applichem)
	10% Glycerin (Applichem)
	10% $\beta$ -Mercaptoethanol
	1 Spatelspitze Bromphenolblau (Roth)

*Durchführung:*

Die Bestandteile des Trenngels wurden wie in Tabelle 3.2 aufgeführt kombiniert und zwischen zwei saubere Glasplatten mit Abstandhaltern (Spacer) gegossen. Der Boden der Glasplatten und die Seiten wurden zuvor mit Tesafilm einer 5%-AgaroseLösung abgedichtet. Bei der Herstellung der Gele musste darauf geachtet werden, dass die Bestandteile TEMED und das 10% APS als letztes pipettiert wurden, da sie die Polymerisation katalysieren. Die Polyacrylamid-Konzentration des Trenngels wurde in Abhängigkeit des Molekulargewichtes der zu untersuchenden Proteine gewählt. Größere Proteine (80-200 kDa) werden besser in Gelen mit 8-10% Polyacrylamid-Gehalt aufgetrennt, während bei kleineren Proteinen höhere Polyacrylamid-Konzentrationen (12-15%) besser geeignet sind. Nach abgeschlossener Polymerisierung des Trenngels wurde dieses mit dem Sammelgel

(Zusammensetzung, siehe Tabelle 3.3) überschichtet und der Beladungskamm in die noch flüssige Sammelgel-Lösung zwischen die Platten geschoben. Nachdem auch dieses polymerisiert war, wurde der Kamm wieder vorsichtig entfernt und das Gel mit den Glasplatten und Spacer in die Elektrophoresekammer gesetzt und vollständig mit Laufpuffer überschichtet.

Lösung	8%	9%	10%	12%	15%
Lösung A	4 ml	4,5 ml	5 ml	6 ml	7,5 ml
Lösung B	5,6 ml				
20% SDS	75 µl				
H <sub>2</sub> O bidest.	5,215 ml	4,815 ml	4,215 ml	3,215 ml	1,715 ml
TEMED	10 µl				
10% APS	100 µl				

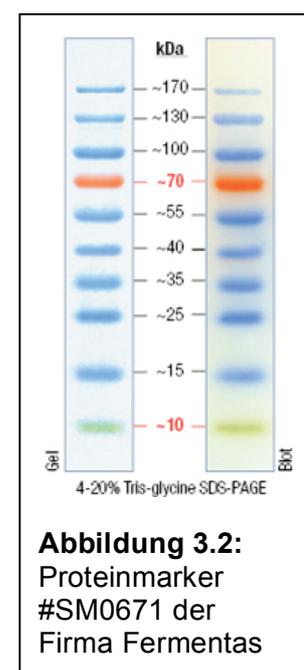
**Tabelle 3.2:** Zusammensetzung der Trenngel für SDS-PAGE

Lösung	5%
Lösung A	1,67 ml
Lösung C	1,25 ml
20% SDS	50 µl
ddH <sub>2</sub> O	6,925 ml
TEMED	10 µl
10% APS	150 µl

**Tabelle 3.3:** Zusammensetzung Sammelgel

Vor der Beladung des Gels wurden die Proben zur besseren Denaturierung nochmals 5-10 Minuten bei 95°C gekocht und durch vortexen vermischt. Das im Probenpuffer enthaltene Glycerin (10%) bewirkt ein Absinken der Proben in die vorgesehenen Taschen des Sammelgels. Als zusätzliche Spur wurde ein Proteingrößenmarker #SM0671 der Firma Fermentas (Abb. 3.2) aufgetragen. Dabei handelte es sich um einen so genannten „pre-stained“ Marker. Dieser war vorgefärbt, was eine ständige Beobachtung des Laufverhaltens im Gel ermöglichte.

Das Gel wurde zunächst konstant bei einer Spannung 60 V gefahren. Wenn die Lauffront das Trenngel erreicht hatte,



wurde die Spannung auf konstant 120-150 Volt erhöht. Nach Beendigung der Gelelektrophorese konnte das Gel in Coomassie Blau (siehe 3.3.2) gefärbt werden oder in einem Western Blot (siehe 3.3.3) weiter verarbeitet werden.

### 3.3.2 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Um Proteinbanden auf SDS-Polyacrylamidgelen sichtbar zu machen, wurden diese einer Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung unterzogen. Dabei handelt es sich um einen Triphenylmethanfarbstoff, der sich unspezifisch an die Seitenketten der Aminosäuren anheftet.

#### *Lösungen:*

Coomassie-Färbelösung:	0,25% (w/v) Brillant Blau (Roth) 40% (v/v) Methanol (Applichem) 8% (v/v) Essigsäure (Applichem) → mind. 30 Minuten rühren lassen → 3x filtrieren
Entfärber-Lösung:	25% (v/v) Methanol (Applichem) 10% (v/v) Essigsäure (Applichem)

#### *Durchführung:*

Die Polyacrylamidgele wurden mindestens 2 Stunden in der Coomassie-Färbelösung unter dauerhaftem Schwenken inkubiert. Danach wurde das Gel in die Entfärber-Lösung gegeben. Der Prozess der Entfärbung konnte durch Zugabe eines Papiertuches beschleunigt werden. Nach vollständiger Entfärbung waren auf dem Gel nur noch die jeweiligen Proteinbanden erkennbar.

Um die gefärbten Gele zu Dokumentationszwecken dauerhaft haltbar zu machen, wurden diese getrocknet. Hierzu wurde handelsübliche Einmachfolie verwendet. Diese wurde vollständig mit H<sub>2</sub>O bidest. benetzt. Das zu trocknende Gel wurde faltenfrei zwischen zwei feuchte Einmachfolien gegeben und in einen Rahmen gespannt. Der Trockenprozess erfolgte bei Raumtemperatur und dauerte circa 12-24 Stunden.

### 3.3.3 Western Blot in der Graphit-Blot-Kammer

Die Methode des Western Blot bietet die Möglichkeit Proteine aus einem Gel nach der SDS-PAGE (siehe 3.3.1) auf eine Nitrozellulosemembran zu transferieren. Auf diesen Membranen können einzelne Proteine aus Proteingemischen detektiert werden. Dabei bindet ein primärer, für das jeweilige Protein spezifischer Antikörper

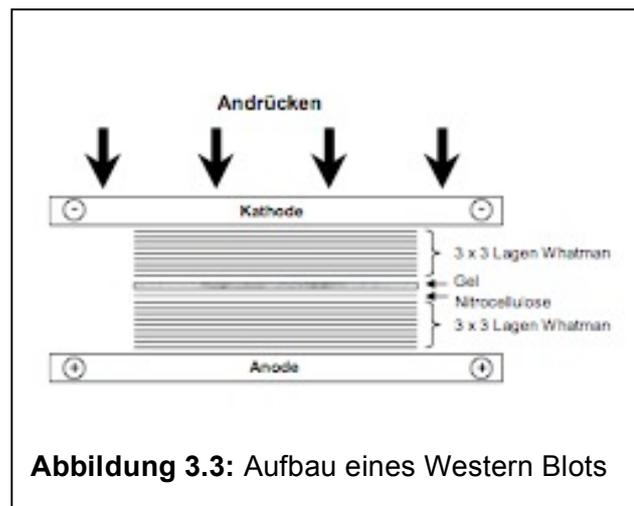
an sein entsprechendes Antigen auf der Membran und wird wiederum über einen sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper lokalisiert. Durch die Zugabe einer ECL-Lösung kann die Antikörper-Bindung schließlich sichtbar gemacht werden.

**Lösungen:**

CAPS-Puffer (pH 10):	50 mM CAPS (Sigma-Aldrich)
	10% (v/v) Methanol (Applichem)
TBST (pH 7,4):	150 mM NaCl (Applichem)
	10 mM Tris/HCl (Roth)
	0,1% (v/v) Tween®20 (Applichem)
10% (w/v) Milch in TBST (pH 7,4-7,6):	Magermilchpulver (Roth)
Ponceau S (Applichem)	
ECL™-Lösungen A und B (Amersham Bioscience)	
Whatman® Nitrocellulose (über Hartenstein)	
Whatman® Gel-Blotting-Papier (über Hartenstein)	

**Proteintransfer auf die Nitrocellulosemembran:**

Das Gel wurde nach Beendigung der SDS-PAGE vorsichtig aus der Elektrophorese-kammer entnommen. Die Glasplatten, das Sammelgel und Reste der Agarose wurden vorsichtig entfernt. In Vorbereitung auf den Western Blot, musste das Gel in CAPS-Puffer 5-10 Minuten equilibriert werden. Die Nitrocellulosemembran und die Whatman® Gel-Blotting-



**Abbildung 3.3:** Aufbau eines Western Blots

Papiere wurden auf die jeweilige Größe des Gels zugeschnitten und ebenfalls in CAPS-Puffer getränkt. Geblottet wurde in einer Graphit-Blot-Kammer. Der Aufbau des Western Blot ist in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt. Um Luftblasen- und Faltenbildung weitgehend zu reduzieren, wurden die saugfähigen Whatman® Papiere zu je drei Stück aufgelegt. Mit einem sauberen Glasröhrchen wurde anschließend sanft darüber gerollt. Die Whatman® Nitrocellulose wurde vorsichtig auf das Gel aufgelegt. Luftblasen wurden sorgfältig mit CAPS-Puffer-befeuchteten Fingern (mit Handschuhen) ausgestrichen. Nach dem Auflegen des Deckels der Graphit-Blot-Kammer wurde zunächst überschüssiger CAPS-Puffer vorsichtig

abgeschüttet und dann das Netzgerät angelegt. Die Proteine wurden bei einer konstanten Stromstärke von  $1 \text{ mA/cm}^2$  Nitrocellulose 45-60 Minuten vom Gel auf die Membran transferiert. Die Spannung stieg im Verlauf des Blots von circa 4V auf 20V, sollte aber nicht höher als 30 V liegen.

Nach Beendigung des Transfers wurde die Nitrocellulose zur Kontrolle der Proteinübertragung in Ponceau S für 3 Minuten gefärbt. Dieser Farbstoff lagert sich über Salzbrücken an die Proteine und färbt diese unspezifisch an. Die Entfärbung erfolgte in TBST. Eine zusätzliche Kontrolle des Transfers konnte über eine Coomassie-Färbung (siehe 3.3.2) des Gels erfolgen.

#### *Antikörper-Bindung:*

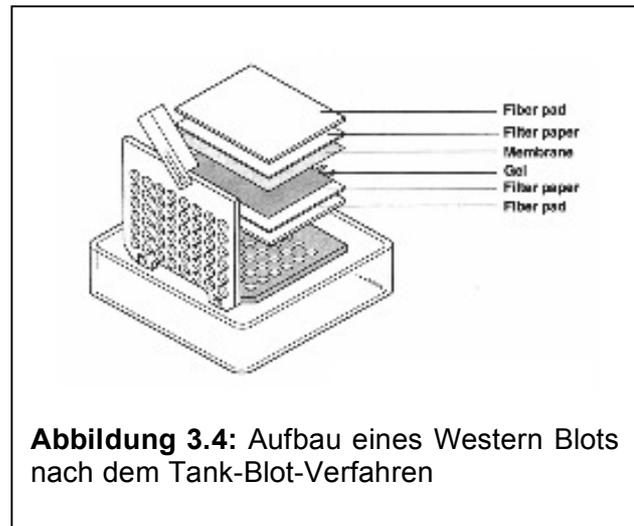
Nach dem Entfärbeprozess mit TBST wurde die Membran antikörperabhängig in 5-10% Milch/TBST über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  und zusätzlich 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper inkubiert. Dieser wurde in 5-10% Milch/TBST verdünnt (siehe Tabelle 2.1). Danach erfolgte ein dreimaliger 10-minütiger Waschschrift in TBST. Der gesamte Vorgang wurde mit dem sekundären Antikörper wiederholt. Hier betrug die Antikörper-Inkubation jedoch maximal eine Stunde.

#### *Antikörper-Detektion:*

Im Anschluss an den letzten Waschschrift erfolgte die Zugabe der Detektionslösungen. Dieser Schritt wurde in einer Dunkelkammer durchgeführt. Die ECL-Lösungen A und B wurden zunächst 1/1 gemischt, dann auf den Blot gegeben und für mindestens eine Minute inkubiert. Die Nitrocellulose wurde direkt im Anschluss in Klarsichtfolien eingeschlagen und erst dann konnte der Röntgenfilm aufgelegt werden. Die an die sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert durch die Spaltung von Peroxid eine Redoxreaktion zwischen den beiden Komponenten der ECL-Lösung, wodurch Licht frei gesetzt wird. Die frei werdenden Strahlen belichten den der Membran aufgelegten Röntgenfilm und werden nach dessen Entwicklungen (drei Minuten Entwicklerlösung, kurz Wasser, drei Minuten Fixierlösung, Wasser) als Banden sichtbar. Diese Banden entsprechen dann dem Protein auf der Membran, das von dem jeweiligen spezifischen Antikörper detektiert wurde. Die Belichtungszeit des Röntgenfilms konnte 1 Sekunde bis hin zu mehreren Stunden betragen. Er war abhängig von der Stärke der Proteinbande und somit von der Menge der gekoppelt vorliegenden Peroxidase.

### 3.3.4 Western Blot nach dem Tank-Blot-Verfahren

Größere Proteine ließen sich besser mit dem Tank-Blot-Verfahren auf die Nitrocellulose-Membran transferieren. Dabei wurden die gleichen Lösungen wie beim Western Blot in der Graphit-Blot-Kammer verwendet (siehe 3.3.3). Der Transfer wurde in der Mini TransBlot-Kammer der Firma BioRad durchgeführt. Zunächst wurden das Gel, die Nitrocellulose, die Whatman® Gel-Blotting-Papiere und die Filterpads



**Abbildung 3.4:** Aufbau eines Western Blots nach dem Tank-Blot-Verfahren

in CAPS-Puffer equilibriert. In Abbildung 3.4 ist der Aufbau eines solchen Blots schematisch dargestellt. Luftblasen wurden vorsichtig mithilfe eines sauberen Glasröhrchens ausgestrichen. Der Blot-Sandwich wurde geschlossen, in entsprechender Orientierung in die Mini TransBlot-Kammer eingelegt und mit CAPS-Puffer vollständig überschichtet. Der Transfer erfolgte für 30-60 Minuten bei konstant 50 V (circa 170 mA) und unter ständiger Kühlung auf Eis. Im Anschluss daran wurde der Blot abgebaut der Transfer mit Ponceau S-Färbung überprüft. Die weitere Behandlung der Nitrocellulosemembran verlief, wie in 3.3.3 bereits beschrieben.

### 3.3.5 Strippen eines Western Blots

Die Entfernung der gebundenen Antikörper von einer Nitrocellulose-Membran war notwendig, wenn auf der gleichen Membran auch ein anderes Protein nachgewiesen werden sollte. Der Entfernungs-Prozess wird auch als „Strippen“ bezeichnet. Eine Austrocknung des Blots sollte unbedingt verhindert werden. Daher wurde die Nitrozellulose nach der Detektion bis zur weiteren Verwendung in TBST aufbewahrt.

*Lösungen:*

TBST (siehe 3.3.3)

Strip-Puffer 1 (pH 2,5):

100 mM Glycin (Roth)

Strip-Puffer 2 (pH 6,7):

100 mM Tris/HCl (Roth)

20% (w/v) SDS (Applichem)

*Durchführung:*

Der Blot wurde großzügig mit Strip-Puffer 1 bedeckt und unter Schwenken für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Puffer vollständig abgeschüttet und zur Neutralisierung Strip-Puffer 2 zugegeben. Dieser wurde ebenfalls 30 Minuten schwenkend inkubiert und schließlich vollständig abgenommen. Die Nitrocellulose wurde dann mehrfach für 5-10 Minuten mit TBST gewaschen. Dann konnte der Blot erneut für mindesten 2 Stunden abgesättigt und mit neuen Antikörpern inkubiert werden (siehe 3.3.3).

**3.3.6 Expression von Fusionsproteinen mit His<sub>6</sub>-Epitop in Bakterien**

Um größere Mengen eines gewünschten Proteins zu erhalten, konnte dieses in Bakterien exprimiert und durch eine anschließende Bakterienlyse aus diesen aufgereinigt werden. Um die Proteine mit einem His<sub>6</sub>-Epitop zu markieren, wurden die codierenden Sequenzen in den Vektor pET21a inseriert. Dieser Vektor fügt bei der Expression ein C-terminales Epitop, bestehend aus 6 Histidin-Resten, an die jeweilige Proteinsequenz an.

*Lösungen:*

LB-Medium (siehe 3.1.1)

Antibiotika-Stammlösungen (vgl. 3.1.1)

1M IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactosid, Applichem)

Lysispuffer (Puffer A, pH 8,0): 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Applichem)

10 mM Tris/HCl (Roth)

8 M Harnstoff (Roth)

Probenpuffer (siehe 3.3.1)

*Durchführung:*

Zunächst wurde eine Flüssigkultur (siehe 3.1.1) des entsprechenden Bakterienklons hergestellt. Standardmäßig wurden 200 ml Flüssigkultur in einem sterilen Glaskolben mit Deckel mit 5-10 ml ÜNK angeimpft. Wurden größere Proteinmengen benötigt, so setzte man parallel mehrere solcher Kulturen an. Die Bakterien wurden bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert und bei einer OD<sub>600</sub> von 0,7-0,9 mit IPTG bei einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Der Vektor pET21a besitzt einen durch IPTG induzierbaren Promotor, womit eine gezielte Proteinexpression ermöglicht werden kann. In Anschluss an die Induktion wurde die Flüssigkeit für weitere 1-4 Stunden unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Vor der Induktion wurde jeweils eine Kontrolle der Flüssigkultur entnommen, die nicht induziert wurde aber parallel

inkubiert wurde. Diese wurde dann im Gel mit der induzierten Kultur verglichen und sollte den Erfolg der Induktion anzeigen. Nach der Entnahme der induzierten Kontrollen wurde die übrige Flüssigkultur auf 50 ml sterile Greiner-Röhrchen aufgeteilt und bei 3000g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Bakterienpellets in 10 ml Puffer A/200 ml Flüssigkultur aufgenommen und sorgfältig resuspendiert. Die Lösungen konnten dann direkt zur Aufreinigung verwendet werden (siehe 3.3.2) oder wurden bei -20°C gelagert.

Die Kontroll-Proben (1ml) wurden bei 14000 rpm für 10 Minuten in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden vollständig abgenommen und verworfen, während die Pellets in 80 µl Probenpuffer aufgenommen, für 5-10 Minuten bei 95°C gekocht und schließlich bei -20°C gelagert wurden. Jeweils 10 µl der Kontroll-Proben wurden in einer SDS-PAGE (siehe 3.3.1) aufgetrennt und anschließend durch eine Färbung des Gels in Coomassie (vgl. 3.3.2) oder im Western Blot (siehe 3.3.3) analysiert.

### 3.3.7 Aufreinigung eines Proteins mit His<sub>6</sub>-Epitop (denaturierend)

Die Aufreinigung der Proteine mit einem His<sub>6</sub>-Tag erfolgte über Ni-NTA-Agarose der Firma Qiagen (siehe 2.2.5). Die Proteine binden dabei über die 6-Histidin-Reste an die Nickelionen der Säulenmatrix, während Proteine ohne ein His<sub>6</sub>-Epitop nicht gebunden werden können. Die gebundenen Proteine können nach zahlreichen Waschschritten mit sauren Puffern wieder von der Säule eluiert werden.

#### *Lösungen:*

Lysispuffer (Puffer A, pH 8,0, vgl. 3.3.6)	
Waschpuffer (Puffer B, pH 6,3)	Zusammensetzung wie Puffer A
Elutionspuffer (Puffer C, pH 5,9)	Zusammensetzung wie Puffer A
Elutionspuffer (Puffer D, pH 4,5)	Zusammensetzung wie Puffer A
Neutralisierungspuffer (pH 9,5)	1 M Tris/HCl (Roth)
Ni-NTA-Agarose (Qiagen, siehe 2.2.5)	

#### *Durchführung:*

Die in Lysispuffer aufgenommenen und resuspendierten Bakterienpellets (siehe 3.3.6) wurden gegebenenfalls 30-60 Minuten auf dem Rollinkubator bei Raumtemperatur aufgetaut.

#### *Vorbereitung der Säule:*

In der Zwischenzeit konnte die Säule vorbereitet werden. Zunächst pipettierte man die sorgfältig resuspendierte Ni-NTA-Agarose auf die Membran einer unten

verschlossenen Säule und ließ die Agarose einige Minuten absetzen. Die Ni-NTA-Agarose lag in einem 1:1 Verhältnis in Ethanol vor. Für 200-400 ml Ausgangs-Flüssigkultur verwendete man 4 ml der Ni-NTA-Suspension, was einem Matrixvolumen von circa 2 ml entsprach. Nachdem sich die Matrix ausreichend abgesetzt hatte, öffnete man die Säule und ließ die überschüssige Flüssigkeit ablaufen. Dabei sollte die Matrix jedoch nicht trocken laufen. Durch die Zugabe von insgesamt 20 ml Lysispuffer wurde die Säulenmatrix gewaschen und equilibriert. Dabei war darauf zu achten, dass die Matrix durch die Zugabe des Puffers nicht zu stark aufgewirbelt wurde. Kurz bevor die Oberfläche der Flüssigkeitssäule die Ni-NTA-Matrix erreichte wurde die Säule wieder verschlossen und war nun einsatzbereit für die Proteinbeladung.

#### *Bakterienlyse:*

Durch den Prozess des Einfrierens und langsamen Auftauens, und durch den Lysispuffer an sich, sollte ein Großteil der Bakterien lysiert vorliegen. Um die Lyse zu vervollständigen wurde die Bakterienlösung zusätzlich 3-4-mal für circa 20 Sekunden auf Eis sonifiziert und anschließend für 15 Minuten bei 4°C und 10000g zentrifugiert. Durch diesen Schritt wurden Zelltrümmer, DNA und andere Bestandteile aus dem Lysat pelletiert werden.

#### *Reinigung:*

Der Überstand wurde vollständig auf die vorbereitete Säule gegeben und der Durchlauf aufbewahrt. Danach wurde die Säule zunächst mit mindestens 40 ml Lysispuffer und dann mit 15 ml Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte die Elution, zunächst mit 10 ml Puffer C und anschließend mit 10 ml Puffer D. Beide Fraktionen wurden in 1 ml-Aliquots gesammelt. Durch die Zugabe von 1/10 Volumen Neutralisierungspuffer zu den Aliquots wurde eine saure Lyse der Proteine verhindert.

Der Erfolg der Aufreinigung wurde durch eine Auftrennung der Proben aus Fraktion C und D im SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung oder im Western Blot kontrolliert. Hierzu wurden jeweils 7,5 µl eines 1ml-Aliquots auf das Gel aufgetragen. Die Elutionsfraktionen konnten bis zum weiteren Gebrauch im Kühlschrank (4°C) gelagert werden.

### **3.3.8 Affinitätsreinigung von Antiseren**

Antikörper die spezifisch für ein bestimmtes Protein bzw. für ein Epitop eines bestimmten Proteins sind, finden in der Forschung vielerlei Anwendungen. Sie

werden in immunologische Nachweismethoden, wie dem Western Blot (siehe 3.3.3), der Ko-Immünpräzipitationen (siehe 3.3.13) oder auch in der Mikroskopie (siehe 3.4) eingesetzt. Da jede B-Zelle des immunisierten Tieres Antikörper gegen ein spezifisches Antigen produziert, sind in einem Serum verschiedenste Antikörper aus verschiedenen B-Zellen mit unterschiedlichen Antigenen des gewünschten Proteins enthalten. Daher spricht man bei Antikörpern, die direkt aus einem Serum gewonnen werden, von „polyklonalen“ Antikörpern.

Ein Serum, das gegen ein spezifisches Peptid gerichtet ist kann durch eine Affinitätsreinigung hinsichtlich seiner Spezifität verbessert werden. Dies erfolgte über das HiTrap™-Säulensystem der Firma Amersham Bioscience.

#### Lösungen:

Bindungspuffer (pH 8,3):	20 mM NaHCO <sub>3</sub> (Applichem) 500 mM NaCl (Applichem)
Waschpuffer 1 (Lagerung bei 4°C):	1 mM HCl (Applichem)
Puffer A (pH 8,3):	500 mM Ethanolamin (C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO, Roth) 50 mM NaCl (Applichem) → lichtgeschützt aufbewahren
Puffer B (pH 4,0):	100 mM Essigsäure (Applichem) 500 mM NaCl (Applichem)
Waschpuffer 2	3,5 M MgCl <sub>2</sub> (Applichem)
PBS (pH 7,4):	140 mM NaCl (Applichem) 2,6 mM KCl (Applichem) 6,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Applichem) 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Applichem)
PBS + 350 mM NaCl (pH 7,4)	
Elutionspuffer (pH 2,5):	100 mM Glycin (Roth)
Neutralisierungspuffer (pH 9,5, siehe 3.3.7)	
Lagerungspuffer (pH 7,0):	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Applichem) 0,1% NaN <sub>3</sub> (Natriumazid)
→ alle Lösungen wurden frisch angesetzt und mussten sterilfiltriert werden!	
70% Ethanol (p.A.)	

#### Durchführung:

In Vorbereitung auf die Affinitätsreinigung mussten zunächst größere Mengen des Antigens aufgereinigt werden. Für eine erfolgreiche Reinigung eines Serums musste

die HiTrap<sup>TM</sup>-Säule mit circa 2-5 mg Antigen beladen werden. Die Bindung an die Matrix musste in Bindepuffer erfolgen. Teilweise handelte es sich bei den Antigenen um synthetisierte Peptide (Firma Seqlab). Diese wurden von der Firma im Anschluss an die Synthese lyophilisiert und mussten folglich nur in 1 ml Bindepuffer aufgenommen werden. Wurden jedoch Antigene verwendet, die in Bakterien exprimiert (3.3.6) und danach aufgereinigt wurden (3.3.7), so musste eine Dialyse (3.3.9) gegen den Bindepuffer durchgeführt werden. Da der Harnstoff vollständig aus dem System entfernt werden musste, wurde mehrfach und gegen große Volumina Bindepuffer (3-5-mal gegen 5l) dialysiert werden. Falls das Polypeptid schwer löslich war, oder ausfiel, konnte SDS in einer Endkonzentration von maximal 2% zugegeben werden.

#### *Vorbereitung der Säule:*

Eine Laborpumpe des Typs Varioperpex®I der Firma LKB Bromma wurde mit einem passenden Schlauch versehen. Dieser wurde einseitig mit einem Adapter des HiTrap<sup>TM</sup>-Säulensystems versehen und mit der anderen Seite in die entsprechenden Lösungen getaucht. Vor und nach der Benutzung der Pumpe wurde der Schlauch zu Reinigungszwecken mit 70% Ethanol und dann mit H<sub>2</sub>O bidest. gespült. Bei dem letzteren Reinigungsschritt wurde die Pumpe auf Fließgeschwindigkeiten von 1, 2 und 3 ml/min geeicht. Im Anschluss wurde der Schlauch luftblasenfrei mit Waschpuffer 1 vollständig gefüllt und die Pumpe kurzzeitig gestoppt. Die HiTrap<sup>TM</sup>-Säule wurde in einem Stativ befestigt. Der obere Verschluss der Säule konnte nun geöffnet und luftblasenfrei mit Waschpuffer 1 befüllt werden. Dann wurde die Säule über den Adapter an den Pumpenschlauch angeschlossen, der untere Säulenverschluss entfernt und die Pumpe konnte wieder angeschaltet werden. Dabei war immer darauf zu achten, dass keine Luft in das System geraten durfte. Mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min wurde nun eiskalter Waschpuffer 1 durch die HiTrap<sup>TM</sup>-Säule gepumpt. Anschließend schaltete man die Pumpe wieder ab, verschloss den unteren Säulenverschluss, koppelte den Adapter von der Säule ab und füllte den offenen oberen Bereich der Säule mit dem Puffer auf, um Austrocknung zu vermeiden. Dieser Schritt wurde bei jedem Pufferwechsel durchgeführt. Der Schlauch wurde dann leer gepumpt und konnte für die Antigen-Beladung der Säule vorbereitet werden.

*Beladung der HiTrap™-Säule mit dem jeweiligen Antigen:*

Lag das in Bindungspuffer gelöste Antigen in einem Volumen von 1 ml vor, so wurde über eine spezielle, an den Adapter angepasste Spritze auf die HiTrap™-Säule gegeben werden. Die Säule wurde daraufhin verschlossen und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. War das Volumen der Antigenlösung jedoch größer, so konnte die Beladung alternativ auch zirkulierend erfolgen. Dabei wurde der Schlauch mit der Lösung befüllt, und diese wiederholt eine Stunde lang mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min über die HiTrap™-Säule gepumpt.

Danach wurde die Säule bei gleich bleibender Fließgeschwindigkeit mit verschiedenen Puffern in folgender Kombination gewaschen:

6 ml Puffer A

6 ml Puffer B

6 ml Puffer A.

Dabei wurde beim ersten Schritt des Waschprozesses der erste Milliliter separat aufgefangen, um gegebenenfalls die Bindung des Antigens über SDS-PAGE überprüfen zu können. Beim letzten Schritt wurde die Säule verschlossen und für 1 Stunde mit Puffer A inkubiert. Dies diente der Absättigung der Säule.

Anschließend wurde die Säule nochmals bei 1 ml/min mit folgenden Puffern gewaschen: 6 ml Puffer B

6 ml Puffer A

6 ml Puffer B.

Nun war die Säule bereit für die Beladung mit dem Serum und wurde zunächst mit Lagerungspuffer beladen. So konnte sie bis zur weiteren Verwendung bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden.

*Affinitätsreinigung des Serums:*

Standardmäßig wurden 3 ml (Meerschweinchen) – 5 ml (Kaninchen) des Serums aufgereinigt. Dazu verdünnte man das jeweilige Serum 1:10 in PBS und zentrifugierte die Lösung für 10 Minuten bei 3000g, um alle Schwebstoffe zu pelletieren. Den Überstand konnte man dann über die HiTrap™-Säule aufreinigen.

Die Säule wurde zunächst mit 10 ml Waschpuffer 2 und anschließend mit 30 ml PBS gewaschen, um ungebundene und defekte Antikörper aus der Matrix zu entfernen. Im Anschluss daran ließ man den Überstand des verdünnten Serums 4-mal mit einer Fließgeschwindigkeit von 1-2 ml/min über die Säule laufen. Der Durchlauf wurde zu

Testzwecken aufbewahrt. Die Säule wurde dann mehrfach, in folgender Puffer-Kombination bei gleich bleibender Flussrate gewaschen:

30-50 ml PBS

30-50 ml PBS + 350 mM NaCl

10 ml PBS.

Dabei richteten sich die Volumina der Waschpuffer nach dem eingesetzten Volumen des jeweiligen Serums. Die Elution der Antikörper erfolgte dann bei einer Fließgeschwindigkeit von 3 ml/min mit 15 ml Elutionspuffer. Der Eluierungsvorgang musste schnell und unter ständiger Zugabe von Neutralisierungspuffer (1/10 Volumen) erfolgen, um eine saure Lyse der Antikörper zu verhindern. Die Säule wurde nochmals mit 20 ml PBS gewaschen und war dann im Lagerungspuffer langfristig haltbar (4°C) und wieder verwendbar.

#### *Weiterverarbeitung des Eluats:*

Direkt im Anschluss an die Affinitätsreinigung wurde das Eluat gegen 5 Liter gekühltes PBS dialysiert (siehe 3.3.9). Die Dialyse erfolgte über Nacht (12-18 Stunden) unter ständigem Rühren bei 4°C. Bei diesem Schritt gehen circa 50% der Antikörper verloren, dabei handelt es sich jedoch größtenteils um defekte Moleküle oder Molekülfragmente. Im Dialysat sollten somit hauptsächlich intakte Antikörper angereichert sein.

#### *Einengung der Antikörperlösung:*

Gering konzentrierte Antikörper sind relativ instabil. Daher musste die jeweilige Antikörperlösung im Anschluss an die Dialyse aufkonzentriert werden. Hierzu wurden die speziellen Filtersysteme Centricon YM50 verwendet. Dabei handelte es sich um Zentrifugenröhrchen, die durch eine Filtermembran in zwei Bereiche getrennt wurden. Die Membran besitzt dabei eine Porengröße von 50 kDa. Das Dialysat wurde in die obere Kammer gefüllt. Durch einen oder mehrere Zentrifugationsschritte bei 3000g und 4°C konnten alle Lösungsbestandteile unterhalb dieser Größe durch die Membran gelangen. Intakte Antikörpermoleküle besitzen eine Molekülmasse von circa 144 kDa und konnten die Membran folglich nicht passieren. Somit wurden sie im oberen Abschnitt des Zentrifugenröhrchens konzentriert, während nicht intakte Moleküle oder Bruchstücke in den Durchlauf gelangten.

Man zentrifugierte das Dialysat zunächst für sieben Minuten und kontrollierte danach die Antikörper-Konzentration durch eine photometrische Messung. Als Leerwert verwendete man dabei, das PBS nach der Dialyse. Eine OD<sub>280</sub> von 1,48 entspricht

einer Antikörperkonzentration von circa 1 mg/ml. In dieser Konzentration sind Antikörper stabil und können längerfristig gelagert werden. Wurde diese OD<sub>280</sub> nach der ersten Zentrifugation nicht erreicht, so zentrifugierte man in 1-Minuten Schritten weiter. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde das Konzentrat in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das minimal erreichbare Konzentrat-Volumen bei Verwendung von Centricon YM50 lag jedoch bei 250 µl. Oftmals wurde dabei nicht die Konzentration von 1 mg/ml erreicht und die Antikörper waren zu stark verdünnt. In solch einem Fall musste das Konzentrat mit BSA in einer Endkonzentration von 1 mg/ml stabilisiert werden.

*Test der affinitätsgereinigten Antikörper:*

Die gereinigten Antikörper wurden im Anschluss an die Aufkonzentrierung im Western Blot (3.3.3) und in der Immunfluoreszenz (3.4.1) getestet. Dabei ermittelte man empirisch die optimale Verdünnbarkeit des jeweiligen Antikörpers. Um eine optimale Lagerung zu gewährleisten und eine maximale Haltbarkeit zu erreichen, wurden kleinere Aliquots mit flüssigem Stickstoff schockgefrostet und entweder bei -70°C gelagert oder lyophilisiert und dann bei Raumtemperatur aufbewahrt. Diese Aliquots wurden dann mit den bei 4°C gelagerten Antikörpern verglichen. War keine Verschlechterung der Qualität und Verdünnbarkeit festzustellen, so wurden die Antikörper in Volumen von 5-10 µl aliquotiert und schockgefrostet. Die Lagerung erfolgte dann bei -70°C oder nach der Lyophilisation bei Raumtemperatur.

### **3.3.9 Dialyse**

Der Dialyseschlauch vom Typ 20/32 VISKING wurde für 30-60 Minuten in 2 mM EDTA (pH 8,0) aufgekocht. Daraufhin wurde eines der beiden Enden vorsichtig zusammengeknotet und durch eine handelsübliche Verschlussklammer zusätzlich abgedichtet. Die zu dialysierende Proteinlösung wurde dann über das zweite Ende in den Dialyseschlauch gefüllt. Auch dieses Ende wurde daraufhin verknotet und zusätzlich über eine Klammer verschlossen. Der befüllte Schlauch wurde in einen Kolben mit mehreren Litern des vorgekühlten Zielpuffers gehängt und für 3-16 Stunden unter sanften Rühren inkubiert. Ein besserer Erfolg des Pufferaustausches wurde erzielt, wenn die Puffer während der Dialyse mehrfach erneuert wurden (Nernst'sches Verteilungsgesetz).

### 3.3.10 Expression rekombinanter Proteine mit dem TNT® System (Promega)

Die zellfreie Expression rekombinanter Proteine mit dem TNT® *in vitro* Transkriptions-/Translationssystem wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden 500 ng der jeweiligen Plasmid-DNA und 1 mM Methionin (Kit-Bestandteil) zum TNT® T7 Quick Master Mix gegeben. Die Inkubation erfolgte für 60-90 Minuten bei 30°C. Die Expression des jeweiligen Konstrukts wurde anschließend im Western Blot (siehe 3.3.3) überprüft.

### 3.3.11 Interaktionsstudien mithilfe des TNT® Systems

*Lösungen:*

Bindungspuffer (pH 8,0):	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Applichem) 150 mM NaCl (Applichem)
Wasch-/ Interaktionspuffer (pH 8,0):	Bindungspuffer + 0,005% Tween® 20 (Applichem)
Ni-NTA-Magnetic-Agarose Beads (Qiagen, siehe 2.2.5)	
Probenpuffer (siehe 3.3.1)	
Magnetic Separator für 1,5-2 ml Reaktionsgefäße	

*Beladung der Ni-NTA-Magnetic-Agarose Beads:*

Für Interaktionsstudien wurden zunächst circa 1 µg eines gereinigten Proteins (siehe 3.3.7) in Bindungspuffer aufgenommen und mit 3,3 µl Ni-NTA-Magnetic-Agarose Beadsuspension für 1 Stunde auf dem Rollinkubator inkubiert. Die Beads wurden anschließend 2-3fach in Waschpuffer gewaschen. Dabei wurde das verwendete 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß auf die „Magnetic-Separator“ positioniert und für circa 1 Minute gewartet. Die magnetischen Kügelchen wurden durch den Magneten angezogen und der Überstand konnte abgenommen werden.

*Interaktionstests:*

Die mit einem Myc-Epitop markierten Proteine oder Deletionsmutanten (siehe 2.3.2.3) wurden zunächst mithilfe des TNT® Systems exprimiert (siehe 3.3.10). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration dieser Konstrukte im Gel wurden circa 1-4 µl des TNT-Ansatzes für einen Interaktionstest eingesetzt. Die jeweilige Menge wurde mit den beladenen Beads und Interaktionspuffer gemischt und anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Beads wurden dann 2-3-mal unter Verwendung des Magnetic-Separators gewaschen und schließlich in einem entsprechenden Volumen Probenpuffer aufgenommen. Zur Kontrolle wurde der

Interaktionstest auch mit unbeladenen Ni-NTA-Agarose Beads durchgeführt. Die Analyse der Bindungsstudie erfolgte über SDS-PAGE (3.3.1) und Western Blot (3.3.3).

### 3.3.12 Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen des Rattenhodens

#### Lösungen:

PBS (pH 7,4, siehe 3.3.8):	vorkühlen auf 4°C
Lysispuffer (pH 7,4; Cooke <i>et al.</i> , 2005):	50 mM Tris/HCl (Roth)
	150 mM NaCl (Applichem)
	0,5% (v/v) Triton X-100
	5 mM EDTA
Proteinase-Inhibitor-Mix:	5 mM $\alpha$ -Aminocapronsäure
	1 mM Benzamidin
	1 mM EDTA
	2 $\mu$ g/ml Aprotinin
	2 $\mu$ g/ml Antipain
	2 $\mu$ g/ml Chymostatin
	2 $\mu$ g/ml Leupeptin
	2 $\mu$ g/ml Pepstatin
	→ Lagerung bei -20°C

#### Herstellung der Zellsuspension:

Die männlichen Ratten (WISTAR, 39-42 Tage alt, Charles River Laboratories) wurden zunächst in einer speziellen Kammer mit CO<sub>2</sub> eingeschläfert. Zur Sicherheit wurde zusätzlich ein Genickbruch durchgeführt. Dann wurde den Tieren die untere Bauchdecke geöffnet und die Hoden konnten entnommen werden. Dabei war darauf zu achten, das anhaftende Gewebe möglichst restlos zu entfernen. Die isolierten Hoden wurden direkt in ein Gefäß mit eiskaltem PBS überführt.

Nachdem alle Hoden entfernt wurden, überführte man diese in eine Glaspetrischale mit gekühltem, frischem PBS und entfernte mit zwei Uhrmacherpinzetten vorsichtig die Tunica albuginea. Das verbleibende lockere Hodengewebe wurde dann durch regelmäßiges Aneinandergleiten zweier frischer Rasierklingen sorgfältig zerkleinert. Durch mehrfaches vorsichtiges Auf- und Abziehen mit einer Spritze ohne Aufsatz wurden die Zellen aus den vereinzelt Tubuli gespült. Die so entstandene homogene Suspension wurde erneut mit der Spritze aufgezogen und mit möglichst geringem Druck durch eine Kanüle mit einem Durchmesser von 0,9 mm gedrückt

und schließlich durch eine Nylonmembran mit einer Maschenweite von 30 µm filtriert. Das Filtrat wurde in einem 50 ml Greiner-Röhrchen aufgefangen und anschließend konnte die Zellzahl bestimmt werden.

*Bestimmung der Zellzahl:*

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauer Zählkammer. Dabei handelt es sich um einen Objektträger, auf dem in mikroskopischer Größe 16 Quadrate eingraviert sind. Man pipettierte 10 µl der Zellsuspension zwischen Deckgläschen und Mittelsteg der Zählkammer. Durch die Kapillarkräfte wurde dabei die Flüssigkeit in den Zwischenraum gesaugt. Die Zählkammer ist so konstruiert, dass dabei jedes der 16 Quadrate mit dem gleichen Flüssigkeitsvolumen bedeckt wird. Unter dem Mikroskop konnte dann die Zellzahl pro Quadrat bestimmt werden. Aus den Zellzahlen mehrerer Quadrate wurde dann ein Mittelwert gebildet und die Zellzahl konnte schließlich nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \varnothing \text{ Zellzahl/Quadrat} \times 16 \times 10^4 \text{ (Kammerfaktor)} \times 10 \text{ (Ausgangsvolumen)}$$

*Herstellung der Proteinextrakte:*

Die Zellen wurden in 1 ml Lysispuffer/5x10<sup>6</sup> Zellen aufgenommen und resuspendiert. Der Proteinase-Inhibitor-Mix wurde in einer Verdünnung von 1:100 hinzugegeben. Der Ansatz wurde zunächst für 10 Minuten auf Eis inkubiert und dann 30-45 Sekunden auf Eis sonifiziert. Danach zentrifugierte man 15 Minuten bei 15000g und 4°C um unlösliche Bestandteile zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein steriles 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und konnte nun für die Ko-Immunitätspräzipitation eingesetzt werden. Die Extrakte wurden direkt verwendet, um eine Degradation von Proteinen zu vermeiden.

### **3.3.13 Ko-Immunitätspräzipitation**

*Lösungen und Materialien:*

PBS (vgl. 3.3.8)

Lysispuffer (siehe 3.3.12)

Proteinase-Inhibitor-Mix (vgl. 3.3.12)

Probenpuffer (siehe 3.3.1)

Protein G Sepharose (GE Healthcare, siehe 2.2.5)

Dynabeads Protein G (Invitrogen, siehe 2.2.5)

Magnetic Separator für 1,5-2 ml Reaktionsgefäße

Magnetic Separator DynaMag™50-magnet (Invitrogen)

*Vor-Inkubation der Proteinextrakte mit den Antikörpern:*

Die Extrakte aus  $1 \times 10^8$  Zellen (20 ml, siehe 3.3.12) wurden zunächst mit 25  $\mu$ l Protein G Sepharose für 2 Stunden bei 4°C unter ständigem Rollen inkubiert. Mit diesem Schritt sollten alle unspezifischen Antikörper aus dem Extrakt abgefangen werden. Durch eine anschließende 10-minütige Zentrifugation bei 10000g und 4°C wurden die Sepharose-Kügelchen pelletiert und der Überstand konnte in ein steriles 50 ml Greiner-Röhrchen überführt werden. Dann erst erfolgte die Inkubation des Proteinextraktes mit den jeweiligen Antikörpern. Dabei wurden 10  $\mu$ g spezifischer Antikörper bzw. unspezifische IgG (Kontrolle) zugegeben und für 16-24 Stunden bei 4°C unter ständigem Rollen inkubiert.

*Beladung der Beads:*

Die Dynabeads wurden zunächst durch vortexen und mehrmaliges Resuspendieren gemischt. 50  $\mu$ l der Beadsuspension wurden anschließend in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Unter Verwendung des Magnetic Separators konnte der Überstand nach circa 1 Minute abgenommen werden und die Beads wurden 3-mal in Lysispuffer gewaschen. Im Anschluss an den letzten Waschschrift wurden die Dynabeads in 50  $\mu$ l Lysispuffer aufgenommen und konnten so für die Ko-Immunpräzipitation eingesetzt werden.

*Ko-Immunpräzipitation:*

Nach erfolgter Inkubation der Antikörper wurden die Extrakte mit jeweils 50  $\mu$ l gewaschen Dynabeads Protein G versetzt. Dieser Ansatz wurde erneut für 2 Stunden bei 4°C unter Rollen inkubiert. Dann wurde das Reaktionsgefäß für 10 Minuten im Magnetic-Separator positioniert. Der Überstand wurde abgenommen, die Dynabeads in frischem Lysispuffer resuspendiert und dann in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Aufgrund des großen Volumens der Extrakte wurde der Überstand noch 2-3-mal im Magnetic Separator platziert. Die Beads konnten somit größtenteils aus der Lösung isoliert werden und wurden vereinigt. Nach 2-3-maligen Waschen der Dynabeads in 1 ml Lysispuffer, wurden diese schließlich in 50  $\mu$ l Probenpuffer aufgenommen und sorgfältig 15 Minuten bei 95°C unter wiederholtem Vortexen aufgeköcht. Um die Beads aus der Probe zu entfernen und nur die Überstände aufzutragen, wurden die Ansätze vor der Analyse in der

SDS-PAGE nochmals am Magnetic Separator platziert. Die Analyse erfolgte anschließend durch einen Western Blot mit spezifischen Antikörpern.

### 3.3.14 Pull-Down

#### *Lösungen und Materialien:*

- PBS (vgl. 3.3.8)
- Bindungspuffer (3.3.11)
- Lysispuffer (siehe 3.3.12)
- Proteinase-Inhibitor-Mix (vgl. 3.3.12)
- Probenpuffer (siehe 3.3.1)
- Protein G Sepharose (GE Healthcare, siehe 2.2.5)
- Dynabeads Protein G (Invitrogen, siehe 2.2.5)
- Magnetic Separator für 1,5-2 ml Reaktionsgefäße
- Magnetic Separator DynaMag™50-magnet (Invitrogen)

#### *Vorbereitung der Dynabeads:*

Zunächst wurden 40 µl der sorgfältig resuspendierten Dynabead-Suspension in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und im Magnetic Separator platziert. Der Überstand konnte abgenommen und durch 400 µl Lysispuffer ersetzt werden. Dieser Waschschrift wurde 2-mal wiederholt. Danach wurden die Beads mit einer Lösung von 3 µg des jeweiligen gereinigten Proteins (siehe 3.3.7) in 400 µl Bindungspuffer oder ausschließlich mit Bindungspuffer (Kontrolle) versetzt. Es folgte eine Inkubation für 2 Stunden unter ständigem Rollen bei 23°C. Dann wurden die Beads 3-mal in Lysispuffer gewaschen (Magnetic-Separator) und konnten schließlich für das Pull-Down-Experiment eingesetzt werden.

#### *Bindungsstudie:*

Zu einem Proteinextrakt aus  $1 \times 10^8$  Zellen (20 ml, 3.3.12) wurden dann die gewaschenen Protein-beladenen oder unbeladenen (Kontrolle) Dynabeads gegeben. Der Ansatz wurde für 2 Stunden bei 23°C rollend inkubiert und anschließend im Magnetic-Separator (DynaMag™50-magnet) platziert. Die Dynabeads konnten in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Um den Großteil der Dynabeads aus dem Ansatz zu isolieren wurde dieser Waschschrift mehrfach wieder. Erst dann erfolgte der eigentliche Waschprozess. Das 1,5 ml Eppendorf-Gefäß wurde im Magnetic-Separator positioniert und die Beads wurden anschließend 2-3-mal mit frischem Lysispuffer gewaschen. Erst dann wurden sie in Probenpuffer aufgenommen und 15 Minuten bei 95°C gekocht. Nach mehrfachen vortexen wurden

die Beads am Magneten vom Überstand getrennt und dieser schließlich auf das Gel beladen. Die Analyse der Proben erfolgte über Western Blot.

### 3.4 Licht- und Elektronenmikroskopische Methoden

#### 3.4.1 Immunfluoreszenzmikroskopie von Kulturzellen

##### Lösungen:

PBS (vgl. 3.3.8)	
Fixierlösung (pH 7,4):	PBS + 2% PFA (Applichem)
Permeabilisierungs-Lösung (pH 7,4):	PBS + 0,1% Triton™ X-100
Absättigungs-Lösung (pH 7,4):	PBS + 100 mM Glycin
Antikörper-Lösung (pH 7,4):	Verdünnung (siehe Tab. 2.1) in PBS
Hoechst 33258 (1:333 in PBS):	SL 5 µg/ml (Roche)
Mowiol:	140 mM NaCl 6,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 6 mM KCl → pH 8,0 10 g Mowiol → 16h Rühren 20 mM Glycerin → 16h Rühren → zentrifugieren → ÜS aliquotieren (-20°C)

##### Durchführung:

Die auf Deckgläschen gewachsenen Kulturzellen mussten vor der Fixierung vom Kulturmedium in PBS überführt und für 5-10 Minuten gewaschen werden. Danach wurden die Zellen für 3 Minuten in der Fixierlösung gegeben. Die anschließende Permeabilisierung erfolgte für 10 Minuten in einer Lösung aus 0,1% Triton™ X-100 in PBS. Die Zellen wurden daraufhin in 100 mM Glycin in PBS für 30 Minuten abgesättigt, dies reduziert die Hintergrundfärbung in der Immunfluoreszenz. Die Deckgläschen wurden kurzzeitig in frisches PBS gegeben und dann in eine Feuchtkammer überführt. Dort soll eine Austrocknung der Zellen verhindert werden. Die Zellen wurden sofort mit der Primär-Antikörper-Lösung überschichtet und für 20 Minuten inkubiert. Danach wurde die Antikörper-Lösung durch Kippen des

Deckgläschen vorsichtig abgenommen und es folgte ein 10-minütiger Waschschrift in PBS. Die Objektträger wurden ein zweites Mal in die Feuchtkammer gelegt und sofort mit den Sekundär-Antikörpern bedeckt. Nach 10 Minuten wurden zusätzlich 1-2 Tropfen der Hoechst-Lösung zugegeben und nochmals 10 Minuten inkubiert. Erst dann wurde die Lösung aus Sekundär-Antikörper und Hoechst abgenommen. Die Zellen wurden für weitere 10 Minuten in PBS gewaschen und konnten dann eingedeckelt werden. Hierzu wurde das PBS weitgehend durch seitliches Anlegen eines fusselfreien, saugfähigen Tuches abgenommen. Dann wurde ein Tropfen Mowiol auf die Zellen gegeben und das Deckgläschen schließlich mit den Zellen nach unten luftblasenfrei auf einem Objektträger abgelegt. Unter Lichtausschluss und Kühlung waren die Präparate so einige Zeit verwendbar.

Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Axiophot stereo, Zeiss). Die Ergebnisse konnten direkt über eine auf das Mikroskop aufgebrachte Kamera (Digitalkamera AxioCam MRm, Zeiss) dokumentiert werden.

### 3.4.2 Epon-Einbettung der Präparate für Elektronenmikroskopie

Zur Untersuchung von Zellen und Geweben auf ultrastruktureller Ebene wurde die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) eingesetzt. Die Einbettung der Zellen bzw. Gewebe in Epon erfolgte durch eine Fixierung mit Glutaraldehyd. Durch die Inkubation mit Osmiumtetroxid ( $\text{OsO}_4$ ) und alkalischer Schwermetall-Salzlösung konnte am Präparat eine Erhöhung des Kontrastes erreicht werden.

#### Lösungen:

2,5% Glutaraldehyd-Lösung (pH 7,2):	2,5% Glutaraldehyd 50 mM KCl 2,5 mM MgCl 50 mM Cacodylat
Cacodylat-Puffer (pH 7,2):	50 mM Cacodylat
$\text{OsO}_4$ -Lösung:	2% $\text{OsO}_4$ in 0,05 Cacodylat-Puffer
Uranylacetat-Lösung:	0,5% Uranylacetat in $\text{H}_2\text{O}$ bidest.
Ethanolreihe (Ethanol p.A.):	50%, 70%, 90%, 96%, 100%
Propylenoxid	
Epon:	Dodecanylsuccinateanhydride Methylnodicanhydride Epon 812 (Glycidether 100) DMP-30 (2,4,6 Triphenol)

*Durchführung:*

Kleinere Gewebestücke aus Hodenmaterial oder die auf den Deckgläschen befindlichen Kulturzellen wurden jeweils 30 Minuten mit einer 2,5% Glutaraldehyd-Lösung fixiert und anschließend 4-mal für je 3 Minuten in Cacodylat-Puffer gewaschen. Dann erfolgte eine Inkubation mit der  $\text{OsO}_4$ -Lösung für 30-60 Minuten. Die Deckgläschen oder Gewebestückchen wurden schließlich über Nacht in 0,5% Uranylacetat in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. eingelegt und am Folgetag mehrfach mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. gewaschen (3x5 Minuten). In einer aufsteigenden Ethanolreihe wurde das Präparat anschließend dehydriert. Dabei erfolgte die jeweils 5-minütige Inkubation der Ethanolstufen zwischen 50% und 96% auf Eis. Die Dehydrierung in 100% Ethanol wurde 2-fach wiederholt und bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die Präparate 2-mal für 10 Minuten in Propylenoxid eingelegt und danach 2-4 Stunden in einem 1:1 Gemisch aus Propylenoxid und Epon inkubiert. Die Inkubation in Epon erfolgte schließlich über Nacht.

Zur Einbettung wurden die Deckgläschen aus dem Epon genommen und mit der Oberseite nach oben auf eine Alufolie gelegt. Eine Gelatine kapsel wurde möglichst luftblasenfrei mit frischem Epon gefüllt, zu Dokumentationszwecken markiert und mittig auf die Probe aufgesetzt (Deckgläschen). Die Gewebestücken wurden direkt in die Kapsel gegeben. Die Polymerisation erfolgte für 24 Stunden im Wärmeschrank bei  $60^\circ\text{C}$ . Anschließend wurden die gehärteten Kapseln von der Folie abgenommen, die Deckgläschen mit flüssigem Stickstoff abgesprengt bzw. die Gewebestückchen wurden freigelegt. Daraufhin konnten die Proben zur Anfertigung von Ultradünnschnitten angetrimmt werden.

**3.4.3 Herstellung von Ultradünnschnitten und Elektronenmikroskopie**

Es wurden Ultradünnschnitte von 50 nm Dicke an einem Ultramikrotom angefertigt. Diese wurden mit Reynold's Bleicitrat nachkontrastiert und konnten dann am Transmissionselektronenmikroskop EM 10 betrachtet werden. Die Dokumentation erfolgte über eine integrierte Kamera erfolgen. Die Negative wurden mit dem Flachbrett-Scanner Quatographic X-Finitiy Pro 42 bei 1200 dpi eingescannt und schließlich mit dem Computerprogramm Adobe Photoshop CS3 bearbeitet.

### 3.5 Zellkultur

Die ektopische Expression von Proteinen oder ausgewählter Deletionsmutanten in somatischen Kulturzellen wurde zur Untersuchung von Proteineigenschaften genutzt. Hierzu wurden COS-7 Zellen gewählt, adhärente Kulturzellen, die ursprünglich von Nierenzellen der afrikanischen Grünaffen (*Cercopithecus aethiops*) abstammen.

#### 3.5.1 Kultivierung von COS-7 Zellen

Die Kultivierung der COS-7 Zelllinie (ATTC CRL 1651) erfolgte in DMEM-Medium (Dulbeccos modified Eagle Medium) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt. Die für die Transfektion verwendeten Zellen wurden aus einer ständig aufrecht erhaltenen Kultur (Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie, Universität Würzburg) entnommen und auf vier Deckgläschen ausgesät. Diese befanden sich in mit Medium gefüllten Petrischälchen (Ø 35 mm, Sarstedt, Nürnbrecht). Die Zellen wuchsen auf der Oberfläche der Deckgläschen an und konnten am Folgetag mit der gewünschten Plasmid-DNA transfiziert werden.

#### 3.5.2 Transfektion der Kulturzellen

Die Einführung von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Ähnlich wie bei der Transformation von Bakterien muss die DNA dabei die Zellmembran passieren und in den Zellkern gelangen. Für die Transfektion wurde das Effectene<sup>TM</sup> Transfection Reagent der Firma Qiagen (siehe 2.2.5) nach Angaben des Herstellerprotokolls verwendet. Dabei handelt es sich um ein nicht-liposomales Lipid, das unter spontaner Micellen-Bildung die DNA in Lipidmoleküle einhüllt und so in die Zellen einschleusen kann. Für die Transfektionen wurden jeweils 300-400 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Danach konnten die transfizierten Zellen für die Immunfluoreszenz- oder Elektronenmikroskopie weiterverarbeitet werden.

### 3.6 Yeast-Two-Hybrid System

Das Yeast-Two-Hybrid System ist eine Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Durch die Klonierung spezifischer Köder- und Beute-Konstrukte konnten gezielt Interaktionen von bestimmten Proteinen oder Deletionsmutanten untersucht werden.

### 3.6.1 Kultivierung von *S. cerevisiae* des Stammes EGY 48

Die Kultivierung der Hefezellen des Stammes EGY48 erfolgte im Flüssigmedium oder auf entsprechenden Agar-Platten bei 30°C im Brutschrank. Die Hefen zeigten ein gutes Wachstum im so genannten Minimalmedium (YNB). Dieses enthielt Glucose als Kohlenstoffquelle, und verschiedene Salze, die Stickstoff, Phosphor und andere Spurenelemente lieferten. Ein deutlich stärkeres Wachstum zeigten die Hefen jedoch im Vollmedium (YPD). Dieses enthält neben den Grundbestandteilen zusätzlich Protein- und Hefezell-Extrakte, die Aminosäuren, Nukleotidvorstufen, Vitamine und andere Metabolite liefern.

Unter optimalen Bedingungen haben Hefen eine Generationszeit von ca. 90-120 Minuten. Während der exponentiellen Wachstumsphase (log-Phase) teilen sich die Zellen in Vollmedium im Idealfall alle 90 Minuten. Dabei unterteilt sich die log-Phase in 3 Stadien:

Frühe log-Phase ( Zelldichte:  $< 10^7$  Zellen/ml)

Mittlere log-Phase ( Zelldichte:  $1-5 \times 10^7$  Zellen/ml)

Späte log-Phase ( Zelldichte:  $5 \times 10^7 - 2 \times 10^8$  Zellen/ml)

Nach dem Erreichen einer Zelldichte von circa  $2 \times 10^8$  Zellen/ml, während der späten logarithmischen Phase, gehen die Zellen in die stationäre Phase ( $G_0$ ) über.

Die Zelldichte der Hefe-Flüssigkulturen wurde photometrisch unter Verwendung einer entsprechenden Leerkontrolle bestimmt (siehe 3.2.8). Dabei entsprach eine  $OD_{600}$  von 1,0 einer Zelldichte von circa  $3 \times 10^8$  Zellen/ml.

#### Lösungen:

Vollmedium (YPD):	20 g/l Glucose (Sigma) 10 g/l Hefe-Extrakt (Roth) in H <sub>2</sub> O bidest. lösen → steril filtrieren und 4°C-Lagerung
Minimalmedium (YND):	20 g/l Glucose oder 20 g/l Galactose/ 10 g/l Raffinose 1,7 g/l yeast nitrogen base amino acids (BD Microbiology Systems) 5 g/l Ammoniumsulfat 0,6 g/l Dropout Mix (Tabelle 3.4) in H <sub>2</sub> O bidest. lösen → steril filtrieren und 4°C-Lagerung → Selektionsmedium

*Durchführung:*

Der Hefestamm EGY48 besitzt eine Auxotrophie für die Enzyme URA3, TRP1, HIS3 und *LEU2*. Daher konnte eine Kultivierung des Grundstammes nur in Vollmedium erfolgen. Die Auxotrophie des Stammes konnte durch „Shuttle“-Plasmid codierte Gene aufgehoben werden. Die transformierten Hefen wurden in den entsprechenden Selektionsmedien kultiviert, da dem Minimalmedium die Aminosäuren Uracil, Tryptophan, Histidin und Leucin je nach Selektionsbedarf zugegeben werden konnten. In Tabelle 3.5 ist aufgeführt in welchen Konzentrationen die Selektions-Metabolite zugegeben wurden. Die Leucin-Auxotrophie des Stammes EGY48 konnte nur durch eine bestehende Interaktion der Köder- und Beute-Konstrukte aufgehoben werden. Erst dann war ein Wachstum im absoluten Minimalmedium möglich.

Zur Herstellung einer Hefe-Übernachtkultur wurden 10 ml Vollmedium oder das jeweilige Selektionsmedium in ein 50 ml Greiner-Röhrchen gefüllt. Anschließend wurde mit einer sterilen Pipettenspitze Hefematerial aus einer Glycerinkultur (siehe 3.6.2) oder direkt von der Agar-Platte entnommen. Die Flüssigkultur wurde über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert.

<b>Metabolite</b>	<b>Endkonzentration in µg/ml</b>
Adenin	40
L-Arginin	20
L-Asparaginsäure	100
L-Glutaminsäure	100
L-Isoleucin	20
L-Lysin_HCl	30
L-Methionin	20
L-Phenylalanin	50
L-Serin	375
L-Threonin	200
L-Tyrosin	30
L-Valin	150

**Tabelle 3.4:** Zusammensetzung des Dropout Mix

Metabolite	100x SL in H <sub>2</sub> O bidest	Endkonzentration in µg/ml
L-Histidin	0,2% (w/v)	20
L-Leucin	0,6% (w/v)	60
L-Tryptophan	0,4% (w/v)	40
Uracil	0,2% (w/v)	20

**Tabelle 3.5:** Zusammensetzung der Stammlösungen und Endkonzentration der Selektions-Metabolite

### 3.6.2 Glycerinkulturen von *S. cerevisiae*

*Lösungen:*

30% Glycerin (v/v): → autoklavieren

*Durchführung:*

Zur Herstellung einer Hefe-Glycerinkultur wurden 750 µl der entsprechenden Flüssigkultur in der späten logarithmischen oder frühen stationären Phase in einem Verhältnis von 1:1 mit 30% Glycerin vermischt und bei -70°C eingefroren. Unter diesen Umständen waren die Kulturen für mehrere Jahre haltbar.

### 3.6.3 Plattenkulturen von *S. cerevisiae*

*Lösungen:*

Selektionsplatten (YNB): (1) 800 ml H<sub>2</sub>O bidest.  
20 g Agar  
1 NaOH Plätzchen  
→ autoklavieren und auf 65°C kühlen

(2) 200 ml jeweiliges Selektionsmedium  
→ sterilfiltrieren  
→ (2) in (1) sterilfiltrieren  
→ Platten gießen

X-Gal-Selektionsplatten: (1) Agar siehe oben  
(2) 100 ml H<sub>2</sub>O bidest.  
7 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Applichem)  
3 g NaHPO<sub>4</sub> (Applichem)  
→ autoklavieren und auf 65°C kühlen

(3) 100 ml jeweiliges Selektionsmedium

(4) 0,8 ml X-Gal (SL 100 mg/ml in DMF)  
→ Komponenten (2)-(4) in (1) sterilfiltrieren → Platten gießen

*Durchführung:*

Die Nährstoffzusammensetzung in den Agar-Platten ist die gleiche, wie in den Flüssigkulturen. Die Zugabe von Natriumhydroxid verhinderte den Zusammenbruch des Agars während des Autoklavierens. Um eine Karamellisierung von Glucose bzw. Galactose zu verhindern, konnte das Selektionsmedium erst nach dem Autoklavieren zum Agar gegeben werden. Die Hefen wurden entweder mit einem sterilen Spatel auf den Selektionsplatten verteilt oder tropfenförmig auf die jeweiligen Platten aufgetragen. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 30°C.

Bei der Herstellung der X-Gal-Selektionsplatten war darauf zu achten, dass die X-Gal-Lösung zusammen mit der Natriumhydrogenphosphat-Lösung in den Agar gegeben wurde. Ohne die Salzkomponente konnte keine Blaufärbung der Hefekolonien erfolgen.

**3.6.4 Transformation von *S. cerevisiae* (nach Gietz & Woods, 1994)**

Kompetente Hefezellen des Stammes EGY48 konnten sowohl linearisierte, als auch zirkuläre DNA aufnehmen. Die verwendeten „Shuttle“-Vektoren (siehe 2.2.2) enthielten spezifische Selektionsmarker, die eine Erkennung positiv transformierter Zellen ermöglichte. Die Transformation wurde ausschließlich mithilfe der Lithiumacetat-Methode nach dem Protokoll von Gietz und Woods (1994) durchgeführt. Diese basiert auf der Tatsache, dass Alkali-Kationen die Hefezellen für eine Aufnahme von DNA kompetent machen. Dabei wurde eine Effizienz von  $10^5$ - $10^6$  transformierten Zellen pro  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA erzielt.

Die Transformation der einzelnen Plasmide (Reporter-, Köder- und Beute-Plasmid) musste nacheinander erfolgen. Um die DNA in die Zellen befördern zu können war außerdem eine so genannte „Carrier“-DNA notwendig. Dabei handelte es sich um ungescherte einzelsträngige DNA (ssDNA), die aus Heringsspermien gewonnen wurde (Clontech, Mountain View, USA). Der Überschuss an Einzelstrang-DNA konnte die zu transformierende „Shuttle“-Plasmid-DNA umhüllen und erleichterte so deren Transport in die Zellen. Die Aufnahmefähigkeit der Hefezellen wurde durch einen Hitzeschock bei 42°C und Polyethylenglycol (PEG) zusätzlich erhöht.

*Lösungen:*

- 50% (v/v) PEG in H<sub>2</sub>O bidest. → sterilfiltrieren
- 1 M Lithiumacetat → sterilfiltrieren
- 100 mM Lithiumacetat
- ssDNA Hering Testes DNA, denatured → 2 mg /ml (Clontech)

*Durchführung:*

Zunächst wurden 10 ml einer Hefe-ÜNK (3.6.1) für 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet in 1 ml der 100 mM Lithiumacetat-Lösung resuspendiert. Dieser Ansatz wurde 5 Minuten unter Schütteln bei 30°C inkubiert und konnte dann für die Transformation eingesetzt werden. Dabei wurden jeweils 100 µl dieses Ansatzes in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und erneut 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Nach möglichst vollständiger Abnahme des Überstandes wurde das Pellet nach folgendem Schema überschichtet:

- 240 µl 50% PEG
- 36 µl 1 M Lithiumacetat
- 25 ssDNA (2 mg/ml)
- 5 µl (100 ng-5 µg) „Shuttle“-Plasmid-DNA
- 45 µl H<sub>2</sub>O bidest.

Der Ansatz musste durch sorgfältiges Vortexen für circa 1 Minute gut durchmischt werden. Es folgte ein Hitzeschock für 30 Minuten bei 42°C im Heizblock. Nach diesem Schritt wurde der Ansatz erneut zentrifugiert (5 min, 3000 rpm). Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 200 µl H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen und mit einem sterilen Spatel auf vorgewärmten Selektionsplatten verteilt. Die Inkubation der Platten erfolgte für 48 Stunden bei 30°C.

**3.6.5 Charakterisierung des Köderproteins**

Einige Köderproteine eignen sich nicht für Interaktionsstudien im Yeast-Two-Hybrid System. Dies ist der Fall, wenn sie entweder Transkriptions-autoaktivierende Fähigkeiten besitzen, also ohne eine Fusion mit dem Beuteprotein die Expression des *lacZ*-Gens anschalten können. Andere Köderproteine können nicht in Hefen exprimiert werden, oder nicht in den Zellkern der Hefen gelangen. Daher musste vor einem Interaktionstest die Eignung der Köderproteine überprüft werden.

*Lösungen und Materialien:*

Selektionsmedium (Glucose):	YNB (Glu) Ura <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> YNB (Glu) Ura <sup>-</sup> , His <sup>-</sup>
Selektionsmedium (Gal/Raff.):	YNB (Gal/Raff) Ura <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> YNB (Gal/Raff) Ura <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> , Leu <sup>-</sup>
Selektionsplatten (Glucose/X-Gal):	YNB (Glu/X-Gal) Ura <sup>-</sup> YNB (Glu/X-Gal) Ura <sup>-</sup> , His <sup>-</sup>

Selektionsplatten (Gal/Raff/X-Gal):	YNB (Gal/Raff/X-Gal) Ura <sup>-</sup>
	YNB (Gal/Raff/X-Gal) Ura <sup>-</sup> , His <sup>-</sup>
Kontroll-Hefestämme:	K <sup>+</sup> EGY48+pSH18-34+pSH17-4
	K <sup>+</sup> EGY48+pJK101+pRFHM1
	K <sup>-</sup> EGY48+pSH18-34+pRFHM1
	K <sup>-</sup> EGY48+pJK101

*Test auf Transkriptions-Autoaktivierung (LacZ-Test):*

Von allen zu testenden Hefestämmen, inklusive der Kontrollstämmen, wurden zunächst ÜNK hergestellt. Am Folgetag wurde photometrisch deren Zelldichte bestimmt und bei allen Kulturen eine OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 eingestellt. 7 µl der jeweiligen Kultur wurden dann tropfenförmig auf die Selektionsplatten aufgetragen. Anschließend wurde die Entwicklung der Blaufärbung über einen Zeitraum von 4-5 Tagen bei einer Inkubation bei 30°C beobachtet und protokolliert.

Der hauptsächliche Test erfolgte auf YNB (Gal/Raff/X-Gal) Ura<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>-Selektionsplatten. Der Kontrollstamm (K<sup>-</sup>) EGY48+pSH18-34+pRFHM1 sollte dabei keine Blaufärbung zeigen. Das Plasmid pSH17-4 codiert für einen autoreaktiven Köder, daher sollten die Kolonien des Stammes EGY48+pSH18-34+pSH17-4 als Positiv-Kontrolle dienen und eine deutliche Blaufärbung zeigen. Die mit dem Köderprotein transformierten Hefekolonien sollten sich Idealfall wie die Negativ-Kontrolle verhalten und nicht blau werden. Andernfalls wäre das betreffende Köderprotein für Interaktionsstudien im Yeast-Two-Hybrid System nicht geeignet.

*Test der Leucin-Abhängigkeit des Köderproteins:*

Dieser Test war der wichtigste Schritt, um zu überprüfen, ob ein Köderprotein einen zu hohen Hintergrund erzeugte und die Fähigkeit besaß die Transkription des *lexA-Operator-LEU2*-Gens alleine zu aktivieren. Der *LEU2*-Reporter ist sensitiver als der pSH18-34-Reporter. Daher konnte in diesem Test ein autoaktivierendes Köderprotein identifiziert werden, auch wenn dieses im vorher beschriebenen LacZ-Test als geeignet eingestuft werden konnte. Als Positivkontrolle wurde in diesem Test der Hefestamm EGY48+pSH18-34+pSH17-4 eingesetzt. Dieser zeigt Transkriptionsaktivität und kann folglich auf den Selektionsplatten (YNB (Gal/Raff) Ura<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>) wachsen.

10 µl der jeweiligen Übernachtskultur wurden in 500 µl H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen und gemischt. Von dieser Lösung wurden wiederum 100 µl entnommen und mit 1 ml H<sub>2</sub>O bidest. vermischt. Ausgehend von diesem Ansatz wurden dann vier verschiedene

Verdünnungen in H<sub>2</sub>O bidest. angefertigt (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000). Diese wurden in 7 µl-Aliquots auf die Selektionsplatten (YNB (Gal/Raff) Ura<sup>-</sup>, His<sup>-</sup> und YNB (Gal/Raff) Ura<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>) aufgetropft und 5 Tage bei 30°C inkubiert.

Zeigte das betreffende Köderprotein YNB (Gal/Raff) Ura<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>-Selektionsplatten ein vergleichbares Wachstum wie die Positivkontrolle, so handelte es sich um einen autoreaktiven Köder. War keine Wachstum erkennbar, konnte der Köder für die Interaktionsstudien verwendet werden.

#### *Repressions-Assay:*

Dieser Test sollte zeigen, ob das Köderprotein in den Zellkern der Hefezellen gelangen konnte. Hefezellen, die das Reporter-Plasmid pJK101 tragen, zeigten eine β-Galactosidaseaktivität in Selektionsmedien mit Galactose als Kohlenstoff-Quelle. Da die Glucose die endogene GAL4-Transkription reprimieren sollte, sollten die betreffenden Kolonien in Medien mit Glucose als deutlicher langsamer blau werden.

LexA-Fusionsproteine, die in der Lage sind in den Zellkern zu gelangen, binden dort an die LexA-Operatoren zwischen der UAS<sub>GAL</sub>-Sequenz und dem *LacZ*-Gen und verhindern dessen Aktivierung. Die Galactosidaseaktivität sollte folglich um den Faktor 3-20 reprimiert werden.

Zur Durchführung des Repressions-Assay mussten die Köder-Plasmide zunächst in zusammen mit dem Reporter-Plasmid pJK101 in die Hefen transformiert werden. Der anschließende Expressionstest erfolgte auf folgenden Selektionsplatten: YNB (Glu/X-Gal) Ura<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>, YNB (Gal/Raff/X-Gal) Ura<sup>-</sup> und YNB (Gal/Raff/X-Gal) Ura<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>. Dabei wurden 3-6 Tropfen (7 µl) des jeweiligen Hefestammes, sowie der Kontrollstämme (K<sup>+</sup> EGY48+pJK101+pRFHM1 und K<sup>-</sup> EGY48+pJK101) auf die Selektionsplatten gegeben. Die Blaufärbung und das Wachstum der Klone wurden über einen Zeitraum von 1-5 Tagen bei einer Inkubation bei 30°C protokolliert.

### **3.6.6 Nachweis der Interaktion zwischen Köder und Beute im 5-Platten-Test**

Der Nachweis einer Interaktion zwischen den Köder- und Beuteproteinen kann über zwei verschiedene Wege erfolgen. Durch die Interaktion der beiden Proteine gelangen die LexA-bindende Domäne der Köderfusionsproteins und die transkriptionsaktivierende B42-Domäne des Beutefusionsproteins in räumliche Nähe und können sich zu einem aktiven Transkriptionsfaktor vereinigen. Dieser induziert zum einen die Expression des chromosomalen *LEU2*-Gens der Hefe und hebt damit die Leucin-Auxotrophie des Hefestammes auf. Zum anderen wird die Expression des *LacZ*-Gens im Reporter-Plasmid pSH18-34 induziert, was eine Blaufärbung der

betreffenden Hefekolonie hervorruft. Sowohl das *LacZ*-Gen als auch das Gen des Beutefusionsproteins stehen unter der Kontrolle eines GAL-Promotors. Folglich sollten Wachstum und Blaufärbung in Glucose-Medien reprimiert werden.

*Lösungen und Materialien:*

Selektionsmedium (Glu)	YNB (Glu) Ura <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> , Trp <sup>-</sup>
Selektionsmedium (Gal/Raff):	YNB (Gal/Raff) Ura <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> , Trp <sup>-</sup> Leu <sup>-</sup>
Selektionsplatten (Glu):	YNB (Glu) Ura <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> , Trp <sup>-</sup> YNB (Glu) Ura <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> , Trp <sup>-</sup> Leu <sup>-</sup>
Selektionsplatten (Gal/Raff):	YNB (Gal/Raff) Ura <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> , Trp <sup>-</sup> Leu <sup>-</sup>
Selektionsplatten (Glu/X-Gal):	YNB (Glu/X-Gal) Ura <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> , Trp <sup>-</sup>
Selektionsplatten (Gal/Raff/X-Gal):	YNB (Gal/Raff/X-Gal) Ura <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> , Trp <sup>-</sup>

*Durchführung:*

Die Hefestämme mussten zuvor in einem mehrstufigen Prozess mit Reporter-Plasmid (pSH18-34), Köder-Plasmid (pEG202) und dem Beute-Plasmid (pJG4-5) transformiert werden (3.6.4). Von ausgewählten Klonen wurden 10 ml Übernachtskulturen angefertigt (siehe 3.6.1) und am darauf folgenden Tag für 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und das Pellet wurde anschließend in 10 ml Galactose-Mangelmedium (YNB (Gal/Raff) Ura<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup>) aufgenommen. Durch diesen Schritt sollte die Expression des Beutefusionsproteins induziert werden. Diese Flüssigkultur wurde erneut für 4 Stunden bei 30°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Zelldichte der Kulturen am Photometer bestimmt (siehe 3.1.4).

Um alle Proben mit einer vergleichbaren Zelldichte auf die Platten aufzutragen, wurden die Flüssigkulturen entsprechend verdünnt und aneinander angeglichen (OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6). Das Auftragen auf die 5 verschiedenen Selektionsplatten erfolgte dann in Form einer Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:5, 1:25, 1:125) in 7 µl-Aliquots. Das Wachstum der Kolonien bei 30°C wurde über 5 Tage beobachtet und protokolliert.

## 4. Ergebnisse

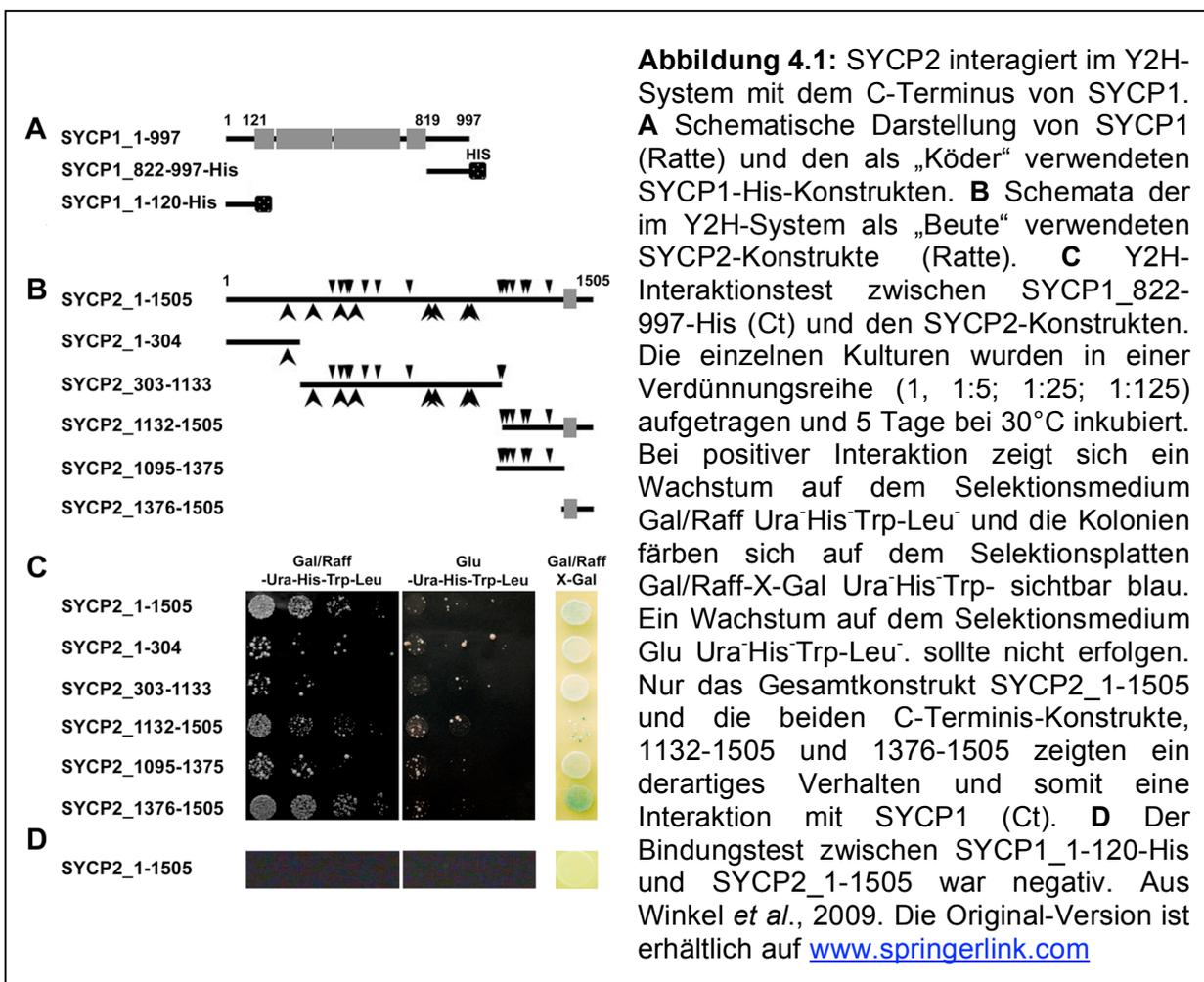
### 4.1 Bindungsstudien mit SYCP1 und SYCP2

In den bisherigen Studien am Synaptonemalkomplex der Ratte konnten Erkenntnisse über die Lokalisation und Orientierung der drei Hauptproteinkomponenten innerhalb der SC-Struktur gewonnen werden. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die beiden Lateralelementproteine SYCP2 und SYCP3 miteinander interagieren können (Tarsounas *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2006). Die Orientierung der SYCP1-Homodimere innerhalb der SC-Struktur wurde bereits mehrfach beschrieben. Dabei ist bekannt, dass die C-Termini den Lateralelementen zugewandt sind, während die N-Termini der sich gegenüberliegenden Dimere ins Zentrale Element ragen und dort in einer Kopf-an-Kopf-Anordnung reißverschlussartig miteinander in Verbindung treten (Liu *et al.*, 1996; Schmekel *et al.*, 1996; Öllinger *et al.* 2005). Dennoch blieb bisher völlig ungeklärt, wie die Transversalfilamente in den Lateralelementen verankert sind und welche Interaktionen dafür notwendig sind. Wie in zahlreichen Studien gezeigt werden konnte, scheint keine direkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen SYCP1 und SYCP3 zu bestehen (Liu *et al.*, 1996; Tarsounas *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 1998; Pelttari *et al.*, 2001). Immungoldfärbungen im Elektronenmikroskop haben gezeigt, dass die SYCP2-Moleküle innerhalb der Lateralelemente eine Tendenz zu jener Seite besitzen, die der Zentralen Region zugewandt ist (Schalk *et al.*, 1998). Aufgrund dieser Erkenntnisse sollte untersucht werden, ob eine Interaktion zwischen SYCP2 und SYCP1 besteht. Diese könnte unter Umständen die Wechselwirkungen zwischen den Lateralelementen und Transversalfilamenten vermitteln.

#### 4.1.1 SYCP1 interagiert mit SYCP2 im Yeast-Two-Hybrid-System

Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse über die Orientierung der SYCP1-Moleküle innerhalb der SC-Struktur (Liu *et al.*, 1996; Schmekel *et al.*, 1996; Öllinger *et al.* 2005) wurden bestimmte Deletionsmutanten vom SYCP1 der Ratte hergestellt. Diese sollten als Köderproteine im Yeast-Two-Hybrid-System dienen und umfassten jeweils nur den N- (AS 1-120) bzw. den C-Terminus (AS 822-997) des Proteins (Siehe Abb. 4.1A). In Vorbereitung auf diese Arbeit wurden außerdem zahlreiche „Beute“-Konstrukte hergestellt (Diplomarbeit Winkel, 2006; siehe auch 2.3.2.2). Diese umfassten entweder die gesamte SYCP2-Proteinsequenz, oder den N-terminalen

(AS 1-304), den mittleren (AS 303-1133) oder den C-terminalen Bereich (AS 1132-1505; AS 1095-1375; AS 1376-1505) des Proteins (siehe Abb. 4.1B). Die Köder- und Beuteproteine wurden in verschiedenen Kombinationen im Hefestamm *S. cerevisiae* EGY48 auf ihre Interaktionsfähigkeit getestet. Die in Abbildung 4.1C dargestellten Ergebnisse der Interaktionstests zeigen eine Bindung zwischen dem C-Terminus von SYCP1 und dem Gesamtprotein SYCP2 (AS 1-1505; siehe Abb. 4.1C, Reihe 1). Eine weitere deutlich positive Interaktion konnte zwischen dem C-Terminus von SYCP1 und den letzten 130 Aminosäuren des C-Terminus von SYCP2 (AS 1376-1505; Abb. 4.1 C, Reihe 6) detektiert werden. Trotz deutlicher Wachstumschwierigkeiten der Hefekolonien, konnte auch die Bindung zwischen dem C-Terminus von SYCP1 und dem C-Terminus von SYCP2 (AS 1132-1505; Abb. 4.1C, Reihe 4) als positiv gedeutet werden, da auch eine Blaufärbung der Kolonien erfolgte. Bei den drei anderen SYCP2 Mutanten konnte keine Interaktion mit dem C-Terminus von SYCP1 festgestellt werden (Abb. 4.1C; Reihe 2, 3, 5). Im Interaktionstest zwischen dem N-Terminus von SYCP1 (AS 1-120) und dem Gesamtprotein von SYCP2 (AS1-1505; Abb. 4.1D) gab es ebenfalls keine Anzeichen

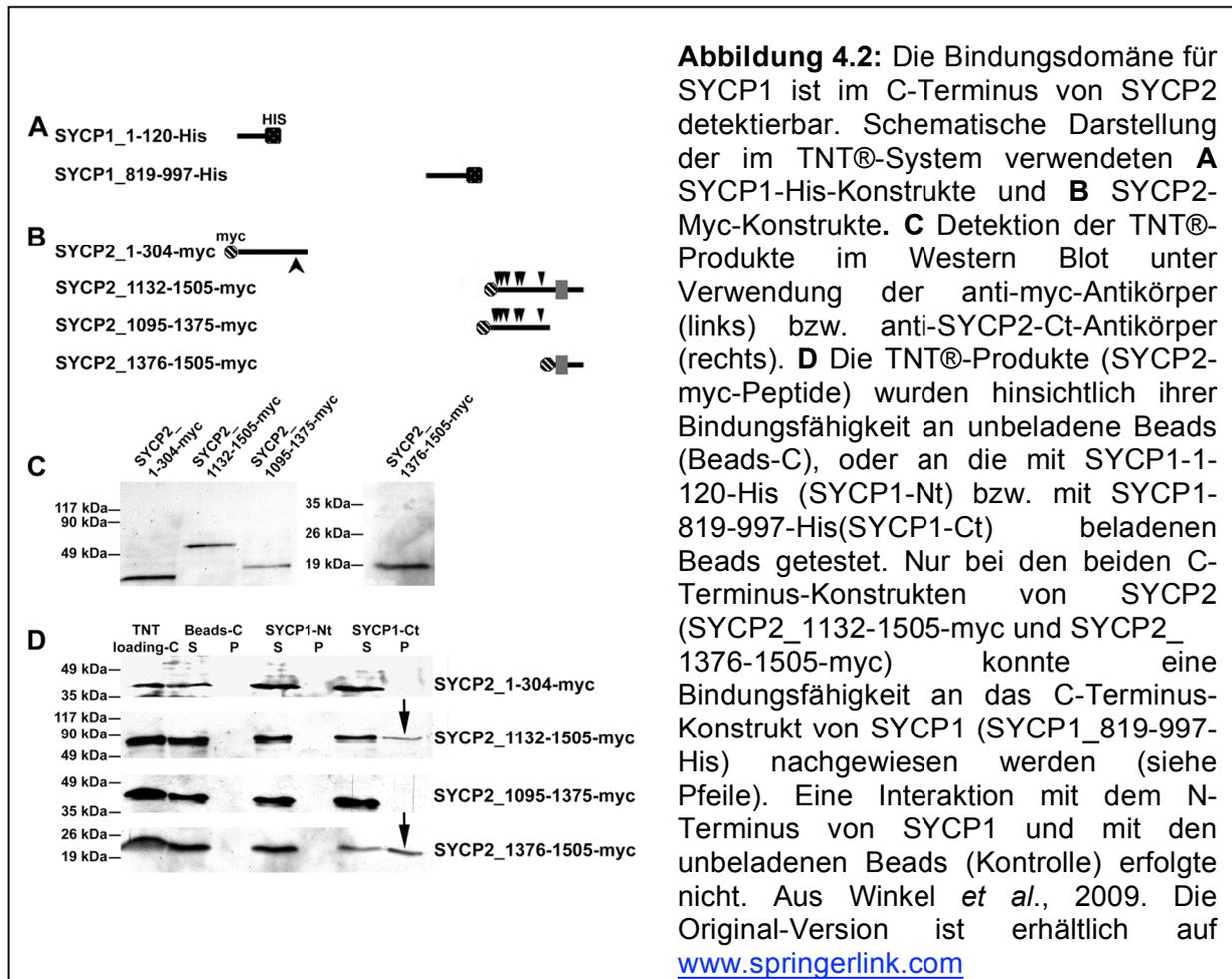


für eine Bindung. Dies befand sich im Einklang mit den bisherigen Erkenntnissen über die Orientierung der SYCP1-Homodimere innerhalb der SC-Struktur. Denn aufgrund ihrer Lokalisation im Zentralen Element des SC wären die N-Termini der SYCP1-Moleküle räumlich nicht für eine Interaktion mit SYCP2 verfügbar. Die Ergebnisse der Yeast-Two-Hybrid-Interaktionsstudien lieferten den ersten Hinweis auf eine direkte Interaktion zwischen SYCP1 und SYCP2.

#### **4.1.2 Der C-Terminus von SYCP1 bindet an die C-terminale Region von SYCP2**

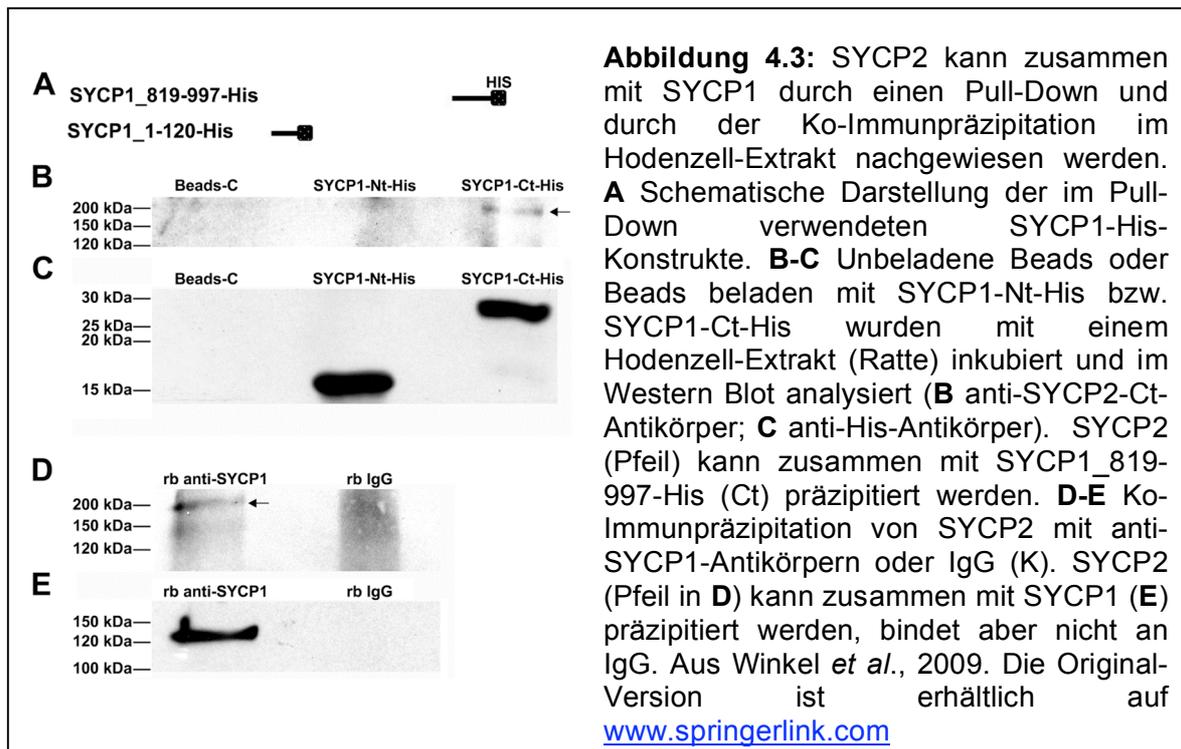
Wie schon die Bindungsstudien im Yeast-Two-Hybrid-System zeigten, scheint der C-Terminus von SYCP2 eine zentrale Rolle bei der Bindung an SYCP1 zu übernehmen. Um diese Ergebnisse zu bekräftigen, sollten die Interaktionsstudien in einem zusätzlichen System durchgeführt werden. Hierfür wurden die gleichen SYCP1-Konstrukte verwendet und zu Detektionszwecken mit einem His<sub>6</sub>-Epitop (SYCP1-Mutanten, Abb. 4.2A) versehen. Eine Auswahl der SYCP2-Deletionsmutanten wurde mit einem Myc-Epitop (SYCP2-Mutanten, Abb. 4.2B) fusioniert. Die rekombinanten Proteinprodukte der einzelnen Konstrukte sind in Abbildung 4.2.A und B schematisch dargestellt und in Abschnitt 2.3.2.3 näher erläutert.

Die SYCP1-His<sub>6</sub>-Fusionsproteine (Abb. 4.2A) dienten als Köder. Sie wurden im *E. coli*-Stamm Rosetta-Blue exprimiert und unter denaturierenden Bedingungen über das Ni-NTA-Säulensystem aufgereinigt. Die jeweiligen myc-markierten SYCP2-Deletionsmutanten wurden mit Hilfe des TNT® *in vitro* Transkriptions-/Translationssystem (Promega) im Reticulocyten-Lysat hergestellt. Sie dienten innerhalb der Studie als Beute-Konstrukte (Abb. 4.2C) und wurden auf ihre Bindungsfähigkeit mit den beiden SYCP1-His<sub>6</sub>-Fusionproteinen getestet. In den Western Blot-Analysen wurde deutlich, dass auch in diesem System eine Interaktion zwischen dem C-Terminus von SYCP1 und dem C-terminalen Bereich (AS 1132-1505) bzw. den letzten 130 Aminosäuren des C-Terminus (AS 1375-1505) von SYCP2 besteht. Beide Fusionsproteine konnten in der Pellet-Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 4.2D, Pfeile). Eine Interaktion dieser beiden SYCP2-Myc-Fusionsproteine und dem His<sub>6</sub>-markierten N-Terminus von SYCP1 oder den unbeladenen Ni-NTA-Beads (Kontrolle) konnte hingegen nicht detektiert werden. Somit konnten die Ergebnisse der Yeast-Two-Hybrid-Studien bestätigt werden.



#### 4.1.3 Endogenes SYCP2 bindet an den C-Terminus von SYCP1

In einem weiteren Experiment sollte getestet werden, ob endogenes SYCP2 mit den bereits im TNT®-System verwendeten SYCP1-His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen (SYCP1\_1-120-His; SYCP1\_819-997-His, Abb. 4.3A) interagieren kann. Hierfür wurde ein Pull-Down-Experiment mit frischem Hodenextrakt der Ratte durchgeführt. Wie die Western Blot-Analysen zeigten, besteht auch unter diesen experimentellen Bedingungen eine Interaktion zwischen dem rekombinanten Fusionsprotein SYCP1\_819-997-His, also dem C-Terminus von SYCP1 (siehe Abb. 4.3C) und endogenem SYCP2 aus dem Hodenextrakt der Ratte (siehe Pfeil in Abb. 4.3B). Eine Bindung zwischen endogenem SYCP2 und dem N-Terminus von SYCP1 (Abb. 4.3C) oder den unbeladenen Ni-NTA-Beads konnte nicht nachgewiesen werden.



#### 4.1.4 SYCP2 ko-immunpräzipitiert mit SYCP1 im Hodenextrakt der Ratte

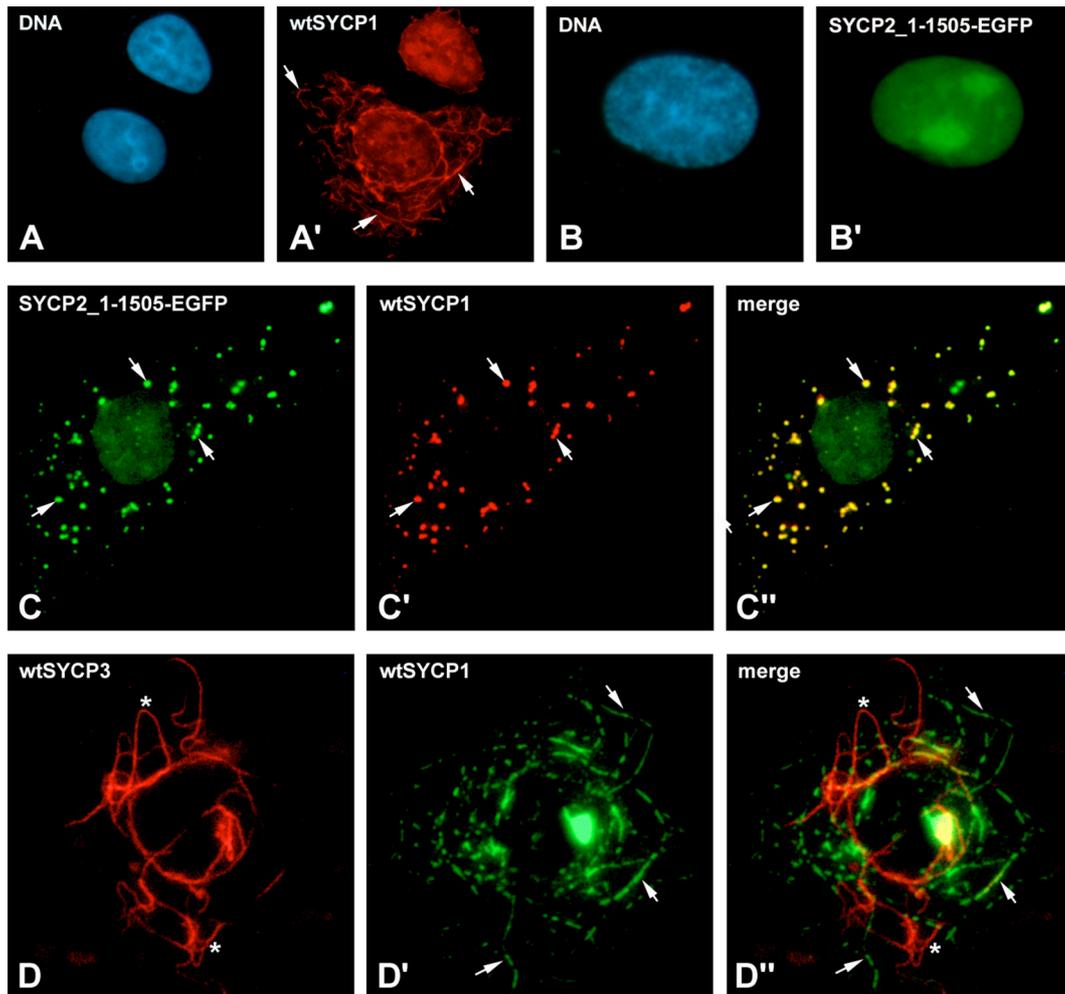
Nach den Ergebnissen der Pull-Down-Experimente stellte sich die Frage, ob in einem Zell-Extrakt aus Hodenmaterial der Ratte endogenes SYCP1 zusammen mit endogenem SYCP2 als Proteinkomplex isoliert werden kann. Dies würde für eine Interaktion der Proteine im natürlichen Umfeld sprechen. Um eine derartige Bindung zu untersuchen, wurden frisch hergestellte Extrakte aus Rattenhodenzellen mit spezifischen Antikörpern gegen den C-Terminus von SYCP1 ( $\alpha$ -SYCP1-Ct; Tabelle 2.1) oder mit unspezifischen Antikörpern (IgG; Tabelle 2.1) aus Kaninchen inkubiert. Wie die anschließende Analysen im Western Blot zeigten, kann SYCP2 unter diesen experimentellen Bedingungen (siehe Abb. 4.3D) zusammen mit SYCP1 (siehe Abb. 4.3E) ko-immunpräzipitiert werden. Im Kontroll-Extrakt, der mit den unspezifischen Antikörpern (IgGs) inkubiert wurde, war keines der beiden Proteine nachweisbar (Abb. 4.3D-E).

#### 4.1.5 SYCP2 kolokalisiert mit SYCP1-Polykomplexen im heterologen System

Da bisher kein stabiles meiotisches Zellsystem zur Verfügung gestellt werden konnte, wurde die Interaktion zwischen SYCP1 und SYCP2 wurde in somatischen Kulturzellen (COS-7) untersucht. In einem solchen heterologen System konnte auch schon die Bindung zwischen SYCP2 und SYCP3 nachgewiesen werden (Pelletari *et*

*al.*, 2001). Ein solches System ist für Experimente mit meiosespezifischen Proteinen vorteilhaft, da diese von somatischen Zellen nicht endogen exprimiert werden. Folglich kann man eine Interaktion meiotischer Proteine im nicht-meiotischen Umfeld untersuchen. In Vorbereitung auf diese Arbeit wurde das Fusionsprotein SYCP2-EGFP hergestellt und in COS-7 Zellen überexprimiert (Diplomarbeit Winkel, 2006). Die Interaktionsfähigkeit dieses Proteins mit SYCP1 wurde durch eine Doppeltransfektion der Zellen im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Dabei wurde SYCP1 als wildtypisches Protein exprimiert und mit einem spezifischen Antikörper ( $\alpha$ -SYCP1-Ct; Tabelle 2.1) detektiert. Eine Kolokalisation der Signale beider Proteine innerhalb der Zellen konnte als Interaktion gewertet werden. Wie bereits beschrieben (Öllinger *et al.*, 2005), bildet wildtypisches SYCP1 bei Einzelexpression in ca. 41% der COS-7 Zellen faserartige Polykomplexstrukturen (Abb. 4.4A') oder Aggregate im Cytoplasma aus. In den übrigen Zellen, war das Protein homogen im Zellkern verteilt, wobei die Bereiche der Nukleoli ausgespart blieben. Das Fusionsprotein SYCP2-EGFP (Abb. 4.4B') und auch wildtypisches SYCP2 hingegen waren bei alleiniger Expression in den COS-7 Zellen homogen im Kern verteilt und lagen konzentriert in den Nukleoli vor (Diplomarbeit Bührle, 2004; Diplomarbeit Winkel, 2006; Winkel *et al.*, 2009). In den doppelt transfizierten Zellen konnte SYCP2-EGFP erstmals im Cytoplasma detektiert werden, wo es mit SYCP1-Polykomplexen und Aggregaten kolokalisierte (Abb. 4.4C-C''). Auch SYCP1 veränderte sein Verteilungsmuster, wenn es zusammen mit SYCP2-EGFP exprimiert wurde. Denn im Unterschied zur Einzeltransfektion war SYCP1 zusätzlich auch angereichert in den Nukleoli zu finden (Diplomarbeit Winkel, 2006). Somit konnte auch im heterologen System eine Interaktion zwischen SYCP1 und SYCP2 nachgewiesen werden.

Als Kontrolle des Systems wurde wildtypisches SYCP1 zusammen mit wildtypischem SYCP3 in den COS-7 Zellen kotransfiziert. Die Detektion von SYCP3 erfolgte mit einem spezifischen Primärantikörper ( $\alpha$ -SYCP3, Serum #13; Tabelle 2.1). Beide Proteine bildeten höher geordnete faserartige cytoplasmatische Strukturen aus (Yuan *et al.*, 1998; Öllinger *et al.*, 2005). Diese schienen jedoch komplett unabhängig voneinander zu sein und zeigten keinerlei Kolokalisationen (Abb.4.4D-D''; Winkel *et al.*, 2009). Somit konnte keine Bindung zwischen SYCP1 und SYCP3 nachgewiesen werden, was sich im Einklang mit Ergebnissen bisheriger Studien befand (Liu *et al.* 1996; Tarsounas *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 1998; Pelttari *et al.*, 2001).



**Abbildung 4.4:** SYCP2-EGFP kolokalisiert im heterologen System mit Polykomplexstrukturen von wildtypischem SYCP1. **A-B** DNA-Färbung transfizierter Zellen mit Hoechst 33258. **A'** Verteilungsmuster von wtSYCP1 bei der Einzeltransfektion in kultivierten COS-7-Zellen. wtSYCP1 bildet filamentöse Polykomplexstrukturen im Cytoplasma aus. **B'** Bei der Einzeltransfektion von SYCP2\_1-1505-EGFP in COS-7 Zellen ist das Fusionsprotein im Nukleoplasma verteilt und angereichert in den Nukleoli zu finden. Im Cytoplasma ist es nicht detektierbar. **C-C''** In koftransfizierten Zellen zeigen SYCP2\_1-1505-EGFP (**C**) und wtSYCP1 (**C'**) deutliche Kolokalisationen in filamentösen, cytoplasmatischen Strukturen (gelb in **C''**). **D-D''** Koexpression von wtSYCP3 (**D**) und wtSYCP1 (**D'**) in COS-7 Zellen. Beide Proteine bilden filamentöse Netzwerke im Cytoplasma aus. Diese höher geordneten Strukturen sind jedoch völlig unabhängig voneinander (Pfeile und Sterne) und zeigen keinerlei Kolokalisationen (**D''**). Aus Winkel *et al.*, 2009. Die Original-Version ist erhältlich auf [www.springerlink.com](http://www.springerlink.com)

Zusammenfassend bestätigten auch die Experimente im heterologen System, dass eine Bindung zwischen SYCP1 und SYCP2 besteht. Denn entgegen seinem wildtypischen Verhalten, konnte SYCP2 bei der Koexpression mit SYCP1 im Cytoplasma detektiert werden und kolokalisierte dort mit den cytoplasmatischen, faserartigen Polykomplexstrukturen von SYCP1.

## **4.2 Vergleich der Polymerisationseigenschaften von SYCP1 zwischen den evolutionär entfernten Spezies Ratte und Medaka**

Der Synaptonemalkomplex ist eine evolutionär hochkonservierte Struktur, die in meiotischen Zellen verschiedenster Organismen detektiert werden konnte. Datenbankanalysen und zahlreiche Studien an verschiedenen Modellorganismen haben gezeigt, dass sich die SC der Vertebraten aus Proteinen zusammensetzen, die scheinbar nur funktionelle Homologien zu SYCP1, SYCP2 und SYCP3 der Säuger aufweisen (Page und Hawley, 2004). In der Fischart Medaka konnten erstmals die homologen Proteine von SYCP1 und SYCP3 identifiziert und deren Expressionsmuster charakterisiert werden (Iwai et al., 2006). Ein Vergleich der Proteine SYCP3 aus Ratte und Medaka zeigte, dass trotz der erheblichen Sequenzunterschiede eine hochgradige Konservierung in der Domänenorganisation und hinsichtlich der Polymerisationseigenschaften besteht. Desweiteren konnten zwei hochkonservierte Sequenzmotive (CM1 und CM2) ermittelt werden, die in beiden Spezies den gleichen Sequenzabstand zueinander hatten (Baier et al., 2007a und b). Aufgrund dieser Erkenntnisse sollte nun untersucht werden, ob auch SYCP1 innerhalb der Evolution der Vertebraten konserviert ist. Hierfür wurden die SYCP1 Proteine aus Ratte und Medaka hinsichtlich der Aminosäuresequenzen, der Domänenorganisation und der Polymerisationseigenschaften untersucht und miteinander verglichen. Dieser Vergleich sollte zeigen, ob und in welchem Ausmaß die Transversalfilamentproteine beider Spezies konserviert sind. Oder ob es sich um Proteine handelt, die innerhalb der SC-Struktur der Vertebraten nur eine funktionelle Homologie aufweisen.

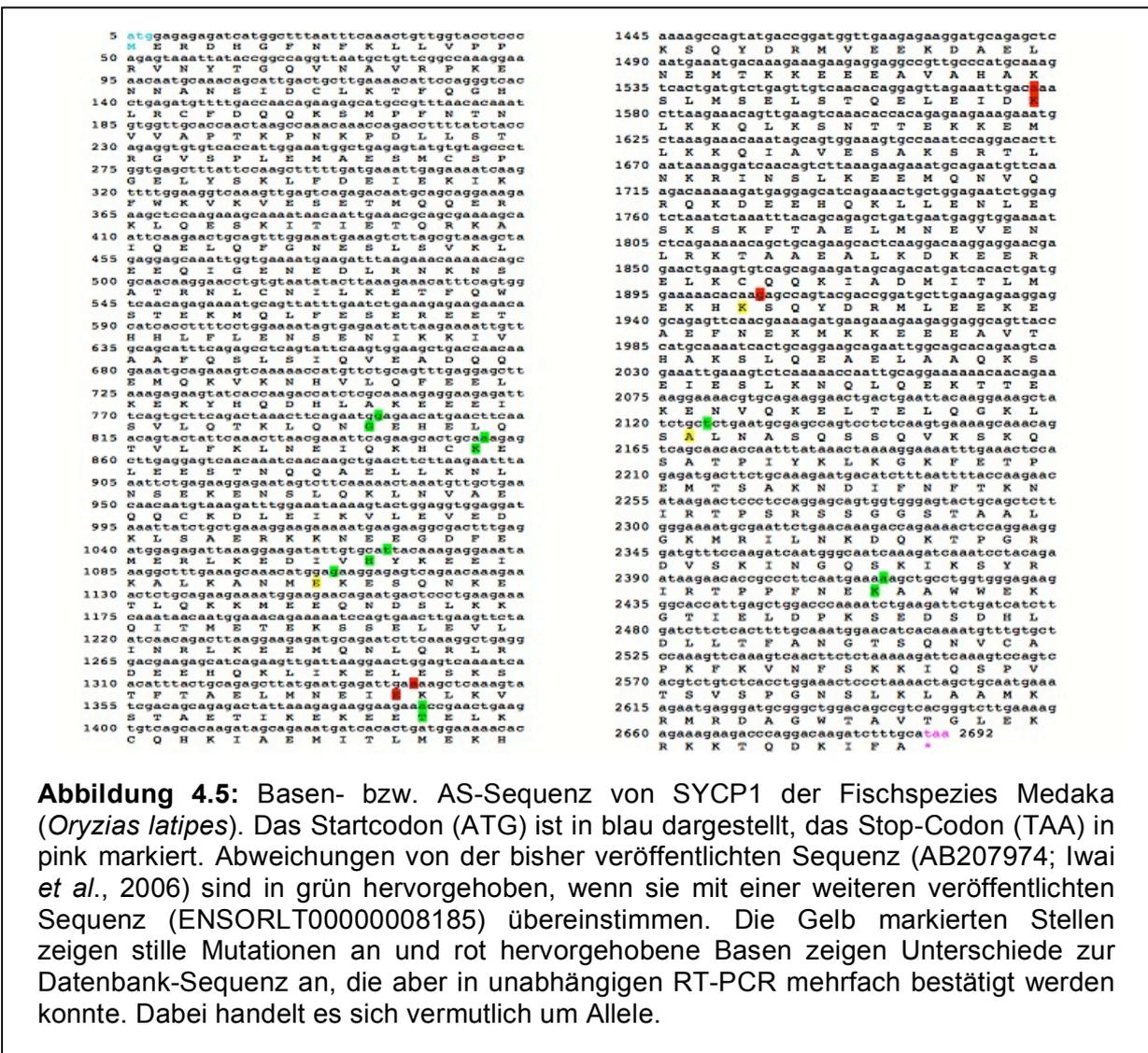
### **4.2.1 Klonierung der cDNA von Medaka-SYCP1 (MeSYCP1)**

Eine grundlegende Voraussetzung für molekularbiologische Experimente ist die Gewinnung der cDNA des zu untersuchenden Proteins. Über Reverse Transkription (RT) wurde zunächst cDNA von der Gesamt-mRNA aus Medaka-Hoden synthetisiert. Um die cDNA von MeSYCP1 gewinnen zu können, wurden spezifische Primer hergestellt (XhoI+Medaka\_SYCP1\_5'ATG; medaka\_SYCP3\_3'TAA+XhoI, siehe Tabelle 2.2) und in einer anschließenden PCR eingesetzt. Das resultierende PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR<sup>®</sup>2.1-Topo zwischenkloniert, vollständig sequenziert und mit der in den Datenbanken veröffentlichten Sequenz verglichen (AB207974;

Iwai *et al.*, 2006). Dabei sind einige Veränderungen in der Nukleotidsequenz deutlich geworden. Diese konnten teilweise durch in den Datenbanken vorhandene EST-Klone bzw. andere Datenquellen bestätigt werden (ENSORLT00000008185). Andere Nukleotidaustausche traten wiederholt in voneinander unabhängigen cDNA-Klonierungen auf, was dafür spricht, dass es sich um Allele handeln könnte. An Position 798 wurde ein Adenin durch ein Guanin ersetzt, was in einem Aminosäureaustausch von Glutaminsäure zu Glycin resultiert. Dieser Austausch konnte in den Datenbanken bestätigt werden (ENSORLT00000008185). Das Guanin an Position 855 wurde durch ein Adenin ersetzt. Dies resultierte in einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Lysin, der ebenfalls in den Datenbanken bestätigt werden konnte (ENSORLT00000008185). Die Base 1069 (Glutamin) wurde durch ein Thymin ersetzt und dadurch ein Aminosäureaustausch von Glutamin zu Histidin verursacht. Auch dieser Nukleotidaustausch wurde bestätigt (ENSORLT00000008185). Des Weiteren wurde ein Austausch an Position 1108 von Adenin zu Guanin registriert (bestätigt in ENSORLT00000008185), was in einer stillen Mutation resultiert. An Position 1342 erfolgte ein Austausch von Cytosin zu Adenin und damit verbunden ein Aminosäurewechsel von Asparaginsäure zu Glutaminsäure. Dieser Austausch trat in mehreren unabhängigen RT-Reaktionen auf. Daher wurde angenommen, dass es sich um ein Allel und nicht um einen Lesefehler der Reversen Transkriptase handelte. Ein weiterer Austausch erfolgte an Base 1388 von Thymin zu Adenin, was einen Wechsel von Threonin zu Serin verursachte. Dieser Nukleotidaustausch konnte in den Datenbanken bestätigt werden (ENSORLT00000008185). An Position 1577 wurde ein Cytosin durch ein Adenin ersetzt. Dies resultierte in einem Aminosäureaustausch von Glutamin zu Lysin. Aufgrund des wiederholten Auftretens dieses Nukleotidaustausches in unabhängigen RT-PCRs konnte von einem Allel ausgegangen werden. Des Weiteren wurde die Base 1906 (Adenin) wurde durch ein Guanin ersetzt, wobei kein Aminosäurewechsel erfolgte. Auch bei diesem Austausch wurde angenommen, dass es sich um ein Allel handelte. Eine weitere stille Mutation verursachte der Austausch an Position 2125 von einem Cytosin zu Thymin. Dieser konnte in den Datenbanken bestätigt werden (ENSORLT00000008185). Der letzte Basenaustausch erfolgte an Position 2415 von einem Guanin zu Adenin. Dieser hat einen Aminosäureaustausch von Arginin zu Lysin zur Folge und war in den Datenbanken erfasst (ENSORLT00000008185). Die Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz von MeSYCP1

und die hier beschriebenen Veränderungen sind zu einem besseren Verständnis in Abbildung 4.5 nochmals dargestellt und farblich markiert (grün = bestätigt in ENSORLT00000008185; gelb = stille Mutation; rot = Allel).

Nach der Sequenzanalyse und dem Vergleich mit den Datenbanken lag MeSYCP1 nun vollständig im pCR<sup>®</sup>2.1-Topo-Vektor vor und konnte als Grundlage für alle weiteren Klonierungen verwendet werden.



**Abbildung 4.5:** Basen- bzw. AS-Sequenz von SYCP1 der Fischart Medaka (*Oryzias latipes*). Das Startcodon (ATG) ist in blau dargestellt, das Stop-Codon (TAA) in pink markiert. Abweichungen von der bisher veröffentlichten Sequenz (AB207974; Iwai *et al.*, 2006) sind in grün hervorgehoben, wenn sie mit einer weiteren veröffentlichten Sequenz (ENSORLT00000008185) übereinstimmen. Die Gelb markierten Stellen zeigen stille Mutationen an und rot hervorgehobene Basen zeigen Unterschiede zur Datenbank-Sequenz an, die aber in unabhängigen RT-PCR mehrfach bestätigt werden konnte. Dabei handelt es sich vermutlich um Allele.

#### 4.2.2 Sequenzvergleich von SYCP1 zwischen Ratte und Medaka

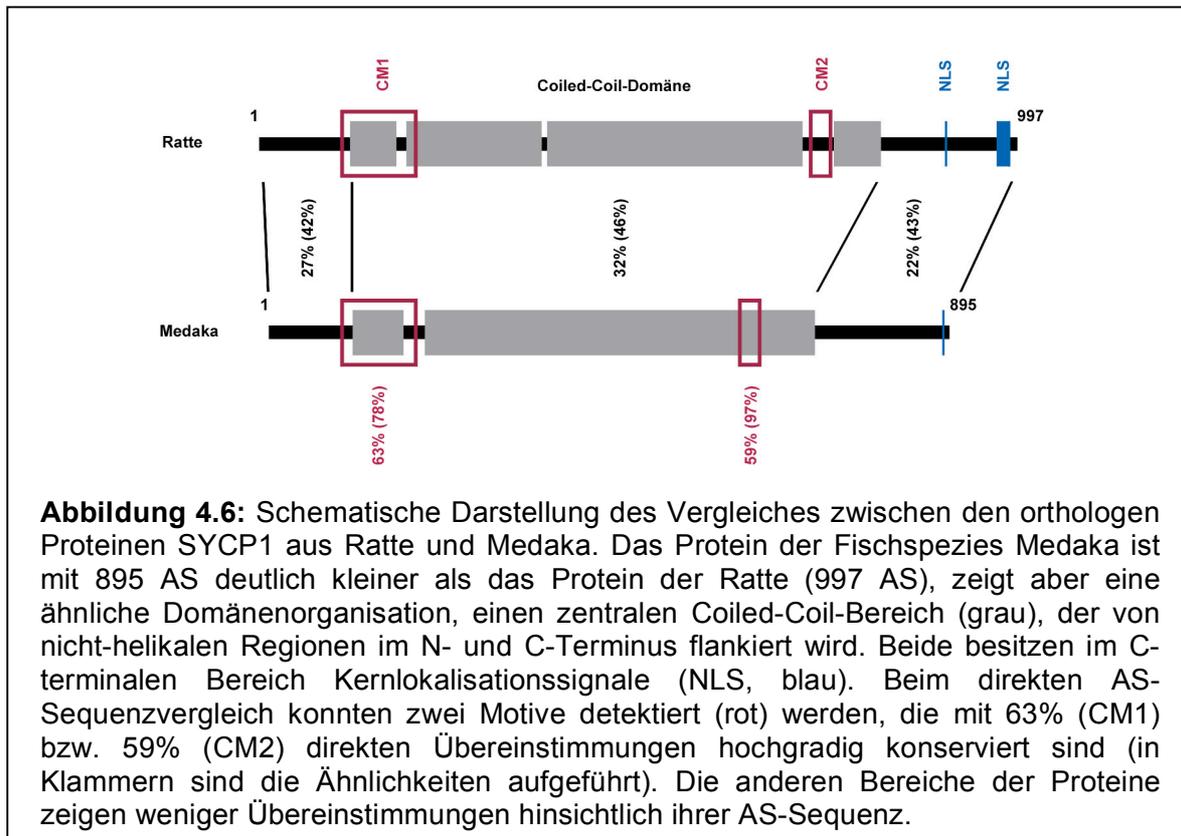
Ein direkter Aminosäuresequenzvergleich der orthologen Proteine aus Ratte (RaSYCP1; NM\_012810) und der Fischart Medaka (MeSYCP1, siehe Abbildung 4.5) sollte Informationen über mögliche konservierte Regionen hervorbringen. Er wurde unter Verwendung der beiden frei zugänglichen Online-Tools BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) und ClustalW (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) durchgeführt.

Die Analyse der Proteinsequenzen hinsichtlich verschiedener Domänen und einzelner Sequenzmotive erfolgte über das ebenfalls frei zugängliche Online-Tool PSORTII (<http://psort.hgc.jp/form2.html>).

Die Sequenz von RaSYCP1 umfasst 997 Aminosäuren, das orthologe Protein in Medaka ist mit 895 Aminosäuren deutlich kleiner. Wie in der schematischen Darstellung in Abbildung 4.6 deutlich wird, konnte bei beiden Proteinen eine ähnliche Organisation der Domänen festgestellt werden. Dabei wird eine zentrale  $\alpha$ -helikale Domäne von zwei nicht-helikalen Bereichen flankiert. Den Berechnungen nach Lupas *et al.* (1991) erstreckt sich die Coiled-Coil-Region bei MeSYCP1 insgesamt von Aminosäure 109 bis 716 und ist einmalig durch einen nicht-helikalen Bereich unterbrochen (AS 175-202). Im Fall von RaSYCP1 erstreckt sich die  $\alpha$ -helikale Domäne von Aminosäure 121 bis 819 (Meuwissen *et al.*, 1992) und ist dabei drei Mal von kurzen nicht-helikalen Bereichen unterbrochen (AS 182-193, AS 373-378, AS 715-756). Beim Sequenzvergleich der Coiled-Coil-Regionen beider Spezies wurden eine relativ geringe Gesamtübereinstimmung von 32% und eine Aminosäuresequenzähnlichkeit von 46% errechnet. Auffällig jedoch, waren zwei kleinere Motive, CM1 und CM2, innerhalb der Coiled-Coil-Regionen. Diese zeigten weitaus höhere Übereinstimmungen bzw. Ähnlichkeiten hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenzen. Das konservierte Motiv CM1 grenzt jeweils an den N-Terminus der Proteine und zeigte 63% Identität und 78% Sequenzähnlichkeit. CM2 befindet sich bei MeSYCP1 im hinteren Drittel der Coiled-Coil-Region. Bei RaSYCP1 hingegen liegt es im dritten kurzen nicht-helikalen Bereich der Coiled-Coil-Domäne. Dieses Motiv zeigte im Vergleich der beiden Spezies 59% Übereinstimmung und sogar 97% Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen. In den N- und C-terminalen Bereichen der Proteine konnte mit 27% und 22% nur eine geringe Übereinstimmung bestimmt werden.

Die Kernlokalisationssignale (NLS) befinden sich bei beiden Proteinen im C-terminalen Bereich (siehe Abbildung 4.6, blaue Balken). Bei MeSYCP1 konnte nur

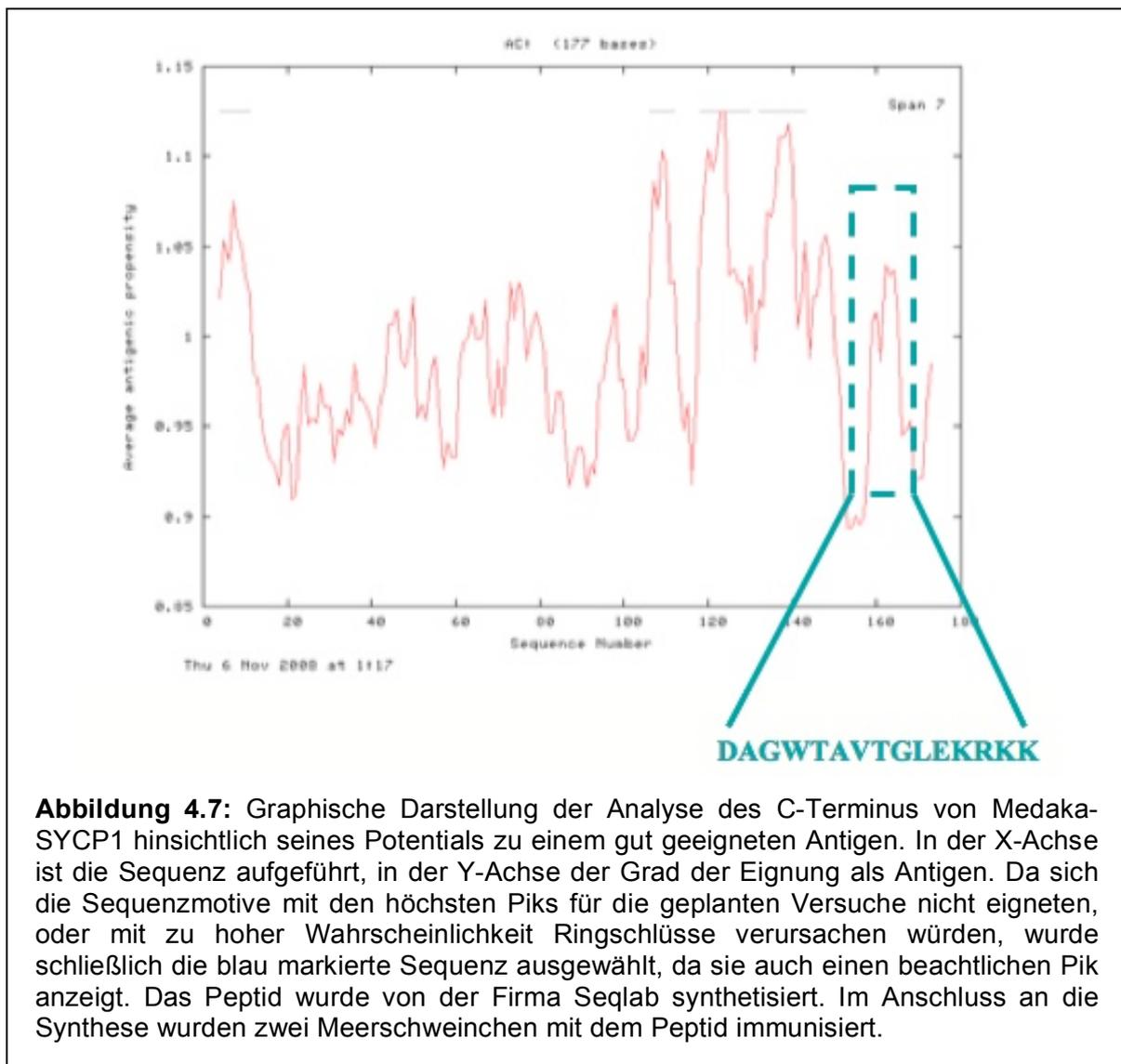
ein NLS von Aminosäure 885 bis 888 identifiziert werden. Die SYCP1-Aminosäuresequenz der Ratte hingegen beinhaltet drei Kernlokalisierungssignale (AS 902-905, AS 985-988, AS 970-986). Aus weiteren Sequenzanalysen an MeSYCP1 ging hervor, dass ähnlich wie bei RaSYCP1 zahlreiche potentielle Erkennungsstellen für verschiedene Proteinkinasen über die gesamte Proteinsequenz vorhanden sind. Diese könnten beim Auf- und Abbau des Synaptonemalkomplexes in Medaka von Bedeutung sein.



#### 4.2.3 Herstellung eines MeSYCP1-spezifischen Antikörpers

Um MeSYCP1 näher charakterisieren zu können, sollte zunächst ein spezifischer Antikörper in Meerschweinchen hergestellt werden. Aus der Erfahrung mit dem orthologen Protein aus der Ratte wurde dabei eine Region im C-terminalen Bereich ausgewählt. Um zu ermitteln welche Sequenzmotive sich besonders gut als Antigen eignen, wurde das frei zugängliche Online-Tool C.V.C Bioinformatics genutzt (<http://immunax.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.pl>). Die Ergebnisse der Datenanalyse sind in Abbildung 4.7 dargestellt. Maxima im Kurvenverlauf konnten als geeignete Regionen gewertet werden. Zusätzlich wurde die Aminosäuresequenz des von einem Expertenteam der Firma Seqlab (Göttingen) analysiert. Das Vorkommen einiger Aminosäuren innerhalb der Antigensequenz kann zu Ringschlüssen oder

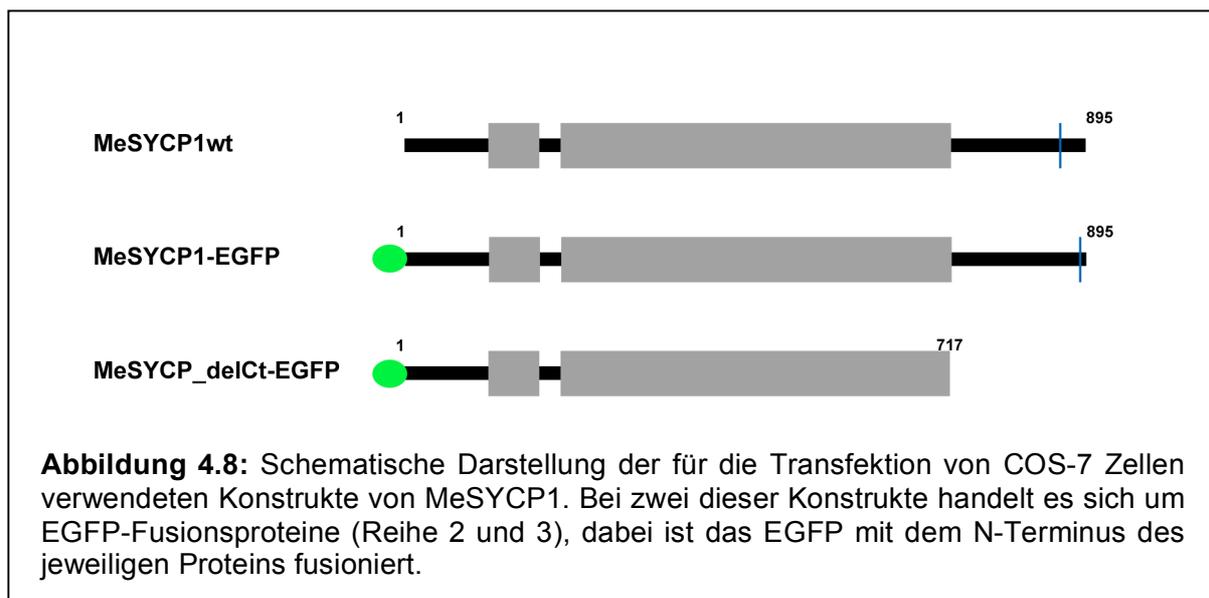
ähnlichen strukturellen Problemen führen. Nach Abgleich der Analyse-Ergebnisse wurde schließlich die Synthese des Peptids von AS 874-888 (siehe Abbildung 4.7, gekennzeichneten Bereich) mit anschließender Immunisierung in Auftrag gegeben. Nach Erhalt der finalen Blutungen wurden diese auf mit MeSYCP1 transfizierten COS-7 Zellen getestet und als positiv befunden. Um die Hintergrundfärbungen weitgehend zu reduzieren wurde die Antikörper affinitätsgereinigt.



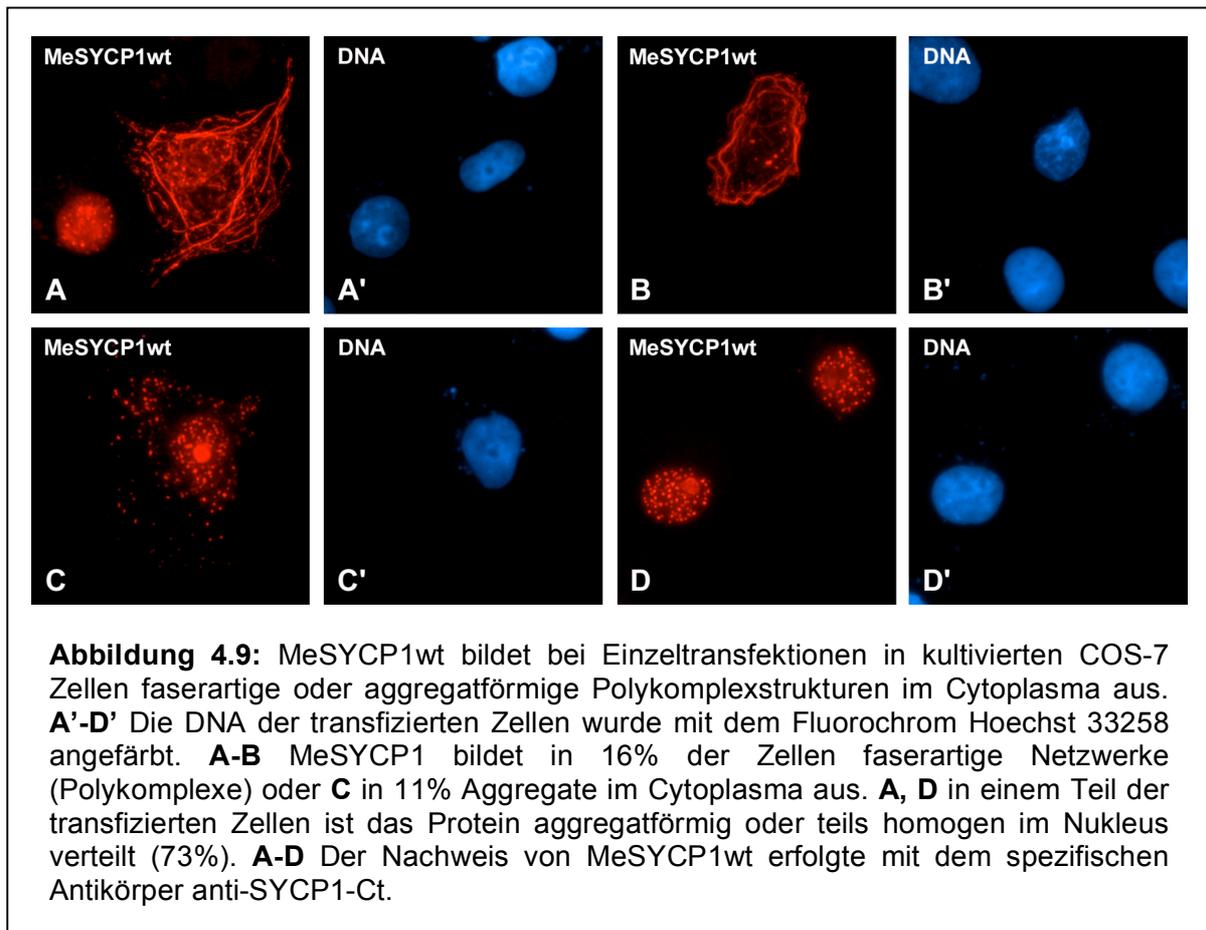
**Abbildung 4.7:** Graphische Darstellung der Analyse des C-Terminus von Medaka-SYCP1 hinsichtlich seines Potentials zu einem gut geeigneten Antigen. In der X-Achse ist die Sequenz aufgeführt, in der Y-Achse der Grad der Eignung als Antigen. Da sich die Sequenzmotive mit den höchsten Piks für die geplanten Versuche nicht eigneten, oder mit zu hoher Wahrscheinlichkeit Ringschlüsse verursachen würden, wurde schließlich die blau markierte Sequenz ausgewählt, da sie auch einen beachtlichen Pik anzeigt. Das Peptid wurde von der Firma Seqlab synthetisiert. Im Anschluss an die Synthese wurden zwei Meerschweinchen mit dem Peptid immunisiert.

#### 4.2.4 Charakterisierung der Polymerisationseigenschaften von Medaka-SYCP1

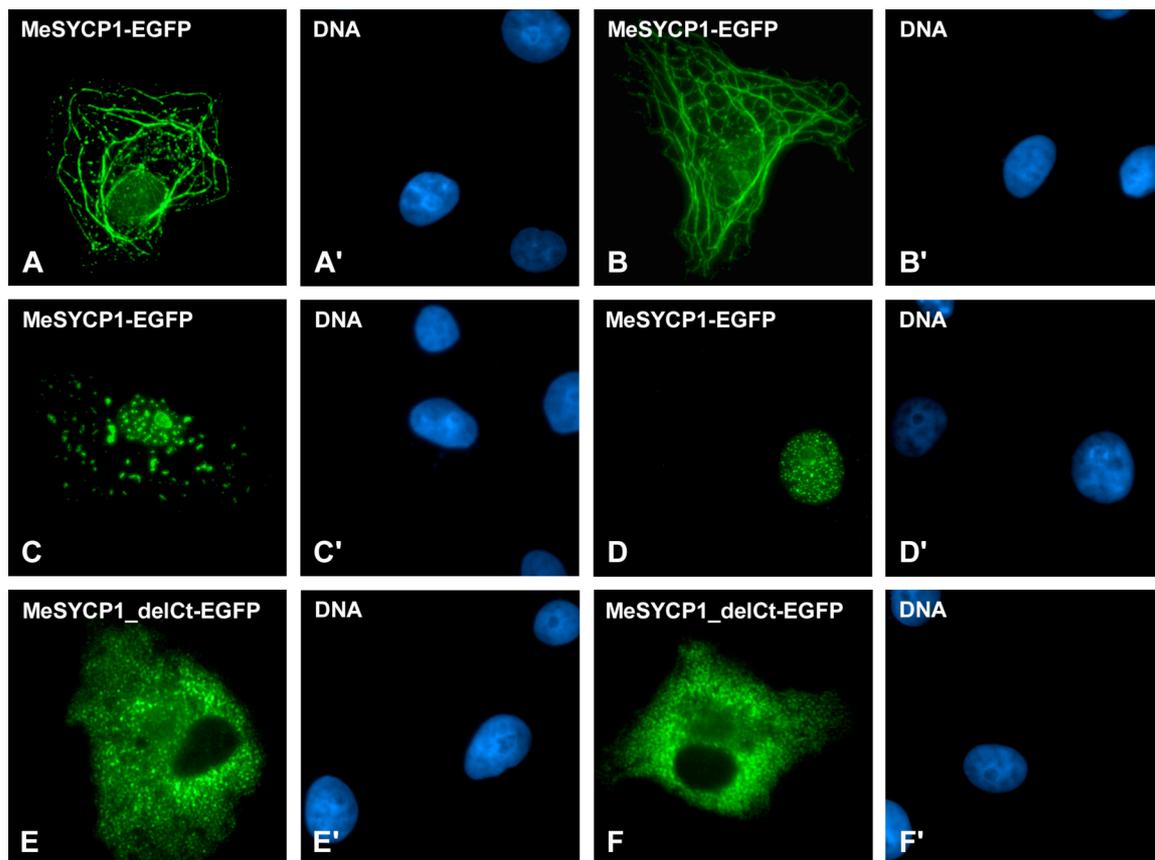
Um die Polymerisationseigenschaften von MeSYCP1 mit denen des homologen Proteins der Ratte vergleichen zu können, mussten zunächst verschiedene Konstrukte von MeSYCP1 hergestellt werden. Hierzu wurde das Gesamtprotein bzw. eine C-Terminus-Deletionsmutante in pEGFP-Vektoren kloniert (siehe 2.3.3), um sie schließlich in eukaryotischen COS-7 Zellen exprimieren zu können. Die Proteinprodukte sind in Abbildung 4.8 schematisch dargestellt.



Für die Untersuchung der Eigenschaften von MeSYCP1 wurde zunächst das wildtypische Protein (MeSYCP1wt, siehe 2.3.3 und Abb. 4.8) in den somatischen Kulturzellen überexprimiert und dessen Verteilungsmuster in der Immunfluoreszenz analysiert. Der Nachweis des Proteins erfolgte mit den affinitätsgereinigten spezifischen Antikörpern (siehe 4.2.3) und entsprechenden Texas-Red-gekoppelten Sekundärantikörpern (Tabelle 2.1). Wildtypisches MeSYCP1 bildete in etwa 16% der Zellen lang gestreckte, faserartige Polykomplexstrukturen im Cytoplasma aus (n=475; Abb. 4.9 A-B). In ca. 11% (n=475; Abb. 4.9 C) der Fälle konnten runde bis längliche Aggregate beobachtet werden. In den restlichen Zellen wurde das Protein im Kern und in den Nukleoli detektiert, wo es ebenfalls Aggregate bildete (73%, n=475; Abb. 4.9 D).



Ein vergleichbares Verteilungsmuster konnte auch in Kulturzellen beobachtet werden, in denen MeSYCP1 als Fusionsprotein mit EGFP überexprimiert wurde. Das EGFP wurde dabei an den N-Terminus des Proteins gekoppelt (MeSYCP1-EGFP; siehe 2.3.3; und Abb. 4.8, Mitte). In insgesamt 40% (n=1782) der Zellen war das Protein im Cytoplasma lokalisierbar. Die Moleküle bildeten dabei in ca. 24% der Fälle filamentöse Polykomplexnetzwerke aus (Abb. 4.10 A-B). In 16% der Zellen konnte das Protein in Form von runden Aggregaten detektiert werden (Abb. 4.10 C). In den verbleibenden 60% der transfizierten Zellen (n=1782) war das EGFP-Fusionsprotein aggregatförmig im Zellkern und in den Nucleoli lokalisierbar (Abbildung 4.10 E). Eine Deletion des nicht-helikalen C-Terminus resultierte beim SYCP1 der Ratte in einer kompletten Veränderung des Protein-Verteilungsmusters innerhalb der COS-7 Zellen. Das Protein war nicht mehr im Kern lokalisierbar, da alle NLS mit der Deletion entfernt wurden. Außerdem wurde die Polykomplexbildung vollständig eingestellt

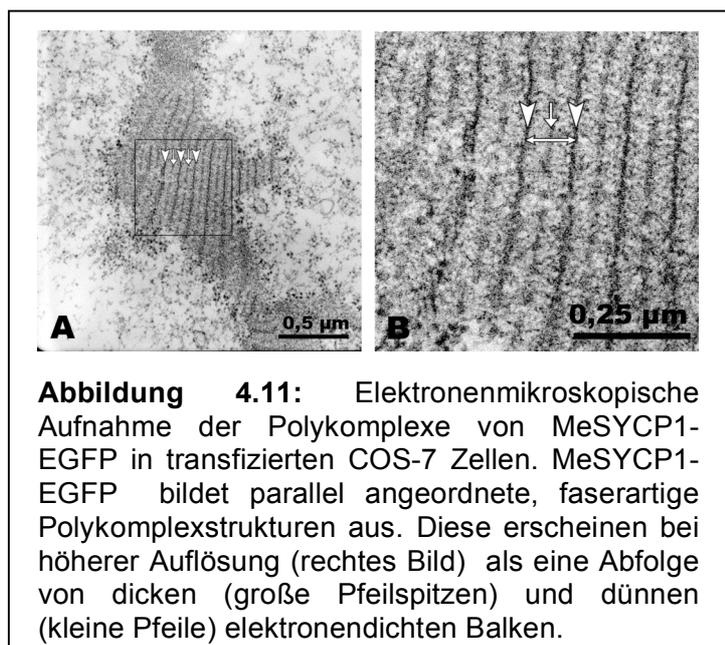


**Abbildung 4.10:** Einzelexpression der Fusionsproteine MeSYCP1-EGFP (**A-D**) bzw. MeSYCP1<sub>delCt</sub>-EGFP (**E-F**) in COS-7 Zellen. **A'-F'** Die DNA der transfizierten Zellen wurde mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 angefärbt. **A-D** Das EGFP-Fusionsprotein von MeSYCP1-EGFP bildet im Cytoplasma der transfizierten Zellen filamentöse Polykomplexstrukturen (24%, **A, B**) oder punktförmige Aggregate (16%, **C**) aus. In den restlichen Zellen ist es überwiegend aggregatförmig im Kern lokalisiert (60%, **D**). **E-F** Eine Deletion des C-Terminus hat den Verlust der Polykomplexstrukturen zur Folge. Die Deletionsmutante ist ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert und zeigt dort überwiegend eine homogene Verteilung, kann aber nicht mehr in den Kern gelangen.

(Öllinger *et al.*, 2005). Um zu untersuchen, ob die Deletion des C-terminalen Bereiches in MeSYCP1 vergleichbare Auswirkungen hat, wurde eine entsprechende Deletionsmutante hergestellt, die als EGFP-Fusionsprotein in COS-7 Zellen exprimiert wurde (MeSYCP1<sub>delCt</sub>-EGFP; siehe 2.3.3; Abb. 4.8). Die Deletion des C-Terminus resultierte auch beim MeSYCP1 in einer homogenen Verteilung des Proteins innerhalb des Cytoplasmas. Die Bildung höher geordneter Strukturen oder eine Lokalisation innerhalb des Kerns konnten nicht mehr beobachtet werden (Abb.

4.10 E-F). Folglich scheint der C-Terminus auch in MeSYCP1 für die Zusammenlagerung der Moleküle zu Polykomplexstrukturen essentiell zu sein.

Eine genauere Untersuchung der Polykomplexstrukturen des Fusionsproteins MeSYCP1-EGFP erfolgte mithilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie. Hierzu wurden Ultradünnschnitte (siehe 3.4.3) von fixierten und in Epon eingebetteten (3.4.2) transfizierten COS-7 Zellen angefertigt und im Elektronenmikroskop analysiert. Dabei wurde deutlich, dass die MeSYCP1-EGFP-Moleküle innerhalb der Polykomplexstrukturen in einer Abfolge von dicken (Abb. 4.11, Pfeilspitzen) und dünnen (Abb. 4.11, Pfeile) elektronendichten Balken angeordnet waren. Die Dimension der Polykomplexe liegt circa zwischen 110 und 113 nm. Die dickeren Balken (Abb. 4.11, Pfeilspitzen) wurden von zahlreichen Transversalfilamenten miteinander verbunden. In vorherigen Studien konnte bei RaSYCP1 gezeigt werden, dass die Proteinmoleküle innerhalb der Polykomplexe so orientiert sind, dass die N-Termini in den dünnen Balken detektierbar sind und die C-Termini in die dicken elektronendichten Balken ragen (Öllinger *et al.*, 2005). Diese Anordnung stimmt mit der Molekülorientierung innerhalb des SC überein (Liu *et al.*, 1996; Schmekel *et al.*, 1996). Ähnlich wie sein homologes Protein in der Ratte, scheint auch MeSYCP1 in somatischen Kulturzellen höhere geordnete Strukturen zu bilden, die in ihrer Anordnung parallelen Stapeln von SC ähneln.

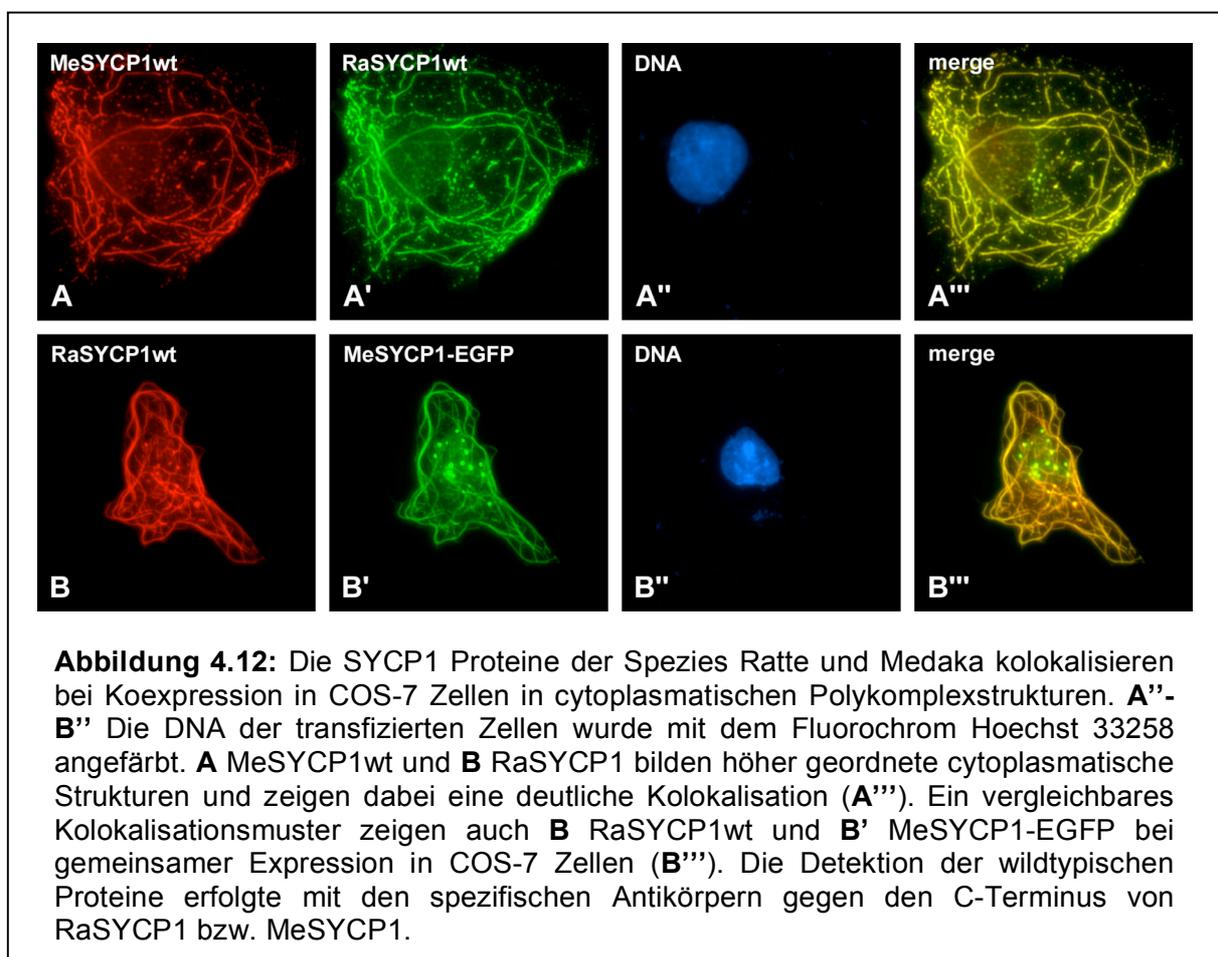


#### 4.2.5 Koexpression der homologen Proteine (SYCP1) aus Ratte und Medaka

Da die orthologen Proteine aus Ratte und Medaka trotz der erheblichen Unterschiede innerhalb der Aminosäuresequenzen eine vergleichbare Domänenorganisation aufwiesen, und zudem gleiche Polymerisationseigenschaften in den somatischen COS-7 Kulturzellen zeigten, sollte zusätzlich untersucht werden, ob diese Proteine evolutionär dennoch so hoch konserviert sind, dass sie speziesübergreifend miteinander interagieren können. Zu diesem Zweck wurden die

SYCP1-Proteine beider Spezies in COS-7 Zellen koexprimiert und anschließend in der Immunfluoreszenz analysiert.

Zunächst erfolgte eine Kotransfektion der wildtypischen Proteine beider Spezies. Dabei musste im Vorfeld getestet werden, ob die Antikörper gegen RaSYCP1 und MeSYCP1 nicht kreuzreagierten. Da dies nicht der Fall war, und die Antikörper aus Immunseren verschiedener Spezies gewonnen wurden (Kaninchen und Meerschweinchen), konnten sie gemeinsam für die Detektion der Proteine eingesetzt werden. Durch die Sekundärantikörper wurden die Proteine durch verschiedenartige Fluorochrome markiert. Es wurde deutlich, dass beide, sowohl RaSYCP1, als auch MeSYCP1, Polykomplexe bilden konnten (Abb. 4.12 A-A'''). Sowohl in den cytoplasmatischen, als auch in nukleoplasmatischen Strukturen konnte dabei eine Kolokalisation der Proteine detektiert werden (Abb. 4.12 A'''). Des Weiteren war im Vergleich zu den Einzeltransfektionen eine deutliche Erhöhung der Polykomplexrate zu verzeichnen. Denn von den doppelt transfizierten Zellen zeigten ca. 63% (n=422) Polykomplexbildung und 14% (n=422) Aggregatbildung im Cytoplasma. Eine Kernlokalisierung der Proteine konnte bei nur circa 23% (n=422) der Zellen detektiert



werden. Außerdem kolokalisierten die beiden Proteine auch innerhalb der Zellkerne. Im Gegensatz zum Verteilungsmuster bei den Einzeltransfektion, konnte RaSYCP1 dabei auch in den Nukleoli detektiert werden.

Die gleiche Versuchsreihe wurde ebenso mit MeSYCP1-EGFP und RaSYCP1wt durchgeführt (Abb. 4.12 B-B'''). Die Polykomplexrate erhöhte sich auch hier auf 59% (n=1069). In 11% (n=1069) der Zellen konnten cytoplasmatische Aggregate detektiert werden. Die Kernlokalisationsrate sank dabei auf 30% (n=1069) ab. Eine Kolokalisation der Proteine beider Spezies erfolgte innerhalb der cytoplasmatischen Polykomplexe und Aggregate (Abb. 4.12B''') und in den aggregatförmigen Strukturen innerhalb der Nukleoli.

Die Kolokalisationen von MeSYCP1 und RaSYCP1 und die deutliche Steigerung der Polykomplexrate innerhalb der Koexpressionstudien deuteten darauf hin, dass die Proteine aus Medaka und Ratte speziesübergreifend zu interagieren scheinen, oder sich mindestens an den Polykomplex-Strukturen des jeweils anderen orientieren können.

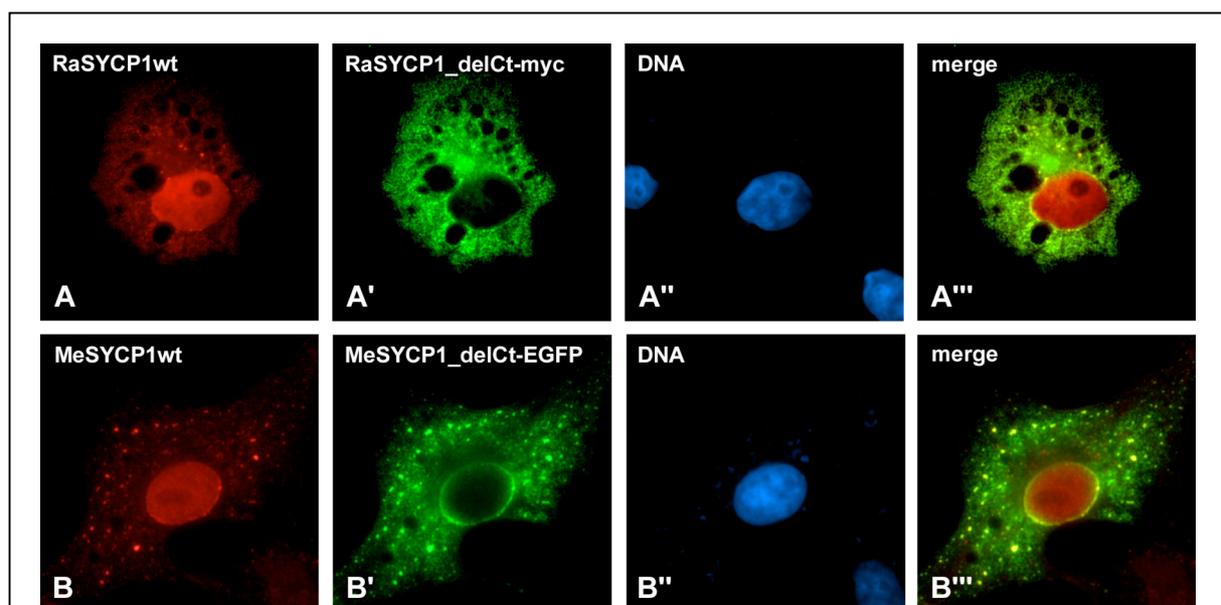
#### **4.2.6 Der Einfluss einer Deletion des C-Terminus von SYCP1 bei der Koexpression mit wildtypischen bzw. EGFP-Fusionsproteinen**

In einem weiteren Experiment sollte getestet werden, ob die Kolokalisationen der Proteine tatsächlich eine Folge von direkten Interaktionen sind, oder sich nur aus nah beieinander liegenden speziesspezifischen Strukturen ergibt. Sowohl bei RaSYCP1, als auch bei MeSYCP1 bewirkt die Deletion des C-Terminus bei der Einzeltransfektion eine komplette Unterdrückung der Polykomplexbildung und den Verlust der Fähigkeit in den Kern gelangen zu können (Öllinger et al., 2005; Abb. 4.10 E-F).

Zunächst sollte getestet werden, welchen Einfluss die gemeinsame Expression von wildtypischen SYCP1 und der entsprechenden C-Terminus-Deletionsmutante der gleichen Spezies auf die Polykomplexbildung hatte. Bei den rattenspezifischen Proteinen wurde die Deletionsmutante mit einer Myc-Sequenz markiert (siehe 2.3.1.1), die dann über spezifische Antikörper detektiert werden konnte. Das Verteilungsmuster des wildtypischen Proteins wurde durch die Koexpression stark beeinflusst. Die wildtypischen Moleküle waren größtenteils, ähnlich wie die Moleküle der Deletionsmutante, homogen im Cytoplasma verteilt. Die Polykomplexbildung, aber auch die Kernlokalisation des wildtypischen Proteins ging deutlich dabei zurück. In den wenigen verbleibenden cytoplasmatischen Strukturen erfolgte Kolokalisation. Die Deletionsmutante konnte nicht in den Kern gelangen, war aber oftmals

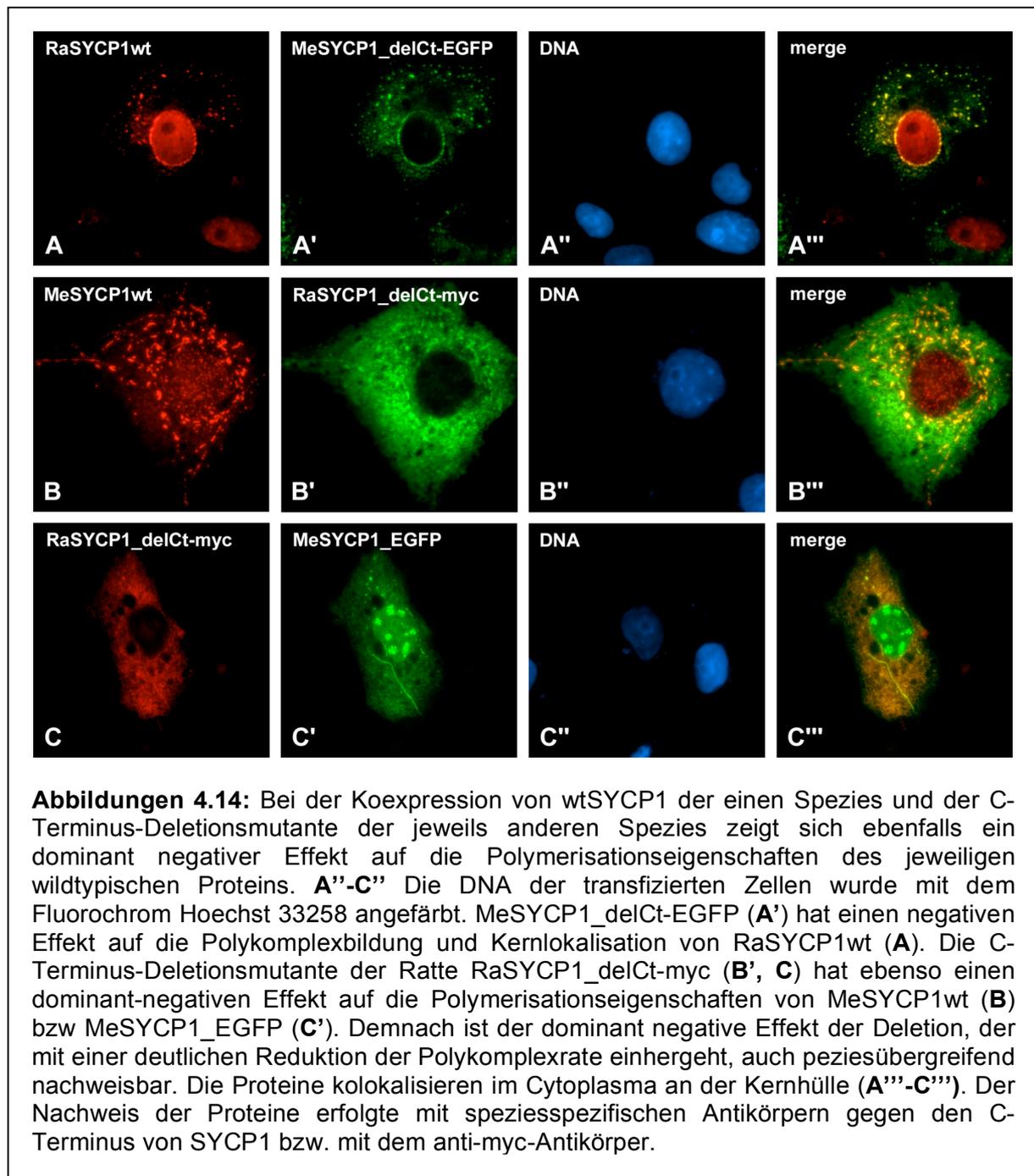
punktförmig an der Kernhülle detektierbar und kolokalisierte dort mit den wildtypischen Proteinen (Abb. 4.13 A'' und A''').

Der gleiche dominant-negative Effekt zeigte sich bei der Kotransfektion von MeSYCP1\_delCt-EGFP und MeSYCP1wt. Auch hier konnte die Deletionsmutante nicht in den Kern gelangen und wurde oft an der Kernhülle detektiert (Abb. 4.13 B'). Die Koexpression der beiden Proteine resultierte in einer deutlichen Reduktion der Polykomplexrate und der Kernlokalisierung des wildtypischen Proteins. Die verbliebenen polykomplexartigen Strukturen erschienen im Vergleich zur Einzel-expression des wildtypischen Proteins weniger regelmäßig und filigran und wirkten eher ungeordnet. Teilweise waren die wildtypischen Proteine auch homogen im Cytoplasma verteilt. Kolokalisationen zwischen MeSYCP1wt und MeSYCP1\_delCt-EGFP erfolgten sowohl in cytoplasmatischen Strukturen, als auch rund um den Kern (Abb. 4.13 B''').



**Abbildung 4.13:** Die C-Terminusdeletion von SYCP1 hat einen dominant negativen Effekt der auf die Polymerisationseigenschaften des wildtypischen Proteins innerhalb der gleichen Spezies (**A-A'''** Ratte-Ratte; **B-B'''** Medaka-Medaka). **A'',B''** Die DNA der transfizierten Zellen wurde mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 angefärbt. Sowohl bei SYCP1 der Ratte (**A**), als auch beim Medaka-Protein (**B**) verursacht eine Koexpression des jeweils wildtypischen Proteins mit der C-Terminus-Deletionsmutante eine deutlich erkennbare Reduktion der Polykomplexbildung. Das jeweils wildtypische Protein ist in einem großen Teil der doppelt transfizierten Zellen homogen oder aggregatförmig im Cytoplasma verteilt (**A**, **B**). Die Lokalisation im Kern ist im Vergleich zur Einzeltransfektion deutlich reduziert. Die jeweilige C-Terminus-Deletionsmutante (**A'**, **B'**) kann nicht in den Kern gelangen. Sie kolokalisiert mit den wildtypischen Proteinen im Bereich der Kernhülle oder im Cytoplasma (**A'''**, **B'''**). Der Nachweis der wildtypischen Proteine erfolgte mit anti-SYCP1-Ct (Ratte bzw. Medaka). Die Deletionsmutante RaSYCP1\_delCt-myc wurde mit dem anti-myc-Antikörper nachgewiesen.

Um zu untersuchen, ob der beobachtete dominant-negative Effekt der C-Terminus-Deletionsmutanten speziessübergreifend ist und somit von einer direkten Interaktion zwischen RaSYCP1 und MeSYCP1 ausgegangen werden kann, wurden in einem zusätzlichem Experiment die wildtypischen Proteine (und auch MeSYCP1-EGFP) in Kombination mit der C-Terminus-Deletionsmutante der jeweils anderen Spezies koexprimiert. Und auch hier zeigte sich ein vergleichbares Bild. Die Wildtypischen Proteine bzw. MeSYCP1-EGFP waren nun größtenteils im Cytoplasma verteilt und kolokalisierten dort in Aggregaten (siehe Abb. 4.14 A''', B''', C'''), ungeordneten Polykomplexstrukturen (Abb. 4.14 C''') oder um die Kernhülle herum (Abb. 4.14 A''')



mit der C-Terminus-Deletionsmutante der jeweils anderen Spezies. Teilweise konnten die wildtypischen Proteine bzw. MeSYCP-EGFP im Kern lokalisiert werden (Abb. 4.14 A, B, C), während die jeweiligen Deletionsmutanten von der Kernlokalisation ausgeschlossen wurden. Eine ausschließliche Kernexpression von RaSYCP1wt, MeSYCP1wt oder MeSYCP1-EGFP konnte nur sehr selten beobachtet werden. Meist erfolgte die Kernlokalisation gemeinsam mit cytoplasmatischer Expression, was nicht dem Verhalten der Proteine bei Einzelexpressionen entsprach. Aus den hier gezeigten Koexpressionstudien konnte geschlossen werden, dass die Polymerisationseigenschaften von SYCP1 evolutionär konserviert sind, auch wenn sich die Proteine auf der Sequenzebene deutlich unterscheiden. Wie die Erhöhung der Polykomplexrate bei der Koexpressionen der wildtypischen Proteine und der dominant-negative Effekt der C-Terminusdeletion zeigen, so scheinen sich die Proteine speziesübergreifend gegenseitig beeinflussen zu können und bilden dabei sogar höher geordnete Strukturen aus. Dies könnte, neben der ähnlichen Domänenorganisation und der vorliegenden Sequenzhomologien, auch auf eine Konservierung der Sekundärstruktur zurückzuführen zu sein, so dass die Proteine untereinander interagieren können.

#### **4.3 Vergleich der Polymerisationseigenschaften von SYCP1 zwischen den evolutionär entfernten Spezies Ratte und Hydra**

In Invertebraten konnten bisher keine homologen Proteine zu SYCP1 gefunden werden. Die Proteinkomponenten der Zentralen Region SYP-1, SYP-2, SYP-3 und SYP-4 in *C. elegans* besitzen zwar zentrale Coiled-Coil-Motive (MacQueen *et al.*, 2002; Colaiácovo *et al.*, 2003; Smolikov *et al.*, 2007; Smolikov *et al.*, 2009), sind aber deutlich kleiner als das SYCP1 der Säuger. Dennoch besteht beim Fadenwurm im Vergleich zum Säuger kaum ein Unterschied in der SC-Dimension (Goldstein und Slaton, 1982; Dernburg *et al.*, 1998). Demzufolge müssen die Proteine innerhalb der SC-Struktur in *C. elegans* anders organisiert sein und scheinen nur funktionell homolog zu SYCP1 zu sein. Auch das C(3)G der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) zeigt die konservierte Domänenorganisation der Transversalfilamentproteine. Auf der Aminosäuresequenzebene jedoch konnten keine Homologien festgestellt werden (Page und Hawley, 2001). Aus dem Vergleich

zwischen SYCP1 der Ratte und dem Medaka-Fisch gehen, wie bereits beschrieben, zwei konservierte Sequenzmotive hervor (CM1 und CM2). Mit diesen Motiven wurde eine Datenbankanalyse durchgeführt, anhand derer ein Protein aus dem Süßwasserpolyphen *Hydra vulgaris* identifiziert werden konnte. Dieses zeigte deutliche Übereinstimmungen in den beiden Motiven CM1 und CM2, sowie eine ähnliche Domäneorganisation wie das SYCP1 der Säuger. Ob es sich bei diesem Protein um ein orthologes von SYCP1 handeln könnte und ob SYCP1 möglicherweise doch in Invertebraten konserviert sein könnte, sollte zunächst in einem Vergleich mit dem Protein der Ratte untersucht werden.

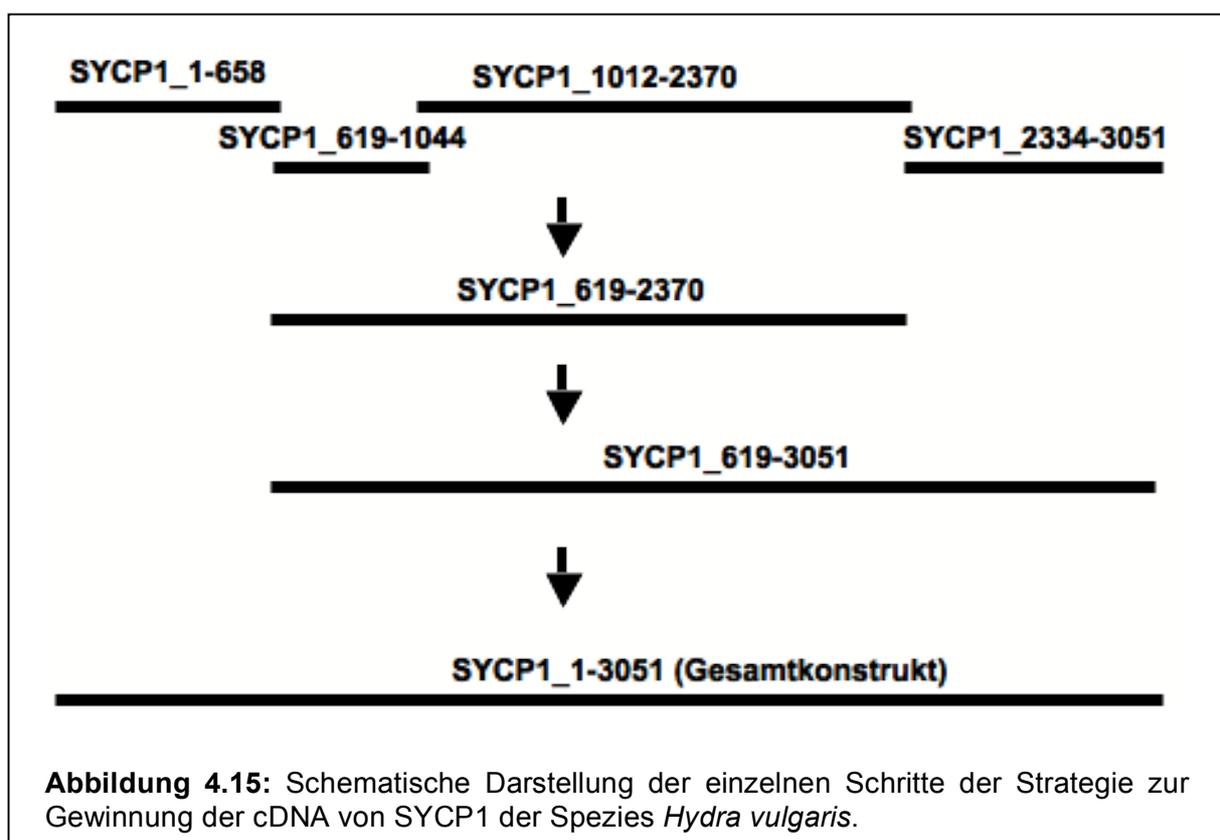
#### **4.3.1 Klonierung der cDNA von Hydra-SYCP1 (HySYCP1)**

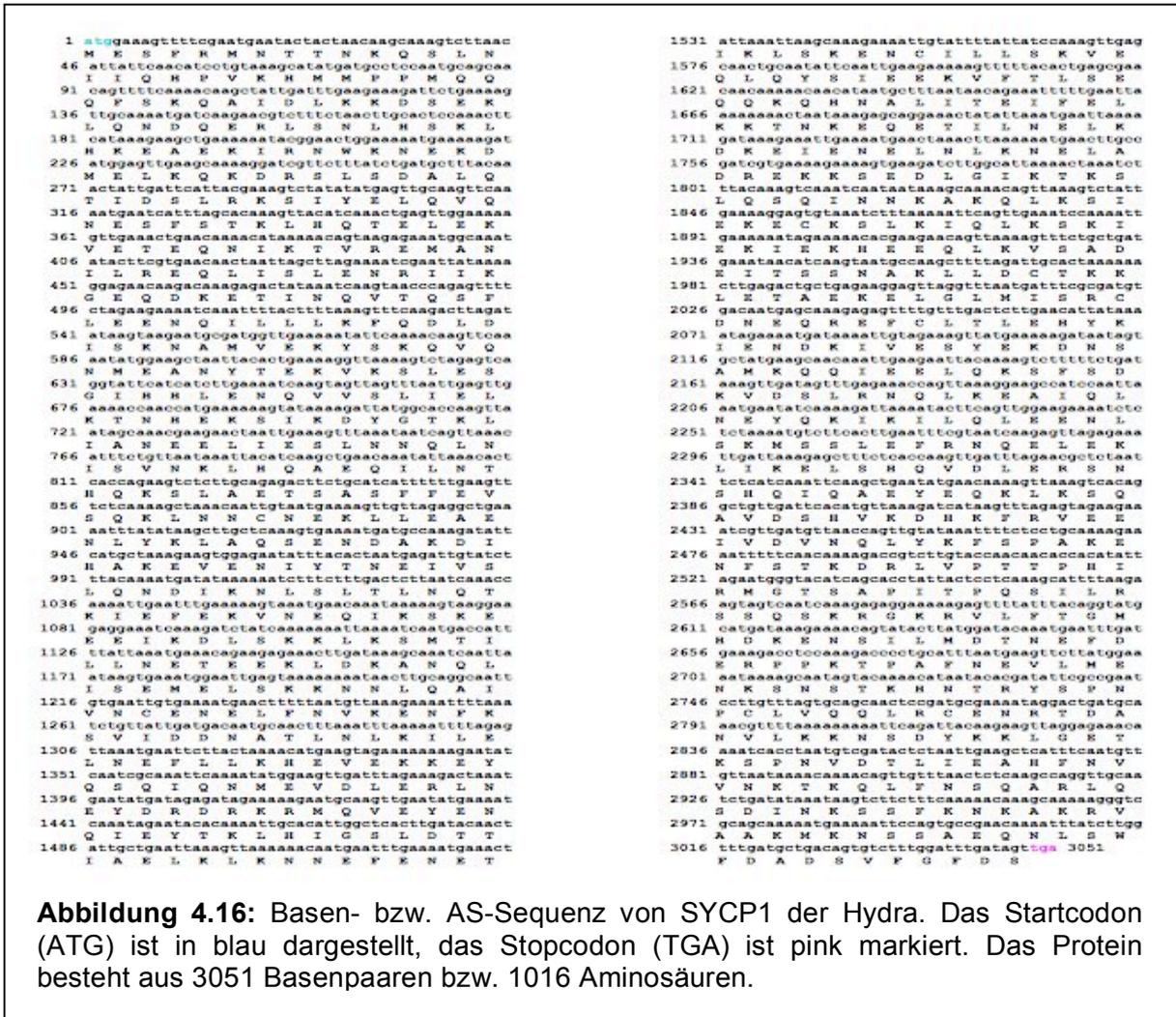
Bei Eintritt in die Sexualperiode durchlaufen die Polypen der *Hydra vulgaris* zunächst eine männliche Phase und dann eine weibliche Phase. Die Gonaden-ähnlichen Strukturen beider Geschlechter treten folglich ab dem Beginn der weiblichen Phase zeitgleich auf. Am Polypen sind sie jedoch in verschiedenen Körperregionen lokalisiert. Die männlichen Strukturen liegen distal, die weiblichen im proximalen Bereich der Gastralregion, direkt über der Knospungszone. Da die Gonaden-ähnlichen Strukturen relativ klein und schwer isolierbar sind, wurden den Polypen mit einer sauberen Rasierklinge großzügig die Kopfregeion mit den Tentakeln und die Fußregion entfernt. Die cDNA von Hydra SYCP1 wurde anschließend über Reverse Transkription (RT) aus der Gastralregion (mit Gonaden-ähnlichen Strukturen und Knospungszonen) von circa. 30 *Hydra vulgaris* gewonnen. Da die mRNA von SYCP1 mit 3016 Nukleotiden relativ lang ist, und sich eine fehlerfreie Amplifikation der cDNA als schwierig erwies, wurde die Gesamtsequenz aus vier überlappenden Teilstücken über mehrere PCRs zusammengefügt und schließlich in den Vektor pCR2.1®-Topo zwischenkloniert.

Das erste Teilstück von 658 Nukleotiden umfasste den 5'-Bereich des Proteins inklusive des Startcodons und wurde mit den spezifischen Primern Hym\_SYCP1\_5'ATG und Hym\_SYCP1\_619\_3' amplifiziert. Das zweite Fragment überlappte in seiner 5'-Region mit dem ersten Teilstück und wurde unter Verwendung der Primer Hym\_SYCP1\_619\_5' und Hym\_SYCP1\_1012\_3' über PCR hergestellt. Das dritte Teilstück überlappte im 5'-Bereich mit dem 2. und im 3'-Bereich mit dem 4. Fragment. Es wurde mit den Primern Hym\_SYCP1\_1012\_5' und Hym\_SYCP1\_3'coil amplifiziert. Für das letzte Fragment wurden die Primer Hym\_SYCP1\_5'coil-Ende und Hym\_SYCP1\_3'TGA\_neu verwendet. Diese vier

Teilstücke des Gesamtproteins wurden anschließend in drei weiteren Schritten über PCR zusammengefügt. Dabei wurden die PCR-Produkte von jeweils zwei überlappenden Teilstücken als Vorlage (Template) für eine neue PCR verwendet. Da die Teilstücke in einem Bereich von circa 40 Nukleotiden komplementär waren, konnten sie innerhalb der jeweiligen PCR aneinander binden und bildeten dabei das zusammengesetzte Template. Durch den Einsatz der spezifischen Primer konnten so die verlängerten Konstrukte entstehen. Über diesen Weg wurden zunächst die Teilstücke 2 und 3 mit den Primern Hym\_SYCP1\_1012\_5' und Hym\_SYCP1\_3'coil zusammengefügt. Das Produkt dieser PCR wurde wiederum mit dem Teilstück 1 verbunden, wobei die Primer Hym\_SYCP1\_5'ATG und Hym\_SYCP1\_3'coil verwendet wurden. Dieses Konstrukt wurde in einer abschließenden PCR mit dem 4. Fragment zum Gesamtproteinkonstrukt verknüpft. Bei diesem letzten Klonierungsschritt wurden die beiden Primer Hym\_SYCP1\_5'ATG und Hym\_SYCP1\_3'TGAneu eingesetzt. Die Strategie ist zu einem besseren Verständnis in Abbildung 4.15 schematisch vereinfacht dargestellt. Die Sequenz von HySYCP1 ist in der Abbildung 4.16 aufgeführt.

Ausgehend von diesem Gesamtproteinkonstrukt im Vektor pCR2.1®-Topo wurden alle nötigen Konstrukte hergestellt und in andere Vektoren umkloniert.





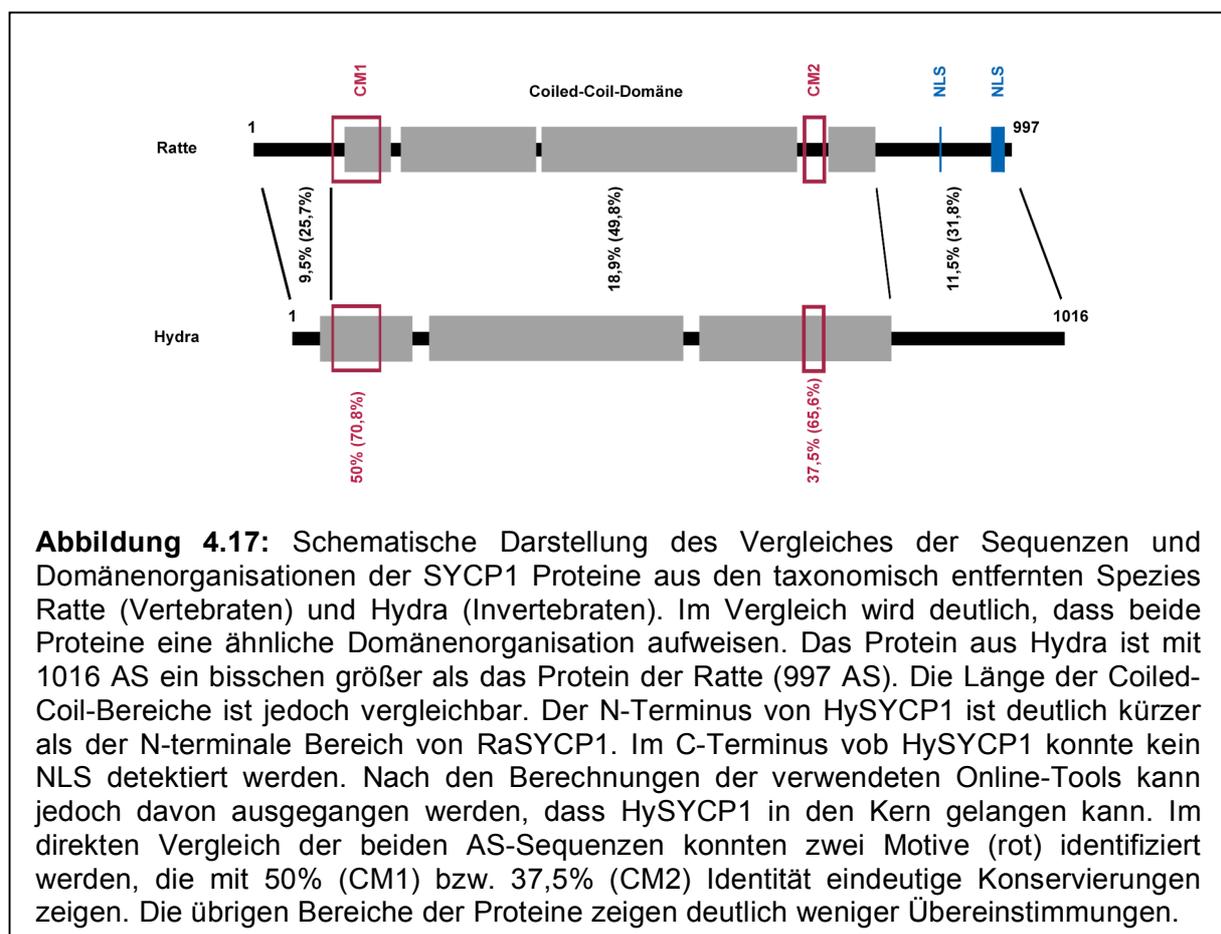
**Abbildung 4.16:** Basen- bzw. AS-Sequenz von SYCP1 der Hydra. Das Startcodon (ATG) ist in blau dargestellt, das Stopcodon (TGA) ist pink markiert. Das Protein besteht aus 3051 Basenpaaren bzw. 1016 Aminosäuren.

### 4.3.2 Sequenzvergleich von SYCP1 zwischen Ratte und Hydra

Ähnlich wie bei Medaka, sollte ein Proteinsequenzvergleich zwischen HySYCP1 und dem orthologen Protein der Ratte erfolgen. Zu dieser Analyse wurde in 4.2.2. bereits benannten Online-Tools deutlich wird, sind sich die beiden Proteine in ihrer Domänenorganisation sehr ähnlich. Beide besitzen eine zentrale  $\alpha$ -helikale Domäne mit Coiled-Coil-Charakter. Diese wird beidseitig von nicht-helikalen Bereichen flankiert. HySYCP1 ist mit einer Differenz von 19 Aminosäuren nur geringfügig länger als das homologe Protein der Ratte. Im Gegensatz zu den homologen Proteinen aus Ratte und Medaka, konnte bei HySYCP1 kein bestimmtes Motiv für eine Kernlokalisierung identifiziert werden. Den Berechnungen der verwendeten Online-Tools zufolge, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass es sich um ein Kernprotein handelt. Ähnlich wie bei den orthologen Proteinen aus Ratte und

Medaka sind zahlreiche Erkennungssequenzen für Proteinkinasen über die gesamte Sequenz von HySYCP1 verteilt.

Den Berechnungen nach Lupas *et al.* (1991) zufolge, erstreckt sich Coiled-Coil-Domäne in der HySYCP1-Sequenz von Aminosäure 37 bis 789 und ist dabei zweifach durch kurze nicht-helikale Bereiche unterbrochen (AS 160-180, AS 516-535). Es ist auffällig, dass der N-terminale Bereich in HySYCP1 mit nur 37 AS deutlich kürzer ist, als der vom SYCP1 der Ratte (120AS). Zudem weisen die N-terminalen Sequenzen aus Ratte und Hydra mit nur 9,5% Identität und 25,7% Ähnlichkeit sehr große Unterschiede auf. Im Vergleich der Coiled-Coil-Bereiche konnte eine Sequenzübereinstimmung von 18,9% und eine Sequenzähnlichkeit von 49,8% ermittelt werden. Die Coiled-Coil-Region von HySYCP1 ist im Vergleich zu RaSYCP1 circa 52 Aminosäuren länger. Auch hier konnten die zwei hoch konservierten Domänen CM1 und CM2 identifiziert werden. Das Motiv CM1 weist im direkten Vergleich eine Übereinstimmung von 50% und sogar 70% Sequenzähnlichkeit auf. Das Motiv ist jedoch mit nur 60 Aminosäuren im Vergleich zum CM1 von Medaka und Ratte (103 AS) deutlich verkürzt. In RaSYCP1 beginnt



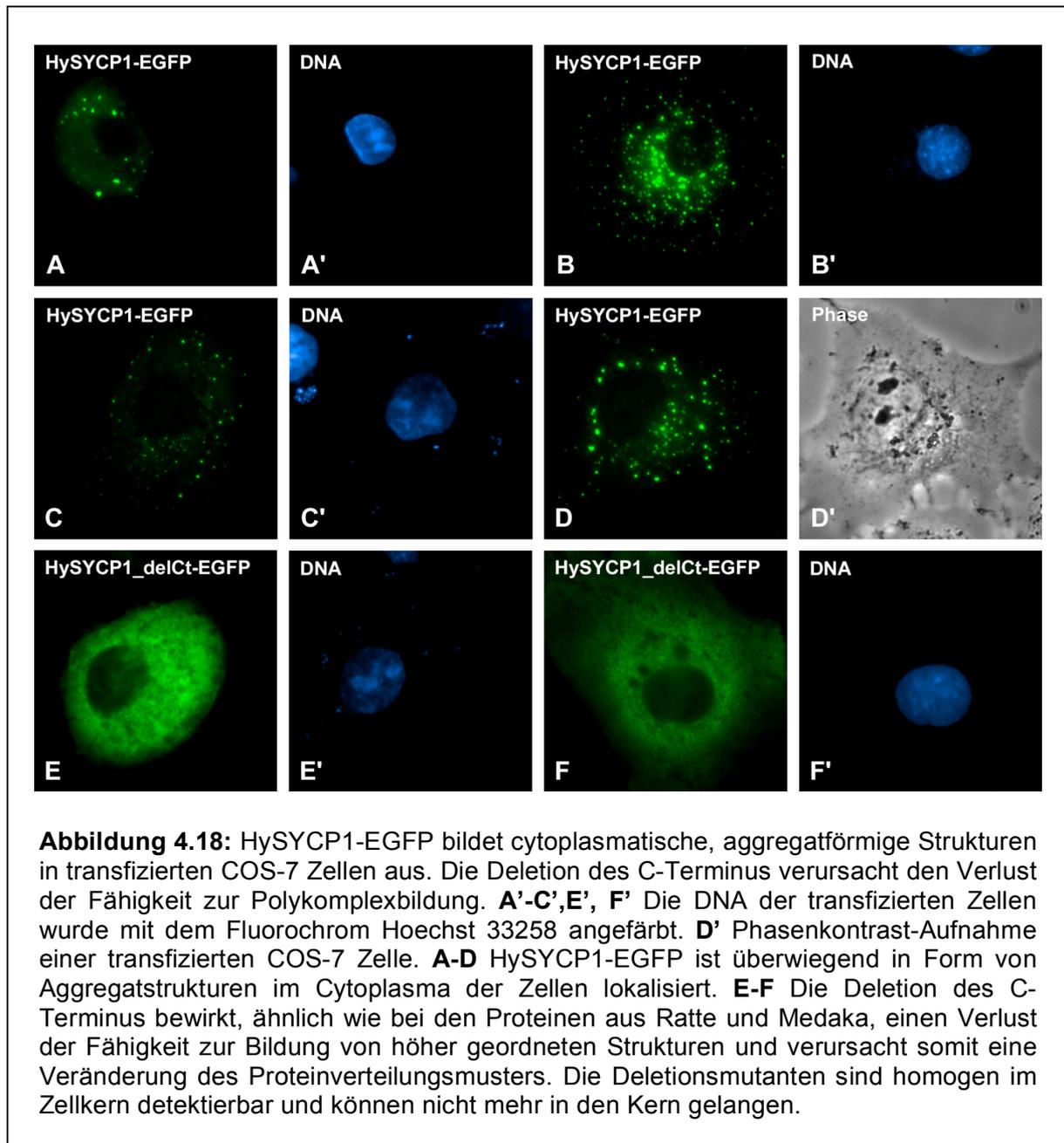
die CM1-Region im nicht-helikalen N-Terminus und geht in die Coiled-Coil-Domäne über. In HySYCP1 liegt sie durch den stark verkürzten N-terminalen Bereich vollständig innerhalb der Coiled-Coil-Domäne. Das zweite konservierte Motiv (CM2) befindet sich in HySYCP1 im hinteren Drittel der Coiled-Coil-Domäne und weist eine Identität von 37,5% und eine Ähnlichkeit von 65,6% mit dem CM2 von RaSYCP1 auf. Die Dimension dieses Motivs ist die gleiche wie bei dem Vergleich zwischen den homologen Proteinen aus Ratte und Medaka. Bei den C-terminalen Sequenzen konnte eine Identität von 11,5% und eine Ähnlichkeit von 31,8% ermittelt werden. Betrachtet man den Vergleich zwischen MeSYCP1 und RaSYCP1 (siehe dazu Abb. 4.6), so sind die Sequenzübereinstimmungen und die Ähnlichkeit der Proteine im Vergleich zwischen Hydra und Ratte deutlich geringer. Dennoch sind in der Domänenorganisation und in den Motiven CM1 und CM2 Konservierungen zu erkennen.

#### **4.3.3 Charakterisierung der Polymerisationseigenschaften von Hydra-SYCP1**

Für einen Vergleich der Polymerisationseigenschaften von RaSYCP1 und dem homologen Protein des Süßwasserpolyphen *Hydra vulgaris* musste zunächst ein entsprechendes Gesamtkonstrukt von HySYCP1 hergestellt werden. Da bis zur Fertigstellung dieser Arbeit kein spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, sollte das Protein als EGFP-Fusionsprotein in den somatischen Kulturzellen exprimiert werden. Hierzu wurde die Gesamtsequenz anhand der DNA HymSYCP1\_ges\_in\_pCR2.1®Topo (Klon 7a1-7; siehe 2.3.4) mithilfe der spezifischen Primer 4+XhoI+HymSYCP1\_5'ATG und HymSYCP1\_3'coil\_+SmaI+4 amplifiziert und über die Schnittstellen XhoI und SmaI in den Vektor pEGFP-C3 inseriert (2.3.4), was zu einer Kopplung des EGFP im N-terminalen Bereich von HySYCP1 führte.

Das resultierende EGFP-Fusionsprotein wurde anschließend in somatischen COS7-Zellen überexprimiert. Die Analyse der Proteinverteilung erwies jedoch als problematisch, da die bisher erreichte Transfektionsrate ungewöhnlich niedrig erschien. Dennoch konnte das Protein in den transfizierten Zellen überwiegend in Form von Aggregat-ähnlichen Strukturen im Cytoplasma detektiert werden (Abb. 4.18 A-D). Bei einem geringen Teil der Zellen konnten auch Aggregate oder eine homogene Verteilung des Proteins innerhalb der Zellkerne lokalisiert werden. Höher geordnete fädige Polykomplexstrukturen konnten nicht detektiert werden.

Ähnlich wie bei den homologen Proteinen von Ratte und Medaka bewirkt eine Deletion der C-terminalen Region bei HySYCP1 eine komplette Veränderung des



Verteilungsmusters in den transfizierten COS-7 Zellen. Es waren keine Aggregate mehr im Cytoplasma detektierbar. Stattdessen konnte eine homogene Verteilung des Proteins im Cytoplasma beobachtet werden, wobei der Kern von der Lokalisation ausgeschlossen war (siehe Abb. 4.18 E, F).

Wie die Untersuchungen an SYCP1 der Hydra zeigten, ist das Protein hinsichtlich seiner Domänenorganisation und innerhalb der beiden spezifischen Sequenzmotive CM1 und CM2 hoch konserviert. Außerdem sind Ähnlichkeiten in den Polymerisationseigenschaften der Proteine aus den taxonomisch weit entfernten Spezies Ratte, Medaka und Hydra zu erkennen, was zusätzlich für eine wichtige Funktion des Proteins spricht.

## 5. Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation konnte ein bedeutender Schritt zu einem besseren Verständnis der SC-Struktur der Säugetiere gemacht werden. Bisher war nicht bekannt, wie die Transversalfilamente des SC bei der Verknüpfung der homologen Chromosomen mit den Lateralelementen in Verbindung treten. Daher wurde innerhalb dieser Arbeit SYCP1 hinsichtlich seiner Bindungspartner innerhalb der SC-Struktur untersucht. Im Vordergrund stand dabei die Frage, ob SYCP1 eine Bindungsfähigkeit zu SYCP2 besitzt. Eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen könnte das fehlende Bindeglied zwischen den Lateralelementen und Transversalfilamenten darstellen.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Erforschung der Evolution der Synapse. Die Struktur des Synaptonemalkomplexes ist evolutionär hochkonserviert. Nach den bisherigen Erkenntnissen wurde angenommen, dass die Proteinbestandteile des SC in den verschiedenen Modellorganismen zwar funktionelle Gemeinsamkeiten aufweisen, aber nicht ortholog sind (Page und Hawley, 2004). Mit der Identifizierung der Proteine SYCP1 und SYCP3 in der Fischart Medaka wurden erstmals SC-Proteinkomponenten in Vertebraten entdeckt, die nicht von einem Säuger stammten (Iwai *et al.*, 2006). In einem Vergleich der Lateralelementproteine SYCP3 aus Ratte und Medaka konnte gezeigt werden, dass SYCP3 Konservierungen in zwei bestimmten Sequenzmotiven, in der Domänenorganisation und im Polymerisationsverhalten aufweist (Baier *et al.*, 2007a und b). Innerhalb dieser Dissertation wurde zunächst ein Vergleich der Transversalfilamentproteine SYCP1 zwischen Ratte und Medaka durchgeführt. Aus diesem gingen zwei hoch konservierte Sequenzmotive hervor (CM1 und CM2), die in einer Datenbankanalyse mit Proteinen anderer Spezies auf Sequenzübereinstimmungen überprüft wurden. Dabei konnte ein Protein ermittelt werden, welches sowohl das CM1, als auch das CM2 enthielt. Das Protein stammt aus dem Süßwasserpolyphen *Hydra vulgaris* und könnte das homologe Protein zu SYCP1 darstellen. In Invertebraten konnten bisher nur Transversalfilamentproteine identifiziert werden, die funktionelle Homologien zeigten, aber nicht ortholog zum SYCP1 der Säuger waren (Page und Hawley, 2004). Der Vergleich zwischen den SYCP1 Proteinen aus Ratte und Hydra sollte nun zeigen, ob möglicherweise doch

eine Konservierung hinsichtlich der Sequenzmotive, Domänenorganisation und im Polymerisationsverhalten besteht.

### **5.1 Die Interaktion von SYCP1 und SYCP2 – das mögliche Bindeglied zwischen den Transversalfilamenten und den Lateralelementen des SC**

Während der Prophase I der ersten meiotischen Teilung werden die homologen Chromosomen über die proteinöse Struktur des SC reißverschlussartig miteinander verknüpft. Dabei erstrecken sich die Lateralelemente entlang der Chromosomenachsen und werden von den Transversalfilamenten miteinander verknüpft (Zickler und Kleckner, 1998; Page und Hawley, 2004; Costa und Cooke, 2007). Bisher war aber unklar wie die Transversalfilamente innerhalb der SC-Struktur in den Lateralelementen verankert sind. SYCP2 und SYCP3 bilden die Hauptproteinkomponenten der LEs. SYCP3 bindet an SYCP2 und ist zudem in der Lage höher geordnete Strukturen auszubilden (Tarsounas *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 1998; Pelttari *et al.*, 2001; Liebe *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006; Baier *et al.*, 2007a). Auch SYCP1 bildet komplexe Strukturen aus und wurde als essentielles Protein der Transversalfilamente identifiziert (de Vries *et al.*, 2005, Öllinger *et al.*, 2005). Innerhalb des SC bildet es parallel orientierte Dimere, deren C-Termini in die Lateralelemente ragen und deren N-Termini in einer Kopf-an-Kopf-Anordnung im Zentralen Element überlappen (Liu *et al.*, 1996; Schmekel *et al.*, 1996). Zusammen mit den Proteinen SYCE1, SYCE2 und TEX12 sind die N-Termini an der Ausbildung der elektronendichten Struktur des Zentralen Elements beteiligt (Öllinger *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2005; Hamer *et al.*, 2006; Bolcun-Filas *et al.*, 2007; Hamer *et al.*, 2008). Aufgrund der Tatsache, dass keine Interaktion zwischen SYCP1 und SYCP3 zu bestehen scheint (Liu *et al.*, 1996; Tarsounas *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 1998; Pelttari *et al.*, 2001; Abbildung 4.5D”), sollte eine mögliche Bindung zwischen den Proteinen SYCP1 und dem anderen Lateralelementprotein SYCP2 untersucht werden. SYCP2 könnte unter Umständen das fehlende Bindeglied zwischen den Lateralelementen und den Transversalfilamenten des SC sein. Um dies analysieren zu können, wurden in Vorbereitung auf diese Arbeit eine Vielzahl rekombinanter Konstrukte für verschiedenste Experimentssysteme hergestellt und nötige Vortests durchgeführt (siehe Diplomarbeit Winkel, 2006).

Die Interaktion zwischen den beiden SC-Hauptproteinkomponenten SYCP1 und SYCP2 konnte im Rahmen dieser Dissertation erstmals gezeigt und in verschiedenen Systemen bestätigt werden (Winkel *et al.*, 2009). Im Hodenextrakt der Ratte konnte SYCP2 zusammen mit SYCP1 ko-immunpräzipitiert werden. Hierzu diente ein spezifischer Antikörper gegen den C-terminalen Bereich von SYCP1 (Winkel *et al.*, 2009; siehe auch Abb. 4.4). In zusätzlichen Immunfluoreszenzanalysen von somatischen COS-7 Kulturzellen, die gleichzeitig wildtypisches SYCP1 und SYCP2-EGFP überexprimierten, konnte ebenfalls eine Interaktion zwischen den Proteinen nachgewiesen werden. SYCP1wt und SYCP2-EGFP veränderten bei der Koexpression ihre Verteilungsmuster und kolokalisierten in cytoplasmatischen Strukturen. Diese Kolokalisation konnte als Bindung interpretiert werden (Diplomarbeit Winkel, 2006; Winkel *et al.*, 2009; siehe auch Abb. 4.5 C-C''). Zur Kontrolle wurden nach dem gleichen Prinzip wildtypisches SYCP1 und wildtypisches SYCP3 in COS-7 Kulturzellen koexprimiert. Beide Proteine bildeten zwar cytoplasmatische Strukturen aus, diese aber waren völlig unabhängig voneinander und zeigten keinerlei Kolokalisation (Winkel *et al.*, 2009; Abb. 4.5 D-D''). Im einem Pull-Down-Experiment war es nur dann möglich SYCP2 aus dem Hodenextrakt zu fischen, wenn His<sub>6</sub>-Epitop-markierte SYCP1-C-Termini als Köder verwendet wurden (Winkel *et al.*, 2009; Abb.4.3). Eine Bindung des Proteins an ebenso markierte SYCP1-N-Termini konnte nicht detektiert werden. Diese Ergebnisse befinden sich im Einklang mit den bisherigen Erkenntnissen über die Orientierung der SYCP1-Dimere innerhalb der SC-Struktur. Denn räumlich betrachtet, ist eine Interaktion zwischen SYCP2 und den N-Termini der SYCP1-Dimere nicht möglich, da diese innerhalb des Zentralen Elements überlappen und circa 50 nm von den Lateralelementen entfernt sind.

Die Ergebnisse konnten auch im Yeast-Two-Hybrid-System bestätigt werden. Hier wurden die N- und C-Terminus-Konstrukte von SYCP1 mit einem His<sub>6</sub>-Epitop markiert und auf ihre Bindungsfähigkeit an SYCP2 getestet. Eine Interaktion mit SYCP2 erfolgte, wie erwartet, nur beim SYCP1-C-Terminus (Winkel *et al.*, 2009; siehe auch Abbildung 4.1.C). Interaktionsstudien zwischen SYCP2 und dem N-Terminus von SYCP1 verliefen negativ (Winkel *et al.*, 2009; Abb. 4.1D)

In einem weiteren Schritt sollte die SYCP1-Bindungsregion auf einen möglichst kleinen Bereich SYCP2-Sequenzbereich begrenzt werden. Auch dies erfolgte in mehreren Systemen. In vorangegangenen Immunfluoreszenzstudien an kotrans-



von SYCP1 120 Aminosäuren aus um mit weiteren SYCP1-N-Termini, sowie den Proteinen SYCE1 und SYCE2 interagieren zu können (Liu *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 2005; Hamer *et al.*, 2006).

Die essentielle Rolle der SC Proteine während der Meiose konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, vor allem durch die Generierung verschiedenster Knock-out-Mäuse bzw. genetisch veränderter Tiere. In *Sycp1*<sup>-/-</sup>-Mäusen beispielsweise kommt es zur normalen Ausbildung der Axial- bzw. Lateralelemente. Durch die fehlenden Transversalfilamente jedoch, kann keine Synapsis erfolgen (de Vries *et al.*, 2005; de Boer *et al.*, 2006). In *Sycp3*<sup>-/-</sup>-Mäusen kann SYCP2 nicht mehr an die Chromosomenachsen binden. Als Folge dessen kommt es zur Unterdrückung der Axial- bzw. Lateralelementbildung (Yuan *et al.*, 2000; Liebe *et al.*, 2004). In Mäusen, die kein wildtypisches SYCP2 bilden können, sondern nur ein mutiertes Protein mit einer Deletion des Coiled-Coil-Bereiches (SYCP2t), zeigte sich ein ähnliches Bild (Yang *et al.*, 2006). Durch die Deletion ging die Bindungsfähigkeit zwischen dem mutierten Protein SYCP2t und SYCP3 verloren und letzteres konnte nicht mehr entlang der Chromosomenachsen lokalisiert werden (Yang *et al.*, 2006). Obwohl auch hier keine Lateralelemente ausgebildet werden konnten, wurde SYCP2t dennoch in Axialelement-ähnlichen Strukturen entlang der Chromosomenachsen detektiert. Diese Beobachtungen befinden sich nicht im Einklang mit den Ergebnissen aus den bisherigen Studien mit *Sycp3*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Dabei scheint SYCP3 notwendig zu sein, um SYCP2 an die AEs zu rekrutieren. Der Effekt in den *Sycp2t*-Mäusen könnte aber auch mit einer Deletionsbedingten Veränderung des Proteinverhaltens erklärt werden. Eine konkrete Aussage kann jedoch erst dann erfolgen, wenn eine *Sycp2*<sup>-/-</sup>-Maus generiert wurde und deren Phänotypen bekannt sind. Ein weiterer Effekt, der in den beiden Mauslinien beobachtet werden konnte, ist die Bildung von SC-ähnliche Abschnitten vermittelt durch SYCP1-Moleküle. Trotz fehlender Lateralelemente konnten so die homologen Chromosomen über geringe Distanzen miteinander verknüpft werden (Yuan *et al.*, 2000; Liebe *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006). Diese transversalfilamentähnlichen Strukturen können jedoch nicht auf eine Interaktion zwischen SYCP1 und SYCP2 zurückzuführen sein. Denn in *Sycp3*<sup>-/-</sup>-Mäusen ist SYCP2 nicht entlang der Chromosomenarme detektierbar und somit auch nicht in den Lateralelementen vorhanden (Yuan *et al.*, 2000; Liebe *et al.*, 2004). Dem mutierten Protein der *Sycp2t*-Mäuse fehlt die Coiled-Coil-Domäne und somit die Bindungsregion für SYCP1 (Yang *et al.*, 2006). Doch aufgrund der zahlreichen

putativen DNA-Bindungsmotive im C-terminalen Bereich der SYCP1-Proteinsequenz besteht die Möglichkeit, dass das Protein in einem gewissen Grad auch unabhängig von SYCP2 an die Chromosomen binden kann (Meuwissen *et al.*, 1992, Dobson *et al.*, 1994; Pelttari *et al.*, 2001), was die Ausbildung der besagten Strukturen erklären könnte. Die Phänotypen der beiden Mauslinien zeigen jedoch, dass diese Bindung zwischen SYCP1 und der DNA zur Bildung einer stabilen Synapse nicht auszureichen scheint. Folglich sind zur Ausbildung eines stabilen SC sowohl die beiden Lateralelementproteine SYCP2 und SYCP3, als auch das Transversalfilamentprotein SYCP1 essentiell. Somit ist auch die Bindung zwischen SYCP2 und SYCP1 eine notwendige Grundlage für die stabile Synapsenbildung zwischen den homologen Chromosomen (Winkel *et al.*, 2009).

Anhand der Erkenntnisse aus bisherigen Studien und den Ergebnissen dieser Arbeit wird deutlich, dass sich die Struktur des Synaptonemalkomplexes aus einem Zusammenspiel zahlreicher Protein-Protein-Interaktion ergibt. Diese Bindungen können zum einen homotypischer Natur sein. Ein Beispiel dafür sind die Transversalfilamentbildenden Dimere von SYCP1 (Liu *et al.*, 1996; Schmekel *et al.*, 1996; Öllinger *et al.*, 2005). Weiterhin wurden in den Lateralelementen Homodimere von SYCP3 (Yuan *et al.*, 1998; Baier *et al.*, 2007b) und innerhalb des Zentralen Elements homotypischen Dimere von SYCE1 und SYCE2 (Costa *et al.*, 2005) identifiziert. Andererseits wurden zahlreiche heterotypische Interaktionen innerhalb des SC beschrieben. So zum Beispiel die Bindung zwischen SYCP2 und SYCP3 innerhalb der Axial- bzw. Lateralelemente (Tarsounas *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2006). Im Zentralen Element sind Interaktionen von SYCP1 mit SYCE1 und SYCE2 (Costa *et al.*, 2005), sowie Bindungen zwischen TEX12 und SYCE2 (Hamer *et al.*, 2006) nachweisbar.

Innerhalb dieser Arbeit konnte die Interaktion zwischen SYCP2 und den C-Termini der SYCP1-Dimere identifiziert werden. Wie in Abbildung 5.1 schematisch dargestellt ist, könnte diese Interaktion das fehlende Bindeglied zwischen den strukturellen Grundbausteinen des SC sein. Ob die Bindung der beiden Proteine ausreicht um die Transversalfilamente in den Lateralelementen zu verankern, muss in weiteren Studien untersucht werden. Experimente mit *Sycp3*<sup>-/-</sup> Knock-out-Weibchen haben gezeigt, dass sich SC-ähnliche Strukturen ausbilden können auch ohne das SYCP3 und SYCP2 in den Axial- bzw. Lateralelementen vorkommen (Yuan *et al.*, 2000, 2002). Ob diese Strukturen so stabil sind wie herkömmliche SC ist fraglich, die Tiere

konnten zwar Nachkommen erzeugen, die Wurfgröße war jedoch deutlich reduziert. In den männlichen Knock-out-Tieren führte das Fehlen von SYCP3 zu Apoptose der meiotischen Zellen innerhalb des Zygotäns (Yuan *et al.*, 2000, Liebe *et al.*, 2004). Somit ist es wahrscheinlich, dass auch weitere Proteine an der Verknüpfung der Lateralelemente und Transversalfilamente beteiligt sein. SYCP2 könnte dabei eine neben der Bindegliedfunktion auch eine stabilisierende Rolle übernehmen. Vermutlich ist es ein Zusammenspiel einzelner Proteinkomponenten, also eine Art Kettenreaktion, bei der eine Bindung den Grundstein für die nächste legt. Betrachtet man die Phänotypen der zahlreichen Knock-out-Mäuse, so wird deutlich, dass der Verlust einer der Proteinkomponenten des SC gravierende Folgen für die Synapsenbildung und Segregation der Homologen mit sich bringt. Wie und in welcher zeitlichen Reihenfolge sich die einzelnen Proteinkomponenten letztendlich zu einer komplexen Struktur zusammenfügen und wie der eigentliche Auf- und Abbau des SC erfolgt, ist noch weitgehend unklar und muss in zukünftigen Experimentreihen geklärt werden.

## **5.2 Ein Vergleich von SYCP1 aus Ratte, Medaka und Hydra – Die Proteine weisen eine konservierte Domänenorganisation und Polymerbildung auf, besitzen evolutionär erhaltene Motive und können speziesübergreifend interagieren**

Im Jahr 2006 wurden die orthologen SC-Proteine SYCP1 und SYCP3 in der Fischart Medaka entdeckt und deren Expressionsmuster in meiotischen Zellen untersucht (Iwai *et al.*, 2006). In einer weiteren Studie (Baier *et al.*, 2007a) an SYCP3 konnte gezeigt werden, dass die orthologen Proteine aus Ratte und Medaka konservierte Sequenzmotive besitzen und eine evolutionär erhaltene Domänenorganisation aufweisen. Zudem zeigen die SYCP3-Moleküle beider Spezies bei der Transfektion in somatischen Kulturzellen (COS-7) ein konserviertes Polymerisationsverhalten und können sogar untereinander binden und gemeinsame höher geordnete Strukturen ausbilden (Baier *et al.*, 2007a). Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass entgegen der bisherigen Annahmen, scheinbar doch evolutionäre Konservierungen in den SC-Proteinkomponenten vorliegen. Um den SC-Aufbau und seine evolutionäre Erhaltung besser verstehen zu können, wurde in

dieser Arbeit ein Vergleich der Transversalfilamentproteine SYCP1 aus den taxonomisch entfernten Spezies Ratte und Medaka durchgeführt. Dieser sollte zeigen, ob auch weitere Proteinkomponenten des SC Konservierungen aufzeigen. In beiden Modellorganismen ist SYCP1 die Hauptproteinkomponente der Transversalfilamente und spielt somit eine zentrale Rolle bei der Synapsenbildung (Meuwissen *et al.*, 1992; Dobson *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1996; Schmekel *et al.*, 1996; de Vries *et al.*, 2005; Iwai *et al.*, 2006). Anhand zweier hoch konservierter Sequenzmotive, die aus dem Vergleich zwischen SYCP1 aus Ratte und Medaka hervorgingen, wurde anschließend innerhalb einer Datenbankanalyse ein Protein aus dem Süßwasserpolyphen *Hydra vulgaris* gefunden. Da es sich bei dem Protein unter Umständen um das homologe Protein SYCP1 handeln konnte, wurde es mit dem SYCP1 der Ratte verglichen und hinsichtlich seiner Polymerisationseigenschaften im heterologen System untersucht.

### **5.2.1 Die homologen Proteine SYCP1 aus Ratte, Medaka und Hydra besitzen evolutionär erhaltene Sequenzmotive, eine hoch konservierte Domänenorganisation und zeigen gleiche Polymerisationseigenschaften**

Der direkte Vergleich hinsichtlich der Aminosäuresequenzen und der Domänenstruktur von SYCP1 hat gezeigt, dass die Proteine, trotz der evolutionär bedingten Anhäufung von Sequenzunterschieden, eine konservierte Organisation der Domänen aufweisen. Bei den homologen Proteinen aus Ratte und Medaka konnten zwei Motive (CM1 und CM2, Abb. 4.6) identifiziert werden, die einen hohen Grad an Konservierung aufzeigten. Während die Proteinsequenzen insgesamt relativ geringe Übereinstimmungen aufwiesen, konnte in diesen Regionen eine hohe Identität errechnet werden (CM1: 63%, CM2: 59%; Abbildung 4.6). Das konservierte Motiv CM1 umfasst im Vergleich zwischen Ratte und Medaka 103 Aminosäuren und beginnt in beiden Proteinen im nicht-helikalen N-Terminus, geht dann aber in den Coiled-Coil-Bereich über. Das zweite konservierte Motiv CM2 besteht aus 32 Aminosäuren und ist innerhalb der Coiled-Coil-Regionen der Proteine lokalisierbar. Aufgrund des hohen Konservierungsgrades dieser beiden Sequenzmotive wurde, wie bereits erwähnt, eine Datenbankanalyse durchgeführt, in der die Motive mit Proteinen anderer Spezies verglichen wurden. Anhand dieser Analyse konnte eine Proteinsequenz des Süßwasserpolyphen *Hydra vulgaris* aus einzelnen EST-Sequenzen zusammengestellt werden, die der des homologen Proteins SYCP1 entsprechen könnte. Diese Sequenz umfasst 1015 AS und ist damit länger als

RaSYCP1 (997 AS) und MeSYCP1 (895 AS). Im direkten Vergleich der Proteinsequenzen von SYCP1 aus Ratte und Hydra, gehen die evolutionär erhaltenen Motive CM1 und CM2 hervor. Das konservierte Motiv CM1 umfasst dabei jedoch nur 60 Aminosäuren. Dies entspricht dem vorderen Bereich des CM1 aus dem Vergleich zwischen Medaka und Ratte (103 AS). Unter Umständen muss die Dimension des konservierten Motivs CM1 allgemein auf 60 Aminosäuren reduziert werden. Hierzu wäre ein breit gefächelter Vergleich zwischen den SYCP1-Sequenzen weiterer Spezies sehr hilfreich. Dieser würde zeigen, ob sich die Motive auch in den anderen Spezies wieder finden und welche Ausmaße sie dort annehmen. Erst dann könnte man eine endgültige Sequenzlänge des Motivs bestimmt werden. Das konservierte Motiv CM2 konnte in allen drei Spezies detektiert werden und umfasst 32 Aminosäuren. Welche Funktion die beiden Domänen übernehmen ist bisher jedoch völlig unklar.

Den Berechnungen nach Lupas *et al.*, 1991 zufolge besitzen sowohl RaSYCP1, als auch MeSYCP1 und HySYCP1 eine zentrale  $\alpha$ -helikale Domäne mit Coiled-Coil-Charakter. Diese wird von zwei nicht-helikalen Regionen im N- und C-terminalen Bereich flankiert. Im C-Terminus der Proteine aus Ratte und Medaka befinden sich Kernlokalisierungssignale. Derartige Sequenzmotive konnten bei HySYCP1 nicht identifiziert werden. Dennoch kann aufgrund der Sequenzeigenschaften davon ausgegangen werden, dass es sich um ein Kernprotein handelt. Bei einer Betrachtung der Domänenstruktur (Abbildung 4.6 und 4.17) und wird deutlich, dass die N- und C-terminalen Bereiche der Proteine aus Ratte und Medaka in etwa gleiche Ausmaße besitzen. Der N-terminale Bereich von HySYCP1 ist hingegen deutlich verkürzt. Beim SYCP1 der Ratte setzt sich der zentrale Coiled-Coil-Bereich aus vier einzelnen Domänen zusammen. Bei HySYCP1 sind es drei Untereinheiten und MeSYCP1 besitzt eine zweigliedrige Coiled-Coil-Domäne. Diese ist im Vergleich zu Hydra und Ratte in ihrer Dimension deutlich verkürzt, was möglicherweise aus einer Deletion der  $\alpha$ -helikalen Region im Verlauf der Evolution hervorgegangen sein könnte.

Der hier gezeigte Vergleich zwischen den SYCP1 Proteinen aus Ratte, Medaka und Hydra besitzt ein enormes Ausmaß, wenn man bedenkt, dass er einen großen Teil des Reiches der Metazoa umfasst. Zum einen ist es der Vergleich zwischen höheren und niederen Vertebraten, den Säugern und Fischen, die sich in circa 450 Millionen Jahren der Evolution deutlich auseinander entwickelt haben. Zum anderen wird noch

tiefer in die Evolution der Metazoa eingedrungen, indem die Transversalfilamentproteine aus Vertebraten (Ratte) und niederen Invertebraten (Hydra) miteinander verglichen wurden, die taxonomisch noch weiter voneinander entfernt sind. Zwischen höheren Vertebraten, wie den Nagern, und niederen Invertebraten, wie der Hydra, liegen mehr circa 500 Millionen Jahre Evolution. Im Vergleich wird deutlich, dass sich die SYCP1 Proteine der drei Spezies hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenzen deutlich auseinander entwickelt haben. Der hohe evolutionäre Erhaltungsgrad der Motive CM1 und CM2 lässt jedoch vermuten, dass diese spezifischen Sequenzmotive eine essentielle Rolle in der Funktion der Transversalfilamentproteine spielen könnten. Durch eine Deletion der einzelnen oder beider Motive und eine anschließende Analyse der Polymerisationseigenschaften der mutanten Proteine könnten möglicherweise Anhaltspunkte für deren Funktion gefunden werden. Der Vergleich liefert deutliche Indizien dafür, dass es sich bei den SYCP1 Proteinen der hier untersuchten Spezies um homologe Proteine handelt. Zukünftige Studien müssen zeigen, ob die beiden Motive auch in den anderen Modellorganismen, vor allem in Invertebraten, wie *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans*, detektiert werden können, bei denen bisher keine Homologien festgestellt werden konnten (Page und Hawley, 2004).

Ein weiteres sehr interessantes Ergebnis dieser Arbeit ist die Erkenntnis, dass neben der sehr ähnlichen Domänenorganisation und den beiden Sequenzmotiven CM1 und CM2, zusätzlich eine deutliche Konservierung der SYCP1-Polymerisationseigenschaften besteht. Wie aus vorangegangenen Studien an Nagern bekannt war (Öllinger et al., 2005), bildet das SYCP1 der Ratte in somatischen COS-7 Zellen bei Überexpression filamentöse Netzwerkstrukturen und Aggregate im Cytoplasma aus, die als Polykomplexe bezeichnet werden. Um das Polymerisationsverhalten der Proteine aus Medaka und Hydra mit denen der Ratte vergleichen zu können, musste zunächst die cDNA von MeSYCP1 und HySYCP1 gewonnen und anschließend in entsprechende Expressionsvektoren inseriert werden. Durch die Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen den C-Terminus von MeSYCP1 konnte neben dem EGFP-Fusionsprotein MeSYCP1-EGFP auch das wildtypische Protein in den Zellen spezifisch nachgewiesen werden. Die Herstellung eines solchen Antikörpers gegen HySYCP1 wurde ebenfalls in Auftrag gegeben, konnte aber nicht vor dem Abschluss dieser Arbeit fertig gestellt werden. Demzufolge konnten die Polymerisationsstudien von HySYCP1 nur mit dem entsprechenden EGFP-Fusionsprotein erfolgen.

Wie die Immunfluoreszenz-Aufnahmen der transfizierten COS-7 Zellen in Abbildung 4.9 zeigen, waren sowohl das wildtypische Protein (Abb. 4.9 A-C), als auch das EGFP-Fusionsprotein (Abb. 4.10 A-C) von MeSYCP1 in der Lage höher geordnete Strukturen im Cytoplasma zu bilden. Bei diesen Strukturen handelte es sich entweder um lang gestreckte, netzartig verzweigte Filamente oder punktförmige Aggregate. In den restlichen Zellen waren die Proteine in den Zellkernen lokalisiert und bildeten dort größtenteils punktförmige Aggregate (Abb. 4.9 D, 4.10 D). Auf ultrastruktureller Ebene konnte gezeigt werden, dass sich die Proteine innerhalb der Polykomplexe zu höher geordneten, SC-ähnlichen Strukturen organisierten (Abb. 4.11). Die Proteinverteilung von MeSYCP1 in den COS-7 Zellen war vergleichbar mit den publizierten Ergebnissen für das rattenspezifische Protein (Öllinger et al., 2005). Bei Transfektionen der COS-7 Kulturzellen mit dem HySYCP1-EGFP-Fusionsprotein konnten ebenfalls cytoplasmatische Aggregate detektiert werden (Abb. 4.18 A-D). Faserartige Polykomplexstrukturen wurden jedoch nicht gefunden. Dies könnte möglicherweise eine Folge der Fusion mit dem EGFP sein. Untersuchungen an COS-7 Zellen, die das wildtypische Protein überexprimieren, würden zeigen, ob die Fusion mit dem EGFP Auswirkungen auf die Bildung höher geordneter Strukturen hat. Desweiteren könnte auch der im Vergleich zu RaSYCP1 und MeSYCP1 stark verkürzte N-Terminus von HySYCP1 eine Rolle bei der Polykomplexbildung spielen. Eine Untersuchung der Aggregatförmigen Strukturen von HySYCP1-EGFP auf ultrastruktureller Ebene würde Aufschluss über die Organisation der cytoplasmatischen Strukturen geben. Dabei würde sich zeigen, ob es sich um eine SC-ähnliche Anordnung der Proteinmoleküle handelt. Die Versuche konnten jedoch aufgrund der unerwartet niedrigen Transfektionsrate bisher nicht durchgeführt werden. Die Gründe für die ungewöhnlich geringe Transfektionsrate sollen zukünftig durch Modifikationen innerhalb der Methode geklärt werden. Erst wenn dadurch eine höhere Transfektionsrate erreicht werden kann, wäre es möglich entsprechende elektronenmikroskopische Studien durchzuführen. Desweiteren soll die Klonierung und anschließende Transfektion des wildtypischen HySYCP1 zeigen, ob die Fusion mit dem EGFP die Expression des Proteins in den somatischen Zellen beeinträchtigt, oder möglicherweise ein anderes Expressionsmuster im Vergleich zum wildtypischen Protein hervorruft. Hierzu ist jedoch auch ein spezifischer Antikörper gegen HySYCP1 notwendig, der bisher noch nicht verfügbar ist.

Die Deletion des C-terminalen Bereiches von RaSYCP1 bewirkte den Verlust der Fähigkeit zur Polykomplexbildung (Öllinger et al., 2005). Auch dieses Phänomen konnte in den homologen Proteinen aus Medaka und Hydra bestätigt werden. Denn wie in den Abbildungen 4.10. E, F und 4.18 E, F deutlich erkennbar ist, waren die Moleküle der Deletionsmutanten ebenfalls homogen im Cytoplasma verteilt. Eine Polykomplex- oder Aggregatbildung, sowie eine Lokalisation der Proteine in den Zellkernen konnte nicht mehr erfolgen. Demnach ist auch bei MeSYCP1 und HySYCP1 der C-Terminus essentiell, damit die Proteine höher geordnete Strukturen ausbilden können bzw. in den Kern transportiert werden.

Das gesamte Verhalten der homologen Proteine aus Ratte, Medaka und Hydra scheint im heterologen System, also in Abwesenheit anderer meiotischer Proteine, speziesübergreifend vergleichbar zu sein. Dies deutet auf eine Konservierung der Proteine hin, was wiederum für eine essentielle Funktion von SYCP1 innerhalb der Meiose spricht. Denn wenn man betrachtet, dass sich zwischen den Spezies in circa 450 bis 500 Millionen Jahren Evolution zahlreiche Sequenzunterschiede angehäuft haben, so ist ein derartig hoher Grad an Konservierung der Polymerisationseigenschaften sehr beachtlich. SYCP1 scheint folglich auch anderen Gruppen von Vertebraten und sogar in niederen Invertebraten ein wichtiger struktureller Bestandteil des Synaptonemalkomplexes während der ersten meiotischen Teilung zu sein.

### **5.2.2 Die Proteine SYCP1 aus Ratte und Medaka können speziesübergreifend interagieren und bilden dabei höher geordnete Strukturen aus**

Über Kotransfektionen mit den Kombinationen RaSYCP1wt/MeSYCP1wt (Abb. 4.12 A) oder RaSYCP1wt/MeSYCP1-EGFP (Abb. 4.12 B) konnte gezeigt werden, dass die homologen Proteine sowohl in den höher geordneten cytoplasmatischen Strukturen, als auch in den Zellkernen kolokalisierten. Außerdem erhöhte sich die Polykomplexrate auf 59% bzw. 63%, was dafür spricht, dass sich die Proteine gegenseitig in ihrer Polykomplexbildung positiv beeinflussen. Dennoch stellte sich die Frage, ob dieser Effekt eine Folge direkter Interaktionen ist, oder ob sich die Proteine nur an den komplexen Netzwerken des anderen orientieren und daher kolokalisierten. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurde der Einfluss der C-Terminusdeletion auf die Polykomplexbildung untersucht. Zunächst wurde die Deletionsmutante zusammen mit dem wildtypischen Protein der gleichen Spezies kotransfiziert. Sowohl in der Kombination RaSYCP1wt/RaSYCP1\_delCt-myc (Abb.

4.13 A-A'''), als auch MeSYCP1wt/ MeSYCP1\_delCt-EGFP (Abb. 4.13 B-B''') zeigte sich ein dominant negativer Effekt auf die Polykomplex- und Aggregatbildung. Zwar konnte diese nicht vollständig unterdrückt werden, jedoch schienen die verbleibenden Polykomplexartigen Strukturen im Vergleich zu den Einzeltransfektion ungeordneter zu sein. In den meisten Zellen erfolgte eine Kolokalisation in cytoplasmatischen Strukturen bis hin zur homogenen Verteilung im Cytoplasma. Die Deletionsmutanten konnten nicht in den Kern gelangen, waren aber oftmals an der Kernhülle detektierbar, wo sie mit den wildtypischen Proteinen kolokalisierten. Da die Kernlokalisierung der wildtypischen Proteine im Vergleich zur Einzeltransfektion stark reduziert wurde, schien es, als würden sie von den Deletionsmutanten im Cytoplasma bzw. an der Kernhülle zurückgehalten werden. Der gleiche dominant negative Effekt war auch bei der speziesübergreifenden Kotransfektion zu beobachten (Abb. 4.14 A-A''' und B-B'''). Im Vergleich zu den Einzeltransfektionen wurde die Polykomplexrate der wildtypischen Proteine deutlich reduziert. Die resultierenden cytoplasmatischen Strukturen, in denen teilweise Kolokalisation erfolgte, erschienen ungeordnet und nicht mehr so filigran (Abb. 4.14 A''' und B''') wie die Netzwerke der Proteine bei Einzeltransfektionen. Auch in diesen Kombinationen konnten nur die wildtypischen Proteine in den Kern gelangen, wobei die Kernlokalisationsrate im Vergleich zu den Einzeltransfektionen deutlich reduziert war. Die Proteine kolokalisierten größtenteils im Cytoplasma oder an der Kernhülle. Der gleiche Effekt zeigte sich bei der Koexpression von MeSYCP1-EGFP und RaSYCP1\_delCt-myc (Abb. 4.14 C-C''').

Demzufolge scheint die gemeinsame Expression mit einer SYCP1-C-Terminus-Deletionsmutante einen speziesübergreifenden dominant negativen Effekt auf die Polykomplexbildung und Kernlokalisierung der wildtypischen Proteine zu haben. Dies impliziert eine direkte Interaktion zwischen den Proteinen aus Medaka und Ratte. Betrachtet man zusätzlich die Tatsache, dass sich Polykomplexrate durch eine Koexpression der wildtypischen Proteine beider Spezies signifikant steigert, so spricht auch dies für eine Bindung der beiden Proteine. Sie können dabei scheinbar gemeinsam höher geordnete Strukturen ausbilden. Ob ein solcher dominant negative Effekt der C-Terminusdeletion auch bei Hydra zu beobachten ist, und ob auch zwischen Hydra und Ratte eine speziesübergreifende Kolokalisation der homologen Proteine in höher geordneten cytoplasmatischen Strukturen besteht bleibt offen. Experimente die diese Fragestellung klären könnten, konnten nicht durchgeführt

werden, da zum einen die Transfektionsrate zu gering war, zum anderen, weil noch kein Antikörper gegen das hydraspezifische Protein zur Verfügung stand. Die Experimente mit RaSYCP1 und MeSYCP1 haben gezeigt, dass sich die Proteine hinsichtlich ihrer Proteinsequenz zwar weitgehend unterscheiden, aber dennoch fähig sind Bindungen einzugehen und dabei untereinander Polykomplexstrukturen auszubilden. Untersuchungen der Strukturen auf ultrastruktureller Ebene würden klären, ob sich aufgrund der Kolo-kalisation der Proteine aus den beiden Spezies die Zusammensetzung und die Beschaffenheit der Polykomplexstrukturen im Vergleich zu den Einzeltransfektionen ändern. Außerdem sollte untersucht werden, inwiefern die konservierten Motive CM1 und CM2 an diesen Polymerisationseigenschaften und der speziesübergreifenden Bindung beteiligt sind. Eine Analyse der Protein-Verteilungsmuster nach einer Deletion der einzelnen oder beider Motive gleichzeitig würde Aufschluss über deren Funktion bei der Polymerisation geben.

Die Tatsache das solche Motive zwischen zwei so weit entfernten Spezies wie Ratte und einem niederen Vertebraten wie der Fischart Medaka derartig hoch konserviert sind, spricht für eine wichtige Funktion dieser Bereiche für das Protein. Ein ähnliche Konserviertheit konnte bereits zwischen den SYCP3-Proteinen von Ratte und Medaka festgestellt werden (Baier *et al.*, 2007a; Baier *et al.*, 2007b). Auch diese SC-Proteine konnten speziesübergreifend miteinander interagieren und bildeten dabei höher geordnete Strukturen aus. Eine Deletion der konservierten Motive in RaSYCP3 resultierte im Verlust der Fähigkeit zur Filamentbildung (Baier *et al.*, 2007b). In Fall von SYCP3, sind die beiden Motive wahrscheinlich deshalb so hochgradig konserviert, weil sie für das normale Polymerisationsverhalten essentiell sind. Inwiefern sich die Deletion der Motive auf die SC-Bildung auswirken würde, müsste in mutanten Tieren untersucht werden.

## 6. Ausblick

Diese Arbeit stellt einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis der Zusammenlagerung der einzelnen Strukturkomponenten des SC in Säugern dar. Dennoch bleiben zahlreiche Fragen offen. Wie erklärt sich das Phänomen, das in *Sycp3*<sup>-/-</sup> weiblichen Knock-out-Mäusen durchaus SC-ähnliche Strukturen gebildet werden, ohne das SYCP2 und SYCP3 in den Axialelementen vorkommen. Welche anderen Proteine sind möglicherweise neben SYCP2 essentiell für die Verankerung der Transversalfilamente in den Lateralelementen, bzw. inwiefern stabilisieren andere Proteine die Verbindung. Auf welche Art und Weise erfolgt die Stabilisierung der Struktur im zentralen Bereich? Welche Proteine sind neben SYCE1, SYCE2 und TEX12 dort lokalisiert. Wie und in welcher Reihenfolge erfolgen das Zusammenspiel und die Aneinanderlagerung der einzelnen Proteine zu einem funktionellen SC. Und wie erfolgt der Auf- und Abbau der SC-Struktur, welche Signale und Modifikationen sind daran beteiligt.

Experimente, die zur Aufklärung dieser Fragen führen könnten, wären beispielsweise die Suche nach weiteren Bindungspartnern von SYCP1, SYCP2 und SYCP3. Interaktionspartner, die SYCP1 im C-Terminus binden, könnten an der Verankerung im LE beteiligt sein, solche die im N-Terminus binden könnten zur Stabilisierung des CE beitragen. Eine *Sycp2*<sup>-/-</sup> Knock-out-Maus würde Aufschluss darüber bringen, wie essentiell dieses Protein für den Auf- und Abbau der AE/LE ist. Es wäre interessant zu wissen, ob diese Proteindefizienz in den weiblichen Tieren Infertilität hervorruft oder wie bei der *Sycp3*<sup>-/-</sup>-Maus nur eine reduzierte Wurfgröße und erhöhte Aneuploidie-Rate (Yuan *et al.*, 2000, 2002) zur Folge hat. Doppel-Knock-out-Mutanten für SYCP2 und SYCP3 würden zeigen, welche Auswirkungen die vollständige Abwesenheit beider Hauptstrukturkomponenten der LE auf die Meiose hat und ob sich in den Weibchen weiterhin kurze Abschnitte von SC-ähnliche Strukturen zwischen den Chromosomen ausbilden können. Um die Mechanismen des Auf- und Abbaus der SC-Struktur besser zu verstehen, sollte außerdem untersucht werden, ob möglicherweise Phosphorylierungen an der Bindung und Lösung einzelner Proteinkomponenten vom SC beteiligt sind. Alle drei Hauptstrukturkomponenten SYCP1, SYCP2 und SYCP3 besitzen innerhalb ihrer Aminosäuresequenzen zahlreiche potentielle Phosphorylierungsmotive, die eine Rolle spielen könnten. Simulierte Phosphorylierungen einzelner oder mehrerer

solcher Motive durch Mutagenese könnten Aufschluss, über deren Funktion geben. Außerdem könnte ein breit gefächertes Vergleich zwischen orthologen Proteinen mehrerer Spezies zeigen, ob einige dieser Motive möglicherweise konserviert sind, was unter Umständen dafür sprechen könnte, dass sie eine essentielle Rolle übernehmen könnten.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Untersuchung der Evolution des SC, bzw. seiner Proteinkomponente SYCP1. Es wurde gezeigt, dass sich zwischen den taxonomisch weit entfernten Spezies trotz der erheblichen Unterschiede innerhalb der Aminosäuresequenzen, deutliche Konservierungen hinsichtlich einzelner Motive (CM1 und CM2) nachweisen lassen. Zudem haben die Proteine vergleichbare Domänenorganisationen und zeigen deutliche Ähnlichkeiten im Polymerisationsverhalten. Doch auch hier bleiben zwangsläufig zahlreiche Fragen offen. Welche Funktion haben die konservierten Motive. Eine Deletion der CM1 und CM2 und anschließende Untersuchungen des Proteinverhaltens würden Aufklärung über mögliche Funktionen dieser Regionen erbringen. Außerdem würde ein breit gefächertes Vergleich der Aminosäuresequenzen der homologen Proteine verschiedenster Spezies zeigen, ob und in welchen Dimensionen diese Motive vorhanden sind. Anhand solcher vergleichenden Experimente könnte ein Stammbaum erstellt werden, der die Evolution von SYCP1 bzw. die Evolution der Synapse meiotischer Chromosomen besser veranschaulichen könnte.

Um die komplexen Mechanismen der Aneinanderlagerung, Rekombination, Synapsis und Segregation während der Meiose besser verstehen zu können, wäre letztendlich ein Zellsystem erforderlich, in dem es möglich wäre kultivierbare Säugerzellen die Meiose durchlaufen zu lassen. Das Vorhandensein solcher Zelllinien würde es enorm vereinfachen, die einzelnen Proteinbestandteile der SC zu charakterisieren. Außerdem könnten in solchen Zellen gezielt einzelne Komponenten beispielsweise durch RNAi ausgeschaltet werden, um deren Funktion zu ergründen. Die Kultivierung meiotischer Säugerzellen ist jedoch bisher an der technischen Umsetzung gescheitert.

## 7. Zusammenfassung

### 7.1 Zusammenfassung

Synaptonemal Komplexe (SC) sind evolutionär konservierte, meiosespezifische, proteinöse Strukturen, die maßgeblich an Synapsis, Rekombination und Segregation der homologen Chromosomen beteiligt sind. Sie zeigen eine dreigliedrige strickleiterartige Organisation, die sich aus i) zwei Lateralelementen (LE), an die das Chromatin der Homologen angelagert ist, ii) zahlreichen Transversalfilamenten (TF), welche die LE in einer Reißverschlussartigen Weise miteinander verknüpfen, und iii) einem zentralen Element (CE) zusammensetzt. Die Hauptproteinkomponenten der Säuger-SC sind das Transversalfilamentprotein SYCP1 und die Lateralelementproteine SYCP2 und SYCP3. Wie sich die SC-Struktur zusammenfügt war bisher nur wenig verstanden; es war nicht bekannt wie die TF innerhalb der LE-Strukturen verankert sind und dabei die homologen Chromosomen verknüpfen. Aufgrund dessen wurde die Interaktion zwischen den Proteinen SYCP1 und SYCP2 untersucht. Mit der Hilfe verschiedenster Interaktionssysteme konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus von SYCP1 mit SYCP2 interagieren kann. Aufgrund der Bindungsfähigkeit zu beiden Proteinen, SYCP1 und SYCP3, kann angenommen werden, dass SYCP2 als Linker zwischen diesen Proteinen fungiert und somit möglicherweise das fehlende Bindungsglied zwischen den Lateralelementen und Transversalfilamenten darstellt. Obwohl die SC-Struktur in der Evolution hochkonserviert ist, schien dies nicht für seine Protein-Untereinheiten zuzutreffen. Um die Struktur und Funktion des SC besser verstehen zu können, wurde ein Vergleich zwischen den orthologen SYCP1 Proteinen der evolutionär entfernten Spezies Ratte und Medaka erstellt. Abgesehen von den erheblichen Sequenzunterschieden die sich in 450 Millionen Jahren der Evolution angehäuft haben, traten zwei bisher nicht identifizierte Sequenzmotive hervor, CM1 und CM2, die hochgradig konserviert sind. Anhand dieser Motive konnte in Datenbankanalysen erstmals ein Protein in *Hydra vulgaris* nachgewiesen werden, bei dem es sich um das orthologe Protein von SYCP1 handeln könnte. Im Vergleich mit dem SYCP1 der Ratte zeigten die Proteine aus Medaka und Hydra, neben den hoch konservierten CM1 und CM2, vergleichbare Domänenorganisationen und im heterologen System zudem sehr ähnliche Polymerisationseigenschaften. Diese Ergebnisse sprechen für eine evolutionäre Konservierung von SYCP1.

## 7.2 Summary

Synaptonemal complexes (SCs) are evolutionarily conserved, meiosis-specific proteinaceous structures critically involved in synapsis, recombination and segregation of homologous chromosomes. They show a tripartite ladder-like organization including i) two lateral elements (LEs), to which the chromatin of the homologs is attached, ii) numerous transverse filaments (TFs), that link the two lateral elements in a zipper-like way, and iii) a central element (CE). Major protein components of mammalian SCs are the transverse filaments protein SYCP1, and the lateral element proteins SYCP2 and SYCP3. How SCs become assembled was poorly understood; in particular it was not known how TFs assemble at the plane of LEs to interconnect the homologous chromosomes. Therefore, I have investigated possible interactions between SYCP1 and SYCP2. Using different interaction traps, I was able to show that the C-terminus of SYCP1 interacts with SYCP2. Because of its binding to both, SYCP1 and SYCP3, it can be proposed that SYCP2 acts as a linker between these proteins and therefore would be the missing connecting piece between LEs and TFs.

Although the SC-structure is conserved in evolution this appears not to be the case for its protein components. For a better understanding of the conserved SC structure und function, I compared ortholog SYCP1 proteins of evolutionary distant species, namely rat and medaka fish. Despite of the sequence-differences that accumulated during 450 million years of evolution, sequence identity was highest at the level of two previously unidentified motifs (CM1 & CM2). Utilizing these motifs in a database analysis a protein of *Hydra vulgaris* could be found for the first time. It can be proposed that this protein is the orthologous of SYCP1. Besides the highly conserved motifs the proteins of medaka and hydra show quite similar domain organization and polymerization properties in comparison with rat SYCP1. These results suggest an evolutionary conservation of SYCP1.

## 8. Literaturliste

**Albini S. M., Jones G. H.**

Synaptonemal complex-associated centromeres and recombination nodules in plant meiocytes prepared by an improved surface-spreading technique.

Exp. Cell Res. 1984; 155(2):588-592

**Austin, C. R.**

The capacitation of the mammalian sperm.

Nature. 1952; 170:326

**Baier A., Alsheimer M., Benavente R.**

Synaptonemal complex protein SYCP3: Conserved polymerization properties among vertebrates.

Biochim. Biophys. Acta. 2007a; 1774(5):595-602

**Baier A., Alsheimer M., Volf J. N., Benavente R.**

Synaptonemal complex protein SYCP3 of the rat: Evolutionarily conserved domains and the assembly of higher order structures.

Sex. Dev. 2007b; 1(3):161-8

**Bailis J. M., Roeder G. S.**

Synaptonemal complex morphogenesis and sister-chromatid cohesion require Mek1-dependent phosphorylation of a meiotic chromosomal protein.

Genes Dev. 1998; 12(22):3551-63

**Bannister L. A., Reinholdt L. G., Munroe R. J., Schimenti J. C.**

Positional cloning and characterization of mouse mei8, a disrupted allele of the meiotic cohesin Rec8.

Genesis. 2004; 40(3):184-94

**Bolcun-Filas E., Costa Y., Speed R., Taggart M., Benavente R., De Rooij D. G., Cooke H. J.**

SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination.

J. Cell Biol. 2007; 176(6):741-7

**Bolcun-Filas E., Hall E., Speed R., Taggart M., Grey C., de Massy B., Benavente R., Cooke H. J.**

Mutation of the mouse Syce1 gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair.

PLoS Genet. 2009; 5(2):e1000393

**Bolor H., Mori T., Nishiyama S., Ito Y., Hosoba E., Inagaki H., Kogo H., Ohye T., Tsutsumi M., Kato T., Tong M., Nishizawa H., Pryor-Koishi K., Kitaoka E., Sawada T., Nishiyama Y., Udagawa Y., Kurahashi H.**

Mutations of the SYCP3 gene in women with recurrent pregnancy loss.

Am. J. Hum. Genet. 2009; 84(1):14-20

**Botelho R. J., DiNicolo L., Tsao N., Karaiskakis A., Tarsounas M., Moens P. B., Pearlman R. E.**

The genomic structure of SYCP3, a meiosis-specific gene encoding a protein of the chromosome core.

Biochim. Biophys. Acta. 2001; 1518(3):294-9

**Braun R. E., Behringer R. R., Peschon J. J., Brinster R. L., Palmiter R.D.**

Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid.

Nature. 1989; 337(6205):373-6

**Bührle K.**

Molekulare Eigenschaften des Synaptonemalkomplexproteins 2.

Diplomarbeit, Universität Würzburg. 2004

**Buonomo S. B., Clyne R. K., Fuchs J., Loidl J., Uhlmann F., Nasmyth K.**

Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin.

Cell. 2000; 103(3):387-98

**Chang, M. C.**

Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes.

Nature. 1951; 168:697-8

**Chelsky D., Ralph R., Jonak G.**

Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus.

Mol. Cell Biol. 1989; 9(6):2487-92

**Colaiácovo M. P., MacQueen A. J., Martinez-Perez E., McDonald K., Adamo A., La Volpe A., Villeneuve A. M.**

Synaptonemal complex assembly in *C. elegans* is dispensable for loading strand-exchange proteins but critical for proper completion of recombination.

Dev. Cell. 2003; 5(3):463-74

**Costa Y., Cooke H. J.**

Dissecting the mammalian synaptonemal complex using targeted mutations.

Chromosome Res. 2007; 15(5):579-89

**Costa Y., Speed R., Ollinger R., Alsheimer M., Semple C. A., Gautier P., Maratou K., Novak I., Höög C., Benavente R., Cooke H. J.**

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

J. Cell Sci. 2005 Jun 15;118(Pt 12):2755-62

**Couteau F., Goodyer W., Zetka M.**

Finding and keeping your partner during meiosis.

Cell Cycle. 2004; 3(8):1014-6

**Couteau F., Zetka M.**

HTP-1 coordinates synaptonemal complex assembly with homolog alignment during meiosis in *C. elegans*.

Genes Dev. 2005; 19(22):2744-56

**Crackower M. A., Kolas N. K., Noguchi J., Sarao R., Kikuchi K., Kaneko H., Kobayashi E., Kawai Y., Koziaradzki I., Landers R., Mo R., Hui C. C., Nieves E., Cohen P. E., Osborne L. R., Wada T., Kunieda T., Moens P. B., Penninger J. M.**  
Essential role of Fkbp6 in male fertility and homologous chromosome pairing in meiosis.

Science. 2003; 300(5623):1291-5

**De Boer E., Heyting C.**

The diverse roles of transverse filaments of synaptonemal complexes in meiosis.

Chromosoma. 2006; 115(3):220-34

**De los Santos T., Hollingsworth N. M.**

Red1p, a MEK1-dependent phosphoprotein that physically interacts with Hop1p during meiosis in yeast.

J. Biol. Chem. 1999; 274(3):1783-90

**Dernburg A. F., Sedat J. W.**

Mapping three-dimensional chromosome architecture in situ.

Methods Cell Biol. 1998;53:187-233

**De Rooij D. G.**

Stem cells in the testis.

Int. J. Exp. Pathol. 1998; 79(2):67-80

**De Rooij D. G.**

Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells.

Reproduction. 2001; 121(3):347-54

**De Rooij D. G., Grootegoed J. A.**

Spermatogonial stem cells.

Curr. Opin. Cell Biol. 1998; 10(6):694-701

**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., Pastink A.**

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

Genes Dev. 2005; 19(11):1376-89

**Dobson M. J., Pearlmén R. E., Karaiskakis A., Spyropoulos B., Moens P. B..**

Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction.

J. Cell Sci. 1994; 107(10):2749-60

**Dong H., Roeder G. S.**

Organization of the yeast Zip1 protein within the central region of the synaptonemal complex.

J. Cell Biol. 2000; 148(3):417-26

**Dym M, Fawcett DW.**

Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis.

Biol. Reprod. 1971;4(2):195-215

**Eijpe M., Heyting C., Gross B., Jessberger R.**

Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes.

J. Cell Sci. 2000; 113(4):673-82

**Eijpe M., Offenberg H., Jessberger R., Revenkova E., Heyting C.**

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

J. Cell Biol. 2003; 160(5):657-70

**Fawcett D. W.**

The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes.

J. Biophys. Biochem. Cytol. 1956; 2(4):403-6

**Gilbert, S. F.**

Developmental Biology. 7th Edition. (2003); Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.

**Gruber S., Haering C. H., Nasmyth K.**

Chromosomal cohesin forms a ring.

Cell. 2003; 112(6):65-77

**Goldstein P., Slaton D. E.**

The synaptonemal complexes of *Caenorhabditis elegans*: comparison of wild-type and mutant strains and pachytene karyotype analysis of wild-type.

Chromosoma. 1982; 84(4):585-97

**Goodyer W., Kaitna S., Couteau F., Ward J. D., Boulton S. J., Zetka M.**

HTP-3 links DSB formation with homolog pairing and crossing over during *C. elegans* meiosis.

Dev. Cell. 2008; 14(2):263-74

**Haering C. H., Schoffnegger D., Nishino T., Helmhart W., Nasmyth K., Löwe J.**

Structure and stability of cohesin's SMC1-kleisin interaction.

Mol. Cell. 2004; 15(6):951-64

**Hamer G., Gell K., Kouznetsova A., Novak I., Benavente R., Höög C.**

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

J. Cell Sci. 2006; 119(19):4025-32

**Hamer G, Wang H, Bolcun-Filas E, Cooke HJ, Benavente R, Höög C.**

Progression of meiotic recombination requires structural maturation of the central element of the synaptonemal complex.

J Cell Sci. 2008; 121(15):2445-51

**Handel M. A.**

The XY body: a specialized meiotic chromatin domain.  
Exp. Cell Res. 2004; 296(1):57-63

**Hassold T. , Hunt P.**

To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy.  
Nat. Rev.Genet. 2001; 2(4):280-91

**Heyting C., Dietrich A. J., Redeker E. J., Vink A. C.**

Structure and composition of synaptonemal complexes, isolated from rat spermatocytes.  
Eur. J. Cell Biol. 1985; 36(2):307-14

**Heyting C., Moens P. B., van Raamsdonk W., Dietrich A. J., Vink A. C., Redeker E. J.**

Identification of two major components of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat.  
Eur. J. Cell Biol. 1987; 43(1):148-54

**Heyting C., Dietrich A. J., Moens P. B., Dettmers R. J., Offenberg H. H., Redeker E. J., Vink A. C.**

Genome. 1989; 31(1):81-7

**Hirano T. Kobayashi R., Hirano M.**

Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a Xenopus homolog of the Drosophila Barren protein.  
Cell. 1997; 89(4):511-21

**Hollingsworth N. M., Goetsch L., Byers B.**

The HOP1 gene encodes a meiosis-specific component of yeast chromosomes.  
Cell. 1990; 61(1):73-84

**Hunt P. A., Hassold T. J.**

Sex matters in meiosis.  
Science. 2002; 296(5576):2181-3

**Hunter N., Kleckner N.**

The single-end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-holliday junction transition of meiotic recombination.  
Cell. 2001; 106(1):59-70

**Iwai T., Yoshii A., Yokota T., Sakai C., Hori H., Kanamori A., Yamashita M.**

Structural components of the synaptonemal complex, SYCP1 and SYCP3, in the medaka fish *Oryzias latipes*.  
Exp. Cell Res. 2006; 312(13):2528-37

**Judis L., Chan E. R., Schwartz S., Seftel A., Hassold T.**

Meiosis I arrest and azoospermia in an infertile male explained by failure of formation of a component of the synaptonemal complex.  
Fertil. Steril. 2004; 81(1):205-9

**Keeney S., Giroux C. N., Kleckner N.**

Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family.

Cell. 1997; 88(3):375-84

**Kimura K., Cuvier O., Hirano T.**

Chromosome condensation by a human condensin complex in *Xenopus* egg extracts.

J. Biol. Chem. 2001; 276(8):5417-20

**Kishimoto A, Nishiyama K, Nakanishi H, Uratsuji Y, Nomura H, Takeyama Y, Nishizuka Y.**

Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase.

J. Biol. Chem. 1985; 260(23):12492-9

**Kitajima T. S., Kawashima S. A., Watanabe Y.**

The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis.

Nature. 2004; 427(6974):510-7

**Kitajima T. S., Sakuno T., Ishiguro K., Iemura S., Natsume T., Kawashima S. A., Watanabe Y.**

Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin.

Nature. 2006; 441(7089):46-52

**Klein F., Mahr P., Galova M., Buonomo S. B., Michaelis C., Nairz K., Nasmyth K.**

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

Cell. 1999; 98(1):91-103

**Kolas N. K., Yuan L., Höög C., Heng H. H., Marcon E., Moens P. B.**

Male mouse meiotic chromosome cores deficient in structural proteins SYCP3 and SYCP2 align by homology but fail to synapse and have possible impaired specificity of chromatin loop attachment.

Cytogenet. Genome Res. 2004; 105(2-4):182-88

**Lammers J. H., Offenberg H. H., van Aalderen M., Vink A. C., Dietrich A. J., Heyting C.**

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. 1994; 14(2):1137-46

**Lammers J. H., van Aalderen M., Peters A. H., van Pelt A. A., de Rooij D. G., de Boer P., Offenberg H. H., Dietrich A. J., Heyting C.**

A change in the phosphorylation pattern of the 30000-33000 Mr synaptonemal complex proteins of the rat between early and mid-pachytene.

Chromosoma. 1995; 104(3):154-63

**Laemmli U. K.**

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
Nature. 1970 15; 227(5259):680-5

**Lange G.**

Licht- und elektronenmikroskopische Dokumentation der sexuellen Reproduktion bei *Hydra viridissima*.

Schriftliche Hausarbeit. Universität Würzburg. 2001

**Lee J., Iwai T., Yokota T., Yamashita M.**

Temporally and spatially selective loss of Rec8 protein from meiotic chromosomes during mammalian meiosis.

J. Cell Sci. 2003; 116(13):2781-90

**Liebe B., Alsheimer M., Höög C., Benavente R., Scherthan H.**

Telomere attachment, meiotic chromosome condensation, pairing, and bouquet stage duration are modified in spermatocytes lacking axial elements.

Mol. Biol. Cell. 2004; 15(2):827-37

**Liu J. G., Yuan L., Brundell E., Björkroth B., Daneholt B., Höög C.**

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. 1996; 226(1):11-9

**Losada A., Yokochi T., Kobayashi R., Hirano T.**

Identification and characterization of SA/Scc3p subunits in the *Xenopus* and human cohesin complexes.

J. Cell Biol. 2000; 150(3):405-16

**Lupas A., van Dyke M., Stock J.**

Predicting coiled coils from protein sequences.

Science. 1991; 252(5009):1162-1164

**MacQueen A. J., Colaiácovo M. P., McDonald K., Villeneuve A. M.**

Synapsis-dependent and -independent mechanisms stabilize homolog pairing during meiotic prophase in *C. elegans*.

Genes Dev. 2002; 16(18):2428-42

**Martinez-Perez E., Villeneuve A. M.**

HTP-1-dependent constraints coordinate homolog pairing and synapsis and promote chiasma formation during *C. elegans* meiosis.

Genes Dev. 2005; 19(22):2727-43

**McDougall A, Elliott DJ, Hunter N.**

Pairing, connecting, exchanging, pausing and pulling chromosomes.

EMBO Rep. 2005; 6(2):120-5

**Meuwissen R. L., Offenberg H. H., Dietrich A. J., Riesewijk A., van Iersel M., Heyting C.**

A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes.

EMBO J. 1992; 11(13):5091-100

**Meyer G. F.**

The fine structure of spermatocyte nuclei of *Drosophila melanogaster*.

Proc. Eur. Reg. Conf. Electron Micros. 1960; 2:951-954

**Miyamoto T., Hasuike S., Yogev L., Maduro M. R., Ishikawa M., Westphal H., Lamb D. J.**

Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3.

Lancet. 2003; 362(9397):1714-9

**Morelli M. A., Cohen P. E.**

Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis.

Reproduction. 2005; 130(6):761-81

**Morgan T. H.** Complete linkage in the second chromosome of the male of *Drosophila*.

Science. 1912; 36:719-720

**Moses M. J.**

Studies on nuclei using correlated cytochemical, light, and electron microscope techniques.

J. Biophys. Biochem. Cytol. 1956; 2(4, Suppl):397-406

**Nasmyth K.**

Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis.

Annu. Rev. Genet. 2001; 35:673-745

**Offenberg H. H., Schalk J. A., Meuwissen R. L., van Aalderen M., Kester H. A., Dietrich A. J., Heyting C.**

SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat.

Nucleic. Acids. Res. 1998; 26(11):2572-9

**Öllinger R.**

Architektur meiotischer Chromosomen: Polymerisationseigenschaften des Synaptonemalkomplexproteins SYCP1 und Charakterisierung von Bindungspartnern. Dissertation. Universität Würzburg. 2005

**Öllinger R., Alsheimer M., Benavente R.**

Mammalian protein SCP1 forms synaptonemal complex-like structures in the absence of meiotic chromosomes.

Mol. Biol. Cell. 2005; 16(1):212-7

**Page S. L., Hawley R. S.**

c(3)G encodes a Drosophila synaptonemal complex protein.  
Genes Dev. 2001; 15(23):3130-43

**Page S. L., Hawley R. S.**

The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex.  
Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2004; 20:525-58

**Parisi S., McKay M. J., Molnar M., Thompson M. A., van der Spek P. J., van Drunen-Schoenmaker E., Kanaar R., Lehmann E., Hoeijmakers J. A., Kohli J.**

Rec8p, a meiotic recombination and sister chromatid cohesion phosphoprotein of the Rad21p family conserved from fission yeast to humans.  
Mol. Cell Biol. 1999; 19(5):3515-28

**Parra M. T., Viera A., Gómez R., Page J., Benavente R., Santos J. L., Rufas J.S., Suja J.A.**

Involvement of the cohesin Rad21 and SCP3 in monopolar attachment of sister kinetochores during mouse meiosis I.  
J. Cell Sci. 2004; 117(7):1221-34

**Pelttari J., Hoja M. R., Yuan L., Liu J. G., Brundell E., Moens P., Santucci-Darmanin S., Jessberger R., Barbero J. L., Heyting C., Höög C.**

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. 2001; 21(16):5667-77

**Pinna L. A.**

Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation?  
Biochim. Biophys. Acta. 1990; 1054(3):267-84

**Prieto I., Pezzi N., Buesa J. M., Kremer L., Barthelemy I., Carreiro C., Roncal F., Martinez A, Gomez L., Fernandez R., Martínez-A C., Barbero J. L.**

STAG2 and Rad21 mammalian mitotic cohesins are implicated in meiosis.  
EMBO Rep. 2002; 3(6):543-50

**Prieto I., Suja J. A., Pezzi N., Kremer L., Martínez-A C., Rufas J. S., Barbero J. L.**

Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I.  
Nat. Cell. Biol. 2001; 3(8):761-66

**Rasmussen S. W.**

Ultrastructural studies of spermatogenesis in Drosophila melanogaster Meigen.  
Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 1973; 140(1):125-44

**Revenkova E., Eijpe M., Heyting C., Gross B., Jessberger R.**

Novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1.  
Mol. Cell Biol. 2001; 21(20):6984-98

**Revenkova E., Eijpe M., Heyting C., Hodges C. A., Hunt P. A., Liebe B., Scherthan H., Jessberger R.**

Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination.

Nat. Cell Biol. 2004; 6(6):555-62

**Revenkova E., Jessberger R.**

Shaping meiotic prophase chromosomes: cohesins and synaptonemal complex proteins.

Chromosoma. 2006; 115(3):235-40

**Riedel C. G., Katis V. L., Katou Y., Mori S., Itoh T., Helmhart W., Gálová M., Petronczki M., Gregan J., Cetin B., Mudrak I., Ogris E., Mechtler K., Pelletier L., Buchholz F., Shirahige K., Nasmyth K.**

Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I.

Nature. 2006; 441(7089):53-61

**Rockmill B., Roeder G. S.**

Meiosis in asynaptic yeast.

Genetics. 1990; 126(3):563-74

**Rockmill B., Sym M., Scherthan H., Roeder G. S.**

Roles for two RecA homologs in promoting meiotic chromosome synapsis.

Genes Dev. 1995; 9(21):2684-95

**Russell L. D., Clermont Y.**

Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats.

Anat. Rec. 1977; 187(3):347-66

**Schalk JA, Dietrich AJ, Vink AC, Offenberg HH, van Aalderen M, Heyting C.**

Localization of SCP2 and SCP3 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat.

Chromosoma. 1998; 107(8):540-8

**Scherthan H., Weich S., Schwegler H., Heyting C., Härle M., Cremer T.**

Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing.

J. Cell Biol. 1996; 134(5):1109-25

**Schmekel K., Meuwissen R. L., Dietrich A. J., Vink A. C., van Marle J., van Veen H., Heyting C.**

Organization of SCP1 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat.

Exp. Cell Res. 1996; 226(1):20-30

**Schmiesing J. A., Gregson H. C., Zhou S., Yokomori K.**

A human condensin complex containing hCAP-C-hCAP-E and CNAP1, a homolog of Xenopus XCAP-D2, colocalizes with phosphorylated histone H3 during the early stage of mitotic chromosome condensation.

Mol. Cell Biol. 2000; 20(18):6996-7006

**Smith P. A., King R. C.**

Genetic control of synaptonemal complexes in *Drosophila melanogaster*.  
Genetics. 1968; 60(2):335-51

**Smith A. V., Roeder G. S.**

The yeast Red1 protein localizes to the cores of meiotic chromosomes.  
J. Cell Biol. 1997; 136(5):957-67

**Smolikov S., Eizinger A., Schild-Prufert K., Hurlburt A., McDonald K., Engebrecht J., Villeneuve A. M., Colaiácovo M. P.**

SYP-3 restricts synaptonemal complex assembly to bridge paired chromosome axes during meiosis in *Caenorhabditis elegans*.  
Genetics. 2007; 176(4):2015-25

**Smolikov S., Schild-Prüfert K., Colaiácovo M. P.**

A yeast two-hybrid screen for SYP-3 interactors identifies SYP-4, a component required for synaptonemal complex assembly and chiasma formation in *Caenorhabditis elegans* meiosis.  
PLoS Genet. 2009; 5(10):e1000669

**Solari A. J.**

The behavior of the XY pair in mammals.  
Int. Rev. Cytol. 1974; 38: 273-317

**Suja J. A., Antonio C., Debec A., Rufas J. S**

Phosphorylated proteins are involved in sister-chromatid arm cohesion during meiosis I.  
J. Cell Sci. 1999; 112(17):2957-69

**Suja J. A., Barbero J.L.**

Cohesin complexes and sister chromatid cohesion in mammalian meiosis.  
Genome Dyn. 2009; 5:94-116

**Sumara I., Vorlaufer E., Gieffers C., Peters B. H., Peters J. M.**

Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase.  
J. Cell Biol. 2000; 151(4):749-62

**Sym M., Engebrecht J. A., Roeder G. S.**

ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis.  
Cell. 1993; 72(3):365-78

**Sym M., Roeder G. S.**

Crossover interference is abolished in the absence of a synaptonemal complex protein.  
Cell. 1994; 79(2):283-92

**Sym M., Roeder G. S.**

Zip1-induced changes in synaptonemal complex structure and polycomplex assembly.  
J. Cell Biol. 1995; 128(4):455-66

**Tarsounas M., Pearlman R. E., Gasser P. J., Park M. S., Moens P.B.**

Protein-protein interactions in the synaptonemal complex.  
Mol. Biol. Cell. 1997; 8(8):1405-14

**Tarsounas M., Pearlman R. E., Moens P. B.**

Meiotic activation of rat pachytene spermatocytes with okadaic acid: the behaviour of synaptonemal complex components SYN1/SCP1 and COR1/SCP3.  
J. Cell Sci. 1999; 112 ( Pt 4):423-34

**Tessé S., Storlazzi A., Kleckner N., Gargano S., Zickler D.**

Localization and roles of Ski8p protein in *Sordaria* meiosis and delineation of three mechanistically distinct steps of meiotic homolog juxtaposition.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003; 100(22):12865-70

**Thompson E. A., Roeder G. S.**

Expression and DNA sequence of RED1, a gene required for meiosis I chromosome segregation in yeast.  
Mol. Gen. Genet. 1989; 218(2):293-301

**Tung K. S., Roeder G. S.**

Meiotic chromosome morphology and behavior in zip1 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.  
Genetics. 1998; 149(2):817-32

**Uwa H., Ojima Y.**

Detailed and banding karyotype analysis of the medaka, *Oryzias latipes*, in cultured cells.  
Proc. Jpn. Acad. 1981; B57:39-43

**Watanabe Y., Nurse P.**

Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis.  
Nature. 1999; 400(6743):461-4

**Westerveld G. H., Repping S., Lombardi M. P., van der Veen F.**

Mutations in the chromosome pairing gene FKBP6 are not a common cause of non-obstructive azoospermia.  
Mol. Hum. Reprod. 2005; 11(9):673-5

**Winkel K.**

Untersuchungen der Interaktionen der Synaptonemalkomplex Proteine SYCP1 und SYCP2.  
Diplomarbeit. Universität Würzburg. 2006

**Winkel K., Alsheimer M., Ollinger R., Benavente R.**

Protein SYCP2 provides a link between transverse filaments and lateral elements of mammalian synaptonemal complexes.  
Chromosoma. 2009; 118(2):259-67

**Xu H, Beasley M, Verschoor S, Inselman A, Handel MA, McKay MJ.**

A new role for the mitotic RAD21/SCC1 cohesin in meiotic chromosome cohesion and segregation in the mouse.

EMBO Rep. 2004; 5(4):378-84

**Xu H., Beasley M. D., Warren W. D., van der Horst G. T., McKay M. J.**

Absence of mouse REC8 cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis.

Dev. Cell. 2005; 8(6):949-61

**Yanagimachi R.**

Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity.

Zygote. 1994; 2(4):371-2

**Yang F., de la Fuente R., Leu N. A., Baumann C., McLaughlin K. J., Wang P. J.**

Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis.

J. Cell Biol. 2006; 173(4):497-507

**Yang F., Wang P. J.**

The Mammalian synaptonemal complex: a scaffold and beyond.

Genome Dyn. 2009; 5:69-80

**Yuan L., Liu J. G., Zhao J., Brundell E., Daneholt B., Höög C.**

The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility.

Mol. Cell. 2000; 5(1):73-83

**Yuan L., Liu J. G., Hoja M. R., Wilbertz J., Nordqvist K., Höög C.**

Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3.

Science. 2002; 296(5570):1115-8

**Yuan L, Pelttari J, Brundell E, Björkroth B, Zhao J, Liu JG, Brismar H, Daneholt B, Höög C.**

The synaptonemal complex protein SCP3 can form multistranded, cross-striated fibers in vivo.

J. Cell Biol. 1998; 142(2):331-9

**Zetka M. C., Kawasaki I., Strome S., Müller F.**

Synapsis and chiasma formation in *Caenorhabditis elegans* require HIM-3, a meiotic chromosome core component that functions in chromosome segregation.

Genes Dev. 1999; 13(17):2258-70

**Zhang W., Zhang S., Xiao C., Yang Y., Zhoucun A.**

Mutation screening of the FKBP6 gene and its association study with spermatogenic impairment in idiopathic infertile men.

Reproduction. 2007; 133(2):511-6

**Zickler D., Kleckner N.**

The leptotene-zygotene transition of meiosis.

Annu. Rev. Genet. 1998; 32:619-97

## 9. Abkürzungen

°C	Grad Celsius
®	registered
™	Trademark
A	Ampere / Adenosin
α	anti (Kurzbezeichnung für Antikörper)
AA	axiale Assoziation („axial associations“)
Abb.	Abbildung
AE	Axialelement („axial element“)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin Triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C-	Carboxy-(-terminal, -Terminus)
ca.	circa
CAPS	Cyclohexylamino-1-Propansulfonsäure
CE	Zentralelement („central element“)
CR	zentrale Region („central region“)
Ct	Carboxyterminus
Da (kDa)	Dalton (Kilodalton)
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosin-Triphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosin-Triphosphat
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidin-Triphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („desoxyribonucleic acid“)
cDNA	komplementäre DNA („complementary DNA“)
dsDNA	doppelsträngige DNA („double stranded DNA“)

ssDNA	einzelsträngige DNA („single stranded DNA“)
DSB	Doppelstrangbruch („double strand break“)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EGFP	verstärktes, grünes Fluoreszenzprotein („enhanced green fluorescent protein“)
<i>et al.</i>	<i>et altera</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung in $m/s^2$
Gal	Galaktose
Glu	Glukose
h	Stunde
H <sub>2</sub> O bidest.	doppelt destilliertes Wasser
HA	Hämagglutinin
His	Histidin
HRP	Meerrettich-Peroxidase („horse radish peroxidase“)
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-Thiogalactosid
K+/K-	Positiv-/Negativkontrolle
Kann	Kanamycin
kb	Kilobase(n)
l	Liter
<i>lacZ</i>	$\beta$ -Galactosidase codierendes Gen in <i>E. coli</i>
LB-Medium	Luria Bertami Medium
LE	Lateralelement
Leu	Leucin
Log	Logarithmus, logarithmisch
M	Mol, molar
MCS	Polylinker-Region in Vektoren („multiple cloning site“)
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute

ml	Milliliter
mg	Milligramm
mM	Millimolar
μ	Mikro, 10 <sup>-6</sup>
μl	Mikroliter, 10 <sup>-6</sup> l
n	Chromosomenzahl im haploiden Genom
N-	Amino- (-terminal, -Terminus)
ng	Nanogramm, 10 <sup>-9</sup> g
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer, 10 <sup>-9</sup> m
NLS	Kernlokalisierungssignal („nuclear location signal“)
Nt	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
p.A.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PEG	Polyethylenglykol
Raff	Raffinose
RN	Rekombinationsknoten („recombination nodule“)
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger-RNA
RNase	Ribonuklease
Rpm	Umdrehungen pro minute („rounds per minute“)
RT	Raumtemperatur
s (sec, sek)	Sekunde
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase
SC	Synaptonemalkomplex („synaptonemal complex“)
SDS	Natrium Dodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
SL	Stammlösung
SYCP	Synaptonemalkomplexprotein („synaptonemal complex protein“)
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TF	Transversalfilament(e) („transversal filaments“)
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Trp	Tryptophan
TSS	„transformation and storage solution“
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat
U	Units
UAS	„upstream activating sequence“
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
Ura	Uracil
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	Vergleich
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid
Y2H	Yeast Two-Hybrid
YNB	Hefe-Mangelmedium („yeast nitrogen base“)
YPD	Hefe-Vollmedium
z.B.	zum Beispiel

## 10. Publikationen

### 10.1 Veröffentlichte Publikationen als Autor

**Winkel K., Alsheimer M., Öllinger R., Benavente R.**

Protein SYCP2 provides a link between transverse filaments and lateral elements of mammalian synaptonemal complexes.

Chromosoma. 2009; 118(2): 259-67

### 10.2 Beteiligung an Kongressen mit veröffentlichten Abstracts

3<sup>rd</sup> International PhD Student Symposium “Horizons in Molecular Biology”

Göttingen, 14.-16. Spetember 2006

**Titel:** “Architecture of the mammalian meiotic chromosome: Protein-protein-interactions of the major synaptonemal complex proteins SYCP1 and SYCP2”

20<sup>th</sup> Wilhelm Bernhard Workshop “International Conference on the Cell Nucleus”

St. Andrews, Schottland, 27.-31. August 2007

**Titel:** “Architecture of the mammalian meiotic chromosome: Assembly and protein-protein interactions of major synaptonemal complex proteins”

10th Young Scientist Meeting “Biology of Cell Division”

Heidelberg, 23.-25. September 2008

**Titel:** “Architecture of the mammalian meiotic chromosome: Assembly and protein-protein interactions of major synaptonemal complex proteins”

The EMBO Conference on Meiosis (1<sup>st</sup>)

Isle sur la Sorgue, Frankreich, 19.-23. September 2009

**Titel:** “Architecture of the mammalian meiotic chromosome: SYCP2 provides a link between transverse filaments and lateral elements of synaptonemal complexes“

## 11. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Dipl.-Biol. Karoline Winkel  
 Private Adresse:  
 Telefon:  
 Email:  
 Geburtsdatum/ Ort: 16.07.1981, Bad Salzungen  
 Staatsangehörigkeit: deutsch  
 Familienstand: ledig

### Schulausbildung:

1988-1992 Grundschule Kieselbach  
 1992-2000 J.G. Seume Gymnasium in Vacha,  
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulstudium:

Okt 2000 – Jun 2006 Studium der Biologie (Diplom) an der Bayerischen Julius Maximilians Universität Würzburg  
 Hauptfach: Zell- und Entwicklungsbiologie  
 Nebenfächer: Genetik, Virologie, Immunologie  
 Sep 2005 – Jun 2006 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie, Biozentrum der Bayerischen Julius Maximilians Universität Würzburg, bei Prof. Dr. R. Benavente  
 Titel: „Untersuchungen der Interaktionen der Synaptonemalkomplex Proteine SYCP1 und SYCP2“.

### Zusätzliche Beschäftigungen während des Studiums:

Aug 2004 – Apr 2005 Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Verhaltensphysiologie und Soziobiologie, Biozentrum der Bayerischen Julius Maximilians Universität Würzburg  
 Feb 2006 – Mai 2006 Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie, Biozentrum der Bayerischen Julius Maximilians Universität Würzburg

**Promotion:**

Seit Juni 2006                      Promotion am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie,  
Biozentrum der Bayerischen Julius Maximilians Universität  
Würzburg, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Benavente  
Titel: „Synaptonemalkomplexprotein SYCP1:  
Bindungspartner, Polymerisationseigenschaften und  
evolutionäre Aspekte “

**Fachkenntnisse:**

Mikroskopie:                      Fluoreszenz-Mikroskopie  
Immunhistochemie:              Mikrotom (Gewebe-Schnitte), Zellkultur  
Genetische Techniken: PCR, Genetische Klonierungen, DNA-Gelelektrophorese,  
Yeast Two-Hybrid-System, Pull-Down, Ko-Immuno-  
präzipitation, Protein- und Antikörper-Aufreinigungen, SDS-  
PAGE, Western-Blotting, Zentrifugale Elutriation

**Zusätzliche Kenntnisse:**

Sprachen:                          Englisch  
    Französisch (Grundkenntnisse)  
Computer-Kenntnisse: Microsoft Office, Adobe Photoshop

Berlin, den 27.10.2009

Karoline Winkel

## 12. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ricardo Benavente. Dafür, dass ich, wann immer meine Versuche mich an den Rand des Wahnsinns getrieben haben, bei Dir anklopfen konnte und mir einen Rat und eine Ladung Alternativen, Zuversicht und neuen Mut abholen konnte. Und dafür, dass Du Dich über tolle Ergebnisse so schön und oft auch Schokoladenlastig freuen konntest. Deine Arbeitsgruppe war für mich ein wahrer Glücksgriff.

Ein weiteres Dankeschön geht an PD Dr. Manfred Alsheimer. Danke Manfred für Deine Betreuung, die nicht abreißende Kette von Vorschlägen, wie man einen Versuch verbessern kann, oder welche alternativen Wege man einschlagen kann und die ständig neuen Ideen (die Du so oft aus Deiner Mittagspause mit Ricardo mitgebracht hast). Wahnsinn wie Du all unsere Projekte so gut unter einen Hut bringen kannst...es ist mir immer wieder ein Rätsel wie Du das machst. Ich konnte so viel von Dir lernen.

Herrn Prof. Dr. Manfred Schartl danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit.

Vielen Dank natürlich auch an all meine lieben Laborkollegen, die mir die Arbeit im Labor und in unserem Schreibraum immer wieder versüßt haben. Axel und Murphy, die beiden Jungs aus C149, was wäre mein Labor ohne Euch gewesen. Sabine, Eva und Rike...die Mädels mit denen ich so manche wichtigen Internet-Recherchen durchgeführt habe. Die Meetings mit Euch waren ein Vergnügen und nicht zu vergessen unsere regelmäßigen Fernsehabende mit leckerster Verpflegung und viel Diskussionsstoff...;o). Hannes, von Dir konnte ich so einiges über Klonierungen und Materialbeschaffung ;o) lernen. Danke Elisabeth, für Deine liebe Art, und vor allem die Hilfe und unendliche Geduld bei meinen letzten Klonierungen. Ich weiß Deine Arbeit sehr zu schätzen. Vielen Dank auch an die „Urgesteine der AG“ Ruppi und Andrea, sowie all die Diplomanden und Praktikanten für das tolle Arbeitsklima.

Bedanken möchte ich mich auch bei all den Mitarbeitern des Lehrstuhls. Besonderer Dank geht dabei an Kathrin und Silke, für die manchmal auch kurzfristige Bereitstellung der Zellen und die schönen Odis und lachenden Sonnen auf meinen Petrischälchen ;o). Vielen Dank auch an Claudia, für die zahlreichen und oftmals blitzschnellen Sequenzierungen am Anfang meiner Arbeit.

Und schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Dafür, dass sie jedes meiner Vorhaben unterstützen und immer an mich glauben.

Sebastian, ich bin unendlich froh, dass es UNS gibt, denn zusammen sind WIR eindeutig besser als allein...

### **13. Erklärung**

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich (gem. § 4 Abs. 3 S. 3, 5 und 8 der Prom. Ordn.),

dass ich die hier vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und dabei keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe,

dass ich diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt habe,

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

Berlin, den 27.10.2009

Karoline Winkel