

**Protein-Protein-Wechselwirkungen  
im männlichen Genitaltrakt der Säuger (Mammalia)  
am Beispiel der Profiline und eines  
G-Protein gekoppelten Rezeptors**

**Dissertation**  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
im Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

MARTINA BEHNEN

Hamburg 2007

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Frau Professor Dr. C. KIRCHHOFF  
Weiterer Gutachterin der Dissertation:  
Frau Priv.-Doz. Dr. I. BRUCHHAUS  
Tag der Disputation: 24. August 2007

Hamburg, den 01. August 2007



Professor Dr. Reinhard Lieberei  
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	V

## **I. Einleitung** **1**

1.1 Die inneren männlichen Geschlechtsorgane .....	1
1.2 Der Hoden und seine Funktion als Reproduktionsorgan .....	1
1.2.1 Ablauf der Spermatogenese .....	1
1.2.2 Kinetik der Spermatogenese.....	4
1.3 Morphologie/Anatomie der Keimzellen.....	5
1.3.1 Akrosom .....	5
1.3.2 Akroplaxom.....	6
1.3.3 transiente Manschette .....	7
1.4 Der Nebenhoden und seine Funktionen .....	7
1.5 Der heptahelikale HE6-Rezeptor/GPR64 im Nebenhoden .....	9
1.5.1 HE6: ein Mitglied der B2-Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.....	9
1.5.2 Lokalisation des HE6-Rezeptors im Nebenhoden.....	11
1.5.3 Funktion des HE6-Rezeptors im Nebenhoden: die HE6-Knockout-Maus.....	12
1.6 Die Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts und der Profiline im Hoden.....	13
1.6.1 Die Profilin-Isoformen im Hoden der Säuger .....	13
1.6.2 Struktur und Funktion der Profiline .....	14
1.6.2.1 Der Einfluss von Profilin auf das Aktin-Zytoskelett.....	15
1.6.2.2 Poly-Prolin-Liganden von Profilin und ihr Einfluss auf die Aktin-Polymerisation...	16
1.6.2.3 PIP <sub>2</sub> -vermittelte Aktin-Reorganisation.....	17
1.6.3 Die vielfältigen Funktionen der Profiline in der Zelle .....	18
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	19

## **II Material & Methoden** **21**

2.1 Molekularbiologische Methoden.....	21
2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben .....	21
2.1.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Gewebeproben.....	21
2.1.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Ratten- und Maus-Geweben.....	21
2.1.1.3 cDNA-Synthese.....	22
2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion .....	22
2.1.2.1 Herkömmliche PCR .....	22
2.1.2.2 Primer für die herkömmliche PCR .....	23
2.1.2.3 quantitative RT-PCR mit dem LightCycler™ .....	25
2.1.2.4 Primer für die quantitative RT-PCR am LightCycler™.....	26
2.1.2.5 Auswertung der quantitativen RT-PCR.....	27
2.1.3 Agarosegel-Elektrophorese .....	27
2.1.4 Aufreinigung von DNA.....	27
2.1.4.1 Elution von Nukleinsäuren aus Agarose-Gelen .....	28
2.1.4.2 Aufreinigung von PCR-Fragmenten.....	28
2.1.4.3 Mini-Präparation von Plasmid-DNA über Silika-Matrix und Zentrifugation .....	28
2.1.4.4 Midi-Präparation von Plasmid-DNA über Anionen-Austauscher-Säulen .....	28
2.1.4.5 Präzipitation von Nukleinsäuren .....	29
2.1.4.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren durch Absorptions-Messung .....	29
2.1.5 Restriktionsverdau von DNA mit Typ II-Restriktionsendonukleasen .....	29
2.1.6 Dephosphorylierung geschnittener Vektoren.....	30

---

2.1.7 Ligation .....	30
2.1.8 Transformation .....	31
2.1.8.1 Transformation kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen und Selektion auf Transformanten.....	31
2.1.8.2 Analyse der rekombinanten Plasmid-DNA .....	32
2.1.9 DNA-Sequenzierung und Analyse .....	32
2.1.10 RNA- <i>in situ</i> Hybridisierung .....	32
2.2 Proteinbiochemische Methoden .....	33
2.2.1 Herstellung von Gewebelysaten für Western Blot-Analysen.....	33
2.2.2 <i>In vitro</i> -Translation.....	34
2.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford.....	34
2.2.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese .....	35
2.2.4.1 Coomassie Blau-Färbung .....	36
2.2.5 Western-Blotting .....	36
2.2.5.1 Gel-Blot: Elektrophoretischer Transfer im Semi-Dry-und Tank-Blot-Verfahren.....	37
2.2.5.2 Ponceau-S-Färbung .....	37
2.2.5.3 Immunologische Entwicklung der Membranen .....	37
2.2.5.4 Visualisierung der immunologisch markierten Protein-Banden .....	39
2.2.6 Immunozytochemie .....	39
2.2.6.1 Gewinnung von Ratten-Keimzellen .....	39
2.2.6.2 Gewinnung von humanen Keimzellen .....	39
2.2.6.3 Herstellung von Paraformaldehyd-fixierten Cytospin-Präparaten .....	40
2.2.6.4 Indirekte Immunfluoreszenz: Detektion der Proteine durch Antikörper.....	40
2.2.6.5 Fluoreszenzfärbung von Zellkern und Akrosom.....	40
2.2.6.6 Laser-konfokale Mikroskopie .....	41
2.3 Das <i>Yeast Two-Hybrid</i> -System – Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	42
2.3.1 Hefestämme und Plasmide des <i>Matchmaker Two-Hybrid</i> Systems .....	42
2.3.1.1 Hefestämme und Wachstumsbedingungen.....	42
2.3.1.2 Hefevektoren .....	43
2.3.1.3 Anzucht von Hefen und Hefe-Nährmedien.....	44
2.3.1.4 Anlegen von Glycerol-Stocks.....	44
2.3.2 Detektion von Interaktionspartnern im <i>Yeast Two-Hybrid</i> System.....	45
2.3.2.1 Konstruktion der <i>Bait</i> -Plasmide .....	45
2.3.2.2 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> nach der Lithiumacetat-Methode.....	45
2.3.2.3 Vorbereitende Untersuchungen .....	46
2.3.2.3.1 Phänotyp-Test der Hefestämme.....	46
2.3.2.3.2 Test auf Toxizität der <i>Baits</i> .....	46
2.3.2.3.3 Kontrolle der Transkriptionsaktivität durch die <i>Bait</i> .....	46
2.3.2.3.4 Untersuchung der <i>Baits</i> auf Interaktion mit der Gal4-AD .....	47
2.3.2.3.5 Test der <i>Baits</i> auf Beeinflussung der Mating-Effizienz .....	47
2.3.2.3.6 3AT-Test.....	47
2.3.2.3.7 Test auf Expression der <i>Bait</i> -Proteine in <i>S.cerevisiae</i> .....	47
2.3.2.4 Y2H-Screening einer prä-transformierten cDNA-Bibliothek .....	48
2.3.4.1 Titer-Bestimmung der cDNA-Bibliothek.....	49
2.3.4.2 Berechnung der Mating-Effizienz und der Anzahl der Klone.....	49
2.3.3 Analyse und Verifizierung potentiell positiver Klone .....	49
2.3.3.1 Passage der diploiden Klone auf Selektionsmedien.....	49
2.3.3.2 $\beta$ -Galaktosidase-Test .....	50
2.3.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S.cerevisiae</i> mit Lyticase.....	50
2.3.3.4 PCR und <i>AluI</i> -Restriktionsanalyse der Inserts .....	51
2.3.3.5 Identifizierung potentieller Interaktionspartner durch Sequenzierung.....	51

2.4 Protein-Protein-Interaktionsstudien.....	51
2.4.1 Einzelmating.....	51
2.4.2 Protein-Protein-Co-Immunopräzipitation.....	52
2.4.3 Poly-L-Prolin-Affinitätschromatographie .....	53
2.4.3.1 Expression von rekombinantem Profilin III und IV .....	53
2.4.3.2 Analyse der Poly-L-Prolin Bindung mittels einer Poly-L-Prolin-Säule.....	54
2.5 Material und Reagenzien.....	55
2.5.1 Puffer und Lösungen .....	55
2.5.2 Reaktions-Kits .....	55
2.5.3 Enzyme.....	55
2.5.4 Molekulargewichtsmarker.....	55
2.5.4.1 Protein-Marker .....	55
2.5.4.2 DNA-Marker .....	55
2.5.5 Software.....	56
2.5.6 Chemikalien.....	57
2.5.7 Verbrauchsmaterial .....	57
2.5.8 Geräte .....	57

### III Ergebnisse

59

3.1 Molekulare Untersuchungen zur Funktion des HE6-Rezeptors im Nebenhoden der Säuger ....	59
3.1.1 Validierung ausgewählter Gene in der HE6-KO-Maus durch quantitative RT-PCR.....	59
3.1.2 <i>In situ</i> Transkript-Hybridisierung zur zellulären Lokalisation der Me9-mRNA.....	60
3.2 Screening einer <i>Yeast Two-Hybrid</i> -Bibliothek zur Detektion von intrazellulären HE6/GPR64-Interaktionspartnern .....	61
3.2.1 Konstruktion der HE6- <i>Baits</i> .....	62
3.2.2 Vorbereitende Untersuchungen.....	63
3.2.3 Y2H-Library-Screening einer prä-transformierten cDNA-Bibliothek .....	64
3.2.3.1 Eliminierung falsch positiver Klone durch Screening auf Reporter-Gen-Expression, Prey-Plasmid-Isolierung, PCR, <i>AluI</i> -Restriktionsanalyse und Sequenzierung .....	65
3.2.3.2 Dritter intrazellulärer Loop als <i>Bait</i> -Protein.....	67
3.2.3.3 HE6-C-Terminus als <i>Bait</i> -Protein .....	68
3.2.4 Verifizierung der Interaktionen zwischen HE6-C-Terminus und den <i>Prey</i> -Proteinen .....	72
3.2.4.1 Kontrollmatings .....	72
3.2.4.2 Einzelmatings mit distinkten Bereichen der potentiellen HE6-Interaktionspartner... ..	73
3.3 Gezielte Y2H des HE6-Rezeptors mit 14-3-3-Proteinen und NHERF1 .....	75
3.4 gezielte Y2H-Studien zur Interaktion von HE6 mit Profilinen .....	76
3.5 Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Profilin-Familie .....	77
3.6 Synthese der Testis-exprimierten Profiline III und IV in der Ontogenese.....	77
3.6.1 Profilin-Antikörper und ihre Spezifität im Western-Blot.....	78
3.6.1.1 Western-Blot-Analyse mit <i>in vitro</i> translatierten Profilinen .....	78
3.6.1.2 Western-Blot-Analyse von Testis-Lysaten .....	79
3.6.2 Die Testis-exprimierten Profiline III und IV im Nagermodell.....	80
3.6.2.1 Gewebe-spezifische Expression der Profiline .....	80
3.6.2.1.1 Transkript-Ebene .....	80
3.6.2.1.2 Protein-Ebene .....	81
3.6.2.2 Entwicklungs-abhängige Expression der Profiline .....	83
3.6.2.2.1 Transkript-Ebene .....	83
3.6.2.2.2 Protein-Ebene .....	85
3.6.3 Die Profiline im humanen Testis mit unterschiedlichen Spermatogenese-Stadien.....	86

3.6.3.1	Transkript-Ebene .....	86
3.6.3.2	Protein-Ebene .....	89
3.6.4	Untersuchung der zellulären und subzellulären Lokalisation der Testis-exprimierten Profiline III und IV der Säuger durch Immunocytochemie.....	90
3.6.4.1	Morphologie und Zytoskelett-Strukturen der Keimzellen .....	91
3.6.4.2	Lokalisation des Profilin III-Proteins .....	94
3.6.4.3	Lokalisation des Profilin IV-Proteins .....	95
3.7	Funktionelle Charakterisierung der Profiline III und IV hinsichtlich „typischer“ Profilin-Bindungseigenschaften.....	98
3.7.1	Proteinalignment der biochemisch und strukturell charakterisierten Säuger-Profiline I und II mit den Testis-exprimierten Profilinen III und IV .....	98
3.7.2	Einzelmatrig der Profiline III und IV mit Aktin, VASP, Diaph3 .....	100
3.7.2.1	Profilin-Interaktion mit Aktin.....	101
3.7.2.2	Profilin-Interaktion mit den Poly-Prolin-Proteinen VASP und Diaph3 .....	102
3.7.3	Bestätigung der Aktin- und Poly-L-Prolin-Interaktionen aus den Einzelmatrigs durch alternative Methoden .....	104
3.7.3.1	<i>In vitro</i> Translation und Co-Immunopräzipitation von Aktin und Profilin.....	104
3.7.3.2	Poly-L-Prolin-Affinitätschromatographie zur Charakterisierung der Poly-L-Prolin-Bindungseigenschaften der Profiline III und IV .....	106
3.8	Screening einer <i>Yeast Two-Hybrid</i> -Bibliothek zur Identifizierung potentieller Interaktionspartner der Profiline III und IV .....	109
3.8.1	Vorbereitende Untersuchungen.....	109
3.8.2	Y2H-Library-Screening einer prä-transformierten murinen Hoden-cDNA-Bibliothek...	110
3.8.2.1	Eliminierung falsch-positiver Klone durch Screening auf Reporterexpression, <i>Prey</i> -Plasmid-Isolierung, <i>AluI</i> -Restriktionsanalyse und Sequenzierung.....	111
3.8.2.2	Profilin III als <i>Bait</i> -Protein.....	112
3.8.2.3	Profilin IV als <i>Bait</i> -Protein.....	116
3.9	Gezielte Y2H-Studien zur Interaktion von Profilin IV mit Tubulin-Proteinen.....	120

---

## **IV Diskussion** **121**

4.1	HE6 und eine Regulation des transepithelialen Flüssigkeitstransportes .....	122
4.2	Veränderte Gen-Expression im proximalen HE6-KO-Nebenhoden .....	125
4.3	Strukturelle und funktionelle Eigenschaften des dritten intrazellulären Loops und des C-Terminus von HE6 .....	126
4.4	Die Rolle der Profiline bei der Ausbildung der spezifischen Zellgestalt der Spermien.....	129
4.5	Sind die Profiline III und IV „typische“ Profiline?.....	131
4.6	Ausblick .....	137

---

## **V Zusammenfassung** **138**

---

## **VI Literaturverzeichnis** **140**

---

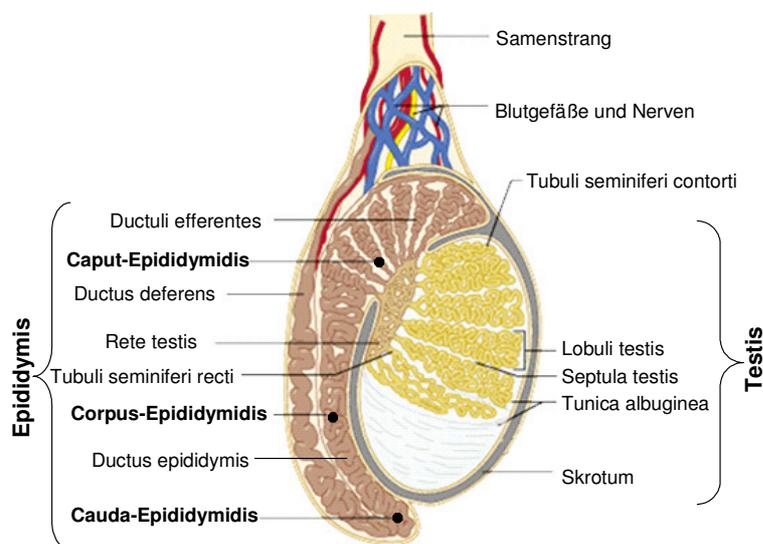
## Abkürzungsverzeichnis

3ICL	dritter intrazellulärer Loop	MCS	multiple Klonierungsstelle ( <i>multiple cloning site</i> )
A	Adenin	MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
Abb.	Abbildung	mg	Milligramm
Amp	Ampicillin	min	Minuten
APS	Ammoniumpersulfat	ml	Milliliter
AS	Aminosäure	mM	Millimolar
ATP	Adenosin-Triphosphat	µl	Mikroliter
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat	mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
bidest	bidestillata (doppelt destilliert)	MW	Molekulargewicht ( <i>molecular weight</i> )
bp	Basenpaare	n	Stoffmenge
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine serum albumin</i> )	NaCl	Natriumchlorid
bzw.	beziehungsweise	NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
C	Cytosin	NBT	Nitroblautetrazolium
°C	Grad Celsius	Ni <sup>++</sup> -NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
ca.	circa	nm	Nanometer
cAMP	zyklisches ( <i>cyclic</i> ) Adenosin-3',5'- monophosphat	nM	Nanomolar
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )	nt	Nukleotid
cfu	<i>colony forming units</i>	N-Terminus	Amino-Terminus
Co-IP	Co-Immunopräzipitation	OD	Optische Dichte
CP	<i>Crossing Point</i>	ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl-β-D-Galactosid
crRNA	komplementäre RNA ( <i>complementary RNA</i> )	ORF	Offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
C-Terminus	Carboxy-Terminus	PAA	Polyacrylamid
Da	Dalton	PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat	PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
dest.	Destillata (einfach destilliert)	PEG	Polyethylenglycol
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat	PFN	Profilin
DEAE	Diethylaminoethanol	pH	Hydrogenanion-Exponent ( <i>potentia hydrogenii</i> )
d.h.	das heißt	PLP	Poly-L-Prolin
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser	PNA	<i>Peanut agglutinin</i>
ddNTP	Didesoxynucleotidtriphosphat	REST	<i>Relative Expression Software Tool</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	RNA	Ribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )	rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
DNase	Desoxyribonuklease	RT	Raumtemperatur
dNTP	Desoxynucleotid-5'-triphosphat	RT-PCR	PCR nach reverser Transkription der mRNA in cDNA
DO	<i>Dropout</i>	SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
ds	doppelsträngig	SCO	<i>Sertoli cell-only</i>
DTT	Dithiothreitol	SD	synthetisches Minimalmedium ( <i>single dropout</i> )
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat	SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	sec	Sekunde
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	sog.	sogenannt(e)
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>	T	Thymidin
<i>et al.</i>	Et alii (und andere)	Tab.	Tabelle
EtBr	Ethidiumbromid	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
F-Aktin	filamentöses Aktin	TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-Zusatz
f.c.	Endkonzentration ( <i>final concentration</i> )	TEMED	N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethyl-diamin
FH	<i>Formin homology</i>	Tm	Schmelztemperatur
G	Guanosin	TM7	sieben-transmembran-Domäne
G-Aktin	globuläres Aktin	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Gal4-AD	Gal4-Aktivierungsdomäne	t-RNA	<i>transfer-RNA</i>
Gal4-DNA-BD	Gal4-DNA-Bindungsdomäne	U	Enzymeinheit ( <i>Unit</i> )
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor	ü.N.	über Nacht
GTP	Guanosin-5'-triphosphat	UTR	untranslatierte Region
h	Stunde ( <i>hour</i> )	UV	Ultraviolett
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>Horseradish Peroxidase</i> )	V	Volt
Hsp	Hitzeschockprotein ( <i>heat shock protein</i> )	VASP	<i>Vasodilator stimulated Phosphoprotein</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid	vgl.	vergleiche
IVT	<i>in vitro</i> -Transkription	Vol.	Volumen
kb	Kilobasen (RNA), Kilobasenpaare (DNA)	(v/v)	Volumen/Volumen
kDa	Kilodalton	(w/v)	Masse/Volumen
Km	Kanamycin	(w/w)	Masse/Masse
KO	Knockout	X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid
l	Liter	Y2H	<i>Yeast Two-Hybrid</i>
LB	Luria Bertani	Y-PER	<i>Yest Protein Extraction Reagent</i>
LED	<i>Light Emitting Diode</i>	z.B.	zum Beispiel
LS	<i>Library-Screen</i> (Bibliothek-Screening)		
M	Molar		
m	Masse		
mA	Milliampere		

# I. Einleitung

## 1.1 Die inneren männlichen Geschlechtsorgane

Zu den inneren männlichen Geschlechtsorganen der Säuger zählen Hoden (Testis), Nebenhoden (Epididymis) und der Samenleiter (Ductus deferens). Der paarig angelegte Hoden ist der Ort der Spermatozoenbildung und eine wichtige Hormondrüse, die die männlichen Geschlechtshormone (Androgene) produziert. Die Spermatozoen werden über ein samenableitendes Netz aus Kanälchen (Rete testis und Ductuli efferentes) in den Nebenhoden abgegeben, der dem Hoden in Längsrichtung kranial lateral aufgelagert ist. Er ist der Ort der post-testikulären Spermatozoenreifung und Speicherort für die Spermien, bevor sie in den Samenleiter gelangen.



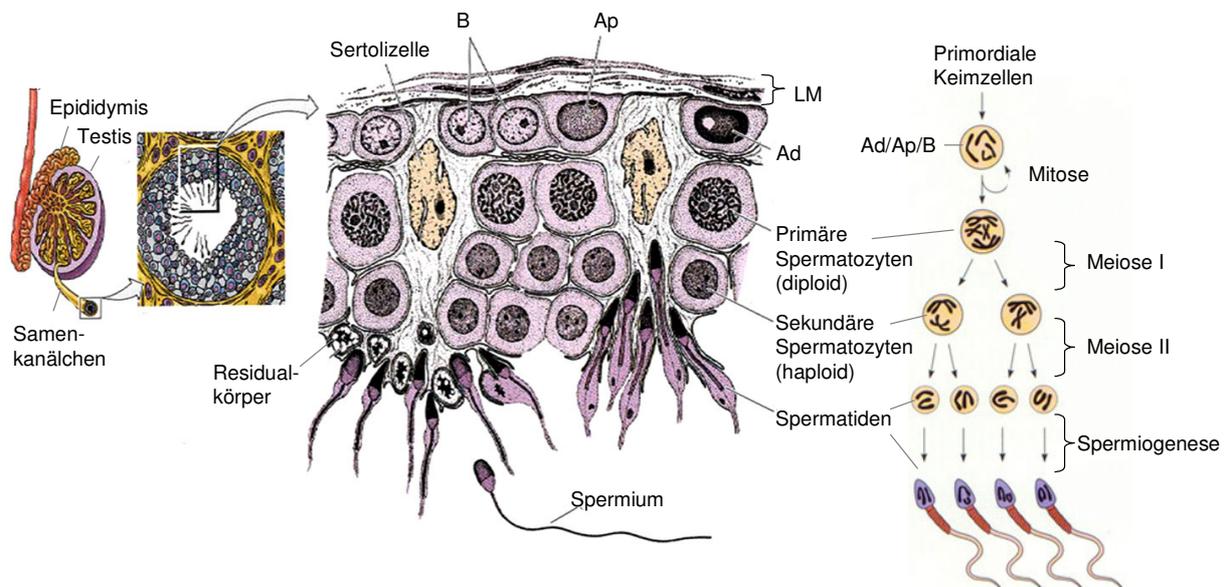
**Abb. 1.1: schematische Darstellung des Hodens (Testis) und Nebenhodens (Epididymis) der Säuger.** Der Nebenhoden liegt dem Hoden auf und wird unterteilt in Kopf (Caput Epididymidis), Körper (Corpus Epididymidis) und Schwanz (Cauda Epididymidis). Ductus deferens: Samenleiter, Ductus epididymis: Nebenhodengang, Lobuli testis: Hodenläppchen, Rete testis: samenableitendes Netz, Septula testis: bindegewebige Septen, Skrotum: Hodensack, Tubuli seminiferi contorti: gewundene Samenkanälchen, Tubuli seminiferi recti: gerade Samenkanälchen, Tunica albuginea: Bindegewebskapsel

## 1.2 Der Hoden und seine Funktion als Reproduktionsorgan

### 1.2.1 Ablauf der Spermatogenese

Im Keimepithel des Hodens findet in den Samenkanälchen, den so genannten Tubuli seminiferi, die Spermatogenese statt. Hierbei handelt es sich um einen komplexen Differenzierungs-Prozess, in dessen Verlauf aus diploiden männlichen Stammzellen (Spermatogonien) die testikulären haploiden Spermien hervorgehen.

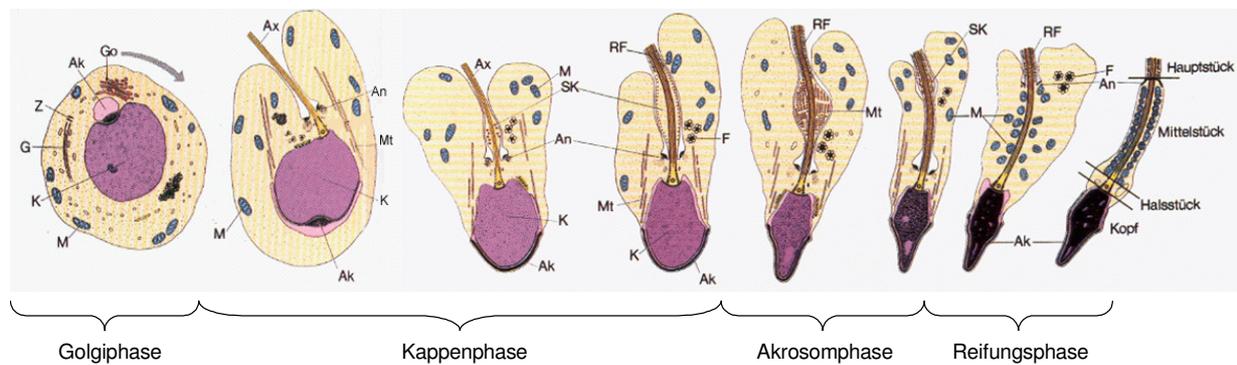
Die Spermatogenese ist ein kontinuierlicher Vorgang, der sich in drei Phasen unterteilen lässt: 1) die Proliferationsphase, die durch zahlreiche mitotische Teilungen der Spermatogonien gekennzeichnet ist, 2) die meiotische Phase, in der das Genom der Spermatozyten rekombiniert und halbiert wird und schließlich 3) die Spermiogenese, in der, ausgehend von runden, haploiden Spermatischen, die morphologische Differenzierung zum elongierten Spermatozoon stattfindet. Der gesamte Prozess dauert bei der Ratte etwa 54 Tage [Russel *et al.*, 1990] und beim Mann 74 Tage [Heller & Clermont, 1963.] In Abbildung 1.2 ist die spermatogenetische Entwicklung der Keimzellen schematisch dargestellt.



**Abb. 1.2: schematische Darstellung der Spermatogenese in einem Samenkanälchen** [modifiziert nach Handel, 1987 und Campell *et al.*, 1999]. B: Typ B-Spermatogonium, Ap: *Apale*-Spermatogonium, Ad: *Adark*-Spermatogonium, LM: Basalmembran. Spermatogonien an der Basalmembran teilen sich mitotisch. Während der Differenzierung wandern die von den Sertolizellen umgebenden Keimzellen in Richtung Tubuluslumen, von wo aus sie in den Nebenhoden entlassen werden.

Die Spermatogenese beginnt mit den Spermatogonien, die peripher an der Basalmembran der Samenkanälchen liegen und in Zellen des Typs A und des Typs B klassifiziert werden. Bei den A-Spermatogonien werden zusätzlich *A(dark)*-Spermatogonien (Ad) und *A(pale)*-Spermatogonien (Ap) unterschieden. Die Ad-Spermatogonien zeigen unter normalen Umständen keine oder nur sehr geringe Proliferationsaktivität [Schlatt & Weinbauer, 1994] und können als Stammzellen der Spermatogonien angesehen werden. Die Ap-Spermatogonien hingegen durchlaufen mitotische Zellteilungen und differenzieren zu B-Spermatogonien. Aus Spermatogonien des Typs B gehen im letzten Schritt der proliferativen Phase die präleptotänen primären Spermatozyten hervor, welche in die Prophase I der ersten meiotischen Teilung eintreten und mit der DNA-Synthese beginnen.

Die Meiose ist ein kritisches Ereignis während der Spermatogenese. Während dieses Prozesses müssen die Rekombination des genetischen Materials, die Reduktion des Chromosomensatzes und die Entwicklung von haploiden Spermatisden erfolgreich abgeschlossen werden. Hierzu lösen sich die primären Spermatozyten von der Basalmembran, passieren die zwischen den Sertolizellen ausgebildete Blut-Hodenschranke und treten in die Prophase I der ersten meiotischen Teilung ein. In den folgenden Stadien Leptotän, Zygotän und Pachytän findet die Chromosomenpaarung und genetische Rekombination statt. Nach der ersten meiotischen Reifeteilung entstehen aus einer primären Spermatozyte zwei sekundäre Spermatozyten, welche einen haploiden Chromosomensatz, jedoch in doppelter Ausführung enthalten. Im Verlauf der zweiten meiotischen Reifeteilung, entstehen aus den zwei sekundären Spermatozyten vier haploide Spermatisden (siehe Abbildung 1.2). Diese runden und teilungsinaktiven Zellen reifen in der letzten Phase der Spermatogenese, der so genannten Spermio-genese, zu hochdifferenzierten, elongierten Spermien aus. Dabei führen markante und komplizierte Transformationen wie Elongation und Kondensation des Zellkerns, Reduktion des Zytoplasmas, Akrosomen-Bildung und Ausdifferenzierung des Flagellums zur Entwicklung der typischen Zellform der Spermatozoen. Der gesamte Prozess ist qualitativ bei allen Säuger-Spezies identisch und lässt sich grob in vier Phasen unterteilen: Golgi-, Kappen-, Akrosom- und Reifungsphase [Leblond & Clermont, 1952 + 1955]. Im Folgenden ist die Spermio-genese am Beispiel des Menschen beschrieben.



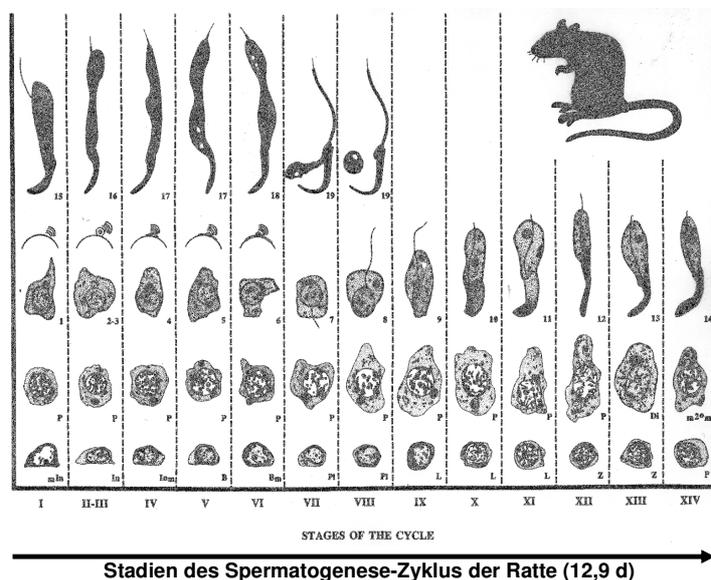
**Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Differenzierung der Spermatiden im humanen Testis** [modifiziert nach Roosen-Runge, 1981] Ak: Akrosom, An: Annulus, Ax: Axonem, F: *Flower*-Struktur, G: Geißelstrukturen, Go: Golgi-Apparat, M: Mitochondrien, Mt: Manschette, K: Zellkern, Sk: spindelförmiger Körper, Z: Zentriol,

In der *Golgi-Phase* erfährt der Golgi-Apparat einen Formwandel und bildet proakrosomale Vesikel. Diese verschmelzen zum so genannten Akrosomenbläschen, das eine elektronendichte Masse enthält und Kontakt zum Akroplaxom aufnimmt. Das Akroplaxom ist eine Aktin-Keratin-haltige Zytoskelett-Struktur, die das entwickelnde Akrosom auf dem Zellkern verankert [Kierszenbaum *et al*, 2003]. In der weiteren Differenzierung bildet sich die kranio-kaudale Symmetrie der Spermatiden aus, indem eines der Zentriolen an der kaudalen Zelloberfläche ein Axonem ausbildet, das aus Mikrotubuli einer klassischen 9 + 2-Anordnung besteht. In der *Kappenphase* breitet sich das Akrosomenbläschen kappenförmig bis über den Zelläquator aus, bedeckt abgeflacht die Hälfte bis zwei Drittel des Zellkerns und bildet das Akrosom. Der Zellkern wandert zur Zelloberfläche, wobei das Akrosom in räumliche Nähe zur Plasmamembran kommt. Das distale Zentriol bewegt sich zum Zellkern, wird dort verankert und dient als Basalkörper der sich verlängernden Geißel, wodurch es zu einer Einschnürung des Zytoplasmas kommt. Während dieses Prozesses bildet sich auch die Manschette, eine transiente Mikrotubuli- und Aktin-haltige Struktur, die für den Transport von Vesikeln und Makromolekülen zum Akrosom und dem sich entwickelnden Flagellum verantwortlich ist. Zudem gibt es Hinweise auf einen Transport der DNA-Verpackungs-Proteine vom und zum Kern entlang der Manschette [Oko, 1988]. In der *Akrosomphase* verlängert sich der Zellkern, das Chromatin kondensiert, das Zytoplasma wird langezogen, und die Elongation der Keimzelle schreitet fort. Im Verlauf der Kernkondensation werden die Histone durch kleine basische arginin- und cysteinreiche Proteine, die Protamine ersetzt, um eine dichtere Packung der DNA zu erreichen. Dieser Austausch erlaubt eine dichtere Packung der DNA, so dass der Zellkern auf 5 % des Volumens eines somatischen Zellkerns kondensiert werden kann [Braun, 2001]. Die DNA befindet sich nun in der „Verpackungsform“. Durch die Chromatinkondensation kommt es zu einer zeitlichen Entkopplung von Transkription und Translation. Das Akrosom folgt der Elongation des Zellkerns und erfährt eine Verdichtung des Inhalts und Anpassung an die Form des Zellkerns. Das Flagellum, das der Fortbewegung des Spermiums im weiblichen Genitaltrakt dient, ist jetzt gut ausgebildet. Es besteht aus dem zentralen Axonem und damit in Verbindung stehenden äußeren dichten Längsfasern sowie der Scheide. In der Reifungsphase bilden sich schließlich Mittel-, Haupt- und Endstück des Flagellums aus. Dabei werden Mitochondrien aus dem Zytoplasma rekrutiert und in einer helikalen Anordnung um das Mittelstück herum angeordnet. Die Manschette verschwindet in dieser Phase. Am Ende der Spermio-genese erfolgt in der Reifungsphase eine Volumenreduktion des reifen Spermatozoons auf etwa 25 % der ursprünglichen Größe. Zum einen wird dies über die Elimination von Wasser aus Zellkern und Zytoplasma erreicht, zum andern über die Abschnürung großer Zytoplasmaanteile, als

so genannte Residualkörper, kurz vor der Spermiation. Die Residualkörper enthalten RNA, Organellen und andere Bestandteile, die für das Überleben des Spermiums nach Freisetzung nicht länger nötig sind. Die Phase der Spermiogenese endet, wenn die testikulären Spermatozoen aus dem Verband des Keimepithels in das Tubulusslumen abgegeben werden.

### 1.2.2 Kinetik der Spermatogenese

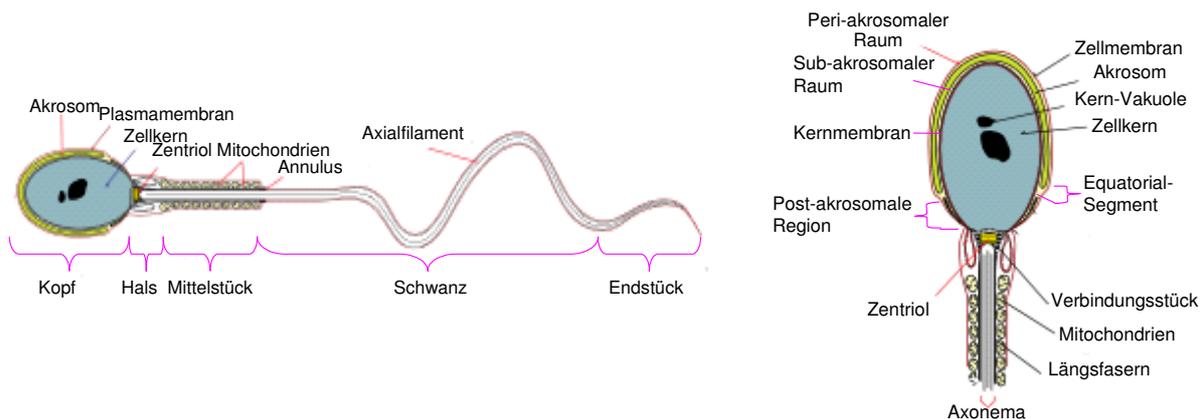
Die Spermatogenese ist ein zyklischer Prozess, der kontinuierlich in den Samenkanälchen des Hodens abläuft und sich dadurch grundsätzlich von dem ebenfalls zyklischen Vorgang der Oogenese des weiblichen Organismus unterscheidet. Die komplexen Vorgänge der Teilungen und Differenzierungen der Keimzellen erfolgen nach genau festgelegten zeitlichen und räumlichen Mustern. Zur gleichen Zeit, zu der aus einem Spermatogonium über Teilung und Differenzierungen neue Spermatozoen entstehen, starten andere Spermatogonien in demselben Areal des Keimepithels mit der Spermatogenese in einer gestaffelten aber zeitlich kontrollierten Sequenz. Dieser zeitlich synchronisierte Ablauf erfordert eine räumliche Verlagerung der Keimzellen von der Basalmembran (Spermatogonien) nach apikal (elongierende Spermatozoen) ins Keimepithel des Samenkanälchens [Schulze & Rheder, 1984]. Durch die zeitliche und räumliche Synchronisation der verschiedenen Keimzellklone entstehen im Keimepithel ständig wiederkehrende Muster charakteristischer Keimzelloassoziationen, die als Stadien der Spermatogenese bezeichnet werden. Die Anzahl der Spermatogenesestadien variiert zwischen den Spezies. Während bei der Laborratte 14 (I-XIV) Stadien unterschieden werden [Leblond & Clermont, 1952], kann die humane Spermatogenese mit sechs Stadien beschrieben werden [Clermont, 1963]. In Abbildung 1.4 sind die möglichen Stadienspezifischen Zellassoziationen am Beispiel der Ratte in einer *Staging map* zusammengefasst dargestellt. Unter dem Zyklus der Spermatogenese versteht man die zeitliche Abfolge bzw. das Durchlaufen aller Stadien der Spermatogenese, d.h. einer Etage der *Staging map*. Bei der Entwicklung und Differenzierung eines einzelnen Spermatogoniums zu einem reifem Spermium werden mindestens vier spermatogenetische Zyklen (Etagen) durchlaufen (Mensch 4,6 Zyklen). Aus dieser Angabe und der Dauer eines Zyklus (16 Tage beim Menschen, 12,9 Tage bei der Ratte) errechnet sich die Gesamtdauer der Spermatogenese.



**Abb. 1.4: Zusammenstellung der Keimzellassoziationen in den 14 Stadien der Spermatogenese in der *Staging map* der Ratte** [aus Russel *et al.*, 1990]. Die fortschreitende Keimzellentwicklung ist von links nach rechts dargestellt, wobei am Ende der Reihe bzw. eines Zyklus die Entwicklung eine Etage weiter oben in einem nächsten Zyklus fortläuft. Die zeitliche Abfolge aller Stadien wird als Zyklus der Spermatogenese bezeichnet. Übereinander liegende Keimzellstadien spiegeln typischen Keimzellassoziationen wider.

### 1.3 Morphologie/Anatomie der Keimzellen

Das Produkt der Spermatogenese ist ein morphologisch vollständiges, hoch differenziertes Spermatozoon, dem aber noch die Fähigkeit zur gerichteten Fortbewegung (progressive Motilität) fehlt und das auch noch nicht befruchtungsfähig ist. Die Morphologie der Spermatozoen variiert zwischen den bisher untersuchten Spezies sehr stark und ist in zahlreichen Arten noch nicht charakterisiert. Typischerweise nehmen die Spermien der Säuger im Laufe der Spermiogenese eine stromlinienförmige Form an, die sich aus einem Spermienkopf, Hals, Mittelstück und Schwanz zusammensetzt, so dass sie sich im flüssigen Milieu des weiblichen Reproduktionstraktes gut bewegen können. In Abbildung 1.5 ist der schematische Aufbau eines Säugetier-Spermatozoons dargestellt. Bei allen Säugern findet sich dieselbe Struktur des Spermischwanzes, wobei die Länge des Axonems und des Mittelstückes sowie die Dicke der dichten Längsfasern variieren können [Fawcett, 1970]. Bei der Form der Spermienköpfe gibt es artspezifische Unterschiede, die für die jeweiligen Spezies charakteristisch sind [Fawcett, 1970]. Der Spermienkopf der Ratte beispielsweise erhält in der Spermiogenese eine hakenförmige Form, während die humanen Spermien einen spatelförmigen Kopf ausbilden. Der Spermatozoonkopf enthält das kondensierte genetische Material, das von einer Kernhülle ohne Poren umgeben wird. Zudem entwickeln sich während der Spermiogenese im Kopfbereich charakteristische Strukturen wie das Akrosom, die transiente Manschette und das Akroplaxom, auf die hier näher eingegangen werden soll.



**Abb 1.5: Schematischer Aufbau eines Säugetier-Spermatozoons.** links: Unterteilung des Spermiums in Kopf, Hals, Mittelstück und Schwanz, rechts: genauere Darstellung der Kopfstrukturen

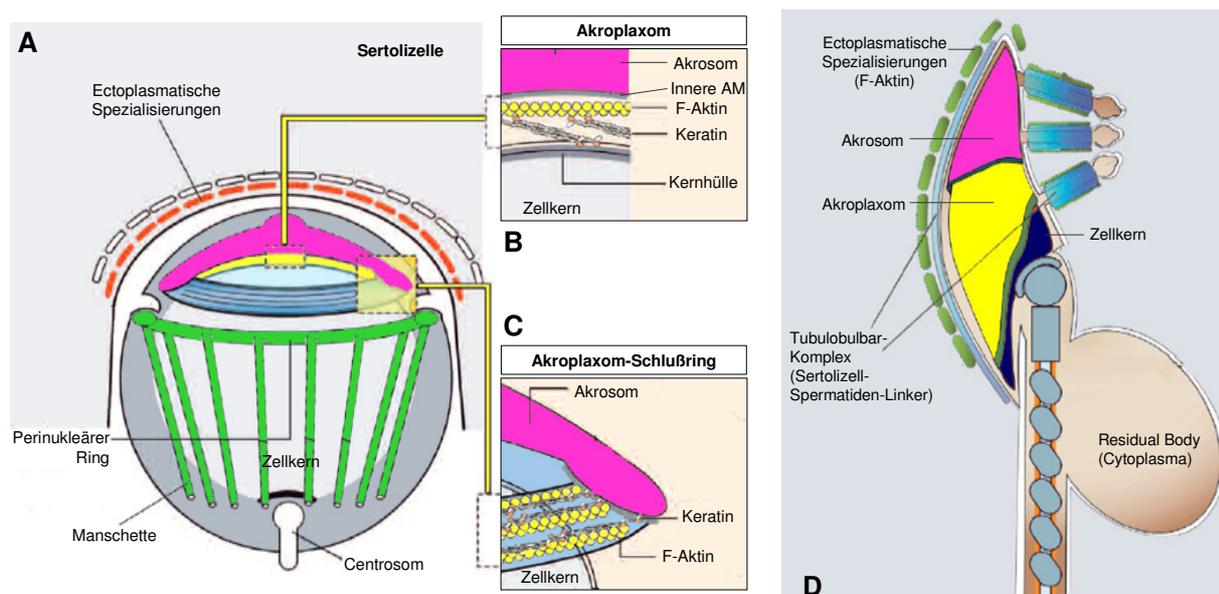
#### 1.3.1 Akrosom

Ein wichtiges Organell des Spermatozoons ist das Akrosom. Dieses beinhaltet unter anderem die hydrolytischen Enzyme (Akrosin, Esterasen, saure Proteasen), die später für eine Spermien-Ei-Interaktion und für die Fertilisation wichtig sind [Barros *et al.*, 1996]. Beim Akrosom handelt es sich um eine den kranialen Spermatozoonkopf überziehende Kappe, deren Ursprung der Golgi-Apparat der runden Spermatiden ist [Fawcett, 1970, Moreno *et al.*, 2000]. Die Akrosomen-Biogenese ist ein kontinuierlich fortschreitender Prozess, der den Vesikel-Transport und die Organellen-Migration umfasst und bis heute noch nicht genau verstanden ist. Die ersten Schritte der Akrosomen-Formation beginnen in frühen runden Spermatiden während der Golgi-Phase, indem proakrosomale Golgi-Vesikel sezerniert werden und zum Akrosomenbläschen fusionieren [Moreno *et al.*, 2000]. Dieses lagert sich kaudal an den Zellkern bzw. das Akroplaxom, welches dem Zellkern aufliegt an und breitet sich, wahrscheinlich bedingt durch die weitere Anlagerung von Golgi-Vesikeln, in der Kappenphase bis über den Äquator des Zellkerns aus. Während der fortschreitenden Modifikation und Elongation der Keimzellen in der Akrosom- und Reifungsphase

verdichtet sich das Akrosom und passt sich der Form des Spermienkopfes an [Russell *et al.*, 1983; Moreno & Alvarado, 2006]. Das fertige Akrosom besteht aus zwei Membranen: von außen nach innen betrachtet liegt die äußere akrosomale Membran unter der Plasmamembran und die innere über der Kernmembran des Spermiums. Zwischen den beiden akrosomalen Membranen befindet sich die akrosomale Matrix. Das Akrosom bedeckt etwa zwei Drittel des Zellkerns und endet im Equatorial-Segment, an dem die Spermien-Ei-Fusion stattfindet [Yanagimachi, 1994]. Die kaudale Region des Kopfes, die nicht von dem Akrosom bedeckt ist, wird post-akrosomale Region genannt, das dort befindliche Zytoskelett wird als Calyx bezeichnet.

### 1.3.2 Akroplaxom

Eine weitere wichtige Rolle während der Spermio-genese nimmt das Akroplaxom ein. Hierbei handelt es sich um eine subakrosomale, F-Aktin/Keratin-haltige Zytoskelett-Struktur, die kranial auf dem Zellkern aufliegt und durch den Akroplaxom-Schlußring begrenzt und stabilisiert wird (siehe Abb. 1.6). Das Akroplaxom hat zunächst die Funktion, das Akrosom auf dem elongierenden Spermatiden-Zellkern zu verankern [Kierszenbaum *et al.*, 2003]. Während der Akrosomen-Biogenese lagern sich die proakrosomalen Golgi-Vesikel auf dem Akroplaxom an, fusionieren zum Akrosomenbläschen und bilden schließlich das Akrosom aus. Die innere Akrosomen-Membran ist fest mit dem Akroplaxom verbunden, welches wiederum auf der Kernhülle verankert ist (siehe Abb. 1.6B) [Kierszenbaum *et al.*, 2003]. Akrosom und Akroplaxom entwickeln sich im Verlauf der Spermio-genese parallel. Das Akroplaxom und vor allem der Akroplaxom-Schlußring übernehmen weiterhin eine Funktion bei der Kondensation und Formung des Zellkerns [Kierszenbaum *et al.*, 2003; Kierszenbaum & Tres, 2004]. Der akroplaxomale Schlusssring umspannt den Zellkern und ist wie das Akroplaxom fest mit der inneren Akrosomenmembran und der Kernhülle verbunden (siehe Abb. 1.6C). Hierdurch wird zum einen das Akrosom über den Zellkern gespannt und in seiner Position fixiert. Zum anderen reduziert der Ring mit fortschreitender Elongation des Zellkerns seinen Durchmesser [Kierszenbaum & Tres, 2004], so dass er eine formgebende und stabilisierende Funktion einnimmt. In elongierten Spermatiden depolymerisiert das F-Aktin des Akroplaxoms zu G-Aktin [Fouquet & Kann, 1994].



**Abb 1.6: schematische Darstellung des Akrosoms, Akroplaxoms und der transienten Manschette in einer erlongierenden Spermatide.** [modifiziert nach Kierszenbaum & Tres, 2004] (A) elongierende Spermatide mit den charakteristischen Strukturen und der transienten Manschette, (B) Struktur des Akroplaxoms, (C) Struktur des Akroplaxom-Schlußrings, innere AM: innere Akrosomen-Membran, (D) Strukturen eines elongierten Spermatids am Ende nach Rückbildung der Manschette

### 1.3.3 transiente Manschette

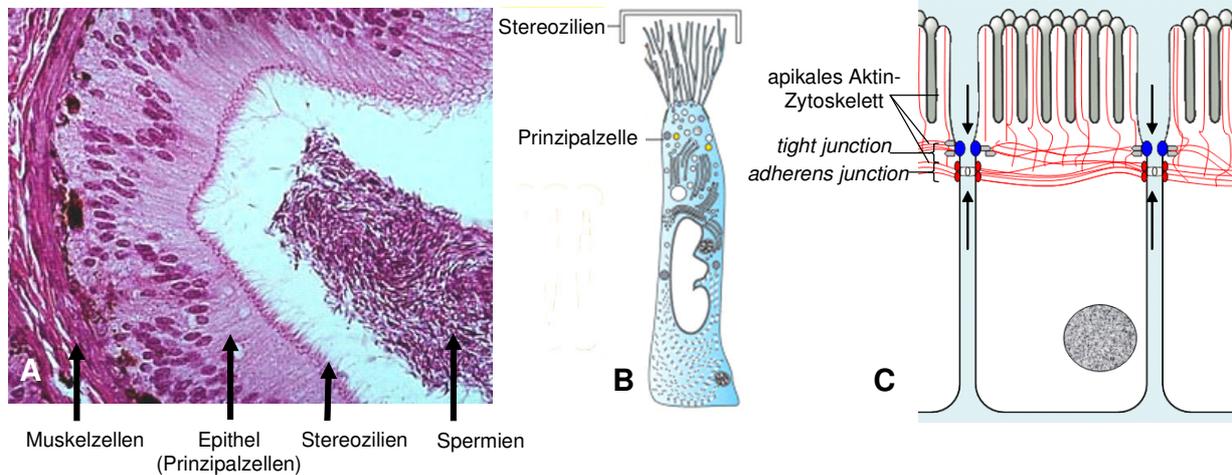
Eine weitere charakteristische Struktur der Spermiogenese ist die so genannte Manschette (siehe Abb. 1.6). Hierbei handelt es sich um eine Mikrotubuli- und Aktin-haltige Zytoskelett-Struktur, die während der Phase der Spermiogenese nur vorübergehend ausgebildet ist und für den Transport von Golgi-Vesikeln und Makromolekülen zum Akrosom und dem sich entwickelnden Flagellum verantwortlich ist. Der Transport der Vesikel erfolgt dabei entlang der Mikrotubuli- und F-Aktin-Filamente mit Hilfe so genannter Vesikel-Motor-Proteine wie Kinesin, Myosin Va, Rab27 und MyRIP [Kierszenbaum *et al.*, 2003]. Die Entstehung der transienten Manschettenstruktur beginnt während der Kappenphase in Korrelation mit der Akrosomen- und Flagellum-Biogenese sowie der Kernelongation. Hierzu zieht sich die Mikrotubuli-Matrix, welche die Spermatiden zunächst komplett umgibt, aus dem kortikalen Bereich zurück und beginnt sich postakrosomal entlang des Zellkerns anzuordnen [Moreno & Schatten, 2000]. Die Mikrotubuli ordnen sich schließlich weiter parallel zur Hauptachse der Spermatiden an und verlaufen vom perinukleären Ring ausgehend, welcher zur Fixierung der Manschettenstruktur dient, in Richtung des Spermienhalses (siehe Abb. 1.6A). Diese Anordnung bleibt nur vorübergehend bestehen und wandert nach erfolgter Kernkondensation und -elongation während der Reifungsphase in späten Spermatiden nach kaudal und wird schließlich mit dem Residualkörper abgestoßen (siehe Abb. 1.6D) [MacKinnon *et al.*, 1973, Moreno & Schatten, 2000]. Neben der Transportfunktion wird für die Manschette, ebenso wie für das Akroplaxom, auch eine Funktion bei der Elongation und Formgestaltung des Zellkerns und des Akrosoms vermutet [Fawcett *et al.*, 1971].

## 1.4 Der Nebenhoden und seine Funktionen

Der Nebenhoden der Säuger setzt sich aus den Ductuli efferentes und dem Nebenhodengang (Ductus epididymis) zusammen. Er lässt sich makromorphologisch in die Abschnitte Nebenhodenkopf (Caput epididymidis), -körper (Corpus epididymidis) und -schwanz (Cauda epididymidis) unterteilen (siehe Abb. 1.7). Der Nebenhodenkopf enthält die 8-20 Ductuli efferentes und den Anfangsabschnitt des Nebenhodenganges. Die Ductuli efferentes stellen die Verbindung zum Rete testis dar, über welche die testikulären Spermatozoen zusammen mit Sekretprodukten der Sertolizellen in den Nebenhoden gelangen. Sie vereinigen sich zum Nebenhodengang. Durch den proximalen Abschnitt (Nebenhodenkörper), der dem Hoden überwiegend dorsal angelagert ist, werden die Spermien mittels peristaltischer Bewegungen der Wand in den Nebenhodenschwanz transportiert. Dieser weist ein erweitertes Lumen auf und ist der Ort der Spermien-speicherung. Der Nebenhoden geht in den Samenleiter (Ductus deferens) über, welcher mit den ihn begleitenden Gefäßen und Hüllen den Samenstrang bildet.

Die Ductuli efferentes und der Nebenhoden sind allesamt mit einem Epithel ausgekleidet und von einem kontraktile Gewebe, in Caput und Corpus Myofibroblasten (kontraktile Bindegewebszellen), in der Cauda glatte Muskelzellen umgeben. Die Nebenhodenabschnitte unterscheiden sich hinsichtlich der Weite des Lumens und der Höhe der auskleidenden Epithelzellen [Robaire & Hintin, 2002]. Nach distal wird das Epithel niedriger und die Muskulatur dicker, so dass die Spermien im Lumen des Nebenhodenkörpers und -schwanzes durch spontane rhythmisch-peristaltische Kontraktion transportiert werden können [Holstein, 1969]. Hauptbestandteil des Nebenhodenepithels sind hochprismatische, stoffwechselaktive so genannte Prinzipalzellen, die entlang des gesamten Nebenhodenkanals zu finden sind [Robaire & Hermo, 1988]. Ihre Ausstattung mit Zellorganellen (u.a. rauhes ER, Golgi-Apparat, Vesikel, Endosomen,

Lysosomen) und ihr Oberflächenbesatz variieren regional und sind den jeweiligen Funktionen des entsprechenden Nebenhodenbereiches angepasst [Robaire & Hermo, 1988]. In den Ductuli efferentes sind sie apikal mit Mikrovilli und Kinozilien (Zilien aus Mikrotubuli) besetzt, während weiter distal im Nebenhoden nur noch Stereozilien, lange Mikrovilli aus Aktin-Filamenten, vorzufinden sind [Robaire & Hinton, 2002]. In Abbildung 1.7 B+C sind exemplarisch das Nebenhodenepithel des Cauda epididymidis sowie eine Prinzipalzelle mit Stereozilien dargestellt.



**Abb.1.7: Das humane Nebenhodenepithel.** (A) mikroskopische Darstellung des Nebenhodenepithels des humanen Cauda epididymidis (Quelle: [http://www.wisc.edu/ansci\\_repro/lec/lec4/malehist.html](http://www.wisc.edu/ansci_repro/lec/lec4/malehist.html)); (B) schematische Darstellung einer Prinzipalzelle mit Stereozilien [modifiziert nach Kierszenbaum, 2003]; (C) schematische Darstellung der *tight junctions*, *adherens junctions* und des apikalen Aktin-Zytoskeletts im resorptiven Nebenhodenepithel

Die Funktionen des Nebenhodens sind vielfältig. Sie umfassen die Konzentration der testikulären Spermien-Flüssigkeit durch Resorption, die Bereitstellung eines passenden biologischen Milieus durch Sekretion, die post-testikuläre Reifung der Spermien sowie den Schutz und die Lagerung der reifen Spermatozoen. An diesen Prozessen ist das epididymale Medium mitsamt dem Epithel aktiv beteiligt. Dabei kommt dem Epithel nicht nur eine Funktion als physiologische Barriere, sondern auch als spezialisiertes Transport-System zu. So spielen z.B. die Prinzipalzellen sowohl eine Rolle bei der Endozytose von extrazellulären Molekülen, als auch bei der Exozytose von sekretorischen Produkten. Durch die Resorption und Sekretion des Nebenhoden-Epithels wird ein spezifisches luminales Milieu für die Reifung und Speicherung der Spermatozoen geschaffen [Turner, 1995; Robaire & Hinton, 2002]. Untersuchungen haben gezeigt, dass es während der Passage der Spermien durch den Nebenhoden durch Wechselwirkung mit den Epithelzellen des Nebenhodenganges und ihren sezernierten Produkte zu einer Reihe biochemischer Veränderungen insbesondere der Spermienoberfläche kommt [Cooper, 1995; Robaire & Hermo, 1988; Jarvis & Robaire, 2001]. Dabei werden bestehende Membrankomponenten modifiziert und umgeordnet, neue Komponenten in die Membran integriert oder assoziiert, andere werden entfernt oder gehen verloren [Jones, 1989; Amann *et al.*, 1993].

Durch die resorptive Funktion des Nebenhodenepithels wird der regulierte Transfer von Ionen, Wasser und kleinen organischen Molekülen aus dem Lumen in das Interstitium vermittelt. Dies geschieht sowohl parazellulär als auch transzellulär vor allem in den Ductuli efferentes, wo bis zu 90 % der Flüssigkeit resorbiert werden [Clulow *et al.*, 1998, Hess, 2000]. Der parazelluläre Transfer erfolgt passiv und bidirektional durch Zellzwischenräume im Epithel und wird durch elektrische oder chemische Gradienten angetrieben. Reguliert wird der parazelluläre Transfer durch Verbindungen zwischen den Epithelzellen, den so genannten epithelialen Schlussleisten (*tight*

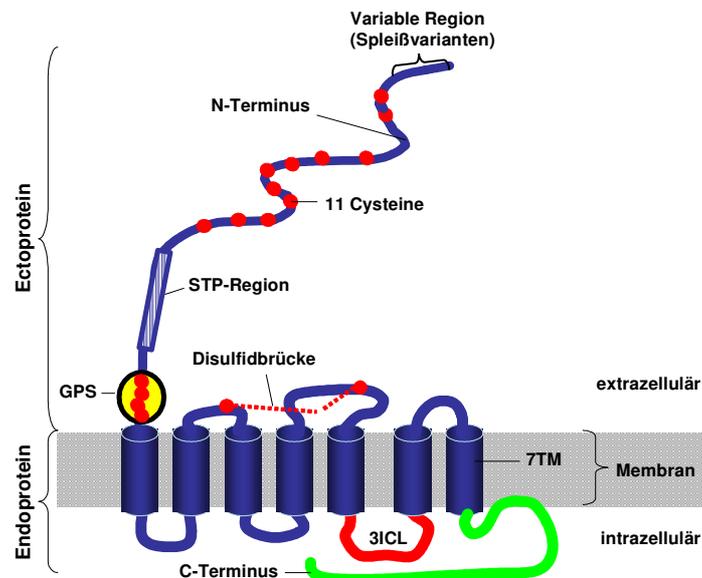
*junctions*), die aus verschiedenen Transmembranproteinen wie z.B. Occludine und Claudine gebildet werden, die die Permeabilität und Selektivität der Zellzwischenräume bestimmen (siehe Abb. 1.7C). Der transzelluläre Transfer erfolgt hauptsächlich durch die nicht mit (Kino-) Zilien beständigen Prinzipalzellen der Ductuli. In der apikalen Domäne dieser Zellen finden sich Ionenkanäle, Aquaporine, Transportproteine und Adaptor-Moleküle, die den regulierten Transfer von Ionen, Wasser und Molekülen vermitteln. Durch die Resorption der Luminallflüssigkeit werden die Spermatozoen pro Volumeneinheit konzentriert und so die intraluminale Spermiedichte erhöht. Zudem trägt die Resorption zur Gestaltung des speziellen biologischen Milieus für die Spermienreifung bei [Clulow *et al.*, 1998]. Eine erhöhte Flüssigkeitsresorption kann zu einer größeren Viskosität der luminalen Spermienflüssigkeit und dadurch zu einem Spermienstau und dem Verschluss der Ductuli efferentes führen; eine inhibierte Resorption hingegen bewirkt eine Verdünnung der luminalen Flüssigkeit und eine Dehnung der Ductuli efferentes. Beides bewirkt letztlich einen Flüssigkeitsrückstau in den Hoden und führt zu Infertilität [Hess, 2003]. Eine regulierte Flüssigkeitsresorption ist unabdingbar, um einen ungestörten Spermientransport sowie die post-testikuläre Reifung und Speicherung der Spermien und die Fertilität zu gewährleisten. Ein bekanntes Beispiel für einen Infertilitäts-Phänotyp aufgrund einer gestörten Flüssigkeitsresorption in den Ductuli ist die Östrogen-Rezeptor-Knockout (ERKO)-Maus [Hess *et al.*, 1997].

In verschiedenen Studien konnten bisher sowohl hormonelle [Hess, 2003; Orgebin-Christ & Jahad, 1979] als auch parakrine Faktoren [Winer & Wolgemuth, 1995] für die Regulation der Flüssigkeitsreabsorption ausgemacht werden. So scheint z.B. die Resorption von Wasser in den Ductuli efferentes Östrogen-abhängig reguliert zu sein [Hess, 2003], während die Sezernierung von Komponenten, die die Spermien fertilisationsfähig machen, androgenabhängig ist [Orgebin-Christ & Jahad, 1979]. Die lokale akute Regulation der Flüssigkeitsresorption erfolgt vermutlich durch die luminalen  $\text{Na}^+$ -Konzentration sowie die Flussrate und extrazelluläres cAMP [Man *et al.*, 2003]. Zur näheren funktionellen Untersuchung der molekularen Vorgänge im humanen Nebenhoden, führten Kirchhoff *et al.* (1990) ein differentielles Screening einer humanen Nebenhoden cDNA-Bank durch. Die Suche nach Nebenhoden-spezifisch exprimierten Genprodukten führte zur Identifizierung eines heptahelikalen Transmembran-Rezeptors (HE6/GPR64) [Osterhoff *et al.*, 1997; Obermann *et al.*, 2003], der eine Rolle bei der lokalen Regulation des transepithelialen Flüssigkeitstransports in den Ductuli efferentes spielt [Davies *et al.*, 2004].

## 1.5 Der heptahelikale HE6-Rezeptor/GPR64 im Nebenhoden

### 1.5.1 HE6: ein Mitglied der B2-Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Das humane HE6-Protein (*human epididymal protein 6*), von dem HUGO Gen-Nomenklatur-Komitee als GPR64 bezeichnet, wird aufgrund seiner Primärstruktur in die B2-Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) mit langem N-Terminus, den so genannten LNB-TM7-Rezeptoren, eingeordnet [Harmar, 2001; Stacey *et al.*, 2000; Osterhoff *et al.*, 1997; Obermann *et al.*, 2003]. Mitglieder dieser GPCR-Subfamilie zeichnen sich durch zwei charakteristische Strukturen aus: 1) sieben hydrophoben  $\alpha$ -Helices, die so genannte Siebentransmembran-Domäne (TM7), die den Rezeptor in der Plasmamembran verankern und durch jeweils drei alternierende extrazelluläre und intrazelluläre Peptidschleifen miteinander verbunden sind, und 2) eine lange und komplexe extrazelluläre hydrophile N-terminale Domäne [Stacey *et al.*, 2000]. Die TM7-Domäne und der intrazelluläre C-Terminus bilden das Endoprotein, die lange N-terminale Domäne das Ectoprotein. In Abbildung 1.8 ist die Struktur des HE6-Rezeptors schematisch dargestellt.



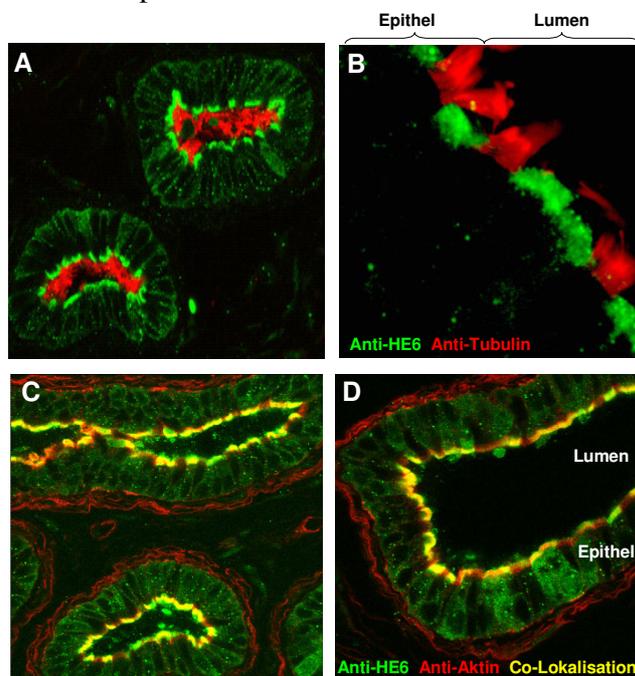
**Abb. 1.8:** Schematische Darstellung des heptahelikalen HE6-Rezeptors (GPR64) der LNB-7TM-Familie [modifiziert nach Kirchhoff *et al.*, 2005]. GPS: G-Protein-gekoppelte Rezeptor Proteolyse-Stelle, 7TM: siebentransmembran Domäne, STP-Region: Serin/Threonin/Prolin-reiche Region (Glykolyierungsstellen), 3ICL: dritter intrazellulärer Loop

Klassischerweise operieren Familie B-GPCRs als Signaltransduktions-Moleküle, indem sie intrazelluläre G-Proteine als Antwort auf extrazelluläre Ligandenbindung aktivieren. Die Liganden-Bindung erfolgt bei den Familie B-Rezeptoren über die ausgeprägte N-terminale Ectodomäne, wobei zusätzliche Wechselwirkungen mit den extrazellulären Schleifen eingegangen werden. Die N-Termini der meisten LNB-TM7-Rezeptoren sind modular organisiert und können aus verschiedenen strukturellen Domänen, die vor allem an Zelladhäsions-Prozessen mit extrazellulären Komponenten und / oder Zell-Zell-Interaktionen beteiligt sind, zusammengesetzt sein [Fredriksson *et al.*, 2002; Bjarnadottir *et al.*, 2004]. Der HE6-N-Terminus weist jedoch keine strukturellen Domänen auf.

Das HE6-Endoprotein ist hoch konserviert (95 % Homologie zwischen Mensch und Nagern) und Kennzeichen der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die dritte intrazelluläre Schleife der GPCRs und zumindest bei einigen Rezeptoren auch der proximale Teil des C-Terminus sind selektiv an der G-Protein-Ankopplung und somit an der Aktivierung vieler verschiedener Effektormoleküle und / oder Ionenkanäle beteiligt [Strader *et al.*, 1994; Wess, 1998]. Untersuchungen mit chimären adrenergen und muscarinen GPCRs haben gezeigt, dass die dritte intrazelluläre Schleife eine Schlüsselrolle bezüglich der Kopplungsspezifität unter den diversen  $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimärer G-Proteine spielt [Kobilka, 1992; Savarese & Fraser, 1992]. Neben der G-Protein-Kopplung kann zusätzlich eine Interaktion der intrazellulären Bereiche der GPCRs mit zyttoplasmatischen *Scaffolding*-Proteine erfolgen, welche dann wiederum den Rezeptor mit einer Vielzahl Signal-Zwischenstufen und intrazellulären Effektoren verlinken und zusätzliche Signalkaskaden triggern können [Hall & Lefkowitz, 2002]. Der intrazelluläre C-Terminus spielt weiterhin eine Rolle bei der Desensibilisierung der GPCRs, welche durch Phosphorylierung des C-Terminus durch eine G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinase moduliert wird [Kierszenbaum, 2003]. Die intrazellulären Bereiche des HE6-Endoproteins, vor allem aber die dritte intrazelluläre Schleife und der C-Terminus erscheinen somit als wichtige Bereiche für Protein-Protein-Interaktionen und die Weiterleitung der Signaltransduktion. Für viele LNB-TM7-Rezeptoren ist bisher jedoch weder ihre Funktion bekannt noch konnte eine G-Protein-Kopplung gezeigt werden (siehe 1.5.3).

### 1.5.2 Lokalisation des HE6-Rezeptors im Nebenhoden

RT-PCR, Northern-Blot-Analysen und *in situ* Hybridisierungen bei Mensch und Nagern [Osterhoff *et al.*, 1997; Obermann *et al.*, 2003] sowie Mikroarray-Analysen von humanen Geweben und Organen [Gottwald *et al.*, 2006] zeigten eine hoch-spezifische Expression des HE6-Transkripts im Nebenhoden, vor allem im Epithel der Ductuli efferentes und des proximalen Ductus epididymidis. Durch Western-Blot-Analysen und immunohistochemische Untersuchungen mit spezifischen HE6-Antikörpern konnte dies Expressionsmuster auch auf Proteinebene bestätigt werden und eine subzelluläre Lokalisation des HE6-Proteins im apikalen, adluminalen Epithelbereich, vor allem in den Stereozilien, jedoch nicht in den Kinozilien, gezeigt werden [Obermann *et al.*, 2003]. Zur Analyse der genauen subzellulären Lokalisation des HE6-Rezeptors im Epithel des Nebenhodens wurden weiterhin Laser-konfokale Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit einem monospezifischen polyklonalen Antikörper (mA23) gegen die TM7-Domäne des murinen HE6 auf perfusionsfixierten Maus-Nebenhodengewebe durchgeführt (Kirchhoff, submitted). In Abbildung 1.9 ist exemplarisch eine kleine Auswahl der konfokalen Immunfluoreszenzbilder gezeigt



**Abb. 1.9: Konfokale Immunfluoreszenz-Analyse der zellulären HE6-Lokalisation im Epithel der Ductuli efferentes bei der Maus** (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. C. Kirchhoff). (A + B) HE6-(grün) und Tubulin (rot)-Markierung; HE6 ist apikal in nicht-Zilien-tragenden Epithelzellen lokalisiert und zeigt keine Co-Lokalisation mit den Mikrotubuli-Kinozilien, (C + D) HE6- (grün) und Aktin (rot)-Markierung; HE6 ist apikal in den Epithelzellen lokalisiert und zeigt eine Co-Lokalisation (gelb) mit den Aktin-haltigen Mikrovilli.

Doppelmarkierungen mit HE6-Antikörper und Tubulin-Antikörper, der die langen Mikrotubuli-haltigen Kinozilien markiert (Abb. 1.9 A+B), ergaben eine strikt apikale Verteilung des HE6-Proteins, die eindeutig auf die Epithelzellen ohne bewegliche Zilien (Kinozilien) beschränkt ist. Die durch den Tubulin-Antikörper (rot) markierten Kinozilien auf den Zilien-tragenden Zellen enthielten eindeutig kein Rezeptor-Protein; auch die übrigen Bereiche dieser Zellen waren negativ. Die maximale HE6-Markierung konnte apikal in den Prinzipalzellen, d. h. den mit Mikrovilli besetzten Epithelzellen, detektiert werden. Die basolaterale Domäne des Epithels sowie die unterhalb des Epithels gelegene Muskelschicht zeigte kaum HE6-Markierung. Durch Doppelmarkierungen mit dem HE6- und einem Aktin-Antikörper (Abb. 1.9 C + D) konnte eine Co-Lokalisation des HE6-Rezeptors mit dem apikalen Aktin-Zytoskelett der nicht-Zilien-tragenden Epithelzellen (Prinzipalzellen) gezeigt werden, so dass eine Lokalisation des HE6-Rezeptors in den Aktin-haltigen Stereozilien angenommen werden kann. Die Lokalisation des Epididymis-spezifischen HE6-Rezeptors ist nach diesen Ergebnissen apikal auf die Prinzipalzellen (Mikrovilli) in den Ductuli efferentes und des proximalen Teils des Ductus epididymidis begrenzt. In diesem Bereich enthält das Epithel eine Vielzahl an Ionenkanälen und Transportern und ist für die

Resorption von bis zu 90 % der luminalen Flüssigkeit verantwortlich [Clulow *et al.*, 1998]. Diese Lokalisation könnte für eine Funktion des HE6-Rezeptors bei der lokalen Kontrolle des transepithelialen Flüssigkeitstransports sprechen. Die enge räumliche Assoziation mit dem apikalen Aktin-Zytoskelett erscheint zudem von funktioneller Bedeutung zu sein, weil in vielen Zelltypen die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts durch GPCR-gesteuerte Signaltransduktions-Kaskaden reguliert wird [Apodaca, 2001; Laroche *et al.*, 2005] bzw. weil die GPCRs mit zytoplasmatischen *Scaffolding*-Proteine interagieren können, welche dann wiederum den Rezeptor mit einer Vielzahl Signal-Zwischenstufen und intrazellulären Effektoren verlinken [Hall & Lefkowitz, 2002]. In resorptiven Epithelien spielt das Aktin-Zytoskelett eine wichtige Rolle beim Auf- und Umbau von Verbindungen zwischen den Epithelzellen und für die Gestalt und Funktion der apikalen Mikrovilli und *tight junctions* und ist so an der Regulation des transepithelialen Flüssigkeitstransfer beteiligt.

### 1.5.3 Funktion des HE6-Rezeptors im Nebenhoden: die HE6-Knockout-Maus

Für viele G-Protein gekoppelte Rezeptoren der LNB-TM7-Subfamilie ist weder ihre Funktion noch der endogene Bindungspartner bekannt. So ist eine G-Protein-Kopplung bisher nicht eindeutig nachgewiesen und es sind kaum intrazelluläre Bindungspartner bekannt. Aus diesen Gründen werden die LNB-TM7-Rezeptoren auch als *Orphan*-Rezeptoren bezeichnet. CD 97 ist der einzige Rezeptor der B2-Familie, dessen Liganden identifiziert wurden [Hamann *et al.*, 1996] und lediglich für den  $\alpha$ -Latrotoxin-Rezeptor CL1 wird aufgrund einer Co-Sedimentation mit  $G\alpha_o$  eine G-Protein-Kopplung vermutet [Lelianova *et al.*, 1997]. Intrazelluläre Interaktionspartner konnten durch Y2H-Studien für die BAI-Rezeptoren ermittelt werden [Shiratsuchi *et al.*, 1998 a+b; Oda *et al.*, 1999].

Um Hinweise auf die Funktion des HE6-Rezeptors im Nebenhoden zu erlangen wurde von Davies *et al.* (2004) eine HE6-Knockout-Maus konstruiert. Der konstitutive Knockout des HE6-Endoproteins, durch den eine mögliche Signaltransduktion des HE6-Rezeptors unterbunden wird, führte zur Subfertilität und schließlich zur Infertilität der männlichen Tiere, wobei der Phänotyp mit zunehmendem Alter der Tiere immer deutlicher wurde. Homozygote weibliche Tiere zeigten dagegen keinen Phänotyp. Die männlichen KO-Tiere hatten keine oder nur wenige missgebildete Spermien im Nebenhoden, große Spermienansammlungen in den Ductuli efferentes sowie ein stark erweitertes Rete testis und teilweise atrophierte Tubuli seminiferi. Dieser Phänotyp ist auf eine Dysregulation der transepithelialen Flüssigkeitsresorption in den Ductuli efferentes zurückzuführen. Es wird vermutet, dass die gezielte Mutation des HE6-Rezeptors eine gesteigerte Flüssigkeitsresorption zur Folge hat, die zu einer übermäßigen Konzentrierung und erhöhten Viskosität der luminalen Spermienflüssigkeit führt. Hierdurch kommt es zu einer Stauung der Spermienflüssigkeit und somit zu einer teilweisen Obstruktion der Ductuli efferentes, die zu einem Flüssigkeitsrückstau in das Rete testis und den Hoden führt und letztendlich sogar testikuläre Atrophie hervorrufen kann.

Durch die HE6-KO-Maus konnte eine zentrale Bedeutung des HE6-Rezeptors für die Regulation des transepithelialen Flüssigkeitstransportes in den Ductuli efferentes und dem proximalen Teil des Ductus epididymis und somit für die männliche Fertilität gezeigt werden [Davies *et al.*, 2004]. Jedoch sind die molekularen Vorgänge dieses Prozesses bis heute nicht aufgeklärt. Möglicherweise könnte HE6 durch Regulation die Funktion der resorptiven Mikrovilli sowie die Permeabilität der epithelialen Barriere (*tight junctions*) steuern. Für den HE6-Rezeptor sind weder Liganden oder Agonisten/Antagonisten, noch eine Signaltransduktion bekannt. Bei dem HE6-Rezeptor handelt es sich also im wahrsten Sinne des Wortes um einen *Orphan*-Rezeptor mit unbekannter Wirkweise.

## 1.6 Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts und der Profiline im Genitaltrakt

Die kontrollierte Formveränderung ist eine der wichtigsten Funktionen lebender Zellen und eines der zentralen Themen der Zellbiologie. Ihr liegt letztendlich stets der gleiche molekulare Mechanismus zugrunde, nämlich ein regulierter, zyklischer Übergang zwischen monomerem G-Aktin und filamentösem F-Aktin. Die männlichen Keimzellen erfahren während ihrer Differenzierung, von runden Spermatiden zu lang gestreckten Spermien, eine dramatische morphologische Formveränderung, die für die Befruchtungsfähigkeit von grundlegender Bedeutung ist. Für diesen Differenzierungsprozess spielt die regulierte Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts eine entscheidende Rolle [Vogl, 1989]. So bilden sich im Verlauf der Spermio-genese in spezifischen Stadien und in spezifischen Regionen der männlichen Keimzellen und der Sertolizellen charakteristische Zytoskelett-Strukturen aus, die für die morphologische Gestaltung der Spermien, die Akrosomen-Biogenese, den Vesikel- und Proteintransport, sowie die Spermienfunktionen essentiell sind [Fouquet & Kann, 1994; Kierszenbaum *et al.*, 2003; Kierszenbaum & Tres, 2004]. Beispiele typischer Zytoskelett-Strukturen sind das subakrosomale F-Aktin/Keratin-haltige Akroplaxom, sowie die postakrosomale F-Aktin-/Mikrotubuli-haltige Manschetten-Struktur, welche beide eine Funktion bei der Elongation und Formgestaltung des Zellkerns und des Akrosoms haben. Des Weiteren dienen spezielle F-Aktin-haltige Strukturen der Sertolizellen, die so genannten ektoplasmatischen Spezialisierungen, der Ausrichtung und Orientierung der Keimzellen im Epithel. In resorptiven Epithelien wie dem Nebenhodenepithel ist das Aktin-Zytoskelett maßgeblich an der Regulation des trans- und parazellulären Flüssigkeitstransportes beteiligt, in dem es am Auf- und Umbau von Verbindungen zwischen den Epithelzellen beteiligt ist und für die Gestalt und Funktion der apikalen Mikrovilli/Stereozilien eine essentielle Rolle spielt [Hirokawa *et al.*, 1982; Hofer & Drenckhahn, 1996]. Auch bei der physiologischen Regulation der epithelialen Schlussleiste, mit dessen Proteinen es über eine Brücke von Adaptermolekülen verbunden ist, ist das Aktin-Zytoskelett maßgeblich beteiligt [Madara *et al.*, 1986; Madara, 1987, Wittchen *et al.*, 1999]. Das Aktin-Zytoskelett hat ferner eine Funktion bei Membran-Umgestaltungen und intrazellulärer Signaltransduktion, während der post-testikulären Reifung der Spermien im Nebenhoden [Lin *et al.*, 2002], sowie bei der Kapazitation und Akrosomen-Reaktion im weiblichen Genitaltrakt [Breitbart *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 1999].

Die Dynamik und Flexibilität des Aktin-Zytoskeletts entsteht zum einen durch das Polymerisationsvermögen der Aktinmonomere, zum anderen durch die regulatorischen Einflüsse einer Vielzahl Aktin-bindender Proteine. Diese beeinflussen unter anderem die Stabilität, die Lage, den Verzweigungsgrad, die Vernetzung und die Membran-Assoziation der Aktin-Filamente [de la Heras *et al.*, 1997; Hurst *et al.*, 1998; Lecuyer *et al.*, 2000; Heid *et al.*, 2002]. Eine Gruppe dieser vielen Aktin-regulatorischen Proteine sind die Profiline.

### 1.6.1 Die Profilin-Isoformen im Hoden der Säuger

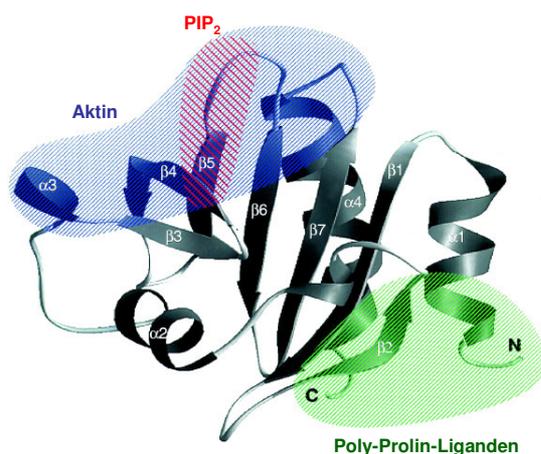
Profiline sind kleine Aktin-bindende Proteine, die für die Zellformung und Polarität in jedem bisher untersuchten Zelltyp essentiell sind [Witke, 2004]. Profilin wurde erstmals 1977 von Carlsson *et al.* als G-Aktin-bindendes Protein beschrieben, das die Dynamik des Mikrofilament-systems entscheidend beeinflusst. Das circa 14 kDa große Protein wurde seit dem in allen bisher untersuchten Eukaryonten wie Protozoen, [Reichstein *et al.*, 1979], Echinodermaten [Tilney *et al.*, 1983], Insekten [Cooley *et al.*, 1992], Pflanzen [Valenta *et al.*, 1991], und Säugern [Kwiatkowski *et al.*, 1988] nachgewiesen und gilt als ubiquitär exprimiertes und hochkonserviertes Protein. Sogar

virale Profiline wurden nachgewiesen [Blasco *et al.*, 1991]. Die essentielle Bedeutung in tierischen, mehrzelligen Organismen wurde durch die Generierung von Profilin-defizienten Mäusen bewiesen, deren homozygote Embryonen bereits im 2-4-Zellstadium sterben [Witke *et al.*, 2001].

Die meisten Spezies besitzen unterschiedliche Profilin-Isoformen mit distinkter Gewebeverteilung und/oder differenten Bindungscharakteristika [Kaiser *et al.*, 1986; Binette *et al.*, 1990; Haugwitz *et al.*, 1991; Staiger *et al.*, 1993; Honore *et al.*, 1993; Lambrechts *et al.*, 1995]. Beim Säuger waren bis vor kurzem vier Profilin-Isoformen (PFN I, IIa, IIb und III) bekannt, die von drei Profilin-Genen kodiert werden. Die einzelnen Profilin-Isoformen sind, mit Ausnahme des ubiquitär exprimierten Profilin I, in distinkten Geweben exprimiert. So ist Profilin IIa hauptsächlich im Gehirn lokalisiert [Witke *et al.*, 1998 + 2001] und Profilin IIb bislang nur in einigen Geweben nachgewiesen [Lambrechts *et al.*, 2000]. Bei Profilin III handelt es sich um eine Testis-spezifische Isoform, die in den Keimzellen lokalisiert ist [Hu *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002; Obermann *et al.*, 2005]. Im Zuge eines *Yeast Two-Hybrid* Screen mit dem HE6-C-Terminus als Bait konnte in unserer Arbeitsgruppe ein weiteres, hoch konserviertes Profilin-ähnliches Protein, das Profilin IV, identifiziert werden. Dieses wurde von Obermann *et al.* (2005) kloniert und näher charakterisiert. Hierbei zeigte sich, dass der Hauptexpressionsort in allen untersuchten Spezies (Mensch, Ratte und Maus) der adulte Hoden ist, und dass das Protein ebenso wie Profilin III in den Keimzellen lokalisiert ist. Im Vergleich zu somatischen Geweben weist der Hoden der Säugetiere, einschließlich des Menschen, somit ein ungewöhnlich komplexes Muster der Profilin-Expression auf.

### 1.6.2 Struktur und Funktion der Profiline

Trotz geringer Aminosäuresequenz-Homologien sind Struktur und Funktion der Profiline, auch aus unterschiedlichen Spezies, stark konserviert und nahezu identisch [Fedorov *et al.*, 1994; Rothkegel *et al.*, 1996; Schutt *et al.*, 1993; Polet *et al.*, 2006]. Die Struktur wird durch eine kompakt gefaltete Polypeptidkette mit einer zentralen Domäne aus fünf bis sieben antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern gebildet, welche auf der einen Seite von zwei terminalen  $\alpha$ -Helices und auf der gegenüberliegenden Seite Spezies-abhängig von zwei weiteren  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblättern flankiert ist. Die Struktur der Säuger-Profiline ist schematisch in Abbildung 1.11 dargestellt.



**Abb. 1.11: Schematische Darstellung der Profilin-Tertiärstruktur mit Bindungsregionen von Aktin, PIP<sub>2</sub> und Poly-Prolin-Liganden** [modifiziert nach Schlüter *et al.*, 1997]. Die Bindungsregionen von Aktin (blau) und PIP<sub>2</sub> (rot) überlappen, während die Bindungsregion für Poly-Prolin-reiche Proteine (grün) auf der gegenüberliegenden Seite des Moleküls lokalisiert ist. Die Interaktion von Profilin mit Poly-Prolin hat keinen Einfluss auf die Wechselwirkung mit Aktin oder PIP<sub>2</sub>, während sich die Bindung von Aktin und PIP<sub>2</sub> gegenseitig ausschließen.

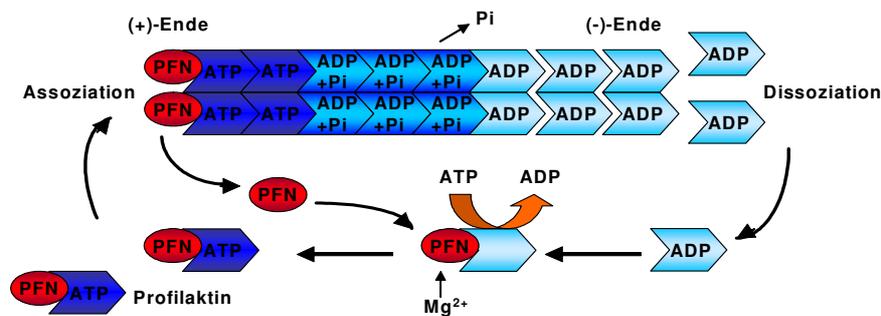
Für die Profiline sind bisher eine Vielzahl an Liganden identifiziert, deren Liste stetig wächst. Jedoch zeichnen sich Profiline biochemisch durch drei charakteristische Eigenschaften aus: sie binden fast alle an G-Aktin [Carlsson *et al.*, 1977], interagieren mit Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) [Lassing & Lindberg, 1985] und wechselwirken mit Poly-L-Prolin bzw. mit Proteinen, die Poly-Prolin-Motive enthalten [Kaiser *et al.*, 1989]. Durch die Wechselwirkung mit G-Aktin haben die Profiline einen entscheidenden Einfluss auf die Dynamik der Aktin-

Polymerisation. Die Interaktion mit PIP<sub>2</sub> und Poly-Proilin-Liganden, wie VASP oder p140mDia, bindet Profilin in zahlreiche Signaltransduktions-Kaskaden ein, die zur Reorganisation des Mikrofilamentsystems führen [Witke, 2004]. Jedoch gibt es quantitative Unterschiede in der Affinität zu den Profilin-Liganden [Schlüter *et al.*, 1999]. Prinzipiell hat Profilin I eine höhere Affinität für Aktin, während Profilin IIa stärker an Poly-Proilin bindet [Wittenmayer *et al.*, 2000; Gieselmann *et al.*, 1995]. Maus Profilin IIb, für das eine Assoziation mit Mikrotubuli beschrieben wurde, bindet nicht mehr G-Aktin, und die Interaktion mit Poly-Proilin-Liganden ist stark geschwächt [Di Nardo *et al.*, 2000]. Jedoch interagiert humanes Profilin IIb mit G-Aktin und die Wechselwirkung mit Poly-Proilin-Liganden ist nicht beeinflusst [Wittenmayer *et al.*, 2000]. Für die Testis-exprimierten Profileine ist das charakteristische Bindungsverhalten gegenüber Aktin, Poly-Proilin und PIP<sub>2</sub> kaum untersucht. Lediglich für das murine Profilin III wurde bisher eine Interaktion mit Aktin und Poly-Proilin gezeigt, jedoch nicht quantifiziert [Hu *et al.*, 2001]. Für Profilin IV liegen keine Daten vor.

### 1.6.2.1 Der Einfluss von Profilin auf das Aktin-Zytoskelett

Das Aktin-Zytoskelett ist eine hochdynamische Struktur, die räumlich und zeitlich koordiniert auf- und abgebaut wird. Grundlage ist die reversible Polymerisierung der globulären Aktin-Moleküle zu linearen Filamenten. Dieser Prozess ist abhängig von dem Nukleotid ATP und zweiwertigen Ionen, insbesondere den Magnesium (Mg<sup>2+</sup>)- oder Kalzium (Ca<sup>2+</sup>)-Ionen. Das Aktin-Molekül besteht aus vier Untereinheiten, die in zwei Domänen unterteilt sind. Zwischen den Domänen befindet sich eine tiefe Furche, in der sich ein ATP zusammen mit den Ionen anlagert [Kabsch *et al.*, 1990]. Dieses Monomer kann mit weiteren Aktinmolekülen polymerisieren und so Filamente ausbilden. Jedes Aktin-Filament besitzt ein so genanntes (+)-Ende und ein (-)-Ende. ATP-Aktin bindet bevorzugt am (+)-Ende, so dass das Filament an diesem Ende wächst. Verbunden mit der Polymerisation ist die Dephosphorylierung des Aktin-gebundenen ATP zu ADP [Carlier, 1991]. Durch die Hydrolyse des ATP vermindert sich die Affinität des ADP-Aktin-Moleküls zum F-Aktin und es dissoziiert vom (-)-Ende ab. Anschließend wird aufgrund der höheren Konzentration an ATP im Vergleich zu ADP innerhalb der Zelle das ADP am Molekül gegen ATP ausgetauscht. Das Monomer steht nun wieder für die Assoziation an das Filament bereit. So kommt es zu einem stetigen Fluss an Aktin-Molekülen durch das Filament, dem sog. „treadmilling“-Effekt [Pollard & Borisy, 2003]. Begrenzender Faktor dieses Prozesses ist die Verfügbarkeit von G-Aktin.

Profilin bindet an globuläres Aktin stöchiometrisch in einem 1:1-Verhältnis und zeigt *in vitro* eine polymersiationsfördernde Funktion (siehe Abb. 1.12). Es ist in der Lage den Nukleotid- und Kationen-Austausch am G-Aktin zu erhöhen, wodurch die Austauschrate etwa um den Faktor 140 gesteigert wird [Selden *et al.*, 1999]. Gleichzeitig inhibiert Profilin die ATPase-Aktivität von Aktin [Tobacman & Korn, 1982]. Neben ATP wird auch Magnesium komplexiert. Die Ionen bewirken eine Konformationsänderung des G-Aktin [Otterbein *et al.*, 2001]. Hierdurch wird polymerisationskompetentes Mg<sup>2+</sup>-ATP-Aktin in Form von Profilaktin, dem Komplex aus Profilin mit ATP-G-Aktin und Magnesium, zur Verfügung gestellt. Dieses Profilaktin zeigt im Vergleich zu monomerem G-Aktin eine höhere Affinität zu F-Aktin, wodurch die Polymerisierung zu F-Aktin beschleunigt wird [Pantaloni & Carlier, 1993]. Die Profilin-Aktin-Komplexe werden direkt an die (+)-Enden von Aktin-Filamenten addiert, mit anschließender Dissoziation des Profilins vom Filament [Pollard & Cooper, 1984; Pring *et al.*, 1992; Tilney *et al.*, 1983]. Die Bildung und polymersiationsfördernde Wirkung des Profilaktins wurde erstmal von Tilney *et al.* (1983) für das Spermien-Profilin des Seeigels beobachtet, wo es an der Ausbildung des so genannten akrosomalen Fadens während der Akrosomen-Reaktion beteiligt ist.



**Abb. 1.12: Schematische Darstellung der Aktin-Polymerisierung mit Beteiligung von Profilin** [modifiziert nach Holt & Koffer, 2001] Profilin (PFN) fördert den Nucleotid-Austausch (ADP zu ATP) am G-Aktin-Molekül (blaue Boxen). Der Komplex aus ATP-G-Aktin, Magnesium ( $Mg^{2+}$ ) und Profilin (Profilaktin) assoziiert an das (+)-Ende der Aktin-Filamente. Profilin löst sich darauffolgend vom Aktin. Im Filament bewirkt die ATPase-Aktivität des Aktins die Hydrolyse von ATP. Am (-)-Ende dissoziieren die ADP-Aktin-Moleküle ab.

Die Bindung von Aktin an Profilin wird durch die Helix drei, die  $\beta$ -Faltblattstränge 4, 5, 6 und den N-terminalen Bereich der Helix vier des Profilins (vergl. Abb. 1.11) an die Subdomänen eins und drei des Aktins vermittelt [Schutt *et al.*, 1993]. Dabei spielen unter anderem die hochkonservierten C-terminalen Aminosäuren Ile73, His119, Gly121 und Asn124 des Profilin-Moleküls eine essentielle Rolle.

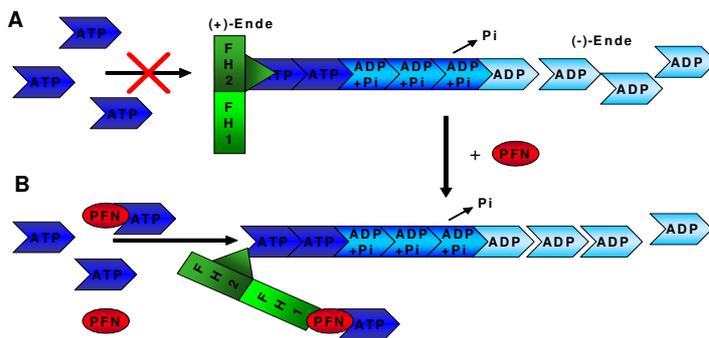
### 1.6.2.2 Poly-Prolin-Liganden von Profilin und ihr Einfluss auf die Aktin-Polymerisation

Mit der Identifikation des *vasodilator stimulated phosphoprotein* (VASP) als erstem Poly-Prolin-Ligand des Profilins erhielt die Poly-Prolin-Bindung erstmals eine biologische Bedeutung [Reinhard *et al.*, 1995]. In der Zwischenzeit sind zahlreiche Poly-Prolin-Liganden charakterisiert worden, die zum großen Teil Mitglieder von Signaltransduktions-Kaskaden sind. Die Bedeutung dieser Proteine wird in der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen gesehen, überwiegend zwischen Mikrofilament-assoziierten und/oder Proteinen, die in die Signalketten eingebunden sind [Holt & Koffer, 2001]. Dementsprechend sind die meisten dieser Polypeptide direkt oder indirekt mit der Membran assoziiert. Von besonderer Bedeutung in Bezug auf die subzelluläre Aktindynamik an der Membran sind die Ena/VASP- und die FH (*formin homology*)-Proteine.

Die Interaktion zwischen VASP und Profilinen ist bisher am besten dokumentiert [Reinhard *et al.*, 1995; Gertler *et al.*, 1996]. VASP enthält neben zwei EVH (*Ena-VASP-homology*)-Domänen eine zentrale Prolin-reiche Region (GPPPPP, sog. GP5-Motiv), welche die Interaktion mit dem C-Terminus der Profiline vermittelt [Lambrechts *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 1997]. Ihm wird eine Adapter-Funktion zugeschrieben, indem es gleichzeitig an Profilin als auch über die EVH1-Domäne an weitere Mikrofilament-Proteine bindet. So spielt VASP eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Zytoskelett-Dynamik, indem es die Aktin-Filamentierung durch die Rekrutierung von Profilaktin an Orte mit hoher Aktin-Dynamik und die Bildung von Nuklei, den Anfangsstadien der Aktinfilamente, fördert [Niebuhr *et al.*, 1997]. Darüber hinaus inhibiert VASP das *capping*-Protein Gelsolin und sichert so die Verfügbarkeit freier (+)-Enden [Bearer *et al.*, 2000].

Die FH-Proteine sind ebenfalls an der Regulierung des Aktin-Zytoskeletts durch Rekrutierung von Profilaktin beteiligt. Formine sind modulare Proteine, die spezielle Domänen und funktionelle Motive enthalten und bereits in einer Vielzahl von Spezies nachgewiesen wurden [Wallar & Alberts, 2003]. Sie verfügen über drei FH- und eine GTPase-Bindungsdomänen. Mit der FH2-Domäne binden sie an die (+)-Enden der Aktin-Filamente und reduzieren dadurch als *capping*-Protein die Polymerisationsrate [Pring *et al.*, 2003; Wallar & Alberts, 2003]. Bei Bindung von Profilin an eine Poly-Prolin-reiche Region der ersten FH-Domäne, d. h. bei Rekrutierung von

Profilin-Aktin-Komplexen, wird die Polymerisation jedoch gefördert [Kovar *et al.*, 2003; Pring *et al.*, 2003; Sagot *et al.*, 2002]. RhoGTPasen stimulieren diesen Prozess. Es wurde bereits für verschiedene FH-Proteine, unter anderem Bnip1 und diverse Diaphanous-Proteine eine Interaktion mit Profilin über die Poly-Proilin-Sequenz der ersten FH-Domäne beschrieben [Watanabe *et al.*, 1997; Wallar & Alberts, 2003]. Eines dieser Proteine ist p140mDia, das Säuger-Homologe zu den Diaphanous-Proteinen von *Drosophila*. Dieses Protein interagiert über seine GTPase-Bindungsdomäne mit den kleinen GTPasen (Rho, Rac oder Cdc24) und trägt durch Rekrutierung von Profilin-Aktin-Komplexen zur Aktin-Filamentbildung bei [Krebs *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 1997]. Für Profilin konnte dementsprechend ein direkter Zusammenhang mit der Cdc42-induzierten Aktin-Reorganisation gezeigt werden [Yang *et al.*, 2000]. In Abbildung 1.13 ist die Wirkweise der FH-Proteine mit Profilinen bei der Regulation des Aktin-Zytoskeletts dargestellt.



**Abb. 1.13: Schematische Darstellung der Wirkweise der FH-Proteine bei der Regulation des Aktin-Zytoskeletts** [modifiziert nach Wallar & Alberts, 2003] (A) Ohne Profilin binden FH-Proteine an das (+)-Ende der Aktin-Filamente und inhibieren als *Capping*-Protein die Polymerisation. (B) In Anwesenheit von Profilin wird die Polymerisierung jedoch gefördert.

Für die Interaktion mit Profilin typische prolinreiche Regionen umfassen mindestens fünf Proline in Folge, jedoch vermitteln acht bis zehn Proline stärkere Wechselwirkungen. Diese Folge kann durch Glycin unterbrochen sein und wird als GP5-Motiv bezeichnet [Lambrechts *et al.*, 1997]. Die Bindungsstelle auf Seiten des Profilin besteht aus einem hochkonservierten, hydrophoben Bereich zwischen den N- und C-terminalen Helices, an dem die Aminosäuren Tryptophan 3, Tyrosin 6, Tryptophan 31, Histidin 133 und Tyrosin 139 beteiligt sind. Mutationen oder Deletionen in diesem Bereich inhibieren die Profilin-Poly-Proilin-Interaktion [Bjorkegren-Sjogren *et al.*, 1997; Haarer *et al.*, 1993; Mahoney *et al.*, 1997]. Die stärkere Bindung von Profilin IIa an Poly-Proilin wird auf einen Aminosäureaustausch zurückgeführt, der eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung erlaubt (Serin 29 in I zu Tyrosin 29 in IIa) [Nodelman *et al.*, 1999]. Im Vergleich zur Aktin-Bindungsregion ist die Poly-Proilin-Domäne auf der abgewandten Seite des Profilins lokalisiert (siehe Abbildung 1.13). Die Interaktion mit Poly-Proilin hat keinen Einfluss auf die Wechselwirkung mit Aktin oder sauren Phospholipiden [Archer *et al.*, 1994; Metzler *et al.*, 1994].

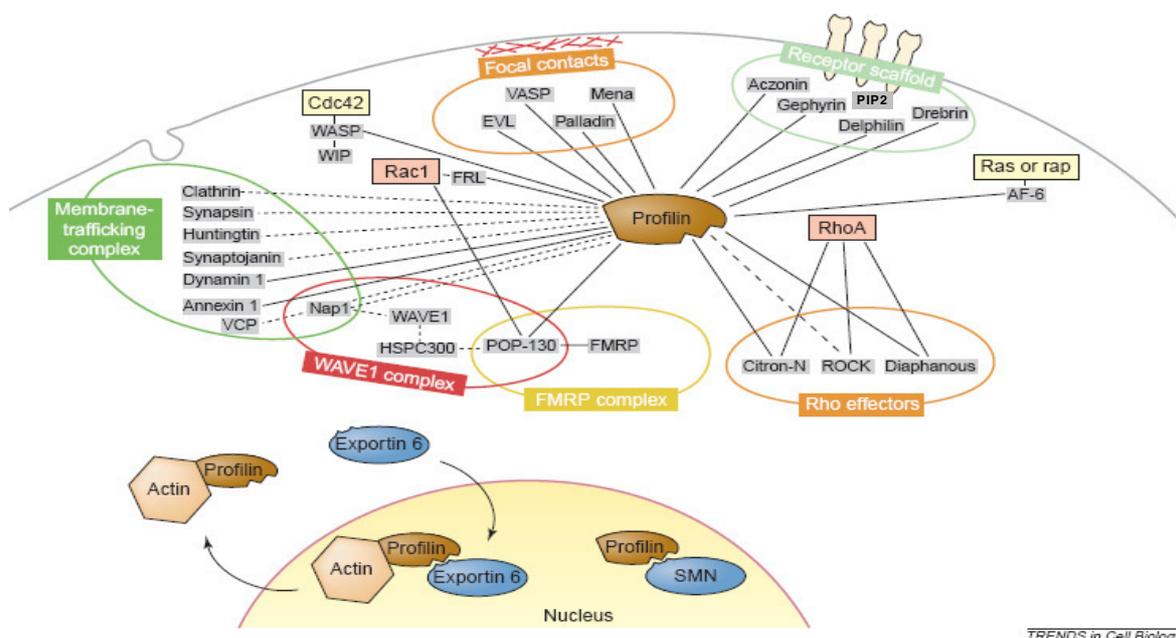
### 1.6.2.3 PIP<sub>2</sub>-vermittelte Aktin-Reorganisation

Die Interaktion von Profilin mit sauren Phospholipiden, insbesondere Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), bindet es in PIP<sub>2</sub>-abhängige Signalkaskaden, wie den Rezeptor-Tyrosinkinase-Weg ein. Die PIP<sub>2</sub>-vermittelte Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts ist daher bei membran-assoziierten Vorgängen von Bedeutung [Schlüter *et al.*, 1997]. Über die Interaktion mit PIP<sub>2</sub> wird Profilin in kortikale Bereiche mit hoher Aktindynamik rekrutiert [Buss *et al.*, 1992]. Die Interaktion von Profilin mit PIP<sub>2</sub> beruht auf der Wechselwirkung der negativ geladenen Phospholipid-Kopfgruppe mit basischen Aminogruppen des Proteins. Da die PIP<sub>2</sub>- und Aktin-Bindestellen überlappen und aufgrund der höheren Affinität von Profilin für PIP<sub>2</sub>, führt die Bindung von PIP<sub>2</sub> an Profilin zur Dissoziation des Profilin-Aktin-Komplexes [Machesky *et al.*, 1990; Fedorov *et al.*, 1994; Haarer *et al.*, 1993]. Zudem bewirkt PIP<sub>2</sub> eine Konformationsänderung

des Profilins und inhibiert auf diese Weise die Interaktion mit Aktin [Ragunathan *et al.*, 1992]. Die Verteilung von PIP<sub>2</sub> in der Membran bestimmt somit die Konzentration an aktivem Profilin in diesen Bereichen. Profilin-gebundenes PIP<sub>2</sub> ist vor der Hydrolyse durch Phospholipase C<sub>γ</sub>1 geschützt, solange diese nicht durch die Rezeptor-Tyrosin-Kinase phosphoryliert und damit aktiviert wird. Nach Aktivierung der Phospholipase C<sub>γ</sub>1 wird PIP<sub>2</sub> in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-3-Phosphat (IP<sub>3</sub>) gespalten, wodurch gleichzeitig Profilin freigesetzt wird [Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1991]. Die lokale Aktivierung von membranständigen Rezeptoren führt somit zur Akkumulation von freiem Profilin. Dieses fördert den Nukleotid-Austausch an G-Aktin-Molekülen und ermöglicht so die F-Aktinbildung in diesem Bereich. Des Weiteren kann PIP<sub>2</sub> Poly-Prolin-Peptide vom Profilin verdrängen, wodurch es eine tragende Rolle bei der Regulation von Profilin in der Zelle erhält [Lambrechts *et al.*, 1997].

### 1.6.3 Die vielfältigen Funktionen der Profiline in der Zelle

Die hier beschriebenen Funktionen des Profilins geben lediglich einen kleinen Einblick in die Vielfalt der Profilin-Interaktionen und die Möglichkeiten der Regulation des Aktin-Zytoskeletts in der Zelle. So ist inzwischen eine Vielzahl an Profilin-Liganden beschrieben, deren Zahl stetig wächst, und die Profiline in diverse Signaltransduktionswege einbinden. Durch die Beteiligung an diversen Signaltransduktionswegen werden unter anderem die Aktin-Polymerisation, Membran-Bewegungen, Rezeptoraktivitäten oder Kernaktivitäten reguliert. Viele der beteiligten Profilin-Liganden und Proteine interagieren und sind Bestandteil verschiedenen Komplexe. Es wird daher vermutet, dass den Profilinen eine zentrale Rolle bei der Regulation und Vermittlung der molekularen Interaktionen und der Vernetzung zum Aktin-Zytoskelett zukommt [Witke, 2004]. So ist auch anzunehmen, dass die Profiline für die Differenzierung der Spermatozoen und die männliche Fertilität von essentieller Bedeutung sind. Abb. 1.14 zeigt die Vielfalt der bisher beschriebenen Profilin-Interaktionen und die komplexe Einbindung in verschiedene zelluläre Komplexe.



TRENDS in Cell Biology

**Abb. 1.14: Netzwerk der molekularen Profilin-Interaktionen** [aus Witke, 2004]. Dargestellt sind bekannte Profilin-Liganden, die entsprechend ihrer zellulären Lokalisation und den Komplexen, in denen sie gefunden wurden, gruppiert sind. Einige der Profilin-Liganden kommen überlappend in zwei Gruppen vor, wodurch ein Crosstalk zwischen den Gruppen, mit Profilin als gemeinsamem Nenner, zustande kommt. Es fällt auf, dass Profilin mit vielen kleinen GTPasen wie RAC1, RhoA, cdc42, Ras und Rap interagiert, die in Signaltransduktionswege zum Aktin-Zytoskelett involviert sind. Bekannte direkte Interaktionen zwischen Profilin und den Liganden sind durch durchgehende Linien gekennzeichnet, während gestrichelte Linien vermutete Interaktionen darstellen.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ein Aspekt dieser Arbeit war der heptahelikale HE6-Rezeptor (GPR64) und die Frage nach seiner Funktion beim transepithelialen Flüssigkeitstransport in den ableitenden Samenwegen. Der HE6-Rezeptor ist in den Epithelzellen der Ductuli efferentes und des proximalen Nebenhodenkopfes exprimiert und zeigt eine Co-Lokalisation mit dem apikalen Aktin-Zytoskelett. Er wird in die Familie B der G-Protein gekoppelten Rezeptoren [Osterhoff *et al.*, 1997; Obermann *et al.*, 2003] eingeordnet und spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des transepithelialen Flüssigkeitstransportes im Nebenhoden, der von zentraler Bedeutung für die männliche Infertilität ist [Kirchhoff *et al.*, 2006]. Möglicherweise handelt es sich bei HE6 um einen lokalen Sensor für die Steuerung der Flüssigkeitsresorption. Die molekularen Funktionen des HE6-Rezeptors, etwaige Liganden bzw. die beteiligten Signaltransduktionswege sind jedoch unbekannt. Der Aufbau der LNB-TM7-Rezeptoren aus einem langen extrazellulären N-Terminus, charakteristischerweise mit Protein-Domänen für Adhäsions- und Interaktions-Prozesse, und der typischen TM7-Region der G-Protein gekoppelten Rezeptoren legt nahe, dass es sich bei diesen Rezeptoren um natürliche Chimeren aus Zell-Adhäsions-Proteinen und Signaltransduktions-Rezeptoren handelt, welche (äußere) Zell-Kontakt-Signale in intrazelluläre Signale umwandeln können. Aufgrund seiner Lokalisation in unmittelbarer Nähe zum apikalen Aktin-Zytoskelett, liegt die Vermutung nahe, dass HE6 am Anfang eines Signaltransduktionsweges stehen könnte, der ein Signal von der adluminalen Seite des Epithels auf das apikale Zytoskelett und die epitheliale Schlussleiste weiterleitet und so den transzellulären bzw. parazellulären Flüssigkeitstransport reguliert.

Um Hinweise auf die molekulare Funktion des HE6-Rezeptors zu erhalten, wurde von Davies *et al.* (2007) das Genexpressionsmuster des Nebenhodenkopfes von Wildtyp- und HE6-KO-Mäusen durch differentielles Screening und Mikroarray-Analyse miteinander verglichen. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine Validierung funktionell interessanter Gene im Vergleich zwischen KO und WT durch quantitative RT-PCR-Analyse sowie die Lokalisation eines beeinflussten Transkripts durch *in situ* Hybridisierung. Die erzielten Ergebnisse wurden in Davies *et al.* (2007) veröffentlicht.

Ein weiterer Weg zur Aufklärung des HE6-Signaltransduktionsweges ist die Identifizierung intrazellulärer Bindungspartner. Um Hinweise auf die molekulare Funktion und die beteiligten Signaltransduktionswege des HE6-Rezeptors in den Epithelzellen zu erhalten, wurden daher im Rahmen dieser Arbeit intrazelluläre Protein-Protein-Wechselwirkungen des HE6-Rezeptors untersucht. Für die Suche nach intrazellulären Bindungspartnern kamen biochemisch-physikalische Methoden wie Affinitätschromatographie oder Co-Immunoprecipitation nicht in Frage, da sich das HE6-Protein nicht rekombinant exprimieren und in den für diese Methoden geeigneten Puffern nicht ausreichend solubilisieren ließ. Als Methode zur Detektion nach Bindungspartnern wurde deshalb das *Yeast Two-Hybrid System (Gal4 Matchmaker Two-Hybrid System 3)* gewählt, mit dem etwaige neue Bindungspartner sofort auf cDNA-Ebene identifiziert werden können.

Eine weitere Protein-Familie die für die männliche Fertilität eine entscheidende Rolle spielen könnte, sind die Profiline, kleine Aktin-bindende Proteine, die bei der Regulation des Zytoskeletts und in vielen Signaltransduktionswegen eine essentielle Rolle übernehmen. In einem *Yeast Two-Hybrid Library-Screen* mit dem HE6-C-Terminus wurde eine neue Profilin-Isoform, das Profilin IV entdeckt, das jedoch hauptsächlich im Testis exprimiert ist [Obermann *et al.*, 2005]. Im Vergleich zu somatischen Geweben weist der Hoden ein ungewöhnlich komplexes Muster der Profilin-Expression auf. Alle bekannten Profiline werden in diesem Organ exprimiert, Profilin III und IV

jedoch überwiegend oder sogar ausschließlich [Hu *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002; Obermann *et al.*, 2005]. Die männlichen Keimzellen sind der Hauptexpressionsort der Profiline. Die Komplexität sowie die Keimzell-spezifische Expression sprechen für eine zentrale und möglicherweise distinkte Rolle der Profiline während der Spermiendifferenzierung und möglicherweise noch während des Befruchtungs-Vorganges selbst und könnten somit von entscheidender Bedeutung für die männliche Fertilität sein. Jedoch sind die biochemischen Eigenschaften sowie die Funktionen der Testis-exprimierten Profiline der Säuger bisher kaum untersucht und nicht bekannt. Es stellte sich die Frage, warum der Hoden so viele verschiedene Profilin-Isoformen exprimiert und welche Funktionen die einzelnen Isoformen erfüllen.

Ziel dieser Arbeit war es zum einen, die zelluläre und subzelluläre Lokalisation der beiden Testis-exprimierten Profiline III und IV im Verlauf der Spermatogenese und in den verschiedenen Keimzellstadien bei Mensch und Nager zu untersuchen. Hierfür kamen Methoden wie (RT-) PCR, Western-Blot und Laser-Konfokale Fluoreszenzmikroskopie zum Einsatz. Ein weiteres Ziel war es, die biochemischen Eigenschaften der Profiline III und IV hinsichtlich ihrer „typischen“ Profilin-Bindungseigenschaften, wie z.B. Interaktion mit Aktin und Poly-Prolin, zu untersuchen. Durch diese funktionellen Studien sollten die Profiline näher charakterisiert und mögliche distinkte Bindungsverhalten ermittelt werden. Hinweise auf die molekularen Funktionen der Testis-exprimierten Profiline III und IV in der Spermiendifferenzierung sollten durch Aufklärung möglicher Protein-Protein-Interaktionen im *Yeast Two-Hybrid*-System gewonnen werden.

## II Material & Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben erfolgte nach einer modifizierten Flüssig-Extraktionsmethode nach Chomczynski & Sacchi [Chomczynski & Sacchi, 1987] mit RNA-Pure™ und anschließender Aufreinigung mit dem *RNeasy Mini* Kit und/oder durch Isopropanol-Fällung.

##### 2.1.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden von der Abteilung für Andrologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt. Zum Schutz der RNA vor Degradation und zur Konservierung des RNA-Expressionsmusters zum Zeitpunkt der operativen Entnahme wurden die Gewebe (ca. 30 mg) unmittelbar nach Entnahme in das Stabilisierungsreagenz RNAlater gegeben und bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4°C gelagert. Für die RNA-Extraktion wurden 3 ml RNAPure in ein 15 ml-Röhrchen vorgelegt, die Proben zugegeben und alles 30 Sekunden mit einem UltraTurrax homogenisiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde zur besseren Phasentrennung 600 µl Chloroform zugegeben, alles kräftig geschüttelt und der Ansatz für 30 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugation war eine deutliche Phasentrennung in wässrige Phase (Überstand), weiße Interphase und organische Phase zu erkennen. Genomische DNA verbleibt unter sauren Bedingungen in der organischen oder Interphase und wird so von der RNA getrennt. Die wässrige Phase mit der RNA wurde vorsichtig abgenommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurden 1,5 ml Isopropanol zugegeben, kräftig geschüttelt und mind. 1 h bei -20°C gefällt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 1 h bei 4000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet kurz an der Luft getrocknet. Die weitere Aufreinigung der RNA erfolgte nach dem *RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup* über RNeasy Mini-Säulen. Die Quantität der Gesamt-RNA wurde spektralphotometrisch bei 260 nm bestimmt, die Qualität bei 260/280 nm. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

##### 2.1.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Ratten- und Maus-Geweben

Nach Gewebeentnahme aus den Tieren wurden die Gewebe bei -80°C gelagert. Zur RNA-Extraktion wurde ca. 1 g tiefgekühltes Gewebe in Alufolie eingewickelt und manuell mit einem Hammer zertrümmert. Zwischenzeitlich erfolgte immer wieder Kühlung in flüssigem Stickstoff. Nach Einfüllen der Gewebestückchen in vorgekühlte Teflonvials wurde das Gewebe im Mikro-Dismembrator durch zweimalige Zentrifugation bei 1800 rpm für 45 Sekunden pulverisiert. Das Gewebepulver wurde mit 20 ml RNAPure™ (PeqLab) versetzt und durch Schütteln gelöst, 4 ml Chloroform zugegeben und alles gevortext. Durch Zentrifugation (60 min, 4°C, 40000 rpm) erfolgte eine Phasentrennung in wässrige Phase (Überstand), weiße Interphase und organische Phase. Die RNA-haltige wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Interphase und organische Phase, wurden verworfen. Die Gewinnung der RNA aus der wässrigen Phase erfolgte durch Isopropanol-Fällung. Hierzu wurden die wässrige Phase mit 10 ml Isopropanol versetzt, 15 min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (60 min, 4°C, 4000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet dreimal mit je 1 ml 70% eiskaltem Ethanol gewaschen und zentrifugiert (15 min, 4°C, 4000 rpm). Nach Lufttrocknung wurde das Pellet in 50 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und die Konzentration spektralphotometrisch ermittelt.

### 2.1.1.3 cDNA-Synthese

Die Reverse Transkription von RNA in komplementäre cDNA erfolgte unter Verwendung des Superscript™ II RNase H-Reverse Transcriptase Systems (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Ausgangsmengen waren dabei 400 ng bzw. 1000 ng Gesamt-RNA, welche mit bidest H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 11 µl gebracht wurden. Nach Zugabe von 1 µl Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer (0,5 µg/µl) wurde die RNA-Primer-Mischung für 5 min bei 70°C erhitzt, um linearisierte, einzelsträngige RNA zu erhalten. Nach anschließender 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden dem Ansatz 4 µl 5 x Erststrang-Puffer, 2 µl DTT, 1 µl dNTP-Mix (10 mM) sowie 1 µl Superscript™ II Reverse Transcriptase (50 U/ µl) zugegeben und für 60 min bei 42°C inkubiert. Die cDNA wurde mit 80 µl bidest H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Polymerase chain reaction)

Die Polymerase-Kettenreaktion [PCR, Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.* 1988] ermöglicht es, enzymatisch *in vitro* DNA-Abschnitte um den Faktor 10<sup>6</sup> bis 10<sup>7</sup> zu amplifizieren. Als Startermoleküle dienen synthetische DNA-Oligonukleotide (Primer), die durch komplementäre Basenpaarung an einzelsträngige Template-DNA binden. Eine thermostabile DNA-Polymerase synthetisiert vom 3'-OH-Ende der Primer ausgehend die komplementären neuen DNA-Stränge. Durch Wahl eines gegenläufig orientierten Primerpaares kann gezielt eine definierte Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden. Da die Syntheseprodukte in jedem weiteren PCR-Zyklus als Vorlage für die anschließende Amplifizierung dienen, kann ein spezifischer DNA-Abschnitt durch Wiederholung des PCR-Zyklus schnell exponentiell angereichert werden.

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten: Denaturierung, Annealing und Elongation. Die thermische Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges erfolgt für 30 Sekunden bei 95°C. Im ersten PCR-Zyklus erfolgt die Denaturierung meist für eine längere Zeit (1 bis 5 min), um sicherzustellen, dass sich die DNA-Stränge getrennt haben. Zudem benötigen die sog. *hot start*-Polymerasen zur Aktivierung eine längere Erhitzungszeit. Im Anschluss an die Denaturierung erfolgt bei erniedrigter Temperatur die Primer-Hybridisierung an die entstandenen einzelsträngigen DNA-Templatemoleküle (Annealing). Die Temperatur während dieser Phase hängt von der Länge und dem G/C-Gehalt der Primer ab und liegt normalerweise 5 C unter ihrem Schmelzpunkt (T<sub>m</sub>-5); typischerweise zwischen 50°C und 65°C. Vom 3'-Ende des angelagerten Primers wird die komplementäre Amplifikation des DNA-Stranges durch eine Polymerase eingeleitet (Elongation). Die Temperatur für diesen Syntheseschritt hängt von der verwendeten DNA-Polymerase ab und liegt meist zwischen 68°C und 72°C. Die Syntheszeit ist ebenfalls abhängig von der Polymerase, jedoch auch von der Länge des DNA-Fragments, das vervielfältigt werden soll (30 sek je 500 bp).

#### 2.1.2.1 Herkömmliche PCR

Standardmäßig wurde für die herkömmlichen PCRs die thermostabile *RedTaq*DNA-Polymerase (Sigma) eingesetzt, welche ihr Temperaturoptimum bei 72°C hat. Diese Polymerase fügt ein überstehendes Adenosin an das 3'-Ende der Produktstränge, so dass die PCR-Produkte direkt in ein TA-Cloning eingesetzt werden können. Der Nachteil der *Taq*-Polymerasen liegt jedoch darin, dass sie keine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität (*proofreading*-Funktion) besitzen und daher beim Kopieren der DNA Fehler produzieren können, was zu Mutationen in der DNA-Sequenz führt. Zur Amplifizierung von PCR-Fragmenten >500 bp

wurde daher der *Advantage™ 2 Polymerase-Mix* (Clontech/TAKARA Biocompany) verwendet, welcher neben einer *hot start Taq* DNA-Polymerase eine Polymerase mit 3`-5`-Exonuclease-Aktivität enthält. Durch diese *proofreading*-Funktion werden während der Synthese falsch eingebaute Desoxynucleotide erkannt und entfernt, so dass die Fehlerrate um etwa den Faktor 10 geringer ist als bei einer PCR mit einer *Taq*-Polymerase. Polymerasen mit *proofreading*-Funktion hängen kein Adenosin an das 3`-Ende, so dass die entstehenden PCR-Produkte glatte Enden aufweisen. Die Polymerasen wurden mit den vom Hersteller gelieferten PCR-Puffern sowie Desoxynucleotidtriphosphate (dNTPs) von der Firma Sigma verwendet und unter empfohlenen Reaktionsbedingungen angesetzt. Alle PCR-Ansätze wurden in einem Volumen von 50 µl mit 100 ng Template-DNA (cDNA oder Plasmid-DNA) und je 0,2 µM *Forward*- und *Reverse*-Primern durchgeführt. Das PCR-Programm wurde entsprechend den verwendeten Polymerasen, Primern und der Größe der zu amplifizierenden Produkte gewählt. Aliquote der PCR-Produkte (5-15 µl) wurden auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. In Tabelle 2.1 ist ein Standard-PCR-Ansatz mit allen essentiellen Komponenten aufgelistet. Tabelle 2.2 zeigt die typischen PCR-Thermocyclerprogramme für die Amplifikation kleiner PCR-Fragmente von bis zu 500 bp mit der *RedTaq*-Polymerase sowie für die Synthese von Fragmenten >500 bp mit dem *Advantage™ 2 Polymerase-Mix*.

Tabelle 2.1: 50µl PCR-Reaktionsansatz

Reagenz	Menge	f.c.
PCR-Puffer, 10x	5 µl	1x
dNTP-Mix (10mM)	1 µl	200 µM
DNA-Template	X µl	100 ng
<i>Forward</i> -Primer (10pmol)	1 µl	0,2 µM
<i>Reverse</i> -Primer (10pmol)	1 µl	0,2 µM
Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	0,05 U/µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl	

Tabelle 2.2: PCR-Thermocyclerprogramm für *RedTaq*DNA-Polymerase und *Advantage™ 2 Polymerase-Mix*

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	2	1
Denaturierung	95	0,5	
Annealing	Primer T <sub>m</sub> -5	0,5-1	30-35
Elongation <i>RedTaq</i> / <i>Advantage2</i>	72 68	1 / 30 sek pro 500 bp	
Restsynthese <i>RedTaq</i> / <i>Advantage2</i>	72 68	10 10	1

### 2.1.2.2 Primer für die herkömmliche PCR

Die Primer für die herkömmliche PCR wurden mit dem Programm *PrimerSelect* von DNASTAR (DNASTAR Inc.) so ausgewählt, dass sie über 24-27 bp komplementär zum Matrizenstrang waren. Sofern keine TA-Klonierung erfolgen sollte, wurden 5` vor der Primer-Sequenz Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen eingefügt, welche die spätere Klonierung der PCR-Fragmente in die *Multiple Cloning Side* (MCS) eines Vektors ermöglichen. Um die Effizienz der Restriktionsenzyme zu erhöhen wurde den Primern vor den Schnittstellen eine kurze Sequenz von nichtkomplementären Nukleotiden vorangestellt. Alle Oligonukleotide wurden von der MWG-Biotch AG als Lyophilisat bezogen und mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 pmol eingestellt. Aliquotierte Primer-Lösungen wurden bei -20°C gelagert. In den Tabellen 2.3 und 2.4 sind die verwendeten Primer-Sequenzen so wie weitere Informationen zu den Primern dargestellt.

**Tabelle 2.3: Primer zur Amplifizierung von Klonierungsprodukten für das Y2H-System**

ORF= Open reading frame, m = Maus, r = Ratte, hu = Human, Restriktionsschnittstellen sind *fett* geschrieben, in () dargestellt sind die amplifizierten Sequenzbereiche in bp; D.: Domäne

Primer-Name	Sequenz	T <sub>m</sub>	Produkt	Accession-No.
huProf2-s2EcoRI	5'-CAGT <b>GAAATTC</b> ATGGCCGGT TGGCAGAG-3'	68°C	446 bp	huProfilin2a
mhrProf2a-as1Ba	5'-CGAT <b>GGATCC</b> AGCAGCTAGAACCAGAGTC-3'	71°C	ORF (99→526)	NM_053024
Eco-mProf3-s	5'-TT <b>GAAATTC</b> ATGAGTGACTGGAAGGGCTACA-3'	65°C	467 bp	mProfilin3
Bam-mProf3-as	5'-TT <b>GGATCC</b> GTTTACCGTTTATTCTGGTCTCC-3'	68°C	ORF (59→524)	NM_029303
mrProf-s6-eco	5'-CAGT <b>GAAATTC</b> AGCATGAGTCACTTGCG-3'	63°C	405 bp	mProfilin 4
Profas2-BamHI	5'-GAT <b>GGATCC</b> TTAGTTTCCCTTTTTCCTTAG-3'	64°C	ORF(861→1250)	NM_028376
Prof-s1-EcoRI	5'-AGT <b>GAAATTC</b> GGGAACATGAGCCATT-3'	61°C	406 bp	huProfilin4
Prof-as1BamHI	5'-GAT <b>GGATCC</b> CTCTGATGACTTAACTTCCT-3'	65°C	ORF (171→557)	BC029523
Eco-Actin-s	5'-TAG <b>AATTC</b> ATGGATGGATGATATCGCCGCGC-3'	67°C	1236 bp	hu B-Aktin,
Bam-Actin-as	5'-A <b>AGGATCCA</b> AGCCATGCCAATCTCA-3'	70°C	ORF (74→1282)	NM_001101
HE6-s7	5'-AGT <b>GAAATTC</b> TGGCCAAAGAAAATGTGAGGAAG-3	67°C	411 bp; CTerm	HE6
HE6-as1	5'-GAT <b>GGATCC</b> CATTGCTCAATAAAGTGTAAG-3'	64°C	(2804→3214)	AF538954
HE6-s6	5'-AGT <b>GAAATTC</b> TGGTTCAGTCTGTGCG-3'	65°C	78 bp 3 <sup>rd</sup> JCL	HE6
HE6-as3	5'-GAT <b>GGATCC</b> ACTCCTGAGTCTTGAAAC-3'	68°C	(2587→2665)	AF538954
ME6-s4	5'-AGT <b>GAAATTC</b> GCAAAGAGAATGTCAGAAAA-3'	61°C	411 bp CTerm.	ME6
HE6-as1	5'-GAT <b>GGATCC</b> CATTGCTCAATAAAGTGTAAG-3'	64°C	(2691→3098)	AF538952
Tubd1-eco-s1	5'-GG <b>AATTC</b> ATGTCGATAGTGACAGTACAGCT-3'	66°C	1406 bp	mTubulin δ1,
Tubd1-bam-as	5'-CC <b>GGATCC</b> TGTAAAGAGCTTTTCTCTTGGC-3'	69°C	ORF(272→1661)	NM_019756
Tuba4-nde-s2	5'-CAGCCCAA <b>ACTCCATATG</b> CGCGAGTGCATT-3'	68°C	1372 bp	mTubulin α4
Tuba4-nde-as1	5'-CC <b>CATATG</b> CTACTCTTCTCCCTCATCCTCGTC-3'	70°C	ORF (33→1405)	NM_009447
Tuba2-bam-s2	5'-CCTCGCCT <b>GGATCC</b> CGTTGCTATCATG-3'	70°C	1412 bp	mTubulin α2,
Tuba2-bam-as2	5'-G <b>CGGATCC</b> CACAGGGGGCTCAAGGAATGGAC-3'	74°C	ORF (55→1467)	NM_011654
Tubb2b-eco-s4	5'-AAGACAGCAAGA <b>AGCGAATTC</b> GGCACCATG-3'	70°C	1382 bp	mTubulin β2b
Tubb2b-eco-as3	5'-G <b>CGAATTC</b> GCTGGGAACTCAAGCCTCATC-3'	72°C	ORF (88→1470)	NM_023716
pACT2s	5'-TATTCGATGATGAAGATACCC <b>CAACC</b> AAACC-3'	67°C	X bp	Primer für
pACT2as	5'-GTGA <b>ACTT</b> GCGGGGTTTTTCAGTATCTACG-3'	67°C	pGADT7-Inserts	pGADT7Insert
dia-s2-EcoRI	5'-CAGT <b>GAAATTC</b> TTTACCGACCACCAAGAACTCAG-3	68°C	668bp,	huDiaphanous
dia-as1-BamHI	5'-CGAT <b>GGATCC</b> TCATATGGCACCCGAAAAGAGC-3'	71°C	(904→1551) FH1 + part. FH2	3 NM_030932
Flot-s1	5'-CAGT <b>GAAATTC</b> ACCATGTTTTTCACTTGTGG-3'	64°C	679 bp Flot +	huFlotillin1
Flot-as2	5'-GGCGGCCTTCTCAGTTCG-3'	61°C	PHB (162→831)	NM_005803
Superv-s1	5'-CAGT <b>GAAATTC</b> AGCAGCAAAGTACAATACA-3'	64°C	817bp, 2Gelsolin	huSupervillin
Superv-as1	5'-CGAT <b>GGATCC</b> AGGCTCCTCTGGCGTCTCC-3'	74°C	+ 1 Villin-D. (6625→7422)	NM_021738
Cript-s3	5'-CAGT <b>GAAATTC</b> AGGATGGTGTGCGAAAA-3'	63°C	370 bp	huCript
Cript-as1	5'-CGATGGATT <b>CCAAGGC</b> AGAAAGTAAAATCAT-3'	64°C	ORF (112→471)	NM_014171
Centrin-Eco-s	5'-GG <b>AATTC</b> CAACTGTTGTGGAGGATG-3'	64°C	773bp	mCentrin
pACT2as	5'-GTGA <b>ACTT</b> GCGGGGTTTTTCAGTATCTACG-3'	67°C	ORF (51→569)	NM_007593
Phf7-Nde-s	5'-GG <b>CATATG</b> TGCCTGGGA <b>ACTC</b> GAGCC-3'	69°C	253 bp	mPhf7
Phf7-Eco-as	5'-GG <b>AATTC</b> GACCATCCTTCCAGCCTA-3'	66°C	(1270→1523)	NM_027949
Nubp2-Eco-s	5'-GG <b>AATTC</b> AGTAGCGGAATGGAGGCT-3	66°C	849 bp	mNubp2
pACT2as	5'-GTGA <b>ACTT</b> GCGGGGTTTTTCAGTATCTACG-3'	67°C	ORF (37→873)	NM_011956
Tektin-Eco-s	5'-GG <b>AATTC</b> ATGGCCAAGCTACTGCAA-3'	64°C	1450 bp	mTektin
pACT2as	5'-GTGA <b>ACTT</b> GCGGGGTTTTTCAGTATCTACG-3'	67°C	ORF (99→1379)	NM_011569
gcl-s2-EcoRI	5'-CAGT <b>GAAATTC</b> TGAAATGGTGA <b>AAAC</b> AGTG-3'	62°C	463 bp;POZ-D	huGMCL1
gcl-as3-BamHI	5'-CGAT <b>GGATCC</b> TGACATTTATACCGAGTTCTT-3	65°C	(434→897)	BC024185
gcl-s4-EcoRI	5'-CAGT <b>GAAATTC</b> ATGGGATCGTCGAGCAGC-3'	68°C	1254 bp	huGMCL1
gcl-as6-BamHI	5'-CGAT <b>GGATCC</b> TAAAAACCCGTC <b>CAAC</b> ACCAGTA-3	70°C	ORF(128→1370)	BC024185
NHERF1-s2-Eco	5'-CAGT <b>GAAATTC</b> CCGGCTCAGCTGCCTGGAGAA-3	63°C	1079 bp	mNHERF1
NHERF1-as4Ba	5'-CGAT <b>GGATCC</b> TAGCAACAGCCACGGAGGT-3	63°C	ORF (174-1229)	NM_012030
Eta-s1-EcoRI	5'-CAGT <b>GAAATTC</b> ATGGGGGACCCGGGAGCAG-3	60°C	785 bp	hu14-3-3 eta
Eta-as1-BamHI	5'-CGAT <b>GGATCC</b> TGGGGGTGGTGGGTGAAGG-3	60°C	ORF (242-1026)	NM_003405
Zeta-s3-EcoRI	5'-CAGT <b>GAAATTC</b> CAATGAGCTGGTTCAGAAGGC-3	57°C	734 bp	hu14-3-3 zeta
Zeta-as4-BamHI	5'-CGAT <b>GGATCC</b> GCCGGTTAATTTTCCCTC-3	54°C	ORF (94-827)	NM_003406
mtheta-s2-EcoRI	5'-CAGT <b>GAAATTC</b> GCATGGGAAGACCGAGCTGATC-3	59°C	742 bp	m14-3-3 theta
mtheta-as1-Bam	5'-CGAT <b>GGATCC</b> TTTAGTTTTCGCCCCCTCTGCT-3	59°C	ORF (343-1084)	NM_011739
pACT2s4	5'-CTACCCGGG <b>GATCC</b> GAAATTCG-3'	68°C	829 bp	huPOMZP3
pACT2as4	5'-CTACTGCAGATAGATCTCTCGAG-3'	68°C	ORF	NM_012230

**Tabelle 2.4: Primer zur Analyse von Expressionsmustern/Gewebeverteilungen bei Maus und Ratte**

Primer-Name	Sequenz	T <sub>m</sub>	Produkt	Accession-No.
mhrProf1-s1	5'-GCCGGGTGGAACGCCTACAT-3'	64°C	355 bp	rProfilin 1, NM_022511
mhProf1-as1	5'-GGACACCTTCTTTGCCCATCAGC-3'	64°C		mProfilin1, NM_011072
mhrProf2ab-s1	5'-GCTACTGCGACGCCAAATAC-3'	59°C	358 bp	rProfilin 2, NM_030873
mrProf2b-as2	5'-AGCGAGTTCATATGTTTTCTTGTTA-3'	56°C		mProfilin 2, NM_019410
mrProf3-s1	5'-TGAGTGACTGGAAGGGCTACATC-3'	60°C	381 bp	rProfilin 3, XM_225173
mrProf3-as1	5'-GATCGTGCAATGTCTTATTGAGGA-3'	58°C		mProfilin 3, NM_029303
rPFN4-s1	5'-GGTGCAGCCCTCATCAAATC-3'	61°C	291 bp	rProfilin 4, NM_001009503
rPFN4-as1	5'-GGCTTCCACGCAGACACTA-3'	59°C		
mrProf-s6-eco	5'-CAGTGAATTCAGCATGAGTCACTTGCA-3'	63°C	405 bp	mProfilin 4,
Profas2-BamHI	5'-GATGGATCCTTAGTTCCCTTTTCCTTAG-3'	64°C		NM_028376
mhProf-s2	5'-GTGGACAGCGCAGCCCTCATC-3'	66°C	405 bp	mProfilin 4
mProf-as2	5'-TCTTCGGTCTTAGTTCCCTTTTCCTTAG-3'	64°C		NM_028376
mProf5-s2	5'-TTCACCAAATAGAGACAGCATACTTACC-3	64°C	403 bp	mProfilin 5
mrProf5-as2	5'-TCCCCTTCTTTCCCATCACCACA-3'	62°C		AV258284
rProf5-s3	5'-ATTCACCTTACAGAGACAGCATACTTAC-3'	64°C	403 bp	rProfilin5
mrProf5-as2	5'-TCCCCTTCTTTCCCATCACCACA-3'	62°C		XM_234152
HPRT-s	5'-CCTGCTGGATTACATTAAGC-3'	56°C	352 bp	rHPRT, NM_012583
HPRT-as	5'-GTCAAGGGCATATCCAACAAC-3'	58°C		mHPRT, NM_013556
hmr-dia3-s1	5'-GCAGAAAAAAGAGGCAAAGATTA-3'	55°C	580 bp	rDiaph3, XM_224392
mr-dia3-as1	5'-AAGGTTCTGAGCAATTTAGGAT-3	55°C		mDiaph3, NM_019670
S27a-for	5'-CCAGGATAAGGAAGGAATTCCTCC-3'	63°C	297 bp	rRPS27a, NM_031113
S27a-rev	5'-CCAGCACCACATTCATCAGAAGG-3'	62°C		mRPS27a, NM_001033865

### 2.1.2.3 quantitative RT-PCR mit dem LightCycler™

Die quantitative RT-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, bietet aber zusätzlich die Möglichkeit zur exakten Quantifizierung der amplifizierten PCR-Produkte. Die quantitative RT-PCR erfolgte mit dem LightCycler™ I (Roche Diagnostics) und dem Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen™ I, einem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff, der sich mit hoher Spezifität in die kleine Furche doppelsträngiger DNA einlagert. Der LightCycler™ kann die Menge der PCR-Produkte in Echtzeit (*real time* PCR) während der PCR bestimmen, indem er nach jedem Elongations-Zyklus spezifisch durch Anregung über eine blaue LED (470 nm) die emittierte Fluoreszenz (521 nm) des in der dsDNA interkalierten Farbstoffs misst. Die während der Synthese gemessene Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zur Anzahl der neu gebildeten dsDNA und damit zur Menge an Ausgangs-DNA. Als Maß für die Quantifizierung der DNA-Startmenge werden die so genannten *Crossing Point* (CP)-Werte herangezogen. Diese entsprechen der Anzahl PCR-Zyklen, die zur Erreichung eines konstanten Fluoreszenzniveaus mit zwei Standard-abweichungen über dem Hintergrund notwendig sind. Am CP befindet sich in allen Ansätzen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Die CP-Werte werden über die *second Derivative Maximum* Methode mit Hilfe der LightCycler-Quantifizierungs-Software ermittelt. Im Falle einer 100%igen PCR-Effizienz verdoppelt sich mit jedem Zyklus die DNA-Produktmenge und analog dazu das Fluoreszenzsignal. Ein um eine Einheit geringerer CP entspräche demnach der doppelten Menge an eingesetzter cDNA.

Da SybrGreen™ I an alle dsDNA-Moleküle bindet, also auch an Primer-Dimere und unspezifische PCR-Produkte, die dann zum Fluoreszenzsignal und somit zu einer ungenauen Quantifizierung beitragen, wurde am Anschluss der RT-PCR routinemäßig eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt. Dabei wird die Temperatur kontinuierlich bis 98 °C erhöht. Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur wird die dsDNA in Einzelstrang-Moleküle aufgespalten, wobei der Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen™ I freigesetzt und eine Fluoreszenzabnahme registriert wird. Anhand der Schmelzkurven kann zwischen spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten oder Primer-Dimeren unterschieden und so die Spezifität der PCR verifiziert werden.

Als Polymerase wurde eine *ExTaq Hot Start*-Polymerase (TaKaRa Biomedicals) verwendet. Die Komponenten eines 20 µl-Ansatzes (siehe Tabelle 2.5) wurden miteinander vermischt, 18 µl des

Ansatzes in eine LightCycler-Kapillare pipettiert und bei 2000 rpm für 2 min in die Kapillare zentrifugiert. Nach Verschließen wurde die Kapillare in das Karussell des LightCycler™ überführt und das Programm gestartet. Die Einstellungen der Zyklus-Parameter erfolgten über die zugehörige Software nach Angaben des Herstellers. Das Standardprogramm für eine RT-PCR am LightCycler™ ist in Tabelle 2.6.aufgeführt. Nach dem PCR-Lauf wurden 5 µl des Ansatzes elektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt und ein Teil zum Sequenzieren eingeschickt.

Tabelle 2.5: RT-PCR-Ansatz

Reagenzien	Menge
Ex Taq-Puffer, 10x	2 µl
dNTP-Mix (2,5 mM je dNTP)	2 µl
Forward-Primer (10 pmol)	1 µl
Reverse-Primer (10 pmol)	1 µl
cDNA	2 µl
BSA (20 mg/ml)	0,25 µl
SybrGreenI (1:1000 in DMSO)	0,5 µl
TaKaRa Ex Taq HS (5U/µl)	0,2 µl
PCR-H <sub>2</sub> O	11,05µl

Tabelle 2.6:Standardprogramm für eine RT-PCR am LightCycler

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	10 sec	40
Annealing	60°C	20 sec	
Elongation	72°C	30 sec	
Cool	40°C	2 min	1
Schmelzkurve	98°C	20 sec	

### 2.1.2.4 Primer für die quantitative RT-PCR am LightCycler™

Die Primer für die RT-PCR wurden mit dem Online-Programm *Primer3* ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) ausgewählt. Als Vorgaben wurden eine Primer-Größe von 24 bp, Annealing-Temperatur von 65°C, Produktgröße von 200-300 bp und GC-Clamp von 2 gewählt. So konnte mit den Primern ein Standard-RT-PCR-Programm mit einer Annealingtemperatur von 60°C gefahren werden. Es wurde darauf geachtet, dass die Primer möglichst Intron-überspannend lagen.

Tabelle 2.7: Primer zur RT-PCR-Analyse auf humaner Testis-cDNA

Primer	Sequenz	T <sub>m</sub>	Produkt	Accession-No.
huPFN2-s	5'-GAT TGT AGG AAA AGA CCG GGA AGG-3'	62°C	205 bp (150→354)	huPFN2 NM_053024
huPFN2-as	5'-CCC TTC TTT TCC CAT TAC AAA GAC-3'	61°C		
huPFN3-s3	5'-GCG CTC CTG GTG CTA ATG G-3'	61°C	81 bp (316→396)	huPFN3 NM_001029886
huPFN3-as4	5'-CAG CCC GCG TAT GAG TTC G-3'	61°C		
PNFIV-for	5'-TTG TTA GAC ACC CTC TTG GGA ACC-3'	64°C	234 bp (197→431)	huPFN4 NM_199346.1
PNFIV-rev	5'-CCA CAC CAG TGT TCT CAT TTT TGG-3'	64°C		
huPFN5-s2	5'-CAG GAT GTC AGT GAA GAG GTC TGG-3'	64°C	219 bp (182→399)	huPFN5 BX105859
huPFN5-as2	5'-GGT CCC TGC AAG GGT GAC TCC-3'	65°C		
MUPP1-s2	5'-GAA TCG TAG AGG TGG ATG GAA TGG-3'	64°C	249 bp (3666→3941)	huMUPP1 NM_003829
MUPP1-as2	5'-CTG GCT CTG ACT ATG ACT GAC TGG-3'	65°C		
Tekt1-s	5'-AGA TAT TCT GAG AAC GCC GTG AGG-3'	61°C	230 bp	huTektin1 NM_053285
Tekt1-as	5'-CTG GCA TCC TTT GTA TCC TTC AGC-3'	61°C		
huCentrin-s	5'-AAG AAG TTC GGG AAG CAT TTG ACC-3'	61°C	237 bp	huCentrin NM_004066
huCentrin-as	5'-AGG CCT TCA GGA TTT CTT TTT TGG-3'	61°C		
S27a-for	5'-CCA GGA TAA GGA AGG AAT TCC TCC-3'	63°C	297 bp (128→423)	huRPS27a NM_002954
S27a-rev	5'-CCA GCA CCA CAT TCA TCA GAA GG-3'	62°C		

Tabelle 2.8: Primer zur RT-PCR-Validierung von HE6-Microarray-Daten auf HE6-KO und WT-cDNA

Primer	Sequenz	T <sub>m</sub>	Produkt	Accession-No.
Clusterin-s2	5'-AGC AGG AGG TCT CTG ACA ATG AGC-3'	64°C	181 bp (155→336)	mClusterin NM_013492
Clusterin-as2	5'-TCC TCT TTC TTC TTC TTG GCT TCC-3'	61°C		
Spp1-s	5'-CTT CCA AGC AAT TCC AAT GAA AGC-3'	59°C	247 bp (438→685)	mSpp1 NM_009263
Spp1-as	5'-TTG ACC TCA GTC CAT AAG CCA AGC-3'	62°C		
Spp1-s2	5'-AGA TTG GCA GTG ATT TGC TTT TGC-3'	64°C	153 bp (225→378)	Spp1 NM_009263
Spp1-as2	5'-ATT CTG CTT CTG AGA TGG GTC AGG-3'	63°C		
Adam28-1s	5'-TGC GTA AAA GAG AGA CCC AAG AGC-3'	62°C	276 bp (273→549)	Adam28 NM_010082
Adam28-1as	5'-TGT AAC CCC GTA GTC CTT GAC AGG-3'	64°C		
Claudin10-2-s	5'-ACT ACT GGA AGG TCT CCA CCA TCG-3'	64°C	218 bp (91→309)	mClaudin10 Iso a: NM_023878 Iso b: NM_021386
Claudin10-2as	5'-TCC AAA GAG TGC AAA AAT GGA ACC-3'	59°C		
Vkorc1-s	5'-TTT ATT TGA ATG AGG CCT GGA AGC-3'	59°C	281 bp (540→821)	mVkorc1 NM_027121
Vkorc1-as	5'-GTC TTT GAT TGG CTC GGT GTA TCC-3'	62°C		
S27a-for	5'-CCA GGA TAA GGA AGG AAT TCC TCC-3'	63°C	297 bp (128→423)	mRPS27a NM_001033865
S27a-rev	5'-CCA GCA CCA CAT TCA TCA GAA GG-3'	62°C		

### 2.1.2.5 Auswertung der quantitativen RT-PCR

Die Expressionswerte der Zielgene wurden mit denen eines nicht regulierten, ubiquitär und homogen exprimierten *Housekeeping Gens* normalisiert (relative Quantifizierung). Für RT-PCRs auf Testis-cDNA wurde das ribosomale Protein S27a verwendet. Zur Berechnung der Expressionsunterschiede zwischen zwei oder mehreren Gruppen (z.B. Wildtyp gegen HE6-KO oder verschiedene Spermatogenesestadien) wurde die REST©-Software (*relative expression software tool*, Pfaffl *et al.*, 2002) verwendet. Diese Software fasst die Gruppen als Mittelwerte zusammen und berechnet daraus die mittleren Expressionsunterschiede der Gruppen, normalisiert über das *Housekeeping Gen*, sowie die Varianz der einzelnen Expressionen. Die Ergebnisse werden statistisch getestet und mit ihren Signifikanzlevels ausgegeben. Die Statistik beruht auf einem sehr robusten und von einer Normalverteilung unabhängigen Randomisierungstest, bei dem beliebig viele tausend Randomisierungen und Wiederholungen durchgeführt werden können.

### 2.1.3 Agarosegel-Elektrophorese

Für die Analyse, zur präparativen Isolierung der Nukleinsäuren nach PCR, Restriktion sowie Plasmidisolierung wurde die Agarosegel-Elektrophorese eingesetzt, bei der die negativ geladene DNA abhängig von ihrer Größe und Konformation im elektrischen Feld aufgetrennt wird. Zur Detektion der gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA wurde Ethidiumbromid (EtBr) verwendet, das zwischen die GC-Basenpaare der Nukleinsäuren interkaliert und bei Anregung mit UV-Licht rotviolett leuchtet. In Abhängigkeit von der Fragmentgröße wurden 0,8-2%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose mit 1 x Tris-Acetat-EDTA-Elektrophorese-Puffer (TAE-Puffer) geschmolzen, nach Abkühlung unter 60°C mit Ethidiumbromid (10 µg/100 ml Gelvolumen) vermischt und in eine Flachbettapparatur gegossen, in der zuvor ein Probenkamm befestigt wurde. Nach Erstarren des Gels wurde dieses mit 1 x TAE-Puffer überschichtet und der Probenkamm entfernt. Die DNA-Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und in die Probenaschen pipettiert. Durch den Ladepuffer wurde die Dichte der DNA-Lösung erhöht, so dass diese leichter in die Proben-Taschen pipettiert werden konnte. Zudem konnte durch die im Ladepuffer enthaltenen Farbmarker Bromphenolblau und Xylencyanol, deren elektrophoretische Beweglichkeit der von 300 bp und 4000 bp DNA-Fragmenten entspricht [Sambrook *et al.*, 1989], der Verlauf der Elektrophorese verfolgt werden. Die Elektrophorese erfolgte für ca. eine Stunde bei 70 Volt. Zur Größenbestimmung und Zuordnung der aufgetrennten DNA wurde im Gel ein Größenstandard mit aufgetrennt.

**Tabelle.2.9: TAE-und Ladepuffer für Agarose-Gelelektrophorese**

1xTAE-Puffer		Ladepuffer	
Tris-HCl	40 mM	Glycerin	10% (v/v)
Essigsäure	0,1 % (v/v)	Bromphenolblau	250 µg/ml
EDTA, pH 8	10 mM	Xylencyanol	250 µg/ml

### 2.1.4 Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung von DNA basiert auf einer modifizierten Methode nach Birnboim & Doly [1979]. Die Prozedur beruht auf der selektiven Bindung von DNA an spezielle Silicagel-Membranen unter „Hochsalz“-Bedingungen in Gegenwart eines chaotropen Salzes. Die gebundene DNA wird nach Bindung an die Membran durch eine Reihe von Wasch- und Zentrifugationsschritten von Primern, Nukleotiden und Salzen gesäubert. Die Elution der Plasmid-DNA aus der Silica-Membran erfolgt unter „Niedrigsalz“-Bedingungen.

#### 2.1.4.1 Elution von Nukleinsäuren aus Agarose-Gelen

Die Gewinnung der DNA nach Elektrophorese aus TAE-Gelen erfolgte entsprechend den Herstellerangaben mit dem *QIAquick™ Gel Extraction Kit (50)* von QIAGEN [modifiziertes Protokoll nach Vogelstein & Gillispie, 1979]. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in einem dreifachen Volumen Puffer QG aufgenommen und für 10 min bei 50°C inkubiert. Nachdem sich das Gel komplett aufgelöst hatte wurde ein Volumen Isopropanol zugegeben, die Lösung auf eine QIAquick-Säule pipettiert und 1 min zentrifugiert. In diesem Schritt bindet die DNA an die Silica-Matrix. Der Überstand wurde verworfen und die an die Matrix gebundene Nukleinsäuren einmal mit 500 µl Puffer QG und einmal mit 750 µl Puffer PE gewaschen und die Matrix anschließend durch 1 min Zentrifugation getrocknet. Die Elution der DNA aus der Säule erfolgte mit 50 µl Puffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) durch Zentrifugation. Der DNA-Gehalt des Eluats wurde photometrisch ermittelt. Die Aufreinigung nach dieser Methode erfordert keine anschließende Präzipitation der Nukleinsäuren.

#### 2.1.4.2 Aufreinigung von PCR-Fragmenten

Die Aufreinigung amplifizierter DNA-Fragmente nach einer PCR erfolgte entsprechend den Herstellerangaben mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* von Pierce [nach Sambrook *et al.*, 1989]. Nach PCR wurde das Volumen eines PCR-Ansatzes mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt und dann mit 500 µl Bindepuffer vermischt. Die Lösung wurde mit einer Pipette auf eine *HighPure*-Filtersäule aufgetragen und zentrifugiert (1 min, 16000 g). Der Überstand wurde verworfen und die gebundenen PCR-Fragmente einmal mit 500 µl und einmal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen und 1 min zentrifugiert. Anschließend wurden die gebundenen PCR-Fragmente mit 50 µl Elutionspuffer durch Zentrifugation (1 min, 16000 g) aus der Matrix eluiert. Diese Aufreinigung erfordert keine anschließende Präzipitation der Nukleinsäuren.

#### 2.1.4.3 Mini-Präparation von Plasmid-DNA über Silica-Matrix und Zentrifugation

Zur Präparation von bis zu 60 µg Plasmid-DNA aus *E.coli*-Flüssigkulturen wurde das NucleoSpin® Plasmid-Kit von Machery Nagel verwendet, welches auf der alkalischen Lyse der Zellen und anschließender Aufreinigung der DNA über Silica-Membranen unter Hochsalzbedingungen beruht [modifiziert nach Birnboim & Doly, 1979]. Hierzu wurden einige der auf Selektiv-Medien gewachsenen Transformanten-Kolonien in jeweils 4 ml LB-Selektivmedium mit Antibiotika überführt und über Nacht bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Die Bakterien-Kultur wurde für 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und die Plasmid-DNA entsprechend den Herstellerangaben aus den Zellen über eine Silica-Membran aufgereinigt. Die Elution der an die Säule gebundenen Plasmide erfolgte mit 50 µl TE-Puffer. Eine Reinigung der isolierten DNA durch Präzipitation ist nicht nötig.

#### 2.1.4.4 Midi-Präparation von Plasmid-DNA über Anionen-Austauscher-Säulen

Zur Aufreinigung größerer Mengen Plasmid-DNA aus 25 ml-*E.coli*-Flüssigkulturen wurde das *JETstar2.0* Plasmid Miniprep Kit von Genomed verwendet. Die Prozedur basiert auf modifizierter alkalischer/SDS Lyse nach Birnboim & Doly [1983] sowie der Plasmid-Bindung an Anionenaustauscher-Säulen unter niedrigen Salz- und pH-Bedingungen. Die Aufreinigung wurde nach Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Die Elution der Plasmid-DNA aus der Säule erfolgte mit 5 ml 1 M KCl-Puffer, pH 8,5 (Puffer E6) Das Eluat wurde in einem sauberen Reaktionsgefäß aufgefangen und die Plasmid-DNA anschließend durch Isopropanol-Präzipitation entsalzt und konzentriert. Die Resuspension der DNA-Pellets erfolgte in 0,25 ml TE-Puffer.

### 2.1.4.5 Präzipitation von Nukleinsäuren

Zur Präzipitation von RNA und DNA aus salzhaltigen wässrigen Lösungen wurde das Volumen der DNA-Lösung bestimmt und mit 1/5 Volumen 10,5 M Ammonium-Acetat-Lösung und 1 Volumen reinem Isopropanol versetzt. Durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 13000 rpm und 4°C konnte die DNA aus der salzhaltigen wässrigen Lösung präzipitiert werden. Um gefälltes Salz und restliches Isopropanol zu entfernen, wurde das DNA-Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und erneut 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet für ca. 15 Minuten getrocknet und in einem äquivalenten Volumen (50-250 µl) TE-Puffer aufgenommen.

### 2.1.4.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren durch Absorptions-Messung

Nukleinsäuren absorbieren elektromagnetische Wellen im UV-Bereich. RNA, DNA und freie Nukleotide haben ihr Maximum bei 260 nm, während die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan bei 280 nm maximal absorbieren. Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen erfolgte über Absorptionsmessung bei 260 nm in einem Spektralphotometer (Ultrospec 3000, Pharmacia) in Quarzküvetten. Dabei gilt folgender Zusammenhang: Eine Extinktion von 1 entspricht 50 µg reiner, doppelsträngiger DNA pro ml [Lottspeich, 1998]. Da ungepaarte Nukleinsäuren eine höhere Absorption besitzen, entspricht der gleiche Wert bei einzelsträngiger RNA einer Konzentration von ca. 40 µg/ml. Eingesetzt wurde 1 µl DNA-Lösung in 99 µl ddH<sub>2</sub>O (1:100) bzw. 2 µl RNA in 98 µl Phosphatpuffer (1:50). Die Nukleinsäure-Konzentration errechnet sich aus dem Extinktionswert bei 260 nm, dem Verdünnungsfaktor und dem spezifischen Multiplikationsfaktor (50 µg/ml für dsDNA, 40 µg/ml für RNA):

$$\text{dsDNA-Konzentration (}\mu\text{g/ml)} = E_{260} \cdot 50 \mu\text{g/ml} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

Um die Reinheit der DNA-Lösungen abzuschätzen, wurde die teilweise Überlagerung der Absorption von Nukleinsäuren bei 260 nm und Proteinen bei 280 nm genutzt. Das Verhältnis der Absorptionswerte zwischen 260 nm und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren. Der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  einer sauberen = proteinfreien dsDNA-Lösung sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen und bei RNA-Lösungen, gemessen in Phosphat-Puffer, zwischen 2,1-2,3 [Lottspeich, 1998].

### 2.1.5 Restriktionsverdau von DNA mit Typ II-Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II spalten doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen hydrolytisch. Die Erkennungssequenzen der Typ II-Endonukleasen bestehen meist aus palindromischen Sequenzen von vier, sechs oder acht Basenpaaren, die entweder gerade (*blunt ends*) oder versetzt (*sticky ends*) geschnitten werden können. Bei einem versetzten Schnitt entstehen kurze 5'- bzw. 3'-überhängende Einzelstrang-Enden mit spezifischen Sequenzen, so genannte kohäsive Enden. Das geschnittene 5'-Ende trägt immer eine Phosphatgruppe, das 3'-Ende eine Hydroxylgruppe. Mit Restriktionsendonukleasen geschnittene DNA-Fragmente und Plasmide können miteinander ligiert werden, wobei die Basenpaarung zwischen komplementären kohäsiven *sticky ends* die Ligationsreaktion erleichtert [Lehninger, 1998].

Der Restriktionsverdau wurde zum einen zur präparativen Vorbereitung z.B. von PCR-Fragmenten und Plasmiden für eine Ligation angewandt. Auf diese Weise wurden Vektoren linearisiert, und Vektor und *Insert* erhielten die für eine Ligation notwendigen kompatiblen Enden. Zum anderen wurde der Restriktionsverdau im Anschluss an eine Klonierung zur Klon-Analyse eingesetzt, um rekombinante Plasmide auf erfolgreiche Integration von *Inserts* zu überprüfen. Zum Einsatz kamen

Restriktionsendonukleasen (10-20 U/ $\mu$ l) von der Firma New England Biolabs, die entsprechend den Herstellerangaben mit den mitgelieferten Puffern verwendet wurden. Für einen analytischen Restriktionsverdau wurde 1  $\mu$ g *Insert*-tragende Plasmid-DNA mit 1 U Enzym in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l eingesetzt und für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Für präparative Restriktionsansätze wurden 5-20  $\mu$ g Vektor oder dsDNA-Fragmente in einem Volumen von 50  $\mu$ l mit 1 U/ $\mu$ g DNA Enzym versetzt, und für 3 bis 4 Stunden bei 37°C inkubiert und die geschnittene DNA anschließend über ein Agarosegel oder mit dem *High Pure PCR Purification Kit* aufgereinigt. In Tabelle 2.10 sind die Ansätze für den analytischen und präparativen Restriktionsverdau aufgelistet.

**Tabelle 2.10: Analytischer und präparativer Restriktionsansatz**

Reagenz	Analytisch	Präparativ
DNA (Plasmid, dsDNA)	1 $\mu$ g	5-20 $\mu$ g
10xRestriktionspuffer	2 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Restriktionsendonuklease	1 U	5-20 U
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu$ l	ad 50 $\mu$ l

Lange lineare PCR-Produkte von >1 kb, die sich nur schwer mit Restriktionsenzymen schneiden ließen, wurden zunächst mit dem pGEM®-TEasy Vector-System I (Promega) über TA-Cloning in den Vektor pGEM®-TEasy ligiert. Der pGEM®-TEasy-Vektor liegt linear vor und enthält an den 3'-Enden T-Überhänge, so dass PCR-Produkte mit kompatiblen A-Überhängen, wie sie von den *Taq*-Polymerasen generiert werden, einfach und effizient inkloniert werden können. Das rekombinante Plasmid wurde in *E.coli* vervielfältigt, das Insert anschließend durch Restriktionsverdau wieder aus dem Vektor herausgeschnitten und aufgereinigt. Über diesen TA-Klonierungsumweg konnte große lineare DNA-Fragmente erfolgreich mit Restriktionsenzymen geschnitten werden.

### 2.1.6 Dephosphorylierung geschnittener Vektoren

Um in einer Ligationsreaktion eine Rezirkularisierung sowie Kontaktamerbildung linearisierter Vektoren zu verhindern und um die Einbaurate der Inserts in den Vektor zu erhöhen, wurden mit nur einem Restriktionsenzym linearisierte Vektoren zur Entfernung der 5'-Phosphatreste mit alkalischer Phosphatase (CIP, *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*) behandelt. Für die Dephosphorylierung wurde der Vektor mit CIP und 10 x Phosphatasepuffer versetzt und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Ein typischer Dephosphorylierungsansatz ist in Tabelle 2.11 dargestellt. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte nach Zugabe von 5mM EDTA für 1 h bei 65 °C. Anschließend wurde das Plasmid aufgereinigt und die DNA-Konzentration ermittelt.

**Tabelle 2.11: Dephosphorylierungsansatz**

Reagenz	Konzentration
DNA	0,5 $\mu$ g/ 10 $\mu$ l
10xPhosphatasepuffer	1x
SCIP (10 U/ $\mu$ l)	1 U/ $\mu$ mol DNA
ddH <sub>2</sub> O	x $\mu$ l

### 2.1.7 Ligation

T4-DNA-Ligase katalysiert in Anwesenheit von ATP die Ausbildung einer kovalenten Phosphodiesterbindung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe zweier DNA-Enden. Auf diese Weise lässt sich ein DNA-Insert mit einem linearisierten Vektor zu einem rezirkularisierten rekombinanten Plasmid ligieren. Die T4-DNA-Ligase ligiert sowohl komplementäre kohäsive (*sticky ends*) als auch glatte Enden (*blunt ends*).

Für Ligationen wurden mit Restriktionsenzymen geschnittene PCR/Insert-Fragmente und lineare Vektoren (pGBKT7, pGADT7, pET21a) mit kohäsiven Enden verwendet. Um die Einbaurrate des Inserts in den Vektor zu fördern und den Anteil rekombinanter Plasmide im Ligationsansatz zu steigern wurde ein Vektor-Insert-Verhältnis von 1:3 gewählt. Die benötigte Menge Insert-DNA im Verhältnis zum Vektor wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{ng \text{ Vektor} \times kb \text{ Insert}}{kb \text{ Vektor}} \times \frac{3}{1} = ng \text{ Insert}$$

Die Ligationen wurden standardmäßig in einem 10 µl Reaktionsansatz mit 200 ng Vektor durchgeführt und erfolgten über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei 22°C. T4-DNA-Ligase wurde entsprechend den Herstellerangaben mit den mitgelieferten Puffern verwendet. Die Zusammensetzung eines Ligationsansatzes ist in Tabelle 2.12 dargestellt.

**Tabelle 2.12: Ligationsansätze**

Reagenz	Menge	Konzentration
Vektor-DNA (50 ng/µl)	1 µl	50 ng
Insert-DNA	x µl	3:1 Insert:Vektor
10xLigationspuffer	1 µl	1x
T4-DNA-Ligase (3U/µl)	1 µl	3 Units
ddH <sub>2</sub> O	ad 10 µl	

Im Anschluss an die Ligation erfolgte die Inaktivierung der T4-DNA-Ligase für 15 min bei 65°C. Zur Vermehrung der rekombinanten Plasmide wurden die Ligationsansätze in kompetente *E.coli*-Zellen transformiert.

### 2.1.8 Transformation

Zur Vermehrung rekombinanter Vektoren, sowie zur Protein-Expression wurden Plasmid-Konstrukte in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert, in denen die Plasmid-DNA unabhängig von der chromosomalen DNA repliziert wird. Auf diese Weise lassen sich große Mengen der DNA-Konstrukte bzw. der exprimierten Proteine gewinnen. Zur Vermehrung rekombinanter Plasmide wurde standardmäßig der *E.coli*-Stamm DH5α oder XL1-Blue verwendet, für Proteinexpression der Stamm BL21(DE3)pLysS. Die Bakterienstämme wurden als kompetente Zellen von den entsprechenden Herstellerfirmen bezogen.

**Tabelle 2.13: verwendete *E.coli*-Stämme**

<i>E.coli</i> -Stamm	Genotyp	Antibiotikaresistenz	Blau-Weiß-Screening
<b>DH5α</b> (subcloning Efficiency competent Cells, Invitrogen)	F- φ80lacZ.M15 (.lacZYA-argF)U169 recA1 endA1hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44thi1gyrA96relA1λ-	-	ja
<b>XL1-Blue</b> (Subcloning-Grade Competent Cells, Stratagene)	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ.M15 Tn10(Tetr)].	Tetracyclin	ja
<b>BL21(DE3)pLysS</b> (competent Cells, Novagen)	F- ompT hsdSB(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dem (DE3) pLysS (CamR)	Chloramphenicol	ja

#### 2.1.8.1 Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen und Selektion auf Transformanten

Für die Transformation wurden je 25 µl kompetente *E.coli*-Zellen zu 10 µl Ligationsansatz/rekombinanter Plasmid-DNA pipettiert und der Ansatz vermischt. Die Ansätze wurden 20 Minuten in einem Eisbad inkubiert, für 60 sek einem kurzen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und anschließend für 2 Minuten in einem Eisbad gekühlt. Diese Behandlung ermöglicht es der DNA in die Zelle einzudringen. Nach Zugabe von je 0,4 ml vorgewärmten LB-Medium wurden die Transformations-Ansätze für eine Stunde bei 37°C inkubiert, um sicherzustellen, dass

die Plasmide ihre Eigenschaften wie Antibiotika-Resistenz phänotypisch ausprägen können. Anschließend wurden die Bakterien auf einem selektiven Medium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Selektivmedium dienten LB-Agarplatten, die je nach transformiertem Vektor das entsprechende Antibiotika enthielten (100 µg/ml Ampicillin bei pGADT7/pGEM-TEasy; 50 µg/ml Kanamycin bei pGBKT7). Auf dem Selektivmedium können nur *E.coli*-Zellen wachsen, die durch Aufnahme des rekombinanten Plasmids eine Antibiotika-Resistenz erworben haben. Die Zellen eines Ansatzes wurden auf je 2 Agarplatten ausplattiert. Auf eine Platte wurden 100 µl ausgespatelt, auf die zweite der Rest des Ansatzes, der durch Zentrifugation (2 Minuten bei 4000 rpm) auf ca. 100 µl eingengt wurde.

### 2.1.8.2 Analyse der rekombinanten Plasmid-DNA

Durch Klonanalyse wurde untersucht, ob die auf den Selektivplatten gewachsenen Transformanten das rekombinante Plasmid enthalten. Hierzu wurde zuerst durch Plasmid-Präparation das Plasmid aus den Transformanten isoliert. Die Analyse der Plasmid-DNA auf Inserts erfolgte anschließend durch einen analytischen Restriktions-Verdau mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen und Sequenzierung.

### 2.1.9 DNA-Sequenzierung und Analyse

Die Sequenzierung rekombinanter Plasmid-DNA und PCR-Produkte wurde von der Firma MWG Biotech AG (<http://www.mwg-biotech.com>) durchgeführt. Hierzu wurden 1 µg Plasmid-DNA bzw. 20 ng PCR-Produkt/100 bp in einem 1,5 ml Gefäß eingetrocknet. Standardmäßig wurde zur Sequenzierung der T7-Primer verwendet. Sofern kein passender Primer angeboten wurde, vor allem zur Sequenzierung von PCR-Produkten, wurden eigene Primer mit eingesandt (10 µl pro Sequenzierung in einer Konzentration von 10 pMol/µl). Die Analyse der Sequenzierungsergebnisse erfolgte mit Hilfe der DNASTar-Software 4.00 (DNASTAR Inc., Madison, USA) und durch Datenbank-Recherche mit der Nucleotid-nucleotid BLAST Funktion (blastn) auf der NCBI-Homepage (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

### 2.1.10 RNA-*in situ*-Hybridisierung

Mit der Technik der *in situ* Hybridisierung kann die Expression einer mRNA einzelnen Zellen im Gewebeverband zugeordnet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *in situ*-Hybridisierung zur Detektion der RNA des epididymalen Gens-Transkripts e9-2 (Me9, NM\_178243) in Paraffinschnitten des Maus-Nebenhodens angewandt. Die Detektion der RNA im Gewebe erfolgte durch Bindung Digoxigenin-markierter einzelsträngiger cRNA-Moleküle (Sonden) an komplementäre Zielsequenzen und die Visualisierung durch alkalische Phosphatase-konjugierte Anti-DIG-Antikörper, sowie Umsatz des NBT/BCIP-Substrates durch die Phosphatase in ein blauviolettetes Präzipitat. Der experimentelle Ablauf der *in situ* Hybridisierung gliedert sich in folgende Schritte: Herstellen der Sonde, Herstellung und Vorbehandlung des histologischen Präparates, Hybridisierung, Waschungen und Detektion.

Für die Me9-Sonde wurde zunächst eine 539 bp Sequenz aus dem Me9-ORF per PCR amplifiziert und über 5'-A-Überhänge in den Transkriptionsvektor pGEM-TEasy kloniert. In Tabelle 2.14 sind die verwendeten Primer sowie die Größe des amplifizierten PCR-Produktes aufgelistet.

**Tabelle 2.14: Primer und PCR-Produkte zur Herstellung einer Me9-Sonde für RNA-*in situ*-Hybridisierung**

Primer-Name	Primer-Sequenz	Amplifiziertes Produkt
Me91-SP6-for	5'-ATG GGC AAG GTA CGG CAA ATG T-3	539 bp (bp 178-717) aus Me9 (NM_178243)
Me91-SP6-rev	5'-CAG AGA AAG TGG TGG CGA ACG-3	

Durch *in vitro*-Transkription mit dem *DIG RNA Labeling Mix* von Roche entsprechend den Herstellerangaben wurden Digoxigenin-11-dUTP-markierte Me9 cRNA-Sonden hergestellt. Hierbei erfolgte das gerichtete Umschreiben der cDNA aus dem Transkriptionsvektor in *sense* und *anti-sense*-cRNA durch T7- bzw. SP6-RNA-Polymerasen.

Paraffinschnitte (7 mm) des Maus-Epididymis wurden nach Pusch *et al.* (2000) durch Entparaffinieren, saure Hydrolyse, Proteinase K-Behandlung und Acetylierung für die *in situ*-Hybridisierung vorbereitet. Um unspezifische Signale auf dem Präparat zu minimieren, erfolgte vor der eigentlichen Hybridisierung eine Prähybridisierung der Schnitte für 3 h bei 52°C mit einem Prähybridisierungsgemisch. Anschließend folgte über Nacht bei 52 °C die Hybridisierung mit *sense*- und *anti-sense* Me9 cRNA-Sonden im Hybridisierungsmix. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zweimal für je 10 min in 2 x SSC gewaschen. Zur Reduzierung des Hintergrundsignals wurden einzelsträngige, nicht-hybridisierte Sonden durch stringentes Waschen der Präparate für 10 min bei 60°C in Hybridisierungspuffer und 30 min RNase A-Verdau bei 42°C entfernt. Nach erneutem Waschen für 3 min in 2 x SSC und 15 min bei 52 °C in 0,1 x SSC wurden die Präparate für 1 h mit 20 % normalem Schafserum blockiert. Zur Detektion hybridisierter Sonden wurden die Präparate über Nacht bei 4°C mit einem alkalischen-Phosphatase-konjugiertem Anti-DIG-Antikörper aus Schaf (Roche, Verdünnung 1:500 in 1% Schafserum) inkubiert. Ungebundene AK wurden am nächsten Tag durch Waschen in Waschpuffer entfernt. Die Visualisierung der cRNA-Antikörperkomplexe erfolgte mit dem *Alkaline Phosphatase Substrate Kit IV* (Vector Laboratories) nach Herstellerangaben mit NBT/BCIP als Substrat im Dunkeln bei Raumtemperatur über Nacht. Die Farbentwicklung wurde am nächsten Tag durch 10 min Inkubation in Stopp-Puffer gestoppt. Die *in situ* hybridisierten Präparate wurden an einem Hellfeld-Mikroskop (Nikon) analysiert und mit einer Leica DC 300 Digitalkamera (Leitz) dokumentiert.

**Tabelle 2.15: Puffer und Reagenzien für RNA-in situ Hybridisierung**

Puffer	Zusammensetzung
Prähybridisierungsgemisch	20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,3 M NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM DTT, 50 % Formamid, 1 x Denthardt's, 100 µg/ml Poly A, 500 µg/ml hs-DNA, 500 µg/ml t-RNA
Hybridisierungsmix	20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,3 M NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM DTT, 1 x Denthardt's, 500 µg/ml hs-DNA, 100 µg/ml Poly A, 500 µg/ml t-RNA, 50 % Formamid, 10 % Dextranulfat, 250 ng Sonde
Hybridisierungspuffe	0,3 M NaCl, 50 % Formamid, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1mM EDTA, 10 mM DTT
RNase A-Verdau	0,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 mg/ml RNase A
20% normal Schafserum	0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 0,15 M NaCl, 20 % Schafserum
Waschpuffer	2 mal 15 min in 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 0,15 M NaCl
Stopp-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA

## 2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.1 Herstellung von Gewebelysaten für Western Blot-Analysen

Es wurden verschiedene Rattengewebe (Herz, Lunge, Niere, Milz, Gehirn, Testis, Nebenhoden) sowie humane Gewebeproben von Hoden mit unterschiedlichen Spermatogenese-Störungen verwendet. Die humanen Gewebe (ca. 30 mg) wurden in MEM-Medium überführt und direkt weiterverarbeitet oder längerfristig bei -80°C in einem Cryoprotektivum gelagert. Die Rattengewebe stammten aus Sprague Dawley Ratten (*Rattus norvegicus* L.) der Firma Charles River Inc. Die Gewebe wurden nach Entnahme unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Zur Herstellung der Gewebelysate wurden pro 30 mg Gewebe 100 µl Lysispuffer zugegeben und das Gewebe 3-mal für je 10 sek auf Eis mit dem UltraTurrax homogenisiert. Die Lysate wurden anschließend für 30 min bei 4°C auf einem Mischer inkubiert und Zellfragmente durch

Zentrifugation (30 min, 4°C, 13000 rpm) abgetrennt. Der klare Überstand wurde abpipetiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde der *BioRad Protein-Assay* nach Bradford eingesetzt. Die Lagerung der Lysate erfolgte bei -80°C.

**Tabelle 2.16: Gewebelysispuffer**

Reagenz	Menge	f.c.
Tris HCl, pH 7,8, 1M	5 ml	10 mM
EDTA, 0,5 M	100 µl	1 mM
DTT, 1M	25 µl	0,5 mM
NaCl, 3M	1 ml	50 mM
NP-40	0,2 ml	0,4 %
NaDOC, 10%	1 ml	0,2 %
10 % SDS	200 µl	0,04 %
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 ml	
pro 10 ml wurde 1 Protease-Inhibitor-Tablette zugegeben		

### 2.2.2 *In vitro*-Translation

Die *in vitro*-Transkription und Translation erfolgte entsprechend den Herstellerangaben mit dem *TNT®-T7 Quick Coupled Transcription, Translation System* (Promega) in einem Kaninchen-Reticulozytenextrakt-Reaktions-Mastermix. Dieses System hat den Vorteil, dass Transkription und Translation gleichzeitig in einem Reaktionsgefäß stattfinden. Der Reticulozyten-Mastermix enthält neben dem Reticulozytenextrakt, welcher alle für die Translation benötigten makromolekularen Komponenten enthält (70S oder 80S-Ribosomen, tRNAs, Aminoacyl-tRNA Synthetase, Initiations-, Elongations- und Terminations-Faktoren etc.) auch T7-RNA-Polymerase und Nukleotide für die Transkription der RNA sowie RNase Inhibitoren und freie Ionen. Als Expressionsvektoren wurden die Plasmide pGBKT7 und pGADT7 verwendet. In diese wurde cDNA der zu translatierenden Gene *downstream* des T7 Promotors und einer *c-myc*-Epitop-Sequenz (im Vektor pGBKT7) bzw. einer HA-Epitop-Sequenz (im Vektor pGADT) einkloniert, so dass mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase Transkripte generiert werden können. Die transkribierte mRNA aus pGBKT7-Plasmiden wird anschließend in das kodierte Protein mit N-terminalem *c-myc*-Epitop-Tag translatiert bzw. die mRNA aus pGADT7-Plasmiden in das codierte Protein mit N-terminalem HA-Epitop-Tag. Die translatierten Proteine können so über *c-myc*- oder HA-Antikörper detektiert werden, ohne dass ein Protein-spezifischer Antikörper benötigt wird.

Für eine Reaktion wurden 40 µl des TnT Quick Mastermixes mit 1 µg Plasmid-DNA und 1 µl 1 mM Methionin versetzt und der Ansatz mit nukleasefreiem Wasser auf 50 µl aufgefüllt (siehe Tabelle...). Die *in vitro* Translation erfolgte für 60-90 min bei 30°C. Zur Überprüfung der *in vitro*-Translation wurden 5 µl des Ansatzes per SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und die translatierten Proteine immunologisch mit *c-myc* monoklonalem Antikörper (BD Biosciences) bzw. *HA High Affinity* monoklonalem Antikörper (Roche) nachgewiesen.

**Tabelle 2.17: *in vitro* Transkriptions/Translations-Ansatz**

Reagenz	Menge	f.c.
Reticulozytenlysat	40 µl	-
Methionin (1mM)	1 µl	0,02 mM
Plasmid-DNA	X µl	1 µg
ddH <sub>2</sub> O, Nuclease frei	ad 50 µl	-

### 2.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Bestimmung des Proteingehaltes in Lysaten und Lösungen wurde in Anlehnung an die Proteinbestimmung von Bradford [Bradford, 1976] durch Extinktionsmessung bei  $\lambda=595$  nm mit dem *Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer*, (Pharmacia Biotech) ermittelt. Diese Methode beruht auf der Bindung des Triphenylmethan-Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau G-

250 an Proteine und der photometrischen Absorptionsmessung. Coomassie-Brilliant-Blau bildet in saurer Lösung mit den kationischen als auch mit den nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine Komplexe. In ungebundener Form hat der rotgefärbte Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfatform stabilisiert und das Absorptionsmaximum verschiebt sich auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Die Detektionsgrenze dieser Methode liegt bei 1-20 µg/ml. Für die Messung wurde 1 µl Probe in 99 µl Tris/EDTA-Puffer (10 mM Tris-Cl pH 7,5, 1mM EDTA) verdünnt. Die käufliche Proteinassay-Stammlösung (BioRad) bestehend aus Farbstoff, Ethanol und Phosphorsäure wurde 1:5 verdünnt, und jeweils 1 ml zu den 100 µl der verdünnten Probenlösung gegeben. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 595 nm im Spektralphotometer gemessen. Zur Bestimmung der Proteinmenge diente eine bei jedem Versuchsansatz mitgeführte Eichreihe aus Rinderserumalbumin (BSA) im Bereich von 0 bis 20 µg BSA/ml.

#### 2.2.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde die eindimensionale Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli [1970] verwendet, bei der Proteine in Gegenwart von 0,1 % (w/v) SDS aufgrund ihres Molekulargewichts getrennt werden. Mit Hilfe des Detergenzes SDS werden Tertiär- und Quartärstrukturen von Proteinen zerstört und diesen entsprechend ihrer Peptidkettenlänge eine äquivalente negative Ladung angelagert (ca. 1,4 g SDS pro g Protein), so dass die Eigenladung der Proteine maskiert wird und anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen. Die einheitliche negative Ladung ermöglicht die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse im Polyacrylamidgel in einem elektrischen Feld. Die Laufstrecke der denaturierten Proteine im Gel ist von der Motilität der SDS-Protein-Komplexe in der Acrylamid-Matrix abhängig und proportional zum Logarithmus der Proteinmasse. Eine Größenanalyse/Quantifizierung der aufgetrennten Moleküle erfolgt durch Vergleich der mit im Gel aufgetragenen Standardproteine bekannter Größe oder Menge.

Verwendet wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE, welche sich zur Auftrennung von Proteinen mit Massen von 10-200 kDa eignet. In diesem Gelsystem werden die Proteine in einem kurzen Sammelgel mit großer Polyacrylamidporen-Weite bei pH 6,8 konzentriert und anschließend in einem längeren Trenngel mit geringerer Porenweite bei pH 8,8 aufgetrennt. Zum Einsatz kamen Polyacrylamid (PAA)-Gele mit einem 6 %igen Sammelgel und 12 oder 15 %igen Trenngel. Die Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele sowie des SDS-Laufpuffers sind in Tabelle 2.18 aufgelistet. Nach Auspolymerisation wurde das Gel in der Elektrophoreseapparatur fixiert, die obere und untere Kammer mit SDS-Laufpuffer gefüllt und die Geltaschen mit den Proben befüllt.

**Tabelle 2.18: Zusammensetzung eines 6 %igen Sammelgels, 12 % und 15 % Trenngels und des SDS-Laufpuffers**

6 % Sammelgel (10 ml)		Trenngel (10 ml)			10 x Laufpuffer	
Reagenz	Menge	Reagenz	12%	15%	Reagenz	Menge
Acrylamidmix *	1,7 ml	Acrylamidmix *	4 ml	5 ml	Glycin	144g
1M Tris, pH 6,8	1,25 ml	1,5 M Tris, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	Tris	30 g
10 % SDS	0,1 ml	10 % SDS	0,1 ml	0,1 ml	SDS	10 g
10 % APS	0,1 ml	10 % APS	0,1 ml	0,1 ml	ddH <sub>2</sub> O	ad 1l
TEMED	0,01 ml	TEMED	4 µl	4 µl		
ddH <sub>2</sub> O	6,8 ml	ddH <sub>2</sub> O	3,3 ml	2,3 ml		

\*Acrylamidlösung (30% Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid, 37,5:1) rotiphorese® Gel 30

Zur Auftrennung kleiner Proteine, wie Profilinen (14 kDa) aus komplexen Gewebelysaten wurden fertige 4-12 %ige NuPage®Novex Bis-Tris Gradientengele (Invitrogen) eingesetzt. Diese Gele

weisen einen Gradienten ansteigender Polyacrylamidkonzentration auf und trennen einen viel weiteren Bereich an Proteinen auf als uniforme Gele. Die Proteinbanden werden dabei besonders im niedermolekularen Bereich schärfer getrennt. Im Unterschied zu Gelen mit einheitlicher Polyacrylamidkonzentration werden Proteine im Gradientengel zwischen 10 und 200 kDA linear aufgetrennt. Für optimale Ergebnisse wurde die Elektrophorese mit dem NuPAGE MES SDS-Running Buffer (Invitrogen) durchgeführt.

Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das PAA-Gel im Verhältnis 1:3 mit 3xProtein-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C hitzedenaturiert. Dithiothreitol (DTT) bewirkt eine Reduzierung von Disulfidbrücken in den Polypeptiden. Es wurden jeweils 40-80 µg Protein in 10-50 µl Volumen eingesetzt. Als Größenstandard wurde zusätzlich zu den Proteinproben ein Molekulargewichtsmarker mit auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte für 2-4 Stunden bei 90 Volt. Die Detektion der Proteine in den Polyacrylamidgelen erfolgte durch Coomassie Blau-Färbung oder immunologisch durch Western-Blot-Analyse.

**Tabelle 2.19: 3 x SDS-Protein-Probenauftragspuffer**

Reagenz	reduzierend	Nicht-reduzierend
1 M Tris HCl, pH 6,8	200 µl	200 µl
20% SDS (w/v)	0,5 ml	0,5 ml
1 M DTT	0,5 ml	-
0,5 M EDTA	10 µl	-
87% Glycerol	0,46 ml	0,46 ml
Bromphenolblau	30 µl	30 µl
ddH <sub>2</sub> O	-	0,5 ml

#### 2.2.4.1 Coomassie Blau-Färbung

Coomassie Brilliant Blau R-250 ist ein Farbstoff, der als tiefblauer Komplex unspezifisch an fast alle Proteine bindet. Die Nachweisgrenze für die Färbung liegt im Bereich von 0,1-2 µg Protein pro Bande [Schrimpf, 2002].

Das PAA-Gel wurde nach beendeter Elektrophorese für ca. 45 Minuten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur in Coomassie Blau-Lösung inkubiert. Die Färbelösung wurde abgegossen und das Gel mit Entfärberlösung (Destain) auf einem Schüttler entfärbt, bis der Hintergrund des Gels farblos und nur noch die angefärbten Proteinbanden zu sehen waren. Dazu wurde die Entfärberlösung mehrmals gewechselt. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einer Digitalkamera.

**Tabelle 2.20: Lösungen für die Coomassie-Färbung**

Reagenz	Färber	Destain
Essigsäure	100 ml	100 ml
Methanol	500 ml	500 ml
Coomassie Brilliant Blue R-250	2,2 g	-
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l	400 ml

#### 2.2.5 Western-Blotting

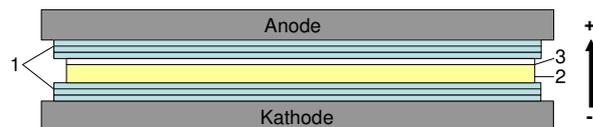
Durch Western-Blotting nach Towbin *et al.* [1979] wurden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld aus der Polyacrylamidmatrix eluiert und auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran transferiert. Bei diesem Vorgang wird das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen, so dass die Proteine renaturieren und teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur, nicht aber ihre Quartärstruktur, wieder einnehmen. Die transferierten Proteine können dadurch von spezifischen Antikörpern erkannt und detektiert werden [modifiziert nach Burnette, 1981]. Weil die Renaturierung nicht vollständig ist, können bei Verwendung monoklonaler Antikörper, die spezifisch nur ein Epitop erkennen, jedoch Probleme auftreten.

### 2.2.5.1 Gel-Blot: Elektrophoretischer Transfer im Semi-Dry- und Tank-Blot-Verfahren

Der Transfer der Proteine auf eine proteinbindende Membran für eine anschließende Antikörper-Detektion erfolgte unmittelbar nach Abschluss der Gelelektrophorese im Semi-Dry-Verfahren [Khyse-Andersen, 1984] mit einem Semidry-Transfergerät (*Pegasus Modell S*, Phase GmbH). Hierfür wurde wie in Abbildung 2.1 dargestellt auf der unteren Elektrodenplatte (Kathode) des Transfergerätes ein Sandwich aus Semi-Dry-Puffer-getränkten Filterpapieren, Polyacrylamid-Gel, Blotting-Membran und feuchten Filterpapieren luftblasenfrei aufgebaut. Nach Auflegen der oberen Elektrodenplatte (Anode) und des Schutzdeckels wurde der Blotting-Vorgang für 1,5 Stunden bei 1-1,2 mA/cm<sup>2</sup> Filterpapierfläche durchgeführt. Käuflich erworbene NuPage-Gele wurden teilweise auch mit dem für die Gele kompatiblen *XCell II Blot-Modul* (Invitrogen) im Tank-Blot-Verfahren geblottet. Hierbei wurde nach Herstellerangaben ein Sandwich aus Filterpapier, Proteingel und Membran auf der Kathode aufgebaut, die Anode aufgesetzt und das komplette Modul in einer *XCell Sure Lock™ Mini Cell* Proteinkammer (Invitrogen) festgeklemmt und mit NuPAGE Transferpuffer aufgefüllt. Der Blotting-Vorgang erfolgte für 1 Stunde bei 30 Volt. Als Blotting-Membran wurde für beide Verfahren Polyvinylidenfluorid (PVDF) verwendet. PVDF besitzt eine sehr hohe Proteinbindekapazität von bis zu 600 µg/cm<sup>2</sup> und ein gute Signal/Hintergrund-Verhältnis, vor allem bei Chemilumineszenz-Detektionssystemen. Vor Verwendung wurde die PVDF-Membran zur Äquibrierung mit Methanol und Transferpuffer benetzt (10 Sek in MeOH, 5 min in ddH<sub>2</sub>O, 5 min in Semi-Dry-Puffer).

**Tabelle 2.21: Semi-Dry-Puffer**

Reagenz	Menge	f.c.
Tris	5,81 g	48 mM
Glycin	2,93 g	39 mM
Methanol	200 ml	20%
ddH <sub>2</sub> O	ad 1l	



**Abb 2.1: Aufbau des Semi-Dry-Blottes:** 1: Filterpapiere, 2: Polyacrylamid- Gel, 3: Nitrocellulose- oder PVDF-Membran

### 2.2.5.2 Ponceau-S-Färbung

Die Effizienz des Blotting-Vorgangs wurde mittels der Ponceau-S-Färbung [Salinovich und Montelaro, 1968] kontrolliert. Ponceau-S färbt unspezifisch Proteine mit einer Nachweisgrenze von 5-15 ng Protein pro mm<sup>2</sup> an. Die Membran wurde in Ponceau-S-Lösung (0,2 (w/v) Ponceau-S in 3 % Trichloressigsäure) angefärbt und anschließend mit ddH<sub>2</sub>O entfärbt, bis der Hintergrund der Membran farblos war und nur noch die Proteinbanden rot erschienen. Nach Trocknen der Membran wurden die Positionen der Markerproteine mit einem Bleistift markiert, da die Markerproteine beim Antikörpernachweis nicht mehr sichtbar gemacht werden können, und der Blot wieder in TBS-Puffer vollständig entfärbt.

### 2.2.5.3 Immunologische Entwicklung der Membranen

Die eigentliche Nachweisreaktion der transferierten Proteine auf der Membran erfolgte durch spezifische Antikörperbindung. Vor Beginn der Antikörper-Nachweisreaktion wurde die Membran für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C abgesättigt. Dieses Blocken sollte überschüssige Proteinbindestellen der Membran saturieren und eine unspezifische Bindung der Antikörper verhindern. Das Blockingreagenz wurde in TBS-T (10 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween20) verdünnt und je nach Detektionsmethode gewählt: 1% Casein (Western Blocking Reagent, Boehringer Mannheim) bei Verwendung von fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern oder 5 % Trockenmilchpulver (ECL-Blocking Agent) bei Verwendung des ECL-Plus-Systems. Durch die Blocking-Prozedur können in seltenen Fällen schwach gebundene Proteine abgelöst und durch das Blockingreagenz ersetzt werden [Hoffmann & Jump, 1986, Hoffmann *et al.*, 1991]. Um

dies zu verhindern, wurden die Membranen vor dem Absättigen vollständig getrocknet, was vor allem bei PVDF-Membranen den Verlust an geblotteten Proteinen um bis zu 50% reduzieren soll [Harlow & Lane, 1988]. Getrocknete PVDF-Membranen wurden vor dem Absättigen wieder mit Methanol rehydratisiert. Im Anschluss an das Blocken wurde die Membran 3-mal für 15 min mit TBS-T gewaschen, um ungebundenes Protein zu entfernen. Nach dem Absättigen folgte als eigentliche Nachweisreaktion die Bindung des primären Antikörpers an transferierte Proteine. Der primäre Antikörper wurde entsprechend den Angaben in Tabelle 2.22 in TBS-T mit 0,5 % (w/v) Blockingreagent verdünnt. Die Inkubation auf der Membran erfolgte in der Regel über Nacht bei 4°C. Nach Entfernen der Primär-Antikörperlösung wurde die Membran mit einem Liter TBS-T gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen und anschließend für 1 Stunde unter Schwenken in Sekundär-Antikörperlösung inkubiert, so dass ein Protein-1.Antikörper-2.Antikörper-Komplex entsteht. Zur indirekten Visualisierung der Bindung tragen die Sekundär-Antikörper eine Fluorophor- (Cy5) oder Peroxidase (HRP)-Markierung. Nach Behandlung mit Zweit-Antikörper wurde ungebundener Antikörper mit 1 Liter TBS abgewaschen und es erfolgte die Visualisierung.

**Tabelle 2.22: Primäre Antikörper für den Immunnachweis im Western Blot**

Antikörper	Spezifität	Host	Verdünnung	Firma/Referenz
Anti-mPFN2aAS361	mProfilin2a: + AYSMAYLRDSGF	Kaninchen	1:10000	M. Rothkegel, TU Braunschweig
Anti Profilin III	Profilin 3: + EVGVLTGPDRHTFL	Kaninchen1, d120, d135	1:700	Obermann <i>et al.</i> , 2005
Anti-Profilin IV	Profilin4: + REGLYFKEKDYKC VRADDYSLYAK	Meerschwein, d120,d135	1:500	Obermann <i>et al.</i> , 2005
Polyclonal Profilin-Antibody	Profilin 1: +	Kaninchen	1:1000	Novus Salazar <i>et al.</i> , 1999
Monoclonal Anti- $\alpha$ -Tubulin, Clone DM 1A	$\alpha$ -Tubulin	Maus	1:500	Sigma Bloese <i>et al.</i> , 1984
Anti-VASP antiserum M4 (immunoGlobe)	Human, Maus, Ratte VASP	Kaninchen	1:1500 – 1:3000	Reinhard <i>et al.</i> , 1995
c-Myc Monoclonal Antibody	c-Myc-Peptid	Maus	1:500 – 1:1000	BDBiosciences Evan <i>et al.</i> , 1985
Anti-HA High Affinity monoclonal antibody (clone 3F10)	HA-Peptid	Ratte	1:1000	Roche Wilson <i>et al.</i> , 1984
Monoclonal Anti $\alpha$ -Smooth Muscle Actin Clone 1A4	$\alpha$ -Aktin	Maus	1:500-1:1000	SIGMA/ Skalli <i>et al.</i> , 1986
Anti-Actin (Ab-1) Mouse mAB (JLA20)	Aktin $-\alpha,-\beta,-\gamma$	Maus	1:5000-1:20000	Calbiochem Thomas <i>et al.</i> , 2000

**Tabelle 2.23: Sekundäre Antikörper**

Antikörper	Spezifität	Host	Verdünnung	Firma
Peroxidase-conjugated AffiniPure Fc-Fragment Goat Anti-Rabbit IgG	Kaninchen IgG	Ziege	1:1000	Jackson ImmunoResearch
Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L)	Maus-IgG	Kaninchen	1:1000	Jackson ImmunoResearch
Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Rat IgG (H+L)	Ratte IgG	Kaninchen	1:1000	Jackson ImmunoResearch
Anti-Rabbit IgG (whole molecule) Peroxidase conjugated	Kaninchen IgG	Ziege	1:1000	Sigma
Anti-Guinea pig IgG (whole molecule) peroxidase conjugated	Meerschwein IgG	Ziege	1:1000	Sigma
Cy5-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Kaninchen IgG	Ziege	1:1000	Jackson ImmunoResearch
Cy5-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Guinea-PigIgG	Meerschwein IgG	Esel	1:1000	Jackson ImmunoResearch
Cy5-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Kaninchen IgG	Ziege	1:1000	Jackson ImmunoResearch
Cy5-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L)	Ratte IgG	Ziege	1:1000	Jackson ImmunoResearch
Cy5-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Maus IgG	Ziege	1:1000	Jackson ImmunoResearch

#### 2.2.5.4 Visualisierung der immunologisch markierten Proteinbanden

Cy5-markierte Antikörper-Komplexe auf der Membran wurden direkt mit dem Fluoroimager Storm™860 (Molecular Dynamics) detektiert. Hierfür wurde über die Steuerungs-Software *Scanner control 5.0* die Funktion *RedFluorescence* gewählt und 200 Micron (200 Datenpunkte / cm) als Parameter für die Pixelgröße und 1000 PMT Voltage als Intensität eingestellt. Der Fluoreszenzfarbstoff Cy5 hat eine maximale Excitation bei 650 nm und Emission bei 670 nm.

Der Nachweis Peroxidase-konjugierter Antikörper auf den Western-Blots erfolgte mit dem *ECL-Plus Western-Blotting-Detection-Reagent* (GE Healthcare) in einer immunochemischen Reaktion. Hierzu wurden die Lösungen A und B in einem Verhältnis von 40:1 vermischt und 3-5 Minuten unter leichtem schwenken bei RT auf der Membran inkubiert. Die Peroxidase oxidiert das in der Detektionslösung enthaltene Substrat und produziert dabei ein Chemifluoreszenz-Signal mit einer maximalen Excitation bei 430 nm und Emission bei 503 nm. Dieses Signal konnte mit dem Storm™860 Fluoroimager unter der Funktionseinstellung *BlueFluorescence* mit 200 Micron und 1000 PMT Voltage eingesannt und detektiert werden. Die eingescannten „gel“-Dateien wurden mit dem Programm *Image Quant Version 5.0* geöffnet und bearbeitet. Den stärksten Signalen („high“-Wert) wurde Schwarz und den schwächsten Signalen („low“-Wert) Weiß zugeordnet, so dass ein Graustufenbild entsteht. Die Bilddateien wurden anschließend in „tif“-Dateien konvertiert.

#### 2.2.6 Immunozytochemie

Die Immunozytochemie ist eine etablierte Standardmethode zum spezifischen Nachweis von Proteinen in einzelnen Zellen, Zellkulturen und Geweben [Coons & Kaplan, 1950; Coons *et al.*, 1955]. In dieser Arbeit wurde die Methode für Lokalisationsstudien der Testis-exprimierten Profilin III und IV, so wie zu Co-Lokalisationsstudien mit anderen spezifischen Proteinen auf Ratten- und humanen Keimzell-Cytospin-Präparaten genutzt, um so Hinweise auf physiologische Zusammenhänge und Funktionen der Profilin zu erhalten. Die Methode lässt sich in drei Schritte gliedern: Die Vorbehandlung der Präparate, die Inkubation mit spezifischen Antikörpern und die Detektion der entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern und konfokaler Lasermikroskopie.

##### 2.2.6.1 Gewinnung von Ratten-Keimzellen

Für die Gewinnung von Ratten-Keimzellen wurde frisches Hodengewebe männlicher Sprague Dawley-Ratten (*Rattus norvegicus* L.) der Firma Charles River Inc. verwendet. Alle Tiere waren geschlechtsreif und zwischen sieben und acht Monaten alt. Nach Töten der Tiere durch CO<sub>2</sub>-Asphyxiation wurden beide Hoden entnommen und in 32°C warmes PBS überführt. Nach vorsichtiger Entfernung der Kapsel wurden die Hoden in einem kleinen Petrischälchen mit 5-10 ml PBS mit einer spitzen Schere zerschnitten. Dabei quellen die Keimzellen aus dem Testisgewebe heraus und sedimentieren zu Boden. Größere Gewebestückchen wurden aus der Lösung entfernt und die verbleibende Keimzellsuspension zur Herstellung von Cytospin-Präparaten verwendet.

##### 2.2.6.2 Gewinnung von humanen Keimzellen

Zur Herstellung von humanen Keimzellpräparaten wurden humane Gewebeproben mit vollständiger Spermatogenese verwendet, da diese im Gegensatz zu Ejakulaten alle Keimzellstadien und Entwicklungsstufen (Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatischen und reife Spermien) beinhalten. Die Biopsien wurden nach der OP-Entnahme direkt in MEM-Medium überführt. Im Labor erfolgte dann zur Herstellung einer Keimzellsuspension die mechanische Zerkleinerung des Gewebestückes durch Zerschneiden in 2 ml MEM. Größere Bindegewebsstücke wurden entfernt und die Keimzellsuspension zur Herstellung von Cytospin-Präparaten verwendet.

### 2.2.6.3 Herstellung von Paraformaldehyd-fixierten Cytospin-Präparaten

Zur optimalen Erhaltung der morphologischen Strukturen erfolgte die Herstellung von Keimzellpräparaten durch Cytospin-Zentrifugation und Paraformaldehyd-Fixierung. Für die Zentrifugation wurden Cytofunnel-Kammern zusammen mit einem Filter auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger gespannt und pro Kammer mit 10-50 µl Keimzellsuspension und PBS ad 90 µl befüllt. Zur Fixierung der Zellen wurde anschließend Fixierlösung (16 % Paraformaldehyd, 12 % Sucrose) im Verhältnis 1:4 zugefügt, so dass eine Endkonzentration von 4 % Paraformaldehyd und 3 % Sucrose erreicht wurde. Durch Zentrifugation der Kammern für 4 min bei 800 rpm im *Medium*-Modus in der Cytospin3 wurden die Zellen auf den Objektträger transferiert. Im Anschluss an die Zentrifugation wurden die Objektträger für 5-10 min luftgetrocknet und entweder direkt weiter verarbeitet oder bis zur Fluoreszenzfärbung bei -20°C aufbewahrt.

### 2.2.6.4 Indirekte Immunfluoreszenz: Detektion der Proteine durch Antikörper

Vor Beginn der immunologischen Markierung mit Antikörpern wurden die Cytospin-Präparate dreimal für je 10 Minuten in PBS rehydriert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 min in 5% *Normal Goat Serum* (NGS)/PBS bei Raumtemperatur, um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen durch einen Überschuss mit NGS zu blockieren. Während dieser Zeit wurden Verdünnungen der primären Antikörper in 2 % NGS/PBS angesetzt. In Tabelle 2.24 sind die verwendeten Antikörper und die eingesetzten Verdünnungen aufgelistet. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Nach dreimaligem Waschen in PBS für je 10 min wurden die Präparate mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (1:100 in PBS mit 2 % NGS) für 60 min bei Raumtemperatur in einer lichtundurchlässigen Kammer inkubiert. Bei einer Doppel-immunfluoreszenz wiederholten sich die beiden Inkubationen mit weiteren Erst- und Zweit-Antikörpern. Für eine gleichzeitige Markierung von Zellstrukturen wurde der Zweitantikörperlösung DAPI, PNA oder Phalloidin zugesetzt. Im Anschluss an die Antikörpermarkierung folgten drei Waschschritte mit PBS für je 10 min, um ungebundene Antikörper von den Präparaten zu waschen. Die Präparate wurden in Fluoromount G eingedeckt um das Ausbleichen zu reduzieren und am Laser-konfokalen Mikroskop ausgewertet.

**Tabelle 2.24: Erstantikörper für die Immunocytochemie;** genauere Angaben zu den Antikörpern finden sich in Tabelle 2.22

Antikörper	Spezifität	Host	Verdünnung
Anti PFN3	Profilin III	Kaninchen 2	1:500
Anti PFN4	Profilin IV	Kaninchen 1	1:500
Monoclonal Anti- $\alpha$ -Tubulin, Clone DM 1A	$\alpha$ -Tubulin	Maus	1:200

**Tabelle 2.25: Fluoreszenzmarkierte Zweit-Antikörper für die Immunocytochemie**

Es wurden jeweils Cyanin-markierte (Cy) Zweitantikörper aus Ziege verwendet, die Spezies-spezifisch gegen den Erstantikörper gerichtet sind. Alle Cy-Zweitantikörper stammen von der Firma Jackson Immuno Research.

Zweit-Antikörper	Verdünnung	Anregungsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)	Farbe
Cy2 (Carbocyanin)-markierte AK	1:100	492	508	Grün
Cy3 (Indocarbocyanin)-markierte AK	1:100	550	570	Rot

### 2.2.6.5 Fluoreszenzfärbung von Zellkern und Akrosom

Für eine Analyse der Morphologie und zur besseren Differenzierung der Zelltypen wurden Zellkerne und Akrosomen sowie Aktinstrukturen der Keimzellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Für die Kernfärbung wurde der klassische DNA-Farbstoff DAPI verwendet, der bevorzugt in der kleinen Furche von dsDNA bindet [Tanious *et al.*, 1992]. Die Akrosomenmarkierung erfolgte mit Hilfe eines Alexa Fluor<sup>®</sup>568-fluoreszenzmarkierten Lektins (*Peanut agglutinin*, PNA), das spezifisch an terminale  $\beta$ -Galaktosereste im Akrosom von Spermien

bindet [Szasz *et al.*, 2000]. Für die F-Aktin-Markierung kam der Farbstoff Alexa-Fluor<sup>®</sup>546-Phalloidin zum Einsatz. Phalloidin gehört zu den Phallotoxinen und bindet stöchiometrisch an F-Aktinfilamente. Es zeigt kaum unspezifische Bindungen [Faulstich *et al.*, 1988]. Die Anregungs- und Emissionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe sind in Tabelle 2.26 aufgelistet. Für die Fluoreszenzfärbung wurden die Cytospin-Präparate 3 mal für 10 Minuten in PBS rehydriert und anschließend in einer feuchten Kammer für 30 min mit den Fluoreszenzfarbstoffen inkubiert. Bei Cytospin-Präparaten, die bereits mit einem Erstantikörper behandelt wurden, erfolgte die Inkubation zusammen mit dem Zweitantikörper für 1 h bei RT. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden in folgenden Verdünnungen in PBS mit 1 mM Ca<sup>2+</sup> und 0,5 mM Mg<sup>2+</sup> angesetzt: PNA 10 µg/ml, DAPI 1 µg/ml und Phalloidin 20 U/ml. Im Anschluss an die Färbung wurden die Präparate dreimal für 10 min in PBS gewaschen und mit Fluoromount G eingebettet.

**Tabelle 2.26: Fluoreszenzfarbstoffe für die Immunocytochemie**

Fluoreszenzfarbstoff	Spezifität	Anregungsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)	Farbe
DAPI	Zellkern/dsDNA	355	450	Blau
Alexa Fluor <sup>®</sup> 568-PNA	Akrosom	570	605	Rot
Alexa-Fluor <sup>®</sup> 546-Phalloidin	F-Aktin	546	573	Rot

### 2.2.6.6 Laser-konfokale Mikroskopie

Die Auswertung der fluoreszenzmarkierten Cytospin-Präparate erfolgte mit dem konfokalen Lasermikroskop *TCS SL* von Leica mit einem inversen Leica DM-IRE2-Stativ, das mit einer Quecksilber-Dampfampe (Osram), einem Argon Laser ( $\lambda = 458 \text{ nm}, 488 \text{ nm}, 514 \text{ nm}$ ) und einem He-Ne-Laser ( $\lambda = 543 \text{ nm}$ ) ausgestattet ist. Auf dem Stativ ist der Scankopf montiert, der einen Lichtleiter, Linsen, Fluoreszenzfilter, dichroische Spiegel, zwei Photomultiplier (Detektor) sowie die Scanvorrichtung enthält. Die Laser dienen als Quelle für monochromatisches Anregungslicht. Der punktförmige Laser-Lichtstrahl wird durch den Lichtleiter über einen dichroischen Spiegel (transparent für das Anregungslicht und reflektierend für das emittierte Licht) in das Objektiv geleitet und auf einen Punkt auf das Präparat fokussiert. Dadurch wird nur wenig Farbstoff über und unter der Fokusebene angeregt, und in lateraler Ebene findet quasi gar keine Anregung statt. Die entstehenden emittierten Fluoreszenzsignale kehren auf inversem Weg durch das Objektiv auf den dichroischen Spiegel zurück. Dieser leitet sie über ein Spiegelsystem zur Detektorlochblende deren Breite die Schichtdicke der Konfokalebene bestimmt und außerhalb der Fokusebene entstammendes Fluoreszenzlicht abschirmt. Die Fluoreszenzsignale werden letztlich durch ein Filtersystem von den Photomultipliern detektiert, an einen nachgeschalteten Computer weitergegeben und als erstes Pixel einer Graphik gespeichert. Die automatische Rastereinrichtung des Mikroskops richtet dann den Strahlengang des Lasers auf einen benachbarten Punkt in der Fokusebene (x-Achse) und speichert ein weiteres Bildelement. Das System verfährt so weiter, bis die erste Zeile des Bildes, 512 Pixel, detektiert ist und springt dann in die zweite Zeile (y-Achse). Auf diese Weise wird ein komplettes Bild der Fluoreszenzintensität aus der Fokusebene erstellt.

Die Ansteuerung der Filter, Spiegel, Scanvorrichtung und der Laser sowie die Auswertung der detektierten Fluoreszenzsignale erfolgten mit der zum System gehörigen Steuerungs- und Auswertungs-Software *Leica Confocal Software*. Die Auswertung der fluoreszenzmarkierten Präparate erfolgte unter standardisierten Bedingungen und Einstellungen des Mikroskops mit einem 40er Objektiv bei Raumtemperatur.

## 2.3 Das *Yeast Two-Hybrid-System* – Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

Das *Yeast Two-Hybrid-System* (Y2H) ermöglicht eine *in vivo* Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in einem eukaryotischen Zellsystem [Fields & Song, 1989, Sherman, 1998]. Das Y2H-System wurde in dieser Arbeit zum einen zum Mustern von cDNA-Bibliotheken nach Interaktionspartnern für den HE6-Rezeptor sowie Profilin III und Profilin IV genutzt und zum anderen zum Nachweis von Interaktionen zwischen zwei Proteinen, sowie zur Kartierung interagierender Domänen in Proteinen. Verwendet wurde das *Gal4 Matchmaker Two-Hybrid System 3* von Clontech, welches die DNA-bindende-Domäne (DNA-BD) und die transkriptionsaktivierende Domänen (AD) des Gal4-Transkriptionsfaktors aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nutzt. Diese beiden Domänen bilden *in vivo* eine zusammenhängende Polypeptidkette und ergeben den funktionsfähigen Hefe-Transkriptionsfaktor Gal4, der definierte UAS (*upstream activating sequences*) erkennt und die damit assoziierten Reportergene durch Rekrutierung der RNA-Polymerase aktiviert. Für das Y2H-System werden diese beiden Domänen getrennt und auf unterschiedlichen Plasmiden mit unterschiedlichen Selektionsmarkern mit den zu untersuchenden Proteinen als Fusionsproteine in *S. cerevisiae* exprimiert. Hierzu wurden die Hefe-Expressionsvektoren pGBKT7 und pGADT7/pGADT7rec verwendet. Fusionsproteine mit der Gal4-DNA-BD werden im Folgenden als *Bait* bezeichnet, Fusionsproteine mit der GAL4-AD als *Prey*. Da die funktionellen Eigenschaften des Gal4-Transkriptionsfaktors bei einer physikalischen Trennung der beiden Domänen erhalten bleiben [Ma & Ptahne 1988], lassen sich Interaktionen von *Bait* und *Prey* über die Rekonstitution eines chimären, funktionellen Gal4-Transkriptionsfaktors durch enge räumliche Assoziation nachweisen [Fields & Sternglanz, 1994]. Detektiert werden Protein-Protein-Interaktionen im *Matchmaker Two-Hybrid System 3* über die die transkriptionelle Aktivierung der Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *lacZ*.

### 2.3.1 Hefestämme und Plasmide des *Matchmaker Two-Hybrid Systems*

#### 2.3.1.1 Hefestämme und Wachstumsbedingungen

Das Y2H-System arbeitet in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die Expression von Proteinen über Plasmide ist ähnlich einfach wie in Bakterien, jedoch ist das Hefe-Expressionssystem dem höherer Eukaryonten soweit ähnlich, dass auch aus Säuger-Genen funktionelle Proteine mit post-translationalen Modifizierungen gebildet werden. Verwendet wurden in vorliegender Arbeit die Hefestämme *S. cerevisiae* AH109 und Y187 aus dem *Matchmaker Two-Hybrid System 3* der Firma Clontech. Die Genotypen und Phänotypen der Hefestämme sind in den folgenden Tabellen aufgelistet. Beide Stämme sind auxotroph für Tryptophan, Leucin, Histidin, Adenin und Uracil. Die Leucin- und Tryptophan-Auxotrophien können durch entsprechende plasmidkodierte Gene (*LEU2* auf pGBKT7, *TRP1* auf pGADT7) komplementiert werden und dienen zur Selektion der positiven Transformanten. Die Gene *HIS3*, *ADE2* und *lacZ* stehen unter Kontrolle des GAL1-, GAL2 oder MEL1-Promotors (3 verschiedene Promotoren zur Vermeidung falsch positiver Klone), die durch den in den Hefen deletierten GAL4-Transkriptionsfaktor reguliert werden. Diese Gene dienen im Y2H als Reporter der Transkription und somit als Selektionsmarker für Protein-Protein-Interaktion, bei der ein aktiver Gal4-Transkriptionsfaktor rekonstituiert wird. Ein für das Y2H-System ebenfalls wichtiger Faktor sind die unterschiedlichen Matingtypen der beiden haploiden Hefestämme (AH109 = Mata, Y187 = Mata $\alpha$ ), die die Fusion zu einer diploiden Zelle initiieren.

**Tabelle 2.27: Genotypen der Hefestämme AH109 und Y187**

<i>S.cerevisiae</i>	Genotyp	Reportergen Promotor	Transformations-Marker	Referenz
<b>AH109</b>	Mata, , ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901 leu2-3, 112, gal4Δ, gal80 Δ, cyh <sup>2</sup> , LYS2::GAL1 <sub>UAS</sub> -HIS3 <sub>TATA</sub> -HIS3, MEL1 URA3::GAL1 <sub>UAS</sub> -GAL1 <sub>TATA</sub> -lacZ	<i>HIS3/GAL1</i> <i>ADE2/GAL2</i> <i>lacZ/MEL1</i>	Trp1 Leu2 cyh <sup>2</sup>	Harper <i>et al.</i> , 1993;
<b>Y187</b>	Mata, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met <sup>-</sup> , gal80Δ, URA3 : : GAL1 <sub>UAS</sub> -Gal1 <sub>TATA</sub> -lacZ, MEL1	<i>lacZ/GAL1</i>	Trp1 Leu2	Harper <i>et al.</i> , 1993

**Tabelle 2.28: Phänotypen der Hefestämme AH109 und Y187.** SD: synthetisches Minimalmedium, - Ade/Met/Trp/Leu/His:/Ura: ohne Adenin/Methionin/Tryptophan/Leucin/Histidin./Uracil, YPDA: Hefevollmedium

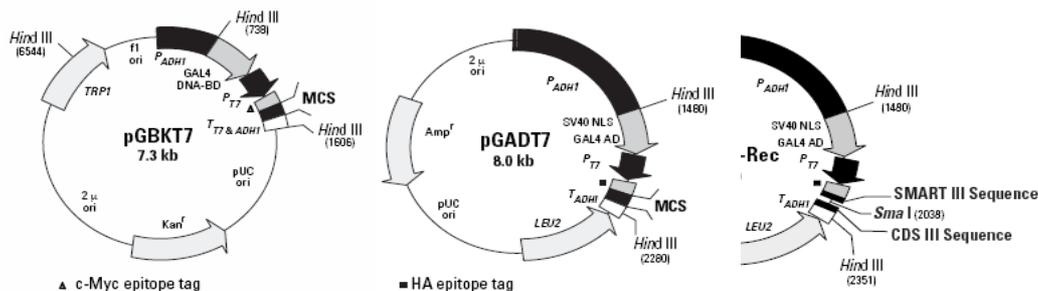
<i>S.cerevisiae</i> -Stamm	SD/-Ade	SD/-Met	SD/-Trp	SD/-Leu	SD/-His	SD/-Ura	YPDA
<b>AH109</b>	-	+	-	-	-	+	+
<b>Y187</b>	-	-	-	-	-	+	+

### 2.3.1.2 Hefevektoren

Zur Herstellung von Fusionsproteinen mit der Gal4-AD bzw. -DNA-BD wurden die Hefe-Expressionsvektoren pGBKT7 und pGADT7/pGADT7-Rec aus dem *Gal4 Matchmaker Two Hybrid System 3* (Clontech) verwendet. In Tabelle 2.29 sind die kodierten Gal4-Domänen und Selektionsmarker der Plasmide aufgelistet. Die Vektoren pGADT7 und pGADT7-Rec unterscheiden sich lediglich in der MCS. pGBKT7 und pGADT7 enthalten zur Klonierung von cDNA-Inserts eine MCS mit verschiedenen Restriktionsschnittstellen, von denen zur Klonierung standardmäßig die Restriktionsschnittstellen EcoRI, BamHI, NdeI oder PstI genutzt wurden. pGADT7-Rec besitzt lediglich die Schnittstellen EcoRI und BamHI, verfügt jedoch zusätzlich über SMART III- und CDS III-Sequenzen zum Einbringen von Inserts durch homologe Rekombination (siehe Abb. 2.2). Als Kontrollvektoren wurden pGBKT7-53 und pGADT7-T verwendet, die das Protein p53 als Fusion mit der Gal4-DNA-BD bzw. das *Large T-Antigen* als Fusion mit der Gal4-AD exprimierten. Diese beiden Proteine sind dafür bekannt, dass sie auch im Y2H sehr stark interagieren [Li & Fields, 1993, Iwabuchi *et al.*, 1993]. Die verwendeten Vektoren besitzen eine *E.coli-ori*, so dass die Plasmide zur weiteren Analyse in Bakterien amplifiziert werden können. Zudem verfügen sie über einen T7-RNA-Polymerase Promotor und ein ATG-Startcodon, so dass durch *in vitro*-Translation Transkripte generiert und diese anschließend translatiert werden können.

**Tabelle 2.29: Hefe-Expressionsvektoren**

Vektor	Größe	Beschreibung	Epitop	Hefe Selektionsmarker	Bakterien-Selektionsmarker
<b>pGBKT7</b>	7,3 kb	exprimiert Gal4 <sub>(1-147)</sub> DNA-BD-Fusionsproteine (Bait)	c-myc	<i>TRP1</i>	Kanamycin
<b>pGADT7</b>	8 kb	Exprimiert GAL4 <sub>(768-881)</sub> -AD-Fusionsproteine (Prey)	HA	<i>LEU2</i>	Ampicillin
<b>pGADT7-Rec</b>	8 kb	GAL4 <sub>(768-881)</sub> AD, wie pGADT7	HA	<i>LEU2</i>	Ampicillin
<b>pGBKT7-53</b>	8,3 kb	exprimiert p53 mit Gal4-DNA-BD	c-myc	<i>TRP1</i>	Kanamycin
<b>pGADT7-T</b>	10 kb	exprimiert SV40 large T-Antigen mit Gal4-AD	HA	<i>LEU2</i>	Ampicillin



**Abb. 2.2: Die Hefevektoren pGBKT7, pGADT7 und pGADT7-Rec.** MCS: multiple cloning site, Kan: Kanamycin-Resistenz-Gen, Amp: Ampicillin-Resistenz-Gen, P<sub>ADH1</sub>: *S.cerevisiae* Alkohol Dehydrogenase Promotor, T<sub>ADH1</sub>: *S.cerevisiae* ADH1 Terminator, TRP1: Tryptophan-Reportergen, Leu2: Leucin-Reportergen, P<sub>T7</sub>: T7-RNA-Polymerase Promotor, pUC ori: Plasmid-Replikations Origin, 2µ ori: Hefe Replikations-Origin

### 2.3.1.3 Anzucht von Hefen und Hefe-Nährmedien

Die *S. cerevisiae*-Stämme wurden nach etablierten Protokollen [Guthrie und Fink, 1991; Sambrook *et al.*, 1989] und Empfehlungen des *Yeast Protocols Handbook* [Clontech, Heidelberg, 2001] kultiviert. Die Anzucht der untransformierten Hefestämme AH109 und Y187 erfolgte auf YPDA-Vollmedium-Platten (siehe Tabelle 2.30). Um transformierten Hefezellen auf Auxotrophie-Marker zu selektieren, wurden je nach Bedarf verschiedene Selektionsmangelmedien verwendet. Als Basis für jedes Selektionsmedium diente ein synthetisches Minimalmedium (SD-Medium, Tabelle 2.31), das die erforderlichen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen bereitstellte. Durch Zugabe eines Gemisches essentieller Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen (DO-Zusätze, *dropout*; siehe Tabelle 2.33), in dem jeweils auf die Komponenten verzichtet wurde, auf deren Synthese durch die verwendeten Auxotrophie-Marker selektiert werden sollte, wurde das Medium den erforderlichen Selektionsbedingungen angepasst. Die Anzucht der Hefestämme erfolgte für 3-6 Tage bei 30°C auf festen Agarnährboden mit 2% (w/v) Agar oder über Nacht bei 30°C und 200 rpm in flüssigem Medium.

**Tabelle 2.30: YPDA-Vollmedium.**

\* YPD-Medium enthält Peptone, Yeast-Extrakt, Dextrose und Glucose

Reagenz	Menge
YPD-Medium* (Clontech)	50 g
0,2 % Adeninhemisulfat	15 ml
Agar	20 g
⇒ in 985 ml ddH <sub>2</sub> O lösen und pH auf 6,5 einstellen	
⇒ 15 min bei 121°C autoklavieren	

**Tabelle 2.31: Synthetisches Minimalmedium (SD-Medium).**

# YNB (*Yeast Nitrogen Base*) ist eine Nährstoffmischung aus Salzen, Vitaminen und Spurenelementen, enthält aber keine C-Quelle und keine Aminosäuren

Reagenz	Menge
<i>Yeast Nitrogen Base</i> ohne Aminosäuren	6,7 g
10 x DO-Lösung (siehe Tabelle 2.33)	100 ml
⇒ den pH mit 10M NaOH auf 5,8 einstellen	
Agar (für feste Medien)	20 g
⇒ 20 min bei 121°C autoklavieren; auf 55°C abkühlen lassen	
40 % Glucose	50 ml
⇒ Glucose nach Abkühlen hinzufügen und Platten gießen	

**Tabelle 2.32: AS-Konz. in SD-Medium**

Aminosäure	f.c. in SD-Medien
L-Tryptophan	20 mg/l
L-Leucin	100 mg/l
L-Histidin	20 mg/l
L-Adenin	20 mg/l
L-Arginin	20 mg/l
L-Isoleucin	30 mg/l
L-Lysin	30 mg/l
L-Methionin	20 mg/l
L-Phenylalanin	50 mg/l
L-Threonin	200 mg/l
L-Tyrosin	30 mg/l
Uracil	20 mg/l
L-Valin	150 mg/l

**Tabelle 2.33: 10 x DO-Lösungen für SD-Selektionsmedien**

10 x DO-Lösungen enthalten alle essentiellen Aminosäuren und Nucleoside, außer derjenigen AS, auf deren Synthese selektiert werden soll. Zur Herstellung der 10 x DO-Lösungen wurde die 10fach angegebene Menge DO-Supplement (Clontech) in 1 l H<sub>2</sub>O eingewogen, verrührt und 15 min bei 121°C autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Da Clontech kein LTA-DO-Supplement bietet, wurde zur Herstellung von 10 x DO-LTA 10 x DO-LTHA mit 10 xHis supplementiert.

Name SD-Medium	Name Dropout	Fehlende Aminosäure
SD/-L	10xDO-L	L-Tryptophan
SD/-T	10xDO-T	L-Leucin
SD/-LT	10xDO-LT	L-Tryptophan, L-Leucin
SD/-LTH	10xDO-LTH	L-Tryptophan, L-Leucin, L-Histidin
SD/-LTA	10xDO-LTA	L-Tryptophan, L-Leucin, L-Adenin
SD/-LTHA	10xDO-LTHA	L-Tryptophan, L-Leucin, L-Histidin, L-Adenin

### 2.3.1.4 Anlegen von Glycerol-Stocks

Die langfristige Lagerung der Hefezellen erfolgte mit 25 %-Glycerol bei -80°C. Für die untransformierten Hefestämme AH109 und Y187 wurde ein YPDA-Glycerol-Gemisch verwendet. Transformierte Hefezellen wurden in SD-Selektionsmedium mit Glycerol gelagert, um den selektiven Druck auf das Plasmid aufrechtzuerhalten. Zum Anlegen der Glycerolstocks wurde eine frische Hefekolonie mit einer sterilen Impföse von einer Platte entnommen, in 400 µl Medium überführt und durch kräftiges Vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von 400 µl 50 %-Glycerol und gründlichem Vermengen wurden die Stocks bei -80°C gelagert.

### 2.3.2 Detektion von Interaktionspartnern im *Yeast Two-Hybrid System*

Das *MATCHMAKER Two-Hybrid System* von Clontech erlaubt die Isolierung von cDNAs, die potentielle Interaktionspartner eines speziellen Proteins codieren. Die Detektion nach potentiellen Interaktionspartnern erfolgte dabei durch Mating des Mat  $\alpha$ -Hefestamms AH109 welcher das *Bait*-Protein mit der Gal4-DNA-BD enthielt, mit dem vortransformierten Mat $\alpha$ -Hefestamm Y187, welcher *Prey*-Proteine aus einer cDNA-Bibliothek als Fusion mit der Gal4-AD enthielt. Die beiden Hefestämme mit unterschiedlichen Mating-Typen (MAT $\alpha$ , MAT $\alpha$ ) verschmelzen zu einem diploiden Hefestamm mit den Eigenschaften beider Stämme. Interagieren *Bait* und *Prey* in der diploiden Zelle, so kommt es zur Rekonstitution eines funktionellen Gal4-Transkriptionsfaktors und zur Expression der Reportergene.

#### 2.3.2.1 Konstruktion der *Bait*-Plasmide

Um das Y2H-System zur Suche nach potentiellen Interaktionspartnern des HE6-Rezeptors, Profilin III und Profilin IV zu nutzen, mussten die zu untersuchenden Proteine als Fusionsproteine mit der Gal4-DNA-BD (*Baits*) im Hefestamm AH109 exprimiert werden. Für die Konstruktion der *Bait*-Plasmide wurden die gewünschten Sequenzen mit EcoRI und BamHI-Schnittstellen mittels PCR amplifiziert, die PCR-Produkte mit EcoRI und BamHI geschnitten und anschließend gerichtet in den Vektor pGBKT7 ligiert. Die Plasmid-Konstrukte wurden in *E.coli* amplifiziert und aufgereinigt. Die Analyse der Plasmid-Konstrukte erfolgte mittels Sequenzierung. Die rekombinanten *Bait*-Plasmide wurden anschließend für das Y2H-Screening in den Mat  $\alpha$ -Hefestamm AH109 transformiert. Die Selektion nach positiven Transformanten erfolgte auf SD/-T Medium.

**HE6-Bait:** Zur Detektion potentieller HE6-Bindungspartner wurde zum einen der intrazelluläre HE6-C-Terminus (bp 2804 bis 3214 von AF538954, 137aa) als *Bait*-Protein gewählt, zum anderen der dritte intrazelluläre Loop (bp 2587 bis 2665 von AF538954, 26aa) (Abbildung 1.8). Die PCR erfolgte mit den Primern HE6-s7 und HE6-as1 für den C-Terminus sowie He6-s6 und He6-as3 für den dritten intrazellulären Loop auf humaner Nebenhoden-cDNA (siehe Primertabelle 2.3).

**PFN III-Bait:** Als PFN III-*Bait* wurde der ORF des Maus Profilin III (bp 59 bis 524 von NM\_029303) gewählt. Die PCR erfolgte aus adulter Maus-Testis cDNA mit den Primern Eco-mProf3-s und Bam-mProf3-as (siehe Primertabelle 2.3).

**PFN IV-Bait:** Zur Detektion nach potentiellen Bindungspartnern für das neue Profilin IV wurde der Maus PFN IV ORF (bp 861 bis 1250 aus NM\_028376) kloniert. Die PCR erfolgte aus adulter Maus-Testis cDNA mit den Primern mrProf-s6-Eco und Prof-as2-BamHI (siehe Primertabelle 2.3).

#### 2.3.2.2 Transformation von *S. cerevisiae* nach der Lithiumacetat-Methode

Zur Hefetransformationen wurde das *Quick and Easy Transformation Protocol* nach Gietz & Woods (2002) verwendet. Mit Hilfe der Lithiumacetat-Methode [Ito *et al.*, 1983; Rothstein, 1993] können Hefezellen schnell und effizient transformiert werden, da ihre Zellmembran durch Alkalimetallionen kurzfristig für ringförmige Plasmid-DNA permeabel wird. Die Transformationseffizienz beträgt  $10^5$  bis  $10^6$  Transformanten pro  $\mu$ g Plasmid-DNA.

Von den Hefestämmen AH109 oder Y187 wurde je eine Kolonie pro Transformation mit einer sterilen Impföse in 1 ml ddH<sub>2</sub>O überführt und durch kräftiges Vortexen resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 sek, 2000 rpm) pelletiert und anschließend in 1 ml 100 mM LiAc resuspendiert. Nach erneutem Pelletieren der Zellen erfolgte die Transformation mit Plasmid-DNA. Hierzu wurden 240  $\mu$ l 50 % (w/v) PEG, 36  $\mu$ l 1 M LiAc, 50  $\mu$ l denaturierte 2 mg/ml Lachssperma-

DNA, 5 µl (100 ng-5 µg) Plasmid-DNA (pGBKT7 oder pGADT7) und 20 µl ddH<sub>2</sub>O zügig in genannter Reihenfolge auf die Zellen pipettiert und der Ansatz durch Vortexen gut gemischt. Es erfolgte ein Hitzeschock für 120 min bei 42°C. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Zellen pelletiert (10 sek, 13000 rpm 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in 400 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Um transformierte Hefeklonen zu selektieren wurde 400 µl einer 1:5-Verdünnung des Transformationsansatzes auf Selektivmedium ausplattiert. Hefezellen, die mit dem Vektor pGBKT7 transformiert wurden, wurden auf SD-Medium ohne Tryptophan (SD/-T) plattiert, Transformanten mit dem pGADT7-Vektor auf SD-Medium ohne Leucin (SD/-L). Nur Klone, die erfolgreich transformiert worden waren, konnten ihren Auxotrophiemangel kompensieren und auf den SD-Selektionsplatten wachsen. Als Kontrolle wurde der restliche Transformationsansatz der pGBKT7-Transformationen auf SD/-L bzw. die pGADT7-Transformationsansätze auf SD/-T plattiert. Die Platten wurden 3-6 Tage bei 30°C inkubiert.

### 2.3.2.3 Vorbereitende Untersuchungen

#### 2.3.2.3.1 Phänotyp-Test der Hefestämme

Bevor die Bait-Konstrukte in den Mat a-Hefestamm AH109 eingebracht wurden, war es notwendig, dessen Phänotyp zu kontrollieren, um in späteren Y2H-Screens ein unspezifisches Wachstum auszuschließen. Außerdem wurden die beiden Kontrollstämme AH109[pGBKT7-53] und Y187[pGADT7-T] sowie diploide Zellen aus den entsprechenden Matings überprüft. Für den Phänotyp-Test wurden die verwendeten Hefestämme auf verschiedene SD-Dropout-Medien ausgestrichen und ihr Wachstum nach fünf Tagen Inkubation bei 30°C protokolliert.

#### 2.3.2.3.2 Test auf Toxizität der Baits

Um eine eventuelle Toxizität der exprimierten *Bait*-Proteine auf den Hefestamm zu testen, wurde die Wachstumsrate zwischen Hefezellen, die mit dem *Bait*-Plasmid transformiert worden waren und solchen, die den leeren *Bait*-Vektor pGBKT7 trugen, in Flüssigkulturen verglichen. Ein deutlich langsames Wachstum des transformierten *Bait*-Stammes wäre ein Zeichen für eine toxische Wirkung. Für den Wachstumsvergleich wurden je 5 ml SD/-T-Medium (Selektion auf den Vektor pGBKT7) in 15 ml Reaktionsgefäßen mit je drei kleinen frischen Hefekolonien angeimpft, die Zellen durch starkes Vortexen (1 min) resuspendiert und die Kulturen bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Die Kontrolle des Wachstums erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 6 h und nach 24 h) durch Absorptionsmessung bei 600 nm gegen den Medium-Blindwert.

#### 2.3.2.3.3 Kontrolle der Transkriptionsaktivität durch die Baits

Eine Transkription der Reportergene (*HIS3*, *ADE2*, *lacZ*) darf erst im Fall einer Interaktion zwischen *Bait* und *Prey* erfolgen und nicht autonom durch das *Bait*-Protein. Bevor die *Bait*-Plasmide für ein cDNA-Bibliothek-Screening verwendet werden konnten, musste deshalb die Transkriptionsaktivität der *Bait*-Proteine überprüft werden. Daher wurden die *Bait*-Stämme AH109[pGBKT7-BaitX] auf den Selektionsplatten SD/-TH und SD/-TA ausgestrichen. Auf diesen Medien können nur Kolonien wachsen, die die Tryptophan-Auxotrophie durch den *Bait*-Vektor pGBKT7 kompensieren und autonom die Transkription der Reportergene *HIS3* und *ADE2* aktivieren. Nach Inkubation für 5 Tage bei 30°C wurde das Wachstum kontrolliert. Bei diesen Versuchen wurden stets Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

#### 2.3.2.3.4 Untersuchung der *Baits* auf Interaktion mit der Gal4-AD

Bevor ein Screening mit einem *Bait* durchgeführt werden konnte, musste überprüft werden, ob das *Bait*-Protein an die Gal4-AD bindet und so eine Aktivierung der Reportergene und Wachstum auf den Selektionsmedien hervorruft. Hierzu wurde wie unter 2.4.1 beschrieben, ein Minimating zwischen dem *Bait*-Hefestamm AH109 und dem mit dem leeren pGADT7-Vektor transformierten Hefestamm Y187, welcher nur die Gal4-AD exprimiert, durchgeführt. Die Ansätze wurden auf SD-Dropout-Medien ausplattiert und das Wachstum nach 5 Tagen Inkubation bei 30°C dokumentiert. Um eine Bindung an die Gal4-AD auszuschließen, durfte lediglich Wachstum auf SD/-L, -/T und -/LT stattfinden.

#### 2.3.2.3.5 Test auf Beeinflussung der Mating-Effizienz

Um zu kontrollieren, ob das *Bait*-Protein einen negativen Einfluss auf die Mating-Effizienz besitzt, wurde ein Kontrollmating mit dem transformierten *Bait*-Stamm und Kontrollstämmen durchgeführt. Die Mating-Effizienzen sollten ungefähr gleich sein und >2 % betragen. Für das Kontrollmating wurde wie unter 2.4.1 beschrieben ein Minimating mit dem entsprechenden *Bait*-Hefestamm AH109[pGBKT7-BaitX] und einem Prey-Hefestamm Y187[pGADT7-T] durchgeführt. Als Kontrolle dienten AH109[pGBKT7-53] und Y187[pGADT7-T]. Von den Matingansätzen wurden nach Inkubation über Nacht bei 30°C mit 200 rpm 100 µl-Aliquots einer 1:100 und 1:1000-Verdünnung in 0,5x YPDA auf SD/-T, SD/-L- und SD/-LT-Selektionsplatten aufgebracht. Nach Inkubation für 5 Tage bei 30°C wurden die haploiden Kolonien auf den Selektionsmedien SD/-T und SD/-L, sowie die diploiden Kolonien auf SD/-LT gezählt und die Mating-Effizienz berechnet.

#### 2.3.2.3.6 3AT-Test

Hefen des Stammes AH109 zeigen eine grundlegende schwache *HIS3*-Expression [Clontech, 1999]. Durch intrinsische DNA-Bindungseigenschaften des *Bait*-Proteins können die *Bait*-AH109-Hefestämme eine leicht erhöhte Expression des *HIS3*-Proteins (His3p) zeigen. Durch die Zugabe von 3-AT (3-Amino-1,2,4-triazol), einem kompetitiven Inhibitor des *HIS3*-Proteins in Hefen, zum Medium lassen sich geringe Konzentrationen von His3p inhibieren und ein Hintergrundwachstum auf SD-Medium ohne Histidin (SD/-H) unterbinden [Fields, 1994, Durfee *et al.*, 1993]. Da 3-AT frisch transformierte Hefezellen abtöten kann, sollte stets die geringste Konzentration verwendet werden, die notwendig ist, um das Hintergrundwachstum zu unterbinden. Um die optimale 3-AT-Konzentration zu ermitteln, wurden die mit *Bait*-Plasmid transformierten AH109 Stämme auf SD/-TH Platten mit unterschiedlichen 3-AT-Konzentrationen (0, 2, 6 und 10 mM) plattiert und für 7 Tage bei 30°C inkubiert. Es wurde für die Y2H-Versuche für die SD-Medien ohne Histidin die 3AT-Konzentration gewählt, bei der nach einer Woche Inkubation bei 30°C gerade kein Hintergrundwachstum zu erkennen war.

#### 2.3.2.3.7 Test auf Expression der *Bait*-Proteine in *S.cerevisiae*

Um zu überprüfen, ob die *Bait*-Konstrukte auch tatsächlich in *S. cerevisiae* exprimiert werden, erfolgte eine Proteinextraktion aus transformierten *Bait*-Kulturen mit anschließender Analyse der Proteinextrakte auf die *Bait*-Proteine im Western-Blot. Die Lyse der Hefezellwand erfolgte mit dem Detergenz-haltigen *Yeast Protein Extraction Reagent* (Y-PER<sup>®</sup>, Pierce) nach Herstellerangaben bei Raumtemperatur, so dass eine aufwändige Urea/SDS-Zellyse durch mechanische Zerkleinerung mit Glasbeads bei 4°C vermieden werden konnte.

Die Proteinextraktion aus Flüssig-Hefekulturen erfolgte aus der späten log-Phase. Hierzu wurden zunächst in 5 ml SD/-T-Medium mit einer *Bait*-Kolonie (AH109/pGBKT7-Protein X)

Starterkulturen angesetzt und diese 16-18 h bei 30°C und 250 rpm inkubiert, so dass die Kulturen die stationäre Phase erreichten ( $OD_{600nm}$  größer 1,5). Mit den ÜN-Kulturen wurden je 50 ml YPD-Medium angeimpft und bei 30°C und 250 rpm inkubiert bis die Kulturen die späte log-Phase erreicht hatten ( $OD_{600nm}$  bei 0,4 bis 0,6, Inkubationsdauer ca. 4-8 h). Nach Inkubation wurden die Kulturen schnell herabgekühlt und die Zellen durch fünfminütige Zentrifugation bei 4°C und 1000 x g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Nassgewicht der Zell-Pellets ermittelt und diese anschließend in einem adäquaten Volumen Y-PER (250 µl pro 50 mg) durch vorsichtiges auf und ab Pipettieren gelöst. Nach 20 Minuten Lyse bei RT unter leichtem Schwenken wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation (14000 x g, 10 min) sedimentiert. Aliquots der Überstände mit den löslich exprimierten Proteinen wurden in eine SDS-PAGE und anschließende Western-Blot Analyse eingesetzt. Die Detektion der *Bait*-Proteine (Fusionsproteine aus Gal4-DNA-BD, *c-myc-tag* und Protein X) erfolgte mit einem monoklonalem *c-myc*-Antikörper (BD Biosciences).

#### 2.3.2.4 Y2H-Screening einer prä-transformierten cDNA-Bibliothek mittels Hefe-Mating

Die Suche nach potentiellen Bindungspartnern für die *Baits* HE6, Profilin III und Profilin IV in AH109 erfolgte entsprechend den Angaben im *Matchmaker Gal4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual* [BD-Biosciences, 1999] durch Screening einer in Y187 vortransformierten Testis cDNA-Bibliothek durch Mating. Die durchgeführten Library-Screens sowie die eingesetzten *Baits* und Testis cDNA-Bibliotheken sind in Tabelle 2.34 aufgelistet. Im Folgenden ist die standardisierte Durchführung eines Y2H-Library Screens beschrieben.

Eine große, frische Kolonie des *Bait*-Stammes AH109[pGBKT7-X] wurde in 1 ml SD/-T Flüssigmedium resuspendiert und in einen 500 ml-Erlenmeyerkolben mit 50 ml SD/-T überführt. Die Kultur wurde für 16-24 h bei 30°C und 250 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die  $OD_{600}$  ermittelt. Lag diese über 0,8, wurden die Zellen für 5 min bei 1000 g in einem 50 ml Reaktionsgefäß pelletiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellpellet in 5 ml des Überstandes durch Vortexen resuspendiert. Ein 1 ml-Aliquot der Y187-Library-Kultur wurde im Wasserbad bei Raumtemperatur aufgetaut und vorsichtig gemixt. 10 µl der Library-Kultur wurden zur späteren Titerbestimmung in ein separates Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Für die Mating-Kultur wurden AH109/*Bait* und Y187/*Prey* in einem sterilen 2 l-Erlenmeyerkolben vereint, 44 ml 2x YPDA/Kan hinzugefügt und alles durch vorsichtiges Schwenken des Kolbens vermengt. Der Mating-Ansatz wurde für 20-24 h bei 30°C und max. 50 rpm inkubiert. Höhere Geschwindigkeiten hätten die Mating-Effizienz drastisch reduziert [BD-Biosciences, 1999]. Nach 22 h Inkubation erfolgte optional eine mikroskopische Kontrolle. Falls noch Zygoten (3fach-gelappte Zellform aus den 2 haploiden, parental Zellen und der knospenden diploiden Zelle) zu sehen waren, wurde die Kultur für weitere 4 Stunden inkubiert. Waren nur Einzelzellen zu erkennen, erfolgte die Abzentrifugation mit 1000g für 10 Minuten bei 4°C. Der Kulturkolben wurde 2-mal mit je 25 ml 2xYPDA/Kan ausgespült und das Medium zum Resuspendieren des Hefepellets verwendet. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (1000g, 10 min, 4°C) und anschließend in 10 ml 0,5 x YPDA/Kan resuspendiert. Das Endvolumen wurde ermittelt und notiert (Resuspensionsvolumen). Anschließend wurde der Mating-Ansatz wie folgt plattiert: Zur Bestimmung der Matingeffizienz wurden je 100 µl einer 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 Verdünnung auf SD/-L, SD/-T und SD/-LT-Agarplatten plattiert. Der verbleibende Mating-Ansatz wurde zur Detektion nach Protein-Protein-Interaktionen in 200 µl-Aliquots auf 150 mm-Platten mit entsprechendem Triple-Dropout (LTH oder LTA) oder Quadruple-Dropout (LTHA) SD-Selektionsmedium ausplattiert. Die Platten wurden 8-21 Tage bei 30°C inkubiert und das Auftreten

von Kolonien dokumentiert. Die Inkubation der Platten erfolgte über einen so langen Zeitraum, um auch langsam wachsende Kolonien, die auf schwache Protein-Interaktionen hindeuten, die Chance zum Wachsen zu geben.

**Tabelle 2.34: Bait-Konstrukte und verwendete cDNA-Librarys für die Yeast Two-Hybrid-Library Screens**

Bait-Protein	Library	Selektionsmedium
HE6-C-Terminus	BD-Matchmaker huTestis (in <i>S.cerevisiae</i> Y187, Mata), HY4035AH, Lot #1030440	SD/-LTH
HE6 dritter intrazellulärer Loop	BD-Matchmaker huTestis (in <i>S.cerevisiae</i> Y187, Mata), HY4035AH, Lot #1030440	SD/-LTH/-LTHA
mProfilin III	BD-Matchmaker mTestis (in <i>S.cerevisiae</i> Y187, Mata), S3467, Lot#3090490	SD/-LTA
mProfilin IV	BD-Matchmaker mTestis (in <i>S.cerevisiae</i> Y187, Mata), S3467, Lot#3090490	SD/-LTH/-LTA/-LTHA

#### 2.3.2.4.1 Titer-Bestimmung der cDNA-Bibliothek

Zur Bestimmung der Anzahl der eingesetzten Bibliothek-Klone wurde ein 10 µl-Aliquot der cDNA-Bibliothek in 1 ml YPDA/Kan aufgenommen (Verdünnung A mit Verdünnungsfaktor 10<sup>-2</sup>) und zusätzlich in 1 ml YPDA/Kan eine Verdünnung B mit Verdünnungsfaktor 10<sup>-4</sup> angelegt. Anschließend wurden 50 µl und 100 µl der Verdünnung B, sowie 10 µl der Verdünnung A, welche aufgrund des geringen Volumens zuvor mit 50 µl YPDA/Kan vermischt wurde, auf SD/-L ausplattiert. Nach Inkubation der Platten für 3-5 Tage bei 30°C wurden die gewachsenen Kolonien gezählt und der Titer in cfu/ml (*colony forming units/ml*) mit Hilfe folgender Formel ermittelt:

$$\text{cfu/ml} = \frac{\text{Anzahl der Kolonien} \times 1000 \mu\text{l/ml}}{\text{ausplattiertes Volumen} (\mu\text{l}) \times \text{Verdünnungsfaktor}}$$

#### 2.3.4.2 Berechnung der Mating-Effizienz und der Anzahl der Klone

Durch das Auszählen der Kolonien auf den SD/-L, SD/-T und SD/-LT Platten konnte die Mating-Effizienz und die Anzahl der getesteten Klone in einem Y2H-Library-Screen berechnet werden. Dafür wurden Platten verwendet, auf denen zwischen 30 und 300 Kolonien wuchsen. Die Berechnungen erfolgten nach den Angaben des MATCHMAKER Manuals der Firma Clontech [Clontech, 1999] mit folgender Gleichung:

$$\text{Mating - Effizienz \%} = \frac{\text{cfu/ml diploide Klone auf SD/-LT}}{\text{cfu/ml limitierender haploider Partner auf SD/-L oder SD/-T}}$$

Die Anzahl der gescreenten Klone ergibt sich durch Multiplikation der cfu/ml Diploide mit dem Resuspensionsvolumen.

### 2.3.3 Analyse und Verifizierung potentiell positiver Klone

#### 2.3.3.1 Passage der diploiden Klone auf Selektionsmedien

Die auf den Selektionsmedien gewachsenen positiven, diploiden Klone wurden zur Kontrolle auf ihre Echtheit, d.h. Transkription der beiden Reportergene *HIS3* und *ADE2*, sowie zur Etablierung des korrekten Phänotyps auf niedrig stringente (SD/-LTH, SD/-LTA) und hoch stringente Selektionsmedien (SD/-LTHA) passagiert. Dazu wurden die Kolonien mit einer sterilen Impfüse von der Original-Platte abgenommen und in je 200 µl SD/-LT resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden Ausstriche auf niedrig stringente SD/-LTA oder SD/-LTH Medium gemacht. Aus der restlichen Zellsuspension wurden Glycerol-Stocks angelegt und bei -80°C gelagert. Nach Inkubation für 4-8 Tage bei 30°C wurden die Klone vom niedrig stringente Medium auf hoch stringente SD/-LTHA-Medium passagiert. Es wurden nur diejenigen Klone weiter analysiert, die sowohl die Histidin- als auch Adenin-Auxotrophie kompensieren konnten.

### 2.3.3.2 $\beta$ -Galaktosidase-Test

Zur Verifizierung wurde zusätzlich die Transkription des dritten Reportergens, *lacZ*, überprüft. Hierfür wurde das *Yeast  $\beta$ -Galaktosidase-Assay Kit* genutzt, das die quantitative Bestimmung der *lacZ*-Reportergenaktivität und somit eine Aussage über das Maß der Interaktion zwischen *Bait* und *Prey* erlaubt. Grundlage des Assays ist die Messung der Enzymaktivität der exprimierten  $\beta$ -Galaktosidase im Hefezelleextrakt über die Spaltung des chromogenen Substrates ONPG (*o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactosid) [Guarente, 1983]. Die Spaltung von ONPG durch  $\beta$ -Galaktosidase liefert außer Galaktose das gelbe *o*-Nitrophenol als Produkt, dessen Absorption bei 420 nm gemessen werden kann. Da das ONPG-Substrat in hohem Überschuss angeboten wird, verhält sich die Menge von produziertem *o*-Nitrophenol proportional zur  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität [Miller, 1972]. Das Detektionslimit liegt bei  $\sim 3 \times 10^8$  Molekülen [Serebriiskii & Golemis, 2000].

Aus 1-2 frischen Hefekolonien und 1 ml Y-PER wurde eine Zellsuspension hergestellt und die  $OD_{600}$  ermittelt. Je 300  $\mu$ l der Hefesuspension (3 Parallelen) wurden in ein klares Reaktionsgefäß überführt, mit 300  $\mu$ l Assay-Puffer (enthält ONPG-Substrat) versetzt, durch Vortexen vermengt und die Zeitmessung gestartet. Der Ansatz wurde bei 37°C im Wasserbad inkubiert und in 15-minütigen Intervallen auf eine sichtbare Gelbfärbung überprüft. Trat in einem Zeitraum von 15 Minuten bis 6 Stunden eine sichtbare Gelbfärbung auf, so wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 240  $\mu$ l Stopp-Puffer gestoppt und die Inkubationsdauer dokumentiert. Proben, die sich in diesem Zeitraum nicht färbten wurden über Nacht inkubiert. Die Proben wurden zur Sedimentation unlöslicher Bestandteile abzentrifugiert (13000 rpm, 1 min) und die  $OD_{420}$  des Überstandes spektralphotometrisch gemessen. Als Positivkontrolle dienten diploide Klone mit [pGBKT7-53] und [pGADT7-T]. p53 und SV40 large T-Antigen zeigen sehr starke Interaktion. Als Negativreferenz wurden diploide Klone mit SV40 T-Antigen [pGADT7-T] und dem HE6 C-Terminus [pGBKT7-H21-21-1] mitgeführt, die keine Interaktion zeigten.

Die Berechnung der relativen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach folgender Formel, die die Zelldichte ( $OD_{600}$ ) und das eingesetzte Volumen der Kultur ( $V$ ) zu Beginn des Versuchs sowie die Absorption des Reaktionsproduktes *o*-Nitrophenol ( $OD_{420}$ ) und die Reaktionsdauer ( $t$ ) einkalkuliert:

$$\beta - Gal \ Units = \frac{OD_{420}}{OD_{600}} \times \frac{1000}{t_{[min]} \times V_{[ml]}}$$

### 2.3.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* mit Lyticase

Die Plasmidisolierung aus Hefen erfolgte nach Lyticase-Behandlung durch alkalische Lyse, Proteinfällung und anschließende Aufreinigung der DNA. Hierzu wurde das *NucleoSpin Plasmid-Isolierungs-Kit* (MacheryNagel) in Kombination mit rekombinanter Lyticase genutzt. Eine Hefekolonie wurde mit einer sterilen Impföse von einer SD-Platte entnommen, in 5 ml SD-Selektionsmedium resuspendiert und über Nacht bei 30°C und 250 rpm inkubiert. Die Zellen der Übernacht-Kultur wurden durch Zentrifugation (5 min, 13000 rpm, 4°C) pelletiert und in 100  $\mu$ l Puffer A1 (50 mM Tris-Cl, pH 8, 10 mM EDTA, 100  $\mu$ g/ml RNaseA) durch Vortexen resuspendiert. Der Ansatz wurde mit 10  $\mu$ l rekombinanter Lyticase (25 U/ $\mu$ l in TE, SIGMA) versetzt, durch Pipettieren vermischt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Lyticase spaltet  $\beta$ -1,3-Glucan-Verbindungen der fungalen Zellwände und bewirkt die Ausbildung so genannter „Sphaeroblasten“, also runder, angeschwollener Pilzzellen. Es wird in rekombinanter Form eingesetzt, um Kontaminationen mit DNA anderer Pilzspezies auszuschließen [Loeffler *et al.*, 1999]. Nach Inkubation wurde das Volumen des Ansatzes mit 150  $\mu$ l Puffer A1 auf 250  $\mu$ l

eingestellt und mit der Lyse sowie der DNA-Extraktion fortgefahren. Die alkalische Lyse erfolgte durch Zugabe von 250 µl Puffer A2 (0.2 M NaOH, 1% SDS) und 5 min Inkubation bei RT. Durch Zugabe von 300 µl Puffer A3 (3 M Kalium-Acetat, pH 5,5) und Zentrifugation (20 min, 13000 rpm) wurden Proteine und Zelltrümmer präzipitiert. Der DNA-haltige Überstand wurde dann wie in Kapitel 2.1.4.3 beschrieben über eine NucleoSpin-Säulen aufgereinigt. Zur Elution der DNA wurden 50 µl auf 70°C vorgewärmter AE-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8, 20 mM Na-EDTA pH 8) 5 min auf der Säule inkubiert und dann 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die isolierte Plasmid-DNA ist wegen der hohen Verunreinigung durch genomische DNA nicht für Sequenzierungen oder Restriktionsanalysen geeignet. Daher wurden 5 µl der Plasmid-DNA in *E.coli* transformiert, in diesen vermehrt und anschließend durch Mini-Präparation isoliert. Die aus *E.coli* gewonnene Plasmid-DNA ist rein genug, um sie für oben genannte Analysen zu verwenden.

#### 2.3.3.4 PCR und *AluI*-Restriktionsanalyse der Inserts

Für eine erste Analyse der potentiellen Interaktionspartner wurden die pGADT7-Inserts per PCR amplifiziert und einem analytischen *AluI*-Restriktionsverdau unterzogen. Die PCR-Reaktion erfolgte mit dem BD Advantage 2 PCR Enzym System mit den pGADT7-spezifischen Primern pACT2s und pACT2as (siehe Tabelle 2.3). 5 µl des PCR-Ansatzes wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und die Größe der PCR-Produkte ermittelt. Weitere 5 µl der PCR-Produkte wurden in einen analytischen *AluI*-Restriktionsverdau eingesetzt. *AluI* erkennt eine palindromische Sequenz aus vier Basenpaaren (AG`CT) und schneidet daher häufig (statistisch alle 256 bp). Die PCR-Fragmente wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. So konnten die Sequenz-spezifischen Muster der einzelnen Inserts miteinander verglichen und identische Library-Inserts identifiziert werden. Mehrfach vorhandene Klone wurden aussortiert und jeweils nur ein Vertreter analysiert.

#### 2.3.3.5 Identifizierung potentieller Interaktionspartner durch Sequenzierung

Die Identifizierung der potentiellen Interaktionspartner aus einem Y2H-Screen erfolgte durch Sequenzierung der isolierten pGADT7-Inserts durch die Firma MWG Biotech AG und anschließender Analyse der Sequenzen mit der „*nucleotid-nucleotid* BLAST“- Funktion (blastn) oder der „megablast“- Funktion der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

## 2.4 Protein-Protein-Interaktionsstudien

Das Y2H-System ist dafür bekannt, dass es zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann [Serebriiskii *et al.*, 2000], so dass potentielle Interaktionspartner aus einem Y2H-Screen zusätzlich mit weiteren unabhängigen Methoden auf ihre Wechselwirkung mit dem *Bait*-Protein überprüft werden müssen.

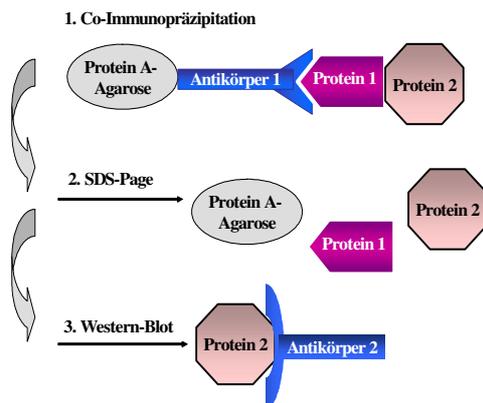
### 2.4.1 Einzelmating

Die Bestätigung möglicher Interaktionen zwischen *Bait* und *Prey* erfolgte zunächst auf Y2H-Ebene durch Einzelmatings. Diese Methode dient gezielt zum Nachweis von Interaktionen zwischen zwei Proteinen sowie zur Kartierung interagierender Domänen in den Proteinen. Zur Durchführung des Matings wurde je eine Kolonie des *Bait*-Hefestammes zusammen mit einer Kolonie des *Prey*-Hefestammes in einem 1 ml Reaktionsgefäß in 0,5 ml 2xYPDA durch Vortexen resuspendiert. Als Kontrollen auf autonome Transkriptionsaktivierung wurden Ansätze mit jeweils nur dem *Bait*-Hefestamm und nur dem *Prey*-Hefestamm angesetzt. Zur Belüftung wurden mit einer Kanüle

Löcher in den Deckel der Reaktionsgefäße gestochen und die Ansätze 20-24 h bei 30°C und 200 rpm inkubiert. In dieser Zeit kommt es zum Verschmelzen der beiden haploiden Hefestämme unterschiedlichen Mat-Typs zu einer diploiden Zelle. Am nächsten Morgen wurden die Ansätze 1 min lang stark gevortext. Von den Kontrollen wurde in 0,5xYPDA 1:100-Verdünnungen hergestellt, von den Matingansätzen 1:10- und 1:100-Verdünnungen. Jeweils 100 µl der Verdünnungen wurden auf folgende Selektionsmedien ausplattiert: SD/-L, SD/-T, SD/-LT, SD/-LTH, SD/-LTA und SD/-LTHA. Auf SD/-L können nur Klone mit dem *Prey* wachsen, auf SD/-T nur Klone mit dem *Bait* und auf SD/-LT diploide Klone mit *Bait* und *Prey*. Diploide Klone, bei denen *Bait* und *Prey* interagieren, zeichnen sich durch Wachstum auf den Dreifach- und Vierfach-Selektionsmedien (SD/-LTH, SD/-LTA und SD/-LTHA) aus. Nach 3-5 Tagen Inkubation bei 30°C wurde das Wachstum durch Zählen der Kolonien kontrolliert und die Mating-Effizienz berechnet.

### 2.4.2 Protein-Protein-Co-Immunopräzipitation

Die Co-Immunopräzipitation (Co-IP) wurde als alternativer Nachweis für Protein-Interaktionen eingesetzt. Die Methode beruht auf der Immunopräzipitation eines Proteins mit einem spezifischen Antikörper über die Bindung an Protein A-Agarose. Proteine, die mit dem präzipitierten Protein interagieren, werden co-präzipitiert und können anschließend in einem Western-Blot immunologisch detektiert werden. Abbildung 2.3 veranschaulicht das Prinzip der Co-Immunopräzipitation.



**Abbildung 2.3: Prinzip der Co-Immunopräzipitation**

1. Im ersten Schritt werden interagierende Proteine über den Antikörper 1, der spezifisch gegen das Epitop von Protein 1 gerichtet ist, an Protein A Agarose gebunden und co-immunopräzipitiert. 2. Durch Denaturieren werden die Proteine anschließend wieder von der Agarose-A getrennt, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. 3. Im Western-Blot werden interagierende Proteine dann mittels eines Antikörpers 2, der spezifisch gegen das co-immunopräzipitierte Protein 2 ist, immunologisch identifiziert/analysiert.

Für die Co-IP wurden Reticulozytenlysate mit *in vitro* translatierten Proteinen mit *c-myc-Tag* (*Bait*-Protein) und *HA-Tag* (*Prey*-Protein) verwendet. Um eine Proteininteraktion zu ermöglichen wurden 25 µl *in vitro* translatiertes *Bait*-Protein und 25 µl *Prey*-Protein zusammengefügt, vorsichtig vermennt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 3 µl eines gegen das *Bait*-Protein gerichteten *c-myc*-Antikörpers (BD Biosciences) zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur auf einer Schwenkplatte wurde 200 µl Protein A-Agarose in PBS zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 4°C auf einem Rotarimischer inkubiert. Der Antikörper bindet sowohl an sein spezifisches Epitop als auch an die Protein A-Agarose und bildet so einen Komplex, der am nächsten Tag durch 10 sek Zentrifugation bei 4°C und 7000 rpm sedimentiert werden konnte. Der Überstand wurde verworfen und das Agarose-Präzipitat dreimal mit je 500 µl Co-IP-Puffer gewaschen. Das Präzipitat wurde bei jedem Waschgang 5 min bei Raumtemperatur in Co-IP-Puffer geschwenkt und anschließend durch Zentrifugation (10 sek, 4°C, 7000 rpm) pelletiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Agarose-Präzipitat in 100 µl 1x Crash-DTT-Puffer resuspendiert, 5 min bei 90°C denaturiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde verwahrt und diente in einem anschließenden Western Blot mit HA-Antikörper, der gegen das *Prey*-Protein

gerichtet ist, dem Nachweis einer Interaktion. Dabei wurde eine immunologisch detektierbare Bande des *Prey*-Proteins im Überstand als positives Ergebnis für Protein-Protein-Interaktion gewertet. Dazu wurden jeweils 25 µl des Überstandes zur Analyse eingesetzt.

Tabelle 2.35: Co-IP-Puffer

Reagenz	Menge	f.c.
Tris-HCl, 1M, pH 8.0	5 ml	50 mM
NaCl, 1M	10 ml	100 mM
EDTA, 0,5M	200 µl	1 mM
NP-40, 10%	5 ml	0,5 %
ddH <sub>2</sub> O	ad 100 ml	-
Direkt vor Gebrauch wurde pro 10 ml eine Tablette Protease-Inhibitoren (Complete EDTA-free) zugegeben		

Tabelle 2.36: 1xCrash-DTT-Puffer

Reagenz	f.c.
Tris-HCl, pH 6,8	40 mM
SDS	2%
DTT	100 mM
EDTA	1 mM
Glycerol	8 %

### 2.4.3 Poly-L-Prolin-Affinitätschromatographie

Die Wechselwirkung von Profilin mit Poly-L-Prolin (PLP) wird standardmäßig für die Aufreinigung von Profilinen mittels Affinitätschromatographie genutzt [Lindberg *et al.*, 1988; Tanaka & Shibata, 1985]. Hier wurde die Poly-L-Prolin-Affinitätschromatographie zur Charakterisierung der Profilin-Interaktion mit Poly-L-Prolin verwendet. In *E.coli* rekombinant exprimiertes Profilin wurde dazu auf eine Poly-L-Prolin-Säule aufgetragen und das Bindungsverhalten durch Harnstoff-Elution und anschließende Western-Blot-Analyse der Eluate analysiert.

Die Charakterisierung der Profileine hinsichtlich ihrer Polyprolinbindung über eine Poly-L-Prolin-Säule erfolgte am Zoologischen Institut in der Abteilung Zellbiologie bei Dr. Martin Rothkegel an der Technischen Universität Braunschweig Carolo Wilhelmina. Die Poly-L-Prolin-Säule, Cyanbromid-aktivierte Sepharose CL-4B (Pharmacia) an die kovalent 250 mg Poly-L-Prolin (Sigma) gekoppelt war, wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Für das Experiment wurden die Profileine III und IV zunächst in den Expressionsvektor pET28a(+) kloniert, in *E.coli* rekombinant exprimiert.

#### 2.4.3.1 Expression von rekombinantem Profilin III und IV

Die rekombinante Expression der Maus Profileine III und IV erfolgte im pET-Expressionssystem durch IPTG-Induktion in BL21(DE3)pLys-Zellen. Die ORFs von Profilin 3 (NM\_029303) und PFN IV (NM\_028376) wurden durch Restriktionsverdau mit NdeI und XhoI aus den Hefevektoren pGBKT7 ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pET28a(+) kloniert (pET28a-mPFN4, pET28a-mPFN3). Die Klonierung der Sequenzen erfolgte mit dem Stopp-Codon in die MCS, so dass der vom Vektor codierte C-terminale His-tag nicht als Fusionsprotein exprimiert wurde. Die Plasmidkonstrukte wurden in BL21(De3)pLys-Zellen transformiert.

Für die Expression wurden 50 ml 2x YT/Kanamycin mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Diese Vorkultur wurde 1:50 in 2x YT/Kan verdünnt (2-mal je 1 l Medium + 20 ml Vorkultur) und im Schüttelinkubator bei 37° C und 220 rpm bis zu einer OD bei 600 nm von 0,5 angezogen. Durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) wurde die Expression induziert und für 4 h bei 42°C fortgeführt. Zur Analyse der Proteinexpression wurden jeweils vor und 4 h nach IPTG-Induktion 50 µl der Kulturen entnommen und je 10 µl in eine SDS-PAGE- und Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Expressionskulturen wurden in 500 ml-Aliquots bei 6000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert und jedes Zellpellet in 25 ml kaltem (4°C) Lysispuffer aufgenommen (siehe Tabelle 2.37). Nach Zugabe einer Spatelspitze Lysozym und Inkubation für 20 min auf Eis wurden die Zellsuspensionen bei -80°C eingefroren. Am nächsten

Morgen wurden die Zellsuspensionen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend auf Eis überführt. Durch Ultraschall-Behandlung (10 x 30 sek 80W mit je 30 sek Pause im Eiswasserbad) erfolgte der Aufschluss der Bakterien und die Freisetzung exprimierter Proteine. Größere Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation für 50 min bei 14000 rpm und 4°C sedimentiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

#### 2.4.3.2 Analyse der Poly-L-Prolin Bindung mittels einer Poly-L-Prolin-Säule

Vor dem Aufbringen auf die Säule wurde dem Lysat eine Probe für spätere SDS-PAGE-Analyse entnommen. Die Poly-L-Prolin-Affinitätssäule wurde mit 5-10 Säulenvolumen Waschpuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl) äquilibriert (Peristaltikpumpe, Flussrate ca. 1 ml/Minute). Das Profilin-Lysat wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 40 ml/h auf eine Poly-L-Prolin-Sepharose-Säule aufgetragen und der Durchfluss aufgefangen. Im Anschluss wurde die Säule mit Waschpuffer mit einer Fließgeschwindigkeit von 50 ml/h gewaschen, bis die Überprüfung der Fraktionen durch Messung der OD bei 280 nm ergab, dass kein Protein mehr abgelöst wurde ( $OD_{280nm} = 0,01$ ). Unspezifisch gebundene Proteine wurden 1 h (50 ml/h) mit 2 M Harnstoff in Waschpuffer von der Säule entfernt. Der Durchfluss wurde in Fraktionen von 2 ml aufgefangen. Zur Analyse der Bindungseigenschaften erfolgte die Elution evtl. gebundener Profiline zunächst mit 4 M Harnstoff (Elutionspuffer I) und anschließend mit 8 M Harnstoff (Elutionspuffer II) für je 2 Stunden mit einer Fließgeschwindigkeit von 40 ml/h. Das Eluat wurde ebenfalls fraktioniert aufgefangen. Die Poly-L-Prolin-Säule wurde nach der Elution zur Reinigung gründlich mit 8 M Harnstoff gewaschen. Die Zusammensetzungen der Wasch- und Elutionspuffer sind in Tabelle 2.37 aufgelistet.

**Tabelle 2.37: Lysis-, Wasch- und Elutionspuffer für die Poly-L-Prolin-Affinitätschromatographie; Der pH-Wert aller Puffer wurde auf pH 7,6 eingestellt**

Lysispuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer I	Elutionspuffer II
50 mM Tris-HCl	20 mM Tris-HCl	20 mM Tris-HCl	20 mM Tris-HCl
10 mM EDTA	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl
10 mM NaCl	-	4 M Urea	8 M Urea
1,5 % (v/v) Triton X-100			
1:1000 Trasylol (Bayer)			
1 µM Pepstatin A			
50 µm Pefabloc SC			

Die Analyse des Profilin-Bindungsverhaltens an Poly-L-Prolin erfolgte mittels SDS-PAGE-Analyse und Western Blot. Eingesetzt wurden jeweils 30 µl des Lysats vor und nach der Säule, der Waschfraktionen sowie der Eluatfraktionen.

## 2.5 Material und Reagenzien

### 2.5.1 Puffer und Lösungen

Alle Reagenzien für Puffer und Lösungen wurden den Erfordernissen entsprechend in bidestilliertem Wasser gelöst und nach Bedarf autoklaviert oder sterilfiltriert.

PBS:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,4
PBS + Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> :	PBS + 1 mM CaCl <sub>2</sub> und 0,5 mM MgCl <sub>2</sub>
TBS:	10 mM Tris-HCl pH 7,5, 137 mM NaCl
TBS-T:	10 mM Tris-HCl pH 7,5, 137 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween20
1 x TAE:	40 mM Tris-HCl, 0,1 % (v/v) Essigsäure, 10 mM EDTA
TE-Puffer:	20 mM Tris/HCl pH 8, 20 mM Na-EDTA pH 8
20 x SSC:	0,3 M Natriumcitrat, 3M NaCl, pH 7
DNA-Ladepuffer:	10 % (v/v) Glycerin, 250 µg/ml Bromphenolblau, 250 µg/ml Xylencyanol
SDS-Laufpuffer:	25 mM Tris-Base, 190 mM Glycin, 0,1 % w/v SDS
Protein-Probenpuffer:	1M Tris-HCl, 20 % SDS, 1 M DTT, 0,5 M EDTA, 87% Glycerol, Bromphenolblau
Semi-Dry-Blotpuffer:	48 mM Tris-HCl, 39 mM Glycin, 20 % (v/v) MeOH

### 2.5.2 Reaktions-Kits

<i>Alkaline Phosphatase Substrate Kit IV</i> , BCIP/NBT	Vector Laboratories, Barlingame, USA
<i>β-Galactosidase Assay Kit</i>	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
<i>ECL Plus Western Blotting Detection Reagent</i>	Amersham, München, Deutschland
<i>High Pure PCR-Product Purification Kit</i>	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
JETstar2.0 Plasmid Miniprep Kit	GENOMED GmbH, Löhne, Deutschland
<i>Nucleospin Plasmid Purification Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
<i>pGEM-TEasy Vector System Kit I</i>	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
<i>QIAquick™ Gel Extraction Kit (50)</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
TaKaRa Ex-Taq Hot Start Version	TaKaRa Biomedicals, USA
<i>TnT@Quick Coupled Transcription/Translation System</i> , Promega GmbH, Mannheim, Deutschland	

### 2.5.3 Enzyme

Advantage™ 2 Polymerase Mix,	Clontech/TAKARA Bio company, USA
Alkalische Phosphatase, Calf Intestinal	New England Biolabs, USA
Biotherm Taq-DNA Polymerase	GeneCraft, Lüdinghausen Germany
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega, Madison, USA
<i>RedTaq</i> DNA-Polymerase,	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, USA
SYBR Premix Ex-Taq	TaKaRa Biomedicals, Japan
T4-DNA Ligase	Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland
ExTaq Hot Start Polymerase	TaKaRa Biomedicals, Japan

### 2.5.4 Molekulargewichtsmarker

#### 2.5.4.1 Protein-Marker

<i>Benchmark Prestained Protein Ladder</i> , 6-180 kDa	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>Rainbow™ coloured protein marker</i> , 2,3-46 kDa,	GE Healthcare, Deutschland
<i>SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard</i> (3-188 kDa)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

#### 2.5.4.2 DNA-Marker

1kb DNA ladder,	GeneCraft, Lüdinghausen, Germany
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
100bp DNA ladder	GeneCraft, Lüdinghausen, Germany
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder,	MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland

### 2.5.5 Software

<i>Leica Confocal Software</i> (LCS), Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
LightCycler™ Quantifizierungs-Software ( <a href="https://www.roche-applied-science.com">https://www.roche-applied-science.com</a> )
Primer 3 (Rozen & Skaletsky, 2000, <a href="http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3-www.cgi_">http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3-www.cgi_</a> )
REST-Software (Pfaffl <i>et al.</i> , 2002, <a href="http://www.gene-quantification.de/rest.html">http://www.gene-quantification.de/rest.html</a> )
STORM™860-Steuerungs-Software: Scanner Control, Version 5.0 (Molecular Dynamics)
STORM™860-Bildbearbeitungs-Software: Image Quant, Version 5.0 (Molecular Dynamics)
DNASTAR Software 4.00 (DNASTAR Inc., Madison, USA)

## 2.5.6 Chemikalienliste

Alle im Folgenden nicht gesondert aufgeführten Reagenzien wurden im höchstmöglichen Reinheitsgrad bzw. als für die Molekularbiologie geeignet von den Firmen Applichem (Darmstadt), Fluka (Buchs, CH), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Sigma (Deisenhofen) und Serva (Heidelberg) bezogen. Für die Herstellung von Lösungen wurde Wasser von einer Reinstwasseranlage von Seradest bezogen.

3-Amino-1,2,4-triazole (3AT), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 4',6-Diaminodino-2-phenylindol (DAPI), Merck, Darmstadt, Deutschland  
 Aceton, Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spanien  
 Acrylamidlösung (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid, 37,5:1) rotiphorese® Gel 30, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland  
 Agar-Agar, Difco, USA  
 Agarose *Electrophoresis Grade*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Ampicillin (D[-]- $\alpha$ -aminobenzylpenicillin), Sigma Chemicals Co., St.Louis, USA  
 APS, National Diagnostics, Hesse Hull, Großbritannien  
 Brilliant Blue für Coomassie-Färbung, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Bromphenolblau, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 BSA (*Bovine Serum Albumin*), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Calciumchlorid, J.C. Baker, Deventer, Holland  
 Citronensäure, Janssen Chemica Geel, Belgien  
 Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland  
 D(+)-Glucose, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Dalton Mark VII-L, Molekulargewichtsmarker, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Deoxyribonucleic acid sodium salt Typ III from Salmon Testes (Carrier-DNA), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Deoxyribonucleotid-Mix, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Digoxigenin-11-dUTP, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland  
 Dithiothreitol, Serva Feinbiochemika GmbH & Co, Heidelberg, Deutschland  
 DMSO, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 dNTP Mix (10 mM *solution, PCR Reagent*), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Dropout-Supplements (für Hefemedien), BD Bioscience/Clontech, USA  
 ECL plus Western Blotting Reagenz, GE Healthcare München, Deutschland  
 ECL Blocking Agent (dried milk powder), GE Healthcare, München, Deutschland  
 EDTA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Essigsäure, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland  
 Ethanol absolut, J.T. Baker, Deventer, Niederlande  
 Ethanol vergällt, Th. Geyer, Hamburg, Germany  
 Ethidiumbromid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Fluoromount G, Southern Biotech, Birmingham, USA  
 Formamid, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland  
 Glycerin, Merck, Darmstadt, Deutschland  
 Glycin, Merck, Darmstadt, Deutschland  
 HCl, Merck, Darmstadt, Deutschland  
 Isopropanol, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland  
 Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid (IPTG), Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland  
 Kaliumchlorid, Merck, Darmstadt, Deutschland  
 Kanamycin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 LAB-Agar (Lennox Agar), GIBCO BRL, Paisley, Scotland  
 LB Komplexmedium LB Broth, Lennox, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland  
 Lektin PNA AlexaFluor®568 Konjugat, Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland  
 Lithium-Acetat, Dihydrate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Lyticase, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Magermilchpulver, Oxoid, Basingstoke, England  
 MEM (*Minimal Essential Medium*, ohne L-Glutamin) GIBCO BRL, Paisley, Scotland  
 Natriumchlorid, Merck, Darmstadt, Deutschland  
 Na-EDTA, Serva, Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Heidelberg, Deutschland  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O, Merck, Darmstadt, Deutschland  
 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>Natriumchlorid, Merck, Darmstadt, Deutschland  
 Natriumhydroxid, Merck, Darmstadt, Deutschland  
 NH<sub>4</sub>OH, Merck, Darmstadt, Deutschland  
 NH<sub>2</sub>PO, Merck, Darmstadt, Deutschland  
 Ni-NTA-Agarose, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland  
 Normal Goat Serum, Vector Laboratories, Burlingame, USA

NuPage® Novex Bis-Tris Gele, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland  
 NuPAGE MES SDS-running Buffer (20x), Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland  
 NuPAGE Transfer Buffer (20x), Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland  
 Paraformaldehyd, Merck, Darmstadt, Deutschland  
 Polyacrylamid, Serva, Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Heidelberg, Deutschland  
 Ployethylenglycol (PEG), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Protein A-Agarose, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland  
 Protein G-Agarose, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland  
 Protein-Assay Farbstoff-Konzentrat, BioRad, Deutschland  
 Rinderserum Albumin, BSA, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland  
 RNAPure, PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland  
 RNALater, Ambion, USA  
 RNase A, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland  
 Roti solv HPLC Grade Wasser, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland  
 SDS, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland  
 Sucrose, Merck, Darmstadt, Deutschland  
 SYBR Green I (nucleic acid gel stain 10 000 x DMSO), Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland  
 TEMED, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 TO-PRO®-3-Iodid, Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland  
 Tri-Chloressigsäure, Fluka chemie AG, Buchs, Schweiz  
 Tricine, Serva, Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Heidelberg, Deutschland  
 Tris, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Tris-HCl, Promega GmbH, Mannheim, Deutschland  
 TritonX-100, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deu  
 Tween 20, Calbiochem, Darmstadt, Deutschland  
 Wasser, Molecular Biology Grade, Eppendorf, Hamburg, Deutschland  
 Wasserstoffperoxid, Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spanien  
 Western Blocking-Reagent (Casein), Boehringer Mannheim./Roche, Mannheim, Deutschland  
 Yeast Nitrogen Base (without amino acids), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 YPD-Medium, Clontech / BD Biosciences, USA  
 Y-PER® Yeast Protein Extraction Reagent, Pierce Biotechnology, Rockford, USA

### 2.5.7 Verbrauchsmaterial

Nicht gesondert aufgeführte Verbrauchsmaterialien, wurden von den Firmen Biozym (Hess. Oldendorf), Nunc (Kamstrup, Dänemark), Greiner (Nürtingen) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

Cytofunnel-Kammern, Shandon/Thermo Electron Corporation, Waltham, USA  
 Deckgläser, Menzel-Gläser, Deutschland  
 Einmal-Impfösen, steril, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland  
 Einmal-Küvetten, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland  
 Einmal-Pipetten, Becton Dickinson  
 Falcon-Röhrchen, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland  
 Filterpapier/Chromatographie-Papier 3mm, Whatman, Maidstone, England  
 Kimwipes® Lite, Kimberly-Clark  
 Light Cycler™ Kapillaren, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland  
 PCR-Tubes, Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland  
 Petrischalen, VWR, Darmstadt, Deutschland  
 Pipettenspitzen, Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland  
 Protan nitrocellulose Transfer Membran, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland  
 PVDF Western Blotting Membran, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland  
 Objektträger, Menzel-Gläser, Deutschland  
 Reaktionsgefäße, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland  
 Spitzenaufsatzfilter Minisart 0,2 µm / 0,45 µm, Sartorius  
 Vakuumfilter-System, 0,2 µm Filter, Corning Inc.

### 2.5.7 Geräte

Dampfsterilisator Varioklav, H&P Labortechnik, Oberschließheim, Deutschland  
 Feinwaage 1615 MP, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland  
 Fluoroimager-Scanner *STORM™ 860*, Molecular Diagnostics  
 Gel-Dokumentationsanlage *Imago Compact Imaging System*, B&L Systems  
 Heizrührer *Ikamag®RH*, Janke&Kunke, IKA®-Werke GmbH, Staufen, Deutschland  
 Heizrührer *MR3001*, Heidolph, Schwabach, Deutschland

Hellfeld-Mikroskop, Nikon, Düsseldorf, Deutschland  
Homogenisator *Art-Micra D8* (UltraTurrax), Art Labortechnik, Mühlheim  
Horizontale DNA-Gelkammern *Easy-Cast Electrophoresis System*, Peqlab  
Inkubator für Bakterien (37°C), Hereaus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland  
Inkubator für Hefen (30°C), Hereaus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland  
Konfokales Lasermikroskop *TCS SL*, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland  
Kühlzentrifuge *Centrifuge 5415 R*, Eppendorf, Hamburg, Deutschland  
Kühlzentrifuge *Megafuge 2.0 R*, Hereaus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland  
Leica DC 300 Digitalkamer, Leitz, Bensheim, Deutschland  
*Light Cycler*<sup>TM</sup> 3, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland  
Mikro-Dismembrator U, B. Braun Biotech International, Deutschland  
Mixer VF2 *Ultra Turrax*<sup>TM</sup>, Janke&Kunke, IKA®-Werke GmbH, Staufen, Deutschland  
Netzteil *Standard Power Pack P25*, Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland  
Netzteil *Electrophoresis Power Supply EPS 600*, Pharmacia Biotech, Wien, Österreich  
PCR-Gerät *PTC-200 Peltier Thermal Cycler*, MJ Research, Waltham, USA  
pH-Meter *pH526*, WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland  
Photometer *Ultrospec 3000* (UV/Visible Spectrophotometer), Pharmacia Biotech  
Protein-Gelkammer *XCell Sure Lock*<sup>TM</sup> *Mini Cell*, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland  
Reine Werkbank *Hera Safe*, Hereaus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland  
Rotarischer, Rotberg Laborbedarf, Göttingen, Deutschland  
Schüttelwasserbad, GFL-Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland  
Semi-Dry-Blotter *Pegasus Modell S*, Phase GmbH, Lübeck, Deutschland  
Standard Power Pack P25, Biometra  
Thermoblock *Thermostat plus*, Eppendorf, Hamburg, Deutschland  
Thermodrucker DPU-411 für Photometer, GE Healthcare, München, Deutschland  
Thermomixer *Thermomixer compact*, Eppendorf, Hamburg, Deutschland  
Tischautoklav *Tuttnauer 2540EL*, Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland  
Tischzentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland  
Tischzentrifuge *Biofuge pico*, Hereaus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland  
Ultraschallgerät/Sonifier *Cell Disrupter B-12*, Branson Sonic Power Company  
UV-Durchlichttisch *Transilluminator*, UVP-Ultra-Violet\_Products Ltd, Cambridge, England  
Wipptisch *Rocking Platform*, Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland  
XCell II Blot-Module, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland  
Zentrifuge Megafuge 2.0R, Hereaus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland  
Zytozentrifuge *Cytospin3*, Shandon/Thermo Electron Corporation, Waltham, USA

## III Ergebnisse

### 3.1 Molekulare Untersuchungen zur Funktion des HE6-Rezeptors im Nebenhoden der Säuger

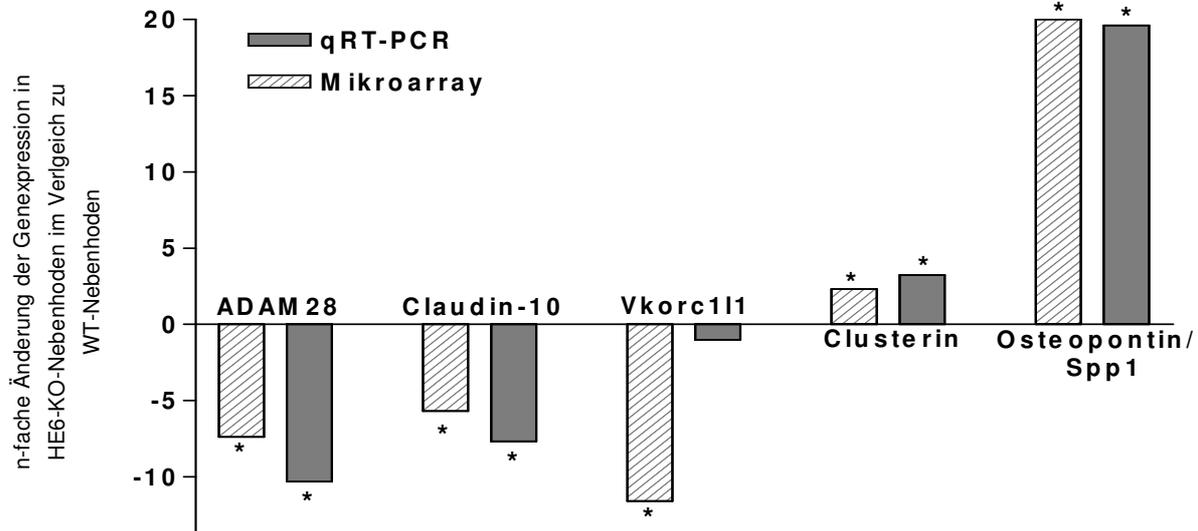
Um Hinweise auf die molekulare Funktion des HE6-Rezeptors sowie auf den beteiligten Signaltransduktionsweg zu erhalten, wurden die Genexpressionsmuster des Nebenhodenkopfes von Wildtyp- und HE6-KO-Mäusen mittels Mikroarray-Technik und differentiellem Screening miteinander verglichen [Davies *et al.*, 2007]. Die Ergebnisse zeigten, dass der konstitutive Knockout des HE6-Endoproteins, durch den eine mögliche Signaltransduktion des HE6-Rezeptors unterbunden wird, ein deutlich verändertes Genexpressionsmuster im proximalen Nebenhoden, dem Hauptexpressionsort des HE6-Rezeptors, zur Folge hat. Während die Mehrheit der Gene in ihrer Expression nicht verändert war, konnte für 26 Nebenhoden-exprimierte Transkripte ein drastischer Rückgang und für zehn Gene eine signifikante Erhöhung der mRNA-Menge im HE6-KO-Nebenhoden beobachtet werden. Die Liste der vermindert exprimierten Gene umfasst sowohl bekannte als auch neue uncharakterisierte Nebenhodenkopf-spezifisch exprimierte Gene wie Adam28, Vkor111, Claudin-10, Cystatin 8 + 12,  $\beta$ -Defensin Defb42, Lipocalin 8 + 9, das Transportprotein EAAC1 sowie ME9, ein neuartiges Membranprotein des Nebenhodens. Zu den verstärkt exprimierten Genen zählen unter anderem Clusterin/ApoJ und Osteopontin/Spp1.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine Validierung funktionell interessanter Gene im Vergleich zwischen HE6-KO und WT durch quantitative RT-PCR. Weiterhin erfolgte die Analyse der Lokalisation der durch HE6-KO beeinflussten Me9-mRNA durch *in situ*-Hybridisierung. Die erzielten Ergebnisse wurden bereits in Davies *et al.* (2007) veröffentlicht.

#### 3.1.1 Validierung ausgewählter Gene in der HE6-KO-Maus durch quantitative RT-PCR

Zur Validierung wurden Gene ausgewählt, die durch den HE6-KO-Nebenhoden signifikant beeinflusst wurden und wie HE6 überwiegend bzw. spezifisch im Nebenhodenkopf exprimiert werden. Dies waren Adam28, Claudin-10, Vkor111, Clusterin/ApoJ und Osteopontin/Spp1. Die Validierung der Mikroarray-Ergebnisse erfolgte durch quantitative RT-PCR. Für die Reaktionen wurden spezifische, möglichst Intron-überspannende Primer verwendet (siehe Tabelle 2.8), wobei anzumerken ist, dass mit den Claudin-10-Primern nicht zwischen den beiden Isoformen a und b diskriminiert wurde. Die relative Quantifizierung wurde anhand von WT- und HE6-KO-Nebenhoden cDNAs unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Für eine Normalisierung der mRNA-Expression wurde das ribosomale Gen RPS27a herangezogen. Zur Berechnung der Expressionsunterschiede zwischen Wildtyp und HE6-KO wurde die REST©-Software [Pfaffl *et al.*, 2002] verwendet. In Abbildung 3.1 sind die ausgewählten Gene sowie ihre n-fache Änderung der Genexpression im HE6-KO-Nebenhoden als Verhältnis zum WT-Nebenhoden gezeigt. Dabei wurden die Ergebnisse aus der Mikroarray- und der RT-PCR-Analyse graphisch und tabellarisch nebeneinander dargestellt. Mit Ausnahme von Vkor111 zeigten alle Gene in der RT-PCR eine Expressionsänderung, die gut mit den Ergebnissen aus der Mikroarray-Analyse korrelierte. Für ADAM28 und Claudin-10 konnte analog zur Mikroarray-Analyse eine signifikante Minderung der mRNA-Mengen im HE6-KO-Nebenhoden ermittelt werden. Die qRT-PCR-Ergebnisse fielen mit einer n-fachen Expressionsänderung von -10,34 für ADAM28 und -7,68 für Claudin-10 sogar noch drastischer aus als die Mikroarray-Daten (-7,4 bzw. -5,7). Für Vkor111, das den Mikroarray-

Ergebnissen zufolge am stärksten herabreguliert sein sollte (-11,6-fach), konnte in der qRT-PCR dagegen keine signifikante Expressionsänderung zwischen WT und HE6-KO detektiert werden. Eine Beeinflussung durch den HE6-KO ließ sich also nicht bestätigen. Für die verstärkt exprimierte Gene Clusterin und Osteopontin/Spp1 zeigte sich wiederum eine recht gute Übereinstimmung zwischen Mikroarray-Daten und RT-PCR-Analyse. Beide Gene wiesen mit einer signifikanten Zunahme von 3,2 für Clusterin und 19,59 für Spp1 zwischen WT und HE6-KO annähernd gleiche Expressionsunterschiede wie in der Mikroarray-Analyse auf.



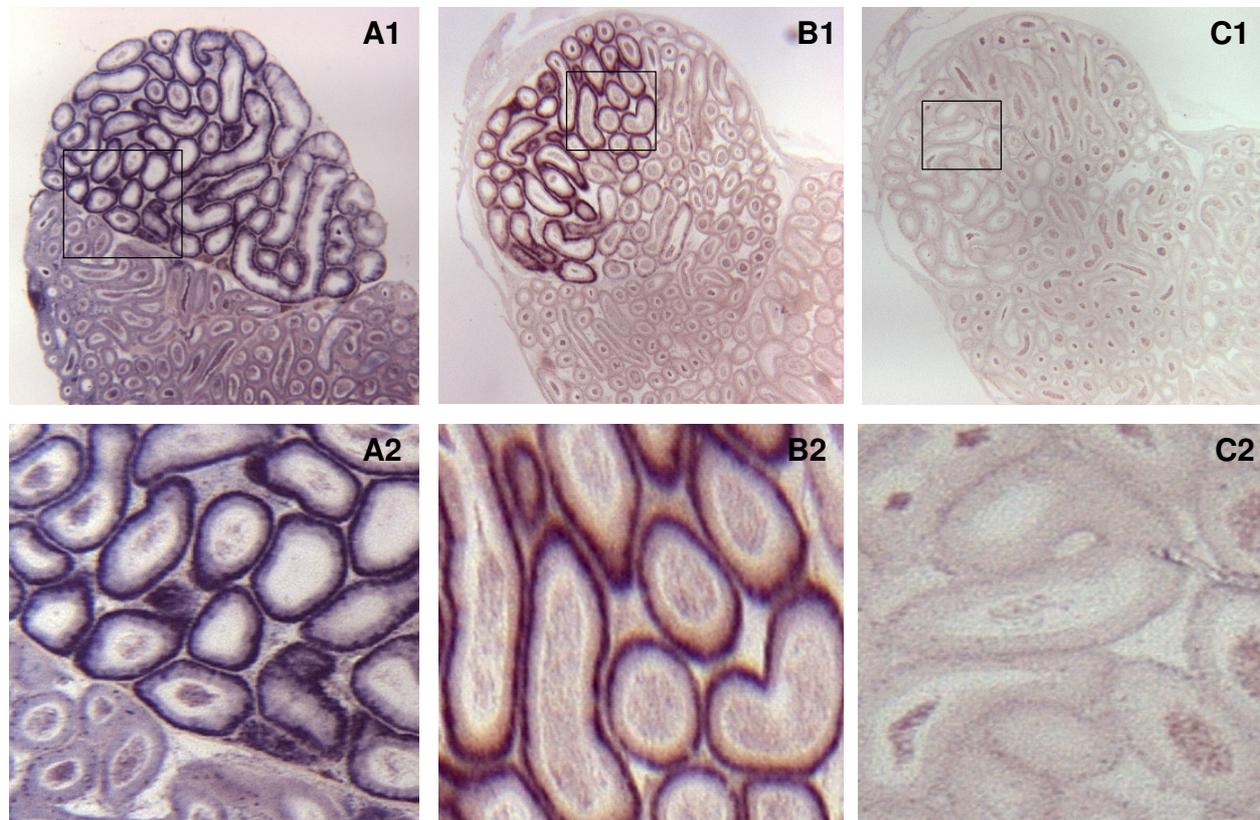
Methode	n-fache Änderung der Genexpression im HE6-KO-NH im Vergleich zu WT-NH				
	Adam 28 (NM_010082)	Claudin-10 (NM_021386)	Vkorc111 (NM_027121)	Clusterin (NM_013492)	Osteopontin/Spp1 (NM_009263)
Mikroarray	- 7,4	- 5,7	- 11,6	+ 2,3	+ 20,3
qRT-PCR	- 10,34	- 7,68	- 1,027	+ 3,22	+ 19,59
p-Wert (RT-PCR)	0,001	0,001	0,789	0,001	0,001

**Abb. 3.1: qRT-PCR-Validierung ausgewählter Gene, die in HE6-KO-Nebenhoden vermindert- bzw. verstärkt exprimiert sind.** Dargestellt sind die n-fachen Expressionsänderungen der Gene in HE6-KO-Nebenhoden im Vergleich zu WT-Nebenhoden, die aus dem Mikroarray-Experiment aus Davies *et al.* (2007) und den qRT-PCRs erhalten wurden. \* markieren signifikante Expressionsunterschiede, NH: Nebenhoden.

### 3.1.2 *In situ* Transkript-Hybridisierung zur zellulären Lokalisation der Me9-mRNA im Nebenhoden

Die Beeinflussung der Me9-mRNA durch die gezielte Mutation des HE6-Rezeptors [Davies *et al.*, 2007] legt eine direkte Beziehung der Genprodukte nahe, weshalb eine mögliche Co-Expression im Nebenhoden untersucht werden sollte. Durch RNA-*in situ*-Hybridisierung wurde das räumliche Expressionsmuster sowie die zelluläre Lokalisation der Me9-Transkripte im Nebenhoden der Maus analysiert. Zur spezifischen Detektion des epididymalen Gentranskripts Me9 (NM\_178243) wurden DIG-markierte *antisense*- und *sense*-Sonden verwendet, die aus der gleichen ORF-Sequenz des Transkripts synthetisiert wurden. In Abbildung 3.2 sind die Ergebnisse der Me9-RNA-*in situ*-Hybridisierungen im Maus Nebenhoden dargestellt. Sie zeigten ein räumliches Expressionsmuster, das mit dem von HE6 [Osterhoff *et al.*, 1997] identisch ist. Die *antisense*-Sonde hybridisierte stark im proximalen Bereich des Nebenhodenkopfes, dem so genannten Initialsegment (siehe Abb. 3.2 A1 und B1). Distale Bereiche des Nebenhodens (Corpus und Cauda epididymidis) hingegen zeigten keine Hybridisierungssignale. Bei näherer Betrachtung der markierten Ductuli (Abb. 3.2 A2 + B2) war zu erkennen, dass das Me9-Transkript im basalen Bereich des Nebenhodenepithels unterhalb der Zellkerne lokalisiert ist. Hier liegt die Hauptmasse des rauen ER, an dem die Proteinsynthese stattfindet. Auch die HE6-mRNA ist hier lokalisiert, während das Proteinprodukt

in apikalen Bereichen des Epithels liegt. Hybridisierungen mit der Me9-*sense*-Sonde (Negativkontrolle, Abb. 3.2 C1 + C2) zeigten keine Markierungen im Nebenhoden der Maus. Die Co-Lokalisation von ME9 und HE6 im proximalen Nebenhoden könnte bedeuten, dass Mitglieder der Me9-Proteinfamilie mit HE6 assoziiert sind und eventuell co-reguliert sind oder sogar mit dem Rezeptor interagieren.



**Abb. 3.2:** RNA-*in situ*-Hybridisierung mit DIG-markierten *antisense* (A1/A2 + B1/B2)- und *sense* (C1/C2)-Me9-Sonden zur Lokalisation des Me9-Transkriptes im proximalen Caput epididymis der Maus. (A1 + B1): *antisense*-Hybridisierung zeigt eine Lokalisation des Me9-Transkriptes im proximalen Caput epididymis, jedoch nicht in distalen Bereichen des Nebenhodens; (A2 + B2): die vergrößerte Darstellung der in A1 und B1 markierten Bereiche zeigt eine Lokalisation vor allem im basalen Bereich des Epithels (C1 + C2): Kontrollen mit der *sense*-Sonde zeigten keine Markierung dieser Bereiche.

### 3.2 Screening einer *Yeast Two-Hybrid*-Bibliothek zur Detektion von intrazellulären HE6/GPR64-Interaktionspartnern

Auf Proteinebene sind bisher keine Wechselwirkungen des HE6-Rezeptors mit anderen Proteinen (G-Proteine oder Agonisten/Antagonisten) bekannt. Auch werden keine Domänen für HE6 vorhergesagt, die Rückschlüsse auf mögliche Interaktionen mit einer bestimmten Proteingruppe erlauben. Lediglich die subzelluläre Lokalisation des Rezeptors im apikalen Bereich der Epithelzellen und die Co-Lokalisation mit F-Aktin-haltigen Stereozilien/Mikrovilli und dem subapikalen Aktin-Zytoskelett, legen die Vermutung nahe, dass HE6 mit Komponenten des epithelialen Zytoskeletts interagieren könnte. In vielen Geweben modulieren G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die Organisation des Aktin-Zytoskeletts auf bisher noch nicht verstandene Art und Weise [Li *et al.*, 2000, Laroche *et al.*, 2005; Burgueno *et al.*, 2003].

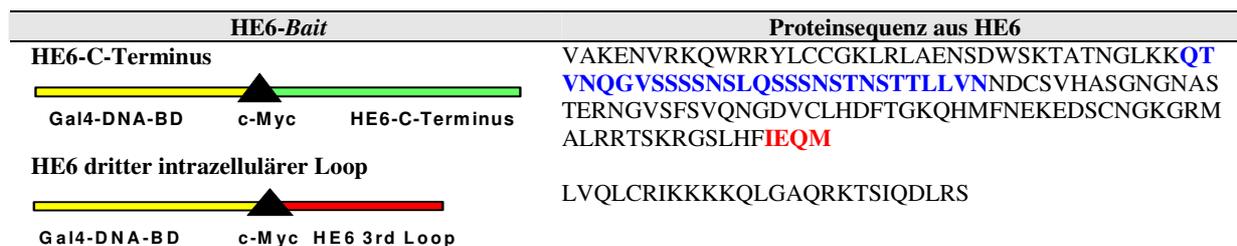
Zur Identifizierung möglicher intrazellulärer Protein-Bindungspartner des HE6-Rezeptors, wurde das *Yeast Two-Hybrid* System gewählt. Eine Co-Immunopräzipitation des schwer löslichen und zur Multimerisierung neigenden Rezeptorproteins kam dagegen nicht in Frage. Verwendet wurde das

*Gal4 Matchmaker Two-Hybrid System 3* von Clontech, das die DNA-bindende-Domäne (DNA-BD) und die transkriptionsaktivierende Domäne (AD) des Gal4-Transkriptionsfaktors aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nutzt. Als *Bait*-Proteine (Fusion an Gal4-DNA-BD) wurde zum einen der intrazelluläre HE6-C-Terminus, zum anderen der dritte intrazelluläre Loop des heptahelikalen Rezeptors gewählt. Mit diesen wurden Screens gegen eine vortransformierte humane Testis-cDNA Bank, in der die Proteine als Fusion an die Gal4-AD als *Prey* exprimiert werden, durchgeführt. Diese cDNA-Bank enthielt neben Testis-cDNAs zusätzlich Ductuli efferentes- und Nebenhodenspezifische Transkripte und wurde ausgewählt, da die Möglichkeit besteht, dass nicht alle HE6-Bindungspartner auf die Ductuli efferentes und/oder den Nebenhoden beschränkt sind, sondern auch im Hoden exprimiert werden, von wo aus sie mit der Luminalflüssigkeit oder auf der Oberfläche der Spermien in den Nebenhoden gelangen.

### 3.2.1 Konstruktion der HE6-Baits

Ein Screening mit dem HE6-Rezeptor in voller Länge als *Bait* war im Y2H-System aus zwei Gründen nicht möglich: Zum einen erfolgt die Transkriptionskontrolle der Reportergene im Zellkern der Hefen und ist somit für Transmembrandomänen nicht geeignet und zum anderen werden lange Aminosäure-Sequenzen (ab 60 kDa / 550 aa) im Hefesystem oft nur schwach exprimiert oder von Hefe-eigenen Proteasen gespalten [Fashena *et al.*, 2000]. Für die Suche nach intrazellulären HE6-Bindungspartnern wurden daher zwei kurze *Baits* ausgewählt: zum einen der gesamte intrazelluläre HE6-C-Terminus (137 aa) und zum anderen der dritte intrazelluläre Loop (26 aa). Diese beiden Bereichen sind klassischerweise an intrazellulärer Protein-Interaktion beteiligt und es wurden bereits für andere GPCRs erfolgreich Y2H-Screens durchgeführt [Tobaben *et al.*, 2000; Kreienkamp *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Saunders & Limbird, 2000]. Zudem sagte eine Motiv-Suche im C-Terminus eine Serin-reiche Region von 29 aa, an die beispielsweise 14-3-3-Proteine binden können, und am absoluten C-Terminus (IEQM-COOH) eine Konsensus-Sequenz (X- $\psi$ -X- $\Phi$ -COOH; X = beliebige Aminosäure,  $\psi$ : saure Aminosäure (D/E);  $\Phi$  = hydrophobe Aminosäure) für die Bindung von Proteinen mit PDZ-Domänen (siehe Abb. 3.3).

Für die Konstruktion der *Bait*-Vektoren wurden die gewünschten Sequenzen durch Sequenzspezifische PCR aus humaner Nebenhoden cDNA amplifiziert und so in den *Bait*-Vektor pGBKT7 kloniert, dass ein Fusionsprotein aus HE6-Protein und N-terminal angefügter Gal4-DNA-BD mit *c-myc-tag* entstehen konnte. Die ausgewählten *Bait*-Bereiche sind in der schematischen Darstellung des HE6-Rezeptors (Abb. 1.8) hervorgehoben. In Abbildung 3.3 sind die HE6-*Bait*-Sequenzen sowie die HE6-*Bait*-Konstrukte dargestellt. Die Analyse der Plasmid-Konstrukte erfolgte durch EcoRI- und BamHI-Restriktionsverdau sowie Sequenzierung. *Bait*-Konstrukte mit korrekter Sequenz und ohne Leserasterverschiebung wurden in den Mat a-Hefestamm AH109 transformiert.

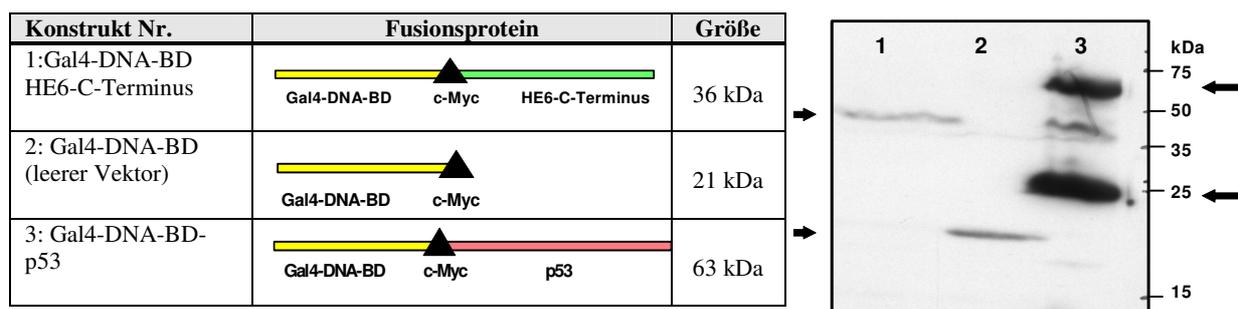


**Abb. 3.3: Ausgewählte HE6-Baits für das Yeast Two-Hybrid System;** SMART-Sequenz-Motiv-Analysen sagen zwei Motive im HE6-C-Terminus voraus. 1) eine Serin-reiche Region (blau) und 2) ein Konsensussequenz (X-D/E-X- $\Phi$ -COOH; X = beliebige Aminosäure,  $\psi$ : saure Aminosäure (D/E),  $\Phi$  = hydrophobe Aminosäure) für die Bindung von PDZ3-Domänen (rot).

### 3.2.2 Vorbereitende Untersuchungen

Bevor die HE6-*Bait*-Konstrukte in ein Bibliothek-Screening eingesetzt wurden, war es notwendig die unter 2.3.2.3 beschriebenen vorbereitenden Untersuchungen durchzuführen. Durch diese Tests wurden die HE6-*Baits* auf eine mögliche toxische Wirkung auf die Hefezellen, eine Beeinflussung der Mating-Effizienz, eine autonome Transkriptionsaktivität sowie auf unspezifische Reaktion mit der Gal4-AD hin untersucht. Zudem wurde die optimale 3-AT-Konzentration ermittelt. Durch diese Untersuchungen sollte unspezifisches / falsch-positives Wachstum ausgeschlossen und optimale Bedingungen für den Screen ermittelt werden.

Vor Transformation der *Baits* wurde der Phänotyp- der Hefestämme kontrolliert. Dieser entsprach sowohl für AH109 als auch Y187 den Angaben des Herstellers. Beide *Bait*-Konstrukte konnten anschließend erfolgreich in den Mat a-Hefestamm AH109 transformiert werden. Ein Wachstumsvergleich über die OD<sub>600</sub> zeigte keine signifikanten Unterschiede im Wachstum zwischen Transformanten mit leerem pGBKT7-Vektor und denen mit HE6-*Bait*-Vektor, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass beide *Bait*-Proteine keine toxische Wirkung auf die Hefezellen haben. Weiterhin konnte für beide *Baits* weder eine autonome Transkriptionsaktivität für die Reportergene *HIS3* und *ADE2* noch eine unspezifische Reaktion mit der Gal4-AD festgestellt werden, so dass falsch positives Wachstum ausgeschlossen werden konnte. In einem Testmating mit Kontrollstämmen und den HE6-*Bait*-Hefestämmen zeigte sich, dass die *Baits* einen leicht negativen Einfluss auf die Mating-Effizienzen haben. Im Mating mit den beiden Kontrollstämmen waren 3 % der Zellen diploid, während mit dem HE6-C-Terminus durchschnittliche Mating-Effizienzen von 1,6% bzw. mit dem dritten intrazellulären Loop als Bait von 1,5 % erreicht wurden. Gefordert werden laut Herstellerangaben Mating-Effizienzen von  $\geq 2\%$ . 3-AT zur Unterdrückung einer leicht erhöhten Expression des HIS3-Proteins, die durch intrinsische DNA-Bindungseigenschaften des *Bait*-Proteins hervorgerufen werden könnten, brauchte nicht eingesetzt werden, da beide *Bait*-Hefestämme sowohl auf den Platten ohne 3-AT als auch auf den Platten mit 2-10 mM 3-AT kein Hintergrundwachstum zeigten. In Abbildung 3.4 ist die Western-Blot-Analyse zur Expression des HE6-*Bait*-Proteins sowie zweier Kontrolle-Protein (Gal4-DNA-BD und Gal4-DNA-BD mit p53) im Hefestamm AH109 dargestellt. Das Fusionsprotein p53-Gal4-DNA-BD zeigte wie erwartet eine Bande bei ca. 65 kDa. Die zusätzliche Bande bei ca. 25 kDa ist auf das p53-Protein ohne Gal4-DNA-BD zurückzuführen. Die Gal4-DNA-BD ohne ein fusioniertes *Bait*-Protein lief erwartungsgemäß bei ca. 20 kDa. Für das Fusionsprodukt aus HE6-C-Terminus und Gal4-DNA-BD konnte eine Proteinbande bei ca. 40 kDa detektiert werden. Dies entspricht in etwa der erwarteten Größe von 36 kDa, so dass davon ausgegangen wurde, dass der HE6-*Bait* im Hefestamm AH109 exprimiert wird.



**Abb. 3.4:** Western-Blot-Analyse zur Expression des HE6-*Bait*-Proteins in *S.cerevisiae* AH109. Primär-AK: *c-myc*-AK, Sekundär-AK: POD-konjugierter AK; 1: HE6-C-Terminus-Gal4-DNA-BD, 2: Gal4-DNA-BD, 3: p53-Gal4-DNA-BD

### 3.2.3 Y2H-Library-Screening einer prä-transformierten cDNA-Bibliothek

Nach Abschluss aller notwendigen Tests wurden die HE6-Bait-Konstrukte im Mat a-Hefestamm AH109 in *Yeast Two-Hybrid*-Library-Screenings eingesetzt. Die Screens wurden wie unter 2.3.2.9 beschrieben gegen eine in den Mata $\alpha$ -Hefestamm Y187 vortransformierte humane Testis cDNA-Bibliothek durchgeführt. Die verwendete cDNA-Bibliothek repräsentierte bei einem Titer von  $> 5 \times 10^7$  cfu/ml insgesamt  $3,5 \times 10^6$  unabhängige Klone. Insgesamt wurden vier Y2H-Library-Screens, als LS-1 bis LS-4 bezeichnet, auf unterschiedlich stringenten Selektionsmedien durchgeführt. Triple-Dropout-Medium (SD/-LTH) diente der weniger stringenten Selektion und der Erfassung von schwächeren Proteininteraktionen. Bei der Verwendung von Quadruple-DO-Medium (SD/-LTHA) erfolgte die Selektion auf Diploide, die den *ADE2*- und den *HIS3*-Reporter exprimieren. In Tab. 3.1 sind die verwendeten Bait-Konstrukte und Selektionsmedien aufgelistet.

**Tabelle 3.1: Mit den HE6-Baits durchgeführte *Yeast Two-Hybrid* Library-Screens**

Library-Screen	Bait-Protein	Bibliothek	Medium
LS 1	HE6-C-Terminus	BD-Matchmaker huTestis (in <i>S.cerevisiae</i> Y187, Mata), HY4035AH, Lot #1030440	SD/-LTHA
LS 2	HE6-C-Terminus		SD/-LTH
LS-3	HE6, dritter intrazellulärer Loop		SD/-LTH
LS-4	HE6-C-Terminus		SD/-LTH

Nach Aufbringen der Screening-Ansätze auf die SD-Selektionsmedien wurden die Platten 8-21 Tage inkubiert, um auch langsam wachsenden Kolonien, die auf schwache Proteininteraktionen hindeuten, die Chance zum Wachsen zu geben. Die Platten wurden täglich kontrolliert und das Wachstum diploider Kolonien dokumentiert. Für jedes Screening wurden zudem der Bibliothek-Titer, die Mating-Effizienz und die Anzahl der gescreenten unabhängigen Klone berechnet. In Tabelle 3.2 sind diese Ergebnisse und die Anzahl der gewachsenen Klone aus den einzelnen Library-Screens zusammengefasst.

**Tabelle.3.2: Titer, Mating-Effizienzen und Anzahl der Klone aus den Y2H-Library Screens mit den HE6-Baits**

	LS-1	LS-2	LS-3	LS-4
Library-Titer	$6 \times 10^7$ cfu/ml	$7,5 \times 10^7$ cfu/ml	$5 \times 10^7$ cfu/ml	$5 \times 10^7$ cfu/ml
Mating-Effizienz	1,8 %	1 %	1 %	1,6 %
Gescreente Klone	$4 \times 10^6$	$2 \times 10^4$	$2,2 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6$
Gewachsene Klone	3	150	56	200

Für ein erfolgreiches *Yeast Two-Hybrid* Library-Screening sollten ein Library-Titer von  $\geq 5 \times 10^7$  cfu/ml und eine Mating-Effizienz von  $\geq 2$  % gegeben sein sowie mindestens  $1 \times 10^6$  unabhängige Klone gescreent werden, um die komplexe mRNA-Population des Gewebes (Hoden) zu repräsentieren [BD-Biosciences, 2003]. Der Library-Titer betrug bei allen durchgeführten Screens mindestens  $5 \times 10^7$  cfu/ml und lag somit im Rahmen der geforderten Bedingungen. In den Screens LS-1 und LS-4 wurden Mating-Effizienzen erreicht, die annähernd die geforderten 2 % erreichten und noch zu tolerieren waren, da in beiden Screenings mehr als  $1 \times 10^6$  unabhängige Klone durchmustert wurden, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die komplexe mRNA-Population des Hodengewebes repräsentiert war. Anders sah es bei den Library-Screens LS-2 und LS-3 aus. Hier betrug die durchschnittliche Mating-Effizienz lediglich 1 %, und die Anzahl der gescreenten unabhängigen Klone lag mit  $2 \times 10^4$  bzw.  $2,2 \times 10^5$  deutlich unter den geforderten  $1 \times 10^6$  Klonen. In diesen Screens wurde somit nicht die gesamte mRNA-Population des Hodengewebes nach potentiellen Bindungspartnern durchforstet, sondern nur ein Teil. Dies bedeutet, dass nicht alle potentiell möglichen HE6-Interaktionspartner repräsentiert und somit das Screening limitiert war.

### 3.2.3.1 Eliminierung falsch-positiver Klone durch Screening auf Reporter-gen-Expression, Prey-Plasmid-Isolierung, PCR, *AluI*-Restriktionsanalyse und Sequenzierung

Im Anschluss an einen *Yeast Two-Hybrid Library* Screen erfolgte die Verifizierung und Analyse der potentiellen HE6-Interaktionspartner, um falsch-positive Klone auszuschließen und potentiell interessante Interaktionspartner zu identifizieren. Dies geschah wie folgt:

1. Mehrmalige Passage der diploiden Klone (> 2mm) aus einem Y2H-Library Screen auf höher stringente Selektionsmedien zur Etablierung des Phänotyps und Selektion auf *ADE2*- und *HIS3*-Reporter-gen-Expression
2. Plasmidisolierung aus den diploiden Hefeklonen, Re-Transformation in *E.coli* und Plasmidisolierung für weitergehende Analysen der potentiellen Interaktionspartner
3. PCR der Bank-Inserts zur Eliminierung von Klonen mit multiplen Inserts oder ohne Inserts, sowie mit Inserts < 400 bp, bei denen es sich um unvollständige cDNAs handelt (*Matchmaker Pretransformed Libraries User Manual*) (siehe auch Abb. 3.6A)
4. *AluI*-Restriktionsanalyse der PCR-Library-Inserts (siehe auch Abb. 3.6B). Anhand eines Vergleichs der Restriktions-Schnittmuster konnten Klone mit identischen Inserts erkannt werden. Nur je einer der mehrfach vorkommenden Klone wurde weiteruntersucht.
5. Sequenzierung der Library-Inserts und Identifizierung der potentiellen Interaktionspartner durch Sequenzanalyse und Datenbankrecherche
6. Eliminierung falsch positiver Klone. In diesem Schritt wurden bekannte falsch Positive wie Heatshock-Proteine, ribosomale Proteine, Elongationsfaktoren oder Proteinen mit *coiled-coil*-Regionen [Serebriiski & Golemis, 2001, Serebriiskii *et al.*, 2000] sowie Inserts mit genomischen Sequenzen, Vektorsequenzen oder ORFs in der 3'UTR als potentielle Interaktionspartner ausgeschlossen. Da für HE6 sowohl mit dem C-Terminus als auch dem dritten intrazellulären Loop nach intrazellulären Interaktionspartnern gesucht wurde, wurden des weiteren Proteine mit abweichender zellulärer Lokalisation, wie z.B. in den Mitochondrien oder im Kern lokalisierte Proteine sowie extrazellulär sezernierte Proteine als falsch positive Interaktionspartner gewertet und ausgeschlossen.
7. Aus den verbleibenden Klonen erfolgte eine Auswahl potentiell interessanter Klone, die näher analysiert wurden. Da der Nebenhoden-spezifische HE6-Rezeptor in der Zellmembran verankert ist und Co-Lokalisation mit Aktin zeigte, wurden vor allem Proteine gewählt, die eine Assoziation mit der Zellmembran und/oder mit dem Zytoskelett aufwiesen. Entsprechende Informationen wurden durch Datenbank- und Literaturrecherche erhalten. Weitere Kriterien waren eine signifikante  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität und/oder mehrfach repräsentierte Klone.
8.  $\beta$ -Galactosidase-Test zur Überprüfung der Expression des dritten Reportergens (*lacZ*) und zur Quantifizierung der Interaktionsstärke zwischen Bait und Prey
9. Die Verifizierung sowie die Identifizierung interagierender Proteindomänen erfolgte durch diverse Einzelmatings

In Abbildung 3.5 ist die Vorgehensweise zur Analyse und Auswertung eines *Yeast Two-Hybrid*-Library-Screens schematisch dargestellt. Es wird deutlich, wie sich die Zahl der potentiellen Interaktionspartner schrittweise reduziert und auf eine übersehbare Anzahl eingegrenzt wird.



**Abb. 3.5:** Schematische Darstellung der Analyse und Auswertung eines *Yeast Two-Hybrid-Library-Screens* anhand von **HE6-C-Terminus als Bait**. Mit Hilfe der gezeigten Kontrollschritte konnte die anfängliche Zahl von 200 gescreenten positiven *His3*+-Klonen auf 3 potentielle Interaktionspartner eingegrenzt werden. Diese sollten durch alternative Methoden bestätigt werden.

Im Folgenden wird für die durchgeführten HE6-Screens eine zusammenfassende Tabelle (Tab. 3.3) geliefert, in der die Anzahl der verbleibenden Klone nach den einzelnen Analyseschritten aufgelistet ist. Des Weiteren sind exemplarisch Bilder einer Agarosegel-Analyse von der PCR und dem *AluI*-Dau der Library-Inserts gezeigt (Abb. 3.6). Erst nachdem die Anzahl der Klone durch Auswahl potentiell interessanter Interaktionspartner ein überschaubares Maß eingenommen hat, wird auf die ausgewählten Klone und die zur Verifizierung durchgeführten Studien näher eingegangen.

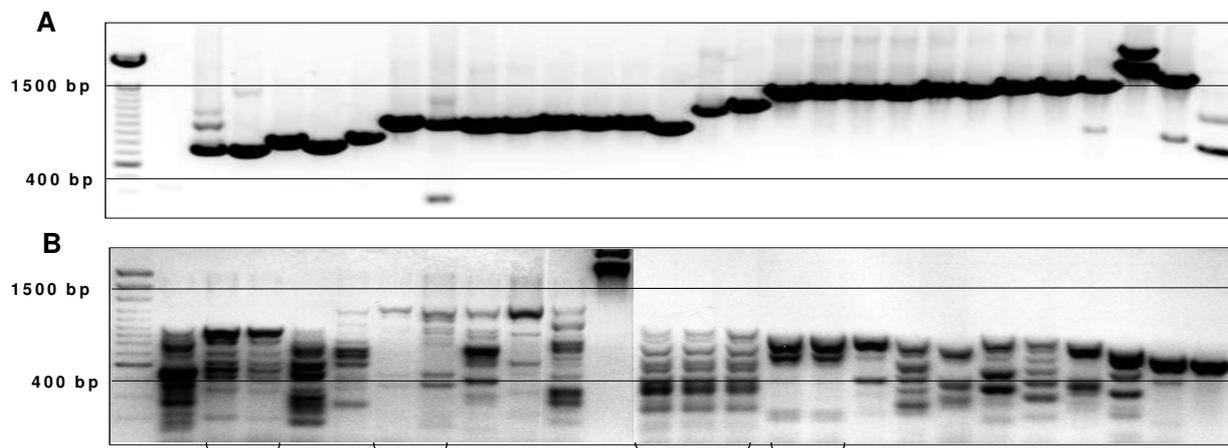


Abb. 3.6: (A) Agarosegel-Analyse der PCRs der Library-Inserts zur Eliminierung von Klonen mit multiplen oder ohne Inserts, sowie mit Inserts < 400 bp. (B) Agarosegel-Analyse der *AluI*-gedauten PCR-Library-Inserts zur Analyse von identischen Klonen mit gleichem Schnittmuster; } markieren identische Klone

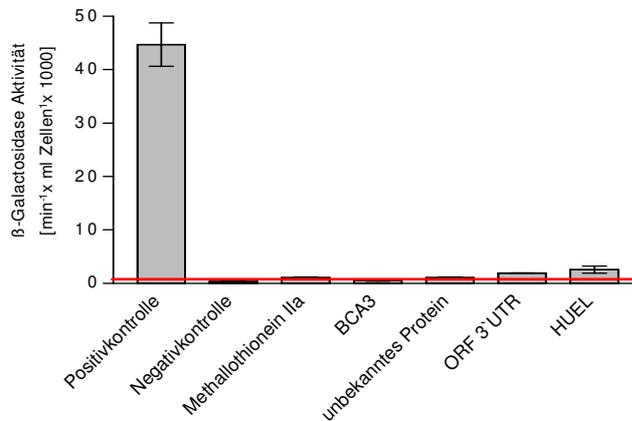
Tabelle 3.3: Analyse und Auswertung der HE6-Library-Screens

Analyse-Schritt	HE6-C-Terminus			3IC-Loop
	LS-1	LS-2	LS-4	LS-3
Gescreente Klone	4 x 10 <sup>6</sup> cfu/ml	2 x 10 <sup>4</sup> cfu/ml	1,7 x 10 <sup>6</sup> cfu/ml	2,2 x 10 <sup>3</sup> cfu/ml
Klone nach Selektion auf <i>HIS3</i> oder <i>ADE2</i>	-	~ 150	~200	56
Klone nach Selektion auf <i>HIS3</i> und <i>ADE2</i>	3	36 von 50	133	30
Klone nach Eliminierung von Klonen mit multiplen/ohne Inserts	3	36	128	20
Klone nach Eliminierung von Duplikaten	2	31	97	16
Sequenzierte Klone	2	30	80	16
Klone nach Eliminierung falsch Positiver	1	10	35	1
Auswahl potentiell interessanter Klone	1	6	13	1
Klone mit $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität	9 von 20 ausgewählten Klonen			0
Bestätigte Interaktionen im Einzelmating	4			0
Potentielle HE6-Interaktionspartner	4			0

### 3.2.3.2 Dritter intrazellulärer Loop als *Bait*-Protein

Für den dritten intrazellulären Loop (3ICL) konnten keine potentiellen Interaktionspartnern für den HE6-Rezeptor ermittelt werden. Insgesamt wurden unter niedrig stringenten Bedingungen zwar 56 Klone erhalten, von diesen blieben jedoch nach Eliminierung falsch-positiver Klone lediglich 16 übrig. Die Sequenzanalyse zeigte weiterhin, dass es sich bei diesen Klonen ebenfalls hauptsächlich um falsch-positive Interaktionspartner handelte. Entweder enthielten die Klone UTRs oder genomische Sequenzen als Inserts und mussten als falsch-positiv ausgeschlossen werden oder sie kamen z.B. aufgrund falscher Lokalisation als potentielle HE6-Interaktionspartner nicht in Frage. So wurde z.B. fünfmal ein extrazelluläres Sekretprotein (LOX, AF039291) und mehrere hauptsächlich nukleär exprimierte Proteine (2 x Methallothionein IIa, BC007034; unbekanntes Protein BC028124; BCA3 AF493785) gefunden. Nach Eliminierung aller falsch-Positiven blieb letztendlich ein potentieller HE6-Bindungspartner übrig, der zweimal gefunden wurde. Hierbei handelte es sich um das *human embryonic lung protein* (HUEL, AF006621), das ubiquitär exprimiert ist. Es gehört zur Familie der Zink-Transporter (*solute carrier family 30*), die eine Rolle bei der Regulation des Kationenhaushaltes spielen. Für HUEL ist jedoch auch eine Funktion bei der DNA-Transkription beschrieben [Sim *et al.*, 2002], so dass es als Transkriptionsfaktor wieder zu den falsch positiven Klonen gezählt werden müsste. In einem quantitativen  $\beta$ -Galaktosidase-Test wurde für HUEL und vier der falsch positiven Klone die Reporteragenaktivität des *lacZ*-Gens untersucht. Alle fünf Klone (Methallothionein IIa, BCA3, unbekanntem Protein und ORF 3`UTR +

HUEL) zeigten keine signifikante  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität (siehe Abb. 3.7), so dass für den dritten intrazellulären Loop keiner der gescreenteten Bindungspartner verifiziert werden konnte. Die mit dem 3ICL gefischten Klone wurden daher nicht weiter analysiert.

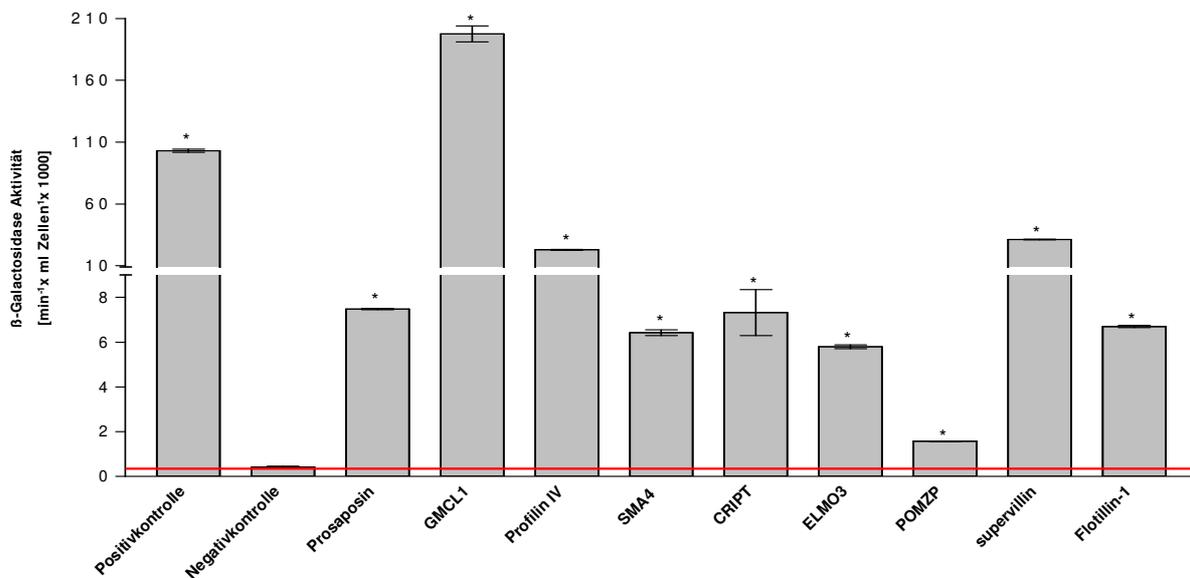


**Abb. 3.7: Quantitativer  $\beta$ -Galaktosidasetest für fünf ausgewählte potentielle Interaktionspartner des dritten intrazellulären Loops des HE6-Rezeptors**

### 3.2.3.3 HE6-C-Terminus als *Bait*-Protein

Das Y2H-Screening mit dem deutlich längeren intrazellulären HE6-C-Terminus erwies sich als ergiebiger. Es wurden insgesamt drei Bank-Screenings durchgeführt. Im LS-1-Screen, der unter hochstringenten Bedingungen durchgeführt wurde wuchsen zwar nur 3 Klone, jedoch enthielten zwei dieser Klone identische Insertsequenzen, bei denen es sich um ein Zinkfinger-Protein namens *Germ cell less homolog1* (GMCL1; NM\_178439) handelte. Der dritte Klon enthielt eine genomische Sequenz ohne erkennbares ORF und wurde als falsch positiv ausgeschlossen. Unter niedrig stringenten Bedingungen (LS-2 und LS-4), d.h. bei Selektion auf ein Reportergen, wuchsen deutlich mehr Klone (zwischen 150-200). Jedoch befanden sich hierunter sehr viele kleine Kolonien, die bei Selektion auf zwei Reportergene kein Wachstum mehr zeigten. Nach Ausschluss von Klonen mit multiplen/ohne Inserts durch PCR-Analyse sowie nach Eliminierung identischer Klone durch *AluI*-Digestion wurden aus beiden Screens die Inserts von 110 potentiellen Interaktionspartnern sequenziert und durch Datenbankrecherche identifiziert. Unter den sequenzierten Klonen befanden sich wieder eine Vielzahl an falsch-positiven Interaktionspartnern wie z.B. Heatshockproteine, extrazellulär, nukleär oder mitochondrial exprimierte Proteine, sowie UTRs oder genomische Sequenzen, so dass sich die Zahl der verbleibenden Klone auf 45 reduzierte. 20 dieser potentielle Interaktionspartner wurden entweder mehrfach bzw. in allen Y2H-Screens gefunden, zeigten eine Assoziation mit der Zellmembran und/oder dem Zytoskelett und/oder wiesen ein ähnliches Expressionsmuster wie HE6 auf, oder es handelte sich um bisher noch nicht charakterisierte hypothetische Proteine. Diese 20 wurden als potentiell interessante Interaktionspartner näher analysiert. In einem ersten  $\beta$ -Galaktosidasetest wurde die Aktivität des *lacZ*-Reportergens untersucht sowie die Stärke der Interaktionen zwischen HE6-C-Terminus als *Bait* und dem jeweiligen potentiellen Interaktionspartner als *Prey* quantifiziert. Von den 20 getesteten Klonen zeigten insgesamt neun eine Expression des *lacZ*-Reportergens, die deutlich über der der Negativkontrolle lag. Bei den restlichen Klonen konnte keine signifikante Expression dieses dritten Reportergens gezeigt werden, so dass diese als potentielle Interaktionspartner ausgeschlossen wurden. In Abbildung 3.8 sind die Ergebnisse des quantitativen  $\beta$ -Galaktosidasetests für die neun verbleibenden potentiellen Interaktionspartner graphisch dargestellt. Die weitaus stärkste Interaktion mit dem HE6-C-Terminus zeigte das *Germ Cell-less Homologe 1* (GMCL1), welches mit einer Aktivität von 195 Units sogar noch deutlich über der  $\beta$ -Gal-Aktivität

der Positivkontrolle lag. Es folgten Supervillin mit 31 Units und Profilin IV mit 23 Units. Prosaposin, Flotillin, SMA4, Cript und Elmo3 zeigten etwa gleich starke  $\beta$ -Gal-Aktivitäten im Bereich von 5,7 bis 7,5 Units. POMZP hingegen wies mit 1,56 Units die geringste  $\beta$ -Gal-Aktivität der neun Klone auf, so dass für dieses Protein zunächst die schwächste Interaktion mit dem HE6-*Bait* angenommen werden musste. In Tabelle 3.4 sind die neun potentiellen Interaktionspartner näher beschrieben sowie die in den Inserts kodierten Bereiche dieser Proteine aufgelistet. Für diese neun verbleibenden Proteine wurde die mögliche Interaktion mit dem HE6-C-Terminus durch weitere Y2H-Versuche näher verifiziert.



**Abb. 3.8: Quantitativer  $\beta$ -Galaktosidasetest für neun ausgewählte potentiell interessante Interaktionspartner des-HE6-C-Terminus.** Dargestellt sind die ermittelten  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten [Milliunits/(ml x Zellen)] diploider Klone aus den Y2H-Screenings. Die rote Linie markiert den Negativwert als Ausschlussgrenze. \* zeigt signifikante  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität im Vergleich zu Negativkontrolle. Als Negativkontrolle dienten diploide Klone ohne Interaktion zwischen *Bait* und *Prey* (HE6-C-Term. x SV40 large T-Antigen) als Positivkontrolle diploide Hefeklone mit Interaktion zwischen HE6-cmyc als *Bait* und dem *c-myc-binding* Protein als *Prey*.

**Tabelle 3.4: Potentiell interessante Interaktionspartner des HE6-C-Terminus aus dem *Yeast Two-Hybrid-Library-Screenings*.** In der Tabelle sind die im Y2H-Screen gefischten *Prey*-Protein kurz beschrieben, die Accession-Nummern und Referenzen aufgelistet und die in den *Prey*-Proteinen repräsentierten Proteinbereiche aufgelistet. aa: Aminosäure, bp: Basenpaar, ORF: *Open reading frame*; UTR: untranslatierte Region

Prey-Insert	Accession-Nummer		Kurze Beschreibung des Proteins	Referenzen	gefischte Domänen
	mRNA-	Protein			
7 x <b>Prosaposin (PSAP)</b> 525 aa	NM_001042465	NP_001035930	Hochkonserviertes Glykoprotein, Vorläuferprotein für die 4 proteolytischen Spaltprodukte Saposin A, B, C und D (modulieren die Hydrolyse von lysosomalen Lipiden); PSAP kommt als Sekretprotein und integrales Membranprotein in vielen Geweben und in Flüssigkeiten des männlichen Reproduktionstraktes vor, v.a. <b>in Rete testis, Ductuli efferentes und Caput epididymis</b> ; PSAP enthält vier Saposin B-Domänen, aus denen die vier Saposine gebildet werden und zwei Saposin A-Domänen die dabei abgespalten werden; ist in Entwicklung und Erhaltung der männl. Reproduktionsorgane bei Mäusen involviert und spielt zudem eine Rolle für die Fertilität der Spermien	O'Brien & Kishimoto, 1991 Sylvester <i>et al.</i> , 1984, 1989 Morales <i>et al.</i> , 2000a,b Hammerstedt <i>et al.</i> , 2001	E wurden sieben unterschiedlich lange ORF-Bereiche des Prosaposin-Gens mit 3'UTR gefischt, die überwiegend die Saposin B-Domänen drei und vier und einen Teil der Saposin A-Domäne enthielten
4 x <b>Germ Cell-less homolog 1 (GMCL1)</b> 527 aa	NM_178439	NP_848526	Protein der Kernmembran; das Maus-Homologe wird ubiquitär exprimiert, die höchste Expression ist jedoch im Testis, wo es distinkt in den Nukleii von Pachyten-Spermatozyten bis zu runden Spermatiden nachzuweisen ist. GMCL-1 spielt direkt oder indirekt durch postmeiotische Transkriptionsrepression eine <b>Rolle in der Spermatogenese</b> . GMCL1-KO-Mäuse zeigen abnormale Spermatogenese, gestörte Fertilität und aberrante Chromatinstrukturen. GMCL-1 enthält eine N-terminale BTB/POZ-Domäne als Bestandteil des Zinkfinger-Motivs für Protein-Protein-Interaktionen, C-terminal sind keine Domänen vorhergesagt. Eine Lokalisation im Nebenhoden ist bisher nicht untersucht.	Kleiman <i>et al.</i> , 2003 Kimura <i>et al.</i> , 1999, 2003 Leatherman <i>et al.</i> , 2000	Gefischt wurden vier verschieden große Bereiche des ORFs mit 3'UTR; die 5'UTR sowie unterschiedlich lange Sequenzen des N-Terminus fehlten. Alle Klone enthielten jedoch die BTB/POZ-Domäne und den C-Terminus. Größtes Genprodukt 444 aa
4 x <b>Profilin IV (PFN IV)</b> 129 aa	NM_199346	NP_955378	Bei Profilin IV handelt es sich um ein neues Protein der Aktin-bindenden Profilinfamilie, welches überwiegend im Testis in den Keimzellen exprimiert ist. Es stellt das Säuger-Homologe zum Seeigelspermien-Profilin dar. <b>Es wäre vorstellbar, dass über ein solches Protein die Verbindung vom C-Terminus des HE6-Rezeptors zum Aktin hergestellt wird.</b> Für PFN IV sind keine distinkten Domänen vorhergesagt und weder Bindungspartner noch Funktion bekannt.	Obermann <i>et al.</i> , 2005	Es wurde viermal der komplette ORF (129 aa) inklusive 5'-und 3'UTR als potentieller Bindungspartner ermittelt. Die ersten 76 aa der 5'UTR befanden sich in einem falschen Leseraster, der ORF war korrekt kodiert
3 x <b>SMA4</b> 140 aa	NM_021652	NP_067684	SMA4 ist charakterisiert durch die Glyko-hydro-2-Domäne (82 aa) der O-Glykosylhydrolase Familie, die Bestandteil von $\beta$ -Galaktosidasen, $\beta$ -Mannosidasen und $\beta$ -Glucuronidasen ist und könnte in den Kohlenhydratstoffwechsel involviert sein. Jedoch ist SMA3,4 bisher nicht charakterisiert und die molekulare Funktion unbekannt. Es ist neben einigen anderen Geweben im männlichen Genitaltrakt exprimiert.	Theodosiou <i>et al.</i> , 1994	Es wurden drei identische Klone gefischt, welche aus dem Großteil des ORF (aa 27-140) + 3'UTR bestehen. Die ersten 26 aa des N-Terminus bzw. die ersten 20 aa der Glyco-hydro-2-Domäne fehlten jedoch.
2 x <b>Cysteine-rich PDZ-binding Protein (CRIPT)</b> 101 aa	NM_014171	NP_054890	CRIP1 ist ein in zahlreichen Geweben cytoplasmatisch exprimiertes Protein, das <b>mit den Mikrotubuli assoziiert</b> ist. Es <b>bindet direkt an <math>\beta</math>-Tubulin</b> und kann mit dem C-Terminus an weitere Proteine, wie z.B. PSD-95 binden, und beide miteinander verlinken. PSD-95 interagiert wiederum mit dem NMDA-Rezeptor, der Bestandteil von Ionen-Kanälen in Synapsen ist, so dass CRIPT als <b>Schnittstelle zwischen Signaltransduktion des Rezeptors über das Zytoskelett</b> angesehen werden kann. CRIPT hat ein c-terminale Konsensus-Sequenz für PDZ-Bindung.	Niethammer <i>et al.</i> , 1998 Passafaro <i>et al.</i> , 1999	Es wurde zweimal der komplette ORF (101 aa) inklusive der 5'-und 3'UTR gefischt.

Prey-Insert	Accession		Kurze Beschreibung des Proteins	Referenzen	gefischte Domänen
	mRNA-	Protein			
<b>2 x Engulfment and Cell motility 3 (ELMO3) 773 aa</b>	NM_024712	NP_078988	ELMO3 ist zytoplasmatisch exprimiert und gehört zur Elmo/Ced-12-Familie, die eine <b>Funktion bei der Zytoskelett-Mediation</b> während der Phagozytose apoptotischer Zellen und bei der Bewegung von Zellen haben. Es enthält das Elmo/CED12-Motiv und eine <i>Pleckstrin homology (PH-) Domäne (aa 595-718)</i> , die <b>Bestandteil vieler Signalproteine und Zytoskelett assoziierter Proteine</b> ist. Die Funktion der PH-Domäne ist nicht bekannt; vermutlich spielt sie eine Rolle bei der Bindung von G-Proteinen, Lipiden, phosphorylierter Serin- und Threoninreste sowie bei der Anheftung an Membranen.	Lemmon <i>et al.</i> , 1998 Gumienny <i>et al.</i> , 2001	Mit dem HE6-C-Terminus wurden die letzten 133 aa des ORF (aa 643-773) und die 3'UTR gefischt. Dieser Bereich umfasst 95 C-terminale aa der PH-Domäne. Das Elmo/Ced12-Motiv ist in dem Prey nicht repräsentiert.
<b>2 x POMZP3 210 aa</b>	NM_012230	NP_036362	Bei POMZP3 handelt es sich um ein Fusionsprotein welches N-terminal der 5' codierenden Region von POM121 ähnlich ist, das ein integrales Kernporen-Membranprotein kodiert, und weiter 3' aus den vier letzten Exons des Zona pellucida Glykoproteins 3 (ZP3) besteht. POMZP3 besitzt jedoch kein Kernlokalisierungssignal und keine Transmembrandomänen, sondern nur die ZP-Domänen, (aa 77-141) die für die Spermien-Adhäsion an die Zona pellucida der Eizelle verantwortlich sind. Das Protein wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, jedoch ist seine Funktion unbekannt.	Kipersztok <i>et al.</i> , 1995	Das bindende Protein enthielt den komplette ORF und die 3'UTR jedoch ohne die ersten 20 N-terminalen Aminosäuren (insgesamt 191 aa)
<b>1 x Supervillin (SVIL) 2214 aa</b>	NM_021738	NP_003165	SVIL ist ein cytoplasmatisch exprimiertes Protein, das mit dem N-Terminus <b>mit der Plasmamembran assoziiert ist und C-terminal mit F-Aktin interagiert</b> . Es hat <b>Einfluss auf die Aktinpolymerisierung</b> und rekrutiert Aktin und andere Zytoskelett-Proteinen zu spezialisierten Strukturen an der Plasmamembran und dem Zellkern wachsender Zellen. SVIL ist ein bipartielles Protein mit distinkten N- und C-terminalen Domänen: es besteht aus einer N-terminalen Kernlokalisationsdomäne und enthält C-Terminus vier Gelsolin- und eine Villin-Domäne für Aktin- und Calcium-Bindung.	Pope <i>et al.</i> , 1998 Wulfskuhle <i>et al.</i> , 1999 Chen <i>et al.</i> , 2003	Es wurde ein relativ kurzer Bereich des C-Terminus gefischt (50 aa), der 8 von 36 aa der Villin-Domäne und die 3'UTR umfasst. Zudem enthielt der Klon einen genomischen Einschub von 41 aa im falschen Leseraster. Die N-terminalen Domäne sowie die Gelsolin-Domänen fehlten komplett.
<b>1 x Flotillin 1 (FLOT1) 427 aa</b>	NM_005803	NP_005794	Ubiquitär exprimiertes integrales Membranprotein der <b>inneren Zellmembran</b> wo es mit Caveolen assoziiert ist, bei denen es sich um nach innen gestülpte Mikrobereiche der Membran handelt, an denen der Protein Ein- und Austritt kontrolliert wird und die einen Anknüpfungspunkt für Signaltransduktion darstellen. FLOT1 spielt eine Rolle bei Vesikel-Transport, <b>Signaltransduktion sowie Zytoskelett-Organisation</b> und interagiert mit einer Vielzahl an Proteinen. Die molekulare Funktion ist jedoch unbekannt. Es besteht aus einer N-terminalen Prohibitin-homologe-Domäne (PHB) (aa 84-266) welche N-terminal ein <i>coiled-coil</i> -Motiv (aa 237-264) enthält	Bickel <i>et al.</i> , 1997 Ding <i>et al.</i> , 2005	Das bindende Protein enthielt den ORF ohne die ersten 70 aa plus die 3'UTR. Die PHB-Domäne und das <i>coiled-coil</i> -Motiv waren komplett vorhanden.

### 3.2.4 Verifizierung der Interaktionen zwischen dem HE6-C-Terminus und den potentiellen Interaktionspartnern

#### 3.2.4.1 Kontrollmatings

Zur Bestätigung der potentiellen Interaktionen aus den *Yeast Two-Hybrid* Library-Screens wurden zunächst Kontrollmatings mit und ohne Hefestammtausch durchgeführt. In diesen Matings wurde die Interaktion der *Prey*-Proteine mit dem HE6-C-Terminus, dem dritten intrazellulären Loop und der Gal4-DNA-BD als *Bait* überprüft, um die Spezifität der Interaktionen zu ermitteln. In Tabelle 3.5 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

**Tabelle 3.5: Ergebnisse der Kontrollmatings zur Verifizierung der Interaktionen zwischen dem HE6-C-Terminus und den gescreenten *Prey*-Proteinen** Interaktion wurde durch Wachstum auf den Selektionsmedien SD/-LTH, -LTA und -LTHA detektiert. +++: mehr als 200 cfu/ml auf SD/-Medium gewachsen, ++: 10-20 cfu/ml gewachsen, +/-: vereinzelte kleine Kolonien gewachsen; -: keine Kolonien auf Selektionsmedium gewachsen.

<i>Prey</i> -Protein	<i>Bait</i> -Protein	Mating-Effizienz	Interaktion		
			-LTH	-LTA	-LTHA
Prosaposin	<b>HE6-C-Terminus</b>	26 %	+++	+++	+++
	HE6 3IC-Loop	14 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	27 %	+/-	+/-	+/-
Germ Cell-less	<b>HE6-C-Terminus</b>	6 %	+++	+++	+++
	HE6 3IC-Loop	8 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	8 %	-	-	-
Profilin IV	<b>HE6-C-Terminus</b>	15 %	+++	+	+/-
	HE6 3IC-Loop	4 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	11 %	-	-	-
SMA4	<b>HE6-C-Terminus</b>	33 %	++	++	++
	HE6 3IC-Loop	46 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	37 %	+/-	+/-	+/-
CRIPT	<b>HE6-C-Terminus</b>	13 %	++	++	++
	HE6 3IC-Loop	65 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	75 %	-	-	-
ELMO3	<b>HE6-C-Terminus</b>	45 %	+++	+	+
	HE6 3IC-Loop	44 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	22 %	-	-	-
POMZP3	<b>HE6-C-Terminus</b>	24 %	+++	+++	+++
	HE6 3IC-Loop	20 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	14 %	-	-	-
Supervillin	<b>HE6-C-Terminus</b>	9 %	+++	++	++
	HE6 3IC-Loop	8 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	7 %	++	-	-
Flotillin	<b>HE6-C-Terminus</b>	21 %	+++	+	+/-
	HE6 3IC-Loop	20 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	20 %	-	-	-

In den Einzelmatings konnte für alle neun Kandidaten eine Interaktion mit dem HE6-C-Terminus bestätigt werden. Für GMCL1, PFN IV, CRIPT, ELMO3 und Flotillin konnte eine spezifische Reaktion gezeigt werden. Diese Proteine zeigten nur Interaktion mit dem HE6-C-Terminus, jedoch nicht mit dem dritten intrazellulären Loop des HE6-Rezeptors und der Gal4-DNA-BD. Es fiel jedoch auf, dass Profilin IV und Flotillin mit 10-20 cfu/ml auf niedrig stringentem Medium und nur vereinzelten Klonen auf hoch stringentem SD/-LTHA-Medium lediglich eine schwache Interaktion mit dem HE6-C-Terminus zeigten. Für Prosaposin, SMA4 und Supervillin konnte eine deutliche Interaktion mit dem HE6-C-Terminus detektiert werden. Diese drei Proteine zeigten ebenfalls keine Interaktion mit dem dritten intrazellulären Loop des HE6-Rezeptors, jedoch war in den Matings mit der Gal4-DNA-BD vereinzeltes Wachstum diploider Klone auf den Selektionsmedien zu verzeichnen. Dies deutete auf eine unspezifische Reaktion der Gal4-DNA-BD mit den Preyproteinen hin, was die Expression der Reportergene und somit falsch positives Wachstum bewirkt. Für Prosaposin, SMA3,4 und Supervillin könnte somit Interaktion durch unspezifische

Reaktion mit der Gal4-DNA-BD des *Baits* vorgetäuscht werden. Da jedoch das Wachstum in den Matingansätzen mit dem HE6-C-Terminus deutlich stärker war als in den Ansätzen mit der Gal4-DNA-BD, und in den Matings mit dem dritten intrazellulären Loop gar kein Wachstum diploider Klone zu detektieren war, wurde trotzdem weiterhin von einer Interaktion mit dem HE6-C-Terminus ausgegangen werden.

### 3.2.4.2 Einzelmatings mit distinkten Bereichen der potentiellen HE6-Interaktionspartner

Um falsch positive Interaktionen des HE6-C-Terminus mit Translationsprodukten aus UTR-Bereichen oder mit *coiled-coil*-Regionen auszuschließen und um die an der Interaktion beteiligten Protein-Domänen enger einzugrenzen, wurden distinkte Bereiche der potentiellen Interaktionspartner subkloniert und mit diesen weitere Y2H-Einzelmatings durchgeführt. Zusätzlich wurde ein Vektortausch vorgenommen, das heißt der HE6-C-Terminus als Fusion mit der Gal4-AD als *Prey* und die potentiellen Interaktionspartner als Fusion mit der Gal4-DNA-BD als *Bait* exprimiert, um unspezifische Reaktionen der Gal4-DNA-BD mit den potentiellen Interaktionspartner, wie sie im Kontrollmating beobachtet wurden, zu unterbinden. Für die Verifizierung wurden distinkter Bereiche wie ORFs oder Protein-Domänen der potentiellen Interaktionspartner, die in den Original-*Prey*-Plasmiden repräsentiert waren, ausgewählt. (siehe Tabelle 3.6).

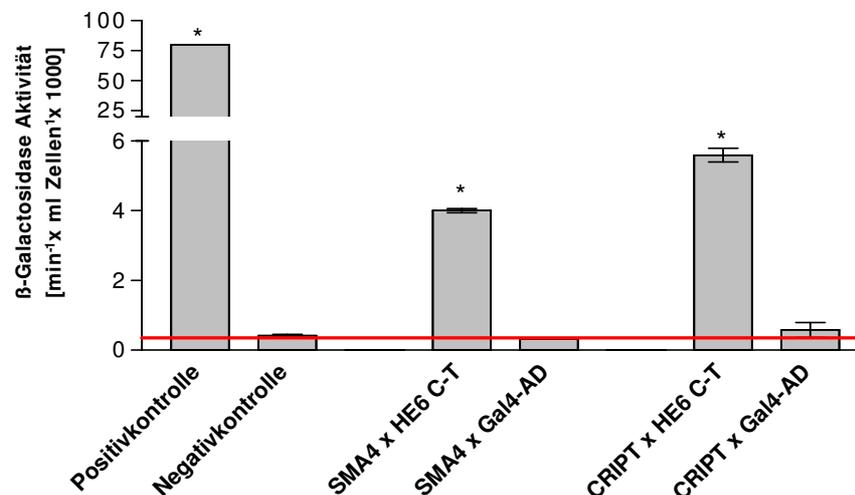
**Tabelle 3.6: Klonierung distinkter Bereiche der potentiellen HE6-Interaktionspartner für Interaktionsstudien *im Yeast Two-Hybrid-System*.** Es wurden nur Bereiche kloniert, die bereits in den ursprünglichen *Prey*-Plasmiden repräsentiert waren. Die klonierten Bereiche sind rot umrandet. Diese wurden sowohl in den Vektor pGBKT7 als auch in pGADT7 ligiert. ORF: *Open reading frame*, aa: Aminosäure, UTR: untranslatierte Region; in der schematischen

Interaktionspartner	Klonierter Bereich	Schematische Darstellung
<b>Prosaposin</b>	aa 320-476 des ORF inklusive der Saposin B-Domänen drei und vier (71 von 73 aa der SapB3 und 65 von 74 aa der SapB4)	
<b>Germ Cell-less homolog 1 (GMCL1)</b>	a) 154 aa des ORF inklusiver der BTB/POZ-Domäne (109 aa) b) kompletter ORF (527 aa)	
<b>Profilin IV (PFN IV)</b>	Kompletter ORF des Profilin IV (129 aa) ohne 5'- und 3'UTR	
<b>SMA4</b>	ORF inklusive Glyco-hydro-2- Domäne (119 von 140 aa), es fehlen die ersten 26 aa des N-Terminus = die ersten 20 aa der Glyco-hydro-2-Domäne (GH2)	
<b>Cysteine-rich PDZ-binding Protein (CRIPT)</b>	Kompletter ORF des CRIPT (101 aa) ohne 5'- und 3'UTR	
<b>Engulfment and Cell motility 3 (ELMO3)</b>	126 C-terminale aa des ORF (aa 647-773). Dieser Bereich umfasst 95 C-terminalen aa der PH-Domäne (123 aa) sowie den C-Terminus	
<b>POMZP3</b>	ORF minus die ersten 20 N-terminalen aa (insgesamt 191 von 210 aa); dieser Bereich umfasst die komplette ZP3-Domäne	
<b>Supervillin (SVIL)</b>	zwei von fünf Gelsolidomänen und eine Villindomäne; ohne genomischen Einschub und ohne 5'- und 3'UTR	
<b>Flotillin 1 (FLOT1)</b>	190 aa des ORF welche die PHB-Domäne ohne das N-terminale <i>coiled-coil</i> -Motiv (107 von 182 aa; der PHB, die 76 C-terminalen aa fehlen) enthält;	

Die ausgewählten Bereiche wurden mittels PCR amplifiziert oder durch Restriktionsverdau aus den *Prey*-Plasmiden ausgeschnitten und anschließend über Restriktionsschnittstellen im richtigen Leseraster in die Hefevektoren kloniert. In Einzelmatings wurde die Interaktion dieser Konstrukte mit dem HE6-C-Terminus untersucht. Als Negativkontrolle dienten Einzelmatings gegen die Gal4-AD. In Tabelle 3.7 sind die Ergebnisse der Einzelmatings dargestellt.

**Tabelle 3.7: Ergebnisse der Einzelmatings zur Verifizierung der Interaktionen zwischen dem HE6-C-Terminus und distinkten Bereiche der *Prey*-Proteine.** Interaktion wurde durch Wachstum auf den Selektionsmedien SD/-LTH, -LTA und -LTHA detektiert. +++: mehr als 200 cfu/ml auf SD/-Medium gewachsen, ++: 10-20 cfu/ml gewachsen, +/-: vereinzelt kleine Kolonien gewachsen; -: keine Kolonien auf Selektionsmedium gewachsen. n.d.: nicht durchgeführt oder nicht erfolgreich

Bait-Protein	Prey-Protein	Interaktion		
		-LTH	-LTA	-LTHA
Prosoposin Saposin-B Domänen 3+4	HE6-C-Terminus	-	-	-
	Gal4-AD	-	-	-
Germ Cell-less POZ-Domäne	HE6-C-Terminus	-	-	-
	Gal4-AD	-	-	-
Germ Cell-less ORF	HE6-C-Terminus	n.d.	n.d.	n.d.
	Gal4-AD	n.d.	n.d.	n.d.
Profilin IV ORF	HE6-C-Terminus	-	-	-
	Gal4-AD	-	-	-
SMA4 ORF inkl. Glyco-hydro-2-Domäne	HE6-C-Terminus	+++	++	++
	Gal4-AD	+/-	+/-	+/-
CRIPT ORF	HE6-C-Terminus	+++	+++	++
	Gal4-AD	-	-	-
ELMO3 PH-Domäne	HE6-C-Terminus	-	-	-
	Gal4-AD	-	-	-
POMZP3 ORF inkl. ZP3-Domäne	HE6-C-Terminus	+/-	+/-	-
	Gal4-AD	+/-	+/-	-
Supervillin Zwei Gelsolin- und eine Villindomäne	HE6-C-Terminus	-	-	-
	Gal4-AD	-	-	-
Flottilin PHB-Domäne ohne coiled-coil-Motiv	HE6-C-Terminus	-	-	-
	Gal4-AD	-	-	-



**Abb. 3.9: Quantitativer  $\beta$ -Galaktosidasetest zur Analyse der HE6-Interaktion mit SMA4 und CRIPT.** Dargestellt sind die ermittelten  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten [Milliunits/(ml x Zellen)] diploider Klone aus den Matings. Die rote Linie markiert den Negativwert als Ausschlussgrenze. \* zeigt signifikante  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Vergleich zur Negativkontrolle.

Nach Entfernung unspezifischer Regionen zeigten nur noch CRIPT und SMA4 eine Interaktion mit dem HE6-C-Terminus. Hier scheinen tatsächlich die Proteine selbst an der Interaktion beteiligt zu sein. Für CRIPT konnte eine spezifische Interaktion mit HE6 beobachtet werden, wohingegen SMA4 geringes Hintergrundwachstum in den Kontrollansätzen zeigte, das auf eine schwach-unspezifische Reaktion mit der Gal4-AD hindeutet. Da jedoch das Wachstum in den Matingansätzen mit dem HE6-C-Terminus deutlich stärker war als in den Ansätzen mit der Gal4-AD und für die Kontrolldiploiden in einem quantitativen  $\beta$ -Galaktosidasetest keine signifikante  $\beta$ -

Galaktosidase-Aktivität gemessen werden konnte, wurde von einer Interaktion mit dem HE6-C-Terminus ausgegangen. Der  $\beta$ -Galaktosidasetest (Abbildung 3.9) bestätigte für beide Proteine, durch eine signifikante Expression des *lacZ*-Reportergens, eine spezifische Interaktion mit dem HE6-C-Terminus. Quantitativ konnte für CRIPT mit 5,6 Units eine stärkere HE6-Interaktion ermittelt werden als für SMA4 (4 Units).

Die Matingansätze für Supervillin stehen noch aus, so dass dieses vorerst als potentieller Interaktionspartner bestehen bleibt. Die ausgewählten Bereiche von Prosaposin und GMCL1 zeigten keine Interaktion mit dem HE6-C-Terminus. Beide Proteine sind mit 525 aa bzw. 527 aa relativ große Proteine, von denen in den Y2H-Library-Screens mehrere unterschiedliche Bereiche als potentielle Interaktionspartner gefunden wurden (siehe Tabelle 3.8). Für die Einzelmatings wurden die am häufigsten repräsentierten Bereiche, bei Prosaposin die Saposin-Domänen drei und vier und bei GMCL1 die BTB/POZ-Domäne kloniert. Diese reichten jedoch für eine Interaktion mit HE6 nicht aus, so dass eine falsch positive Interaktion durch die ursprünglich in denen Klonen enthaltenen UTRs vermutet werden kann. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass andere oder größere Bereiche der Proteine eine Interaktion mit HE6 vermitteln. Um dies zu untersuchen, stehen weitere Interaktionsstudien mit distinkten Protein-Bereichen oder den ganzen Proteinen aus, für die im Rahmen dieser Arbeit keine Zeit mehr war. Für die übrigen sechs Proteine konnte nach Entfernung von 5'UTR, Leserasterverschiebungen und *coiled-coil*-Regionen keine oder falsch positive Interaktion mit dem HE6-C-Terminus gezeigt werden. Bei diesen Proteinen war die in den Y2H-Library-Screens detektierte Interaktion auf unspezifische Reaktionen zurückzuführen.

### 3.3 Gezielte *Yeast Two-Hybrid*-Studien zur Interaktion des HE6-Rezeptors mit 14-3-3-Proteinen und NHERF1

Zusätzlich zum Bibliothek-Screening wurden gezielt mögliche Interaktionspartner getestet. Sequenz-Motiv-Analysen mit dem Online-Programm *Simple Modular Architecture Research Tool* (SMART, <http://smart.embl-heidelberg.de/>) sagten für den HE6-C-Terminus zwei Motive voraus, die Hinweise auf mögliche Interaktionspartner geben (siehe Abbildung 3.3). Zum einen wurde eine Serin-reiche Region von 29 aa ermittelt. Es ist bekannt, dass 14-3-3-Proteine an solche Sequenzen binden können; eine dezidierte Konsensussequenz gibt es jedoch nicht. 14-3-3 Proteine sind kleine regulatorische Moleküle der Signaltransduktion die unter anderem als Adapterproteine in Multiproteinkomplexen eine Schlüsselrolle bei der Signaltransduktion, Zellteilung und Apoptose einnehmen [Xiao *et al.*, 1995; Fu *et al.*, 2000]. Eine Interaktion von GPCRs über den C-Terminus mit 14-3-3-Proteinen wurde bereits für den FSH-Rezeptor [Cohen *et al.*, 2004], den PTH-Rezeptor [Tazawa *et al.*, 2003] und den GABAB-Rezeptor [Couve *et al.*, 2001; Brock *et al.*, 2005] beschrieben. Zudem wurde für verschiedene  $\alpha$ 2-Adrenalinrezeptoren eine Interaktion von 14-3-3-Proteinen mit dem dritten intrazellulären Loop beschrieben [Prezeau *et al.*, 1999]. Für eine mögliche 14-3-3-Bindung kämen somit die Serin-reiche Region im C-Terminus sowie der dritte intrazelluläre Loop von HE6 in Frage.

Als zweites Motiv wurde am absoluten C-Terminus (IEQM-COOH) eine Konsensus-Sequenz (X-D/E-X- $\Phi$ -COOH; X = beliebige Aminosäure,  $\Phi$  = hydrophobe Aminosäure) für die Bindung von Proteinen mit PDZ-Domänen festgestellt. PDZ-Domänen sind modulare Protein-Interaktions-Domänen, die eine Rolle im Protein-Targeting und bei der spezifischen Anordnung von Protein-Komplexen spielen. Ein PDZ-Protein, das aufgrund seiner Funktion und seiner Lokalisation in polarisierten Epithelzellen als Interaktionspartner für HE6 in Frage käme, ist der Na/H Exchanger

Regulatory Factor NHERF1 [Reczek *et al.*, 1997; Weinman *et al.*, 1995 + 2005]. NHERF ist apikal in den nicht-Zilien tragenden Epithelzellen der Ductuli efferentes lokalisiert und mit dem Aktinzytoskelett der Plasmamembran assoziiert. Es hat eine Funktion bei der Flüssigkeitsresorption im proximalen Nebenhoden [Weinman *et al.*, 2005; Yun *et al.*, 1997]. Da für NHERF1 bereits in früheren Studien eine Interaktion mit Signalmolekülen, GPCRs, Ionenkanalproteinen und Zytoskelett-Proteinen gezeigt werden konnte [Ediger *et al.*, 2002; Voltz *et al.*, 2001; Short *et al.*, 1998; Suh *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2004], könnte es ein Adapterprotein zwischen dem HE6-Rezeptor und Ionenkanalproteinen oder dem Zytoskelett darstellen und so in die HE6-Signaltransduktion und Regulation der transepithelialen Flüssigkeitsresorption im Nebenhoden eingebunden sein. Sowohl 14-3-3 als auch NHERF1 wurden deshalb als potentielle Interaktionspartner des HE6-Rezeptors in Erwägung gezogen. Um eine mögliche Interaktion der beiden Proteine mit dem HE6-C-Terminus zu untersuchen, wurden die Proteine in die Hefevektoren pGBKT7 und pGADT7 kloniert und Einzelmatings gegen den HE6-C-Terminus, den dritten intrazellulären Loop und die Gal4-Domäne durchgeführt. Für die Interaktionsstudien wurde der komplette ORF von NHERF1 (NM\_012030) sowie die ORFs der 14-3-3-Isoformen Zeta (NM\_003406), Eta (NM\_003405) und Theta (NM\_011739) ausgewählt. Diese 14-3-3-Isoformen sind im männlichen Genitaltrakt exprimiert und es wurden für sie bereits Interaktionen mit dem C-Terminus bzw. 3ICL verschiedener Rezeptoren beschrieben. In Einzelmatings sowohl mit den potentiellen HE6-Interaktionspartnern als *Bait* (Fusion an Gal4-DNA-BD) als auch als *Prey* (Fusion an Gal4-AD) wurden Interaktionsstudien mit dem HE6-C-Terminus und dem 3ICL durchgeführt. Als Kontrolle wurden Ansätze mit den Gal4-Domänen mitgeführt. Trotz guter Mating-Effizienzen wuchsen keine Klone auf den Selektionsmedien, die auf Interaktion mit dem HE6-Rezeptor hindeuten würden (Daten hier nicht gezeigt). Es konnte also weder für die 14-3-3-Proteine noch für NHERF1 eine Interaktion mit dem HE6-C-Terminus oder dem dritten intrazellulären Loop gezeigt werden.

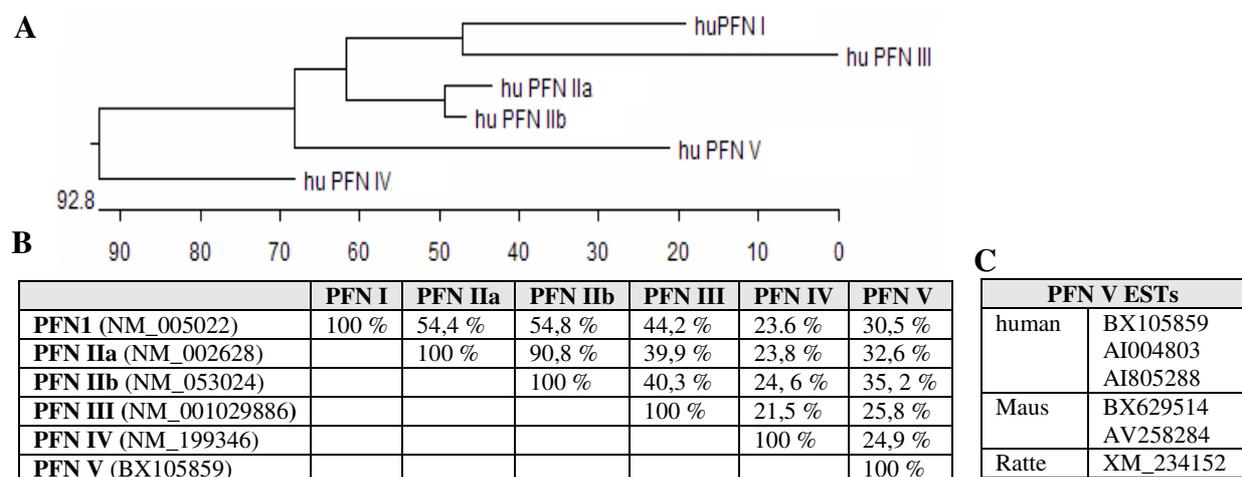
### 3.4 gezielte Y2H-Studien zur Interaktion von HE6 mit Profilinen

In den Y2H-Screenings mit dem HE6-C-Terminus als *Bait* wurde ein neues Mitglied der Profilin-Familie, das Profilin IV, als ein potentieller Interaktionspartner ermittelt, das eine Verbindung zwischen dem HE6-Rezeptor und dem apikalen Aktin-Zytoskelett herstellen und somit eine Rolle bei der intrazellulären Signaltransduktion spielen könnte. Diese Interaktion ließ sich jedoch nicht bestätigen. In weiterführenden Einzelmating-Experimenten wurde eine mögliche Interaktion des humanen und murinen epididymalen Rezeptors (HE6/ME6) mit weiteren Profilin-Isoformen untersucht. Für die Interaktionsstudien wurden die ORFs des humanen und murinen Profilin IV (BC029523/ NM\_028376), sowie der Profile II (NM\_053024) und III (NM\_029303) sowohl als *Bait* als auch als *Prey* verwendet (siehe Tabelle 3.16). Untersucht wurde eine mögliche Interaktion mit dem C-Terminus und dem 3ICL von HE6 (AF538954) und ME6 (AF538952). Es konnte jedoch weder für das humane und murine Profilin IV noch für die Profile II und III eine Interaktion mit dem C-Terminus oder dem 3ICL des HE6-/ME6-Rezeptors gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass der HE6-Rezeptor keine direkte Interaktion mit den Profilinen eingeht und bestätigt, dass es sich bei der im Y2H-Screen detektierten Interaktion mit Profilin IV um eine falsch positive Bindung handelte.

Da es sich jedoch bei dem Profilin IV um eine bisher unbekannte Profilin-Isoform handelt, wurde dieses im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht.

### 3.5 Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Profilin-Familie

Im Vergleich zu somatischen Geweben weist der Hoden der Säugetiere, einschließlich des Menschen, ein ungewöhnlich komplexes Muster der Profilin-Expression auf. Neben den beiden Profilinen I und II, ist hier das Profilin III zu finden, welches ausschließlich in den Keimzellen exprimiert ist [Hu *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002; Obermann *et al.*, 2005]. Auch für das im *Yeast Two-Hybrid*-Screen mit dem HE6-C-Terminus als *Bait* entdeckte Profilin IV, konnte als Hauptexpressionsort in allen untersuchten Spezies (Mensch, Ratte und Maus) ebenfalls der adulte Hoden ausgemacht und eine Lokalisation des Proteins in den Keimzellen beobachtet werden [Obermann *et al.*, 2005]. Durch Datenbankrecherche konnte für Ratte, Maus und Mensch inzwischen in *Expressed sequence tags* (ESTs) aus Testis eine zusätzliche, X-chromosomal lokalisierte Profilin-ähnliche-Sequenz, (Profilin V genannt) entdeckt werden (siehe Abb. 1.10 C). Das neue Profilin V-Gen wurde noch nicht kloniert und näher charakterisiert, jedoch zeigen Sequenzanalysen, dass dieses ebenso wie das Testis-spezifische Profilin III aus einem intronlosen Gen besteht und aufgrund seiner Homologie in die Familie der Profiline eingliedert werden muss. Hierdurch erhöht sich die Zahl der bei Säugern beschriebenen Profilin-Gene auf fünf, aus denen durch alternatives Spleißen des PFN II-Gens sechs Profilin-Proteine resultieren. In Abbildung 3.10 ist eine *Pair-Distance*-Analyse der sechs Profilin-Isoformen des Säugers auf Aminosäure-Ebene am Beispiel der humanen Profiline gezeigt. Der Vergleich zeigt, dass die Profiline I, II III und V in eine gemeinsame Gruppe clustern. In dieser Gruppe weist das neue PFN V die geringste Homologie zu den anderen Profilinen auf und bildet einen eigenen Zweig. Profilin IV weist insgesamt mit nur durchschnittlich 23 % die geringste Homologie zu den anderen Profilinen auf und clustert in eine separate Gruppe.



**Abb. 3.10: Pair-Distance-Analyse der humanen Profiline auf Aminosäure-Ebene nach der Clustal-Methode mit dem Programm MegAlign (DNASTar).** (A) Phylogenetischer Baum, (B) Homologien zwischen den Profilinen in %, (C) PFN V ESTs aus Ratte, Maus und Mensch.

### 3.6 Synthese der Testis-exprimierten Profiline III und IV in der Ontogenese

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das komplexe Muster der Profilin-Expression im Testis und in den Keimzellen der Säuger näher betrachtet werden. Um Hinweise auf mögliche Funktionen der Profiline während der Spermatogenese, insbesondere bei der Spermiogenese, zu erhalten, wurde die zeitliche und Entwicklungs-abhängige Expression sowie die zelluläre und subzelluläre Lokalisation der Profiline im männlichen Genitaltrakt der Säuger auf mRNA und Protein-Ebene

untersucht. Vor allem die Zelltyp- und Stadien-spezifische Expression der Testis-exprimierten Profiline III + IV während der Spermatogenese in den Keimzellen sollte näher beleuchtet werden. Die Analyse der mRNA-Expression der Testis-exprimierten Profiline III und IV erfolgte in den veröffentlichten Studien hauptsächlich durch Northern-Blot-Analysen und *in situ*-Hybridisierungen [Hu *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002, Obermann *et al.*, 2005]. In vorliegender Arbeit wurde die mRNA-Expression der Profiline im NagermodeLL in verschiedenen Geweben und in einer post-natalen Entwicklungsreihe des Hodens sowie human bei unterschiedlichen Spermatogenesestörungen durch die empfindlichere (RT)-PCR-Analyse untersucht. Durch PCR-Amplifikation der Profilin-mRNAs mit jeweils spezifischen Primern (Tabelle 2.4 und 2.7) konnten die Expressionsmuster aller fünf Profiline ermittelt und miteinander verglichen werden.

Auf Protein-Ebene wurde das Expressionsmuster der Profiline durch Western-Blot-Analyse mit Profilin-spezifischen Antikörpern (Tabelle 2.22) ebenfalls in verschiedenen Geweben, einer post-natalen Entwicklungsreihe des Ratten-Hodens sowie bei unterschiedlichen Spermatogenesestörungen des Menschen untersucht. Die Spezifität und Funktionalität der verwendeten Profilin-Antikörper im Western-Blot wurde zuvor mit *in vitro* translatierten Profilinen und Gewebelysaten getestet. Da für das neue Profilin V bisher noch keine Antikörper generiert wurden, konnte die Expression und Lokalisation dieses Profilins auf Protein-Ebene nicht untersucht werden.

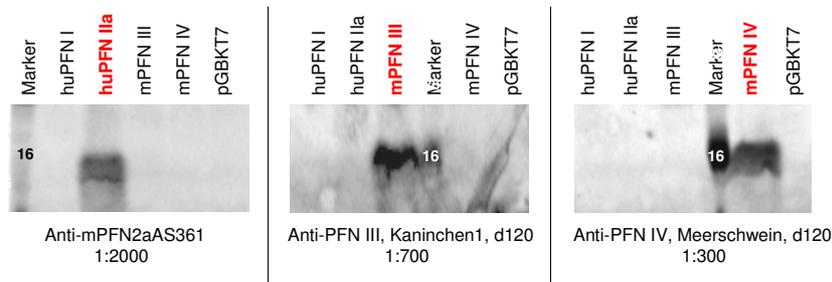
Zur Analyse der genauen zellulären und subzellulären Lokalisation der Profiline in den Keimzellen kam die Methode der Immunocytochemie zum Einsatz. Die Stadien-spezifische Expression und subzelluläre Lokalisation der Profiline in den Keimzellen wurde anhand von Laser-konfokalen Mikroskopbildern dokumentiert.

### 3.6.1 Profilin-Antikörper und ihre Spezifität im Western-Blot

Für die Detektion der Profiline in Western-Blots und Immunocytochemie standen die in Tabelle 2.22 aufgeführten Profilin-Antikörper zur Verfügung. Bei den PFN III und PFN IV-Antikörpern handelt es sich um polyklonale Antiseren, die durch Immunisierung von Kaninchen bzw. Meerschwein mit einem chemosynthetischen Profilin-Oligopeptid gewonnen wurden (Pineda-Antikörper Service). Vor Durchführung der Western-Blot-Analysen zur Ermittlung der Profilin-Expressionsmuster wurden die Antikörper auf ihre Spezifität und Funktionalität bei dieser Methode getestet.

#### 3.6.1.1 Western-Blot-Analyse mit *in vitro* translatierten Profilinen

Zur Analyse der Spezifität der Profilin-Antikörper wurden die Profiline I bis IV in den Expressionsvektor pGBKT7 kloniert und mit dem TNT®-T7 *Quick Coupled Transcription, Translation System in vitro* translatiert. Jeweils 4 µl der *in vitro* translatierten Profiline, wurden per SDS-PAGE in einem 10 % Acrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membranen wurden anschließend über Nacht bei 4°C mit den Profilin-Antikörpern inkubiert. Die Detektion und Visualisierung der Antikörper-markierten Profiline erfolgte über Cy5-konjugierte Zweitantikörper (1:500) und mit dem Fluoroimager Storm™860. In Abbildung 3.11 sind die Western-Blot-Analysen mit den *in vitro* translatierten Profilinen zur Ermittlung der Spezifität der Profilin-Antikörper dargestellt. Vorweg sei erwähnt, dass die *in vitro* translatierten Profiline aufgrund des angefügten *c-myc-tag* bei Expression aus dem Vektor pGBKT7 bei ca. 16kDa statt 14 kDa bandieren sollten.

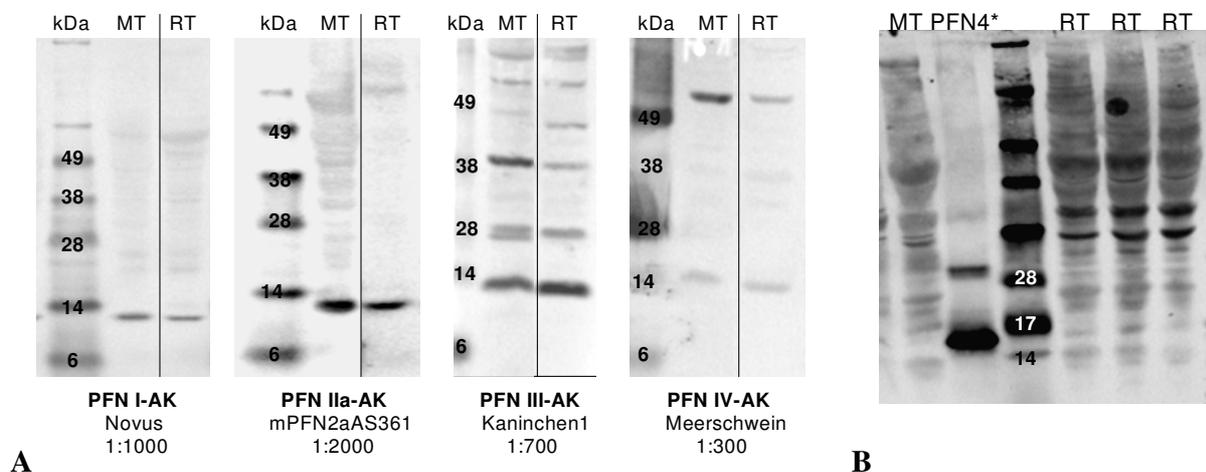


**Abb 3.11: Western-Blot-Analysen mit *in vitro* translatierten Profilinen zur Ermittlung der Spezifität der Profilin-Antikörper.** Die Detektion und Visualisierung der Antikörpermarkierten Profiline erfolgte über Cy5-markierte Zweitantikörper (1:500).

Wie zu erkennen ist, konnte mit dem jeweiligen Profilin-Antiseren im Western-Blot eine ca. 16 kDa große Proteinbande bei der entsprechenden Profilin-Isoform detektiert werden, so dass davon auszugehen ist, dass die verwendeten Antikörper die jeweils spezifischen Profiline erkennen. Es fiel jedoch auf, dass die Profilin III- und IV-Antikörper, im Unterschied zum PFN II-Antikörper, neben der Profilinbande bei ca. 16 kDa unspezifisch weitere Proteine markieren (siehe Abb. 3.11).

### 3.6.1.2 Western-Blot-Analyse von Testis-Lysaten

Um zu kontrollieren, ob die Profilin-Antikörper auch auf Gewebelysaten spezifische Signale geben, in denen die Profiline nicht so konzentriert wie in *in vitro*-Translationsansätzen und zudem modifiziert und evtl. anders gefaltet vorliegen, wurden Western-Blot-Analysen mit Gewebelysaten durchgeführt. Da sowohl für PFN III als auch PFN IV Expression im Testis der Nager beschrieben ist [Obermann *et al.*, 2005], wurden zur Analyse der Funktionalität der Antikörper je 80 µg Maus- und Ratten-Testis-Lysat per SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblotet und diese anschließend für die immunologische Detektion mit den Profilin-Antikörpern verwendet. In Abbildung 3.12A ist das Ergebnis der Western-Blot-Analysen dargestellt.



**Abb. 3.12: Western-Blot-Analyse zur Funktionalität der Profilin-Antikörper auf Testis-Lysaten.** (A) Detektionsmuster der Profilin I, IIa, III und IV; (B) Detektionsmuster des PFN IV-AK. Die Detektion und Visualisierung der Antikörpermarkierten Profiline I bis III erfolgte über Cy5-markierte Zweitantikörper (1:500). Der PFN IV-Western-Blot wurde unter nativen Bedingungen durchgeführt und die Detektion des Antikörpermarkierten PFN IV erfolgte mit dem ECL-Plus-System. MT: Maus-Testis, RT: Ratten-Testis, AK: Antikörper, PFN4\*: PFN IV mit His-tag.

Mit den Profilin I, II bzw. III-spezifischen Antikörpern konnten deutliche Proteinbanden bei ca. 14 kDa detektiert werden, wobei der Profilin III-Antikörper zusätzlich unspezifische Proteinbanden bei ca. 28 und 38 kDa sowie im höhermolekularen Bereich lieferte. Der Profilin IV-Antikörper markierte recht schwache Proteinbanden bei ca. 14 kDa, bei denen es sich wahrscheinlich um PFN IV handelt. Jedoch sind die Western-Blot-Analysen mit dem PFN IV-AK mit Vorsicht zu interpretieren, da dieser bei der Detektion in Gewebelysaten generell Probleme bereitet. Der Antikörper markierte insgesamt im Lysat zwar mehrere Proteinbanden, jedoch waren diese vor allem im niedermolekularen Bereich von 14-17 kDa oft so schwach, dass sie nicht als spezifisch

angesehen wurden. In Abb.3.11B ist exemplarisch ein typisches Detektionsmuster des Profilin IV-AK gezeigt. Wie zu erkennen ist, konnte hochkonzentriertes, rekombinant exprimiertes PFN IV mit *His-tag* (ca. 16 kDa) von dem AK eindeutig markiert werden. In den Testis-Lysaten jedoch sind im Bereich der nativen Profiline bei ca. 14 kDa nur sehr schwach markierte Proteinbanden zu erkennen, die nicht als eindeutiges Signal angesehen wurden. Auch durch die Verwendung sensitiverer Detektionssysteme, wie dem ECL-Plus-System, Auftragen größerer Proteinmengen oder durch den Einsatz verschiedener Gelsysteme und Laufpuffer (nativ, denaturierend) konnten oft keine Verbesserungen erzielt werden. Abbildung 3.11 zeigt einen Western-Blots, in dem eine Profilin-Bande zwar schwach, aber eindeutig markiert werden konnte. Generell bleibt festzuhalten, dass der Profilin IV-AK aufgrund schwacher und nicht eindeutiger Markierungen nicht für Western-Blot-Analysen geeignet schien. Die Ursachen hierfür können vielfältig sein. Bei dem verwendeten PFN IV-AK handelt es sich um ein Antikörper-Serum aus Meerschwein, das nur spezifisch ein Epitop erkennt. So besteht z.B. die Möglichkeit, dass der AK durch unvollständige Renaturierung des PFN IV beim Blotten oder aufgrund einer Proteinfaltung des nativen Profilins, die das Epitop verbirgt, nicht in der Lage ist, Profilin IV aus Gewebelysaten mit ausreichend starker Affinität im Western-Blot zu markieren.

Die im Folgenden gezeigten Western-Blot-Analysen wurden allesamt mit den hier getesteten Profilin-Antikörpern durchgeführt. Aufgrund der durchgeführten Tests lässt sich sagen, dass die AK für PFN I, II und III, auch in Gewebelysaten, spezifisch die jeweiligen Profiline erkennen.

### 3.6.2 Die Testis-exprimierten Profiline III und IV im Nagermodell

#### 3.6.2.1 Gewebe-spezifische Expression der Profiline

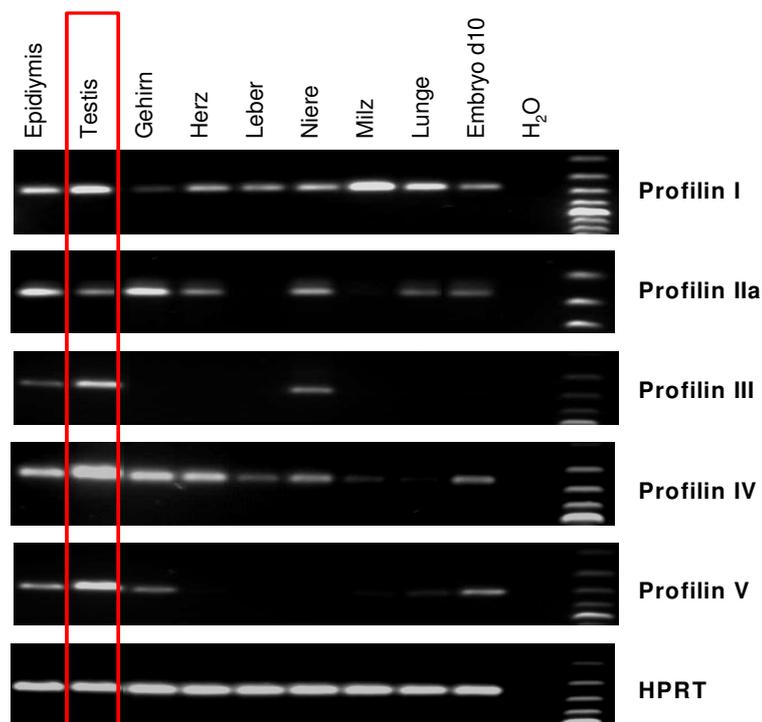
Zunächst wurde zur Kontrolle bereits beschriebener Profilin-Expressionsmuster sowie zur Analyse der Expression des neuen Profilin V die Gewebe-spezifische Verteilung der Profilin-mRNAs im Nagermodell durch RT-PCR untersucht. Analysiert wurde die Expression der Profiline in Nebenhoden, Testis, Gehirn, Herz, Leber, Niere, Milz und Lunge adulter Mäusen, aus denen RNA extrahiert und cDNA, als Template für die PCR, synthetisiert wurde. Aus den gleichen Geweben wurden Gewebelysate hergestellt, um durch Western-Blot-Analysen die Gewebe-Verteilung der Profilin-Proteine zu untersuchen.

##### 3.6.2.1.1 Transkript-Ebene

In Abbildung 3.13 sind die Ergebnisse der RT-PCR-Analyse zur Gewebe-spezifischen Profilin-Expression bei der Maus im Agarosegel dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der Hoden der Säuger im Vergleich zu somatischen Geweben ein ungewöhnlich komplexes Muster der Profilin-Expression aufweist. Im Gegensatz zu allen anderen getesteten Geweben zeigt lediglich dieses Gewebe eine deutliche Expression aller fünf Profilin-mRNAs.

Für die Profiline I und II konnten die bekannten Expressionsmuster per RT-PCR bestätigt werden: Profilin I ist ubiquitär in allen Geweben exprimiert [Witke *et al.*, 2001], Profilin IIa hauptsächlich in Gehirn und Nebenhoden sowie unterschiedlich stark/schwach in den anderen Geweben [Honore *et al.*, 1993, Lambrechts *et al.*, 2000]. Mit PFN III-spezifischen Primern konnte ein PCR-Produkt im Nebenhoden, Testis und in der Niere detektiert werden. Das Signal in der Niere ist jedoch nicht auf Transkription des Profilin III-Gens zurückzuführen, sondern resultiert aus dem Transkript des *slc34a1*-Gens (kodiert für einen Natrium-abhängigen Phosphatase-Transporter) welches in seiner 3'UTR die Profilin III-Sequenz in *antisense*-Orientierung enthält [Braun *et al.*, 2002]. Somit

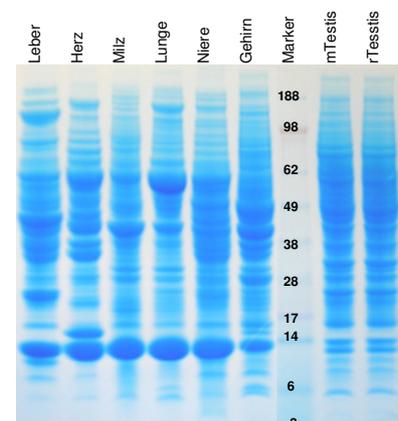
konnte für Profilin III eine spezifische Expression im männlichen Genitaltrakt der Säuger bestätigt werden, wobei die Expression im Hoden überwiegt und im Nebenhoden recht gering ist. Hauptexpressionsort der Profilin IV mRNA ist ebenfalls der adulte Hoden. Im Unterschied zu den von Obermann *et al.* (2005) durchgeführten Northern-Blot-Analysen scheint das Transkript jedoch nicht auf den männlichen Genitaltrakt begrenzt zu sein. Durch die empfindlichere RT-PCR-Methode konnte die PFN IV mRNA, wenn zum Teil auch nur schwach, in allen getesteten Geweben nachgewiesen werden. Der Hoden stellt aber den Hauptexpressionsort dar. Auch bei der neu entdeckten Profilin V-Sequenz scheint es sich um ein hauptsächlich im Testis exprimiertes Transkript zu handeln. Ähnlich dem Profilin IV zeigt es zusätzlich Expression im Gehirn und sehr schwach in der Lunge und der Milz, jedoch nicht in Herz, Leber und Niere. Alle Profiline, bis auf das Testis-spezifische Profilin III, werden bereits im frühen Embryo (d 9/10) transkribiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle fünf Profiline auf RNA-Ebene im Hoden exprimiert werden, die Profiline III, IV und V jedoch überwiegend oder sogar ausschließlich in diesem Organ.



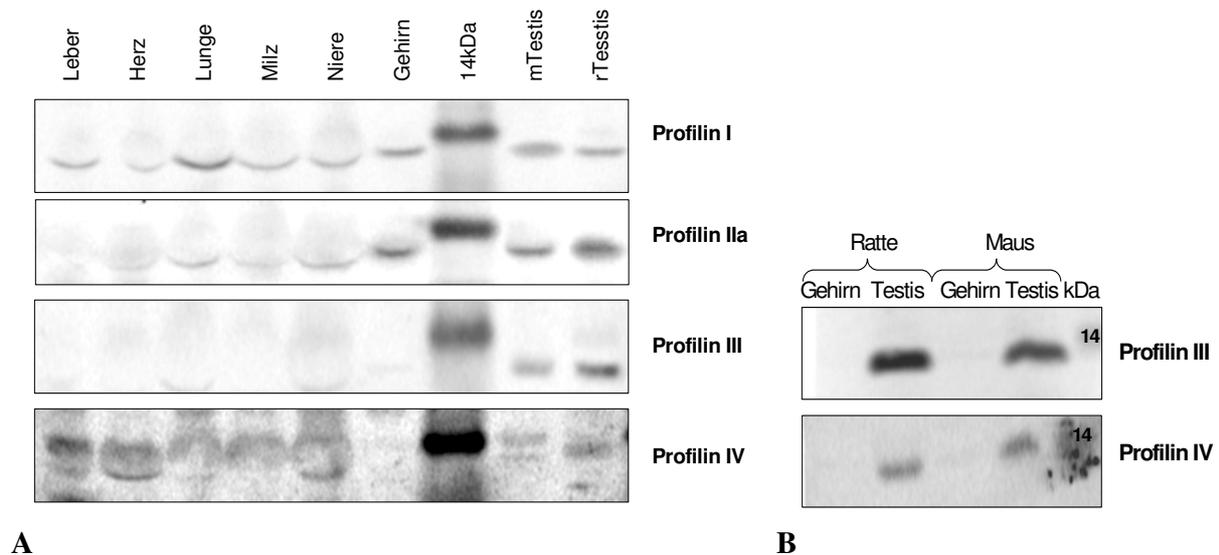
**Abb. 3.13: RT-PCR-Analyse zur Gewebe-spezifischen Profilin-Expression am Beispiel der Maus.** Gezeigt ist die Agarosegel-Elektrophorese, in der jeweils 5 µl der RT-PCR-Ansätze aufgetrennt wurden. Die rote Umrandung hebt die im Testis detektierten Transkripte hervor.

### 3.6.2.1.2 Protein-Ebene

Wie in Abb. 3.14 an einem Coomassie-gefärbten Proteingel zu erkennen ist, konnten aus allen Geweben erfolgreich Lysate mit einer repräsentativen und gleichmäßigen Proteinverteilung von 6-190 kDa hergestellt werden. Für die Western-Blot-Analysen wurden jeweils 80 µg Gesamtprotein eingesetzt.



**Abb. 3.14: SDS-PAGE-Analyse der Gewebelysate.** Dargestellt ist das Coomassie-Blau-gefärbte Proteingel nach SDS-PAGE. Aufgetragen wurden jeweils 80 µg Gewebelysate



**Abb. 3.15: Western-Blot-Analyse mit Profilin-Antikörpern zur Gewebe-spezifischen Profilin-Expression im Nagermode.** (A) Expression der Profile I bis IV in verschiedenen Geweben der Ratte, (B) Expression der Profile III und IV in Gehirn und Testis bei Ratte und Maus; aufgetragen wurden jeweils 80 µg Gesamtprotein. Die Detektion der Profile erfolgte mit folgenden Antikörpern: Profilin I: polyklonaler Profilin-AK (Novus) 1:1000, Profilin IIa: Anti-mPFN2aAS361, 1:2000, Profilin III: PFN III-AK aus Kaninchen, d120, 1:700, Profilin IV: PFN IV-AK aus Meerschwein, d120, 1:300. Die Visualisierung der Antikörper-markierten Profile erfolgte über Cy5-markierte Zweitantikörper (1:500).

In Abbildung 3.15 ist das durch Western-Blot ermittelte Expressionsmuster der Profile in den verschiedenen Geweben gezeigt. Profilin I konnte analog zur PCR-Analyse im Testis und in allen anderen Geweben nachgewiesen werden. Profilin IIa zeigt in der Western-Blot-Analyse starke Expression im Gehirn und im Testis. In den anderen Geweben konnte entweder ein sehr schwaches oder gar kein Profilin IIa-Signal detektiert werden. Für Profilin III konnte auf Protein-Ebene eine Testis-spezifische Lokalisation gezeigt werden. Außer im Hoden wurde in keinem anderen Gewebe, auch nicht der Niere, ein Signal detektiert. Profilin IV konnte durch schwach markierte Proteinbanden bei ca. 14 kDa ebenfalls im Hoden nachgewiesen werden. Zur Profilin IV-Synthese in den anderen Geweben lassen sich jedoch keine definitiven Aussagen machen, da bei diesen mit dem PFN IV-AK im Western-Blot keine eindeutigen Proteinbanden markiert werden konnten. Aufgrund der etwas stärkeren Proteinbanden in Leber, Herz und Niere könnte ein Vorkommen des Profilin IV-Proteins in diesen Geweben vermutet werden. Im Gehirn konnte keine Proteinbande detektiert werden, so dass zu vermuten ist, dass PFN IV hier nicht synthetisiert ist. Die Expression der Profile III und IV in Gehirn und Testis bei Ratte und Maus wurde in einem weiteren Western-Blot untersucht (Abb. 3.15B). Hier zeigte sich, dass Profilin IV, obwohl als Transkript nachgewiesen, auf Protein-Ebene scheinbar nicht im Gehirn lokalisiert ist. Die Proteine konnten übereinstimmend mit Obermann *et al.* (2005) nur im Testis detektiert werden. Jedoch ist für PFN IV zu berücksichtigen, dass der Antikörper nicht optimal ist, so dass eine Profilin IV-Expression im Gehirn nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassend ergibt sich, dass der Hoden der Säuger im Vergleich zu somatischen Geweben ein ungewöhnlich komplexes Muster der Profilin-Expression aufweist. Ebenso wie auf RNA-Ebene sind auch auf Protein-Ebene zusätzlich zu den bekannten Profilen I und II, Profilin III ausschließlich und Profilin IV scheinbar hauptsächlich in diesem Organ lokalisiert. Die Expression des neuen Profilin V auf Protein-Ebene bleibt zu untersuchen.

### 3.6.2.2 Entwicklungs-abhängige Expression der Profiline

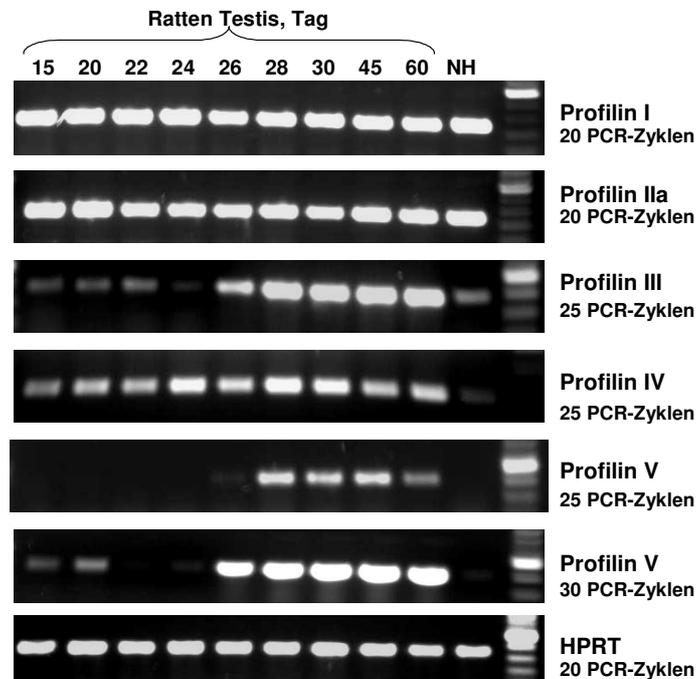
Die Entwicklungs-abhängige Expression der Testis-exprimierten Profiline während der Spermatogenese wurde in einer post-natalen Entwicklungsreihe des Ratten-Hodens von Tag 15 bis 60 untersucht. In diesem Zeitraum findet die erste Welle der Spermatogenese statt, die bei der Ratte so gut erforscht ist, dass das Auftreten spezifischer Keimzellstadien durch den zeitlichen Ablauf definiert werden kann [Malkov *et al.*, 1998]. In Tabelle 3.8 sind der zeitliche Ablauf und die korrelierenden Keimzell-Entwicklungsstufen der Ratten-Spermatogenese dargestellt.

Tag	Auftreten definierten Keimzell-Stadien	Periode
6-7	Spermatogonien und somatische Zellen	Wachstum und Vermehrung
11-12	Primäre Spermatozyten	
13-14	Leptotän Spermatozyten	Reifung (Meiose)
17-18	Zygotän Spermatozyten	
19-20	Frühe Pachytän Spermatozyten	
22-23	Späte Pachytän Spermatozyten	
24-25	Runde Spermatiden	Spermiogenese
30-31	Elongierende Spermatiden	
36-37	Elongierte Spermatiden	
42-60	Testikuläre Spermatozoen	
45	Erste Spermien im Epididymis	

**Tabelle 3.8** Zeitlicher Ablauf der Spermatogenese mit dem korrelierten Auftreten definierte Keimzell-Stadien bei der Ratte [modifiziert nach Malkov *et al.*, 1998].

#### 3.6.2.2.1 Transkript-Ebene

Zunächst wurde die Expression während der post-natalen Entwicklung im Testis auf mRNA-Ebene durch semiquantitative PCR untersucht. Zur Amplifikation der Ratten-Profiline wurden die in Tab. 2.3 aufgelisteten Primer verwendet und ein PCR-Programm mit 20-25 Zyklen gefahren, um nicht in den Bereich der Sättigung zu gelangen. In Abbildung 3.16 ist die gelelektrophoretische Analyse der PCRs dargestellt.



**Abb. 3.16:** PCR-Analyse zur Entwicklungs-abhängigen Expression der Profiline im post-natalen Ratten-Hoden, d 15-60. Es wurden jeweils 5 µl der PCR-Ansätze aufgetragen. NH: Nebenhoden d60

Die Profiline I und II sowie das HPRT-Kontroll-Gen waren über die komplette Entwicklungsreihe gleichmäßig exprimiert. Es konnte keine Korrelation mit dem fortschreitenden Verlauf der Spermatogenese und dem Auftreten bestimmter Keimzell-Stadien beobachtet werden, so dass eine

somatische Expression angenommen werden kann. Im Unterschied dazu zeigen die Profile III und V entwicklungsabhängige Expressionsmuster, die unterschiedlich mit dem Verlauf der Spermatogenese korreliert sind. Bei Profilin IV ist diese Abhängigkeit schwach ausgeprägt.

Entsprechend den in Tab. 3.14 aufgeführten Entwicklungsstufen bei der Ratte deutet das Expressionsmuster der PFN III-mRNA auf eine postmeiotische Expression während der Spermio-genese hin. In der frühen Entwicklung von d 15 bis 24 ist die PFN III mRNA nur sehr schwach exprimiert und kaum zu detektieren. Die drastische Zunahme der mRNA von Tag 24 bis 28 korreliert mit dem Auftreten und der zunehmenden Anzahl an runden und elongierenden Spermatiden zu diesem Zeitpunkt, so dass eine Expression der PFN III mRNA vor allem in diesen Keimzellstadien angenommen werden kann. Das relativ konstant bleibende PCR-Signal von Tag 45 bis 60 lässt vermuten, dass in elongierten und reifen Spermatiden keine mRNA-Expression mehr stattfindet. Im adulten Nebenhoden, in den nach ca. 45 Tagen die ersten testikulären Spermien freigesetzt werden, ist das Expressionssignal zudem so gering, so dass angenommen werden muss, dass reife Spermien nur noch in sehr geringem Maße PFN III-mRNA enthalten.

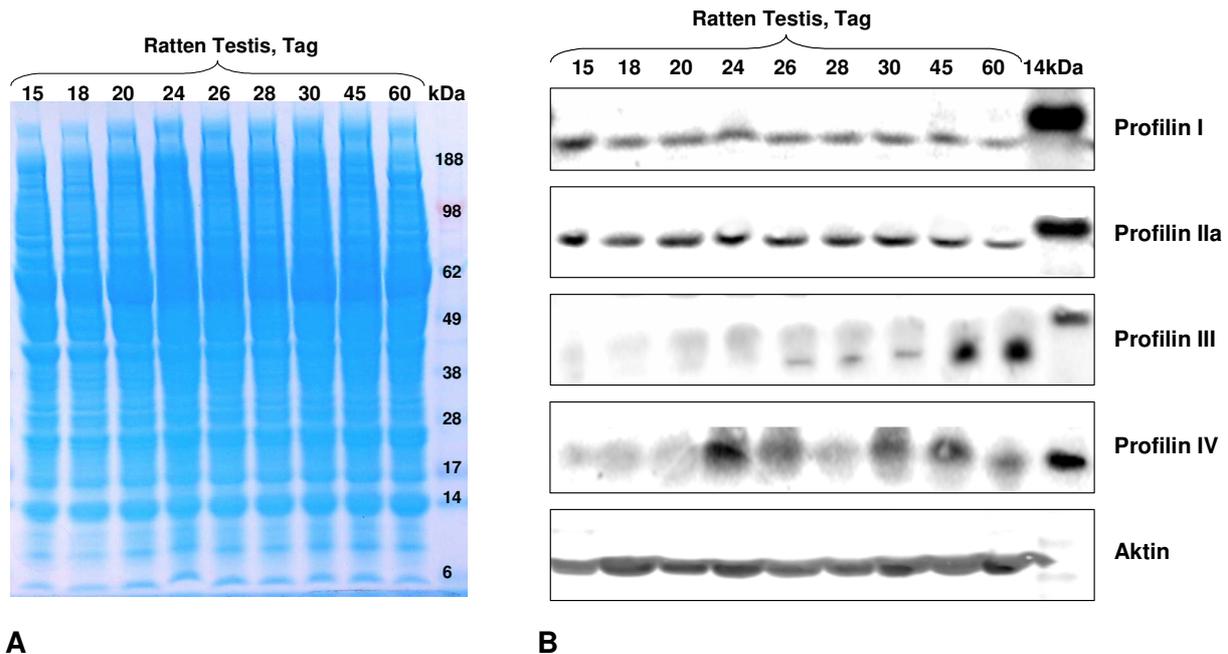
Für die Profilin IV-mRNA konnte ebenfalls ein Entwicklungs-abhängiges Expressionsmuster gezeigt werden, das mit dem Fortschreiten der Spermatogenese korreliert ist, sich jedoch von der PFN III-Expression unterscheidet. Am stärksten ist die Expression von Tag 24 bis 30 ausgeprägt. Davor und danach ist das PFN IV-Transkript deutlich reduziert. Die Profilin IV-mRNA ist somit im Vergleich zu PFN III bereits während der Meiose in diploiden Spermatozyten und insgesamt während eines längeren Zeitraums exprimiert. Die verstärkten Signale zwischen Tag 24-30 deuten darauf hin, dass die PFN IV-mRNA jedoch wie Profilin III vor allem post-meiotisch während der Spermio-genese in haploiden runden und elongierenden Spermatiden exprimiert ist.

Für die Profilin V-mRNA konnte ein Expressionsmuster, das stark mit dem des PFN III-Transkripts übereinstimmt, ermittelt werden. Wie PFN III ist die PFN V-mRNA hauptsächlich postmeiotisch während der Spermio-genese von Tag 26/28 bis 60 in haploiden Spermatiden exprimiert. Jedoch ist zu beachten, dass das PFN V-Signal im Vergleich zu PFN III, bei gleicher PCR-Zykluszahl (25) sehr schwach ist. Mit 30 PCR-Zyklen konnten jedoch deutliche PFN V-Signale, die mit Beginn und dem Verlauf der Spermio-genese (d26-60) korrelieren, detektiert werden. Von Tag 15-24 hingegen sind bei 25 PCR-Zyklen keine bzw. bei 30 PCR-Zyklen nur sehr schwache Signale vorhanden, so dass keine bzw. nur eine sehr eingeschränkte Expression der PFN V-Transkripte während der Meiose angenommen werden kann. Dieses Expressionsmuster des X-chromosomal-lokalisierten PFN V-Gens ließe sich durch die Inaktivierung des X-Chromosoms in männlichen Keimzellen während der Meiose erklären. Das ebenfalls sehr schwache Expressionssignal im Nebenhoden, deutet darauf hin, dass das PFN V-Transkript kaum noch in reifen Spermatiden vorhanden ist.

Die PCR-Analyse zeigte für die Profile III, IV und V ein Entwicklungs-abhängiges mRNA-Expressionsmuster, das mit dem Auftreten definierter Keimzellstadien assoziiert ist. Zwar erfolgte die Expression nicht immer gleichzeitig und zum Teil in sukzessiven Stadien, jedoch ist auffällig, dass alle drei Profilin-Transkripte während der Spermio-genese in Korrelation mit dem Auftreten runder und elongierender Spermatiden exprimiert sind, was für eine zentrale Rolle während der Spermien-Differenzierung spricht.

### 3.6.2.2.2 Protein-Ebene

In Abbildung 3.17B ist die Western-Blot-Analyse zur Entwicklungs-abhängigen Lokalisation der Profiline auf Protein-Ebene im post-natalen Hoden dargestellt. Wie am Coomassie-gefärbten Proteingel (Abb. 3.17A) und am Aktin-Kontrollblot zu erkennen ist, wurden gleiche Mengen an Protein aufgetragen, so dass davon auszugehen ist, dass die ermittelten Verteilungsmuster der Profiline der tatsächlichen Lokalisation während der Spermatogenese entsprechen. Für die Profiline I und II decken sich die Ergebnisse der PCR und der Western-Blot-Analysen. Beide Profiline sind sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene in allen Entwicklungsstadien des Hodens (von Tag 15-60) gleichmäßig exprimiert und zeigen keine Assoziation mit dem Verlauf der Spermatogenese.



**Abb. 3.17: Entwicklungs-abhängige Expression der Profilin-Proteine im post-natalen Ratten-Hoden, d 15-60.** (A) Coomassie-gefärbtes Gel nach SDS-PAGE der Ratten-Testis-Lysate, (B) Western-Blot-Analyse mit spezifischen Profilin-Antikörpern, Aufgetragen wurden jeweils 80 µg Gesamtprotein. Die Detektion der Profiline erfolgte mit folgenden Antikörpern: Profilin I: polyklonaler Profilin-AK (Novus) 1:1000, Profilin IIa: Anti-mPFN2aAS361, 1:2000, Profilin III: PFN III-AK aus Kaninchen, d120, 1:700, Profilin IV: PFN IV-AK aus Meerschwein, d120, 1:300. Die Visualisierung der Antikörper-markierten Profiline erfolgte über Cy5-markierte Zweitantikörper (1:500).

In der PCR-Entwicklungsreihe zeigte sich, dass die Profilin-III mRNA von Tag 15-24 nur sehr schwach und erst ab Tag 26 bis Tag 60 zunehmend stark exprimiert ist. Das Auftreten des Profilin III-Proteins korreliert mit diesem-Expressionsmuster: erst in der Phase der Spermiogenese, ab Tag 26, konnte Profilin III im Western-Blot detektiert werden und zeigte ab hier eine Korrelation mit dem Fortschreiten der Spermatogenese. Der Signalintensität der detektierten Proteinbanden zufolge ist das Profilin III-Proteins zwar bereits in haploiden runden und elongierenden Spermatiden vorhanden (schwaches Signal bei d 26-30), jedoch hauptsächlich in ausdifferenzierten, reifen Spermien lokalisiert (starke Proteinbanden bei d 45 und 60). Dies deutet darauf hin, dass Profilin III in Keimzell-Strukturen lokalisiert ist, die sich erst im Verlauf der Spermiogenese ab den runden Spermatiden entwickeln und in ausdifferenzierten Spermatiden erhalten bleiben.

Wie in Abb. 3.17 zu erkennen ist, konnten von Tag 15-60 Proteinbanden bei ca. 14 kDa detektiert werden, die dem Profilin IV zugeordnet werden könnten. Am deutlichsten ausgeprägt sind die Signale von Tag 24 bis 45/60, mit Ausnahme der schwachen Proteinbande bei Tag 28. Dies deutet auf ein Vorkommen des Profilin IV-Proteins während der Phase der Spermiogenese in haploiden Spermatiden hin, so dass auch für das Profilin IV-Protein eine Assoziation mit dem Verlauf der Spermatogenese angenommen werden kann.

Sowohl für Profilin III als auch Profilin IV kann aufgrund der gezeigten Western-Blot-Ergebnisse eine Entwicklungs-abhängige Korrelation mit der Spermatogenese angenommen werden. Beide Proteine treten vor allem während der Spermiogenese auf. Dieser Prozess beinhaltet drastische morphologische Veränderungen wie die zunehmende Kondensation und Verdichtung der DNA, die Reduktion des Zytoplasmas, die Bildung des Akrosoms sowie die Ausdifferenzierung des Flagellatums. Für diese Entwicklungen ist ein hochdynamisches Aktin-Zytoskelett erforderlich, bei dem die Profiline als bekannte Aktin-bindende Proteine eine wichtige Rolle spielen könnten.

### 3.6.3 Die Profiline im humanen Testis mit unterschiedlichen Spermatogenese-Stadien

#### 3.6.3.1 Transkript-Ebene

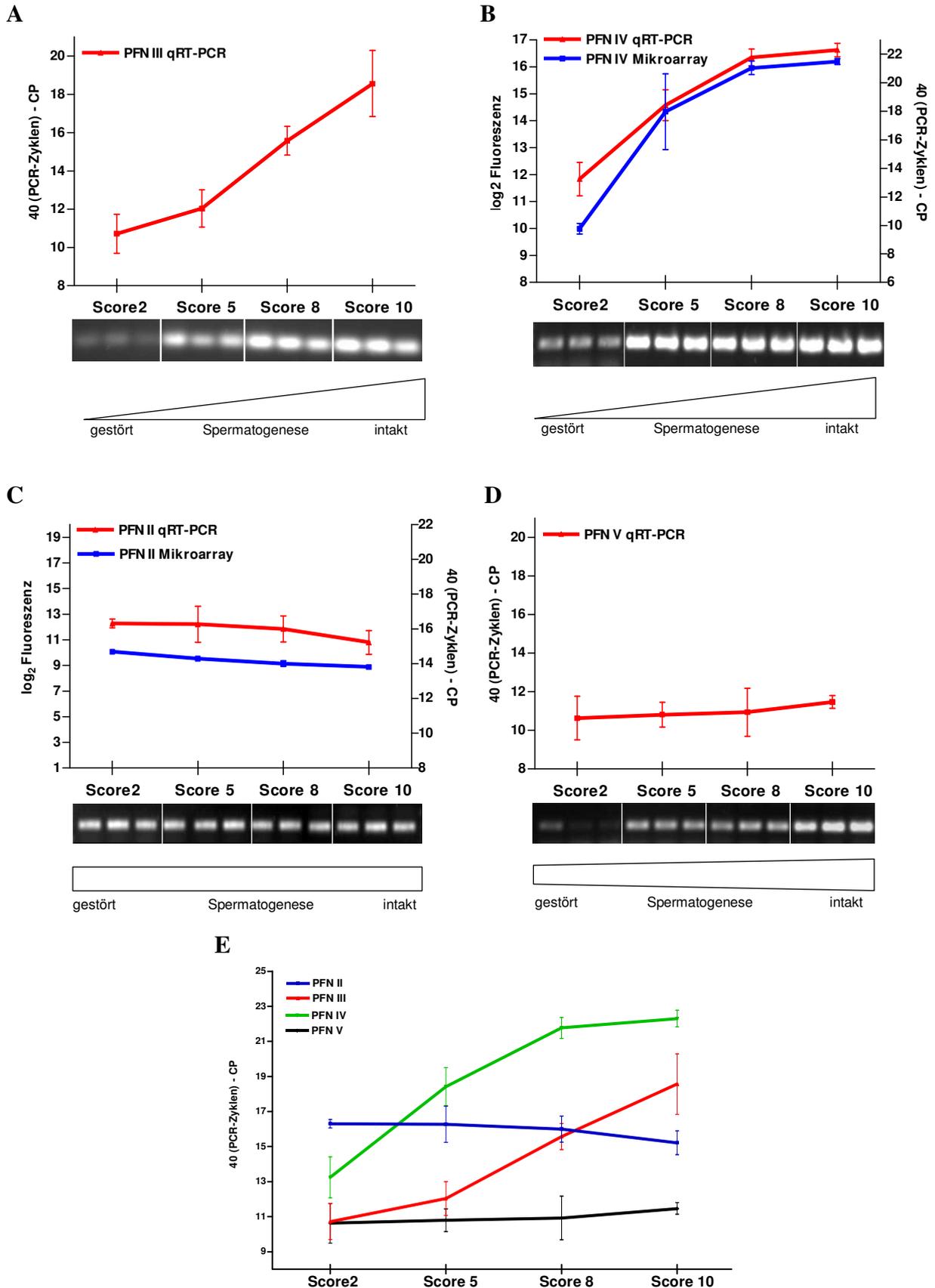
Die mRNA-Expression der Profiline im humanen Testis wurde durch quantitative RT-PCR untersucht. Hierfür standen von der Abteilung für Andrologie am UKE humane Testisproben zur Verfügung, deren Spermatogenese durch genaue histopathologische Untersuchungen beschrieben, quantifiziert und nach dem so genannten „Johnsen-Score“ klassifiziert wurden [Johnsen, 1970; cited in Schulze *et al.* 1999]. Für die RT-PCR wurden Testisgewebe mit *Sertoli cell only*-Syndrom (Score 2), Spermatogenese-arrest auf Stufe der Meiose (Score 5), Hypospermatogenese (Score 8) und intakter Spermatogenese verwendet, wobei pro Gruppe mindestens fünf individuelle humane Testisgewebe untersucht wurden. In Tabelle 3.9 sind die Spermatogenese-Stadien der verwendeten Johnsen Scores dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Scores durch das Hinzukommen jeweils spezifischer Keimzellstadien den Verlauf der Spermatogenese beschreiben: von gestört, über Meiose, Spermiogenese bis hin zu intakter Spermatogenese. Zwischen Score 8 und Score 10 besteht lediglich ein quantitativer Unterschied in der Keimzellpopulation.

**Tabelle 3.9: Klassifizierung der humanen Spermatogenese nach dem Johnsen-Score**

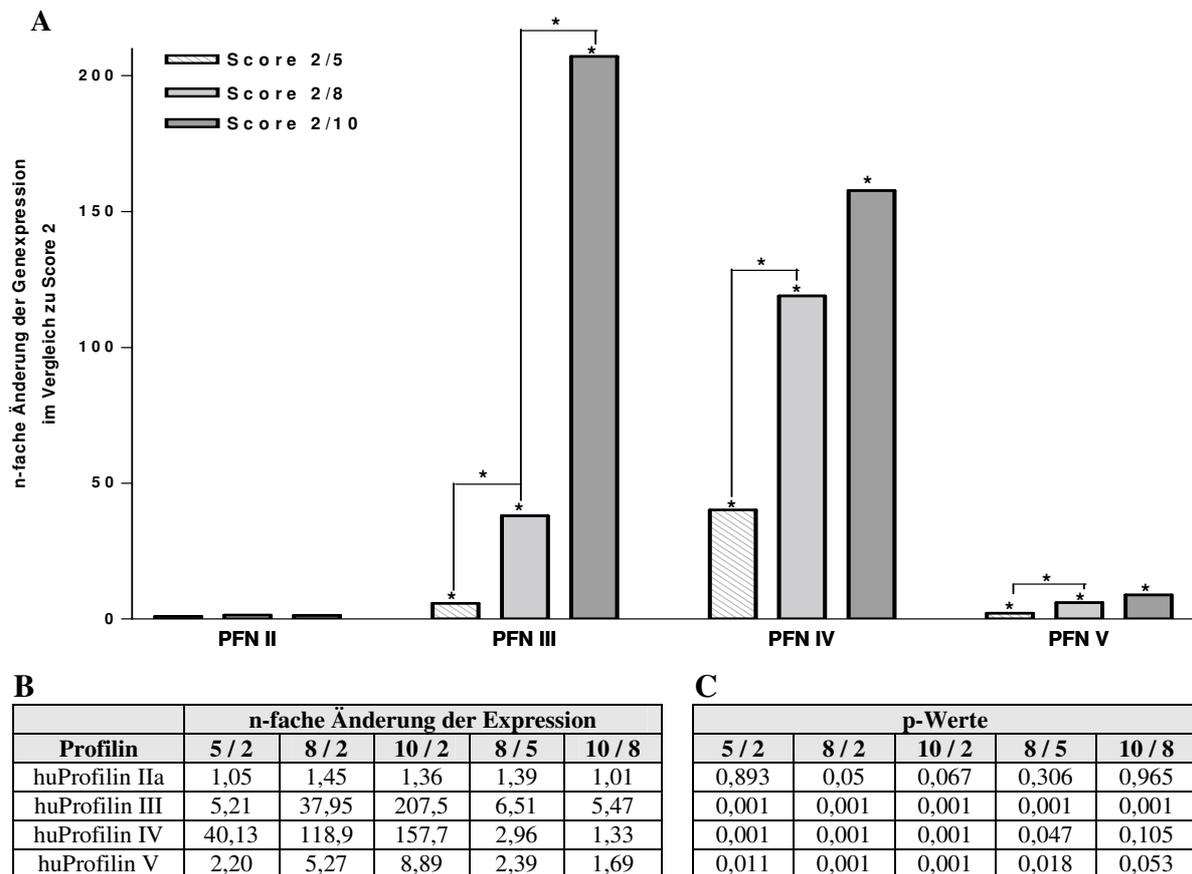
Johnsen-Score	Spermatogenese-Status	Vorhandene Keimzellstadien
2	<i>Sertoli cell only</i> -Symptomatik (SCO)	keine Keimzellen, nur Sertolizellen
5	Spermatogenese-arrest auf Stufe der Meiose	Spermatogonien, Spermatozyten
8	Hypospermatogenese	Spermatogonien, Spermatozyten, wenige runde Spermatisden, wenige elongierte Spermatisden
10	Intakte Spermatogenese	Spermatogonien, Spermatozyten, runde Spermatisden, elongierte Spermatisden

Die RT-PCR wurde unter standardisierten Bedingungen mit spezifischen Primern (Tabelle 2.7) durchgeführt. Über den CP-Wert wurde die relative Transkriptmenge in den Proben ermittelt. Je höher dieser Wert war, desto geringer war das Gen in der Probe exprimiert. Zur graphischen Darstellung wurde der CP-Wert für jede Probe von der Gesamtzahl der PCR-Zyklen (40 Zyklen) abgezogen, so dass sich die Zyklenzahl auf der Ordinate proportional zur Transkriptmenge verhält. Die relativen Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen wurden mit der REST-Software [Pfaffl, 2002] durch Normalisierung über das ribosomale Gen RPS27a quantifiziert.

In Abbildung 3.18A-D sind die ermittelten Expressionsverläufe der Profiline II, III, IV und V im humanen Testis der Score-Gruppen 2, 5, 8 und 10 dargestellt (rote Linie). Soweit vorhanden, wurden zusätzlich die Expressionsverläufe aus eine Mikroarray-Studie [Feig *et al.*, 2007] mit humanen Testisproben dieser Score-Gruppen dargestellt (blaue Linie). Abbildung 3.18E zeigt die RT-PCR-Expressionsprofile der Profiline in einem direkten Vergleich.



**Abb. 3.18: Quantitative RT-PCR-Analyse zur Expression der Profilin-mRNAs in humanen Testisbiopsien der Score - Gruppen 2, 5, 8 und 10.** (A) Expressionsprofil des Profilin III-Gens, (B) Expressionsprofil des Profilin IV-Gens, (C) Expressionsprofil des Profilin II-Gens, (D) Expressionsprofil des Profilin V-Gens; dargestellt sind jeweils die normalisierten Expressionsprofile aus der quantitativen RT-PCR (rote Linie) und soweit vorhanden die Expressionsprofile aus einer Mikroarray-Studie (blaue Linie); pro Score Gruppe wurden mindestens fünf individuelle Testisproben untersucht, (E) direkter Vergleich der RT-PCR-Expressionsprofile der fünf Profilin-Gene.



**Abb. 3.19:** n-fache Änderung der Expression der Profilin-Gene in humanen Testisproben der Score Gruppen 5, 8 und 10 im Vergleich zu Score 2; die quantitative Berechnung der n-fachen Expressionsänderung erfolgte mit Hilfe der REST-Software über Normalisierung des ribosomalen Gens RPS27A; (A) graphische Darstellung der n-fachen Expressionsänderung im Vergleich zu Score 2 (B) Datentabelle zur n-fachen Expressionsänderung, (C) zugehörige p-Werte; signifikante Expressionsunterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Scores sind durch \* markiert

Die quantitative Expressionsänderung der Profilin-Gene bei Hinzukommen von Spermatozyten (Score 5) bzw. Spermatisden (Score 8) sowie bei Zunahme der Spermatisden-Anzahl (Score 10) im Vergleich zum SCO-Syndrom ohne Keimzellen, ist in Abbildung 3.19 dargestellt. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen sind durch Sternchen markiert. Den Abbildungen ist auf den ersten Blick zu entnehmen, dass alle vier Profile unterschiedliche Expressionsverläufe aufweisen, d.h. während unterschiedlicher Spermatogenese-Stadien exprimiert werden.

Das Expressionslevel des PFN II-Transkripts zeigte zwischen den humanen Testisproben mit unterschiedlichen Spermatogenese-Stadien keine signifikanten Expressionsunterschiede. Es konnte keine Korrelation der mRNA mit dem Auftreten spezifischer Keimzelltypen, das heißt mit dem Verlauf der Spermatogenese beobachtet werden, so dass für das Profilin II-Gen eine somatische Expression angenommen werden muss.

Die Transkripte der Profilin-Gene III, IV und V zeigten allesamt einen Verlauf, der auf unterschiedliche Art und Weise mit dem fortschreitenden Verlauf der Spermatogenese (von Score 2 zu Score 10) korreliert ist. Für die Profilin III-mRNA konnte eine sehr starke Zunahme (207-fach) der Transkriptmenge von gestörter zu intakter Spermatogenese beobachtet werden. Dabei war die mRNA-Zunahme zwischen den einzelnen Scores zwar signifikant, jedoch nahm sie nicht von Score zu Score linear in gleichem Maße zu (Abb. 318A). Die stärkste Expressionsänderung konnte mit einer 6,5-fachen Steigerung zwischen Score 5 und 8 ermittelt werden, wobei zwischen Score 8 und 10 eine fast linear weiter fortlaufende Expressionszunahme (5,4-fach) beobachtet werden konnte. Die geringste Änderung der Transkriptmenge zeigte sich zwischen Score 2 und 5. Entsprechend den in Tabelle 3.15 aufgelisteten Spermatogenesestadien ergibt sich somit für PFN III eine

hauptsächlich post-meiotische Expression, die mit dem Auftreten haploider runder und elongierender Spermatiden in der Score-Gruppe 8 und der quantitativen Zunahme dieser Keimzellstadien in der Score 10 Gruppe assoziiert ist. In Spermatozyten (Score 5), das heißt während der Meiose, ist das PFN III-Transkript nur in geringem Ausmaße exprimiert. Die Expression des PFN III-Gens korreliert somit insgesamt zwar mit dem Verlauf der Spermatogenese, findet aber überwiegend post-meiotisch in der Spermiogenese statt.

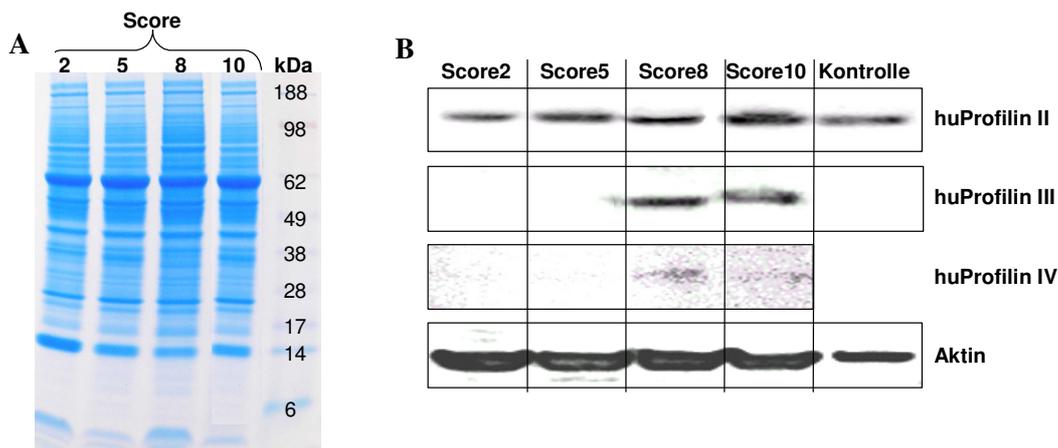
Die Expression der Profilin IV-mRNA ist ebenfalls mit dem Verlauf der Spermatogenese assoziiert (157-fache Zunahme von Score 2 zu 10), jedoch zeigt sich im Vergleich zu Profilin III ein anderes Expressionsprofil. So ist die stärkste Zunahme der Transkriptmenge (40-fach) zwischen Score 2 und 5, also im Zusammenhang mit dem Auftreten der Spermatogonien und Spermatozyten, zu beobachten. Während bei Profilin III der drastischste Expressionsunterschied post-meiotisch zwischen Score 5 und 8 verzeichnet wurde, konnte bei Profilin IV zwischen diesen beiden Score-Gruppen mit einer 2,9-fachen Steigerung zwar noch eine signifikante, aber im Vergleich zur Änderung zwischen Score 2 und 5 deutlich reduzierte Zunahme des Expressionslevels ermittelt werden. Zwischen den Score-Gruppen 8 und 10 konnte für das Profilin IV-Transkript keine signifikante Veränderung mehr gemessen werden. Das ermittelte Expressionsprofil zeigt, dass die Profilin IV-mRNA zwar wie PFN III auch post-meiotisch während der Spermiogenese exprimiert ist, jedoch findet die hauptsächlichliche Expression bereits prä-/meiotisch in Spermatozyten statt.

Wie in Abb. 3.19 gut zu erkennen ist, zeigte das Transkript des Profilin V-Gens eine deutlich schwächere Expression als die Transkripte der anderen vier Profilin-Gene. Jedoch konnte auch für PFN V eine signifikante Zunahme der Transkriptmenge von Score 2 nach Score 10 um das 8,9-fache und somit eine Korrelation mit dem Verlauf der Spermatogenese beobachtet werden. Zwischen den einzelnen Score-Gruppen konnten signifikante Expressionsunterschiede von Score 2 nach 5 und von Score 5 nach 8 gemessen werden, jedoch nicht von Score 8 nach 10. Die stärkste Zunahme der mRNA-Expression war von Score 5 nach 8 (2,39-fach) zu verzeichnen. Das Profilin V-Expressionsprofil deutet somit wie bei Profilin III auf eine hauptsächlich post-meiotische Expression während der Spermiogenese in haploiden Keimzellen hin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression der Profilin-Gene III, IV und V im humanen Testis auf unterschiedliche Art und Weise mit dem fortschreitenden Verlauf der Spermatogenese korreliert. In Abbildung 3.18E sind die distinkten Expressionsprofile im direkten Vergleich dargestellt. Für die Profile III und V konnte eine überwiegend post-meiotische Expression während der Spermiogenese in haploiden Keimzellen gezeigt werden, während die Transkription des Profilin IV-Gens hauptsächlich (prä-) meiotisch erfolgt. Profilin II ist somatisch exprimiert und zeigte keine Korrelation mit der Spermatogenese.

### 3.6.3.2 Protein-Ebene

Um die Expression der Profile im humanen Testis auf Protein-Ebene zu untersuchen wurden Western-Blot-Analysen mit Testis-Lysaten durchgeführt. Insgesamt wurden 25 individuellen Proben mit unterschiedlichen Spermatogenese-Stadien (von Score 2 bis 10) verwendet, so dass ebenso wie auf mRNA-Ebene die Profilin-Expression von gestörter bis hin zu intakter Spermatogenese betrachtet werden konnte. In Abbildung 3.20A ist exemplarisch ein Coomassie-gefärbtes Proteingel dargestellt, in dem jeweils 40 µg Gesamtprotein der Testis-Lysate der Score Gruppen 2, 5, 8 und 10 elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Abbildung 3.20B zeigt eine Western-Blot-Analyse mit Profilin II, III und IV-Antikörper auf humanen Testis-Lysaten dieser Score-Gruppen, welche die Ergebnisse der RT-PCR-Analyse reflektieren.



**Abb. 3.20: Expression der Profilin-Proteine im humanen Testis mit Spermatogenese der Score-Gruppen 2, 5, 8 und 10.** (A) Coomassie-gefärbtes Proteingel mit Testis-Lysaten, (B) Western-Blot-Analyse; eingesetzt wurden jeweils 80 µg Gesamtprotein; Score 2: keine Keimzellen, Score 5: Spermatogenese-Arrest auf Stufe der Meiose, Score 8: Hypospermatogenese, Score 10: intakte Spermatogenese, Kontrolle: Speicheldrüsen-Lysat.

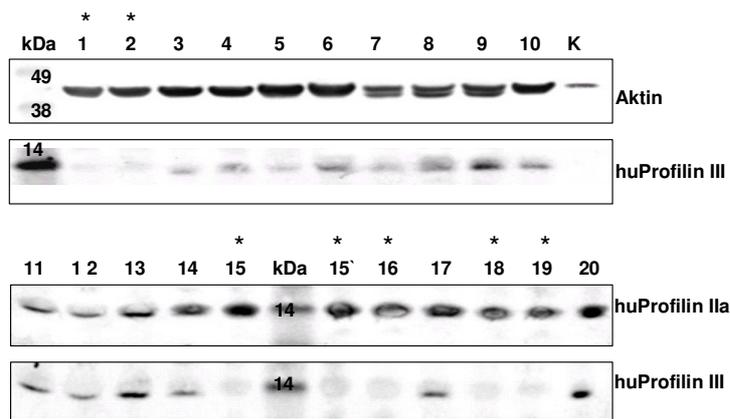
Profilin IIa konnte auch auf Protein-Ebene in allen Proben, von gestörter Spermatogenese bis hin zu intakter Spermatogenese, sowie in der Kontrollprobe (Schilddrüse) detektiert werden.

Profilin III zeigte auf Protein-Ebene eine Korrelation mit intakter Spermatogenese. Mit dem Profilin III-spezifischen Antikörper (PFN III, K1, d120, 1:500) konnten in der somatischen Kontrolle, in der Probe ohne Keimzellen (Score 2) sowie bei Spermatogenese-Arrest auf Stufe der Meiose (Score 5) keine Profilin-Banden markiert werden, so dass eine Lokalisation des Profilin III-Proteins in somatischen Zellen, Sertolizellen, Spermatogonien und Spermatozyten ausgeschlossen werden kann. Erst ab dem Stadium der Spermiogenese, gekennzeichnet durch das Auftreten von Spermatisiden in den Testisproben (Score 8 und 10), konnte in Korrelation zur mRNA-Expression das Profilin III-Protein deutlich detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass Profilin III post-meiotisch in Keimzell-Strukturen lokalisiert ist, die sich erst im Verlauf der Spermiogenese ab den runden Spermatisiden entwickeln.

Mit dem Profilin IV-Antikörper konnten keine zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden. Es konnten keine oder nur sehr schwache Proteinbanden bei ca. 14 kDa markiert werden, die jedoch aufgrund des schwachen Signals und des sehr viel höheren Hintergrundes nicht als spezifische Profilin-Banden angesehen werden konnten. In Abb. 3.20B ist ein solcher Profilin IV-Blot, bei dem schwache Signale bei 14 kDa markiert werden konnten, dargestellt. Bei den markierten Banden könnte es sich aufgrund des zu erahnenen Expressionsmusters um Profilin IV handeln. Wie bei Profilin III konnten 14-kDa-Proteinbanden lediglich bei intakter Spermatogenese, jedoch nicht bei gestörter Spermatogenese detektiert werden. Demnach wäre Profilin IV ebenfalls nicht somatisch oder prä- bzw. meiotisch, sondern wie Profilin III erst post-meiotisch ab der Phase der Spermiogenese lokalisiert. Jedoch waren die Profilin IV-Western-Blot-Analysen allesamt so unzufriedenstellend, dass dies nur vermutet werden kann.

Die Profilin III-Expression wurde insgesamt in 20 unabhängigen, individuellen Testisproben mit unterschiedlichen Spermatogenese-Stadien untersucht. Wie in Abbildung 3.21 zu erkennen ist, konnte durchweg in Proben mit intakter Spermatogenese (Score 8 und 10, Nr. 3-14, 17 und 20) ein Profilin III-Signal detektiert werden, in Proben mit gestörter Spermatogenese (Score 2 oder 5, Nr. 1, 2, 15, 16, 18, 19) hingegen nicht. Weiterhin konnte ein quantitativer Unterschied in der Signalintensität zwischen Proben der Score Gruppe 8 (Hypospermatogenese, Nr. 3, 5 + 7) und 10 (Nr. 6, 8, 9) beobachtet werden, der mit der zunehmenden Anzahl an Spermatisiden von Score 8

nach Score 10 korreliert. Im Vergleich dazu konnten die Kontrollproteine (Profilin IIa oder Aktin) gleichmäßig stark in allen Proben detektiert werden.



**Abb.3.21: Western-Blot-Analysen des Profilin III-Proteins in 20 individuellen Testisproben mit unterschiedlichen Spermatogenesestadien, \*** markieren Proben mit gestörter Spermatogenese (Score 2 oder 5), bei allen anderen Proben handelt es sich um intakte Spermatogenese (Score 8, 9 oder 10), K: Kontrolle (Speicheldrüse).

Die Western-Blot-Analysen zeigten für Profilin III und eingeschränkt auch für Profilin IV eine Korrelation mit der Phase der Spermiogenese, so dass für den Menschen ebenso wie im Nagerrmodell eine Lokalisation der beiden Proteine post-meiotisch in haploiden Spermatozyten angenommen werden kann. Bei stärker gestörter Spermatogenese wie *Sertoli cell only*-Syndrom oder Arrest auf Stufe der Meiose (Score 2 und Score 5) können die beiden Profile nicht mehr detektiert werden. Für das Profilin V konnten auf Protein-Ebene keine Versuche durchgeführt werden, da noch kein Antikörper existiert.

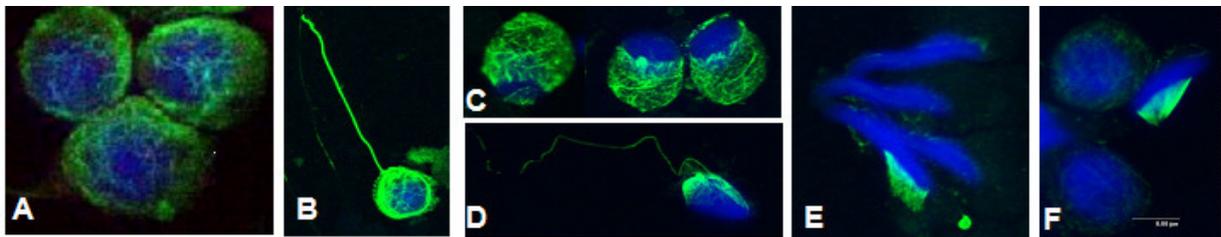
### 3.6.4 Untersuchung der zellulären und subzellulären Lokalisation der Testis-exprimierten Profile III und IV der Säuger durch Immunocytochemie

Die PCR- und Western-Blot-Analysen zeigten eine entwicklungs-abhängige Expression der Profile III und IV im humanen Testis während der Phase Spermiogenese in haploiden Spermatozyten. Für Profilin IV konnte zudem durch Immunhistochemie auf Testisschnitten bereits eine Keimzell-spezifische Lokalisation in runden und elongierenden Spermatozyten des Menschen und der Ratte gezeigt werden [Obermann *et al.*, 2005], wobei jedoch die subzelluläre Lokalisation noch nicht aufgeklärt wurde. Für das Profilin III-Protein wurden bisher keine Studien zur zellulären Lokalisation im Testis der Säuger durchgeführt. Zur Ermittlung der Stadien-Spezifität sowie der zellulären und subzellulären Lokalisation der Profile III und IV-Proteine in den männlichen Keimzellen der Säuger wurden daher im Rahmen dieser Arbeit immunocytochemische Untersuchungen auf Keimzellpräparaten durchgeführt. Zur Herstellung der Keimzellpräparate wurden adulte Rattenhoden oder humane Testisproben mit intakter Spermatogenese verwendet, da diese alle Keimzellstadien von Spermatozyten bis hin zu elongierten Spermatozyten, enthalten. Die immunocytochemische Detektion erfolgte indirekt über Profilin-Antiseren und fluoreszenzmarkierten Cy-Antikörper.

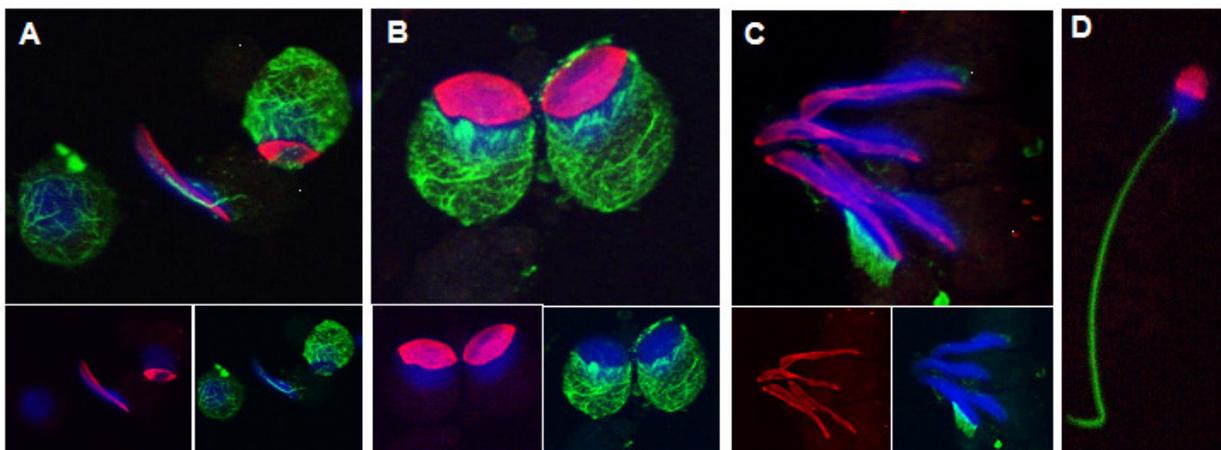
#### 3.6.4.1 Morphologie und Zytoskelett-Strukturen der Keimzellen im Verlauf der Spermatogenese

Im Verlauf der Spermatogenese, insbesondere während der Spermiogenese, werden die Keimzellen zu reifen Spermatozyten differenziert und erfahren drastische morphologische Veränderungen. Diese Differenzierung ist durch das Auftreten spezifischer Keimzelltypen (Spermatozyten, Spermatozyten und Spermatozyten) und Strukturen (z.B. transiente Manschette, Akrosom, Schwanz)

charakterisiert. Zur besseren Differenzierung der Keimzelltypen und für eine erste Analyse der Morphologie und Spermien-Strukturen wurden zunächst nur Studien mit Akrosomen-, Kern- sowie Aktin und Tubulin-Markierungen durchgeführt. Für die Kernfärbung wurde der klassische DNA-Farbstoff DAPI verwendet. Die Akrosomenmarkierung erfolgte mit Hilfe eines Alexa Fluor®568-fluoreszenzmarkierten Lektins aus Erdnuss (PNA), das spezifisch an terminale  $\beta$ -Galaktosereste im Akrosom von Spermien bindet [Szasz *et al.*, 2000]. Für die F-Aktin-Markierung kam der Farbstoff Alexa-Fluor®546-Pahlloidin zum Einsatz, welcher stöchiometrisch an F-Aktinfilamente bindet [Faulstich *et al.*, 1988]. Die Markierung der Tubulin-Strukturen erfolgte mit dem monoklonalen  $\alpha$ -Tubulin-Antikörper und einem fluoreszenzmarkierten Cy-Zweitantikörper (Tabelle 2.22 + 2.23). Die Analysen zeigten, dass Keimzellpräparate mit allen Keimzelltypen der Spermatogenese hergestellt werden konnten. Weiterhin konnte in den Spermatischen spezifische Keimzellstrukturen wie das Akrosom, die transiente Manschette und das Akroplaxom lokalisiert werden. Im Folgenden sind exemplarisch ausgewählte Bilder dieser Strukturen am Beispiel der Ratte gezeigt.



**Abb. 3.22: Konfokale Fluoreszenz-Analyse der Tubulin-Immunozytochemie auf Ratten-Keimzellpräparaten**, gezeigt sind *Overlay*-Bilder der DAPI- (blau) und der Cy2/Tubulin-Fluoreszenz (grün) (A, B) runde Spermatische mit komplettem Tubulin-Netzwerk, (C) Anfangsstadium der Manschetten-Bildung, gekennzeichnet durch die post-akrosomale Anordnung der Mikrotubuli (D) Formation der Manschette in einer elongierenden Spermatische, (E) elongierende Spermatische mit typischer Manschetten-Struktur, (F) späte elongierende Spermatische mit kaudaler Manschette und ohne Manschetten-Struktur .

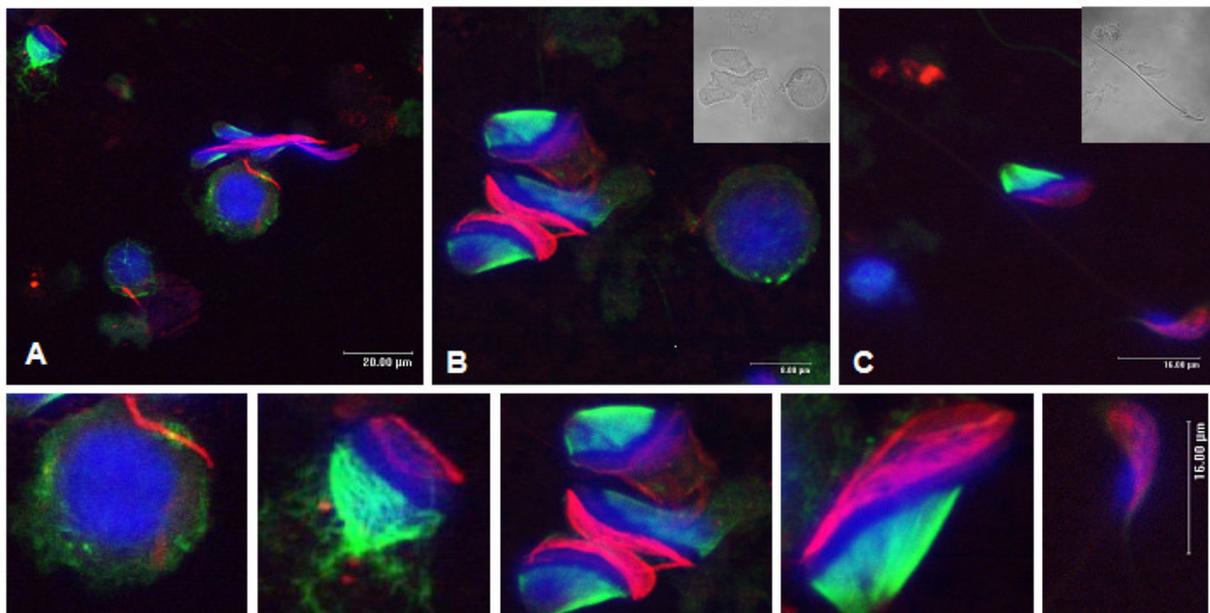


**Abb. 3.23: Konfokale Fluoreszenzanalyse der PNA/Tubulin-Immunozytochemie auf Keimzellpräparaten**. Im oberen Teil des Bildes sind *Overlays* aus DAPI (blau-), PNA (rot) und Tubulin (grün)-Fluoreszenzen gezeigt. Im unteren Teil sind jeweils verkleinert *Overlays* der DAPI-PNA (links) bzw. DAPI-Tubulin-Fluoreszenzen dargestellt. (A) Beginn der Entwicklung des Akrosoms und der Manschette in runden Spermatischen der Ratte, (B) zwei runde Ratten-Spermatische im Anfangsstadium der Manschetten-Formation mit Akrosom, (C) elongierte Ratten-Spermatische mit Akrosom sowie mit und ohne Manschette, (D) humanes reifes Spermium mit Akrosom und ohne Manschetten-Struktur.

Durch die Tubulin- und Akrosomen-Markierung konnte die Entwicklung der transienten Manschette während der Spermiogenese nachvollzogen werden (siehe Abb. 3.22 + 3.23). In frühen runden Spermatischen erscheinen die Mikrotubuli wie ein Netz um die Zellkörper gewunden (Abb. 3.22 A+B). Mit Beginn der Akrosomen-Biogenese in späten runden Spermatischen beginnt sich das Mikrotubuli-Zytoskelett aus der kortikalen Region zurückzuziehen (Abb. 3.22C). Durch

Markierung des Akrosoms mit PNA (Abb. 3.23) wird deutlich, dass eine Verlagerung in den post-akrosomalen Bereich erfolgt. In elongierenden Spermatiden organisieren die sich Mikrotubuli schließlich axial um den Zellkern an und beginnen die Manschetten-Struktur auszubilden (Abb. 3.22 D-F). Abb. 3.22 D zeigt die typische Manschetten-Struktur, bei der die Mikrotubuli post-akrosomal von der Axe des Zellkerns zum Flagellum hin verlaufen. In späten elongierenden Spermatiden wandert die Mikrotubuli-Struktur nach kaudal und ist schließlich in späten elongierten Spermatiden der Reifungsphase nicht mehr zu detektieren (Abb. 3.23 C+D). Das Akrosom hingegen ist nun voll ausgebildet und liegt dem stark kondensierten Kern auf.

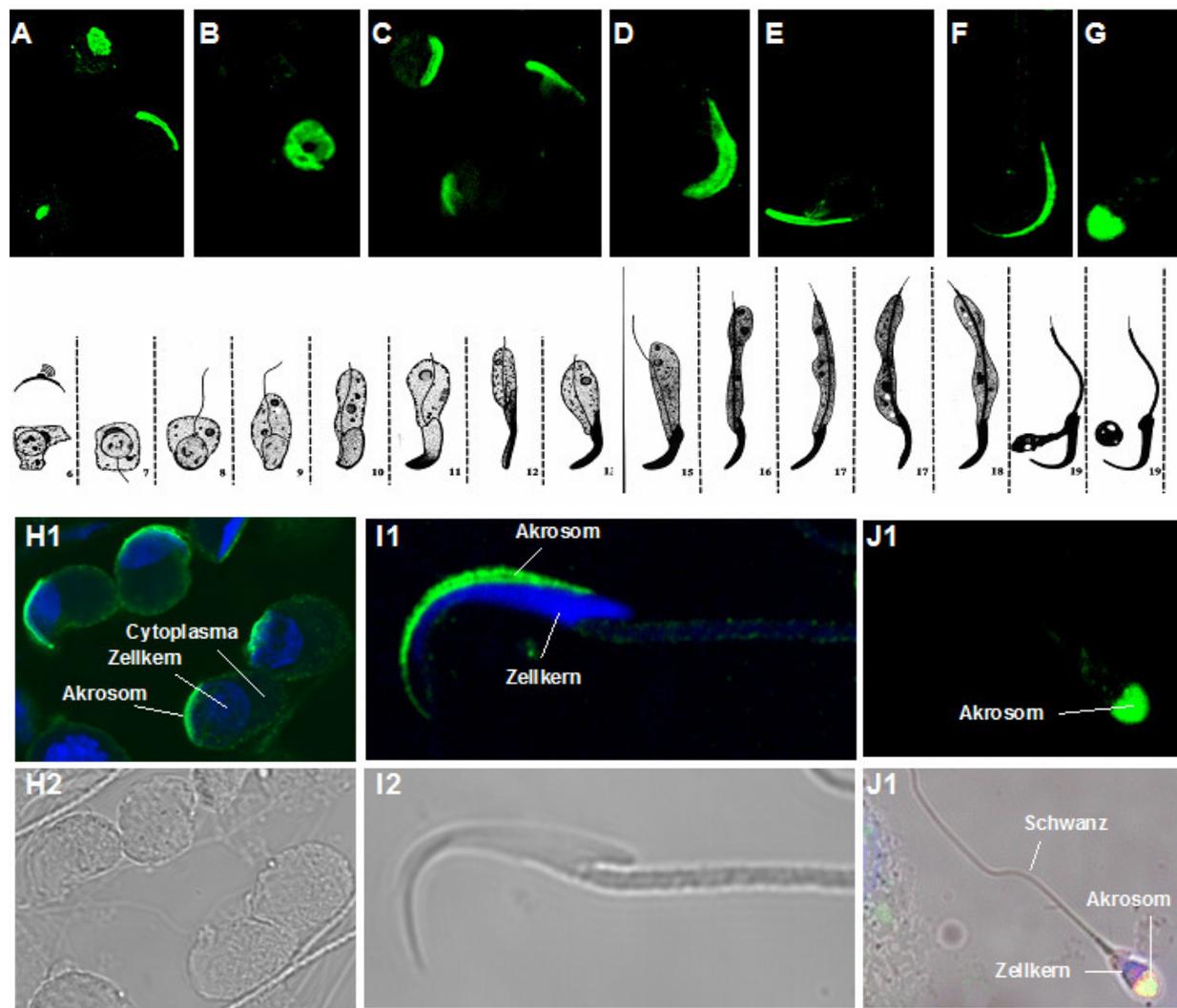
In Abbildung 3.24 sind neben den Tubulin-Strukturen (grün) F-Aktin-haltige Zytoskellett-Strukturen mit Alexa-Fluor<sup>®</sup> 546-Phalloidin (rot) markiert. Zum anderen konnte auch hier die Entwicklung und Ausbildung der transienten Manschette beobachtet werden. Als F-Aktin-haltige Struktur wurde das Akroplaxom markiert, welches wie das Akrosom (siehe Abb. 3.23) kranial auf dem Zellkern aufliegt. In frühen runden Spermatiden (Abb. 3.24A) ist zunächst nur eine Ringstruktur zu erkennen, die sich um den oberen Bereich des Zellkerns schlingt. Hierbei könnte es sich im den Akroplaxom-Abschlußring handeln, der das Akroplaxom später begrenzt und stabilisiert und zudem eine formgebende Funktion einnimmt [Kierszenbaum *et al.*, 2003]. In elongierenden Keimzellstadien (Abb. 3.24 B und C) ist schließlich die ganze apikale Akrosomen-Region des Zellkerns durch das Akroplaxom bedeckt. Die Entwicklungsmuster von Akrosom (Abb. 3.23) und Akroplaxom (Abb. 3.24) zeigen, dass die beiden Strukturen sich parallel zueinander entwickeln. In Abb. 3.24C ist die apikale Lokalisation des Akroplaxoms in der Akrosomenregion und die post-akrosomale Lokalisation der transienten Manschette zu erkennen. In späten elongierten Spermatiden wird die F-Aktin-Markierung des Akroplaxoms deutlich schwächer (Abb. 3.24C). Dies ist auf Depolymerisation des F-Aktins zu G-Aktin zurückzuführen [Fouquet & Kann, 1994].



**Abb. 3.24: Konfokale Fluoreszenzanalyse der Phalloidin/Tubulin-Immunozytochemie auf Ratten-Keimzellpräparaten zur Analyse der Akroplaxom und Manschetten-Strukturen während der Spermatogenese;** gezeigt sind Overlay-Bilder der DAPI (blau), -Cy2/Tubulin (grün) und Alexa-Fluor Phalloidin (rot) -Fluoreszenzen, im unteren Teil der Abbildung sind einzelne Spermatiden aus A-C vergrößert dargestellt. (A) Drei runde und zwei elongierende Spermatiden mit Akroplaxom-Strukturen, (B) eine runde Spermatide ohne F-Aktin-Markierung und drei elongierende Spermatiden mit Akroplaxom-Markierung (C) elongierte/elongierende Spermatiden mit und ohne transiente Manschette

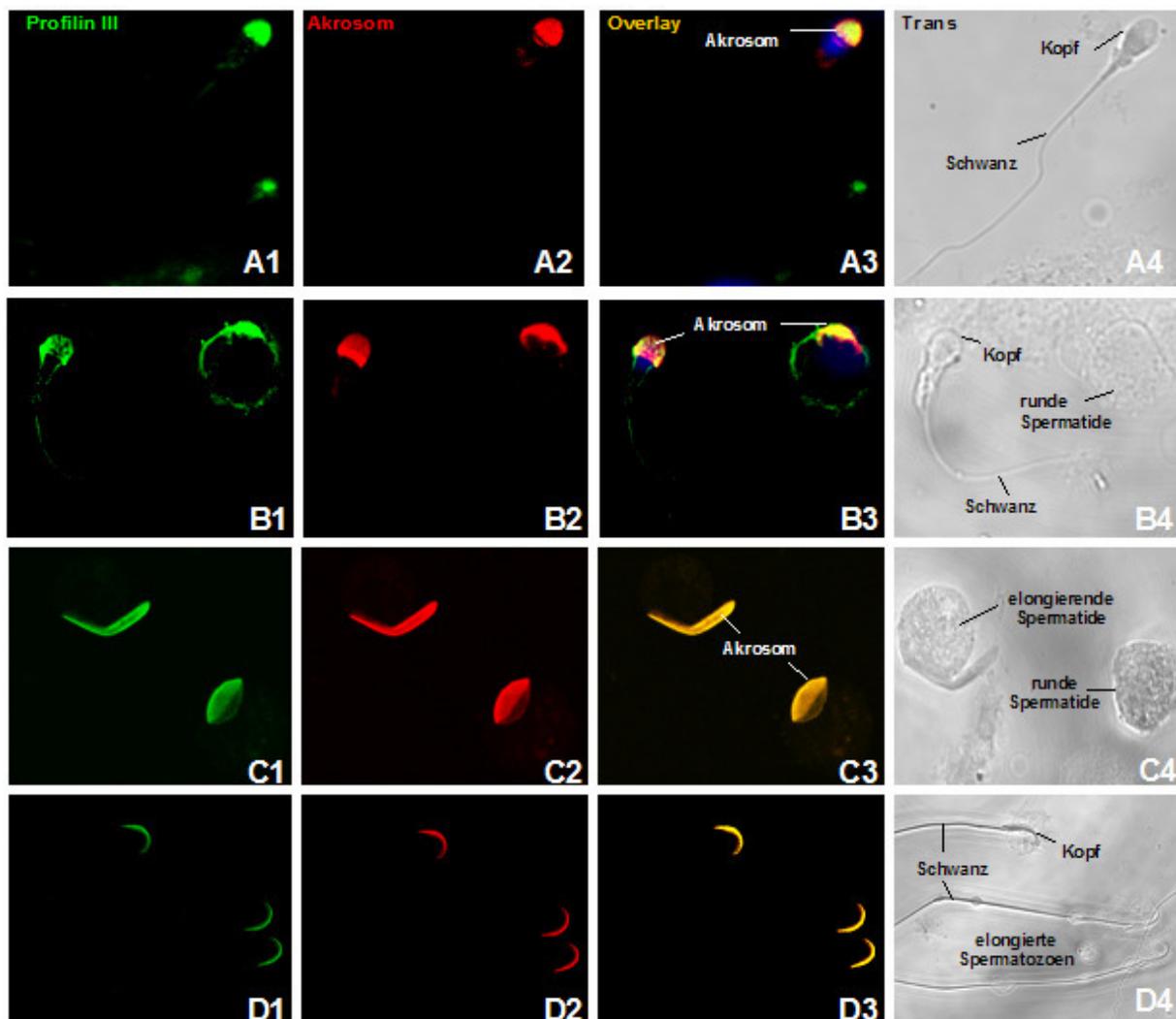
### 3.6.4.2 Lokalisation des Profilin III-Proteins

Die immunozytochemischen Untersuchungen mit dem Profilin III-spezifischen Antikörper zeigten eine Lokalisation des Profilin III-Proteins im Akrosom runder elongierender Spermatiden sowie reifer testikulärer Spermatozoen. In Abbildung 3.25 sind exemplarisch repräsentative Laser-konfokale Bilder der Profilin III-Immunozytochemie dargestellt. Dabei ist anhand der Profilin III-Markierungen die Entwicklung des Akrosoms nachzuvollziehen. Zunächst ist in frühen runden Spermatiden nur der akrosomale Vesikel markiert (Abb. 3.25A, unten links); mit zunehmender Differenzierung der Spermatiden breitet sich die Struktur immer weiter aus (Abb. 3.25 B, C + G) und passt sich der Form des Spermienkopfes an (Abb. 3.25 .D +E). In reifen Spermatozoen liegt die markierte Struktur / das Akrosom schließlich dem Zellkern auf und bedeckt artspezifisch charakteristisch hakenförmig bei der Ratte (Abb. 3.25H) bzw. als Kappe beim Menschen (Abb. 3.25G) den Spermienkopf.



**Abb. 3.25: Konfokale Fluoreszenzanalyse der Profilin III-Immunozytochemie auf Keimzellpräparaten zur Analyse der subzellulären Profilin III-Lokalisation;** Profilin III/Cy2 ist grün dargestellt, der Zellkern durch DAPI blau eingefärbt. Dargestellt ist die Profilin III-Lokalisation in runden Ratten-Spermatiden (A-C + H), elongierenden Ratten-Spermatiden (D + E) und in reifen testikulären Spermatozoen der Ratte (F + I) und des Menschen (G + J). Es ist gut die Lokalisation des Profilin III-Proteins in den akrosomalen Strukturen der Spermatiden zu erkennen.

Dass es sich bei der durch den Profilin III-Antikörper markierten Struktur tatsächlich um das Akrosom handelt, konnte durch Co-Lokalisationsstudien mit PNA nachgewiesen werden. In Abbildung 3.26 sind exemplarisch einige Laser-konfokale Fluoreszenzbilder zur Co-Lokalisation von Profilin III mit dem Akrosom dargestellt. Deutlich ist eine Überlagerung (im *Overlay* gelb dargestellt) von Profilin III mit dem Akrosom zu erkennen.

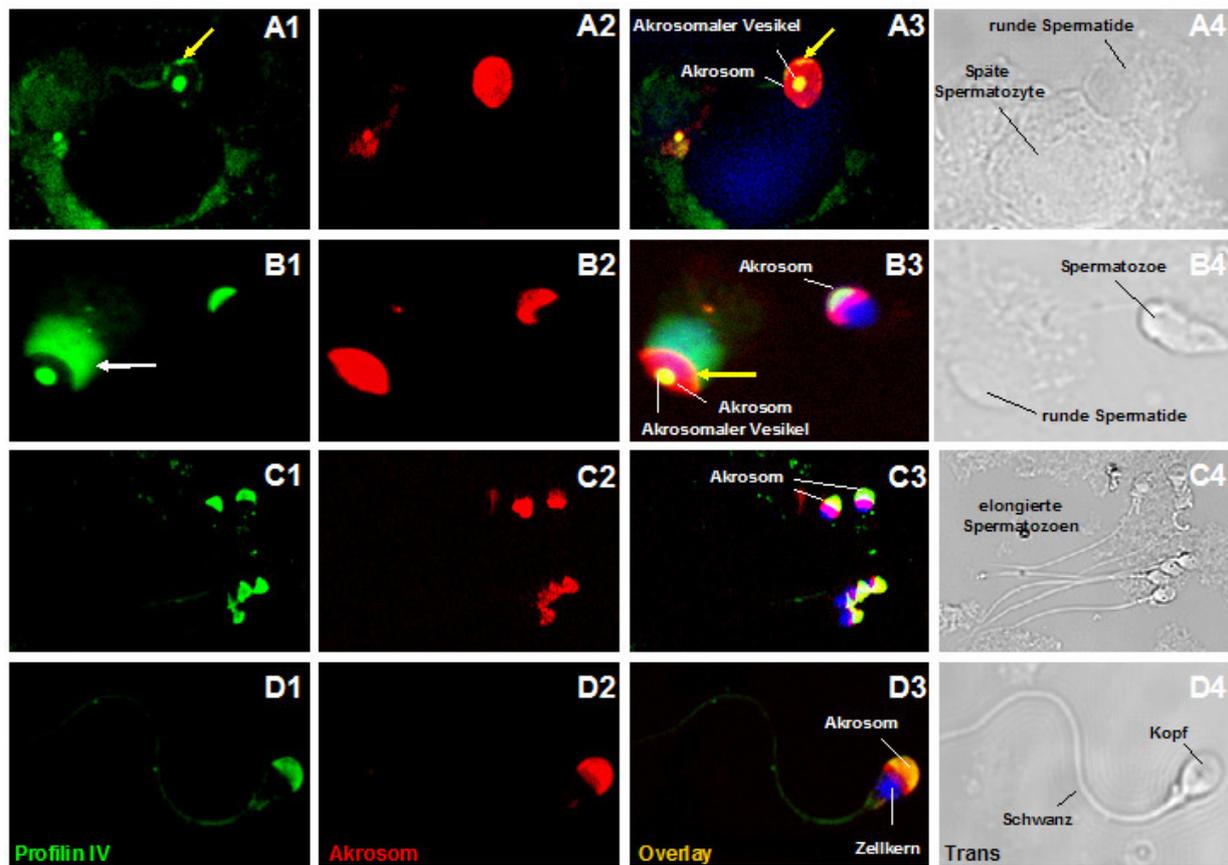


**Abb. 3.26: Konfokale Fluoreszenzanalyse zur Co-Lokalisation von Profilin III und dem Akrosom.** Profilin III/Cy2 ist grün dargestellt, das Akrosom/PNA in rot, der Zellkern/DAPI in blau und Co-Lokalisationen von PFN III mit dem Akrosom in gelb (*Overlay*). In der Abbildungsreihe (A) ist ein humanes reifes Spermium mit Akrosomenkappe gezeigt, in (B) eine runde Spermatische und ein reifes Spermium des Menschen. Die Abbildungsreihen C + D zeigen Ratten-Keimzellen. In (C) sind eine runde und eine elongierende Spermatische mit sich entwickelndem Akrosom gezeigt, in (D) drei reife Spermien mit charakteristischem hakenförmigen Akrosom. Deutlich ist die Co-Lokalisation von Profilin III mit dem Akrosom zu erkennen.

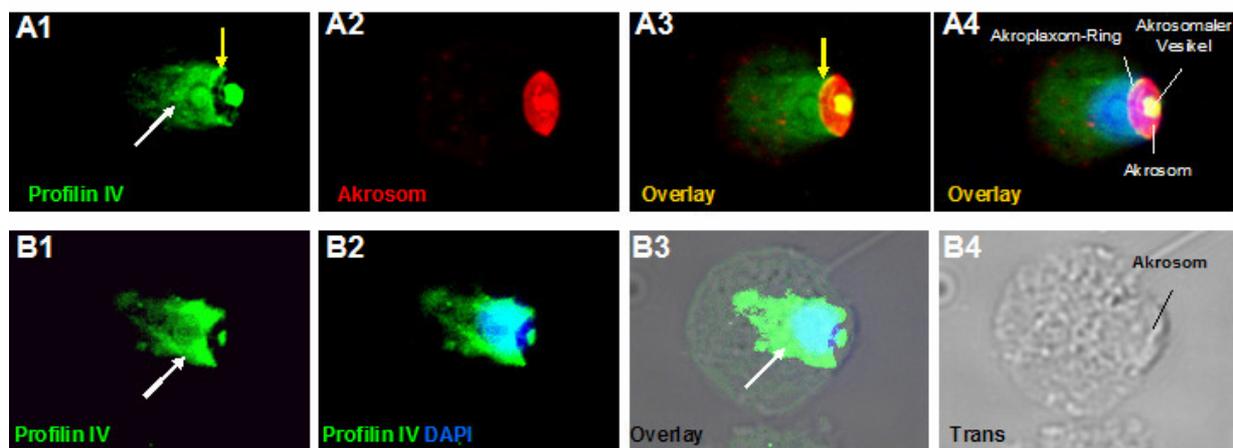
### 3.6.4.3 Lokalisation des Profilin IV-Proteins

Für Profilin IV wurde ebenfalls eine Lokalisation des Proteins im Akrosom runder elongierender und reifer Keimzellen beobachtet. Jedoch zeigten sich im Vergleich zu Profilin III Unterschiede in der subzellulären Lokalisation. So konnte Profilin IV in runden Spermatischen nicht im kompletten Akrosom detektiert werden, sondern nur im akrosomalen Vesikel (Abb. 3.27 A+B) und im äußersten Bereich des Akrosoms (gelbe Pfeile in Abb. 3.27 A3, B3 und Abb.3.28 .A1,A3), bei dem es sich um den Abschlussring des Akroplaxoms handeln könnte. In elongierten Spermatozoen (Abb. 3.27 C + D) konnte Profilin IV im apikalen Bereich der Akrosomenkappe lokalisiert werden. Das kraniale Drittel des Akrosoms hingegen zeigte keine Co-Lokalisation mit Profilin IV.

Neben der Lokalisation im akrosomalen Vesikel und dem Akroplaxom-Abschlussring wurde Profilin IV in einer post-akrosomalen Struktur runder, elongierender Spermatischen detektiert. Der weiße Pfeil in Abbildung 3.27 B1 deutet auf diese Struktur. In Abbildung 3.28 ist diese Lokalisation exemplarisch am Beispiel von zwei späten runden Spermatischen verdeutlicht. Die markierte Struktur beginnt direkt am Ende des Akrosoms, am Äquator des Zellkerns, umgibt diesen und breitet sich kaudal in das Zytoplasma aus. Diese V-förmige Struktur ähnelt stark der von Tachibana *et al.*, (2005) beschriebenen Manschetten-Struktur humaner Keimzellen.



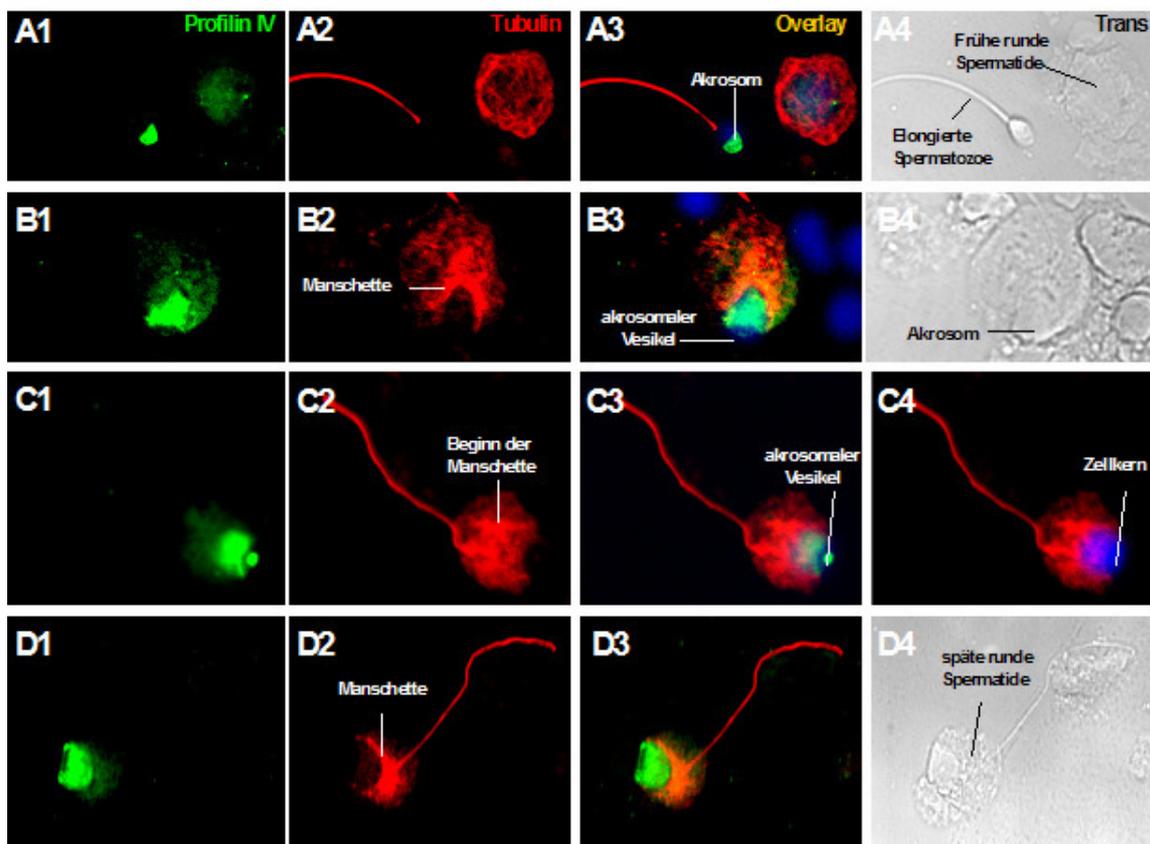
**Abb. 3.27: Konfokale Fluoreszenzanalyse zur Lokalisation von Profilin IV in humanen Keimzellen.** Profilin IV/Cy2 ist grün dargestellt, das Akrosom/PNA in rot, der Zellkern/DAPI in blau und Co-Lokalisationen von PFN III mit dem Akrosom in gelb (*Overlay*). In der Abbildungsreihe (A) sind eine Spermatozyte und eine frühe runde Spermatide dargestellt, in (B) eine runde Spermatide und ein reifes Spermium. In den Abbildungsreihen C + D sind elongierte Spermatozoen mit voll ausgebildetem Akrosom dargestellt. Gelbe Pfeile deuten auf den Akroplaxom-Abschlussring, weiße Pfeile auf die post-akrosomale Struktur; Profilin IV zeigt in runden Spermatiden eine Co-Lokalisation mit dem akrosomalen Vesikel; in elongierten Spermatiden ist Profilin IV im vorderen Bereich des Akrosoms lokalisiert.



**Abb. 3.28: Konfokale Fluoreszenzanalyse zur Lokalisation von Profilin IV in runden, elongierenden Spermatiden des Menschen.** Profilin IV/Cy2 ist grün dargestellt, das Akrosom/PNA in rot, der Zellkern/DAPI in blau und Co-Lokalisationen von PFN III mit dem Akrosom in gelb. Neben einer Lokalisation im akrosomalen Vesikel und dem Akroplaxom-Abschlussring (gelbe Pfeile) wurde Profilin IV in einer post-akrosomalen Struktur detektiert (weiße Pfeile).

Um zu untersuchen, ob es sich bei der markierten Struktur um die transiente Manschette handeln könnte, wurden Co-Lokalisationsstudien mit Profilin IV und acetyliertem  $\alpha$ -Tubulin durchgeführt. Da  $\alpha$ -Tubulin mit Cy3-detektiert wurde, welches die gleiche Anregungswellenlänge wie PNA benötigt, konnte keine gleichzeitige Markierung des Akrosoms durchgeführt werden. Die Ergebnisse der Co-Lokalisationsstudien sind in Abbildung 3.29 dargestellt. Mit dem Tubulin-

Antikörper konnte deutlich die Manschetten-Struktur in runden elongierenden Spermatischen markiert werden. In frühen runden Spermatischen, in denen sich der akrosomale Vesikel gerade auszubilden beginnt (Abb.3.29A), umgibt das Mikrotubuli-Netz noch den gesamten Zellkörper. Während der Akrosomen-Biogenese in späten runden Spermatischen (Abbildung 3.29B, C und D) zieht sich das Mikrotubuli-Netzwerk post-akrosomal zurück und bildet die typisch V-förmige Manschette aus. In diesen Stadien ist auch für Profilin IV, neben einer deutlichen Markierung des akrosomalen Vesikels, eine hauptsächlich post-akrosomale Lokalisation zu erkennen. *Overlay*-Bilder der Tubulin-Cy3- und Profilin-Cy2-Fluoreszenzen zeigten jedoch, dass es sich um distinkte, nur gering überlappende Strukturen handelt (Abb. 3.29 B3, C3, D3). Lediglich in zytoplasmatischen Bereichen, in denen Profilin IV schwach detektiert wurde, konnte eine teilweise Co-Lokalisation mit der Manschette beobachtet werden (orange dargestellt in Abb. 3.29 C3 + D3). Es ist nicht auszuschließen, dass es sich bei den schwachen Profilin-Signalen im Zytoplasma um unspezifische Signale handelt, zumal die Markierung im akrosomalen Vesikel und der post-akrosomalen Struktur deutlich intensiver ausfiel. Die Profilin IV-haltige post-akrosomale Struktur scheint demnach einen Übergang zwischen Akrososom und der transienten Manschette zu markieren und zeigt nur geringe Überlappungsbereiche mit der Manschette. In reifen testikulären Spermatozoen haben sich sowohl die Manschette als auch die Profilin IV-haltige post-akrosomale Struktur zurückgebildet. In diesem Stadium ist Profilin IV nur noch im Akrosom lokalisiert, während Tubulin nur noch im Schwanz des Spermiums zu finden ist.



**Abb. 3.29: Konfokale Fluoreszenzanalyse zur Co-Lokalisation von Profilin IV mit der Manschette in humanen Keimzellen.** Profilin IV/Cy2 ist grün dargestellt, acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin/Cy3 in rot, der Zellkern/DAPI in blau und Co-Lokalisationen von PFN IV mit Tubulin in orange. In Abbildungsreihe (A) ist ein reifes Spermium und eine frühe runde Spermatische mit sehr kleinen akrosomalen Vesikeln dargestellt. Die Abbildungsreihen B, C und D zeigen späte runde, elongierende Spermatische, in denen sich die transiente Manschettenstruktur ausbildet. In (B) ist die Manschette im Anfangsstadium, in (C) und (D) bereits gut ausgebildet. Das akrosomale Vesikel ist aufgrund der unterschiedlichen Ansichten nicht überall zu erkennen.

### 3.7 Funktionelle Charakterisierung der Profiline III und IV hinsichtlich „typischer“ Profilin-Bindungseigenschaften

Die gut charakterisierten Profiline I und II weisen trotz geringer Sequenzhomologien eine gleiche strukturelle Faltung und ähnliche biochemische Eigenschaften auf [Fedorov *et al.*, 1994, Polet *et al.*, 2007, Lu & Pollard, 2001]. Sie binden fast alle an G-Aktin [Carlsson *et al.*, 1977] und interagieren mit Poly-L-Prolin bzw. Proteinen, die Poly-Prolin-Motive enthalten [Kaiser *et al.*, 1989]. Es gibt lediglich quantitative Unterschiede in der Affinität zu den Profilin-Liganden [Schlüter *et al.*, 1999]. Im Zuge dieser Arbeit wurden die Testis-exprimierten Profiline III und IV hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften an die „typischen“ Profilin-Interaktionspartner Aktin und Poly-Prolin näher charakterisiert. Erste Annahmen über das Bindungsverhalten der Testis-exprimierten Profiline III und IV basierten auf Alignment der Profilinsequenzen sowie Vergleich mit den Profilinen I und II. Mögliche Interaktionen der Profiline mit  $\beta$ -Aktin und Poly-Prolin-Liganden wurden im Y2H-System durch Einzelmating untersucht und durch einen  $\beta$ -Galaktosidase-Test quantifiziert. Zur Charakterisierung der Poly-Prolin-Interaktion wurde das *Vasodilator stimulated phosphoprotein* (VASP) sowie Diaphanous3 (Diaph3) ausgewählt. Diese beiden Proteine sind Poly-Prolin-Liganden verschiedener Profiline [Reinhard *et al.*, 1995; Wallar & Alberts, 2003], da sie über eine prolinreiche Region verfügen [Haffner *et al.*, 1995; Katho & Katho, 2004]. Als alternative Methode zum Y2H-System erfolgte die Bestätigung von Aktin-Interaktionen durch Co-Immunopräzipitation mit *in vitro* translatierten Proteinen. Die generelle Poly-L-Prolin-Bindungseigenschaften der Profiline III und IV wurden zusätzlich durch eine Poly-L-Prolin-Affinitätschromatographie näher analysiert. Die Charakterisierung der Profiline hinsichtlich ihrer Poly-Prolin-Bindung an eine Poly-L-Prolin-Säule erfolgte am Zoologischen Institut der Technischen Universität Braunschweig Carolo Wilhelmina in der Abt. Zellbiologie bei Dr. Martin Rothkegel.

Zur näheren Charakterisierung der Profilin-Bindungseigenschaften wurden die Methoden des Y2H und der Co-Immunopräzipitation gewählt, da die Profiline III und IV bisher noch nicht nativ in ausreichenden Mengen aufgereinigt werden konnte, um andere biochemische Analysemethoden, wie z.B. ELISAs, Circular-Dichroismus-Studien oder Crosslink-Studien durchführen zu können.

#### 3.7.1 Proteinalignment der biochemisch und strukturell charakterisierten Säuger-Profiline I und II mit den Testis-exprimierten Profilinen III und IV

Um erste Hinweise auf ein mögliches Bindungsverhalten der Säuger Profiline III und IV mit Aktin und Poly-L-Prolin zu erhalten, wurde ein Protei-Alignment mit den biochemisch und strukturell bereits gut charakterisierten Profilinen I, IIa und IIb durchgeführt. Das Alignment wurde mit dem Programm *Megalign* aus dem DNASTar-Softwarepaket 4.00 (DNASTar, USA) am Beispiel der humanen Profiline durchgeführt. Hierzu wurden folgende Proteinsequenzen aus der NCBI-Datenbank verwendet: huProfilin I: NP\_005013, huProfilin IIa: NP\_444252, huProfilin IIb: NP\_002619, huProfilin III: NP\_001025057, huProfilin IV: AAH29523. In Abbildung 3.30 ist das Alignment der humanen Profiline dargestellt.

huPFN I	1	M	A	G	W	N	A	Y	I	-	D	N	L	M	A	D	G	T	C	Q	D	A	A	I	V	G	Y	K	D	S	P	S	V	W	A	A	V	
huPFN IIa	1	M	A	G	W	Q	S	Y	V	-	D	N	L	M	C	D	G	C	C	Q	E	A	A	I	V	G	Y	C	D	A	K	Y	V	W	A	A	T	
huPFN IIb	1	M	A	G	W	Q	S	Y	V	-	D	N	L	M	C	D	G	C	C	Q	E	A	A	I	V	G	Y	C	D	A	K	Y	V	W	A	A	T	
huPFN III	1	M	G	D	W	K	V	Y	I	-	S	A	V	L	R	D	Q	R	I	D	D	V	A	I	V	G	H	A	D	N	S	C	V	W	A	S	R	
huPFN IV	1	M	S	H	L	Q	S	L	L	-	D	T	L	L	G	T	K	H	V	D	S	A	A	L	I	K	I	Q	E	R	S	L	-	-	-	C	V	
huPFN I	36	P	G	K	T	F	V	N	I	T	P	A	E	V	G	V	L	V	-	-	-	G	K	D	R	S	S	F	Y	V	N	G	L	T	L	G	G	
huPFN IIa	36	A	G	G	V	F	Q	S	I	T	P	I	E	I	D	M	I	V	-	-	-	G	K	D	R	E	G	F	F	F	T	N	G	L	T	L	G	A
huPFN IIb	36	A	G	G	V	F	Q	S	I	T	P	I	E	I	D	M	I	V	-	-	-	G	K	D	R	E	G	F	F	F	T	N	G	L	T	L	G	A
huPFN III	36	P	G	G	L	L	A	A	I	S	P	Q	E	V	G	V	L	T	-	-	-	G	P	D	R	H	T	F	L	Q	A	G	L	S	V	G	G	
huPFN IV	34	A	S	P	G	F	-	N	V	T	P	S	D	V	R	T	L	V	N	G	F	A	K	N	P	L	Q	A	R	*R	E	G	L	Y	F	K	G	
huPFN I	69	Q	K	C	S	V	I	R	D	S	L	L	Q	D	G	E	F	S	M	D	L	R	T	K	S	T	G	G	A	P	T	F	N	V	T	V	T	
huPFN IIa	69	K	K	C	S	V	I	R	D	S	L	Y	V	D	G	D	C	T	M	D	I	R	T	K	S	Q	G	G	E	P	T	Y	N	V	A	V	G	
huPFN IIb	69	K	K	C	S	V	I	R	D	S	L	Y	V	D	G	D	C	T	M	D	I	R	T	K	S	Q	G	G	E	P	T	Y	N	V	A	V	G	
huPFN III	69	R	*C	C	V	I	R	D	*K	L	L	A	E	G	D	G	V	L	D	A	R	*T	K	G	L	D	A	R	A	-	-	-	-	V	C	V	G	
huPFN IV	69	K	D	Y	R	C	V	R	A	D	-	-	-	-	-	E	Y	S	L	Y	A	K	N	E	N	T	G	-	-	-	-	-	-	-	V	V	V	
huPFN I	105	K	T	D	K	T	L	V	L	L	M	G	K	E	G	V	H	G	G	L	I	N	K	K	C	Y	E	M	A	S	H	L	R	R	S	Q	Y	
huPFN IIa	105	R	A	G	R	V	L	V	F	V	M	G	K	E	G	V	H	G	G	L	N	K	K	A	Y	S	M	A	K	Y	L	L	R	R	S	G	F	
huPFN IIb	105	R	A	G	R	A	L	V	I	V	M	G	K	E	G	V	H	G	G	T	L	N	K	K	A	Y	E	L	A	L	Y	L	R	R	S	D	V	
huPFN III	102	R	A	P	R	A	L	L	V	L	M	G	R	E	G	V	H	G	G	I	L	N	K	T	V	H	E	L	I	R	G	L	R	M	Q	G	A	
huPFN IV	94	K	T	H	L	Y	L	L	V	A	T	Y	T	*E	G	M	Y	*P	*S	I	C	V	E	A	T	E	S	L	G	D	Y	L	R	K	K	G	S	

**Abb. 3.30: Protein-Alignment der humanen Profiline I, IIa, IIb, III und IV**

■: AS, die mit dem Konsensus übereinstimmen, □: konservierte aromatische/hydrophobe AS für die Interaktion mit PLP  
□: AS die bei der korrekten Platzierung von AS die mit PLP interagieren eine Rolle spielen, \* \* : Mutationen bei AS für PLP-Bindung, □ konservierte AS für die Aktin-Bindung, \* : Mutationen bei AS für Aktin-Bindung, □: PFN3-spezifische Deletionen, □: PFN IV-spezifische Deletionen

Für die Profiline I und II wurde bereits in mehreren Arbeiten die Bindung zu Aktin und Poly-L-Prolin charakterisiert und konservierte Aminosäuren, die an den Interaktionen beteiligt sind identifiziert [Bjorkegren *et al.*, 1993; Lambrechts *et al.*, 1995; Mahoney *et al.*, 1997; Bjorkegren-Sjörge *et al.*, 1997; Schlüter *et al.*, 1997]. Im dargestellten Alignment sind bekannte konservierte AS, die an der Aktin- und PLP-Bindung beteiligt sind, durch farblich markierte Kästen hervorgehoben: grün für konservierte AS die an der Aktin-Interaktion beteiligt sind, rot und gelb für aromatische/hydrophobe AS, die eine Rolle bei der Interaktion der Profiline mit PLP spielen. Abweichungen in den konservierten AS-Sequenzen sind durch entsprechend farblich markierte Sternchen verdeutlicht: grünes Sternchen bei Mutation einer AS für Aktin-Bindung, rotes/gelbes Sternchen bei Mutation einer AS für PLP-Interaktion. Ebenfalls farblich hervorgehoben sind die im Vergleich zu PFN I/II spezifischen Deletionen der Profiline III (rosa Kästen) und IV (blaue Kästen). Wie dem Alignment zu entnehmen ist, besitzen die Profiline I und II gleiche Längen (139 aa) und sind in ihren Sequenzen sehr homolog. Vor allem in Aktin- und PLP-Bindung involvierten AS liegen konserviert vor. Die N- und C-terminal lokalisierten aromatischen AS für PLP-Interaktion (W3, Y6, W31, H/Y133, Y/F139) sind besonders zwischen PFN I und II hoch konserviert. Lediglich das Tyrosin 29, auf welches die stärkere Affinität der PFN II-Isoformen zu Poly-Prolinreichen Peptiden zurückzuführen ist [Nodelman *et al.*, 1999], ist in PFN I durch ein Serin ersetzt. Die PFN IIb-Isoform, welche T29 ebenfalls besitzt, zeigt aufgrund eines Austausches der aromatischen Aminosäure Tyrosin an Position 139 im C-Terminus durch ein aliphatisches Valin (Y139V) eine schwächere Affinität zu PLP als PFN IIa [Lambrechts *et al.*, 2000]. Das Testis-spezifische PFN III zeigt an diesen beiden Stellen und zusätzlich an Position 133 ebenfalls eine Mutation der konservierten Aminosäuren für PLP-Bindung (Y29C, Y139A, H/Y133G), so dass durch den geringeren aromatischen Charakter, vor allem des C-Terminus, ebenfalls eine schwächere Affinität zu PLP angenommen werden muss. Bei PFN IV sind die aromatischen und hydrophoben AS für die PLP-Interaktion weder C-terminal noch N-terminal konserviert. Bis auf Y133 und L134 sind alle konservierten AS durch Austauschmutationen oder Deletionen nicht bewahrt. Von Bjorkegren-Sjörge *et al.* (1997) konnte gezeigt werden, dass W3-H133-Mutanten kein PLP mehr binden, so dass für PFN IV durch den Verlust der aromatischen/hydrophoben AS

an diesen Stellen und bedingt durch die zusätzlichen Mutationen angenommen werden muss, dass es keine Interaktion zu PLP aufweist. Weiterhin liegt sowohl für PFN III als auch PFN IV aufgrund der Mutationen der aromatischen AS H/Y133 und Y139 im C-Terminus, welche für die Interaktion mit VASP essentiell sind, die Vermutung nahe, dass diese nicht mehr zur Interaktion mit dem Poly-Prolin-reichen Protein VASP fähig sind.

Ein ähnliches Bild wie für die konservierten PLP-interagierenden AS ergibt sich bei PFN III und IV auch für die Aktin-interagierenden AS. Diese liegen hochkonserviert bei den Profilinen I und II vor, für welche Aktin-Bindung dokumentiert ist [Carlsson *et al.*, 1977, Schlüter *et al.*, 1997; Witke, 2004]. Bei den Profilinen III und IV hingegen sind viele dieser Aktin-bindenden Bereiche durch Austauschmutationen oder Deletionen nicht mehr konserviert. Im Gegensatz zu PFN IV sind jedoch bei PFN III die AS im C-Terminus, welcher eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit  $\beta$ -Aktin spielt, noch deutlich stärker konserviert. So konnte für PFN III von Hu *et al.* (2001) Interaktion mit Aktin nachgewiesen werden. PFN IV zeigt bis auf R74 keine konservierten AS für die Aktin-Interaktion mehr. Zudem enthält PFN IV zwei Deletionen im Mittelteil der Sequenz, die direkt an eine Aktin-Bindestelle grenzen bzw. diese deletieren. Bei PFN III ist nur eine dieser Deletionen und zudem in kürzerem Ausmaß vorhanden. Da die Mutationen und Deletionen in der PFN IV-Sequenz hinsichtlich der Aktin-interagierenden AS recht drastisch sind und kaum konservierte Bereiche verbleiben, ist anzunehmen, dass dies funktionelle Folgen bezüglich der Aktin-Bindung haben wird. Es stellt sich die Frage, ob PFN IV überhaupt noch in der Lage ist mit Aktin zu interagieren.

Durch das Proteinsequenz-Alignment der humanen Profiline wird ersichtlich, dass sich PFN IV in seiner Aminosäuresequenz erheblich von den übrigen Profilinen unterscheidet. Vor allem die hochkonservierten Aminosäuren, die bei den bekannten Profilinen für die Interaktion mit Aktin und Poly-L-Prolin verantwortlich sind, sind in Profilin IV nicht an homologen Stellen vorhanden. Es ist anzunehmen, dass dies funktionelle und biochemische Folgen für die charakteristischen Profilin-Bindungseigenschaften mit Aktin und Poly-L-Prolin mit sich bringt.

### 3.7.2 Einzelmatings der Profiline III und IV mit Aktin, VASP, Diaph3

Um zu überprüfen, ob die Profiline III und IV eine Interaktion mit Aktin, VASP und Diaph3 eingehen und inwiefern diese Interaktionen spezifisch sind, wurden Einzelmatings durchgeführt. Getestet wurden die Interaktionen zwischen den ORFs der Profiline III (NM\_029303) und IV (NM\_028376, BC029523) mit den möglichen Interaktionspartnern  $\beta$ -Aktin (ORF, NM\_001101), VASP (ORF, NM\_003370) und Diaph3 (FH1 und FH2-Domänen aus Diaph3, NM\_030932). Als Positivkontrolle diente in diesen Versuchen Profilin II (NM\_053024), für welches die Bindung mit Aktin, VASP und Diaph3 schon beschrieben ist [Schlüter *et al.*, 1999; Reinhard *et al.*; 1995, Witke, 2004]. Als Negativkontrollen wurden die Leervektoren pGBKT7 bzw. pGADT7 eingesetzt, die die Gal4-DNA-BD bzw. Gal4-AD ohne ein fusioniertes Protein exprimieren, so dass keine Interaktion mit den Profilinen erfolgen sollte. Um unspezifische Reaktionen auszuschließen, wurden verschiedene Variationen der Einzelmatings durchgeführt:

- a) Profiline als *Bait* (Fusion mit der Gal4-DNA-BD) und potentieller Interaktionspartner als *Prey* (Fusion mit Gal4-AD)
- b) Potentielle Interaktionspartner als *Bait* (Fusion mit der Gal4-DNA-BD) und Profiline als *Prey* (Fusion mit Gal4-AD)
- c) Tausch der Hefestämme (AH109 und Y187 jeweils mit *Bait* oder *Prey*)

In Tabelle 3.10 sind die Konstrukte, mit denen die Einzelmatings durchgeführt wurden, aufgelistet.

**Tabelle 3.10: Verwendete Konstrukte für die Einzelmating-Tests zur Charakterisierung der Aktin- und PLP-Bindungseigenschaften der Profiline.** Alle Sequenzen wurden per PCR amplifiziert und in die Vektoren pGBKT7 und pGADT7 kloniert, so dass sie sowohl als *Bait* als auch als *Prey* eingesetzt werden konnten. Zudem wurden alle Konstrukte in beide Hefestämme (AH109 und Y187) transformiert. Insgesamt wurden somit für die Minimatings 28 Hefeklone hergestellt.

Sequenz	Vektor	Hefestamm
huPFNIIa ORF (NM_053024, 446 bp (bp 99→526))	pGBKT7 & pGADT7	AH109 & Y187
mProfilin III ORF (NM_029303, 467 bp (bp 59→524))		
mProfilin IV ORF (NM_028376, 405 bp (bp 861→1250))		
huProfilin IV ORF (BC029523, 406 bp (bp 171→557))		
hu $\beta$ -Aktin ORF (NM_001101, 1236 bp (bp 74→1282))		
huVASP ORF (NM_003370)		
huDiaph3 FH1+FH2-Domäne (NM_030932, 668bp, ( bp 904→1551))		

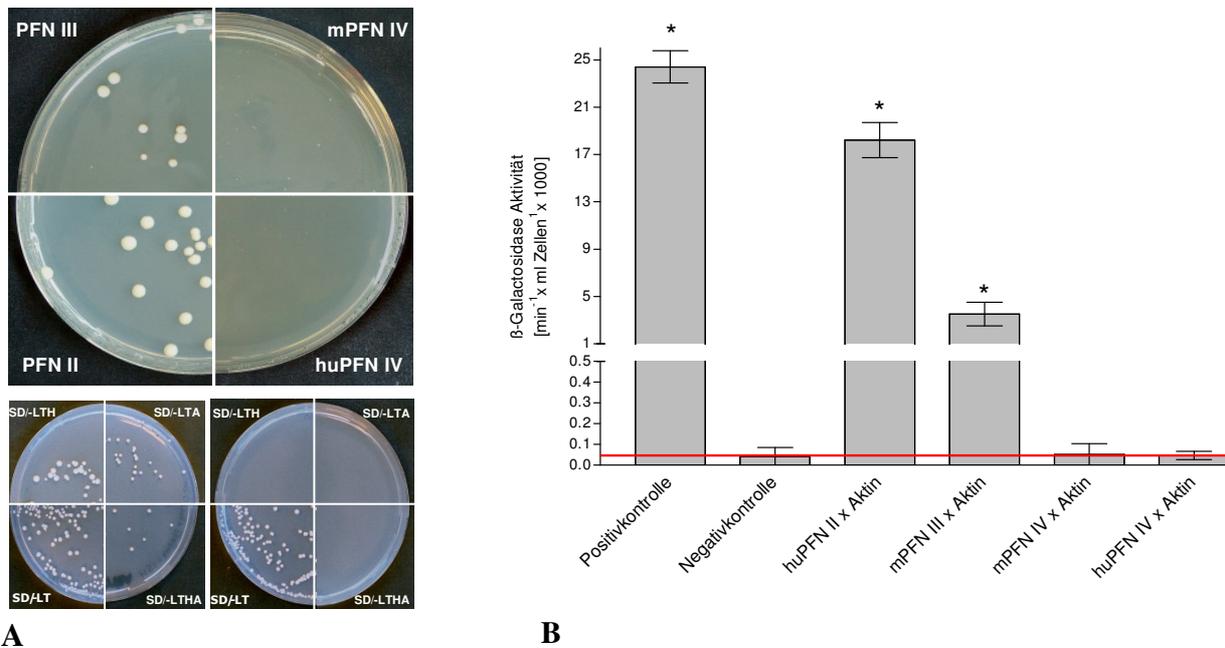
Positive Interaktion in den Einzelmatings wurde durch Wachstum auf SD-Selektionsmedien und im quantitativen  $\beta$ -Galaktosidase-Assay überprüft. Bei Interaktion zwischen *Bait*- und *Prey*-Protein werden durch Rekonstitution eines aktiven Gal4-Transkriptionsfaktors die Reportergene *His3*, *Ade2* und *lacZ* aktiviert, so dass Wachstum auf Histidin- und/oder Adenin-freien-Medien (SD/-LTH, -LTA und -LTHA) erfolgen kann und  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nachweisbar ist. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Matings und  $\beta$ -Galaktosidase-Assays zur Charakterisierung der Profilin-Bindungseigenschaften mit Aktin, VASP und Diaph3 dargestellt. Wie schon erwähnt, wurden mehrere Minimatings mit getauschten *Baits* und *Preys* sowie Hefestämme durchgeführt. Nachfolgend werden jedoch nicht alle Matings im Einzel aufgeführt, sondern nur zusammenfassende Tabelle geliefert, in denen vermerkt ist, ob Interaktion der Profiline im Y2H-System mit den potentiellen Interaktionspartnern zu detektieren war, oder nicht.

### 3.7.2.1 Profilin-Interaktion mit Aktin

In Tabelle 3.11 sind die Ergebnisse der verschiedenen Profilin-Aktin-Matings zusammengefasst dargestellt. Abbildung 3.30A zeigt exemplarisch das Wachstum der diploiden Klone aus diesen Matings auf SD/-LTA-Medium, auf dem nach Klonen mit Interaktion zwischen *Bait* und *Prey* selektiert wird. Wie zu erkennen ist, konnte im Y2H-Einzelmating Aktin-Interaktion für die Profiline II und III durch Wachstum auf den Selektionsmedien detektiert werden. Profilin IV hingegen zeigte kein Wachstum auf den Selektionsmedien und weist demnach im Y2H-System keine Interaktion mit  $\beta$ -Aktin auf. Wie erwartet zeigten die Negativkontrollen, Mating der Gal4-DNA-BD und Gal4-AD mit den Profilinen bzw. Aktin, ebenfalls kein Wachstum auf den Selektionsmedien für Protein-Interaktion. Somit konnten unspezifische Interaktionen durch die Gal4-DNA-BD und Gal4-AD mit Aktin und Profilin ausgeschlossen werden.

**Tabelle 3.11: Profilin-Aktin-Interaktion im Y2H-Einzelmating.** Interaktion wurde durch Wachstum auf den Selektionsmedien SD/-LTH, -LTA und -LTHA detektiert. +++: mehr als 200 cfu/ml auf SD/-Medium gewachsen, ++: 10-20 cfu/ml gewachsen, -: keine Kolonien auf Selektionsmedium gewachsen. Da mehrere Matings durchgeführt wurden, wird die Spanne von der niedrigsten bis zur höchsten detektierten Matingeffizienz angegeben.

Testprotein	Profilin	Mating-Effizienz	Interaktion		
			-LTH	-LTA	-LTHA
$\beta$ -Aktin	huProfilin II	8-18 %	+++	+++	+++
	mProfilin III	15-30 %	+++	+++	++
	mProfilin IV	12-35 %	-	-	-
	huProfilin IV	5-22 %	-	-	-
	Gal4-AD	10-40 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	12-43 %	-	-	-
Gal4-DNA-BD	Profilin II - IV	8-55 %	-	-	-
Gal4-AD	Profilin II - IV	10-45 %	-	-	-



**Abb. 3.30: Einzelmatings und quantitativer  $\beta$ -Galaktosidase-Assay zur Analyse der Profilin-Aktin-Interaktion. (A) Detektion nach Profilin-Aktin-Interaktion auf SD/-LTA (Bild oben). Die Profiline II und III zeigen Interaktion mit Aktin durch Wachstum auf dem Selektionsmedium, Profilin IV nicht. Die Positivkontrolle (Aktin x PFN II; Bild unten links) zeigt Wachstum auf den Selektionsmedien SD/-LTH, LTA und -LTHA, die Negativkontrolle (Aktin x Gal4-DNA-AD, Bild unten rechts) nur auf SD/-LT (B) quantitativer  $\beta$ -Galaktosidase-Assay; dargestellt sind die ermittelten  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten [Milliunits/(ml x Zellen)] diploider Klone aus den Matings. Die rote Linie markiert den Negativwert als Ausschlussgrenze. \* zeigt signifikante  $\beta$ -Gal-Aktivität im Vergleich zu Negativkontrolle. Positivkontrolle: diploide Klone mit starker Interaktion zwischen p53 (pGBKT7-53) und SV40 large T-Antigen (pGADT7-T), Negativkontrolle: Diploide mit dem HE6-C-Terminus (pGBKT7-H21-21-1) und SV40 T-Antigen (pGADT7-T)**

Um auch die Expression des *lacZ*-Reportergens zu überprüfen, sowie zur Quantifizierung der detektierten Profilin-Aktin-Interaktionen, wurde ein  $\beta$ -Galaktosidase-Test durchgeführt. In diesem Test wurden für interaktionspositive Klone (PFN II und III x Aktin) diploide Kolonien von SD/-LTHA bzw. für interaktionsnegative Klone (PFN IV x Aktin) diploide Kolonien mit *Bait* und *Prey* von SD/-LT-Medium verwendet. Abbildung 3.30B zeigt das Ergebnis des quantitativen  $\beta$ -Galaktosidas-Tests für die diploiden Profilin-Aktin-Hefeklone. Für PFN II und PFN III konnte mit 18,21 bzw. 3,5  $\beta$ -Gal-Units eine signifikant über der Negativkontrolle (0,04  $\beta$ -Gal-Units) liegende Expression des *lacZ*-Reportergens gezeigt und so die Interaktion mit Aktin bestätigt werden. Hierbei konnte für PFN II eine um ca. 80 % stärkere  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität als für PFN III ermittelt werden. Da die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität eine Aussage über das Maß der Interaktion zwischen Bait und Prey erlaubt, kann gesagt werden, dass das Testis-spezifische PFN III eine schwächere Affinität zu  $\beta$ -Aktin aufweist als PFN II. Für die Klone aus den PFN IV-Aktin-Matings konnte keine nachweisbare *lacZ*-Expression bzw.  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ermittelt, das heißt keine Interaktion zwischen  $\beta$ -Aktin und Profilin IV gezeigt werden. Die gemessenen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten lagen mit 0,053  $\beta$ -Gal-Units für Maus-PFN IV und 0,046  $\beta$ -Gal-Units für humanes PFN IV nicht signifikant über denen des Negativwertes.

### 3.7.2.2 Profilin-Interaktion mit den Poly-Prolin-Proteinen VASP und Diaph3

Von den Poly-Prolin-haltigen Profilin-Liganden ist die Interaktion zwischen VASP und Profilinen bisher am besten dokumentiert [Reinhard *et al.*, 1995; Gertler *et al.*, 1996]. VASP enthält eine Prolin-reiche Domäne, welche Interaktion mit dem C-Terminus der Profiline vermittelt [Lambrechts *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 1997]. In den Einzelmatings wurde VASP als Poly-Prolin-Ligand für die Testis-exprimierten Profiline III und IV getestet, um vor allem die Funktionalität des Profilin C-Terminus, welcher in den Profilinen III und IV Mutationen der VASP-interagierenden

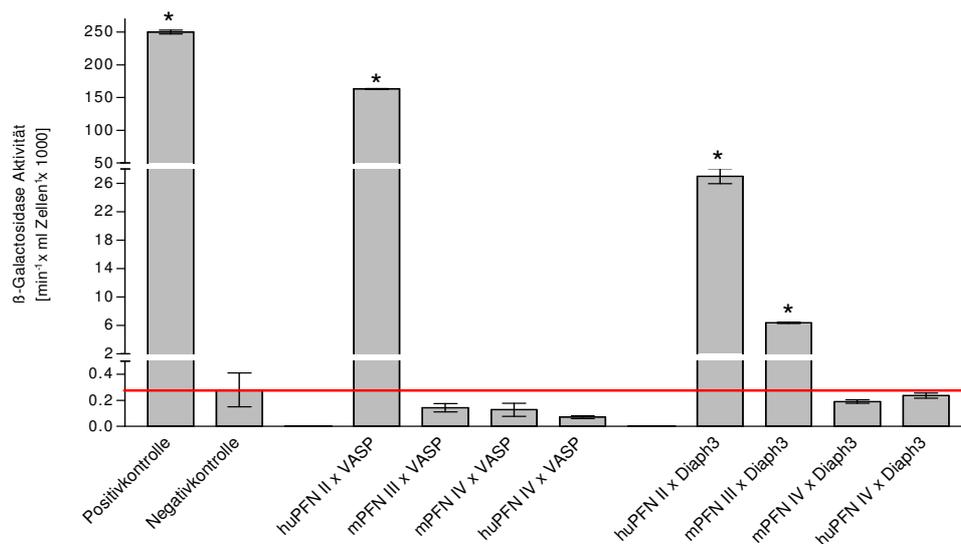
AS aufweist zu untersuchen. Als zweiter potentieller Poly-Prolin-Ligand der Profiline wurde Diaph3 getestet. Von Diaph3 existieren zwei Isoformen, von denen die kürzere (Isoform 2, NM\_030932) im Testis exprimiert wird [Katho & Katho, 2004]. Diaph3 gehört zur Familie der FH (*formin homology*)-Proteine, welche über eine Poly-L-Prolin-reiche Region in der FH1-Domäne an Profiline und über die FH2-Domäne an Aktin binden [Kovar *et al.*, 2003; Pring *et al.*, 2003; Sagot *et al.*, 2002]. Die verwendeten Hefekonstrukte für die VASP und Diaph3-Matings sind in Tabelle 3.16 aufgelistet. Die Ergebnisse der Matings zwischen den Profilinen II, III und IV mit den Poly-Prolin-Proteinen VASP und Diaph3 sind in Tabelle 3.12 zusammengefasst dargestellt. Abbildung 3.31 zeigt die zugehörigen  $\beta$ -Galaktosidase-Test-Ergebnisse.

**Tabelle 3.12: Profilin-Interaktion mit VASP und Diaph3 im Y2H-Einzelmating.** Interaktion wurde durch Wachstum auf den Selektionsmedien SD/-LTH, -LTA und -LTHA detektiert (hier nicht im Einzelnen aufgeführt). Wachstumsbeurteilung: +++: mehr als 200 cfu/ml, ++: 10-20 cfu/ml, +: 1-10 cfu/ml -: keine Kolonien auf Selektionsmedium gewachsen. Da mehrere Matings durchgeführt wurden, wird keine genaue Matingeffizienz angegeben, sondern der Bereich von der niedrigsten bis zur höchsten Effizienz aus den verschiedenen Matings.

Test-Protein	Profilin	Mating-Effizienz	Interaktion
VASP	huProfilin II	13-35 %	+++
	mProfilin III	20-45 %	-
	mProfilin IV	9-30 %	-
	huProfilin IV	15-38 %	-
	Gal4-AD	28-43 %	-
	Gal4-DNABD	25-50 %	-

Test-Protein	Profilin	Mating-Effizienz	Interaktion
Diaph3 FH1- und FH2- Domäne	huProfilin II	15-48 %	+++
	mProfilin III	6-33 %	+
	mProfilin IV	11-42 %	-
	huProfilin IV	21-35 %	-
	Gal4-AD	12-40 %	-
	Gal4-DNABD	15-45 %	-



**Abb. 3.31: Quantitativer  $\beta$ -Galaktosidase-Assay zur Analyse der Profilin-Interaktionen mit den Poly-Prolin-Proteinen VASP und Diaph3.** Dargestellt sind die ermittelten  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten [Milliunits/(ml x Zellen)] diploider Klone aus den Matings. Die rote Linie markiert den Negativwert als Ausschlussgrenze. \* zeigt signifikante  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität im Vergleich zur Negativkontrolle. Als Negativkontrolle dienten diploide Klone ohne Interaktion zwischen *Bait* und *Prey* (HE6-C-Term. x SV40 large T-Antigen), als Positivkontrolle diploide Hefeklone mit Interaktion zwischen p53 und SV40 T-Antigen.

In den Matings konnte für PFN II (Positivkontrolle) durch starkes Wachstum diploider Klone auf den Selektionsmedien SD/-LTH, -LTA und -LTHA, welches auf Expression der Reportergene *His3* und *Ade2* zurückzuführen ist, eine Interaktion mit VASP und Diaph3 detektiert werden. Auch die signifikante Expression des dritten Reportergens, *lacZ*, konnte im  $\beta$ -Galaktosidase-Test die Interaktion mit VASP und Diaph3 bestätigen. Der  $\beta$ -Gal-Test zeigte weiterhin, dass PFN II deutlich stärker mit dem Poly-Prolin-Protein VASP (163  $\beta$ -Gal-Units) als mit Diaph3 (27  $\beta$ -Gal-Units) interagiert. Für PFN III konnte sowohl in den Einzelmatings als auch im  $\beta$ -Galaktosidase-Test eine Poly-Prolin-Bindung durch Interaktion mit Diaph3 gezeigt werden. Im quantitativen  $\beta$ -

Gal-Test zeigte PFN III zu Diaph3 mit 6,4  $\beta$ -Gal-Units zwar eine um ca. 76 % schwächere Interaktion als PFN II zu Diaph3 (27  $\beta$ -Gal-Units). Jedoch lag die  $\beta$ -Gal-Aktivität noch immer signifikant über der der Negativkontrolle (0,28  $\beta$ -Gal-Units), so dass von einer Poly-Prolin-Bindungseigenschaft des PFN III ausgegangen werden kann. Mit dem prolinreichen Protein VASP konnte für PFN III weder im Mating durch Wachstum auf Selektionsmedien, noch im  $\beta$ -Gal-Test durch *lacZ*-Expression eine Interaktion nachgewiesen werden. Profilin IV zeigte weder Interaktion mit dem Poly-Prolin-Protein VASP noch mit Diaph3. Es wuchsen keine Klone auf den Selektionsmedien und es konnte keine  $\beta$ -Gal-Aktivität der diploiden Klone gemessen werden. Die ermittelten  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten lagen mit 0,07 bis 0,236  $\beta$ -Gal-Units sogar noch unter denen der Negativkontrolle. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass PFN IV, zumindest in Bezug auf die Proteine VASP und Diaph3, keine Poly-Prolin-Bindungseigenschaften besitzt.

### 3.7.3 Bestätigung der Aktin- und Poly-L-Prolin-Interaktionen aus den Einzelmatings durch alternative Methoden

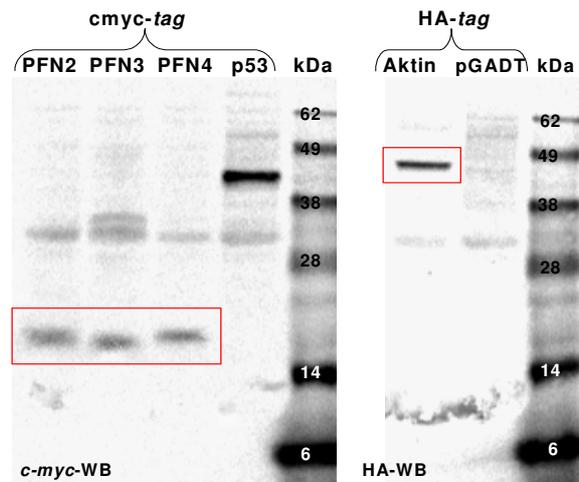
Die im Y2H-System detektierten Interaktionseigenschaften der Profiline wurden durch alternative Methoden überprüft. Dabei wurde zur Bestätigung der Profilin-Aktin-Bindungseigenschaften die Co-Immunopräzipitation angewandt. Die Interaktion der Profiline mit VASP und Diaph3 konnte mit dieser Methode aus folgenden Gründen nicht überprüft werden: *In vitro* translatiertes VASP bandierte genau auf Höhe der schweren *c-myc*-Antikörperkette und konnte trotz mehrfacher Versuche weder mit einem *c-myc*-AK aus Maus noch mit einem VASP-AK aus Kaninchen im Western-Blot nach Co-IP eindeutig detektiert werden. *In vitro* translatiertes Diaph3 zeigte in der Co-IP, auch bei unterschiedlich stringentem Waschen, eine unspezifische Bindung an Protein A-Agarose und war durchgehend in den Kontroll-Ansätzen zu detektieren, so dass auch hier keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden konnten.

Da durch die Y2H-Studien lediglich die Bindungseigenschaft der Profiline III und IV bezüglich der Poly-Prolin-haltigen Proteine VASP und Diaph3 beurteilt und keine Aussage über eine generelle Poly-Prolin-Bindungseigenschaft der Profiline gemacht werden konnte, wurde zur Charakterisierung ihrer PLP-Affinität eine Poly-L-Prolin-Affinitätschromatographie durchgeführt. Diese erschien auch sinnvoll, zumal von Lambrechts *et al.* (2002) für Profiline mit einem *c-myc-tag* eine drastisch reduzierte Poly-L-Prolin-Bindung beobachtet wurde. Zwar wurde dies nur für C-terminale Protein-tags beschrieben (N-Terminale tags wurden nicht getestet), jedoch lässt sich nicht ausschließen, dass die für das Y2H-System N-terminal an die Profiline angefügten Gal4-DNA-BD- und *c-myc-tags* keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften besitzen.

#### 3.7.3.1 *In vitro*-Translation und Co-Immunopräzipitation von Aktin und Profilin

Die Bestätigung der im Y2H-System detektierten Profilin-Aktin-Interaktionen erfolgte durch Co-Immunopräzipitation mit *in vitro* translatierten Profilinen und Aktin. Für die Translation wurden die in Tabelle 3.16 aufgelisteten Profilin-Sequenzen in pGBKT7 und  $\beta$ -Aktin in pGADT7 verwendet, so dass den Profilinen ein N-terminaler *c-myc-tag* (*Bait*-Protein) und Aktin ein *HA-tag* (*Prey*-Protein) angefügt wurde. Die *in vitro* Translation wurde wie unter 2.2.2 beschrieben durchgeführt. Zur Überprüfung der *in vitro*-Translation wurden 5  $\mu$ l des Ansatzes per SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und die translatierten *Bait*-Proteine immunologisch mit *c-myc* monoklonalem Antikörper bzw. die *Prey*-Proteine mit *HA High Affinity* monoklonalem

Antikörper nachgewiesen. Abbildung 3.32 zeigt die Western-Blot-Analyse der *in vitro*-Translation. Wie zu erkennen ist konnten sowohl die Profiline mit *c-myc-tag* (ca. 16 kDa) als auch Aktin mit *HA-tag* (ca. 46 kDa) erfolgreich *in vitro* translatiert werden.



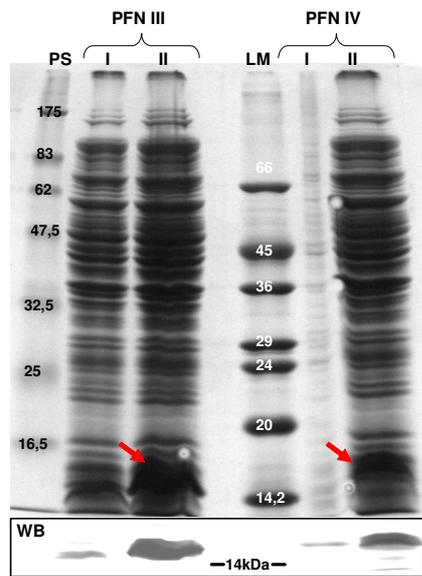
**Abb. 3.32: Immunologischer Nachweis von *in vitro* translatierten Profilinen und Aktin.** Die Profiline wurden mit *c-myc-tag* translatiert und über einen monoklonalen *c-myc*-AK detektiert (*c-myc*-WB). Aktin wurde mit *HA-tag* translatiert und über einen *HA*-AK detektiert (*HA*-WB). Die *in vitro* translatierten Profiline bandieren bei ca. 16 kDa, Aktin bei ca. 46 kDa. Als Positivkontrolle wurde p53 mit *c-myc-tag* translatiert, als Negativkontrolle pGADT7.

Für die Co-IP wurden je 25  $\mu$ l Reticulozytenlysats mit dem Profilin-Bait bzw. dem Aktin-Prey vermengt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um Protein-Interaktionen zu ermöglichen. Anschließend wurden interagierende Proteine durch einen *c-myc*-Antikörper und Protein A-Agarose co-immunopräzipitiert. Nach Elution der co-immunopräzipitierten Proteine aus der Protein A-Agarose, wurden 25  $\mu$ l des gewonnenen Überstands durch SDS-PAGE und Western-Blot mit *c-myc*-AK auf präzipitiertes Bait-Protein und mit *HA*-Antikörper auf co-immunopräzipitiertes Prey-Protein hin analysiert. Dabei wurde eine immunologisch detektierbare Bande des Aktin-Preys im Überstand als positives Ergebnis für Protein-Protein-Interaktion mit dem präzipitierten Bait-Profilin gewertet.

In den Abbildungen 3.33 und 3.34 sind die Ergebnisse der Profilin-Aktin-Co-Immuno-Präzipitationen dargestellt. Abbildung 3.33 zeigt die Profilin-Aktin-Co-IP, Abbildung 3.34 die zugehörigen Kontrollen. Wie zunächst im *c-myc*-Western-Blot in Abb. 3.34 zu erkennen ist, konnten alle drei Bait-Profiline erfolgreich über einen *c-myc*-AK und Protein A-Agarose präzipitiert werden. Dies ist an den Profilin-Banden bei ca. 16 kDa in den Ansätzen mit *c-myc*-AK erkennen. Ansätze ohne *c-myc*-AK enthalten keine Profilin-Bande, was darauf hindeutet, dass die Profiline nicht unspezifisch an Protein A-Agarose binden. Auch unspezifische Aktinbindung an Protein A-Agarose (Abb. 3.33 Ansätze mit Aktin und PFN, aber ohne *c-myc*-AK) und Präzipitation des Aktin-Preys durch den *c-myc*-AK (Kontrollblott Abb. 3.34 : Aktin + *c-myc*-AK ohne PFN.) konnte ausgeschlossen werden, so dass davon auszugehen ist, dass detektierbare Aktin-Banden auf Co-Immuno-Präzipitation und somit Interaktion mit den Profilinen zurückzuführen ist. Im *HA*-Western-Blot (unterer Teil Abb. A) wurde co-immunopräzipitiertes Aktin (bei ca. 46 kDa) detektiert. Wie zu erkennen ist konnte Aktin mit Profilin II und Profilin III co-immunopräzipitiert werden, jedoch nicht mit Profilin IV. Dieses Ergebnis bestätigt das Y2H-Minimizing, so dass vermutet werden kann, dass PFN IV im Gegensatz zu PFN II und III, keine Interaktion mit  $\beta$ -Aktin aufweist.



exprimiert. In den Western-Blots mit PFN III bzw. PFN IV-spezifischen Antikörpern konnten diese IPTG-induzierten Proteinbanden deutlich detektiert werden, so dass davon auszugehen ist, dass Profilin III und Profilin IV exprimiert wurden.



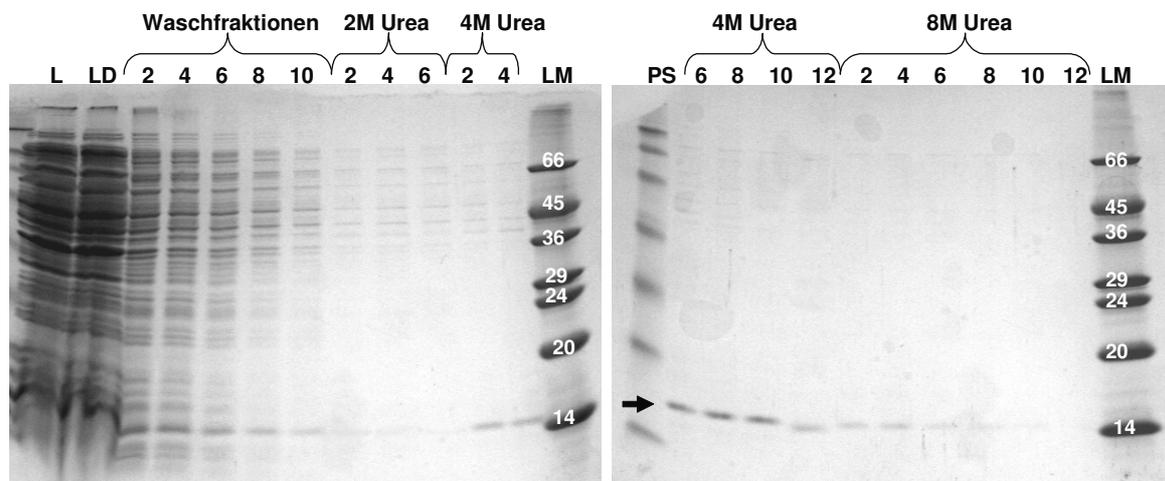
**Abb.3.35: SDS-PAGE-Analyse (Coomassie-gefärbtes Gel) und Western-Blot-Nachweis (WB) der überexprimierten Profilin III und IV:** I: Kulturprobe vor IPTG-Induktion, II: Kulturprobe 4 h nach IPTG-Induktion, PS: Prestained Marker (kDa), LM: Low Mass Ladder (kDa); von der Probe PFN IV I ist versehentlich zu wenig Probe aufgetragen

Durch Lysozym und Ultraschallbehandlung wurden die exprimierten Proteine aus den Zellen freigesetzt und ein Proteinlysate hergestellt. Das Lysat mit den löslich exprimierten Proteinen wurde auf eine Poly-L-Prolin-Säule (PLP-Säule), aus Cyanbromid-aktivierter Sepharose CL-4B an die kovalent 250 mg Poly-L-Prolin gekoppelt war, aufgetragen. Der Lysat-Durchfluss (LD) wurde aufgefangen. Ungebundenes Protein wurde in zwei Schritten, mit Waschpuffer und 2 M Urea in Waschpuffer, von der Säule ausgewaschen. Zur Charakterisierung der PLP-Bindungseigenschaften erfolgte die Elution gebundener Profiline zunächst mit 4 M Harnstoff und anschließend mit 8 M Harnstoff von der Säule. Für die Analyse der Bindungs- und Elutionseigenschaften der Profiline wurden Waschpuffer und Eluate nach Durchfluss durch die Säule in je 2 ml Fraktionen aufgefangen und profilinhaltige Fraktionen mittels SDS-PAGE ermittelt. Der Proteinnachweis im Gel erfolgte durch Coomassie-Färbung. In den Abbildungen 3.36 und 3.37 sind die Coomassie-gefärbten Gele zur Dokumentation des Bindungsverhaltens der Profiline III und IV an PLP gezeigt. Bei einem direkten Vergleich des Elutionsverhaltens der Profiline III und IV von der PLP-Säule wird ersichtlich, dass PFN IV im Gegensatz zu PFN III keine Interaktion mit Poly-L-Prolin aufweist. Das rekombinant exprimierte PFN IV zeigte keine Bindung an die PLP-Säule und wurde direkt mit den ersten drei Waschfraktionen wieder aus der Säule herausgespült. Sogar durch steigende Harnstoffkonzentration im Waschpuffer konnte auch unter sehr stark denaturierenden Bedingungen (8 M Urea) kein Profilin mehr von der Säule eluiert werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass PFN IV keine Poly-L-Prolin-Bindungseigenschaft besitzt.

Für PFN III zeigte sich in der PLP-Affinitätschromatographie ein völlig anderes Elutionsmuster. Im Gegensatz zu PFN IV konnte ein Großteil des rekombinanten PFN III an die Säule gebunden und durch 4 M und 8 M Urea wieder eluiert werden. Dies ist an den deutlich stärkeren Profilin-Banden bei ca. 14 kDa in den entsprechenden Fraktionen zu erkennen (siehe Pfeil Abb. 3.36). Somit konnte eine Interaktion des Testis-spezifischen PFN III mit PLP bestätigt werden. Für die Profiline I und II ist eine Elution erst ab 6 M bzw. 8 M Urea beschrieben, so dass für PFN III,

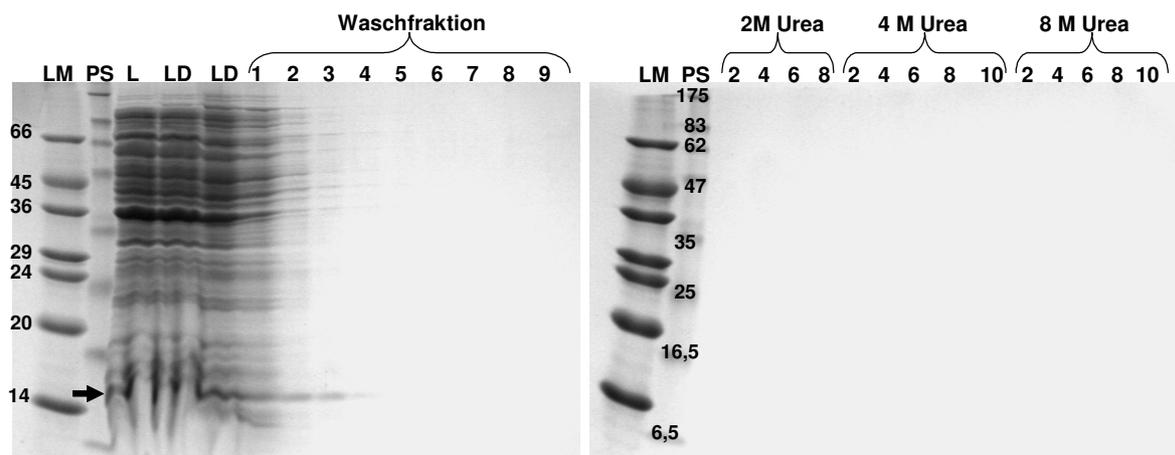
welches bei 4 M Urea eluiert, eine schwächere Affinität zu PLP angenommen werden muss. Wie zu erkennen ist, konnte PFN III jedoch nicht nur in den 4-8 M Urea-Fractionen, sondern auch zunehmend schwächer werdend in den Waschfraktionen und sehr schwach in den 2 M Urea-Fractionen detektiert werden. Dies kann zum einen auf eine Überladung der Säule und ungenügendes Waschen zurückzuführen sein. Auf der anderen Seite könnte die Elution bei 2 M Urea jedoch auch auf eine schwache Affinität des PFN III zu PLP hindeuten. Allerdings kann durch die deutlich verstärkte PFN III-Elution mit 4 M Urea definitiv von einer Interaktion des PFN III mit PLP ausgegangen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die PLP-Affinitätschromatographie die Ergebnisse des Y2H-Minimatings bestätigt werden konnten. Für PFN III konnte in beiden Systemen Interaktion mit PLP bzw. Poly-Prolin-Proteinen gezeigt werden, für PFN IV hingegen nicht.



**Abb. 3.36: Elektrophoretische Dokumentation der PFN III-PLP-Affinitätschromatographie**

Gezeigt sind die Coomassie-gefärbten Gele der SDS-PAGE-Analyse der aufgefangenen Fraktionen von der PLP-Säule. Der Pfeil zeigt auf die Profilin III-Proteinbande bei ca. 14 kDa, L: Lysat vor der Säule, LD: Lysat nach Säulendurchfluss, 2 M Urea 2-6: Fraktionen 2-6 des 2 M Urea-Waschpuffers nach der Säule, 4 M Urea 2-12: Fraktionen 2-12 des 4 M Eluats, 8 M Urea 2-12: Fraktionen 2-12 des 8 M Eluats, LM: Low Mass-Ladder, PS: Prestained-Marker.



**Abb. 3.37: Elektrophoretische Dokumentation der PFN IV-PLP-Affinitätschromatographie**

Gezeigt sind die Coomassie-gefärbten Gele der SDS-PAGE-Analyse der aufgefangenen Fraktionen von der PLP-Säule. Der Pfeil zeigt auf die Profilin IV-Proteinbande bei ca. 15 kDa, L: Lysat vor der Säule, LD: Lysat nach Säulendurchfluss, 2 M Urea 2-8: Fraktionen 2-8 des 2 M Urea-Waschpuffers nach der Säule, 4 M Urea 2-10: Fraktionen 2-10 des 4 M Eluats, 8 M Urea 2-10: Fraktionen 2-10 des 8 M Eluats, LM: Low Mass-Ladder, PS: Prestained-Marker.

### 3.8 Screening einer *Yeast Two-Hybrid*-Bibliothek zur Identifizierung potentieller Interaktionspartner der Profilin III und IV

Erste Untersuchungen hinsichtlich typischer Profilin-Interaktionen mit Aktin und Poly-L-Prolin zeigten, dass sich Profilin III und IV in ihren biochemischen Bindungseigenschaften unterscheiden. Während für Profilin III eine Interaktion mit Aktin und Poly-L-Prolin gezeigt werden konnte, sind für Profilin IV bisher keine Bindungspartner bekannt. Über die molekularen Funktionen der Profilin III und IV in den männlichen Keimzellen der Säuger kann bisher nur spekuliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten durch *Yeast Two-Hybrid*-Screening gegen eine Testis-cDNA-Bibliothek potentielle Interaktionspartner der Profilin III und IV identifiziert und hierdurch Hinweise auf eine mögliche Funktion der beiden Profilin in den männlichen Keimzellen gewonnen werden. Hierzu wurde das *Gal4 Matchmaker Two-Hybrid System 3* von Clontech eingesetzt. Als *Bait*-Proteine wurden die kompletten ORFs der murinen Profilin III (NM\_029303) und IV (NM\_028376) gewählt. Diese wurden durch PCR mit spezifischen Primern (siehe Tabelle 3.19) aus Testis-cDNA adulter Mäuse amplifiziert und im durchlaufenden Leseraster in den Hefevektor pGBKT7 kloniert, so dass ein Fusionsprotein aus dem jeweiligen Profilin und N-terminal angefügter Gal4-DNA-BD mit *c-myc-tag* entstehen konnte. *Bait*-Konstrukte mit korrekter Sequenz und ohne Leserasterverschiebung wurden für das *Yeast Two-Hybrid* Screening in den Mat *a*-Hefestamm AH109 transformiert.

#### 3.7.2 Vorbereitende Untersuchungen

Um unspezifisches / falsch positives Wachstum auszuschließen und optimale Bedingungen für den Screen zu ermitteln wurden die gleichen vorbereitenden Untersuchungen wie für die HE6-*Yeast Two-Hybrid*-Screenings durchgeführt.

Beide Profilin-*Bait*-Konstrukte konnten erfolgreich in den Mat *a*-Hefestamm AH109 transformiert werden. Die Transformanten konnten wie erwartet ihre Tryptophan-Auxotrophie kompensieren und zeigten nur Wachstum auf SD-Medium ohne Tryptophan (SD/-T) und nicht auf SD/-Leucin. Der Vergleich der Wachstumsrate über die OD<sub>600</sub> zeigte keine signifikanten Unterschiede im Wachstum zwischen den Transformanten mit leerem pGBKT7-Vektor und denen mit dem Profilin-*Bait*-Vektor, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass beide Profilin-*Baits* keine toxische Wirkung auf das Wachstum der Hefestämme haben. Weiterhin konnte für beide *Baits* eine autonome Transkriptionsaktivität für die Reportergene *HIS3* und *ADE2* sowie eine unspezifische Interaktion mit der Gal4-AD ausgeschlossen werden. In einem Kontrollmating der Profilin-*Baits* mit Kontrollstämmen konnten keine drastischen Unterschiede in den Mating-Effizienzen beobachtet werden. Im Mating mit den beiden Kontrollstämmen AH109[pGBKT7-53] und Y187[pGADT7-T] waren ca. 6 % der Zellen diploid. In den Matings der *Bait*-Hefestämme AH109[pGBKT7-Profilin] mit dem Prey-Hefestamm Y187[pGADT7-T] wurden Mating-Effizienzen von 5,5 % (Profilin III als *Bait*) bzw. 8 % (Profilin IV als *Bait*) erreicht. Alle Effizienzen lagen deutlich über 2 %, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die *Bait*-Proteine keinen negativen Einfluss auf die Mating-Effizienz besitzen und in einem Bibliothek-Screening ausreichend viele unabhängige Klone gescreent werden können, um repräsentative Ergebnisse zu erlangen.

In Tabelle 3.13 ist das Wachstum der Profilin-*Bait*-Hefestämme bei unterschiedlichen 3-AT-Konzentrationen im SD/-TH-Medium aufgelistet.

**Tabelle 3.13: His3-Hintergrundwachstum der Bait-Hefestämme bei unterschiedlichen 3-AT-Konzentrationen nach sieben Tagen Inkubation bei 30°C. +: 1-10 cfu/ml, +/-: vereinzelte kleine Kolonien gewachsen; -: keine Klone gewachsen**

Bait Hefestamm	SD/-Trp/-His + 3-AT			
	0 mM	2 mM	6 mM	10 mM
AH109[pGBKT7-Profilin III]	+	+/-	+/-	-
AH109[pGBKT7-Profilin IV]	+	+/-	+/-	-

Beide *Bait*-Hefestämme zeigten sowohl auf den Platten ohne 3-AT als auch mit 2 mM und 6 mM 3-AT durch das Auftreten kleiner Hefe-Kolonien < 2mm schwaches Histidin-Hintergrundwachstum. Auf Medium mit 10 mM 3-AT konnte kein Hintergrundwachstum mehr detektiert werden. Dies bedeutete, dass dem LTH-Medium 10 mM 3-AT zugesetzt werden müsste, um unspezifisches Hintergrundwachstum zu unterbinden. Es zeigte sich jedoch durch Kontrollmatings mit verschiedenen *Prey*-Hefestämmen (Aktin und Diaph3), dass das Hintergrundwachstum und somit die optimale 3AT-Konzentration nicht nur vom *Bait*-Hefestamm allein abhängig ist, sondern zusätzlich durch den jeweiligen *Prey*-Hefestamm beeinflusst wird (siehe Tabelle3.14).

**Tabelle 3.14: Wachstumsanalyse zum unspezifischen His3-Hintergrundwachstum diploider Klone mit und ohne Interaktion zwischen Profilin III/IV und Aktin/Diaph3 auf SD/-LTH-Medium mit und ohne optimale 3-AT-Konzentrationen. ++: 10-20 cfu/ml, +: 1-10 cfu/ml -: keine Kolonien gewachsen; ohne Klammern dargestellt ist das Wachstum von Kolonien > 2 mm, die auf Interaktion hindeuten, in Klammern dargestellt ist das unspezifische Hintergrundwachstum kleiner Kolonien < 2 mm**

AH109[pGBKT7-Profilin III] x Y187[pGADT7-ProteinX]	SD/-Medium			
	-LTH	-LTH + 10 mM 3-AT	-LTA	-LTHA
Profilin III x Aktin (Interaktion)	++/(++)	++/(-)	++/(-)	++/(-)
Profilin IV x Aktin (keine Interaktion)	-/(++)	-/(-)	-/(-)	-/(-)
Profilin III x Diaph3 (Interaktion)	++/(++)	-/(-)	++/(-)	++/(-)
Profilin IV x Diaph3 (keine Interaktion)	+/(++)	-/(-)	-/(-)	-/(-)

In einem Y2H-Screening besteht nun das Problem, dass das *Bait*-Protein mit einer Vielzahl potentieller Interaktionspartner interagiert, so dass im Vorhinein keine optimale 3-AT-Konzentration festgelegt werden kann. Auch auf die Gefahr hin, unspezifische Interaktionen zu detektieren, wurden daher in Y2H-Screens, die auf SD/-LTH durchgeführt wurden, kein 3-AT zugesetzt, um möglichst keine Interaktionen zu inhibieren.

### 3.8.2 Yeast Two-Hybrid-Library-Screening einer prä-transformierten murinen Hoden-cDNA-Bibliothek

Nach Abschluss aller notwendigen Tests wurden die Profilin-Konstrukte im Mat a-Hefestamm AH109 in *Yeast Two-Hybrid-Library*-Screenings eingesetzt. Die Screens wurden wie unter 2.3.2.9 beschrieben gegen eine in den Mat  $\alpha$ -Hefestamm Y187 vortransformierte murine Testis cDNA-Bibliothek durchgeführt. Die verwendete Testis-cDNA-Bibliothek repräsentierte bei einem Titer von  $> 5 \times 10^7$  cfu/ml insgesamt  $1,75 \times 10^7$  unabhängige Klone. Insgesamt wurden vier Y2H-Library-Screens, als LS-5 bis LS-8 bezeichnet, auf unterschiedlich stringenten Selektionsmedien durchgeführt. Triple-Dropout-Medium (SD/-LTH und SD/-LTA) diente der weniger stringenten Selektion und der Erfassung von schwächeren Proteininteraktionen. Bei der Verwendung von Quadruple-DO-Medium (SD/-LTHA) erfolgte die Selektion auf Diploide, die den *ADE2*- und den *HIS3*-Reporter exprimieren. In Tabelle 3.15 sind die in den einzelnen Screens verwendeten *Bait*-Konstrukte und Selektionsmedien aufgelistet.

**Tabelle 3.15: Mit den Profilin-Baits durchgeführte Yeast Two-Hybrid Library-Screens**

Library-Screen	Bait-Protein	Bibliothek	Medium
LS 5	mProfilin IV	BD-Matchmaker mTestis (in <i>S.cerevisiae</i> Y187, Mata), S3467, Lot#3090490	SD/-LTHA
LS 6	mProfilin IV		SD/-LTH
LS-7	mProfilin III		SD/-LTA
LS-8	mProfilin IV		SD/-LTA

Nach Aufbringen der Screening-Ansätze auf die SD-Selektionsmedien wurden die Platten 8-21 Tage inkubiert, um auch langsam wachsenden Kolonien, die auf schwache Protein-Interaktionen hindeuten, die Chance zum Wachsen zu geben. Die Platten wurden täglich kontrolliert und das Wachstum diploider Kolonien dokumentiert. Für jedes Screening wurde zudem der Bibliothek-Titer, die Mating-Effizienz und die Anzahl der gescreenten unabhängigen Klone berechnet. In Tabelle 3.16 sind diese Ergebnisse aus den einzelnen Library-Screens zusammengefasst dargestellt.

**Tabelle 3.16: Bibliothek-Titer, Mating-Effizienzen und Anzahl der Klone aus den Y2H-Screens mit den Profilin-Baits**

	LS-5	LS-6	LS-7	LS-8
Bibliothek-Titer	13 x 10 <sup>7</sup> cfu/ml	15 x 10 <sup>7</sup> cfu/ml	11,8 x 10 <sup>7</sup> cfu/ml	7,75 x 10 <sup>7</sup> cfu/ml
Mating-Effizienz	9,7 %	3,7 %	7,8 %	8 %
Gescreente Klone	14 x 10 <sup>6</sup> cfu/ml	3,4 x 10 <sup>6</sup> cfu/ml	5,4 x 10 <sup>6</sup> cfu/ml	6,2 x 10 <sup>6</sup> cfu/ml
Gewachsene Klone	3	47	152	6 / 28

Für ein erfolgreiches *Yeast Two-Hybrid Library*-Screening sollten nach Angaben des *Matchmaker™ Pretransformed Libraries User Manual* (2003) ein Titer von > 5 x 10<sup>7</sup> cfu/ml vorliegen sowie mit einer Mating-Effizienz von > 2%, mindestens 1 x 10<sup>6</sup> unabhängige Klone gescreent worden sein, um die komplexe mRNA-Population des Hoden-Gewebes zu repräsentieren. Diese Bedingungen wurden in allen vier Screens deutlich erfüllt, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die Screenings nicht durch eingeschränkte Mating-Effizienzen oder ungenügend Klonzahlen limitiert waren.

### 3.8.2.1 Eliminierung falsch-positiver Klone durch Screening auf Reporter-gen-Expression, Prey-Plasmid-Isolierung, *AluI*-Restriktionsanalyse und Sequenzierung

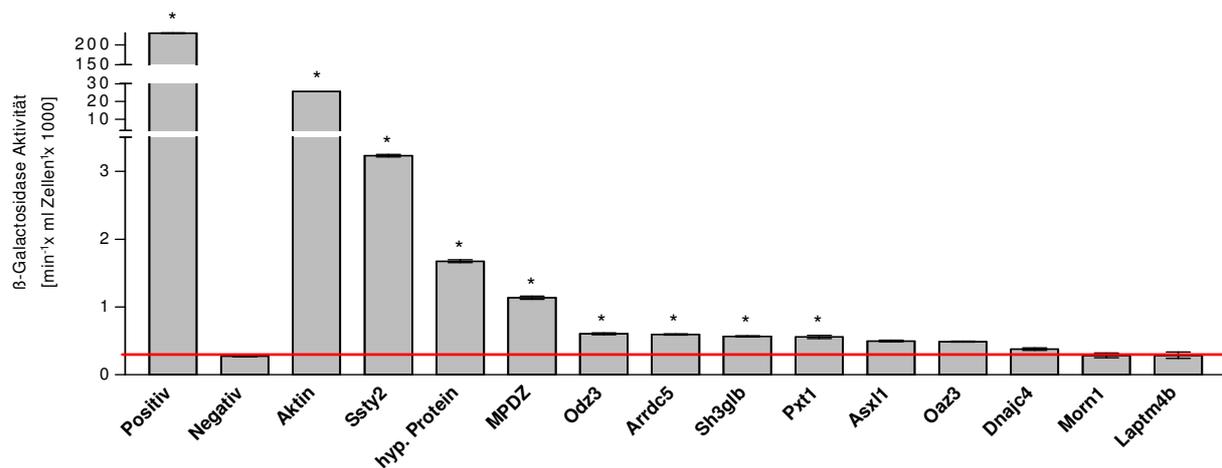
Die Verifizierung und Analyse der potentiellen Profilin-Interaktionspartner, um falsch positive Klone auszuschließen und potentiell interessante Interaktionspartner zu identifizieren, erfolgte wie unter 3.2.3.1 beschrieben. Im Folgenden wird für die durchgeführten Profilin-Screens eine zusammenfassende Tabelle geliefert, in der die verbleibenden Klone nach den einzelnen Analyseschritten aufgelistet ist. Erst nachdem die Anzahl der Klone durch Auswahl potentiell interessanter Interaktionspartner ein überschaubares Maß eingenommen hat, wird auf die ausgewählten Klone und die zur Verifizierung durchgeführten Studien näher eingegangen.

**Tabelle 3.17: Analyse und Auswertung der Profilin-Y2H-Library-Screens.**

Analyseschritt	Profilin-Library-Screen			
	Profilin IV			Profilin III
	LS-5	LS-6	LS-8	LS-7
Gescreente Klone	14 x 10 <sup>6</sup> cfu/ml	3,4 x 10 <sup>6</sup> cfu/ml	5,4 x 10 <sup>6</sup> cfu/ml	6,2 x 10 <sup>6</sup> cfu/ml
Klone nach Selektion auf HIS3 <u>oder</u> ADE2	-	47	30	152
Klone nach Selektion auf HIS3 <u>und</u> ADE2	3	36	4	130
Klone nach Eliminierung von Klonen mit multiplen/ohne Inserts	3	28	4	74
Klone nach Eliminierung von Duplikaten	2	16	2	52
Sequenzierte Klone	2	16	2 + 20	36
Klone nach Eliminierung falsch Positiver	1	11	1 / 10	13
Auswahl potentiell interessanter Klone	1	9	5	13
Klone mit $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität	11			8
Bestätigte Interaktionen im Einzelmating	Nicht durchgeführt			7
Potentielle HE6-Interaktionspartner	11			7

### 3.8.2.2 Profilin III als *Bait*-Protein

Mit Profilin III als *Bait*-Protein blieben nach Eliminierung falsch positiver Interaktionspartner durch Wachstumsselektion, PCR der Prey-Inserts, *AluI*-Dau und Sequenzanalyse 13 potentielle Interaktionspartner bestehen. Diese wurden als potentiell interessante Interaktionspartner in Betracht gezogen und einem quantitativen  $\beta$ -Galaktosidasetest unterzogen, um die Expression des *lacZ*-Reportergens sowie die Stärke der Interaktion mit Profilin III zu ermitteln. In Abbildung 3.38 ist das Ergebnis dieses  $\beta$ -Galaktosidasetests graphisch dargestellt.



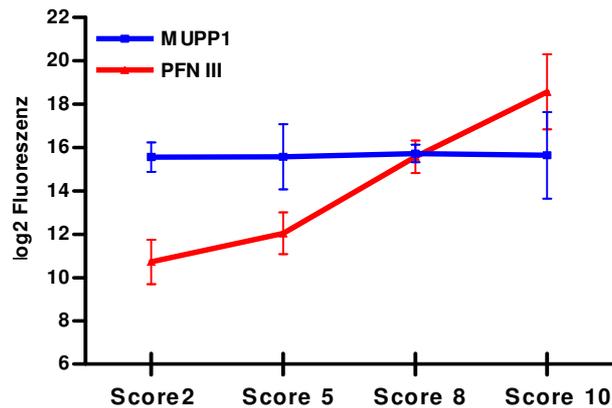
**Abb. 3.38: Quantitativer  $\beta$ -Galaktosidasetest der 13 verbleibenden diploiden Klone aus dem Y2H-Library-Screen mit Profilin III als *Bait*-Protein.** Dargestellt sind die ermittelten  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten [Milliunits/(ml x Zellen)] diploider Klone aus den Y2H-Screening mit Profilin III als *Bait*. Die rote Linie markiert den Negativwert als Ausschlussgrenze. \* markiert signifikante  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ( $p \leq 0,5$ ) im Vergleich zur Negativkontrolle. Als Negativkontrolle dienten diploide Klone ohne Interaktion zwischen *Bait* und *Prey* (HE6-C-Term. x SV40 large T-Antigen) als Positivkontrolle diploide Hefeklone mit Interaktion zwischen p53 und SV40 large T-Antigen als *Prey*.

Deutlich signifikante  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten wurden für die diploiden Klone mit MPDZ ( $p = 0,25$ ), einem hypothetischen Protein ( $p = 0,16$ ), Ssty2 ( $p = 0,09$ ) und Aktin ( $p = 0,01$ ) als *Prey*-Protein ermittelt, wobei Aktin mit 25,5  $\beta$ -Gal-Units die weitaus stärkster Interaktion mit Profilin III zeigte. Vier Klone zeigten eine schwach signifikante  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität mit einem  $p$ -Wert von 0,5 bis 0,4 und somit eine relativ schwache Interaktion zwischen Profilin III und dem *Prey*-Protein (Pxt1, Sh3glb, Arrdc5, Odz3). Nach dem quantitativen  $\beta$ -Galaktosidasetest verblieben somit acht potentiell interessante Interaktionspartner des Profilins III, die sich durch die Expression aller drei Reportergene hervorhoben. In Tabelle 3.18 sind diese Interaktionspartner dargestellt und die Häufigkeit ihrer Treffer sowie die im Y2H-Screen gefischten Proteinbereiche aufgelistet.

Das Zytoskelett-Protein Aktin wurde mit sieben Treffern weitaus am häufigsten als potentieller Profilin III-Interaktionspartner identifiziert. Die hohe Treffer-Zahl sowie die starke  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität (23  $\beta$ -Gal-Units) zeigen, dass es sich um einen Interaktionspartner mit hoher Affinität zu Profilin III handelt. Ebenfalls mehrfach, jedoch deutlich weniger oft als Aktin, und zudem mit schwächerer  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität, wurden Ssty2 (3x, 3,3  $\beta$ -Gal-Units) und ein hypothetisches Protein (2x, 1,7  $\beta$ -Gal-Units) ermittelt. Bei beiden handelt es sich um Proteine, die bisher nicht beschrieben / charakterisiert wurden und deren Funktionen unbekannt sind.

Die verbleibenden potentiellen Interaktionspartner wurden im Y2H-Screen allesamt nur einmal gefunden und zeigten zudem schwächere  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten, so dass eine deutlich schwächere Interaktion mit Profilin III angenommen werden muss. Unter diesen Proteinen erschien

das Multiple PDZ-Domänen Protein MUPP1 besonders interessant. Für MUPP1 wurde bei Säugern eine Lokalisation im Akrosom von runden und elongierenden Spermatisden beschrieben, die sich mit der PFN III-Lokalisation deckt [Heydecke *et al.*, 2006]. Dies ließ erwarten, dass die MUPP1-mRNA ebenso wie PFN III ein post-meiotisches Expressionsprofil aufweisen müsste, das mit dem Auftreten von Spermatisden im Verlauf der Spermatogenese korreliert ist. Quantitative RT-PCR-Analysen (Abbildung 3.39) zeigten jedoch für die MUPP1-mRNA keine Korrelation mit dem Verlauf der Spermatogenese. Vielmehr ergaben sich gleich bleibende Expressionslevel ohne Stadien-spezifische Expressionsunterschiede, so dass eine überwiegend somatische Expression der MUPP1-mRNA und somit des Proteins angenommen werden muss.



**Abb. 3.39:** Quantitative RT-PCR-Analyse zur Expression der MUPP1-mRNA Expression humanen Testisproben der Score Gruppen 2, 5, 8 und 10 im Vergleich zu Profilin III; dargestellt sind die normalisierten Expressionsprofile aus der quantitativen RT-PCR für MUPP1 (blaue Linie) und Profilin III (rote Linie); pro Score Gruppe wurden fünf individuelle Testisproben untersucht.

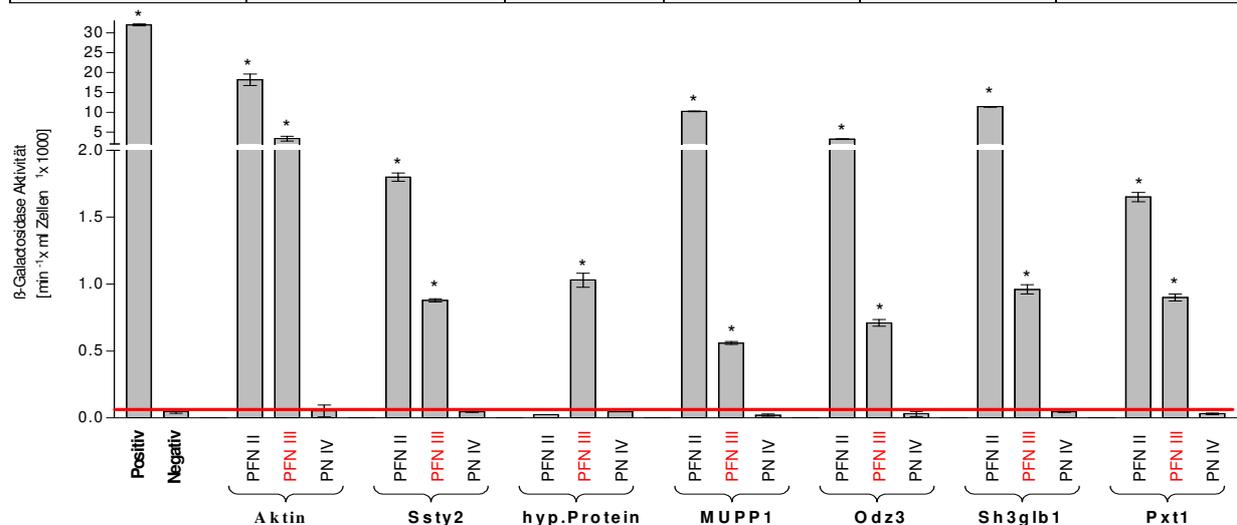
**Tabelle 3.18:** Potentiell interessante Interaktionspartner von Profilin III aus dem *Yeast Two-Hybrid-Library-Screen*. In der Tabelle sind die im Y2H-Screen gefischten Prey-Protein kurz beschrieben, die Accession-Nummern und Referenzen aufgelistet und die in den Prey-Proteinen repräsentierten Proteinbereiche aufgelistet. aa: Aminosäure, bp: Basenpaar, ORF: *Open reading frame*; UTR: untranslatierte Region

Prey-Protein	Kurze Beschreibung	Referenz	Bereiche des Prey-Inserts
7 x $\beta$ -Aktin NM_007393 / NP_031419	Ubiquitär exprimiertes zytoplasmatisches Zytoskelett-Protein; durch Arginylierung von $\beta$ -Aktin wird das Zytoskelett und die Zell-Motilität reguliert die Polymerisierung von G-Aktin zu filamentösen F-Aktin wird u.a. durch Profilin reguliert, die Aktin in einem molaren Verhältnis von 1:1 binden	Carlsson <i>et al.</i> , 1977 Pollard <i>et al.</i> , 2000 Hu <i>et al.</i> , 2001 Karakozova <i>et al.</i> , 2006	Es wurde sieben mal der komplette ORF inklusive 3' UTR gefischt
3 x Ssty2 ( <i>spermiogenesis specific transcript on Y2</i> ) NM_023546 / NP_076036	Eines vieler Y-Chromosomaler Ssty-Multicopy-Gene, für die bisher kaum Proteine nachgewiesen wurden. Partielle Deletionen der Y-chr. Ssty-Bereiche resultieren in gestörter Fertilität und Spermien-Defekten. Als einziges Protein wurde bisher Ssty1 identifiziert, das spezifisch während der Spermiogenese in Spermatischen exprimiert ist. Die molekulare Funktion ist unbekannt. Proteine der Spin/Ssty-Familie enthalten drei ca. 50 aa lange Spin/Ssty-Sequenz-Motive.	Staub <i>et al.</i> , 2001 Toure <i>et al.</i> , 2004 Toure <i>et al.</i> 2004b	Das Prey -Insert enthält den Sequenzbereich des ORF, der aa 93-Ende des Proteins + 3' UTR kodiert. Dieser Bereich enthält die Ssty-Spin-Motive 2+3 (aa 100-149 + 178-223)
2 x Hypothetisches Protein ( <i>4930519H02 gene</i> ) XM_899261 / XP_904353	Bisher nicht beschrieben und charakterisiert	-	Gefischt wurde der komplette ORF des hypothetischen Proteins inklusive 5' und 3' UTR
1 x MPDZ/MUPP1 ( <i>multiple PDZ-domain protein</i> ) NM_010820 / NP_034950	2055 aa großes Protein mit insgesamt 13 PDZ-Domänen. PDZ-Proteine vermitteln spezifische Protein-Protein-Interaktionen in Multi-Protein-Komplexen und spielen eine Rolle bei der Signaltransduktion zwischen transmembranen und zytoplasmatischen Komponenten. MUPP1 ist in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, unter anderen ist eine Lokalisation im Akrosom von runden und elongierten Spermien beschrieben, die sich mit der PFN III-Lokalisation deckt	Fanning & Anderson, 1999 Fan & Zhang, 2002 Heydecke <i>et al.</i> , 2006	Es wurde der C-terminale Bereich (aa 1859-2055) des MUPP1-Proteins mit den PDZ-Domänen 12 und 13 sowie der 3' UTR gescreent.
1 x Odz3 ( <i>odd Oz/ten-m homolog 3</i> ) NM_011857 / NP_035987	Integrales Protein der Plasmamembran (2715 aa) mit acht EGF-ähnlichen Modulen (aa 520-780), zwei intrazellulären Regionen (aa 10-195 und aa 168-308) und langem C-Terminus; Odz3 zählt zur Familie der Typ II Transmembranproteine mit unbekannter Funktion, aber es wird eine Rolle in der Signaltransduktion angenommen. Stark exprimiert in Testis, Niere und Gehirn	Ben-Zur <i>et al.</i> , 2000 Oohashi <i>et al.</i> , 1999	Vom Prey-Insert werden die aa 1507-1646 des ORF kodiert; dann folgt ein Stopp-Codon; dieser Bereich umfasst kein Protein- Domänen
1 x Arrdc5 ( <i>arrestin domain containing 5</i> ) NM_029799 / NP_084075	342 aa großes Protein mit einer N-terminalen-Domäne (aa 37-138 ) und einer C-terminalen Arrestin-Domäne (aa 186-318). Nach GnfSym-Atlas spezifisch im Testis exprimiert; hypothetisches Protein unbekannter Funktion	-	Vom Prey werden nur aa 1-98 richtig kodiert, dann folgt eine Leseraster-Verschiebung und ein Stopp (aa 137)
2 x Sh3glb1/Bif-1 ( <i>SH3-domain GRB2-like B1/Endophilin</i> ) NM_019464 / NP_062337	Sh3glb1 gehört zur Familie der Endophilin B-Proteine, welche mit intrazellulären Membranen assoziiert sind und wahrscheinlich eine Funktion in Membran-gebundenem Transport und Endozytose von Vesikeln haben; Sh3glb1 (397 aa) enthält N-terminale Domäne zur Lipid-Bindung und eine SH3 Domäne (aa 309-363), welche die Bindung an Poly-Prolin-Proteine vermittelt und diese als Adaptor-Protein transportiert. Unter anderem wird von Endophilin B Dynamamin, ein mit den Mikrotubuli assoziiertes Zytoskelett-Protein, gebunden.	Schuske <i>et al.</i> , 2003 Modregger <i>et al.</i> , 2003	Es wurde der Großteil des ORF (aa 98-355 von Sh3glb1) gefischt. Dieser Bereich umfasst fast die komplette SH3-Domäne.
1 x Pxt1 ( <i>peroxisomal, testis specific 1</i> ) NM_153390 / NP_700439	Kleines (51 aa) Testis-spezifisches Protein ohne Protein-Domänen, das in den Peroxisomen männlicher Keimzellen lokalisiert ist. Die Funktion des Proteins ist bisher unbekannt.	<a href="http://www.humangenetik.gwd.de/HG/1/index.php?i=Fo&amp;s=Peroxisomalen">http://www.humangenetik.gwd.de/HG/1/index.php?i=Fo&amp;s=Peroxisomalen</a>	Es wurde der komplette ORF inklusive 5' und 3' UTR gefischt

Zur Bestätigung der potentiellen Interaktionen wurden zunächst Kontroll-Matings der *Prey*-Proteine mit den Profilinen II, III und IV sowie der Gal4-DNA-BD durchgeführt, um die Spezifität der Profilin III-Interaktion zu ermitteln. In Tabelle 3.19 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Die Quantifizierung der Protein-Protein-Interaktionen aus den Einzelmatings erfolgte durch einen  $\beta$ -Galaktosidasetest, dessen Ergebnisse in Abbildung 3.40 graphisch dargestellt sind.

**Tabelle 3.19: Ergebnisse der Kontrollmatings zur Verifizierung der Interaktionen zwischen Profilin III und den gescreenten Prey-Proteinen.** Interaktion wurde durch Wachstum auf den Selektionsmedien SD/-LTH, -LTA und -LTHA detektiert. +++: > 100 cfu/ml, ++: 50-100 cfu/ml, +: 10-50 cfu/ml +/-: 1-10 cfu/ml; -: keine Kolonien.

Prey-Protein	Bait-Protein	Mating-Effizienz	Interaktion		
			-LTH	-LTA	-LTHA
Aktin	Profilin II	18 %	+++	+++	+++
	<b>Profilin III</b>	30 %	+++	+++	++
	Profilin IV	35 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	22 %	-	-	-
Ssty2	Profilin II	19 %	+++	+++	++
	<b>Profilin III</b>	16 %	+++	+++	+++
	Profilin IV	13 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	25 %	-	-	-
Hypot. Protein	Profilin II	21 %	-	-	-
	<b>Profilin III</b>	14 %	+	+	+
	Profilin IV	12 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	50 %	-	-	-
Mupp1	Profilin II	45 %	+++	+++	+++
	<b>Profilin III</b>	50 %	+++	+++	++
	Profilin IV	40 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	50 %	-	-	-
Odz3	Profilin II	22 %	+++	+++	+++
	<b>Profilin III</b>	31 %	+++	+++	+++
	Profilin IV	25 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	30 %	-	-	-
Sh3glb1	Profilin II	42 %	+/-	+/-	+/-
	<b>Profilin III</b>	57 %	++	++	++
	Profilin IV	45 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	40 %	-	-	-
Pxt1	Profilin II	41 %	+++	+++	+++
	<b>Profilin III</b>	32 %	+++	+++	+++
	Profilin IV	35 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	30 %	-	-	-

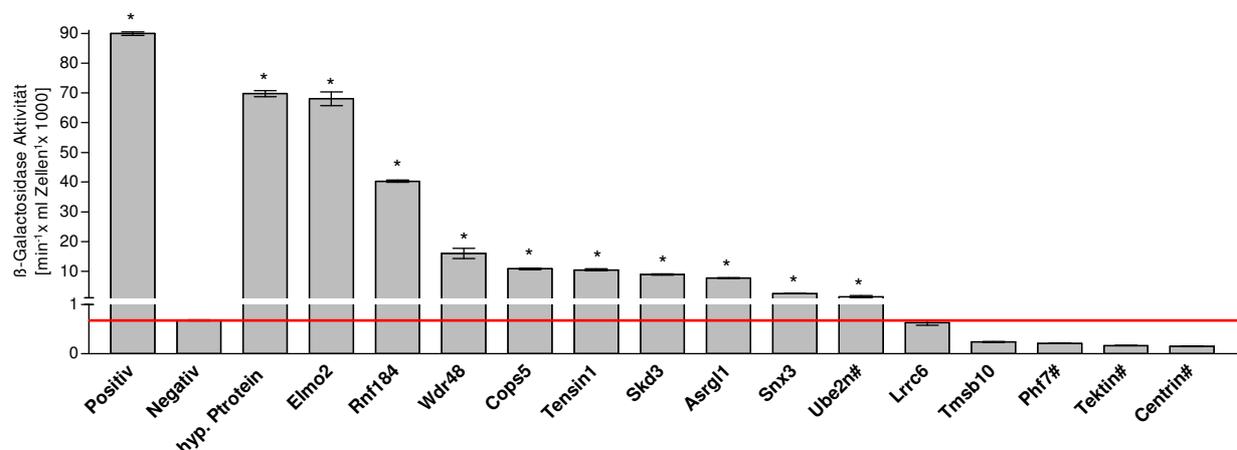


**Abb. 3.40: Quantitativer  $\beta$ -Galaktosidasetest der diploiden Klone aus den Kontrollmatings zur Analyse der spezifischen Interaktion der Prey-Proteine mit Profilin III.** Dargestellt sind die ermittelten  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten [Milliunits/(ml x Zellen)] diploider Klone mit den Profilinen als Bait und den potentiellen PFN III-Interaktionspartnern als Prey. Die rote Linie markiert den Negativwert als Ausschlussgrenze. \* markiert signifikante  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ( $p \leq 0,5$ ) im Vergleich zur Negativkontrolle. Als Negativkontrolle dienten diploide Klone ohne Interaktion zwischen Bait und Prey (HE6-C-Term. x SV40 large T-Antigen), als Positivkontrolle diploide Hefeklone mit Interaktion zwischen p53 und SV40 large T-Antigen als Prey.

Für alle getesteten *Prey*-Proteine konnte eine Interaktion mit Profilin III bestätigt und eine unspezifische Reaktion mit der Gal4-DNA-BD ausgeschlossen werden. Jedoch scheint nur das hypothetische Protein allein spezifisch mit Profilin III zu interagieren. Alle anderen *Prey*-Proteine zeigten neben einer Profilin III-Interaktion zusätzlich Interaktion mit dem nahe verwandten Profilin IIa. Dabei fiel die Interaktion mit Profilin II in allen Fällen quantitativ deutlich stärker aus. Am deutlichsten war dies bei MUPP1 zu beobachten. Keines der getesteten *Prey*-Proteine zeigte mit Profilin IV eine Interaktion. Die quantitativ stärkste Interaktion mit Profilin II und III wurde für Aktin verzeichnet. Eine Interaktion von Aktin mit Profilinen ist bereits mehrfach beschrieben [z.B. Carlsson *et al.*, 1977; Pollar & Cooper, 1984; Pring *et al.*, 1992; Tilney *et al.*, 1983] und konnte auch in den funktionellen Studien für Profilin III gezeigt werden. Für die anderen *Prey*-Proteine sind bisher keine Interaktionen mit Profilinen beschrieben worden. Hier handelt es sich demnach um neue, potentielle Interaktionspartner der Profileine II und/oder III. Das hypothetische Protein erscheint dabei aufgrund seiner spezifischen Interaktion mit Profilin III und der zweitstärksten  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität als interessantester Interaktionspartner.

### 3.8.2.3 Profilin IV als *Bait*-Protein

Mit Profilin IV als *Bait*-Protein wurden drei Y2H-Screenings durchgeführt. Insgesamt konnten deutlich weniger potentielle Interaktionspartner ermittelt werden, als in einem einzigen Y2H-Screen mit Profilin III als *Bait*. Von diesen zeigte zudem nur knapp die Hälfte Wachstum bei Selektion auf die beiden Reportergene *HIS3* und *ADE2*, so dass nach Eliminierung von mehrfach vorkommenden Klonen und Klonen mit multiplen Inserts lediglich 20 potentielle Interaktionspartner übrig blieben. Diese und zusätzliche 20 Klone, die nur unter niedrig stringenten Bedingungen wuchsen, wurden durch Sequenzierung identifiziert. Dabei fiel auf, dass nicht ein Interaktionspartner ermittelt wurde, der in allen drei oder auch nur in zwei Screens überlappend gefunden wurde. Zudem wurden so gut wie keine Interaktionspartner mehrfach gefunden. Nach Eliminierung falsch-positiver Klone blieben letztlich 15 als potentielle Interaktionspartner des Profilin IV-Proteins bestehen. Diese wurden einem  $\beta$ -Galaktosidasetest unterzogen, um die Expression des *lacZ*-Reportergens sowie die Stärke der Interaktion mit Profilin III zu ermitteln (siehe Abbildung 3.41)

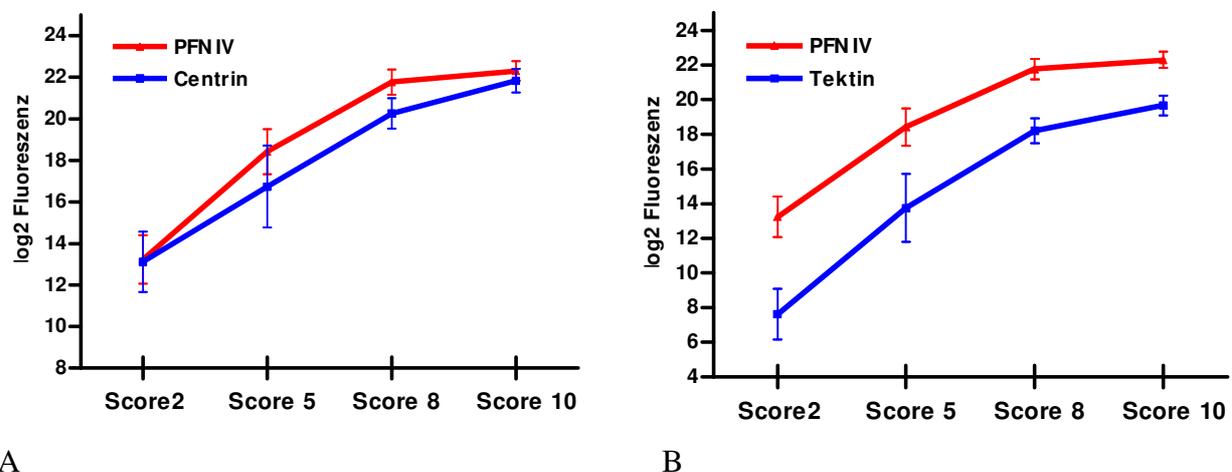


**Abb. 3.41: Quantitativer  $\beta$ -Galaktosidasetest der 15 diploiden Klone aus den Profilin IV-Screens zur Analyse der spezifischen Interaktion der *Prey*-Proteine mit Profilin IV** Dargestellt sind die ermittelten  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten [Milliunits/(ml x Zellen)] diploider Klone mit Profilin IV als *Bait* und den potentiellen Interaktionspartnern als *Prey*. Die rote Linie markiert den Negativwert als Ausschlussgrenze. \* markiert signifikante  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Vergleich zur Negativkontrolle. Negativkontrolle: diploide Klone ohne Interaktion zwischen *Bait* und *Prey* (HE6-C-Term. x SV40 large T-Antigen), Positivkontrolle: diploide Klone mit Interaktion zwischen p53 und SV40 large T-Antigen., # markiert *Prey*-Insert mit Leserasterverschiebungen.

Sequenzanalysen zeigten, dass sich bei vier der getesteten Klone die Inserts in einem falschen Leseraster befanden, so dass eine Translation nicht-korrekt-er Genprodukte angenommen werden musste (in Abbildung 3.44 mit # markiert). Diese falsch-kodierten Genprodukte könnten eine falsch-positive Interaktion hervorrufen oder andererseits eine tatsächliche Interaktion der korrekt-translatierten Genprodukte verbergen. Hierbei handelte es sich um die Proteine:

- Centrin1/Caltractin (NM\_007593 / NP\_031619), ein Calcium-bindendes Protein, das in Signaltransduktion und Zytoskelett-Organisation involviert ist;
- Tektin1 (NM\_011569 / NP\_035699), ein Protein des Mikrotubuli-Zytoskeletts, das im Schwanz und der post-akrosomalen Region der Spermien lokalisiert ist;
- Phf7 (NM\_027949 / NP\_082225), ein Protein der Sertolizellen, für das eine Funktion bei der Regulation der Spermatogenese beschrieben ist ;
- Ube2n (NM\_080560 / NP\_542127), eines von drei Enzymen der Ubiquitynylierung und eines der wenigen Proteine, dass mehrfach als potentieller Interaktionspartner gefischt wurde.

Unter diesen vier Proteinen erschienen Centrin und Tektin als besonders interessante Interaktionspartner des Profilin IV, da ihre mRNAs in einer quantitativen RT-PCR-Analyse ein übereinstimmendes Expressionsprofil zeigten. In Abbildung 3.42 sind die durch RT-PCR ermittelten Expressionsprofile der humanen Centrin- und Tektin-Transkripte im Vergleich zu Profilin IV dargestellt. Die Expression dieser drei Gene fand zeitgleich im Verlauf der Spermatogenese statt. Dieses Ergebnis könnte auf eine mögliche Interaktion der Proteine hindeuten.



**Abb. 3.42: Quantitative RT-PCR-Analyse zur Expression der Centrin- und Tektin mRNAs in humanen Testisproben der Score Gruppen 2, 5, 8 und 10 im Vergleich zu Profilin IV (A) Expressionsprofil des Centrin-Gens, (B) Expressionsprofil des Tektin-Gens; dargestellt sind die normalisierten Expressionsprofile aus der quantitativen RT-PCR für Centrin bzw. Tektin (blaue Linie) im Vergleich zu Profilin IV (rote Linie); pro Score Gruppe wurden mindestens fünf individuelle Testisproben untersucht,**

Um die Interaktion der korrekt-translatierten Genprodukte mit Profilin IV zu analysieren, wurden in einem nächsten Arbeitsschritt die ORFs der falsch kodierten *Prey*-Protein ohne Leserasterverschiebung neu kloniert und Einzelmatings zur Verifizierung der Interaktion mit Profilin IV durchgeführt. Zusätzlich wurde die Interaktion des Testis-spezifischen Thymosin  $\beta$ -10 (Tmsb10; NM\_025284) in Einzelmatings untersucht. Dieses Protein zeigte im  $\beta$ -Galaktosidasetest zwar keine Interaktion mit Profilin IV, jedoch erschien es aufgrund seiner beschriebenen Lokalisation im Akrosom runder und elongierender Spermatozoen und als Aktin-bindendes Protein des Zytoskeletts, welches als Gegenspieler des Profilins die Aktinpolymerisierung inhibiert [Xue & Goldberg, 2000], als ein interessanter potentieller Interaktionspartner. Zur Beurteilung der Spezifität einer möglichen

Interaktion, wurden in diesem Zuge auch Einzelmatings gegen die Profilin II und III und die Gal4-DNA-BD durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.20 zusammengefasst. Die Interaktion für Phf7 konnte nicht überprüft werden, da die Klonierung des ORF nicht erfolgreich war.

**Tabelle 3.20: Ergebnisse der Einzelmatings zur Verifizierung der Interaktionen zwischen Profilin III und den spezifisch translatierten Genprodukten Centrin, Tektin und Ube2n.** Interaktion wurde durch Wachstum auf den Selektionsmedien SD/-LTH, -LTA und -LTHA detektiert. +++: mehr als 100 cfu/ml, ++: 50-100 cfu/ml, +: 10-50 cfu/ml +/-: 1-10 cfu/ml; -: keine Kolonien auf Selektionsmedium gewachsen.

<i>Prey-Protein</i>	<i>Bait-Protein</i>	<b>Mating-Effizienz</b>	<b>Interaktion</b>		
			<b>-LTH</b>	<b>-LTA</b>	<b>-LTHA</b>
<b>Centrin</b>	Profilin II	30 %	-	-	-
	Profilin III	25 %	-	-	-
	<b>Profilin IV</b>	40 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	28 %	-	-	-
<b>Tektin</b>	Profilin II	40 %	-	-	-
	Profilin III	66 %	-	-	-
	<b>Profilin IV</b>	31 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	42 %	-	-	-
<b>Ube2n</b>	Profilin II	60 %	+++	+++	+++
	Profilin III	33 %	+++	+++	+++
	<b>Profilin IV</b>	30 %	+++	+++	+++
	Gal4-DNA-BD	40 %	++	++	++
<b>Tmsb10</b>	Profilin II	45 %	-	-	-
	Profilin III	40 %	-	-	-
	<b>Profilin IV</b>	18 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	30 %	-	-	-

Durch die Einzelmatings konnte jedoch auch für die korrekt-translatierten Proteine keine spezifische Interaktion mit Profilin IV gezeigt werden. Somit reduzierte sich die Zahl der noch verbleibenden potentiellen Interaktionspartner auf elf. Diese elf sind in Tabelle 3.21 näher beschrieben.

Da viele der *Prey*-Inserts nicht nur die ORF-Sequenz, sondern zusätzlich noch Bereiche aus den UTRs sowie *coiled-coil*-Regionen enthalten, müssen die Interaktionen dieser elf Proteine mit Profilin IV weiter verifiziert und analysiert werden. Ein nächster Schritt wäre es daher, distinkte Bereiche der gescreenten *Prey*-Protein zu klonieren und Einzelmatings durchzuführen, um Interaktionen mit unspezifisch translatierten Bereichen auszuschließen und spezifische Interaktion der Genprodukte zu untersuchen. Aus zeitlichen Gründen war dies im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr möglich.

**Tabelle 3.21: Potentiell interessante Interaktionspartner von Profilin IV aus den Yeast Two-Hybrid-Library-Screens.** In der Tabelle sind die im Y2H-Screen gefischten *Prey*-Proteine kurz beschrieben, die Accession-Nummern und Referenzen aufgelistet und die in den *Prey*-Proteinen repräsentierten Proteinbereiche aufgelistet; aa: Aminosäure, bp: Basenpaar, ORF: *Open reading frame*; UTR: untranslatierte Region

<b>Prey-Protein</b>	<b>Kurze Beschreibung</b>	<b>Referenz</b>	<b>Bereiche der Prey-Inserts</b>
1 x hypothetisches Protein NM_177185 / NP_796159	Hypothetisches Protein <i>LOC320538</i> (1313 aa) ohne charakteristische Protein-Domänen oder Sequenz-Motive; Expression und Funktion sind unbekannt	-	Das Prey-Insert kodiert aa 315 bis 620 des 1313 aa großen hypoth. Proteins.
1 x ELMO2 ( <i>engulfment and cell motility 2, ced-12 homolog, isoform2</i> ) NM_207706 / NP_997589	ELMO2 (732 aa) gehört zur Elmo/Ced-12-Familie, die eine Funktion bei der Zytoskelett-Mediation haben. Es enthält eine Elmo/CED12-Motiv (aa 322-496) und eine Phospholipase C Pleckstrin homology-Domäne (PH-PLC, aa 610-677), die diverse Funktionen übernehmen kann und oft in den Transfer von Proteinen zur Plasmamembran involviert ist. Die molekulare Funktion von ELMO2 ist nicht bekannt.	Lemmon <i>et al.</i> , 1998 Gumienny <i>et al.</i> , 2001	Es wurde der C-terminale Bereich des ORF + 3'UTR gefischt. Diese Sequenz kodiert aa 502-732 und umfasst die komplette PH-PLC-Domäne.
1 x Rnf184 ( <i>ring finger protein 184</i> ) XM_150227 / XP_150227	Rnf184 (581 aa) auch <i>MSL2L1 (male-specific lethal 2-like 1)</i> genannt, enthält eine Zink-Finger-Domäne des Typs C3HC4 ( <i>RING finger</i> , aa 44-84), eine Cystein-reiche Region zur Bindung von zwei Zinkionen und für die Mediation von Protein-Protein-Interaktionen. MSL-Proteine acetylieren das Histon H4 und steigern so die Transkription männlicher X-Chromosomaler Gene. Die molekulare Funktion für das MSL2-ähnliche Protein Rnf184 ist jedoch unbekannt.	Zhou <i>et al.</i> , 1995 Smith <i>et al.</i> , 2005	Das Prey-Insert enthält die C-terminale Sequenz des ORF + 3'UTR und kodiert das Rnf-Protein ab aa 344 bis zum Ende. Die Zink-Finger-Domäne ist nicht enthalten.
1 x WDR48 ( <i>WD repeat domain 48</i> ) NM_026236 / NP_080512	Das bProtein der <i>WD-repeat</i> -Familie (676 aa) enthält sieben WD40-Domänen (aa 14-388), welche eine Plattform für Proteinbindung bilden und unter anderem als Adapter/Regulator-Molekül in der Signaltransduktion und der Zytoskelett-Organisation eine Rolle spielen. WDR48 ist in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, seine Funktion ist jedoch unbekannt.	van Nocker&Ludwig, 2003 Killian & Hubbard, 2004	Es wurde eine Prey-Sequenz die die aa480 bis aa 67 kodiert, + 3'UTR gescreent Dieser Bereich enthält keine der sieben WD40-Domänen.
1 x Cops5 ( <i>COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 5</i> ) NM_013715 / NP_038743	Multifunktionlles Protein (334 aa), das mit einer Vielzahl von Proteinen des Zellzyklus und der Signaltransduktion interagiert und eine Rolle bei der Regulation von Proteininteraktionen, Zell-Zell-Kontakt abhängiger Signaltransduktion, Differenzierungsprozessen und Ubiquitinylierung spielt. Es enthält eine JAB/MPN-Domäne unbekannter Funktion (aa 54-191).	Fukumoto <i>et al.</i> , 2005 Tomoda <i>et al.</i> , 2004	Als Prey-Protein wurden aa 20-334 von Cops5 gescreent, also fast das komplette Protein mit der JAB/MPN-Domäne
1 x Tensin1 XM_619639 / XP_619639	Das Phosphoprotein (1708 aa) ist ein Strukturprotein, welches Aktinfilamente im Verhältnis 1:10 bindet und diese so miteinander verlinkt. Zudem inhibiert es die F-Aktin-Nukleation und verbindet das Zytoskelett mit der Plasmamembran Tensin1 enthält eine SH2-Domäne, eine Tensin-Phosphotyrosin-Binde-Domäne (PTB) und drei Aktin-bindende Domänen (aa 1-263, 2633-463 und 888-989)	Lo <i>et al.</i> , 1994 + 2004 Chen <i>et al.</i> , 2000	Das Prey-Insert enthält den ORF ab bp 1407 + 3'UTR. Auf Proteinebene werden aufgrund einer Leserasterverschiebung und eines Stopp-Codons nur 274 aa translatiert; darunter aa 468-676 von Tensin + 66 unspezifisch translatierte aa.; es sind keine Protein-Domänen repräsentiert
1 x Skd3 ( <i>supressor of K<sup>+</sup> transport defect 3</i> ) NM_009191 / NP_033217	Skd3 (677 aa) drei Ankyrin-Repeats (ANK, aa 133-162, 166-195, 265-294), welche Protein-Protein- sowie Protein-Zytoskelett-Interaktion vermitteln; eine AAA-Domäne für ATP-Bindung (aa 373-527) und eine <i>Coiled-coil</i> -Region (aa 318-336). Es wird vermutet, dass Skd3 in die mitochondriale Biogenese involviert ist, jedoch ist die molekulare Funktion unbekannt.	Murdock <i>et al.</i> , 1999	Das Prey-Protein besteht aus 50 unspezifisch translatierten aa, dann folgt Skd3 ab aa 216, mit dem dritten ANK-Repeat, der AAA-Domäne und der <i>coiled-coil</i> -Region
11 x Asrg11 / ALP ( <i>asparaginase like 1</i> ) NM_025610	Für Asrg11 (326 aa) sind keine Domänen oder Sequenzmotive vorhergesagt und Interaktionspartner und molekulare Funktion sind unbekannt. Für das Ratten-Asparaginase-like Protein (ALP) konnte gezeigt werden, dass es im Testis exprimiert und im Mittelstück der Spermien lokalisiert ist,	Bush <i>et al.</i> , 2002	Mit Profilin IV als Bait wurde Asrg11 ab aa73 gescreent.
2 x Snx3 ( <i>sorting nexin 3</i> ) NM_017472 / NP_059500	Snx3 (162 aa) ist ein zytoplasmatisch exprimiertes, hydrophiles Protein, das mit der Zellmembran assoziiert ist Es enthält eine PX-Domäne (aa 26-148), welche Bindung an Phosphoinositole vermittelt. snx-Proteine interagieren mit verschiedenen Rezeptoren und nehmen eine Funktion bei der intrazellulären Signaltransduktion ein. Die molekulare Funktion von snx3 ist unbekannt.	Haft <i>et al.</i> , 1998 Ellson <i>et al.</i> , 2002	Das Prey-Insert enthält den kompletten ORF mit einem Einschub von 52 bp + 5'und 3'UTR. Translatiert werden 24 aa der 5'UTR und die ersten 86 aa von snx3, welche einen Teil der PX-Domäne bilden

### 3.9 Gezielte Y2H-Studien zur Interaktion von Profilin IV mit Tubulin

Zusätzlich zum Bibliothek-Screening wurden gezielt mögliche Profilin IV-Interaktionspartner getestet. Ein möglicher Interaktionspartner ist das Tubulin, welches bereits von Witke *et al.* (1998) in Profilin I und II-Komplexen nachgewiesen wurde. Eine direkte Interaktion konnte jedoch nur für Profilin I und nicht für Profilin II gezeigt werden. In der Immunocytochemie konnte Profilin IV unter anderem in einer post-akrosomale Struktur zwischen dem Akrosom und der Manschette lokalisiert werden. Diese Struktur tritt vorübergehend und zeitgleich mit der Manschette auf und zeigte eine teilweise Co-Lokalisation mit dieser. Die Manschette besteht neben Aktin überwiegend aus Mikrotubuli, welche sich wiederum aus den helikal angeordneten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Isoformen zusammensetzen. Aufgrund seiner Mikrotubuli-assoziierten Lokalisation stellt sich die Frage, ob es sich bei Profilin IV eventuell um ein Mikrotubuli-interagierendes Protein handeln könnte. Um dieser Frage nachzugehen, wurden gezielte Interaktionsstudien im *Yeast Two-Hybrid*-System durchgeführt. Hierzu wurden die ORFs der Tubuline  $\alpha 2$  (NM\_011654) und  $\beta 2b$  (NM\_009447), sowie des Tubulin  $\delta$  (NM\_019756), welches im perinukleären Ring der Manschette lokalisiert ist [Kato *et al.*, 2004; Kierszenbaum, 2002] kloniert und in die Hefestämme AH109 und Y187 transformiert, so dass sie als Fusion an die Gal4-AD als *Prey*-Proteine exprimiert wurden. In Einzelmating-Experimenten wurde eine mögliche Interaktion mit den Profilinen II, III und IV untersucht. Die Ergebnisse sind zusammengefasst in Tabelle 3.22 dargestellt.

**Tabelle 3.22: Ergebnisse der Einzelmatings zur Analyse der Interaktionen zwischen den murinen Profilinen II, III und IV und Tubulin  $\alpha$  (NM\_011654),  $\beta$  (NM\_009447) und  $\delta$  (NM\_019756).** Interaktion wurde durch Wachstum auf den Selektionsmedien SD/-LTH, -LTA und -LTHA detektiert; -: keine Kolonien auf Selektionsmedium gewachsen. 1: 1 cfu/ml.

<i>Prey</i> -Protein	<i>Bait</i> -Protein	Mating-Effizienz	Interaktion		
			-LTH	-LTA	-LTHA
<b>Tubulin <math>\alpha</math></b>	Profilin II	38 %	-	1	1
	Profilin III	45 %	-	-	-
	<b>Profilin IV</b>	45 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	50 %	-	-	-
<b>Tubulin <math>\beta</math></b>	Profilin II	42 %	-	-	-
	Profilin III	56 %	-	-	-
	<b>Profilin IV</b>	35 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	45 %	-	-	-
<b>Tubulin <math>\delta</math></b>	Profilin II	65 %	-	-	-
	Profilin III	53 %	-	-	-
	<b>Profilin IV</b>	54 %	-	-	-
	Gal4-DNA-BD	46 %	-	-	-

Weder für Profilin II, III noch IV konnte eine Interaktion mit Tubulin  $\alpha$ ,  $\beta$  oder  $\delta$  ermittelt werden. Zwar wuchs bei den plattierten Matingansätzen mit Profilin II als Bait und Tubulin  $\alpha$  als *Prey*, jeweils eine Kolonie auf den Selektionsmedien SD/-LTA und SD/-LTHA, jedoch zeigte ein anschließend durchgeführter  $\beta$ -Galaktosidasetest (hier nicht gezeigt) keine signifikante  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität, so dass die detektierte Interaktion aufgrund der sehr geringen Anzahl der gewachsenen Kolonien und der fehlenden Expression des dritten Reportergens als falsch Positiv gewertet wurde.

## IV Diskussion

In dieser Arbeit ging es um die Frage der Regulation zweier Prozesse, die von entscheidender Bedeutung für die männliche Fertilität sind:

- 1) die morphologische Differenzierung der Keimzellen zu reifen Spermien und
- 2) den transepithelialen Flüssigkeitstransport in den ableitenden Samenwegen.

Beide Vorgänge hängen unmittelbar von der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts ab, das den gesamten Zellkörper durchzieht und reguliert umstrukturiert und geformt wird. Die Funktionen des Aktin-Zytoskeletts liegen in der mechanischen Stabilisierung der Zelle und ihrer äußeren Form sowie bei Transport und Bewegungen innerhalb der Zelle.

Die männlichen Keimzellen erfahren während ihrer Differenzierung von runden Spermatiden zu lang gestreckten Spermien eine dramatische morphologische Formveränderung, die für die Befruchtungsfähigkeit von grundlegender Bedeutung ist. Für diesen als Spermiogenese bezeichneten Differenzierungsprozess, der sich im Keimepithel des Hodens vollzieht, spielt die regulierte Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts und Wechselwirkungen zwischen dem Aktin-Zytoskelett der Sertolizellen auf der einen und dem Keimzell-eigenen Zytoskelett auf der anderen Seite, eine entscheidende Rolle [Vogl, 1989]. So bilden z.B. hochspezialisierte F-Aktin-haltige Strukturen der Sertolizellen, die so genannten ektoplasmatischen Spezialisierungen, dynamische Zell-Zell-Verbindungen, die der Ausrichtung und Orientierung der Keimzellen im Epithel dienen [Vogl, 1989]. In den Keimzellen selbst bilden sich in spezifischen Stadien und Regionen charakteristische Zytoskelett-Strukturen aus, die für die morphologische Gestaltung der Spermien, die Akrosomen-Biogenese, den Vesikel- und Proteintransport, sowie die Spermienfunktionen essentiell sind. So sind z.B. der subakrosomale F-Aktin/Keratin-haltige Akrosom/Akroplaxom-Komplex, sowie die postakrosomale F-Aktin-/Mikrotubuli-haltige Manschetten-Struktur an der Ausformung des Spermienkopfes beteiligt [Fouquet & Kann, 1994; Kierszenbaum *et al.*, 2003; Kierszenbaum & Tres, 2004]. Die beteiligten molekularen Komponenten sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Typischerweise sind Profiline, kleine Aktin-bindende Proteine, maßgeblich an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt [Carlsson *et al.*, 1977; Tilney *et al.*, 1983; Pring *et al.*, 1992; Schlüter *et al.*, 1999], so dass diese Protein-Familie im Zentrum dieser Arbeit stand. Im männlichen Genitaltrakt der Säuger weisen die Profiline die höchste Komplexität auf. Mindestens vier verschiedene Isoformen werden in räumlich und zeitlich regulierter Weise im Hoden exprimiert. Auf mRNA-Ebene ließen sich sogar fünf Profiline nachweisen. In dieser Arbeit wurde vor allem die Rolle der Testis-exprimierten Profiline III und IV näher untersucht. Dabei kamen verschiedene molekulare Methoden zum Einsatz, die es ermöglichen sollten, ihre Expression auf mRNA- und Protein-Ebene sowie ihre Wechselwirkung und Co-Lokalisation mit anderen Proteinen zu analysieren. Die erzielte funktionelle Charakterisierung und Lokalisation der Profiline III und IV wird zu einem besseren molekularen Verständnis der Säuger Spermiogenese beitragen.

In resorptiven Epithelien wie dem Nebenhodenepithel spielt das Aktin-Zytoskelett eine wichtige Rolle beim Auf- und Umbau von Verbindungen zwischen den Epithelzellen und für die Gestalt und resorptive Funktion der Mikrovilli und Stereozilien [Höfer & Drenckham, 1996]. Die Permeabilität der epithelialen Schlussleisten (*tight junctions*) hängt ebenfalls von einer regulierten Aktin-Dynamik ab [Madara *et al.*, 1986; Madara, 1987, Kojima *et al.*, 1999; Wittchen *et al.*, 1999]. Über eine Brücke von Adaptermolekülen sind Aktin-Filamente mit den transmembranen Schlussleisten-Proteinen verbunden und so an der physiologischen Regulation des parazellulären Flüssigkeitstransportes beteiligt. Die auslösende Signalkaskade, die auf einen Stimulus hin das

Aktin-Zytoskelett verändert und die Permeabilität der epithelialen Schlussleiste reguliert, ist jedoch bis heute unverstanden. Möglicherweise könnte es sich bei dem HE6-Rezeptor, für den eine zentrale Bedeutung für den transepithelialen Flüssigkeitstransport in den ableitenden Samenwegen gezeigt werden konnte [Davies et al., 2004], um einen lokalen Sensor für die Steuerung der Flüssigkeitsresorption handeln. Durch zwei methodisch unterschiedliche Herangehensweisen wurden daher die Bedeutung des HE6-Rezeptors und seine Stellung in der Signalkaskade untersucht. Zum einen wurden durch einen Vergleich des Expressionsmusters von Wildtyp- und HE6-KO-Mäusen Nebenhoden-spezifische Gene identifiziert, deren Transkription von einem funktionsfähigen Rezeptor abhängen. Mit dieser Methode konnte unter anderem die HE6-abhängige Expression eines wichtigen Schlussleisten-Proteins gezeigt werden. Zum anderen wurden mit Hilfe der *Yeast Two-Hybrid*-Methode weitere intrazelluläre HE6-Interaktionspartner nachgewiesen, die in eine Signaltransduktion involviert sein könnten.

#### 4.1 HE6 und eine Regulation des transepithelialen Flüssigkeitstransportes

HE6 wird spezifisch im Epithel des Ductuli efferentes und des Nebenhodens exprimiert [Obermann et al., 2003]. In diesem Bereich werden bis zu 90% der Luminalflüssigkeit über das Nebenhodenepithel resorbiert, wodurch ein spezielles biologisches Milieu für die post-testikuläre Spermienreifung, -lagerung und den Transport der Spermien im Nebenhoden geschaffen wird [Clulow et al., 1998; Hess, 2000]. Eine gestörte Flüssigkeitsresorption führt zu einem Flüssigkeitsrückstau in den Hoden und letztendlich zu männlicher Infertilität [Hess, 2003]. Der heptahelikale HE6-Rezeptor spielt eine essentielle Rolle bei der Regulation der transepithelialen Flüssigkeitsresorption in diesem Bereich und somit für die männliche Fertilität [Davies et al., 2004]. Die molekulare Funktion und Signaltransduktionswege des Rezeptors sind jedoch unbekannt. Die Lokalisation in unmittelbarer Nähe zum apikalen Aktin-Zytoskelett des resorptiven Epithels [Kirchhoff et al., submitted] legt die Vermutung nahe, dass HE6 am Anfang eines Signaltransduktionsweges stehen könnte, der ein Signal von der adluminalen Seite des Epithels auf das apikale Aktin-Zytoskelett und die epitheliale Schlussleiste weiterleitet und so den parazellulären Flüssigkeitstransport reguliert. Andererseits könnte HE6 aber auch direkt die Funktion der apikalen Mikrovilli, die eine Vielzahl an Ionen-Kanälen und Transportern enthalten, und somit den transzellulären Flüssigkeitstransport durch die Epithelzellen steuern.

In dieser Arbeit wurde durch den Vergleich des Expressionsmusters von WT und HE6-KO-Nebenhodengewebe ein Hinweis auf den erst genannten Mechanismus gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass die gezielte Mutation des HE6-Rezeptors unter anderem die Expression einer Komponente der epithelialen Schlussleiste beeinträchtigt, nämlich des Claudin-10 [Davies et al., 2007]. Claudine, kleine konservierte Transmembranproteine, sind der wichtigste Bestandteil der in Epithelien vorkommenden Zellverbindungen, den so genannten *tight junctions*. Sie spielen eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung eines spezifischen biologischen Milieus und der Zellpolarität, indem sie durch homotypische und heterotypische Interaktionen Poren zwischen den Zellen ausbilden und so die Permeabilität und Selektivität der Zellzwischenräume bestimmen und einen kontrollierten parazellulären Flüssigkeitstransport ermöglichen [Gumbiner, 1993; Morita et al., 1999]. Die Ionen-Selektivität der parazellulären Poren wird durch geladene Aminosäurereste ihrer extrazellulären Loops bestimmt, wohingegen die physiologische Regulation des *tight junctions* vermutlich über Aktin-Filamente erfolgt, mit denen die Schlussleistenproteine über *Scaffolding*-Protein verbunden sind [Van Itallie & Anderson, 2004]. Bei Claudin-10 handelt es sich

um ein Nebenhoden-spezifische Isoform, die ebenso wie HE6 im Epithel des proximalen Nebenhodenkopfes exprimiert ist, wo es apikal in den epithelialen Schlussleisten eine Rolle bei der Regulation der Zell-Permeabilität für Ionen, gelöste Stoffe und Wasser und somit bei der transepithelialen Flüssigkeitsresorption spielt [Guan *et al.*, 2005]. Durch Einbindung in die intrazelluläre HE6-Signaltransduktion könnten Claudin-10 über seine Verbindung zum apikalen Aktin-Zytoskelett eine veränderte Permeabilität der *tight junctions* und eine regulierte, HE6-abhängige Änderung der parazellulären Flüssigkeitsresorption bewirken.

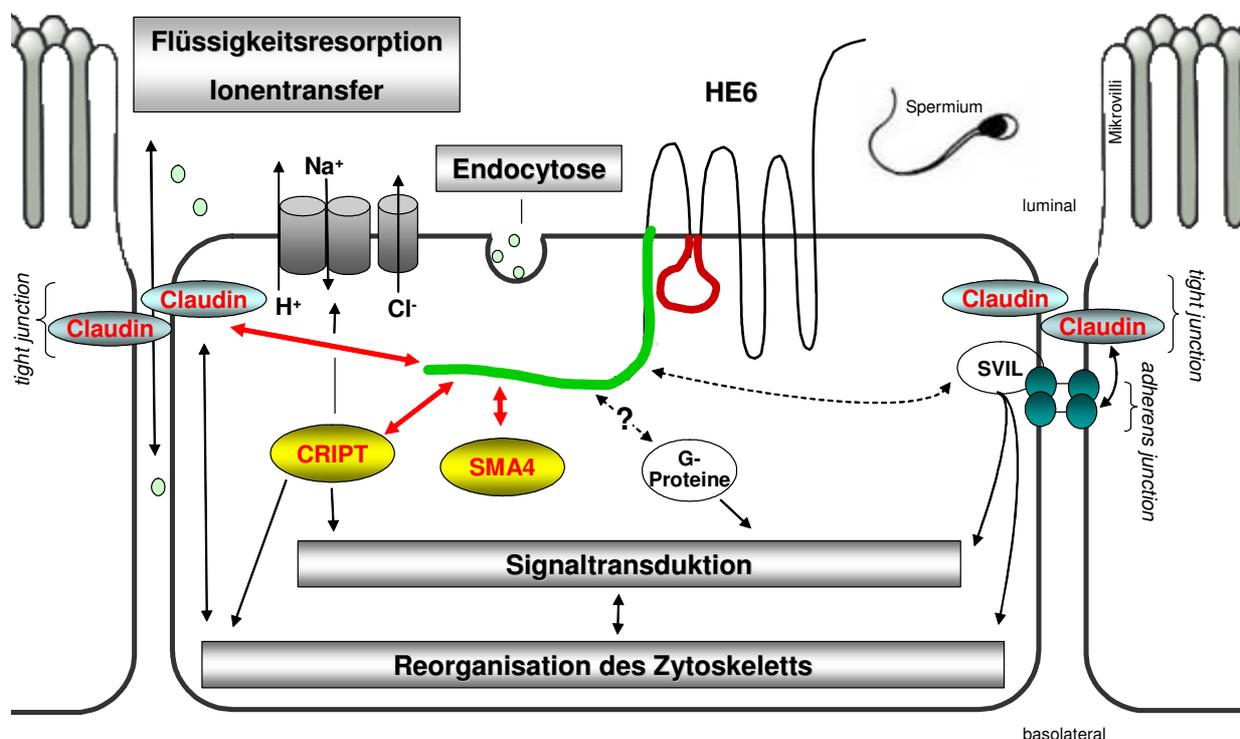
Eine zunächst vermutete direkte Interaktion des HE6-Rezeptors mit den Aktin-regulatorischen Profilinen [Kirchhoff *et al.*, 2006], vor allem dem Profilin IV, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Eine HE6-abhängige Regulation des apikalen Aktin-Zytoskeletts mittels Profilinen oder Profilin-ähnlichen Adaptermolekülen wie in Kirchhoff *et al.* (2006) angenommen, erscheint damit eher unwahrscheinlich. Auf Proteinebene konnte jedoch mit CRIPT eine anderes Zytoskelett-Protein als potentieller Interaktionspartner des HE6-Rezeptors ermittelt werden, das über eine Reorganisation des Zytoskeletts in eine HE6-abhängige Signaltransduktion und Regulation des Flüssigkeitsresorption involviert sein könnte. Bei CRIPT handelt es sich um ein hoch konserviertes zytoplasmatisches Protein, das in einer Vielzahl von Geweben, von Säugern bis Pflanzen vorkommt und mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett assoziiert ist. Zum einen besitzt das Protein eine Zytoskelett-regulatorische Funktion, indem es durch direkte Interaktion mit  $\beta$ -Tubulin die Organisation der Mikrotubuli beeinflusst [Niethammer *et al.*, 1998; Passafaro *et al.*, 1999]. Weiterhin kommt dem Protein eine Funktion als Adapter-Molekül zugute, indem es gleichzeitig neben Tubulin über seinen C-Terminus an weitere Proteine binden kann und diese so mit dem Zytoskelett verlinkt. So konnte für CRIPT z.B. eine gleichzeitige Interaktion mit Tubulin und der dritte PDZ-Domäne von PSD-95, einem *Scaffolding*-Protein von Membranproteinen und Ionen-Kanälen gezeigt werden [Niethammer *et al.*, 1998], so dass CRIPT als Schnittstelle für intrazelluläre Signaltransduktion von Membran-Rezeptoren über das Zytoskelett angesehen werden kann. Für eine Vielzahl von Rezeptoren und Ionen-Kanälen ist inzwischen eine Interaktion mit zytoplasmatischen Proteinen beschrieben, die eine Funktion in der Modulation oder der Signaltransduktion der Rezeptoren/Ionen-Kanäle haben und diese mit dem Zytoskelett verbinden [Apodaca, 2001; Hall & Lefkowitz, 2002; Laroche *et al.*, 2005]. Über eine gleichzeitige Interaktion mit dem HE6-C-Terminus und Tubulin könnte CRIPT in die HE6-abhängige Signaltransduktion involviert sein und eine Verbindung des Rezeptors zum Zytoskelett herstellen, über welches wiederum weitere Protein, Ionenkanäle oder Transporter reguliert werden können. Im Nebenhoden wurde CRIPT bisher noch nicht beschrieben, allerdings ist aufgrund der starken Konservierung des Proteins zwischen Pflanzen und Tieren, der breiten Gewebeverteilung und der beschriebenen Adapter-Protein-Funktion eine fundamentale Rolle von CRIPT in Zytoskelett-Membran-Interaktionen auch im Nebenhoden anzunehmen.

Ein weiterer potentieller Interaktionspartner, der den HE6-Rezeptor mit dem Zytoskelett verbinden könnte, dessen Interaktion aber noch bestätigt werden muss, ist Supervillin. Supervillin ist insofern ein interessanter Kandidat für eine Interaktion mit HE6, als es mit der Plasmamembran assoziiert ist, Zytoskelett-Proteine zu spezialisierten Strukturen an der Plasmamembran rekrutiert und durch direkte Interaktion mit F-Aktin einen regulatorischen Einfluss auf das Zytoskelett hat [Pope *et al.*, 1998; Wulfkühle *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2003]. In Epithelzellen ist es an den so genannten *adherens junctions* vorzufinden, die sich direkt unter den *tight junctions* befinden und eine Verbindungen zwischen den Aktinfilamenten zweier Zellen darstellen, so dass die Aktinfilamente vieler Zellen zu einem transzellulären Netzwerk (Adhäsionsgürtel) zusammengeschlossen werden

(siehe Abbildung 1.7). Dort ist es mit Cadherin, einem Transmembranprotein der *adherens junctions* assoziiert und verbindet dies mit dem Aktin-Zytoskelett [Pestonjamas *et al.*, 1997]. Über das apikale Aktin-Zytoskelett stehen die *tight junctions* und *adherens junctions* in einem engen Zusammenhang. Sie besitzen teilweise sogar gleiche Brückenproteine, die die Verbindung zum Aktin-Zytoskelett herstellen. Eines dieser Proteine ist das *zona occludens* Protein 1 (ZO-1), das sowohl mit den Claudinen und Occludinen der *tight junctions* als auch den Catenin-Proteinen der *adherens junction* interagiert [Müller *et al.*, 2005]. Durch Interaktion mit HE6 könnte Supervillin die Schnittstelle zwischen dem Rezeptor und dem apikalen Aktin-Zytoskelett darstellen und so beispielsweise über F-Aktin-Filamente an der Regulation der *adherens junctions* und/oder *tight junctions* beteiligt sein, oder eine vernetzende und strukturgebende Funktion einnehmen.

Als weiterer potentieller HE6-Interaktionspartner wurde SMA4 ermittelt. SMA4 ist bisher nicht charakterisiert und seine molekularen Funktionen sind unbekannt, so dass über seine Rolle im Nebenhoden nur spekuliert werden kann. Aufgrund seiner Glyko-hydro-2-Domäne, die charakteristisch für O-Glykosyl-Hydrolasen ist, kann eine hydrolitische, Zucker-spaltende Aktivität vermutet werden. Möglicherweise könnte SMA4 in den Kohlenhydratstoffwechsel involviert sein. Das Protein weist eine ca. 75 %ige Homologie zu den Beta-Glukuronidasen auf, die überwiegend im Lysosom lokalisiert sind und eine wichtige Rolle beim Recycling zellulärer Komponenten, sowie im metabolischen und katabolischen Zuckerstoffwechsel spielen. Die Lokalisation des SMA4-Proteins im Nebenhoden und seine Funktion müssten in weiterführenden Arbeitsschritten analysiert werden, um einen funktionellen Zusammenhang zum HE6-Rezeptor und / oder dem Zytoskelett herzustellen.

In Abbildung 4.1 sind die potentiellen intrazellulären Protein-Interaktionspartner des HE6-Rezeptors und ihre mögliche Einbindung in Signaltransduktion, Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und Flüssigkeitsregulation dargestellt.



**Abb. 4.1: Netzwerk potentieller intrazellulärer Protein-Interaktionen mit dem HE6-Rezeptor.** Dargestellt sind potentielle HE6-Interaktionspartner und ihre Beteiligung an verschiedenen zellulären Prozessen wie Signaltransduktion, Zytoskelett-Organisation und Flüssigkeitsregulation. Durchgehende rote Pfeile und gelb dargestellte Proteine markieren im Y2H-System bestätigte Interaktionen mit dem HE6-C-Terminus. Interaktionen die durch gestrichelte Pfeile dargestellt sind, müssen noch genauer verifiziert werden.

## 4.2 Veränderte Gen-Expression im proximalen HE6-KO-Nebenhoden

Neben Claudin-10 konnten weitere Transkripte identifiziert werden, die eine deutlich veränderte Expression im proximalen HE6-KO-Nebenhoden zeigten. Jedoch ist für diese Kandidaten fraglich, ob es sich um so genannte *downstream*-regulierte Gene handelt, deren verändertes Expressionsmuster auf das chronische Fehlen des HE6-Rezeptors zurückzuführen ist. Es gibt zahlreiche Untersuchungen, die belegen, dass ein Verschluss der Ductuli efferentes, wie er auch durch den HE6-KO hervorgerufen wird, zumindest bei Nagern, ebenfalls zu einem spezifisch veränderten Genexpressionsmuster führt [Hinton *et al.*, 1998; Hermo *et al.*, 2000]. Gene, die vor allem spezifisch im proximalen Bereich des Nebenhodens exprimiert werden, sind oft von testikulären Faktoren oder Hormonen abhängig, die über das Rete testis in die Ductuli efferentes und den proximalen Nebenhodengang gelangen. So wurde für ADAM28 [Oh *et al.*, 2005] und Me9 [Davies *et al.*, 2007], die beide im HE6-KO-Nebenhoden herunterreguliert waren, eine Abhängigkeit von testikulären Faktoren nachgewiesen. ADAM28 gehört zur Familie der transmembranen ADAM-Proteine (*A disintegrin and metalloproteases*), die eine Funktion als Zell-Adhäsions-Moleküle haben, Metalloprotease-Aktivität besitzen und an verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt sind [Cho *et al.*, 1998; Oh *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006]. Es ist wie HE6 im proximalen Nebenhodenkopf exprimiert, wo es an der Zelloberfläche lokalisiert ist und möglicherweise sezerniert wird [Oh *et al.*, 2005]. Bridges *et al.* (2002) konnten eine proteolytische Funktion, Integrin-Bindung und Zell-Adhäsion für ADAM28 zeigen. Seine epididymale Funktion ist jedoch unbekannt. Möglicherweise könnte die sezernierte Form als Metalloprotease an der Prozessierung und Regulation anderer Nebenhoden-Proteine, wie z.B. der Trypsinierung von Schlussleistenproteinen beteiligt und so in die HE6-abhängige Regulation des parazellulären Flüssigkeitsransports eingebunden sein. Me9 ist ein Mitglied einer neuartigen Familie von Nebenhoden-spezifischen Membranproteinen [Gebhardt *et al.*, 1999, Kirchhoff, 2002b; Davies *et al.*, 2007], deren Funktion noch unbekannt ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Co-Lokalisation des ME9-Transkripts mit HE6 im proximalen Nebenhoden gezeigt werden. Auf Proteinebene konnte bei Nagern ebenfalls eine Lokalisation von Me9-verwandten Proteinen im Epithel des proximalen Nebenhodenkopfes, unter anderem in Stereozilien, beobachtet werden [Davies *et al.*, 2007]. Die Co-Lokalisation und Co-Regulation mit HE6 im proximalen Nebenhoden könnte darauf hin deuten, dass Mitglieder der Me9-Proteinfamilie mit HE6 assoziiert sind und möglicherweise mit dem Rezeptor interagieren oder in dessen Signaltransduktion involviert sind. Nach Verschluss der Ductuli oder Kastration mit und ohne Androgen-Supplementation, wodurch die Zufuhr der luminalen testikulären Faktoren unterbunden wird, sind sowohl ADAM28 als auch ME9 kaum noch oder gar nicht mehr exprimiert [Oh *et al.*, 2005; Davies *et al.*, 2007]. Auch im proximalen HE6-KO-Nebenhoden könnte das veränderte Genexpressions-muster eine indirekte Folge des KO-Phänotyps mit partiellem Verschluss der Ductuli sein und möglicherweise in keinem direkten Zusammenhang mit dem fehlenden HE6-Rezeptor stehen.

Auch für die beiden im HE6-KO-Nebenhoden verstärkt exprimierten Gene Clusterin und Osteopontin/Spp1 ist ein direkter Zusammenhang mit dem Fehlen des HE6-Rezeptors fraglich. Clusterin, ein heterodimeres Glykoprotein, wird im männlichen Genitaltrakt überwiegend im Testis von den Sertolizellen und im Nebenhodenkopf von den Prinzipalzellen sezerniert [Ahuja *et al.*, 1996; Sylvester *et al.*, 1984]. Als multifunktionelles Protein spielt es unter anderem eine Rolle in der Immunmodulation [Jenne & Tschopp, 1989], bei Apoptose [Buttayan *et al.*, 1989], Lipid-Transport [de Silva *et al.*, 1990] und beim Membran-Recycling [Leger *et al.*, 1987], jedoch wird

eine jeweils Gewebe- und kontext-spezifische physiologische / pathologische Funktion vermutet [Jones & Jomary, 2002]. Untersuchungen haben gezeigt, dass Clusterin streß-induziert bei apoptotischen Prozessen eine Chaperon-ähnliche Funktion ausübt [Buttyan *et al.*, 1989; Humphreys *et al.*, 1999] und dass es bei einer Ligation der Ductuli efferentes zu einer bis zu 100-fachen Erhöhung der Clusterin-Mengen kommt [Grima *et al.*, 1990]. So ist vermutlich auch das drastisch erhöhte Expressionslevel im HE6-KO-Nebenhoden auf die Obstruktion der Ductuli, Gewebeveränderungen und apoptotische / pathologische Prozesse, d.h. indirekt auf den KO-Phänotyp zurückzuführen. Ähnliches kann für Osteopontin/Spp1 vermutet werden. Osteopontin ist ein multifunktionales Phosphoprotein, das auf der Oberfläche von vielen Epithelien gefunden wird und in verschiedene pathologische Prozesse involviert ist [Denhardt *et al.*, 2001]. Im Nebenhoden ist es wie HE6 apikal in den Mikrovilli der Prinzipalzellen exprimiert, wo vermutet wird, dass es eine Funktion bei der Regulation der luminalen Flüssigkeit spielt, indem es Kalzium-Ionen aus dem epididymalen Lumen entfernt [Luedtke *et al.*, 2002]. Da für Osteopontin eine Interaktion mit anderen Rezeptoren beschrieben wurde, wodurch es verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert und in Prozesse wie Zell-Adhäsion, intrazelluläre Kalzium-Regulation und Zytoskelett-Organisation eingebunden wird [Denhardt & Guo, 1993], kann eine Interaktion mit HE6 vermutet werden. So könnte es als HE6-*downstream*-reguliertes Gen an der transepithelialen Resorption von Kalzium-Ionen und somit an der Gestaltung eines speziellen biologischen Milieus im Nebenhodenkopf beteiligt sein. Andererseits ist Osteopontin jedoch ein wichtiges regulatorisches Protein der Zellimmunität, das bei pathologischen und inflammatorischen Prozessen wie z.B. Gewebeverletzungen drastisch heraufreguliert wird [Denhardt *et al.*, 2001], so dass die verstärkte Expression im HE6-KO auf die indirekten Folgen des KO, nämlich Obstruktion und Atrophie zurückgeführt werden könnte. Es bleibt zu klären, ob die veränderten Genexpressionsmuster dieser vier Gene in einem direkten Zusammenhang mit dem KO des HE6-Rezeptors stehen, es sich also um so genannte *downstream*-regulierte Gene handelt, oder ob sie eine indirekte Folge des KO-Phänotyps mit partiellem Verschluss der Ductuli sind und auf das Fehlen testikulärer Faktoren oder auf inflammatorische Prozesse zurückzuführen sind.

### **4.3 Strukturelle und funktionelle Eigenschaften des dritten intrazellulären Loops und des C-Terminus von HE6**

HE6 zählt aufgrund seiner Primärstruktur zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), welche klassischerweise als Signal-Transduktions-Moleküle operieren, indem sie intrazellulär heterodimere GTP-bindende Proteine, so genannte G-Proteine, als Antwort auf extrazelluläre Ligandenbindung/-reize, wie z.B. Bindung von Peptiden, Aminosäuren, Ionen oder auch sensorische Stimuli, aktivieren. Für die Kopplung und Aktivierung der G-Proteine spielen die zweite und dritte intrazelluläre Schleife sowie der proximale Teil des ebenfalls intrazellulären C-Terminus der GPCRs eine entscheidende Rolle [Strader *et al.*, 1994; Wess, 1998]. Die dritte intrazelluläre Schleife spielt eine Schlüsselrolle bezüglich der Kopplungsspezifität unter den diversen  $\alpha$ -Untereinheiten heterodimärer G-Proteine [Kobilka *et al.*, 1992; Savares & Fraser, 1992], wohingegen die zweite intrazelluläre Schleife nicht für die Spezifität, sondern für die Effizienz der G-Protein-Aktivierung entscheidend ist [Dohlman *et al.*, 1991; Wess, 1997]. Neben der G-Protein-Aktivierung können die intrazellulären Bereiche der GPCRs mit weiteren zytoplasmatischen Proteinen wechselwirken, welche wiederum zusätzliche Signal-Kaskaden

triggern [Hall & Lefkowitz, 2002] oder die Desensibilisierung der GPCRs modulieren, z.B. durch Phosphorylierung der intrazellulären Domänen mittels einer G-Protein-gekoppelte Rezeptor Kinase [Kierszenbaum, 2003]. Die hauptsächliche Interaktion der meisten GPCRs mit intrazellulären Interaktionspartner erfolgt über den C-Terminus, dessen absolutes Ende oft eine Konsensus-Sequenz für PDZ-Bindung enthält [Bockaert *et al.*, 2002; Brady *et al.*, 2002].

Für die Untersuchung intrazellulärer Protein-Protein-Wechselwirkungen im *Yeast Two-Hybrid* System wurde als *Bait*-Protein zum einen der gesamte intrazelluläre HE6-C-Terminus (137 aa) und zum anderen der relativ kurze dritte intrazelluläre Loop (26 aa) gewählt. Mit diese beiden Bereichen wurden bereits für andere LNB-TM7-Rezeptoren wie z.B. den  $\alpha$ -Latrotoxin-Rezeptor CL1 oder BAI1, erfolgreich Y2H-Screens [Tobaben *et al.*, 2000; Kreienkamp *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2000, Saunders & Limbird, 2000] oder andere Interaktionsstudien durchgeführt [Wu *et al.*, 1997; Gelber *et al.*, 1999; DeGraff *et al.*, 2002]. Jedoch ist anzumerken, dass in einem Y2H-Screen allein mit dem C-Terminus oder dem dritten intrazellulären Loop bisher keine Interaktion mit G-Proteinen gezeigt werden konnte, was darauf zurückzuführen ist, dass diese eine Aktivierung des Rezeptors durch Ligandenbindung voraussetzt.

Mit dem dritten intrazellulären Loop (3ICL) als Bait konnten keine potentiell interessanten Interaktionspartner des HE6-Rezeptors gefunden werden. Die ermittelten Klone enthielten außergewöhnlich viele falsch Positive, z.B. mit kleine Inserts von < 400 bp, die unvollständige cDNAs repräsentieren, genomischen Insertsequenzen oder UTRs. Die wenigen verbleibenden Klone mit kodierenden Inserts kamen aufgrund falscher Lokalisation oder fehlender  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität als Interaktionspartner ebenfalls nicht in Frage. Ein Vergleich mit der Literatur zeigte, dass Protein-Interaktionen für GPCRs vor allem mit wesentlich längeren dritten intrazellulären Loops (bis zu >150 aa) nachgewiesen werden konnten, die zudem verschiedene Konsensus-Sequenzen für Protein-Bindungsmotive und Proteindomänen enthielten [z.B. Wade *et al.*, 1996; DeGraff *et al.*, 2002]. Der 3ICL von HE6 ist mit 26 aa vergleichsweise klein und zeigt zudem keine Ähnlichkeiten mit Konsensus-Sequenzen bekannter Bindungsmotive. Der strukturelle Unterschied und die Y2H-Ergebnisse könnten ein Indiz dafür sein, dass der dritte 3ICL des HE6-Rezeptors keine bedeutende Rolle bei der Vermittlung von Protein-Interaktionen spielt.

Anders sieht es bei dem intrazellulären C-Terminus des HE6-Rezeptors aus. Dieser zeigte im Vergleich mit anderen GPCRs wie z.B. BAI1 (133 aa) [Shiratsuchi *et al.*, 1998] mit 137 aa eine durchschnittliche Länge. Zudem sagte eine Motiv-Suche zwei Konsensus-Sequenzen für die Bindung von Proteinen voraus (siehe Abb. 3.3). Zum einen ist dies die Konsensus-Sequenz für die Bindung von Proteinen mit PDZ-Domänen am absoluten C-Terminus, die auch in anderen GPCRS konserviert ist und zum anderen eine Serin-reiche Region von 29 aa. Als Interaktionspartner für Serin-reichen Regionen sind unter anderem 14-3-3-Proteine beschrieben. Dies sind konservierte regulatorische Moleküle der Signaltransduktion, die in allen eukaryotischen Zellen, hauptsächlich zytoplasmatisch exprimiert werden [Aitken *et al.*, 1996]. Sie binden an eine Vielzahl verschiedener Proteine, darunter auch transmembrane Rezeptoren und viele Signaltransduktionsproteine, und können unterschiedlichste Funktionen übernehmen [Xiao *et al.*, 1995]. Unter anderem sind sie Adapterproteine in Multiproteinkomplexen und nehmen eine Schlüsselrolle bei der Signaltransduktion, Zellteilung und Apoptose ein [Fu *et al.*, 2000]. Eine Interaktion von G-Protein gekoppelten Rezeptoren über den C-Terminus mit 14-3-3-Proteinen wurde bereits für den FSH-Rezeptor [Cohen *et al.*, 2004], den PTH-Rezeptor [Tazawa *et al.*, 2003] und den GABAB-Rezeptor [Couve *et al.*, 2001; Brock *et al.*, 2005] beschrieben. Zudem wurde für verschiedene  $\alpha$ 2-

Adrenalinrezeptoren eine Interaktion von 14-3-3-Proteinen mit dem dritten intrazellulären Loop beschrieben [Prezeau *et al.*, 1999]. Jedoch konnte weder für den C-Terminus mit seiner Serinreichen Region noch für den dritten intrazellulären Loop von HE6 eine Interaktion mit verschiedenen 14-3-3 Proteinen nachgewiesen werden.

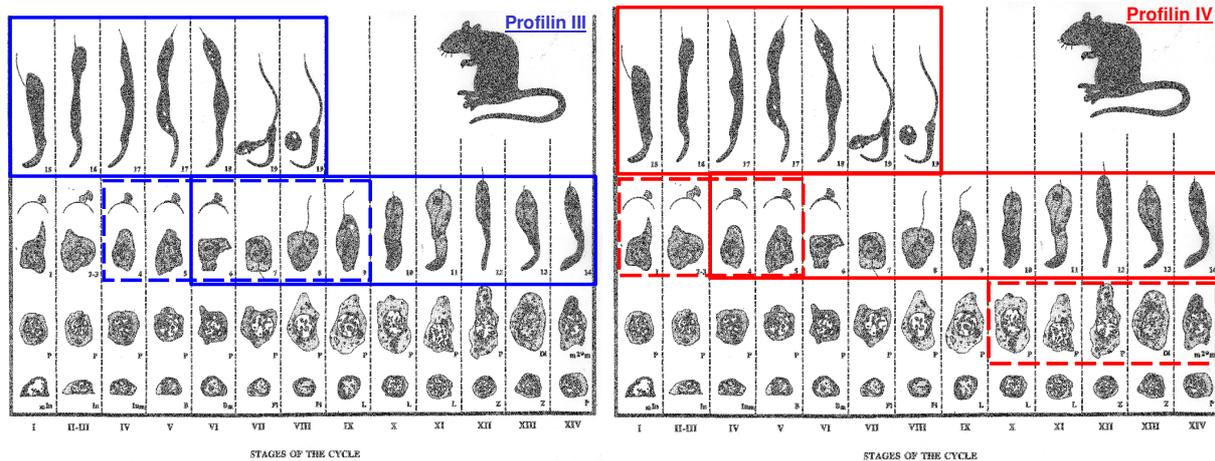
Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch keine Interaktion des HE6-C-Terminus mit PDZ-Proteinen gezeigt werden. Um eine solche Interaktion zu untersuchen wurden Einzelmatings mit dem Na/H Exchanger Regulatory Factor NHERF1 [Reczek *et al.*, 1997; Weinman *et al.*, 1995 + 2005] durchgeführt. Dieses PDZ-Protein kam aufgrund seiner beschriebenen Funktion und seiner Co-Lokalisation mit HE6 in den Prinzipalzellen der Ductuli efferentes als möglicher Interaktionspartner für die PDZ-Konsensus-Sequenz im HE6-C-Terminus in Frage. NHERF ist mit dem Aktinzytoskelett der Plasmamembran assoziiert und spielt unter anderem als regulatorischer Faktor des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauschers (NHE3, Na/H Exchanger) eine Rolle bei der Flüssigkeitsresorption im proximalen Nebenhoden [Weinman *et al.*, 2005; Yun *et al.*, 1997]. Weitere Bindungspartner sind Signalmoleküle, GPCRs, Iontentransporter, und Zytoskelett-(regulatorische)-Proteine [Ediger *et al.*, 2002; Voltz *et al.*, 2001; Short *et al.*, 1998; Suh *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2004]. NHERF1 könnte also ein Adapterprotein zwischen dem HE6-Rezeptor und Iontentransportern wie NHE3 oder dem Zytoskelett darstellen. Diese Vermutung ließ sich jedoch nicht bestätigen, da NHERF keine Interaktion mit dem HE6-C-Terminus zeigte. Des Weiteren wurde in den durchgeführten Y2H-Screenings kein einziges PDZ-Protein als potentieller Interaktionspartner des C-Terminus gefunden, so dass die Funktionalität der HE6-Konsensus-Sequenzen zur Bindung von PDZ-Proteinen fraglich bleibt. Basierend auf der Aminosäure-Sequenz werden die Konsensus-Sequenzen für PDZ-Bindung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren am absoluten C-Terminus in drei Gruppen unterteilt: I: E-/ST-X-V/I; II:  $\Phi$ -X- $\Phi$  und III:  $\psi$ -X- $\Phi$  (X = beliebige Aminosäure,  $\Phi$  = hydrophobe Aminosäure;  $\psi$ : saure Aminosäure (D/E)) [Bockaert *et al.*, 2003]. Die Konsensus-Sequenz des HE6-C-Terminus (IEQM-COOH) zählt zur Gruppe III, für die bisher lediglich bei zwei Glutamat-Rezeptoren eine Interaktion mit PDZ-Proteinen gezeigt werden konnte [El Far *et al.*, 2000; Hirbec *et al.*, 2002], wobei diese eine andere Aminosäure-Zusammensetzung der Konsensus-Sequenz aufwiesen als HE6. Die meisten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, für die eine Interaktion mit PDZ-Proteinen über den C-Terminus gezeigt werden konnte, enthalten Konsensus-Sequenzen der Gruppen I oder II [zusammengefasst in Bockaert *et al.*, 2003]. Auch die bisher einzigen Rezeptoren aus der LNB-TM7-Familie, BAI2 und CL1, für die eine Interaktion mit PDZ-Proteinen gezeigt wurde, enthalten den Gruppe I-Konsensus [zusammengefasst in Bockaert *et al.*, 2003 und Kreienkamp, 2002]. Die Funktionalität der HE6-Konsensus-Sequenz IEQM-COOH zur Bindung von PDZ-Proteinen bleibt nach diesen Y2H-Ergebnissen fraglich und müsste in funktionellen Studien näher untersucht werden.

Es bleibt zu beachten, dass die hier durchgeführten Studien mit dem isolierten dritten intrazellulären Loop / HE6-C-Terminus durchgeführt wurden. Für verschiedene intrazelluläre Protein-Protein-Wechselwirkungen von GPCRs über den dritten intrazellulären Loop und / oder den C-Terminus, z.B. mit G-Proteinen oder Arrestinen, ist jedoch bekannt, dass sie von der Phosphorylierung und der Aktivierung der Rezeptoren durch Ligandenbindung abhängig sind [Gurevich & Benovic, 1993]. Dies könnte auch für Interaktionen des HE6-Rezeptors mit PDZ-Proteinen entscheidend sein. Jedoch sind bis heute keine Liganden des Rezeptors bekannt, die eine Aktivierung und Signaltransduktion induzieren könnten. Die Summe der beobachteten Negativ-Ergebnisse spricht also für einen sehr ungewöhnlichen Rezeptortyp.

## 4.4 Die Rolle der Profiline bei der Ausbildung der spezifischen Zellgestalt der Spermien

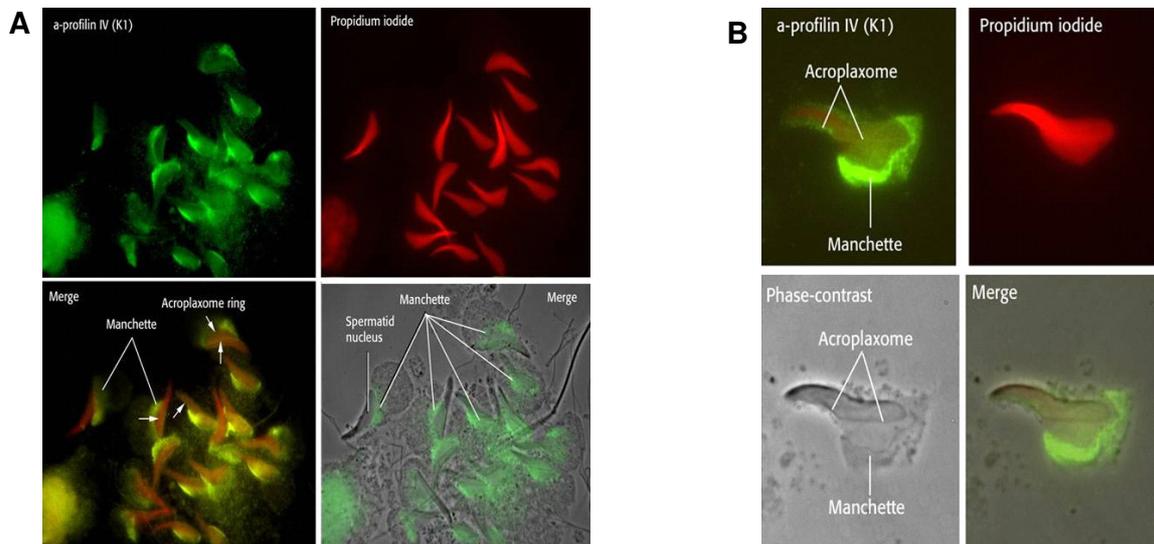
Der Hoden der Säuger, einschließlich des Menschen, weist ein ungewöhnlich komplexes Muster der Profilin-Expression auf. Neben den Profilinen I und II sind hier das Testis-spezifische Profilin III [Hu *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002] sowie die hauptsächlich Testis-exprimierten Profiline IV [Obermann *et al.*, 2005] und V zu finden. Die männlichen Keimzellen sind der Hauptexpressionsort der Profiline III und IV. Diese Komplexität spricht für eine zentrale Rolle während der Spermien-Differenzierung.

Die komplexe Profilin-Expression im Hoden bzw. den Keimzellen der Säuger kann mehrere Gründe haben. Zum einen wäre es möglich, dass die Profilin-Proteine nur kurze Halbwertszeit haben, so dass die verschiedenen Profilin-Isoformen in unterschiedlichen Stadien der Spermatogenese gleiche Funktionen erfüllen. So wird zum Beispiel das X-chromosomal lokalisierte Profilin V-Gen aufgrund der Inaktivierung des X-Chromosoms während der Meiose nicht exprimiert. Diese Inaktivierung könnte durch die Expression eines autosomalen Profilin-Paralogs kompensiert werden. Zum anderen wäre es möglich, dass ein so drastischer morphologischer Vorgang wie die Spermatogenese, der ein hochdynamisches spezialisiertes Zytoskelett erfordert, eine besonders hohe Konzentration und / oder eine besondere Ausstattung an Profilinen benötigt, welche durch die Aktivierung zusätzlicher, Testis-spezifischer Profilin-Gene bereitgestellt wird. Studien an den Profilinen I und II sprechen jedoch gegen kurze Halbwertszeiten und zu geringe zelluläre Konzentrationen [Lambrechts *et al.*, 1997 + 2000]. Es ist daher anzunehmen, dass die Keimzell-spezifischen Profiline neben den Funktionen der somatischen Zellprodukte zusätzliche strukturelle und / oder funktionelle Ergänzungen aufweisen. Viele Keimzell-spezifisch exprimierte Gene werden oft erst post-meiotisch in haploiden Keimzellstadien transkribiert, wenn die speziellen Strukturen der Spermien gebildet werden. Ein post-meiotisches Expressionsprofil konnte auch für die beiden Profiline III und V beobachtet werden. In Abbildung 4.2 sind die Stadien-spezifischen Expressionsmuster der Profiline III und IV auf mRNA- und Proteinebene am Beispiel der Ratten Spermatogenese in der *staging map* schematisch dargestellt. Der Verlauf der mRNA-Expression ist durch gestrichelte Kästen dargestellt, die Protein-Lokalisation durch geschlossene Markierungen. Diese Expressionsmuster ergaben sich aus den im Rahmen dieser Arbeit und denen von Obermann *et al.* (2005) durchgeführten Untersuchungen an Ratte, Maus und Mensch. Die Profilin III-mRNA ist nur während einer kurzen Periode von Stadium IV bis IX in haploiden runden und frühen elongierenden Spermatozyten nachzuweisen. Die Profilin IV-mRNA hingegen ist während einer längeren Periode von späten Pachytän-Spermatozyten bis hin zu runden Spermatozyten (Stadium X bis Stadium V im nächsten Zyklus), und somit nicht nur postmeiotisch, sondern bereits prä-/meiotisch exprimiert. Auf Proteinebene konnte für die Profiline III und IV eine Korrelation mit der Phase der Spermiogenese beobachtet werden. Beide Profiline sind in runden, elongierenden und reifen Keimzellen, also ebenfalls in den post-meiotischen Stadien der Spermiogenese lokalisiert, und somit mit intakter Spermatogenese assoziiert. Jedoch ist Profilin IV auch auf Proteinebene bereits in etwas früheren Keimzellstadien (ab Stadium IV) als Profilin III (ab Stadium VI) zu finden.



**Abb. 4.2:** Expressionsprofile der Testis-exprimierten Profilin III und IV auf mRNA- und Protein-Ebene während der Spermatogenese. I : Profilin III-mRNA I : Profilin III-Protein I : Profilin IV-mRNA I : Profilin IV-Protein

Als subzelluläre Lokalisation konnte für beide Profile in den Keimzellen das Akrosom ermittelt werden, wobei jedoch auch Unterschiede zu beobachten waren. Während Profilin III im kompletten Akrosomen-Bereich von runden Spermatiden bis hin zu reifen testikulären Spermien lokalisiert wurde, konnte Profilin IV in runden Spermatiden nur im akrosomalen Vesikel und dem Akroplaxom-Abschlußring bzw. in reifen Spermatozoen nur im apikalen Bereich des Akrosoms detektiert werden. Zusätzlich wurde Profilin IV in einer post-akrosomalen Struktur zwischen dem Akrosom und der Manschette lokalisiert. A.L. Kierszenbaum (Department of Cell Biology and Anatomical Sciences, City University of New York Medical School, New York) führte in einer Kooperation ebenfalls immunozytochemische Untersuchungen mit dem Profilin IV-Antikörper auf Ratten-Keimzellen durch und beobachtete eine Lokalisation des Profilin IV-Proteins in der Manschette elongierender Spermatiden (siehe Abbildung 4.3).



**Abb. 4.3:** Immunozytochemische Detektion von Profilin IV in Ratten-Keimzellen [durchgeführt und zur Verfügung gestellt von Kierszenbaum]. Profilin IV/Cy2 ist grün und der Zellkern /Propidium-Iodid rot dargestellt. Abbildung (A) zeigt mehrere elongierende Spermatozoen, in (B) ist eine einzelne elongierende Spermatozoon vergrößert dargestellt.

Diese vollständige Co-Lokalisation in der Manschette konnte durch eigene Immunozytochemie nicht bestätigt werden. Die Profilin IV-haltige post-akrosomale Struktur markierte einen Übergang zwischen Manschette und Akrosom und zeigte somit nur geringe Überlappungsbereiche mit der Manschette. Es fiel jedoch auf, dass sich Manschette und die Profilin IV-markierte Struktur

zeitgleich während der Akrosomen-Biogenese entwickeln, beide nur vorübergehend ausgebildet und in reifen Spermatozoen nicht mehr vorhanden waren, so dass ein Zusammenhang oder eine Wechselwirkung zwischen diesen beiden Strukturen vermutet werden kann. Da für Profilin I bereits eine Interaktion mit Tubulin beschrieben wurde [Witke *et al.*, 1998], lag die Vermutung nahe, dass das Profilin IV mit den Tubulinen der Manschetten-Struktur interagieren könnte. Jedoch konnte weder für Profilin IV noch die Profile IIa oder III eine Interaktion mit den Tubulinen  $\alpha 2$  und  $\beta 2b$  sowie dem im perinukleären Ring der Manschette lokalisierten Tubulin  $\delta$  gezeigt werden. Eine Funktion des Profilin IV in der Manschette, über eine Profilin-Tubulin-Interaktion kann somit ausgeschlossen werden.

Die spezifische Lokalisation der Profilin III und IV in den post-meiotischen Stadien der Keimzellen sprechen für eine zentrale Rolle während der Spermien-Differenzierung und möglicherweise der Befruchtung selbst. Für verschiedene Evertebraten konnte bereits eine entscheidende Funktion der Profile in der Spermatogenese und für die Befruchtungsfähigkeit der Spermien gezeigt werden. So ist das erste beschriebene Aktin-bindende Profilin aus Seeigel-Spermien [Carlsson *et al.*, 1977] an der Ausbildung des so genannten akrosomalen Fadens, einer Struktur aus filamentösem Aktin, während der Akrosomreaktion beteiligt [Tilney *et al.*, 1983]. In *Drosophila* führten Mutationen im Profilin-Gen zu schweren Störungen der Meiose und somit der gesamten Spermatogenese und führten letztendlich zu Infertilität [Verheyen & Cooley, 1994]. Über die eigentliche Funktion der Testis-exprimierten Profile in den männlichen Keimzellen der Säuger kann aber nur spekuliert werden. Die unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen legen nahe, dass die Testis-spezifischen Profile III und IV distinkte, nicht-überlappende Funktionen in den Keimzellen während der Spermatogenese übernehmen. Die Lokalisation im Akrosom könnte für eine Funktion der Profile bei der Akrosomen-Biogenese, der Kondensation und Formgestaltung des Zellkerns sowie möglicherweise bei der Akrosomreaktion und Befruchtung selbst sprechen. Die Profilin IV-haltige post-akrosomale Struktur, welche zum gleichen Zeitpunkt wie die Manschette ausgebildet ist und teilweise mit dieser co-lokalisiert, könnte möglicherweise eine Rolle beim Transport von Golgi-Vesikeln und Makromolekülen spielen und ein Bindeglied zwischen Akrosom und Manschette darstellen.

#### 4.5 Sind die Profile III und IV „typische“ Profile?

Für die Testis-exprimierten Profile III und IV war das charakteristische Bindungsverhalten an Aktin, Poly-Prolin und PIP<sub>2</sub> bisher kaum bzw. nicht untersucht. Lediglich für das murine Profilin III wurde von Hu *et al.* (2001) eine Interaktion mit Aktin und Poly-Prolin gezeigt, jedoch nicht quantifiziert. Für Profilin IV lagen keine biochemischen Erkenntnisse vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Wissenslücke ein wenig gefüllt, in dem funktionelle Studien zu den Aktin- und Poly-L-Prolin-Bindungseigenschaften der Profile III und IV durchgeführt wurden. Die Ergebnisse bestätigten die Annahme, dass die beiden Profile in den Keimzellen distinkte Rollen übernehmen. Für das murine Profilin III konnte eine Bindung an Aktin und Poly-L-Prolin nachgewiesen werden, so dass eine Funktion als Zytoskelett-regulatorisches Protein angenommen werden kann. Für das humane und murine Profilin IV konnte hingegen keine dieser Profilin-charakteristischen Interaktionen gezeigt werden. In Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse aus den biochemischen Charakterisierungen der Profile III und IV in einer modifizierten Tabelle nach Polet *et al.* (2007) dargestellt.

**Tabelle. 4.1: Bekannte biochemische Eigenschaften der Vertebraten-Profiline** [modifiziert nach Polet *et al.*, 2007].

+: Bindung wurde gezeigt, aber nicht quantifiziert, -: keine Interaktion, ND: nicht durchgeführt; die Testis-exprimierten Profiline sind rot umrandet und die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse über die biochemischen Eigenschaften der Testis-exprimierten Profiline III und IV rot dargestellt, hu: human, r: Ratte

Profilin	K <sub>d</sub> für Aktin	K <sub>d</sub> für Poly-L-Prolin	K <sub>d</sub> für PIP <sub>2</sub>	Expression
human Profilin I	0,35 µM	200-300 µM	11 µM	Ubiquitär
Maus Profilin I	ND	ND	ND	Ubiquitär
Rind Profilin I	0,34 µM	> 120 µM	+	ND
Ratten Profilin IIa	0,38 µM	0,3 µM	geringe Affinität	ND
Maus Profilin IIa	+	+	ND	Gehirn, Muskel
Rind Profilin IIa	0,36 µM	0,5 µM	Gering	ND
human Profilin IIb	0,6 µM	Sehr geringe Affinität	Sehr geringe Affinität	Gehirn
Maus Profilin IIb	-	-	ND	Leber, Niere
<b>Maus Profilin III</b>	<b>+ &lt; huPFN IIa</b>	<b>+ &lt; huPFN IIa</b>	ND	Testis
Ratten Profilin III	ND	ND	ND	Testis
human Profilin III	ND	ND	ND	Testis
<b>Maus Profilin IV</b>	-	-	ND	Testis
Ratte Profilin IV	ND	ND	ND	Testis
<b>human Profilin IV</b>	-	-	ND	Testis
<b>hu/r Profilin V</b>	ND	ND	ND	<b>Testis</b>

### Profilin III

Die Interaktion von Profilin III mit Aktin konnte *in vivo* durch Y2H-Experimente und *in vitro* durch Co-Immunopräzipitation gezeigt werden, so dass sicher von einer Aktin-Interaktion auszugehen ist. Die Stärke der Interaktionen ließ sich mit diesen Methoden nur abschätzen. Vom Hersteller des Gal4-Y2H-Systems wird angegeben, dass Protein-Interaktionen mit Dissoziations-Konstanten (K<sub>d</sub>) von ungefähr 70 µM detektiert werden können [BD-Biosciences, 2003]. Ein quantitativer β-Galaktosidasetest zeigte zudem, dass Profilin III eine schwächere Affinität zu Aktin aufweist als PFN IIa. Auch die Proteinsequenz des Profilin III deutete bereits auf eine schwächere Affinität hin (vergl. Abb. 3.30). Im Vergleich zu den hoch konservierten Profilinen I und IIa, enthält Profilin III mehrere veränderte bzw. deletierte Aminosäuren, die im 3D-Modell die Aktin-Bindestelle bilden [Polet *et al.*, 2007; Schlüter *et al.*, 1997]. Da jedoch die Aminosäuren im C-Terminus, welcher eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit β-Aktin spielt [Schlüter *et al.*, 1997, Witke, 2004], noch gut konserviert sind, ist eine Bindung an Aktin möglich. Ebenso wie für Aktin musste bei Profilin III auch eine geringere Affinität zu Poly-Prolin-Liganden angenommen werden, da es ähnlich wie Profilin IIb, welches eine schwächere Affinität zu Poly-L-Prolin aufweist [Lambrechts *et al.*, 2000], einen geringeren aromatischen Charakter besitzt (vergl. Abb. 3.30). Diese Vermutung ließ sich durch Bindungsstudien mittels einer Poly-L-Prolin-Säule bestätigen. Während für Profilin I eine Elution bei 6 M Harnstoff und für Profilin IIa, aufgrund der höheren Affinität zu PLP, erst bei 8 M Harnstoff beschrieben ist [Wittenmayer *et al.*, 2000], eluierte PFN III bereits bei 4 M Harnstoff von der Säule. Generell zeigt PFN III jedoch noch eine Interaktion mit Poly-L-Prolin. Dies wurde im Y2H-System bestätigt, indem eine Interaktion mit dem Poly-Prolin-haltigen FH-Protein Diaph3 gezeigt werden konnte. Mit dem Poly-Prolin-Liganden VASP, dessen Interaktion mit den Profilinen bisher am besten dokumentiert ist [Reinhard *et al.*, 1995; Gertler *et al.*, 1996], konnte für PFN III jedoch keine Interaktion gezeigt werden. Dies kann auf die in den Proteinen enthaltenen Poly-Prolin-Sequenzen und die schwächere Affinität von PFN III zu Poly-Prolin zurückzuführen sein. Für die Interaktion mit Profilin typische prolinreiche Regionen umfassen mindestens fünf Proline in Folge, jedoch vermitteln acht bis zehn Proline stärkere Wechselwirkungen. Diese Folge kann durch Glycin unterbrochen sein [Lambrechts *et al.*, 1997]. VASP enthält ein so genanntes GP5-Motiv aus einem Glycin und fünf Prolinen, das Interaktion mit dem C-Terminus der Profiline vermittelt [Lambrechts *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 1997]. Diaph3

hingegen besitzt in seiner FH1-Domäne, für die eine Interaktion mit Profilinen beschrieben ist [Watanabe *et al.*, 1997; Wallar & Alberts, 2003], eine Poly-Prolin-reiche Region (aa 575-615) die zweimal fünf und einmal elf Proline in Folge enthält. Aufgrund der durch Mutationen geschwächten Poly-Prolin-Affinität des Profilin III ist daher anzunehmen, dass ein GP5-Motiv für eine Interaktion nicht ausreichend ist und erst eine größere Poly-Prolin-Sequenz eine ausreichend starke Wechselwirkung mit der Poly-Prolin-Bindungsregion des Profilin III vermittelt.

So wie für die bereits gut charakterisierten Profiline I und II neben Aktin eine Vielzahl weiterer Interaktionspartner beschrieben sind, durch welche die Profiline in diverse Signaltransduktionswege eingebunden werden, konnten auch für Profilin III weitere potentielle Interaktionspartner ermittelt werden. Hierbei handelt es sich um Liganden, die bisher als Profilin-Bindungspartner nicht beschrieben und überwiegend Testis-spezifisch exprimiert sind. Als interessantester Interaktionspartner erscheint unter diesen ein hypothetisches Protein (XP\_904353), welches zweimal detektiert wurde und als einziges spezifisch mit Profilin III interagiert. Das Gen ist Testis-spezifisch exprimiert, so dass es sich um einen Keimzell-spezifischen Interaktionspartner des Profilin III handeln könnte. Jedoch ist das Protein bisher nicht charakterisiert, so dass weder etwas über die zelluläre Lokalisation, potentielle Interaktionspartner noch die molekulare Funktion bekannt ist und keine Rückschlüsse auf die Funktion des Profilin III gemacht werden können. Ebenfalls unbekannt sind die molekularen Funktionen der potentiellen Interaktionspartner Odz3, Arrdc5 und Pxt1, so dass ausgehend von diesen Proteinen ebenfalls keine Rückschlüsse auf weitere Funktionen des Profilin III in den Keimzellen gemacht werden können.

Ein weiterer potentiell interessanter Interaktionspartner des Profilin III ist das *Endophilin SH3-domain GRB2-like B1* (Sh3glb1). Endophiline sind mit intrazellulären Membranen assoziiert und haben eine Funktion beim membrangebundenen Transport und der Endozytose von Vesikeln [Schuske *et al.*, 2003; Modregger *et al.*, 2003]. Sie interagieren zudem mit Dynamin und Poly-Prolin-reichen Proteinen [Ringstad *et al.*, 1997], welche wiederum mit vielen Aktin-bindenden Proteinen und anderen Zytoskelett-Proteinen interagieren. Endophilin wird daher als Adapter-Protein zwischen Zytoskelett und membranassoziierter Endozytose angesehen. Die Interaktion zwischen Profilin III und Endophilin könnte eine Bedeutung für die Entstehung des Akrosoms während der Spermiogenese und/oder die Akrosomreaktion bei der Befruchtung haben. Die Akrosomen-Biogenese beginnt in frühen runden Spermatiden, indem proakrosomale Golgi-Vesikel sezerniert werden und zum Akrosomenbläschen fusionieren [Moreno *et al.*, 2000]. Bedingt durch die weitere Endozytose von Golgi-Vesikeln bildet sich das Akrosom aus und breitet sich bis über den Äquator des Zellkerns aus. Dieser Prozess erfordert einen membrangebundenen Vesikeltransport und die regulierte Endozytose der Golgi-Vesikel. Zeitgleich mit dem Akrosom wird das F-Aktin-haltige Akroplaxom ausgebildet, welches das Akrosom auf dem Zellkern verankert. Es ist somit eine Koordination zwischen Akrosomen-Biogenese = Endozytose und Akroplaxom-Bildung = Aktin-Zytoskelett-Regulation erforderlich, die durch eine Interaktion zwischen Profilin III und Endophilin vermittelt und reguliert werden könnte. Zudem bildet das Akrosom selbst ein vesikuläres Organell, in dem auch nach der Akrosomen-Biogenese endozytotische Vorgänge ablaufen. So fusioniert im Zuge der Akrosomreaktion die Plasmamembran über dem Akrosom mit der äußeren Akrosommembran, was zur Bildung von Vesikeln führt, die während der Passage durch die Zona pellucida der Eizelle abgegeben werden [Tulsiani *et al.*, 1998; Wassarman, 1999; Wassarman *et al.*, 2001]. Diese endozytotischen

Vorgänge sind für die Befruchtungsfähigkeit der Spermien essentiell und es ist möglich, dass Profilin III und Endophilin hier eine entscheidende Rolle spielen.

Beim *Spermiogenesis specific transcript on Y2* (Ssty2; NP\_076036) handelt es sich um ein hypothetisches Protein, welches bisher noch nicht beschrieben oder charakterisiert wurde. Das Gen wird jedoch ebenso wie Profilin III spezifisch post-meiotisch während der Spermiogenese in Spermatischen exprimiert [Bishop & Hatat, 1987; Toure *et al.*, 2005], so dass aufgrund des gleichen Expressionsprofils ein Zusammenhang nicht ausgeschlossen werden kann. Ssty2 ist eines der Y-chromosomalen Ssty-Multicopy-Gene, für die bisher kaum Proteine nachgewiesen wurden. Deletionsstudien zeigten jedoch, dass partielle Deletionen der Ssty-Bereiche in Spermienkopf-Defekten und gestörter Fertilität resultieren, so dass eine essentielle Bedeutung der Ssty-Genprodukte für die Spermatogenese angenommen werden muss [Toure *et al.*, 2003 + 2005]. Der Bezug zum Profilin und seine molekularen Funktionen sind jedoch unbekannt.

Als ein weiterer potentieller Interaktionspartner wurde das Multiple-PDZ-Protein 1 (MUPP1) ermittelt, das ebenso wie Profilin III im Akrosom runder, elongierender und reifer Säuger-Spermatischen lokalisiert sein soll [Heydecke *et al.*, 2006]. Im Unterschied zu Profilin III, das bereits auf Transkript-Ebene ein post-meiotisches Expressionsprofil zeigt, konnte für MUPP1 jedoch keine Assoziation mit dem Verlauf der Spermatogenese beobachtet werden, so dass eine überwiegend somatische Expression angenommen werden muss. Jedoch müssen mRNA und Protein-Vorkommen nicht zwingen miteinander korrelieren, so dass eine post-meiotische Lokalisation des Proteins im Akrosom der Spermatischen durchaus möglich ist. Aufgrund der Lokalisation im Akrosom und der Beobachtung, dass MUPP1 nach Akrosomreaktion nicht mehr zu detektieren ist, postulieren Heydecke *et al.* (2006) für MUPP1 eine Funktion bei der Kapazitation und Akrosomreaktion. Die molekulare Funktion von MUPP1 in Spermien bleibt jedoch ungeklärt. Generell spielen PDZ-Proteine eine Rolle bei der Mediation spezifischer Protein-Protein-Interaktionen, die an Signaltransduktion sowie am Aufbau und Erhalt von Zellpolarität beteiligt sind. Sie bilden so genannte *scaffolding*-Proteine, also Gerüstproteine, welche die Grundlage für die Organisation von größeren Proteinkomplexen an spezifischen, subzellulären Kompartimenten bilden. Spermiogenese, Kapazitation und Akrosomreaktion sind komplexe Vorgänge, die durch eine Vielzahl an intrazellulären Signaltransduktionswege und somit spezifische Protein-Interaktionen reguliert werden. In diese Prozesse könnten Profilin III und MUPP1 involviert sein.

Den Ergebnissen der Interaktionsstudien zufolge scheint es sich bei Profilin III um ein „typisches“ Aktin-bindendes Profilin zu handeln, dessen Funktion in der Regulierung und Förderung der Aktin-Polymerisation liegt. Ebenso wie Profilin I und II könnte es die Aktin-Dynamik beeinflussen, indem es durch direkte Interaktion mit Aktin oder die Bindung an F-Aktin-gebundenes Diaph3, die Aktin-Polymerisationsrate steigert. Es könnte sich um *das* „typische“ Aktin-regulatorische Profilin der Keimzellen handeln, das essentiell an der morphologischen Differenzierung der Spermatischen, der Ausbildung charakteristischer Keimzellstrukturen sowie intrazellulärer Signaltransduktion beteiligt ist und womöglich auch bei der Akrosomreaktion und Befruchtung eine Rolle spielt, und dem durch die Interaktion mit weiteren Liganden eine zentrale Rolle bei der Regulation und Vermittlung der molekularen Interaktionen und der Vernetzung zum Aktin-Zytoskelett zukommt.

### Profilin IV

Für das murine und humane Profilin IV konnte eindeutig keine Interaktion mit Aktin und Poly-L-Prolin bzw. den Poly-Prolin-Proteinen VASP und Diaph3 gezeigt werden. Die Versuche wurden parallel zu Profilin III durchgeführt, so dass anzunehmen ist, dass es sich bei Profilin IV um kein „typisches“ Profilin handelt. Phylogenetische Analysen und ein Aminosäure-Sequenzvergleich mit den anderen Profilin-Isoformen zeigten, dass sich Profilin IV erheblich von den anderen Profilinen unterscheidet. Es weist mit durchschnittlich 23 % die geringste Homologie zu den anderen Profilinen auf und bildet eine separate Gruppe (siehe Abb.3.10 und Polet *et al.*, 2007). Vor allem hoch konservierte Aminosäuren, die die Aktin und Poly-Prolin-Bindestellen ausbilden, sind in Profilin IV nicht mehr erhalten (siehe Abb. 3.30), was die fehlenden Interaktionen mit Aktin und Poly-Prolin-reichen Proteinen erklärt. Trotz dieser drastischen Sequenzabweichungen wird Profilin IV jedoch eindeutig in die Gruppe der Profiline eingeordnet. Polet *et al.* (2007) untersuchten die phylogenetische Verwandtschaft der Profilin-Isoformen zwischen verschiedenen Spezies. Dabei beobachteten sie ebenfalls, dass die Profilin IV-Isoformen der verschiedenen Spezies einen völlig getrennten Cluster bilden und die geringste Homologie zu den übrigen Profilin-Isoformen aufweisen. Zudem stellten sie bei einem Vergleich aller vier humanen Profiline mit denen der Wirbellosen fest, dass die Profiline I, II und III des Menschen zwar zusammen clustern, das humane Profilin IV jedoch die größte Homologie zu den Profilin-Sequenzen von Seeigel und Ciona zeigte. Ein Profilin im Akrosom von Seeigel-Spermien war das erste beschriebene Aktin-bindende Profilin [Tilney *et al.*, 1983], jedoch handelt es sich bei den Sequenzen mit denen Profilin IV im phylogenetischen Vergleich zusammen clustert um genomische Sequenzen, von denen bisher nicht bekannt ist, ob sie tatsächlich das Akrosomen-Profilin des Seeigels kodieren. Aufgrund der größten Ähnlichkeit des Profilin IV zu den Profilinen der Evertebraten und niederen Eukaryoten und da ein Profilin IV-ähnliches Gen in allen sequenzierten Spezies gefunden wird, vermuten Polet *et al.* (2007), dass es frühzeitig in der Evolution der Tiere zu einer Genverdopplung kam und sich das Profilin IV-Gen womöglich bereits vor der Abspaltung der Wirbeltiere getrennt von den übrigen Profilinen entwickelt hat. Die Tatsache, dass sich die verschiedenen Profilin-Gruppen (Profilin I, II und III auf der einen Seite und Profilin IV auf der anderen Seite) früh in der Evolution getrennt haben, dass aber die Isoformen innerhalb der Gruppen hoch konserviert geblieben sind, legen die Vermutung nahe, dass die Profiline spezifische Funktionen besitzen. Diese These kann schon allein durch die gut charakterisierten Profilin-Isoformen I und II unterstützt werden. Beide sind hauptsächlich in unterschiedlichen Geweben exprimiert, und es sind unterschiedliche Liganden und verschiedene Affinitäten zu gleichen Liganden beschrieben [Witke *et al.*, 1998; Lambrechts *et al.*, 1997, 2000]. Die funktionellen Studien und die distinkte subzelluläre Lokalisation der Testis-exprimierten Profiline III und IV in den Keimzellen unterstreichen diese Vermutung. So scheint es sich bei Profilin III um ein „typisches“ Profilin mit Aktin- und Poly-L-Prolin-Bindungsfähigkeit zu handeln, während Profilin IV diese biochemischen Bindungseigenschaften nicht aufweist. Auch in den Y2H-Library-Screenings zur Identifizierung potentieller Interaktionspartner, die Hinweise auf die molekularen Funktionen der Profiline III und IV in der Spermiogenese liefern sollten, zeigten sich diese Unterschiede. Während für Profilin III  $\beta$ -Aktin als Interaktionspartner gefunden wurden, befand sich unter den ermittelten Profilin IV-Interaktionspartnern weder Aktin noch andere charakteristische Profilin-Liganden wie z.B. Poly-Prolin-reiche Proteine. Hauptsächlich wurden Proteine unbekannter molekularer Funktion als potentielle Interaktionspartner ermittelt, die keine direkten Rückschlüsse auf die Funktion des Profilin IV in den Keimzellen erlauben. Zwar können einige dieser potentiellen Interaktionspartner in einen Zusammenhang mit dem Zytoskelett und /

oder der intrazellulären Signaltransduktion gebracht werden, jedoch ist derzeit nicht sicher, ob es sich um tatsächliche Interaktionspartner handelt, da alle diese Proteine jeweils nur einmal als Bindungspartner ermittelt wurden und die Interaktionen noch nicht durch Kontrollversuche bestätigt werden konnten.

Einer dieser potentiellen Interaktionspartner ist Tensin, das über seine zahlreichen funktionellen Domänen an verschiedene Strukturproteine und Signalmoleküle binden kann. Unter anderem interagiert es über seine drei Aktin-Bindestellen mit F-Aktin und ist an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt, in dem es ähnlich wie die FH-Protein an die (+)-Enden der Filamente bindet und so das Wachstum in diese Richtung inhibiert oder verschiedene Aktin-Filamente miteinander verknüpft [Ruhnau *et al.*, 1989, Weigt *et al.*, 1992]. Über eine der weiteren Proteindomänen (SH2- oder PTB-Domäne) ist Tensin als Adapterprotein in der Lage, das Zytoskelett mit der Zellmembran und dort lokalisierten Rezeptoren wie z.B. dem Integrin-Rezeptor zu verbinden. Es ist so unter anderem in die Tyrosin-Kinase-Signaltransduktion involviert [Lo *et al.*, 1994 + 2004]. Auch für WDR48 kann aufgrund seiner Zugehörigkeit zur *WD-repeat*-Familie eine Funktion als Adapter- bzw. Regulator-Molekül in der Signaltransduktion und Zytoskelett-Organisation vermutet werden. Ein Beispiel für ein *WD-repeat*-Protein, dem eine Funktion in der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen und bei der Zytoskelett Regulation zukommt ist das *Actin-related Protein* Arp2/3. Dieses bindet an mehrere F-Aktin-Filamente und vernetzt diese so in einer Y-Anordnung [Blanchoin *et al.*, 2000; Mullins *et al.*, 1998]. Für die potentiellen Interaktionspartner Elmo2 und Skd3, deren *in vivo* Funktionen unbekannt sind, kann ebenfalls eine Beziehung zum Zytoskelett vermutet werden. So ist für die Elmo/Ced-12-Familie eine Rolle bei der Zytoskelett-Mediation beschrieben [Lemmon *et al.*, 1998; Gumienny *et al.*, 2001], und Skd3 enthält drei Ankyrin-Domänen, welche eine Vielzahl von Protein-Protein- und Protein-Zytoskelett-Interaktionen vermitteln [Mosavi *et al.*, 2004]. Snx3, Rnf184 und Cops5 spielen vermutlich eine Funktion bei der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen und bei der intrazellulären Signaltransduktion, jedoch sind auch hier die Funktionen im Testis bzw. den Keimzellen unbekannt. Über das gefundene hypothetische Protein sowie Asrg11 ist bisher nichts bekannt.

Die Ergebnisse der Protein-Protein-Interaktionsstudien legen den Verdacht nahe, dass es sich bei Profilin IV um kein charakteristisches Profilin handelt, dessen Hauptfunktion in der direkten Aktin-Regulation läge. Möglicherweise handelt es sich um ein Protein der so genannten *Profilin like adaptor proteins* (ProflAP). Diese Proteine weisen eine Profilin-ähnliche Struktur auf; jedoch sind sie ebenso wie Profilin IV in Bereichen für Poly-L-Prolin und PIP<sub>2</sub>-Interaktionen kaum konserviert, so dass sie nur eine schwache Interaktion mit wenigen Phosphoinositolen zeigen und wie Profilin IV keine Bindung mit Poly-Prolin-Sequenzen eingehen können [Qian *et al.*, 2005]. Als erstes repräsentatives Protein dieser neuen Subgruppe wurde das Adapter-Protein p14 beschrieben [Kurzbaauer *et al.*, 2004; Qian *et al.*, 2005]. Dieses ist mit dem späten endosomalen/lysosomalen Kompartiment assoziiert und hat eine Funktion bei der Endozytose. In dem es an das *scaffolding*-Proteine MP1 bindet, wird MP1 in das Endosom transportiert wo sich ein Komplex aus p14/MP1, dem Kinase-Aktivatoren MEK1 und der MAP-Kinase ERK1 bildet, welcher für die Signaltransduktion über die ERK-MAP-Kinase essentiell ist [Qian *et al.*, 2005]. Ebenso wie die ProflAPs könnte Profilin IV eine hauptsächliche Funktion in der Signaltransduktion und weniger in der direkten Zytoskelett-Regulation einnehmen.

## 4.6 Ausblick

Durch Vergleich der Genexpressionsmuster von WT- und HE6-KO-Nebenhoden sowie Y2H-Screening konnten potentielle Kandidaten ermittelt werden, die in eine HE6-abhängige Signaltransduktion involviert sein könnten. Aufgrund der veränderten Genexpressionsmuster im HE6-KO-Nebenhoden und der Co-Expression der betroffenen Gene mit HE6 kann ein Zusammenhang zwischen HE6 und den beeinflussten Genen angenommen werden. Jedoch bleibt zu klären, ob es sich bei diesen Genen um so genannte *downstream*-regulierten Gene handelt, deren Expression direkt durch das chronische Fehlen des HE6-Rezeptors verändert wird oder ob das veränderte Genexpressionsmuster eine indirekte Folge des KO-Phänotyps mit partiellem Verschluss der Ductuli ist. Da zudem die funktionelle Ebene die Protein-Ebene ist, müssen in einem nächsten Schritt Analysen auf Proteinebene durchgeführt werden, um zu untersuchen, in wie weit die Menge der einzelnen Transkripte mit der jeweiligen Proteinmenge assoziiert ist. Gegenwärtig gibt es nur wenig gesicherte Informationen über das Verhältnis zwischen „Transkriptom“ und „Proteom“, jedoch besteht in vielen Fällen keine direkte Korrelation [Gronborg *et al.*, 2006; Nissom *et al.*, 2006]. Dies ist z.B. auf unterschiedliche Umsatzraten von mRNAs, mögliche Regulationsvorgänge auf Ebene der Translation oder unterschiedliche Stabilitäten von Proteinen zurückzuführen.

Mittels der Y2H-Technik konnten auf Proteinebene potentielle direkte Interaktionspartner des HE6-C-Terminus auf Proteinebene ermittelt werden. Diese Interaktionen müssen jedoch in Zukunft durch alternative Methoden wie z.B. Co-Immunopräzipitation, PDZ-Pulldown oder ELISA bestätigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits erste Experimente zur *in vitro* Translation und Co-IP von HE6 und CRIPT bzw. SMA4 durchgeführt (nicht gezeigt).

Auch für die Testis-exprimierten Profilin III und IV konnten auf Proteinebene im Y2H-System potentielle neue Interaktionspartner ermittelt werden. Die detektierten Interaktionen müssten ebenfalls durch weiterführende Studien im Y2H-System und alternative Methoden bestätigt werden, bevor Aussagen über mögliche molekulare Funktionen der Profilin in den Keimzellen und ihre Rolle bei der Differenzierung der Spermatiden gemacht werden können. Um weitere Hinweise auf eine mögliche Interaktion der ermittelten Proteine mit den Profilinen zu erhalten, bieten sich Co-Lokalisations-Studien mit spezifischen Antikörpern auf Keimzellpräparaten an. Weiterhin stehen noch funktionelle Untersuchungen der Testis-exprimierten Profilin zur PIP<sub>2</sub>-Interaktion aus. Hierfür und für weitere Studien wie z.B. ELISA, Cross-link-Studien, Dot-Overlays oder auch für eine Profilin-Säule zur Affinitätschromatographie mit Testis-Lysaten, wäre eine rekombinante Expression und Aufreinigung der Profilin geeignet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits verschiedene Methoden zur Expression und Aufreinigung der Profilin III und IV ausgetestet (*HIS-tag*, *GST-tag*, Poly-L-Prolin-Säule). Jedoch gelang es noch nicht, die Aufreinigung so weit zu optimieren, dass ausreichende Mengen an nativem Protein für funktionelle Studien gewonnen werden konnten.

Um die im Rahmen dieser Arbeit erlangten Ergebnisse besser einordnen zu können und um die *in vivo* Funktionen der Profilin in den männlichen Keimzellen und ihre Bedeutung für die Spermatogenese und Befruchtungsfähigkeit der Spermien zu überprüfen, würde sich die Generierung von Profilin III / IV-KO-Mäusen anbieten.

## V Zusammenfassung

Die Dynamik des Aktin-Zytoskletts bildet die Grundlage für die Regulation zweier zentraler Vorgänge des Fortpflanzungsgeschehens, nämlich der Spermatogenese und des transepithelialen Flüssigkeitstransportes in den ableitenden Samenwegen.

Ein Aspekt dieser Arbeit war die Rolle des heptahelikalen HE6-Rezeptors (GPR64) beim transepithelialen Flüssigkeitstransport im proximalen Nebenhoden. Aufgrund seiner Lokalisation in unmittelbarer Nähe zum apikalen Aktin-Zytoskelett der Epithelzellen [Kirchhoff *et al.*, submitted] könnte HE6 am Anfang eines Signaltransduktionsweges stehen, der ein Signal von der adluminalen Seite des Epithels auf das apikale Aktin-Zytoskelett und die *tight junctions* weiterleitet und somit den transzellulären und parazellulären Flüssigkeitstransport reguliert. In dieser Arbeit konnte mit Claudin-10, das durch die gezielte Mutation des HE6-Rezeptors in seiner Expression beeinflusst wird, eine Verbindung des HE6-Rezeptors zu den *tight junctions* und dem apikalen Aktin-Zytoskelett hergestellt werden. Claudin-10 könnte auf einen HE6-Stimulus hin über das apikale Aktin-Zytoskelett die Permeabilität der *tight junctions* verändern und so in eine HE6-abhängige Regulation des parazellulären Flüssigkeitstransports involviert sein. Eine zunächst vermutete direkte Interaktion des HE6-Rezeptors mit den Profilinen, vor allem dem Profilin IV, konnte in dieser Arbeit dagegen nicht bestätigt werden, so dass die Regulation der Aktin-Dynamik mittels Profilinen, wie in Kirchhoff *et al.* (2006) angenommen, unwahrscheinlich erscheint. Jedoch wurde mit CRIPT auf Proteinebene ein anderes Zytoskelett-Protein als potentieller Interaktionspartner des HE6-Rezeptors ermittelt, das in die intrazelluläre Signaltransduktion involviert sein könnte. Durch eine gleichzeitige Interaktion mit dem HE6-C-Terminus und Tubulin könnte es die Schnittstelle zwischen dem Rezeptor und dem apikalen Zytoskelett herstellen, über das wiederum weitere Proteine, Ionenkanäle oder Transporter reguliert werden können.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit waren die Testis-exprimierten Profiline III und IV und ihre Rolle bei der Ausbildung der spezifischen Zellgestalt der Spermien. Hauptexpressionsort beider Profiline sind die männlichen Keimzellen. Für die mRNAs konnten distinkte Expressionsprofile gezeigt werden, die mit dem Verlauf der Spermatogenese korreliert sind. Während das Profilin III-Gen ein post-meiotisches Expressionsmuster aufweist und erst in den haploiden Spermatischen zu finden ist, sind Profilin IV-Transkripte bereits prä-/meiotisch in Spermatozyten nachzuweisen. Auf Proteinebene sind beide Profiline mit der Phase der Spermiogenese korreliert und erst post-meiotisch in Spermatischen vorzufinden. Jedoch sind beide in unterschiedlichen Keimzellstrukturen lokalisiert. Profilin III ist im kompletten Akrosom runder, elongierender und reifer Spermatischen vorzufinden, wohingegen Profilin IV in runden Spermatischen zunächst im akrosomalen Vesikel und in reifen Spermatozoen nur im apikalen Akrosomenbereich lokalisiert ist. Zusätzlich konnte es in einer post-akrosomalen Struktur zwischen Akrosom und Manschette detektiert werden. Diese zeitlich und räumlich unterschiedlichen Expressionsprofile sprechen für distinkte Funktionen der Profiline während der Spermiogenese. Diese Vermutung wurde durch die funktionellen Studien und die Ergebnisse der *Yeast Two-Hybrid*-Library-Screenings unterstrichen. Hier zeigte sich Profilin III als ein „typisches“ Profilin mit den charakteristischen Aktin- und Poly-L-Prolin-Bindungseigenschaften, Profilin IV hingegen nicht. Die Interaktion des Profilin III mit Aktin und dem FH-Protein Diaph3 lassen vermuten, dass es sich bei Profilin III um ein regulatorisches Protein des Aktin-Zytoskletts der Keimzellen handelt. Ebenso wie die Profiline I und II könnte es die Aktin-Dynamik beeinflussen, in dem es *in vivo* durch Bildung von Profilin-Aktin-Komplexen

oder die Bindung an F-Aktin-gebundenes Diaph3, die Aktin-Polymerisationsrate steigert [Selden *et al.*, 1999; Pantaloni & Carlier, 1993; Higgs, 2005]. Bei Profilin III könnte es sich also um das „typische“ Aktin-bindende Profilin der männlichen Keimzellen handeln, das durch direkte und indirekte Regulation des Aktin-Zytoskelettes an der morphologischen Differenzierung der Spermatozoen, die für die Fertilität des Spermium von grundlegender Bedeutung ist [Barros *et al.*, 1996; Kierszenbaum *et al.*, 2003] beteiligt ist. Da dem Aktin-Zytoskelett der Spermien weiterhin eine wichtige Bedeutung bei Membran-Umgestaltungen und intrazellulärer Signaltransduktion während der post-testikulären Reifung der Spermien im Nebenhoden [Lin *et al.*, 2002] sowie bei der Kapazitation und der Akrosomen-Reaktion [Breitbart *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 1999] zukommt, kann eine Beteiligung des Keimzell-spezifischen Profilin III, als Aktin-regulatorisches Protein, an all diesen Prozessen vermutet werden.

Profilin IV scheint im Unterschied zu Profilin III kein „typisches“ Profilin mit den charakteristischen Aktin- und Poly-Prolin-Bindungseigenschaften zu sein. Schon der phylogenetische Vergleich und die Sequenz-Analyse ließen vermuten, dass Profilin IV aufgrund seiner geringen Homologie zu den anderen Profilinen und kaum konservierten funktionellen Aminosäuren keine charakteristischen Profilin-Interaktionen eingehen kann. Dementsprechend konnte weder in den funktionellen Studien noch im Y2H-Library Screen eine Interaktion mit Aktin oder anderen charakteristischen Profilin-Liganden, wie z.B. Poly-Prolin-Proteinen ermittelt werden. Es ist daher anzunehmen, dass Profilin IV im Gegensatz zu Profilin III in keiner direkten oder sehr schwachen Interaktion mit dem Aktin-Zytoskelett steht. Möglicherweise handelt es sich um eine Profilin-Isoform, die ihre hauptsächliche Funktion in der Signaltransduktion und weniger in der direkten Zytoskelett-Regulation hat.

## VI Literaturverzeichnis

- Ahuja, H. S., Tenniswood, M., Zakeri, Z. F. (1996). "Differential expression of clusterin in the testis and epididymis of postnatal and germ cell deficient mice." *J Androl*, 17(5), 491-501.
- Aitken, A. (1996). "14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways." *Trends Cell Biol*, 6(9), 341-7.
- Alastalo, T. P., Lonnstrom, M., Leppa, S., Kaarniranta, K., Pelto-Huikko, M., Sistonen, L., Parvinen, M. (1998). "Stage-specific expression and cellular localization of the heat shock factor 2 isoforms in the rat seminiferous epithelium." *Exp Cell Res*, 240(1), 16-27.
- Amann, R.P., Hammerstedt, R. H., Veeramachaneni, D. N. (1993). "The epididymis and sperm maturation: a perspective." *Reprod Fertil Dev*, 5(4), 361-81.
- Apodaca, G. (2001). "Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton." *Traffic*, 2(3), 149-59.
- Archer, S. J., Vinson, V. K., Pollard, T. D., Torchia, D. A. (1994). "Elucidation of the poly-L-proline binding site in Acanthamoeba profilin I by NMR spectroscopy." *FEBS Lett*, 337(2), 145-51.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Barros, C., Crosby, J.A., Moreno, R.D. (1996). "Early steps of sperm-egg interactions during mammalian fertilization." *Cell Biol Int*, 20(1), 33-9.
- BD-Biosciences. (1999). "MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual."
- BD-Biosciences. (2001). *Yeast Protocols Handbook*, Heidelberg.
- BD-Biosciences. (2003). *BD Matchmaker Pretransformed Libraries User Manual*, BD Biosciences
- Bearer, E. L., Prakash, J. M., Manchester, R. D., Allen, P. G. (2000). "VASP protects actin filaments from gelsolin: an in vitro study with implications for platelet actin reorganizations." *Cell Motil Cytoskeleton*, 47(4), 351-64.
- Bedford, J. M. (1994). "The status and the state of the human epididymis." *Hum Reprod*, 9(11), 2187-99.
- Ben-Zur, T., Feige, E., Motro, B., Wides, R. (2000). "The mammalian Odz gene family: homologs of a Drosophila pair-rule gene with expression implying distinct yet overlapping developmental roles." *Dev Biol*, 217(1), 107-20.
- Bickel, P. E., Scherer, P. E., Schnitzer, J. E., Oh, P., Lisanti, M. P., Lodish, H. F. (1997). "Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins." *J Biol Chem*, 272(21), 13793-802.
- Binette, F., Benard, M., Laroche, A., Pierron, G., Lemieux, G., Pallotta, D. (1990). "Cell-specific expression of a profilin gene family." *DNA Cell Biol*, 9(5), 323-34.
- Birnboim, H. C. (1983). "A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA." *Methods Enzymol*, 100, 243-55.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res*, 7(6).
- Bishop, C. E., & Hatat, D. (1987). "Molecular cloning and sequence analysis of a mouse Y chromosome RNA transcript expressed in the testis." *Nucleic Acids Res*, 15(7), 2959-69.
- Bjarnadottir, T. K., Fredriksson, R., Hoglund, P. J., Gloriam, D. E., Lagerstrom, M. C., Schioth, H. B. (2004). "The human and mouse repertoire of the adhesion family of G-protein-coupled receptors." *Genomics*, 84(1), 23-33.
- Bjorkegren, C., Rozycki, M., Schutt, C. E., Lindberg, U., Karlsson, R. (1993). "Mutagenesis of human profilin locates its poly(L-proline)-binding site to a hydrophobic patch of aromatic amino acids." *FEBS Lett*, 333(1-2), 123-6.
- Bjorkegren-Sjogren, C., Korenbaum, E., Nordberg, P., Lindberg, U., Karlsson, R. (1997). "Isolation and characterization of two mutants of human profilin I that do not bind poly(L-proline)." *FEBS Lett*, 418(3), 258-64.
- Blanchoin, L., Amann, K. J., Higgs, H. N., Marchand, J. B., Kaiser, D. A., Pollard, T. D. (2000). "Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins." *Nature*, 404(6781), 1007-11.
- Blasco, R., Cole, N. B., Moss, B. (1991). "Sequence analysis, expression, and deletion of a vaccinia virus gene encoding a homolog of profilin, a eukaryotic actin-binding protein." *J Virol*, 65(9), 4598-608.
- Blose, S. H., Meltzer, D. I., Feramisco, J. R. (1984). "10-nm filaments are induced to collapse in living cells microinjected with monoclonal and polyclonal antibodies against tubulin." *J Cell Biol*, 98(3), 847-58.
- Bockaert, J., Claeysen, S., Becamel, C., Pinloche, S., Dumuis, A. (2002). "G protein-coupled receptors: dominant players in cell-cell communication." *Int Rev Cytol*, 212, 63-132.
- Bockaert, J., Marin, P., Dumuis, A., Fagni, L. (2003). "The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks." *FEBS Lett*, 546(1), 65-72.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- Brady, A. E., and Limbird, L. E. (2002). "G protein-coupled receptor interacting proteins: emerging roles in localization and signal transduction." *Cell Signal*, 14(4), 297-309.
- Braun, A., Aszodi, A., Hellebrand, H., Berna, A., Fassler, R., Brandau, O. (2002). "Genomic organization of profilin-III and evidence for a transcript expressed exclusively in testis." *Gene*, 283(1-2), 219-25.
- Braun, R. E. (2001). "Packaging paternal chromosomes with protamine." *Nat Genet*, 28(1), 10-2.
- Breitbart, H., Cohen, G., Rubinstein, S. (2005). "Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction." *Reproduction*, 129(3), 263-8.
- Bridges, L. C., Tani, P. H., Hanson, K. R., Roberts, C. M., Judkins, M. B., Bowditch, R. D. (2002). "The lymphocyte metalloprotease MDC-L (ADAM 28) is a ligand for the integrin alpha4beta1." *J Biol Chem*, 277(5), 3784-92.
- Brock, C., Boudier, L., Maurel, D., Blahos, J., Pin, J. P. (2005). "Assembly-dependent surface targeting of the heterodimeric GABAB Receptor is controlled by COPI but not 14-3-3." *Mol Biol Cell*, 16(12), 5572-8.
- Burgueno, J., Blake, D.J., Benson, M.A., Tinsley, C.L., Esapa, C.T., Canela, E.I., Penela, P., Mallol, J., Mayor, F., Jr., Lluís, C., Franco, R., Ciruela, F. (2003). "The adenosine A2A receptor interacts with the actin-binding protein alpha-actinin." *J Biol Chem*, 278(39), 37545-52.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." *Anal Biochem*, 112(2), 195-203.
- Bush, L. A., Herr, J. C., Wolkowicz, M., Sherman, N. E., Shore, A., Flickinger, C. J. (2002). "A novel asparaginase-like protein is a sperm autoantigen in rats." *Mol Reprod Dev*, 62(2), 233-47.
- Buss, F., Temm-Grove, C., Henning, S., Jockusch, B. M. (1992). "Distribution of profilin in fibroblasts correlates with the presence of highly dynamic actin filaments." *Cell Motil Cytoskeleton*, 22(1), 51-61.
- Buttayan, R., Olsson, C. A., Pintar, J., Chang, C., Bandyk, M., Ng, P. Y., Sawczuk, I. S. (1989). "Induction of the TRPM-2 gene in cells undergoing programmed death." *Mol Cell Biol*, 9(8), 3473-81.
- Campbell, N. A., Reece, J. B., Mitchell, L. G. (1987). *Biology*, Pearson Benjamin Cummings, San Francisco.
- Carlner, M. F. (1991). "Nucleotide hydrolysis in cytoskeletal assembly." *Curr Opin Cell Biol*, 3(1), 12-7.
- Carlsson, L., Nystrom, L. E., Sundkvist, I., Markey, F., Lindberg, U. (1977). "Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells." *J Mol Biol*, 115(3), 465-83.
- Chen, H., Ishii, A., Wong, W. K., Chen, L. B., Lo, S. H. (2000). "Molecular characterization of human tensin." *Biochem J*, 351 Pt 2, 403-11.
- Chen, Y., Takizawa, N., Crowley, J. L., Oh, S. W., Gatto, C. L., Kambara, T., Sato, O., Li, X. D., Ikebe, M., Luna, E. J. (2003). "F-actin and myosin II binding domains in supervillin." *J Biol Chem*, 278(46), 46094-106.
- Cho, C., Bunch, D. O., Faure, J. E., Goulding, E. H., Eddy, E. M., Primakoff, P., Myles, D. G. (1998). "Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta." *Science*, 281(5384), 1857-9.

- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem*, 162(1), 156-9.
- Clermont, Y. (1963). "The cycle of the seminiferous epithelium in man." *Am J Anat*, 112, 35-51.
- Clulow, J., Jones, R.C., Hansen, L.A., Man, S.Y. (1998). "Fluid and electrolyte reabsorption in the ductuli efferentes testis." *J Reprod Fertil Suppl*, 53, 1-14.
- Cohen, B. D., Nechamen, C. A., Dias, J. A. (2004). "Human follitropin receptor (FSHR) interacts with the adapter protein 14-3-3 $\tau$ ." *Mol Cell Endocrinol*, 220(1-2), 1-7.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., Hsu, L. (1972). "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69(8), 2110-4.
- Cooley, L., Verheyen, E., Ayers, K. (1992). "chickadee encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis." *Cell*, 69(1), 173-84.
- Coons, A. H., & Kaplan, M. H. (1950). "Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody." *J Exp Med*, 91(1), 1-13.
- Coons, A. H., Leduc, E. H., Connolly, J. M. (1955). "Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit." *J Exp Med*, 102(1), 49-60.
- Cooper, T. G. (1995). "Role of the epididymis in mediating changes in the male gamete during maturation." *Adv Exp Med Biol*, 377, 87-101.
- Couve, A., Kittler, J. T., Uren, J. M., Calver, A. R., Pangalos, M. N., Walsh, F. S., Moss, S. J. (2001). "Association of GABA(B) receptors and members of the 14-3-3 family of signaling proteins." *Mol Cell Neurosci*, 17(2), 317-28.
- Davies, B., Baumann, C., Kirchhoff, C., Ivell, R., Nubbemeyer, R., Habenicht, U. F., Theuring, F., Gottwald, U. (2004). "Targeted deletion of the epididymal receptor HE6 results in fluid dysregulation and male infertility." *Mol Cell Biol*, 24(19), 8642-8.
- Davies, B., Behnen, M., Cappallo-Obermann, H., Spiess, A. N., Theuring, F., Kirchhoff, C. (2007). "Novel epididymis-specific mRNAs downregulated by HE6/Gpr64 receptor gene disruption." *Mol Reprod Dev*, 74(5), 539-53.
- de las Heras, M. A., Valcarcel, A., Perez, L. J., Moses, D. F. (1997). "Actin localization in ram spermatozoa: effect of freezing/thawing, capacitation and calcium ionophore-induced acrosomal exocytosis." *Tissue Cell*, 29(1), 47-53.
- de Rooij, D. G. (1998). "Stem cells in the testis." *Int J Exp Pathol*, 79(2), 67-80.
- de Silva, H.V., Stuart, W.D., Duvic, C.R., Wetterau, J.R., Ray, M.J., Ferguson, D.G., Albers, H.W., Smith, W.R., Harmony, J.A. (1990). "A 70-kDa apolipoprotein designated ApoJ is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins." *J Biol Chem*, 265(22), 13240-7.
- DeGraff, J. L., Gurevich, V. V., Benovic, J. L. (2002). "The third intracellular loop of alpha 2-adrenergic receptors determines subtype specificity of arrestin interaction." *J Biol Chem*, 277(45), 43247-52.
- Denhardt, D. T., Giachelli, C. M., Rittling, S. R. (2001). "Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury." *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41, 723-49.
- Denhardt, D. T. & Guo, X. (1993). "Osteopontin: a protein with diverse functions." *Faseb J*, 7(15), 1475-82.
- Ding, Y., Jiang, M., Jiang, W., Su, Y., Zhou, H., Hu, X., Zhang, Z. (2005). "Expression, purification, and characterization of recombinant human flotillin-1 in *Escherichia coli*." *Protein Expr Purif*, 42(1), 137-45.
- Dingwall, C., Kandels-Lewis, S., Seraphin, B. (1995). "A family of Ran binding proteins that includes nucleoporins." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(16), 7525-9.
- Dohlman, H. G., Thorner, J., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. (1991). "Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors." *Annu Rev Biochem*, 60, 653-88.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H., Elledge, S. J. (1993). "The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit." *Genes Dev*, 7(4), 555-69.
- Ediger, T. R., Park, S. E., Katzenellenbogen, B. S. (2002). "Estrogen receptor inducibility of the human Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor/ezrin-radixin-moesin binding protein 50 (NHE-RF/EBP50) gene involving multiple half-estrogen response elements." *Mol Endocrinol*, 16(8), 1828-39.
- El Far, O., Airas, J., Wischmeyer, E., Nehring, R. B., Karschin, A., Betz, H. (2000). "Interaction of the C-terminal tail region of the metabotropic glutamate receptor 7 with the protein kinase C substrate PICK1." *Eur J Neurosci*, 12(12), 4215-21.
- Ellson, C. D., Andrews, S., Stephens, L. R., Hawkins, P. T. (2002). "The PX domain: a new phosphoinositide-binding module." *J Cell Sci*, 115(Pt 6), 1099-105.
- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G., Bishop, J. M. (1985). "Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product." *Mol Cell Biol*, 5(12), 3610-6.
- Fan, J. S. & Zhang, M. (2002). "Signaling complex organization by PDZ domain proteins." *Neurosignals*, 11(6), 315-21.
- Fanning, A. S. & Anderson, J. M. (1999). "Protein modules as organizers of membrane structure." *Curr Opin Cell Biol*, 11(4), 432-9.
- Fashena, S. J., Serebriiskii, I. G., Golemis, E. A. (2000). "LexA-based two-hybrid systems." *Methods Enzymol*, 328, 14-26.
- Faulstich, H., Zobeley, S., Rinnerthaler, G., Small, J. V. (1988). "Fluorescent phallotoxins as probes for filamentous actin." *J Muscle Res Cell Motil*, 9(5), 370-83.
- Fawcett, D. W. (1970). "A comparative view of sperm ultrastructure." *Biol Reprod*, 2, Suppl 2:90-127.
- Fawcett, D. W., Anderson, W.A., Phillips, D. (1971). "Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head." *Dev Biol*, 26(2), 220-51.
- Fedorov, A. A., Pollard, T. D., Almo, S. C. (1994). "Purification, characterization and crystallization of human platelet profilin expressed in *Escherichia coli*." *J Mol Biol*, 241(3), 480-2.
- Feig, C., Kirchhoff, C., Ivell, R., Naether, O., Schulze, W., Spiess, A. N. (2007). "A new paradigm for profiling testicular gene expression during normal and disturbed human spermatogenesis." *Mol Hum Reprod*, 13(1), 33-43.
- Fields, S. & Song, O. (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." *Nature*, 340(6230), 245-6.
- Fields, S. & Sternglanz, R. (1994). "The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions." *Trends Genet*, 10(8), 286-92.
- Flick, J. S. & Johnston, M. (1990). "Two systems of glucose repression of the GAL1 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol*, 10(9), 4757-69.
- Fouquet, J. P. & Kann, M. L. (1994). "The cytoskeleton of mammalian spermatozoa." *Biol Cell*, 81(2), 89-93.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Hoglund, P. J., Schiöth, H. B. (2002). "Novel human G protein-coupled receptors with long N-terminals containing GPS domains and Ser/Thr-rich regions." *FEBS Lett*, 531(3), 407-14.
- Fu, H., Subramanian, R.R., Masters, S.C. (2000). "14-3-3 proteins: structure, function, and regulation." *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40, 617-47.
- Fukumoto, A., Tomoda, K., Kubota, M., Kato, J. Y., Yoneda-Kato, N. (2005). "Small Jab1-containing subcomplex is regulated in an anchorage- and cell cycle-dependent manner, which is abrogated by ras transformation." *FEBS Lett*, 579(5), 1047-54.
- Ganz, T. (2003). "Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity." *Nat Rev Immunol*, 3(9), 710-20.
- Gebhardt, K., Ellerbrock, K., Pera, I., Ivell, R., Kirchhoff, C. (1999). "Differential expression of novel abundant and highly regionalized mRNAs of the canine epididymis." *J Reprod Fertil*, 116(2), 391-402.
- Gelber, E. I., Kroeze, W. K., Willins, D. L., Gray, J. A., Sinar, C. A., Hyde, E. G., Gurevich, V., Benovic, J., Roth, B. L. (1999). "Structure and function of the third intracellular loop of the 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor: the third intracellular loop is alpha-helical and binds purified arrestins." *J Neurochem*, 72(5), 2206-14.
- Gertler, F. B., Niebuhr, K., Reinhard, M., Wehland, J., Soriano, P. (1996). "Mena, a relative of VASP and *Drosophila* Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics." *Cell*, 87(2), 227-39.
- Gietz, R. D. & Woods, R. A. (2002). "Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method." *Methods Enzymol*, 350, 87-96.

- Goldschmidt-Clermont, P. J., Kim, J. W., Machesky, L. M., Rhee, S. G., Pollard, T. D. (1991). "Regulation of phospholipase C-gamma 1 by profilin and tyrosine phosphorylation." *Science*, 251(4998), 1231-3.
- Gottwald, U., Davies, B., Fritsch, M., Habenicht, U. F. (2006). "New approaches for male fertility control: HE6 as an example of a putative target." *Mol Cell Endocrinol*, 250(1-2), 49-57.
- Grima, J., Zwain, I., Lockshin, R. A., Bardin, C. W., Cheng, C. Y. (1990). "Diverse secretory patterns of clusterin by epididymis and prostatic/seminal vesicles undergoing cell regression after orchiectomy." *Endocrinology*, 126(6), 2989-97.
- Gronborg, M., Kristiansen, T. Z., Iwahori, A., Chang, R., Reddy, R., Sato, N., Molina, H., Jensen, O. N., Hruban, R. H., Goggins, M. G., Maitra, A., Pandey, A. (2006). "Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach." *Mol Cell Proteomics*, 5(1), 157-71.
- Guan, X., Inai, T., Shibata, Y. (2005). "Segment-specific expression of tight junction proteins, claudin-2 and -10, in the rat epididymal epithelium." *Arch Histol Cytol*, 68(3), 213-25.
- Guarente, L. (1983). "Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast." *Methods Enzymol*, 101, 181-91.
- Gumbiner, B. M. (1993). "Breaking through the tight junction barrier." *J Cell Biol*, 123(6 Pt 2), 1631-3.
- Gumienny, T. L., Brugnara, E., Tosello-Tramont, A. C., Kinchen, J. M., Haney, L. B., Nishiwaki, K., Walk, S. F., Nemergut, M. E., Macara, I. G., Francis, R., Schedl, T., Qin, Y., Van Aelst, L., Hengartner, M. O., Ravichandran, K. S. (2001). "CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration." *Cell*, 107(1), 27-41.
- Gurevich, V. V. & Benovic, J. L. (1993). "Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin." *J Biol Chem*, 268(16), 11628-38.
- Guththrie, C. & Fink, G. R. (1991). *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego.
- Haarer, B. K., Petzold, A. S., Brown, S. S. (1993). "Mutational analysis of yeast profilin." *Mol Cell Biol*, 13(12), 7864-73.
- Haffner, C., Jarchau, T., Reinhard, M., Hoppe, J., Lohmann, S. M., Walter, U. (1995). "Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP." *Embo J*, 14(1), 19-27.
- Haft, C. R., de la Luz Sierra, M., Barr, V. A., Haft, D. H., Taylor, S. I. (1998). "Identification of a family of sorting nexin molecules and characterization of their association with receptors." *Mol Cell Biol*, 18(12), 7278-87.
- Hall, R. A. & Lefkowitz, R. J. (2002). "Regulation of G protein-coupled receptor signaling by scaffold proteins." *Circ Res*, 91(8), 672-80.
- Hamann, J., Vogel, B., van Schijndel, G. M., van Lier, R. A. (1996). "The seven-span transmembrane receptor CD97 has a cellular ligand (CD55, DAF)." *J Exp Med*, 184(3), 1185-9.
- Hammerstedt, R. H., Cramer, P. G., Barbato, G. F., Amann, R. P., O'Brien, J. S., Griswold, M. D. (2001). "A fragment of prosaposin (SGP-1) from rooster sperm promotes sperm-egg binding and improves fertility in chickens." *J Androl*, 22(3), 361-75.
- Hansen, L. A., Clulow, J., Jones, R. C. (1999). "The role of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange in fluid and solute transport in the rat efferent ducts." *Exp Physiol*, 84(3), 521-7.
- Harlowe, E., & Lane, D. (1988). "Antibodies, a laboratory manual." *Cold Spring Harbor Laboratory*, 471-510.
- Harmar, A. J. (2001). "Family-B G-protein-coupled receptors." *Genome Biology*, 2(12).
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S. J. (1993). "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases." *Cell*, 75(4), 805-16.
- Haugland, R. P. (1996). *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*, Molecular Probes, Inc., Eugene.
- Haugwitz, M., Noegel, A. A., Rieger, D., Lottspeich, F., Schleicher, M. (1991). "Dictyostelium discoideum contains two profilin isoforms that differ in structure and function." *J Cell Sci*, 100 ( Pt 3), 481-9.
- Hayashi, M., Fujimoto, S., Takano, H., Ushiki, T., Abe, K., Ishikura, H., Yoshida, M. C., Kirchhoff, C., Ishibashi, T., Kasahara, M. (1996). "Characterization of a human glycoprotein with a potential role in sperm-egg fusion: cDNA cloning, immunohistochemical localization, and chromosomal assignment of the gene (AEG1)." *Genomics*, 32(3), 367-74.
- Heid, H., Figge, U., Winter, S., Kuhn, C., Zimbelmann, R., Franke, W. (2002). "Novel actin-related proteins Arp-T1 and Arp-T2 as components of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head." *Exp Cell Res*, 279(2), 177-87.
- Heller, C. G. & Clermont, Y. (1963). "Spermatogenesis in man: an estimate of its duration." *Science*, 140, 184-6.
- Hermo, L., Xiaohong, S., Morales, C. R. (2000). "Circulating and luminal testicular factors affect LRP-2 and Apo J expression in the epididymis following efferent duct ligation." *J Androl*, 21(1), 122-44.
- Hess, R. A. (2000). "Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract." *Rev Reprod*, 5(2), 84-92.
- Hess, R. A. (2003). "Estrogen in the adult male reproductive tract: a review." *Reprod Biol Endocrinol*, 1, 52.
- Hess, R. A., Bunick, D., Lee, K. H., Bahr, J., Taylor, J. A., Korach, K. S., Lubahn, D. B. (1997). "A role for oestrogens in the male reproductive system." *Nature*, 390(6659), 509-12.
- Heydecke, D., Meyer, D., Ackermann, F., Wilhelm, B., Gudermann, T., Boekhoff, I. (2006). "The multi PDZ domain protein MUPP1 as putative scaffolding protein for organizing signaling complexes in the acrosome of mammalian spermatozoa." *J Androl*, 27(3), 390-404.
- Higgs, H. N. (2005). "Formin proteins: a domain-based approach." *Trends Biochem Sci*, 30(6), 342-53.
- Hinton, B. T., Lan, Z. J., Rudolph, D. B., Labus, J. C., Lye, R. J. (1998). "Testicular regulation of epididymal gene expression." *J Reprod Fertil Suppl*, 53, 47-57.
- Hirbec, H., Perestenko, O., Nishimune, A., Meyer, G., Nakanishi, S., Henley, J. M., Dev, K. K. (2002). "The PDZ proteins PICK1, GRIP, and syntenin bind multiple glutamate receptor subtypes. Analysis of PDZ binding motifs." *J Biol Chem*, 277(18), 15221-4.
- Hirokawa, N., Tilney, L. G., Fujiwara, K., Heuser, J. E. (1982). "Organization of actin, myosin, and intermediate filaments in the brush border of intestinal epithelial cells." *J Cell Biol*, 94(2), 425-43.
- Hofer, D. & Drenckhahn, D. (1996). "Cytoskeletal differences between stereocilia of the human sperm passageway and microvilli/stereocilia in other locations." *Anat Rec*, 245(1), 57-64.
- Hoffman, W. L. & Jump, A. (1986). "Tween 20 removes antibodies and other proteins from nitrocellulose." *J Immunol Methods*, 94(1-2), 191-6.
- Hoffman, W. L., Jump, A. A., Kelly, P. J., Ruggles, A. O. (1991). "Binding of antibodies and other proteins to nitrocellulose in acidic, basic, and chaotropic buffers." *Anal Biochem*, 198(1), 112-8.
- Holstein, A. F. (1969). "Morphologische Studien am Nebenhoden des Menschen." *Abhandlungen aus dem Gebiet der normalen und pathologischen Anatomie*, W. D. Bargmann, W., ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Holt, M. R. & Koffer, A. (2001). "Cell motility: proline-rich proteins promote protrusions." *Trends Cell Biol*, 11(1), 38-46.
- Honore, B., Madsen, P., Andersen, A. H., Leffers, H. (1993). "Cloning and expression of a novel human profilin variant, profilin II." *FEBS Lett*, 330(2), 151-5.
- Hu, E., Chen, Z., Fredrickson, T., Zhu, Y. (2001). "Molecular cloning and characterization of profilin-3: a novel cytoskeleton-associated gene expressed in rat kidney and testes." *Exp Nephrol*, 9(4), 265-74.
- Humphreys, D. T., Carver, J. A., Easterbrook-Smith, S. B., Wilson, M. R. (1999). "Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins." *J Biol Chem*, 274(11), 6875-81.
- Hurst, S., Howes, E. A., Coadwell, J., Jones, R. (1998). "Expression of a testis-specific putative actin-capping protein associated with the developing acrosome during rat spermiogenesis." *Mol Reprod Dev*, 49(1), 81-91.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A. (1983). "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations." *J Bacteriol*, 153(1), 163-8.
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P., Fields, S. (1993). "Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization." *Oncogene*, 8(6), 1693-6.
- Jenne, D. E. & Tschopp, J. (1989). "Molecular structure and functional characterization of a human complement cytotoxicity inhibitor found in blood and seminal plasma: identity to sulfated glycoprotein, a constituent of rat testis fluid." *Proc Natl Acad Sci*, 86(18), 7123-7.
- Jervis, K. M. & Robaire, B. (2001). "Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis." *Biol Reprod*, 65(3), 696-703.

- Johnsen, S. G. (1970). "Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males." *Hormones*, 1(1), 2-25.
- Jones, R. (1989). "Membrane remodelling during sperm maturation in the epididymis." *Oxf Rev Reprod Biol*, 11, 285-337.
- Jones, S. E. & Jomary, C. (2002). "Clusterin." *Int J Biochem Cell Biol*, 34(5), 427-31.
- Kabsch, W., Mannherz, HG, Suck, D., Pai, E, Holmes, KC (1990). "Atomic structure of the actin:DNase I complex." *Nature*, 347(6288), 37-44
- Kaiser, D. A., Goldschmidt-Clermont, P. J., Levine, B. A., Pollard, T. D. (1989). "Characterization of renatured profilin purified by urea elution from poly-L-proline agarose columns." *Cell Motil Cytoskeleton*, 14(2), 251-62.
- Kaiser, D. A., Sato, M., Ebert, R. F., Pollard, T. D. (1986). "Purification and characterization of two isoforms of *Acanthamoeba* profilin." *J Cell Biol*, 102(1), 221-6.
- Kang, F., Laine, R. O., Bubb, M. R., Southwick, F. S., Purich, D. L. (1997). "Profilin interacts with the Gly-Pro-Pro-Pro-Pro sequences of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP): implications for actin-based *Listeria* motility." *Biochemistry*, 36(27), 8384-92.
- Karakozova, M., Kozak, M., Wong, C. C., Bailey, A. O., Yates, J. R., 3rd, Mogilner, A., Zebroski, H., Kashina, A. (2006). "Arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton and cell motility." *Science*, 313(5784), 192-6.
- Kato, A., Nagata, Y., Todokoro, K. (2004). "Delta-tubulin is a component of intercellular bridges and both the early and mature perinuclear rings during spermatogenesis." *Dev Biol*, 269(1), 196-205.
- Katoh, M. & Katoh, M. (2004). "Identification and characterization of human DIAPH3 gene in silico." *Int J Mol Med*, 13(3), 473-8.
- Kierszenbaum, A. L. (2002). "Sperm axoneme: a tale of tubulin posttranslation diversity." *Mol Reprod Dev*, 62(1), 1-3.
- Kierszenbaum, A. L. (2003). "Epididymal G protein-coupled receptor (GPCR): two hats and a two-piece suit tailored at the GPS motif." *Mol Reprod Dev*, 64(1), 1-3.
- Kierszenbaum, A. L., Rivkin, E., Tres, L. L. (2003). "Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head." *Mol Biol Cell*, 14(11), 4628-40.
- Kierszenbaum, A. L. & Tres, L. L. (2004). "The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head." *Arch Histol Cytol*, 67(4), 271-84.
- Killian, D. J. & Hubbard, E. J. (2004). "C. elegans pro-1 activity is required for soma/germline interactions that influence proliferation and differentiation in the germ line." *Development*, 131(6), 1267-78.
- Kim, T., Oh, J., Woo, J. M., Choi, E., Im, S. H., Yoo, Y. J., Kim, D. H., Nishimura, H., Cho, C. (2006). "Expression and relationship of male reproductive ADAMs in mouse." *Biol Reprod*, 74(4), 744-50.
- Kimura, T., Ito, C., Watanabe, S., Takahashi, T., Ikawa, M., Yomogida, K., Fujita, Y., Ikeuchi, M., Okuyama, A., Okabe, M., Toshimori, K., Nakano, T. (2003). "Mouse germ cell-less as an essential component for nuclear integrity." *Mol Cell Biol*, 23(4), 1304-15.
- Kimura, T., Yomogida, K., Iwai, N., Kato, Y., Nakano, T. (1999). "Molecular cloning and genomic organization of mouse homologue of *Drosophila* germ cell-less and its expression in germ lineage cells." *Biochem Biophys Res Commun*, 262(1), 223-30.
- Kipersztok, S., Osawa, G. A., Liang, L. F., Modi, W. S., Dean, J. (1995). "POM-ZP3, a bipartite transcript derived from human ZP3 and a POM121 homologue." *Genomics*, 25(2), 354-9.
- Kirchhoff, C. (2002). "Specific gene expression in the human and non-human primate epididymis." The Epididymis: From molecules to clinical practice, B. Robaire and B. T. Hinton, eds., Kluwer Academic and Plenum Publishers, New York, NY.
- Kirchhoff, C. (2002b). "The dog as a model to study human epididymal function at a molecular level." *Mol Hum Reprod*, 8(8), 695-701.
- Kirchhoff, C., Habben, I., Ivell, R., Krull, N. (1991). "A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors." *Biol Reprod*, 45(2), 350-7.
- Kirchhoff, C., Krull, N., Pera, I., Ivell, R. (1993). "A major mRNA of the human epididymal principal cells, HE5, encodes the leucocyte differentiation CDw52 antigen peptide backbone." *Mol Reprod Dev*, 34(1), 8-15.
- Kirchhoff, C., Obermann, H., Behnen, M., Davies, B. (2006). "Role of epididymal receptor HE6 in the regulation of sperm microenvironment." *Mol Cell Endocrinol*, 250(1-2), 43-8.
- Kirchhoff, C., Osterhoff, C., Habben, I., Ivell, R. (1990). "Cloning and analysis of mRNAs expressed specifically in the human epididymis." *Int J Androl*, 13(2), 155-67.
- Kirchhoff, C., Pera, I., Rust, W., Ivell, R. (1994). "Major human epididymis-specific gene product, HE3, is the first representative of a novel gene family." *Mol Reprod Dev*, 37(2), 130-7.
- Kleiman, S. E., Yogev, L., Gal-Yam, E. N., Hauser, R., Gamzu, R., Botchan, A., Paz, G., Yavetz, H., Maymon, B. B., Schreiber, L., Barzilai, S., Amarioglio, N., Rechavi, G., Simon, A. J. (2003). "Reduced human germ cell-less (HGCL) expression in azoospermic men with severe germinal cell impairment." *J Androl*, 24(5), 670-5.
- Kobilka, B. (1992). "Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors." *Annu Rev Neurosci*, 15, 87-114.
- Kovar, D. R., Kuhn, J. R., Tichy, A. L., Pollard, T. D. (2003). "The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin." *J Cell Biol*, 161(5), 875-87.
- Kreienkamp, H. J. (2002). "Organisation of G-protein-coupled receptor signalling complexes by scaffolding proteins." *Curr Opin Pharmacol*, 2(5), 581-6.
- Kreienkamp, H. J., Zitzer, H., Richter, D. (2000). "Identification of proteins interacting with the rat somatostatin receptor subtype 2." *J Physiol Paris*, 94(3-4), 193-8.
- Kurzbaue, R., Teis, D., de Araujo, M. E., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, F., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Hekman, M., Rapp, U. R., Huber, L. A., Clausen, T. (2004). "Crystal structure of the p14/MP1 scaffolding complex: how a twin couple attaches mitogen-activated protein kinase signaling to late endosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(30), 10984-9.
- Kwiatkowski, D. J. & Bruns, G. A. (1988). "Human profilin. Molecular cloning, sequence comparison, and chromosomal analysis." *J Biol Chem*, 263(12), 5910-5.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." *J Biochem Biophys Methods*, 10(3-4), 203-9.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature*, 227(5259), 680-5.
- Lambrechts, A., Braun, A., Jonckheere, V., Aszodi, A., Lanier, L. M., Robbins, J., Van Colen, I., Vandekerckhove, J., Fassler, R., Ampe, C. (2000). "Profilin II is alternatively spliced, resulting in profilin isoforms that are differentially expressed and have distinct biochemical properties." *Mol Cell Biol*, 20(21), 8209-19.
- Lambrechts, A., Jonckheere, V., Dewitte, D., Vandekerckhove, J., Ampe, C. (2002). "Mutational analysis of human profilin I reveals a second PI(4,5)-P2 binding site neighbouring the poly(L-proline) binding site." *BMC Biochem*, 3, 12.
- Lambrechts, A., van Damme, J., Goethals, M., Vandekerckhove, J., Ampe, C. (1995). "Purification and characterization of bovine profilin II. Actin, poly(L-proline) and inositolphospholipid binding." *Eur J Biochem*, 230(1), 281-6.
- Lambrechts, A., Verschelde, J. L., Jonckheere, V., Goethals, M., Vandekerckhove, J., Ampe, C. (1997). "The mammalian profilin isoforms display complementary affinities for PIP2 and proline-rich sequences." *Embo J*, 16(3), 484-94.
- Laroche, G., Rochdi, M. D., Laporte, S. A., Parent, J. L. (2005). "Involvement of actin in agonist-induced endocytosis of the G protein-coupled receptor for thromboxane A2: overcoming of actin disruption by arrestin-3 but not arrestin-2." *J Biol Chem*, 280(24), 23215-24.
- Larsson, M., Norrander, J., Graslund, S., Brundell, E., Linck, R., Stahl, S., Hoog, C. (2000). "The spatial and temporal expression of Tek11, a mouse tektin C homologue, during spermatogenesis suggest that it is involved in the development of the sperm tail basal body and axoneme." *Eur J Cell Biol*, 79(10), 718-25.
- Lassing, I. & Lindberg, U. (1985). "Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin." *Nature*, 314(6010), 472-4.

- Leatherman, J. L., Kaestner, K. H., Jongens, T. A. (2000). "Identification of a mouse germ cell-less homologue with conserved activity in *Drosophila*." *Mech Dev*, 92(2), 145-53.
- Leblond, CP, Clermont, Y (1952). "Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in rat." *AnnNYAcad Sci*, 55(4), 548-73
- Leblond, C. P. & Clermont, Y. (1952). "Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique." *Am J Anat*, 90(2), 167-215.
- Lecuyer, C., Dacheux, J. L., Hermand, E., Mazeman, E., Rousseaux, J., Rousseaux-Prevost, R. (2000). "Actin-binding properties and colocalization with actin during spermiogenesis of mammalian sperm calicin." *Biol Reprod*, 63(6), 1801-10.
- Leger, J. G., Montpetit, M. L., Tenniswood, M. P. (1987). "Characterization and cloning of androgen-repressed mRNAs from rat ventral prostate." *Biochem Biophys Res Commun*, 147(1), 196-203.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. (1988). "Prinzipien der Biochemie." 2. Auflage.
- Lelianova, V. G., Davletov, B. A., Sterling, A., Rahman, M. A., Grishin, E. V., Totty, N. F., Ushkaryov, Y. A. (1997). "Alpha-latrotoxin receptor, latrophilin, is a novel member of the secretin family of G protein-coupled receptors." *J Biol Chem*, 272(34), 21504-8.
- Lemmon, M. A. & Ferguson, K. M. (1998). "Pleckstrin homology domains." *Curr Top Microbiol Immunol*, 228, 39-74.
- Li, B., and Fields, S. (1993). "Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system." *Faseb J*, 7(10), 957-63.
- Li, M., Bermak, J. C., Wang, Z. W., Zhou, Q. Y. (2000). "Modulation of dopamine D(2) receptor signaling by actin-binding protein (ABP-280)." *Mol Pharmacol*, 57(3), 446-52.
- Lin, M, Hess, R, Aitken, RJ (2002). "Induction of sperm maturation invitro in epididymal cell cultures of the tammar wallaby: disruption of motility initiation and sperm morphogenesis by inhibition of actin polymerization." *Reproduction*, 124(1),107-17.
- Lindberg, U., Schutt, C. E., Hellsten, E., Tjader, A. C., Hult, T. (1988). "The use of poly(L-proline)-Sepharose in the isolation of profilin and profilactin complexes." *Biochim Biophys Acta*, 967(3), 391-400.
- Liu, D. Y., Martic, M., Clarke, G. N., Dunlop, M. E., Baker, H. W. (1999). "An important role of actin polymerization in the human zona pellucida-induced acrosome reaction." *Mol Hum Reprod*, 5(10), 941-9.
- Lo, S. H. (2004). "Tensin." *Int J Biochem Cell Biol*, 36(1), 31-4.
- Lo, S. H., Janmey, P. A., Hartwig, J. H., Chen, L. B. (1994). "Interactions of tensin with actin and identification of its three distinct actin-binding domains." *J Cell Biol*, 125(5), 1067-75.
- Loeffler, I. K. & Peterson, R. E. (1999). "Interactive effects of TCDD and p,p'-DDE on male reproductive tract development in utero and lactationally exposed rats." *Toxicol Appl Pharmacol*, 154(1), 28-39.
- Lottspeich, F. & Zorbach, H. (1988). "Bioanalytik." *Spektrum Akademischer Verlag*.
- Lu, J., and Pollard, T. D. (2001). "Profilin binding to poly-L-proline and actin monomers along with ability to catalyze actin nucleotide exchange is required for viability of fission yeast." *Mol Biol Cell*, 12(4), 1161-75.
- Luedtke, C.C., McKee, MD., Cyr, DG., Gregory, M., Kaartinen, MT., Mui, J., Hermo, L. (2002). "Osteopontin expression and regulation in the testis, efferent ducts, and epididymis of rats during postnatal development through to adulthood." *Biol Reprod*, 66(5), 1437-48.
- Ma, J. & Ptashne, M. (1988). "Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator." *Cell*, 55(3), 443-6.
- Machesky, L. M., Goldschmidt-Clermont, P. J., Pollard, T. D. (1990). "The affinities of human platelet and *Acanthamoeba* profilin isoforms for polyphosphoinositides account for their relative abilities to inhibit phospholipase C." *Cell Regul*, 1(12), 937-50.
- MacKinnon, E. A., Abraham, P. J., Svatek, A. (1973). "Long link induction between the microtubules of the manchette in intermediate stages of spermiogenesis." *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 136(4), 447-60.
- Madara, J. L. (1987). "Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to cytoskeleton." *Am J Physiol*, 253(1 Pt 1), C171-5.
- Madara, JL., Barenberg, D., Carlson, S. (1986). "Effects of cytochalasin D on occluding junctions of intestinal absorptive cells: evidence that the cytoskeleton may influence paracellular permeability and junctional charge selectivity." *JCell Biol*, 102(6), 2125-36
- Mahoney, N. M., Janmey, P. A., Almo, S. C. (1997). "Structure of the profilin-poly-L-proline complex involved in morphogenesis and cytoskeletal regulation." *Nat Struct Biol*, 4(11), 953-60.
- Man, S. Y., Clulow, J., Jones, R. C. (2003). "Signal transduction in the ductuli efferentes testis of the rat: inhibition of fluid reabsorption by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate." *Biol Reprod*, 69(5), 1714-8.
- Metzler, W. J., Bell, A. J., Ernst, E., Lavoie, T. B., Mueller, L. (1994). "Identification of the poly-L-proline-binding site on human profilin." *J Biol Chem*, 269(6), 4620-5.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Modregger, J., Schmidt, AA., Ritter, B., Huttner, WB., Plomann, M. (2003). "Characterization of Endophilin B1b, a brain-specific membrane-associated lysophosphatidic acid acyl transferase with properties distinct from endophilin A1." *J Biol Chem*, 278(6), 4160-7.
- Morales, C. R., Zhao, Q., El-Alfy, M., Suzuki, K. (2000a). "Targeted disruption of the mouse prosaposin gene affects the development of the prostate gland and other male reproductive organs." *J Androl*, 21(6), 765-75.
- Morales, C. R., Zhao, Q., Lefrancois, S., Ham, D. (2000b). "Role of prosaposin in the male reproductive system: effect of prosaposin inactivation on the testis, epididymis, prostate, and seminal vesicles." *Arch Androl*, 44(3), 173-86.
- Morales, F. C., Takahashi, Y., Kreimann, E. L., Georgescu, M. M. (2004). "Ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding phosphoprotein 50 organizes ERM proteins at the apical membrane of polarized epithelia." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(51), 17705-10.
- Moreno, R. D., and Alvarado, CP. (2006). "The mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence." *Mol Reprod Dev*, 73(11), 1430-4.
- Moreno, R. D., Ramalho-Santos, J., Sutovsky, P., Chan, E. K., Schatten, G. (2000). "Vesicular traffic and golgi apparatus dynamics during mammalian spermatogenesis: implications for acrosome architecture." *Biol Reprod*, 63(1), 89-98.
- Moreno, R. D. & Schatten, G. (2000). "Microtubule configurations and post-translational alpha-tubulin modifications during mammalian spermatogenesis." *Cell Motil Cytoskeleton*, 46(4), 235-46.
- Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S. (1999). "Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(2), 511-6.
- Mosavi, L. K., Cammett, T. J., Desrosiers, D. C., Peng, Z. Y. (2004). "The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition." *Protein Sci*, 13(6), 1435-48.
- Müller, S. L., Portwich, M., Schmidt, A., Utepergenov, D. I., Huber, O., Blasig, I. E., Krause, G. (2005). "The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha-catenin share a common interaction mechanism with ZO-1." *J Biol Chem*, 280(5), 3747-56.
- Mullins, R. D., Heuser, J. A., Pollard, T. D. (1998). "The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11), 6181-6.
- Mullis, KB & Faloona, F (1987). "Specific synthesis of DNA invitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol*, 155,335-50
- Murdock, D. G., Boone, B. E., Esposito, L. A., Wallace, D. C. (1999). "Up-regulation of nuclear and mitochondrial genes in the skeletal muscle of mice lacking the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator." *J Biol Chem*, 274(20), 14429-33.
- Niebuhr, K., Ebel, F., Frank, R., Reinhard, M., Domann, E., Carl, U. D., Walter, U., Gertler, F. B., Wehland, J., Chakraborty, T. (1997). "A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family." *Embo J*, 16(17), 5433-44.
- Nieschlag, E. & Behre, H. M. (2000). *Andrologie - Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Springer.
- Niethammer, M., Valtchanoff, J. G., Kapoor, T. M., Allison, D. W., Weinberg, R. J., Craig, A. M., Sheng, M. (1998). "CRIPT, a novel postsynaptic protein that binds to the third PDZ domain of PSD-95/SAP90." *Neuron*, 20(4), 693-707.

- Nishitani, H., Hirose, E., Uchimura, Y., Nakamura, M., Umeda, M., Nishii, K., Mori, N., Nishimoto, T. (2001). "Full-sized RanBPM cDNA encodes a protein possessing a long stretch of proline and glutamine within the N-terminal region, comprising a large protein complex." *Gene*, 272(1-2), 25-33.
- Nissom, P.M., Sanny, A., Kok, Y.J., Hiang, Y.T., Chuah, S.H., Shing, T.K., Lee, Y.Y., Wong, K.T., Hu, W.S., Sim, M.Y., Philp, R. (2006). "Transcriptome and proteome profiling to understanding the biology of high productivity CHO cells." *Mol Biotechnol*, 34(2), 125-40.
- Nodelman, I. M., Bowman, G. D., Lindberg, U., Schutt, C. E. (1999). "X-ray structure determination of human profilin II: A comparative structural analysis of human profilins." *J Mol Biol*, 294(5), 1271-85.
- Obermann, H., A. Samalecos, C. Osterhoff, B. Schroder, R. Heller, and C. Kirchhoff. "He6, a Two-Subunit Heptahelical Receptor Associated with Apical Membranes of Efferent and Epididymal Duct Epithelia." *Mol Reprod Dev* 64, no. 1 (2003): 13-26.
- Obermann, H., Raabe, I., Balvers, M., Brunswig, B., Schulze, W., Kirchhoff, C. (2005). "Novel testis-expressed profilin IV associated with acrosome biogenesis and spermatid elongation." *Mol Hum Reprod*, 11(1), 53-64.
- O'Brien, J.S., Kishimoto, Y. (1991). "Saposin proteins: structure, function, and role in human lysosomal storage disorders." *Faseb J*, 5(3), 301-8.
- Oda, K., Shiratsuchi, T., Nishimori, H., Inazawa, J., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Nakamura, Y., Tokino, T. (1999). "Identification of BAIAP2 (BAI-associated protein 2), a novel human homologue of hamster IRSp53, whose SH3 domain interacts with the cytoplasmic domain of BAI1." *Cytogenet Cell Genet*, 84(1-2), 75-82.
- Oh, J., Woo, J. M., Choi, E., Kim, T., Cho, B. N., Park, Z. Y., Kim, Y. C., Kim, D. H., Cho, C. (2005). "Molecular, biochemical, and cellular characterization of epididymal ADAMs, ADAM7 and ADAM28." *Biochem Biophys Res Commun*, 331(4), 1374-83.
- Oko, R. (1988). "Comparative analysis of proteins from the fibrous sheath and outer dense fiber of rat spermatozoa." *Biol Reprod*, 39(1), 169-82.
- Oohashi, T., Zhou, X., Feng, K., Richter, B., Morgelin, M., Perez, M., Su, W.D., Chiquet-Ehrismann, R., Rauch, U., Fassler, R. (1999). "Mouse ten-m/odc is a new family of dimeric type II transmembrane proteins expressed in many tissues." *J Cell Biol*, 145(3), 563-77.
- Orgebin-Crist, M. C. & Jahad, N. (1979). "The maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture: stimulation by epididymal cytoplasmic extracts." *Biol Reprod*, 21(2), 511-5.
- Osterhoff, C., Ivell, R., Kirchhoff, C. (1997). "Cloning of a human epididymis-specific mRNA, HE6, encoding a novel member of the seven transmembrane-domain receptor superfamily." *DNA Cell Biol*, 16(4), 379-89.
- Osterhoff, C., Kirchhoff, C., Krull, N., Ivell, R. (1994). "Molecular cloning and characterization of a novel human sperm antigen (HE2) specifically expressed in the proximal epididymis." *Biol Reprod*, 50(3), 516-25.
- Otterbein, L.R., Graceffa, P., Dominguez, R. (2001). "The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state." *Science*, 293(5530), 708-11.
- Pantaloni, D., Carlier, M. F. (1993). "How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4." *Cell*, 75(5), 1007-14.
- Passafaro, M., Sala, C., Niethammer, M., Sheng, M. (1999). "Microtubule binding by CRIPT and its potential role in the synaptic clustering of PSD-95." *Nat Neurosci*, 2(12), 1063-9.
- Pelletier, R.M., Byers, S.W. (1992). "The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations." *Microsc Res Tech*, 20(1), 3-33.
- Pestonjasp, K. N., Pope, R. K., Wulfschlegel, J. D., Luna, E. J. (1997). "Supravillin (p205): A novel membrane-associated, F-actin-binding protein in the villin/gelsolin superfamily." *J Cell Biol*, 139(5), 1255-69.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., Dempfle, L. (2002). "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." *Nucleic Acids Res*, 30(9), e36.
- Polet, D., Lambrechts, A., Vandepoel, K., Vandekerckhove, J., Ampe, C. (2007). "On the origin and evolution of vertebrate and viral profilins." *FEBS Lett*, 581(2), 211-7.
- Pollard, T. D., Blanchoin, L., Mullins, R. D. (2000). "Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells." *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29, 545-76.
- Pollard, T. D. & Borisy, G. G. (2003). "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments." *Cell*, 112(4), 453-65.
- Pollard, T. D. & Cooper, J. A. (1984). "Quantitative analysis of the effect of Acanthamoeba profilin on actin filament nucleation and elongation." *Biochemistry*, 23(26), 6631-41.
- Pope, R. K., Pestonjasp, K. N., Smith, K. P., Wulfschlegel, J. D., Strassel, C. P., Lawrence, J. B., Luna, E. J. (1998). "Cloning, characterization, and chromosomal localization of human superillin (SVIL)." *Genomics*, 52(3), 342-51.
- Prezeau, L., Richman, J. G., Edwards, S. W., Limbird, L. E. (1999). "The zeta isoform of 14-3-3 proteins interacts with the third intracellular loop of different alpha2-adrenergic receptor subtypes." *J Biol Chem*, 274(19), 13462-9.
- Pring, M., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C., Zimond, S. H. (2003). "Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments." *Biochemistry*, 42(2), 486-96.
- Pring, M., Weber, A., Bubb, M. (1992). "Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at barbed end." *Biochemistry*, 31(6), 1827-36.
- Pusch, W., Balvers, M., Weinbauer, G. F., Ivell, R. (2000). "The rat endozepine-like peptide gene is highly expressed in late haploid stages of male germ cell development." *Biol Reprod*, 63(3), 763-8.
- Qian, C., Zhang, Q., Wang, X., Zeng, L., Farooq, A., Zhou, M. M. (2005). "Structure of the adaptor protein p14 reveals a profilin-like fold with distinct function." *J Mol Biol*, 347(2), 309-21.
- Raghuathan, V., Mowery, P., Rozycki, M., Lindberg, U., Schutt, C. (1992). "Structural changes in profilin accompany its binding to phosphatidylinositol, 4,5-bisphosphate." *FEBS Lett*, 297(1-2), 46-50.
- Reczek, D., Beryman, M., Bretscher, A. (1997). "Identification of EBFP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family." *J Cell Biol*, 139(1), 169-79.
- Reichstein, E. & Korn, E. D. (1979). "Acanthamoeba profilin. A protein of low molecular weight from Acanthamoeba castellanii that inhibits actin nucleation." *J Biol Chem*, 254(13), 6174-9.
- Reinhard, M., Giehl, K., Abel, K., Haffner, C., Jarchau, T., Hoppe, V., Jockusch, B. M., Walter, U. (1995). "The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins." *Embo J*, 14(8), 1583-9.
- Ringstad, N., Nemoto, Y., De Camilli, P. (1997). "The SH3p4/SH3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(16), 8569-74.
- Robaire, B. & Hermo, L. (1988). "Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulations." *The Physiology of Reproduction*, Raven Press, New York, NY, 999-1080.
- Robaire, B. & Hinton, B. T. (2002). *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice: A Comprehensive Survey of the Efferent Ducts, the Epididymis and Vas Deferens*. Kluwer Academic and Plenum Publishers, New York, NY.
- Rose, A. B., & Broach, J. R. (1990). "Propagation and expression of cloned genes in yeast: 2-microns circle-based vectors." *Methods Enzymol*, 185, 234-79.
- Rothkegel, M., Mayboroda, O., Rohde, M., Wucherpfennig, C., Valenta, R., Jockusch, B. M. (1996). "Plant and animal profilins are functionally equivalent and stabilize microfilaments in living animal cells." *J Cell Sci*, 109 (Pt 1), 83-90.
- Rothstein, R. J. (1983). "One-step gene disruption in yeast." *Methods Enzymol*, 101, 202-11.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." *Methods Mol Biol*, 132, 365-86.
- Ruhnau, K., Gaertner, A., Wegner, A. (1989). "Kinetic evidence for insertion of actin monomers between the barbed ends of actin filaments and barbed end-bound insertin, a protein purified from smooth muscle." *J Mol Biol*, 210(1), 141-8.
- Russell, L. (1977). "Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis." *Am J Anat*, 148(3), 313-28.
- Russell, L. D. (1984). *Spermatiation - the sperm release process: ultrastructural observations and unresolved problems.*, Plenum Press NY.
- Russell, L. D., Lee, I. P., Ettl, R., Peterson, R. N. (1983). "Development of the acrosome and alignment, elongation and entrenchment of spermatids in procarbazine-treated rats." *Tissue Cell*, 15(4), 615-26.

- Sagot, I., Rodal, A. A., Moseley, J., Goode, B. L., Pellman, D. (2002). "An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin." *Nat Cell Biol*, 4(8), 626-31.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science*, 239(4839), 487-91.
- Salazar, R., Bell, S. E., Davis, G. E. (1999). "Coordinate induction of the actin cytoskeletal regulatory proteins gelsolin, vasodilator-stimulated phosphoprotein, and profilin during capillary morphogenesis in vitro." *Exp Cell Res*, 249(1), 22-32.
- Salinovich, O. & Montelaro, R. C. (1986). "Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." *Anal Biochem*, 156(2), 341-7.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual." *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2. Auflage.
- Saunders, C. & Limbird, L. E. (2000). "Microtubule-dependent regulation of alpha(2B) adrenergic receptors in polarized MDCKII cells requires the third intracellular loop but not G protein coupling." *Mol Pharmacol*, 57(1), 44-52.
- Saunders, P. T., Gaughan, J., Saxty, B. A., Kerr, L. E., Millar, M. R. (1996). "Expression of protamine P2 in the testis of the common marmoset and man visualized using non-radioactive in-situ hybridization." *Int J Androl*, 19(4), 212-9.
- Savarese, T. M. & Fraser, C. M. (1992). "In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors." *Biochem J*, 283 ( Pt 1), 1-19.
- Schild, D. (1996). "Laser scanning microscopy and calcium imaging." *Cell Calcium*, 19(4), 281-96.
- Schlüter, K., Jockusch, B.M., Rothkegel, M. (1997). "Profilins as regulators of actin dynamics." *Biochimica et Biophysica Acta*(1359), 97-109.
- Schrumpf, G. (2002). "Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor." 3. Auflage.
- Schulze, W. & Rehder, U. (1984). "Organization and morphogenesis of the human seminiferous epithelium." *Cell Tissue Res*, 237(3), 395-407.
- Schulze, W., Thoms, F., Knuth, U. A. (1999). "Testicular sperm extraction: comprehensive analysis with simultaneously performed histology in 1418 biopsies from 766 subfertile men." *Hum Reprod*, 14 Suppl 1, 82-96.
- Schuske, K. R., Richmond, J. E., Matthies, D. S., Davis, W. S., Runz, S., Rube, D. A., van der Blik, A. M., Jorgensen, E. M. (2003). "Endophilin is required for synaptic vesicle endocytosis by localizing synaptojanin." *Neuron*, 40(4), 749-62.
- Schutt, C. E., Myslik, J. C., Rozycki, M. D., Goonsekere, N. C., Lindberg, U. (1993). "The structure of crystalline profilin-beta-actin." *Nature*, 365(6449), 810-6.
- Selden, L. A., Kinoshian, H. J., Estes, J. E., Gershman, L. C. (1999). "Impact of profilin on actin-bound nucleotide exchange and actin polymerization dynamics." *Biochemistry*, 38(9), 2769-78.
- Serebriiskii, I., Estojak, J., Berman, M., Golemis, E. A. (2000). "Approaches to detecting false positives in yeast two-hybrid systems." *Biotechniques*, 28(2), 328-30, 332-6.
- Serebriiskii, I. G. & Golemis, E. A. (2000). "Uses of lacZ to study gene function: evaluation of beta-galactosidase assays employed in the yeast two-hybrid system." *Anal Biochem*, 285(1), 1-15.
- Serebriiskii, I. G. & Golemis, E. A. (2001). "Two-hybrid system and false positives. Approaches to detection and elimination." *Methods Mol Biol*, 177, 123-34.
- Sherman, F. (1998). *An introduction to the Genetics and Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae; modified from: Meyers, R.A. (1997), VCH Pub. pp. 302-325*
- Shiratsuchi, T., Futamura, M., Oda, K., Nishimori, H., Nakamura, Y., Tokino, T. (1998a). "Cloning and characterization of BAI-associated protein 1: a PDZ domain-containing protein that interacts with BAI1." *Biochem Biophys Res Commun*, 247(3), 597-604.
- Shiratsuchi, T., Oda, K., Nishimori, H., Suzuki, M., Takahashi, E., Tokino, T., Nakamura, Y. (1998b). "Cloning and characterization of BAP3 (BAI-associated protein3), a C2domain-containing protein that interacts with BAI1." *Biochem Biophys Res Commun*, 251(1), 158-65.
- Short, D. B., Trotter, K. W., Reczek, D., Kreda, S. M., Bretscher, A., Boucher, R. C., Stutts, M. J., Milgram, S. L. (1998). "An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton." *J Biol Chem*, 273(31), 19797-801.
- Sim, D.L., Yeo, W.M., Chow, V.T. (2002). "The novel human HUEL protein shares homology with the DNA-binding domain of the XPA DNA repair protein and displays nuclear translocation in a cell cycle-dependent manner." *Int Biochem Cell Biol*, 34(5), 487-504.
- Skalli, O., Ropraz, P., Trzeciak, A., Benzonana, G., Gillesen, D., Gabbiani, G. (1986). "A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation." *J Cell Biol*, 103(6 Pt 2), 2787-96.
- Smith, E. R., Cayrou, C., Huang, R., Lane, W. S., Cote, J., Lucchesi, J. C. (2005). "A human protein complex homologous to the Drosophila MSL complex is responsible for the majority of histone H4 acetylation at lysine 16." *Mol Cell Biol*, 25(21), 9175-88.
- Stacey, M., Lin, H. H., Gordon, S., McKnight, A. J. (2000). "LNB-TM7, a group of seven-transmembrane proteins related to family-B G-protein-coupled receptors." *Trends Biochem Sci*, 25(6), 284-9.
- Staiger, C. J., Goodbody, K. C., Hussey, P. J., Valenta, R., Drobak, B. K., Lloyd, C. W. (1993). "The profilin multigene family of maize: differential expression of three isoforms." *Plant J*, 4(4), 631-41.
- Staub, E., Mennerich, D., Rosenthal, A. (2002). "The Spin/Ssty repeat: a new motif identified in proteins involved in vertebrate development from gamete to embryo." *Genome Biol*, 3(1), RESEARCH0003.
- Steger, K. (1999). "Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids." *Anat Embryol (Berl)*, 199(6), 471-87.
- Strader, C. D., Fong, T. M., Tota, M. R., Underwood, D., Dixon, R. A. (1994). "Structure and function of G protein-coupled receptors." *Annu Rev Biochem*, 63, 101-32.
- Suh, P. G., Hwang, J. I., Ryu, S. H., Donowitz, M., Kim, J. H. (2001). "The roles of PDZ-containing proteins in PLC-beta-mediated signaling." *Biochem Biophys Res Commun*, 288(1), 1-7.
- Sylvester, S. R., Morales, C., Oko, R., Griswold, M. D. (1989). "Sulfated glycoprotein-1 (saposin precursor) in the reproductive tract of the male rat." *Biol Reprod*, 41(5), 941-8.
- Sylvester, S. R., Skinner, M. K., Griswold, M. D. (1984). "A sulfated glycoprotein synthesized by Sertoli cells and by epididymal cells is a component of the sperm membrane." *Biol Reprod*, 31(5), 1087-101.
- Szasz, F., Sirivaidyapong, S., Cheng, F. P., Voorhout, W. F., Marks, A., Colenbrander, B., Solti And, L., Gadella, B. M. (2000). "Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen." *Mol Reprod Dev*, 55(3), 289-98.
- Tachibana, M., Terada, Y., Murakawa, H., Murakami, T., Yaegashi, N., Okamura, K. (2005). "Dynamic changes in the cytoskeleton during human spermiogenesis." *Fertil Steril*, 84 Suppl 2, 1241-8.
- Tanaka, M. & Shibata, H. (1985). "Poly(L-proline)-binding proteins from chick embryos are a profilin and a profilactin." *Eur J Biochem*, 151(2), 291-7.
- Tanious, F. A., Veal, J. M., Buczak, H., Ratmeyer, L. S., Wilson, W. D. (1992). "DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites." *Biochemistry*, 31(12), 3103-12.
- Tazawa, H., Takahashi, S., Zilliacus, J. (2003). "Interaction of the parathyroid hormone receptor with the 14-3-3 protein." *Biochim Biophys Acta*, 1620(1-3), 32-8.
- Theodosiou, AM, Morrison, KE, Nesbit, A, Daniels, R, Campbell, L, Christodoulou, Z, Davies, KE. (1994). "Complex repetitive arrangements of gene sequence in the candidate region of the spinal muscular atrophy gene in 5q13." *Am J Hum Genet*, 55(6), 1209-17
- Thomas, W. D., Zhang, X. D., Franco, A. V., Nguyen, T., Hersey, P. (2000). "TNF-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of melanoma is associated with changes in mitochondrial membrane potential and perinuclear clustering of mitochondria." *J Immunol*, 165(10), 5612-20.
- Tilney, L. G., Bonder, E. M., Coluccio, L. M., Mooseker, M. S. (1983). "Actin from Thyone sperm assembles on only one end of an actin filament: a behavior regulated by profilin." *J Cell Biol*, 97(1), 112-24.

- Tobaben, S., Sudhof, T. C., Stahl, B. (2000). "The G protein-coupled receptor CLI interacts directly with proteins of the Shank family." *J Biol Chem*, 275(46), 36204-10.
- Tobacman, L. S. & Korn, E. D. (1982). "The regulation of actin polymerization and the inhibition of monomeric actin ATPase activity by *Acanthamoeba* profilin." *J Biol Chem*, 257(8), 4166-70.
- Tomoda, K., Yoneda-Kato, N., Fukumoto, A., Yamanaka, S., Kato, J. Y. (2004). "Multiple functions of Jab1 are required for early embryonic development and growth potential in mice." *J Biol Chem*, 279(41), 43013-8.
- Tourea, A., Grigoriev, V., Mahadevaiah, S. K., Rattigan, A., Ojarikre, O. A., Burgoyne, P. S. (2004). "A protein encoded by a member of the multicopy Ssty gene family located on the long arm of the mouse Y chromosome is expressed during sperm development." *Genomics*, 83(1), 140-7.
- Tourea, A., Sztot, M., Mahadevaiah, S. K., Rattigan, A., Ojarikre, O. A., Burgoyne, P. S. (2004b). "A new deletion of the mouse Y chromosome long arm associated with the loss of Ssty expression, abnormal sperm development and sterility." *Genetics*, 166(2), 901-12.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), 4350-4.
- Tulsiani, D. R., Abou-Haila, A., Loeser, C. R., Pereira, B. M. (1998). "The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization." *Exp Cell Res*, 240(2), 151-64.
- Turner, T. T. (1995). "On the epididymis and its role in the development of the fertile ejaculate." *J Androl*, 16(4), 292-8.
- Valenta, R., Duchene, M., Breitenbach, M., Pettenburger, K., Koller, L., Scheiner, O., Kraft, D. (1991). "A low molecular weight allergen of white birch (*Betula verrucosa*) is highly homologous to human profilin." *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 94(1-4), 368-70.
- Van Itallie, C. M. & Anderson, J. M. (2004). "The molecular physiology of tight junction pores." *Physiology (Bethesda)*, 19, 331-8.
- van Nocker, S. & Ludwig, P. (2003). "The WD-repeat protein superfamily in Arabidopsis: conservation and divergence in structure and function." *BMC Genomics*, 4(1), 50.
- Verheyen, E. M. & Cooley, L. (1994). "Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during *Drosophila* development." *Development*, 120(4), 717-28.
- Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979). "Preparative and analytical purification of DNA from agarose." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(2), 615-9.
- Vogl, A. W. (1989). "Distribution and function of organized concentrations of actin filaments in mammalian spermatogenic cells and Sertoli cells." *Int Rev Cytol*, 119, 1-56.
- Voglmayr, J. K., Scott, T. W., Setchell, B. P., Waites, G. M. (1967). "Metabolism of testicular spermatozoa and characteristics of testicular fluid collected from conscious rams." *J Reprod Fertil*, 14(1), 87-99.
- Voltz, J. W., Weinman, E. J., Shenolikar, S. (2001). "Expanding the role of NHERF, a PDZ-domain containing protein adapter, to growth regulation." *Oncogene*, 20(44), 6309-14.
- Volynski, K. E., Silva, J. P., Lelianova, V. G., Atiqur Rahman, M., Hopkins, C., Ushkaryov, Y. A. (2004). "Latrophilin fragments behave as independent proteins that associate and signal on binding of LTX(N4C)." *Embo J*, 23(22), 4423-33.
- Wade, S. M., Scribner, M. K., Dalman, H. M., Taylor, J. M., Neubig, R. R. (1996). "Structural requirements for G(o) activation by receptor-derived peptides: activation and modulation domains of the alpha 2-adrenergic receptor i3c region." *Mol Pharmacol*, 50(2), 351-8.
- Wallar, B. J., Alberts, A. S. (2003). "The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton." *Trends Cell Biol*, 13(8), 435-46.
- Wang, H., Bedford, F. K., Brandon, N. J., Moss, S. J., Olsen, R. W. (1999). "GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton." *Nature*, 397(6714), 69-72.
- Wassarman, P. M. (1999). "Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion." *Cell*, 96(2), 175-83.
- Wassarman, P. M., Jovine, L., Litscher, E. S. (2001). "A profile of fertilization in mammals." *Nat Cell Biol*, 3(2), E59-64.
- Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B. M., arumiya, S. (1997). "p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin." *Embo J*, 16(11), 3044-56.
- Weigt, C., Gaertner, A., Wegner, A., Korte, H., Meyer, HE (1992). "Occurrence of an actin-inserting domain in tensin." *J Mol Biol*, 227(2)
- Weinman, E. J., Cunningham, R., Wade, J. B., Shenolikar, S. (2005). "The role of NHERF-1 in the regulation of renal proximal tubule sodium-hydrogen exchanger 3 and sodium-dependent phosphate cotransporter 2a." *J Physiol*, 567(Pt 1), 27-32.
- Weinman, E. J., Steplock, D., Wang, Y., Shenolikar, S. (1995). "Characterization of a protein cofactor that mediates protein kinase A regulation of the renal brush border membrane Na(+)-H+ exchanger." *J Clin Invest*, 95(5), 2143-9.
- Wess, J. (1997). "G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition." *Faseb J*, 11(5), 346-54.
- Wess, J. (1998). "Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity." *Pharmacol Ther*, 80(3), 231-64.
- Wilson, I. A., Niman, H. L., Houghten, R. A., Cherenon, A. R., Connolly, M. L., Lerner, R. A. (1984). "The structure of an antigenic determinant in a protein." *Cell*, 37(3), 767-78.
- Winer, M. A. & Wolgemuth, D. J. (1995). "The segment-specific pattern of A-raf expression in the mouse epididymis is regulated by testicular factors." *Endocrinology*, 136(6), 2561-72.
- Witke, W. (2004). "The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes." *Trends Cell Biol*, 14(8), 461-9.
- Witke, W., Podtelejnikov, A. V., Di Nardo, A., Sutherland, J. D., Gurniak, C. B., Dotti, C., Mann, M. (1998). "In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly." *Embo J*, 17(4), 967-76.
- Witke, W., Sutherland, J. D., Sharpe, A., Arai, M., Kwiatkowski, D. J. (2001). "Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(7), 3832-6.
- Wittchen, E. S., Haskins, J., Stevenson, B. R. (1999). "Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3." *J Biol Chem*, 274(49), 35179-85.
- Wittenmayer, N., Rothkegel, M., Jockusch, B. M., Schluter, K. (2000). "Functional characterization of green fluorescent protein-profilin fusion proteins." *Eur J Biochem*, 267(16), 5247-56.
- Wu, G., Krupnick, J. G., Benovic, J. L., Lanier, S. M. (1997). "Interaction of arrestins with intracellular domains of muscarinic and alpha2-adrenergic receptors." *J Biol Chem*, 272(28), 17836-42.
- Wulfkühle, JD., Donina, IE., Stark, NH., Pope, RK., Pestonjamas, KN., Niswonger, ML., Luna, E. J. (1999). "Domain analysis of supervillin, an F-actin bundling plasma membrane protein with functional nuclear localization signals." *J Cell Sci*, 112 ( Pt 13), 2125-36.
- Xiao, B., Smerdon, S. J., Jones, D. H., Dodson, G. G., Soneji, Y., Aitken, A., Gamblin, S. J. (1995). "Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways." *Nature*, 376(6536), 188-91.
- Xin, Y., Yu, L., Chen, Z., Zheng, L., Fu, Q., Jiang, J., Zhang, P., Gong, R., Zhao, S. (2001). "Cloning, expression patterns, and chromosome localization of three human and two mouse homologues of GABA(A) receptor-associated protein." *Genomics*, 74(3), 408-13.
- Xue, JC., & Goldberg, E. (2000). "Identification of a novel testis-specific leucine-rich protein in human and mice." *Biol Reprod*, 62(5), 1278-84
- Yanagimachi, R. (1994). "Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity." *Zygote*, 2(4), 371-2.
- Yun, CH., Oh, S., Zizak, M., Steplock, D., Tsao, S., Tse, C., Weinman, EJ., Donowitz, M. (1997). "cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na+/H+ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(7), 3010-5.
- Zhou, S., Yang, Y., Scott, M. J., Pannuti, A., Fehr, K. C., Eisen, A., Koonin, E. V., Fouts, D. L., Wrightsman, R., Manning, J. E., (1995). "Male-specific lethal 2, a dosage compensation gene of *Drosophila*, undergoes sex-specific regulation and encodes a protein with a RING finger and a metallothionein-like cysteine cluster." *Embo J*, 14(12), 2884-95.

## VII Anhang

### 7.1 Danksagung

Diese Arbeit wurde im März 2004 am Institut für Hormon und Fortpflanzungsforschung (IHF) begonnen und von September 2004 an in der Abteilung für Andrologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf fortgeführt. Ermöglicht wurde mir die Arbeit durch ein Stipendium des Graduierten Kollegs 336 „Molekulare Endokrinologie und Molekularer Stoffwechsel“ der Universität Hamburg.

Frau Prof. Dr. Christiane Kirchhoff danke ich recht herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für ihre Betreuung und Unterstützung während meiner Arbeit und unter den manchmal doch recht schwierigen Umständen.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Schulze, dem Direktor der Abteilung für Andrologie am UKE, gebührt ein Dankschön für seinen unermüdlichen Einsatz für unsere Arbeitsgruppe sowie für die Bereitstellung humaner Gewebeproben.

Frau PD Dr. Iris Bruchhaus vom Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Weiterer Dank geht an alle (ehemaligen) Laborkollegen für fachliche und nicht-fachliche Diskussionen und die tolle Zusammenarbeit. Dank ihnen herrschte ein angenehmes Arbeitsklima, so dass ich immer gerne im Labor gearbeitet habe. Besonders danken möchte ich Frau Dr. Heike Cappallo-Obermann, die mich während ihrer Zeit in unserer Arbeitsgruppe intensiv betreute und in das *Yeast Two-Hybrid* System eingeführt hat. Auch Frau Dr. Caroline Feig gilt für die Bereitstellung humaner cDNAs und die gemeinsamen Zeit im Labor ein besonderer Dank.

Last but not least gilt mein größter Dank meiner Familie und meinem Freund, die mich immer unterstützt und ermutigt haben.

# Wissenschaftlicher Werdegang

## Zu meiner Person

---

Martina Behnen  
Diplom-Biologin  
geboren 1977 in Haselünne

## Hochschulstudium – Diplom Biologie

---

10. 1997 - 11.2003 Studium der Diplom-Biologie  
an der Carl-von-Ossietzky- Universität Oldenburg  
Abschluss als Diplom-Biologin mit Gesamtnote „sehr gut“
- Spezialisierung während des Hauptstudiums in den Fächern
- Genetik, Mikrobiologie und Biochemie
  - Diplomarbeit in der Abteilung Geomikrobiologie zum Thema „Pigment-Pigment-Rekonstitutionsexperimente von in *E.coli* überexprimierten Fucoxanthin-Chlorophyll *a/c*-bindenden Polypeptiden der zentrischen Diatomee *Cyclotella cryptica*“

## Naturwissenschaftliche Promotion im Fachbereich Biologie

---

03. 2004 – 02. 2007 Doktorandenstipendium im GRK 336 „Molekulare Endokrinologie - Molekularer Stoffwechsel“ der Universität Hamburg
- Durchführung der Arbeit von März 2004 bis August 2004 am Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung (IHF), ab September 2004 in der Abteilung für Andrologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
- 03.2007 – 09.2007 wissenschaftliche Angestellte in der Abteilung für Andrologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

## Veröffentlichungen

---

Behnen M., Obermann H., Feig C., Schulze W., Kirchhoff C.: “Profilin levels associated with normal spermatogenesis and spermatogenic failure.” Posterpräsentation beim Stoffwechsel-Symposium des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf am 18. August 2005

Behnen M., Obermann H., Feig C., Mitchell V., Schulze W., Kirchhoff C.: “Novel non-overlapping roles of profilins during mammalian spermatogenesis?” Kurzvortrag auf dem 14<sup>th</sup> European Testis Workshop, Bad Aibling, Deutschland, 22.-26. 04. 2006

Kirchhoff C., Obermann H., Behnen M., Davies B. (2006): “Role of epididymal receptor HE6 in the regulation of sperm microenvironment.” *Molecular & Cellular Endocrinology*, 250 (1-2), 43-48

Davies B., Behnen M., Cappallo-Obermann H., Spiess A.N., Theuring F., Kirchhoff C. (2007) “Novel epididymis-specific mRNAs downregulated by HE6/Gpr64 receptor gene disruption.” *Molecular Reproduction and Development*, 74 (5), 539-553