

SYCE3, ein neues Synaptonemalkomplexprotein: Expression, funktionelle Analyse und Bindungspartner

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

vorgelegt von

Sabine Schramm

aus

Coburg

Würzburg 2011

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Ricardo Benavente

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Scharl

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Gametogenese	1
1.1.1	Spermatogenese der Säuger	1
1.1.1.1	Ablauf der Spermatogenese	1
1.1.1.2	Die erste Welle der Spermatogenese	2
1.1.1.3	Die verschiedenen Stadien des Samenepithelzyklus	2
1.1.2	Oogenese der Säuger	3
1.1.3	Sexualdimorphismus der Gametogenese	4
1.2	Meiose	6
1.2.1	Meiose I	7
1.2.2	Meiose II	9
1.3	Makromolekulare Architektur meiotischer Chromosomen	10
1.3.1	Kohäsine und Kondensine	10
1.3.1.1	Kohäsine	10
1.3.1.2	Kondensine	12
1.3.2	Der Synaptonemalkomplex	12
1.3.2.1	Spezifische Proteine des SC	14
1.3.2.1.1	Proteine der AEs/LEs	14
1.3.2.1.2	Proteine der CR	15
1.3.2.2	Assembly und Disassembly	19
1.4	Homologe Rekombination	21
1.4.1	Mechanismus der homologen Rekombination	21
1.4.2	Molekulare Manifestation der Rekombination auf den chromosomalen Achsen	23
1.5	Zielsetzung	24
2	Ergebnisse	25
2.1	Grundcharakterisierung von SYCE3	25
2.1.1	Klonierung der cDNA von SYCE3	25
2.1.2	SYCE3 ist hoch konserviert zwischen einzelnen Spezies der Säuger	25
2.1.3	SYCE3 wird gonadenspezifisch exprimiert	27
2.1.4	Expressionsmuster von SYCE3 im Verlauf der Spermatogenese	27
2.1.5	SYCE3 ist Bestandteil des Zentralelements des Synaptonemalkomplexes	29
2.1.5.1	Lokalisation von SYCE3 in Spermatozyten	29
2.1.5.2	Lokalisation von SYCE3 in Oocyten	33
2.1.6	SYCE3 kolokalisiert mit SYCE1, aber nicht notwendigerweise mit SYCE2	33
2.1.7	Die Rekrutierung von SYCE3 auf die Achsen ist unabhängig vom AEs/LEs Zusammenbau und den CE Bestandteilen SYCE1 und SYCE2, aber abhängig von SYCP1	35
2.2	SYCE3 ist notwendig für die Fertilität beider Geschlechter	37
2.2.1	Generierung der <i>Syce3</i> ^{-/-} Maus	37
2.2.1.1	Knockout Strategie und Klonierung des Replacementvektors	37
2.2.1.2	Elektroporation in R1/E Zellen und Selektion	39
2.2.1.3	Genotypisierung der R1/E Zellen	39
2.2.1.4	Blastocysteninjektion und Verpaarung der Chimären	40
2.2.1.5	Genotypisierung der F1 Generation	40
2.2.1.6	In <i>Syce3</i> ^{-/-} Mäusen wird kein SYCE3 Protein exprimiert	41
2.2.2	Charakterisierung der <i>Syce3</i> ^{-/-} Maus	42
2.2.2.1	<i>Syce3</i> ^{-/-} Mäuse sind infertil	42
2.2.2.2	<i>Syce3</i> Knockout führt bei Männchen und Weibchen zu einem Abbruch der Meiose	43
2.3	SYCE3 ist essentiell für die Synapse und die homologe Rekombination	46
2.3.1	<i>Syce3</i> wird zur Initiation der Synapse benötigt	46

2.3.2	SYCE3 ist essentiell für die Umwandlung von frühen Rekombinationsereignissen in Crossing-over Strukturen	47
2.4	Bindungspartner von SYCE3	50
2.4.1	SYCE3 bindet an SYCE1 und SYCE2	50
2.4.1.1	Verwendete Konstrukte	50
2.4.1.2	Koimmunpräzipitation im heterologen System	51
2.4.2	SYCE3 wird von SYCP1 im heterologen System rekrutiert	54
2.4.2.1	Verwendete Konstrukte	54
2.4.2.2	Koexpression von EGFP-SYCE3 und SYCP1 im heterologen System	55
3	Diskussion	56
3.1	SYCE3: evolutionäre Aspekte und Struktur motive	56
3.2	SYCE3 spielt eine essentielle Rolle beim Assembly Prozess des CE	58
3.3	SYCE3 wird für das Fortschreiten der homologen Rekombination benötigt	63
4	Ausblick	67
5	Material	68
5.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	68
5.2	Computerprogramme	69
5.3	Chemikalien	69
5.4	Kits und Einzelkomponenten	69
5.5	Biologisches Material	70
5.5.1	Zelllinien	70
5.5.2	Antikörper	70
5.6	Molekularbiologisches Material	71
5.6.1	Enzyme	71
5.6.2	Plasmidvektoren	71
5.6.3	Oligonukleotide	75
5.6.4	Rekombinante DNA	76
6	Tiere und Bakterienstämme	77
6.1	Tiere	77
6.2	Bakterienstämme	77
7	Methoden	78
7.1	Mikrobiologische Methoden	78
7.1.1	Kultivierung von Bakterien	78
7.1.1.1	Flüssigkulturen	78
7.1.1.2	Glycerinkulturen	78
7.1.1.3	Bakterienkultivierung auf Agarplatten	78
7.1.2	Herstellung kompetenter Bakterien	79
7.1.3	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien	79
7.1.4	Testen der Transformationseffizienz	79
7.2	Molekularbiologische Methoden	80
7.2.1	Extraktion von RNA aus Gewebe	80
7.2.2	Extraktion von Plasmid-DNA	80
7.2.3	Gewinnung von genomischer DNA aus Gewebe und Zellen	80
7.2.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (DNA und RNA)	80
7.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	81

7.2.5.1	Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)	81
7.2.5.2	Konventionelle PCR	81
7.2.5.3	PCR aus genomischer DNA	83
7.2.5.4	Kolonie-PCR	83
7.2.6	DNA-Sequenzierung	83
7.2.7	Auftrennung von DNA-Molekülen durch Agarose-Gelelektrophorese	84
7.2.8	Präparative DNA-Gelelektrophorese	84
7.2.9	Klonierung	84
7.2.9.1	StrataClone-Klonierungsreaktion	85
7.2.9.2	Restriktionsverdau von DNA	85
7.2.9.3	Dephosphorylierung des Vektors	85
7.2.9.4	Ligation von DNA-Fragmenten	86
7.2.10	Southern Blot	86
7.2.10.1	Digoxigenin-Markierung der DNA-Sonde	86
7.2.10.2	Verdau der genomischen DNA	87
7.2.10.3	Gelelektrophorese genomischer DNA	87
7.2.10.4	Transfer der DNA auf Nylonmembran	87
7.2.10.5	Berechnung der optimalen Hybridisierungstemperatur für die DNA-Sonde	88
7.2.10.6	Hybridisierung des Blots mit der Digoxigenin markierten Sonde	89
7.2.10.7	Detektion der Sonde über ECL (Enhanced Chemi-luminescence)	89
7.3	Proteinbiochemische Methoden	90
7.3.1	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	90
7.3.1.1	Aufreinigung von N-Terminalen Hexa-Histidin-Fusionsproteinen unter denaturierenden Bedingungen	90
7.3.1.2	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	91
7.3.2	Methanol/Chloroformfällung von Proteinen	92
7.3.3	Produktion von Antikörpern	93
7.3.3.1	Immunisierung	93
7.3.3.2	Aufreinigung polyklonaler Antiseren	93
7.3.4	Auftrennung von Proteinen mittels Gelelektrophorese	94
7.3.4.1	Tricin-SDS-PAGE	95
7.3.4.2	Laemmli-SDS-PAGE	96
7.3.5	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	97
7.3.6	Immun-Blot	98
7.3.6.1	Transfer der Proteine auf Nitrocellulose	98
7.3.6.2	Anfärben der transferierten Proteine	99
7.3.6.3	Antikörperinkubation der Nitrocellulose und ECL-Reaktion	99
7.3.7	Koimmunpräzipitation im heterologen System	99
7.4	Zellkultur	100
7.4.1	Kultivierung von COS-7 Zellen	100
7.4.2	Transfektion der Kulturzellen	100
7.5	Licht- und elektronenmikroskopische Methoden	101
7.5.1	Gewebepräparation	101
7.5.1.1	Herstellung und Verarbeitung von gefrorenem Gewebe	101
7.5.1.1.1	Einfrieren von Geweben	101
7.5.1.1.2	Gefrierschnitte	101
7.5.1.2	Spreitungen von Hodengewebe	101
7.5.1.3	Spreitungen von embryonalem Ovar	102
7.5.1.4	Herstellung und Verarbeitung von in Paraffin eingebettetem Gewebe	103
7.5.1.4.1	Paraffineinbettung von Geweben	103
7.5.1.4.2	Anfertigen von Paraffinschnitten	103
7.5.1.4.3	Entparaffinierung der Schnitte	104
7.5.2	TUNEL-Assay	104
7.5.3	Hämatoxylin-Eosin Färbung	105
7.5.4	Immunfluoreszenz auf Zellen	105

7.5.5	Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten _____	106
7.5.6	Immunfluoreszenz auf Spreitungen _____	106
7.5.7	Analyse am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) _____	107
7.5.8	Analyse am Zeiss Axiophot Stereo Fluoreszenzmikroskop _____	107
7.5.9	Herstellung und Analyse der Präparate für die Elektronenmikroskopie _____	107
7.5.9.1	Epon Einbettung _____	107
7.5.9.2	Anfertigen von Semidünnschnitten und Ultradünnschnitten _____	108
7.5.9.3	Preembedding Immungold-Lokalisation _____	108
7.5.9.4	Aufnahmen am Zeiss EM 10 und Entwicklung der Negative _____	109
8	Zusammenfassung _____	110
9	Summary _____	112
10	Literaturverzeichnis _____	113
11	Abkürzungen _____	121
12	Erklärung _____	123
13	Publikationsliste _____	125
13.1	Publikationen als Autor und Koautor _____	125
13.2	Poster und Vorträge auf internationalen Kongressen _____	125
14	Lebenslauf _____	127
15	Danksagung _____	129

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1-1: Vergleich zwischen Mitose und Meiose.....	6
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung mitotischer (A) und meiotischer (A-F) Kohäsin-Komplexe	10
Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Kohäsin-Komplexe während der Meiose in Vertebraten.....	11
Abbildung 1-4: Elektronenmikroskopische Aufnahme des SC der Maus	12
Abbildung 1-5: Schematische Darstellung des Synaptonemalkomplexaufbaus bei Säugern.....	13
Abbildung 1-6: Dreidimensionales Model der CR des SC von <i>Blaps cribrosa</i>	16
Abbildung 1-7: Model des SC Assemblys.....	20
Abbildung 1-8: Überblick über die Hauptwege der homologen Rekombination in Säugern.	22
Abbildung 1-9: Reifung der Rekombinations-Proteinkomplexe, die mit den Achsen meiotischer Chromosomen während der Prophase I assoziiert sind.....	23
Abbildung 2-1: Die SYCE3 Aminosäuresequenz ist konserviert zwischen einzelnen Spezies der Säuger.....	26
Abbildung 2-2: Die Aminosäuresequenz von SYCE3 ist konserviert zwischen Maus und Mensch.....	26
Abbildung 2-3: SYCE3 mRNA wird gonadenspezifisch exprimiert	27
Abbildung 2-4: SYCE3 mRNA wird während der Meiose exprimiert	28
Abbildung 2-5: SYCE3 wird während der Meiose exprimiert.	28
Abbildung 2-6: SYCE3 ist ausschließlich in Spermatozyten, nicht aber in Spermato gonien, Spermatischen und Spermien detektierbar.	29
Abbildung 2-7: SYCE3 ist Bestandteil des Synaptonemalkomplexes und lokalisiert spezifisch an den über die Transversalfilamente miteinander verbundenen Bereichen der homologen Chromosomen	30
Abbildung 2-8: SYCE3 und SYCP1 kolokalisieren in Pachytän-Spermatozyten.....	31
Abbildung 2-9: SYCE3 lokalisiert spezifisch im CE des SC	32
Abbildung 2-10: SYCE3 ist ebenfalls in Oocyten Bestandteil des SC	33
Abbildung 2-11: SYCE3 kolokalisiert mit SYCE1, aber nicht vollständig mit SYCE2	34
Abbildung 2-12: Die Rekrutierung von SYCE3 an die Chromosomenachsen ist unabhängig vom Zusammenbau der AEs/LEs und SYCE1 bzw. SYCE2, aber abhängig von SYCP1.	36
Abbildung 2-13: Grafische Übersicht des genomischen Bereichs des <i>Syce3</i> Gens.....	37
Abbildung 2-14: Schematische Darstellung des <i>Syce3</i> Gens, des Replacementvektors und des mutierten genomischen Abschnitts	37
Abbildung 2-15: Amplifikation des F2 Fragments aus S129 Zellen.....	38
Abbildung 2-16: Klonierung des F1 Fragments aus genomischer DNA (R1/E Zellen).....	38
Abbildung 2-17: Genotypisierungs-PCR des positiven ES Zell Klons B5.....	39
Abbildung 2-18: Southern Blot des positiven ES Zell Klons B5.....	39
Abbildung 2-19: Genotypisierung der F1 Generation.	40
Abbildung 2-20: Die Expression des SYCE3 Proteins wird durch den Knockout des <i>Syce3</i> Gens verhindert	41
Abbildung 2-21: <i>Syce3</i> ^{-/-} Mäuse zeigen keinen somatischen Phänotyp	42
Abbildung 2-22: Größenunterschied adulter wildtypischer Hoden (links) und <i>Syce3</i> ^{-/-} Hoden (rechts)	42
Abbildung 2-23: Das Fehlen von SYCE3 hat einen Abbruch der Meiose zur Folge.....	43
Abbildung 2-24: In <i>Syce3</i> ^{-/-} Tubuli sind viele TUNEL-positive Zellen detektierbar.....	45
Abbildung 2-25: In <i>Syce3</i> ^{-/-} Hoden erfolgt ein Stadium IV Arrest der Spermatozyten..	45
Abbildung 2-26: In <i>Syce3</i> ^{-/-} Tieren bildet sich keine Synapse zwischen den homologen Chromosomen aus	46
Abbildung 2-27: Die Initiation der Synapse ist in <i>Syce3</i> ^{-/-} Spermatozyten defekt	47
Abbildung 2-28: Das Fortschreiten der homologen Rekombination ist in <i>Syce3</i> ^{-/-} Oocyten gestört.....	49
Abbildung 2-29: Schematische Darstellung aller für die IP im heterologen System verwendeten Konstrukte	50
Abbildung 2-30: SYCE3 bindet an SYCE1	51
Abbildung 2-31: SYCE3 bindet an SYCE2	52
Abbildung 2-32: myc-SYCE3 konnte SYCP1 N-Term-EGFP, EGFP-SYCP1 C-Term und Tex12-EGFP nicht kopräzipitieren.	53

Abbildung 2-33: Verwendete Konstrukte für die Koexpression von EGFP-SYCE3 und SYCP1 im heterologen System	54
Abbildung 2-34: Im heterologen System wird EGFP-SYCE3 von SYCP1 rekrutiert.....	55
Abbildung 3-1: Model des Assembly Prozesses der CR basierend auf Studien an verschiedenen Knockout Mausmodellen einschließlich der <i>Syce3</i> Knockout Maus	61
Abbildung 5-1: Vektorkarte und Multiple Cloning Site (MCS) des pSC-A-amp/kan Vektors	71
Abbildung 5-2: Vektorkarte und MCS des pCR 2.1-TOPO	72
Abbildung 5-3: Vektorkarte und MCS des pGEX-5x-1	72
Abbildung 5-4: Vektorkarte und MCS des pQE31 Vektors.....	73
Abbildung 5-5: Schematische Darstellung des pKS/ <i>oxPNT</i> Vektors	73
Abbildung 5-6: Vektorkarte des pCMV-Myc Vektors mit MCS	74
Abbildung 5-7: Vektorkarte und MCS des pEGFP-N2 (A) und pEGFP-C2 (B) Vektors	74
Abbildung 7-1: Aufbau eines Southern Blots.....	88
Abbildung 7-2: Aufbauschema für Immun-Blot.....	98
Tabelle 1-1: Keimzellstadien im Hoden pubertierender Mäuse.	2
Tabelle 1-2: Zelloassoziationen in den verschiedenen Stadien des Samenepithelzyklus	3
Tabelle 1-3: Sexualdimorphismus der Gametogenese	5
Tabelle 2-1: <i>Syce3</i> Knockout führt zu einer Reduktion des Hodengewichts.	42
Tabelle 5-1: Verwendete Antikörper.	70
Tabelle 5-2: Verwendete Oligonukleotide.....	75
Tabelle 7-1: Abhängigkeit des Trennbereichs von der Agarosekonzentration	84

1 Einleitung

1.1 Gametogenese

Die Gametogenese bezeichnet im Allgemeinen den Entwicklungsprozess der Keimzellen. Er findet in den Gonaden sich sexuell fortpflanzender Organismen statt und wird beim Männchen als Spermatogenese, beim Weibchen als Oogenese bezeichnet.

1.1.1 Spermatogenese der Säuger

Die Spermatogenese ist ein vektorieller, zyklischer Prozess, in dessen Verlauf aus diploiden prämeiotischen männlichen Keimzellen haploide Spermien gebildet werden. Die Spermatogenese kann in drei Phasen unterteilt werden: (1) **Proliferation** der Stammzellen (Spermatogonien) und Differenzierung zu Spermatocyten, (2) Reduktion des Chromosomensatzes und Austausch genetischen Materials während der **Meiose** und (3) Differenzierung der Keimzellen zu Spermien (**Spermiogenese**). Die Spermatogenese beginnt nach der Geburt und findet in den Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti) der Hoden (Testes) statt.

1.1.1.1 Ablauf der Spermatogenese

Die Spermatogenese beginnt mit der Proliferation von Stammzellen, den sogenannten Spermatogonien. Diese Stammzellen entwickeln sich aus Urgeschlechtszellen (primordial germ cells (PGCs)), die während der Embryonalentwicklung in die Genitalleiste einwandern. Dort assoziieren sie mit Sertoli-Zellen, differenzieren zu Gonocyten, proliferieren und werden nach wenigen Tagen in der G_0/G_1 Phase des Zellzyklus arretiert. Die **Spermatogenese** beginnt kurz nach der Geburt, mit dem Wiedereintritt der Gonocyten in den Zellzyklus (de Rooij, 1998). Aus den Gonocyten bilden sich Typ A-Spermatogonien aus, die in drei unterschiedliche Gruppen unterteilt werden können: A_{single} (A_s), A_{paired} (A_{pr}) und $A_{aligned}$ (A_{al}) (de Rooij & Grootegoed, 1998). Dabei sind Typ A_s -Spermatogonien die eigentlichen Stammzellen der Spermatogenese, da sie sowohl die Fähigkeit besitzen zu differenzieren als auch die Stammzellpopulation durch Selbsterneuerungsteilungen aufrechtzuerhalten. Teilt sich eine Typ A_s -Spermatogonie werden die Tochterzellen nach der Teilung entweder getrennt und es entstehen zwei neue Typ A_s -Spermatogonien, oder sie bleiben nach einer unvollständigen Cytokinese über interzelluläre Cytoplasmabrücken miteinander verbunden und es entstehen Typ A_{pr} -Spermatogonien (de Rooij & Grootegoed, 1998). Typ A_{pr} -Spermatogonien teilen sich weiter, wodurch Ketten von 4, 8 und 16 Typ A_{al} -Spermatogonien ausgebildet werden. Bei Mäusen **differenzieren** Typ A_{al} Spermatogonien zu intermediären und schließlich zu Typ B-Spermatogonien (de Rooij & Grootegoed, 1998). Typ B-Spermatogonien können schließlich zu primären Spermatocyten differenzieren und in die **Meiose** eintreten. Die erste meiotische Teilung dient dem Austausch genetischen Materials und der Reduktion des Chromosomensatzes, weshalb sie auch Reduktionsteilung genannt wird (siehe 1.2.1). Die zweite meiotische Teilung hingegen verläuft ähnlich einer mitotischen Teilung. Aus ihr gehen haploide, runde Zellen, die sogenannten Spermatisden, hervor (siehe 1.2.1). Diese differenzieren in der **Spermiogenese** zu länglichen, mobilen Spermien. Für diese Differenzierung muss das Chromatin im Zellkern kondensieren, das Akrosom muss sich aus dem Golgi-Apparat entwickeln und das Flagellum ausgebildet werden (Holstein *et al.*, 2003).

1.1.1.2 Die erste Welle der Spermatogenese

Die Spermatogenese läuft im Samenepithel der Samenkanälchen räumlich und zeitlich geordnet ab: Im Samenepithel befinden sich die Spermatogonien am Rand des Samenkanälchens. Je weiter die Zellen differenzieren, desto weiter wandern sie in Richtung des Lumens des Samenkanälchens. Ein besonderes Augenmerk kann auf die **erste Welle der Spermatogenese** gelegt werden. Diese setzt kurz nach der Geburt der Maus in allen Samenkanälchen gleichzeitig mit der Proliferation der Spermatogonien ein (Bellve *et al.*, 1977; Malkov *et al.*, 1998). In Hoden von Tag 6 und 8 alten Mäusen sind daher nur Spermatogonien und somatische Zellen zu finden. Einige Spermatogonien differenzieren und treten ab Tag 10 in die Meiose I ein, weshalb ab diesem Zeitpunkt Präleptotän- und Leptotän-Spermatocyten im Samenkanälchen gefunden werden können. Zwischen Tag 12 und Tag 20 sind meiotische Zellen verschiedener Stadien im Hoden angereichert: So können Zygotän-Spermatocyten erstmals in Tag 12 Hoden nachgewiesen werden, Pachytän-Spermatocyten erst mit Tag 14. Ab Tag 20 sind postmeiotische Zellen im Hoden vorhanden. Diese differenzieren im Verlauf der Spermiogenese zu Spermien. Für eine Übersicht der verschiedenen Keimzellstadien in Hoden pubertierender Mäuse siehe Tabelle 1-1.

Zelltyp	Tage nach der Geburt							
	6	8	10	12	14	16	18	20
Spermatogonien	16	27	18	15	12	17	10	10
Preleptotän-Spermatocyten			15	11	9	5	10	7
Leptotän-Spermatocyten			15	12	14	5	5	9
Zygotän-Spermatocyten				23	14	7	8	8
Pachytän-Spermatocyten					15	27	36	33
Sekundäre Spermatocyten							1	1
Runde Spermatozoon							1	4

Tabelle 1-1: Keimzellstadien im Hoden pubertierender Mäuse. Die Tabelle gibt den prozentualen Anteil an Spermatogonien, primären beziehungsweise sekundären Spermatocyten und runden Spermatozoen in Mäusehoden verschiedenen Alters an. Das Alter der Mäuse ist in Tagen nach der Geburt angegeben. Somatische Zellen wurden nicht in die Tabelle aufgenommen, weshalb die relativen Zellmengen addiert keine 100% ergeben. Tabelle abgewandelt nach Bellve *et al.*, 1977.

1.1.1.3 Die verschiedenen Stadien des Samenepithelzyklus

Die Spermatogenese verläuft in einem periodischen Prozess. Die Zeitspanne, die für die Entwicklung eines reifen Spermiums aus einer Spermatogonie benötigt wird, beträgt bei der Maus ungefähr 35 Tage. Alle 8,6 Tage wird ein neuer Zyklus angestoßen. Diese periodische Abfolge von Zyklen hat zur Folge, dass alle 8,6 Tage in jedem bestimmten Bereich eines Samenkanälchens die gleichen Assoziationen von Zelltypen zu beobachten sind (Clermont & Trott, 1969; Clermont, 1972; Eddy, 2002). Dieser Zyklus wird Samenepithelzyklus (englisch: cycle of the seminiferous epithelium) genannt und kann anhand der ersten 12 Entwicklungsstufen der Spermiogenese in 12 Phasen unterteilt werden (Oakberg, 1956). Als Kriterium dient hierfür besonders die Assoziation von Spermien und Spermatogonien. Beispielsweise sind Spermatozoen aus dem Stadium 5 der

Spermiogenese immer mit Typ B-Spermatogonien und Pachytän-Spermatocyten vergesellschaftet (Ahmed & de Rooij, 2009). Die Stadien des Samenepithelzyklus und deren spezifische Zellassoziationen sind in Tabelle 1-2 aufgeführt.

Stadien des Samenepithelzyklus												
Zelltypen	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Spermatiden	13	13	14	14	15	15	16	16				
Spermatiden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Spermatocyten	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P/D	D	Meiotische Teilung I, II
Spermatogonien	A ₃ / A ₄	A ₄ / In	In	In/B	B	B/ preL	preL	preL / L	L	L/Z	Z	Z/P
Spermatogonien							A ₁	A ₁	A ₁ / A ₂	A ₂	A ₂ / A ₃	A ₃
Spermatogonien	A _s →	A _{pr} →	A _{al}					A _{al} ↗				

Tabelle 1-2: Zellassoziationen in den verschiedenen Stadien des Samenepithelzyklus. (A_s) Typ A_{single}-Spermatogonie, (A_{pr}) Typ A_{paired}-Spermatogonie, (A_{al}) Typ A_{aligned}-Spermatogonie, (In) Intermediäre Spermatogonie, (B) Typ B Spermatogonie, (preL) Präleptotän-Spermatocyte, (L) Leptotän-Spermatocyte, (Z) Zygotän-Spermatocyte, (P) Pachytän-Spermatocyte, (D) Diplotän-Spermatocyte. Tabelle nach Ahmed & de Rooij, 2009.

1.1.2 Oogenese der Säuger

Die Oogenese beschreibt den Prozess, in dessen Verlauf aus prämeiotischen Keimzellen reife Eizellen ausgebildet werden. Auch sie kann in drei Phasen unterteilt werden: (1) die Proliferation von Oogonien, (2) die Differenzierung der Keimzellen und (3) die Meiose. Im Menschen beginnt die Oogenese zwischen dem zweiten und dem siebten Monat der Embryonalentwicklung. Ab diesem Zeitpunkt teilen sich die etwa 1000 vorhandenen Oogonien und bilden so ungefähr sieben Millionen Keimzellen aus, deren Mehrzahl allerdings stirbt (Atresie). Die verbleibenden Oocyten treten in die Meiose I ein und durchlaufen die Prophase I der Meiose bis zum Diplotän-Stadium, in dem sie arretiert werden (Baker & Scrimgeour, 1980). Dieses Stadium wird auch als Diktyotän-Stadium bezeichnet. Jede dieser primären Oocyten wird von einer Schicht Granulosa- und Thecazellen umhüllt und bildet so einen primären Follikel aus. In diesem Zustand verweilen die primären Follikel bis zur Geschlechtsreife des Individuums. Mit dem Einsetzen der Pubertät werden jeden Monat 5-15 primäre Follikel reaktiviert und durch follikelstimulierendes Hormon (FSH) und luteinisierendes Hormon (LH) zur Reifung stimuliert. Die Reifung des Follikels dauert im Menschen ungefähr 85 Tage und der Großteil der Follikel stirbt während dieses Prozesses. Im Menschen reift pro Zyklus durchschnittlich nur eine Oocyte vollständig heran. Diese wird durch den Anstieg des LH zur Ovulation angeregt und vollendet die Meiose I. Ein Chromosomensatz verbleibt dabei in der Oocyte, während der andere in einem kleinen Teil des Cytoplasmas als Polkörper abgeschnürt wird. Direkt im Anschluss an die Meiose I bildet sich erneut eine Spindel aus und die Chromosomen lagern sich an der Metaphaseplatte an. In diesem Stadium (also Metaphase II) bleiben die Zellen, die nun Eizellen heißen, bis zur Befruchtung oder der Degeneration arretiert. Mit der Fusion von Spermium und Eizelle vollendet sich dann die zweite meiotische Teilung, wobei die Hälfte der Chromatiden in der Eizelle, die jetzt Zygote heißt, verbleibt und die andere als zweiter Polkörper abgeschnürt wird. Nach

der Verschmelzung der Vorkerne kann nun die erste mitotische Furchungsteilung stattfinden (siehe auch Hunt & Hassold, 2008).

In der Maus verläuft die Oogenese ähnlich, jedoch in einem kürzeren Zeitraum: Die Oogenese in der Maus beginnt ungefähr am Tag 13 nach der Befruchtung (dpc, day post coitum). In Ovarien können ab diesem Tag die ersten sich teilenden Oogonien entdeckt werden. Am Tag 14 dpc ist die Mehrzahl der Oogonien in die Meiose eingetreten und befindet sich im Leptotän- oder Zygotän-Stadium. Mit Tag 15 dpc befinden sich so gut wie alle Oogonien im Zygotän und frühen Pachytän. Zwischen Tag 16 dpc und Tag 19 dpc dominiert das Pachytän-Stadium, wobei während dieser Zeit viele Zellen absterben. Von Tag 19 dpc an ist die Anzahl an Pachytän-Zellen rückläufig und die meisten Oocyten treten ins Diplotän ein, in dem sie arretiert bleiben. Nach der Geburt beginnt die Oocyte zu wachsen und es bildet sich ein primärer Follikel aus (Borum, 1961). Die Reifung des Follikels dauert bei Mäusen ungefähr 14 Tage (Hunt & Hassold, 2008).

1.1.3 Sexualdimorphismus der Gametogenese

Obwohl der Gametogenese sowohl beim Männchen als auch beim Weibchen dasselbe Prinzip zugrundeliegt, nämlich die Reduktion des Chromosomensatzes und die homologe Rekombination, gibt es dennoch beträchtliche geschlechtsspezifische Unterschiede (Zusammenfassung siehe Tabelle 1-3).

Der erste Unterschied liegt in dem **zeitlichen Ablauf der Meiose**: Die Meiose in männlichen Organismen setzt zu Beginn der Pubertät ein und läuft von diesem Zeitpunkt an kontinuierlich ab. Im Gegensatz dazu beginnt die Meiose in weiblichen Organismen schon während der Embryonalentwicklung und erstreckt sich zudem über einen wesentlich längeren Zeitraum, da die Gameten während der Embryonalentwicklung in der Prophase I der Meiose **arretiert** werden. Sie treten erst wieder in die Meiose ein, wenn sie nach Erlangung der Geschlechtsreife in periodisch aufeinanderfolgenden Phasen hormonell zum Follikelwachstum und zur Ovulation angeregt werden. In der Metaphase II werden sie schließlich nochmals arretiert und vollenden die Meiose erst nach der Befruchtung durch ein Spermium.

Auch die Zellen, die letztendlich aus der Gametogenese hervorgehen, unterscheiden sich sowohl in ihrer **Morphologie**, als auch in ihrer **Anzahl**. Während das Endprodukt der Oogenese ein haploides Ei (und zwei Polkörper) ist, entstehen durch die Spermatogenese vier haploide Spermien. Morphologisch unterscheiden sich die männlichen und weiblichen Keimzellen deutlich, da jede einzelne Oocyte von Granulosa- und Thecazellen umgeben wird und daher isoliert im Ovar vorliegt, wohingegen Spermatozyten über Gap Junctions miteinander verbunden und von Sertoli- und Leydig-Zellen umgeben sind.

Ein weiterer Unterschied liegt in der **Differenzierung** der Gameten. Oocyten differenzieren in der Prophase I und dem Diplotän-Arrest, folglich vor der Reduktionsteilung und somit zu einem Zeitpunkt, zu dem die Oocyten diploid sind. Wie schon beschrieben, differenzieren die männlichen Keimzellen nach Abschluss der Meiose während der Spermiogenese. Folglich sind die männlichen Gameten zu dem Zeitpunkt der Differenzierung haploid.

Der letzte Unterschied betrifft die **Regulation und Stringenz** der Meiose. Besonders für den Menschen konnte gezeigt werden, dass die Rate aneuploider Oocyten (<25%) wesentlich höher ist als die von Spermien (<2%) (Hassold & Hunt, 2001). Dies ließ die Vermutung aufkommen, dass die

molekularen Abläufe der Prophase I in männlichen Organismen stringenter überwacht und kontrolliert werden, als die in weiblichen Organismen. Diese weniger ausgeprägte Stringenz von molekularen Kontroll-Prozessen (diese werden auch Check-Points genannt), ist in Weibchen wahrscheinlich für die erhöhte Rate von Aneuploidien nach der Meiose I verantwortlich (Morelli & Cohen, 2005). Diese These konnte durch zahlreiche Knockout Maus Modelle belegt werden. So führt beispielsweise der Knockout des Axialelementproteins SYCP3 zur Unfruchtbarkeit von Männchen, *Sycp3^{-/-}* Weibchen weisen allerdings eine Subfertilität auf, die sich in einer geringeren Wurfgröße äußert (Yuan *et al.*, 2000, 2002). Als weiteres Beispiel wäre der Knockout des Rekombinationsproteins MLH1 zu nennen. Auch hier sind die Männchen steril, manche Oocyten in Weibchen können allerdings zur Eizelle reifen und befruchtet werden. Diese entwickeln sich allerdings nicht über das Ein-Zell-Stadium hinaus (Edelmann *et al.*, 1996). Diese Beispiele zeigen, dass Defekte, die durch das Fehlen meiosespezifischer Proteine ausgelöst werden, in männlichen und weiblichen Organismen zu unterschiedlichen Phänotypen führen können, da die Kontrollprozesse während der Meiose im Männchen stringenter ablaufen als im Weibchen.

	Oogenese	Spermatogenese
Zeitlicher Ablauf der Meiose	Die Prophase I findet während der Embryogenese statt, die Metaphase I und alle darauffolgenden Stadien laufen nach Erlangung der geschlechtlichen Reife ab	Die Meiose beginnt mit dem Einsetzen der Pubertät und läuft von da an kontinuierlich ab
Meiosearrest	1. Arrestpunkt im Diktyotän Stadium (während der Prophase I bis mindestens zum Einsetzen der Pubertät) 2. Arrestpunkt Metaphase II (bis zur Befruchtung)	nein
Produktion der Gameten	Aus einer Keimzelle entsteht eine haploide Oocyte (und zwei Polkörper) Meist ovuliert nur eine Oocyte pro Menstruationszyklus	Aus einer Keimzelle entstehen vier haploide Spermien; Millionen von Spermien stehen pro Ejakulation zur Verfügung
Morphologie	Jede Oocyte liegt isoliert im Ovar vor und wird von Granulosazellen umgeben	Spermatocyten sind durch Gap Junctions miteinander verbunden und werden von Sertoli- und Leydig-Zellen umgeben
Differenzierung der Gameten	Die Differenzierung findet während der Prophase I und des Diktyotän-Arrests statt, also während die Zellen diploid sind	Die Differenzierung findet in haploiden Zellen statt, also nachdem die Meiose beendet wurde
Aneuploidie-Rate der Gameten	Im Menschen bis zu 25%	Im Menschen bis zu 2%

Tabelle 1-3: Sexualdimorphismus der Gametogenese; Tabelle nach Morelli & Cohen, 2005.

1.2 Meiose

Für die Entstehung von Keimzellen sich sexuell fortpflanzender Organismen ist eine besondere Form der Zellteilung notwendig: die Meiose. Während bei der Zellteilung in somatischen Zellen (Mitose) zwei genetisch identische Zellen entstehen, ist die Meiose durch eine Reduktion des Chromosomensatzes und durch die Rekombination genetischen Materials der homologen Chromosomen gekennzeichnet (siehe Abbildung 1-1). Die Rekombination genetischen Materials ist entscheidend für sich sexuell fortpflanzende Organismen, da durch sie genetische Vielfalt unter den Nachkommen erzielt wird, die für die Evolution von zentraler Bedeutung ist. Auch die Reduktion des Chromosomensatzes ist von elementarer Bedeutung, um die Chromosomenzahl in der Folgegeneration aufrecht zu erhalten. Die Reduktion des Chromosomensatzes wird während der Meiose dadurch erreicht, dass auf eine Replikationsrunde der DNA zwei Teilungsschritte folgen. Dabei tauschen die aus zwei Schwesterchromatiden bestehenden homologen Chromosomen während der ersten Teilung (**Meiose I**) genetisches Material aus und werden anschließend so auf zwei Tochterzellen verteilt, dass jede dieser Zellen nur noch eine Kopie jedes homologen Chromosomenpaares besitzt. Diese erste Teilung wird auch als Reduktionsteilung bezeichnet. Die darauf folgende zweite Teilung (**Meiose II**) gleicht in wesentlichen Grundzügen der Mitose. Während der Meiose II werden die Schwesterchromatiden voneinander getrennt und nach dem Zufallsprinzip auf die Tochterzellen verteilt (siehe Abbildung 1-1). Folglich verfügt jede der vier während der Meiose produzierten Zellen über eine einzelne (**haploide**) Kopie jedes Chromosoms (siehe Abbildung 1-1).

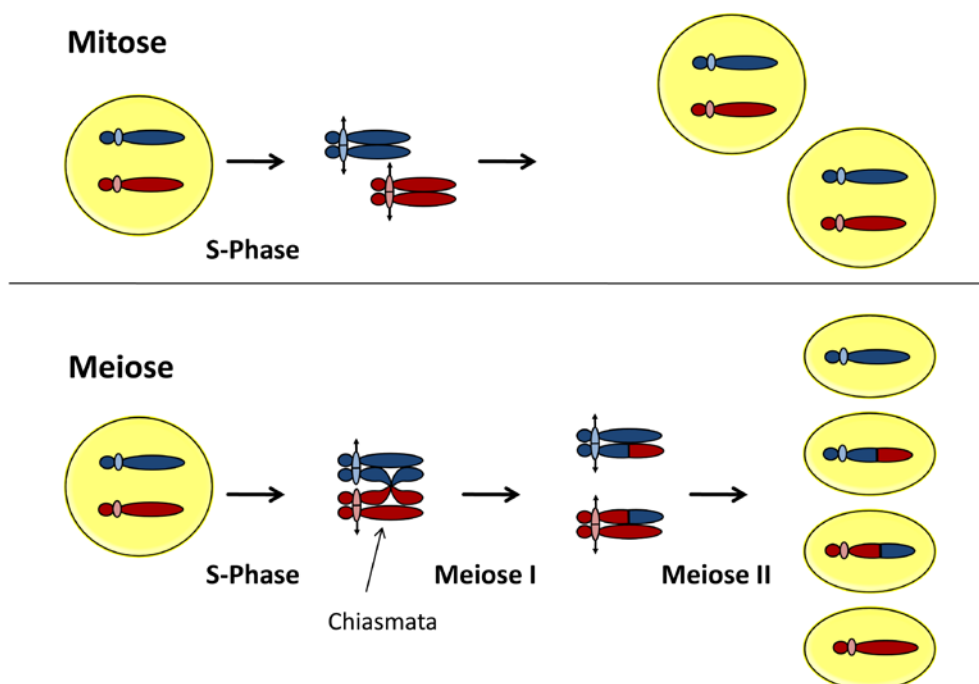


Abbildung 1-1: Vergleich zwischen Mitose und Meiose. Während sich bei der Mitose (oberer Bildabschnitt) nach der Synthese der DNA eine Zellteilung anschließt, die zu zwei identischen Tochterzellen führt, folgen auf die Synthese-Phase der Meiose (unterer Bildabschnitt) zwei Teilungen: Bei der ersten Teilung trennen sich die homologen Chromosomen nach der Rekombination genetischen Materials, wodurch zwei Zellen mit halbiertem Chromosomensatz entstehen (Meiose I). In der darauffolgenden zweiten meiotischen Teilung werden die Schwesterchromatiden nach dem Zufallsprinzip auf die Tochterzellen verteilt und es entstehen vier haploide, genetisch unterschiedliche Zellen. Zur Vereinfachung wurde je nur ein väterliches (blau) und ein mütterliches (rot) Chromosom dargestellt. Abbildung nach Zickler & Kleckner, 1998.

1.2.1 Meiose I

Für eine korrekte Separation der homologen Chromosomen während der Meiose I, müssen sich die homologen Chromosomen im Zellkern finden (Paarung), sie müssen physikalisch miteinander verbunden werden (Synapse) und genetisches Material muss zwischen ihnen ausgetauscht werden (homologe Rekombination). Diese komplexen Prozesse erfolgen in einem streng regulierten Ablauf und sind von der Beteiligung verschiedener Proteine und Proteinkomplexe abhängig.

Die Meiose I kann in vier Abschnitte unterteilt werden: Prophase I, Metaphase I, Anaphase I und Telophase I. Nach der Synthese der DNA treten die Keimzellen in die Prophase I ein. Die Prophase I ist die zeitlich längste Phase der Meiose. Sie dauert in männlichen Mäusen mehrere Tage (siehe Tabelle 1-1)) und in Oocyten sogar mehrere Monate beziehungsweise Jahre (siehe 1.1.2). Sie ist die wichtigste Phase der Meiose I, da in ihr sowohl die Paarung der homologen Chromosomen, als auch die Synapse und die homologe Rekombination stattfinden. Die Prophase I kann morphologisch wiederum in fünf Stadien unterteilt werden: Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakinese.

Im **Leptotän** (leptos, griechisch: dünn) ist die DNA Replikation vollständig abgeschlossen und jedes Chromosom besteht aus zwei Schwesterchromatiden. Die Chromosomen beginnen zu kondensieren, wodurch sie im Lichtmikroskop als fädige Strukturen sichtbar werden. An den Centromeren bilden sich die Kinetochore aus, die in der Metaphase als Ansatzpunkt für die Mikrotubuli des Spindelapparates dienen. Im Leptotän beginnt auch die Assoziation von Synaptonemalkomplexproteinen und Kohäsinen an die Chromosomenachsen. Diese Achsen werden zu diesem Zeitpunkt als Axialelemente (AEs) bezeichnet und deren Ausbildung markiert den Beginn des Synaptonemalkomplex (SC) Assembly. Zwischen den AEs bilden sich DNA Brücken aus, die als axiale Assoziationen bezeichnet werden (Albini & Jones, 1984). Des Weiteren wird im Leptotän mit dem Einfügen von DNA Doppelstrangbrüchen (DNA DSBs) durch das Enzym SPO11 und mindestens zwei weiteren assoziierten Proteinen die homologe Rekombination initiiert (Kumar *et al.*, 2010; Kumar & de Massy, 2010). Nach der Prozessierung der 3' Überhänge der DNA DSBs kann die Stranginversion durch die Proteine DMC1 und Rad51 initiiert werden (Kumar & de Massy, 2010). Im Leptotän heften sich auch die Telomere der Chromosomen über die „Anheftungsplatte meiotischer Chromosomen“ (englisch: attachment plate) an die Kernhülle an (Liebe *et al.*, 2004). Dabei verknüpft der LINC-Komplex die Chromosomen über die Kernhülle mit dem Zytoskelett (Schmitt *et al.*, 2007; Méjat & Misteli, 2010). Auf diesen Anheftungsplatten beginnen die Telomere nun entlang der Kernhülle zu wandern. Die Dynamik der Telomere dürfte hierbei durch eine lokale Aufweichung der Lamina durch das meiosespezifische Lamin C2 ermöglicht werden (Jahn *et al.*, 2010).

Die Wanderung der Telomere wird im **Zygotän** (zygos, griechisch: Paar) fortgesetzt und führt dazu, dass die Telomere in einer Hälfte des Zellkerns polarisieren. Dieser Zustand wird als Bouquet-Stadium bezeichnet, ist evolutionär hoch konserviert und spezifisch für die Meiose (für eine Übersicht siehe Zickler & Kleckner, 1998). Eine Funktion des Bouquet-Stadiums ist es, die Paarung und Synapse der homologen Chromosomen zu erleichtern, indem es die Homologen durch die Bewegungen der Telomere entlang der Kernhülle näher zusammenbringt (Scherthan *et al.*, 1996; Zickler & Kleckner, 1998; Alsheimer, 2009). Im Zygotän lagern sich auch die Rekombinationsproteine Msh4 und RPA an die zuvor von DMC1 und Rad51 assoziierten Foci und markieren so Stellen späterer doppel Holliday-Strukturen (dHJs, double Holliday Junctions) (Ross-Macdonald & Roeder, 1994). Außerdem beginnt im Zygotän die Ausbildung eines vollständigen SC zwischen den homologen Chromosomen. Die im Leptotän gebildeten AEs werden dabei über Transversalfilamente (TFs) miteinander verbunden und

werden ab diesem Zeitpunkt Lateralelemente (LEs) genannt. Dieser Prozess wird als Synapse bezeichnet und schreitet im weiteren Verlauf des Zygotäns mit der Ausbildung eines vollständigen SC über die gesamte Länge der Homologen voran.

Im **Pachytän** (pachus, griechisch: dick) sind die homologen Chromosomen über ihre gesamte Länge über einen SC miteinander verbunden. Eine Ausnahme bilden hierbei die Gonosomen der männlichen Keimzellen. Diese sind nur an der pseudoautosomalen Region, dem einzig homologen Abschnitt, über den SC miteinander verbunden. Zusätzlich setzen sich X und Y Chromosom aufgrund ihres hohen Kondensationsgrades vom restlichen Chromatin ab und bilden so den XY Body aus. Im Lichtmikroskop sind die homolog gepaarten Chromosomen, die zu diesem Zeitpunkt auch als Bivalente bezeichnet werden, als kurze, dicke, fädige Strukturen sichtbar. Das Bouquet-Stadium ist zu diesem Zeitpunkt bereits wieder vollständig aufgelöst. Im Pachytän schreitet auch die homologe Rekombination voran und es bilden sich nach der Assoziation von MLH1 und anderen Proteinen Crossing-over Strukturen (COs) aus. An diesen Stellen wird genetisches Material zwischen den Homologen getauscht.

Im anschließenden **Diplotän** (diploos, griechisch: doppelt) beginnt sich der SC wieder aufzulösen und das Chromatin dekondensiert. Die Homologen bleiben nur an den Stellen, an denen ein CO stattgefunden hat, miteinander verbunden. Diese Stellen werden im Lichtmikroskop als Chiasmata sichtbar. Oocyten werden in einer besonderen Form des Diplotäns, dem Dictyotän, über mehrere Jahre arretiert. In diesem Stadium findet auch aktive Genexpression statt.

In der **Diakinese** (kinesis, griechisch: Bewegung) kondensiert das Chromatin wieder und die Genexpression kommt zum Stillstand. Lichtmikroskopisch sind die Chiasmata und pro Bivalent je vier Chromatiden sichtbar.

Im Anschluss an die Prophase I löst sich zu Beginn der **Metaphase I** die Kernhülle auf und die Bivalente ordnen sich entlang der Metaphaseplatte an. Diese Anordnung erfolgt durch ein Kräftegleichgewicht, das durch den Spindelapparat aufgebaut wird. Dabei strahlen die Mikrotubuli des Spindelapparats von gegenüberliegenden Polen der Zelle aus und heften sich an die Kinetochoren an. Während es in der Metaphase der Mitose beziehungsweise der Meiose II zu einer bipolaren Orientierung der Schwesterkinetochore kommt, bei der die Schwesterkinetochoren mit verschiedenen Zellpolen assoziiert sind (amphitelische Anlagerung), verbinden sich die Schwesterkinetochoren während der Metaphase I mit Mikrotubuli desselben Zellpols (Petronczki *et al.*, 2003). Diese Anlagerung wird auch als synhelische Anlagerung bezeichnet und führt zur Monoorientierung der Schwesterkinetochore (Petronczki *et al.*, 2003). Die Bivalente werden während dieser Phase durch die Chiasmata zusammengehalten. Liegen alle Bivalente in Monoorientierung entlang der Metaphaseplatte, können mit Beginn der **Anaphase I** die homologen Chromosomen getrennt werden. Dies erfolgt durch das Auflösen der Kohäsion zwischen den Armen der Schwesterchromatiden. Die Kohäsine in der Centromerregion bleiben allerdings erhalten und gewährleisten, dass die Schwesterchromatiden zusammenbleiben und zu den jeweiligen Zellpolen gezogen werden (Petronczki *et al.*, 2003; Revenkova & Jessberger, 2005). Da es dem Zufall überlassen bleibt, mit welchem Zellpol sich die väterlichen und mütterlichen Chromosomen über die Mikrotubuli verbinden, ist auch die Verteilung der Homologen auf die Tochterzellen willkürlich. Bei der darauf folgenden **Telophase I** bilden sich zwei neue Kernhüllen um die jeweils vollständigen einfachen Chromosomensätze, bestehend aus je zwei Chromatiden.

1.2.2 Meiose II

Die in der Meiose I entstandenen Zellen treten nun ohne vorausgegangene DNA Replikation in die Meiose II ein. Wie bereits erwähnt, verläuft die Meiose II ähnlich der Mitose. Bei beiden Teilungen werden die Schwesterchromatiden auf unterschiedliche Tochterzellen verteilt.

Während der Meiose II kondensiert das Chromatin, die Kinetochore assoziieren mit den Schwesterchromatiden und ein Spindelapparat wird ausgebildet. In der Metaphase II verbinden sich die Schwesterkinetochore mit Mikrotubuli entgegengesetzter Pole und lagern sich so amphitelisch an der Metaphaseplatte an. Sind alle Chromosomen entlang der Metaphaseplatte ausgerichtet, wird die Kohäsion zwischen der Centromerregion der Schwesterchromatiden aufgelöst und die Schwesterchromatiden werden in der Anaphase II zu den entgegengesetzten Polen gezogen. In der Telophase II bilden sich zwei neue Kernhüllen aus. Somit sind aus einer diploiden Keimzelle vier haploide Zellen entstanden.

1.3 Makromolekulare Architektur meiotischer Chromosomen

1.3.1 Kohäsine und Kondensine

1.3.1.1 Kohäsine

Die Kohäsion zwischen Schwesterchromatiden spielt für die Segregation der Chromosomen während des Zellzyklus eine essentielle Rolle (siehe auch 1.2). Sie unterliegt während Mitose und Meiose verschiedenen Regulationsmechanismen: Während in der Anaphase der Meiose I die Homologen voneinander getrennt werden und die Schwesterchromatiden verbunden bleiben, müssen sich die Schwesterchromatiden während der Anaphase der Mitose oder Meiose II voneinander trennen. Sowohl in somatischen, als auch in meiotischen Zellen, werden die Schwesterchromatiden durch den Kohäsion-Komplex zusammengehalten. Dieser besteht in somatischen Säugerzellen aus den Bestandteilen SMC1, SMC3, Rad21 und SA1/SA2 (Nasmyth, 2001). Dabei bilden SMC1 α und SMC3 ein Heterodimer, welches aus zwei Armen, zwei Kopfdomänen (jeweils assoziiert mit einem Arm) und einer Gelenkregion aufgebaut ist (siehe Abbildung 1-2, A). Dieser Aufbau verleiht dem Molekül eine V-ähnliche Form, die es der Kohäsion-Einheit ermöglicht, zwei Schwesterchromatiden mit ihren Armen wie eine Klammer zu umgreifen. Die Klammer kann im Anschluss durch die Anlagerung von Rad21 und SA1/SA2 verschlossen werden, indem Rad21 die Kopfdomänen miteinander verbindet. Diese Ausbildung einer ringartigen Kohäsion-Einheit dient wahrscheinlich einer topologischen Interaktion mit der DNA (Gruber *et al.*, 2003).

Da durch die Besonderheiten der Meiose eine andere Abfolge der Segregation der Chromosomen notwendig ist, ist es nicht verwunderlich, dass es meiosespezifische Varianten mancher Kohäsion-Untereinheiten gibt: Für RAD21 existieren in Vertebraten die meiotischen Homologen REC8 (Parisi *et al.*, 1999; Watanabe & Nurse, 1999) und RAD21L (Lee & Hirano, 2011). SA1/SA2 besitzen das meiotische Homolog STAG3 (Pezzi *et al.*, 2000). Auch SMC1 α verfügt über ein meiosespezifisches Homolog: SMC1 β (Revenkova *et al.*, 2001). Diese Kohäsion-Untereinheiten können Mischkomplexe mit den somatischen Homologen eingehen und so mindestens sechs Kohäsion-Komplexe ausbilden (siehe Abbildung 1-2 und (Revenkova & Jessberger, 2005; Lee & Hirano, 2011)).

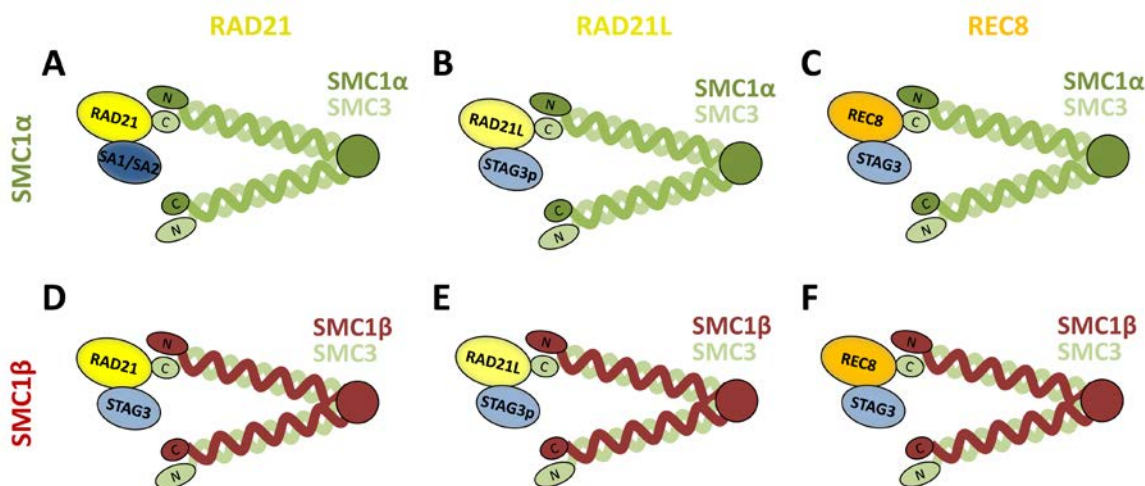


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung mitotischer (A) und meiotischer (A-F) Kohäsion-Komplexe. Es wurden bis jetzt mindestens sechs Kohäsion-Komplexe in Meiozyten isoliert, die alle noch nicht vollständig charakterisiert sind. Abbildung nach Revenkova & Jessberger, 2005 und Lee & Hirano, 2011.

Im Verlauf der Meiose lagern sich die Kohäsion-Untereinheiten SMC1 β und SMC3 im Leptotän zeitgleich mit den AEs/LEs-Proteinen SYCP2 und SYCP3 an die chromosomalen Achsen an (Eijpe *et al.*, 2000; Revenkova *et al.*, 2001). Hingegen werden REC8 und RAD21L schon vor der meiotischen S-Phase an die chromosomalen Achsen rekrutiert (Eijpe *et al.*, 2003; Lee & Hirano, 2011). RAD21L wird mit der Ausbildung der COs vollständig von den Achsen depletiert. Hingegen wird REC8 erst kurz vor der ersten meiotischen Teilung von den Chromosomenarmen entfernt und bleibt in der unmittelbaren Region der Centromere bis zum Beginn der Anaphase II erhalten (Buonomo *et al.*, 2000).

Diese Beobachtung kann auch erklären, wie die Kohäsion während der Meiose abläuft. Diese wird durch das schrittweise Entfernen der Kohäsion-Komplexe bewerkstelligt (siehe Abbildung 1-3 und Revenkova & Jessberger, 2005). Während der Anaphase I wird die Schwesterchromatid-Kohäsion an den Chromosomenarmen aufgelöst. Hierzu werden die Kohäsion-Untereinheit REC8 und RAD21, nachdem sich alle Bivalenten an der Metaphaseplatte angelagert haben, entlang der Chromosomenarme durch das Enzym Separase geschnitten. Durch die Spaltung von REC8 und RAD21 kann sich die Ring-Struktur des Kohäsion-Komplexes öffnen. Dies wird durch die Aktivität des Anaphase fördernden Komplexes (APC) ausgelöst. Die Centromer-Kohäsion wird durch Proteine der Shugoshin-Familie geschützt. In der Hefe schützt Shugoshin während der Anaphase I Rec8p in der näheren Umgebung der Centromere vor dem Abbau durch das Enzym Separase (Revenkova & Jessberger, 2005). In Vertebraten konnte Shogushin-2 charakterisiert werden, das die Centromer-Kohäsion aufrecht erhält (Llano *et al.*, 2008). Durch die Auflösung der Arm-Kohäsion während der Anaphase I können die COs aufgelöst und die Homologen, die immer noch über die Centromer-Kohäsion miteinander verbunden sind, so zu entgegengesetzten Zellpolen gezogen werden. Während der Anaphase II wird die Centromer-Kohäsion aufgelöst und die Schwesterchromatiden können so auf die zwei entstehenden Tochterzellen aufgeteilt werden (Llano *et al.*, 2008).

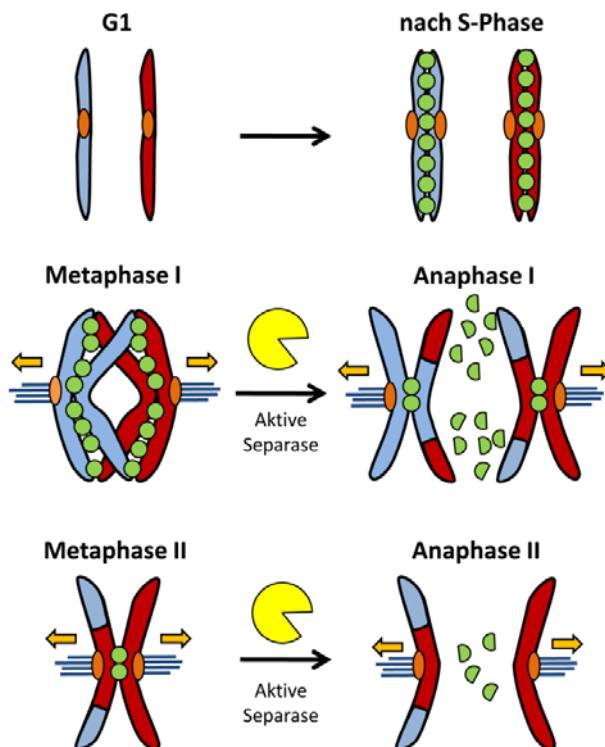


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Kohäsion-Komplexe während der Meiose in Vertebraten. Nach der S-Phase werden die Schwesterchromatiden über ihre gesamte Länge durch Kohäsion-Komplexe miteinander verbunden. Nachdem sich während der Prophase I COs ausgebildet und sich die homologen Chromosomen an der Metaphaseplatte angelagert haben, wird durch die Aktivierung von Separase (gelb) das meiosespezifische Kleisin REC8 (grün) entlang der Chromosomenarme gespalten. An den Centromeren bleibt REC8 durch das Protein Shugoshin-2 vor der Separase-Aktivität geschützt. Durch die Auflösung der Arm-Kohäsion können sich die COs auflösen und die Homologen werden zu den entgegengesetzten Zellpolen gezogen. Zu Beginn der Anaphase II wird schließlich die Centromer-Kohäsion in einer Separase-abhängigen Reaktion entfernt und die Schwesterchromatiden können auf zwei Tochterzellen verteilt werden. Abbildung nach Buonomo *et al.*, 2000.

1.3.1.2 Kondensine

Kondensine bestehen genauso wie Kohäsine-Proteinkomplexe aus SMC Proteinen (SMC2 und SMC4) und nicht-SMC Proteinen. Auch die SMC-Untereinheiten der Kondensine bilden eine V-ähnliche Struktur aus, die durch die nicht-SMC Proteine zu einer ringförmigen Struktur geschlossen werden kann. Während der Mitose sind Kondensine unter anderem für die Verdichtung des Chromatins verantwortlich. Dies ist notwendig, damit die Segregation der Schwesterchromatiden normal ablaufen kann (Wood *et al.*, 2010). Auch im Verlauf der Meiose werden Kondensine für die Verdichtung des Chromatins benötigt. Zudem fördern Kondensine in der Hefe die Ausbildung des SC und sind essentiell für die Anlagerung von Proteinen, die für das Entfernen von Kohäsion-Komplexen während der Prophase I benötigt werden. In *C. elegans* konnte den Kondensinen eine Funktion in der Regulation von COs nachgewiesen werden. Zudem scheinen sie hier die Länge der AEs des SC zu regulieren (Wood *et al.*, 2010).

1.3.2 Der Synaptonemalkomplex

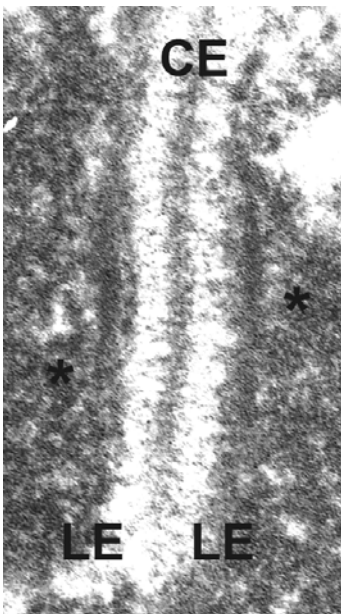


Abbildung 1-4: Elektronenmikroskopische Aufnahme des SC der Maus: Der SC ist eine proteinöse Struktur, die sich zwischen den homologen Chromosomen während der Prophase I der Meiose ausbildet. Er besteht aus Lateralelementen (LEs), die sich an das Chromatin anlagern (Chromatin ist mit einem Stern markiert) und einem Zentralelement (CE), das im Elektronenmikroskop als dichte Struktur zwischen den LEs sichtbar wird.

Der Synaptonemalkomplex (SC) ist eine proteinöse Struktur, die sich zwischen den Homologen während der Meiose I ausbildet. Er wurde 1956 erstmals in Spermatozyten des Krebses (Moses, 1956), und wenig später auch im Schwein, der Katze und im Menschen (Fawcett, 1956) beschrieben. Er wird als Leiter-ähnliche Struktur im Elektronenmikroskop sichtbar (siehe Abbildung 1-4). Die Holme der Leiter werden **Lateralelemente** (LEs) genannt und sind auf der Außenseite mit den chromosomalen Achsen assoziiert. Die Sprossen der Leiter bilden die **Transversalfilamente** (TFs), die mit den LEs interagieren und den Raum zwischen zwei LEs durchspannen. Bevor zwei LEs über Transversalfilamente miteinander verbunden sind, werden diese als **Axialelemente** (AEs) bezeichnet. Den Raum zwischen zwei LEs nennt man Zentralregion (CR). In ihr befinden sich die eben schon erwähnten TFs und eine elektronendichte Struktur in der Mitte, die als **Zentralelement** (CE) bezeichnet wird (siehe Abbildung 1-4 und Abbildung 1-5).

Die Ausbildung des SC beginnt im Leptotän mit dem Assembly der AEs. Diese werden im Zygotän über TFs miteinander verbunden, ein Prozess, der **Synapse** genannt wird. In Pachytän-Zellen verbindet der SC alle Homologen über ihre komplette Länge mit Ausnahme von X und Y Chromosom. Der Abbau des SC beginnt im Diplotän.

Die Ausbildung eines vollständigen SC zwischen den homologen Chromosomen ist essentiell für die Fertilität von Mäusen und auch für ein korrektes Fortschreiten der homologen Rekombination (de Vries *et al.*, 2005; Bolcun-Filas *et al.*, 2007, 2009; Hamer *et al.*, 2008). Auf der anderen Seite ist aber auch die homologe Rekombination essentiell für die Ausbildung eines vollständigen SC (Romanienko & Camerini-Otero, 2000). Diese beiden Prozesse sind also wechselseitig voneinander abhängig.

Da der SC eine essentielle Funktion für die Rekombination und die Fertilität übernimmt, wurde diese Struktur während der Evolution stark **konserviert**. Dennoch kann nicht in allen Organismen ein SC nachgewiesen werden. So können sich die homologen Chromosomen in der Bierhefe (*Saccharomyces pombe*), dem Pilz *Aspergillus nidulans* und auch dem *Drosophila melanogaster* Männchen korrekt paaren ohne, dass sich ein SC ausbildet (Rasmussen, 1973; Olson *et al.*, 1978; Egel-Mitani *et al.*, 1982). In allen anderen Modelorganismen konnte eine SC Struktur nachgewiesen werden. Interessanterweise sind allerdings die SC-spezifischen Proteine in diesen Organismen nicht immer in ihrer Primärstruktur (Aminosäuresequenz) konserviert, sondern es ist vielmehr eine Konservierung auf struktureller Ebene zu beobachten (Page & Hawley, 2004). In dem nächsten Abschnitt werden die SC-spezifischen Proteine von Nagern näher beschrieben.

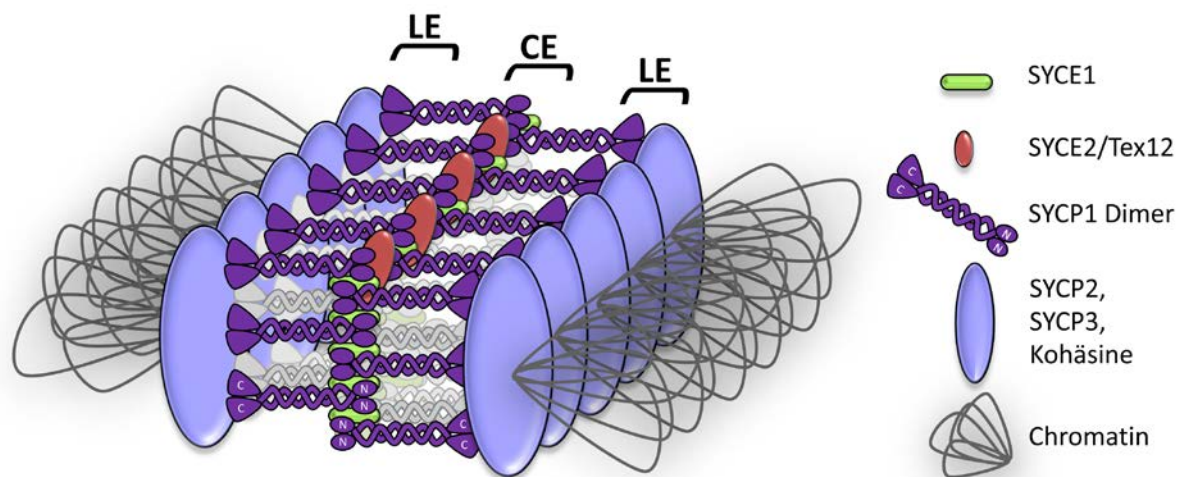


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung des Synaptonemalkomplexaufbaus bei Säugern. Der Synaptonemalkomplex besteht aus den Lateralelementen (LEs), dem Zentralelement (CE) und Transversalfilamenten (bestehend aus SYCP1 Dimeren). Die LEs (blau) assoziieren mit dem Chromatin und sind in diesem Model vereinfacht dargestellt. Sie bestehen aus den zwei SC-spezifischen Strukturproteinen SYCP2 und SYCP3, zahlreichen Kohäsinen und den HORMA-Domänen Proteinen. Das CE enthält die N-Termini von sich gegenüberliegenden SYCP1 Molekülen und die CE-spezifischen Proteine SYCE1 (grün) und den SYCE2/Tex12 Komplex (rot). Die Transversalfilamente werden durch SYCP1 Dimere ausgebildet (lila).

1.3.2.1 Spezifische Proteine des SC

1.3.2.1.1 Proteine der AEs/LEs

Die AEs/LEs bei Säugern bestehen hauptsächlich aus den Proteinen SYCP2 und SYCP3. Diese können miteinander (Yang *et al.*, 2006), mit dem Chromatin und mit Kohäsinen interagieren (Eijpe *et al.*, 2000).

SYCP3

Mit der Charakterisierung von SYCP3 gelang es der Gruppe um Heyting erstmals einen Bestandteil der AEs in Nagern zu identifizieren (Heyting *et al.*, 1987). SYCP3 wird meiosespezifisch exprimiert. Erstmals kann es im Leptotän an den AEs nachgewiesen werden, von diesen dissoziiert es im Diplotän und bleibt schließlich bis zur Metaphase I mit dem Centromerbereich der Chromosomen assoziiert (Dobson *et al.*, 1994; Page & Hawley, 2003). SYCP3 ist ein basisches Protein (isoelektrischer Punkt: 9,4) von 257 Aminosäuren (Lammers *et al.*, 1994). Genaue Untersuchungen konnten zeigen, dass in Maus und Ratte zwei Isoformen von SYCP3 existieren, die ein Molekulargewicht von 30 beziehungsweise 33 kDa aufweisen (Heyting *et al.*, 1987; Lammers *et al.*, 1994; Alsheimer *et al.*, 2010). In anderen Organismen (Mensch, Medaka, Hamster (Dobson *et al.*, 1994; Miyamoto *et al.*, 2003; Baier *et al.*, 2007a)) hingegen konnte nur eine SYCP3 Variante gefunden werden. SYCP3 verfügt über eine Coiled-coil Domäne, die in der C-terminalen Hälfte des Proteins gelegen ist. Diese Coiled-coil Domäne ist für die Ausbildung homotypischer Wechselwirkungen essentiell (Tarsounas *et al.*, 1997). In der N-terminalen Hälfte von SYCP3 liegt ein Kernlokalisierungssignal (Lammers *et al.*, 1994) und ein sogenanntes Motiv-A, das charakteristisch für nukleotidbindende Proteine ist (Lammers *et al.*, 1994).

Außerdem findet man über die gesamte Aminosäuresequenz verteilt putative Phosphorylierungsstellen. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass der Phosphorylierungszustand von SYCP3 Einfluss auf dessen Polymerisationseigenschaften ausübt. Exprimiert man SYCP3 in somatischen Zellen, so können sich homophile Bindungen ausbilden und es entstehen dicke Filamente im Zellkern (Yuan *et al.*, 1998). Für diese Interaktion sind zum einen die Coiled-coil Domäne und die N-terminale nicht-Helikale Domäne und zum anderen die konservierten Struktur motive CM1 und CM2 notwendig (Baier *et al.*, 2007b). Außerdem konnte 1999 gezeigt werden, dass der Phosphorylierungszustand von SYCP3 die subzelluläre Lokalisation des Proteins verändern kann: während nichtphosphoryliertes SYCP3 an den chromosomalen Achsen lokalisiert, wird phosphoryliertes SYCP3 graduell von diesen abgelöst (Tarsounas *et al.*, 1999a). Dies lässt vermuten, dass der Phosphorylierungszustand von SYCP3 Einfluss auf die SC Organisation nimmt.

Um die Funktion von SYCP3 für den Assembly Prozess des SC und für die Meiose zu untersuchen, wurde eine *Sycp3*^{-/-} Knockout Maus hergestellt. Interessanterweise führt die Deletion von SYCP3 zu einem sexuell dimorphen Phänotyp. Während männliche *Sycp3*^{-/-} Tiere infertil sind, können weibliche *Sycp3*^{-/-} Mäuse zwar Nachwuchs hervorbringen, weisen aber eine deutlich reduzierte Wurfgröße auf (Yuan *et al.*, 2000, 2002). Die Infertilität beim *Sycp3*^{-/-} Männchen resultiert aus einem Abbruch der Meiose im Zygotän-Stadium (Yuan *et al.*, 2000). Durch ein Fehlen von postmeiotischen Stadien sind die Hoden von *Sycp3*^{-/-} Tieren im Vergleich zu wildtypischen Geschwistern deutlich verkleinert. Die Depletion von SYCP3 führt beim Männchen dazu, dass keine AEs ausgebildet werden können. Auch

das Assembly der CR ist in diesen Tieren verändert, da das Transversalfilamentprotein SYCP1 im Vergleich zum Wildtyp kürzere Strukturen ausbildet, die zudem fragmentiert sind und axiale Lücken aufweisen (Yuan *et al.*, 2000; Liebe *et al.*, 2004). Interessanterweise ist aber die Erkennung und Paarung der Homologen in *Sycp3*^{-/-} Spermatozyten und Oocyten nicht beeinträchtigt (Yuan *et al.*, 2002; Liebe *et al.*, 2004).

Die Reduktion der Wurfgröße in weiblichen *Sycp3*^{-/-} Mäusen resultiert daraus, dass eine erhöhte Anzahl an Embryonen in utero stirbt. Eine Untersuchung von Metaphase I *Sycp3*^{-/-} Oocyten ergab, dass eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöhte Rate an aneuploiden Zellen zu beobachten war. Diese Aneuploidie in *Sycp3*^{-/-} Oocyten ist wahrscheinlich die Folge einer erniedrigten Chiasmata Ausbildung, die durch das Fehlen von SYCP3 ausgelöst wird. Dabei spielt wahrscheinlich die lückenhafte Ausbildung von Transversalfilamenten zwischen den Homologen und das Fehlen von AEs (auch SYCP2 kann nicht an den chromosomalen Achsen lokalisieren) eine entscheidende Rolle (Yuan *et al.*, 2002).

SYCP2

SYCP2 ist mit seinem Molekulargewicht von 173 kDa das größte bis jetzt beschriebene Synaptonemalkomplexprotein. Es ist ein aus 1505 Aminosäuren bestehendes basisches Protein (isoelektrischer Punkt 8,0) und wird meiosespezifisch exprimiert. Die Proteinsequenz von SYCP2 verfügt im C-Terminus über eine Coiled-coil Domäne (Aminosäure 1364 bis 1499) und über DNA-bindende Motive (S/T-P Motive), die eine unspezifische Interaktion mit der DNA ermöglichen. Zusätzlich kann SYCP2 mithilfe seiner Kernlokalisationssequenzen in den Zellkern transportiert werden. Elektronenmikroskopische Studien haben ergeben, dass SYCP2 an den AEs des SC lokalisiert (Offenberg *et al.*, 1998). Durch das Herstellen einer Mauslinie, bei der die für die Coiled-coil Domäne kodierende Region des SYCP2 Gens deletiert wurde, konnte gezeigt werden, dass intaktes SYCP2 Protein notwendig ist für ein korrektes Fortschreiten der Meiose in Männchen. Der Abbruch der Meiose führt in männlichen *Sycp2* Mutanten zur Infertilität. Weibchen dagegen verfügen über eine Subfertilität, die sich in reduzierten Wurfgrößen äußert (Yang *et al.*, 2006). Die Deletion der Coiled-coil Domäne in SYCP2 verändert zudem sowohl in Weibchen als auch in Männchen die Ausbildung der AEs und die Synapse zwischen den Homologen. So kann zum Beispiel SYCP3, die andere Hauptkomponente der AEs, in dieser Mauslinie nicht mehr an die AE-ähnlichen Strukturen rekrutiert werden. Diese Beobachtung und zusätzliche Bindungsstudien zwischen SYCP3 und SYCP2 zeigen, dass SYCP2 über die Coiled-coil Domäne mit SYCP3 interagieren kann (Tarsounas *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2006). Weitere Bindungsstudien zwischen SYCP2 und SYCP1, der Hauptkomponente der TFs, konnten zeigen, dass der C-Terminus von SYCP2 durch seine Interaktion mit dem C-Terminus von SYCP1 ein Bindeglied zwischen den LEs und den TFs darstellt (Winkel *et al.*, 2009).

1.3.2.1.2 Proteine der CR

Die CR des SC umfasst den Bereich zwischen zwei LEs. In ihr befinden sich die TFs, deren Hauptkomponente das Protein SYCP1 ist. In der Mitte der CR befindet sich das CE, in dem die N-Termini von SYCP1 und noch mindestens vier weiteren CE-spezifischen Proteinen lokalisiert sind (Costa *et al.*, 2005; Hamer *et al.*, 2006). Die einzelnen Proteinkomponenten der CR in Säugern sollen im nächsten Abschnitt genauer beschrieben werden.

SYCP1

SYCP1 besteht aus 946 Aminosäuren (Ratte) und hat ein Molekulargewicht von 111 kDa (Meuwissen *et al.*, 1992). SYCP1 ist ein fibrilläres Molekül, das aus einer zentralen Coiled-Coil Domäne und flankierenden globulären C- und N-Termini besteht (Meuwissen *et al.*, 1992). Es wird spezifisch während der Prophase I exprimiert, wobei es erstmals im Zygotän nachgewiesen werden kann. Es lokalisiert hier spezifisch auf bereits gepaarten Regionen des SC. Während des Pachytän-Stadiums ist es kontinuierlich über die gesamte Länge der chromosomalen Achsen der Autosomen verteilt. Zwischen X und Y Chromosom kann eine starke SYCP1 Markierung nur an der pseudoautosomalen Region beobachtet werden, wohingegen die heterologen Bereiche nur schwach von SYCP1 markiert werden. Im Diplotän lokalisiert SYCP1 nur an den Stellen der Chromosomen, an denen die Synapse noch nicht wieder aufgelöst wurde (Meuwissen *et al.*, 1992). Dabei ist SYCP1 in der CR so organisiert, dass es mit seinen N-Termini in das CE ragt und die C-Termini in den LEs verankert sind (Meuwissen *et al.*, 1992).

SYCP1 ist in der Lage parallele Homodimere auszubilden, die mit ihren C-Termini in den LEs des SC verankert sind und deren N-Termini Kopf-an-Kopf mit den N-Termini gegenüberliegender SYCP1 Homodimere im CE des SC interagieren (Meuwissen *et al.*, 1992; Schmekel & Daneholt, 1995; Liu *et al.*, 1996; Öllinger *et al.*, 2005). Mehrere Heterodimere lagern sich übereinander an und bilden so ein dreidimensionales filamentöses Gebilde aus, das den Raum zwischen den LEs durchspannt und entlang der LEs verlängert werden kann (siehe Abbildung 1-5 und Abbildung 1-6 und Schmekel & Daneholt, 1995).

SYCP1 Moleküle sind auch in der Abwesenheit anderer meiotischer Proteine in der Lage zu Strukturen höherer Ordnung zu polymerisieren. Exprimiert man SYCP1 nämlich in somatischen Zellen, so bilden sich filamentöse cytoplasmatische Strukturen aus, die mit einem SYCP1 Antikörper markiert werden können und Polykomplexe genannt werden. Dabei ist besonders der C-Terminus von SYCP1 für die Polymerisation essentiell (Öllinger *et al.*, 2005). Diese Versuche ließen die Vermutung aufkommen, dass SYCP1 ein molekulares Netzwerk ausbilden kann, an das sich andere Proteine anlagern und so das CE aufbauen können (Öllinger *et al.*, 2005).

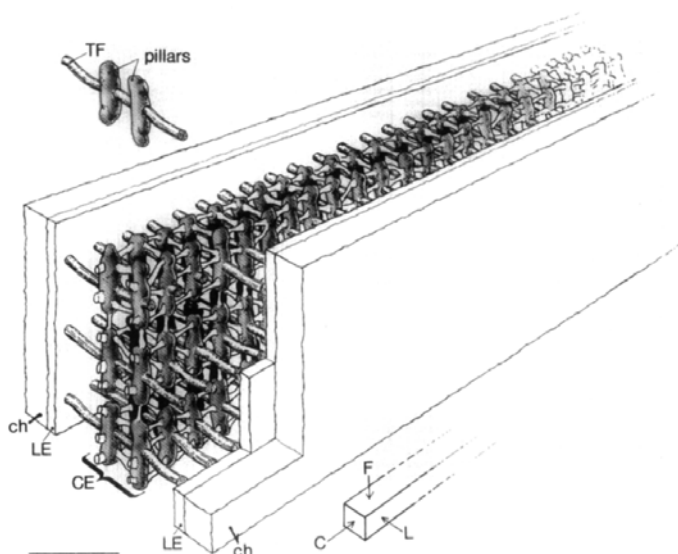


Abbildung 1-6: Dreidimensionales Modell der CR des SC von *Blaps cribrosa*. Die Transversalfilamente sind in mehreren Schichten übereinander angeordnet und bilden so ein dreidimensionales filamentöses Netzwerk, das den Bereich zwischen den zwei LEs durchspannt. (TF) Transversalfilament; (ch) Chromatin; (LE) Lateralelement; (CE) Zentralelement. Balken, 50 nm. Abbildung aus Schmekel & Daneholt, 1995.

Die zentrale Bedeutung von SYCP1 für die Ausbildung des SC, und damit für die Meiose wurde mit der Herstellung einer *Sycp1* Knockout Maus untermauert. Im Gegensatz zu den bereits vorgestellten Knockout Tieren der AEs/LEs beeinflusst der Knockout von SYCP1 beide Geschlechter gleichermaßen: Sowohl homozygote Männchen als auch Weibchen sind unfruchtbar. Die Hoden von männlichen *Sycp1*^{-/-} Tieren sind deutlich kleiner als die ihrer wildtypischen Geschwister, was vermutlich auf den Abbruch der Meiose im Pachytän (Stadium IV Arrest) zurückzuführen ist. Auch das Ovar von *Sycp1*^{-/-} Weibchen unterscheidet sich klar von wildtypischem Kontrollgewebe, da in ihm keine Follikel gefunden werden können. Auch dies deutet auf einen Abbruch der Meiose hin. Nähere Untersuchungen der *Sycp1*^{-/-} Maus haben gezeigt, dass sich die AEs normal ausbilden und die homologen Chromosomen sich paaren können. Es kann allerdings kein vollständiger SC ausgebildet werden (de Vries *et al.*, 2005). Auch das Fortschreiten der homologen Rekombination ist in *Sycp1*^{-/-} Tieren gestört. Die homologe Rekombination kann zwar initiiert werden, was mit der Anwesenheit von DNA DSBs und Markern früher (DMC1/RAD51) beziehungsweise mittlerer (RPA, MSH4) Rekombinationsereignisse gezeigt werden konnte, allerdings können diese in *Sycp1*^{-/-} Tieren nicht weiter prozessiert werden, was sich in einem Persistieren dieser Marker auf den chromosomalen Achsen zeigt. Außerdem kann MLH1, ein Marker für spätere Rekombinationsereignisse, nicht auf die Achsen rekrutiert werden. Zudem werden in diesen Mäusen während der Metaphase I nur wenige Chiasmata ausgebildet (de Vries *et al.*, 2005). Auch diese Ergebnisse sprechen dafür, dass SYCP1 als molekulares Netzwerk dienen kann, an das sich andere Proteine anlagern können.

SYCE1

SYCE1 ist ein meiosespezifisch exprimiertes Protein mit einer Länge von 329 Aminosäuren. Es verfügt über Orthologe in verschiedenen Säugern, wobei für die Mausequenz vier Coiled-coil Domänen berechnet werden konnten (Costa *et al.*, 2005). SYCE1 wird in Spermatozyten und Oocyten spezifisch während der Prophase I ab dem Zygotän exprimiert und kolokalisiert mit SYCP1. Im Diplotän löst sich SYCE1 mit der Auflösung der Synapse von den chromosomalen Achsen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass es spezifisch im CE des SC lokalisiert. SYCE1 kann mit sich selbst, SYCE2 und SYCP1 interagieren (Costa *et al.*, 2005) und wird in *Sycp1*^{-/-} Spermatozyten nicht mehr an die chromosomalen Achsen rekrutiert (Hamer *et al.*, 2006).

Die Funktion von SYCE1 innerhalb des CE wurde mithilfe einer Knockout Maus untersucht. Beide Geschlechter der *Syce1*^{-/-} Maus sind infertil. Hoden und Ovar von *Syce1*^{-/-} Tieren sind im Vergleich zum Wildtyp deutlich verkleinert. Beim Männchen kommt es zu einem Abbruch der Meiose im Pachytän-Stadium (Stadium IV Arrest). Auch beim Weibchen kommt die Meiose zum Erliegen, was durch ein Fehlen von Follikeln in *Syce1*^{-/-} Ovar sichtbar wird. Für den Abbruch der Meiose in Männchen und Weibchen ist ein Ausbleiben der Synapse zwischen den homologen Chromosomen verantwortlich (Bolcun-Filas *et al.*, 2009). Die AEs können sich in *Syce1* defizienten Zellen zwar normal ausbilden und die Autosomen können sich paaren, aber es kann kein vollständiger SC zwischen den Homologen ausgebildet werden, was anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden konnte. Das Ausbleiben der Synapse wird nochmals an der Markierung mit SYCP1 deutlich, das nicht wie in wildtypischen Zellen nur zwischen synapsierten Bereichen des SC zu finden ist, sondern in *Syce1*^{-/-} Zellen in einem schwachen kontinuierlichen Muster entlang der AEs verteilt vorliegt. Dabei spielt es für die SYCP1 Lokalisation keine Rolle, ob die AEs nahe zusammenliegen oder nicht (Bolcun-Filas *et al.*, 2009). Auch die anderen zwei CE-spezifischen Proteine SYCE2 und Tex12 (siehe unten) zeigen ein im Vergleich zum Wildtyp deutlich verändertes

Lokalisationsmuster, denn sie binden in *Syce1*^{-/-} Zellen in distinkten Foci zwischen AEs, die sich in unmittelbarer Nähe befinden. Zusätzlich zu der essentiellen Funktion von SYCE1 für die Ausbildung eines vollständigen SC, konnte gezeigt werden, dass SYCE1 auch für die Ausbildung von COs benötigt wird. Zwar können DNA DSBs in *Syce1*^{-/-} Meiozyten eingefügt werden und auch die Ausbildung von frühen Rekombinationsknoten (ENs) und Transitionsknoten (TNs) ist in *Syce1*^{-/-} Tieren normal, die Prozessierung zu späten Rekombinationsknoten ist in Abwesenheit von SYCE1 jedoch gestört, was am Fehlen von MLH1 deutlich wird (Bolcun-Filas *et al.*, 2009).

SYCE2

SYCE2 (ursprünglich CESC1) besteht in der Maus aus 171 Aminosäuren. Die Proteinsequenz weist eine Coiled-coil Domäne und eine α -Hairpin Struktur auf. Es existieren homologe Sequenzen von SYCE2 in verschiedenen Vertretern der Vertebraten (Säuger, Huhn, Frosch, Fisch) und sogar in der Muschel (Costa *et al.*, 2005). SYCE2 lokalisiert spezifisch am CE des SC und wird wie SYCP1 und SYCE1 während der Prophase I spezifisch exprimiert (Meuwissen *et al.*, 1992; Costa *et al.*, 2005). SYCP2 kann homotypische Interaktionen und Interaktionen mit den SC-spezifischen Proteinen SYCE1, SYCP1 und Tex12 eingehen (Costa *et al.*, 2005; Hamer *et al.*, 2006). Die Interaktion von SYCP1 und SYCE2 wird zusätzlich dadurch bestätigt, dass SYCE2 in *Sycp1*^{-/-} Spermatozyten nicht mehr an die chromosomalen Achsen rekrutiert werden kann (Hamer *et al.*, 2006). Als weiterer Bindungspartner von SYCE2 konnte das für die homologe Rekombination spezifische Protein RAD51 identifiziert werden (Bolcun-Filas *et al.*, 2009).

Auch SYCE2 ist, genauso wie die schon beschriebenen CE-spezifischen Proteine SYCP1 und SYCE1, essentiell für die Fertilität von Mäusen. Auch in *Syce2*^{-/-} Spermatozyten können AEs ausgebildet werden. Diese können sich normal paaren, aber es kommt zu einer fehlerhaften Ausbildung der Synapse. Elektronenmikroskopisch konnte gezeigt werden, dass in *Syce2*^{-/-} Zellen kurze CE-ähnliche Abschnitte zwischen den gepaarten AEs vorliegen. Dies ist in Übereinstimmung mit der Lokalisation von SYCP1 in *Syce2*^{-/-} Spermatozyten. SYCP1 lokalisiert in distinkten Foci auf den AEs. An diesen Stellen stehen die AEs in räumlicher Nähe zueinander und dort lokalisiert auch das andere CE-spezifische Protein SYCE1. Tex12 hingegen ist in diesen Zellen nicht an den AEs lokalisiert (Bolcun-Filas *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass SYCE2 im Männchen nicht für die Initiation der Synapse, aber für deren Ausbreitung über die chromosomalen Achsen verantwortlich ist. In *Syce2*^{-/-} Oocyten können die AEs normal ausgebildet werden, aber die Paarung der homologen Chromosomen ist deutlich eingeschränkter als in männlichen *Syce2*^{-/-} Tieren. Zusätzlich konnten in *Syce2*^{-/-} Oocyten keine CE-ähnlichen Strukturen zwischen den AEs festgestellt werden (Bolcun-Filas *et al.*, 2007). Der Knockout von SYCE2 hat auch Auswirkungen auf die homologe Rekombination: Wie in *Syce1*^{-/-} Zellen beschrieben, können frühe Rekombinationsereignisse ablaufen, aber die Ausbildung von COs ist in *Syce2*^{-/-} Tieren gestört (Bolcun-Filas *et al.*, 2007).

Tex12

Tex12 (Protein ID: NP_079963) besteht in der Maus aus 123 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 14 kDa. Es konnten Orthologe in Säugern und Fischen gefunden werden. Tex12 mRNA wird gonadenspezifisch exprimiert und zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie SYCP3. Die spatio-temporale Verteilung gleicht der eines meiosespezifischen Proteins, da es in Spermatozyten ab dem Leptotän bis zu Typ V Spermatozyten detektierbar ist, wobei das

Expressionsmaximum im Pachytän liegt (Hamer *et al.*, 2006). Tex12 ist ein Bestandteil des SC und markiert innerhalb des SC spezifisch das CE. Während es im Zygotän noch ein eher punktuelleres Verteilungsmuster aufweist, kann man im Pachytän eine kontinuierlichere Lokalisation über die gesamte Länge der chromosomalen Achsen beobachten. Dieses Verteilungsmuster gleicht dem von SYCE2, mit dem es auch interagieren kann. Außerdem konnte gezeigt werden, dass SYCP1 essentiell für die Rekrutierung von Tex12 an die chromosomalen Achsen ist (Hamer *et al.*, 2006).

Auch der Knockout des dritten CE-spezifischen Proteins Tex12 führt zur Unfruchtbarkeit beider Geschlechter. Während im Männchen ein Stadium IV Arrest beobachtet werden kann, können im *Tex12* defizienten Ovar keine primären Follikel ausgebildet werden. Diese Beobachtungen lassen auf einen Abbruch der Meiose schließen, der auch im *Tex12* Knockout durch eine fehlerhafte Synapse ausgelöst wird. Zwar können sich in *Tex12*^{-/-} Spermatozyten AEs ausbilden und diese können paaren, aber die Synapse kann in diesen Zellen nur an manchen Stellen zwischen den Homologen initiiert werden und sich nicht über die gesamte Länge der Homologen ausbreiten (Hamer *et al.*, 2008). An diesen Initiationsstellen der Synapse kolokalisieren SYCP1 und SYCE1 und es können auch CE-ähnliche Strukturen im Elektronenmikroskop beobachtet werden. Der Tex12 Interaktionspartner SYCE2 kann in *Tex12*^{-/-} Tieren allerdings nicht an die chromosomalen Achsen rekrutiert werden.

Wie auch in den anderen Knockout Mäusen von CE-spezifischen Proteinen konnte im *Tex12* Knockout eine Störung im Ablauf der homologen Rekombination festgestellt werden. Auch in *Tex12*^{-/-} Oocyten können DNA DSBs eingefügt werden. Die Prozessierung von ENs und TNs ist aber gestört, was sich darin äußert, dass DMC1 und RPA länger als im Wildtyp auf den Achsen persistieren. Außerdem können keine COs in *Tex12*^{-/-} Oocyten gebildet werden (Hamer *et al.*, 2008).

1.3.2.2 *Assembly und Disassembly*

Das Assembly des SC beginnt während des Leptotäns mit der Anlagerung von SYCP2 und SYCP3 an die zuvor ausgebildeten Kohäsin-Achsen. Die Kohäsin-Achsen bestehen aus REC8, RAD21L, SCM1 β und SMC3, wobei sich REC8 und RAD21L schon vor der meiotischen S-Phase an die chromosomalen Achsen anlagern (Eijpe *et al.*, 2003; Lee & Hirano, 2011), SMC1 β und SMC3 hingegen erst zeitgleich mit der Rekrutierung von SYCP2 und SYCP3 im Leptotän (Eijpe *et al.*, 2000; Revenkova *et al.*, 2001). In Hefe und *C. elegans* ist REC8 sowohl für die Ausbildung der Schwesterchromatid-Kohäsion, also auch für die Ausbildung der AEs notwendig (Klein *et al.*, 1999). Dagegen können sich in der Maus AEs auch in der Abwesenheit von REC8 ausbilden (Bannister *et al.*, 2004).

Noch während sich die AEs ausbilden wird im Zygotän die Synapse initiiert. Die Synapse beschreibt den Prozess, bei dem die AEs homologer Chromosomen über TFs miteinander verbunden werden. Dabei bildet SYCP1 parallele Homodimere aus, die mit ihren C-Termini in den AEs verankert sind und deren N-Termini im CE Kopf-an-Kopf mit einem Homodimer der gegenüberliegenden Seite interagieren können (Meuwissen *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1996). SYCP2 fungiert dabei als Linker, der die Bindung zwischen SYCP1 und den AEs vermittelt (Winkel *et al.*, 2009). Da sich SYCP1 auch in Abwesenheit anderer meiotischer Proteine zu Filamenten zusammenlagern kann wurde vermutet, dass SYCP1 ein molekulares Netzwerk ausbildet, an das sich andere Proteine anlagern können (Öllinger *et al.*, 2005). In vivo konnte allerdings gezeigt werden, dass SYCP1 alleine keine korrekt assemblierte CR ausbilden kann (Bolcun-Filas *et al.*, 2007, 2009; Hamer *et al.*, 2008). Hierfür sind unter anderem die CE-spezifischen Proteine SYCE1, SYCE2 und Tex12 essentiell. Durch die

Untersuchung entsprechender Knockout Mausmodelle konnte gezeigt werden, dass bei einem Fehlen von SYCE1 die Synapse nicht initiiert werden kann. Daraus wurde geschlossen, dass SYCE1 die N-terminale Kopf-an-Kopf Interaktion der SYCP1 Homodimere stabilisieren könnte (Bolcun-Filas *et al.*, 2009). In *Syce2* und *Tex12* defizienten Tieren hingegen kann die Synapse zwar initiiert, aber nicht entlang der Achsen ausgebreitet werden. Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, dass SYCE2 und *Tex12* für eine „Maturation“ des CE verantwortlich sind, indem sie lateral benachbarte SYCP1 Dimere verbinden und so die Synapse entlang des SC elongieren (Bolcun-Filas *et al.*, 2007; Hamer *et al.*, 2008), bis im Pachytän alle Homologen über ihre gesamte Länge durch einen vollständigen SC miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 1-7).

Über die Regulation des Assembly und Disassembly ist relativ wenig bekannt. Der Abbau des SC beginnt während des Diplotäns mit der Desynapsis der Homologen. Die LEs bleiben nur an den Stellen verbunden, an denen COs stattgefunden haben. Während der Diakinese dissoziieren auch SYCP2 und SYCP3 von den chromosomalen Achsen. Beim Säuger wird der Phosphorylierungszustand der SC Hauptkomponenten SYCP1, SYCP2 und SYCP3 mit dem Abbau des SC in Verbindung gebracht (Meuwissen *et al.*, 1992; Lammers *et al.*, 1994; Offenberg *et al.*, 1998). Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass der Phosphorylierungszustand von SYCP3 Einfluss auf den Abbau des SC hat (Tarsounas *et al.*, 1999a).

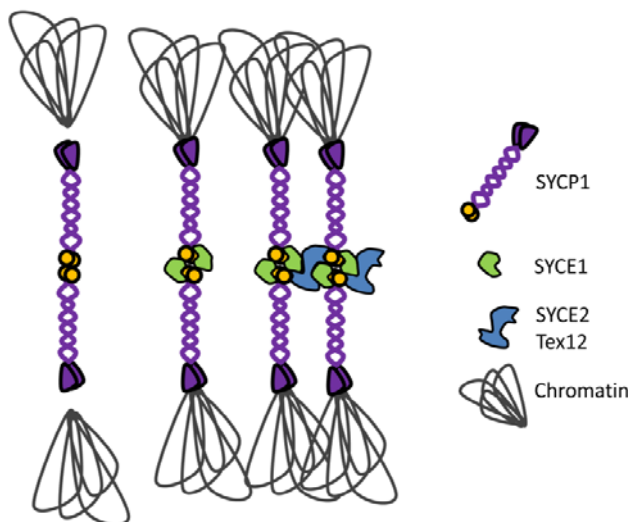


Abbildung 1-7: Model des SC Assemblys.

SYCP1 Homodimere lagern sich Kopf-an-Kopf mit Ihren N-Termini aneinander. Mit ihren C-Termini verankern sie sich über die AEs/LEs am Chromatin. Die N-terminale Interaktion von SYCP1 wird durch SYCE1 stabilisiert. Für eine Elongation der Synapse über die gesamte Länge der Homologen wird ein Komplex aus SYCE2 und *Tex12* benötigt, der die einzelnen SYCP1 Moleküle miteinander verknüpfen und dadurch stabilisieren kann. Model nach Bolcun-Filas *et al.*, 2007.

1.4 Homologe Rekombination

1.4.1 Mechanismus der homologen Rekombination

DNA Doppelstrangbrüche und Rekombinations-Hotspots

Die homologe Rekombination wird im Leptotän der Prophase I mit dem Einfügen von DNA DSBs initiiert. Die DNA DSBs werden durch das von Hefe bis Säuger konservierte Topoisomerase-II-ähnliche Protein SPO11 in das Genom eingefügt (Handel & Schimenti, 2010) und können unter anderem durch die phosphorylierte Form des Histons H2AX (γ H2AX) markiert werden. Interessanterweise liegen DNA DSBs und die an diesen Stellen entstehenden COs nicht zufällig verteilt im Genom vor, sondern häufig an spezifischen Stellen, den sogenannten Rekombinations-Hotspots (für eine Zusammenfassung siehe Youds & Boulton, 2011). Die Position von Hotspots scheint in Hefe und *C. elegans* von der Zugänglichkeit der DNA für das Enzym SPO11 abhängig zu sein. Die Zugänglichkeit kann hierbei durch Chromatin-modifizierende Proteine und Kondensine verändert werden (Youds & Boulton, 2011). Auch Proteine, die mit der chromosomalen Achse assoziieren, scheinen die Position von Rekombinations-Hotspots zu beeinflussen (beispielsweise MEI4 in der Maus (Kumar *et al.*, 2010)). Aber an welchen Stellen im Genom werden bevorzugt Rekombinations-Hotspots ausgebildet? Es konnte in den vergangenen Jahren gezeigt werden, dass 40% aller menschlichen Hotspots mit einem 13-Nukleotid langen konservierten Sequenzmotiv assoziiert sind (Myers *et al.*, 2008). Zusätzlich spielen bei der Positionierung von Hotspots epigenetische Faktoren eine Rolle. Dabei scheinen spezifische Modifikationen von Histonen DSBs zu markieren. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass Chromatin-Modifikationen nicht alleine für die Hotspot-Aktivität zuständig sind (Youds & Boulton, 2011).

Stranginversion

Nach dem Einfügen von DNA DSBs werden die entstandenen Enden so prozessiert, dass Enden mit 3' Überhängen entstehen. An diese 3' Überhänge binden die recA homologen Proteine DMC1 und Rad51 (Habu *et al.*, 1996; Plug *et al.*, 1996). Diese evolutionär hoch konservierten Proteine katalysieren den Strangaustausch zwischen den homologen Chromosomen. Rad51 und DMC1 sind Marker für frühe DNA-Reparaturprozesse. Beim Strangaustausch assoziiert der entstandene 3'Überhang mit der homologen doppelsträngigen DNA, wodurch eine D-Loop Struktur ausgebildet wird (siehe Abbildung 1-8). Der 3' Überhang wird im Anschluss durch DNA Synthese verlängert, wobei der homologen DNA Strang als Template dient.

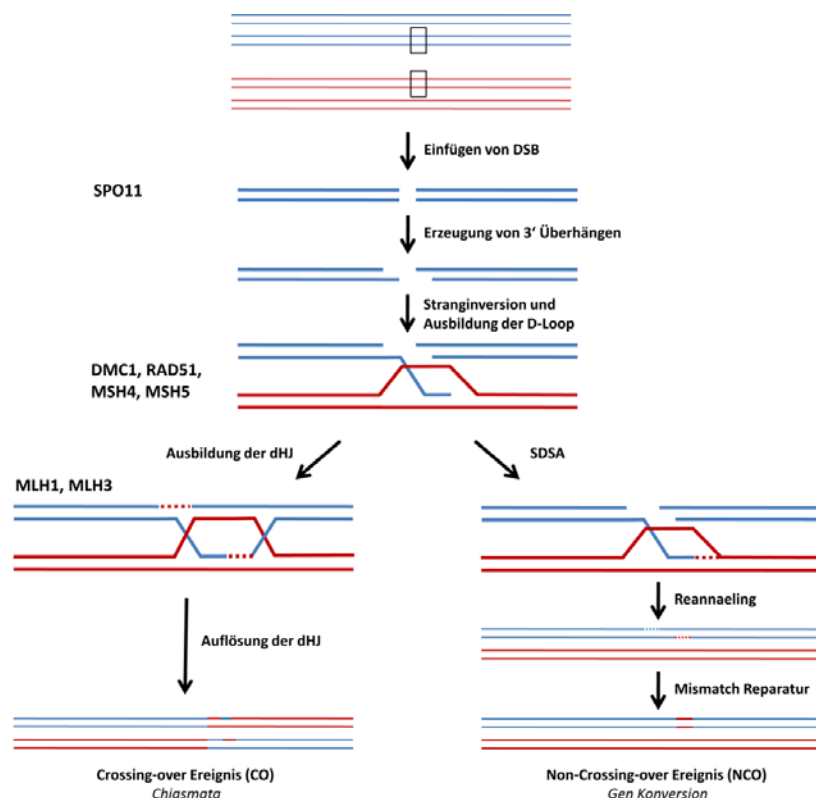
Prozessierung der D-Loop Struktur

Das bei der Stranginversion entstandene Produkt kann auf zwei unterschiedliche Weisen weiter prozessiert werden, was entweder in einem CO (kanonisches Szostak Model) oder in einem nicht-Crossing-Over-Ereignis (NCO) (Synthese abhängiges Strang Annealing (SDSA)) resultiert (siehe Abbildung 1-8 und (Guillon *et al.*, 2005; Baudat & de Massy, 2007). Bei Produkten, aus denen COs entstehen können, wird das noch freie Ende des DSB in die D-Loop Struktur eingebaut, wodurch eine dHJ entsteht (siehe Abbildung 1-8, links). Diese kann, je nachdem wie sie aufgelöst wird, zur Genkonversion oder zu einem reziproken Austausch von Genmaterial (CO) führen (Cohen *et al.*, 2006). NCOs entstehen dann, wenn der invasierende Strang wieder aus der D-Loop Struktur verdrängt wird und die freien verlängerten Enden schließlich religieren (siehe Abbildung 1-8, rechts).

Die endgültige Anzahl an COs ist genau reguliert. Von den ungefähr 300 eingefügten DSBs in Leptotän-Zellen der Maus werden nur ungefähr 23-27 in COs prozessiert. Dabei verfügt jedes Chromosom über mindestens ein CO. Die restlichen DSBs werden in NCOs aufgelöst. Auch die Lage der COs auf den Chromosomen ist nicht zufällig gewählt. Sie wird durch ein Phänomen, die sogenannte Interferenz, reguliert, indem in der Nähe einer CO die Ausbildung einer weiteren CO unterdrückt wird.

Abbildung 1-8: Überblick über die Hauptwege der homologen Rekombination in Säugern.

Der DNA Doppelstrang (blau) eines Chromatids wird durch das Einfügen von DNA DSBs gespalten. Die dadurch entstandenen Enden werden so prozessiert, dass 3' Überhänge entstehen. An diese 3' Überhänge können sich Rad51 und DMC1 anlagern und die Stranginversion katalysieren. Nach der Ausbildung der D-Loop Struktur kommt es zur DNA Synthese (Template: roter DNA Strang). Von diesem Punkt aus kann das entstandene Produkt auf zwei verschiedene Weisen prozessiert werden: Entweder es bilden sich dHJs aus, die durch die Anlagerung von MLH1 und MLH3 zu COs aufgelöst werden können (links) oder es kommt zum Synthese abhängigen Strang Annealing (SDSA), das nicht in COs aufgelöst wird, sondern zur Genkonversion führen kann (rechts). Abbildung nach Handel & Schimenti, 2010.



1.4.2 Molekulare Manifestation der Rekombination auf den chromosomalen Achsen

Schon 1975 konnten unter dem Elektronenmikroskop Strukturen beschrieben werden, die mit der homologen Rekombination in Zusammenhang gebracht wurden (Carpenter, 1975). Diese als Rekombinationsknoten (recombination nodules, RNs) bezeichneten elektronendichten Strukturen sind während des Pachytän-Stadiums mit dem SC assoziiert (Carpenter, 1975). Bis zur heutigen Zeit konnten noch zwei andere Arten von Rekombinationsknoten beschrieben werden: die frühen Rekombinationsknoten (early nodules, ENs) (Albini & Jones, 1987; Barlow *et al.*, 1997) und die Transitionsknoten (transition nodules, TNs) (Moens *et al.*, 2002). Dabei entscheidet sowohl die molekulare Zusammensetzung der jeweiligen Knoten als auch die temporale Erscheinung im Verlauf der Prophase I, um welcher Art von Knoten es sich handelt.

Frühe Rekombinationsknoten werden im Leptotän ausgebildet. Sie enthalten DNA DSBs, die durch die phosphorylierte Form des Histons H2AX (γ H2AX) markiert werden (Mahadevaiah *et al.*, 2001). Frühe Rekombinationsknoten sind molekular durch die Anwesenheit der RecA-Homologen Proteine DMC1 und RAD51, die den Strangaustausch zwischen den Homologen katalysieren, charakterisiert (siehe 1.4.1). Während der Spermatogenese der Maus bilden sich pro Zellkern etwa 300 frühe Rekombinationsknoten aus (Moens *et al.*, 2002). Diese werden im Zygotän in **Transitionsknoten** umgewandelt, sobald sich zwischen den chromosomalen Achsen ein vollständiger SC ausgebildet hat. Dabei verdrängen die Proteine MSH4 und RPA die in den ENs enthaltenen RecA-Homologen DMC1 und RAD51. RPA und MSH4 können nun entweder das Protein BLM, ein Mitglied der RecQ Helicasen Familie, und die Topoisomerase IIIa rekrutieren, welche den Strangaustausch wieder auflösen können (Entstehung von NCOs), oder sie lagern MLH1 und MLH3 an und reifen so zu **Rekombinationsknoten**, die die Stellen mutmaßlicher COs markieren (Moens *et al.*, 2002). Pro Maus Spermatoocyte finden sich ungefähr 200 RPA/MSH4 Foci pro Zelle. Von diesen 200 Foci rekrutieren in der Maus nur ungefähr 10-15% das Protein MLH1 (de Boer & Heyting, 2006). Die MLH1 enthaltenden Foci sind bei der Maus für ungefähr 90% aller COs verantwortlich (de Boer & Heyting, 2006), werden als Klasse I COs bezeichnet und zeigen Interferenz.

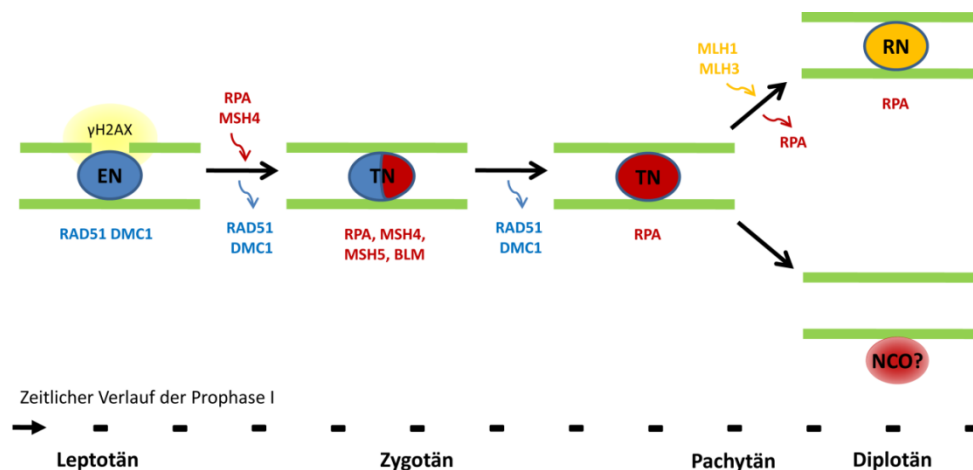


Abbildung 1-9: Reifung der Rekombinations-Proteinkomplexe, die mit den Achsen meiotischer Chromosomen während der Prophase I assoziiert sind. Im Leptotän lagern sich frühe Rekombinationsknoten (ENs, blau) an die chromosomalen Achsen (grün). DNA DSBs sind mit dem Histon γ H2AX (gelb) assoziiert. Im Zygotän werden RAD51 und DMC1 durch die Proteine RPA, MSH4 und MSH5 ersetzt. Die Knoten werden ab diesem Zeitpunkt Transitionsknoten (TNs, rot) genannt. Mit dem Fortschreiten der Prophase I wird zu diesem Proteinkomplex schließlich BLM und Topoisomerase IIIa rekrutiert. Diese Knoten können nun entweder durch die Assoziation von MLH1 und MLH3 in Rekombinationsknoten (RNs, orange) umgewandelt werden und zukünftige COs markieren, oder in die Peripherie der chromosomalen Achsen wandern und in NCOs aufgelöst werden. Abbildung nach Moens *et al.*, 2007. Für eine detaillierte Übersicht über die molekulare Zusammensetzung von Transitionsknoten siehe auch Fig. 1F (Moens *et al.*, 2007).

1.5 Zielsetzung

Die Meiose ist eine besondere Form der Zellteilung sich geschlechtlich fortpflanzender Organismen, bei der aus einer diploiden Stammzelle genetisch verschiedene Tochterzellen mit haploidem Chromosomensatz entstehen. Die Meiose ist ein komplexer Prozess, an dem diverse Proteinkomplexe beteiligt sind und deren Zusammenspiel streng reguliert ist. Eine essentielle meiotische Struktur in Säugern ist der Synaptonemalkomplex, der die homologen Chromosomen während der Prophase I der Meiose strukturell verbindet. Seine zentrale, spezieübergreifende Bedeutung für die Meiose wird ferner dadurch ersichtlich, dass der Großteil sich sexuell fortpflanzender Organismen über eine derartige Struktur verfügt.

In den letzten beiden Jahrzehnten konnten detaillierte Kenntnisse über die Bedeutung und Funktion der einzelnen Komponenten und Proteine des Synaptonemalkomplexes von Säugern durch gezielte genetische Manipulation von Mäusen gewonnen werden. Dennoch blieben viele Grundfragen über die genaue Interaktion der einzelnen Proteinkomponenten beim Assembly des Synaptonemalkomplexes bis zu diesem Zeitpunkt ungeklärt. Ziel dieser Arbeit war es daher, Einblicke in das Assembly des Synaptonemalkomplexes und das funktionelle Zusammenspiel zwischen Synaptonemalkomplex und homologer Rekombination zu erhalten. Hierbei wurde im Rahmen dieser Arbeit mit SYCE3 eine neue Komponente der Zentralregion des Synaptonemalkomplexes identifiziert und charakterisiert. Ein besonders Augenmerk wurde dabei auf die Analyse der Funktion von SYCE3 während des Synaptonemalkomplex Assemblys gelegt. Um dies zu ermöglichen, wurde für diese Arbeit eine *Syce3* Knockout Mauslinie generiert. Anhand dieser Mauslinie wurde vor allem die Bedeutung von SYCE3 für die Synapse der homologen Chromosomen und die homologe Rekombination untersucht.

2 Ergebnisse

2.1 Grundcharakterisierung von SYCE3

Zur Identifizierung noch nicht charakterisierter meiosespezifischer Proteine, die an der Organisation der meiotischen Chromosomen beteiligt sind, wurden vor dieser Arbeit aus einem Genexpressionsprofil einer *Dazl*^{-/-} Maus mehrere Kandidatengene ausgewählt. DAZL ist ein keimzellspezifisches RNA-bindendes Protein, dessen Fehlen bei der Maus zu Unfruchtbarkeit führt. Diese Unfruchtbarkeit ist auf einen Abbruch der Spermatogenese in adulten Tieren während der Differenzierung von Typ A_{a1}- zu A₁-Spermatogonien zurückzuführen (Schrans-Stassen *et al.*, 2001). Somit bricht die Spermatogenese in *Dazl*^{-/-} Mäusen ab, bevor meiosespezifische Genprodukte benötigt werden. Diese Veränderung in der Genexpression als Folge des *Dazl* Knockouts wurde von Maratou und Kollegen mit einem cDNA-Micorarray untersucht (Maratou *et al.*, 2004). Die hierbei gefundenen Gene mit veränderter Genexpression als Folge des *Dazl* Knockouts (siehe Maratou *et al.*, 2004) wurden vor dieser Arbeit bioinformatisch nach folgenden Kriterien gefiltert: (1) existieren gonadenspezifische EST Klone in den Datenbanken? (2) verfügt die zugehörige Aminosäuresequenz über eine bioinformatisch berechnete nukleäre Lokalisation? (3) konnte für die zugehörige Proteinsequenz eine bioinformatisch berechnete Coiled-coil Domäne bestimmt werden? Eines dieser so erhaltenen Kandidatengene (1700007E06Rik), das von uns *Syce3* genannt wurde, wurde im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert.

2.1.1 Klonierung der cDNA von SYCE3

Für die Klonierung der SYCE3 cDNA (GenBank accession number: HQ130280) wurde Gesamt-RNA aus Maushodengewebe (Tag 18) isoliert (siehe 7.2.1) und in einer RT-PCR in cDNA umgeschrieben (siehe 7.2.5.1). Diese cDNA diente als Template für die Amplifizierung der SYCE3-spezifischen cDNA. Als Primer für die Phusion-PCR wurden die SYCE3-spezifischen Primer DA8_5' und DA8_3' (siehe Tabelle 5-2) mit einer Annealing-Temperatur von 65°C und 25 Zyklen verwendet. Das PCR Produkt wurde in den StrataClone Vektor ligiert, in diesem sequenziert und mittels BLAST Suche auf Sequenzhomologie zur genomischen Sequenz (1700007E06Rik) überprüft. Die SYCE3-spezifische cDNA kodiert für ein putatives 88 Aminosäuren langes Protein, mit einer berechneten Molekularmasse von 12 kDa. Mit dem frei zugänglichen Online-Tool PSORTII (<http://psort.hgc.jp/form2.html>) konnte eine Coiled-coil Domäne in der putativen SYCE3 Aminosäuresequenz berechnet werden, die sich insgesamt von Aminosäure 6 bis 39 erstreckt.

2.1.2 SYCE3 ist hoch konserviert zwischen einzelnen Spezies der Säuger

Der Grad der Konservierung der Aminosäuresequenz kann Aufschluss über die funktionelle Bedeutung des Proteins geben. Daher wurde untersucht, ob und wie weit SYCE3 evolutionär konserviert ist. Hierzu diente die murine cDNA Sequenz von SYCE3 als Quelle für den tBlastN Algorithmus (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blaest.cgi>). Hierbei wurden homologe Sequenzen bei folgenden Spezies der Vertebraten gefunden: *Homo sapiens* (NP_001116697), *Pan troglodytes* (XP_001156556), *Macaca mulatta* (NP_001180282), *Bos taurus* (XP_001256940), *Rattus norvegicus* (NP_001128725), *Oryctolagus cuniculus* (XP_002723272), *Gallus gallus* (XP_001231764), *Xenopus*

tropicalis (XP_002939573), *Tetradon nigroviridis* (CAG10121), *Danio rerio* (NP_001129458). Für nicht-Vertebraten konnten keine homologen Sequenzen gefunden werden.

Mit Hilfe des CLUSTALW Online-Programms (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) wurde ein Multiples Sequenz Alignment für die erhaltenen Säuger Sequenzen durchgeführt (siehe Abbildung 2-1). Dieses Alignment zeigt, dass SYCE3 zwischen den einzelnen Spezies der Säuger hoch konserviert ist. Zusätzlich wurde für die Mausequenz von SYCE3 mit dem NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) eine Tyrosin Phosphorylierungsstelle (siehe Abbildung 2-1; grüne Markierung) und eine Serin Phosphorylierungsstelle berechnet. Interessanterweise sind diese Phosphorylierungsstellen in allen aufgelisteten Säugersequenzen konserviert (siehe Abbildung 2-1; rote Markierung).

Diese hohe Sequenzhomologie wird am Beispiel des Sequenz Alignments zwischen Maus und Mensch nochmals verdeutlicht (siehe Abbildung 2-2), bei dem 90% der Aminosäuren identisch und 96% gleichartig sind.

Mus musculus	MADSDPGRSYDNMLKMLSDLNKDLEKLLEEMEKISVQATWMAYDMVVMR	50
Rattus norvegicus	MADSDPGRSYDNMLKMLSDLNKDLERLLEEMEKISVQATWMAYDMVVMR	50
Oryctolagus cuniculus	MADSDPGERNYDNMLKMLSDLNKDLEKLLEEMEKISVQATWMAYDMVVMR	50
Bos taurus	MADDPDGERNYDNMLKMLSDLNKDLEKLLEEMEKISVQATWMAYDMVVMR	50
Pan troglodytes	MDDADPEERNYDNMLKMLSDLNKDLEKLLEEMEKISVQATWMAYDMVVMR	50
Homo sapiens	MDDADPEERNYDNMLKMLSDLNKDLEKLLEEMEKISVQATWMAYDMVVMR	50
Macaca mulatta	MADADPEERNYDNMLKMLSDLNKDLEKLLEEMEKISVQATWMAYDMVVMR	50
	* . *	
Mus musculus	TNPTLAESMRRLEDAFLNCKEEMKKNWQELLTETKRKQ	88
Rattus norvegicus	TNPTLAESMRRLEDAFLNCKEEMKKNWQELLTETKRKQ	88
Oryctolagus cuniculus	TNPTLAESMRRLEDAFLNCKEEMKKNWQEMLRETTPKQ	88
Bos taurus	TNPALAESMRRLEDAFLNCKEEMKKNWQELLSEAKRAQ	88
Pan troglodytes	TNPTLAESMRRLEDAFVNCKEEMKKNWQELLHETKQRP	88
Homo sapiens	TNPTLAESMRRLEDAFVNCKEEMKKNWQELLHETKQRL	88
Macaca mulatta	TNPTLAESMRRLEDAFVNCKEEMKKNWQELLHETKQRP	88
	:**:*****:***:* * : *	

Abbildung 2-1: Die SYCE3 Aminosäuresequenz ist konserviert zwischen einzelnen Spezies der Säuger. Multiples Sequenz Alignment der SYCE3 Sequenz zwischen Säugern; „*“ bedeutet gleiche Aminosäure, „.“ markiert einen konservierten und „.“ einen semi-konservierten Aminosäureaustausch Die für die Mausequenz bioinformatisch berechneten Tyrosin und Serin Phosphorylierungsstellen wurden in grün bzw. rot markiert.

Mus_musculus	MADSDPGRSYDNMLKMLSDLNKDLEKLLEEMEKISVQATWMAYDMVVMR	50
Homo_sapiens	MDDADPEERNYDNMLKMLSDLNKDLEKLLEEMEKISVQATWMAYDMVVMR	50
	* * : * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
Mus_musculus	TNPTLAESMRRLEDAFLNCKEEMKKNWQELLTETKRKQ	88
Homo_sapiens	TNPTLAESMRRLEDAFVNCKEEMKKNWQELLHETKQRL	88
	*****:*****:*****:***: : *	

Abbildung 2-2: Die Aminosäuresequenz von SYCE3 ist konserviert zwischen Maus und Mensch. Sequenz Alignment der SYCE3 Aminosäuresequenz zwischen Maus und Mensch; „*“ bedeutet gleiche Aminosäure, „.“ markiert einen konservierten und „.“ einen semi-konservierten Aminosäureaustausch.

2.1.3 SYCE3 wird gonadenspezifisch exprimiert

Da über das gewebespezifische Expressionsmuster von SYCE3 vor dieser Arbeit noch nichts bekannt war, wurde dies mit Hilfe von RT-PCR Experimenten untersucht. Hierzu wurde RNA aus unterschiedlichen Mausgeweben isoliert (siehe 7.2.1) und die Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben (siehe 7.2.5.1). Mit der jeweiligen Gesamt-cDNA als Template wurde eine PCR mit den SYCE3-spezifischen Primern DA8_5' und DA8_3' bei einer Annealing-Temperatur von 65°C und 25 Zyklen durchgeführt. Zur Eichung der cDNA Mengen für die unterschiedlichen Gewebe wurde parallel eine PCR mit GAPDH-spezifischen Primern durchgeführt. Die Proben wurden im Anschluss auf einem 1%igen Agarosegel (siehe 7.2.7) aufgetrennt.

Die PCR mit den SYCE3-spezifischen Primern zeigt eindeutig, dass SYCE3 mRNA nicht in somatischen Geweben amplifiziert wurde. SYCE3-spezifische mRNA konnte nur in Testis und im embryonalen Ovar (16,5 dpc) nachgewiesen werden. Alle anderen Gewebe weisen keine SYCE3-spezifische Bande auf, interessanterweise auch das adulte Ovar nicht (Abbildung 2-3, oben). Mit der für das Haushaltsgen GAPDH-spezifischen PCR wurde eindeutig gezeigt, dass für jedes Gewebe die gleiche Menge an cDNA eingesetzt wurde, da die mRNA des Haushaltsgens GAPDH in allen Spuren gleichmäßig amplifiziert wurde (Abbildung 2-3, unten).

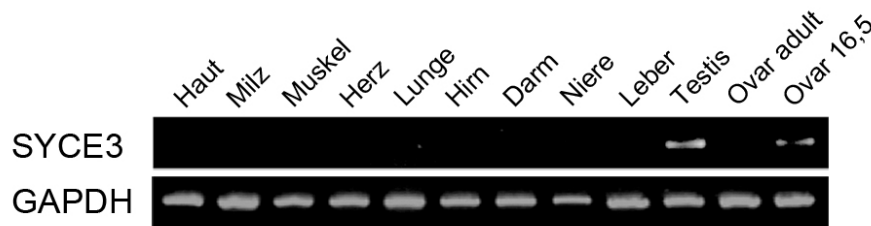


Abbildung 2-3: SYCE3 mRNA wird gonadenspezifisch exprimiert. RT-PCR mit SYCE3-spezifischen Primern auf verschiedenen Mausgeweben; Die cDNA Menge wurde mit dem Haushaltsgen GAPDH für alle Gewebe geeicht.

2.1.4 Expressionsmuster von SYCE3 im Verlauf der Spermatogenese

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass SYCE3 mRNA zwar gonadenspezifisch exprimiert wird, allerdings nicht in adultem Ovar. Dies könnte darauf hindeuten, dass SYCE3-spezifisch während der Meiose exprimiert wird, da die Prophase I der Meiose in Weibchen während der Embryogenese stattfindet und die Oocyten bis zum Erlangen der Geschlechtsreife im Diplotän arretiert bleiben (siehe 1.1.2 und Borum, 1961).

Um diese These zu prüfen, wurde das Expressionsmuster von SYCE3 während der Spermatogenese näher analysiert. Hierzu macht man sich die Tatsache zu nutzen, dass die erste Welle der Spermatogenese in männlichen Mäusen während der ersten 30 Tage ihres Lebens stattfindet (siehe 1.1.1.2). Dies bedeutet, dass der Hoden von Mäusen am Tag 8 mit Spermatogonien, zwischen Tag 12-18 hauptsächlich mit Spermatocyten (Meiose) und an den darauffolgenden Tagen mit Spermatischen (Spermiogenese) angereichert ist. Zur Untersuchung des Expressionsmusters von SYCE3 wurden nun RT-Experimente mit Gesamt-RNA aus Hoden von Mäusen unterschiedlichen Alters durchgeführt.

Hierzu wurde aus Hoden von 8, 12, 15, 18, 21 und 25 Tage alten Mäusen RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Eine RT-PCR mit SYCE3-spezifischen Primern (vgl. 2.1.3) zeigte, dass SYCE3 mRNA ab Tag 12 exprimiert wird (Abbildung 2-4), also in Zellen, die bereits in die Meiose eingetreten sind.

Die Tatsache, dass die mRNA von SYCP3, einem meiosespezifischen Bestandteil der AEs/LEs des Synaptonemalkomplexes (SC), ein ähnliches Expressionsmuster zeigt, bekräftigt die Aussage, dass SYCE3 während der Spermatogenese spezifisch während der Meiose exprimiert wird (siehe Abbildung 2-4).

Um das Expressionsmuster von SYCE3 auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurden von denselben Mäusen Gesamtzellhodenextrakte hergestellt, in Probenpuffer aufgenommen, 1×10^5 Zellen pro Spur auf einem Tricin-SDS Gel (siehe 7.3.4.1) aufgetrennt und schließlich auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (siehe 7.3.6). Die Inkubation der abgesättigten Nitrocellulose-Membran mit dem in der vorliegenden Arbeit hergestellten anti-SYCE3 Antikörper (siehe 7.3.3.1) zeigte ab Tag 12 eine spezifische Bande bei ca. 12 kDa (Abbildung 2-5), was eindeutig beweist, dass auch die Expression des SYCE3 Proteins erst mit Beginn der Meiose einsetzt.

Da man durch das RT-PCR Experiment und den Western Blot keine Aussagen treffen kann, ob SYCE3 außerdem noch in postmeiotischen Zellen exprimiert wird, wurde zusätzlich eine Immunfluoreszenz mit anti-SYCE3 Antikörper auf Gefrierschnitten von Hoden adulter Mäuse durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass SYCE3 Signal nur in Spermatozyten nachgewiesen werden kann. In Spermatozyten, Spermatozyten und Spermien war SYCE3 nicht detektierbar (siehe Abbildung 2-6). Zusammengefasst kann aus den RT-PCR Experimenten, dem Westernblot und der Immunfluoreszenz geschlossen werden, dass SYCE3 ein meiosespezifisch exprimiertes Protein ist.

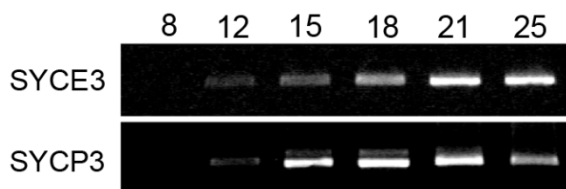


Abbildung 2-4: SYCE3 mRNA wird während der Meiose exprimiert. RT-PCR auf Hodengewebe von unterschiedlich alten Mäusen mit SYCE3-spezifischen Primern (oben) und SYCP3-spezifischen Primern (unten). SYCE3 mRNA ist erstmalig in Tag 12 Hoden nachweisbar und bleibt während der gesamten Meiose exprimiert. Die mRNA von SYCP3, einem meiosespezifischen Protein, weist ein ähnliches Expressionsmuster auf.

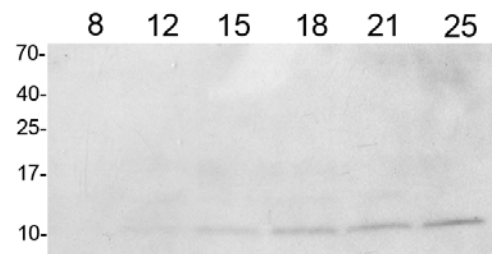


Abbildung 2-5: SYCE3 wird während der Meiose exprimiert. Western Blot mit anti-SYCE3 (gp) Antikörper auf Gesamthodensuspension von Mäusen unterschiedlichen Alters. Pro Spur wurden 1×10^5 Zellen aufgetragen. Die SYCE3-spezifische Bande bei ca. 12 kDa erscheint erstmals am Tag 12 und ist während der gesamten Meiose detektierbar.

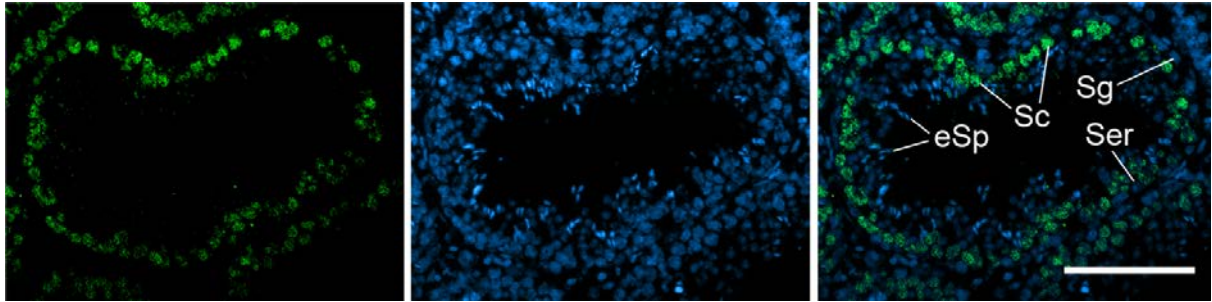


Abbildung 2-6: SYCE3 ist ausschließlich in Spermatocyten, nicht aber in Spermatogonien, Spermatiden und Spermien detektierbar. Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten von Maushoden mit anti-SYCE3 Antikörper (grün). DNA wurde mit Hoechst markiert (blau). SYCE3 ist nur in Spermatocyten detektierbar, Spermatogonien und alle postmeiotischen Zellen (Spermatiden und Spermien) weisen kein SYCE3 Signal auf. (Sg) Spermatogonien, (Sc) Spermatocyten, (Ser) Sertoli-Zellen, (eSp) elongierte Spermatiden. Balken 50 µm.

2.1.5 SYCE3 ist Bestandteil des Zentralelements des Synaptonemalkomplexes

2.1.5.1 Lokalisation von SYCE3 in Spermatocyten

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass SYCE3 meiosespezifisch exprimiert wird. Als nächstes wurde die subzelluläre Lokalisation von SYCE3 in meiotischen Zellen untersucht. Für diesen Zweck wurden Spreitungen von Oocyten aus embryonalem Ovar (siehe 7.5.1.3) und von Spermatocyten aus adultem Hodengewebe hergestellt (siehe 7.5.1.2).

Für die Untersuchung der SYCE3 Lokalisation in Spermatocyten wurden die Objektträger mit anti-SYCE3 und anti-SYCP3 – ein Marker für die AEs/LEs – doppelmarkiert. Das Assembly des SC beginnt im Leptotän mit der Ausbildung der AEs, die an das Chromatin angelagert sind. Im Zygotän paaren sich die homologen Chromosomen und die AEs werden über TFs miteinander verbunden. Dieser Prozess wird als Synapse bezeichnet und ist im Pachytän abgeschlossen. In diesem Stadium sind die Autosomen über ihre volle Länge über den SC miteinander verbunden. Zwischen X und Y Chromosom hingegen wird die Synapse nur an der pseudoautosomalen Region ausgebildet. Im Diplotän schließlich wird der SC abgebaut. Die Chromosomen bleiben nur an den Stellen miteinander verbunden, an denen COs stattgefunden haben. In Zygotän-Spermatocyten markiert SYCP3 die AEs/LEs des SC (Abbildung 2-7). Auch SYCE3 Fluoreszenz ist im Zygotän nachweisbar. SYCE3 lokalisiert aber nur an Bereichen des SC, die stärker mit SYCP3 markiert sind (Abbildung 2-7). In Pachytän-Spermatocyten kolokalisieren SYCE3 und SYCP3 an den Autosomen, nur an den Gonosomen unterscheidet sich ihr Verteilungsmuster: Während SYCP3 die AEs beider Geschlechtschromosomen markiert, ist SYCE3 Fluoreszenz nur an der pseudoautosomalen Region detektierbar. Dieses Verteilungsmuster ähnelt dem von SYCP1, der Hauptkomponente der TFs (siehe Abbildung 2-8), und deutet darauf hin, dass SYCE3 spezifisch an synapsierte Bereiche der homologen Chromosomen lokalisiert. Diese Aussage wird durch die Lokalisation von SYCE3 in Diplotän-Spermatocyten bestärkt: Während der anti-SYCP3 Antikörper sowohl Achsen markiert, die noch über den SC miteinander verbunden sind (dickere Achsen), als auch Achsen, zwischen denen sich der SC schon abgebaut hat (dünnere Achsen), ist SYCE3 nur an den Bereichen der Homologen zu finden, die noch über den SC miteinander verbunden sind (Abbildung 2-7). In der Diakinese schließlich wird SYCE3 nicht mehr exprimiert (Abbildung 2-7).

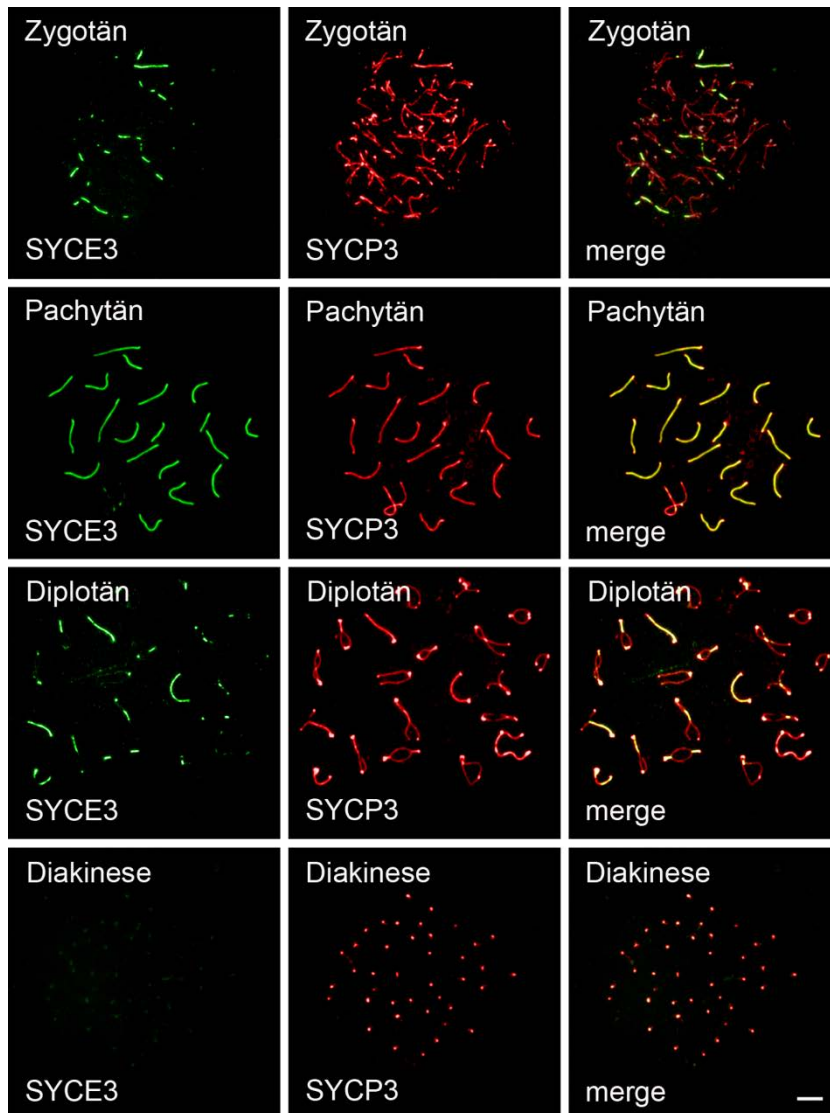


Abbildung 2-7: SYCE3 ist Bestandteil des Synaptonemalkomplexes und lokalisiert spezifisch an den über die Transversalfilamente miteinander verbundenen Bereichen der homologen Chromosomen. Kolokalisation von SYCE3 (grün) und SYCP3 (rot) auf gespreiteten Maus-Spermatocyten. Gezeigt sind Zygotän-, Pachytän-, Diplotän- und Diakinese-Stadien. Balken, 10 µm.

Ein Protein, das als Marker für die Synapse eingesetzt wird, ist SYCP1. SYCP1 ist Hauptbestandteil der TFs, die die LEs miteinander verbinden und so die Synapse vermitteln. Um die spezifische Lokalisation von SYCE3 an diese gepaarten und über die TFs miteinander verbundenen Bereiche der Homologen zu bestätigen, wurden Immunlokalisationen auf gespreiteten Maus-Spermatocyten mit anti-SYCE3 Antikörper und anti-SYCP1 Antikörper durchgeführt (Abbildung 2-8). In Pachytän-Spermatocyten kolokalisieren SYCE3 und SYCP1 in einem kontinuierlichen Muster über die volle Länge der miteinander verbundenen homologen Autosomen. Interessant ist hier die Lokalisation von SYCE3 und SYCP1 im XY Body, in dem sich die Geschlechtschromosomen befinden (Abbildung 2-8, Pfeil). Auch hier ist SYCE3, wie schon in Abbildung 2-7 gezeigt, nur an der pseudoautosomalen Region detektierbar und kolokalisiert dort mit SYCP1 (Abbildung 2-8).

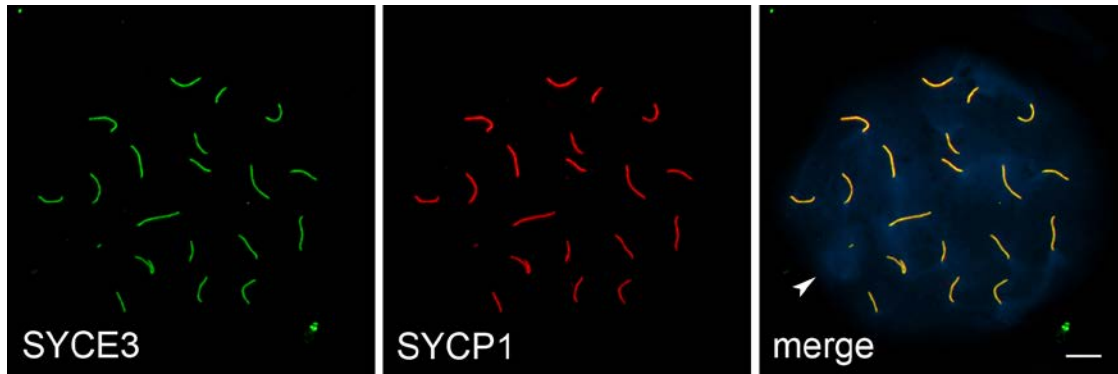


Abbildung 2-8: SYCE3 und SYCP1 kolokalisieren in Pachytän-Spermatocyten. Immunfluoreszenz auf gespreiteten Maus Pachytän-Spermatocyten mit anti-SYCE3 und anti-SYCP1 Antikörpern. Die DNA wurde mit Hoechst markiert (blau). Der Pfeil markiert den XY Body, in dem sich die pseudoautosomale Region befindet, die sowohl mit SYCE3 als auch mit SYCP1 markiert ist. Zwischen den vollständig miteinander verbundenen homologen Autosomen kolokalisieren SYCE3 und SYCP1 in einem kontinuierlichen Muster. Balken, 7,5 µm.

Mit den vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass SYCE3 Bestandteil des SC ist und spezifisch an den Stellen lokalisiert, an denen sich die Synapse zwischen den homologen Chromosomen ausgebildet hat. Um eine noch präzisere Aussage über die Lokalisation von SYCE3 im SC zu treffen, wurden Gefrierschnitte von adulten Rattenhoden mit anti-SYCE3 und anti-SYCP1 Antikörpern elektronenmikroskopisch untersucht. Der SYCP1 Antikörper, der gegen die Coiled-coil Region von SYCP1 gerichtet war, diente hierzu als Kontrolle. Auf beiden Präparaten ist die Struktur des SC mit den LEs, die mit dem Chromatin assoziiert sind, und dem elektronendichten CE deutlich zu erkennen. In dem mit SYCE3 markierten Präparat lokalisieren die Goldpartikel ausschließlich im CE des SC (siehe Abbildung 2-9, A). Im Gegensatz dazu markiert der Antikörper, der gegen die Coiled-coil Domäne von SYCP1 gerichtet ist, den gesamten Bereich zwischen den LEs, da die zwei Coiled-coil Domänen von sich gegenüberliegenden SYCP1 Molekülen diesen Bereich komplett durchspannen (siehe Abbildung 2-9, A und Liu *et al.*, 1996; Schmekel *et al.*, 1996; Öllinger *et al.*, 2005). Für die quantitative Auswertung der EM Daten wurde die Verteilung der Goldpartikel nach Moens und Schmekel analysiert (Moens *et al.*, 1987; Schmekel *et al.*, 1996). Der Abstand zwischen der Mitte des SC und den LEs wurde in sieben gleiche Abschnitte aufgeteilt. In jedem dieser Abschnitte wurden anschließend die Goldpartikel gezählt. Dieser Versuch zeigt, dass der Großteil der Goldpartikel, die SYCE3 markieren, in den zwei Abschnitten liegt, die direkt an die Mitte angrenzen. (siehe Abbildung 2-9, B). Im Gegensatz dazu sind die Goldpartikel, die die Coiled-coil Domäne von SYCP1 markieren, hauptsächlich in den Abschnitten zwei bis vier lokalisiert. Dies spiegelt den Bereich zwischen dem CE und den LEs wider (siehe Abbildung 2-9, B).

Mit diesen Versuchen konnte die Aussage getroffen werden, dass es sich bei SYCE3 um eine neue Komponente des CE des SC handelt.

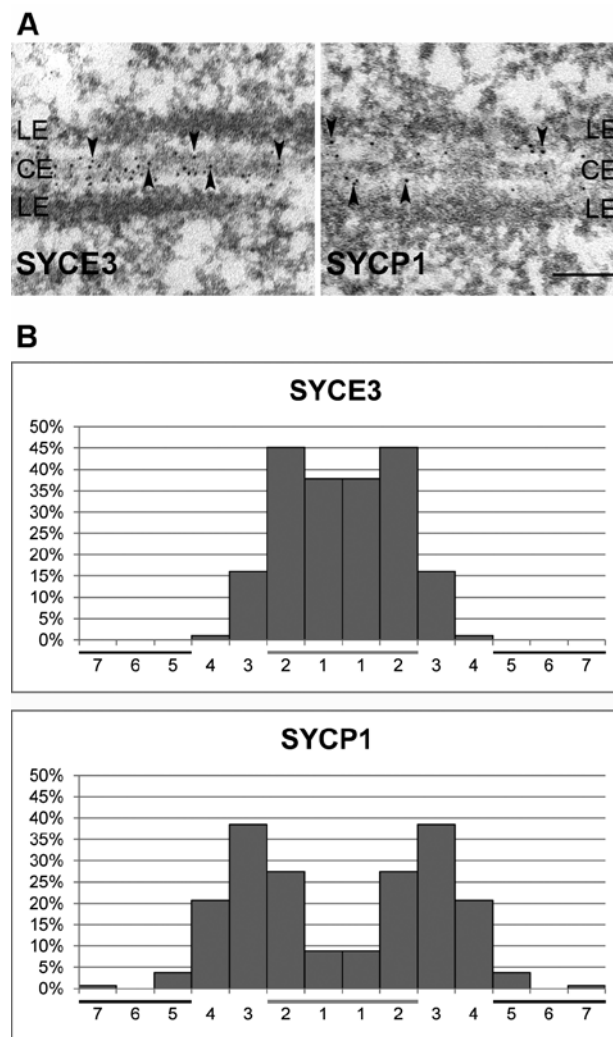


Abbildung 2-9: SYCE3 lokalisiert spezifisch im CE des SC. (A) Preembedding Immunelektronenmikroskopische Aufnahmen von Gefrierschnitten von Rattenhoden, markiert mit einem anti-SYCE3 Antikörper (links) und einem gegen die Coiled-coil Domäne von SYCP1 gerichteten Antikörper (rechts). Die Pfeilspitzen markieren ausgewählte Goldpartikel. SYCE3 lokalisiert spezifisch im CE des SC. Der anti-SYCP1 Antikörper hingegen markiert die TFs, die den Raum zwischen den zwei LEs durchspannen. (LE) Lateralelement, (CE) Zentralelement; Balken, 100 nm. (B) Quantifizierung der Verteilung der Goldpartikel in EM Aufnahmen von SYCE3 markierten (oben, n=304) und SYCP1 markierten Proben (unten, n=136). Die Distanz zwischen der Mitte des SC und den LEs wurde in sieben gleichgroße Abschnitte aufgeteilt. Die Goldpartikel wurden in jedem Abschnitt gezählt. Die Mitte des SC ist mit einem grauen Balken markiert, die LEs hingegen mit schwarzen Balken.

2.1.5.2 Lokalisation von SYCE3 in Oocyten

Da die RT-PCR Experimente (siehe 2.1.3) gezeigt haben, dass SYCE3 mRNA ausschließlich in adulten Hoden und embryonalem Ovar (16,5 dpc) exprimiert wird, wurde als nächstes die subzelluläre Lokalisation von SYCE3 in Oocyten analysiert. Dafür wurden Spreitungen von Pachytän-Oocyten (17,5 dpc) angefertigt und mit anti-SYCE3 und anti-SYCP3 Antikörper markiert (Abbildung 2-10).

SYCE3 und SYCP3 kolokalisieren in Pachytän-Oocyten, zwischen deren Homologen sich der SC vollständig ausgebildet hat. Dieses Experiment bestätigt, dass SYCE3 auch auf Proteinebene in Oocyten exprimiert wird und auch hier Bestandteil des SC ist.

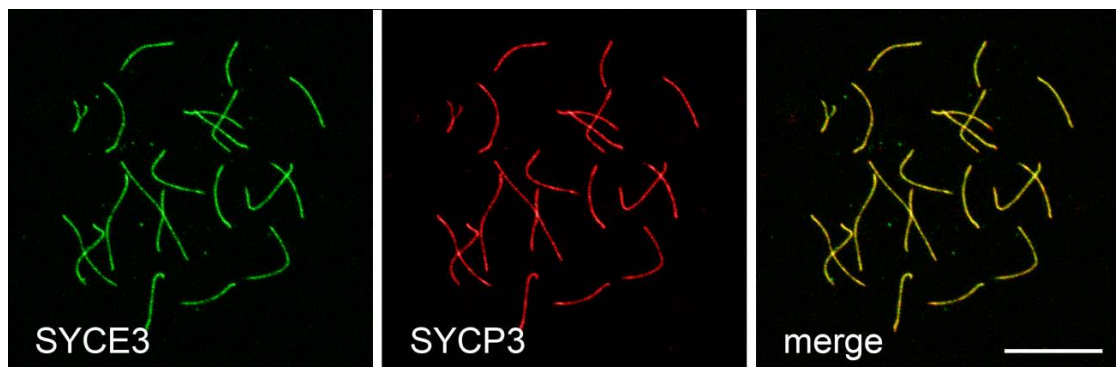


Abbildung 2-10: SYCE3 ist ebenfalls in Oocyten Bestandteil des SC. Spreitungen von Oocyten aus embryonalem Ovar (17,5 dpc) markiert mit anti-SYCE3 (grün) und anti-SYCP3 Antikörper (rot). Im Pachytän kolokalisieren SYCE3 und SYCP3 auf synapsierten Bereichen der Homologen. Balken, 10 µm.

2.1.6 SYCE3 kolokalisiert mit SYCE1, aber nicht notwendigerweise mit SYCE2

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass das murine Transversalfilamentprotein SYCP1 essentiell für die Fertilität beider Geschlechter ist (de Vries *et al.*, 2005). Daher wurde dem Aufbau der CR des SC intensive Forschung gewidmet. Hierbei wurden drei neue und bis dahin noch nicht charakterisierte Proteine entdeckt, die ausschließlich im CE des SC lokalisieren: SYCE1, SYCE2 und Tex12. Der Knockout jedes dieser Proteine führt zur Unfruchtbarkeit beider Geschlechter. Es wurde gezeigt, dass SYCE1 und SYCE2 jeweils mit sich selbst und miteinander interagieren können und beide an SYCP1 binden können (Costa *et al.*, 2005). Tex12 im Gegensatz dazu bildet einen Komplex mit SYCE2 und bindet so indirekt an SYCP1 (Hamer *et al.*, 2006). Zusammengefasst wurde durch die Charakterisierung dieser Proteine gezeigt, dass die Ausbildung der Synapse von einem komplexen Zusammenspiel mehrerer Proteine abhängt und außerdem, dass die Synapse essentiell für die Fertilität ist.

Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass SYCE3 im CE des SC lokalisiert, wurde nun die Verteilung von SYCE3 im Vergleich zu der Lokalisation von SYCE1 und SYCE2 untersucht (Tex12 wurde nicht mit untersucht, da es mit SYCE2 kolokalisiert). Hierfür wurden Doppelimmunfluoreszenzen mit SYCE3 und SYCE1 beziehungsweise SYCE2 auf Zygotän- und Pachytän-Spermatocyten durchgeführt. Die Markierung von SYCE3 und SYCE1 zeigt, dass diese beiden Proteine sowohl im Zygotän als auch im Pachytän vollständig kolokalisieren, was besonders an den Vergrößerungen in Abbildung 2-11 zu sehen ist. Im Gegensatz dazu wird an der Doppelimmunfluoreszenz von SYCE3 und SYCE2 deutlich, dass

diese beiden Proteine nicht vollständig kolokalisieren, da SYCE3 ein kontinuierliches, SYCE2 hingegen ein eher punktuell verteiltes Verteilungsmuster aufweist (Vergrößerung in Abbildung 2-11).

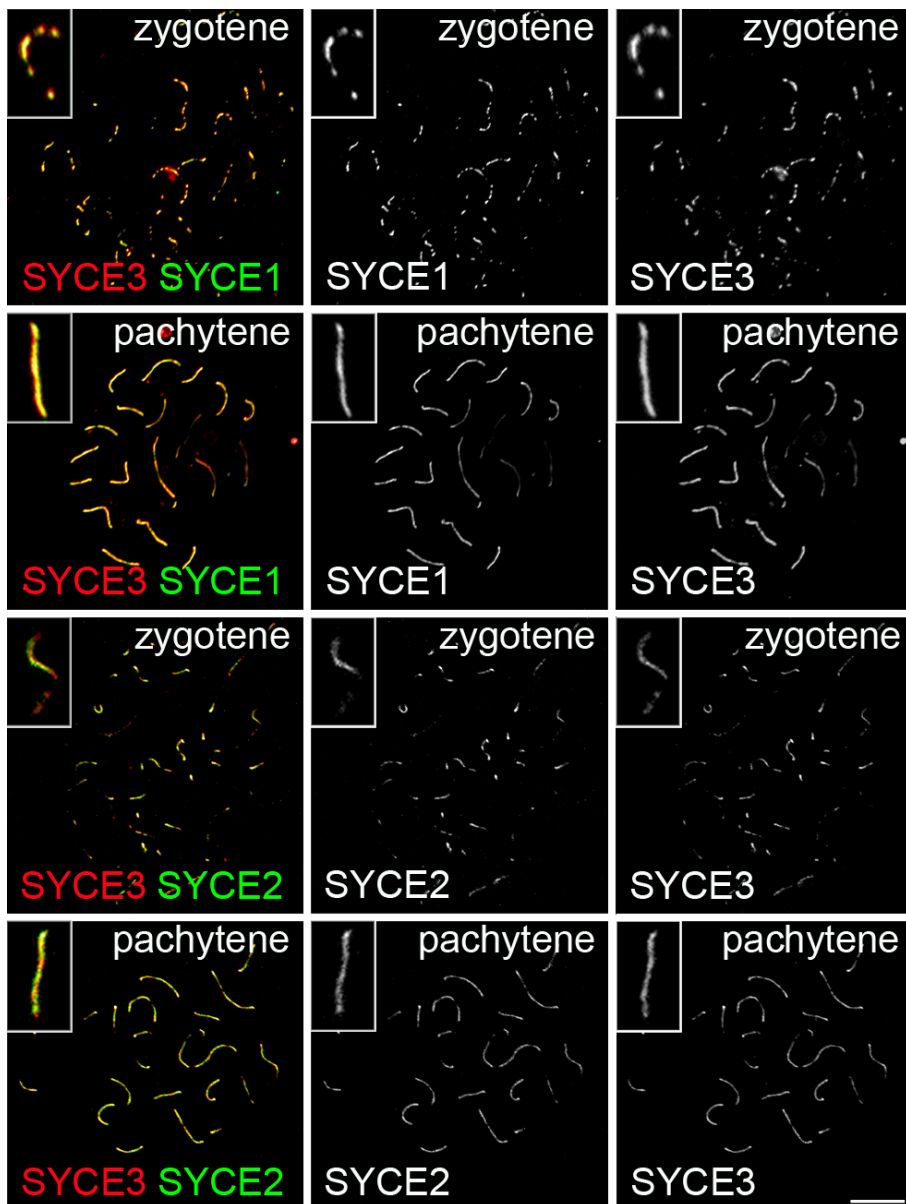


Abbildung 2-11: SYCE3 kolokalisiert mit SYCE1, aber nicht vollständig mit SYCE2. Doppelimmunfluoreszenz mit anti-SYCE3 und anti-SYCE1 beziehungsweise anti-SYCE2 Antikörpern auf Zygoten- und Pachytan-Spermatocyten. SYCE3 kolokalisiert mit SYCE1 sowohl im Zygoten als auch im Pachytan (Vergrößerung). SYCE3 und SYCE2 kolokalisieren nicht notwendigerweise: SYCE3 weist ein kontinuierliches, SYCE2 hingegen ein punktuell verteiltes Verteilungsmuster auf (Vergrößerung). Balken, 10 µm.

2.1.7 Die Rekrutierung von SYCE3 auf die Achsen ist unabhängig vom AEs/LEs Zusammenbau und den CE Bestandteilen SYCE1 und SYCE2, aber abhängig von SYCP1

Mit den vorherigen Versuchen wurde gezeigt, dass SYCE3 Bestandteil des CE ist und mit SYCE1 kolokalisiert. Um zu untersuchen, ob SYCE3 von SYCP3 (Bestandteil der AEs/LEs), den anderen Bestandteilen des CE (SYCE1 und SYCE2) und/oder von SYCP1 abhängig ist, wurden Doppelimmunfluoreszenzen mit SYCE3 und SYCP1 bzw. SYCP3 auf gespreiteten *Sycp1*^{-/-}, *Sycp3*^{-/-}, *Syce1*^{-/-} und *Syce2*^{-/-} Pachytän-ähnlichen-Spermatocyten durchgeführt.

Spermatocyten, die den Hauptbestandteil der TFs SYCP1 nicht exprimieren, sind dadurch gekennzeichnet, dass sie morphologisch normale AEs ausbilden können und die homologen Chromosomen sich paarweise aneinanderlagern können. Allerdings kann sich in diesen Zellen keine CR zwischen den Homologen ausbilden, was durch ein vollständiges Fehlen von CE-ähnlichen Strukturen im Elektronenmikroskop sichtbar wird (de Vries *et al.*, 2005). Um das Verhalten von SYCE3 in diesen Zellen zu untersuchen wurde eine Doppelimmunfluoreszenz mit SYCP3 und SYCE3 durchgeführt. Es konnte allerdings auch nach mehrmaligem Wiederholen des Versuchs keine SYCE3 Fluoreszenz auf den mit SYCP3 markierten AEs detektiert werden (Abbildung 2-12, A). Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Rekrutierung von SYCE3 abhängig von SYCP1 ist.

Im Gegensatz dazu konnte mit den im nächsten Abschnitt beschriebenen Immunfluoreszenzen gezeigt werden, dass die SYCE3 Lokalisation an die Chromosomenachsen in Abwesenheit von SYCP3, SYCE1 und SYCE2 erfolgen kann:

Sycp3^{-/-} Mäuse bilden keine AEs/LEs aus, weisen aber dennoch kurze CR-Bereiche auf, in denen SYCP1 korrekt organisiert vorliegt (Liebe *et al.*, 2004). Diese kurzen Bereiche der CR sind direkt mit dem Chromatin verbunden. Eine Doppelmarkierung von SYCE3 und SYCP1 konnte zeigen, dass SYCE3 in diesen Spermatocyten mit SYCP1 kolokalisiert (Abbildung 2-12, B). Mit anderen Worten: Ein Fehlen von SYCP3 hat keine Auswirkung auf die Rekrutierung von SYCE3 an die vorhandenen SC-ähnlichen Strukturen.

Der Knockout von SYCE1 führt in Spermatocyten zu einem *Sycp1*^{-/-} ähnlichen Phänotyp. Auch in *Syce1*^{-/-} Spermatocyten kann keine Synapse zwischen den Homologen ausgebildet werden, obwohl die Ausbildung der AEs und die Paarung der Homologen nicht gestört ist (Bolcun-Filas *et al.*, 2009). In *Syce1* defizienten Spermatocyten konnte in dieser Arbeit durch eine Doppellokalisierung von SYCP3 und SYCE3 gezeigt werden, dass SYCE3 hier in einem schwachen diskontinuierlichen Muster entlang der AEs verteilt vorliegt. Interessanterweise liegt SYCE3 auch an den Stellen der AEs vor, die sich nicht in unmittelbarer Nähe zueinander befinden (siehe Abbildung 2-12, C (Vergrößerungen)). Dies ist bemerkenswert, da im ersten Teil dieser Arbeit beschrieben wurde, dass SYCE3 nur an synapsierte Bereiche der Chromosomenachsen lokalisiert (siehe 2.1.5).

In *Syce2*^{-/-} Spermatocyten können sich die homologen Chromosomen paaren und es können sich kurze CE-ähnliche Strukturen ausbilden. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurde zudem gezeigt, dass SYCP1 und SYCE1 in *Syce2*^{-/-} Spermatocyten auf kurzen Bereichen der AEs kolokalisieren, die eng gepaart vorliegen (Bolcun-Filas *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass SYCE3 in *Syce2*^{-/-} Spermatocyten auch in distinkten Foci an Stellen der AEs vorliegt, die in engem

Kontakt miteinander stehen (siehe Abbildung 2-12, D (Vergrößerungen)). Also kann trotz des Fehlens von SYCE2 SYCE3 an bestimmte Stellen der AEs rekrutiert werden.

Zusammenfassend geht aus diesem Versuch hervor, dass die Rekrutierung von SYCE3 auf die Chromosomenachsen unabhängig von SYCP3, SYCE1 und SYCE2 ist. Ein Fehlen von SYCP1 allerdings führt zur Misslokalisierung von SYCE3 von den Chromosomen.

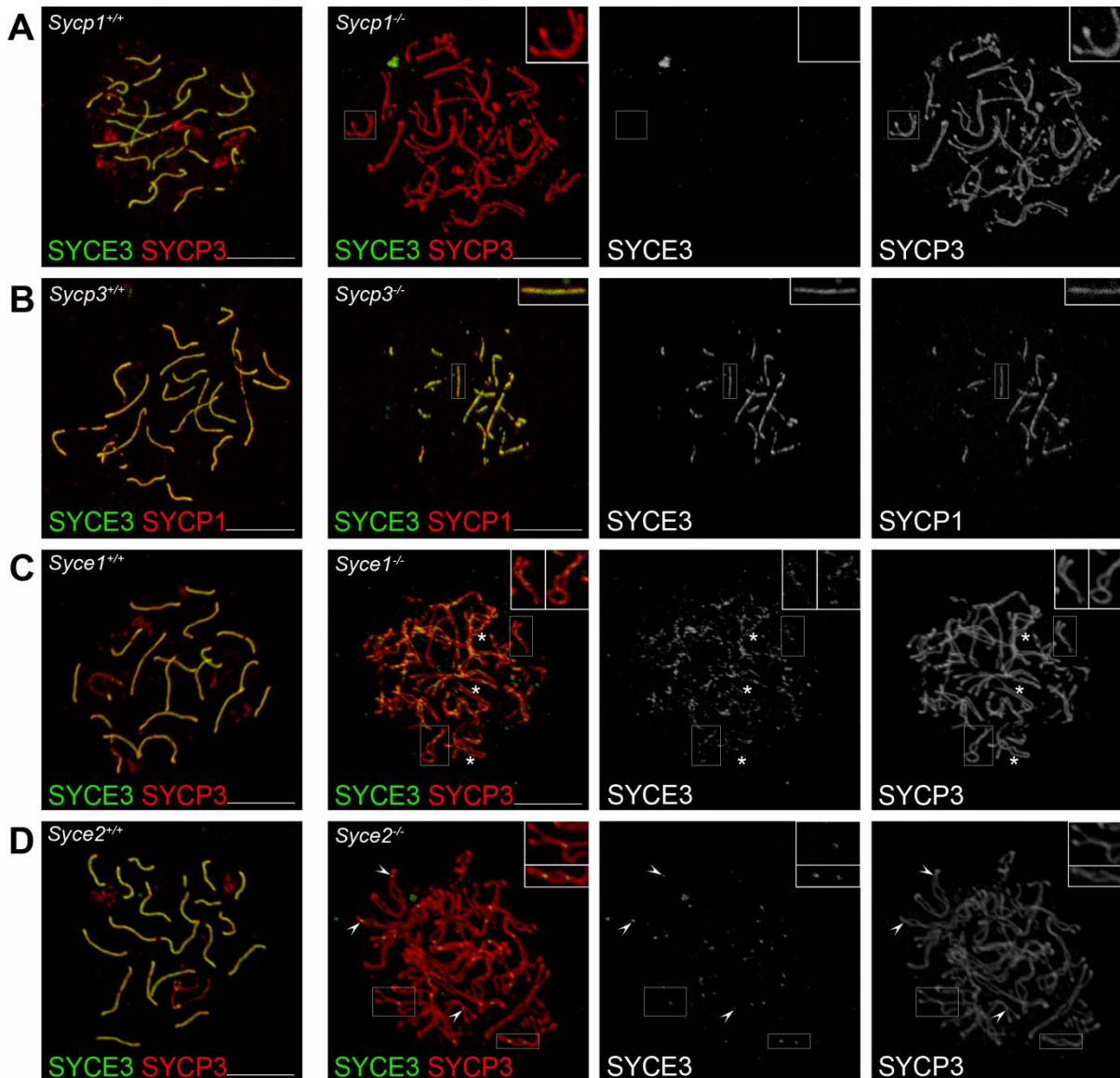


Abbildung 2-12: Die Rekrutierung von SYCE3 an die Chromosomenachsen ist unabhängig vom Zusammenbau der AEs/LEs und SYCE1 bzw. SYCE2, aber abhängig von SYCP1. Doppelimmunfluoreszenz auf *Sycp1*^{-/-}, *Sycp3*^{-/-}, *Syce1*^{-/-} und *Syce2*^{-/-} Spermatozyten mit Antikörpern gegen anti-SYCE3 (grün) und entweder anti-SYCP1 (rot) oder anti-SYCP3 (rot). (A) In *Sycp1*^{-/-} Spermatozyten werden keine CE-ähnlichen Strukturen ausgebildet, die Ausbildung der AEs und die Paarung der homologen Chromosomen ist aber nicht gestört. In diesen Zellen wurden die AEs durch SYCP3 (rot) sichtbar gemacht, es konnte aber kein SYCE3 Signal nachgewiesen werden. (B) In *Sycp3*^{-/-} Spermatozyten lokalisiert SYCP1 in kurzen fibrillären Abschnitten. An diesen fibrillären Abschnitten ist auch SYCE3 nachweisbar. (C) *Syce1*^{-/-} Spermatozyten sind dadurch charakterisiert, dass in ihnen keine CE-ähnlichen Strukturen zwischen den Homologen ausgebildet werden. In diesen Zellen ist SYCE3 in einem schwachen diskontinuierlichen Muster an den chromosomalen Achsen sichtbar. Die Sterne markieren Bereiche, in denen SYCE3 an AEs lokalisiert, die nicht eng gepaart vorliegen. (D) In *Syce2*^{-/-} Spermatozyten liegt SYCE3 in distinkten Foci an Bereichen der AEs vor, die eng gepaart vorliegen. Diese Stellen sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Balken, 10 µm.

2.2 SYCE3 ist notwendig für die Fertilität beider Geschlechter

2.2.1 Generierung der *Syce3*^{-/-} Maus

Im ersten Teil der Ergebnisse wurden das Expressionsmuster und die subzelluläre Verteilung von SYCE3 analysiert. Zur funktionellen Analyse von SYCE3 wurde im Rahmen dieser Arbeit eine *Syce3*^{-/-} Maus generiert. Als Strategie wurde ein konventioneller Knockout gewählt, bei dem der gesamte kodierende Genomabschnitt des *Syce3* Gens (Exon 2 und 3) durch eine Neomycin-Selektionskassette ersetzt wurde. Eine Übersicht über das *Syce3* Gen wird in Abbildung 2-13 gezeigt. *Syce3* liegt auf Chromosom 15 an Position 89,220,605-89,240,694. Innerhalb des *Syce3* Gens liegen keine Introns und Exons anderer Gene.

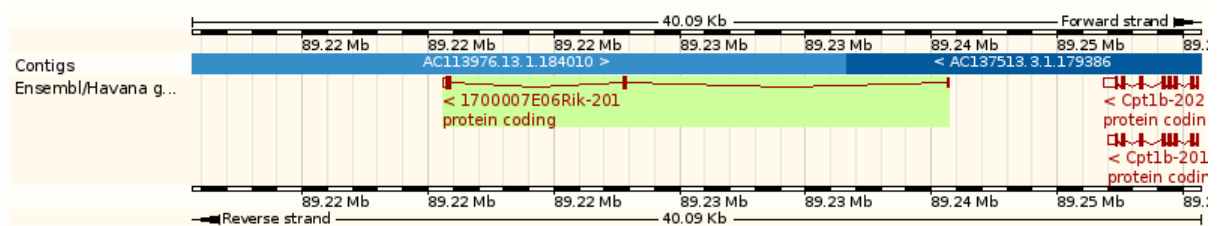


Abbildung 2-13: Grafische Übersicht des genomischen Bereichs des *Syce3* Gens (Ensemble, Gene: 1700007E06Rik (ENSMUSG00000078938)). *Syce3* liegt auf Chromosom 15 an Position 89,220,605-89,240,694 auf dem reversen Strang. Es liegen keine Introns oder Exons anderer Gene im *Syce3* Gen.

Quelle: http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary?g=ENSMUSG00000078938;r=15:89220605-89240694;t=ENSMUST00000109314

2.2.1.1 Knockout Strategie und Klonierung des Replacementvektors

Für die Herstellung einer Knockout Maus wurde als erstes eine Strategie entworfen, mit der der gesamte kodierende Bereich des *Syce3* Gens - Exon 2 und 3, da Exon 1 nicht kodierend ist - entfernt werden konnte. Zugleich musste die Strategie eine spätere Genotypisierung der genetisch veränderten ES Zellen und Mäuse mittels Southern Blot erlauben. Dafür wurde der genomische DNA Bereich um das *Syce3* Gen nach möglichen Schnittstellen für Restriktionsenzyme analysiert. Es wurde eine Strategie gewählt, bei der die DNA mit dem Restriktionsenzym BstEII verdaut wurde. Nach einem BstEII Restriktionsverdau wildtypischer DNA entsteht ein (mit einer spezifischen Sonde)

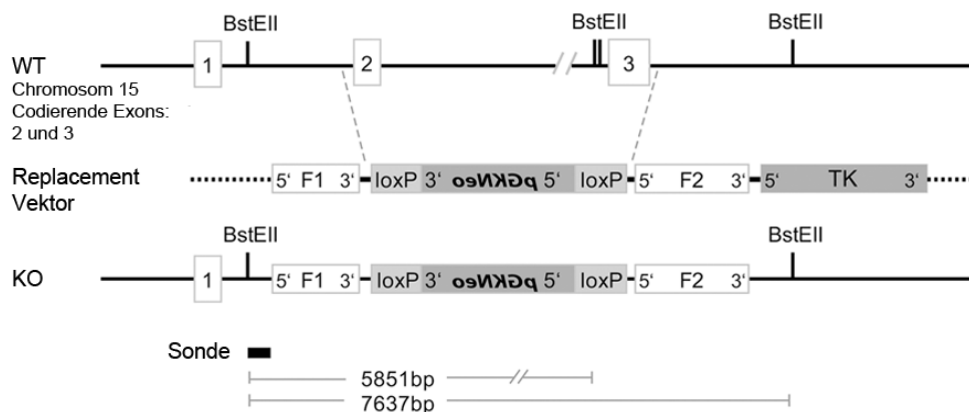


Abbildung 2-14: Schematische Darstellung des *Syce3* Gens, des Replacementvektors und des mutierten genomischen Abschnitts.

nachweisbares Fragment von 5851 bp. Wurden Exon 2 und 3 durch die Neomycin-Selektionskassette ersetzt, so wurde die wildtypische BstEII Schnittstelle, die zwischen Exon 2 und 3 liegt, entfernt und es entstand ein längeres Fragment von 7637 bp (siehe Abbildung 2-14). Die homologen Bereiche (F1 und F2) wurden so gewählt, dass sie sowohl keine repetitiven Sequenzbereiche als auch keine Homolgien zu anderen DNA Bereichen des Mausgenoms enthielten.

Für die Klonierung des langen Arms (auch F2-Bereich genannt) wurde genomische DNA aus S129 Zellen isoliert (siehe 7.2.3), das genomische Fragment mit den für den F2-Bereich spezifischen Primern F2_5' und F2_3' (siehe Tabelle 5-2) in einer Phusion-PCR (siehe 7.2.5.2) amplifiziert (siehe Abbildung 2-15) und in den StrataClone Vektor ligiert. Die Sequenz wurde auf Ihre Richtigkeit durch Sequenzierung überprüft und mit EcoR1 in den ebenfalls EcoR1-geschnittenen pKS/oxPNT Vektor (vgl. 5.6.2) kloniert.

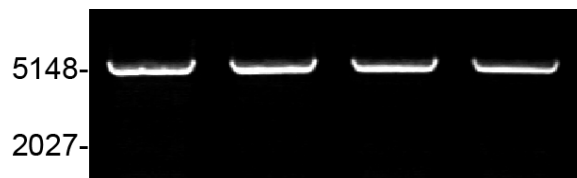


Abbildung 2-15: Amplifikation des F2 Fragments aus S129 Zellen. Phusion-PCR mit F2-spezifischen Primern F2_5' und F2_3' bei 63°C Annealing-Temperatur.

Für die Klonierung des F1 Fragments wurde durch eine Phusion-PCR bei 66°C Annealing-Temperatur mit den F1-spezifischen Primern F1_Cla1_5' und F2_Cla1_3' (siehe Tabelle 5-2) der spezifische Bereich aus genomischer DNA (aus R1/E Zellen) amplifiziert und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (siehe Abbildung 2-16).

Die so gewonnene DNA wurde in den StrataClone Vektor ligiert und sequenziert. Aus diesem wurde sie mit ClaI (die Schnittstellen wurden während der Amplifikation über die Primer angefügt) geschnitten und die DNA Überhänge mit Klenow Fragment aufgefüllt. Das so modifizierte F1 Fragment konnte darauf in den pKS/oxPNT Vektor (in den zuvor schon das F2 Fragment kloniert wurde) in die mit Sall geschnittene und mit Klenow Fragment aufgefüllte Restriktionsschnittstelle kloniert werden. Im pKS/oxPNT Vektor wurden beide Sequenzen durch Sequenzierung nochmals auf ihre Richtigkeit getestet.



Abbildung 2-16: Klonierung des F1 Fragments aus genomischer DNA (R1/E Zellen). In einer Phusion-PCR bei 66°C Annealing-Temperatur wurde das F1 Fragment mit den F1-spezifischen Primern F1_Cla1_5' und F2_Cla1_3' amplifiziert.

2.2.1.2 Elektroporation in R1/E Zellen und Selektion

60 µg des wie im vorherigen Abschnitt beschrieben hergestellten Replacementvektors wurden mit KpnI linearisiert und an die Transgenic Core Facility des MPIs in Dresden zur Elektroporation in R1/E Zellen geschickt. Mit G418 wurden dort die Klone selektioniert, die den Replacementvektor im Genom integriert hatten. Nach einer Selektion über 2 Wochen konnten 500 Klone vereinzelt werden und standen für die anschließende Genotypisierung bereit.

2.2.1.3 Genotypisierung der R1/E Zellen

Die selektionierten R1/E Klone wurden mittels Phusion-PCR (siehe 7.2.5.2) auf die Insertion des Replacementvektors überprüft. Für die das F1 Fragment überspannende PCR wurden die Primer DA8_Sonde_5' und Lc2vf1 neo verwendet, für die F2 Fragment überspannende PCR die Primer LC2neo und DA8_hF2_LaA_3' (siehe Tabelle 5-2). Im Falle des F1 Fragments wird ein PCR-Produkt von 1502 bp erwartet, für das F2 Fragment ein PCR-Produkt von 4271 bp.

Eine Überprüfung der 500 Klone mittels der Langarm PCR konnte den Klon B5 als positiv identifizieren (siehe Abbildung 2-17). Um die richtige Insertion zu überprüfen, wurde dieser Klon zusätzlich mit der Kurzarm PCR untersucht, bei der eine Bande in der erwarteten Höhe bei ca. 1400 bp detektiert wurde (siehe Abbildung 2-17).

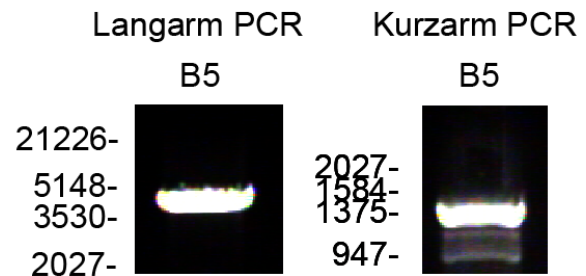


Abbildung 2-17: Genotypisierungs-PCR des positiven ES Zell Klons B5.

Mit Hilfe des Southern Blots, wurde die richtige Insertion des Replacementvektors in den Klon B5 nochmals bestätigt. Wildtypische DNA und DNA des Klons B5 wurden mit dem Restriktionsenzym BstEII verdaut, auf einem Agarosegel aufgetrennt (siehe 7.2.7) und auf eine Nylonmembran transferiert (siehe 7.2.10). Beim anschließenden Southern Blot mit der SYCE3-spezifischen Sonde konnte im Wildtyp eine Bande bei ca. 7000 bp detektiert werden (erwartete Höhe der Bande bei 5851 bp), wohingegen im Klon B5 zusätzlich zu der wildtypischen Bande eine Bande bei ca. 9000 bp (erwartete Höhe der Bande bei 7637 bp)

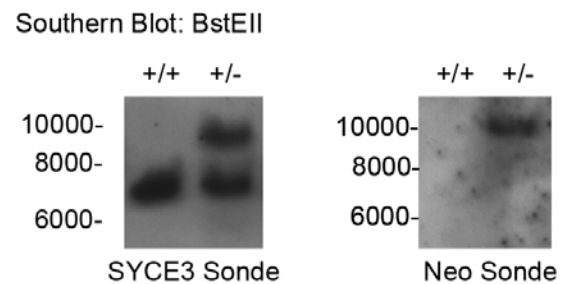


Abbildung 2-18: Southern Blot des positiven ES Zell Klons B5 mit SYCE3-spezifischer Sonde (links) und neospezifischer Sonde (rechts)

sichtbar wurde. Durch diesen Blot wird verdeutlicht, dass (1) der Replacementvektor an der richtigen Stelle integriert und (2) nur eine Kopie des Vektors eingebaut wurde. Um sicherzustellen, dass der Replacementvektor spezifisch in das *Syce3* Gen inseriert wurde und nicht zusätzlich in einer anderen Stelle des Genoms, wurde außerdem ein Southern Blot mit einer neospezifischen Sonde beprobt. Hätte sich der Vektor an mehreren Stellen im Genom integriert, würde man mehrere Banden auf dem Blot detektieren können, da die Neomycin-Selektionskassette in diesem Fall in mehreren unterschiedlich großen Teilfragmenten des Verdaus vorzufinden wäre. Da aber im Klon B5 mit der

neospezifischen Sonde nur eine Bande auf der Höhe von 9000bp detektiert werden konnte, was der erwarteten Höhe entspricht, konnte eine Mehrfachintegration im Genom ausgeschlossen werden.

2.2.1.4 Blastocysteninjektion und Verpaarung der Chimären

Der positive getestete ES Zell Klon wurde in der Transgenic Core Facility des MPIs für "Molecular Cell Biology and Genetics" mittels „laser assisted microinjection“ in eine 8-Zell C57BL/6 Morula injiziert und anschließend in eine CD1 (Auszucht) Leihmutter transferiert. Die daraus entstandenen Chimären wurden mit C57BL/6 Mäusen verpaart.

2.2.1.5 Genotypisierung der F1 Generation

Aus der Verpaarung der Chimären mit C57BL/6 Mäusen entsprang die F1 Generation, die mittels PCR genotypisiert wurde. Da die korrekte Insertion des Replacementvektors in den ES Zellen schon bewiesen wurde, erfolgten alle weiteren Genotypisierungen mit den nicht überspannenden Primern „SYCE3 neu 5' neo“, „SYCE3 neu 5' WT“ und „SYCE3 neu 3' WT neo“ in einer Phusion-PCR.

Die Primerpaare wurden so gewählt, dass der 3' Primer sowohl im WT als auch im Knockout im F2 Fragment bindet, der 5' Primer allerdings spezifisch entweder nur in der Neomycin-Selektionskassette oder in der wildtypischen Sequenz, die im Knockout durch die Neomycin-Selektionskassette ersetzt wurde. Abbildung 4-19 zeigt die „neo“ und „Wildtyp“ PCR der Tiere 2778-2784. Da die Tiere der F1 Generation entweder heterozygot oder wildtypisch sind, kann bei allen 7 Tieren eine Bande in der „Wildtyp“ PCR detektiert werden. In der „neo“ PCR hingegen konnte nur bei den Tieren 2779 (♂), 2781 (♂) und 2784 (♀) ein DNA Fragment amplifiziert werden. Diese 3 Tiere sind folglich heterozygot und konnten für die Etablierung der *Syce3*^{-/-} Zucht in Würzburg verwendet werden.

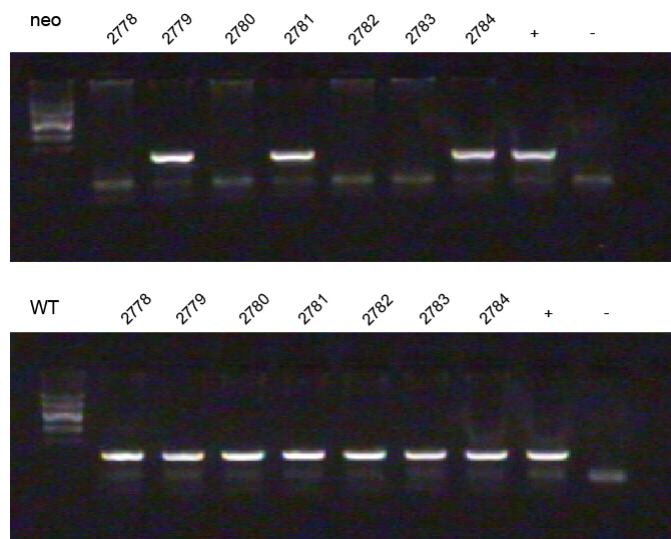


Abbildung 2-19: Genotypisierung der F1 Generation. Oben: "neo"-PCR, unten: WT PCR.

2.2.1.6 In *Syce3*^{-/-} Mäusen wird kein SYCE3 Protein exprimiert

Der Knockout des *Syce3* Gens wurde in den vorherigen Kapiteln auf DNA Ebene durch PCRs und Southern Blot sowohl auf den embryonalen Stammzellen wie auch in den Knockout Mäusen beschrieben. Ziel eines Knockouts ist es, die Proteinexpression des Gens zu verhindern. Um zu beweisen, dass der Knockout des *Syce3* Gens die Expression des SYCE3 Proteins verhindert, wurde Hodengewebe aus *Syce3*^{+/+}, *Syce3*^{+/-} und *Syce3*^{-/-} Mäusen auf zwei Tricin-SDS Gelen (siehe 7.3.4.1) aufgetrennt und auf zwei Nitrocellulose-Membranen geblottet (siehe 7.3.6). Diese wurden mit den Antikörpern anti-SYCE3 (rb) und anti-SYCE3 (gp) (siehe 5.5.2) inkubiert. Beide Antikörper erkannten im wildtypischen und im heterozygoten Hodengewebe eine SYCE3-spezifische Bande bei ca. 12 kDa. Im Knockout Gewebe hingegen konnten beide Antikörper keine Bande auf der entsprechenden Höhe detektieren. (siehe Abbildung 2-20, oben). Um zu zeigen, dass gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden, wurden die Blots gestrippt und mit einem anti-Actin Antikörper inkubiert. Auf diesen Blots sind in allen Spuren gleich starke Banden zu sehen, was die gleichmäßige Beladung der Blots belegt (siehe Abbildung 2-20, unten). Die Tatsache, dass beide anti-SYCE3 Antikörper im Knockout Hodengewebe keine Bande detektieren konnten beweist zwei Dinge: (1) die Deletion des *Syce3* Gens verhindert die SYCE3 Proteinexpression vollständig; (2) die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Antikörper (siehe 7.3.3) erkennen spezifisch das SYCE3 Protein.

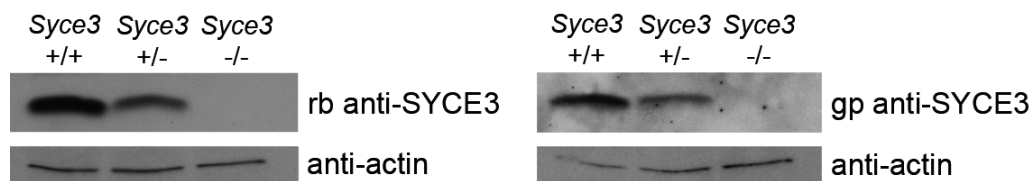


Abbildung 2-20: Die Expression des SYCE3 Proteins wird durch den Knockout des *Syce3* Gens verhindert. Tricin-SDS-PAGE mit anschließendem Immun-Blot von *Syce3*^{+/+}, *Syce3*^{+/-} und *Syce3*^{-/-} Mäusen beprobt mit einem anti-SYCE3 (rb) (links oben) und einem anti-SYCE3 (gp) Antikörper (rechts oben). Die Blots wurden gestrippt und mit einem anti-Actin Antikörper zur Eichung der Gele inkubiert (siehe untere Blots). Bei beiden SYCE3 Antikörpern konnte nur im wildtypischen und heterozygoten Gewebe eine SYCE3-spezifische Bande detektiert werden. Diese war im Knockout bei beiden Antikörpern nicht nachweisbar.

2.2.2 Charakterisierung der *Syce3*^{-/-} Maus

2.2.2.1 *Syce3*^{-/-} Mäuse sind infertil

Syce3^{-/-} Mäuse zeigen äußerlich keinen somatischen Phänotyp (siehe Abbildung 2-21). Aber wiederholte Paarungsversuch von *Syce3*^{-/-} Männchen und *Syce3*^{-/-} Weibchen mit wildtypischen Mäusen brachten keine Nachkommen hervor. Um die durch den *Syce3* Knockout verursachte Infertilität näher zu untersuchen, wurden sowohl *Syce3*^{-/-} Hoden als auch *Syce3*^{-/-} Ovar adulter Tiere präpariert. Es fiel auf, dass *Syce3*^{-/-} Hoden deutlich kleiner sind, als die Hoden ihrer wildtypischen Geschwister (siehe Abbildung 2-22).

Auch das Gewicht der Hoden ist in *Syce3*^{-/-} Mäusen deutlich verringert (siehe Tabelle 2-1), wohingegen das Körpergewicht der wildtypischen, heterozygoten und *Syce3*^{-/-} Mäuse gleich ist (siehe Tabelle 2-1).



Abbildung 2-22: Größenunterschied adulter wildtypischer Hoden (links) und *Syce3*^{-/-} Hoden (rechts). Balken, 200 µm.

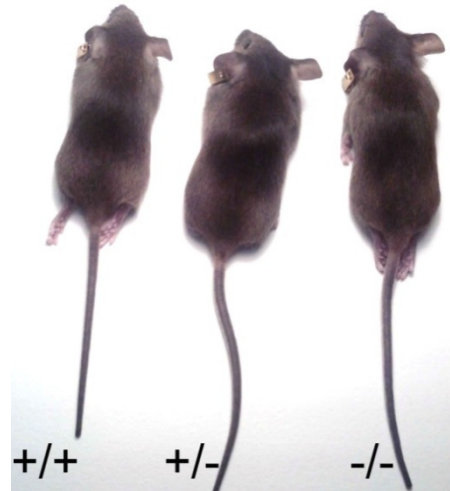


Abbildung 2-21: *Syce3*^{-/-} Mäuse zeigen keinen somatischen Phänotyp. Vergleich der Geschwistertiere: Rein von ihrem äußeren Körperbau sind die Tiere nicht von einander zu unterscheiden.

Genotyp	Körpergewicht	Hodengewicht	Alter
+/-	21,31	0,05105	31 Tage
-/-	21,41	0,02855	31 Tage
+/-	20,8	0,07365	33 Tage
+/+	20,5	0,074	33 Tage
-/-	20,06	0,0423	33 Tage
-/-	18,69	0,025	33 Tage
+/-	20,95	0,08575	45 Tage
-/-	25,52	0,03345	45 Tage
-/-	24,16	0,03695	45 Tage
-/-	27,73	0,03155	45 Tage
-/-	25,94	0,03585	45 Tage

Tabelle 2-1: *Syce3* Knockout führt zu einer Reduktion des Hodengewichts. Gewichtstabelle der Versuchstiere nach 31–45 Tagen. Beim Körpergewicht ist kein Unterschied zwischen *Syce3*^{-/-} Tieren und heterozygoten bzw. wildtypischen Geschwistern zu beobachten. *Syce3*^{-/-} Tiere weisen aber ein deutlich geringeres Hodengewicht auf als ihre wildtypischen und heterozygoten Geschwister.

2.2.2.2 *Syce3* Knockout führt bei Männchen und Weibchen zu einem Abbruch der Meiose

Die Ursache der in *Syce3*^{-/-} Hoden beobachteten Größenreduktion wurde mit Hämatoxylin/Eosin gefärbten Paraffinschnitten von *Syce3*^{-/-}, *Syce3*^{+/-} und *Syce3*^{+/+} Hoden untersucht. In Präparaten von wildtypischen und heterozygoten Tieren sind Sertoli-Zellen, Spermatozyten und Spermatoziden in den Samenkanälchen erkennbar. Ganz im Gegensatz dazu können in dem *Syce3*^{-/-} Gewebe keine postmeiotischen Stadien entdeckt werden. In *Syce3*^{-/-} Tubuli sind nur Spermatozoen, Sertoli-Zellen und Spermatozyten vorhanden. In anderen Tubuli sind Spermatozoen und apoptotische Spermatozyten erkennbar (siehe Abbildung 2-23, obere Reihe). Die Tubuli im *Syce3*^{-/-} Hoden sind zudem dadurch charakterisiert, dass sie allgemein einen kleineren Durchmesser aufweisen als wildtypische Tubuli (siehe Abbildung 2-23, obere Reihe).

Die Anwesenheit apoptotischer Spermatozyten und die Abwesenheit von postmeiotischen Stadien lassen den Rückschluss zu, dass SYCE3 essentiell für die Meiose ist. Das Fehlen von SYCE3 scheint zu einem Abbruch der Meiose zu führen.

Auch *Syce3*^{-/-} Ovarien weisen eine deutlich andere Morphologie auf als vergleichbares wildtypisches Gewebe. Während im wildtypischen und *Syce3*^{+/-} Ovar Oocyten in verschiedenen Reifestadien sichtbar sind, fehlen die Oocyten im *Syce3*^{-/-} Ovar vollständig (siehe Abbildung 2-23). Auch dieses Fehlen von Oocyten lässt auf einen Abbruch der Meiose schließen.

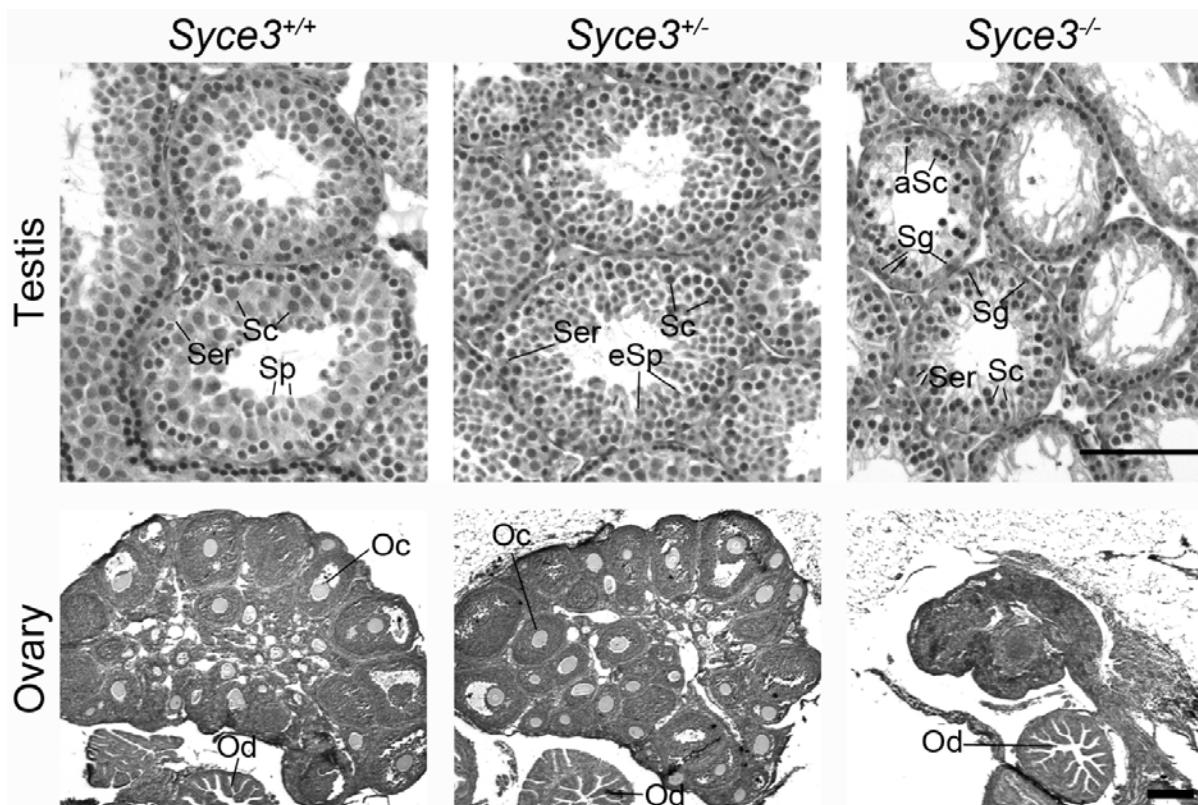


Abbildung 2-23: Das Fehlen von SYCE3 hat einen Abbruch der Meiose zur Folge. Histologische Analysen von in Paraffin eingebettetem Hoden (Tag 30) und Ovar (Tag 32) von *Syce3*^{+/+}, *Syce3*^{+/-} und *Syce3*^{-/-} Mäusen gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin. (Ser) Sertoli-Zelle, (Sc) Spermatozyt, (Sp) Spermatozid, (eSp) elongierte Spermatozid, (aSc) apoptotische Spermatozyt, (Sg) Spermatozoen, (Oc) Oocyte, (Od) Ovidukt. Balken, 100 µm bzw. 175 µm.

Wie mit der Hämatoxylin-Eosin Färbung gezeigt werden konnte, sind im *Syce3*^{-/-} Hoden apoptotische Spermatozyten vorhanden. Dieses Ergebnis wurde durch den TUNEL Assay auf *Syce3*^{+/+}, *Syce3*^{+/-} und *Syce3*^{-/-} Hodengewebe bestätigt. In Abbildung 2-24 sind in wildtypischen und heterozygoten Tubuli vereinzelt TUNEL-positive Signale zu erkennen. Die Mehrzahl an Zellen weist jedoch kein TUNEL-positives Signal auf. Im Gegensatz dazu sind in manchen Samenkanälchen von *Syce3*^{-/-} Mäusen zahlreiche TUNEL-positive Zellen detektierbar. Interessanterweise sind allerdings auch Tubuli vorhanden, die keine apoptotischen Zellen, in manchen Fällen allerdings auch keine anderen Spermatozyten aufweisen. Dies deutet drauf hin, dass sich die Spermatozyten bis zu einem gewissen Stadium „normal“ entwickeln können, dann aber aufgrund der Störungen, die durch den *Syce3* Knockout hervorgerufen werden, alle gleichzeitig apoptotisch werden.

Das Stadium, in dem Spermatozyten bei einem Fehlen von SYCE3 apoptotisch werden, wurde in Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten anhand der Morphologie der Spermatozoen ermittelt (siehe Abbildung 2-25 und Ahmed & de Rooij, 2009). Der Samenepithelzyklus kann in zwölf verschiedene Stadien unterteilt werden: In Hämatoxylin gefärbten Präparaten ist für diese Unterscheidung die Zellzusammensetzung wichtig - vor allem die unterschiedlichen Kombinationen von Spermatozoen und elongierten Spermatozoen. Diese Einteilung der Tubuli in die zwölf verschiedenen Stadien macht sich die zeitliche Synchronität der Spermatogenese zunutze (siehe 1.1.1.3). Will man die Tubuli-Stadien von Knockout Mäusen, die keine postmeiotischen Stadien enthalten, bestimmen, so ist eine eindeutige Unterscheidung aller 12 Stadien nicht möglich. In diesen Tubuli können lediglich Stadium III-X eindeutig voneinander unterschieden werden (siehe Ahmed & de Rooij, 2009). Für die Bestimmung des Tubuli-Stadiums bei einem Fehlen postmeiotischer Zellen (also auch im Falle des *Syce3* Knockouts) dienen die verschiedenen Typen von Spermatozoen als Unterscheidungsmerkmal. Stadium X-II Tubuli sind dadurch gekennzeichnet, dass sie Typ A-Spermatozoen und Zygotän- bzw. Pachytän-Spermatozyten enthalten. Typ A-Spermatozoen haben im Gegensatz zu den anderen Spermatozoentypen kein Heterochromatin. Zygotän- und Pachytän-Spermatozyten können nicht voneinander unterschieden werden. Stadium III und IV Tubuli können anhand von intermediären Spermatozoen identifiziert werden. Dies sind relativ große Zellen, die mehr Heterochromatin aufweisen als Typ A-Spermatozoen, aber weniger als Typ B-Spermatozoen. Je nachdem ob frühe intermediäre Spermatozoen oder späte vorhanden sind, wird der Tubus als Typ III oder Typ IV Tubus bezeichnet. Die intermediären Spermatozoen differenzieren nun weiter und so liegen in Stadium V-VI Tubuli Typ B-Spermatozoen vor, die durch eine abgerundete Form und einen höheren Gehalt an Heterochromatin gekennzeichnet sind.

Bei der Untersuchung von *Syce3*^{-/-} Tubuli, konnten anhand des Vorhandenseins von Typ A-Spermatozoen Stadium X-II Tubuli eindeutig identifiziert werden (siehe Abbildung 2-25). In diesem Tubus-Stadium sind noch keine morphologischen Veränderungen, die auf eine Apoptose der Zygotän- bzw. frühen Pachytän-Spermatozyten hinweisen würden, erkennbar. Im Gegensatz hierzu kann man in Stadium IV Tubuli, die intermediäre Spermatozoen enthalten, apoptotische Spermatozyten identifizieren (siehe Abbildung 2-25). Da die Pachytän-Spermatozyten im Stadium IV apoptotisch werden, ist es nicht verwunderlich, dass in Stadium V-VI Tubuli nur Typ B-Spermatozoen, jedoch keine Pachytän-Spermatozyten mehr identifiziert werden können (siehe Abbildung 2-25).

Somit konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass die Infertilität der *Syce3*^{-/-} Mäuse auf einen Abbruch der Meiose zurückzuführen ist, der beim Männchen während der Spermatogenese in

Stadium IV Tubuli stattfindet. Im nächsten Abschnitt wird die Ursache für den Abbruch der Meiose untersucht

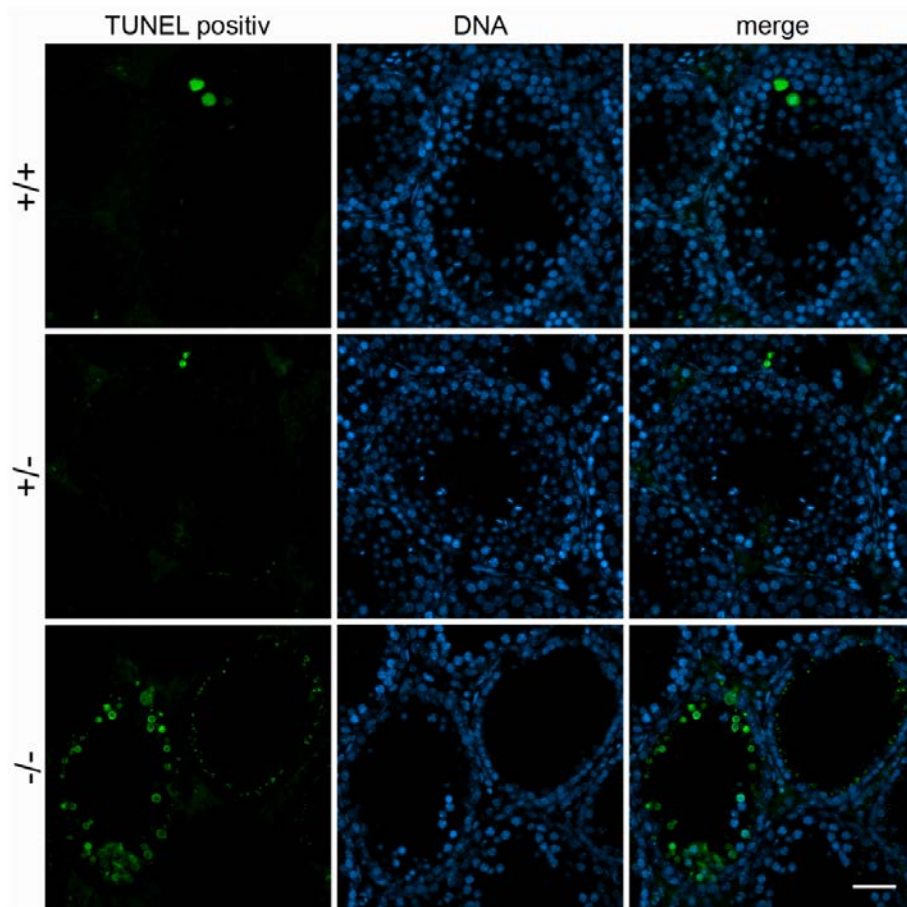


Abbildung 2-24: In *Syce3*^{-/-} Tubuli sind viele TUNEL-positive Zellen detektierbar. TUNEL Färbung von *Syce3*^{+/+}, *Syce3*^{+/-} und *Syce3*^{-/-} Hämatoxylin-Eosin gefärbten Hoden (Tag 30). In wildtypischen und heterozygoten Zellen können vereinzelte TUNEL-positive Signale (grün) detektiert werden. Die Mehrzahl der Zellen (DNA markiert mit Höchst (blau)) weist hingegen kein TUNEL-positives Signal auf. Im Gegensatz dazu sind in *Syce3*^{-/-} Tubuli viele TUNEL-positive Zellen zu finden (grün). Balken, 40 μ m.

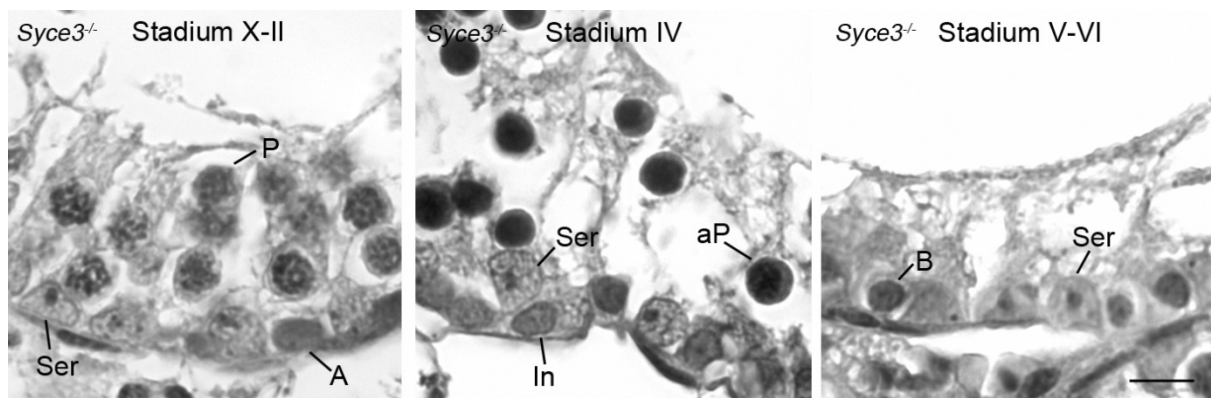


Abbildung 2-25: In *Syce3*^{-/-} Hoden erfolgt ein Stadium IV Arrest der Spermatocyten. Lichtmikroskopische Aufnahmen von *Syce3*^{-/-} Hoden (Paraffinschnitte): Gezeigt sind Stadium X-II, IV und V-VI Tubuli. In Stadium X-II Tubuli sind Typ A-Spermatogonien und Zygotän- oder Pachytän-Spermatocyten vorhanden. Stadium IV Tubuli sind durch intermediäre Spermatogonien und apoptotische Pachytän-Spermatocyten charakterisiert. In Typ V-VI Tubuli können Typ B-Spermatogonien detektiert werden. (Ser) Sertoli-Zellen, (P) Pachytän-Zellen, (A) Typ A-Spermatogonien, (aP) apoptotische Pachytän-Zellen, (In) intermediäre Spermatogonien und (B) Typ B-Spermatogonien. Balken, 10 μ m.

2.3 SYCE3 ist essentiell für die Synapse und die homologe Rekombination

2.3.1 *Syce3* wird zur Initiation der Synapse benötigt

Dem CE wurde in früheren Arbeiten eine essentielle Rolle für die Synapse der homologen Chromosomen nachgewiesen (Bolcun-Filas *et al.*, 2007, 2009; Hamer *et al.*, 2008). Da SYCE3 ein Bestandteil des CE ist, wurde als erste mögliche Ursache für das Abbrechen der Meiose in *Syce3*^{-/-} Mäusen untersucht, ob die Synapse initiiert werden kann. Hierfür wurden Spreitungspräparate von *Syce3*^{+/+} und *Syce3*^{-/-} Spermatocyten hergestellt und diese mit SYCP3 zum Visualisieren der AEs und SYCP1 als Marker für die TFs markiert. In wildtypischen Pachytän-Spermatocyten sind die 19 LEs der Autosomen und die zwei AEs der Gonosomen sichtbar (siehe SYCP3 Markierung in Abbildung 2-26). Im Gegensatz dazu markiert der anti-SYCP3 Antikörper in den *Syce3* Knockout Zellen 40 Chromosomenachsen, von denen jeweils zwei nebeneinander liegen (Ausnahme: X und Y Chromosom, siehe Pfeilspitze) (Abbildung 2-26). Dies deutet darauf hin, dass sich in *Syce3*^{-/-} Spermatocyten die AEs ausbilden können und die Paarung der Homologen in wildtypischer Weise stattfinden kann. Allerdings scheint die Synapse der homologen Chromosomen in *Syce3*^{-/-} Spermatocyten gestört zu sein.

Ein weiterer Hinweis auf eine Störung der Synapse in *Syce3*^{-/-} Spermatocyten ist die Lokalisation von SYCP1 in diesen Zellen. In wildtypischen Pachytän-Spermatocyten kann man eine für SYCP1 typische

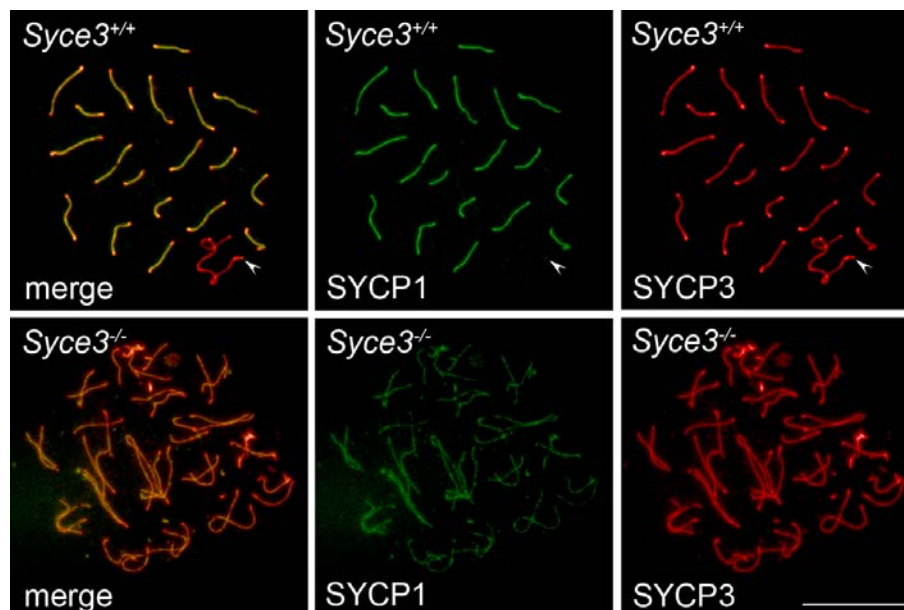


Abbildung 2-26: In *Syce3*^{-/-} Tieren bildet sich keine Synapse zwischen den homologen Chromosomen aus. Spreitungspräparate von wildtypischen und *Syce3*^{-/-} Pachytän- bzw. Pachytän-ähnlichen-Spermatocyten doppelmarkiert mit anti-SYCP1 (grün) und anti-SYCP3 (rot) Antikörpern. In *Syce3*^{-/-} Zellen findet die Paarung der homologen Chromosomen statt, es wird aber keine Synapse ausgebildet. Zudem unterscheidet sich die Lokalisation von SYCP1: In wildtypischen Zellen ist SYCP1 nur an Regionen der homologen Chromosomen lokalisiert, zwischen denen sich der SC ausgebildet hat. Am XY Body ist SYCP1 hauptsächlich an der pseudoautosomalen Region lokalisiert (siehe Pfeilspitze). In *Syce3*^{-/-} Zellen hingegen ist SYCP1 entlang der gepaarten homologen Chromosomen in einem schwachen, diskontinuierlichen Muster lokalisiert, unabhängig davon, ob diese eng nebeneinander liegen oder nicht. Balken, 10 µm.

Markierung aller Autosomen sehen, zwischen denen sich über die volle Länge der SC ausgebildet hat. Am XY Body ist SYCP1 nur an der pseudoautosomalen Region lokalisiert (siehe Abbildung 2-26, Pfeilspitze). Hingegen ist SYCP1 in *Syce3*^{-/-} Pachytän-ähnlichen-Spermatocyten in einem schwachen diskontinuierlichen Muster entlang der gepaarten Chromosomen verteilt, unabhängig davon, ob diese eng nebeneinander liegen oder nicht (siehe Abbildung 2-26, unten).

Um die Defekte bei der Ausbildung der Synapse noch genauer zu untersuchen, wurden Ultradünnschnitte von Glutaraldehyd fixierten *Syce3*^{+/+} und *Syce3*^{-/-} Hoden angefertigt und unter dem Transmissionselektronenmikroskop ausgewertet. Im Gegensatz zu einem wildtypischen SC, bei dem die LEs durch das CE miteinander verbunden sind, kann man in *Syce3*^{-/-} Gewebe kein CE oder eine CE-ähnliche Struktur erkennen (siehe Abbildung 2-27).

Diese Ergebnisse belegen eindeutig, dass SYCE3 für die Initiation der Synapse essentiell ist.

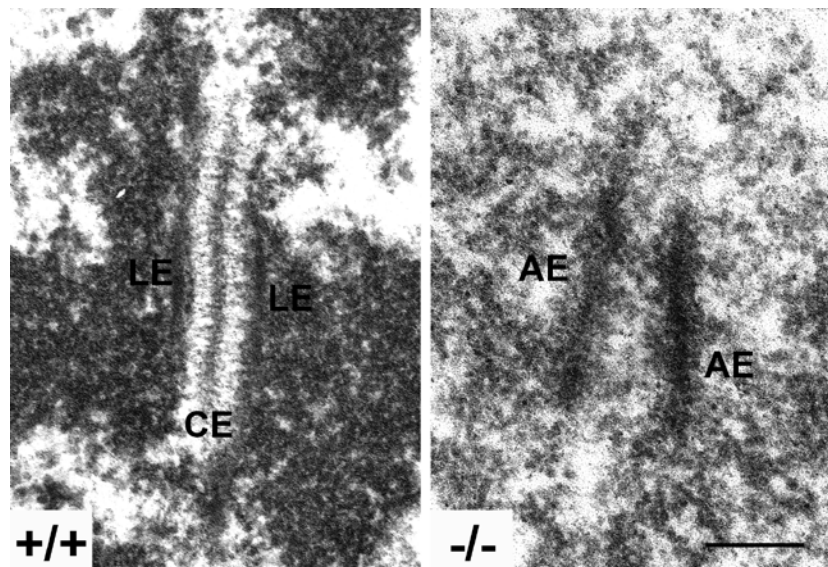


Abbildung 2-27: Die Initiation der Synapse ist in *Syce3*^{-/-} Spermatocyten defekt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Syce3*^{+/+} und *Syce3*^{-/-} Spermatocyten. Im Wildtyp ist ein SC gezeigt, dessen LEs mit Chromatin assoziiert und über das CE miteinander verbunden sind. In Knockout-Spermatocyten konnten keine CE-ähnlichen Strukturen gefunden werden. Hier sind die AEs an keiner Stelle miteinander verbunden. Balken, 200 nm.

2.3.2 SYCE3 ist essentiell für die Umwandlung von frühen Rekombinationsereignissen in Crossing-over Strukturen

In diesem Abschnitt wurde die Auswirkung des *Syce3* Knockouts auf die homologe Rekombination untersucht. Hierzu wurde das Verhalten von DNA DSBs, mittleren Rekombinationsknoten und COs näher analysiert. Da im Abschnitt 2.2.2.2 gezeigt wurde, dass *Syce3*^{-/-} Spermatocyten im Pachytän apoptotisch werden, wurden die Untersuchungen zur meiotischen Rekombination an *Syce3*^{-/-} Oocyten durchgeführt, da *Syce3*^{-/-} Oocyten durch einen weniger stringenten Meiose Checkpoint das Diplotän Stadium erreichen. Für alle Analysen wurden Spreitungspräparate von *Syce3*^{+/+}, *Syce3*^{+/-} und *Syce3*^{-/-} Ovar aus neugeborenen Mäusen (19,5 dpc) hergestellt und mit dem jeweiligen Rekombinationsmarker in Kombination mit SYCP3 doppelmarkiert und unter dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) untersucht.

Bei der Betrachtung der *Syce3*^{-/-} Oocyten fällt zuerst auf, dass die AEs im Gegensatz zum *Syce3*^{-/-} Spermatozyten nicht gepaart vorliegen (siehe SYCP3 Markierung in Abbildung 2-28, A). Ob dies durch eine weibchenspezifische Funktion von SYCE3 oder durch einen sekundären Effekt aufgrund der fehlenden Synapse in *Syce3*^{-/-} Oocyten ausgelöst wird, kann mit diesen Versuchen im Moment nicht geklärt werden.

Zuerst wurden die Induktion und die Reparatur von DSBs im *Syce3* Knockout betrachtet. Als Marker für DNA DSBs diente das Histon γ H2AX. Dieses ist in frühen wildtypischen Stadien (Leptotän und Zygotän) diffus über das gesamte Chromatin verteilt. Im Wildtyp verschwindet diese diffuse, wolkenähnliche Lokalisation mit dem Fortschreiten der Meiose I (und mit der damit verbundenen Reparatur der DNA DSBs). Die Lokalisation von γ H2AX begrenzt sich auf den Bereich des XY Body (Mahadevaiah *et al.*, 2001) oder wie in Oocyten auf wenige γ H2AX Spots an Stellen des Chromatins, an denen homologe Rekombination stattfindet (Scherthan *et al.*, 2010). In *Syce3*^{-/-} Oocyten können DSBs eingefügt werden, was dadurch erkenntlich wird, dass γ H2AX in Pachytän-Oocyten mit dem Chromatin assoziiert ist (siehe Abbildung 2-28 (A) oben). Allerdings ist ein deutlicher Unterschied zwischen Wildtyp und Knockout sichtbar, da γ H2AX in *Syce3*^{-/-} Oocyten länger als im Wildtyp diffus auf dem Chromatin persistiert (siehe Abbildung 2-28 (A)).

Als nächstes wurde das Verhalten von Transitionsknoten (transition nodules, TNs) in *Syce3*^{-/-} Oocyten untersucht. TNs werden zeitgleich mit der Synapse ausgebildet und sind im Zygotän zwischen den gepaarten chromosomalen Achsen lokalisiert. Sie entstehen durch die Umwandlung von frühen Rekombinationsknoten (ENs) und sind molekular unter anderem durch die Anwesenheit des Proteins RPA gekennzeichnet (Moens *et al.*, 2002, 2007). In wildtypischen Maus Zygotän-Meiozyten ist RPA in bis zu 250 Knoten pro Zellkern zu finden (Moens *et al.*, 2002, 2007). Die Anzahl an RPA Foci nimmt in wildtypischen Zellen im Verlauf der Prophase I ab, bis im späten Pachytän nur noch vereinzelte RPA Foci detektiert werden können (siehe Abbildung 2-28 A, B und Moens *et al.*, 2002). Im Gegensatz hierzu konnte für den *Syce3* Knockout gezeigt werden, dass RPA in Pachytän-Zellen signifikant länger auf den Chromosomenachsen verweilt (Median an RPA Foci: WT, 22; *Syce3*^{-/-} 67; $p < 0,001$) (siehe Abbildung 2-28, (A) mittlere Reihe, (B) links). Noch deutlicher wird das Verweilen von RPA in Diplotän-Oocyten, bei denen der Median an RPA Foci im Wildtyp 4 beträgt und im *Syce3*^{-/-} Knockout 27 ($p < 0,001$) (siehe Abbildung 2-28, A mittlere Reihe; B, links).

Als letzter Punkt wurde die Ausbildung von COs in *Syce3*^{-/-} Oocyten untersucht. COs werden molekularbiologisch durch das Protein MLH1 markiert. MLH1 wird ab dem Pachytän an manche TNs rekrutiert und transformiert diese so in Rekombinationsknoten (recombination nodules, RNs) (Baker *et al.*, 1996; Moens *et al.*, 2007). In wildtypischen Pachytän- ($n=23$) und Diplotän-Zellen ($n=18$) sind im Median 22 beziehungsweise 7,5 MLH1 Foci pro Zellkern detektierbar (siehe Abbildung 2-28 (A) unten, (B) rechts). Im Gegensatz hierzu liegt der Median an MLH1 Foci in *Syce3*^{-/-} Pachytän- ($n=26$) und Diplotän-Oocyten ($n=20$) bei 0 (siehe Abbildung 2-28, A unten; B, rechts). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney *U* Test bestätigt.

Um auszuschließen, dass diese signifikanten Veränderungen in der RPA und MLH1 Dynamik in SYCE3-defizienten Oocyten durch ein Verzögerung der Meiose an sich hervorgerufen wurden, wurde das Verhältnis zwischen Pachytän- (WT, $n=44$; *Syce3*^{-/-}, $n=53$) und Diplotän-Oocyten (WT, $n=33$; *Syce3*^{-/-}, $n=35$) in *Syce3*^{-/-} Tieren quantifiziert. Wie in Abbildung 2-28 (C) deutlich wird, konnte kein signifikanter Unterschied im Pachytän/Diplotän Verhältnis zwischen Wildtyp und *Syce3*^{-/-} Tieren festgestellt werden (ermittelt mit Qui-Quadrat Test). Dies lässt den Rückschluss zu, dass die

Progression der Prophase I in *Syce3*^{-/-} Weibchen an sich nicht gestört ist, dass aber das Fortschreiten der homologen Rekombination von SYCE3 abhängig ist.

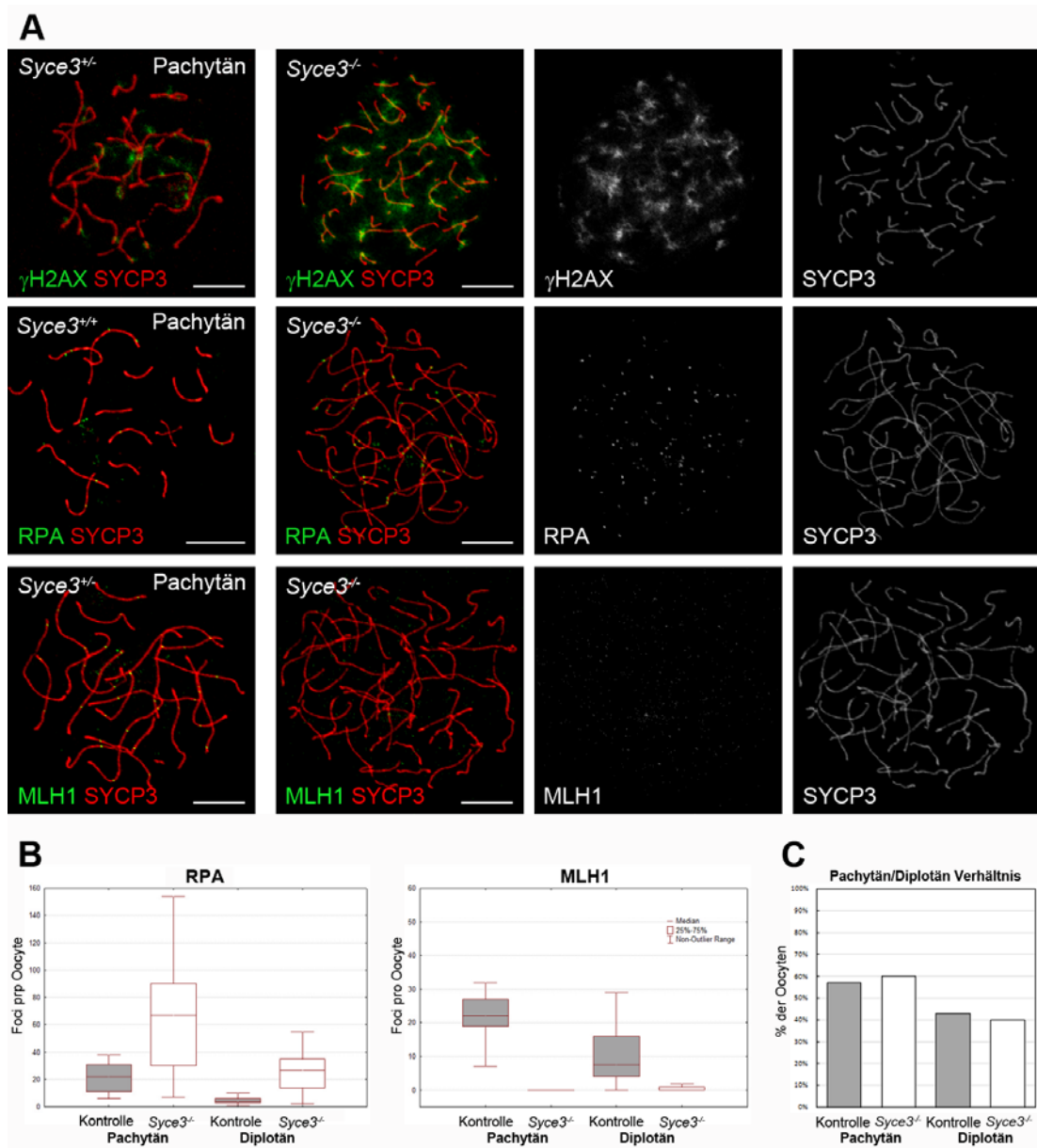


Abbildung 2-28: **Das Fortschreiten der homologen Rekombination ist in *Syce3*^{-/-} Oocyten gestört.** (A) Spreitungspräparate von *Syce3*^{+/+}, *Syce3*^{+/-} und *Syce3*^{-/-} Pachytän-Oocyten (19,5 dpc) doppelmarkiert mit γ H2AX (grün), RPA (grün) oder MLH1 (grün) und SYCP3 (rot), aufgenommen am CLSM. Das Einfügen von DSBs scheint in *Syce3*^{-/-} Oocyten nicht gestört zu sein, was an dem Vorhandensein der γ H2AX Markierung deutlich wird, allerdings persistiert das γ H2AX Signal in *Syce3*^{-/-} Pachytän-Oocyten deutlich länger auf dem Chromatin. Dies lässt auf eine fehlerhafte Reparatur der DNA DSBs schließen. Auch die RPA Verteilung ist in *Syce3*^{-/-} Pachytän-Oocyten verändert, da RPA auch hier länger auf den Achsen verweilt als in wildtypischen Oocyten. Dies kann ein Anzeichen dafür sein, dass Transitionsknoten in *Syce3*^{-/-} Oocyten länger auf den Chromosomenachsen verweilen als in wildtypischen Oocyten. Die unterste Reihe zeigt die Immunfluoreszenz mit MLH1, bei der in der wildtypischen Pachytän-Oocyte mit jeder Chromosomenachse mindestens ein MLH1 Foci assoziiert ist. Im Gegensatz dazu ist in *Syce3*^{-/-} Pachytän Oocyten kein MLH1 Signal detektierbar. Balken, 10 μ m. (B) Anzahl der RPA Foci (links) in Wildtyp und *Syce3*^{-/-} Pachytän (WT, n=21; *Syce3*^{-/-}, n=27) und Diplotän (WT, n=15; *Syce3*^{-/-}, n=15) Oocyten, dargestellt in einem Whisker-Box-Plot. Anzahl der MLH1 Foci (rechts) in Kontroll- und *Syce3*^{-/-} Pachytän- (WT, n=23; *Syce3*^{-/-}, n=26) und Diplotän- (WT, n=18; *Syce3*^{-/-}, n=20) Oocyten dargestellt in einem Whisker-Box-Plot. (C) Pachytän/Diplotän Verhältnis in Kontroll- und *Syce3*^{-/-} Oocyten.

2.4 Bindungspartner von SYCE3

In Kapitel 2.1.5 wurde gezeigt, dass SYCE3 im CE des SC lokalisiert. Wie in der Einleitung beschrieben, können alle anderen bisher bekannten CE-Bestandteile SYCE1, SYCE2 und SYCP1 miteinander interagieren und einen Komplex im CE ausbilden (siehe (Costa *et al.*, 2005; Hamer *et al.*, 2006). Daher werden in diesem letzten Abschnitt die Bindungseigenschaften von SYCE3 analysiert.

2.4.1 SYCE3 bindet an SYCE1 und SYCE2

Da bisher kein stabiles meiotisches Zellkultursystem zur Verfügung steht und sich die Koimmunpräzipitation (IP) aus murinen Hodenextrakten aufgrund der begrenzten Sensitivität dieses Versuchsansatzes als schwierig gestaltete, wurde die IP in doppeltransfizierten somatischen COS-7 Zellen durchgeführt (Stewart-Hutchinson *et al.*, 2008). Dies hat unter anderem den Vorteil, dass in diesem System keine anderen meiosespezifischen Proteine exprimiert werden.

2.4.1.1 Verwendete Konstrukte

Für die IP im heterologen System wurden somatische Zellen (COS-7) mit verschiedenen Fusionskonstrukten mit Effectene (QUIAGEN, Hilden) transfiziert. Alle für die IP verwendeten Konstrukte sind in Abbildung 2-29 dargestellt. Eine Beschreibung der Konstrukte und die genaue Vorgehensweise der Klonierung sind in Kapitel 5.6.4 aufgeführt. Unter 5.6.2 sind die Vektorkarten und in Tabelle 5-2 alle Primer verzeichnet. Die notwendigen Methoden werden im Kapitel 7.2.9 erklärt.

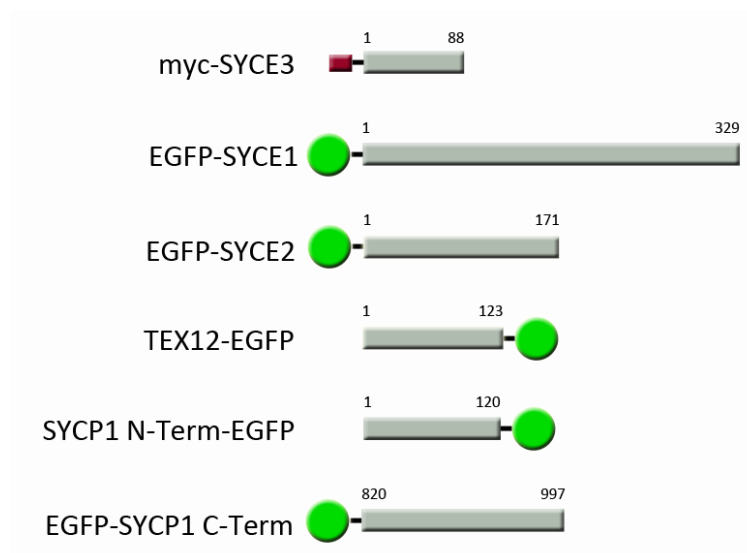


Abbildung 2-29: Schematische Darstellung aller für die IP im heterologen System verwendeten Konstrukte. Das rote Rechteck repräsentiert das myc-Tag im myc-Fusionsprotein. In EGFP-Fusionsproteinen wurde das EGFP-Tag mit einem grünen Kreis gezeigt. Die Positionsangaben oberhalb der Fusionsproteine beziehen sich auf die Aminosäureposition im wildtypischen Protein.

2.4.1.2 Koimmunpräzipitation im heterologen System

SYCE3 und SYCE1

Zuerst wurde die mögliche Interaktion von SYCE3 und SYCE1 untersucht. Die IP wurde, wie unter 7.3.7 beschrieben, durchgeführt und die Proben auf einem Laemmli-SDS-Gel aufgetrennt und anschließend geblottet. In der Input Spur wurden 5% der für die IP eingesetzten Gesamtproteinmenge aufgeladen.

Im Zellysate von mit EGFP-SYCE1 und myc-SYCE3 transfizierten Zellen, aus dem die Proteinkomplexe mit einem anti-myc Antikörper gefischt wurden, konnte mit einem anti-EGFP Antikörper EGFP-SYCE1 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 2-30 (links), Pfeilspitze). Dies zeigt erstmals, dass EGFP-SYCE1 an myc-SYCE3 binden kann. Das untere Gel zeigt denselben Blot nach Strippen und Inkubation mit einem anti-myc Antikörper als Kontrolle dafür, dass der Köder an den anti-myc Antikörper gebunden hat. Um zu beweisen, dass die Bindung zwischen den jeweiligen Proteinen (hier myc-SYCE3 und EGFP-SYCE1) spezifisch ist, wurde zu jedem Experiment eine Negativkontrolle durchgeführt. Die Zellextrakte, die für die Negativkontrolle verwendet wurden, enthielten kein Köderprotein (also in diesem Fall myc-SYCE3), sondern nur das Beuteprotein (EGFP-SYCE1) (siehe Abbildung 2-30, links, unteren Blot). Nach der IP mit einem anti-myc Antikörper konnte in diesem Zellextrakt kein EGFP-SYCE1 nachgewiesen werden, was beweist, dass EGFP-SYCE1 nicht unspezifisch an den anti-myc Antikörper oder die Protein G Beads bindet, sondern spezifisch an myc-SYCE3.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde eine IP mit Zellextrakt durchgeführt, der mit denselben Konstrukten transfiziert wurde, allerdings wurden die Immunkomplexe hier mit einem anti-EGFP Antikörper gefischt. Auch in dieser IP konnte gezeigt werden, dass EGFP-SYCE1 und myc-SYCE3 miteinander interagieren, da myc-SYCE3 mit EGFP-SYCE1 kopräzipitiert wurde (siehe Abbildung 2-30 rechts, oben, Pfeilspitze). Auch hier wurden die Köder auf einem separaten Blot nachgewiesen (unterer Blot).

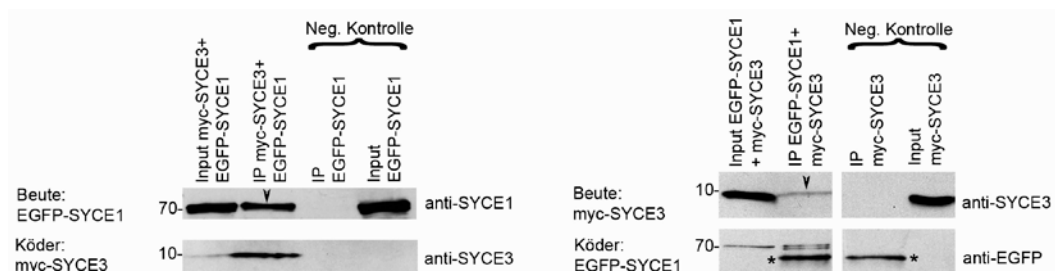


Abbildung 2-30: SYCE3 bindet an SYCE1. IP im heterologen System. Mit myc-SYCE3 und EGFP-SYCE1 transfizierte COS-7 Zellen wurden lysiert. Als Negativkontrollen wurden Zellextrakte hergestellt, die nur mit dem Beuteprotein transfiziert waren. Die Immunkomplexe wurden in beiden Fällen entweder mit einem anti-myc Antikörper (links) oder einem anti-EGFP Antikörper (rechts) präzipitiert, auf einem 12%igen Laemmli-SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Input-Spur enthält 5% der Proteinmenge, die für die IP eingesetzt wurde.

Die linke Abbildung zeigt, dass EGFP-SYCE1 mit myc-SYCE3 präzipitiert werden kann (obere Abbildung, Pfeilspitze). In der unteren Abbildung ist der Köder nach Strippen desselben Blots nachgewiesen. In der rechten Abbildung ist gezeigt, dass myc-SYCE3 auch mit EGFP-SYCE1 präzipitiert werden kann. Mit Sternen wurden die schweren Ketten der Immunglobuline markiert, die für die IP eingesetzt wurden. (IP) Koimmunpräzipitation.

SYCE3 und SYCE2

Als nächstes wurde die mögliche Interaktion zwischen SYCE3 und SYCE2 untersucht. Hierzu wurde derselbe experimentelle Ansatz wie oben gewählt, nur dass die Zellen in diesem Fall mit myc-SYCE3 und EGFP-SYCE2 transfiziert wurden (siehe 2.4.1.1). Bei diesem Versuch konnte auf dem Blot gezeigt werden, dass EGFP-SYCE2 bei der IP mit einem anti-myc Antikörper mit myc-SYCE3 kopräzipitiert wird (siehe Abbildung 2-31, links oben, Pfeilspitze). Der Nachweis des Köders erfolgte mit einem anti-myc Antikörper auf demselben Blot, nachdem dieser gestrippt wurde (siehe Abbildung 2-31, links unten). Auch für diesen Versuch wurde die IP in entgegengesetzter Richtung wiederholt, um das Ergebnis zu reproduzieren (siehe Abbildung 2-31, rechts oben). Auch hier konnte gezeigt werden, dass myc-SYCE3 und EGFP-SYCE2 spezifisch miteinander interagieren (siehe Pfeilspitze). Der Nachweis des Köders ist im unteren Blot gezeigt.



Abbildung 2-31: SYCE3 bindet an SYCE2. IP im heterologen System. In diesem Experiment wurden die Zellen mit myc-SYCE3 und EGFP-SYCE2 transfiziert und die Proteinkomplexe mit den jeweiligen Antikörpern präzipitiert, auf einem Laemmli-SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Nach Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern konnte gezeigt werden, dass myc-SYCE3 EGFP-SYCE2 spezifisch präzipitieren kann (links oben, Pfeilspitze und Negativkontrolle). Die rechte Seite zeigt die IP in die entgegengesetzte Richtung: Auch hier kann myc-SYCE3 mit EGFP-SYCE2 gefischt werden (Pfeilspitze). Die Sternchen markieren die schweren Ketten der Antikörper, die für die IP eingesetzt wurden. (IP) Koimmunpräzipitation.

SYCE3 und Tex12, SYCP1 N-Term und C-Term

Abschließend wurden die möglichen Interaktionen zwischen SYCE3 und Tex12, SYCP1 N-Term und C-Term untersucht. COS-7 Zellen wurden mit den Konstrukten Tex12-EGFP, SYCP1 N-Term-EGFP oder EGFP-SYCP1 C-Term und myc-SYCE3 transfiziert (siehe 2.4.1.1) und lysiert. Wie in Abbildung 2-32 erkennbar, konnte für alle drei Konstrukte unter diesen experimentellen Bedingungen keine Interaktion mit myc-SYCE3 nachgewiesen werden (siehe A, B, C jeweils oberer Blot). Der Köder myc-SYCE3 konnte in allen drei Fällen mit dem anti-myc spezifischen Antikörper gefischt werden (siehe Abbildung 2-32, A, B und C jeweils unterer Blot).

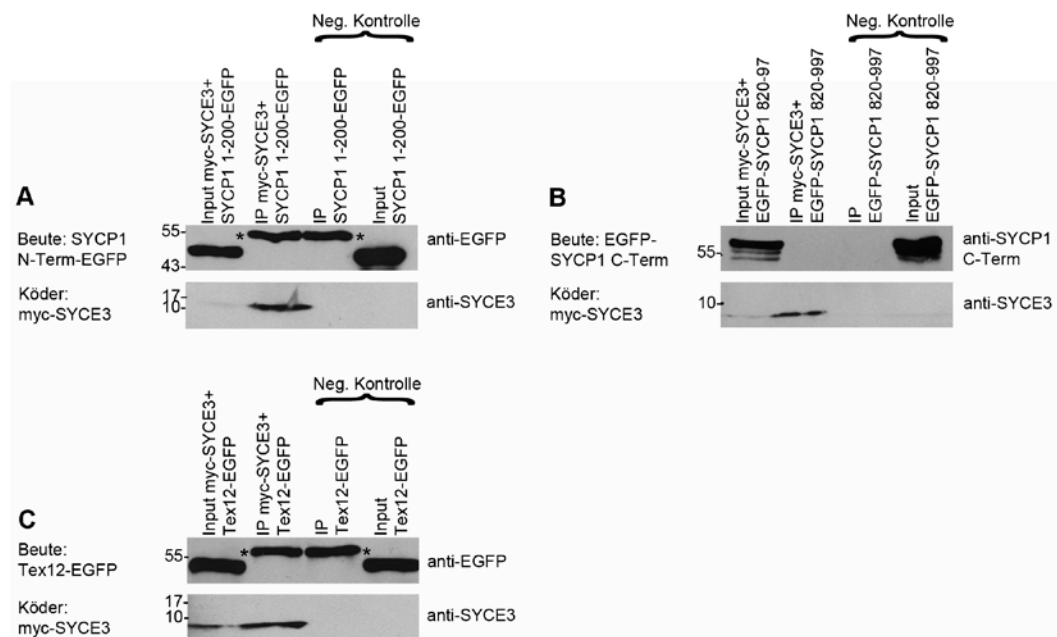


Abbildung 2-32: myc-SYCE3 konnte SYCP1 N-Term-EGFP, EGFP-SYCP1 C-Term und Tex12-EGFP nicht kopräzipitieren. IP im heterologen System. COS-7 Zellen wurden mit myc-SYCE3 und (oder nur) SYCP1 N-Term-EGFP (A), oder EGFP-SYCP1 C-Term (B) oder Tex12-EGFP (C) transfiziert und lysiert. Von den Lysaten wurden je 5% der Gesamtmenge in der Input Spur aufgetragen. Aus den übrigen 95% wurden mit einem anti-myc Antikörper die Proteinkomplexe gefischt. Es konnte weder für SYCP1 N-Term-EGFP (A), noch für EGFP-SYCP1 C-Term (B) oder für Tex12-EGFP (C) eine Bindung mit myc-SYCE3 nachgewiesen werden (jeweils oberer Blot). Der Köder (myc-SYCE3) konnte aber in allen drei Fällen mit dem myc-Antikörper präzipitiert werden (jeweils der untere Blot). Die Sternchen repräsentieren auch hier die schweren Ketten des zur IP eingesetzten anti-myc Antikörpers. (IP) Koimmunpräzipitation.

2.4.2 SYCE3 wird von SYCP1 im heterologen System rekrutiert

Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass myc-SYCE3 mit EGFP-SYCE1 und EGFP-SYCE2 interagieren kann. Eine Interaktion mit SYCP1 und Tex12-EGFP konnte allerdings unter diesen experimentellen Bedingungen nicht detektiert werden. Da in dieser Arbeit allerdings bewiesen werden konnte, dass ein Fehlen von SYCP1 zu einer Misslokalisierung von SYCE3 führt (siehe 2.1.7), wurden die Bindungseigenschaften von SYCE3 und SYCP1 in einem weiteren Versuchsansatz getestet.

Für diesen Versuchsansatz macht man sich die Polymerisationseigenschaften von SYCP1 in COS-7 Zellen zunutze. Öllinger *et al.* (2005) konnten zeigen, dass SYCP1, wenn es in Kulturzellen überexprimiert wird, filamentöse Strukturen, so genannte Polykomplexe, ausbilden kann. Polykomplexe sind CE-ähnliche Strukturen und sind im EM durch ein Muster von dicken und dünnen elektronendichten Balken, die durch TFs miteinander verbunden sind, gekennzeichnet (Öllinger *et al.*, 2005). Diese besondere Eigenschaft von SYCP1 Molekülen in Abwesenheit anderer meiosespezifischer Komponenten selbständig CE-ähnliche Strukturen zu bilden, führte zu der Hypothese, dass SYCP1 ein molekulares Gerüst bildet, an das sich andere CE Proteine anlagern und so das CE ausbilden können. Diese Hypothese wird unter anderem dadurch unterstützt, dass Costa *et al.* (2005) zeigen konnten, dass in COS-7 Zellen überexprimiertes SYCP1 in der Lage war, SYCE1 und SYCE2 zu rekrutieren. Mit dieser Methode (siehe auch Costa *et al.*, 2005) wurde im nächsten Versuch die mögliche Interaktion zwischen EGFP-SYCE3 und SYCP1 untersucht.

2.4.2.1 Verwendete Konstrukte

Die für die Überexpression in COS-7 Zellen verwendeten Konstrukte sind in Abbildung 2-33 aufgelistet. Eine genaue Beschreibung der Herstellung der Konstrukte ist in Kapitel 5.6.4 zu finden.



Abbildung 2-33: Verwendete Konstrukte für die Koexpression von EGFP-SYCE3 und SYCP1 im heterologen System. Das EGFP im EGFP-Fusionsprotein ist durch einen grünen Kreis dargestellt. Die Positionsangabe oberhalb der Konstrukte bezieht sich auf die Aminosäureposition im wildtypischen Protein.

2.4.2.2 Koexpression von EGFP-SYCE3 und SYCP1 im heterologen System

In COS-7 Zellen wurde entweder EGFP-SYCE3, SYCP1, oder SYCP1 gleichzeitig mit EGFP-SYCE3 exprimiert. SYCP1 wurde mit einem anti-SYCP1 Antikörper sichtbar gemacht (siehe 7.5.4) und die Zellen unter dem Mikroskop untersucht.

Abbildung 2-34 (A) zeigt die Verteilung von EGFP-SYCE3. Wird EGFP-SYCE3 in diesen Zellen überexprimiert, liegt es im Cytoplasma und im Zellkern vor. Ganz anders verhält sich SYCP1 wenn es in COS-7 Zellen exprimiert wird. SYCP1 bildet, wie in Abbildung 2-34 (B) sichtbar wird, feine filamentöse Strukturen aus, die sich durch das Cytoplasma ziehen. Wird EGFP-SYCE3 und SYCP1 koexprimiert, ändert sich das Verteilungsmuster von EGFP-SYCE3: EGFP-SYCE3 ist hier nicht mehr homogen über die gesamte Zelle verteilt, sondern wird von den filamentösen Strukturen rekrutiert (C). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass EGFP-SYCE3 mit SYCP1 interagieren kann.

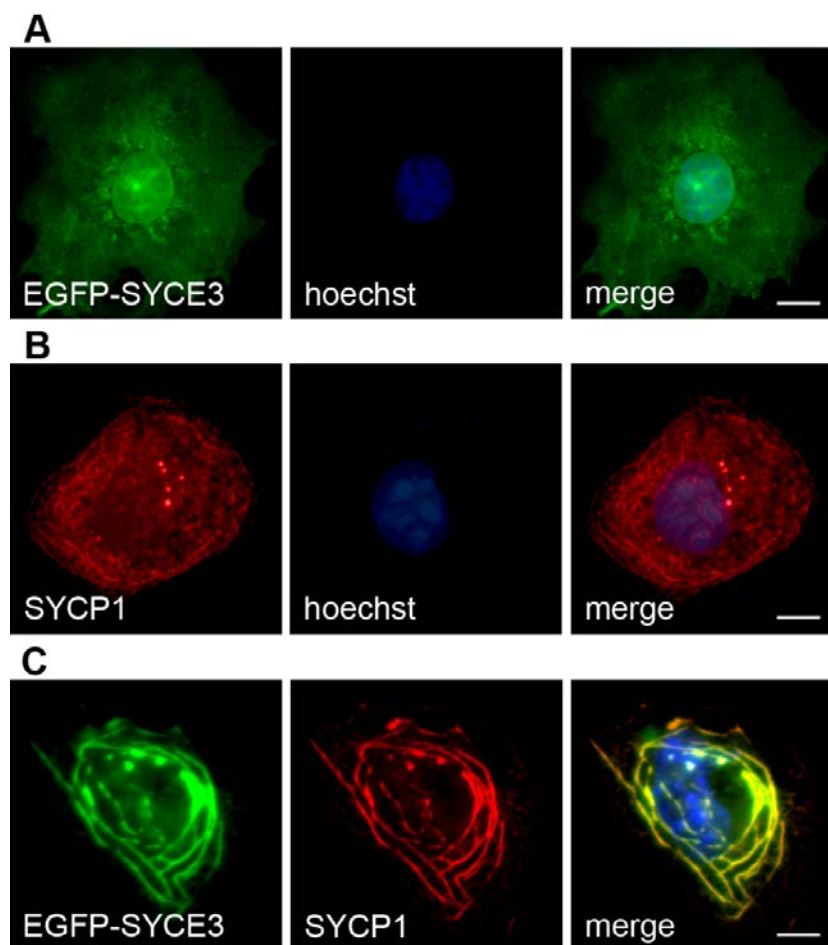


Abbildung 2-34: Im heterologen System wird EGFP-SYCE3 von SYCP1 rekrutiert. Überexpression von EGFP-SYCE3 (A), SYCP1 (B) und SYCP1 und EGFP-SYCE3 (C) in COS-7 Zellen. SYCP1 wurde mit einem anti-SYCP1 Antikörper detektiert.

(A) Exprimiert man EGFP-SYCE3 in somatischen COS-7 Zellen, kann man eine homogene Verteilung von EGFP-SYCE3 im Cytoplasma und im Zellkern beobachten. (B) Wird SYCP1 in Kulturzellen überexprimiert, so bilden sich im Cytoplasma in 41% aller Zellen filamentöse Strukturen aus: die sogenannten Polykomplexe (siehe auch: Öllinger *et al.*, 2005). (C) Wird EGFP-SYCE3 und SYCP1 koexprimiert, rekrutiert SYCP1 EGFP-SYCE3 an die Polykomplexe. Balken, 10µm.

3 Diskussion

Der Synaptonemalkomplex wurde 1956 erstmals von Fawcett beschrieben (Fawcett, 1956). In den letzten sechs Jahrzehnten wurde diese meiose-spezifische und evolutionär hoch-konservierte Struktur, die die homologen Chromosomen wie ein Reisverschluss zusammenhält, in vielen Modelorganismen untersucht und dadurch immer besser verstanden. So konnten beispielsweise die molekularen Komponenten der AEs/LEs der Ratte, SYCP2 und SYCP3, in den Jahren 1998 beziehungsweise 1994 identifiziert werden (Lammers *et al.*, 1994; Offenberg *et al.*, 1998). Auch die molekulare Hauptkomponente der TFs konnte mit der Charakterisierung von SYCP1 im Jahr 1992 beschrieben werden (Meuwissen *et al.*, 1992). Die CR des SC rückte weiter ins Zentrum des Interesses, als de Vries und Kollegen in den 90igern mit der Untersuchung der *Sycp1*^{-/-} Maus die große Bedeutung des CE für die Fruchtbarkeit von Mäusen beweisen konnte (de Vries *et al.*, 2005). So gelang es kurze Zeit später drei weitere Komponenten des CE zu identifizieren: SYCE1, SYCE2 und Tex12 (Costa *et al.*, 2005; Hamer *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurde mit SYCE3 ein weiteres neues Protein des CE gefunden und charakterisiert. Um die Funktionalität des Proteins zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine *Syce3*^{-/-} Maus hergestellt. Ein besonderer Schwerpunkt wurde bei der Analyse des Phänotyps wurde auf die Konsequenzen des Knockouts für den Ablauf der Meiose und den Ablauf der homologen Rekombination gelegt. Abschließend wurden die Bindungseigenschaften von SYCE3 mit anderen Proteinen untersucht. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse haben einen bedeutenden Schritt zur Aufklärung des Assemblys des CE beigetragen. Der erste Teil der Diskussion befasst sich mit der Struktur und den evolutionären Aspekten von SYCE3. Im darauffolgenden Abschnitt wird die Rolle von SYCE3 während des Assemblys des CE erörtert. Abschließend soll der Einfluss von SYCE3 auf die homologe Rekombination diskutiert werden.

3.1 SYCE3: evolutionäre Aspekte und Struktur motive

SYCE3 ist ein kleines Protein von 88 Aminosäuren. Homologe Proteine konnten im Rahmen dieser Arbeit in diversen Vertebraten, bis hin zum Zebrafisch (*Danio rerio*) gefunden werden. Dies deckt sich mit Sequenzuntersuchungen der anderen Proteine des CE, die auch Homologe in diversen Vertebraten aufweisen (Costa *et al.*, 2005; Hamer *et al.*, 2006). Für nicht-Vertebraten konnten für SYCE3 im Rahmen dieser Arbeit, wie auch für die anderen CE Proteine - mit Ausnahme von SYCE2 (siehe Costa *et al.*, 2005; Hamer *et al.*, 2006) -, keine homologen Sequenzen ermittelt werden. Da der SC aber auch in niederen Organismen wie beispielsweise *S. cerevisiae*, *C. elegans* oder *Drosophila* ausgebildet wird, ist das Fehlen homologer CE Proteine in diesen Organismen erstaunlich. Eine Erklärungsmöglichkeit wurde durch Analysen zur Evolution des Transversalproteins SYCP1 gefunden (siehe auch Page & Hawley, 2004; Hamer *et al.*, 2006). Auch für die murine SYCP1 Sequenz findet man homologe Aminosäuresequenzen nur innerhalb der Säuger. Dennoch konnten in diversen anderen Organismen Moleküle beschrieben werden, die die Funktion von SYCP1 in den jeweiligen SCs übernehmen und diesen hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur ähneln (Analoge): In *Drosophila* wurde das Protein C(3)G gefunden, SYP-1 und SYP-2 in *C. elegans* und Zip1p als SYCP1 Analog in *S. cerevisiae* (Page & Hawley, 2004). Folglich könnte es sein, dass auch im Falle von SYCE3 analoge Sequenzen in nicht-Vertebraten existieren. Die alternative Möglichkeit, dass das CE in diesen

Organismen jedoch vollständig anders aufgebaut sein könnte, kann mit den bisherigen Versuchen nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund des hohen Grades an Sequenzkonservierung unter den Säugern (siehe Abbildung 2-1), kann man allerdings mutmaßen, dass SYCE3 nicht nur in der Maus, sondern auch in nicht-murinen Säugern eine wichtige Funktion ausübt.

Wie ebenfalls in Abbildung 2-1 gezeigt, konnten für die murine SYCE3 Aminosäuresequenz zwei putative Phosphorylierungsstellen berechnet werden. Diese Phosphorylierungsstellen sind interessanterweise zwischen allen Säugern konserviert (siehe Abbildung 2-1), was die Vermutung zulässt, dass diese Phosphorylierungsstellen eine wichtige Funktion ausüben. Regulationen durch Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen spielen während der Meiose (beispielsweise während des Übergangs von Prophase I zur Metaphase) eine entscheidende Rolle. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass der Phosphorylierungszustand von SYCP3 die subzelluläre Lokalisation des Proteins verändern kann: während nichtphosphoryliertes SYCP3 an den chromosomalen Achsen lokalisiert, wird phosphoryliertes SYCP3 graduell von diesen abgelöst (Tarsounas *et al.*, 1999a). Dieses Beispiel belegt deutlich, dass während der Meiose zelluläre Prozesse durch den Phosphorylierungszustand von meiotischen Proteinen reguliert werden. Ob die in SYCE3 gefundenen putativen Phosphorylierungsstellen allerdings tatsächlich an der Regulation der Proteinfunktion beteiligt sind, müsste in zusätzlichen Versuchen untersucht werden.

Wie unter 2.1 beschrieben, verfügt SYCE3 über eine Coiled-coil Domäne (Aminosäureposition 6 bis 39; berechnet mit PSORTII). Interessanterweise weisen auch alle anderen bisher bekannten Proteine des CE Coiled-coil Sequenzmotive auf (siehe Meuwissen *et al.*, 1992; Costa *et al.*, 2005) und Aminosäuren 49-79 von Tex12 berechnet mit PSORTII). Coiled-coil Sequenzmotive sind bekannte Protein-Protein Interaktionsmotive, wie sie zum Beispiel auch in Intermediärfilamentproteinen gefunden werden können (Meuwissen *et al.*, 1992; Mason & Arndt, 2004). Charakteristisch für Coiled-coil Domänen ist ihr Aufbau aus heptameren Abschnitten, wobei an der ersten und vierten Position eines solchen Abschnitts meist hydrophobe Aminosäuren zu finden sind, die durch ihre hydrophoben Wechselwirkungen die Ausbildung der Coiled-coil Struktur stabilisieren (Mason & Arndt, 2004). Proteine mit Coiled-coil Domänen bilden häufig Homodimeren aus, indem sich ihre Helices umeinander winden (beispielsweise SYCP1). Teilweise werden auch heterotypische Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eingegangen (Meuwissen *et al.*, 1992). So wurde von Costa und Kollegen vermutet, dass SYCE1, SYCE2 und SYCP1 eventuell über ihre Coiled-coil Domänen miteinander interagieren können und so einen stabilen Komplex im CE ausbilden, der dem SC zwischen den Homologen mechanische Stabilität verleiht und so die Synapse ermöglicht (siehe Costa & Cooke, 2007). Da auch SYCE3 über eine putative Coiled-coil Domäne verfügt, kann vermutet werden, dass SYCE3 eventuell ebenfalls über diese Domäne mit den anderen Proteinen des CE interagiert und so den SC stabilisieren kann. Die Rolle von SYCE3 bei der Stabilisierung des CE wird im nächsten Abschnitt noch ausführlicher diskutiert.

3.2 SYCE3 spielt eine essentielle Rolle beim Assembly Prozess des CE

Wie schon beschrieben, besteht das CE des SC unter anderem aus einem Proteinkomplex von SYCP1, SYCE1, SYCE2 und Tex12. In diesem Komplex kann SYCP1 mit SYCE1 und SYCE2 interagieren (Costa *et al.*, 2005). Zusätzlich können SYCE1 und SYCE2 mit sich selbst und miteinander interagieren (Costa *et al.*, 2005), wohingegen Tex12 nur an SYCE2 binden kann (Hamer *et al.*, 2006). In *Syce1*^{-/-} Spermatozyten kolokalisieren SYCE2 und Tex12 in distinkten Foci zwischen eng gepaart vorliegenden Chromosomenachsen. In diesen Zellen bilden sich die AEs in wildtypischer Weise aus und die Paarung der homologen Chromosomen ist nicht beeinträchtigt. Allerdings bilden sich keine CE-ähnlichen Strukturen aus, was bedeutet, dass in diesen Zellen keine Synapse der Homologen stattfindet (Bolcun-Filas *et al.*, 2009). Auch in *Syce2*^{-/-} und *Tex12*^{-/-} Spermatozyten ist die Synapse der Homologen gestört, allerdings können hier im Elektronenmikroskop CE-ähnliche Strukturen detektiert werden. An diesen Stellen, an denen die chromosomalen Achsen näher beieinander liegen, kolokalisieren SYCE1 und SYCP1 in distinkten Foci (Bolcun-Filas *et al.*, 2007; Hamer *et al.*, 2008). Diese Ergebnisse erlaubten es folgendes Model für das Assembly des CE zu postuliert: SYCP1 bildet ein molekulares Grundgerüst aus, an das sich SYCE1 und SYCE2 anlagern können (Costa *et al.*, 2005; Öllinger *et al.*, 2005). Hierbei stabilisiert SYCE1 durch die Bindung an SYCP1 die Interaktion der SYCP1 N-Termini (Bolcun-Filas *et al.*, 2009). Diese stabilisierten Assoziationen ermöglichen die Ausbildung eines dreidimensionalen SYCP1 Filament-Netzwerkes und regulieren so die Dicke des SC. An diesen Stellen stabiler Assoziation können SYCE2 und Tex 12 mit SYCE1 und SYCP1 interagieren. Schließlich können SYCE2 und Tex12 durch diese Interaktion die Synapse entlang der Homologen ausbreiten, indem sie die einzelnen SYCP1/SYCE1 Komplexe longitudinal miteinander verbinden (Bolcun-Filas *et al.*, 2007; Hamer *et al.*, 2008).

Zusammengefasst lassen die Ergebnisse aller bisher untersuchten Mutanten der Proteine des CE drei Schlüsse zu: (1) die Organisation des CE ist hoch komplex, (2) das Fehlen jedes dieser Proteine führt zur Unfruchtbarkeit beider Geschlechter und (3) obwohl die Phänotypen aller CE-Protein Knockout Mäuse ähnlich sind, können zwei Untergruppen gebildet werden. Die eine beinhaltet SYCE1 und SYCP1 und ist durch eine gestörte Initiation der Synapse (vollständiges Fehlen von CE-ähnlichen Strukturen) charakterisiert. In der anderen sind SYCE2 und Tex12 enthalten, bei deren Fehlen die Synapse zwar initiiert werden kann, aber die Ausbreitung der Synapse entlang der Homologen gestört ist (kurze CE-ähnliche Strukturen vorhanden).

Aber welche Rolle spielt SYCE3 für das CE und die Synapse? Um zu untersuchen, ob SYCE3 möglicherweise an der Initiation oder der Elongation der Synapse beteiligt ist, wurden *Syce3*^{-/-} Spermatozyten elektronenmikroskopisch untersucht. In diesen Zellen konnte kein CE oder keine CE-ähnliche Struktur detektiert werden (siehe Abbildung 2-27). Diese Beobachtungen weisen deutlich darauf hin, dass SYCE3, wie SYCE1, an der Initiation der Synapse beteiligt ist. Dies steht in Einklang mit Ergebnisse aus Immunfluoreszenz Analyse mit SYCE3 und SYCE1 beziehungsweise SYCE3 und SYCE2. Diese zeigen, dass SYCE3 vollständig mit SYCE1 kolokalisiert, allerdings im Vergleich zu SYCE2 ein leicht verändertes Verteilungsmuster aufweist (siehe Abbildung 2-11). Diese Ergebnisse bekräftigen die Zugehörigkeit von SYCE3 zu der Untergruppe von CE-Proteinen, die SYCE1 und SYCP1 beinhaltet und deren Fehlen durch eine gestörte Initiation der Synapse gekennzeichnet ist.

Als nächstes sollte in der vorliegenden Arbeit die Frage geklärt werden, welche Rolle SYCE3 für die Initiation der Synapse spielt. Hierzu wurden Immunfluoreszenz Analysen von SYCE3 auf unterschiedlichen Knockout-Spermatocyten durchgeführt (siehe 2.1.7). Die Immunfluoreszenz Aufnahmen von *Sycp1*^{-/-} Spermatocyten - markiert mit SYCE3 - konnten klar beweisen, dass die Anlagerung von SYCE3 an die chromosomalen Achsen von SYCP1 abhängig ist, da SYCE3 in diesen Zellen abwesend war (siehe Abbildung 2-12, A). Dies stimmt mit der Vorstellung überein, dass SYCP1 als molekulares Gerüst dient, an das sich die anderen CE-Proteine anlagern können (Costa *et al.*, 2005; Öllinger *et al.*, 2005). Fehlt dieses Gerüst, führt dies zu einer Mislokalisierung aller bisher bekannten Proteine des CE (Hamer *et al.*, 2006). Anders hingegen verhält es sich bei Zellen, in denen die Proteine SYCP3, SYCE1 oder SYCE2 fehlen: SYCP3 defiziente Zellen können zwar keine wildtypischen AEs/LEs ausbilden, dennoch können sich in diesen Zellen SC-ähnliche Strukturen assemblieren, in denen SYCP1 nachzuweisen ist (Yuan *et al.*, 2000, 2002; Liebe *et al.*, 2004). Die Lokalisation von SYCE3 in *Sycp3*^{-/-} Spermatocyten spiegelt die Verteilung von SYCP1 auf den kurzen SC-ähnlichen Strukturen wider (siehe Abbildung 2-12, B). In *Syce1*^{-/-} Spermatocyten lokalisiert SYCE3 in einem punktuellen Muster auf den gepaarten Achsen, egal ob diese eng beieinander liegen oder nicht (siehe Abbildung 2-12, C). Dieses Verteilungsmuster erinnert stark an das von SYCP1 in *Syce1*^{-/-} Zellen. Auch SYCP1 lokalisiert in diesen Zellen in einem schwachen diskontinuierlichen Muster auf den Achsen, unabhängig davon, wie weit die gepaarten Achsen voneinander entfernt sind (Bolcun-Filas *et al.*, 2009). Auch in *Syce2*^{-/-} Spermatocyten konnte SYCE3 an die gepaarten AEs binden. In diesen Zellen ist SYCE3 in distinkten Foci an den Stellen der Achsen lokalisiert, die in engem räumlichem Kontakt zueinander stehen (siehe Abbildung 2-12, D). Auch diese Verteilung ähnelt der von SYCP1 beziehungsweise SYCE1 in diesen Knockout Zellen (siehe Bolcun-Filas *et al.*, 2007). Aus diesen Beobachtungen können zwei Schlussfolgerungen gezogen werden: (1) die Rekrutierung von SYCE3 an die AEs ist unabhängig von SYCP3, SYCE1 und SYCE2, aber abhängig von SYCP1; (2) in Knockoutzellen von SYCP1, SYCP3, SYCE1 und SYCE2 weisen SYCE3 und SYCP1 (beziehungsweise SYCE1) ein ähnliches Verteilungsmuster auf, was nochmals die im vorherigen Abschnitt beschriebene Zugehörigkeit von SYCE3 zu der von SYCE1 und SYCP1 gebildeten Untergruppe von CE-Proteinen bestätigt.

Betrachtet man das Assembly des CE in einem zeitlichen Kontext, so lassen diese Ergebnisse den Rückschluss zu, dass SYCE3 zu einem früheren Zeitpunkt als SYCE1, SYCE2 und Tex12 in das CE eingebaut wird (also „upstream“ agiert) und daher ein Fehlen dieser Proteine die Rekrutierung vom SYCE3 an die AEs nicht verhindert. Eine andere Möglichkeit warum das Fehlen von SYCE1 und SYCE2 die Rekrutierung von SYCE3 an die AEs nicht beeinflusst, wäre sicherlich auch, dass SYCE3 über einen unabhängigen Mechanismus ans CE rekrutiert wird und somit nicht in den bisher beschriebenen CE-Komplex involviert ist.

Eine Möglichkeit diese Frage zu beantworten, war es die Bindungseigenschaften von SYCE3 mit den anderen Proteinen des CE zu untersuchen. Würde man eine Bindung zwischen diesen Proteinen nachweisen können, würde dies zusammen mit der Achsenlokalisierung von SYCE3 in *Sycp1*^{-/-} und *Sycp2*^{-/-} Mäusen darauf hindeuten, dass SYCE3 „upstream“ im SC Assembly Prozess agiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies anhand einer IP im heterologen System und Koexpressionsstudien in COS-7 Zellen durchgeführt. In der IP aus doppeltransfizierten COS-7 Zellextrakten konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass myc-SYCE3 und EGFP-SYCE1 sich gegenseitig präzipitieren lassen (Abbildung 2-30). Hierzu wurden die Immunkomplexe entweder mit einem anti-myc- oder einem anti-EGFP-spezifischen Antikörper gefischt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur mit

dem Beuteprotein transfiziert waren. Dieser Versuch zeigte eindeutig, dass SYCE3 und SYCE1 unter diesen Umständen miteinander interagieren können und somit SYCE3 Bestandteil des CE ist. Auch eine Bindung zwischen SYCE3 und SYCE2 konnte unter diesen experimentellen Bedingungen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 2-31), was die Zugehörigkeit von SYCE3 zu dem bereits beschriebenen Proteinkomplexes im CE des SC bestätigt. Für Tex12, SYCP1 N-Term und SYCP1 C-Term konnte unter diesen Bedingungen keine Interaktion mit SYCE3 festgestellt werden (siehe Abbildung 2-32). Dieses Fehlen von Interaktion bestätigt die Spezifität der für SYCE1 und SYCE2 gezeigten Interaktion mit SYCE3. Um die Bindungsverhältnisse zwischen SYCE3 und wildtypischem SYCP1-Gesamtprotein zu untersuchen, wurden Koexpressionsstudien in COS-7 Zellen durchgeführt. Hierzu wurde EGFP markiertes SYCE3 und wildtypisches SYCP1 in COS7 Zellen koexprimiert. Exprimiert man SYCP1 in somatischen Zellen, so kann es trotz der Abwesenheit anderer meiosespezifischer Proteine Strukturen höherer Ordnung, sogenannte Polykomplexe, ausbilden (Öllinger *et al.*, 2005 und Abbildung 2-34, B). In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass diese Strukturen in der Lage sind, meiotische Bindungspartner zu rekrutieren und dadurch deren Verteilungsmuster in COS-7 verändern können (Costa *et al.*, 2005). Beobachtet man die Verteilung von EGFP-SYCE3 in transfizierten Zellen, so sieht man, dass EGFP-SYCE3 homogen über die ganze Zelle verteilt vorliegt (siehe Abbildung 2-34, A). Diese homogene Verteilung ändert sich allerdings in mit SYCP1 und EGFP-SYCE3 doppeltransfizierten Zellen. Hier wird SYCE3 an die von SYCP1 gebildeten Polykomplexe rekrutiert (Abbildung 2-34, C), was eine Interaktion zwischen SYCE3 und SYCP1 vermuten lässt. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der Hypothese, dass SYCP1 als molekulares Gerüst dient, an das sich die anderen Proteine des CE-Komplexes anlagern (Costa *et al.*, 2005; Öllinger *et al.*, 2005). Die Tatsache, dass die Interaktion von SYCE3 und SYCP1 nur bei den Koexpressionsstudien und nicht bei der IP im heterologen System nachgewiesen werden konnte, könnte daran liegen, dass für diese Interaktion SYCP1 in höher-organisierten Strukturen vorliegen muss. Da die IP im heterologen System jeweils nur mit dem N-Terminus oder dem C-Terminus durchgeführt wurde und so bei beiden Konstrukten die für die Protein-Protein Interaktion wichtige zentrale Coiled-Coil Domäne fehlte, konnten sich in diesen Zellen eventuell keine höher-organisierten Strukturen ausbilden (Liu *et al.*, 1996). Zusammengefasst konnten die Bindungsstudien im Rahmen dieser Arbeit eine Interaktion von SYCE3 mit SYCE1, SYCE2 und SYCP1 zeigen. Diese Interaktion von SYCE3 mit drei der vier bekannten Proteine des beschriebenen CE-Proteinkomplexes, untermauert die Auffassung, dass SYCE3 durch den gleichen Mechanismus ans CE rekrutiert wird, wie die anderen CE-Proteine. Betrachtet man die axiale Lokalisation von SYCE3 in *Syce1* und *Syce2* defizienten Spermatozyten in diesem Kontext, so bekräftigen die Ergebnisse aus den Bindungsstudien die Annahme, dass SYCE3 im Assembly Prozess des CE „upstream“ von SYCE1 und dem SYCE2/Tex12 Komplex agiert.

Diese Hierarchie im Assembly Prozess des SC wurde in unserer Arbeitsgruppe mit der Lokalisation von SYCE1 und SYCE2 auf *Syce3* Knockout Zellen bestätigt (Fraune, 2010, Schramm *et al.*, 2011). Würde SYCE3 wirklich in der Hierarchie des CE Assemblys oberhalb von SYCE1 und SYCE2 liegen, so könnten diese beiden Proteine in der Abwesenheit von SYCE3 nicht an die Achsen rekrutiert werden. Und tatsächlich konnte in *Syce3*^{-/-} Zellen für SYCE1 und SYCE2 keine Fluoreszenz auf den chromosomalen Achsen detektiert werden (Fraune, 2010, Schramm *et al.*, 2011), was zeigt, dass SYCE3 für die Rekrutierung von SYCE1 und SYCE2 an die chromosomalen Achsen essentiell ist. Somit unterstützt und bekräftigt dieser Versuche die These, dass SYCE3 „upstream“ der anderen bekannten Proteine im Assembly Prozess des CE agiert und ein Fehlen von SYCE3 demnach die darauffolgenden Schritte des CE Assembly verhindert.

Durch die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Rolle von SYCE3 im Assembly Prozess des SC und Erkenntnisse aus Untersuchungen verschiedener Knockout Mausmodelle kann ein neues Model des SC Assembly postuliert werden (siehe Abbildung 3-1): Hierbei beginnt das Assembly mit der Ausbildung der AEs durch die Assoziation von SYCP2 und SYCP3 an das Chromatin. Diese Assoziation ist unabhängig von SYCP1, wie in der *Sycp1*^{-/-} Maus gezeigt wurde (de Vries *et al.*, 2005). In einem zweiten Schritt lagern sich die C-Termini von SYCP1 Homodimeren an die zuvor gebildeten AEs an. Die Interaktion von SYCP1 mit den Axialelementen erfordert kein wildtypisches CE, da SYCP1 auch in Abwesenheit von SYCE3 (und damit in Abwesenheit von CE-ähnlichen Strukturen) an die chromosomalen Achsen binden kann. Im dritten Schritt des SC Assembly kann sich SYCE3 an die Achsen anlagern. Da es in wildtypischen Zellen im CE lokalisiert, interagiert SYCE3 hier wahrscheinlich mit den N-Termini von SYCP1 Homodimeren. Diese Interaktion könnte die N-Termini der SYCP1 Homodimere gleichzeitig so modifizieren, dass diese nun im vierten Schritt des SC Assembly SYCE1

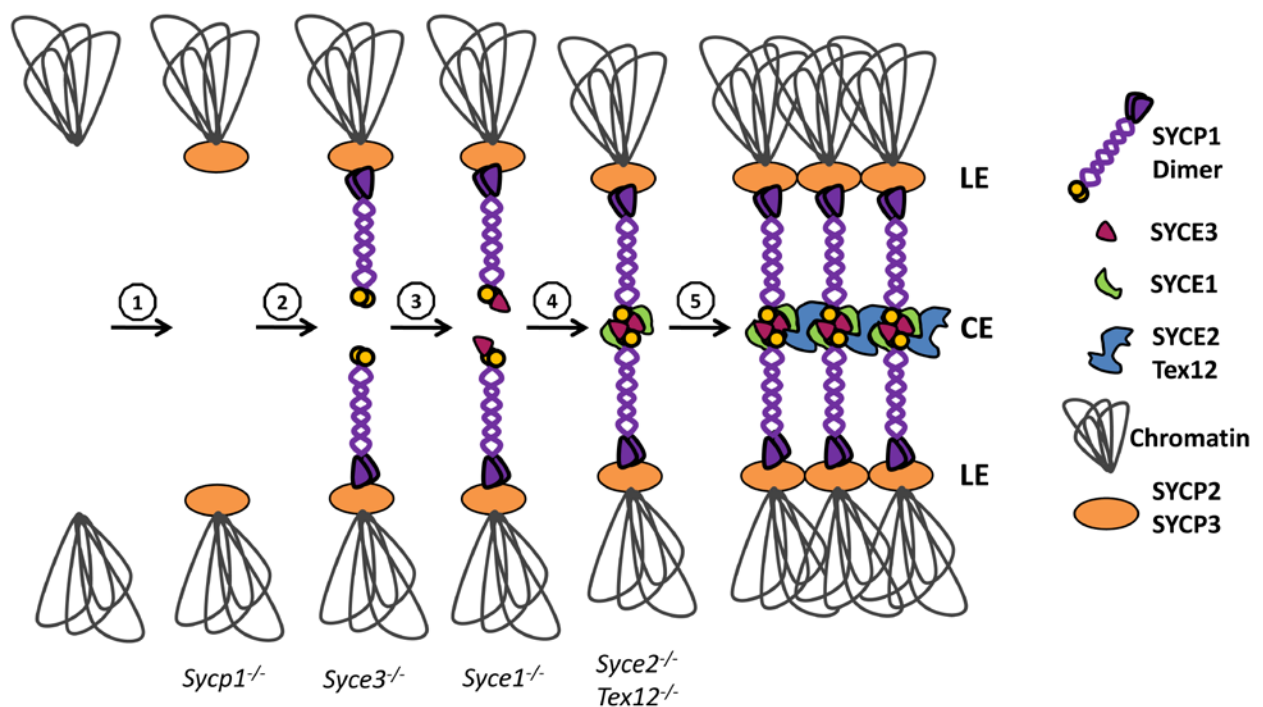


Abbildung 3-1: Model des Assembly Prozesses der CR basierend auf Studien an verschiedenen Knockout Mausmodellen einschließlich der *Syce3* Knockout Maus. Zu Beginn des SC Assembly lagern sich SYCP2 und SYCP3 an das Chromatin und bilden die Axialelemente aus. Für diesen ersten Schritt sind SYCP1 und die anderen CE-spezifischen Proteine nicht essentiell (de Vries *et al.*, 2005; Bolcun-Filas *et al.*, 2007, 2009; Hamer *et al.*, 2008; Schramm *et al.*, 2011). Im zweiten Schritt lagern sich SYCP1 Homodimere mit ihren C-Termini an die zuvor ausgebildeten Axialelemente, wobei die N-Termini gegenüberliegender SYCP1 Moleküle nicht miteinander interagieren müssen. Dies kann man in *Syce3* defizienten Zellen beobachten, in denen SYCP1 auch an Bereiche der chromosomalen Achsen angelagert ist, die sich nicht in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander befinden. Im dritten Assembly-Schritt bindet SYCE3 an die chromosomalen Achsen. SYCE3 assoziiert auch mit den Achsen, wenn SYCE1, SYCE2 und Tex12 fehlen und kein wildtypisches CE ausgebildet werden kann. In diesen Zellen spiegelt es die Lokalisation von SYCP1 wider. Da SYCE3 in wildtypischen Zellen im Zentralelement lokalisiert, ist es wahrscheinlich, dass es entweder direkt oder indirekt mit den N-Termini von SYCP1 interagieren kann. Durch diese Interaktion könnten die SYCP1 N-Termini so modifiziert werden, dass SYCE1 in einem vierten Assembly-Schritt an diese binden kann und die Kopf-an-Kopf Interaktion von sich gegenüberliegenden SYCP1 Homodimeren stabilisiert werden (Bolcun-Filas *et al.*, 2007; Schramm *et al.*, 2011). Dies wird als Initiation der Synapse definiert und kann in *Syce2*^{-/-} und *Tex12*^{-/-} Zellen beobachtet werden. Im fünften und letzten Schritt des SC Assembly muss die Synapse schließlich über die chromosomalen Achsen ausgebreitet werden. Für diese Elongation der Synapse ist eine „Maturation“ des Zentralelements nötig, die durch SYCE2 und Tex12 vermittelt wird (Bolcun-Filas *et al.*, 2007; Hamer *et al.*, 2008). Dabei sollen SYCE2 und Tex12 in wildtypischen Zellen nebeneinanderliegende SYCP1 Homodimere verbinden und so die CR über die Achsen ausbreiten (Bolcun-Filas *et al.*, 2007; Hamer *et al.*, 2008). (LE) Lateralelement, (CE) Zentralelement.

rekrutieren können. Mit anderen Worten könnte durch die Interaktion von SYCE3 mit SYCP1 eine Anlagerung von SYCE1 an das CE ermöglicht werden. Wie in vorausgegangenen Arbeiten beschrieben, soll SYCE1 dabei die N-terminale Assoziation von SYCP1 Homodimere stabilisieren (Bolcun-Filas *et al.*, 2007, 2009). Dieser Zustand wird als Initiation der Synapse definiert und kann in *Syce2*^{-/-} und *Tex12*^{-/-} Spermatozyten beobachtet werden. Im fünften und letzten Schritt des SC Assembly wird die Synapse schließlich entlang der chromosomalen Achsen ausgebreitet. Für eine Elongation der Synapse über die Initiationsstellen hinaus wird der Komplex aus SYCE2 und Tex12 benötigt. Dieser Komplex kann nur an das CE binden, wenn SYCP1 und SYCE3 bereits im CE angelagert sind. Durch diese Interaktion mit dem CE können SYCE2 und Tex12 die laterale Aneinanderreihung der SYCP1 Moleküle stabilisieren und so entscheidend dazu beitragen, dass die Synapse - von den Initiationsstellen ausgehend - die homologen Chromosomen wie ein Reißverschluss über ihre gesamte Länge miteinander verbinden kann.

3.3 SYCE3 wird für das Fortschreiten der homologen Rekombination benötigt

Die molekularen Mechanismen der meiotischen Rekombination wurden sehr detailliert in *S. cerevisiae* untersucht (Hunter, 2007) und viele der hier gefundenen Merkmale sind auch in höheren Eukaryoten konserviert (Handel & Schimenti, 2010). In Säugern wird die homologe Rekombination – wie in *S. cerevisiae* – durch das Einfügen von DNA Doppelstrangbrüchen (DSBs) initiiert. Dies geschieht im Leptotän durch das Topoisomerase-ähnliche Enzym SPO11 und noch mindestens zwei assoziierte Proteine (Kumar *et al.*, 2010). Die so entstandenen Enden der DNA werden auf beiden Seiten des Bruchs so prozessiert, dass DNA Moleküle mit 3' Überhängen entstehen. An diese 3' Überhänge können sich die Proteine DMC1 und/oder Rad51 anlagern, die die Stranginversion durchführen (für eine Übersicht, siehe Yanowitz, 2010). Hierbei bildet der 3' Überhang mit einem homologen Bereich auf einem intakten nicht-Schwesterchromatid des homologen Chromosoms eine D-Loop Struktur aus. Dieser 3' Überhang wird nun durch DNA Synthese verlängert, wobei der invasive Strang als Template dient. Von diesem Punkt aus gibt es zwei unterschiedliche Wege: Während des ersten Reaktionsweges wird die Struktur durch „Synthese-abhängiges Strang Annealing“ prozessiert, was zu Genkonversion führt und als non-Crossing-over (NCO) bezeichnet wird (die molekularen Strukturen, die bei diesem Weg gebildet werden, sind allerdings noch unklar). Der andere Weg ist die DSB Reparatur, die die Ausbildung von doppel Holliday-Strukturen (double holliday junctions, dHJs) zur Folge hat und in Crossing-over Strukturen (COs) aufgelöst wird (Kumar & de Massy, 2010). Eine doppel Holliday-Struktur bildet sich dann aus, wenn sich der verdrängte Strang an den nach der Stranginversion noch freien 3' Überhang anlagert, dieser durch DNA Synthese verlängert und schließlich an das freie Ende ligiert wird. Molekulare essentielle Komponenten für die Ausbildung von dHJs sind in Säugern die Proteine RPA und Msh4 (Ross-Macdonald & Roeder, 1994). Diese lagern sich im Zygotän an DMC1 und Rad51 gebundenen DSBs an. Die Anzahl an DMC1/Rad51 Foci in Leptotän-Spermatocyten der Maus korreliert hierbei mit der Anzahl an DSBs und liegt bei ungefähr 300 (Moens *et al.*, 2002). Rad51 und DMC1 werden ungefähr zeitgleich mit Initiation der Synapse durch Msh4 und RPA ersetzt (Moens *et al.*, 2002). Msh4 Foci sind dabei nur auf Bereichen der chromosomalen Achsen lokalisiert, die bereits über TFs miteinander verbunden sind, beziehungsweise werden Msh4 Foci auch in der Synapsis-Gabel gefunden (Moens *et al.*, 2002; de Vries *et al.*, 2005). Im Zygotän dekorieren etwa 200 RPA/Msh4 Foci die Chromosomenachsen einer Spermatocyte (Moens *et al.*, 2002). Zur Ausbildung von COs ist die Rekrutierung von MLH1 und MLH3 an die Msh4 Foci notwendig. Im Gegensatz zur Hefe entwickeln sich bei Säugern allerdings nicht aus allen Msh4 Foci spätere COs: Nur etwa 10-15% dieser Foci (also ca. 20-25 pro Zelle) rekrutieren MLH1 (de Boer & Heyting, 2006). Die MLH1 enthaltenden Foci sind bei der Maus für ungefähr 90% aller COs verantwortlich (de Boer & Heyting, 2006), werden als Klasse I COs bezeichnet und zeigen Interferenz.

Diese verschiedenen, eben beschriebenen Foci konnten schon früher unter dem Elektronenmikroskop beobachtet werden. Aufgrund ihrer zeitlichen Erscheinung während der Prophase I und auch anhand deren molekularer Komposition wurden diese in drei Kategorien eingeteilt: frühe Rekombinationsknoten (early nodules, ENs) (Albini & Jones, 1987; Barlow *et al.*, 1997), Transitionsknoten (transition nodules, TNs) (Moens *et al.*, 2002) und Rekombinationsknoten (recombination nodules, RNs) (Carpenter, 1975). ENs enthalten die Rekombinationsproteine DMC1 und Rad51 und werden im Zygotän sukzessive in TNs umgewandelt (Moens *et al.*, 2002). Als

molekulare Marker für TNs dienen Msh4 und RPA (Moens *et al.*, 2002). RNs hingegen sind durch die Anwesenheit von MLH1 charakterisiert und können vom mittleren Pachytän bis ins späte Pachytän beobachtet werden (Moens *et al.*, 2002). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass RNs eng mit der Oberfläche des CE verbunden sind und die komplette Breite der CR bis zu deren äußeren lateralen Randes besetzen (Schmekel & Daneholt, 1998).

Aus diesen Gründen ist es nicht verwunderlich, dass das Assembly des SC und die homologe Rekombination voneinander abhängige Prozesse sind. In Mäusen, denen das für die Induktion von DNA Doppelstrangbrüchen (DSBs) verantwortliche Protein SPO11 fehlt, ist die Ausbildung des SC stark eingeschränkt oder er bildet sich zwischen nicht homologen Chromosomen aus (Baudat *et al.*, 2000; Romanienko & Camerini-Otero, 2000). Auf der anderen Seite wurde in *S. cerevisiae* gezeigt, dass die Ausbildung von Klasse I COs von dem Transversalfilamentprotein Zip1 (und den ZMM Proteinen) abhängig ist (Börner *et al.*, 2004). Auch in Mäusen ist die Ausbildung dieser COs abhängig von der Hauptkomponente der TFs: Erstens konnte gezeigt werden, dass *Sycp1*^{-/-} Mäuse keine MLH3 und MLH1 Foci ausbilden können (de Vries *et al.*, 2005), obwohl ein geringer Teil der Spermatozyten bis ins späte Pachytän überlebt, in dem in wildtypischen Zellen MLH1 detektiert werden kann (Moens *et al.*, 2002). Zweitens bilden *Sycp1*^{-/-} Spermatozyten, die bis ins Diplotän überleben, keine Chiasmata aus (de Vries *et al.*, 2005). Eine interessante Beobachtung ist sicherlich, dass der Knockout des AE Proteins SYCP3 zumindest in Weibchen die Ausbildung von COs nicht verhindert (Yuan *et al.*, 2002) und sich auch in der Abwesenheit von SYCP3 sowohl in Spermatozyten als auch in Oocyten CE-ähnliche Strukturen ausbilden können (siehe Liebe *et al.*, 2004 und Abbildung 2-12). Dies zeigt deutlich, dass die Progression der homologen Rekombination nicht von den AEs, sondern vom CE abhängig ist. Diese essentielle Rolle des CE für die meiotische Rekombination wird zudem am Rekombinations-Phänotyp der anderen Knockout Mausmodelle des CE deutlich: Sowohl bei *Syce1*, also auch *Syce2* und *Tex12* Knockout Mäusen läuft die Initiation der Rekombination in wildtypischer Weise ab. Der weitere Verlauf der homologen Rekombination ist in diesen Mäusen allerdings gestört, was in einem Fehlen von COs in diesen Tieren resultiert (de Vries *et al.*, 2005; Bolcun-Filas *et al.*, 2007, 2009; Hamer *et al.*, 2008). Eine zusätzliche interessante Beobachtung ist, dass SYCE2 und SYCP1 mit der Rekombinase Rad51 interagieren können (Tarsounas *et al.*, 1999b; Bolcun-Filas *et al.*, 2009;).

In diesem Abschnitt soll nun die Folge des *Syce3* Knockouts auf die homologe Rekombination erörtert werden. Untersucht wurde die Ausbildung von frühen, mittleren und späten Rekombinationsereignissen. Um auch die späten Rekombinationsereignisse, also die Ausbildung von COs zu untersuchen, wurden alle Analysen in dieser Arbeit auf embryonalen Oocyten (19,5 dpc) durchgeführt. Diese erreichen - wahrscheinlich aufgrund von weniger stringenten Meiose-Checkpoints - im Gegensatz zu *Syce3*^{-/-} Spermatozyten (Apoptose im Pachytän: siehe Abbildung 2-25) mindestens ein spätes Pachytän-ähnliches Stadium, in dem sich in wildtypischen Tieren die COs ausbilden. Frühe Rekombinationsereignisse, also das Einfügen von DSBs in die DNA, wurde indirekt über eine Markierung mit γ H2AX untersucht. Das Histon H2AX wird spezifisch an Stellen des Chromatins phosphoryliert, an die durch Spo11 induzierte DSBs eingefügt wurden (Mahadevaiah *et al.*, 2001). γ H2AX persistiert in wildtypischen Zellen so lange auf den Achsen, bis die Stranginversion vollendet ist, die Synapse zwischen den Homologen initiiert wird und die DSBs repariert werden (Mahadevaiah *et al.*, 2001). Auch in *Syce3*^{-/-} Pachytän-Oocyten kann γ H2AX detektiert werden (siehe Abbildung 2-28), was beweist, dass DNA DSBs in *Syce3*^{-/-} Oocyten eingefügt werden können und somit die Initiation der meiotischen Rekombination nicht gestört ist. Allerdings zeigt γ H2AX eine

veränderte Dynamik im Vergleich zum Wildtyp: In *Syce3*^{-/-} Oocyten persistiert γ H2AX bis in Pachytän-ähnliche Stadien auf den ungepaarten Achsen (siehe Abbildung 2-28), wohingegen in wildtypischen Pachytän-Oocyten γ H2AX nur noch an den Stellen der DNA lokalisiert ist, die zukünftige COs repräsentieren (siehe Abbildung 2-28 und Scherthan *et al.*, 2010). Auch die weitere Prozessierung der frühen Rekombinationsereignisse scheint in *Syce3*^{-/-} Oocyten nicht gestört zu sein, was in Abbildung 2-28 mit der Lokalisation von RPA gezeigt wurde. RPA kann in *Syce3*^{-/-} Tieren auf die Achsen rekrutiert werden. Dennoch zeigt sich auch im Falle von RPA eine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Dynamik der RPA Foci. Nehmen diese in wildtypischen Zellen im Pachytän ab (Abbildung 2-28 und Moens *et al.*, 2002), so bleiben sie in *Syce3*^{-/-} Oocyten bis in Pachytän-ähnliche Stadien zahlreich mit den Achsen assoziiert (Abbildung 2-28 A, B). Dies deutet auf eine fehlerhafte Prozessierung der Rekombinationsereignisse in *Syce3*^{-/-} Oocyten hin. Abschließend wurde die Fähigkeit von *Syce3*^{-/-} Oocyten untersucht, COs auszubilden. Die Doppellokalisierung von MLH1 und SYCP3 konnte zeigen, dass *Syce3*^{-/-} Pachytän-Oocyten nicht in der Lage sind, MLH1 auf die Achsen zu rekrutieren (Abbildung 2-28 A, B), was den Rückschluss zulässt, dass die Ausbildung von COs in *Syce3* defizienten Oocyten defekt ist. Zusammengefasst kann also postuliert werden, dass SYCE3 keinen Einfluss auf die Initiation der homologen Rekombination hat, aber essentiell für den weiteren Ablauf der Rekombination ist. Was aber könnte diesen Rekombinationsphänotyp auslösen?

Für die erste Erklärungsmöglichkeit wird der SC - und hier besonders das CE - als proteinöse Plattform angesehen, an die sich die Rekombinationsknoten anlagern können. Die These, dass der SC eine Protein-Plattform für Rekombinationsknoten bildet, kann mit Ergebnissen von Schmekel und Daneholt (1998) bestärkt werden: Schmekel und Kollegen konnten zeigen, dass RNs eng mit der Oberfläche des CE (und über Fibrillen auch mit den AEs) verbunden sind. Weitere molekularbiologische Hinweise darauf, dass der SC und besonders das CE als Plattform für die Anlagerung von Rekombinationsknoten dienen, wurden mit der Aufklärung der Bindungspartner von Rad51 geliefert. Rad51 interagiert sowohl mit SYCP3 und SYCP1 (Tarsounas *et al.*, 1999b) als auch mit dem CE-spezifische Protein SYCE2 (Bolcun-Filas *et al.*, 2009). Geht man nun davon aus, dass das CE als proteinöse Plattform dient, an die sich die Rekombinationsproteine anlagern können, ist es nicht verwunderlich, dass in *Syce3* defizienten Zellen die Progression der Rekombination verändert beziehungsweise gestört ist. Dadurch, dass SYCE3 „upstream“ im Assembly Prozess des CE agiert (siehe Abbildung 2-12) und so in *Syce3* defizienten Zellen weder SYCE1 noch SYCE2 oder Tex12 an die chromosomalen Achsen rekrutiert werden können (Fraune, 2010; Schramm *et al.*, 2011), ist die Ausbildung einer intakten Plattform in diesen Zellen nicht möglich. Dies könnte die Dynamik und auch die Funktionalität von Proteinen verändern, die für die DNA DSB Reparatur zuständig sind. So könnte eventuell die Bindung (und damit auch die Funktionalität) des RPA/Msh4 Komplexes an die Achsen verändert sein, was eine fehlerhafte Reparatur der DNA DSBs zur Folge haben könnte. Dies könnte auch das Ausbleiben von COs in *Syce3*^{-/-} Tieren erklären, da die Hauptaufgabe des RPA/Msh4 Komplexes in der Ausbildung von dHJs liegt, die essentiell für Klasse I COs sind. Diese Beobachtung bestätigt und erweitert die oben genannte Hypothese dahingehend, dass dem CE des SC nicht nur eine strukturelle Funktion als Plattform, sondern eventuell auch eine regulatorische Funktion für die homologe Rekombination zugewiesen werden könnte. Für einen endgültigen Beweis müssten allerdings noch weitere Versuche durchgeführt werden.

Die zweite Erklärungsmöglichkeit wurde von Börner 2004 mit dem mechanischen Model aufgestellt (Börner *et al.*, 2004). Dieses Model besagt, dass der voll ausgebildete SC im Pachytän eventuell die Prozessierung von D-Loop Strukturen (Stranginversion) zu doppel Holliday-Strukturen begünstigt.

Hierbei sollen die Chromatin-Schleifen eine mechanische Kraft auf den SC ausüben, die den SC dazu veranlasst, dass er sich um die eigene Achse dreht. Die Kräfte, die sich innerhalb des SC während dieser „Verdrillung“ aufbauen, sind an den Stellen am stärksten, an denen die DNA durch DSBs gebrochen ist, also folglich an den Stellen, an denen die Rekombinationskomplexe sitzen. Durch diese lokalen Kräfte könnten die Rekombinationskomplexe lokale Veränderungen hervorrufen und außerdem die Achsen näher zusammenrücken, was die Ausbildung der dHJ ermöglichen könnte (Börner *et al.*, 2004). Betrachtet man den *Syce3* Knockout im Kontext dieses Modells, so kann die fehlerhafte Progression der homologen Rekombination dadurch erklärt werden, dass sich in *Syce3*^{-/-} Zellen keine Synapse ausbilden kann (siehe Abbildung 2-26). Somit können die Kräfte, die durch die Expansion der Chromatin-Schleifen hervorgerufen werden, nicht aufgebaut werden und lokale Veränderungen durch die Rekombinationskomplexe nicht stattfinden. Eventuell persistieren daher RPA enthaltende Foci länger auf den Achsen. Auch das Ausbleiben von COs könnte mit diesem Modell erklärt werden, da durch das Fehlen des CE und die daraus fehlende Ausübung von Kraft auf die Stellen der DNA, an denen die Rekombinationskomplexe sitzen, die Ausbildung von dHJs ausbleiben würde, die eine Voraussetzung für COs sind.

Beide Erklärungsmöglichkeiten zeigen eindeutig die bedeutende Rolle des CE für die homologe Rekombination. Der SC ist von entscheidender Bedeutung für die homologe Rekombination und somit letztendlich für die Fruchtbarkeit von Organismen. Mit SYCE3 konnte in dieser Arbeit ein neues Protein charakterisiert werden, das essentiell für die Ausbildung dieser wichtigen Struktur ist.

4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit liefert fundierte Erkenntnisse zu grundsätzlichen Fragestellungen hinsichtlich des SC Assembly und des Zusammenspiels zwischen dem SC und der homologen Rekombination. Darüber hinaus führen die hier gezeigten Daten und die daraus abgeleiteten Modelle zu neuen interessanten Fragen und möglichen experimentellen Ansätzen für zukünftige Studien.

Mit SYCE3 konnte eine neue, essentielle Komponente des SC charakterisiert und ein neues, präziseres Modell des SC Assembly aufgestellt werden. Details über die regulatorischen Mechanismen des SC Assembly sowie eine eventuelle Rolle von SYCE3 in diesem Prozess wurden allerdings nicht untersucht. Die Tatsache, dass SYCE3 über putative Phosphorylierungsstellen verfügt und in früheren Arbeiten ein Zusammenhang zwischen dem Phosphorylierungszustand von SYCP1 beziehungsweise SYCP3 und der Regulation des SC Assembly postuliert wurde (Tarsounas *et al.*, 1999a), legt den Verdacht einer regulatorischen Funktion von SYCE3 für das SC Assembly nahe. Um diese Frage zu klären müsste man untersuchen, ob die putativen Phosphorylierungsstellen im SYCE3 Protein tatsächlich funktionelle Zielstellen für Kinasen und/oder Phosphatasen sind. Dazu stehen etablierte Protokolle für Untersuchungen in Zelllysaten von Pachytän-Spermatocyten zur Verfügung. Sollten die Phosphorylierungsstellen im SYCE3 Protein tatsächlich funktionell sein, könnte man in weiterführenden Versuchsansätzen zudem die Abhängigkeit der Interaktion von SYCE3 mit den anderen CE-Proteinen und SYCP1 vom Phosphorylierungszustand des SYCE3 Proteins untersuchen. Experimentell könnte dies zum Beispiel durch „Pull-Down“ Analysen mit phosphoryliertem und nichtphosphoryliertem SYCE3 und den anderen Proteinen des CE getestet werden.

Da in dieser Arbeit eine Interaktion zwischen wildtypischem SYCP1 und SYCE3 postuliert werden konnte, wären zusätzliche Bindungsstudien, die die Bindungsdomäne von SYCE3 im SYCP1 Molekül exakt definieren, sinnvoll. So könnte das in dieser Arbeit neu aufgestellte Modell des SC Assembly noch um wichtige Details erweitert werden. Hierzu würde sich das Hefe „Two-Hybrid“-System oder ein Pull-Down Assay mit in vitro translatierten Proteinen aus einem TNT®-System (Promega) eignen. Experimentell werden beide Ansätze bereits in der Arbeitsgruppe verfolgt. Zusätzlich könnte durch Co-Immunpräzipitationsanalysen aus Maus- beziehungsweise Rattenhodenextrakt nach weiteren, bis jetzt unbekanntem Interaktionspartnern von SYCE3 gesucht werden.

Auch die hier durchgeführte Untersuchung zur Funktion von SYCE3 während der homologen Rekombination hat interessante Fragen aufgeworfen: Beispielsweise stellt sich die Frage, ob dem CE während der homologen Rekombination eine strukturelle und/oder eine regulatorische Funktion zukommt. Um diese Frage zu beantworten, müssten die Interaktionen der verschiedenen CE-spezifischen Proteine mit rekombinationspezifischen Proteinen getestet werden. Dazu ist bereits bekannt, dass sowohl SYCE2 (Bolcun-Filas *et al.*, 2009) als auch SYCP1 und SYCP3 (Tarsounas *et al.*, 1999b) mit dem *recA* homologen Protein Rad51 interagieren können. Ob SYCE3 mit Rad51 oder anderen rekombinationspezifischen Proteinen interagieren kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Experimentell könnte auch dies durch Pull-Down Assays mit in vitro translatierten Proteinen aus dem TNT®-System (Promega) oder in einem Hefe „Two-Hybrid“-System getestet werden. Eine direkte Interaktion von SYCE3 (oder anderer CE-spezifischer Proteine) mit der „Rekombinationsmaschinerie“ würde eine regulatorische Funktion des CE während der homologen Rekombination - zusätzlich zu seiner strukturellen Funktion als Plattform für Rekombinationsknoten - weiter bekräftigen.

5 Material

5.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Brutschrank CO2-Auto-Zero	Heraeus-Holding, Hanau
Drehtisch Reax 2	Heidolph, über Hartenstein, Würzburg
Electrophoresis Power Supply	PEQLAB, Erlangen
Feinwaage Mettler AC 100	Mettler, Düsseldorf
Flachbrettscanner Epson Perfection V700 Photo	EPSON, Meerbusch
Fluoreszenzmikroskop Axiophot Stereo HB050 mit Quecksilberlampe	Zeiss, Oberkochen
Gefriermikrotom 2800 Frigocut E	Reichert-Jung
Gewebekulturschalen	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Graphitblotkammer LMS;	bezogen über Hartenstein, Würzburg
Heizblock	Liebisch, über Hartenstein, Würzburg
Heizplatte Medax	Nagel GmbH, Kiel
Infinite® M200	Tecan, Männedorf (Schweiz)
Kippschüttler WS5 Laborgerätebau	Edmund Bühler, Tübingen
Kühltischzentrifuge MIKRO 200R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Minifuge T	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments, Bad Homburg
Laborpumpe Varioperpex® II	LKB/Bromma, Schweden
Laborwaage Mettler PJ 3600 DeltaRange®	Mettler, Düsseldorf
Magnetrührer M35	GLW, Würzburg
pH-Meter pH 523	WTW, über Hartenstein, Würzburg
Petrischälchen (Ø 60 mm)	Sarstedt, Nürmbrecht
Proteingelkammer Mini V8	Gibco BRL
Schlittenmikrotom	Leitz, Wetzlar
Sonifier B12 Branson	Sonic Power Company
Sterile Bank Steril GARD Hood Class III	Müller Labortechnik, Windhagen
The Denley Mixer A257	Multi Axle Rotator bezogen über Hartenstein, Würzburg
Thermocycler primus 25 advanced	PEQLAB, Erlangen
Tischzentrifuge MIKRO 200	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Transmissionselektronenmikroskop EM 10	Zeiss, Oberkochen
Vortex L24	GLW, Würzburg

5.2 Computerprogramme

Adobe Photoshop
 AxioVision Release 4.7.1
 BioEdit Ibis Biosciences, Carlsbad, USA
 LCS Lite, Leica Solms Deutschland
 Microsoft Word 2007
 Microsoft Office PowerPoint 2007
 Tecan i-control 1.6

5.3 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden, sofern nicht anders vermerkt, in Analysenqualität von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth®(Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

5.4 Kits und Einzelkomponenten

peqGOLD Trifast™	PEQLAB, Erlangen
<i>NucleoSpin® Plasmid Kit</i>	MACHEREY-NAGEL, Düren
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
StrataClone PCR Cloning Kit	Agilent Technologies, Waldbronn
Nickel NTA Agarose	QIAGEN, Hilden
DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II	Roche, Mannheim
Wizard® SV Gel and PCR Cleanup System	Promega, Mannheim
ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit	Chemicon
ECL™ Detection Kit	GE Healthcare, München
Nitrozellulose	Schleicher&Schuell, Dassel
Whatmanpapier	Schleicher&Schuell, Dassel
Nylon Membran, positively charged	Roche, Mannheim
Glutathion Sepharose® 4B	GE Healthcare, München
Effectene™ Transfection Reagent	QIAGEN, Hilden
Dynabeads Protein G	Invitrogen, Karlsruhe
HiTrap™-Säulensystem	GE Healthcare, München

5.5 Biologisches Material

5.5.1 Zelllinien

COS-7 Zellen:

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

R1/E Zellen:

Subklon der R1 embryonalen Stammzelllinie. R1 embryonale Stammzellen stammen aus 129X1/SvJ x 129S1 d3,5 Blastocysten und weisen eine hohe Keimbahngängigkeit auf.

5.5.2 Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Herkunftstier	Hersteller	Verdünnung		
				IF	IB	EM
Anti-SYCE3 (gp)	GST-SYCE3	Meerschwein	e.H. (SEQLAB)	1:100	1:1000	-
Anti-SYCE3 (rb)	GST-SYCE3	Kaninchen	e.H. (SEQLAB)	1:50	1:1000	1:500
Anti-myc	Myc-Peptid	Maus	Invitrogen (R950-25)	-	1:2000	-
Anti-GFP	GFP Gesamtprotein	Maus	Santa Cruz (SC-9996)	-	1:200	-
Anti-Actin	C-Terminales Peptid	Maus	Sigma-Aldrich (A4700)	-	1:10000	-
Anti-SYCE1	SYCE1	Meerschwein	(Hamer <i>et al.</i> , 2006)	1:1000	1:1000	-
Anti-SYCE2	SYCE2	Meerschwein	(Hamer <i>et al.</i> , 2006)	1:200	1:400	-
Anti-SYCP1	N-Term (AS 1-120)	Meerschwein	(Winkel <i>et al.</i> , 2009)	1:150	-	-
Anti-SYCP1	C-Term (letzten 76 AS)	Kaninchen	(Öllinger <i>et al.</i> , 2005)	1:200	-	-
Anti-SYCP1 (VIIIID3)	Coiled-coil (AS 457-699)	Maus	(Öllinger, 2005)	-	-	1:150
Anti-SYCP2	C-Term (die letzten 414 AS)	Meerschwein	(Winkel <i>et al.</i> , 2009)	1:150	-	-
Anti-SYCP3	SYCP3 (AS 27-38 des Rattenproteins)	Meerschwein	(Alzheimer & Benavente, 1996)	1:150	-	-
Anti-SYCP3	C-Terminales Peptid des humanen Proteins	Kaninchen	Acris (NB300-232)	1:200	-	-
Anti-γH2AX	AS 134-142 des humanen γH2AX	Maus	Millipore (05-636)	1:500	-	-
Anti-RPA	Gereinigtes RPA aus U293 Zellen	Maus	Calbiochem (NA19L)	1:40	-	-
Anti-MLH1	Humanes MLH1	Maus	BD Pharmingen (551091)	1:30	-	-

Tabelle 5-1: Verwendete Antikörper.

5.6 Molekularbiologisches Material

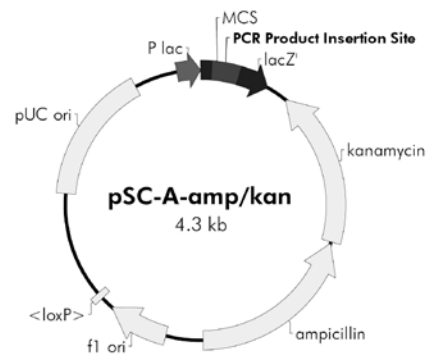
5.6.1 Enzyme

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden, wenn nicht anders beschrieben, über MBI Fermentas (St. Leon-Rot) oder New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen. Phusion Polymerase wurde bei der Firma Biozym (Hessisch Oldendorf) erworben.

5.6.2 Plasmidvektoren

StrataClone

Dieser Vektor ist Teil des *StrataClone PCR Cloning Kits* der Firma Agilent Technologies und wurde für die direkte Klonierung von DNA-Fragmenten mit A-Überhang verwendet, die durch PCR gewonnen wurden. Der Vektor besitzt eine Ampicillin- und eine Kanamycin-Resistenz und ermöglicht eine Blau/Weiß-Selektion, um positive Klone leichter identifizieren zu können.



pSC-A-amp/kan PCR Cloning Vector PCR Product Insertion Site Region
(sequence shown 4261–4270, 1–250)

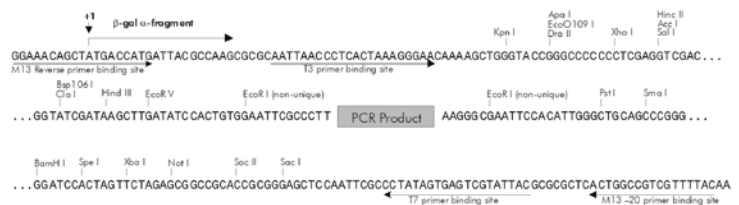


Abbildung 5-1: Vektorkarte und Multiple Cloning Site (MCS) des pSC-A-amp/kan Vektors

pCR®2.1-TOPO

Dieser Vektor ist Bestandteil des *Topo TA Cloning® Kits* der Firma Invitrogen (Karlsruhe). Er wurde für die direkte Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhang verwendet. Der Vektor besitzt ein Lac-Operon, das eine Blau/Weiß-Selektion ermöglicht. Zur Selektion transformierter Bakterien trägt der Vektor sowohl eine Ampicillin- als auch eine Kanamycin-Resistenz.

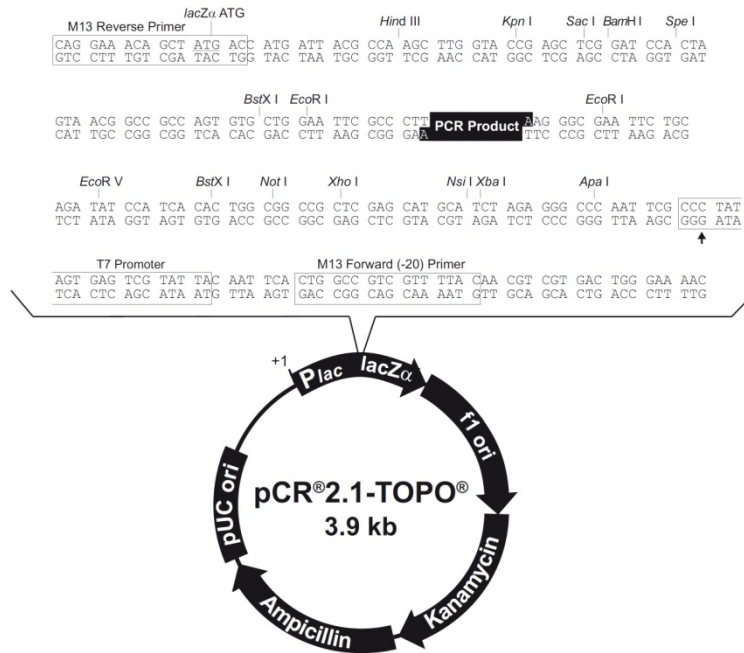


Abbildung 5-2: Vektorkarte und MCS des pCR 2.1-TOPO

pGEX-5x-1

Der pGEX-5x-1 wurde verwendet, um GST-Fusionsproteine herzustellen. Hierzu wurde die entsprechende DNA im richtigen Leseraster in die Multiple Cloning Site (MCS) ligiert, in *E. coli* Rosetta™ Bakterien exprimiert und mit Hilfe von Glutathion Sepharose® 4B aufgereinigt. Der Vektor verfügt über eine Ampicillin-Resistenz.

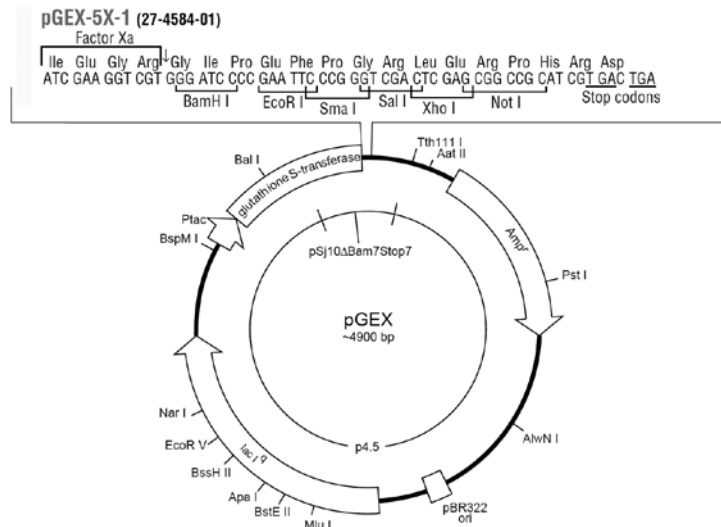


Abbildung 5-3: Vektorkarte und MCS des pGEX-5x-1

pQE31

Der pQE31 Vektor wird zur Herstellung bakteriell exprimierter N-terminaler HIS Fusionsproteine verwendet. Hierzu wird das entsprechende Insert im richtigen Leseraster in die MCS des Vektors kloniert, in *E. coli* RosettaBlue™ Bakterien exprimiert und über NiNTA Agarose mit Hilfe des HIS-Tags aufgereinigt. Der Vektor besitzt eine Ampicillin-Resistenz.

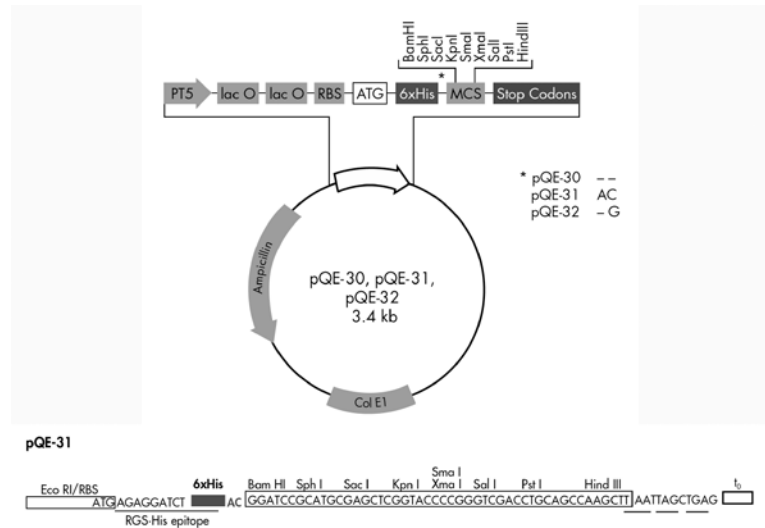


Abbildung 5-4: Vektorkarte und MCS des pQE31 Vektors

pKS/loxPNT Vektor

Dieser Vektor wurde von Prof. Sagrario Ortega für die Herstellung des *Syce3*^{-/-} Replacementvektors zur Verfügung gestellt. Der Vektor enthält eine Thyminidinkinase- sowie eine Neomycin-Selektionskassette. Für die Selektion in Bakterien verfügt der Vektor über eine Ampicillin-Resistenz.

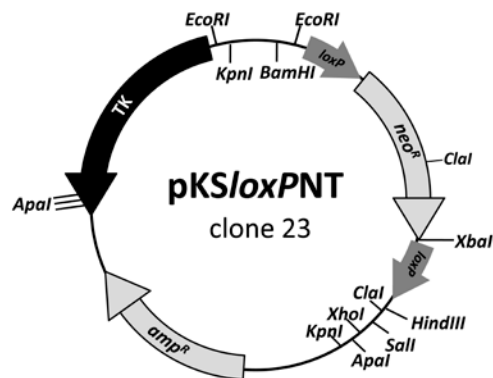


Abbildung 5-5: Schematische Darstellung des pKS/loxPNT Vektors

p-Myc

Dies ist ein Expressionsvektor für Säugerzellen, der die Expression eines N-terminalen c-Myc-Fusionsproteins ermöglicht. Durch den CMV (Cytomegalievirus) Promotor wird eine hohe Expressionsrate des c-Myc-Fusionsproteins in Säugerzellen erreicht. Der Vektor besitzt für die Selektion in Bakterien eine Ampicillin-Resistenz.

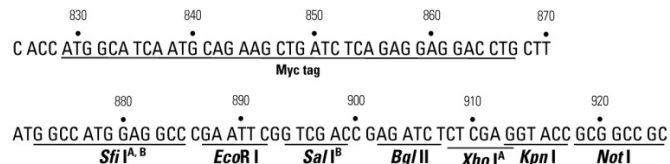
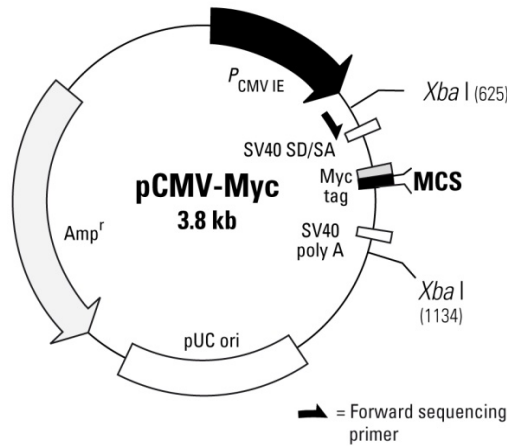


Abbildung 5-6: Vektorkarte des pCMV-Myc Vektors mit MCS

pEGFP-Vektoren

pEGFP Vektoren wurden von der Firma Clontech (Heidelberg) bezogen. pEGFP-Vektoren werden für die Expression von EGFP-Fusionsproteinen in eukaryotischen Zellen verwendet, da sie einen menschlichen CMV Promotor enthalten. In den pEGFP-N Vektoren wird das aus *Aequorea victoria* stammende fluoreszierende Protein EGFP (enhanced green fluorescent protein) an den C-Terminus des gewünschten Proteins fusioniert.

Es können aber auch Proteine ohne angehängtes EGFP-Tag exprimiert werden, indem die inserierte cDNA durch ein Stopcodon vom EGFP getrennt wird. In den pEGFP-C Vektoren wird das Protein EGFP an den N-Terminus des gewünschten Proteins fusioniert.

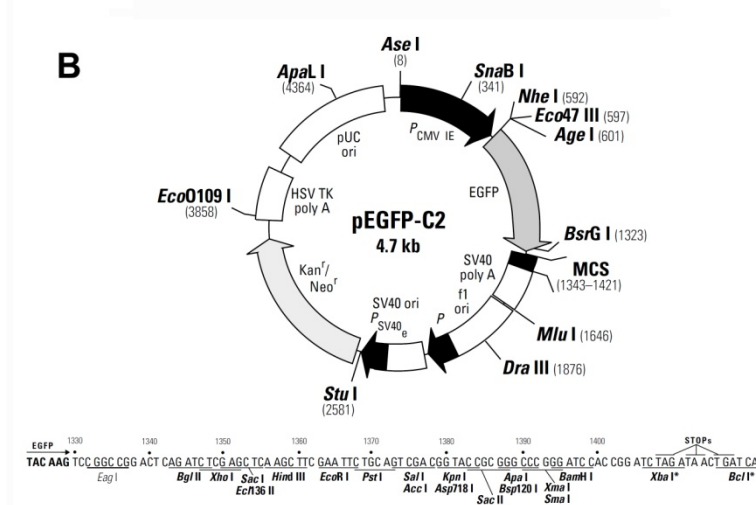
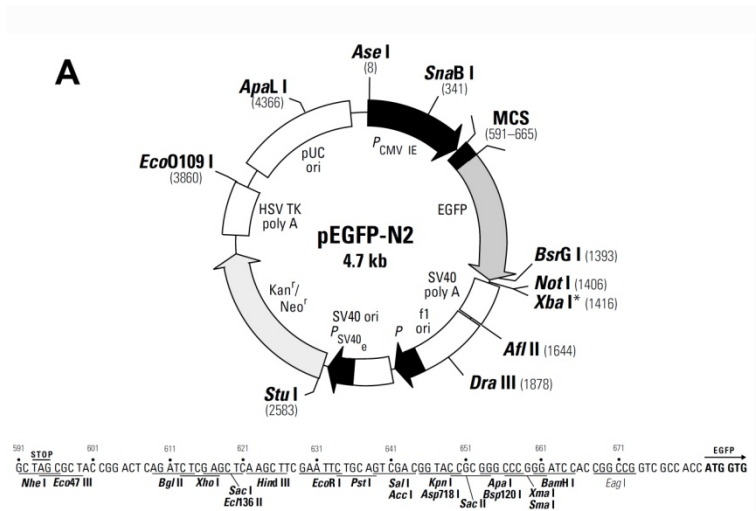


Abbildung 5-7: Vektorkarte und MCS des pEGFP-N2 (A) und pEGFP-C2 (B) Vektors

5.6.3 Oligonukleotide

	Oligonukleotidname	Sequenz 5' -> 3'	Schmelztemperatur
Charakterisierung von SYCE3			
SYCE3 RT PCR und Klonierung	DA8_5'	ATGGCTGATTCCGATCCTGGG	59,0°C
	DA8_3'	GTACCATGCACATGGCTACACGTCT	58,0°C
SYCP3 RT PCR	SCP35'ATG	GGCTTCGTGATGCTTCGAG	56,0°C
	SCP3TAA+	GACTCATCAGAATAACATGGATTGAAG	54,0°C
GAPDH RT PCR	GAPDH 5'	GGGCCACTTGAAGGGTGGAGC	64,5°C
	GAPDH 3'	GTCAGATCCACGACGGACACATTGG	63,2°C
Tex12-EGFP	Tex12_5'	ATGATGGCAAACCACCTGTAA	53,6°C
	Tex12_3'_TAA-	CTTGTGTAGGGTGTGGTAATTACTGT	54,1°C
Myc-SYCE3	SYCE3_myc_5'_ecoRI	TCGAATTCGGATGGCTGATTCCGATC	66,4°C
	SYCE3_myc_3'_Sall	TTGTCGACGTACCATGCACATGGCTACAC	66,9°C
SYCE3 Knockout Maus			
SYCE3 Sonde Southern Blot	DA8_Sonde_5'	CAGGTGAAAGGTGAGGGCCTG	58,2°C
	DA8_Sonde_3'	CTTGCAAATGAAGCTTTGCCCTT	58,6°C
F1 (Kurzer Arm)	F1_cla1_5'	ATCGATACTCCAAGCACTGGACTTTCC	63,4°C
	F1_cal1_3'	ATCGATTTCTGTATAGCTCTGGCTGTCTGG	63,7°C
F2 (Langer Arm)	F2_5'	CATGGTTGCCCCAGGGACCAAG	64,0°C
	F2_3'	CCTGGGAAAGAAAAGAAAGGAGCCAG	62,3°C
Sequenzier-primer F2	F2_seq1	TTCTGGCCGTAGGCTTCTTC	53,6°C
	F2_seq2	GTTGTAGCAGAACACCTTGTTGG	53,1°C
	F2_seq3	TGCGTTTCTCCTCCGTTG	55,9°C
	F2_seq4	CTGGGGCTGGGGAGGTTAA	56,1°C
	F2_seq5	TTAGCCCCTGACCCTGCAG	55,0°C
Genotypisierung F1 überspannend	DA8_Sonde_5'	CAGGTGAAAGGTGAGGGCCTG	58,2°C
	Lc2vf1 neo	CGAAGCTTATCGATACCGTCGAC	56,8°C
Genotypisierung F2 überspannend	LC2neo	GCTGGACGTAACTCCTCTTCAGAC	56,6°C
	DA8_hF2_LaA_3'	GGAGAGGTGACCACCAGAGGG	57,0°C
Genotypisierung F2 Knockout	SYCE3 neu 5' neo	CTACCCGGTAGAATTGACCTGCAG	57,9°C
	SYCE3 neu 3' WT neo	GTCATTCTGGGACTCTTGCTATCCTG	58,4°C
Genotypisierung F2 Wildtyp	SYCE3 neu 5' WT	GGGTAATCAGGTTGAAGGTCAGGC	60,0°C
	SYCE3 neu 3' WT neo	GTCATTCTGGGACTCTTGCTATCCTG	58,4°C

Tabelle 5-2: Verwendete Oligonukleotide.

5.6.4 Rekombinante DNA

Replacementvektor SYCE3 Knockout:

Das F2 Fragment (Langer Arm) wurde mit den Primern F2_5' und F2_3' aus genomischer DNA einer S129 Wildtypmaus amplifiziert und in den StrataClone Vektor ligiert. Aus diesem wurde das Insert mit EcoRI in den ebenfalls mit EcoRI geschnittenen pKSloxPNT Vektor kloniert. In diesen modifizierten Vektor wurde das F1 Fragment wie folgt kloniert: Das F1 Fragment (Kurzer Arm) wurde aus genomischer DNA aus R1/E Zellen amplifiziert, in den StrataClone Vektor kloniert und von dort mit ClaI geschnitten. Die Überhänge wurden mit Klenow Fragment aufgefüllt und dieses Fragment anschließend in den mit Sall geschnittenen und mit Klenow Fragment aufgefüllten pKSloxPNT+F2 Vektor kloniert. Sowohl die richtige Integration in den pKSloxPNT Vektor als auch die Sequenzhomologie zu den Sequenzen der R1/E Zellen wurde per Sequenzierung für F1 und F2 Fragment überprüft.

SYCE3 in pQE31

Proteinprodukt: HIS-SYCE3

SYCE3 wurde mit den Primern DA8_5' und DA8_3' aus Maus cDNA amplifiziert und in den StrataClone Vektor ligiert. Durch Sequenzierung wurde die Sequenz auf Richtigkeit geprüft, mit EcoRI aus dem StrataClone Vektor geschnitten und anschließend mit Klenow Fragment gebluntet in den SmaI geschnittenen pQE31 kloniert.

SYCE3 in pGEX-5x-1

Proteinprodukt: GST-SYCE3

Zur Klonierung von SYCE3 in den pGEX-5x-1 Vektor wurde SYCE3 mit EcoRI aus dem StrataClone Vektor geschnitten und in den ebenfalls mit EcoRI geschnittenen pGEX-5x-1 Vektor ligiert.

SYCE3 in pCMV-Myc

Proteinprodukt: Myc-SYCE3

Die Mausequenz von SYCE3 wurde mit Hilfe der Oligonukleotide SYCE3_myc_5'_ecoRI und SYCE3_myc_3'_Sall amplifiziert, mit EcoRI und Sall geschnitten und in den mit EcoRI und Sall geöffneten pCMV-Myc Vektor kloniert.

Tex12 in den pEGFP-N2

Proteinprodukt: Tex12-EGFP

Tex12 wurde aus Maus cDNA mit den Oligonukleotiden Tex12_5' und Tex12_3'_Taa- mit Taq-Polymerase amplifiziert und in den TopoTA Vektor (Invitrogen) kloniert. Von dort wurde die überprüfte Sequenz mit EcoRI in den ebenfalls mit EcoRI geöffneten EGFP-N2 Vektor kloniert.

Andere rekombinante DNA Konstrukte

Folgende rekombinante DNA Konstrukte waren bereits im Labor vorhanden (siehe Öllinger, 2010): EGFP-SYCE1, EGFP-SYCE2, SYCP1 1-200-EGFP und EGFP-SYCP1 820-997.

6 Tiere und Bakterienstämme

6.1 Tiere

Syce3 Knockout Maus:

Der Replacementvektor für den *Syce3* Knockout wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt (siehe 5.6.4). Die Elektroporation in R1/E Zellen und die Blastocysteninjektion erfolgten an der Transgenic Core Facility des MPI für Molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden. Die Zucht der Mäuse wurde im Tierstall des Biozentrums in Würzburg etabliert.

Sycp1, Syce1, Syce2 und Sycp3 Knockout Mäuse:

Eingefrorene Gewebe der *Sycp1* und *Sycp3* Knockout Mäuse wurden uns vom Lehrstuhl „Cell and Molecular Biology“ des Karolinska Instituts, Schweden von Herrn Professor C. Höög bereitgestellt. Eingefrorenes Hodengewebe der *Syce1*^{-/-} und *Syce2*^{-/-} Mäuse wurde von Prof. H. J. Cooke (Human Genetics Unit, Western General Hospital, Edinburgh) bezogen.

6.2 Bakterienstämme

StrataClone SoloPack Competent Cells: Kompetente Zellen, in die der StrataClone Vektor transformiert wurde.

TOP10 One Shot® kompetente Zellen: Zur Transformation von pCR®2.1-TOPO Vektoren wurden die im Kit (Invitrogen) enthaltenen *TOP10 One Shot*® kompetenten Zellen verwendet.

E. coli XL1-Blue:

Für die Vermehrung von Plasmidvektoren wurde der Bakterienstamm *E. coli* XL1-Blue der Firma Stratagene (Agilent) eingesetzt.

E. coli Rosetta™:

Dieser Bakterienstamm der Firma Novagen wurde ausschließlich zur bakteriellen Expression rekombinanter GST-Fusionsproteine verwendet (siehe. 7.3.1.2). Rosetta™ Stämme enthalten ein zusätzliches Plasmid, das für bestimmte, in Bakterien selten vorkommende tRNAs kodiert. Auf diese Weise wird die Expression des Fusionsproteins erhöht. Das Zusatzplasmid beinhaltet eine Chloramphenicol-Resistenz und ist mit pGEX Vektoren kompatibel.

E. coli RosettaBlue™:

RosettaBlue™ Bakterienstämme entsprechen grundsätzlich den beschriebenen Rosetta™ Stämmen. Sie unterscheiden sich dadurch, dass RosettaBlue™ Bakterienstämme zusammen mit pQE Vektoren für die Aufreinigung von HIS-Fusionsproteinen (siehe. 7.3.1.1) verwendet und über Chloramphenicol und Tetracyclin selektiert werden.

7 Methoden

7.1 Mikrobiologische Methoden

7.1.1 Kultivierung von Bakterien

7.1.1.1 Flüssigkulturen

- LB-Medium (pH 7,4):
10 g/l Bacto-Trypton
5 g/l Hefeextrakt
10 g/l NaCl
→ autoklavieren
- Verwendete Antibiotika:

	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Tetracyclin	15 mg/ml in 70% Ethanol	15 µg /ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in Ethanol	34 µg/ml

Für eine Übernachtskultur wurden 15 ml LB Medium in ein Greiner Röhrchen vorgelegt und zur Selektion - je nach verwendetem Bakterienstamm - das entsprechende Antibiotikum in der angegebenen Arbeitskonzentration zugegeben. Zum Animpfen wurde Bakterienmaterial aus einer Glycerinkultur oder einer Bakterienkolonie von einer Agarplatte verwendet. Die Übernachtskultur wurde unter Schütteln über Nacht bei 37°C inkubiert.

7.1.1.2 Glycerinkulturen

Zur längeren Aufbewahrung der Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden 800 µl einer Übernachtskultur mit 200 µl sterilem Glycerin vermischt und bei -70°C gelagert.

7.1.1.3 Bakterienkultivierung auf Agarplatten

- 1,5% Agar in LB Medium (siehe 7.1.1.1)

Für die Herstellung der Agarplatten wurde 1,5% Agar in LB-Medium abgewogen und anschließend autoklaviert. Nach Abkühlen des Gemisches auf 50°C wurde das zu verwendende Antibiotikum in seiner Arbeitskonzentration zugefügt und das flüssige Gemisch in sterile Platten gegossen, bis der Boden bedeckt war. Nachdem der Agar ausgehärtet war, wurden die Platten umgedreht und über Nacht bei RT getrocknet. Je nach zugesetztem Antibiotikum konnten die Platten 3-4 Wochen bei 4°C gelagert werden. Für die Bakterienkultur auf Agarplatten wurden 100 µl einer Bakterienkultur mit einem sterilen Drigalskispatel auf der Platte verstrichen.

7.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien

- TSS (Transformation and Storage Solution) (pH 6,5):
 - LB-Medium (siehe 7.1.1.1)
 - + 10 % (w/v) PEG 3350 oder 8000
 - + 5 % (v/v) DMSO
 - + 50-70 mM Mg²⁺ (MgCl₂)→ steril filtrieren, Lagerung bei -20°C

5 ml einer Flüssigkultur (*E. coli* XL1-Blue, *E. coli* Rosetta™ oder *E. coli* RosettaBlue™) wurde zu 100 ml LB Medium (+ entsprechendes Antibiotikum) gegeben. Unter Schütteln wurden die Bakterien so lange kultiviert, bis eine optische Dichte von OD₆₀₀ 0,6-0,8 erreicht war, was der logarithmischen Phase des Bakterienwachstums entspricht. Die Kultur wurde anschließend auf zwei 50 ml Greiner Rörchen verteilt und 10 min bei 900g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellt in eiskaltem TSS resuspendiert (Menge an TSS: 1/40 des Ausgangsvolumens der Bakterienkultur). Die Lösung wurde rasch bei 4°C in 100 µl Fraktionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Bakterien konnten etwa ein halbes Jahr bei -70°C gelagert werden.

7.1.3 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Als Transformation bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA in Bakterien. Um die Fremd-DNA vor Degradation durch die Bakterien zu schützen, muss diese ringförmig vorliegen. Außerdem muss sie einen eigenen Replikationsursprung und eine Antibiotika-Resistenzkassette zur Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien aufweisen.

Ein bei -70°C gelagertes Aliquot kompetenter Bakterien wurde auf Eis ca. 20 min aufgetaut. Zu diesem wurde ca. 50-150 ng Plasmid-DNA oder ein Ligationsansatz (siehe 7.2.9.4) pipettiert, ohne die Bakterien zu resuspendieren. Nach einer anschließenden Inkubation von 30 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock der Bakterien bei 42°C für 60-90 sek. Die Bakterien wurden danach sofort für 1 min auf Eis gestellt. Um den Aufbau der Antibiotika-Resistenz zu gewährleisten, wurden die Bakterien in 900 µl LB Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss konnten die Bakterien auf Agarplatten in zwei unterschiedlichen Verdünnungen (1/10 und 9/10) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert werden.

7.1.4 Testen der Transformationseffizienz

Um die Qualität selbst hergestellter kompetenter Bakterien zu definieren, wurde die Transformationseffizienz der Bakterien getestet. Die Transformationseffizienz definiert sich als Anzahl der Transformanten pro µg DNA, bezogen auf den pUC-Vector. Die Transformationseffizienz sollte zwischen 1×10^7 - 1×10^9 Transformanten pro µg DNA liegen. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden 10, 100 und 1000 pg pUC-Vektor-DNA in die Bakterien transformiert und im Anschluss die Kolonien ausgezählt.

7.2 Molekularbiologische Methoden

7.2.1 Extraktion von RNA aus Gewebe

Die Extraktion von RNA aus Gewebe erfolgte mit *peqGOLD Trifast™* der Firma PEQLAB, Erlangen, nach Herstellerprotokoll. Die RNA wurde für die Gewinnung von spezifischer cDNA (siehe 7.2.5.1) mittels RT-PCR genutzt.

7.2.2 Extraktion von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mit dem *NucleoSpin® Plasmid* Kit der Firma MACHEREY-NAGEL, Düren, nach Herstellerprotokoll aus einer Übernachtskultur isoliert und in 50 µl H₂O aufgenommen.

7.2.3 Gewinnung von genomischer DNA aus Gewebe und Zellen

- SDS-Mix (pH 7,5):
 - 17 mM Tris/HCl
 - 17 mM EDTA
 - 170 mM NaCl
 - 0,85% SDS
- Proteinase K (AppliChem) (20 mg/ml in 10 mM CaCl₂)
- Gesättigte NaCl Lösung (6M)

Genomische DNA (gDNA) wurde aus embryonalen Stammzellen der Maus (R1/E Zellen) oder aus Mausechwanzproben isoliert. Hierzu wurden die embryonalen Stammzellen oder die Schwanzstücke in 500 µl SDS-Mix aufgenommen und mit 50 µl Proteinase K Stammlösung versetzt. Die Proteine wurden über Nacht bei 56°C unter Drehen der Proben verdaut. Nach Zugabe von 250 µl gesättigter NaCl Lösung wurden die Proben 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die nicht löslichen Bestandteile bei 10000g, 4°C pelletiert. Aus 500 µl des Überstand wurde durch Zugabe von 1000 µl eiskaltem 100%igem Ethanol die genomische DNA gefällt. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 13000g wurde das DNA Pellet zweimal mit 80% Ethanol gewaschen (5 min bei 13000g) und 1 h bei RT getrocknet. Das DNA Pellet wurde über Nacht bei 4°C in 30-100 µl H₂O (je nach Pelletgröße) gelöst und die gDNA wurde bei 4°C gelagert.

7.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (DNA und RNA)

DNA und RNA wurden mit dem Infinite® M200 der Firma Tecan, Crailsheim und der Tecan i-control Software gemessen. Dabei wurden die DNA oder RNA Proben auf die NanoQuantPlate pipettiert, für die vorher mit H₂O der Nullwert bestimmt wurde. Die Absorption wurde dann bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Zusätzlich konnten aus dem Quotienten OD260/OD280 Aussagen über die Verunreinigung der Probe mit Proteinen abgeleitet werden.

7.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

7.2.5.1 Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)

- RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor (Fermentas)
- RT-Puffer (Promega)
- Oligo(dT) Primer (Fermentas)
- dNTPs (Fermentas)
- Reverse Transkriptase MMULV (Promega)

Zum Herstellen rekombinanter DNA, die beispielsweise zur Proteinexpression in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen eingesetzt wird, kann man cDNA als Template verwenden. Dabei hat die Verwendung von cDNA im eukaryotischen System den Vorteil, dass zu ihrer Synthese prozessierte mRNA als Template verwendet wurde und die so entstehende cDNA dadurch nur codierende Genbereiche (Exons) enthält.

Die praktische Durchführung der RT-PCR unterteilt sich in zwei Abschnitte: Im ersten Schritt wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus Gesamt-mRNA Gesamt-cDNA hergestellt. Im zweiten Abschnitt wird aus dieser cDNA mit spezifischen Primern bei einer konventionellen PCR (siehe 7.2.5.2) das gewünschte DNA Fragment amplifiziert.

Standard RT-PCR-Ansatz:

- 1 µg RNA
- 1 µl RNase Inhibitor 40 U/µl
- 4 µl RT-Puffer 5x
- 1 µl dNTPs 10 mM
- 1 µl Oligo(dT) Primer 500 µg/ml
- 1 µl Reverse Transkriptase MMULV 200 U/µl
- mit H₂O bidest. auf 20 µl auffüllen

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert, 5 min bei 95°C hitzeinaktiviert und danach bei 4°C gelagert. Für die anschließende PCR wurden 1-2 µl des Reaktionsansatzes verwendet.

7.2.5.2 Konventionelle PCR

Mit Hilfe der PCR ist es möglich bestimmte DNA Abschnitte in vitro zu amplifizieren. Für eine PCR Reaktion benötigt man Oligonukleotide (Primer), welche den zu amplifizierenden Bereich eingrenzen, Desoxyribonucleosid-Triphosphate, die Grundbausteine eines DNA Moleküls, und eine thermostabile DNA Polymerase, die die Einzelstrang-DNA-Synthese katalysiert.

Die PCR ist ein zyklischer Prozess, der in drei Abschnitte gegliedert wird:

1. Denaturierung: Zunächst wird die doppelsträngige DNA auf 94-96°C erhitzt, um die Stränge zu trennen. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, aufgebrochen.

2. Annealing: Nach der Trennung der Stränge wird die Temperatur gesenkt, so dass die Primer die homologen Sequenzen auf den einzelsträngigen DNA Molekülen binden können. Die Temperatur während dieser Phase ist von den eingesetzten Primern abhängig und liegt normalerweise zwischen 50°C und 65°C.
3. Elongation: Schließlich füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Sie beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang. Die DNA-Polymerase benötigt hierfür eine Temperatur von 72°C. Die Zeit, die für diesen Schritt benötigt wird, hängt von der verwendeten DNA-Polymerase und der Länge des DNA-Fragments ab, das vervielfältigt werden soll.

Die PCR ist ein zyklischer Prozess, bei dem die während der Elongation neu gebildeten DNA Stränge nach der Denaturierung ihrerseits Matrizen ausbilden. So kommt es nach jedem Zyklusschritt zu einer Verdopplung der DNA Moleküle, was einem exponentiellen Anstieg entspricht (n^2 , n= Anzahl der Zyklen). Standardmäßig wird eine Zyklusanzahl von 25-35 verwendet.

Design der Oligonukleotide

Das Design der Oligonukleotide ist für eine erfolgreiche PCR-Reaktion maßgeblich. Die Schmelztemperatur der beiden Oligonukleotide sollte in etwa gleich sein und zwischen 50°C und 65°C liegen, um eine spezifische Bindung der Oligonukleotide an die DNA zu ermöglichen. Zur Abschätzung der Schmelztemperatur gilt folgende Regel:

$$T_m = 2^\circ\text{C} [\Sigma(A, T) + 2 \Sigma(G, C)] - 5^\circ\text{C}$$

Amplifikationsreaktion

Für die Amplifikation wurde entweder die im Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie hergestellte Taq-Polymerase oder Phusion™-DNA-Polymerase von Biozym verwendet.

Pipettierschema für Taq-Polymerase:

20-100 ng Template-DNA
 1 µl 5'-Primer (10 pmol/µl)
 1 µl 3'-Primer (10 pmol/µl)
 5 µl Taq-DNA-Polymerase 10x
 3 µl MgCl₂ (25 mM)
 1 µl dNTPs (10 mM)
 1 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)
 → mit H₂O bidest. auf 50 µl auffüllen

Pipettierschema für die Phusion™-DNA-Polymerase:

1 pg-2 ng Template-DNA
 1 µl 5'-Primer (10 pmol/µl)
 1 µl 3'-Primer (10 pmol/µl)
 10 µl HF bzw. GC Buffer 5x
 1 µl dNTPs (10 mM)
 1,5 µl DMSO 100%
 0,5 µl Phusion™-DNA-Polymerase (0,02 U/µl)
 → mit H₂O bidest. auf 50 µl auffüllen

Der Ansatz wurde je nach eingesetzter Polymerase im Thermocycler mit folgenden Programmen inkubiert:

PCR-Programm für Taq-Polymerase		
Initiale Denaturierung:	2 min 96°C	
Denaturierung:	30 sek 96°C	} 25x
Primer-Annealing:	30 sek (Temperatur je nach Primer)	
Elongation:	1 min pro 1000 Basen 72°C	
Finale Elongation:	10 min 72°C	
Kühlung:	∞ 4°C	

PCR-Programm für Phusion-DNA-Polymerase		
Initiale Denaturierung:	2 min 98°C	
Denaturierung:	20 sek 98°C	} 30-35x
Primer-Annealing:	30 sek (Temperatur je nach Primer)	
Elongation:	15 sek pro 1000 Basen 72°C	
Finale Elongation:	7 min 72°C	
Kühlung:	∞ 4°C	

Die Auswertung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1% Agarosegel (siehe 7.2.7).

7.2.5.3 PCR aus genomischer DNA

Die PCR aus gDNA wurde mit der Phusion-DNA-Polymerase unter Standardbedingungen (siehe 7.2.5.2) mit folgender Modifikationen durchgeführt: Im Vergleich zur konventionellen PCR muss für die PCR aus gDNA eine größere Menge an DNA (500 ng) eingesetzt werden, da das zu amplifizierende DNA Fragment in einer geringeren Kopienzahl pro µg DNA im Vergleich zu beispielsweise Plasmid-DNA vorliegt.

7.2.5.4 Kolonie-PCR

Nach einer Klonierung wurden die selektierten Bakterienklone durch Kolonie-PCR auf eine erfolgreiche Ligation des durch Transformation eingebrachten rekombinanten Vektors getestet. In der PCR-Reaktion wurde Bakterienmaterial als Template eingesetzt und mit geeigneten Primern überprüft, ob das DNA-Fragment in den Vektor inseriert war (5'- und 3'- Primer spezifisch für das Insert) und welche Orientierung das DNA-Insert hatte (5'-Primer spezifisch für die Zielvektorsequenz, 3'-Primer spezifisch für das Insert, oder umgekehrt). Für diese Ansätze wurde im Allgemeinen die Instituts-eigene Taq-Polymerase eingesetzt (Pipettierschema und Programm für den Thermocycler: siehe 7.2.5.2).

7.2.6 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen von rekombinanten Plasmiden wurden von der Firma GATC (Konstanz) durchgeführt.

7.2.7 Auftrennung von DNA-Molekülen durch Agarose-Gelelektrophorese

- 20x SB-Puffer (pH 8,0):
200 mM NaOH
add Borsäure bis pH 8,0
- 6x DNA-Beladungspuffer:
60% Glycerin
30% 0,2 M EDTA
Spatelspitze Orange G

Zum Auftrennen von DNA Molekülen - beispielsweise nach einer PCR - verwendet man die Agarose-Gelelektrophorese. Hierbei wandern die negativ geladenen DNA Moleküle in einem angelegten Stromfeld durch ein Agarosegel zum positiven Pol und können so ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die Konzentration der Agarose im Gel bestimmt hierbei das Laufverhalten der DNA Moleküle (siehe Tabelle 7-1) und wird abhängig von der Größe des aufzutrennenden DNA-Fragments gewählt.

Die Agarose (peqGOLD Universal-Agarose, PEQLAB, Erlangen) wurde je nach gewünschter Konzentration in SB Puffer eingewogen, aufgekocht und nach Zugabe von 1 µg/ml Ethidiumbromid in einen Gelschlitten gegossen. Als Größenreferenz wurde der HyperLadder I (Bioline) oder der Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker (Fermentas) verwendet. Das Gel wurde bei 250 V gefahren.

Agarose-Konzentration	Optimaler Trennbereich
0,3 %	5-60 kb
0,6 %	1-20 kb
0,7 %	0,8-10 kb
0,9 %	0,5-7 kb
1,2 %	0,4-6 kb
1,5 %	0,2-3 kb

Tabelle 7-1: Abhängigkeit des Trennbereichs von der Agarosekonzentration

7.2.8 Präparative DNA-Gelelektrophorese

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarose Gel wurde mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die DNA wurde in 25 µl Wasser eluiert und, falls nötig, bei -20°C gelagert.

7.2.9 Klonierung

Die DNA-Klonierung ist eine gezielte DNA-Rekombination, bei der spezifische cDNAs oder Fragmente genomischer DNA in einen Klonierungsvektor eingebracht werden, der in kultivierbare Wirtszellen (z.B. *E. coli* XL1-Blue) eingeschleust und in diesen vermehrt wird. In der praktischen Durchführung wurden zwei Möglichkeiten genutzt ein DNA-Fragment in einen Zielvektor zu klonieren: (1) Umklonierung eines „Insert“ aus einem bereits vorhandenen Quellvektor (beispielsweise StrataClone Vektor mit Insert) durch Restriktionsverdau oder (2) direkte Klonierung eines PCR Produkts mit angefügten Restriktionsschnittstellen in den Zielvektor.

7.2.9.1 StrataClone-Klonierungsreaktion

Um PCR Produkte schnell und effizient in einen Zwischenvektor zu klonieren, wurde das StrataClone PCR Cloning Kit (Agilent Technologies, Waldbronn) nach Herstellerprotokoll verwendet. Die DNA von positiv getesteten Klonen konnte im Anschluss sequenziert und für weitere Klonierungen in verschiedene Zielvektoren verwendet werden.

7.2.9.2 Restriktionsverdau von DNA

Zur Insertion von DNA-Fragmenten in einen Vektor, wurde dieser in seiner MCS mit Restriktionsenzymen geöffnet und die gewünschte DNA-Sequenz mit entsprechenden komplementären Schnittstellen eingefügt.

Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme wurden von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen. Während der Klonierungen wurden die Enzyme laut Herstellerprotokoll verwendet.

Standardansatz für einen Restriktionsverdau (10 µl)

- 1-2 µg Plasmid-DNA
- 1 µl 10x Puffer (MBI, passend zum verwendeten Enzym)
- 1 µl Restriktionsenzym (MBI)
- mit H₂O bidest. auf 10 µl auffüllen

Der Ansatz wurde gemischt und ein bis zwei Stunden bei der für das Enzym entsprechenden Temperatur (meist 37°C) inkubiert. Wurde die verdaute DNA für Folgeversuche benötigt, erfolgte vor der Gelelektrophorese je nach Enzym ein Inaktivierungsschritt bei 65-85°C für 15 min.

7.2.9.3 Dephosphorylierung des Vektors

Verdaut man den Zielvektor mit nur einem Restriktionsenzym (ungerichtete Klonierung) oder aber einem Restriktionsenzym, das glatte Enden produziert, ist es notwendig, den Zielvektor zu dephosphorylieren, um die Autoligationsrate zu vermindern. Durch das Entfernen der 5' Phosphatgruppe nach dem Linearisieren kann der Vektor nicht mehr religieren, wodurch die Autoligation verhindert wird.

Für die Dephosphorylierung wurde Shrimp alkalische Phosphatase von (MBI, Fermentas) verwendet.

Standard Dephosphorylierungs-Ansatz:

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

Der Ansatz wurde 1-2 h bei 37°C inkubiert und danach 15 min bei 70°C hitzeinaktiviert.

7.2.9.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch die Ligation können DNA-Fragmente kovalent miteinander verbunden werden. Die DNA-Fragmente müssen hierzu entweder überlappende Enden mit jeweils komplementären Sequenzen besitzen oder glatte phosphorylierte 5'-Enden. Die Ligation zweier DNA-Fragmente wird durch die T4-DNA-Ligase katalysiert und bewirkt die dauerhafte Integration eines bestimmten DNA-Abschnitts in einen Zielvektor. Bei der Ligation sollte das molekulare Verhältnis zwischen Insert und linearisiertem Zielvektor wenigstens 3:1 betragen.

Standard-Ligationsansatz (20 µl):

x ng Insert
 150 ng linearisierter Vektor
 2 µl T4-DNA Ligase Puffer (10x, MBI Fermentas GmbH)
 1 µl T4-DNA Ligase (5 U/µl, MBI Fermentas GmbH)
 → mit H₂O bidest. auf 20 µl auffüllen

Ligationsansatz nach Dephosphorylierung (20 µl):

x ng Insert
 1 Dephosphorylierungs-Ansatz (5 µl, 100-150 ng Vektor)
 1,5 µl T4-DNA Ligase Puffer (10x, MBI Fermentas GmbH)
 1 µl T4-DNA Ligase (5 U/µl, MBI Fermentas GmbH)
 → mit H₂O bidest. auf 20 µl auffüllen

Die Ligation erfolgte für eine Stunde bei RT. Bei der Ligation von glatten DNA-Enden wurde die Inkubationszeit auf 90 Minuten erhöht, wobei nach 45 Minuten erneut 1 µl T4-DNA-Ligase zugegeben wurde. Der Ligationsansatz wurde anschließend für die Transformation in *E.coli*-Bakterien eingesetzt (siehe 7.1.3).

7.2.10 Southern Blot

Mit Hilfe des Southern Blots können spezifische DNA-Fragmente in einem DNA Gemisch mit DNA-Sonden identifiziert werden. Diese Methode kann z.B. für die Genotypisierung von Knockout Mäusen verwendet werden. Hierfür wird genomische DNA des zu untersuchenden Organismus mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen verdaut. Anschließend wird das komplexe DNA-Fragment-Gemisch denaturiert, auf einem Agarosegel aufgetrennt und durch Kapillarkräfte auf eine Nylonmembran transferierte. Auf der Nylonmembran erfolgt dann die Hybridisierung mit der spezifischen Sonde. In dieser Arbeit wurde der Southern Blot für die Genotypisierung der *Syce3* Knockout Maus verwendet. Hierfür ist eine eindeutige Strategie notwendig, bei der nach Verdau mit einem bestimmten Restriktionsenzym Banden unterschiedlicher Größe bei dem wildtypischen und genetisch veränderten Organismus entstehen (Details zur Southern Blot Strategie im Falle des *Syce3* Knockouts: siehe 2.2.1.1).

7.2.10.1 Digoxigenin-Markierung der DNA-Sonde

- PCR DIG Probe Synthesis Mix (Roche)
- Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde mit Digoxigenin markierten Southern Blot-Sonden gearbeitet. Dabei ist ein Digoxigeninmolekül an ein dUTP gekoppelt. Die Markierung erfolgte über PCR.

Pipettierschema für die Sondenmarkierung:

100 pg Template-DNA	
1 µl 5'-Primer	(10 pmol/µl)
1 µl 3'-Primer	(10 pmol/µl)
5 µl Taq-DNA-Polymerase 10x	
3 µl MgCl ₂	(25 mM)
5 µl PCR DIG Probe Synthesis Mix	(200µM je dNTP)
1 µl Taq-DNA-Polymerase	(5 U/µl)
→ mit H ₂ O bidest. auf 20 µl auffüllen	

Als Thermocycler-Programm wurde das Standard Taq-Polymerase Protokoll verwendet. Die Oligonukleotide, die für die *Syce3*-spezifische Sonde verwendet wurden, sind in Tabelle 5-2 aufgelistet. Nach der PCR wurde die Sonde über ein präparatives Gel aufgereinigt (siehe 7.2.8). Um die Reinheit der Sonde zu erhöhen, wurde sie nochmals über das Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim) nach Herstellerprotokoll für PCR-Produkte aufgereinigt.

7.2.10.2 Verdau der genomischen DNA

Für den Restriktionsverdau der genomischen DNA wurden 10 µg gDNA mit dem jeweiligen Restriktionsenzym über Nacht bei der für das Restriktionsenzym angegebene Temperatur inkubiert. Für die Genotypisierung der *Syce3*^{-/-} Mäuse wurde das Restriktionsenzym BstEII (New England Biolabs, Frankfurt am Main) über Nacht bei 30°C verwendet.

Pipettierschema für den Verdau genomischer DNA:

10 µg gDNA	
8 µ Puffer 3	(supplementiert mit BSA)
8 µl BstEII	(10 u/µl)
→ mit H ₂ O bidest. auf 80 µl auffüllen	

7.2.10.3 Gelelektrophorese genomischer DNA

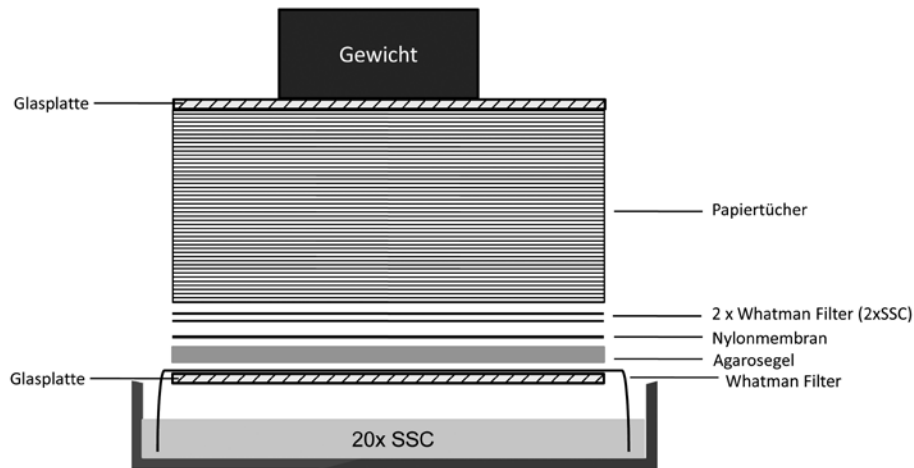
Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurde die gDNA 10 min bei 70°C denaturiert und danach sofort auf Eis gestellt, um eine Rehybridisierung der DNA-Fragment Enden und somit ein Steckenbleiben der DNA-Moleküle in der Tasche zu verhindern. Nach der Denaturierung wurden die Proben auf einem 0,6%igem Agarosegel ohne Ethidiumbromid bei 200 V ca. 4 h aufgetrennt. Im Anschluss wurde das Gel für 15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und danach unter dem UV-Transilluminator dokumentiert.

7.2.10.4 Transfer der DNA auf eine Nylonmembran

- Denaturierungslösung: 0,5 M NaOH
1,5 M NaCl
- Neutralisationslösung (pH 7,5): 1,5 M NaCl
0,5 M Tris/HCl
- 20x SSC (pH 7,0): 3 M NaCl

- 2x SSC (pH 7,0):
 - 300 mM Natriumcitrat
 - 0,3 M NaCl
 - 30 mM Natriumcitrat
- Whatman-Filter
- Nylonmembran, positive geladen (Roche Applied Science)

Die bei der Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente wurden durch zweimalige Inkubation in Denaturierungslösung für 15 min unter leichtem Schwenken im Agarosegel denaturiert. Darauf folgte eine zweimalige Neutralisation der DNA-Fragmente für je 15 min in Neutralisationslösung. Vor dem Aufbau des Southern Blots wurde das Gel schließlich 15 min in 20x SSC Puffer inkubiert. Der Blot wurde, wie in Abbildung 7-1 dargestellt, aufgebaut. Die Whatman-Filter waren dabei in 2x SSC getränkt, während die Nylonmembran trocken aufgelegt wurde. Transferiert wurde 24 h.



Nach Beendigung des Transfers wurde der Blot abgebaut und die Nylonmembran auf einen mit 2x SSC getränkten Whatman-Filter gelegt. Die DNA wurde mit UV-Licht auf die Nylonmembran fixiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für 5 min in ddH₂O gewaschen. Die transferierte DNA wurde durch Backen für 30 min bei 80°C endgültig auf der Membran fixiert. Der Blot konnte in Alufolie eingewickelt mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden.

7.2.10.5 Berechnung der optimalen Hybridisierungstemperatur für die DNA-Sonde

Für die optimale Hybridisierungstemperatur der DNA-Sonde, unter Verwendung von DIG Easy Hyb (Roche), wurde folgende vom Hersteller empfohlene Formel verwendet.

$$T_{\text{hyb}} = [49.82 + 0.41 (\% \text{ G} + \text{C}) - 600/L] - (20^\circ\text{C bis } 25^\circ\text{C})$$

wobei: L = Länge der Sonde

7.2.10.6 Hybridisierung des Blots mit der Digoxigenin markierten Sonde

- Prähybridisierungslösung : DIG Easy Hyb Granules + 64 ml steriles Wasser
(10 ml Aliquots bei -20°C lagerbar)
- Hybridisierungslösung: 10 ml DIG Easy Hyb + 25 ng Sonde/ml
- Waschpuffer 1 (pH 7,0): 2x SSC
0,1% (w/v) SDS
- Waschpuffer 2 (pH 7,0): 0,1x SSC
0,1% (w/v) SDS
- DIG-Puffer(pH 7,5): 100 mM Maleinsäure
150 mM NaCl

Der Blot wurde zunächst in 10 ml Prähybridisierungslösung bei der für die Sonde spezifischen Hybridisierungstemperatur (Berechnung: siehe 7.2.10.5) für 30 min in einem Hybridisierungssofen unter Rollen inkubiert. Für die Hybridisierung wurde die Sonde für 10 min bei 96°C denaturiert und direkt im Anschluss in der entsprechenden Konzentration zu der Prähybridisierungslösung hinzupipettiert. Der Blot wurde über Nacht in der Prähybridisierungslösung bei Hybridisierungstemperatur inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Blot zweimal 5 min bei RT mit Waschpuffer 1 gewaschen. Die nächsten beiden Waschschrte folgten mit Waschpuffer 2 bei Hybridisierungstemperatur für je 15 min. Danach wurde der Blot für 1 min in DIG-Puffer equilibriert.

7.2.10.7 Detektion der Sonde über ECL (Enhanced Chemi-luminescence)

- DIG Waschpuffer (pH 7,5): 100 mM Maleinsäure
150 mM NaCl
0,3% Tween 20
- Blockinglösung (Roche): in DIG-Puffer 1:10 verdünnt
- Antikörperlösung: Anti-DIG-AP (Roche)
1:10000 verdünnt in Blockinglösung
- Detektionspuffer (pH 9,5): 100 mM Tris/HCl
100 mM NaCl
- CSPD Ready to use (Roche)

Der Blot wurde vor der 30minütigen Antikörperinkubation 30 min bei RT in Blockinglösung abgesättigt. Um unspezifische Bindungen zu entfernen, wurde der Blot nach der Antikörperinkubation zweimal 15 min in DIG Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde er für 5 min in Detektionspuffer equilibriert und danach die CSPD Reaktion nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

Säulenvorbereitung

Für die Aufreinigung eines Proteins aus einer 600-ml-Kultur wurden 2 ml Ni-NTA-Agarose-Suspension (QIAGEN, Hilden) auf eine entsprechende Säule (BD Biosciences, Heidelberg) pipettiert, was einem Säulenvolumen von 1 ml entsprach. Die überschüssige Lagerungsflüssigkeit wurde entfernt und die Agarosematrix konnte mit 20 ml Harnstoffpuffer (pH 8,0) equilibriert werden. Nach diesem Vorgang war die Säule gebrauchsfertig und konnte beladen werden.

Aufreinigung des HIS-Fusionsproteins

Die equilibrierte Säule wurde mit dem Überstand des zentrifugierten Sonifikats vorsichtig beladen, ohne Säulenmaterial aufzuwirbeln. Ein Teil des Durchlaufs wurde gesammelt, um die Bindung des Proteins an die Säule zu überprüfen. Anschließend folgte die Reinigung des Proteins über einen diskontinuierlichen pH-Gradienten nach folgendem Protokoll:

10-30 ml Überstand Lysat	→ einen Teil auffangen, den Rest verwerfen
20 ml Harnstoffpuffer (pH 8,0)	→ Waschfraktionen auffangen
15 ml Harnstoffpuffer (pH 6,3)	→ Waschfraktionen auffangen
10 ml Harnstoffpuffer (pH 5,9)	→ Eluat in Aliquots zu 1 ml auffangen
10 ml Harnstoffpuffer (pH 4,5)	→ Eluat in Aliquots zu 1 ml auffangen

Zu den eluierten Fraktionen wurde jeweils 50 µl Neutralisationspuffer gegeben. Der Proteingehalt und die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurden auf einem SDS-Gel bestimmt. Hierfür wurden 7,5 µl Probe und die gleiche Menge Proteinprobenpuffer aufgekocht, auf einem Laemmli-SDS-Gel (siehe 7.3.4.2) aufgetrennt und der Proteingehalt mit einem BSA Standard abgeschätzt.

7.3.1.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

- Glutathion Sepharose® 4B (GE Healthcare, 75%ige Suspension in 20 % Ethanol)
- PBS (pH 7,4):
 - 140 mM NaCl
 - 2,6 mM KCl
 - 6,4 mM Na₂HPO₄
 - 1,4 mM KH₂PO₄
 - pH 7,4
- Aufschlusspuffer:
 - PBS (pH 7,4)
 - 1 % (v/v) Triton™ X-100
- Elutionspuffer (pH 8,0):
 - 50 mM Tris/HCl pH 8,0
 - 10 mM reduziertes Glutathion (GE Healthcare)

Für die Herstellung eines GST-Fusionsproteins, wurde das entsprechende DNA Fragment unter Berücksichtigung des richtigen Leserasters in den pGEX-5x-1 Vektor (GE Healthcare, München) kloniert. Nach Expression dieses Konstrukts in Bakterien des Stammes *E.coli* Rosetta™ erhält man ein Fusionsprotein, das aus der Glutathion-S-Transferase, einem Enzym mit einer molekularen Masse

von ca. 26 kDa und dem spezifischen Protein besteht. Über den GST-Anteil ist dann eine Aufreinigung des Proteins möglich.

Expression des GST-Fusionsproteins

Die Expression des GST-Fusionsproteins erfolgte wie für das HIS-Fusionsprotein beschrieben (siehe 7.3.1.1).

Aufschluss der Bakterien

Der Aufschluss der Bakterien wurde, wie für die Aufreinigung des HIS-Fusionsproteins beschrieben, durchgeführt (siehe 7.3.1.1) mit der Abwandlung, dass die Lyse des Bakterienpellets in Aufschlusspuffer (1/20 des Kulturausgangsvolumens) durchgeführt wurde.

Aufreinigung des GST-Fusionsproteins

Herstellung Glutathion Sepharose Matrix

Für 400 ml Ausgangsvolumen der Bakterienkultur wurden 200 µl der Glutathion Sepharose® 4B Suspension verwendet. Die Matrix wurde bei 500g für 5 min und 4°C pelletiert, der Überstand verworfen und die Matrix zweimal in kaltem PBS gewaschen.

Aufreinigung des GST-Fusionsproteins

Der Überstand der sonifizierten Bakterien wurde zu der Glutathion Sepharose Matrix gegeben und 30 min unter Rollen bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde das GST-Fusionsprotein durch Zugabe von 200 µl Elutionspuffer unter Rollen für 10 min eluiert. Die Matrix wurde 5 min bei 500g und 4°C zentrifugiert und der Überstand, der das Fusionsprotein enthält, konnte abgenommen werden. Es folgten fünf weitere Elutionsschritte. Die Proteinmenge und Reinheit der Elutionsfraktionen wurde im Anschluss auf einem Laemmli-SDS-Gel (siehe 7.3.4.2) analysiert. Die Proben konnte kurzfristig bei 4°C, längerfristig bei -20°C gelagert werden.

7.3.2 Methanol/Chloroformfällung von Proteinen

Einer zu fällenden Proteinlösung wurde das vierfache Volumen eisgekühlten Methanols, das einfache Volumen Chloroform sowie das dreifache Volumen eisgekühlten H₂O zugegeben und auf einem Vortexer gemischt. Der Ansatz wurde für 10 min auf Eis inkubiert und danach bei 13000g zentrifugiert. Es bildeten sich zwei Phasen, an deren Grenze (Interphase) sich das denaturierte Protein befand. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Dem verbliebenen Ansatz, der sich aus der chloroformhaltigen unteren Phase und der proteinhaltigen Interphase zusammensetzt, wurde das vierfache Volumen Methanol, bezogen auf das Ausgangsvolumen, zusetzt. Das Gemisch wurde für 2 min bei 13000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet luftgetrocknet und je nach weiterer Verfahrensweise (z.B.: Laemmli-SDS-PAGE (7.3.4.2) oder Immunisierung (siehe 7.3.3.1)) bearbeitet.

7.3.3 Produktion von Antikörpern

7.3.3.1 Immunisierung

Da für SYCE3 keine käuflich zu erwerbenden Antikörper zur Verfügung standen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei SYCE3-spezifische Antikörper hergestellt. Für die Immunisierung wurde für beide Antikörper ein GST-SYCE3 Fusionsprotein als Antigen verwendet, um die Immunreaktion durch die Vergrößerung des Moleküls (SYCE3 alleine: ca. 10 kDa, GST-SYCE3: ca. 36 kDa) zu verstärken. Es wurde ein Kaninchen und ein Meerschweinchen immunisiert (SEQLAB, Göttingen).

7.3.3.2 Aufreinigung polyklonaler Antiseren

- Bindepuffer (pH 8,3): 200 mM M NaHCO₃
500 mM NaCl
- Waschpuffer 1 (4°C): 1 mM HCl
- Puffer A (pH 8,3): 500 mM C₂H₇NO (Ethanolamin)
500 mM NaCl
- Puffer B (pH 4,0): 100 mM Essigsäure
500 mM NaCl
- Waschpuffer 2: 3,5 M MgCl₂
- PBS (pH 7,4): (siehe 7.3.1.2)
- PBS + 350 mM NaCl (pH 7,4): (insg. 490 mM NaCl)
- Elutionspuffer (pH 2,5): 100 mM Glycin
- Neutralisierungspuffer (pH 9,5): 1 M Tris/HCl
- Lagerungspuffer (pH 7,0): 50 mM Na₂HPO₄
0,1% (w/v) NaN₃

Alle Puffer wurden vor Gebrauch frisch angesetzt und steril filtriert.

Kopplung des Antigens an die NHS aktivierte Sepharose

Für die Aufreinigung wurde eine 1 ml NHS aktivierte HiTrapTM Säule (GE Healthcare, München) verwendet. Für alle Waschschrte wurde die Säule über ein Schlauchsystem an eine Laborpumpe angeschlossen. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass die Säule nicht trocken lief oder Luftblasen durch die Schläuche in die Säule gelangten. Die Waschpuffer wurden in einer Fließgeschwindigkeit von ca. 1-2 ml pro Minute auf die Säule geladen.

Vor dem Beladen der Säule mit der Antigenlösung, wurde sie mit 6 ml eiskaltem Waschpuffer 1 gewaschen. Im Anschluss wurde das Antigen - in diesem Fall gereinigtes HIS-SYCE3 - Methanol/Chloroform gefällt (siehe 7.3.2), in 1 ml Bindepuffer aufgenommen und mit Hilfe einer

Spritze auf die Säule gegeben und dort 1 h inkubiert. Vor dem Beladen der Säule wurde die Proteinlösung für 5 min bei 3000g und 4°C zentrifugiert, damit keine ungelösten Partikel in die Säule gelangten. Nach dem Beladen der Säule wurde sie mit 6 ml Puffer A, 6 ml Puffer B und nochmals mit 6 ml Puffer A gewaschen. In Puffer A wurde die Säule 1 h bei RT inkubiert, um freie Bindungsstellen mit Ethanolamin abzusättigen. Die Säule wurde nochmals mit 6 ml Puffer B, 6 ml Puffer A und Puffer B gewaschen und war nun bereit für die Affinitätsreinigung des Antiserums. Sie konnte für kürzere Zeit bei 4°C und längerfristig in Lagerungspuffer bei 4°C gelagert werden.

Affinitätsreinigung des Serums

3-5 ml Meerschweinenserum oder 10 ml Kaninchenserum wurden 10 min bei 3000g, 4°C zentrifugiert und der Überstand in 1:10 PBS verdünnt. Die mit Antigen beladene Säule wurde mit 10 ml Waschpuffer 2 gewaschen, um ungebundene Antigenbruchstücke aus der Säule zu entfernen. Im Anschluss wusch man die Säule mit 30 ml PBS und konnte dann das in PBS verdünnte Antiserum auf die Säule laden. Insgesamt wurde die Säule viermal mit dem Antiserum beladen. Danach wusch man die Säule mit 30 ml PBS (Meerschweinenserum) bzw. 50 ml PBS (Kaninchenserum), 30 ml PBS + 350 mM NaCl (Meerschweinenserum) bzw. 50 ml PBS + 350 mM NaCl (Kaninchenserum) und 10 ml PBS (Angabe für beide Seren).

Nach diesen Waschschritten konnte der Antikörper eluiert werden. Hierfür wurden 15 ml Elutionspuffer mit einer Fließgeschwindigkeit von 3 ml pro Minute auf die Säule gegeben und der Durchlauf in einem 15 ml Greiner Röhrchen aufgefangen. Nach jedem Milliliter wurden 50 µl Neutralisationspuffer zu dem Eluat pipettiert. Die Säule wurde mit 20 ml PBS gewaschen und schließlich im Lagerungspuffer bei 4°C aufbewahrt.

Dialyse des Antikörpers

Um Antikörperbruchstücke zu entfernen und die Pufferbedingungen zu ändern, wurde die Antikörperlösung über Nacht bei 4°C gegen 4 l gekühltes PBS dialysiert (Ausschlussgrenze des Dialyseschlauchs: 50 kDa).

Einengen des Antikörpers

Zum Einengen des Antikörpers wurden Centriplus YM 50 (Millipore) Centricons nach Herstellerprotokoll verwendet. Die Dichte der Antikörperlösung wurde mit einem Photometer bestimmt, wobei solange weiter eingengt wurde, bis eine OD₂₈₀ von 1,48 erreicht wurde, was einer Antikörperkonzentration von 1mg/ml entsprach. Konnte diese Konzentration wegen der zu geringen Gesamtmenge an aufgereinigtem Antikörper nicht erreicht werden, wurde die Lösung mit BSA in einer Endkonzentration von 1 mg/ml stabilisiert.

7.3.4 Auftrennung von Proteinen mittels Gelelektrophorese

Proteingemische können durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt werden. Im Allgemeinen hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von Molekülen in einem elektrischen Feld von drei Faktoren ab: ihrer Masse, ihrer Form und ihrer elektrischen Ladung. Bei der SDS-PAGE ist für die Wanderungsgeschwindigkeit ausschließlich die Masse von Bedeutung. Dies wird durch die Zugabe von Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) und β-Mercaptoethanol erreicht: SDS ist ein starkes anionisches Detergenz und besitzt die Fähigkeit, die Eigenladungen von Proteinen zu maskieren.

Durch Zugabe von Thiolen (β -Mercaptoethanol) werden Disulfidbrücken der Proteine durch Reduktion gespalten und liegen dadurch vollständig gestreckt vor. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Arten der SDS-PAGE verwendet: Für die Auftrennung von SYCE3 aus einer Hodensuspension wurde die Tricin-SDS-PAGE angewandt, die sich besonders zur Auftrennung von Proteinen eignet, deren relative Molekülmasse kleiner als 30 kDa ist (Schagger, 2006). Für größere Proteine wurde die SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet.

7.3.4.1 *Tricin-SDS-PAGE*

- Lösung A: 29,22% (w/v) Acrylamid
0,8% (w/v) Bisacrylamid
- Gelpuffer (10x): 3 M Tris
1 M HCl
0,3% SDS
pH 8,45
- Anodenpuffer (10x) (pH 8,9): 1 M Tris
0,225 M HCL
- Kathodenpuffer (10x): 1 M Tris
1 M Tricin
1% SDS
(pH nicht einstellen, liegt bei 8,25)
- 10% (w/v) APS in ddH₂O
- TEMED (Roth)
- 2x Probenpuffer (pH 6,8): 120 mM Tris/HCl
10% (w/v) SDS
20% (v/v) Glycerin
20% β -Mercaptoethanol

Vorbereitung der Proben:

Die Proteinproben wurden in 2x Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C aufgekocht, um die Proteine zu denaturieren. Nach einer kurzen Zentrifugation konnten sie für die SDS-PAGE eingesetzt werden.

Tricin-SDS-PAGE:

Das Gel wurde zwischen zwei mit Spacern getrennte Glasplatten gegossen. Die Unterseite wurde mit Gewebeband und 0,5%iger Agarose abgedichtet und die Glasplatten wurden bis 2/3 mit Trenngellösung befüllt, die - wie im Pipettierschema beschrieben - vorher zusammengemischt wurde. Das Trenngel wurde mit 1 ml H₂O überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Wasser abgegossen, das Sammelgel (Zusammensetzung siehe Pipettierschema) über das Trenngel geschichtet und der Kamm in das noch flüssige Sammelgel gesteckt. Nach der Aushärtung des Sammelgels, wurde der Kamm vorsichtig gezogen, das Gewebeband entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Anodenkammer (unten) wurde mit 1x Anodenpuffer

aufgefüllt, die Kathodenkammer (oben) mit 1x Kathodenpuffer. Nun konnten die in Probenpuffer aufgenommenen Proben in die Geltaschen geladen werden. Das Gel wurde bei 30 V gefahren, bis die Proteine das Trenngel erreicht hatten, dann wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde das Gel aus den Glasplatten herausgenommen, das Sammelgel sowie die Agarose entfernt und das Trenngel entweder im Coomassie-Färber gefärbt (siehe 7.3.5) oder für einen Immun-Blot (siehe 7.3.6) verwendet.

Pipettierschema:

Trenngel (16% mit Harnstoff)		Sammelgel	
Lösung A	5,3 ml	Lösung A	1,6ml
Gelpuffer	3,3 ml	Gelpuffer	4 ml
Harnstoff	3,6 g	Harnstoff	-
APS	100 µl	APS	150 µl
TEMED	20 µl	TEMED	20 µl
H ₂ O	Auf 10 ml auffüllen	H ₂ O	6,3 ml

7.3.4.2 Laemmli-SDS-PAGE

- Lösung A: 29,22% (w/v) Acrylamid
0,8% (w/v) Bisacrylamid
- Lösung B (Trenngelpuffer): 1 M Tris/HCl, pH 8,7
- 20% (w/v) SDS
- Lösung C (Sammelgelpuffer): 1 M Tris/HCl, pH 6,8
- Laufpuffer (pH 8,5): 25 mM Tris/HCl
112 mM Glycin
0,1% SDS
- 10% (w/v) APS in ddH₂O
- TEMED (Roth)
- 2x Probenpuffer (pH 6,8): 120 mM Tris/HCl
10% (w/v) SDS
20% (v/v) Glycerin
20% β-Mercaptoethanol

Vorbereitung der Proben:

Die Proteinproben wurden in einer geeigneten Menge an 2x Probenpuffer aufgenommen und zum Denaturieren 5 min bei 95°C aufgeköcht. Im Anschluss wurden die Proben kurz zentrifugiert und auf das Gel geladen.

Laemmli-SDS-PAGE

Das Gel wurde in gleicher Weise - wie für die Tricin-SDS-PAGE (siehe 7.3.4.1) beschrieben - gegossen, außer, dass Trenngel-Lösung und Sammelgel-Lösung andere Zusammensetzungen aufwiesen. Die Zusammensetzung der beiden Lösungen für die Laemmli-SDS-PAGE ist folgendem Pipettierschema zu entnehmen:

Trenngel					
	8%	9%	10%	12%	15%
Lösung A	4 ml	4,5 ml	5 ml	6 ml	7,5 ml
Lösung B	5,6 ml	5,6 ml	5,6 ml	5,6 ml	5,6 ml
20% SDS	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl
ddH₂O	5,215 ml	4,715 ml	4,215 ml	3,125 ml	1,715 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

Sammelgel	
	5%
Lösung A	1,67 ml
Lösung B	1,25 ml
20% SDS	50 µl
ddH₂O	6,925 ml
TEMED	10 µl
APS	150 µl

Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde es in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Laufpuffer gefüllt. Vor dem Beladen der Proben in 2xProteinprobenpuffer wurden diese kurz zentrifugiert. Das Gel wurde mit einer anfänglichen Spannung von 60 V gefahren, bis die Lauffront das Trenngel erreicht hatte und die Spannung konstant auf 120-150 V erhöht wurde. Nach Beendigung der Gelelektrophorese konnte das Gel in Coomassie Blau (siehe 7.3.5) gefärbt oder in einem Immun-Blot (siehe 7.3.6) weiter verarbeitet werden.

7.3.5 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

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

Das Trenngel wurde 1 h in der Coomassie Blau-Färbelösung gefärbt und im Anschluss solange in der Entfärbelösung entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

7.3.6 Immun-Blot

Der Immun-Blot (Western Blot) ermöglicht es spezifische Proteine in einem Proteingemisch zu identifizieren. Hierzu wird das Proteingemisch mittels der *Laemmli*-SDS-PAGE (siehe 7.3.4.2) oder der Tricin-SDS-PAGE (siehe 7.3.4.1) aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert, auf der das jeweilige Protein mit einem spezifischen Primärantikörper inkubiert wird. Dieser wird mit einem Sekundärantikörper, an den das Enzym Peroxidase gekoppelt ist, durch ECL (*enhanced chemiluminescens*) visualisiert.

- CAPS-Puffer (pH 10): 50 mM CAPS
10 % (v/v) Methanol
1 mM Mercaptopropionsäure
- TBST (pH 7,4): 150 mM NaCl
10 mM Tris/HCl
0,1 % (v/v) Tween
- 5 % (w/v) Milch in TBST (pH 7,4)
- Ponceau S (Sigma; 0,2 % Ponceau-S in 3 % TCA)

7.3.6.1 Transfer der Proteine auf Nitrocellulose

Nach der SDS-PAGE (siehe 7.3.4) wurde das Gel für 10 min in CAPS Puffer equilibriert. Die Nitrocellulose-Membran und die Whatman Papiere wurden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und ebenfalls in CAPS Puffer equilibriert. Anschließend wurde der Blot in einer Graphitkammer, wie in Abbildung 7-2 beschrieben, aufgebaut. Um eventuelle Luftblasen aus dem System zu entfernen, wurde vorsichtig mit einem Greiner Röhrchen über die einzelnen Schichten gerollt. Es wurde bei Proteinen unter 30 kDa 30 min bei 1 mA/cm^2 , bei größeren Proteinen für 1 h bei gleicher Stromstärke geblottet.

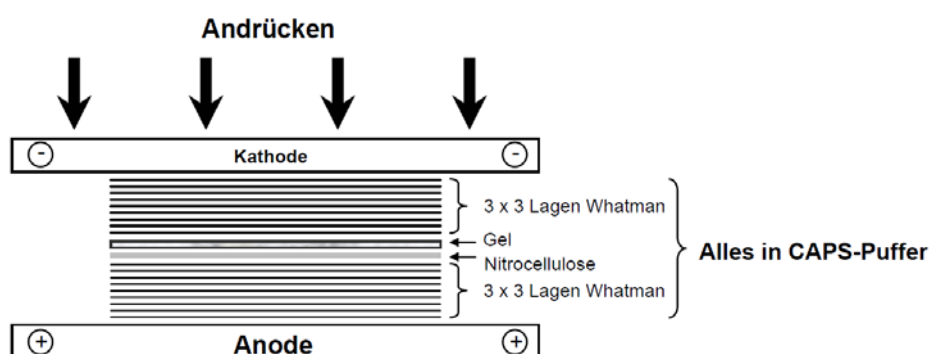


Abbildung 7-2: Aufbauschema für Immun-Blot

7.3.6.2 Anfärben der transferierten Proteine

Die Proteine wurden auf der Membran durch eine Färbung mit Ponceau S sichtbar gemacht. Hierzu wurde der Blot vorsichtig abgebaut, und die Membran für 3 min bei RT in Ponceau S Lösung inkubiert. Danach wurde der Blot mit H₂O gewaschen bis die Proteinbanden (bei erfolgreichem Transfer) sichtbar wurden. Die Markerbanden und Spuren auf dem Gel konnten mit einem Graphitstift markiert werden.

7.3.6.3 Antikörperinkubation der Nitrocellulose und ECL-Reaktion

Nach dem Anfärben der markierten Proteine wurde die Membran in 5% Milch in TBST über Nacht bei 4°C abgesättigt. Am folgenden Tag wurde der Blot weitere 2 h bei RT in 5%iger Milchlösung inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1 h bei RT. Dieser wurde, je nach erforderlicher Konzentration des jeweiligen Antikörpers, in 5%iger Milchlösung verdünnt. Vor der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde der Blot dreimal 10 min bei RT in TBST gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde 1:10000 in 5%iger Milchlösung verdünnt und für 45 min inkubiert. Der Blot wurde dreimal für 10 min in TBST gewaschen. Die Detektion des Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte mit dem Western Lightning®- Plus-ECL Kit (PerkinElmer, Rodgau) nach Herstellerprotokoll.

7.3.7 Koimmunpräzipitation im heterologen System

Ziel einer Koimmunpräzipitation (IP) ist es, eine Interaktion zwischen Proteinen nachzuweisen. Um die Bindungspartner von SYCE3 zu untersuchen, wurde die IP in dieser Arbeit im heterologen System nach (Stewart-Hutchinson *et al.*, 2008) durchgeführt. Hierzu wurden COS-7 Zellen mit myc- und EGFP-Fusions-Konstrukten transfiziert. Nach Expression der rekombinanten Proteine wurden die Zellen lysiert und die Proteinkomplexe konnten mit einem anti-EGFP oder anti-myc Antikörper gefischt werden. Die Protein/Antikörper Komplexe wurden dann mit Proteine G Dynabeads (Invitrogen, Darmstadt) präzipitiert und konnten mittels SDS-PAGE und Immun-Blot untersucht werden.

- PBS (pH 7,4): (siehe 7.3.1.2)
- RIPA Puffer (pH 7,4): 1x PBS (siehe 7.3.1.2)
1% Triton x-100
0,5% Deoxycholate
0,1% SDS
1 mM β -Glycerophosphate
1 mM Na₃VO₄
1 mM EGTA
1 mM EDTA
Protease und Phosphatase Inhibitor Mix (Roche)

Transfektion der Kulturzellen

Für jede IP wurden zwei konfluente 60mm Petrischalen COS-7 Zellen mit Effectene (QUIAGEN, Hilden) nach Herstellerprotokoll transfiziert. Pro 60mm Schale wurde 1 μ g des jeweiligen DNA Konstrukts verwendet.

Lyse der Zellen

24 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Hierzu wurde das Kulturmedium aus der Petrischale entfernt und die Zellen mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml PBS mit einem Zellschaber geerntet und durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 4°C und 500g pelletiert. Das Pellet wurde in 250 µl RIPA Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Um unlösliche Zellbestandteile zu entfernen, folgte eine 15 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm, 4°C. Vom Überstand wurden 12,5 µl abgenommen und mit der gleichen Menge an 2x Proteinprobenpuffer (siehe 7.3.4.2) versetzt (Input).

Präzipitation der Proteinkomplexe

Zu den restlichen 225 µl Überstand wurde 1 µg anti-myc oder anti-EGFP Antikörper hinzugegeben und über Nacht bei 4°C unter Rollen inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Antikörper/Antigenkomplex mit 10 µl Protein G Dynabeads (Invitrogen, Darmstadt) für 2 h inkubiert. Nach der Inkubation konnten die Dynabeads mit gebundenem Antikörper/Antigenkomplex durch eine 1 minütige Zentrifugation bei 500g, 4°C präzipitiert, für 1 min auf einen Magneten gestellt und der Überstand abgenommen werden. Die Dynabeads wurden dreimal mit 500 µl PBS gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift wurden die Dynabeads jeweils 1 min bei 500g, 4°C zentrifugiert und für 1 min auf einen Magneten gestellt, um den Überstand abzunehmen. Das Dynabeads-Pellet wurde in 25 µl Proteinprobenpuffer aufgenommen und konnte mit einem Immun-Blot analysiert werden (siehe 7.3.6).

7.4 Zellkultur

7.4.1 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% CO₂-Gehalt. Die für die Transfektion verwendeten Zellen wurden in mit Medium gefüllten Petrischälchen (60 mm, Sarstedt, Nürmbrecht), in die ein Deckgläschen gelegt wurde, ausgesät und konnten am Folgetag mit der gewünschten Plasmid-DNA transfiziert werden.

7.4.2 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, um in den Zellkern zu gelangen. Für die Transfektion wurde das EffecteneTM Transfection Reagent der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellerprotokolls verwendet. Für die Transfektionen wurde jeweils 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt im Brutschrank. Danach konnten die transfizierten Zellen für die IP (siehe 7.3.7) oder Immunfluoreszenz (siehe 7.5.4) weiterverarbeitet werden.

7.5 Licht- und elektronenmikroskopische Methoden

7.5.1 Gewebepräparation

7.5.1.1 Herstellung und Verarbeitung von gefrorenem Gewebe

7.5.1.1.1 Einfrieren von Geweben

Mäuse wurden mit CO₂ eingeschläfert und die Hoden wurden entnommen, halbiert und für 3 min in -140°C gekühltes Methylbutan überführt. Die Hoden konnten in Methylbutan bei -70°C gelagert werden.

7.5.1.1.2 Gefrierschnitte

Gefrierschnitte (Dicke: 5-12 µm) wurden mit dem Gefriermikrotom 2800 FRIGOCUT E von Reichert-Jung (Heidelberg) hergestellt. Diese wurden auf SuperFrost Plus Objektträger überführt und konnten für Immunfluoreszenz-Analysen (siehe 7.5.5 und 7.5.6) und Immungold-Lokalisation (siehe 7.5.9.3) eingesetzt werden.

7.5.1.2 Spreitungen von Hodengewebe

Spreitungen von Spermatozyten wurden nach dem „dry down“ Verfahren von de Boer und Kollegen (2009) aus frischem bzw. eingefrorenem Hodengewebe hergestellt. Bei einer Spreitung werden die Zellkerne der Spermatozyten flach auf einer großen Fläche verteilt, was den Vorteil hat, dass Strukturen wie der Synaptonemalkomplex für eine Immunfluoreszenz besser zugänglich sind.

- PBS (pH 7,4): (siehe 7.3.1.2)
- Hypotonischer Puffer (pH 8,2): 30 mM Tris/HCl
17 mM Natriumcitrat
5 mM EDTA
50 mM Sucrose
→ pH einstellen
5 mM DTT (aus 1 M DTT-Stammlösung in ddH₂O)
- Sucrose 100 mM
- Paraformaldehyd (pH 9,2): 1 g PFA in 80 ml ddH₂O + ca. 15 µl 1 M NaOH auf
60°C erhitzen und lösen
→ auf Eis auf 20°C abkühlen
→ pH einstellen
→ +20 ml ddH₂O, steril filtrieren
→ +0,15 % Triton X-100

Herstellung von Spreitungen aus frischem Gewebe

Aus männlichen, mit CO₂ eingeschläfert Mäusen wurden die Hoden entnommen und einzelne Samenkanälchen in eine Petrischale mit hypotonischem Puffer überführt, in dem sie ca. 30 min quellen mussten. Pro Objektträger wurde ein aufgequollenes Samenkanälchen in 20 µl Sucrose resuspendiert, indem dieser zunächst mit zwei Uhrmacherpinzetten in kleine Stücke gerissen und

dann mit einer 10 µl Pipette in der Sucrose weitestgehend gelöst wurde. Nicht gelöste Gewebestücke wurden dabei aus der Lösung entfernt. Für das Spreiten der Zellen wurde ein Objektträger in die 1%ige Paraformaldehyd/0,15% Triton Lösung getaucht. Man ließ so viel Flüssigkeit abtropfen, bis nur ein Tropfen in einer Ecke des Objektträgers übrig war. In diesen Tropfen wurden die Sucroslösung pipettiert und durch Schwenken über den gesamten Objektträger verteilt. Die Fixierung (durch Paraformaldehyd) und Permeabilisierung (durch Triton) der Zellen auf dem Objektträger erfolgt in einer geschlossenen Feuchtekammer für 2 h bei RT. Danach wurden die Objektträger weitere 30 min bei halb offener und im Anschluss bei vollständig geöffneter Feuchtekammer getrocknet. Die Objektträger konnten für die längere Aufbewahrung in Alufolie verpackt und bei -70°C gelagert werden.

Herstellung von Spreitungen aus gefrorenem Gewebe

Die Spreitung von gefrorenem Hodengewebe erfolgte ähnlich wie die aus frischem Gewebe. In diesem Fall wurde ein kleines Stück Hodengewebe in PBS gelöst und die dadurch entstandene Suspension großflächig auf einem SuperFrost Plus Objektträger verteilt. Dort ließ man die Zellen 10 min absetzen. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und 500 µl Hypotonischer Puffer auf den Objektträger pipettiert. Nach einer erneuten Wartezeit von 10 min wurde auch dieser Überstand vorsichtig abgenommen und der Objektträger konnte in die 1%ige Paraformaldehyd/0,15% Triton Lösung getaucht werden. Auch hier ließ man den Großteil der Lösung abtropfen und pipettierte 20 µl Sucroslösung in den verbleibenden Tropfen, der sich an einer Seite des Objektträgers gebildet hatte. Unter Schwenken wurde die Sucrose auf dem Objektträger verteilt und 2h in einer geschlossenen und 30 min in einer halb geöffneten Feuchtekammer inkubiert. Abschließend wurden die Objektträger bei vollständig geöffneter Feuchtekammer getrocknet und konnten zur längeren Lagerung in Alufolie verpackt bei -70°C gelagert werden.

7.5.1.3 Spreitungen von embryonalem Ovar

- PBS (pH 7,4): (siehe 7.3.1.2)
- Sucrose 100 mM
- 1% Paraformaldehyd (pH 9,0): 1 g PFA in 80 ml ddH₂O + ca. 15 µl 1 M NaOH auf 60°C erhitzen und lösen
→ auf Eis auf 20°C abkühlen
→ pH einstellen
→ +20 ml ddH₂O, steril filtrieren
→ +0,15 % Triton X-100
- Hypotonischer Puffer (pH 8,2): 30 mM Tris/HCl
17 mM Natriumcitrat
5 mM EDTA
50 mM Sucrose
→ pH einstellen
5 mM DTT (aus 1 M DTT-Stammlösung in ddH₂O)

Die trächtige Maus wurde mit CO₂ eingeschlüpfert und die Embryonen herauspräpariert und sofort in gekühltes PBS überführt. Die Embryonen wurden dekapitiert, die Ovarien entnommen und sofort in PBS (RT) überführt. Im Anschluss wurden die Ovarien für 15 min in Hypotonischem Puffer inkubiert. Um das Ovar von dem Epithelium superficiale zu befreien, wurde es in einen Tropfen (ca. 25µl) 100 mM Sucrose Lösung überführt, der zuvor auf einen Objektträger pipettiert wurde. Unter dem Mikroskop wurde das Epithel entfernt, das Ovar mit einer Präpariernadel punktiert und 5 min vorsichtig geschüttelt. Nachdem soviel ungelöste Gewebestücke wie möglich aus dem Sucrose Tropfen entfernt wurden, wurde der Objektträger für 5 min in einer Feuchtekammer inkubiert. Im Anschluss wurde das gleiche Volumen 1%ige Paraformaldehyd/0,15% Triton Lösung zu dem Sucrose-Tropfen pipettiert und für 1 Stunde bei geschlossenem und für 30 min bei geöffnetem Deckel inkubiert. Die Objektträger wurden nun in der geöffneten Feuchtekammer bei 37°C getrocknet, bis sie die Konsistenz von Toffee hatten (ca. 1-2h). Die Objektträger konnten in Alufolie verpackt bei -70°C gelagert werden. Bevor die Objektträger für eine Immunfluoreszenz eingesetzt werden konnten, wurden sie dreimal 5 min in PBS gewaschen.

7.5.1.4 Herstellung und Verarbeitung von in Paraffin eingebettetem Gewebe

7.5.1.4.1 Paraffineinbettung von Geweben

Für die histologische Untersuchung von Gewebe durch Hämatoxylin-Eosin Färbung (siehe 7.5.3) oder für den TUNEL Assay (siehe 7.5.2) wurden Hoden und Ovar in 4% Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet.

- PBS: (siehe 7.3.1.2)
- 4% Paraformaldehyd in PBS
- Ethanolreihe (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%)

Aus mit CO₂ eingeschlüpferten Mäusen wurden entweder Hoden oder das Ovar entnommen und anschließend direkt in PBS überführt. Das Gewebe wurden über Nacht bei RT in 4% Paraformaldehyd in einem 50 ml Greiner Röhrchen fixiert und am nächsten Tag einmal in PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgt eine Entwässerung des Gewebes über eine aufsteigende Ethanolreihe von 50%, 60%, 70%, 80%, 90% bis 100% für je 1 h. Danach wurde das Gewebe in 10 ml tertiärem Butanol für genau eine Stunde inkubiert, direkt danach in ein Schälchen mit flüssigem Paraffin überführt und über Nacht bei 60°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde es in ein Schälchen mit frischem, flüssigem Paraffin überführt und in dem Schälchen ausgerichtet. Danach ließ man das Gewebe in Paraffin bei RT für ca. 2 h aushärten.

7.5.1.4.2 Anfertigen von Paraffinschnitten

Eine Heizplatte wurde auf 58°C erhitzt, das in Paraffin eingebettete Gewebe mit Hilfe eines erhitzten Spatels auf einen kleinen Holzblock geklebt und in das Paraffinmikrotom eingespannt. Nun wurden Schnitte der gewünschten Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden mit einem feinen Pinsel auf einen Wassertropfen, der zuvor auf einen SuperFrost Plus Objektträger pipettiert wurde, überführt und solange auf die Heizplatte gelegt, bis sich die Schnitte streckten. Das Wasser wurde danach mit einem Tuch vorsichtig entfernt und das restliche Wasser durch kräftiges Schleudern des

Objektträgers abgeschüttelt. Die Qualität der Schnitte wurde unter dem Mikroskop geprüft. Vor der weiteren Verwendung der Schnitte wurden diese bei RT 1 h getrocknet.

7.5.1.4.3 Entparaffinierung der Schnitte

- Roti®-Histol (Roth)
- Ethanolreihe (100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%)
- PBS (siehe 7.3.1.2)

Die Schnitte wurden zunächst zweimal 5 min in Roti®-Histol entparaffiniert und danach in einer absteigenden Ethanolreihe für je 1 min rehydriert. Die Objektträger wurden für 5 min in 50%igem Ethanol inkubiert und danach 5 min in ddH₂O gewaschen. Danach standen sie für weitere Versuche zur Verfügung.

7.5.2 TUNEL-Assay

Der TUNEL-Assay wurde auf Paraffinschnitten nach Herstellerprotokoll (ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis, Chemicon) mit folgenden Abweichungen durchgeführt: Die Schnitte wurden wie unter (siehe 7.5.1.4.3) entparaffiniert. Außerdem wurde zur Detektion der apoptotischen Zellen kein DIG-Peroxidase Antikörper, sondern ein monoklonaler DIG anti-Maus Antikörper der Firma Roche (Mannheim) in der Verdünnung 1:100 verwendet.

7.5.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung

- Ethanolreihe (100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%)
- Hämatoxylin Lösung nach Meyer (Fluka, München)
- 1%ige Eosin Lösung
- Roti®-Histokitt (Roth, Karlsruhe)

Paraffinschnitte wurden wie unter 7.5.1.4.2 beschrieben hergestellt und über Nacht getrocknet. Am folgenden Tag erfolgt die Entparaffinierung der Schnitte wie unter 7.5.1.4.3 beschrieben. Zum Anfärben der sauren Bestandteile der Zelle (hauptsächlich Zellkerne) wurden die Präparate 10 min mit 150 µl Hämatoxylin Lösung nach Meyer in der Feuchtekammer inkubiert. Die Präparate wurden kurz in Leitungswasser gewaschen und danach für 3-10 min in Leitungswasser gebläut. Die Intensität der Färbung wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Präparate kurz mit ddH₂O gespült und für 5 min in ddH₂O gewaschen. Anschließend erfolgte das Anfärben der cytoplasmatischen Bestandteile der Zellen durch Eosin Färbung der Präparate mit 150 µl 1%iger Eosin Lösung für 20 min in der Feuchtekammer. Vor dem Eindeckeln der Präparate mit Roti®-Histokitt wurden die Präparate für je eine Minute in 50%igem, 70%igem und 100%igem EtOH dehydriert und kurz in Rotihistol getaucht.

7.5.4 Immunfluoreszenz auf Zellen

- PBS (pH 7,4): (siehe 7.3.1.2)
- 1% Formaldehyd in PBS (pH 7,4)
- 0,1% Triton in PBS (pH 7,4)
- 100 mM Glycin in PBS (pH 7,4)
- Hoechst 33258: Arbeitskonzentration 1:333 in PBS (Roche)

Die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen (siehe 7.4.1) wurden in einem Deckgläschen-Ständer in PBS gesammelt und im Anschluss für 3 min in 1%igem Formaldehyd in PBS fixiert. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zellen für 10 min in 0,1% Triton in PBS. Nach zweimaligem Waschen der Zellen für 7 min in PBS wurden die freien Antikörperbindungsstellen für 30 min in der Feuchtekammer mit der 100 mM Glycin Lösung abgesättigt. Die Deckgläschen wurden kurzzeitig in frisches PBS überführt. Nach dem Transfer in eine Feuchtekammer wurde sofort der Primäantikörper für 30 min auf die Deckgläschen geschichtet. Nach zweimaligem Waschen für 7 min wurde der entsprechende Sekundäantikörper für 20 min auf die Deckgläschen pipettiert. Nach 10 min wurde pro Deckgläschen ein Tropfen Hoechst 33258 in seiner Arbeitskonzentration hinzugegeben. Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und konnten in einem 1:1 Gemisch aus PBS und Glycerin eingebettet werden.

7.5.5 Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten

- PBS (pH 7,4): (siehe 7.3.1.2)
- 1% Formaldehyd in PBS (pH 7,4)
- 0,1% Triton in PBS (pH 7,4)
- PBT (pH 7,4):
 PBS
 1,5% BSA
 0,1% Tween 20
- Hoechst 33258: Arbeitskonzentration 1:333 in PBS (Roche)

Die Gefrierschnitte (siehe 7.5.1.1.2) wurden nach dem Trocknen 3 min in 1% Formaldehydlösung fixiert und danach für 10 min in 0,1%igem Triton in PBS permeabilisiert. Anschließend wusch man die Präparate zweimal 7 min in PBS und blockte die Schnitte für 1 h in PBT in der Feuchteammer. Darauf folgt die Antikörperinkubation mit dem Primärantikörper in der entsprechenden Konzentration für 30 min bei RT. Nach zweimaligem Waschen für 7 min in PBS wurde der entsprechende Sekundärantikörper auf den Schnitt pipettiert und 20 min inkubiert. Zehn Minuten vor Ende der Inkubationszeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst in seiner Arbeitskonzentration in PBS zugefügt. Vor dem Eindeckeln der Schnitte in einem 1:1 Gemisch aus Glycerin und PBS wurden die Präparate zweimal 7 min in PBS gewaschen.

7.5.6 Immunfluoreszenz auf Spreitungen

- PBS (pH 7,4): (siehe 7.3.1.2)
- Blockinglösung (pH 7,4): 5 % Milch
 5 % Kälberserum (FCS) in PBS
 → bei -20°C lagern
 → vor Gebrauch 1 mM PMSF in DMSO hinzufügen
- Hoechst 33258: Arbeitskonzentration 1:333 in PBS (Roche)

Die Spreitungen wurden wie unter 7.5.1.2 beschrieben hergestellt. Um eine Fluoreszenz durchzuführen, wurden die weggefrorenen Präparate in Alufolie auf Raumtemperatur gebracht und zweimal 7 min in PBS gewaschen. Es erfolgte eine halbstündige Inkubation mit Blockinglösung, deren unlösliche Bestandteile vorher bei einer Zentrifugation bei 16000g für 30 min, 4°C pelletiert wurden. Die Blockinglösung wurde entfernt und der Primärantikörper, der zuvor in Blockinglösung verdünnt und ebenfalls 30 min bei 16000g und 4°C zentrifugiert wurde, konnte auf die Objektträger pipettiert werden. Auf den Objektträger wurde vorsichtig ein Deckglas gelegt, damit sich die Antikörperlösung auf der gesamte Fläche verteilt. Nach 30 min wurde das Deckglas vorsichtig entfernt und es folgten zwei Waschschrte für je 7 min in PBS. Nach einer erneuten Absättigung für 30 min in zuvor zentrifugierter Blockinglösung konnte der Sekundärantikörper verdünnt in Blockinglösung (zuvor bei 16000g, 30 min, 4°C zentrifugiert) für 30 min auf dem Präparat inkubiert werden. Auch bei dieser

Inkubation wurde der Objektträger mit einem Deckglas abgedeckt, um den Antikörper besser zu verteilen. 10 min vor Ende der Inkubationszeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst in seiner Arbeitskonzentration zugegeben. Schließlich wurden die Präparate zweimal 7 min in PBS gewaschen und mit einem 1:1 Gemisch aus Glycerin und PBS eingedeckelt.

Um ein unspezifisches Binden von zwei unterschiedlichen Antikörpern bei einer Doppellokalisierung zu vermeiden, erfolgte die Inkubation jedes einzelnen Antikörpers nacheinander (1. Primärantikörper, 1. Sekundärantikörper, 2. Primärantikörper, 2. Sekundärantikörper), wobei vor jedem Schritt für 30 min mit Blockinglösung abgesättigt wurde.

7.5.7 Analyse am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM)

Immunfluoreszenz-Präparate wurden mit einem Leica TCS SP2/AOBS Konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert. Hierbei wurden folgende Einstellungen in der Software verwendet:

- Objektiv: HCX PI APO lbd.Bl. 63x 1.4 Ölimmersionsobjektiv
- Scangeschwindigkeit: 400 mW
- Pinhole: 1 AE
- Zoom: 4-6x für einzelne Zellen
- Anzahl der Scans pro Bild: 3-4

Um einen Epifluoreszenz-Eindruck zu erhalten, wurde der Zellkern in der Z-Achse mit mehreren, aufeinanderfolgenden Scans (ca. 8-15) aufgenommen. Die einzelnen Scans wurden mit dem Algorithmus „maximum projektion“ der Leica Software verrechnet. Wurden im selben Präparat mehrere Fluorochrome aufgenommen, erfolgten die einzelnen Aufnahmen sequentiell. Die digitalen Bilder wurden mit Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA) bearbeitet.

7.5.8 Analyse am Zeiss Axiophot Stereo Fluoreszenzmikroskop

Für Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop wurde das Zeiss Axiophot Fluoreszenz Mikroskop (Zeiss, München, Deutschland) verwendet. Die Aufnahmen wurden entweder mit dem Plan-NEOFLUAR 40x/0,75 oder dem Plan-NEOFLUAR 20x/0,5 Objektiv und der AxioCam MRm (Zeiss) Kamera aufgenommen. Die digitalen Aufnahmen wurden in Photoshop (Adobe Systems) bearbeitet.

7.5.9 Herstellung und Analyse der Präparate für die Elektronenmikroskopie

7.5.9.1 Epon Einbettung

- 2,5% Glutaraldehydlösung (pH 7,2): 2,5% Glutaraldehyd
50 mM KCl
2,5 mM MgCl₂
50 mM Cacodylat
- Cacodylatpuffer (pH 7,2): 50 mM Cacodylat
- OsO₄-Lösung: 2% OsO₄ in 0,05 M Cacodylatpuffer
- Uranylacetatlösung: 0,5% Uranylacetat in ddH₂O

- Ethanolreihe: 50%, 70%, 90%, 96%, 100% Ethanol p.a.
- Propylenoxid
- Epon: Dodecanylsuccinateanhydride
Methylnodicanhydride
Epon 812 (Glycidether 100)
DMP-30 (2,4,6 Triphenol)

Alle Fixierungs- und Waschschrte wurden bei 4° durchgeföhrt. Für die Einbettung von Hodengewebe in Epon wurden wenige kleine Tubuli-Stücke aus einem frisch präparierten Hoden isoliert und für 45 min in 2,5% gepuffertem Glutaraldehyd fixiert. Nach fünfmaligem Waschen in 50 mM Cacodylatpuffer für je 3 min folgte die Fixierung in 2% gepuffertem OsO₄ für 2h. Die Proben wurden im Anschluss fünfmal 3 min in H₂O gewaschen und in 0,5% wässrigem Uranylacetat über Nacht kontrastiert. Am nächsten Tag wusch man die Proben fünfmal 3 min in H₂O. Danach wurden die Gewebstücke in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert (50%, 70%, 90%, 96% 100%, 100%, 100%), wobei die Proben 30 min in der jeweiligen Ethanolmischung auf Eis inkubiert wurden. Darauf folgten drei Inkubationsschritte in Propylenoxid für 30 min bei RT. Die Gewebestücke wurden in ein 1:1 Gemisch aus Propylenoxid und Epon überführt und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag überführte man die Probe in Epon und inkubierte sie für 2 h. Das Epon wurde danach zweimal ausgetauscht und jeweils für weitere 2 h inkubiert. Die Probe wurde in Epon bei 60°C ausgehärtet.

7.5.9.2 Anfertigen von Semidünnschnitten und Ultradünnschnitten

Zur Vorbereitung der Schnittfläche wurde das Präparat in einen Halter gespannt, der in einem Untersatz unter der Stereolupe befestigt wurde. Während des sog. Trimmens wurde das Epon um das Präparat mit einer Rasierklinge entfernt, so dass eine pyramidenförmige Schnittfläche mit einer Kantenlänge von ca. 0,5 mm entstand. Der Eponblock wurde dann in das Ultramikrotom eingespannt. Mit einem Glasmesser wurden einige Semidünnschnitte angefertigt, die nach dem Übertragen auf einen Objektträger und Toluidinblaufärbung unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden konnten. Wurde die richtige Schnittebene erreicht, wurde das Glasmesser gegen ein Diamantmesser ausgetauscht. Die Dicke der Schnitte betrug zwischen 60 und 80 nm. Die Schnitte wurden auf Kupfernetzchen übertragen und getrocknet. Kontrastiert wurden die Netze mit wässrigen 2% Uranylacetat (5 min). Danach wurden sie zweimal für 10 sek in ddH₂O gewaschen. Im Anschluss wurden die Netzchen 5 min mit Bleicitrat inkubiert und kurz in ddH₂O gewaschen. Überschüssige Flüssigkeit wurde mit einem Filterpapier abgesaugt und die Netze getrocknet in einer Grid-Box aufbewahrt.

7.5.9.3 Preembedding Immungold-Lokalisation

- PBS (pH 7,4): (siehe 7.3.1.2)
- 2% Paraformaldehyd in PBS
- Ammoniumchlorid Lösung: 50 mM in PBS
- 2,5% Glutaraldehydlösung: (siehe 7.5.9.1)

Cacodylatpuffer:	(siehe 7.5.9.1)
OsO ₄ -Lösung:	(siehe 7.5.9.1)
Uranylacetatlösung:	(siehe 7.5.9.1)
Ethanolreihe:	50%, 70%, 90%, 96%, 100% Ethanol p.a.
Propylenoxid	
Epon:	(siehe 7.5.9.1)

Es wurden Gefrierschnitte (Dicke 10 µm) (Herstellung siehe 7.5.1.1.2) von Rattenhoden angefertigt und getrocknet. Die Schnitte wurden 10 min in -20°C kaltem Aceton fixiert und getrocknet. Danach folgte die Antikörperinkubation für 4h in der Feuchtekammer (Verdünnungen: anti- SYCE3 (1:500) und anti-SYCP1 VIIIID3 (1:150)). Die Präparate wurden zweimal 5 min in PBS gewaschen und nochmals in 2% Paraformaldehyd nachfixiert. Danach wurden die Proben zweimal 8 min mit Ammoniumchlorid Lösung abgesättigt und zweimal 5 min in PBS gewaschen. Der an 6 nm Goldpartikel gekoppelte Sekundäntikörper wurde in der Verdünnung 1:10 über Nacht in einer Feuchtekammer inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Präparate 6 mal 5 min in PBS gewaschen und es folgte die Einbettung in Epon. Hierzu wurden die Präparate in 2,5% Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer für 30 min fixiert, kurz in Cacodylatpuffer gewaschen und in 2% OsO₄ gepuffert in 0,05M Cacodylatpuffer für 1 h fixiert. Im Anschluss folgte die Entwässerung der Proben, wie unter 7.5.9.1 beschrieben. Zur Aushärtung der Proben bei 60°C, wurde den Präparaten eine mit Epon gefüllte Gelatine kapsel aufgesetzt. Das Deckglas bzw. der Objektträger wurde nach der Aushärtung mit flüssigem Stickstoff abgesprengt. Danach konnten, wie in 7.5.9.2 beschrieben, Ultradünnschnitte der Präparate angefertigt werden.

7.5.9.4 Aufnahmen am Zeiss EM 10 und Entwicklung der Negative

Die transmissionselektronischen Aufnahmen wurden mit dem Zeiss EM 10 aufgenommen. Zur Aufnahme von SCs wurde meist eine Vergrößerung von 24000 gewählt. Die Aufnahmen erfolgten mit der im Mikroskop eingebauten Kamera mit automatischer Belichtungssteuerung. Die Planfilme (Kodak) wurden mit dem EM-Negativentwickler Kodak-D19 (Kodak) entwickelt. Danach wurden die Filme im Fixierbad fixiert. Die Negative wurden mit 1200 dpi eingescannt und abschließend mit Adobe Photoshop (Adobe Systems) bearbeitet.

8 Zusammenfassung

Der Synaptonemalkomplex ist eine evolutionär hoch konservierte Struktur. Er wird spezifisch während der Prophase I der Meiose ausgebildet und ist essentiell für die Segregation der homologen Chromosomen während der Meiose und auch für die Entstehung genetischer Vielfalt. Der Synaptonemalkomplex ist eine proteinöse Struktur, deren Aufbau dem einer Leiter ähnelt. Dabei werden die Leiterholme als Lateralelemente bezeichnet. Sie bestehen unter anderem aus den Proteinen SYCP2 und SYCP3 und assoziieren mit dem Chromatin der homologen Chromosomen. Die Stufen der Leiter bestehen hingegen aus Transversalfilamenten, deren Hauptkomponente parallele Homodimere des meiosespezifische Proteins SYCP1 sind. Dabei wird ein SYCP1 Dimer mit seinem C-Terminus in den Lateralelementen verankert und kann über seine N-terminale Domäne eine schwache Interaktion mit der N-terminalen Domäne eines gegenüberliegenden SYCP1 Dimers eingehen. Um diese Bindung zu stabilisieren werden Proteine des Zentralelements des Synaptonemalkomplexes benötigt: Während SYCE1 durch seine Interaktion mit SYCP1 die N-terminale Assoziation zweier gegenüberliegender SYCP1 Dimere stabilisiert, verknüpfen die zwei anderen zentralelementspezifischen Proteine SYCE2 und Tex12 lateral benachbarte SYCP1 Filamente und breiten so das SYCP1 Netzwerk entlang der chromosomalen Achsen aus. Dieser Prozess wird als Synapse bezeichnet und stellt eines der Schlüsselereignisse der Meiose dar. Fehler während dieses Prozesses führen meist zu Aneuploidie der entstehenden Gameten oder zum Abbruch der Meiose und somit zu Infertilität des betroffenen Organismus.

In dieser Arbeit wurde mit SYCE3 ein neues Protein des murinen Synaptonemalkomplexes charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass SYCE3 meiosespezifisch in Männchen und Weibchen exprimiert wird und Bestandteil des Zentralelements des Synaptonemalkomplexes ist. Hierbei zeigt es dasselbe Verteilungsmuster wie SYCP1 und SYCE1 und kann mit beiden Proteinen interagieren. Eine zusätzliche Interaktion konnte zwischen SYCE3 und SYCE2 nachgewiesen werden. Durch Untersuchungen an entsprechenden Knockout Mausmodellen konnte in dieser Arbeit außerdem gezeigt werden, dass SYCE3 in Abwesenheit von SYCP1 nicht an die chromosomalen Achsen rekrutiert werden kann. Die Ausbildung der Lateralelemente und auch die Anwesenheit der anderen zentralelementspezifischen Proteine SYCE1 und SYCE2 sind hingegen für die Anlagerung von SYCE3 an die chromosomalen Achsen nicht essentiell. Somit steht SYCE3 hinsichtlich seiner Bedeutung für die Paarung und die Synapse der homologen Chromosomen hierarchisch offenbar über den bisher beschriebenen Zentralelementproteinen SYCE1, SYCE2 und Tex12.

Die funktionelle Bedeutung von SYCE3 für die Synapse der homologen Chromosomen und für den korrekten Ablauf der homologen Rekombination wurde im Rahmen dieser Arbeit durch die Herstellung und die Charakterisierung einer *Syce3*^{-/-} Maus detailliert untersucht: Dabei führte der Knockout von SYCE3 zur Infertilität in beiden Geschlechtern, die gleichzeitig mit einer signifikanten Reduktion der Größe der entsprechenden Hoden und Ovarien im Vergleich zum Wildtyp einherging. Weitere Untersuchungen ergaben zudem, dass es in *Syce3* defizienten Tieren zu einem Abbruch der Meiose kommt. Dabei hatte das Fehlen von SYCE3 keinen Einfluss auf die Ausbildung der Axialelemente. Die Initiation der Synapse hingegen war sowohl in Oocyten als auch in Spermatozyten in Abwesenheit von SYCE3 stark gestört. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass das Fehlen von SYCE3 Einfluss auf die homologe Rekombination nimmt: Zwar können sich frühe (DNA Doppelstrangbrüche) und intermediäre (Transitionsknoten)

Rekombinationsereignisse in der Abwesenheit von SYCE3 ausbilden, die Prozessierung zu späten Rekombinationsstrukturen (Rekombinationsknoten) und die damit einhergehende Ausbildung von Crossing-over Strukturen fand jedoch nicht statt.

Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass das neue Synaptonemalkomplexprotein SYCE3 essentiell für die Fertilität von Mäusen ist. Durch den Knockout von *Syce3* kann die Synapse zwischen den Homologen nicht initiiert werden und es findet kein Crossing-over statt. Im Assembly Prozess des Synaptonemalkomplexes agiert SYCE3 oberhalb der anderen zentralelementspezifischen Proteine und unterhalb von SYCP1.

9 Summary

The synaptonemal complex is an evolutionary highly conserved structure. It assembles specifically during prophase I of meiosis and is essential for the segregation of homologous chromosomes and thus represents a major determinant of the genetic diversity of sexually reproducing organisms. The synaptonemal complex is a proteinaceous, ladder-like structure. The ladder beams are termed lateral elements and are composed of the meiosis-specific proteins SYCP2 and SYCP3 which are associated with the chromatin of the homologs. The rungs are made up of transverse filaments mainly consisting of the meiosis-specific protein SYCP1. SYCP1 forms parallel homodimers that are anchored via their C-termini to the lateral elements and interact in a head-to-head fashion with an opposing SYCP1 homodimer. For stabilizing this interaction additional proteins are essential. These are components of the so-called central element of the synaptonemal complex: while SYCE1 stabilizes the N-terminal association of opposing SYCP1 homodimers, the two other central element specific proteins SYCE2 and Tex12 connect adjoined SYCP1 filaments and thus elongate the SYCP1 network along the homologs. This process is termed synapsis and is a key feature of meiosis. Errors occurring during this process frequently lead to aneuploidy of the resulting gametes or cause meiotic arrest and infertility.

Within the scope of this study a novel protein of the murine synaptonemal complex, we named SYCE3, was characterized. SYCE3 is exclusively expressed during male and female meiosis and is a component of the central element. Its expression pattern resembles that of SYCP1 and SYCE1 and it is able to interact with both of these proteins. Additionally, an interaction between SYCE3 and SYCE2 could be verified. In the context of this dissertation it was found that loading of SYCE3 to the chromosomal axis requires SYCP1. In contrast, chromosome loading of SYCE3 was independent of lateral element assembly and of the presence of the other central element specific proteins, SYCE1, SYCE2 and Tex12.

The second thematic complex addressed in this thesis was the relevance of SYCE3 for synapsis and homologous recombination. To this end a *Syce3*^{-/-} mouse was generated. *Syce3*^{-/-} mice are infertile and both testes and ovaries are characterized by a significant reduction in size compared to wild-type littermates. Furthermore, depletion of SYCE3 had no influence on the assembly of axial elements and in males alignment of homologs was not affected. However, *Syce3*^{-/-} oocytes and spermatocytes were unable to initiate synapsis between homologous chromosomes. In addition, homologous recombination was analyzed in the scope of this study and the obtained data strongly points to a central role of SYCE3 during this process: while early (DNA double-strand breaks) and intermediate (transition nodules) recombination events could take place in the absence of SYCE3, structures indicating late recombination events (recombination nodules) and sites of homologous recombination (crossovers) failed to develop.

Taken together, this thesis clearly demonstrates that the novel synaptonemal complex protein SYCE3 is essential for fertility in mice. Deletion of *Syce3* blocks initiation of synapsis and formation of crossovers. During synaptonemal complex assembly, SYCE3 acts downstream of SYCP1, but upstream of other central element proteins (SYCE1, SYCE2 and Tex12).

10 Literaturverzeichnis

- Ahmed EA and de Rooij DG (2009).** Staging of mouse seminiferous tubule cross-sections. *Meiosis: Volume 2, Cytological Methods*, Springer, Berlin Heidelberg, 558, 263–277.
- Albini SM and Jones GH (1984).** Synaptonemal complex-associated centromeres and recombination nodules in plant meiocytes prepared by an improved surface-spreading technique. *Exp Cell Res*, 155, 588–592.
- Albini SM and Jones GH (1987).** Synaptonemal complex spreading in *Allium cepa* and *A. fistulosum*. *Chromosoma*, 95, 324–338.
- Alsheimer M (2009).** The dance floor of meiosis: evolutionary conservation of nuclear envelope attachment and dynamics of meiotic telomeres. *Genome Dyn*, 5, 81–93.
- Alsheimer M, Baier A, Schramm S, Schütz W and Benavente R (2010).** Synaptonemal complex protein SYCP3 exists in two isoforms showing different conservation in mammalian evolution. *Cytogenet Genome Res*, 128, 162–168.
- Alsheimer M and Benavente R (1996).** Change of karyoskeleton during mammalian spermatogenesis: expression pattern of nuclear lamin C2 and its regulation. *Exp Cell Res*, 228, 181–188.
- Baier A, Alsheimer M and Benavente R (2007).** Synaptonemal complex protein SYCP3: conserved polymerization properties among vertebrates. *Biochim Biophys Acta*, 1774, 595–602.
- Baker SM, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC, Yao X, Christie D, Monell C, Arnheim N, Bradley A, Ashley T and Liskay RM (1996).** Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat Genet*, 13, 336–342.
- Baker TG and Scrimgeour JB (1980).** Development of the gonad in normal and anencephalic human fetuses. *J Reprod Fertil*, 60, 193–199.
- Bannister LA, Reinholdt LG, Munroe RJ and Schimenti JC (2004).** Positional cloning and characterization of mouse mei8, a disrupted allele of the meiotic cohesin Rec8. *Genesis*, 40, 184–194.
- Barlow AL, Benson FE, West SC and Hulten MA (1997).** Distribution of the Rad51 recombinase in human and mouse spermatocytes. *EMBO J*, 16, 5207–5215.
- Baudat F and de Massy B (2007).** Regulating double-stranded DNA break repair towards crossover or non-crossover during mammalian meiosis. *Chromosome Res*, 15, 565–577.
- Baudat F, Manova K, Yuen JP, Jasin M and Keeney S (2000).** Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Mol Cell*, 6, 989–998.
- Bellve AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM and Dym M (1977).** Spermatogenic cells of the prepuberal mouse: isolation and morphological characterization. *J Cell Biol*, 74, 68–85.

- Bolcun-Filas E, Speed R, Taggart M, Grey C, de Massy B, Benavente R and Cooke HJ (2009).** Mutation of the mouse *Syce1* gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair. *PLoS Genet*, 5, e1000393.
- Bolcun-Filas E, Costa Y, Speed R, Taggart M, Benavente R, de Rooij DG and Cooke HJ (2007).** SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. *J Cell Biol*, 176, 741-747.
- Börner GV, Kleckner N and Hunter N (2004).** Crossover/noncrossover differentiation, synaptonemal complex formation, and regulatory surveillance at the leptotene/zygotene transition of meiosis. *Cell*, 117, 29-45.
- Borum K (1961).** Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Exp Cell Res*, 24, 495-507.
- Buonomo SB, Clyne RK, Fuchs J, Loidl J, Uhlmann F and Nasmyth K (2000).** Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell*, 103, 387-398.
- Carpenter ATC (1975).** Electron microscopy of meiosis in *Drosophila melanogaster* females: II. The recombination nodule--a recombination-associated structure at pachytene? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 3186-3189.
- Clermont Y (1972).** Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev*, 52, 198-236.
- Clermont Y and Trott M (1969).** Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of 3H-thymidine and radioautography. *Fertil Steril*, 20, 805-817.
- Cohen PE, Pollack SE and Pollard JW (2006).** Genetic analysis of chromosome pairing, recombination, and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. *Endocr Rev*, 27, 398-426.
- Costa Y and Cooke H (2007).** Dissecting the mammalian synaptonemal complex using targeted mutations. *Chromosome Res*, 15, 579-589.
- Costa Y, Speed R, Öllinger R, Alsheimer M, Semple CA, Gautier P, Maratou K, Novak I, Hoog C, Benavente R and Cooke HJ (2005).** Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *J Cell Sci*, 118, 2755-2762.
- de Boer E and Heyting C (2006).** The diverse roles of transverse filaments of synaptonemal complexes in meiosis. *Chromosoma*, 115, 220-234.
- de Boer E, Lhuissier FGP and Heyting C (2009).** Cytological analysis of interference in mouse meiosis. *Methods Mol Biol*, 558, 355-382.
- de Rooij DG (1998).** Stem cells in the testis. *Int J Exp Pathol*, 79, 67-80.
- de Rooij DG and Grootegoed JA (1998).** Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Cell Biol*, 10, 694-701.

- de Vries FAT, de Boer E, van den Bosch M, Baarends WM, Ooms M, Yuan L, Liu J, van Zeeland AA, Heyting C and Pastink A (2005).** Mouse *Sycp1* functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev*, 19, 1376–1389.
- Dobson MJ, Pearlman RE, Karaiskakis A, Spyropoulos B and Moens PB (1994).** Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J Cell Sci*, 107, 2749–2760.
- Eddy EM (2002).** Male germ cell gene expression. *Recent Prog Horm Res*, 57, 103–128.
- Edelmann W, Cohen PE, Kane M, Lau K, Morrow B, Bennett S, Umar A, Kunkel T, Cattoretti G, Chaganti R, Pollard JW, Kolodner RD and Kucherlapati R (1996).** Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. *Cell*, 85, 1125–1134.
- Egel-Mitani M, Olson LW and Egel R (1982).** Meiosis in *Aspergillus nidulans*: another example for lacking synaptonemal complexes in the absence of crossover interference. *Hereditas*, 97, 179–187.
- Eijpe M, Heyting C, Gross B and Jessberger R (2000).** Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes. *J Cell Sci*, 113, 673–682.
- Eijpe M, Offenbergh H, Jessberger R, Revenkova E and Heyting C (2003).** Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1 β and SMC3. *J Cell Biol*, 160, 657–670.
- Fawcett DW (1956).** The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytol*, 2, 403–406.
- Fraune J (2010).** Interaktionspartner des Proteins SYCE3 und homologe Rekombination in *Syce3*^{-/-}-Spermatocyten. (Diplomarbeit, Universität Würzburg).
- Gruber S, Haering CH and Nasmyth K (2003).** Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell*, 112, 765–777.
- Guillon H, Baudat F, Grey C, Liskay RM and de Massy B (2005).** Crossover and noncrossover pathways in mouse meiosis. *Mol Cell*, 20, 563–573.
- Habu T, Taki T, West A, Nishimune Y and Morita T (1996).** The mouse and human homologs of *DMC1*, the yeast meiosis-specific homologous recombination gene, have a common unique form of exon-skipped transcript in meiosis. *Nucleic Acids Res*, 24, 470–477.
- Hamer G, Gell K, Kouznetsova A, Novak I, Benavente R and Hoog C (2006).** Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci*, 119, 4025–4032.
- Hamer G, Wang H, Bolcun-Filas E, Cooke HJ, Benavente R and Hoog C (2008).** Progression of meiotic recombination requires structural maturation of the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci*, 121, 2445–2451.

- Handel MA and Schimenti JC (2010).** Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet*, 11, 124–136.
- Hassold T and Hunt P (2001).** To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet*, 2, 280–291.
- Heyting C, Moens PB, van Raamsdonk W, Dietrich AJ, Vink AC and Redeker EJ (1987).** Identification of two major components of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat. *Eur J Cell Biol*, 43, 148–154.
- Holstein A, Schulze W and Davidoff M (2003).** Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol*, 1, 107.
- Hunt PA and Hassold TJ (2008).** Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends Genet*, 24, 86–93.
- Hunter N (2007).** Meiotic recombination. *Molecular Genetics of Recombination*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, 381–442.
- Jahn D, Schramm S, Benavente R and Alsheimer M (2010).** Dynamic properties of meiosis-specific lamin C2 and its impact on nuclear envelope integrity. *Nucleus*, 1, 273–283.
- Klein F, Mahr P, Galova M, Buonomo SBC, Michaelis C, Nairz K and Nasmyth K (1999).** A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell*, 98, 91–103.
- Kumar R, Bourbon H and de Massy B (2010).** Functional conservation of Mei4 for meiotic DNA double-strand break formation from yeasts to mice. *Genes Dev*, 24, 1266–1280.
- Kumar R and de Massy B (2010).** Initiation of meiotic recombination in mammals. *Genes*, 1, 521–549.
- Laemmli UK (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lammers JH, Offenbergh HH, van Aalderen M, Vink AC, Dietrich AJ and Heyting C (1994).** The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol*, 14, 1137–1146.
- Lee J and Hirano T (2011).** RAD21L, a novel cohesin subunit implicated in linking homologous chromosomes in mammalian meiosis. *J Cell Biol*, 192, 263–276.
- Liebe B, Alsheimer M, Höög C, Benavente R and Scherthan H (2004).** Telomere attachment, meiotic chromosome condensation, pairing, and bouquet stage duration are modified in spermatocytes lacking axial elements. *Mol Biol Cell*, 15, 827–837.
- Liu J, Yuan L, Brundell E, Björkroth B, Daneholt B and Höög C (1996).** Localization of the N-terminus of SCP1 to the central element of the synaptonemal complex and evidence for direct interactions between the N-termini of SCP1 molecules organized head-to-head. *Exp Cell Res*, 226, 11–19.

- Llano E, Gómez R, Gutiérrez-Caballero C, Herrán Y, Sánchez-Martín M, Vázquez-Quinones L, Hernández T, de Alava E, Cuadrado A, Barbero JL, Suja JA and Pendás AM (2008).** Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Genes Dev*, 22, 2400–2413.
- Mahadevaiah SK, Turner JMA, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, Blanco-Rodriguez J, Jasin M, Keeney S, Bonner WM and Burgoyne PS (2001).** Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet*, 27, 271–276.
- Malkov M, Fisher Y and Don J (1998).** Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biol Reprod*, 59, 84–92.
- Maratou K, Forster T, Costa Y, Taggart M, Speed RM, Ireland J, Teague P, Roy D and Cooke HJ (2004).** Expression profiling of the developing testis in wild-type and *Dazl* knockout mice. *Mol Reprod Dev*, 67, 26–54.
- Mason JM and Arndt KM (2004).** Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem*, 5, 170–176.
- Méjat A and Misteli T (2010).** LINC complexes in health and disease. *Nucleus*, 1, 40–52.
- Meuwissen RLJ, Offenbergh HH, Dietrich AJ, Riesewijk A, van Iersel M and Heyting C (1992).** A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J*, 11, 5091–5100.
- Miyamoto T, Hasuike S, Yogev L, Maduro MR, Ishikawa M, Westphal H and Lamb DJ (2003).** Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *Lancet*, 362, 1714–1719.
- Moens PB, Heyting C, Dietrich AJ, van Raamsdonk W and Chen Q (1987).** Synaptonemal complex antigen location and conservation. *J Cell Biol*, 105, 93–103.
- Moens PB, Kolas NK, Tarsounas M, Marcon E, Cohen PE and Spyropoulos B (2002).** The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA-DNA interactions without reciprocal recombination. *J Cell Sci*, 115, 1611–1622.
- Moens PB, Marcon E, Shore JS, Kochakpour N and Spyropoulos B (2007).** Initiation and resolution of interhomolog connections: crossover and non-crossover sites along mouse synaptonemal complexes. *J Cell Sci*, 120, 1017–1027.
- Morelli MA and Cohen PE (2005).** Not all germ cells are created equal: Aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction*, 130, 761–781.
- Moses MJ (1956).** Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytol*, 2, 215–218.
- Myers S, Freeman C, Auton A, Donnelly P and McVean G (2008).** A common sequence motif associated with recombination hot spots and genome instability in humans. *Nat Genet*, 40, 1124–1129.
- Nasmyth K (2001).** Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu Rev Genet*, 35, 673–745.

- Oakberg EF (1956).** A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am J Anat*, 99, 391–413.
- Offenberg HH, Schalk JAC, Meuwissen RLJ, van Aalderen M, Kester HA, Dietrich AJJ and Heyting C (1998).** SCP2: A major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Res*, 26, 2572–2579.
- Öllinger R (2005).** Polymerisationseigenschaften des Synaptonemalkomplexproteins SYCP1 und Charakterisierung von Bindungspartnern. (Doktorarbeit, Universität Würzburg).
- Öllinger R, Alsheimer M and Benavente R (2005).** Mammalian protein SCP1 forms synaptonemal complex-like structures in the absence of meiotic chromosomes. *Mol Biol Cell*, 16, 212–217.
- Olson LW, Edén U, Egel-Mitani M and Egel R (1978).** Asynaptic meiosis in fission yeast? *Hereditas*, 89, 189–199.
- Page SL and Hawley RS (2003).** Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science*, 301, 785–789.
- Page SL and Hawley RS (2004).** The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, 525–558.
- Parisi S, McKay MJ, Molnar M, Thompson MA, van der Spek PJ, van Drunen-Schoenmaker E, Kanaar R, Lehmann E, Hoeijmakers JH and Kohli J (1999).** Rec8p, a meiotic recombination and sister chromatid cohesion phosphoprotein of the Rad21p family conserved from fission yeast to humans. *Mol Cell Biol*, 19, 3515–3528.
- Petronczki M, Siomos MF and Nasmyth K (2003).** Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell*, 112, 423–440.
- Pezzi N, Prieto I, Kremer L, Pérez Jurado LA, Valero C, Del Mazo J, Martínez-A C and Barbero JL (2000).** *STAG3*, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of *STAG3*-related genes flanking the Williams-Beuren syndrome deletion. *FASEB J*, 14, 581–592.
- Plug AW, Xu J, Reddy G, Golub EI and Ashley T (1996).** Presynaptic association of Rad51 protein with selected sites in meiotic chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 5920–5924.
- Rasmussen SW (1973).** Ultrastructural studies of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 140, 125–144.
- Revenkova E, Eijpe M, Heyting C, Gross B and Jessberger R (2001).** Novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1. *Mol Cell Biol*, 21, 6984–6998.
- Revenkova E and Jessberger R (2005).** Keeping sister chromatids together: cohesins in meiosis. *Reproduction*, 130, 783–790.
- Romanienko PJ and Camerini-Otero RD (2000).** The mouse *Spo11* gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell*, 6, 975–987.

- Ross-Macdonald P and Roeder GS (1994).** Mutation of a meiosis-specific MutS homolog decreases crossing over but not mismatch correction. *Cell*, 79, 1069–1080.
- Schagger H (2006).** Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protocols*, 1, 16–22.
- Scherthan H, Weich S, Schwegler H, Heyting C, Härle M and Cremer T (1996).** Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J Cell Biol*, 134, 1109–1125.
- Scherthan H, Sfeir A and de Lange T (2010).** Rap1-independent telomere attachment and bouquet formation in mammalian meiosis. *Chromosoma*, 1-7.
- Schmekel K, Meuwissen RLJ, Dietrich AJJ, Vink ACG, van Marle J, van Veen H and Heyting C (1996).** Organization of SCP1 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Exp Cell Res*, 226, 20–30.
- Schmekel K and Daneholt B (1995).** The central region of the synaptonemal complex revealed in three dimensions. *Trends Cell Biol*, 5, 239–242.
- Schmekel K and Daneholt B (1998).** Evidence for close contact between recombination nodules and the central element of the synaptonemal complex. *Chromosome Res*, 6, 155-159.
- Schmitt J, Benavente R, Hodzic D, Höög C, Stewart CL and Alsheimer M (2007).** Transmembrane protein Sun2 is involved in tethering mammalian meiotic telomeres to the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 7426-7431.
- Schramm S, Fraune J, Naumann R, Hernandez-Hernandez A, Höög C, Cooke HJ, Alsheimer M and Benavente R (2011).** A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination and fertility. *PLoS Genet (in press)*.
- Schrans-Stassen BHGJ, Saunders PTK, Cooke HJ and de Rooij DG (2001).** Nature of the spermatogenic arrest in *Dazl*^{-/-} mice. *Biol Reprod*, 65, 771–776.
- Stewart-Hutchinson PJ, Hale CM, Wirtz D and Hodzic D (2008).** Structural requirements for the assembly of LINC complexes and their function in cellular mechanical stiffness. *Exp Cell Res*, 314, 1892–1905.
- Tarsounas M, Pearlman RE, Gasser PJ, Park MS and Moens PB (1997).** Protein-protein interactions in the synaptonemal complex. *Mol Biol Cell*, 8, 1405–1414.
- Tarsounas M, Pearlman RE and Moens PB (1999a).** Meiotic activation of rat pachytene spermatocytes with okadaic acid: the behaviour of synaptonemal complex components SYN1/SCP1 and COR1/SCP3. *J Cell Sci*, 112, 423–434.
- Tarsounas M, Morita T, Pearlman RE and Moens PB (1999b).** Rad51 and Dmc1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and synaptonemal complexes. *J Cell Biol*, 147, 207–220.
- Watanabe Y and Nurse P (1999).** Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature*, 400, 461–464.

- Winkel K, Alsheimer M, Öllinger R and Benavente R (2009).** Protein SYCP2 provides a link between transverse filaments and lateral elements of mammalian synaptonemal complexes. *Chromosoma*, 118, 259–267.
- Wood AJ, Severson AF and Meyer BJ (2010).** Condensin and cohesin complexity: the expanding repertoire of functions. *Nat Rev Genet*, 11, 391–404.
- Yang F, de La Fuente R, Leu NA, Baumann C, McLaughlin KJ and Wang PJ (2006).** Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis. *J Cell Biol*, 173, 497–507.
- Yanowitz J (2010).** Meiosis: making a break for it. *Curr Opin Cell Biol*, 22, 744–751.
- Youds JL and Boulton SJ (2011).** The choice in meiosis - defining the factors that influence crossover or non-crossover formation. *J Cell Sci*, 124, 501–513.
- Yuan L, Pelttari J, Brundell E, Björkroth B, Zhao J, Liu JG, Brismar H, Daneholt B and Höög C (1998).** The synaptonemal complex protein SCP3 can form multistranded, cross-striated fibers in vivo. *J Cell Biol*, 142, 331–339.
- Yuan L, Liu J, Hoja M, Wilbertz J, Nordqvist K and Hoog C (2002).** Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science*, 296, 1115–1118.
- Yuan L, Liu J, Zhao J, Brundell E, Daneholt B and Höög C (2000).** The murine *SCP3* gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell*, 5, 73–83.
- Zickler D and Kleckner N (1998).** The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu Rev Genet*, 32, 619–697.

11 Abkürzungen

®	registered
AE	Axialelement
APC	Anaphase fördernder Komplex
AS	Aminosäure
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CE	Zentralelement
CLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
CMV	Cytomegalievirus
CO	Crossing-over Strukturen
CR	Zentralregion
ddH₂O	bidest. doppelt destilliertes Wasser
dHJ	doppel Holliday-Struktur
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA DSBs	DNA Doppelstrangbrüche
dpc	Tag nach der Befruchtung
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
e.H.	eigene Herstellung
ENs	frühe Rekombinationsknoten
EtOH	Ethanol
F1 Fragment	Kurzer Arm
F2 Fragment	Langer Arm
FCS	Fötales Kälberserum
FSH	follikelstimulierendes Hormon
gp	Meerschwein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
IP	Koimmunpräzipitation
IPTG	Isopropyl β-D-Thiogalactosid
kDa	Kilodalton
LE	Lateralelement
LH	luteinisierendes Hormon
MCS	Multiple Cloning Site
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
NCO	nicht-Crossing-over
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisierungssignal
nm	Nanometer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGCs	Urgeschlechtszellen
rb	Kaninchen
RNs	Rekombinationsknoten
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
SC	Synaptonemalkomplex
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sek	Sekunden
TF	Transversalfilament
T_m	Schmelztemperatur
TNs	Transitionsknoten
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TSS	Transformation and storage solution
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat
™	Trademark
WT	Wildtyp
X-Gal	Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

12 Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich,

dass ich die vorliegende Arbeit unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen selbständig angefertigt habe,

dass ich diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen habe,

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

Würzburg, den

.....

Sabine Schramm

13 Publikationsliste

13.1 Publikationen als Autor und Koautor

Alsheimer M, Baier A, Schramm S, Schütz W and Benavente R (2010). Synaptonemal complex protein SYCP3 exists in two isoforms showing different conservation in mammalian evolution. *Cytogenet Genome Res*, 128, 162–168.

Jahn D, Schramm S, Benavente R and Alsheimer M (2010). Dynamic properties of meiosis-specific lamin C2 and its impact on nuclear envelope integrity. *Nucleus*, 1, 273–283.

Alsheimer M., D. Jahn, S. Schramm, R. Benavente: Nuclear lamins in mammalian spermatogenesis. In: Epigenetics and Human Reproduction. Edited by S. Rousseaux and S. Khochbin. Book series: Epigenetics and Human Health. ISBN: 978-3-642-14772-2, p. 279-288. Springer Verlag, Heidelberg (2011).

Schramm S, Fraune J, Naumann R, Hernandez-Hernandez A, Höög C, Cooke HJ, Alsheimer M and Benavente R (2011). A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination and fertility. *PLoS Genet* (*in press*).

13.2 Poster und Vorträge auf internationalen Kongressen

Schramm S, Benavente R and Alsheimer M. Dynamic properties of meiosis-specific lamin C2. “20th Wilhelm Bernhard workshop: international conference on the cell nucleus“ in St. Andrews, Schottland, 27.-31. August 2007. (Poster)

Schramm S, Benavente R and Alsheimer M. Dynamic properties of meiosis-specific lamin C2. “10th DGZ young scientist meeting“ in Heidelberg, Deutschland, 24.-25. September 2008. (Vortrag)

Schramm S, Alsheimer M and Benavente R. SYCE3 – a novel mammalian synaptonemal complex protein. “The EMBO conference on meiosis (1st)“ in Isle sur la Sorgue, Frankreich, 19.-23. September 2009. (Poster)

Schramm S, Alsheimer M and Benavente R. SYCE3 – a novel mammalian synaptonemal complex protein. “2nd Symposium of the research training group 1048: molecular basis of organ development in vertebrates“, in Würzburg, Deutschland, 5. Oktober 2009. (Vortrag)

Schramm S, Fraune J, Naumann R, Alsheimer M and Benavente R. Novel mouse protein SYCE3 is essential for synaptonemal complex assembly, recombination and fertility. “1st Annual meeting: mechanisms of genome haploidization. Priority program of the German research foundation (DFG)“ in Heidelberg, Deutschland, 22.-24. März 2010. (Poster)

14 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sabine Schramm
 Adresse: Wilhelm-Dahl-Straße 3, 97082 Würzburg, Deutschland
 Geboren am: 22.11.1981 in Coburg
 Familienstand: ledig

Schulbildung

06/2001 Allgemeine Hochschulreife (Gymnasium Albertinum, Coburg)

Hochschulausbildung

10/2001 - 09/2006 Hochschulstudium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Studienschwerpunkte:

Hauptfach: Zell- und Entwicklungsbiologie
 Nebenfach: Virologie und Immunbiologie
 Nebenfach: Biochemie

11/2005 - 09/2006

Diplomarbeit:

Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Marie-Christine Dabauvalle am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Thema:

„Charakterisierung des nukleolären Proteins CSIG und seiner Bindungspartner“

Promotion

10/2006 - 05/2011 Promotion am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg bei Herrn Prof. Dr. Ricardo Benavente

Thema:

„SYCE3, ein neues Synaptonemalkomplexprotein: Expression, funktionelle Analyse und Bindungspartner“

Stipendiatin des Graduiertenkollegs 1048: *“Molecular basis of organ development in vertebrates”*

15 Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Ricardo Benavente bedanken. Danke für das interessante Thema, für die Betreuung der Arbeit, für Deine Freude über neue Ergebnisse und das angenehme Arbeitsklima.

Herrn Prof. Manfred Schartl möchte ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Ein besonderer Danke gilt natürlich auch Herrn Dr. Manfred Alsheimer für die tolle Betreuung, die vielen guten Ratschläge und Tipps und nicht zuletzt für neue Einblicke in die fränkische Kartenspielkultur.

Ganz besonders möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Zell- und Entwicklungsbiologie bedanken. Ein riesengroßes Dankeschön geht natürlich an die Arbeitsgruppen Benavente und Alsheimer (Hannes, Karoline, Eva, Murphy, Baary, Jana, Hanna, Silke und Elisabeth): Ihr seid echt alle Spitze!!! So ein tolles Arbeitsklima mit so netten, hilfsbereiten Arbeitskollegen muss man wirklich erst mal finden. Außerdem werde ich die Abende beim Schmitt, die Mojito-Sessions, unseren sehr, sehr lustigen Karten-Bastel-Abend, den Triopszuchtverein e. V., die ausführlichen Dr. Marc Meier Nachbesprechungen und so viele andere Dinge ganz sicher nicht vergessen ☺. Ein ganz besonderer Dank gilt Rike, die meine F2-Praktikumsmama war und mir mittlerweile eine sehr, sehr gute Freundin geworden ist: Ohne Dich hätte ich so manches nicht so gut gemeistert... Danke dafür ☺. Auch möchte ich mich natürlich bei den „mittlerweile-nicht-mehr-ganz-so-Neuen“ am Lehrstuhl für die Hilfsbereitschaft und das lustige Arbeitsklima bedanken (ich sag nur Atzen ;)). Auch die Arbeitsgruppe Hock mit ihren vielen Tipps und Diskussionen (sei es zu labortechnischen oder auch weltanschaulichen Dingen ;)) darf natürlich nicht unerwähnt bleiben. Alles in allem habt Ihr alle es geschafft, dass es mir (meistens) wirklich Spaß gemacht hat auf die Arbeit zu gehen (auch wenn die Arbeitsmotivation nach der tausendsten Bindungsstudie oder meinem Gefrierschrank-Zwischenfall zeitweise nicht mehr allzu hoch war ;).

Vielen Dank auch an Elisabeth, Kathrin, Reinhild, Natalia, Sylwia, Anneliese, Claudia, Silke, Lidia und Uli für die Unterstützung im Labor und bei allen organisatorischen Aufgaben.

Norbert danke ich für die Pflege der Computer und seine lustige Art.

Ein großes Dankeschön gilt auch dem Graduiertenkolleg 1048, das mir meine Doktorarbeit und die Teilnahme an zahlreichen internationalen Konferenzen überhaupt erst ermöglicht hat.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken: Danke Mama und Papa, dass ihr mich immer unterstützt und wieder motiviert habt. Danke Daniel, dass es dich gibt! Und zu guter Letzt: Danke Mini, dass du mir noch die Zeit gelassen hast meine Arbeit fertig zu schreiben. Super Timing!!!