

# Interaktionen des testikulären *outer dense fibre protein 2* (ODF2) bei der zellulären Organisation

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Fatima Fosuaa Donkor

aus Accra/Ghana

Göttingen 2006

Referent: Prof. Dr. rer.nat. Ulrich Grossbach

Korreferent: Prof. Dr. med. Wolfgang Engel

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.06

Meinen Kindern Aaron Lukas und Anton Leander  
sowie Heinz Schwuchow.

*Imagination is more important than knowledge.  
Knowledge is limited. Imagination encircles the world.  
Albert Einstein*

Inhaltsverzeichnis	Seite
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>1</b>
Abbildungsverzeichnis .....	4
Tabellenverzeichnis .....	6
Abkürzungsverzeichnis .....	7
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>10</b>
1.1 Das Spermium .....	10
1.2 Mantelfaserproteine .....	12
1.2.1 Das Zytoskelett und die Mantelfaserproteine .....	13
1.2.2 Bedeutung der Spermischwanzproteine bei der Befruchtung .....	20
1.3 Ziele der vorliegenden Arbeit .....	21
<b>2 MATERIALIEN UND METHODEN</b> .....	<b>23</b>
2.1 Materialien .....	23
2.1.1 cDNS-Bibliothek .....	23
2.1.2 Antikörper .....	23
2.1.2.1 Primäre monoklonale Antikörper .....	23
2.1.2.2 Primäre polyklonale Antikörper .....	23
2.1.2.3 Sekundäre Antikörper .....	23
2.1.3 Bakterien- und Hefestämme .....	23
2.1.3.1 Bakterienstämme .....	23
2.1.3.2 Hefestämme .....	23
2.1.4 Vektoren .....	24
2.1.5 Enzyme .....	24
2.1.6 Oligonukleotide .....	24
2.1.6.1 Spezifische Odf-Primer .....	24
2.1.6.2 Vektorenspezifische Primer .....	25
2.1.7 Nährmedien .....	25
2.1.7.1 Nährmedien zur Anzucht von <i>Escherichia coli</i> .....	25
2.1.7.2 Nährmedien zur Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	25
2.1.8 Sterilisation .....	26
2.1.9 Geräte .....	26
2.1.10 Chemikalien .....	26
2.1.11 Verwendete Puffer und Lösungen .....	27
2.1.12 Gebrauchsfertige Kits .....	29
2.1.13 Sonstiges .....	29
2.1.14 Zelllinien .....	30
2.1.15 Medien für die Zellkultur .....	30
2.1.16 Software .....	30
2.2 Methoden .....	30
2.2.1 Klonierung von <i>Odf1</i> und <i>Odf2</i> in GFP-Expressionsvektoren .....	30
2.2.1.1 Erzeugung der Konstrukte .....	30
2.2.1.2 Transformation von <i>E. coli</i> .....	32
2.2.2 DNS-Präparation .....	33
2.2.2.1 Plasmidpräparation mit Hilfe des Mini-Präparations-Kits von PeqLab .....	33
2.2.2.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNS .....	33

2.2.2.3	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen mit Hilfe des MinElute™ Gel Extraction Kits .....	33
2.2.2.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNS .....	33
2.2.3	Restriktionsverdau von Plasmid-DNS .....	33
2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction) PCR .....	34
2.2.4.1	<i>Touchdown PCR</i> .....	34
2.2.5	<i>Grow'n'Glow GFP Yeast Two-Hybrid-System</i> von MoBiTec .....	34
2.2.5.1	Klonierung von <i>Odf2</i> in das pEG202 (bait Plasmid) .....	35
2.2.5.2	Test auf Eigeninduktion (Autoaktivierung) .....	36
2.2.5.3	Transformation der cDNS-Bibliothek in Hefe .....	36
2.2.5.4	Selektion der putativ positiven Interaktionspartner .....	36
2.2.5.5	Plasmidpräparation aus Hefe .....	36
2.2.5.6	Transformation von <i>E. coli</i> mit den aus Hefe isolierten Plasmiden .....	37
2.2.5.7	<i>Prey</i> -Plasmid Identifikation über PCR .....	37
2.2.6	Sequenzanalyse von Plasmiden .....	37
2.2.7	Rechnergestützte Auswertung von Nucleotidsequenzen .....	37
2.2.8	Transfektion der COS-7 und HeLa-Zelllinien .....	37
2.2.8.1	Kotransfektionen .....	38
2.2.9	Brefeldin A Versuche an transfizierten COS-7-Zellen .....	38
2.2.10	Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) .....	38
2.2.10.1	Quantifizierung des zellulären DNS-Gehalts und Ermittlung der Zellzyklusverteilung an transfizierten HeLa-Zellen mit Hilfe eines Durchflusszytometers .....	38
2.2.10.2	Experiment zur Proliferation an ODF2-überexprimierenden COS-7-Zellen .....	40
2.2.11	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie .....	41
2.2.11.1	Immunzytologie .....	42
2.2.11.2	Mikroskopie und Detektion der Fluoreszenz mit Hilfe des Zeiss cLSM 510 .....	42
2.2.12	<i>Life-Imaging</i> von transfizierten HeLa-Zellen .....	43
2.2.12.1	<i>Head over Bottom</i> .....	46
2.2.13	Mikrotubuli-Kosedimentation .....	47
2.2.14	SDS-PAGE .....	47
2.2.15	Western-Blot .....	48
2.2.15.1	Immunologische Detektion der Antikörper auf den Membranen .....	48
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>49</b>
3.1	ODF2-Fusionsproteine kosedimentieren mit Mikrotubuli unter Mikrotubuli-polymerisierenden Bedingungen .....	49
3.2	Identifizierung von putativen ODF2-Interaktionspartnern .....	50
3.3	Zelluläre Fluoreszenzmikroskopie von ODF1- und ODF2-Fusionsproteinen mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie .....	53
3.3.1	ODF1 kolokalisiert in COS-7-Zellen mit centrosomalen Strukturen ...	54
3.3.2	Bei Kotransfektion von <i>Odf1</i> und <i>Odf2</i> in COS-7-Zellen ändert sich die subzelluläre Organisation von ODF1 .....	57
3.3.3	ODF2-Fusionsproteine assoziieren mit dem Golgi-Apparat und dem ER .....	61
3.4	ODF2-überexprimierende Zellen und der Proteintransport .....	67
3.4.1	ODF2-überexprimierende Zellen zeigen eine Verlagerung der subzellulären Körperchen in Richtung Zellperipherie bei Inkubation mit Brefeldin A .....	67

3.4.2	ODF2 und der Dynein-abhängige Proteintransport .....	70
3.5	Anti-proliferativer Effekt bei Überexpression von testikulärem ODF2 in COS-7-Zellen .....	72
3.5.1	Reduktion der G2-Phase in <i>Odf2</i> -transfizierten HeLa-Zellen .....	75
3.6	Videomikroskopie von HeLa-Zellen und ODF2-überexprimierenden Zellen	82
3.6.1	<i>Head over Bottom</i> .....	83
3.6.2	Videomikroskopie an HeLa-Zellen.....	86
3.6.3	Überexpression von Testis-spezifischem ODF2 induziert Apoptose ähnliche Strukturen in HeLa-Zellen .....	89
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>95</b>
4.1	Putative ODF2-Interaktionspartner .....	95
4.2	ODF2 und der Proteintransport.....	96
4.3	Mantelfaserproteine in somatischen Zellen.....	98
4.4	Testikuläres ODF2 und das Zytoskelett.....	101
4.4.1	ODF2 assoziiert und kosedimentiert in somatischen Zellen mit Mikrotubuli .....	101
4.4.2	Die medierte Bindung des ODF2-Proteins an die Mikrotubuli.....	101
4.5	Das testikuläre ODF1 in somatischen Zellen .....	102
4.5.1	Das ODF1-Protein interagiert in somatischen Zellen mit ODF2 und generiert dabei ein zytoskelettales Netzwerk.....	103
4.6	ODF2 im Zellzyklusverlauf .....	104
4.6.1	Mögliche Bedeutung der ODF2-Lokalisation an den subdistalen Anhängseln der muren Centriole .....	104
4.6.2	Überexpression von ODF2 in Säugerzellen führt möglicherweise zu einer fehlenden Trennung der Centrosomen .....	105
4.7	ODF2 übt einen anti-proliferativen Effekt aus und induziert dabei Apoptose ähnliche Strukturen in HeLa-Zellen .....	105
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>110</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR- UND INTERNETVERZEICHNIS .....</b>	<b>111</b>
7.1	Literaturverzeichnis .....	111
7.2	Internetverzeichnis.....	129
	<b>VIDEOMIKROSKOPISCHE AUFZEICHNUNGEN .....</b>	<b>130</b>
	<b>ANHANG .....</b>	<b>133</b>
	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>140</b>
	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>141</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematischer Aufbau eines Säugetierspermiums .....	11
Abbildung 2	Struktur und Komponenten des Spermienkopfes .....	15
Abbildung 3	Centrosom Duplikation in Beziehung zum Zellzyklus.....	18
Abbildung 4	Modell der Kinesinstruktur .....	18
Abbildung 5	Cytosolisches Dynein und der Heteroprotein-Komplex Dynaktin.....	19
Abbildung 6	Schematische Übersicht über die in den Konstrukten enthaltenen Proteinbereiche.....	32
Abbildung 7	Grow'n'Glow GFP <i>Yeast Two-Hybrid</i> System.....	35
Abbildung 8	Skizze eines konfokalen Laser Mikroskops .....	42
Abbildung 9	MiniCeM™ <i>Miniaturized cell chamber</i> zur Mikroskopie.....	44
Abbildung 10	MiniCeM™ <i>Life-Cell-Image</i> Vorrichtung.....	44
Abbildung 11	Life-Cell-Imaging Vorrichtung .....	45
Abbildung 12	Life-Cell-Imaging Vorrichtung .....	45
Abbildung 13	Life-Cell-Imaging Vorrichtung .....	45
Abbildung 14	Unterschiedliche Ausrichtung der Zellen in der Inkubationskammer..	46
Abbildung 15	Mikrotubuli Kosedimentation der vier ODF2-GFP-Fusionsproteine aus COS-7-Zellen .....	50
Abbildung 16	Amplifikation der Prey-Plasmide mit Hilfe der Touchdown PCR .....	53
Abbildung 17	Schema des ODF1-NC-CFP-Fusionsproteins .....	55
Abbildung 18	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie an ODF1-exprimierenden COS-7-Zellen .....	56
Abbildung 19	Schemata der ODF1-NC-CFP und ODF2-NC-YFP Fusionsproteine.	57
Abbildung 20	Dualchromophore konfokale Fluoreszenzmikroskopie an <i>Odf1</i> - und <i>Odf2</i> - kotransfizierten COS-7-Zellen.....	59
Abbildung 21	Vergleich der subzellulären Organisation der <i>Odf1</i> -NC-ECFP einzeltransfizierten mit <i>Odf1</i> -NC-CFP und <i>Odf2</i> -NC-YFP doppeltransfizierten COS-7-Zellen.....	60
Abbildung 22	Immunfluoreszenzaufnahmen von anti-Hsp47 an ODF2-GFP-überexprimierenden COS-7-Zellen.....	64
Abbildung 23	Immunfluoreszenzaufnahmen von anti-Golgin97 an ODF2-GFP-überexprimierenden COS-7-Zellen.....	65
Abbildung 24	Detektion von Mitochondrien in ODF2-GFP-überexprimierenden Zellen 66	
Abbildung 25	BFA Inkubation an ODF2-GFP-überexprimierenden COS-7-Zellen...	69
Abbildung 26	Immunfluoreszenzbilder der mit <i>Odf2</i> und pCMV-H50 kotransfizierten HeLa-Zellen .....	71
Abbildung 27	Proliferationsassay an ODF2-GFP-überexprimierenden COS-7-Zellen 74	
Abbildung 28	Gating und Diskriminierung von Zelldebris. ....	78
Abbildung 29	Histogramme der Zellzyklusverteilung von pEGFP-transfizierten HeLa- Zellen und von Kontrollzellen.....	80
Abbildung 30	Histogramme der Zellzyklusverteilung von ODF2-NC-GFP und ODF2-NC1-GFP-exprimierenden HeLa-Zellen.....	81
Abbildung 31	Histogramme der Zellzyklusverteilung von ODF2-NC2 und ODF2-N2C-überexprimierenden HeLa-Zellen .....	82
Abbildung 32	Beobachtungen zur Zellproliferation. Die Zellen wurden über Kopf <i>up-down</i> kultiviert.....	84

Abbildung 33	Beobachtungen zur Zellproliferation. Die Inkubationskammer mit den Zellen wurde in der Orientierung <i>up-up</i> kultiviert. ....	85
Abbildung 34	Einbringen einer Gaze mit einer Maschenweite von 30-50 $\mu\text{m}$ in die Inkubationskammer.....	86
Abbildung 35	Proliferation einer eukaryotischen Zelle.....	87
Abbildung 36	Videomikroskopie proliferierender HeLa-Zellen.....	88
Abbildung 37	Videomikroskopie ODF2-NC-überexprimierende HeLa-Zellen im Zellzyklus .....	90
Abbildung 38	Subzelluläre Körperchen des ODF2-NC-Fusionsproteins im Zellzyklusverlauf .....	91
Abbildung 39	Lokalisation des ODF2-NC-Fusionsproteins in subzellulären Körperchen. Ausschnittvergrößerung.....	92
Abbildung 40	Lebendzellaufnahmen an ODF2-NC-überexprimierenden HeLa-Zellen im erweiterten Beobachtungszeitraum.....	93
Abbildung 41	Skizze des ODF2-Fusionsproteins.....	97
Abbildung 42	Wechselwirkungen und Interaktionspartner der Mantelfaserproteine	100
Abbildung 43	Aufbau des Centrosoms .....	104

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Aminosäurenkomponenten in Nährmedien zur Prototrophieselektion und Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	26
Tabelle 2	Verwendete Fluorochrome und deren Anregungs- und Emissionswellenlängen sowie die korrespondierenden Interferenzfilter .....	39
Tabelle 3	Trenngel- und Sammelgelzusammensetzung .....	48
Tabelle 4	Zusammengefasste Liste der putativ positiven ODF2-Interaktionspartner aus dem Anhang .....	52
Tabelle 5	Fluoreszenzspektren der verwendeten Reporterproteine .....	57
Tabelle 6	Fluoreszenzspektren der verwendeten Fluorochrome.....	61
Tabelle 7	Subzelluläre Verteilung der ODF2-Fusionsproteine .....	62
Tabelle 8	Übersicht und Zusammenfassung der zellulären Kolokalisation der ODF2-Fusionsproteine in COS-7-Zellen .....	62
Tabelle 9	Ausgesäte untransfizierte COS-7-Zellen. Ermittelte Zellzahl nach definiertem Zeitraum .....	73
Tabelle 10	Ermittlung der Zellzahl FACS sortierter ODF2-GFP-überexprimierender Zellen nach definiertem Zeitraum.....	73
Tabelle 11	Die für den Proliferationsversuch ermittelten Zellzahlen.....	73
Tabelle 12	Proliferativität der ODF2-überexprimierten Fusionsproteine .....	75
Tabelle 13	Statistische Darstellung der Zellpopulation nach dem Gaten mit den Werten der Fluoreszenzintensität DAPI positiver Kontrollzellen und Proben .....	77

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
abs.	Absolut
ADP	Adenosindiphosphat
AF	Aktinfilamente
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ART	ADP-Ribosyltransferase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5-triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BFA	Brefeldin A, <i>Eupenicillium brefeldianum</i> ,
bp	<i>base pairs</i> , Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cDNS	komplementäre DNS
CFP	<i>cyan fluorescence protein</i>
cLSM	<i>confocal Laser Scanning Microscope</i>
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
COS-7	Eine Affen Nieren Zelllinie der afrikanischen Grünen-Meerkatze ( <i>Cercopithecus aethiops</i> ).
cpm	<i>counts per minute</i>
CSF	<i>cytostatic factor</i>
Cy3	Cyanine Cy3
Da	Dalton
DAPI	4'6-Diamidino-2-Phenyl-Indol-Dihydrochlorid
d.h.	das heißt
DIK	Differentieller Interferenzkontrast
DMP	Dimethylpimelimidate-2 HCl
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's media</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothrietol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ELM	<i>Eukaryotic Linear Motif resource for functional sites in proteins;</i>
EMED	N,N,N',N' -tetramethylethylendiamin
ER	Endoplasmatisches Reticulum
et al.	et alteres, und andere
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FSC	<i>forward scatter light</i>
g	Gramm
GAL4	Das Hefe GAL4-Protein ist ein DNS-bindender Transkriptionsaktivator
Gal/Raf	Galaktose, Raffinose
GFP	<i>green fluorescent protein</i>

G1 .....	<i>gap</i> Phase
G2 .....	<i>gap</i> Phase
G418 .....	Geneticin Antibiotikum
GTP .....	Guanosintriphosphat
h .....	<i>hour</i> , Stunde
HeLa .....	Erste kontinuierliche humane karzinome Zelllinie, gespendet von He(nrietta) La(cks) 1951.
HEPES .....	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HIS .....	Histidin
HRP .....	<i>Horse Raddish Peroxidase</i>
HSB .....	<i>High Salt Buffer</i>
IF .....	Intermediärfilament
IFAP .....	<i>Intermediate filament-associated protein</i>
KHC .....	<i>Kinesine heavy chain</i>
KLC .....	<i>Kinesin light chain</i>
kb .....	<i>kilobase</i> , Kilobase
kDa .....	Kilodalton
LB .....	Luria-Bertani Medium
LCM .....	Leucin-Zipper-Motiv
LEU .....	Leucin
LSM .....	<i>Laser Scanning Microscope</i>
M-Phase .....	Mitosephase
M .....	molar
m .....	milli
mA .....	Milliampere
MAP .....	<i>microtubule-associated protein</i>
max. ....	maximal
mcs .....	<i>multiple cloning site</i> , multiple Klonierungsstelle
mg .....	Milligramm
min .....	Minuten
ml .....	Milliliter
MT .....	Mikrotubuli
mM .....	millimolar
MTOC .....	<i>microtubuli organizing center</i>
μ .....	Mikro
μl .....	Mikroliter
μm .....	Mikrometer
ng .....	Nanogramm
nm .....	Nanometer
NuMA .....	<i>nuclear mitotic aparatus protein</i>
ODF .....	<i>outer dense fibers</i>
ODF1-NC	ODF1-NC Potein beschreibt das gesamte Protein von AS 1 bis AS 244 ( <i>accession number</i> NP_032783).
ODF2-NC	Das ODF2-NC-Protein beschreibt das gesamte Protein von AS 1 bis AS 591 ( <i>accession number</i> AAC53134).
ODF2-NC1	ODF2 ΔC <sub>429-591</sub> .
ODF2-NC2	ODF2 ΔC <sub>375-591</sub> .
ODF2-N2C	ODF2 ΔN <sub>1-369</sub> .
OCR .....	<i>oligomerization chain reaction</i>
PAGE .....	Polyacylamidgelelektrophorese
pBluescript SK(-) .....	<i>E. coli</i> Phagemid Vektor
PBS .....	<i>phosphate-buffered saline</i> , Natriumphosphatpuffer
PBST .....	<i>phosphate-buffered saline with tween</i>

PC-12 .....	(Ratten)-Phäochromocytom-Zelllinie
PCM .....	perizentrioläre Matrix
PCR.....	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGFRB .....	<i>Platelet-derived growth factor receptor, beta poly peptide</i>
pECFP.....	<i>plasmid enhanced cyan fluorescence protein</i>
pEGFP-N1.....	<i>plasmid enhanced green fluorescent protein</i>
pEYFP .....	<i>plasmid enhanced yellow fluorescent protein</i>
pGEM-T .....	<i>E. coli</i> Phagemid Vektor
pH.....	potentium hydrogenii
PMSF .....	Phenylmethylsulfonylfluorid
r.p.m .....	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI .....	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
PVDF.....	Polyvinylidendifluorid
® .....	Eingetragenes Warenzeichen
RHAMM .....	<i>hyaluronan-mediated motility</i>
RT .....	Raumtemperatur
SAK57 .....	<i>Sperm-associated keratin of molecular mass 57kDa</i>
SC .....	<i>Synthetic Complete</i>
SDS.....	Natriumdodecylsulfat
sHSP .....	<i>small Heat-shock protein</i>
SIP30 .....	<i>SNAP25 interacting protein 30</i>
SNAP25 .....	<i>synaptosome-associated proteins of 25 kDa</i>
SNARE.....	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
SPAG .....	<i>sperm-associated antigen</i>
S-Phase .....	Synthesephase
SSC.....	<i>sideward scatter light</i>
SV-40 .....	Simian Virus 40
TEMED.....	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM .....	<i>Trademark</i>
TRP .....	Tryptophan
U.....	<i>Unit</i>
UAS.....	<i>Upstream Activation Sequence</i>
URA.....	Uracil
UV .....	Ultraviolett
VAMP .....	<i>vesicle-associated membrane protein</i>
VDAC .....	<i>voltage-dependent anion-selective channel</i>
Vol. ....	Volume (Ausgabe)
v/v.....	Volumen/Volumen
w/v .....	<i>weight/volume</i> , Gewicht/Volumen
x.....	mal
x g.....	mal Erdbeschleunigung, Gravitation
YFP .....	<i>yellow fluorescence protein</i>
YPD.....	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>
ZW10.....	<i>Zeste White 10</i>
Zwint-1 .....	<i>ZW10-interacting protein 1</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Spermium

Die Spermatogenese der Säuger ist ein Differenzierungsprozess, in dem aus den diploiden Spermatogonien haploide bewegliche Spermatozoen hervorgehen.

Aus den runden, haploiden Spermatiden differenzieren sich in der Spermiohistogenese die reifen Spermatozoen (Leblond und Clermont, 1952).

Das Spermium besteht aus einer Kopfreion, in der sich der haploide Kern und die Centriolen befinden, dem Kern liegt die Akrosomenkappe auf (Lalli und Clermont, 1981), dem Mittelstück mit den Mitochondrien sowie einem Bewegungsapparat, dem Spermischwanz. Das Akrosom, das aus der Akrosomenkappe hervorgeht, beinhaltet eine Reihe von Enzymen, die Proteine und komplexe Zuckerverbindungen verdauen. Mit Hilfe der Enzyme wird bei der Befruchtung die äußere Eihülle penetriert. Der Kopf ist mit dem Schwanz über ein Verbindungsstück, *connecting piece*, verbunden (Abbildung 1).

In einem der ersten Schritte der Spermatogenese, der Golgi-Phase, bilden sich proakrosomale Granula im Golgi-Apparat, diese vereinigen sich zu Bläschen und es kommt zur Anheftung am späteren Vorderende. Am Gegenpol induziert ein Centriol die Geißelbildung, das distale Centriol dient dabei als Basalkörper der sich verlängernden Geißel. Subsekutiv bildet sich aus den Centriolen das Flagellum. Die Centriolen befinden sich auf der dem Akrosom gegenüberliegenden Seite des Kerns. Das Flagellum erstreckt sich schließlich bis in das Lumen des Tubulus. Im letzten Abschnitt der akrosomalen Phase verlängert sich der Zellkern, das Chromatin kondensiert, es erfolgt eine endgültige Differenzierung des Akrosoms, der Kern nimmt seine speziesspezifische Form an (Abbildung 1). Der Kern wird umgeben von einer Manschette aus Mikrotubuli, diese ist mit dem unteren Rand der Akrosomenkappe verbunden (Abbildung 2).

Das sich ausstreckende Zytoplasma lagert sich mit den Mitochondrien an die Geißel, die Mitochondrien formen einen Ring um die Basis des Flagellums und lagern sich streng um das Mittelstück des sich bildenden Spermischwanzes an, und der Schwanz erhält seine entgültige Form. Der Schlussring entsteht aus dem Chromatidkörper und die Manschette aus Mikrotubuli. In dieser transienten, kurzlebigen, mikrotubulären Struktur der Manschette werden temporär Keratine wie das SAK57<sup>1</sup>, ein Keratin 5 Ortholog (K5), ODF1<sup>2</sup>, ODF2 und SPAG4<sup>3</sup> gespeichert und später bei der Ausdifferenzierung der zytoskelettalen Struktur des Spermischwanzes abgerufen und eingebaut (Kierszenbaum, 2001; Kierszenbaum et al., 2003). Die Manschette wird nach der vollständigen Elongation und Kondensation des Kerns eliminiert (Clermont et al., 1993).

Das restliche Zytoplasma der Spermatiden wird schließlich abgeschnürt (Leblond und Clermont, 1952) und die Organellen werden ebenfalls eliminiert.

Die Spermatozoen werden in das Tubuluslumen abgegeben und gelangen in den Nebenhoden, die Epididymis. Hier reifen sie zu befruchtungsfähigen Spermien heran. Der Bewegungsapparat des Spermiums, das Flagellum, unterteilt sich in Mittel-, Haupt-

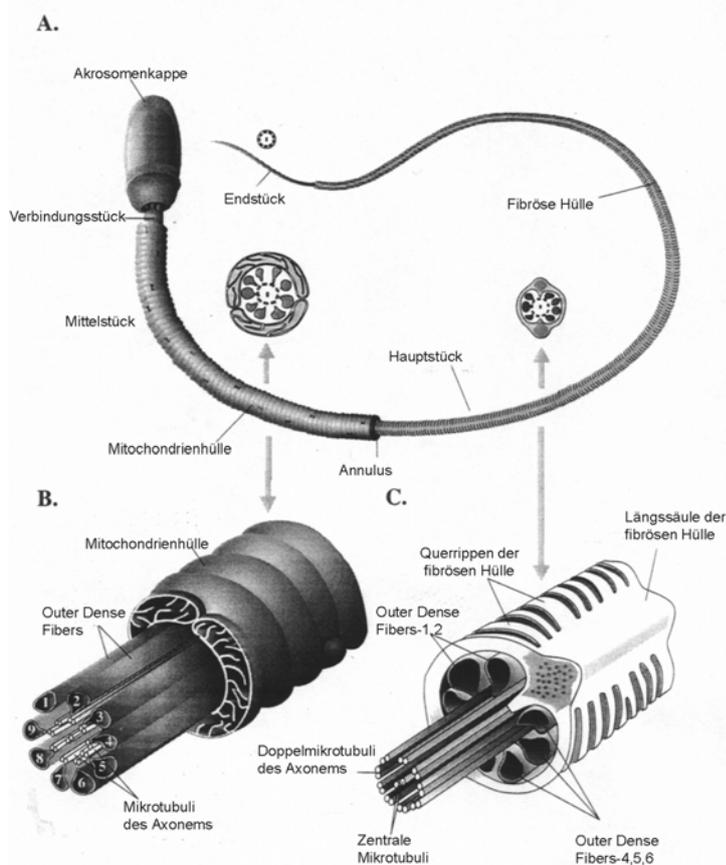
<sup>1</sup> *Spermatogenic cell/Sperm-associated keratin of molecular mass 57 kDa*

<sup>2</sup> *Outer dense fibers* (ODF) sind filamentöse Strukturen des Spermischwanzes.

<sup>3</sup> *sperm associated antigen*

und Endstück (Abbildung 1). Im Zentrum des Flagellums liegt das Axonem, das den gesamten Spermenschwanz durchzieht. Das Axonem besteht aus Mikrotubuli. Es formiert sich aus den Centriolen, die distal vom Spermienkern liegen. Das Axonem besteht aus zwei zentralen Einzeltubuli, die umgeben sind von neun Doppeltubuli (Fawcett, 1954). Die Struktur des Axonems mit der 9+2 Mikrotubuli-Organisation mit den verbundenen Dyneinarmen ist evolutiv konserviert. Sie ist in allen Cilien und Flagellen der Eukaryoten zu finden (Schultheiss und Mandelkow, 1983). Die notwendige Energie zur Bewegung des Flagellums wird über Mitochondrien vermittelt. Sie umgeben das Mittelstück ringförmig. Zwischen den Mitochondrien und dem Axonem liegen die Mantelfasern, die *outer dense fibers* (ODF). Sie bilden die zytoskelettalen Strukturen des Spermenschwanzes aus.

Ausgehend vom *connecting piece* umgeben die Mantelfasern das Axonem und erstrecken sich bis in das Hauptstück hinein. Daraus ergibt sich für das Mittelstück im Querschnitt eine 9+9+2 Struktur (Olson und Sammons, 1980). Im Hauptstück des Flagellums werden die Mantelfasern von einer fibrösen Hülle umgeben, die ein weiteres Strukturelement des Säugetierspermiums ist. Die fibröse Hülle besteht aus zwei gegenüberliegenden Längssäulen und zahlreichen Querrippen (Abbildung 1). Die Längssäulen sind aus den Mantelfasern Nr. 3 und Nr. 8 hervorgegangen. Im Hauptstück des Spermenschwanzes wird die 9+9+2 Struktur aufgegeben, da nur noch sieben ODFs vorhanden sind. Daraus ergibt sich im Querschnitt eine 7+9+2 Anordnung (Fawcett, 1975).



**Abbildung 1 Schematischer Aufbau eines Säugetierspermiums**

**(A)** Darstellung eines Säugetierspermiums mit der Unterteilung in **Kopf-, Mittel-, Haupt- und Endstück**. Das Halsstück enthält unter anderem die beiden Centriolen (proximales und distales). Das reife Spermium nimmt seine speziesspezifische Form an, die Mitochondrien sind im Mittelstück dicht und ringförmig angelagert. Die DNS im Kern ist maximal kondensiert.

**(B)** Querschnitt des Spermenschwanzes im **Mittelstück**. Das Mittelstück besteht aus einer Scheide von ringförmig um das Axonem gruppierten Mitochondrien zur Bereitstellung der Energie für die Geißelbewegung. ODF sind spezifische subzelluläre Komponenten des Spermien-

schwanzes **(C)** Querschnitt des Spermienchwanzes im **Haupt- und Endstück**. Das Hauptstück besitzt eine Scheide aus Ringfasern um das Axonema. Das Endstück besteht nur noch aus der 9+2 Struktur des Axonemas (nach Fawcett, 1975).

## 1.2 Mantelfaserproteine

Die Mantelfaserproteine der Säugetierspermien bestehen aus mehreren Proteinen, deren molekulare Masse von 11 kDa bis 87 kDa reicht (Oko, 1988). Es besteht die Annahme, dass die Mantelfaserproteine eine passive elastische Struktur aufbauen und somit bei ihrer Passage durch den Nebenhoden den Spermienschwanz vor Scherkräften schützen (Oko, 1988; Lindmann, 1996). Biochemische Analysen zeigten, dass die Mantelfaserproteine der Ratte aus bis zu 14 Hauptproteinkomponenten bestehen (Oko, 1988; Vera et al., 1984). Eine dieser Hauptproteinkomponenten wird von *Odf1* kodiert. Es besitzt eine molekulare Masse von rund 30 kDa, ist cysteinereich und vernetzungsfähig (Burfeind und Hoyer-Fender, 1991). Am C-terminalen Ende des Proteins befindet sich ein repetitives Cys-Gly-Pro-Motiv bzw. Varianten dieses Motivs (Burfeind, 1992). Dieses Motiv erlaubt Bindungen und Assoziationen von Proteinen über Disulfidbrücken (Woycechowsky et al., 2003).

In der Arbeit von Brohmann et al. (1997) wurde mit Hilfe von Antikörpern gegen ODF-Proteine eine Rattentestis-Expressionsbibliothek gescreent, dabei wurde das *Odf2*-Gen isoliert. *Odf2* wird während der Spermatidentwicklung exprimiert. Die höchste Transkriptionsmenge wird in elongierten Spermatiden detektiert (Turner et al., 1997). Schalles et al. (1998) lokalisierten das ODF2-Protein im Mittelstück des Spermienschwanzes und identifizierten ODF2 als eine Hauptproteinkomponente des Spermienschwanzes. Shao et al. (1997) zeigten in einem Protein-Interaktionsscreen, dass ODF1 über den N-terminalen Leucin-Zipper mit ODF2 interagiert. Sie postulierten, dass sich über die Interaktion der Leucin-Zipper der Mantelfaserproteine ODF1 und ODF2, mit dem andere ODF-Proteine verbunden sein sollen, ein molekulares Netzwerk bildet. Sequenzanalysen der strukturellen Domänen von ODF2 ergaben eine alpha-helikale *coiled-coil* Struktur (Lupas et al., 1991, Petersen et al., 1999). C-terminal liegen Dimerisationsregionen in der Form von zwei Leucin-Zipper-Motiven (Shao et al., 1997). *Coiled-coil* Strukturen sind ubiquitäre Proteinmotive, die die Oligomerisierung von Proteinen kontrollieren. Sehr lange *coiled-coil* Bereiche werden in Intermediärfilamenten und in Komponenten des mitotischen Spindelapparats gefunden (Walshaw und Woolfson, 2001). Donkor et al. (2004) konnten zeigen, dass das ODF2-Protein intramolekulare Interaktionen eingeht, somit oligomerisiert und dies unabhängig von Sequenzmotiven. Die Oligomerisierung beruht möglicherweise auf den strukturellen Proteindomänen der alpha-helikalen *coiled-coil* Struktur.

Die Arbeitsgruppe Lange et al. (1995) identifizierte einen molekularen Marker für das mature Centriol, das Cenexin. Cenexin2 zeigt eine Aminosäuresequenzidentität von 99 % mit dem testikulären ODF2-Protein. In weiteren Studien lokalisierte und identifizierte die Arbeitsgruppe Nakagawa et al. (2001) ODF2 an den distalen/subdistalen Anhängseln der murenen Centriolen.

Das ODF2-Protein ist demnach nicht nur ein exklusives Protein der männlichen Keimzellen und des Spermienschwanzes. Transkripte von *Odf2* lassen sich in der Epididymis, im Ovar und Ovidukt nachweisen (Hoyer-Fender et al., 2003). Bei Zellen in Kultur lässt sich darüber hinaus eine Kolokalisation mit dem mitotischen Spindelapparat und gamma-Tubulin nachweisen (Donkor 2001; Hoyer-Fender et al., 2003). In somatischen Zellen

generiert das ODF2-Protein fibrilläre Strukturen, die indirekt über einen noch nicht identifizierten Linker mit dem Mikrotubuli-Netzwerk assoziiert sind. Dabei ist das von ODF2-generierte Netzwerk unabhängig vom Tubulin-Netzwerk (Donkor et al., 2004). Weitere identifizierte Interaktionspartner von ODF1 sind das SPAG4 und SPAG5. Das SPAG4-Protein bildet eine Proteinkomponente des Axonems und der Manschette, mikrotubuläre Strukturen der männlichen Keimzellen (Shao et al., 1999; Kierszenbaum, 2001). Aufgrund der Daten wird vermutet, dass SPAG4 als Vermittler zwischen den ODFs und dem Axonem dient (Shao et al., 1999). Das SPAG5 Protein bindet an die Proteine der Axonemata (Shao et al., 2001), es ist ein 200 kDa großes Protein, das C-terminal zwei Leucin-Zipper-Motive besitzt. Über diese Leucin-Zipper-Motive interagiert SPAG5 mit ODF1. Intramolekular kann das Protein auch mit sich selbst interagieren, dabei zeigt SPAG5 keine Interaktion mit ODF2 (Shao et al., 2001; Fitzgerald et al., 2005). Die Interaktion von ODF1 mit SPAG5 impliziert, dass SPAG5 an der Spermischwanzmorphogenese beteiligt ist. In elongierenden Spermatischen assoziiert das SPAG5 Protein mit den ODFs, nicht mit den axonemalen Mikrotubuli. Dies lässt vermuten, dass es kein Strukturprotein der zytoskelettalen Komponenten des Spermischwanzes ist.

Die SPAG5-mRNA wird während der Meiose vorwiegend in den Pachytänspermatocyten und in geringerem Maße in den runden Spermatischen gefunden. Es lassen sich dabei keine *Spag5*-Transkripte in reifen Spermatozoa finden (Xue et al., 2002). Dieses testikuläre Protein scheint identisch mit dem humanen Protein Astrin bzw. Deepest zu sein, einem putativen mitotischen *coiled-coil* Spindelpolprotein (Chang et al., 2001; Gruber et al., 2002; Mack und Compton 2001; Shao et al., 2001). Fitzgerald et al. (2005) konnten SPAG5-Transkripte in somatischen Zellen der Ratte nachweisen. Dabei detektierte die Arbeitsgruppe das Protein im Endoplasmatischen Reticulum (ER) und an den Mikrotubulifilamenten.

Mit Hilfe einer homologen Rekombination in Maus-Mutanten konnten *Spag5*-Transkripte sowie das Protein ausgeschaltet werden (Xue et al., 2002). Bei den generierten männlichen Null-Mutanten wurde bei der Analyse der Spermatogenese kein dominanter Phänotyp gefunden. Die männlichen Mäuse waren fertil und entwicklungsfähig. Diese von der Arbeitsgruppe Xue et al. (2002) ermittelten Daten lassen die Autoren vermuten, dass SPAG5-Proteine wahrscheinlich von bis jetzt unbekannt Proteinen kompensiert werden.

### 1.2.1 Das Zytoskelett und die Mantelfaserproteine

Das Zytoskelett bildet eine dynamische dreidimensionale Struktur<sup>4</sup>. Eingebettet im Zytoplasma, determiniert das Zytoskelett die Architektur und die Morphologie einer eukaryotischen Zelle und ordnet dabei auch die Lokalisation der Organe im Organismus. Das Zytoskelett baut sich auf drei Proteinfilamentsystemen auf, mit deren Hilfe die Motilität, der inter- und intramolekulare Vesikeltransport und Signalkaskaden einer Zelle organisiert werden.

---

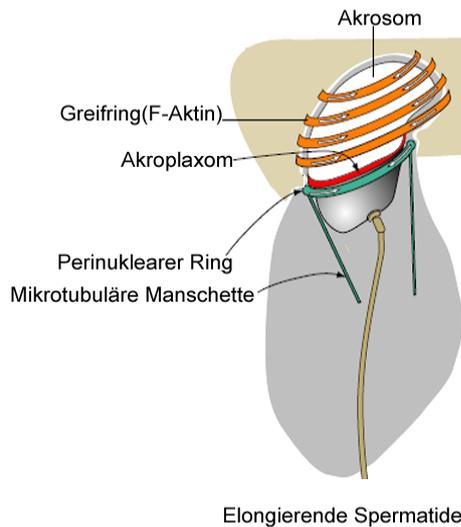
<sup>4</sup> Die Komposition einer Zelle wird vom Zytoskelett determiniert; dieses Netzwerk bestimmt Form und mechanische Stabilität einer Zelle. Mit Hilfe des Proteinfilamentsystems können sich Zellen teilen und auf externe sowie interne Einflüsse reagieren. Darüber hinaus dient es dem Transport von zellulären Strukturen wie Vesikeln und Mitochondrien.

Das Proteinfilamentsystem des Zytoskeletts generiert sich primär aus Aktinfilamenten auch als Mikrofilamente bezeichnet (AF), Mikrotubuli (MT) und Intermediärfilamenten (IF). Intermediärfilamente werden in nahezu allen eukaryotischen Zellen gefunden, nicht in Pflanzen und Pilzen. Da die IF mit der Plasmamembran des Zellkerns assoziiert sind, kommt ihnen wohl eher eine zytoskelettale architektonische Funktion zu. Die Intermediärfilamente unterscheiden sich auch hinsichtlich ihrer Struktur, Stabilität und Größe von anderen zytoskelettalen Fibrillen. Die Untereinheiten der IF sind alpha-helikale Heteropolymere, deren Assoziation, *self assembly*, zu Intermediärfilamenten nicht von der Hydrolyse von ATP oder GTP, wie bei der Polymerisation von G-Aktin und Tubulin, abhängig ist. Die Familie der IF wird derzeit in fünf Gruppen eingeteilt (Lamine, saure und basische Keratine, Neurofilamente und Desmine), die hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenzen, ihrer Expressionsmuster und Distributionen in den spezifischen Zellgeweben unterschieden werden.

Lamine werden exklusiv im Zellkern gefunden. Über die Assoziation von Homodimeren, wird ein stabilisierendes Netzwerk um die innere Membran der Kernhülle formiert. Keratine werden in epithelialen Zellen gefunden, sie assoziieren über die sauren und basischen Polymere zu heteropolymeren Keratinfilamenten. Keines der jeweiligen Heteropolymere kann sich alleine zu Keratinfilamenten formieren (Coulombre et al., 2002). Die unterschiedlichen epithelialen Zellen exprimieren die für sie typische, charakteristische Kombination von sauren und basischen Keratinen und gehören deshalb zu den facettenreichsten Proteinen mit einer Reihe von unterschiedlichsten Keratin-Isoformen. Neurofilamente bilden einen wesentlichen Bestandteil des Zytoskeletts der Nervenzellen, unterstützen den axonalen Transport und stabilisieren die komplexe Struktur der Nervenzelle. Kierszenbaum et al. (1996) identifizierte SAK57 in den meiotischen und postmeiotischen Stadien der Spermatogenese und charakterisierte SAK57 als IF und Homolog zum Keratin5 (K5). Es gehört zu den sauren Keratinen, die sich aus Heteropolymeren in einem Prozess des *self assembly* zu Filamenten organisieren.

Das SAK57-Protein assoziiert mit der Manschette, einer transienten mikrotubulären Struktur, die von dem perinukleären Ring der Spermatiden ausgeht. Während der Spermiogenese übt die Manschette einen Einfluss auf die Modellierung des Spermienkopfes aus, der in diesen Phasen seine Spezies-spezifische Form erhält. Später, im Verlauf der Spermiogenese, lässt sich SAK57 nicht mehr in der Kopfreion der maturen Spermatiden finden (Tres und Kierszenbaum, 1996); es verbleibt an den Axonem und den ODFs assoziiert, sowie an den Querrippen der fibrösen Hülle der reifen Spermien (Abbildung 1). Im Prozess der Spermatogenese werden neben dem SAK57, auch die Proteine ODF1 und ODF2 zunächst in der Manschette gelagert, um dann als strukturbildende Komponenten der Mantelfaser und den Querrippen der fibrösen Hülle des sich ausbildenden Spermischwanzes eingebaut zu werden (Abbildung 1).

Bei dem Prozess der Spermatogenese, während der Organisation und Differenzierung des Axonems, bildet sich die Manschette, eine dynamische mikrotubuläre Struktur, die zytoskelettale Proteine, die bei der Spermischwanzgenese involviert sind, neben dem SAK57 das ODF1, ODF2, SPAG4 und K9, bereit stellen soll (Kierszenbaum et al., 2002). Neben der Bedeutung der Manschette bei der Entwicklung des Spermischwanzes, kommt ihr auch eine bedeutende Rolle bei dem Transport von Vesikeln und Makromolekülen zum Centrosom zu (Kierszenbaum und Tres, 2004).



**Abbildung 2 Struktur und Komponenten des Spermienkopfes**

Die Abbildung zeigt eine elongierende Spermatide. Die Formierung und Organisation des Säugerspermienkopfes zur speziesspezifischen Form unterliegt diversen Prozessen. Das orchestrale Zusammenspiel dieses zellulären Differenzierungsprozesses geschieht unter Mitwirkung und Einwirkung von Akrosom, Akroplaxom und Manschette. Deformation des Akrosoms und des Zellkerns führt zur männlichen Infertilität. Neben der Manschette und dem Akroplaxom spielt der perinukleare Ring, eine weitere zytoskelettale Struktur, eine Rolle bei der Differenzierung zur speziesspezifischen Morphologie des Spermienkopfes. Verändert nach Kierszenbaum et al., 2004.

Zur Architektur des Spermienkopfes gehört das Akroplaxom, ein prominenter Ring bestehend aus den zytoskelettalen Komponenten F-Aktin und SAK57 (Abbildung 2), der mit dem Spermatidkern verankert ist. Während des Stadiums der runden Spermatiden bei der Biogenese des Akrosoms fusionieren proakrosomale Granula und Vesikel, entstanden im Goli-Apparat. Bei diesem Transport und der Fusion der proakrosomalen Vesikel ist wohl das Akroplaxom involviert und sorgt für eine Bindung des Akrosoms an den Zellkern (Toshimori und Ito, 2003). Der Akrosom-Akroplaxom-Manschetten-Komplex spielt somit wohl eine kooperative Rolle bei der morphologischen Ausbildung der speziesspezifischen Form des Säugerspermienkopfes (Kierszenbaum und Tres, 2002).

Aumüller und Seitz haben 1988 immunzytologisch im subakrosomalen Bereich der Spermatiden sowie in den Mantelfasern des Spermischwanzes Aktin lokalisiert. Aktin besteht aus globulären Monomeren, dem G-Aktin, die zu langen, dünnen, helikalen Fibrillen polymerisieren. Dabei lagern sich die paarig angeordneten komplementären Bindungsstellen des G-Aktins zu einem verdrehten doppelsträngigen Filament aneinander, dem F-Aktin. Dieses hat einen Durchmesser von etwa 8 nm. Sie sind damit die dünnsten zytoskelettalen Filamente und werden auch als Mikrofilamente bezeichnet. Die Polymerisation verläuft dabei gerichtet und ist reversibel; dieser Prozess geschieht unter Hydrolyse von ATP.

Kierszenbaum et al. (2004) beobachteten eine Korrelation der Ausdehnung des Akroplaxoms mit der Ausbreitung und Formierung des Akrosoms im Spermienkopf der elongierenden Spermatide. Dies impliziert, dass bei der Entstehung des Akroplaxoms das F-Aktin eine Matrize bzw. Vorlage bei der Assoziation mit dem Keratinfilament SAK57 ist. Bei der Spermatogenese wird F-Aktin im subakrosomalen Abschnitt des Spermienkopfes detektiert; im Verlauf der Spermio-genese und Spermatidbildung depolymerisiert es zu G-Aktin (Vogl, 1989). Es wird angenommen, dass das im Akroplaxom detektierte F-Aktin mit zellulären Motorproteinen interagiert. Kierszenbaum et al. (2004) detektierten Myosin Va im Akroplaxom. Dies impliziert eine mögliche Beteiligung des zytoskelettalen Akroplaxoms am intramolekularen Vesikeltransport innerhalb der Manschette.

Die dritte zytoskelettale Komponente ist das Mikrotubuli-System. Es ist ebenso wie das Mikrofilamentsystem auch an der Zellmotilität, Geißelbewegung und dem zytoplasma-

tischen Vesikeltransport in der Zelle beteiligt und bildet eine strukturelle Komponente im Spindelapparat.

Die beiden Tubuli-Untereinheiten, das  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, bilden Heterodimere. Bei der Formierung der Mikrotubulstruktur werden nicht-kovalente lineare Polymere gebildet, die eine kinetische Dynamik zeigen. Diese kinetische Dynamik erlaubt es, permanente und transiente Strukturen aufzubauen. Dabei gibt es stabile, langlebige Mikrotubuli, wie z.B. die Axonemata. Zu den kurzlebigen Mikrotubuli zählt der Spindelapparat, der während der Mitose ausgebildet wird.

Jede Tubulin-Untereinheit bindet GTP. Das  $\alpha$ -Tubulin bindet GTP irreversibel, d.h. dass GTP nicht hydrolysiert wird. Das  $\beta$ -Tubulin hingegen bindet GTP reversibel, d.h. dass GTP bei der Polymerisierung zu GDP+P gespalten wird. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten sind, wie oben erwähnt, nicht kovalent verbunden. Die Seite, an die das GTP reversibel an die  $\beta$ -Tubuline gebunden ist, reguliert die Anlagerung von weiteren Tubulin-Untereinheiten (Desai und Mitchison, 1997).

Die longitudinal assoziierten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulindimere bilden Protofilamente. Diese Protofilamente lagern sich lateral aneinander und bilden eine zweidimensionale Struktur, die sogenannten *sheets*. Dabei kommt das  $\alpha$ -Tubulin des einen Protofilaments in Kontakt mit dem  $\alpha$ -Tubulin des benachbarten Protofilaments (Song und Mandelkow, 1993). Die aneinander gelagerten Protofilamente bilden schließlich einen hohlen Zylinder, den Mikrotubulus. Da alle Protofilamente in einem Mikrotubulus dieselbe Orientierung haben, bildet sich an den Mikrotubulusenden eine strukturelle Polarität aus.

Das eine Ende des Tubulines setzt sich aus den  $\alpha$ -Tubulin-Untereinheiten zusammen. Dieses Ende wird terminologisch als (-) Seite definiert. An der gegenüberliegenden Seite des Zylinders befinden sich  $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten. Die freien Tubulindimere binden präferentiell an die  $\beta$ -Tubulineinheit. Dabei wird das an dem  $\beta$ -Tubulin gebundene GTP zu GDP hydrolysiert. Dieses Ende wird terminologisch als (+) Seite definiert. Die Untereinheiten polymerisieren an der (+) Seite zu Mikrotubuli, wodurch es zur Elongation der Mikrotubuli kommt. Die Depolymerisation erfolgt präferentiell an der (-) Seite. Diese Polarität erlaubt eine Oszillation der Struktur zwischen Wachstum und Abbau.

*In vivo* geht die Orientierung und Polymerisation der Mikrotubuli vom MTOC, dem Centrosom, aus (Pickett-Heaps, 1969). Das langsam wachsende (-) Ende der Mikrotubuli liegt im Centrosom und die dynamische, schnell polymerisierende (+) Seite befindet sich distal (Heidemann und McIntoch, 1980). In der pericentriolaren Matrix (PCM), die die beiden Centriolen umgibt, befinden sich eine Reihe von Proteinen, die bei der centrosomalen Polymerisation der Mikrotubuli einen unterschiedlich starken Einfluss ausüben (Gould und Borisy, 1977; Kalt und Schliwa, 1993). Die molekularen Mechanismen, durch die im Centrosom die Mikrotubuli-Formation ausgeprägt wird, sind noch nicht verstanden.

Oakley und Oakley (1989) identifizierten das gamma-Tubulin als einen invarianten Faktor für die Mikrotubuli-Formation im Centrosom. Die Lokalisation des gamma-Tubulins im MTOC konnte mit Hilfe von Antikörpern gezeigt werden (Oakley et al., 1989). Gamma-Tubulin ist außerdem im Cytoplasma der somatischen Zellen der Vertebraten vorhanden (Stearns et al., 1994). Etwa 80 % des in der Zelle vorkommenden gamma-Tubulins ist Bestandteil eines 25S-Komplexes. Dieser gamma-Tubulin-Komplex

( $\gamma$ -TuRC) bindet, unabhängig vom Centrosom, an das (-) Ende der Mikrotubuli (Stearns et al., 1994).

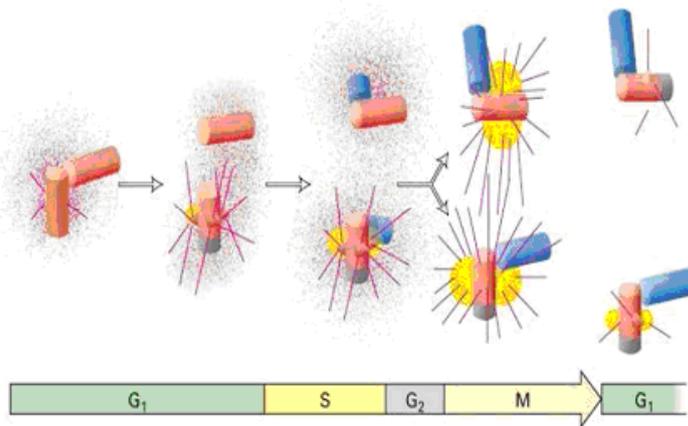
Mit Hilfe der immunelektronischen Tomographie und Antikörper-Affinitätschromatographie zeigten Moritz et al. (1995) ebenso wie Zheng et al. (1995), dass der gamma-Tubulin-Komplex ringförmig ist und sich aus sieben unterschiedlichen Proteinen zusammensetzt. In der Arbeit von Moritz et al. (1995) wird das Modell postuliert, dass sich die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulidimere longitudinal an den  $\gamma$ -TuRC binden. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulindimere werden über die Interaktion mit dem  $\gamma$ -TuRC stabilisiert und fungieren als Plattform, von der die Polymerisation ausgeht. Ein weiteres Modell beschreibt die Polymerisation ausgehend davon, dass das gamma-Tubulin Protofilamente bildet und sich daran die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulindimere lateral binden (Wiese und Zeng, 1999). In beiden Fällen wird von einer gamma-Tubulin vermittelten Polymerisation ausgegangen.

Fouquet et al. (1998) detektierten gamma-Tubulin in den proximalen und distalen Centriolen der runden Spermatiden. In den elongierenden Spermatiden lokalisierte die Arbeitsgruppe gamma-Tubulin in der PCM. Es wurde eine Assoziation von gamma-Tubulin mit der mikrotubulären Manschette gefunden. Dies impliziert eine Rolle des gamma-Tubulin bei der Bildung der axonemalen Strukturen im Spermenschwanz. In den murenen Spermatozoen wird kein gamma-Tubulin detektiert; es geht während der Spermatogenese verloren (Schatten, 1994). Das Centrosom und die Centriolen der Oocyte degenerieren vor der meiotischen Teilung (Stearns, 2001). Das gamma-Tubulin gehört zu den Proteinen, die während der Oogenese im Cytoplasma verbleiben. Es wird angenommen, dass die Wiederherstellung des zygotischen Centrosoms bei der Befruchtung maternale Komponenten des 25S- $\gamma$ -Tubulin-Komplexes benötigt (Schatten, 1994). Die Centriolen der humanen Zygote sind paternalen Ursprungs.

Die Centriolen somatischer Zellen duplizieren sich in jedem Zellzyklus. Die Duplikation der Centriolen wird zur selben Zeit im Zellzyklus initiiert wie die Replikation der chromosomalen DNS. In der G1-Phase besitzen die Zellen ein Centrosom mit zwei Centriolen, die orthogonal zueinander angeordnet sind. Das mature Centriol ist durch die distalen fibrillären Ausläufer charakterisiert. Nur dieses Centriol ist in der Lage, einen Basalkörper für ein primäres Cilium zu bilden, das nicht motil ist (Rider, 1982). Das immature Centriol besitzt weder die distalen, fibrillären Ausläufer, noch die Fähigkeit zur Cilienbildung (Sorokin, 1962). Beim Übergang von der G1- zur S-Phase teilt sich das Centriolenpaar und gibt seine orthogonale Anordnung auf. Seitlich aus den ursprünglichen Centriolen wachsen dann die Procentriolen, die neuen Centriolen (Abbildung 3). Während der G2-Phase elongieren die Procentriolen. In der pericentriolären Matrix des neuen Centrosoms ist dann das  $\epsilon$ -Tubulin detektierbar (Stearns, 2001). Während des Übergangs von der G2-Phase zur Mitose erlangt das immature Centriol in dem neuen Centrosom fibrilläre, distale Ausläufer.

Nach der Zellteilung besitzt jede Tochterzelle ein altes (matures) Centriol, das zwei Zellzyklen zuvor entstand, und ein neues (immatures) Centriol, das sich im vorhergehenden Zellzyklus gebildet hat (Kochanski und Borisy, 1990). Analog zur DNS-Replikation handelt es sich hier um eine semikonservative Duplikation.

**Abbildung 3 Centrosom Duplikation in Beziehung zum Zellzyklus**

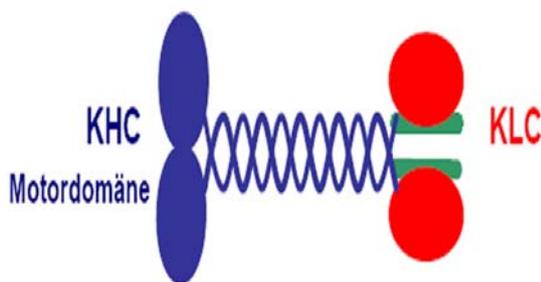


In der G1-Phase besitzen die Zellen ein Centrosom mit zwei parentalen Centriolen (rot), die orthogonal zueinander angeordnet sind. Das mature Centriol besitzt an seinem distalen Ende fibrilläre Ausläufer. Bei dem Übergang von der G1- zur S-Phase separieren die parentalen Centriolen, seitlich aus der ursprünglichen Centriole wachsen die Procentriolen (blau). Die Centrosomen duplizieren während der S-Phase. Hier entstehen zwei Centrosomen mit jeweils distinkten pericentriolären

Matrizes (gelb). Während der G2-Phase elongieren die Procentriolen. Während des Übergangs von der G2-Phase zur Mitose erlangt das immature Centriol in dem neuen Centrosom fibrilläre Ausläufer (Stearns et al., 2001), und das Cenexin-Protein ist dann ebenfalls nachweisbar. Verändert nach Lodish et al., 2004.

Spezifische Motorproteine, Kinesine und cytoplasmatische Dyneine, im Gegensatz zu den axonemalen Dyneinen, vermitteln den intrazellulären Transport entlang der Mikrotubuli. Die Kinesine sind aus jeweils zwei schweren (*heavy chain*) und zwei leichten, (*light chain*) Ketten aufgebaut (Abbildung 4). Die meisten Kinesine besitzen zwei *heavy chain*, z.B Kinesin I. Die schweren Ketten haben eine konservierte, globuläre ATP bindende Domäne und einen Schwanz, zusammengesetzt aus stabartigen, gestreckten Strukturen. Die globulären ATP-bindenden Domänen binden an die MTs, die Schwänze vermitteln die Spezifität für bestimmte zu transportierende Lasten (*cargo*). Über die Hydrolyse von ATP zu ADP wird chemische Energie in mechanische Energie konvertiert und in den meisten Fällen in Richtung (+) Ende der Mikrotubuli transportiert.

**Abbildung 4 Modell der Kinesinstruktur**



Am N-Terminus befindet sich die Motordomäne, an die sich die lange Stieldomäne der Kinesin-schweren-Ketten, *Kinesine havy chain* (KHC), anschließt (blau). Die C-terminale Domäne der Kinesin-schweren-Ketten (grün) interagiert mit den Kinesin-leichten-Ketten, *Kinesin light chain* (KLC) (rot). Die essentielle Region für die Transportgutbindung liegt in einem konservierten spiraligen Segment, das an die globuläre Schwanzdomäne im C-terminalen Bereich des Kinesinmoleküls angrenzt. Die zwei leichten Kinesinketten modulieren vermutlich die Bindung des Transportguts an die Mikrotubuli. (Brady und Pfister, 1991; Stenoiens u. Brady, 1997).

Bei Kinesinen befindet sich in der Regel die Motordomäne am N-Terminus des Proteins (N-Typ), bei anderen Kinesinen kann diese auch zentral (M-Typ) oder auch am C-Terminus (C-Typ) lokalisiert sein. N- und M-Typ Kinesine sind (+) *end-directed motors*, C-Typ Kinesine sind (-) *end-directed motors* (Vale et al., 1997; Kull et al., 2002). Kinesine werden in zwei funktionelle Gruppen unterteilt, die cytosolischen und mitotischen Kinesine. Cytosolisches Kinesin ist beim Vesikel und Organelltransport involviert. Die mitoti-

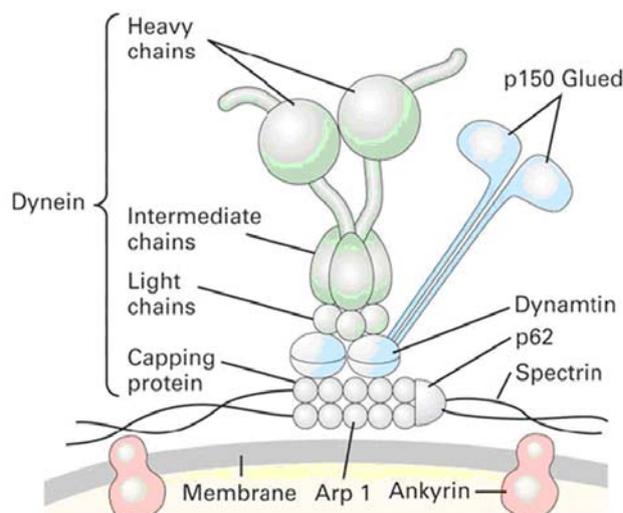
schen Kinesine organisieren unter anderem den mitotischen Spindelapparat, die Chromosom-Segregation und den Prozess der Zellteilung.

Anterograde Mikrotubuli Motorproteine, in der Regel Kinesin-basierende (+) *end-directed motors*, sorgen für den Vesikeltransport in Richtung Zellperipherie. Die retrograden Mikrotubuli-Motorproteine, (-) *end-directed motors*, sorgen für den Cargotransport in Richtung Centrosom.

Jüngste Forschungsberichte dokumentieren eine Assoziation von Kinesin-Protein mit den Mantelfaserproteinen unabhängig vom Mikrotubuli-Netzwerk (Bhullar et al., 2003). Die Expression des Kinesin-kodierenden Gens *kinesin light chain 3 (klc3)* erfolgt in postmeiotischen Keimbahnzellen der männlichen Säuger. ODF1 wurde als Bindungspartner mit dem KLC3-Protein identifiziert, die Interaktion wird dabei über die Leucin-Zipper vermittelt (Bhullar et al., 2003). Zhang et al. (2004) fanden eine Assoziation von KLC3 mit den Mitochondrien in dem Stadium der Spermatogenese, in der die Mitochondrien von der Plasmamembran zu den sich entwickelnden Mittelstück gelangen. Die Interaktion von KLC3 mit dem ODF und den Mitochondrien des Spermiums könnte, nach Annahme von Bhullar und Zhang, eine Bedeutung bei der akrosomalen- und Reifephase haben, in der die Umverteilung der Mitochondrien des Spermienkopfes erfolgt und somit bei der Ausbildung der axonemalen Morphologie Einfluß nehmen.

Das cytosolische Dynein gehört zu den retrograden, (-) *end-directed* Motorproteinen. Es besteht aus mehreren Untereinheiten (Abbildung 5) und ist ein außergewöhnlich großer Proteinkomplex. Es ist unter anderem am retrograden axonalen Transport und am Golgi Vesikeltransport zum Centrosom beteiligt (Allan et al., 2002; Dell et al., 2003). Das Protein besteht aus zwei bis drei *heavy chains*, die die Kopfdomäne determinieren. Transportbindungen und der intramolekulare Vesikeltransport des cytosolischen Dyneins erfolgen über die Interaktion des Dynaktin-Komplexes mit den leichten Ketten (*light chains*) des Dyneins (Schroer und Sheetz, 1991; Echeverri et al., 1996). Es spielt auch eine Rolle während des Prozesses der Mitose (Allan et al., 2002; Schroer, 1996; Vallee und Sheetz, 1996; Wittmann et al., 2001). Das axonemale Dynein ist bei der Geißelbewegung der Cilien und Flagellen involviert.

Der Heteroprotein-Komplex Dynaktin besteht aus mehreren Untereinheiten. Dem Protein Glued, p150 *Glued*, dem Säugetierhomolog des Drosophila Genproduktes *Glue*, das die Bindung von Dynein zu den Mikrotubuli vermittelt, dem filamentösen F-Aktin ähnlichen Arp-1-Protein, das an einem Ende mit dem *actin-capping* Protein und an der gegenüberliegenden Seite mit dem p62-Protein assoziiert ist (Schafer et al., 1994) und dem Dynamitin, das z.B. die Verbindung von Vesikeln und Chromosomen an die leichte Kette (*light chain*) des Dyneins herstellt (Abbildung 5).



**Abbildung 5 Cytosolisches Dynein und der Heteroprotein-Komplex Dynaktin**

Das cytosolische Dynein ist mit dem Dynaktin-Komplex über die leichte Kette des Dyneins und dem Dynamitin verbunden. Die Dynaktin Untereinheit setzt sich zusammen aus dem Protein Glued (Mikrotubulibindung), Arp1 (Aktin-ähnliches Protein, das über das p62

Protein und das *capping* Protein, an Spektrinen bindet) und dem Dynamitin, das die Verbindung an die leichte Kette des Dyneins vermittelt.  
Verändert nach Lodish et al., 2004.

Fouquet et al. (2000) detektierten das Arp1, eine Komponente des Dynaktin-Komplexes, in den runden Spermatiden, im Centrosom und im Golgi-Apparat dabei haben die stadienspezifischen Lokalisationen von Arp1 während der Spermiogenese keine Detektion in den testikulären Spermatozoa gezeigt. In den elongierenden Spermatiden wurde das Arp1 in der Manschette lokalisiert. In den prämaternen Spermatiden ließ sich das Arp1-Protein in den pericentriolären Strukturen nachweisen, wohingegen das Protein bei den testikulären Spermatozoen nicht detektiert werden konnte. Diese stadienspezifische Lokalisation von Arp1 während der Spermiogenese impliziert eine Beteiligung bei den unterschiedlichen zellulären Differenzierungsprozessen der Spermatogenese.

Die Mikrotubuli-bindende Seite des *Glued* besteht aus dem CLIP170, einem Mikrotubuli-assoziierten Protein, das bei dem Prozess des Vesikeltransports die Verbindungen zwischen den Mikrotubuli und den endocytischen/endosomalen Vesikeln herstellt (Perez et al., 1999). Homozygote weibliche CLIP170 *knock out* Mäuse sind entwicklungsfähig und vital. Die männlichen *knock out* Mäuse hingegen zeigten Unregelmäßigkeiten bei der Spermiogenese. Sie produzierten Spermien mit abnormen Köpfen. Akhmanova et al. (2005) beobachteten dabei Unterschiede bei der CLIP170 Expression während der Spermatogenese im Vergleich zur Spermiogenese. Dem Protein wird eine wesentliche Rolle bei der Spermatidendifferenzierung und der Ausbildung der speziesspezifischen Morphologie des Spermienkopfes zugewiesen.

### 1.2.2 Bedeutung der Spermischwanzproteine bei der Befruchtung

Bei der Befruchtung fusioniert das Spermium mit der Oocytenmembran. Nach der vollständigen Verschmelzung der beiden Membranen dringt der Spermienkern in die Oocyte ein. Beim Menschen gelangt der Hauptteil des Flagellums<sup>5</sup>, das die Geißelbewegung des Spermiums vermittelt, mit in die Oocyte. Die bei Cilien und Flagellen im Zytoplasma eingebetteten Basalkörper zeigen strukturelle Analogien zu den Centriolen (Schatten, 1994). Die Centriolen des Spermiums, die mit in die Oocyte gelangt sind, formieren sich zum MTOC, dem Centrosom, und strahlen von hier Mikrotubulibündel aus. Diese Mikrotubulibündel (Aster) treten mit dem weiblichen Pronukleus in Verbindung. Über die Mikrotubulistränge wandert der weibliche Pronukleus auf den männlichen Pronukleus zu. Dieser Vorgang wird als Asternbildung bezeichnet. Die jeweiligen Kernmembranen lösen sich auf und die beiden haploiden Chromosomensätze fusionieren, es entsteht die Zygote. Bis heute sind die regulatorischen Mechanismen der Asternbildung noch nicht vollständig bekannt. Experimente, bei denen unbefruchtete Oocyten mit Spermienköpfen injiziert wurden, lösten keine Asternbildung aus. Bei Experimenten, bei denen isolierte Mittelstücke des Spermischwanzes in die unbefruchtete Oocyte injiziert wurden, konn-

---

<sup>5</sup> Flagellen, wie z.B der Spermischwanz, und Cilien sind mikrotubuläre Strukturen und besitzen dieselbe basale Struktur.

te die Formierung der Aster induziert werden (Pinto-Correia et al., 1994). Eine der Hauptproteinkomponenten des Mittelstücks ist dabei das ODF2. Der MPM-2-Antikörper detektiert centrosomale Proteine und zeigt dabei ein sehr komplexes Proteinbandenmuster (Vandre et al., 1991; Long et al. 1997), das genau dem komplexen Bandenmuster der ODF2-Proteine entspricht (Hoyer-Fender, persönliche Mitteilung).

Diese ersten Daten ließen eine direkte oder indirekte Bedeutung des ODF2-Proteins in centrosomale Prozesse vermuten. Die Arbeitsgruppe Lange et al. (1995) identifizierte einen molekularen Marker für das mature Centriol (Cenexin) ein Element des Centrosoms. Cenexin2 zeigt eine Aminosäuresequenzidentität von 99 % mit dem testikulären ODF2-Protein. Nakagawa et al. (2001) lokalisierte ODF2 an den distalen/subdistalen Anhängseln der maturen Centriolen. Dies impliziert nun einen Einfluß von ODF2 auf centriolare Prozesse. Versuche der Arbeitsgruppe Hoyer-Fender, bei denen Injektionen von testikulären *Odf2* in unbefruchtete Maus-Oocyten vorgenommen wurden, induzierten eine Zellteilung bis zum Achtzellstadium (unpublizierte Beobachtung). Die Daten ließen vermuten, dass das ODF2-Protein bei der Induktion des zygotischen Centrosoms und bei der zellulären Organisation eine wesentliche Rolle spielen könnte. Daraufhin wurden Versuche zur Lokalisation und Organisation von testikulären *Odf2* in somatischen Zellen vorgenommen, die darüber weitere Hinweise liefern sollten.

### 1.3 Ziele der vorliegenden Arbeit

In jüngster Zeit wurden Transkripte des testikulären ODF2-Proteins in somatischen Zellen detektiert. Im Vordergrund des Interesses war es zu verstehen, wie sich das testikuläre ODF2-Protein in somatischen Zellen organisiert, welche Interaktionen es dabei eingeht und bei welchen zellulären Prozessen ODF2 involviert ist. Bereits beschriebene Wechselwirkungsbeziehungen des ODF2-Proteins mit dem ODF1-Protein (Shao et al., 1997) lassen vermutet, dass über diese Interaktion ein molekulares Netzwerk generiert wird. Um nachzuvollziehen, inwiefern sich die ODF1/ODF2 Interaktion in somatischen Zellen manifestiert, sollten mit Hilfe der konfokalen Dualchromophorenmikroskopie Lokalisationen und Morphologien ODF1/ODF2-GFP-Fusionsprotein-koexprimierender Säugerzellen analysiert werden.

Die Assoziation von ODF2 mit dem Mikrotubuli-Netzwerk war anhand vorheriger immunocytologischer Experimente beschrieben worden (Donkor, 2001). In dieser Studie sollte der Frage nachgegangen werden, ob diese Assoziation aus einer physikalischen Wechselwirkungsbeziehung entstanden war. Dazu sollten Mikrotubuli-Kosedimentations experimente durchgeführt werden. Mikrotubuli spielen eine wichtige Rolle bei der Organisation und Positionierung der Zellorganellen und bei den intramolekularen Transportprozessen. Zelluläre Kolokalisationsexperimente mit Hilfe der indirekten konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie sollten Hinweise auf Assoziationen des ODF2-Proteins mit Zellorganellen geben.

Der mikrotubuliabhängige intrazelluläre Proteintransport und der Einfluss der Verteilung von Membranorganellen wurde in ODF2-überexprimierenden Zellen über die Zugabe von Brefeldin A und der Überexpression von Dynamitin fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Ein *Yeast-two-hybrid* Experiment an Rattenhirn cDNS-Bibliothek sollte Interaktionspartner des ODF2-Proteins bei den Proteintransportwegen und den putativen Mikrotubulibindungspartner identifizieren helfen.

Die Lokalisation von ODF2 in den distalen/subdistalen Anhängseln der maturen Centriole Nakagawa et al. (2001) leitete zur Frage über, ob ODF2 eventuell im Verlauf des Zellzyklus einen Einfluß auf centriolare Prozesse wie Centrosomenduplikation haben könnte. Dazu sollten Proliferationsexperimente, Durchflusszytometrieanalysen und fluoreszenzmikroskopische Lebendzellaufnahmen an ODF2-überexprimierenden Säugerzellen Hinweise darauf geben.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 cDNS-Bibliothek

Rattenhirn cDNS-Bibliothek in pJG4-5 (MoBiTec).  
Rattentestis cDNS-Bibliothek in ZAPII (Stratagene).

#### 2.1.2 Antikörper

##### 2.1.2.1 Primäre monoklonale Antikörper

anti- $\alpha$ -Tubulin, Oncogene Research Products CALBIOCHEM® Cat# CP06,  
anti- $\gamma$ -Tubulin, Sigma Clone GTU-88 Mouse Ascites Fluid T6557,  
anti-human Golgin97, mouse monoclonal CDF4, MoBiTec A-21270,  
anti-Hsp47 (Colligin), mouse monoclonal MoBiTec # SR-B470,  
MitoTracker® *Mitochondrion-Selective Probes*, MoBiTec M-75123,  
myc-Antikörper freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Kerstin Meier,  
Arbeitsgruppe Prof. Wimmer.

##### 2.1.2.2 Primäre polyklonale Antikörper

anti-GFP, MoBiTech A-6455,  
anti-ODF2, Brohmann et al., 1997.

##### 2.1.2.3 Sekundäre Antikörper

anti-Kaninchen Immunglobulin IgG Antikörper; gekoppelt an Meerrettichperoxidase,  
Sigma Immuno Chemicals,  
anti-Maus IgG-Antikörper, an Cy 3 gekoppelt, Sigma Immuno Chemicals,  
MFP590 goat anti-mouse IgG (H+L), MoBiTec MFP-A1032.

### 2.1.3 Bakterien- und Hefestämme

#### 2.1.3.1 Bakterienstämme

Zur Vermehrung der rekombinanten DNS bzw. der Vektoren wurde der folgende Wirtsstamm eingesetzt:

*Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1983)

Zur Generierung von GST und GST-Fusionsproteine wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) (Studier und Moffatt, 1986) verwendet.

[F<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>*, (*r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>*), *gal*, *dcm*, (DE3)]

#### 2.1.3.2 Hefestämme

Der verwendete Hefestamm: *Saccharomyces cerevisiae* EGY48 [*MAT $\alpha$* , *trp1*, *his3*, *ura3*, *leu2::6 LexAop-LEU2*]

Dem Stamm wurde das LEU2 Reportergen integriert. Dieses Gen enthält Kopien 2:6 des LexA Operator *upstream* zum Promotor

## 2.1.4 Vektoren

pGEM-T	Promega
pBluescript-SK	Promega
pEGFP-N1	Clontech
pECFP-C1	Clontech
pEYFP-N1	Clontech
GFP Reporter Plasmid pGNG1	MOBiTech
<i>Bait Plasmid</i> pEG202	MOBiTech
<i>Prey Plasmid</i> pJG4-5	MOBiTech
pMAL™c2x	New England Biolabs. freundlicherweise von Richard Vallee zur Verfügung gestellt

## 2.1.5 Enzyme

Restriktionsendonukleasen, MBI Fermentas, Pharmacia, Promega  
 Taq-Polymerase, PeqLab  
 T4-Ligase, MBI Fermentas

## 2.1.6 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von MWG hergestellt.

### 2.1.6.1 Spezifische Odf-Primer

Die angegebenen Bindebereiche der *Odf1*-spezifischen Primer beziehen sich auf die von Burfeind et al. (1993) veröffentlichte cDNS-Sequenz. Analog dazu beziehen sich die Bindebereiche der *Odf2*-spezifischen Primer auf die von Brohmann et al. (1997) publizierte cDNS-Sequenz.

5/1-1 (*Odf1*) Bindestelle 837-822  
 5'-ATGCTGACGGAGCCTA-3'

SHF 32 (*Odf1*), Bindestelle 115-132  
 5'-CTTTTGGACAGTGTTAGA-3'

SHF 82 (*Odf2*), Bindestelle 1352-1370  
 5'-CTCGGCATACTCCTCACTC -3'

SHF 85 (*Odf2*), Bindestelle 421-438  
 5'-GAGTGACCTTTCTACAGA-3'

*Odf1*-N, mit *SacI* und *HindIII* Schnittstellen, Bindestelle 97-114  
 5'-GAGCTCAAGCTTTGGCCGCACTGAGTTGTC-3'

*Odf1*-C, mit *KpnI* und *SacII* Schnittstellen, Bindestelle 830-813  
 5'-CCGCGGTACCCAAGATCATCTTCTACTACA-3'

*Odf2*-N2, mit *EcoRI* und *HindIII* Schnittstellen, Bindestelle 1412-1429  
 5'-TCGAATTCGTATGGAAGCTTTATCTACTCTG-3'

*Odf2*-C1, mit *SmaI* und *BamHI* Schnittstellen, Bindestelle 1588-1569  
 5'-TGGATCCCGGGTCTCTCTACCAAGCTGTG-3'

*Odf2-C2*, mit *SmaI* und *BamHI* Schnittstellen, Bindestelle 1424-1408  
 5'-TGGATCCCGGGTAGATAAAGCTTCAGC-3'

### 2.1.6.2 Vektorenspezifische Primer

Die angegebenen Bindebereiche der Vektoren-spezifischen Primer beziehen sich auf die von Clontech bzw. MoBiTec angegebenen Sequenzen.

pEGFP-N1 reverse, Bindestelle 773-755  
 5'-CGGACACGCTGAACTTGTG-3'

pEGFP-C1 forward, Bindestelle 1306-1324  
 5'-CAAAGACCCCAACGAGAAG-3'

pEGFP-N1 forward, Bindestelle 548-565  
 5'-CAAAGACCCCAACGAGAAG-3'

5'-PREY-Primer  
 5'-CTG AGT GGA GAT GCC TCC-3'

3'-PREY-Primer  
 5'-GCC GAC AAC CTT GAT TG-3

### 2.1.7 Nährmedien

#### 2.1.7.1 Nährmedien zur Anzucht von *Escherichia coli*

Luria-Bertani (LB)-Medium:	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 170 mM NaCl pH 7,2
LB-Agar:	15 g Agar pro 1 l LB-Medium
Kanamycin-Platten:	LB-Agar 50 µg/ml Kanamycin
OJA-Platten:	1 l LB-Agar 75 µg/ml Ampicillin 0,004 % X-Gal 1 mM IPTG

#### 2.1.7.2 Nährmedien zur Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

YPD	2 % (w/v) Glukose, 2 % (w/v) Bactopecton, 1 % (w/v) Hefe-Extrakt
SC complete	2 % (w/v) Glukose, 0,175 <i>Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate</i> , 0,51% Ammoniumsulfat, 680 mg/l SC
SC drop out	2 % (w/v) Glukose, 0,17 % <i>Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate</i> 0,51% Ammoniumsulfat,(680-x) mg/l SC x: Komponente, auf deren Prototrophie selektioniert wurde
SC drop out (Gal/Raf)	2 % (w/v) Galaktose, 1% (w/v) Raffinose, 0,17 % <i>Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate</i> 0,51 % Ammoniumsulfat, (680-x) mg/l SC x: Komponente, auf deren Prototrophie selektioniert wurde.

*Synthetic Complete* (SC) ist eine Mischung aus Aminosäuren und Nukleobasen. In *drop out*-Medien wurde jeweils diejenige Komponente, auf deren Prototrophie selektioniert wurde, weggelassen.

**Tabelle 1 Aminosäurenkomponenten in Nährmedien zur Prototrophieselection und Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*.**

Aminosäuren	mg/ Liter Medium	Aminosäuren	mg/ Liter Medium
Adenin	40 mg	Prolin	20 mg
Arginin	30 mg	Serin	200 mg
Histidin	20 mg	Threonin	200 mg
K-Glutamat	100 mg	Tryptophan	30 mg
Leucin	40 mg	Tyrosin	30 mg
Lysin	40 mg	Uracil	20 mg
Methionin	20 mg	Valin	65 mg
Phenylalanin	50 mg	Isoleucin	20 mg

### 2.1.8 Sterilisation

Die Sterilisation der Nährmedien erfolgte bei 105 Pascal und 120°C für 60 min im Dampfdruckautoklaven. Die Lösungen, die nicht durch feuchte Hitze sterilisiert werden konnten, wurden durch einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert.

Glukose wurde getrennt autoklaviert. Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren erst bei einer Temperatur von 50°C zugesetzt.

Feste Medien enthielten 1,5% (w/v) Agar. Antibiotika wie Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) oder Kanamycin (Endkonzentration 30 µg/ml) wurden bei Bedarf nach dem Autoklavieren aus einer Stammlösung zugesetzt, nachdem die Lösung auf unter 50°C abgekühlt war.

### 2.1.9 Geräte

Axioplan 2, Zeiss, *image*

Autoklav, Varioklav Dampfsterilisator

Binokular, Olympus S2X12

Zentrifugen:

Beckmann L 8 M Ultrazentrifuge

Sorvall RC 28S

Hettich

Rotoren:

Universal 30 RF

SS 34

AH 650

### 2.1.10 Chemikalien

Acrylamid/ Bisacrylamid, 30 % Stammlösung (29/1), Gerbu

Aminocaprinsäure, Sigma

Ammoniumperoxodisulfat (APS), Sigma

Antibiotika:

Ampicillin, Sigma

G418 Gentamycin-Sulfat, Calbiochem®

Penicillin, Gibco BRL® Life Technologies®

Penicillin/Streptomycin, Gibco BRL® Life Technologies®

Kanamycin, Sigma

Bacto®-Trypton, DIFCO Laboratories

Bacto®-Hefeextrakt, DIFCO Laboratories

Brefeldin-A, Sigma

4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI), Sigma



BRB80X:	80 mM Pipes pH 6,8, 1 mM MgCl 1 mM EGTA 0,5 mM DTT, 1 mM GTP 5 µM taxol, 10 µM Benzamidine-HCl, 10 µg/ml Aprotinin 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin.
Dejelling-Buffer:	110 mM NaCl 20 mM Tris 0,1 mM EGTA 2 % Cystein pH 8,5
HBB:	25 mM HEPES pH 7,9 25 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM DTT
Homogenisationspuffer (Puffer 1):	10 mM HEPES pH 7,6 25 mM KCl 0,15 mM Spermin 0,5 mM Spermidin 1 mM EDTA 1,94 M Sucrose 10 % Glycerin (v/v)
Homogenisationspuffer (Puffer 2):	90 % Homogenisationspuffer (Puffer 1) + 10 % Glycerin
High-Salt-Buffer 10 x (HSB):	110 mM NaCl 2 mM KCl 1 mM MgSO <sub>4</sub> 0,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM NaHCO <sub>3</sub> 15 mM Tris-HCl pH 7,4
Kernpuffer:	10 mM HEPES pH 7,9 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,1 mM EDTA 0,5 mM DTT 0,1 mM PMSF
10 x Laemmli Elektrophorese Puffer:	250 mM Tris-HCl pH 8,3 1,92 M Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Natriumphosphat-Puffer:	1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 8,1
PBS:	0,075 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,15 mM KCl 6,85 mM NaCl pH 7,4
PBST	1000 ml PBS 0,5 ml Tween <sup>®</sup>
PEM-1:	0,1 mM Pipes, pH 7,6; 1 mM EGTA, 1 mM MgSO <sub>4</sub>

Reassembly Buffer (BRB):	80 mM K-Pipes pH 6,8 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EGTA 1 mM DTT 1 mM PMSF 2 µg/ml Pepstatin 2 µg/ml Aprotinin 1 µg/ml Leupeptin
Sammelgel-Puffer:	0,375 M Tris-HCl pH 6,8 0,3 % SDS
50 x TAE Puffer:	2 M Tris-Acetat pH 8,0 50 mM EDTA
<i>swelling solution:</i>	1 mM EGTA, pH 7.6 1 mM MgSO <sub>4</sub>
TBB:	10 mM Tris-HCl pH 7,5 50 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT
TBST:	20 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5 60 ml 5 M NaCl 1 ml Tween <sup>®</sup> 20 auf 2 l
Towbin-Transferpuffer:	25 mM Tris-HCl pH 8,3 192 mM Glycerin 20 % Methanol 0,1 % SDS 1 mM MgCl <sub>2</sub>
Trenngelpuffer:	1,125 M Tris-HCl pH 8,8 0,3 % SDS (w/v)

### 2.1.12 Gebrauchsfertige Kits

Effectene™ Transfection Reagent, Qiagen®  
 Mini-Präparations Kits von PeqLab®  
 Plasmid Mini-Prep Kit, Qiagen®  
 Plasmid Midi Kit (100), Qiagen®  
 QIAEX II Agarose Gel Extraction®, Qiagen®  
 Renaissance® Western Blot Chemiluminescence Reagent, NEN  
 Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep, Zymo Research Corp.  
 Grow'N'Glow High Efficiency Yeast Transformation Kit, MoBiTec #22001

### 2.1.13 Sonstiges

Amicon-Säulen, Millipore  
 Sterile Deckgläser (22 mm<sup>2</sup> Fläche), Krannich  
 DNS-Molekulargewichtsstandards (GeneRuler), MBI Fermentas  
 Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech  
 PVDF, PolyScreen®, NEN™ Life Science Products  
 Röntgenfilme Contatyp CX-BL, Typon Röntgenfilm GmbH  
 SDS-PAGE Molekulargewichtsstandard Nr. 161-0317 Broad Range, Bio-Rad  
 Tubulin-Tetramethylrhodamin-Konjugat aus Rinderhirn, MoBiTec  
 Whatman-Papier, Schleicher & Schuell

### 2.1.14 Zelllinien

Verwendet wurde die COS-7-Zelllinie. Die Zellen besitzen eine fibroblastenartige Morphologie. Die COS-7-Zellen sind eine permanente Zelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*). Im Erbmaterial der COS-7-Zellen sind Teile des Genoms des Affenvirus SV40 integriert. Eingesetzt bei den immunzytologischen Experimenten, Proliferations Experimenten, Brefeldin A Versuchen, FACS-assay sowie bei der Mikrotubuli-Kosedimentation.

Die HeLa-Zelle ist eine menschliche immortale Cervix-Karzinom Zelllinie. Die adhärenenten Zellen wurden eingesetzt bei den immunzytologischen Experimenten, Brefeldin A Versuchen, FACS-assay und *Life-Imaging*.

### 2.1.15 Medien für die Zellkultur

DMEM, Gibco BRL® Life Technologies®

CO<sub>2</sub>-Independent, Gibco BRL® Life Technologies®

RPMI, Gibco BRL® Life Technologies®

#### Medium für die COS-7-Zellen:

DMEM, 10 % hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum, Gibco BRL® Life Technologies®

5 % Penicillin/Streptomycin (5000 U), Gibco BRL® Life Technologies®

#### Medium für die HeLa-Zellen:

DMEM, 10 % hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum, Gibco BRL® Life Technologies®

5 % Penicillin/Streptomycin (5000 U), Gibco BRL® Life Technologies®

#### Medium für die Inkubation bei Langzeit-Mikroskopie:

CO<sub>2</sub>-Independent Gibco BRL® Life Technologies®

10 % hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum, Gibco BRL® Life Technologies®

5 % Penicillin/Streptomycin (5000 U), Gibco BRL® Life Technologies®

### 2.1.16 Software

Adobe Photoshop 5.5

Zeiss Laser Scanning Software LSM 510 Release 2.01

WinMedi 2.8 (J. Trotter, <http://facs.scripps.edu/>)

FlowJo Version 5.7.2

ImageJ Version 1.33u

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Klonierung von *Odf1* und *Odf2* in GFP-Expressionsvektoren

#### 2.2.1.1 Erzeugung der Konstrukte

Das *green fluorescent protein* (GFP) ist ein monomeres Protein von 27 kDa (238 Aminosäuren) aus dem Organismus *Aequorea victoria*. Das Protein ist in der Lage, autokatalytisch fluoreszierende Pigmente zu bilden. Es absorbiert das blaue Licht (bei max. 395 nm) und emittiert das grüne Licht bei einem Maximum von 508 nm. Der

pEGFP-N1-Vektor (*enhanced green fluorescent protein*) kodiert für eine stärker fluoreszierende Variante des nativen GFP.

Der dem Reporter gen EGFP vorgeschaltete Promotor (CMV) ermöglicht hohe Expressionsraten in Säugerzellen. Zwischen dem Promotor und dem offenen Leserahmen des *EGFP*-Gens befindet sich eine multiple Klonierungsstelle (*mcs*). Die *mcs* ermöglicht die Insertion von zusätzlicher DNS. Bei einer Klonierung im selben Leserahmen wie EGFP kann ein Fusionsprotein exprimiert werden, wobei der EGFP-Anteil im C-terminalen Bereich des Fusionsproteins lokalisiert ist.

Der pEYFP-N1-Vektor kodiert eine gelb-grün fluoreszierende Variante des GFPs, die Licht bei 513 nm absorbiert und im Bereich von 527 nm emittiert. Bei Klonierung im selben Leserahmen wie EYFP kann ein Fusionsprotein exprimiert werden. Bei dem resultierenden Fusionsprodukt ist der EYFP-Anteil im C-terminalen Bereich.

Der pECFP-C1-Vektor kodiert eine blau fluoreszierende Variante des GFPs, die Licht bei 433 nm absorbiert und im UV-Bereich bei 475 nm emittiert. Im generierten Fusionsprotein ist der ECFP-Anteil im N-terminalen Bereich.

Am 3'-Ende des Reporter gens befindet sich ein SV40 Polyadenylierungssignal, das eine effiziente Prozessierung des 3'-Endes gewährleistet. Die drei Plasmide generieren eine Neomycin-Resistenz und ermöglichen somit stabile Transfektionen in eukaryotischen Zelllinien. Weiterhin vermitteln die Vektoren eine Kanamycin-Resistenz für Klonierungs- und Amplifikationsarbeiten in *E. coli*.

Über eine PCR mit *Odf*-spezifischen Primern wurde aus der cDNS der Ratte bzw. der Maus (Burfeind et al., 1991), der transkribierte Bereich der jeweiligen cDNS amplifiziert. Die Primer trugen jeweils an ihrem 5'-Ende zusätzliche Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen (2.1.6.1). Das PCR-Produkt wurde enzymatisch geschnitten. Die DNS-Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, isoliert und entweder direkt oder über einen Subklonierungsschritt in pGEM-T bzw. pBlueskript eingebracht und abschließend in pEGFP-N1, pEYFP-N1 bzw. pECFP-C1 ligiert. Für die Ligation wurden 0,1 µg zu klonierendes DNS-Fragment mit 0,5 µg Vektor bei 16°C über Nacht ligiert. Die Klonierung im korrekten Leserahmen zum GFP-Reporter gen wurde durch Sequenzierungen überprüft.

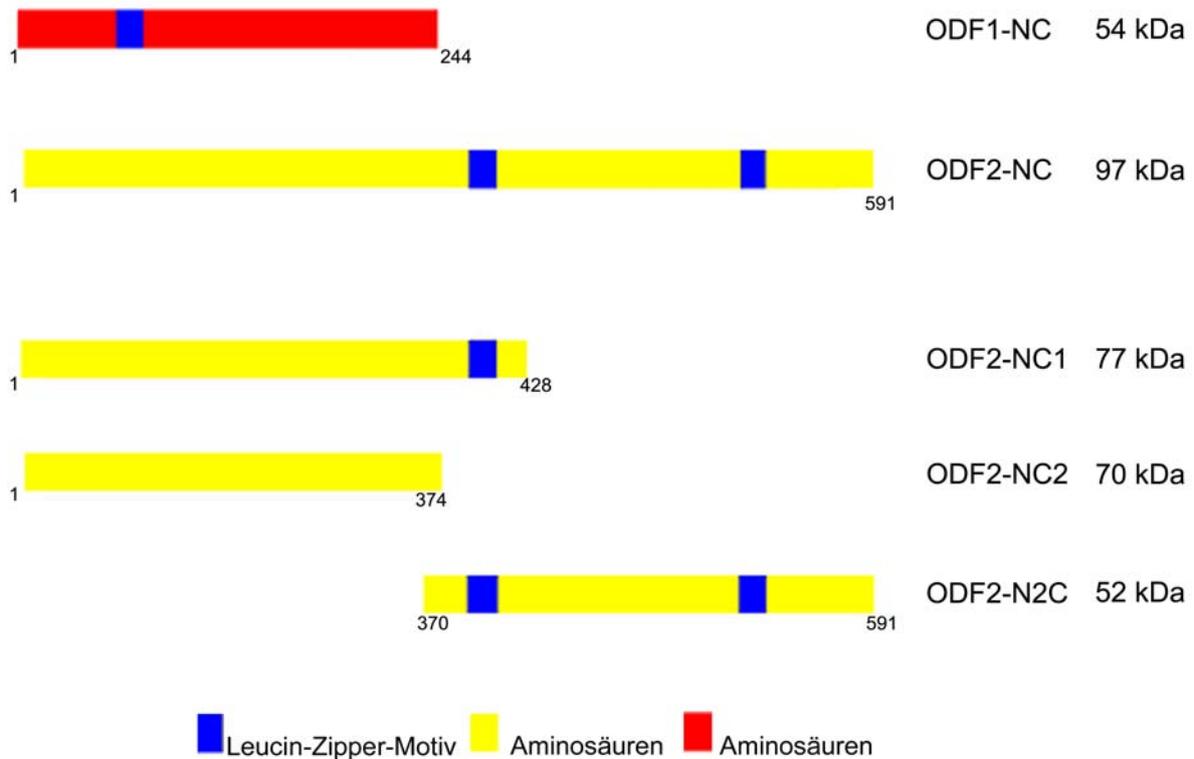
Das *Odf2*-NC-Konstrukt beinhaltet das gesamte Protein von AS 1 bis AS 591 (*accession number* AAC53134). Im C-terminalen Bereich von AS 392 bis AS 413 und von AS 530 bis AS 551 sind zwei Leucin-Zipper-Motive vorhanden (Brohmann et al. 1997).

Alle übrigen Konstrukte wurden analog über PCR Amplifikationen erzeugt und im korrekten Leserahmen in pEGFP-N1 oder pEYFP-N1 eingebracht. Die generierten Fusionsproteine sind in Abbildung 6 dargestellt. Sie enthalten den GFP-Anteil jeweils am C-terminalen Ende. ODF2-NC1 (ODF2  $\Delta C_{429-591}$ ) enthält eines der beiden Leucin-Zipper-Motive, ODF2-NC2 (ODF2  $\Delta C_{375-591}$ ) enthält kein Leucin-Zipper-Motiv und ODF2-N2C (ODF2  $\Delta N_{1-369}$ ) ist das N-terminal verkürzte Fragment mit beiden Leucin-Zipper-Motiven (Abbildung 6).

Das *Odf1*-Gen kodiert für ein Protein mit einem putativen Leucin-Zipper-Motiv im N-terminalen Bereich von Aminosäure AS 69 bis AS 95 (Burfeind et al., 1991). Das ODF1-Protein hat ein Molekulargewicht von ca. 27 kDa. Zusammen mit dem ECFP von 27 kDa ergibt sich daher eine theoretische Größe des Fusionsproteins von 54 kDa (Abbildung 6).

Alle Konstrukte wurden ansequenziert und damit der korrekte Leserahmen und der Übergang zum EGFP, ECFP und EYFP bestätigt (ohne Abbildung).

Die rekombinanten pEGFP-N1, pEYFP-N1 und pECFP-C1-Vektoren können über Standardtransfektionsprotokolle in eukaryotische Zellen eingebracht werden. Somit besteht die Möglichkeit, die rekombinanten Fusionsproteine *in vivo* zu analysieren.



**Abbildung 6 Schematische Übersicht über die in den Konstrukten enthaltenen Proteinbereiche.**

ODF1-NC hat eine Länge von 244 AS mit einem N-terminalen Leucin-Zipper-Motiv (AS 69-AS 96).

ODF2-NC hat eine Länge von 593 AS mit zwei C-terminalen Leucin-Zipper-Motiven (AS 392-AS 413 und AS 530-AS 551).

ODF2-NC1 hat eine Länge von 428 AS mit einem Leucin-Zipper-Motiv (AS 392-AS 413; ODF2  $\Delta C_{429-591}$ ).

ODF2-NC2 hat eine Länge von 374 AS ohne Leucin-Zipper-Motiv (ODF2  $\Delta C_{375-591}$ ).

ODF2-N2C hat eine Länge von 235 AS mit zwei Leucin-Zipper-Motiven (AS 392-AS 413 und AS 530-AS 551; ODF2  $\Delta N_{1-369}$ ).

Die angegebenen Molekulargewichte beziehen sich jeweils auf die Fusionsproteine, d.h. sie sind inklusive des Molekulargewichts von EGFP, EYFP und ECFP von 27 kDa.

### 2.2.1.2 Transformation von *E. coli*

Die kompetenten Zellen wurden zur Transformation auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurden 1  $\mu$ g zu transformierende DNS (maximal 20  $\mu$ l) zugegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wurde der Ansatz einem Hitzeschock unterzogen (45s, 42°C). Im Anschluss wurde der Transformationsansatz für fünf Minuten auf Eis abgekühlt. Zu den Zellen wurden 300-800  $\mu$ l LB-Medium gegeben und die Kultur wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 200  $\mu$ l der Zellkultur auf Selektionsmedium ausplattiert. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 2.2.2 DNS-Präparation

### 2.2.2.1 Plasmidpräparation mit Hilfe des Mini-Präparations-Kits von PeqLab

Die Isolation von Plasmid-DNS aus Bakterienkulturen basiert auf dem Verfahren der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979).

Je nachdem, ob es sich um ein Plasmid mit niedriger oder hoher Kopienzahl handelt, erlaubt dieser Kit die Extraktion von 6-20 µg Plasmid-DNS aus 3-5 ml Bakterienkultur. Es wurde eine Übernachtskultur angeimpft und 12-16 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Diese bakterielle Übernachtskultur wurde durch Zentrifugieren für 10 min bei 5.000 x g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Isolierung der DNS erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

### 2.2.2.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNS

Die Methode nach Qiagen® ermöglicht die Isolation von hoch sauberer Plasmid-DNS in einer Menge von 80-100 µg. Diese Plasmid-DNS wurde für Transfektionen und für automatische Sequenzierungen eingesetzt.

Die Isolierung der DNS erfolgte nach den Angaben des Herstellers (2.1.12)

### 2.2.2.3 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen mit Hilfe des MinElute™ Gel Extraction Kits

Die entsprechenden DNS-Fragmente wurden unter einer UV-Lampe bei 360 nm aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung der DNS-Fragmente aus dem Agarosegel erfolgte nach den Angaben des Herstellers (2.1.12).

### 2.2.2.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNS

Zur Ermittlung der DNS-Konzentration erfolgte eine Messung im Spektralphotometer. Gemessen wurde bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren. Die Reinheit der Probe wurde ermittelt, indem zusätzlich bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen und aromatischen Aminosäuren gemessen wurde. Dabei sollte ein ideales Verhältnis  $OD_{260} : OD_{280}$  von 2 : 1 vorhanden sein.

Die Konzentration der DNS ermittelt sich aus folgender Gleichung:

$$C_{\text{Probe}} \mu\text{g}/\mu\text{l} = (E_{\text{Probe}} - E_0) \cdot V \cdot K$$

$E_0$  = Extinktion des Nullwerts

$V$  = Verdünnungsfaktor

$K$  = Konzentrationskoeffizient (für doppelsträngige DNS = 0,05 µg/µl)

## 2.2.3 Restriktionsverdau von Plasmid-DNS

Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNS erfolgte nach Brooks, 1987. Die Restriktionsendonukleasen der Klasse II sind bakterielle Enzyme. Sie spalten die beiden Stränge eines DNS-Moleküls innerhalb oder benachbart zu ihrer spezifischen Erkennungssequenz. Die Erkennungssequenzen bestehen in der Regel aus vier bis acht Basenpaaren und bilden meistens ein Palindrom. Die Plasmid-DNS wurde mit Restriktionsendonukleasen nach den Angaben des Herstellers für 2 h inkubiert. Dabei wurden pro µg DNS 1 U Enzym eingesetzt. Der Restriktionsansatz wurde anschließend in einem 1 % igen Agarosegel analytisch oder präparativ elektrophoretisch getrennt.

## 2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction) PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient zur selektiven Anreicherung spezifischer Nukleinsäuresequenzen aus einer Mischung von Nukleinsäuremolekülen (Saiki et al., 1985). 50 ng DNS, 1  $\mu$ l 10 mM dNTPs (pH 7,2), zwei flankierende synthetische Oligonukleotide (100 ng/ $\mu$ l), 5  $\mu$ l 10 x PCR Puffer, 3  $\mu$ l  $MgCl_2$  (26 mM) und 1 U *Taq*-Polymerase wurden eingesetzt. Der Ablauf unterteilt sich in zwei Zyklen:

A: Die DNS wurde zunächst für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend amplifiziert.

B: Der Amplifikationszyklus setzt sich aus drei Phasen zusammen:

- (i) die Denaturierung [30 s, 95°C],
- (ii) die Anhybridisierung der Primer [2 min 30 s, 52°C] und
- (iii) die Elongation [2 min 30 s, 72°C]. Dieser Zyklus wurde 35 x wiederholt.

### 2.2.4.1 Touchdown PCR

Die *Touchdown* PCR (Don et al., 1991) ist eine weitere Methode der PCR. Die Annealingtemperatur wird der berechneten Schmelztemperatur des Primers ( $T_m$ ) zyklusweise angenähert und über diese hinaus abgesenkt.

Durch die zyklusweise Annäherung der Annealingtemperatur an die Schmelztemperatur des Primers wird die Spezifität der Primerbindung erhöht und eine bevorzugte Vermehrung des gewünschten Amplikons gewährleistet. Diese Methode der PCR wurde bei der Identifikation der *Prey*-Plasmide angewendet (2.2.5.9).

## 2.2.5 Grow'n'Glow GFP Yeast Two-Hybrid-System von MoBiTec

Das *Yeast Two hybrid interaction trap* (Fields und Song, 1989) System ist eine molekulargenetische Technik, um Protein-Protein Interaktionen zu identifizieren.

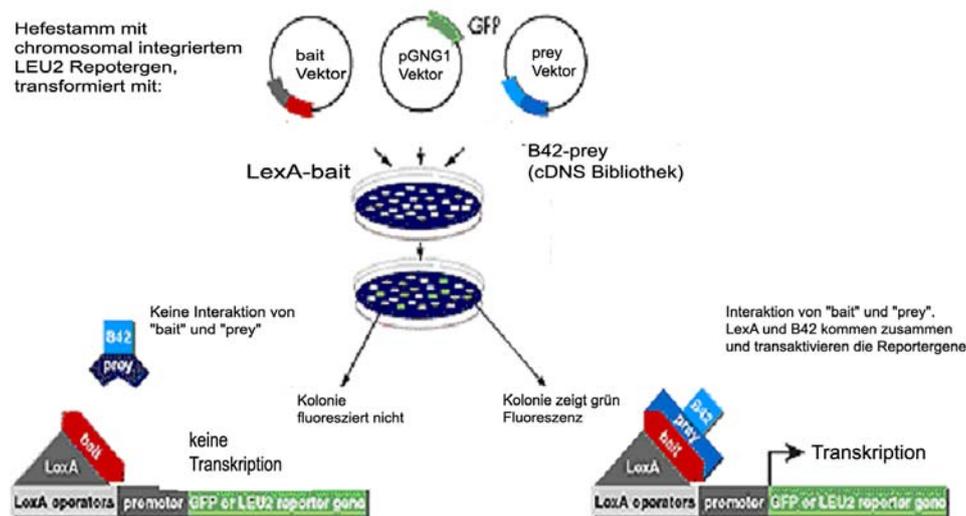
Die Methode basiert darauf, dass eukaryotische Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel GAL4, zwei physikalisch separate modulare Domänen, eine DNS-bindende Domäne (LexA) und eine transkriptionsaktivierende Domäne (B42 *acid blob*) besitzen. Zur Aktivierung der Transkription müssen diese beiden Domänen physikalisch zusammen gebracht werden. Das Protein, für das Interaktionspartner identifiziert werden sollen, wird als Fusionsprotein mit der DNS-bindenden Domäne exprimiert. Gene oder DNS-Fragmente einer Bibliothek, die auf Interaktion hin untersucht werden soll, werden als Fusion mit einer transkriptionsaktivierenden Domäne exprimiert. Eine Interaktion der exprimierten Proteine bringt die DNS-bindende und die transkriptionsaktivierende Domäne zusammen, wodurch die Expression von Reportergenen induziert wird. Diese Reportergene sind in den im *Two-Hybrid*-System verwendeten Stämmen chromosomal integriert und stehen unter der Kontrolle der UAS. Häufig werden das *lacZ*-Gen aus *E. coli* (kodiert für die  $\beta$ -Galaktosidase) und zur Selektion ein Gen für eine Aminosäureprototrophie verwendet. Das Zusammenbringen beider Domänen erfolgt entweder über Kreuzung der plasmidtragenden Stämme oder durch Transformation (2.2.5.3).

Bei dem GFP-*Two-Hybrid*-System handelt es sich um eine auf LexA/B42-basierender Variation der ursprünglichen Methode. Hier werden LexA als DNS-Bindedomäne und B42 (*acid blob*) als Transkriptionsaktivator-Domäne verwendet. Beides sind bakterielle Proteine, deren Verwendung das Risiko, falsch positive Kolonien (durch Bindung endogener Hefe-Proteine an eine der beiden Domänen) zu erhalten, verringern. Als ein Reportergen wird anstelle des *LacZ*-Gens das für GFP (*green fluorescent protein*) kodierende

rende Gen *GFPuv* verwendet. *GFPuv* ist nicht chromosomal integriert sondern liegt separat auf dem Plasmid pGNG1 vor. Das Gen steht unter der Kontrolle des *GAL1*, *10*-Promotors, der vier *LexA*-Operatoren, also acht Bindestellen für das Protein LexA, besitzt. GFP hat gegenüber der  $\beta$ -Galaktosidase den Vorteil, dass positive Kolonien bei Anregung mit UV-Licht sofort über eine grüne Fluoreszenz identifiziert werden können. Ein weiteres Reportergen ist das in den verwendeten Hefestämmen chromosomal integrierte *LEU2*-Gen, das ebenfalls von *LexA*-Operatoren kontrolliert wird. Dieses Gen führt zur Leucinprototrophie und wird zur Selektion verwendet (Abbildung 7).

ODF2, für das Interaktionspartner gesucht wurden, wurde nach Klonierung in dem Plasmid pEG202 als Fusionsprotein mit *LexA* exprimiert (Abbildung 7). Die cDNS-Bibliothek aus Rattenhirn liegt im Vektor pJG4-5 vor. Ein Protein dieser Bibliothek wird als Fusion mit dem Transkriptionsaktivator B42 exprimiert (Mönnich, 2002).

Die Identifizierung putativ positiver Interaktionspartner erfolgte durch Selektion auf Leucinprototrophie und Expression von GFP (Abbildung 7).



**Abbildung 7 Grow'n'Glow GFP Yeast Two-Hybrid System.**

Verändert nach MoBiTec.

### 2.2.5.1 Klonierung von *Odf2* in das pEG202 (bait Plasmid)

pEG202 ist ein Hefe-Expressionsvektor mit dem Promoter des Hefe ADH1 Gens. Es beinhaltet die kodierenden Sequenzen des bakteriellen Repressorproteins LexA, eine multiple Klonierungsschnittstelle (Polylinker) und die Transkriptions-Terminator-Sequenz des Hefe ADH1 Gens. Zusätzlich besitzt es ein *E.coli origin of replication* (pBR ori), die kodierende Sequenz für eine Ampicillinresistenz (AmpR), einen Hefe Trophiemarker (HIS3) und einen Hefe *origin of replication* (2  $\mu$  ori).

Der Trophiemarker ermöglicht ein Wachstum bei Abwesenheit von Histidin bei konstitutiver Expression von LexA. Die Protein-kodierende Sequenz von *Odf2* wurde im offenen Leserahmen zum LexA eingebracht (Mönnich, 2002).

Unter Verwendung von Standard molekularbiologischen Techniken wurde das *Odf2* Fragment in das *bait* pEG202-Plasmid subkloniert. Es wurde im Leserahmen und in der korrekten Orientierung zum Polylinker des pEG202 eingebracht, so dass das LexA-*Odf2*-

Fusionsprotein korrekt exprimiert wird (Mönnich, 2002). Die Konstrukte wurden ansequenziert und damit der korrekte Leserahmen und der Übergang zum LexA bestätigt. Das pEG202-*Odf2*-Konstrukt wurde in den Hefestamm *S. cerevisiae* EGY484 über eine Transformation eingebracht: In einer zweiten Transformation wurde zusätzlich der Reporter pGNG1 eingebracht, siehe dazu die Diplomarbeit von Mönnich, 2002.

#### **2.2.5.2 Test auf Eigeninduktion (Autoaktivierung)**

Transformanten mit dem *bait*-Fusionsprotein und dem Reporter pGNG1 wurden auf Eigeninduktion getestet. Es wurde analysiert, ob das zu untersuchende Protein von sich aus eine transkriptionsaktivierende Fähigkeit besitzt. Eigeninduktion konnte nicht nachgewiesen werden (Mönnich, 2002).

#### **2.2.5.3 Transformation der cDNS-Bibliothek in Hefe**

Der Hefestamm, der das *bait-Odf2*-Konstrukt und den pGNG1-Reporter enthält, wurde mit 100 µg pJG4-5-cDNS-Bibliothek transformiert. Die Transformation wurde mit Hilfe des *Grow'n'Glow High Efficiency Yeast Transformation Kit* durchgeführt (2.1.12).

Die Transformationssuspension (100 µl) wurde in 900 µl sterilem, destilliertem Wasser aufgenommen und auf die SC *drop out* (Gal/Raf) -HIS -URA -TRP -LEU Platten (150 mm) ausgestrichen. Zur Ermittlung der Transformationseffizienz wurde eine zweite Transformationssuspension auf SC *drop out* (Glu)-HIS-URA-TRP Platte (150 mm) ausgestrichen.

#### **2.2.5.4 Selektion der putativ positiven Interaktionspartner**

Da die Expression des Zielproteins nur bei Anwesenheit von Galactose und Abwesenheit von Glukose erfolgt, sind Kolonien, die die LEU2 Gen Expression bei Anwesenheit von Glukose SC *drop out* (Glu) -HIS -LEU -URA -TRP aktivieren, „falsch positive“. Kolonien, die auf SC *drop out* (Gal/Raf) -HIS -URA -TRP -LEU Platten aber nicht auf SC *drop out* (Glu) -HIS -LEU -URA -TRP Platten wuchsen, waren potentiell positiv. Die Platten wurden bei 30°C für 1-3 Tage inkubiert. Diese wurden auf GFPuv-Expression getestet.

Das chromosomal integrierte Reporter gen LEU2 wird nur dann transkribiert, wenn der B42/LexA-Komplex bindet. B42 wird nur dann exprimiert, wenn der GAL1,10 Promoter auf dem pJG4-5-Vektor über Galactose induziert wird.

Putativ positive Kolonien wurden von der Platte gepickt und in 3 ml SC *drop out* (Glu) -HIS -URA -TRP Medium angeimpft. Die Suspension wurde über Nacht bei 30°C inkubiert. Ein Milliliter der Kultur wurde in 5 % Glycerin bei -80°C archiviert.

#### **2.2.5.5 Plasmidpräparation aus Hefe**

Die Isolation von Plasmid-DNS aus Hefe basiert auf dem Verfahren der alkalischen Lyse aus *E. coli* (Birnboim und Doly, 1979) mit der Zugabe von Zymolase, einem Enzym, das die Zellwand von Hefen effektiv auflöst und dadurch die Isolation der Hefe-Plasmid-DNS ermöglicht. Isolierte Plasmid-DNS aus Hefen ist häufig mit genomischer DNS der Hefen kontaminiert. In dieser Arbeit wurde der Hefe-Plasmid *Minipreparations Kit Zymoprep™* (2.1.12) verwendet. Aus einer 1,5 ml Übernachtskultur konnten 0,3-0,01 ng Plasmid-DNS isoliert werden. Verfahren wurde nach dem Standardprotokoll des Herstellers. Das isolierte Plasmid wurde in sterilem Wasser aufgenommen und zur Sequenzierung, PCR und Transformation in *E. coli* verwendet.

#### 2.2.5.6 Transformation von *E. coli* mit den aus Hefe isolierten Plasmiden

Die Transformation erfolgte über ein Standard Transformationsprotokoll (2.2.1.2). Eingesetzt wurden 5 µl Hefe-Plasmid DNS. Die Transformationssuspension wurde auf LB-Amp Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Kolonien, die auf diesen Platten wuchsen, trugen das *bait*-, *prey*- oder pGNG1 Reporter-Plasmid (Abbildung 7).

#### 2.2.5.7 *Prey*-Plasmid Identifikation über PCR

Die Identifikation des *prey*-Plasmids erfolgte über eine *Touchdown*-PCR (2.2.4.1). Ein Aliquot jeder Kolonie wurde auf neue LB-Amp Agarplatten überimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert. Ein Teil der Kolonie wurde in einen 50 µl PCR-Ansatz gegeben. Die PCR Reaktion erfolgte mit den 5'-PREY-Primer und 3'-PREY-Primer (2.1.6.2; 2.2.4.1). Nach der Amplifikation wurde die PCR-Reaktion auf ein Agarosegel geladen. Kolonien, die ein amplifiziertes Fragment zeigten, enthielten putativ positive Interaktionspartner von ODF2. Die entsprechende putativ positive Kolonie wurde angeimpft und das Plasmid isoliert (2.2.2.1). Die *prey*-Plasmid PCR-Fragmente wurden mit dem 5'-PREY-Primer sequenziert (2.1.4) und anschließend über Homologievergleiche ausgewertet (2.2.7).

#### 2.2.6 Sequenzanalyse von Plasmiden

Die DNS-Sequenzierungen wurden von der Firma SeqLab/Göttingen ausgeführt.

#### 2.2.7 Rechnergestützte Auswertung von Nucleotidsequenzen

Für DNS-Sequenzvergleiche, Identifizierung von offenen Leserahmen, Vergleiche und Charakterisierungen von Aminosäuresequenzen wurden folgende Computerprogramme verwendet:

BLAST (Altschulz et al., 1990), Swiss-Prot, Pfam (Bateman et al., 2002).

*Generunner-DNA sequence analysis software* (<http://www.generunner.com/>).

#### 2.2.8 Transfektion der COS-7 und HeLa-Zelllinien

Für die Transfektionen wurden die adhärennten COS-7-Zellen oder HeLa-Zellen verwendet. Die Zellen wurden in DMEM (2.1.15) kultiviert.

24 h vor der Transfektion wurden die Zellen in einer Zellzahl von  $2 \times 10^5$  in Gewebekulturplatten mit sechs Vertiefungen ausplattiert. In jede Vertiefung wurde ein steriles Deckgläschen gegeben. Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Bei einer Konfluenz von 40-80 % wurde die Transfektion durchgeführt. Dabei wurde ein Verhältnis von DNS zu Effecten von 1 : 10 gewählt. 0,4 µg DNS wurden im DNS-Kondensationspuffer EC, der ein Bestandteil des Effecten™ Transfection Reagent, (2.1.11) ist, auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Hinzu kamen 3,2 µl Enhancer. Diese Lösung wurde für 1 s gemischt und bei Raumtemperatur (RT) für 2-5 min inkubiert. Nach der Inkubation kamen 10 µl Effectene-Transfection-Reagent zu dem DNS-Enhancer-Gemisch hinzu. Hiernach wurde die Probe für 10 s gemischt. Es folgte eine 10 min Inkubation bei RT zur Komplexbildung der Probe. In dieser Zeit wurde das Medium von den Zellen entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. In den Vertiefungen wurden die Zellen mit 3 ml frischem Medium versetzt. Danach wurde durch mehrma-

liges Auf- und Abpipettieren der Transfektionskomplex gemischt und tropfenweise auf die Zellen in die jeweiligen Vertiefungen der Gewebekulturplatten pipettiert.

Das Medium über den transfizierten Zellen wurde durch leichtes Schwenken vorsichtig gemischt. Die Zellen mit dem Reaktionskomplex wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 16-24 h wurde eine ausreichende Fluoreszenz beobachtet.

### 2.2.8.1 Kotransfektionen

COS-7-Zellen wurden jeweils mit einem der vier *Odf2*-Konstrukte und mit 5 µg pCMV-H50, der für Dynamitin kodiert (Vallee, 1991), kotransfiziert. Parallel dazu wurde ein zweites Experiment durchgeführt. Es erfolgte zuerst eine Transfektion mit dem pCMV-H50 Konstrukt und dann jeweils mit einem der vier *Odf2*-Konstrukte.

Für die Experimente der dualchromophoren Mikroskopie wurden COS-7-Zellen mit dem *Odf2*-NC-YFP Konstrukt und dem *Odf1*-NC-CFP Konstrukt kotransfiziert. Die so transfizierten Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert, immundekoriert (2.2.11.1) und anschließend fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (2.2.11.2).

## 2.2.9 Brefeldin A Versuche an transfizierten COS-7-Zellen

Inkubation von Zellen in Kultur mit Brefeldin A (BFA) führt zu einer Blockade des Proteintransports zum Golgi-Apparat und zur Akkumulation von Proteinen am ER. BFA induziert den 'retrograden Transport' von Proteinen; dies ist ein Energie-, Temperatur-, und Mikrotubuli-abhängiger Prozess.

Die mit den *Odf2*-Konstrukt transfizierten Säugerzellen (2.2.8) wurden mit

- (i) 10 µg/ml BFA 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.
- (ii) 12,5 µg/ml BFA, 50 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

Das Medium über den Zellen wurde anschließend abgezogen und die Zellen mit 3-5 ml PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen fixiert und immundekoriert (2.2.11.1). Es erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung (2.2.11.2).

## 2.2.10 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

*Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) ist eine Fluoreszenz-basierte Selektion von Zellsuspensionen. FACS *Vantage* erlaubt eine Trennung von heterogenen Zellpopulationen. Es wurden transfizierte Zellen, die GFP-exprimierten, positiv gegen nicht-transfizierte Zellen sortiert. Die Sortierung wurde am Universitätsklinikum der Onkologischen Abteilung von Prof. Trümper durchgeführt.

### 2.2.10.1 Quantifizierung des zellulären DNS-Gehalts und Ermittlung der Zellzyklusverteilung an transfizierten HeLa-Zellen mit Hilfe eines Durchflusszytometers

Bei der Messung der Zellen im Durchflusszytometer werden in einem Flüssigkeitsstrom Zellen und Zellpopulationen hinsichtlich ihrer chemischen, biologischen und biophysikalischen Eigenschaften, wie DNS-Gehalt und Antigenexpression, analysiert.

Es ist u.a. auch eine Methode zur Untersuchung von Zellparametern wie Größe und Granularität.

Die mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markierten Partikel werden kontinuierlich hintereinander an einer Lichtquelle vorbeigeführt, man spricht von einer hydrodynamischen Fokussierung. Die in Suspension vereinzelt und gefärbt vorliegenden Partikel gelangen durch Pressluft in eine Kapillare, aus der sie in die Probenkammer geschleust

werden. Der Probenstrom erzeugt zusammen mit einem Hüllstrom in dieser Kapillare eine laminare Strömung, was eine Durchmischung von Probenlösung und Trägerflüssigkeit verhindert. Die Partikel werden zentriert und mit hoher Geschwindigkeit auf die Meßstelle zugeführt. Jeder Partikel wird dabei einzeln durch die optimale Fokussierungsebene des Objektivs geleitet (Waggoner, 1999).

Bei der Fluoreszenzanregung des Farbstoffs emittiert jede Zelle ein Lichtsignal proportional zur stöchiometrisch gebundenen Fluorochrommenge. Dieses Lichtsignal wird in einem Photomultiplier verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt.

Die Durchflussrate (Partikel/Zeit) wird über die eingehenden Signale berechnet und digital angezeigt. Die so gewonnenen Daten werden in Form von Histogrammen visualisiert und abgespeichert (3.5.1).

Bei der Passage der Zellen durch den Laserstrahl wird dieser gestreut. Je größer eine Zelle ist und je mehr Strukturen in ihrem Inneren sind, desto größer ist das entstehende Streulicht. Die Vorwärtsstreuung (*forward scatter light*, FSC) wird in einem definierten Winkel zur Strahlenrichtung des Anregungslasers, und das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter light*, SSC) im 90°-Winkel erfasst. Die Vorwärtsstreuung korreliert mit der Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht mit der Granularität. Die Streulicht-Messergebnisse werden in einer Graphik, einem sog. Dot-Plot, dargestellt. Dabei wird auf der x-Achse das Vorwärts- und auf der y-Achse das Seitwärtsstreulicht aufgetragen (3.5.1).

Der HOECHST-Farbstoff 33342 ist ein Derivat der bis-Benzimide. Der Farbstoff wird bei Analysen des Zellzyklus verwendet und zeigt eine geringe Toxizität. Der Hoechst-Farbstoff bindet an AT-reiche Regionen der DNS und ist zur stöchiometrischen quantitativen DNS-Analyse geeignet. HOECHST 33342 wird bei 351-364 nm angeregt und emittiert eine Fluoreszenz bei 465 nm.

Das Fluorochrom, 4'-6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) interkaliert in die DNS. Der DAPI-DNS-Komplex erlaubt eine stöchiometrische DNS-Quantifizierung (Coleman et al., 1981), da er ähnliche Emissions- und Absorptionswerte besitzt wie Hoechst wird er hier für das Experiment eingesetzt (Tabelle 2).

Zur Vermeidung einer Interferenz der Fluoreszenzemission des GFPs mit der Anregungswellenlänge der DAPI-Fluorochrome wurde ein entsprechender Filter eingesetzt (Tabelle 2).

**Tabelle 2** Verwendete Fluorochrome und deren Anregungs- und Emissionswellenlängen sowie die korrespondierenden Interferenzfilter

Farbstoff	Anregungs-wellenlänge [nm]	Emissions-wellenlänge [nm]	Anregungs-bereich [nm]	Interferenzfilter
Hoechst 33342	351 nm	465 nm	351-363 nm	425/40
DAPI	360 nm	455 nm	350-365 nm	450/40
EGFP	488 nm	508 nm	488 nm	510/20

Eine quantitative DNS-Gehaltsbestimmung wurde an den transfizierten HeLa-Zellen und parallel an nicht-transfizierten HeLa-Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers ermittelt und die Daten mit dem FlowJo Programm ausgewertet (2.1.15).

HeLa-Zellen wurden in einer 6-Loch-Platte ausgesät und jeweils mit einem der vier *Odf2*-pEGFP-Konstrukte transfiziert (2.2.8).

Die transfizierten HeLa-Zellen sowie die entsprechenden Kontrollzellen wurden 48 h nach der Transfektion mit DAPI (1 µg/ml) versetzt und 30 min bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium über den Zellen abgezogen und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Die Zellen wurden trypsinisiert und erneut mit PBS gewaschen. Die Suspension wurde bei 1500 rpm, 5 min zentrifugiert und die Zellen in 1 ml DMEM-Medium aufgenommen und suspendiert. Folgende Kontrollen wurden verwendet:

A: untransfizierte HeLa-Zellen.

B: untransfizierte HeLa-Zellen, DNS-markiert.

C: pEGFP-N1 transfizierte HeLa-Zellen, DNS-markiert.

Die vier Proben und die drei Kontrollen wurden hinsichtlich ihrer DAPI Fluoreszenzintensität an einem Durchflusszytometer analysiert und miteinander verglichen.

Der BD LSR II ist ein analytischer Durchflusszytometer (2.1.9). Das Gerät (Deutsches Primaten Zentrum DPZ, Abteilung Virologie, Arbeitsgruppe PD Sopper) verfügt über drei luftgekühlte Laser (405, 488 und 633 nm). Damit ist eine simultane Messung von bis zu neun Fluoreszenzsignalen sowie Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, also von insgesamt elf Parametern möglich. Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der FACS-DIVA Software (2.1.8).

### **2.2.10.2 Experiment zur Proliferation an ODF2-überexprimierenden COS-7-Zellen**

Der Versuch diente dazu, den Einfluss von überexprimierten ODF2 auf COS-7-Zellen zu bestimmen. COS-7-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 40-60 % mit jeweils einem der vier *Odf2*-pEGFP-Konstrukte transfiziert (2.2.8). Die transfizierten Zellen wurden mit Hilfe des FACS-sorters unter sterilen Bedingungen in zwei unterschiedliche Zell-Populationen getrennt. Die Fusionsprotein exprimierenden Zellen wurden wieder in einer definierten Zellzahl in Zellkulturflaschen zur weiteren Kultivierung überführt. Es erfolgte ein Mediumwechsel alle zwei Tage. Als Kontrolle wurden parallel untransfizierte COS-7-Zellen in definierter Zellzahl ausplattiert und kultiviert. Die Zellzahl wurde bei den Kontrollzellen jeweils nach 5 und 13 Tagen mit der Neubauer-Zählkammer nach Angaben des Herstellers ermittelt (3.5).

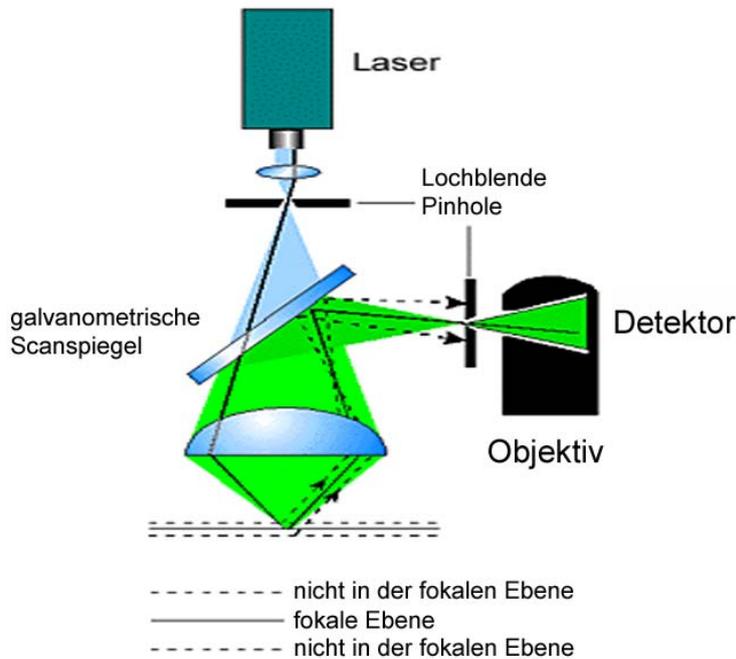
### 2.2.11 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die konfokale Laser *Scanning* Mikroskopie (cLSM) erlaubt es, dreidimensionale Untersuchungen auf zellulärer, histologischer und subzellulärer Ebene an fluoreszenzmarkierten Objekten durchzuführen. Dies wird umgesetzt, indem eine Lichtmikroskopie an eine LSM-Einheit, bestehend aus einem Laser- und einem Scanning-Modul, gekoppelt wird. Es können an fixierten oder vitalen biologischen Objekten, aufgrund spezifischer optischer Konfigurationen, dünne optische Schnitte gelegt werden. Die einfache Fluoreszenzmikroskopie erzeugt ein Bild von dem emittierten Licht aus der Fokusebene. Dabei können zum Teil unerwünschte Photonen, die unter- oder oberhalb der fokalen Ebene emittiert werden, zur Bildentstehung mit beitragen. Dies führt zu einem qualitativen Verlust und einer reduzierten Auflösung der Bildinformation.

Die galvanometrischen Scanspiegel ermöglichen es bei der cLSM, die Energie des Lasers, die in definierten Wellenlängen formuliert wird, als beugungsbegrenzten Lichtpunkt durch das Objektiv sequentiell auf das Präparat zu fokussieren (Abbildung 8). Über den Scanner gelangt das aus der Fokusebene emittierte Licht zu verschiedenen Farbteilern. Hier wird die Fluoreszenzemission spezifisch nach der Wellenlänge diskriminiert und anschließend weiter auf die Detektoren verteilt. Eine Einschränkung von Wellenlängenbereichen der zu detektierenden Photonen wird mit Hilfe von Emissionsfiltern erreicht. Der Detektor konvertiert die Photonen zu Elektronen, dieses analoge Signal wird digitalisiert und in einem Rechner aufgezeichnet.

Im Gegensatz zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie können die Photonen, die nicht aus der fokalen Bildebene stammen, durch eine variable Lochblende (*Pinhole*) ausgeschlossen werden. Es können somit bei der cLSM hochauflösende Abbildungen erzeugt werden.

Das Gerät arbeitet mit einem Argon-Laser (488 nm), Helium/Neon-Laser (543 nm) sowie einem UV-Laser (364 nm). Das Laserlicht wird durch einen Lichtleiter zur Scan-Einheit gebracht. Zum Abrastern (*Scannen*) des Objekts muss der Anregungsstrahl nacheinander auf viele Punkte des Objekts gelenkt werden. Laserlicht eignet sich für diese Anwendung besonders gut, weil ein Laserstrahl monochromatisches Licht mit hoher Intensität auf einen kleinen Punkt fokussieren kann. Um ein Bild zu bekommen, wird das Objekt Punkt für Punkt und Zeile für Zeile abgerastert. Zwei Scanspiegel sind dazu nötig: Einer für die Punkte innerhalb einer Zeile (X-Richtung) und einer für die Zeilen des Bildes (Y-Richtung). Das Fluoreszenzlicht wird über die Spiegel zum Detektor geleitet. Ein Rechner steuert die Position der Scanspiegel und rekonstruiert aus der gemessenen Fluoreszenzintensität jedes einzelnen Punktes ein Bild des Objekts. Zudem ist es möglich, das Objekt in Richtung des Strahlengangs (Z-Richtung) zu *scannen*. Da die konfokale Optik dafür sorgt, dass nur Licht aus der Brennebene des Objektivs zum Detektor gelangt, können nacheinander mehrere Schichten des Objekts gescannt und abgebildet werden. Solche optischen Schnitte können dann im Rechner zu drei-dimensionalen Bildern des Objekts zusammengesetzt werden.



**Abbildung 8 Skizze eines konfokalen Laser Mikroskops**

Ein fokussierter Laserstrahl scannt lateral entlang der x- und y-Achse eines Objekts. Das emittierte Fluoreszenzsignal wird im Detektor aufgezeichnet. Emittierte Photonen, die nicht die fokale Ebene treffen, werden über die Lochblende separiert.

Verändert nach:  
<http://www.hi.helsinki.fi/>

### 2.2.11.1 Immunzytologie

Das Medium über den Zellen wurde quantitativ entfernt und die Zellen mit 1 x PBS gewaschen. 2 ml 3,7 % Paraformaldehyd, frisch angesetzt in 1 x PBS pH 7,5, wurden auf die Zellen gegeben und für 20-30 min inkubiert.

Die Zellen wurden anschließend zweimal mit jeweils 6 ml 1 x PBS für 5 min gewaschen. Hierauf wurde mit 0,2 % Triton X-100 in PBS für 5 min inkubiert, erneut mit 1 x PBS für 5 min gewaschen und 3 x für jeweils 10 min mit BSA-PBS (0,2 % BSA, 0,1 % Triton X-100 in 1 x PBS) inkubiert.

Der erste Antikörper (Ak) wurde in 2 % BSA in PBS im Verhältnis 1 : 100 bis 1 : 500 verdünnt und für 30 min bei RT oder bei 4°C über Nacht mit den fixierten Zellen inkubiert. Hiernach wurde 3 x für je 10 min mit BSA-PBS gewaschen.

Der zweite Ak wurde im Verhältnis 1 : 100 in 2 % BSA in PBS verdünnt und zusammen mit DAPI, 1 : 100 verdünnt, für 30 min bei RT auf den Zellen inkubiert.

Die Zellen wurden in PBS 0,1% Triton-X-100 gewaschen. Darauf erfolgte eine Inkubation für 5 min in PBS und eine weitere für 5 min in ddH<sub>2</sub>O.

Die Zellen wurden zum Abschluss mit *Vectashield* versetzt (2.1.10) und das Deckgläschen auf einem Objektträger fixiert.

### 2.2.11.2 Mikroskopie und Detektion der Fluoreszenz mit Hilfe des Zeiss cLSM 510

Die Daten der konfokalen Lasermikroskopie wurden aufgezeichnet und mit Hilfe der Zeiss *laser scanning software* LSM 510, Release 2.01, bearbeitet. Die Fluoreszenz im Grünbereich wurde mit 488 nm angeregt und die Emission zwischen 505-550 nm detektiert. Zum Nachweis der DAPI-DNS-Anfärbung wurde bei 365 nm angeregt und die Emission bei 395 nm gemessen. Bei den Aufnahmen für die Cy3-Fluoreszenz erfolgte die Anregung bei 543 nm und die Emission wurde bei 560 nm detektiert.

An der LSM Einheit war ein Mikroskop angekoppelt, in dem der Kondensator mit Nomarski-Prismen ausgestattet und zusätzlich ein Polarisator integriert war. Diese Ausstattung des Mikroskops erlaubte es, differentielle Interferenz-Kontrast-Mikroskopie nach Nomarski auszuführen. Hierbei werden Differenzen in der optischen Weglänge, wie sie z.B. zwischen der Zelle und dem Medium bestehen, in einen Reliefkontrast umgesetzt. Dadurch wird eine Kontrastierung des mikroskopischen Bildes auf optischem Wege erreicht, d.h. es können kontrastarme Objekte als sogenannte Phasenkontrastpräparate untersucht werden.

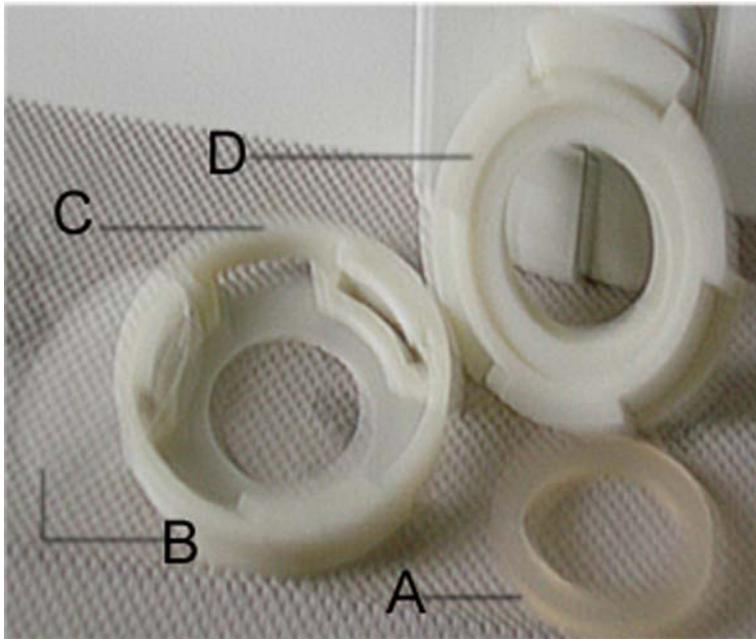
Bei Objekten, die mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, kann es dazu kommen, dass die Emissionssignale der einzelnen Fluoreszenzen nicht ausreichend voneinander getrennt werden können. Es entstehen Artefakte, die durch ein „Durchbluten“ von Signalen bestimmt sind. Um diese Artefakte zu verhindern, wurden in dieser Arbeit zusätzlich die jeweiligen Emissionen getrennt voneinander aufgezeichnet.

### **2.2.12 Life-Imaging von transfizierten HeLa-Zellen**

Das *Life-Imaging* dient zur Untersuchung von dynamischen Prozessen bei lebenden Zellen. Diese Methode erlaubt es, in festen Intervallen Aufnahmen von lebenden Zellen zu machen. Der Computer steuert während dieser Zeit eine Digitalkamera. Mit Hilfe der Aufnahmen können Zellbewegungen und Zellteilungen sichtbar gemacht werden. Diese Möglichkeit zur Visualisierung von lebenden Zellen über eine lange Zeitspanne erlaubt es, transiente Ereignisse aufzuzeigen. Die zu beobachtenden lebenden Zellen brauchen dabei streng definierte Bedingungen. Es muss eine dauerhafte Sauerstoffzufuhr gewährleistet sein, ein gleichbleibender physiologischer pH-Wert, eine konstante Temperierung der Zellen und die Sicherstellung, dass die Zellen während des Beobachtungszeitraums nicht austrocknen.

Die *Life-Cell-Imaging-Vorrichtung* (Abbildung 11; Abbildung 12; Abbildung 13) wurde in dieser Arbeit interdisziplinär in Zusammenarbeit mit dem Dipl. Physiker G.Hoch eingeführt und etabliert. Verwendet wurde das Axioplan 2 *image*, Zeiss, ein motorisiertes *upright* Mikroskop, eine Digitalkamera und eine Inkubationskammer für die Zellen, die eine Aufrechterhaltung physiologischer Bedingungen erlaubt (Abbildung 9). Das flexible Material des Silikon-Ringes der Inkubationskammer ermöglicht einen Gasaustausch. Die Komponenten der Inkubationskammer sind autoklavierbar. Das Medium (2.1.15), in dem die Zellen während des Langzeitexperiments inkubiert wurden, ist pH stabil und es bedarf keiner weiteren CO<sub>2</sub>-Begasung.

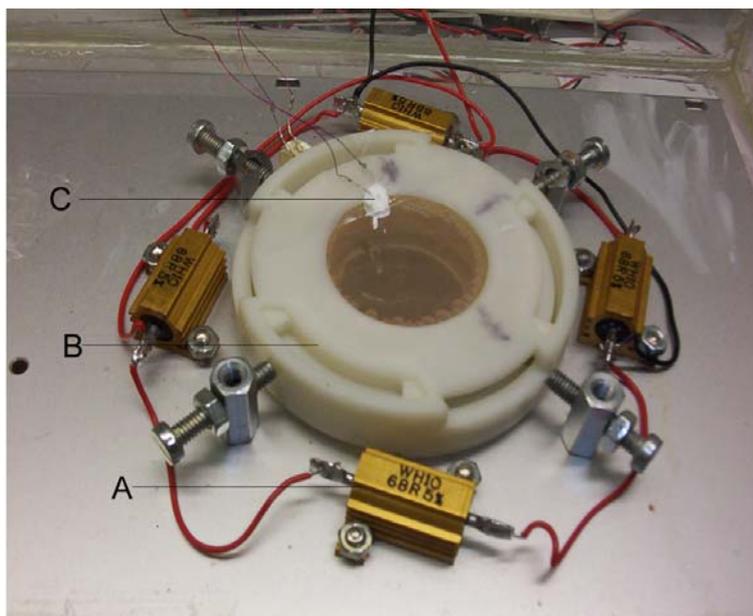
Die Zellen wurden auf ein Deckgläschen umgesetzt und im entsprechenden Medium bis zu einer Konfluenz von 40-60 % inkubiert (2.1.15). Daraufhin wurden sie transfiziert (2.2.8). Die transfizierten Zellen auf dem Deckgläschen wurden dann in die Inkubationskammer überführt. Es erfolgte daraufhin ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden dann in der Inkubationskammer mit dem CO<sub>2</sub>-*Independent* Medium zur Langzeit-Mikroskopie (2.1.15) weiter gehalten. Diese videomikroskopischen Langzeitexperimente an transfizierten HeLa-Zellen wurden fünf mal durchgeführt in einem Zeitraum von jeweils 18-22 h. Ein weiteres abschließendes Experiment umspannte einen Zeitraum von nahe zu drei Tagen. Es wurde im mikroskopischen Blickfeld dabei durchschnittlich 4-10 transfizierte Zellen pro einzelnen Experiment erfasst und beobachtet.



**Abbildung 9** MiniCeM™ *Miniaturized cell chamber* zur Mikroskopie

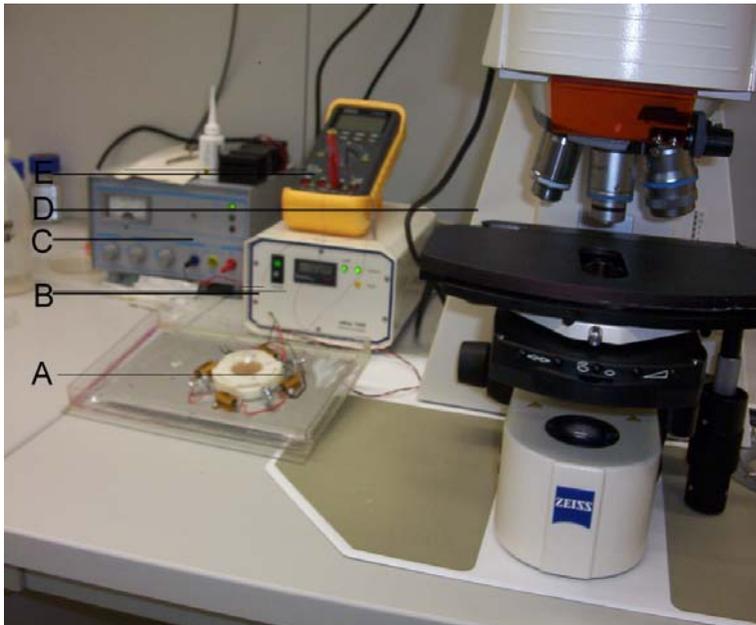
Die Inkubationskammer setzt sich zusammen aus einem Silikon Ring (A), zwei *coverslips* (B), jeweils 40 mm Durchmesser mit 0,17 mm Dicke. C und D sind die Komponenten des *Chambers*, die über einen Bajonett-Verschluss verschlossen werden. Der zusammengesetzte Inkubator hat einen Durchmesser von 65 mm. Die zur Beobachtung verfügbare Fläche beträgt 300-700 mm<sup>2</sup>. Die *coverslips*, bestehend aus Borosilicat, sind zur Fluoreszenzmikroskopie geeignet.

Aus technischen Gründen musste die Inkubationskammer über Kopf gedreht werden. Mit Hilfe von Stellschrauben wurde die Kammer auf einer beheizbaren Platte befestigt, zusätzlich besitzt die Platte eine runde Aussparung zur Mikroskopie (Abbildung 10). Beheizt wurde über die vier angebrachten Widerstände (Abbildung 10; Abbildung 11). Direkt auf den von den Zellen bewachsenen *coverslips* wurde die Wärmeleitpaste aufgetragen (Abbildung 10; Abbildung 12) Die Paste verbindet ein Kabel zur Spannungsquelle. Dies erlaubt eine indirekte Temperaturmessung der inneren Inkubationskammer. Nach der Platzierung der Inkubationskammer und Zentrierung der zu beobachtenden Zellen wurde die Vorrichtung abgedeckt. Dies diente zur Vermeidung von Wärmeverlusten in den Raum (Abbildung 13).



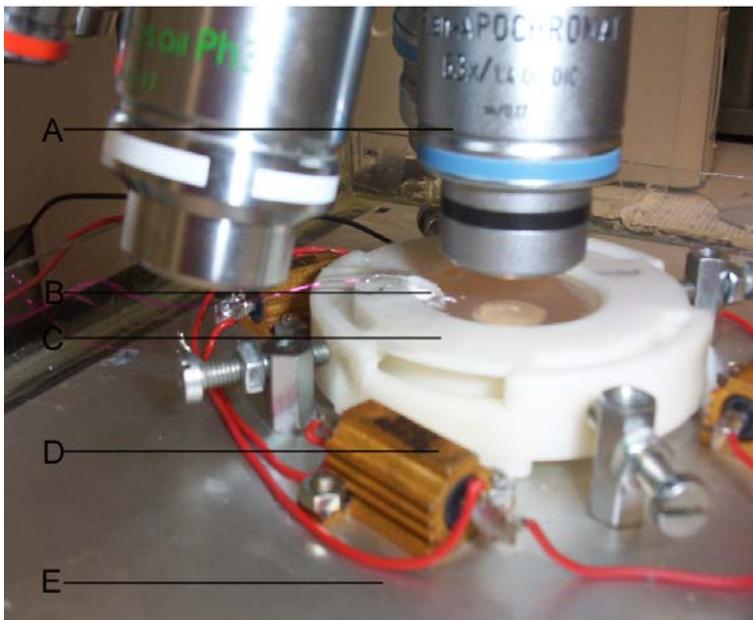
**Abbildung 10** MiniCeM™ *Life-Cell-Image* Vorrichtung

(A) Widerstand. Inkubationskammer (B) mit den lebenden Zellen, befestigt auf einer beheizbaren Platte mit einer entsprechenden Aussparung zur Mikroskopie. (C) Wärmeleitpaste.



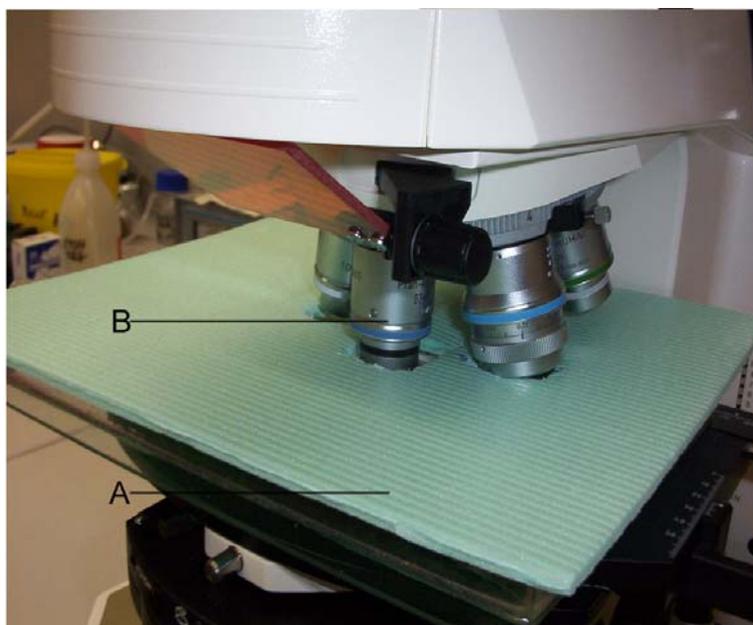
**Abbildung 11 Life-Cell-Imaging Vorrichtung**

Die auf der beheizbaren Platte befestigte Inkubationskammer (A). HBO Lampe (B). Stromerzeuger/Widerstand (C). Upright Mikroskop (D). Spannungsquelle (E). Die digitale Kamera ist hier nicht abgebildet.



**Abbildung 12 Life-Cell-Imaging Vorrichtung**

Die Inkubationskammer (C) wurde unter das Mikroskop platziert. (A) 40 x Öl Objektiv. (B) Wärmeleitpaste. (D) Widerstand. (E) Beheizbare Platte



**Abbildung 13 Life-Cell-Imaging Vorrichtung**

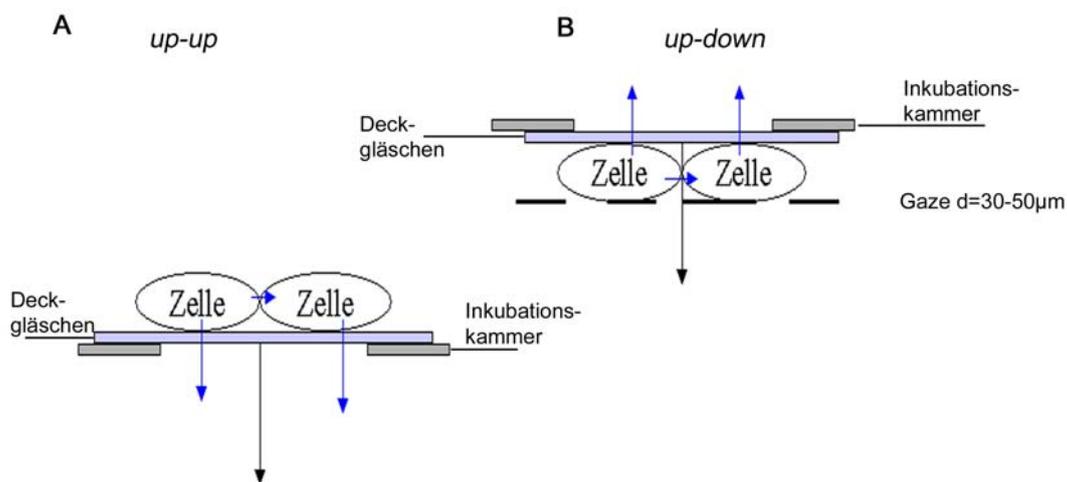
40 x Öl Objektiv (B). Abdeckung der Inkubationskammer zur Vermeidung von Wärmeverlusten (A).

### 2.2.12.1 *Head over Bottom*

Wie eingangs erwähnt musste aus technischen Gründen die Inkubationskammer mit den bewachsenen Zellen während der mikroskopischen Langzeitbeobachtung über Kopf installiert werden. Es erfolgten drei Versuche, die klären sollten, ob es dabei eventuell zu störenden Einflüssen auf die lebenden Zellen kommt.

- (i) Die Zellen wurden auf das Deckgläschen ausgesät und in die Inkubationskammer überführt. Die Inkubationskammer wurde im Brutschrank kopfüber *up-down* inkubiert (Abbildung 14). Das Wachstum der Zellen wurde alle 2 Tage in einem Zeitraum von 5 Tagen mikroskopisch hinsichtlich einer Zu- oder Abnahme der Dichte beobachtet und aufgezeichnet.
- (ii) Die Inkubationskammer wurde mit den Zellen in der Orientierung *up-up* im Brutschrank inkubiert (Abbildung 14). Das Wachstum der Zellen wurde hinsichtlich einer Zu- oder Abnahme der Dichte mikroskopisch in einem Zeitraum von 5 Tagen dokumentiert.

Aufgezeichnet wurden vier verschiedene Ausschnittpositionen. Der Ausschnitt wurde markiert und qualitativ hinsichtlich einer Dichte Zu- oder Abnahme bewertet.



**Abbildung 14 Unterschiedliche Ausrichtung der Zellen in der Inkubationskammer**

Die Inkubationskammer mit den eingebrachten Zellen musste aus technischen Gründen über Kopf auf dem Mikroskopiertisch befestigt werden.

(A) Die Zellen wachsen adhären auf dem Deckgläschen. Die Adhäsionskräfte (blaue Pfeile) und die Gravitation (schwarzer Pfeil) wirken in eine Richtung, *up-up*.

(B) Die Adhäsionskräfte (blaue Pfeile) und die Gravitation wirken in entgegengesetzter Richtung, *up-down*, die Zellen verlieren den Kontakt mit dem Deckgläschen. Mit dem Einbringen der Gaze mit einer Maschenweite von 30-50µm konnte dies verhindert werden.

- (iii) Die HeLa-Zellen wurden auf dem Deckgläschen ausgesät und im entsprechenden Medium bis zu einer Konfluenz von 40-60 % inkubiert (2.1.12). Dann wurde eine sterilisierte Gaze mit einer Maschenweite von 30-50 µm auf das bewachsene Deckgläschen gelegt und die Inkubationskammer in der Orientierung *up-down* mit dem  $\text{CO}_2$ -Independent Medium zur Langzeit-Mikroskopie weitergehalten (2.1.15).

### 2.2.13 Mikrotubuli-Kosedimentation

Die Aufreinigung von Mikrotubuli und Mikrotubuli-assoziierten Proteinen, *microtubule associated proteins* (MAPs) wurde nach den Methoden von Vallee und Collins (1986) und Kellog et al. (1989) durchgeführt.

Transfizierte COS-7-Zellen wurden zuerst in 1xPBS und anschließend in PEM-1 gewaschen. Die Zellen wurden in kalter *swelling solution* resuspendiert (2.1.11). Es erfolgte eine Zugabe von Protease-Inhibitoren (Endkonzentration: 10  $\mu$ M Benzamidin-HCl, 10  $\mu$ g/ml Aprotinin, 10  $\mu$ g/ml Leupeptin, 10  $\mu$ g/ml Pepstatin) und 0.1 M Pipes. Danach wurde die Suspension bei 4°C homogenisiert. Das Homogenat wurde für 5 min bei 700 x g zentrifugiert, der Überstand abgezogen und mit DTT (0.5 mM), GTP (1 mM) und Taxol (20  $\mu$ M) versetzt. Die Lösung wurde 2 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf ein 10 % iges Sucrose-Kissen in BRB80x Puffer überschichtet und 30 min bei 4°C und 48.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen erneut in BRB80x Puffer resuspendiert und wiederholt bei 45.000g für 15 min und 20°C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in SDS-Probenpuffer 3 min bei 98°C inkubiert.

Parallel zum oben beschriebenen Experiment wurde ein zweites Experiment unter Mikrotubuli-depolymerisierenden Bedingungen durchgeführt: Der Überstand nach der ersten Zentrifugation wurde nur mit DTT (0.5 mM) versetzt und die Suspension 30 min bei 4°C inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zentrifugation über das 10 % ige Sucrose- Kissen in BRB80X-Lösung ohne GTP und Taxol. Das Fehlen von GTP und Taxol sowie die Inkubation bei 4°C depolymerisiert Mikrotubuli und verhindert die Repolymerisation.

Das resultierende Pellet wurde ebenfalls in SDS Probenpuffer 3 min bei 98°C inkubiert und die Proteine mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert (2.2.14). Die Detektion der Fusionsproteine auf der Membran erfolgte mit dem anti-GFP Antikörper (2.1.2.2)

### 2.2.14 SDS-PAGE

Für die Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli, 1970) wurde eine gebrauchsfertige, wässrige Stammlösung aus 30 % (w/v) Acrylamid und 0,8 % (w/v) Bisacrylamid verwendet. Trenn- und Sammelgel wurden aus den entsprechenden Komponenten zusammengestellt. Die Zusammensetzung des Trenngel- und Sammelgelpuffers ist unter 2.1.11 beschrieben. Tabelle 3 zeigt die Zusammensetzung des Gels.

Die Glasplatten, Abstandshalter (1,25 mm) und Käbme wurden vor dem Gebrauch mit 70 % igem Ethanol (v/v) gereinigt. Das Trenngel wurde bis zu einer Höhe von 14 cm zwischen die Glasplatten gegossen. Die Geloberfläche wurde mit Wasser überschichtet und das Gel bei 65°C für ca. 15 min polymerisiert. Das Wasser wurde danach entfernt und die Oberfläche mit wenig Sammelgel gewaschen. Auf das Trenngel wurde das Sammelgel gegossen. Die Polymerisation des Sammelgels erfolgte ebenfalls bei 65°C für ca. 15 min.

Die Proteine wurden bei 15 W im Sammelgel und bei 38 W im Trenngel bei 4°C aufgetrennt.

Tabelle 3 Trenngel- und Sammelgelzusammensetzung

Geltyp	Trenngel	Trenngel	Sammelgel
Acrylamidkonzentration	10 %	15 %	5 %
Sammelgelpuffer pH 6,8	-----	-----	4 ml
Trenngelpuffer pH 8,8	12 ml	12 ml	-----
d H <sub>2</sub> O	12 ml	6 ml	6 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	12 ml	18 ml	2 ml
TEMED	12 µl	12 µl	4 µl
10 % APS	120 µl	120 µl	60 µl

### 2.2.15 Western-Blot

Die Methode des *Western-blotting* ermöglicht es, Proteine aus einem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran zu transferieren und anschließend immunologisch zu detektieren (Towbin et al., 1989).

In einer Nassblotapparatur wurden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Membran und das Whatman-Papier wurden auf die entsprechende Gelgröße zurechtgeschnitten und in Towbin-Puffer aquilibriert (2.1.11). In einer Halterung wurden die folgenden Komponenten in der Anordnung: Schwamm, Whatman-Papier, Nitrocellulosemembran, Gel, Whatman-Papier, Schwamm befestigt und so in die Blotkammer überführt. Das Gel kam mit den Proteinen auf der Kathodenseite und die Membran auf der Anodenseite zu liegen. Der Transfer der Proteine auf die Membran wurde 45-50 min bei 1 A durchgeführt.

#### 2.2.15.1 Immunologische Detektion der Antikörper auf den Membranen

Nach Auftrennung (2.2.14) und Transfer (2.2.15) der Proteine erfolgte die immunologische Detektion.

Die Membran wurde für 1 h in 5 % Magermilchpulver in TBST (2.1.11) blockiert. Die Blockierungslösung wurde verworfen. Der jeweilige primäre Antikörper wurde im Verhältnis von 1 : 5.000 bis 1 : 500 in 5 % Magermilchpulver in TBST verdünnt und die Membran über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Zum Entfernen von nicht oder unspezifisch gebundenen Antikörpern wurde nach der Inkubation für 30 min mit TBST (2.1.11) gewaschen, wobei alle 5 min die Waschlösung ausgetauscht wurde.

Die Inkubation mit dem in Blockierungspuffer verdünnten sekundären Antikörper erfolgte für 1 h auf dem Schüttler. Die Membran wurde anschließend erneut für 30 min mit TBST gewaschen und die Waschlösung alle 5 min gewechselt.

Nach dem Dekantieren der letzten Waschlösung wurde die Membran in einer Lösung aus Lumineszenz-Reagenz und Oxidations-Reagenz im Verhältnis 1 : 1 (Renaissance® Western Blot, 2.1.12) inkubiert. Die Detektion des emittierten Chemilumineszenzsignals erfolgte durch Exposition auf einem Röntgenfilm.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 ODF2-Fusionsproteine kosedimentieren mit Mikrotubuli unter Mikrotubuli-polymerisierenden Bedingungen

Das ODF2-Protein bildet zusammen mit anderen Spermienschwanz-spezifischen Proteinen zytoskelettale Strukturen. Die Primärstruktur des ODF2-Proteins ermöglicht es, *coiled-coil* Strukturen zu generieren (Petersen et al., 1999). Dieses ubiquitäre Proteinmotiv kontrolliert möglicherweise die Oligomerisierung von Proteinen und schafft dabei die Voraussetzungen zur Bildung von fibrillären Strukturen (Donkor et al., 2004 ; 1.2.1).

Die vorangegangenen immunzytologischen Kolo-kalisationsexperimente belegten eine Assoziation des ODF2-Fusionsproteins mit dem mikrotubulären System (Donkor, 2001; Donkor et al., 2004). Sollte diese Assoziation auch eine physikalische Interaktion sein, so müsste das ODF2-Protein bei den physiologischen Bedingungen, unter denen die Mikrotubuli sedimentieren, ebenfalls kosedimentieren. Dazu wurden die Kosedimentationsexperimente durchgeführt (2.2.13).

Den Nachweis einer physikalischen Interaktion von ODF2 mit den Mikrotubuli sollten *in vitro* Experimente zur Mikrotubuli-Kosedimentation an *Odf2*-transfizierten COS-7-Zellen erbringen (2.2.8). Das Prinzip des Experiments beruht auf der Sedimentation von Mikrotubuli und den daran gebundenen Proteinen mittels Ultrazentrifugation der transfizierten Zelllysaten. Diese Versuche zur Kosedimentation von Mikrotubuli wurden modifiziert nach den Methoden durchgeführt, wie sie bei Vallee und Collins (1986) sowie bei Kellogg et al. (1989) beschrieben sind (2.2.13).

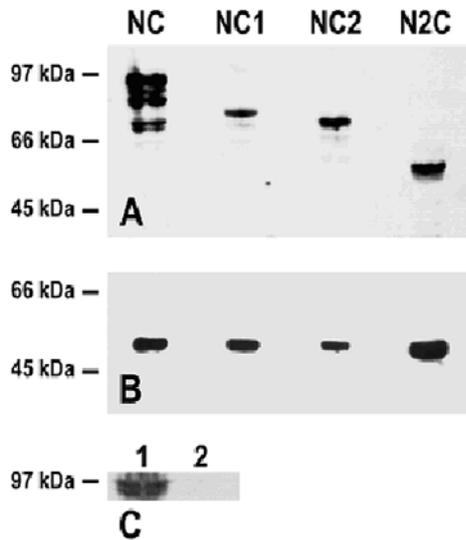
Aus den ODF2-exprimierenden COS-7-Zellen wurden Mikrotubuli extrahiert und für die Experimente zur Kosedimentation eingesetzt. Die Versuche wurden sowohl unter Mikrotubuli-polymerisierenden als auch unter Mikrotubuli-depolymerisierenden Bedingungen durchgeführt (2.2.13).

Die nach den Sedimentationen erhaltenen Pellets wurden elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.14) und auf eine Membran transferiert. Daraufhin erfolgte die immunologische Detektion der ODF2-Fusionsproteine mittels eines anti-GFP Antikörpers (2.1.2.2; 2.2.15.1). Auf derselben Membran in den korrespondierenden Spuren konnte gleichzeitig mittels eines anti- $\alpha$ -Tubulin Antikörpers Tubulin detektiert werden (Abbildung 15). Dies belegt, dass ODF2-Proteine zusammen mit den extrahierten Mikrotubuli unter Bedingungen, unter denen Mikrotubuli polymerisieren, kosedimentieren (Abbildung 15 C).

Im Experiment zur Kosedimentation von ODF2 unter depolymerisierenden Bedingungen von Mikrotubuli wurde das Pellet nach der ersten Sedimentation in zwei Fraktionen geteilt:

- (i) Die eine Fraktion wurde unter depolymerisierenden Bedingungen weiterbehandelt und zentrifugiert.
- (ii) Die andere Fraktion wurde unter polymerisierenden Bedingungen weiterbehandelt und ebenfalls zentrifugiert. Die Proteine in den resultierenden Pellets wurden dann parallel mit den Proteinen der ersten Fraktion elektrophoretisch aufgetrennt und immunologisch mit Hilfe des anti-GFP Antikörpers detektiert (2.2.14; 2.2.15; 2.2.15.1).

Es wurde dabei kein ODF2-Fusionsprotein detektiert, d.h. ODF2 kosedimentiert nicht mit Mikrotubuli unter depolymerisierenden Bedingungen (Abbildung 15 C2). Die Kontrolle belegt jedoch, dass ODF2-Proteine im Zelllysat vorhanden waren (Abbildung 15 C1).



**Abbildung 15 Mikrotubuli Kosedimentation der vier ODF2-GFP-Fusionsproteine aus COS-7-Zellen**

Mikrotubuli wurden aus den mit jeweils einer der vier *Odf2*-Konstrukte transfizierten COS-7-Zellen kosedimentiert. Die Sedimentation erfolgte unter Mikrotubuli stabilisierenden Bedingungen (A) und unter depolymerisierenden Bedingungen (C). Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Detektion erfolgte mit dem anti-GFP Antikörper (2.1.2).

(A) Zeigt die Kosedimentation von ODF2-NC und den deletierten Fusionsproteinen ODF2-NC1, ODF2-NC2 und ODF2-N2C (2.2.1) mit Mikrotubuli.

(B) Detektion von Tubulin über den anti-α-Tubulin Antikörper in den jeweiligen korrespondierenden Fraktionen wie unter A, belegt die Kosedimentation mit Mikrotubuli.

(C) ODF2-Proteine kosedimentieren nicht unter depolymerisierenden Bedingungen (2). Die Kontrolle (1) zeigt die Anwesenheit von ODF2 in der Fraktion, die bei der Sedimentation vorgelegen hat. Detektiert und nachgewiesen wurde dies mit Hilfe des anti-GFP Antikörpers (2.1.2).

### 3.2 Identifizierung von putativen ODF2-Interaktionspartnern

Die Identifikation zweier interagierender Proteine kann mit Hilfe des Hefe *Two-hybrid*-Systems realisiert werden. Im Fokus des Interesses standen Proteine, die im Proteintransport involviert sind und mit denen das ODF2-Protein in Wechselwirkungsbeziehungen steht. Aus diesem Grunde wurde ein *two-hybrid-screen* mit cDNS aus Rattenhirn durchgeführt (2.2.5). Es sollte darüber hinaus auch der putative Interaktionspartner der medierten Interaktion von ODF2 mit den Mikrotubuli identifiziert werden, da Mikrotubuli-Bindungsversuche belegen, dass es zu keiner direkten Bindung von ODF2 mit den Mikrotubuli kommt (Donkor et al., 2004).

Bei einer Interaktion des ODF2-Proteins mit Wechselwirkungspartnern wird in einer Hefezelle ein Reporter gen angeschaltet (2.2.5). Das hier eingesetzte System beruht dabei auf der Expression zweier Fusionsproteine in einer Zelle. Eines der Fusionsproteine (der Köder, engl. *bait*) enthält eine DNS-bindende Domäne. Domänen sind strukturelle und funktionelle Einheiten eines Proteins. Diese DNS-bindende Domäne bindet an den Promotor des Reporter gens. Das zweite Fusionsprotein bindet an einer transkriptionsaktivierenden Domäne. Interagieren nun diese beiden Fusionsproteine miteinander wird das Reporter gen angeschaltet und die Hefezelle kann auf einer spezifischen Selektionsplatte wachsen (2.2.5.4).

Zur Identifikation von ODF2-Interaktionspartnern wurde die testikuläre *Odf2* kodierende Sequenz (Hoyer-Fender et al., 1995; Brohmann et al., 1997) in den pEG202 Vektor eingebracht und als Fusionsprotein mit LexA exprimiert (2.5.1). Die DNS-Bibliothek des Rattenhirns wurde in den pJG4-5 Vektor eingebracht und als Fusion mit dem Transkriptionsaktivator B42 exprimiert. Das Zusammenbringen der DNS-bindenden Proteine LexA und des transkriptionsaktivierenden Proteins B42 erfolgte über die Transformation (2.2.1.2).

Daraufhin erfolgte ein Test auf Autoaktivierung des LEU2 Reporters über das Baitprotein (2.2.5.2). Es wurde ermittelt, ob das zu untersuchende Protein von sich aus eine transkriptionsaktivierende Fähigkeit besitzt. Das Baitprotein zeigte keine Eigeninduktion (Mönnich, 2001) und wurde für den eigentlichen Screen weiter verwendet.

Die darauf folgende Selektion auf Leucinprototrophie und Emission von GFP-Fluoreszenz erlaubte die Identifizierung putativ positiver Klone (2.2.5.4).

Die Expression des Zielproteins erfolgt nur bei Anwesenheit von Galactose (2.2.5.6), dagegen sind Kolonien, die die LEU2 Genexpression bei Anwesenheit von Glukose aktivieren, „falsch positive“ und wurden nicht weiter charakterisiert.

Mit Hilfe einer *Touchdown* PCR (2.2.4.1) wurden die *Prey*-Plasmide amplifiziert. Abbildung 16 zeigt exemplarisch die PCR Amplifikate nach der *Touchdown* PCR. Die identifizierten PCR-Amplifikate wurden sequenziert und über Vergleiche annotierter Sequenzen identifiziert (2.2.6).

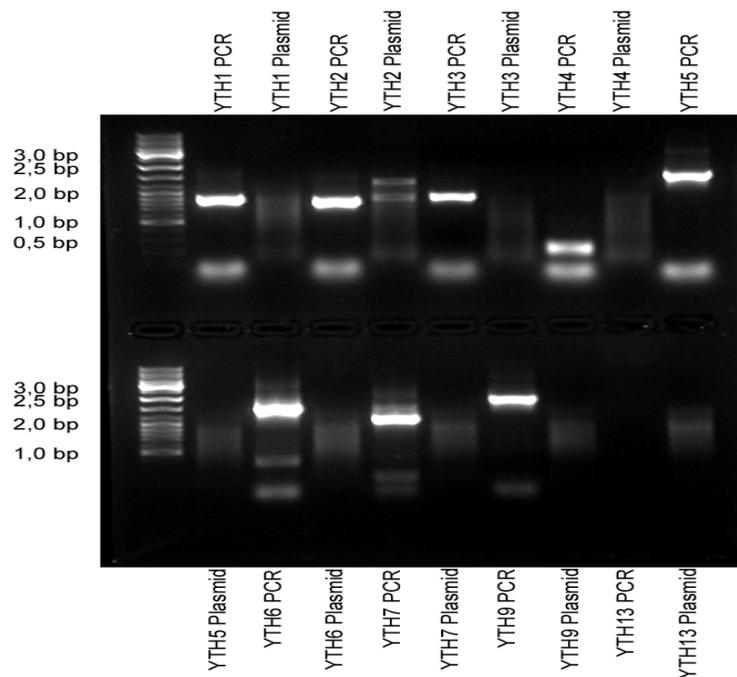
Zur Identifizierung der offenen Leserahmen und Sequenzvergleiche der Aminosäuresequenzen wurden die ausgewiesenen Computerprogramme verwendet (2.2.7). Tabelle 4 listet die sequenzierten putativen ODF2-Interaktionspartner auf. Die in der Liste fett hervorgehobenen über Homologievergleiche ermittelten putativen ODF2-Interaktionspartner zeigten eine Übereinstimmung des Leserahmens (Anhang). Die sequenzierten Bereiche und die Accessionsnummern der jeweiligen putativen ODF2-Interaktionspartner werden in der Liste im Anhang aufgeführt. Die ermittelten Daten müssen durch weitere Sequenzierung überprüft und bestätigt werden.

Aus den gelisteten Ergebnissen des *two-hybrid-screen* werden einige annotierte Vertreter (siehe dazu auch den Anhang)

- (i) fett hervorgehoben: solche mit übereinstimmenden Leserahmen
- (ii) kursiv hervorgehoben: Proteine die in Transportweg und Zellkommunikation involviert sind sowie mit dem Zytoskelett interagieren.

Tabelle 4 Zusammengefasste Liste der putativ positiven ODF2-Interaktionspartner aus dem Anhang

Annotierte putativ positive ODF2-Interaktionspartner	Anzahl der ermittelten putativ positiven Klone im <i>Yeast-two hybrid</i> Versuch	Sequenzierter Bereich/ Score/ Identities %
<b>cytochrome c oxidase subunit 3</b>	2	<b>8635-9320/1277/98</b>
<b>CRES cystatin 8 (cst8) mRNA</b>	1	<b>30-704/1261/98</b>
ubiquitin activating enzyme	7	9-44/58/97
Homo sapiens calcium and integrin binding 1 (calmyrin)	5	2-21/40/100
mature malate dehydrogenase	1	139-604/737/94
Rattus norvegicus eukaryotic translation elongating factor 2 (Eef2) mRNA	2	2164-2805/2145/99
Rattus norvegicus amyloid beta (A4) precursor protein (App)	6	1542-2229/1350/99
<i>Calmodulin regulated spectrin associated protein 1</i>	2	3779-3976/234/90
<i>SNAP25 Interacting Protein 30</i>	3	24-332/613/100
Clone RP23241K20	1	
<b>Rattus norvegicus voltage-dependent anion channel 2 (Vdac2), mRNA</b>	<b>3</b>	<b>18-326/613/100</b>
Hypothetical protein FLJ13045	3	2426-2712/569/100
Mus musculus chromosome 19, clone RP23-41B18	4	
Cell division control related protein 1. Synonyms: Pnutl1, Cdcrel1, Cdcrel-1	1	1341-1632/547/98
<b>Rattus norvegicus similar to ART3 mono(ADP-ribosyl)transferase (LOC305235)</b>	6	<b>1-214/424/100</b>
Mus musculus adult male cerebellum cDNS; clone 15000032F14 unknown EST	1	407-284/125/88
Rattus norvegicus CDK 109 mRNA	1	67-344/484/97
<i>Rattus norvegicus receptor for hyaluron-mediated motility mRNA "RHAMM"</i>	3	272-1/464/97
Similar to MGC15476 protein	3	
<b>Rattus norvegicus similar to sperm antigen HCMOGT-1 (LOC303208)</b>	1	<b>2135-2419/565/100</b>
Rattus norvegicus Estrogen-regulated protein CBL20, 20.4kD, mRNA	1	231-406/349/100
PREDICTED: Mus musculus RIKEN cDNS 2210404007 gene	1	211-337/119/100
Human DNS-PK interaction protein (KIP) mRNA	4	1-21/42/100



**Abbildung 16 Amplifikation der Prey-Plasmide mit Hilfe der Touchdown PCR**

10 µl der PCR Amplifikate wurden jeweils mit den entsprechenden Plasmiden nebeneinander aufgetragen und elektrophoretisch in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Die PCR-Amplifikate wurden sequenziert, die theoretische Aminosäuresequenz bestimmt und vergleiche angestellt. Die sequenzierten Bereiche und die Accessionsnummern werden in der Liste im Anhang aufgeführt. Die schwächere untere Bande repräsentiert unspezifische Bindungskonglomerate, unter anderem Primer-Dimere. Linke Spur: DNS-Marker.

Die ermittelten Sequenzen zeigten in den meisten Fällen eine hohe Übereinstimmung zu den in der Datenbank annotierten Proteinen (siehe dazu den Anhang und Tabelle 4). Die putativen ODF2-Interaktionspartner müssen im Detail weiter untersucht werden; dies wird Gegenstand weiterer Studien sein. In dieser Studie wird diskutiert, in welchen Kontext einige ausgewählte putative Interaktionspartner stehen könnten.

### 3.3 Zelluläre Fluoreszenzmikroskopie von ODF1- und ODF2-Fusionsproteinen mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie

Das Zytoskelett ist ein sehr dynamisches System und reagiert sensitiv auf chemische und mechanische Änderungen. Bei der Visualisierung von Zytoskelett-Proteinen bei immunzytologischen Experimenten müssen optimale Bedingungen zur Konservierung nativer Strukturen gewählt werden. Puffersysteme, Fixanzien und Detergenzien beeinflussen die Strukturen, einige Antikörper binden ihr Antigen nur unter spezifischen Fixationsbedingungen. Zur Erhaltung nativer Strukturen eignet sich die Formaldehyd-Fixierung<sup>6</sup>. Bei der Präparation und Antikörperdekoration des Tubulinzytoskeletts ist die Wahl der Fixierungsmethode davon abhängig, ob nur das Mikrotubuli-Netzwerk allein visualisiert wer-

<sup>6</sup> Bei der Methanol-Fixierung z.B. liegen die Proteine in einem denaturierten Zustand vor. Ein Problem tritt bei der Methanol-Fixierung auf: es zerstört die Morphologie der Chromosomen. Unter Einwirkung von Methanol „schwellen“ mitotische Chromosomen an. Dies wird bei einer Formaldehyd-Fixierung nicht beobachtet (<http://mitchison.med.harvard.edu/Protocols.htm>).

den soll oder Mikrotubuli zusammen mit anderen Proteinen. Soll nur das Mikrotubuli-Netzwerk visualisiert werden, eignet sich eine Formaldehyd-Fixierung. In dieser Arbeit wurde die Methode der Formaldehyd-Fixierung verwendet.

Die Gliederung und Kompartimentierung eukaryotischer Zellen in Zellkern, Zytoplasma und Zytoskelett kann mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Methoden visualisiert werden. Das Zytoskelett ist eines der Determinanten der Zellarchitektur. Wechselwirkungen von Proteinen mit den zytoskelettalen Filamenten bilden unter anderem die Grundlage bei der Signaltransduktion und den dynamischen Prozessen innerhalb einer Zelle. Die Generierung von Fusionsproteinen mit Fluorophoren wie EGFP ermöglicht eine fluoreszenzmikroskopische Detektion und Visualisierung des Fusionsproteins über den gekoppelten Fluorophor sowie eine räumliche Zuordnung des Zielproteins in den Kompartimenten der Zelle. Die Methode der zellulären Fluoreszenzmikroskopie sollte hier einen Einblick in die Lokalisation und Organisation der ODF-Fusionsproteine *in vivo* geben; dazu wurden die testisspezifischen *Odf1*- und *Odf2*-Sequenzen jeweils im Leserahmen zum pEGFP bzw. pECFP eingebracht (2.2.1). Die jeweiligen Konstrukte wurden dann anschließend in Säugerzellen transfiziert, die Zellen fixiert und für die konfokale Fluoreszenzmikroskopie präpariert (2.2.8). Die fluoreszierenden Fusionsproteine ermöglichen dann die Detektion und Lokalisation der Zielproteine in der Zelle.

Die konfokale Mikroskopie ist eine Methode, bei der ein fokussierter Laserstrahl lateral entlang der x- und y-Achse des mikroskopierten Objektes fährt. Die von den Fluorophoren emittierten Signale werden auf einen Photomultiplier (Detektor) geleitet und in einem Rechner digital in bildgebende Signale umgewandelt. Photonen, die außerhalb der fokalen Ebene entstehen, werden mit Hilfe einer Lochblende (engl. *Pinhole*) blockiert (2.2.11), so dass ein konturenscharfes Bild des Objekts nachgezeichnet werden kann. Das hier eingesetzte Zeiss LSM 510 besitzt zwei voneinander unabhängige Kanäle, die die spezifischen Fluorophoren, Laser-Spektrallinien und Emissionsbandweiten aufzeichnen können und es dadurch zu einer optimalen Verarbeitung und Differenzierung der Signale kommt. Dies reduziert Kreuzreaktionen oder Signalüberlappungen. Kreuzreaktionen oder Signalüberlappungen entstehen, wenn das Emissionsspektrum eines Fluorophors das Absorptionsspektrum des zweiten Fluorophors erreicht und dadurch destruktive Interferenzen induziert. Diese destruktiven Interferenzen können, wenn sie nicht eliminiert oder gefiltert werden, „falsche“ Signale übermitteln und die Interpretation eventueller Kolokalisationen erschweren, aber auch die Aussagefähigkeit der Fluoreszenzaufnahmen negativ beeinflussen, die dann zu eventuellen Fehlinterpretationen führen.

### 3.3.1 ODF1 kolokalisiert in COS-7-Zellen mit centrosomalen Strukturen

Die mikroskopische Visualisierung von Mehrfachfluoreszenzmarkierungen innerhalb einer Zelle erlaubt es nun, Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Zellkompartimenten zu erhalten. Dabei wird sich auch die Tatsache zunutze gemacht, dass Immunglobuline mit spezifischen chemischen Chromophoren gekoppelt werden können ohne dabei ihre spezifischen Bindungseigenschaften an das homologe Antigen zu verlieren. Die Fluochrom-markierten Antikörper reagieren spezifisch mit den Antigenen auf den präparierten und fixierten Zellen. Bei der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie wird gegen einen antigenspezifischen unmarkierten Antikörper ein gegen diesen gerichteter fluoreszenzmarkierter sekundärer Antikörper detektiert und dient, wie eingangs be-

schrieben, dem Nachweis von Strukturen und Komponenten innerhalb einer Zelle. Die testisspezifische *Odf1*-Sequenz wurde in den pECFP-C1-Vektor eingebracht (2.2.1; Abbildung 17). Das Fluorophor ECFP kodiert für eine Cyan fluoreszierende Variante des GFPs und besitzt ein Absorptionsmaximum von 433-453 nm bei einer gleichzeitigen Emissionswellenlänge von 475-501 nm.

Zur einführenden Charakterisierung des testikulären ODF1-Proteins in somatischen Zellen sollte mit Hilfe des Fluoreszenz-markierten Fusionsproteins die Lokalisation innerhalb der Zellen bestimmt werden; zu diesem Anliegen wurden Einzeltransfektionen durchgeführt (2.2.8). Diese Ergebnisse wurden dann den parallel durchgeführten Kotransfektionsexperimenten (2.2.8.1) in einer vergleichenden Studie gegenübergestellt und ausgewertet.



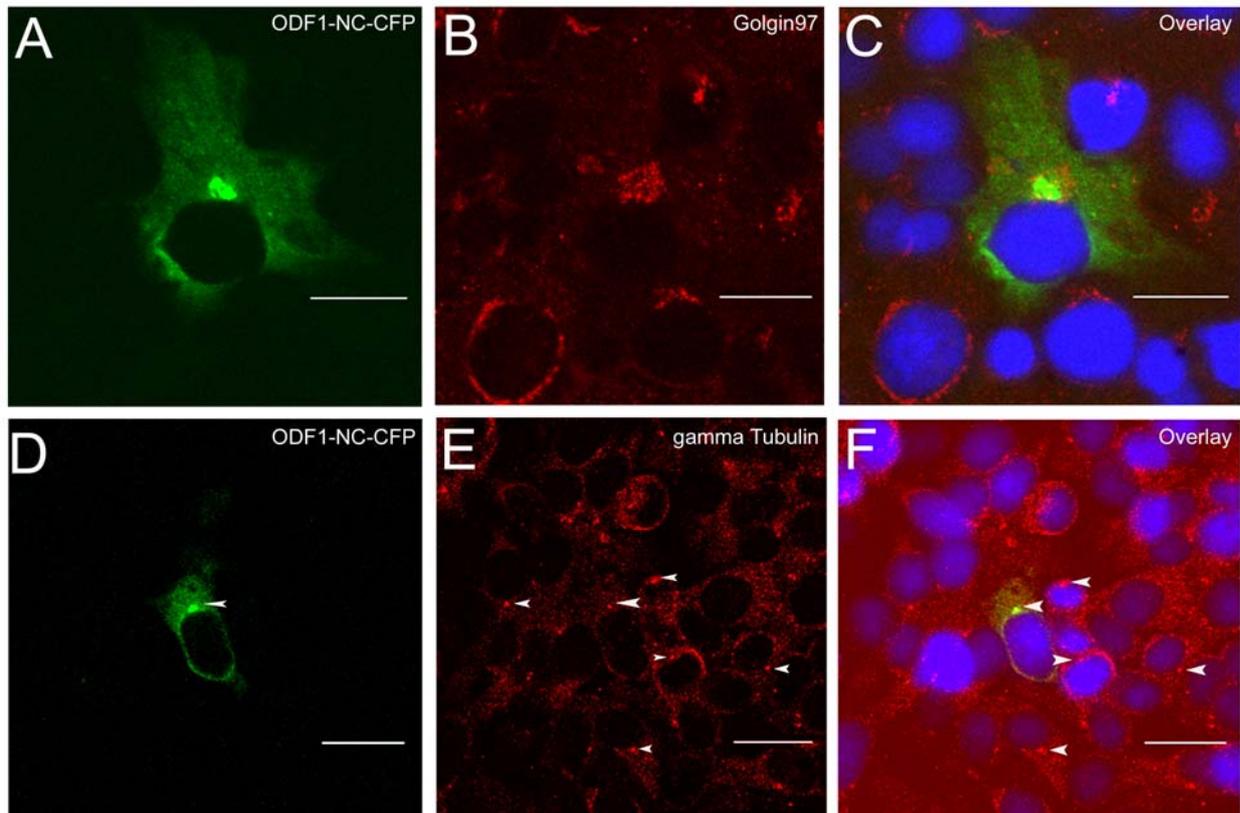
**Abbildung 17 Schema des ODF1-NC-CFP-Fusionsproteins**

Am Fusionsprotein lokalisiert der CFP-Anteil N-terminal. (Blau) = Leucin-Zipper-Motiv. Zahl = AS Position

Das ODF1-Fusionsprotein lokalisierte in COS-7-Zellen im Zytoplasma und zeigte dabei keine fibrilläre Organisation (Abbildung 18 A; Abbildung 18 D).

Auffällig war die prominent nahe am Zellkern gelegene Struktur, die nach Erfahrungswerten das Centrosom oder den Golgi-Apparat repräsentierte. Um dies einwandfrei zu belegen brauchte es Kolkalisationsexperimente, mittels derer über eine Visualisierung von Mehrfachfluoreszenzmarkierungen Moleküle oder Proteine, die miteinander interagieren oder räumlich nahe beieinander kolkalisieren, identifiziert werden können.

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie, durch die in der Immundekoration das Centrosom bzw. der Golgi-Apparat detektiert wurde (2.2.12.1), wurde an *Odf1*-NC-CFP transfizierten COS-7-Zellen eine Kolkalisation mit centrosomalen Strukturen identifiziert (Abbildung 18 F). Die prominenten Strukturen, die nahe am Kern assoziierten, korrespondierten mit der Lokalisation des gamma-Tubulins (Abbildung 18 E und Abbildung 18 F), und darüber hinaus lässt sich auch eine schwache und partielle Assoziation mit dem Golgi-Apparat (Abbildung 18 C) beobachten.



**Abbildung 18 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie an ODF1-exprimierenden COS-7-Zellen**

**(A)** Das ODF1-NC-CFP Fusionsprotein lokalisiert im Zytoplasma und in Strukturen, die prominent nah am Zellkern liegen (grün). Das Fusionsprotein zeigt keine fibrillären Strukturen.

**(B)** Das Bild zeigt die indirekte Immunfluoreszenzaufnahme des anti-Golgin97 Antikörpers.

**(C)** Die digital übereinandergelegten Aufnahmen (Overlay) zeigen, dass das ODF1-NC-Fusionsprotein partiell mit dem Golgi-Apparat assoziiert.

**(D)** Das Fusionsprotein lokalisiert im Zytoplasma und in Strukturen, die prominent nah am Zellkern liegen.

**(E)** Das Bild zeigt die indirekte Immunfluoreszenzaufnahme des anti-gamma-Tubulin Antikörpers. Die Pfeile markieren das Centrosom

**(F)** Das Fusionsprotein kolokalisiert mit gamma-Tubulin (Overlay).

Der Zellkern wurde mit DAPI markiert (blau). Die Fluoreszenz des Fusionsproteins wurde in der Fehlfarbe grün dargestellt, um die Blau-Fluoreszenz der Kernmarkierung dagegen abheben zu können. Die Skalierungen entsprechen 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.2 Bei Kotransfektion von *Odf1* und *Odf2* in COS-7-Zellen ändert sich die subzelluläre Organisation von ODF1

Zur Untersuchung von molekularen Prozessen *in vivo* wurden die ausgewiesenen Interaktionspartner *Odf1* und *Odf2* (Shao et al., 1997) in COS-7-Zellen kotransfiziert.

Von Interesse war, wie sich diese Interaktion in somatischen Zellen manifestiert und ob die Proteine in kolokalisieren. Kolokalisation wird detektiert, wenn Moleküle oder Proteine interagieren, d.h. an Strukturen binden, die identisch sind oder räumlich nahe beieinander lokalisieren. Dazu mussten die Fusionsproteine unterschiedlich markiert vorliegen, um sie visuell innerhalb der Zellkompartimente voneinander zu unterscheiden.

Es galt Fluorophorenpaare zu finden, die in ihren Fluoreszenzspektren nicht interferieren. Auf Grund ihrer Fluoreszenzspektren sind ECFP und EYFP ein ideales Fluoreszenzproteinpaar für die dualchromophore Fluoreszenzmikroskopie (Tabelle 5).

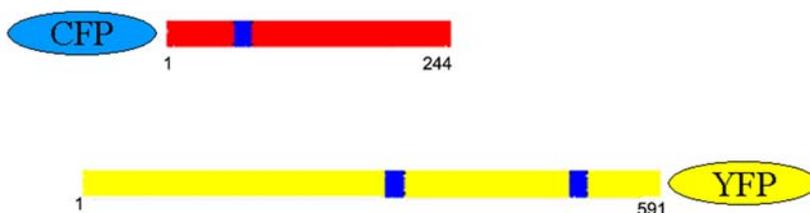
Es wurden die *Odf1*-spezifischen Sequenzen in pECFP-C1 und die *Odf2*-spezifischen Sequenzen in pEYFP-N1 eingebracht (2.2.8.1). In dem doppelt markierten Experiment wurde die ektopische duale Lokalisation der beiden Proteine in COS-7-Zellen fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und die Ergebnisse der jeweiligen Einzeltransfektionen vergleichend gegenübergestellt (2.2.8; 2.2.8.1).

**Tabelle 5** Fluoreszenzspektren der verwendeten Reporterproteine

Fluoreszierende Proteine	Absorptions-Maximum	Emissions-Maximum
EGFP	488 nm	507 nm (grün)
ECFP	433 nm	475 nm (cyan)
EYFP	513 nm	527 nm (gelb)

Das ODF2-NC-YFP-Fusionsprotein zeigte eine identische Lokalisation wie das ODF2-NC-GFP-Fusionsprotein (ohne Abbildung). Es lokalisierte im Zytoplasma, im Zellkern und in prominenten Strukturen, die nahe am Zellkern assoziieren. Diese Strukturen korrespondieren mit der Lokalisation des Golgi-Apparates (3.3.3). Dabei bildet das ODF2-NC-Fusionsprotein fibrilläre Strukturen (Donkor et al., 2004).

Das ODF1-NC-Fusionsprotein lokalisierte im Zytoplasma, kolokalisierte mit centrosomalen Strukturen (Abbildung 18) und zeigte es eine schwache Assoziation mit dem Golgi-Apparat.



**Abbildung 19** Schemata der ODF1-NC-CFP und ODF2-NC-YFP Fusionsproteine

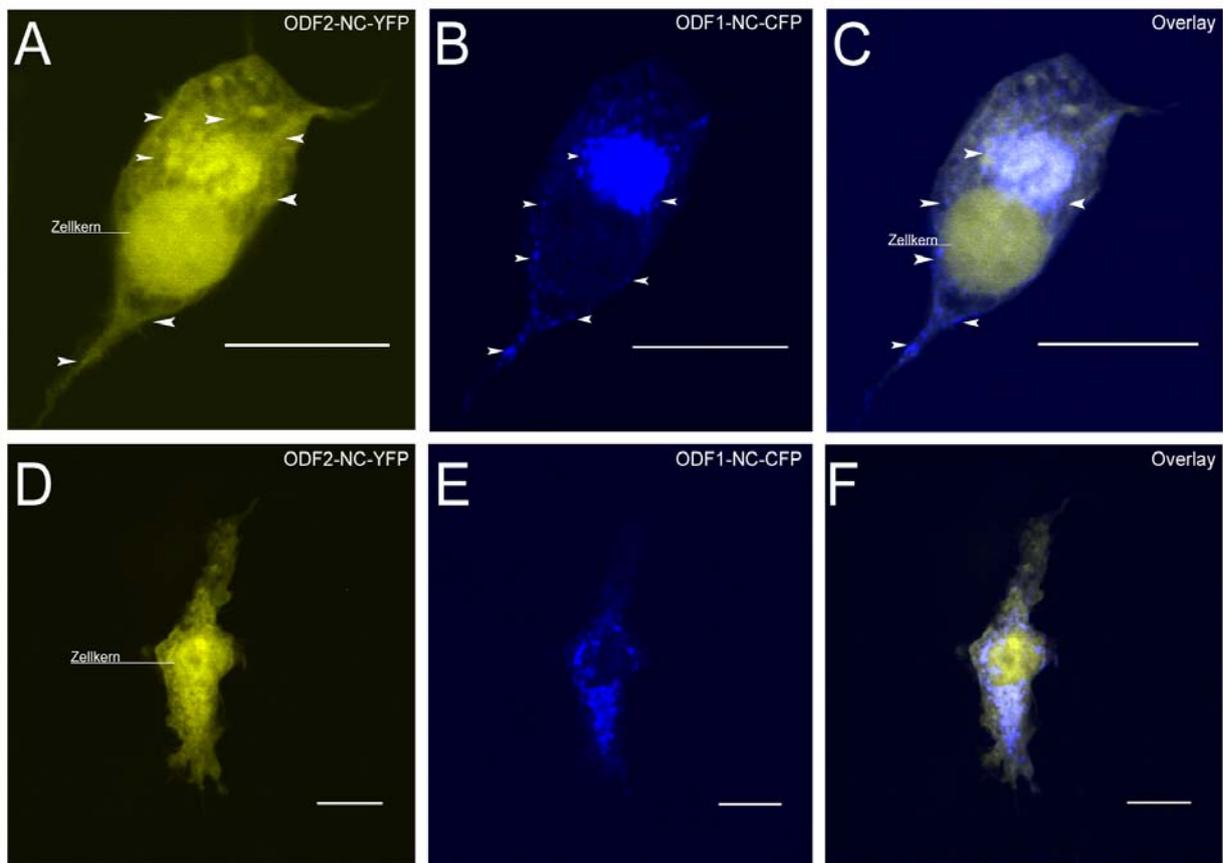
Die Zahlen markieren die AS Positionen, Leucin-Zipper-Motive sind blau unterlegt.

Vergleicht man die Ergebnisse der Einzeltransfektionen mit den Kotransfektionen, so zeigte sich ein Verändertes Erscheinungsbild der ODF1-Fusionsprotein exprimierenden COS-7-Zellen.

- (i) Bei Kotransfektion mit *Odf2*-NC-EYFP in COS-7-Zellen aggregierte im Zytoplasma das ODF1-NC-CFP-Fusionsprotein in prominenten Strukturen nahe am Zellkern, die mit den ODF2-NC-YFP-Fusionsprotein-Aggregaten korrespondierten (Abbildung 19; Abbildung 20).
- (ii) Das ODF1-NC-CFP-Fusionsprotein ordnet sich perlenartig an den von ODF2-NC generierten Fibrillen an (Abbildung 19; Abbildung 21).

Die Anordnung zu Perlenschnur-analogen Strukturen, die sich entlang der *Odf2*-generierten Fibrillen formieren, belegt den Einfluss von ODF2 auf das ODF1-Protein (Abbildung 21). Das ODF2-Protein scheint dem ODF1-Protein seine zytoskelettale fibrilläre Anordnung aufzuzwingen, indem diese gegenseitige Wechselwirkung darin mündet, dass das ODF1-Protein mit den vorgegebenen fibrillären Strukturen assoziiert und folgt. Die Überexpression von ODF1-NC-Fusionsprotein allein organisierte sich nicht zu Fibrillen (Abbildung 18).

Die hier detektierten Beobachtungen visualisieren, dass die nachgewiesene physikalische Interaktion der beiden Mantelfaserproteine ODF1 und ODF2 (Shao et al., 1997) in somatischen Zellen zur Bildung von Protein-Netzwerk ähnlichen Strukturen führt.



**Abbildung 20 Dualchromophore konfokale Fluoreszenzmikroskopie an *Odf1*- und *Odf2*-kotransfizierten COS-7-Zellen**

COS-7-Zellen wurden mit *Odf1*-NC-ECFP und *Odf2*-NC-EYFP kotransfiziert.

(A) Das ODF2-NC-YFP-Fusionsprotein lokalisiert im Zellkern, im Zytoplasma. Das Fusionsprotein organisiert sich in fibrillären Strukturen (Pfeile).

(B) Das ODF1-NC-CFP-Fusionsprotein lokalisiert im Zytoplasma und liegt punktuell auf den korrespondierenden ODF2-Fibrillen (Pfeile).

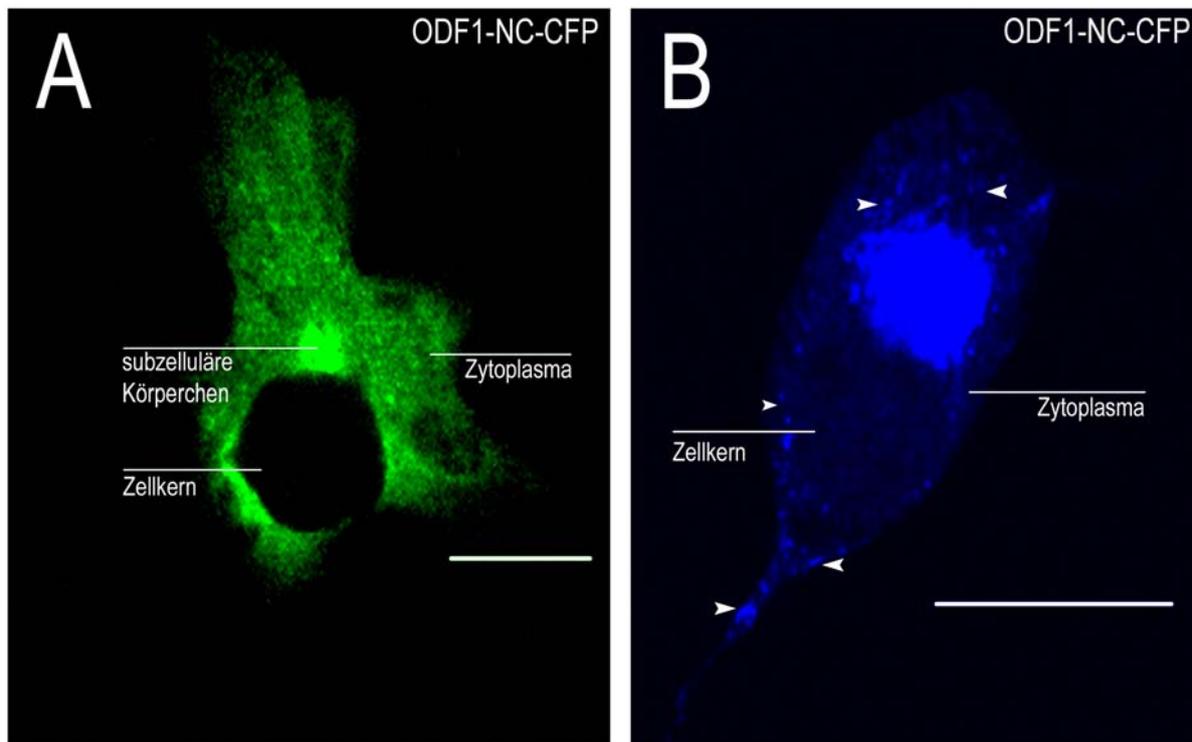
(C) Die übereinander gelegte Fluoreszenzaufnahme, Overlay (C und F), zeigt die Kolo-kalisation von ODF1-NC-Fusionsproteinen auf den ODF2-Fibrillen und in den subzellulären Strukturen des ODF2-Proteins.

(D) Das ODF2-NC-YFP-Fusionsprotein lokalisiert im Zellkern und im Zytoplasma.

(E) Das ODF1-NC-CFP-Fusionsprotein lokalisiert in Aggregaten im Zytoplasma.

(F) Die Aggregate korrespondieren mit dem ODF2-NC-YFP-Fusionsprotein.

Die Skalierungen entsprechen 20  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 21** Vergleich der subzellulären Organisation der *Odf1*-NC-ECFP einzeltransfizierten mit *Odf1*-NC-CFP und *Odf2*-NC-YFP doppeltransfizierten COS-7-Zellen

**(A)** *Odf1*-NC-ECFP lokalisiert im Zytoplasma und in subzellulären Strukturen. (Vergleiche dazu Abbildung 18).

**(B)** ODF1-NC-exprimierende COS-7-Zelle kotransfiziert mit *Odf2*-NC-EYFP. Die Abbildung zeigt das Emissionssignal des ODF1-NC-Fusionsproteins. Das Fusionsprotein lokalisiert im Zytoplasma, akkumuliert in der Nähe des Zellkerns und reihet sich perlenförmig im Zytoplasma an (Pfeile).

Die Skalierungen entsprechen 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.3 ODF2-Fusionsproteine assoziieren mit dem Golgi-Apparat und dem ER

Die erste Indikation einer potentiellen funktionellen Wechselwirkung zwischen Molekülen und anderen Zellbestandteilen in ihrer Umgebung kann mit Hilfe von Mehrfachfluoreszenzmarkierungen sichtbar gemacht und über eine eventuelle Kolo-kalisation markierter Zellstrukturen festgestellt werden. Voraussetzung dafür ist eine *Crosstalk*-freie Trennung der überlagernden Fluoreszenzsignale (*Emissions-Crosstalk*, *Anregungs-Crosstalk*) der Fluoreszenz-markierten Zellstrukturen. In jedem Fall ergibt sich bei der Detektion eventuell kolo-kalisierender Komponenten die Frage nach der Aussagefähigkeit der dokumentierten Beobachtung. Bei der Interpretation des Datenmaterials möchte man sich nicht auf Artefakte stützen.

Der bei der indirekten konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie eingesetzte Chromophor-markierte sekundäre MFP590 Antikörper (2.1.2; 2.2.11.1) besitzt aufgrund seines Absorptions- und Emissionsspektrums die Voraussetzung zur kreuzreaktionsfreien Trennung der Fluoreszenzsignale bei gleichzeitiger Markierung der exprimierten GFP-Fusionsproteine (Tabelle 6). Damit waren die Voraussetzungen für aussagekräftige Experimente geschaffen.

**Tabelle 6 Fluoreszenzspektren der verwendeten Fluorochrome**

<b>Fluorochrom</b>	<b>Absorptions-Maximum</b>	<b>Emissions-Maximum</b>
MFP590	550 nm und 597 nm	624 nm
EGFP	488 nm	508 nm

COS-7-Zellen wurden jeweils mit einem der vier *Odf2*-GFP-Konstrukte transfiziert (2.2.8). Die Zellen wurden fixiert und Zellorganellen (ER, Mitochondrien und Golgi-Apparat) immunologisch detektiert und fluoreszenzmikroskopisch visualisiert (2.2.11; 2.2.12.1).

Die Analyse der Fluoreszenzaufnahmen von *Odf2*-transfizierten Säugerzellen erbrachte ein heterogenes Bild innerhalb einer Zellpopulation (Donkor et al., 2004; Tabelle 7). Das ODF2-NC-Fusionsprotein, das den gesamten Bereich des *Odf2*-Gens kodiert, lokalisiert zu je einem Drittel im Zytoplasma, Nukleus und Nukleus/Zytoplasma (Tabelle 7). Zusätzlich beobachtet man eine Lokalisation des Fusionsproteins in subzellulären Körperchen, die nahe am Zellkern assoziieren (Abbildung 23). In den vorangegangenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass das ODF2-Protein fibrilläre Strukturen generiert und über ein bis jetzt unbekanntes Protein mit dem Mikrotubuli-Netzwerk assoziiert (Donkor et al., 2004).

Das variierende Erscheinungsbild der *Odf2*-transfizierten Zellen äußerte sich insofern, dass das ODF2-NC-Fusionsprotein neben der Lokalisation im Zytoplasma und im Zellkern zusätzlich mit einer prominenten Struktur, die nahe am Zellkern lokalisiert, vorkommt (Abbildung 23; Abbildung 24; Tabelle 7). Kontrollzellen, die das Chromophorenprotein GFP exprimierten, zeigten eine gleichmäßige Verteilung innerhalb der Zellen ohne Aggregatbildung (siehe dazu auch Diplomarbeit, Donkor 2001).

Das ODF2-NC1-Fusionsprotein lokalisiert zu 78 % im Zytoplasma. Daneben wurden disperse punktförmige Aggregate, die im Zytoplasma angeordnet liegen, beobachtet. Das ODF2-NC2-Fusionsprotein lokalisiert zu 99 % im Zytoplasma; hier werden ebenso disperse punktförmige Aggregate beobachtet, die sich ebenfalls im Zytoplasma organi-

sieren. Das ODF2-N2C-Fusionsprotein lokalisiert zu 73 % im Zellkern und zeigt keine punktförmigen Aggregate. (Abbildung 22; Abbildung 23; Abbildung 24; Tabelle 7).

Nun stellte sich die Frage, ob diese subzellulären Körperchen und dispersen Aggregationen bei den C-terminal deletierten ODF2-Konstrukten (ODF2-NC1 und ODF2-NC2; Tabelle 7; Abbildung 6) mit Zellorganellen assoziieren. Erste Hinweise darauf würde eine Kolokalisation mit dem ER, dem Golgi-Apparat oder auch den Mitochondrien ergeben. Dazu wurden immunzytologische Experimente an transfizierten fixierten Präparaten durchgeführt und mikroskopisch ausgewertet (2.2.11.1).

**Tabelle 7 Subzelluläre Verteilung der ODF2-Fusionsproteine**

Fusionsproteine	Nukleus	Nukleus/Zytoplasma	Zytoplasma	Aggregate/subzelluläre Körperchen
ODF2-NC-GFP 	37 %	33 %	30 %	subzelluläre Körperchen Kern nah assoziiert
ODF2-NC1-GFP, ODF2 $\Delta$ C <sub>429-591</sub> 	-	22 %	78 %	punkt-förmige Aggregate im Zytoplasma
ODF2-NC2-GFP, ODF2 $\Delta$ C <sub>375-591</sub> 	1 %	3 %	99 %	punkt-förmige Aggregate im Zytoplasma
ODF2-N2C-GFP, ODF2 $\Delta$ N <sub>1-369</sub> 	73 %	26 %	1 %	keine Aggregate, keine supzelluläre Körperchen

Eine Interpretation der subzellulären Verteilung der ODF2-Fusionsproteine deutet darauf hin, dass eine mögliches Kernlokalisierungssignal in dem C-terminalen Abschnitt des Proteins kodiert ist, der durch ODF2-N2C repräsentiert wird, da keine Kernlokalisierung der beiden N-terminalen Fusionsproteine detektiert wurde, die von den zwei Konstrukten *Odf2*-NC1 und *Odf2*-NC2 repräsentiert werden (Tabelle 7; Donkor et al., 2004).

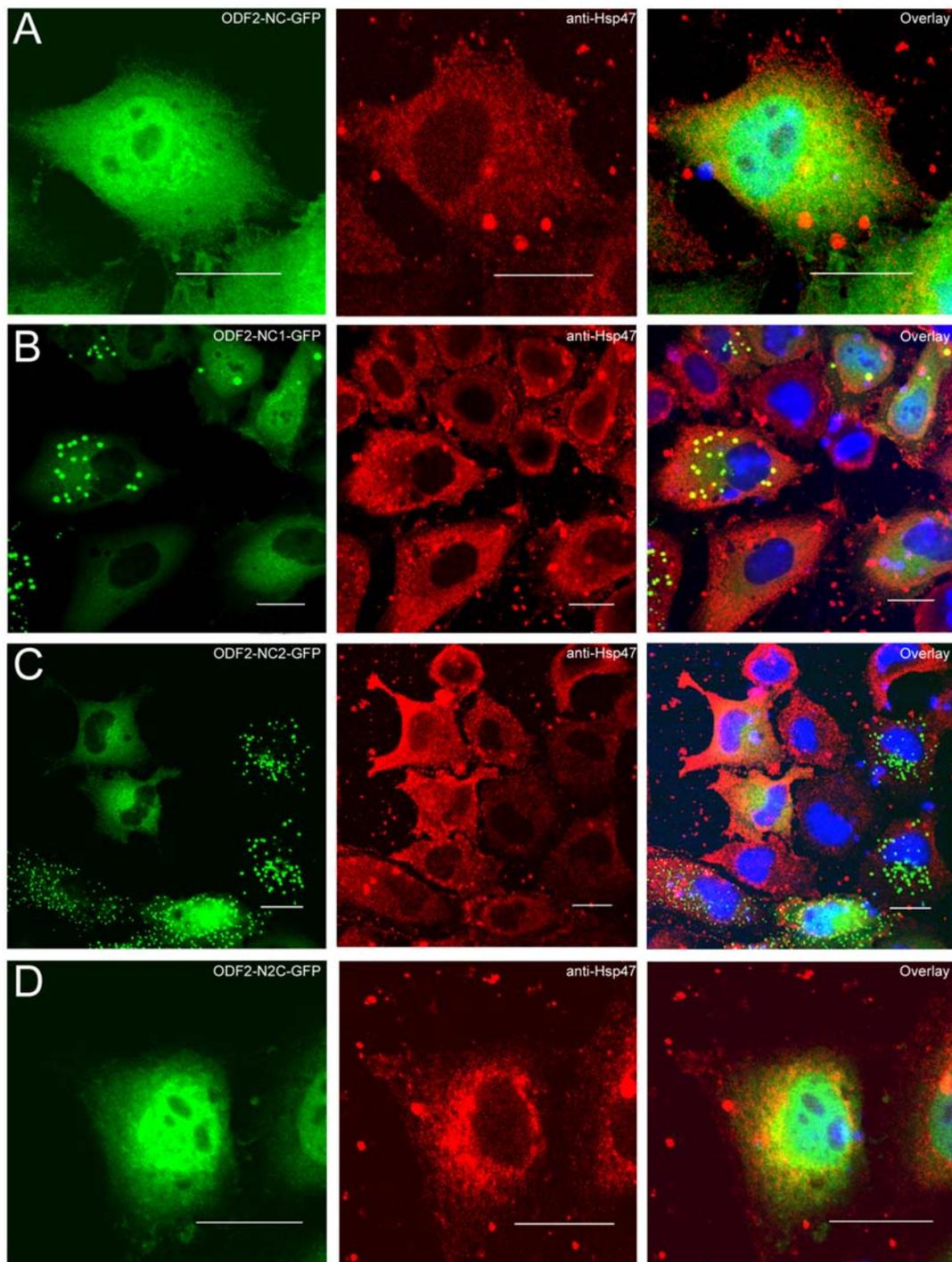
Verwendet wurden Antikörper gegen das ER-ständige Hitzeschock-Protein Hsp47 (Ko et al., 1999) und gegen Golgin97, ein peripheres Membran Protein welches an der zytoplasmatischen Oberfläche des Golgi-Apparates lokalisiert (Lu et al., 2004). Der Mitochondrien selektive MITO Tracker® ist eine Zellmembran permeabilisierende Substanz, die in den Mitochondrien lebender und respirierender Zellen oxidiert, dann mit den Thio- len der Proteine und Peptide reagiert, dadurch autofluoreszierend wird und ein fixierbares Konjugat bildet (Vanden, 2004). Die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte, dass die dispersen punktförmigen aggregierten Fusionsproteine im Fall des ODF2-NC1 und -NC2 schwach mit dem ER, dem Golgi-Apparat und den Mitochondrien korrespondieren. Die ODF2-NC-GFP- und ODF2-N2C-GFP-Fusionsproteine zeigten hingegen eine partielle Assoziation mit dem Hsp47-Protein und den Mitochondrien (Abbildung 22; Abbildung 24; Tabelle 8) und eine kolokalisation mit dem Golgi-Apparat (Abbildung 23; Tabelle 8).

**Tabelle 8 Übersicht und Zusammenfassung der zellulären Kolokalisation der ODF2-Fusionsproteine in COS-7-Zellen**

Fusionsproteine	ER Lokalisation	Golgi Lokalisation	Mitochondrien Lokalisation
ODF2-NC-GFP 	partiell kolokalisiert	kolokalisiert	partiell kolokalisiert
ODF2-NC1-GFP 	schwache Kolokalisation	schwache Kolokalisation	keine Kolokalisation
ODF2-NC2-GFP 	schwache Kolokalisation	schwache Kolokalisation	keine Kolokalisation
ODF2-N2C-GFP 	partiell kolokalisiert	kolokalisiert	partiell kolokalisiert

Die beiden ODF2-Fusionsproteine die den N-terminalen Abschnitt des ODF2-Proteins repräsentierenden zeigten nur eine schwache Kolokalisation mit dem ER (Abbildung 22). Es kann in einem Ausschlussprinzip ein möglicher determinierender Bereich für die Lokalisation mit dem ER im C-terminalen Abschnitt des ODF2-Proteins ausgewiesen werden, der im Aminosäurebereich 370-591 liegen könnte (Tabelle 8). Die Sequenz für die Kolokalisation des ODF2-Fusionsproteins mit dem Golgi-Apparat und den Mitochondrien ist, nach gleicher Überlegung wie oben angeführt, im C-terminalen Abschnitt des Proteins lokalisiert und betrifft ebenfalls den Aminosäurebereich 370-591 (Abbildung 23; Abbildung 24). Es ist eine mögliche Organellen-bindene Domäne im C-terminalen Abschnitt des ODF2-Proteins determiniert.

Diese heterogenen Erscheinungsformen in den asynchronen transient transfizierten Zellen lässt vermuten, dass die Verteilung des Fusionsproteins zellulären dynamischen Prozessen unterliegt, die abhängig vom Zellzyklus sind. Die fixierten Zellen, die zur Mikroskopie eingesetzt wurden, erlauben nur den Blick auf transiente Momentaufnahmen. Dies leitete dazu über, bekannte Transportmechanismen zu blockieren, um dann die Verteilung und Lokalisation der Fusionsproteine in der Zelle zu charakterisieren (3.4). Die direkte Beobachtung der dynamischen Prozesse innerhalb lebender Zellen mit Hilfe der mikroskopischen Lebendzellaufnahmen (3.6) sollten Einblicke in die dynamische Verteilung von ODF2 während des Zellzykluses geben.



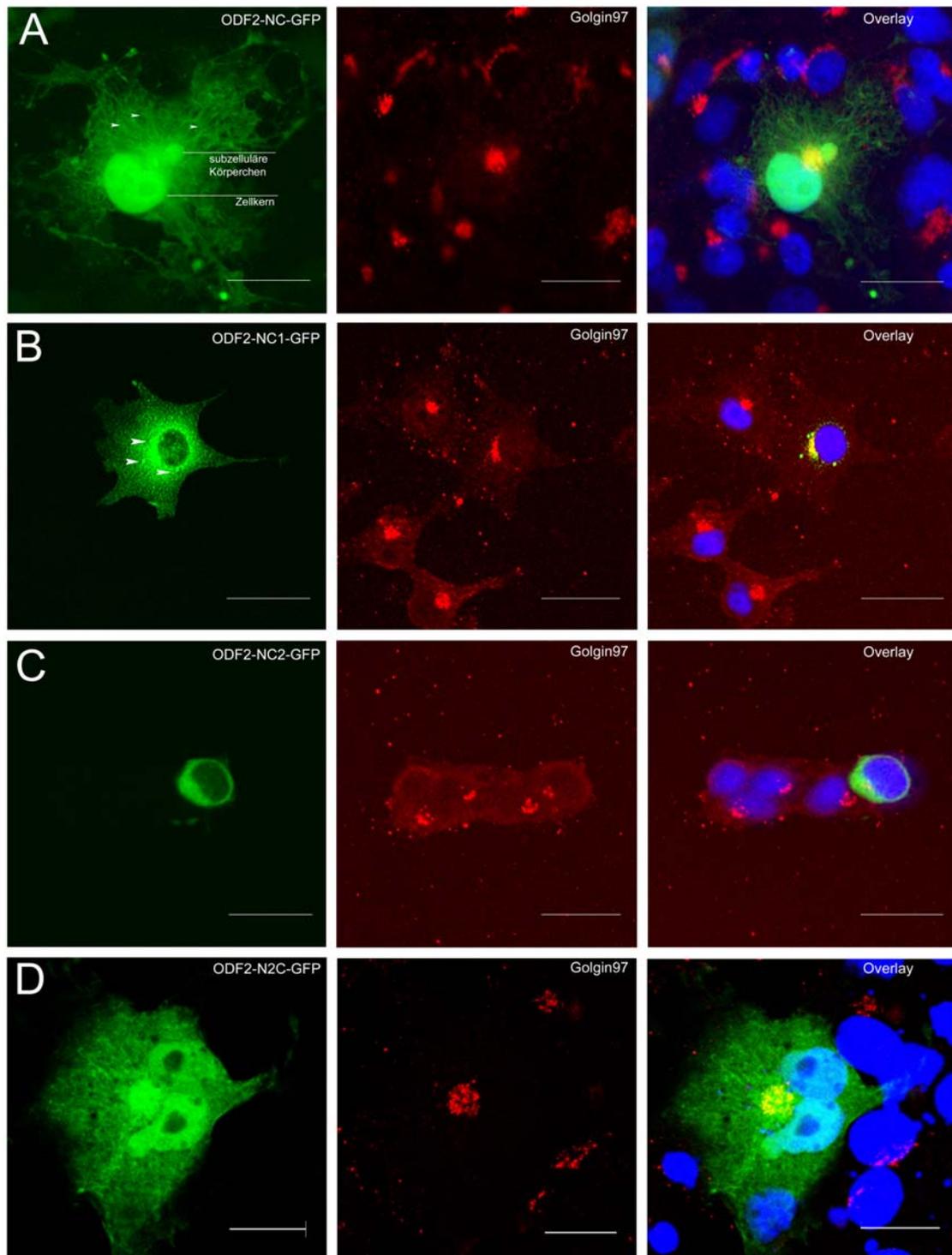
**Abbildung 22 Immunfluoreszenzaufnahmen von anti-Hsp47 an ODF2-GFP-überexprimierenden COS-7-Zellen**

**(A)** Lokalisation des ODF2-NC-Fusionsproteins im Zellkern und im Zytoplasma. Das Bild in der Mitte zeigt die Immunfluoreszenzaufnahme des Hsp47-Proteins. Das rechte Bild (Overlay) zeigt die digital übereinander gelegten Bilder; das Fusionsprotein korrespondiert partiell mit dem Hsp47-Protein.

**(B)** ODF2-NC1-Fusionsprotein lokalisiert im Zytoplasma und in dispersen Aggregaten. Das Bild in der Mitte zeigt die Immunfluoreszenzaufnahme derselben Zelle. Es zeigt eine schwache Kolokalisation der Aggregate mit dem Hsp47-Protein (Overlay).

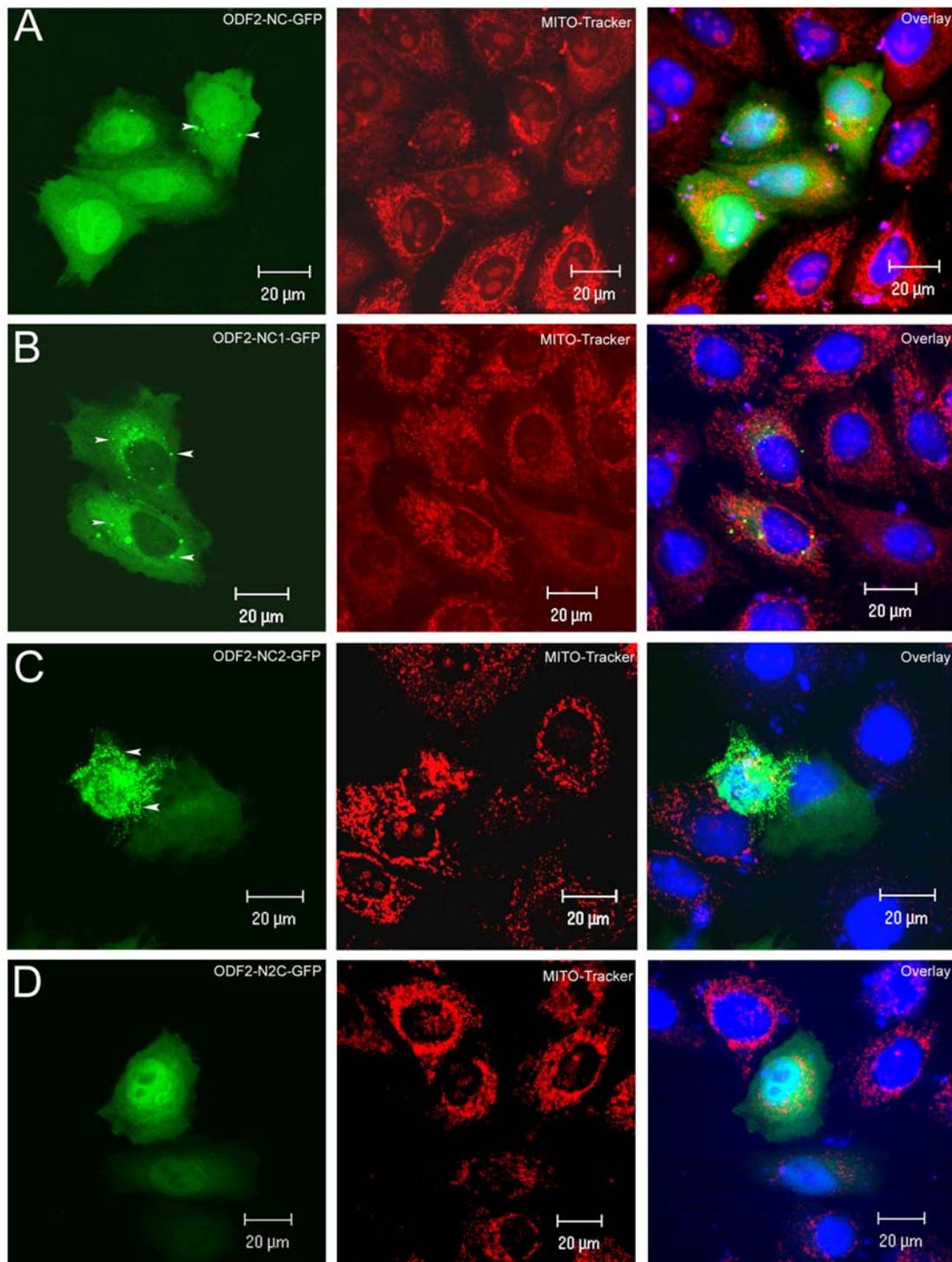
**(C)** Das ODF2-NC2-Fusionsprotein lokalisiert im Zytoplasma und in dispersen Aggregaten. Das Fusionsprotein kolokalisiert schwach mit dem Hsp47-Protein (Overlay).

**(D)** Das ODF2-N2C-Fusionsprotein lokalisiert im Zellkern und im Zytoplasma. Es kolokalisiert partiell mit dem Hsp47-Protein. Die Skalierung entspricht 20 µm.



**Abbildung 23 Immunfluoreszenzaufnahmen von anti-Golgin97 an ODF2-GFP-überexprimierenden COS-7-Zellen.**

**(A)** Das ODF2-NC-GFP-Fusionsprotein lokalisiert im Zellkern, im Zytoplasma, in den subzellulären Körperchen und generiert fibrilläre Strukturen im Zytoplasma (Pfeile). Das Bild in der Mitte zeigt die Immunfluoreszenzaufnahmen von anti-Golgin97. Das digital übereinander gelegte Bild (Overlay) zeigt die Kolokalisation des Fusionsproteins mit dem Golgi-Apparat. **(B)** Das ODF2-NC1-Fusionsprotein lokalisiert im Zytoplasma und zeigt eine partielle Assoziation mit dem Golgi-Apparat (Overlay). **(C)** Das ODF2-NC2-Fusionsprotein lokalisiert im Zytoplasma und zeigt eine partielle Assoziation mit dem Golgi-Apparat. **(D)** Das ODF2-N2C-Fusionsprotein lokalisiert im Zytoplasma, im Zellkern und kolokalisiert mit dem Golgi-Apparat (Overlay). Die Skalierung entspricht 20 µm.



**Abbildung 24 Detektion von Mitochondrien in ODF2-GFP-überexprimierenden Zellen**

Mit Hilfe der MITO Tracker wurden die Mitochondrien in den transfizierten Zellen detektiert.

**(A)** Das ODF2-NC-Fusionsprotein lokalisiert im Zytoplasma, Zellkern und in den subzellulären Strukturen (Pfeile). Das Bild in der Mitte zeigt die mikroskopische Aufnahme der Mitochondrien derselben Zelle. Das rechte Bild zeigt die digital übereinander gelegten Bilder. Das Fusionsprotein mit den subzellulären Körperchen kolokalisiert schwach mit den Mitochondrien der COS-7-Zellen.

**(B)** Das ODF2-NC1-Fusionsprotein kolokalisiert nicht mit den Mitochondrien der COS-7-Zellen.

Auch die dispersen Aggregate des Fusionsproteins lokalisieren nicht mit den Mitochondrien.

**(C)** Das ODF2-NC2-Fusionsprotein und die dispersen Aggregate kolokalisieren vereinzelt mit den Mitochondrien der COS-7-Zellen.

**(D)** Das ODF2-N2C-Fusionsprotein kolokalisiert schwach mit den Mitochondrien der COS-7-Zellen.

### 3.4 ODF2-überexprimierende Zellen und der Proteintransport

#### 3.4.1 ODF2-überexprimierende Zellen zeigen eine Verlagerung der subzellulären Körperchen in Richtung Zellperipherie bei Inkubation mit Brefeldin A

Die eingangs erhaltenen Ergebnisse lassen nun eine weitaus umfassendere Beschreibung des testikulären ODF2-Proteins zu. Das Protein assoziiert mit dem Zytoskelett und mit den Zellorganellen somatischer Zellen (3.3.3). Es generiert fibrilläre Strukturen und zeigt Ähnlichkeiten mit dem Intermediärfilamentsystem (Donkor et al., 2004). Diese beobachteten Assoziationen könnten auf eine Bedeutung des ODF2-Proteins bei der zellulären somatischen Organisation hindeuten. Weitere durchgeführte Experimente sollten eine mögliche Interaktion des ODF2-Proteins bei den intrazellulären Proteintransporten untersuchen.

Brefeldin A (BFA) ist ein fungiides Stoffwechselprodukt von *Eupenicillium brefeldianum*. BFA inhibiert den intrazellulären Protein-Transport vom ER zum Golgi-Apparat sowie die Proteinsekretion (Klausner et al, 1992). Ohne den retrograden Transport zu blockieren. Die schnelle und reversible Umverteilung von intrazellulären Membranen führt zu verschiedenen vielseitigen spezifischen und reversiblen Effekten bei zellulären Proteintransporten (Pelham, 1991; Rothman und Orci, 1992). Inkubation von Zellen in Kultur mit BFA führt zu einer Blockierung des Proteintransports zum Golgi und zu einer Akkumulation der Proteine im ER (Fujiwara et al., 1988). Auf Grund dieser Eigenschaft von BFA an Zellen in Kultur können Mechanismen des Proteintransports analysiert werden.

Die zelluläre konfokale Fluoreszenzmikroskopie an ODF2-GFP-überexprimierenden COS-7-Zellen und HeLa-Zellen erbrachte eine definierte und identische Lokalisation des Fusionsproteins innerhalb der Zelle und, wie oben beschrieben, in beiden Zelllinien eine Assoziation mit dem Golgi-Apparat (3.3.3). Der Golgi-Apparat besteht aus abgeflachten Membranzisternen, die als Stapel um das Centrosom der Zelle orientiert sind. An den Übergängen des Golgi-Apparates zu den anderen Kompartimenten der Zelle bilden tubuläre und vesikuläre Membranstrukturen das cis- und trans-Golgi-Netzwerk. Nahe dem Golgi-Apparat lokalisierte in den transfizierten Zellen das subzelluläre Körperchen des ODF2-Fusionsproteins (Abbildung 23). Eine Blockierung des Golgi-ER-Transportes in *Odf2*-überexprimierenden Zellen sollte belegen, ob das Fusionsprotein in Prozessen des intrazellulären Proteintransportes involviert ist.

COS-7-Zellen wurden mit dem *Odf2*-NC-Konstrukt transfiziert (2.2.8) und in zwei Experimenten:

- (i) 30 min bei einer BFA Konzentration von 10 µg/ml
- (ii) 50 min bei einer BFA Konzentration von 12,5 µg/ml

inkubiert (2.2.9). Die Zellen wurden nach der Inkubation immundekoriert (2.2.11.1) und mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die gleichzeitige Immundekoration mit anti-alpha-Tubulin und anti-Golgin97 diente zur indirekten Lokalisation des Centrosoms der BFA behandelten Zellen.

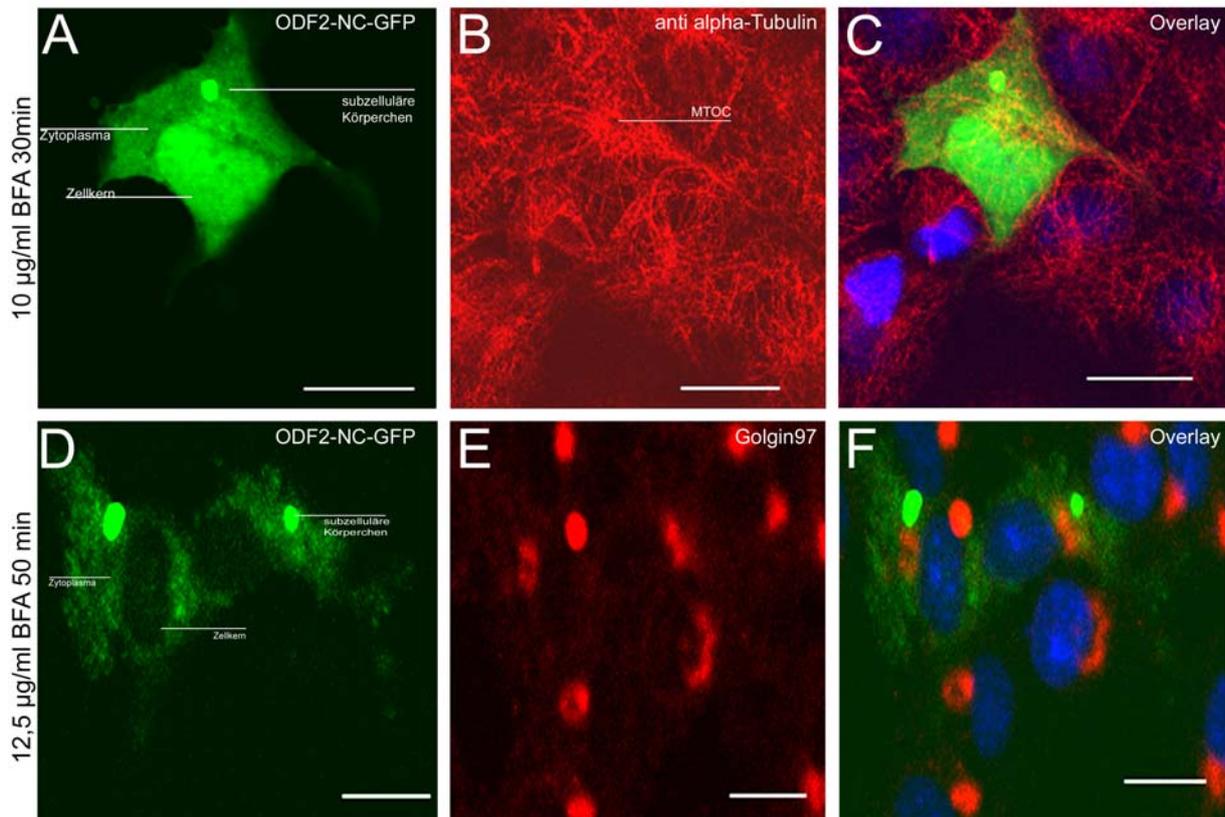
Nach 30 minütiger Inkubation mit BFA (10 µg/ml) wurde eine veränderte Lokalisation des Fusionsproteins beobachtet: Das subzelluläre Körperchen verlagerte die Position weg vom Centrosom hin in Richtung Zellperipherie, dabei blieb die Zytoplasma- und Zellkernlokalisation konstant (Abbildung 25).

Da der Effekt und der Einfluss des Fungizids BFA auf Zellkulturzellen eventuell in Abhängigkeit zur Konzentration und zur Einwirkdauer stehen, wurde im zweiten Experiment länger inkubiert und mit einer höheren BFA Konzentration gearbeitet. Nach der 50 minütigen Inkubation mit BFA (12,5 µg/ml) wurde in einigen Zellen das Fehlen der Kernlokalisierung des Fusionsproteins beobachtet (Abbildung 25).

Da das ODF2-NC Fusionsprotein auch zu 30 % ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert sein kann (3.3.3; Tabelle 7) muss dieser Phänotyp nicht unbedingt auf die Auswirkung der BFA Inkubation zurückgeführt werden, bleibt aber dennoch auffällig.

Zusammenfassend ist zu notieren:

- (i) In unbehandelten ODF2-überexprimierenden Zellen lokalisiert das subzelluläre Körperchen des ODF2-NC-Fusionsproteins in naher Assoziation mit dem Zellkern und kolokalisiert mit dem Interphase Golgi-Komplex.
- (ii) Bei Einwirkung von BFA verlagern sich die subzellulären Körperchen in Richtung Zellperipherie und verlieren ihre nahe Zellkernassoziation, sie kolokalisieren nicht mit dem Golgi-Komplex (Abbildung 25).



**Abbildung 25 BFA Inkubation an ODF2-GFP-überexprimierenden COS-7-Zellen**

BFA ist ein Modulator der Proteinsekretion. Es unterbricht den Transportweg vom ER zum *cis* Golgi.

**(A)** *Odf2*-NC-GFP-transfizierte COS-7-Zellen wurden 30 min mit BFA (10 µg/ml) inkubiert. Das Fusionsprotein lokalisierte im Zytoplasma, im Zellkern und im subzellulären Körperchen. Dieses subzelluläre Körperchen verlagerte die Lokalisation in Zytoplasma und verliert die nahe Assoziation zum MTOC.

**(B)** Immunfluoreszenzaufnahme des anti-alpha-Tubulin Antikörpers.

**(C)** Die digital übereinander gelegten fluoreszenzmikroskopischen Aufzeichnungen (*Overlay*).

**(D)** Das Fusionsprotein lokalisiert bei 12 µg/ml BFA und 50 min Inkubation im Zytoplasma und in den subzellulären Körperchen. Keine Lokalisation des Fusionsproteins im Zellkern.

**(E)** Immunfluoreszenzaufnahme. Detektion des Golgi-Apparates mit Hilfe des anti-Golgin97 Antikörpers. Der Golgi-Apparat ist um das Centrosom der Zelle organisiert.

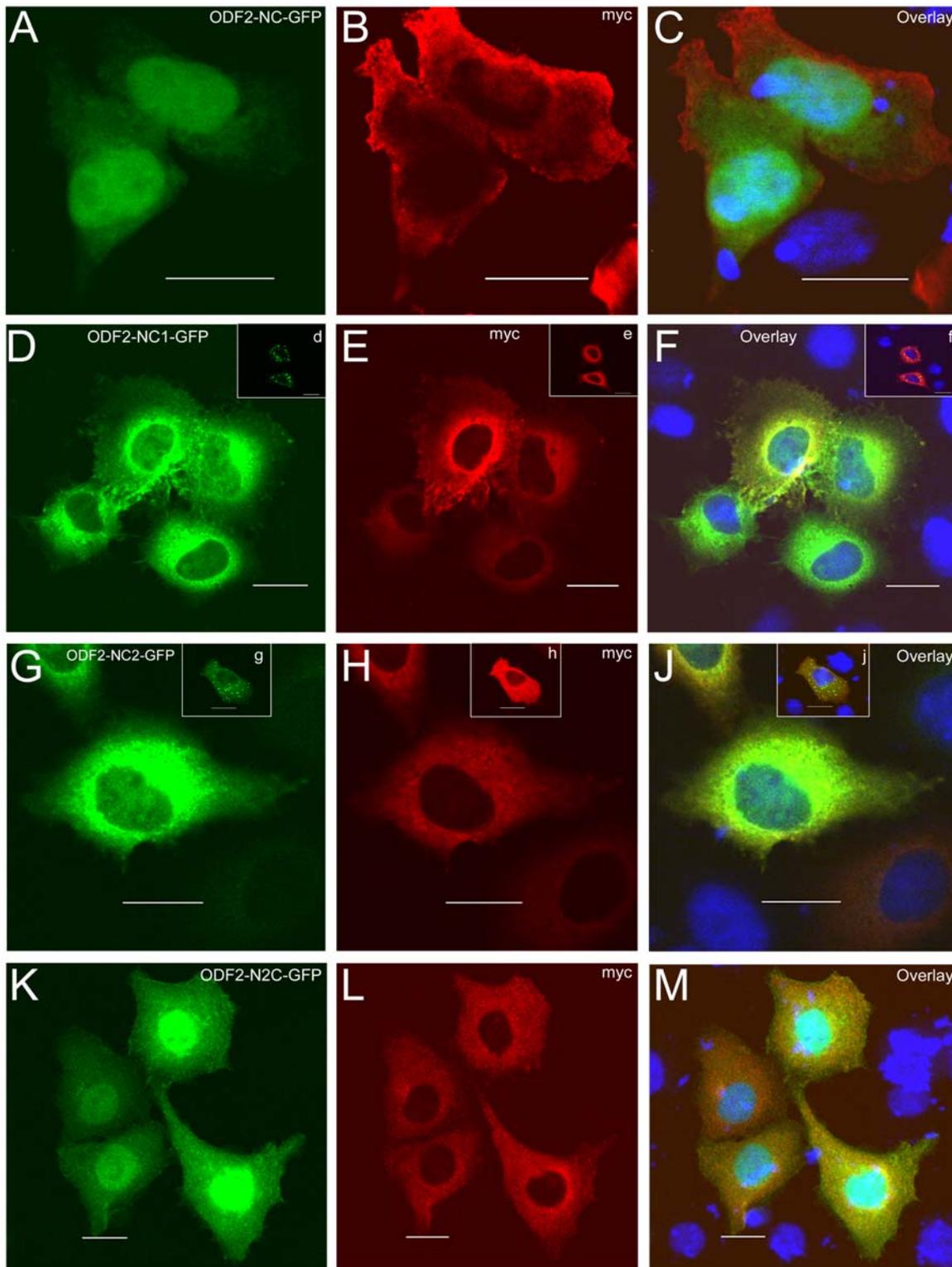
**(F)** *Overlay*: Das subzelluläre Körperchen des Fusionsproteins verlagerte die nahe centrosomale Lokalisation hin in das Zytoplasma.

Der Maßstab entspricht 20 µm.

### 3.4.2 ODF2 und der Dynein-abhängige Proteintransport

Dynamitin ist eine Untereinheit des Mikrotubuli-abhängigen Motorproteins Dynein (Abbildung 5). Überexpression von Dynamitin beeinflusst die Verteilung von membranösen Organellen, indem es den Mikrotubuli-abhängigen retrograden (*minus end-directed*) Transport unterbricht (Burkhardt et al., 1997). Die cDNS des Dynamitins wurde in den pCMV-Expressionsvektor unter der Kontrolle des Cytomegalovirus Promotors (CMV) kloniert. Der Vektor besitzt zusätzlich einen *myc-tag* (Echeverri et al., 1996). Ein Antikörper, gerichtet auf den *myc-tag*, erlaubt eine Markierung der Dynamitin-exprimierenden Zellen (2.1.2; 2.2.8).

ODF2-GFP-überexprimierende Säugerzellen wurden mit dem pCMV-H50 Konstrukt kotransfiziert (2.2.1; 2.2.8.1). Immunfluoreszenzstudien an transfizierten HeLa-Zellen und COS-7-Zellen zeigten dabei identische subzelluläre Lokalisation der ODF2-Fusionsproteine (ohne Abbildung). Die transfizierten Zellen wurden fixiert und mit dem anti-myc Antikörper immundekoriert (2.2.11.1). Analysiert wurden die kotransfizierten Zellen, die sowohl das Fusionsprotein als auch Dynamitin exprimierten (2.2.11.2). Verglichen wurde die subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine in kotransfizierten Zellen mit den Ergebnissen der Einzeltransfektionen (ohne Abbildung). Das ODF2-NC-Fusionsprotein zeigte eine Auffälligkeit bei gleichzeitiger Überexpression der Dynamitin-Untereinheit (Abbildung 26 A-C): Die subzellulären Körperchen, die in HeLa- als auch in COS-7-Zellen sonst am Kern in der Nähe des Centrosoms assoziiert waren konnten nicht mehr detektiert werden. Die ODF2-NC1, -NC2 und -N2C-Fusionsproteine zeigten keine Änderung der subzellulären Verteilung und Lokalisation in Dynamitin-überexprimierenden HeLa-Zellen (Abbildung 26 D-H und J-M). Auch die bei den C-terminal verkürzten Konstrukten (ODF2-NC1 und ODF2-NC2) auftretenden Aggregationen des Fusionsproteins (Abbildung 26 d-h und j), blieben bei Überexpression der Dynamitin-Untereinheit in ihrer Morphologie und subzellulären Verteilung, verglichen mit den Einzeltransfektionen, unverändert.



**Abbildung 26** Immunfluoreszenzbilder der mit *Odf2* und pCMV-H50 kotransfizierten HeLa-Zellen

Die Zellen exprimierten sowohl das Fusionsprotein (grün) als auch die Dynamitin-Untereinheit (rot). **(A)** Kotransfizierte HeLa-Zellen, die das ODF2-NC Fusionsprotein und Dynamitin exprimieren. Das subzelluläre Körperchen konnte nicht detektiert werden. **(B)** Immunfluoreszenzaufnahme der anti-myc dekorierten HeLa-Zellen. **(C)** Die digital übereinander gelegten fluoreszenzmikroskopischen Bilder (*Overlay*). Keine Änderung der Lokalisation und Verteilung des ODF2-NC-Fusionsproteins. **(D-F)** ODF2-NC1-Fusionsprotein zeigte keine Änderung der subzellulären Verteilung und Lokalisation. **(d-f)** Der zweite Phänotyp des ODF2-NC1-Fusionsproteins zeigte ebenfalls keine Änderung der subzellulären Lokalisation und Verteilung. **(G-H)** Das ODF2-NC2-Fusionsprotein und der zweite Phänotyp **(g-h)** zeigten keine Änderung der subzellulären Lokalisation. **(K-M)** Das ODF2-N2C-Fusionsprotein zeigte keine Veränderung der Lokalisation im Vergleich zu den Einzeltransfektionen. Der Maßstab entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.5 Anti-proliferativer Effekt bei Überexpression von testikulärem ODF2 in COS-7-Zellen

Lange et al. (1995) konnten nachweisen, dass das Centriolenpaar biochemisch unterschiedlich ist und identifizierten einen molekularen Marker, das Cenexin, das präferentiell in der muren Centriole zu detektieren ist. Cenexin hat eine Aminosäureidentität von 99 % mit dem testikulären ODF2. Nakagawa et al. (2001) lokalisierten ODF2/Cenexin in den distalen/subdistalen Anhängseln der Centriole und charakterisierten ODF2 als ein centrosomales Protein.

Da die Centriolen während der Mitose eine semikonservative Duplikation erfahren und bei den Prozessen der Mitose eine exklusive Rolle spielen (1.2.2), wird hier der Frage nachgegangen, ob das jüngst als centrosomales Protein identifizierte ODF2 eine proliferative Wirkung auf somatische Zellen ausübt. Ebenso war das variierende Erscheinungsbild der *Odf2*-transfizierten COS-7-Zellen (3.3.3) ein Hinweis auf eine mögliche Zellzyklus-abhängige Lokalisation der Fusionsproteine. Klärung sollte ein Proliferationsassay geben (2.2.10.2).

Die COS-7-Zellen wurden einzeln mit den jeweiligen vier *Odf2*-GFP-Konstrukten transfiziert (2.2.8). Da von einer hohen Dichte transfizierter Zellen ausgegangen werden sollte, wurde mit Hilfe des FACS-sorters die heterogene Zellpopulation aufgetrennt und die Zellzahl ermittelt (2.2.10). Parallel als Kontrolle zu den Zellpopulationen, die ausschließlich die jeweiligen ODF2-Fusionsproteine exprimierten, wurden untransfizierte COS-7-Zellen in gleicher Zellzahl ausgesät, für den Proliferationsassay eingesetzt und in Kultur gehalten (Tabelle 9). Die Kontrollzellen wurden nach fünf Tagen umgesetzt, ein Mediumwechsel erfolgte an jedem zweiten Tag und nach 13 Tagen wurde neben den Proben und der Kontrolle die jeweilige Zellzahl ermittelt (Tabelle 10;Tabelle 11).

Tabelle 9 Ausgesäte untransfizierte COS-7-Zellen. Ermittelte Zellzahl nach definiertem Zeitraum

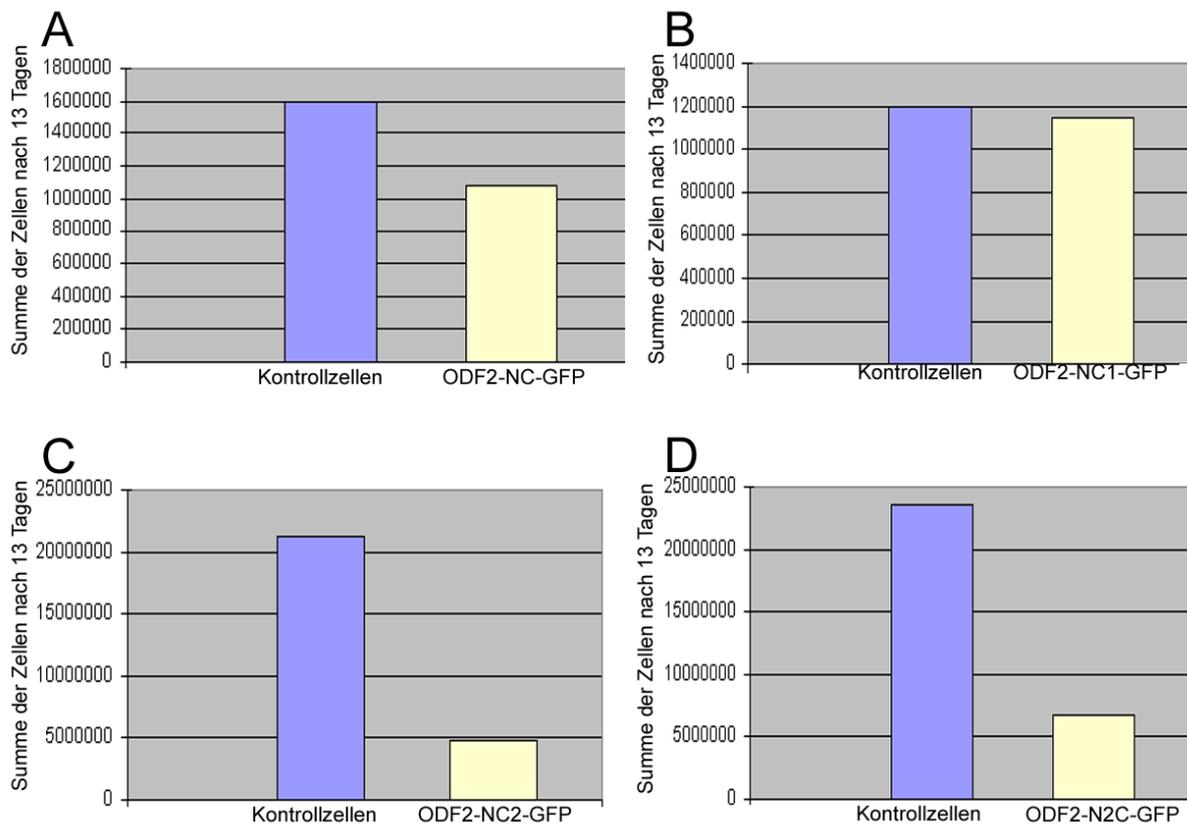
Untransfizierte Zellpopulation 0 Tage	Untransfizierte Zellpopulation nach 5 Tagen	Untransfizierte Zellpopulation nach 13 Tagen
1000	50000	1200000
4000	87500	1600000
5000	140000	5900000
10000	175000	10737500
15000	337500	20750000
20000	375000	21225000
25000	700000	23512500

Tabelle 10 Ermittlung der Zellzahl FACS sortierter ODF2-GFP-überexprimierender Zellen nach definiertem Zeitraum.

Transfizierte Odf2-Konstrukte	Transfizierte Ausgangspopulation nach FACS-Analyse 0 Tage	Transfizierte Ausgangspopulation nach 13 Tagen
<b>ODF2NC-GFP</b>	4266	1080000
<b>ODF2NC1-GFP</b>	1086	1150000
<b>ODF2NC2-GFP</b>	22923	4810000
<b>ODF2N2C-GFP</b>	26726	6680000

Tabelle 11 Die für den Proliferationsversuch ermittelten Zellzahlen

Zellzahl der parallel angesetzten Kontrolle	Nach 13 Tagen A	Odf2-Konstrukte	Eingesetzte Zellzahl nach FACS-sorter	Nach 13 Tagen B	Differenz (B-A)	(B-A)/Bx100
1000	1200000	NC	1086	1150000	50000	4 %
4000	1600000	NC1	4266	1080000	520000	33 %
20000	21225000	NC2	22923	4810000	1641500 0	77 %
25000	23512500	N2C	26726	6680000	1683250 0	72 %



**Abbildung 27 Proliferationsassay an ODF2-GFP-überexprimierenden COS-7-Zellen**

Untransfizierte Kontrollzellen (blau) wurden mit ODF2-GFP-überexprimierenden COS-7-Zellen verglichen. Parallel zu den Proben wurden Kontrollen mit jeweils identischer Zellzahl kultiviert. Nach 13 Tagen wurden die Proben und die jeweiligen Kontrollzellen manuell ausgezählt.

(A) Das in COS-7-Zellen überexprimierte ODF2-NC-GFP reduziert die Proliferation in COS-7-Zellen um 4% im Vergleich zu den untransfizierten COS-7-Zellen.

(B) Das Fusionsprotein ODF2-NC1-GFP reduziert die Proliferation der COS-7-Zellen um 33 %.

(C) Das Fusionsprotein ODF2-NC2-GFP reduziert die Proliferation der COS-7-Zellen um 77 % im Vergleich zu den nicht-transfizierten Kontrollzellen.

(D) Das Fusionsprotein ODF2-N2C-GFP reduziert die Proliferation der COS-7-Zellen um 73 % im Vergleich zu den Kontrollzellen.

Die vier transfizierten *Odf2*-GFP-Konstrukte zeigten eine geringere Proliferativität gegenüber den untransfizierten Kontrollzellen bei gleicher Ausgangszellzahl nach 13 Tagen. Die exprimierten ODF2-Fusionsproteine üben einen anti-proliferativen Effekt auf COS-7-Zellen aus (Abbildung 27; Tabelle 9; Tabelle 10; Tabelle 11; Tabelle 12)

- (i) Das ODF2-NC-Fusionsprotein, das dem gesamten kodierenden Bereich des testikulären ODF2 entspricht (Brohman et al., 1997), reduziert bei Überexpression in COS-7-Zellen die Proliferation um 4 %.
- (ii) Das ODF2-NC1-Fusionsprotein, das C-terminal deletiert ist (Abbildung 6) und nur eines der beiden Leucin-Zipper besitzt, reduziert die Proliferation um 33 % im Vergleich zu den eingesetzten Kontrollzellen.
- (iii) Das Fusionsprotein ODF2-NC2-GFP, das den N-terminalen Bereich exklusiv der beiden Leucin-Zipper repräsentiert, reduziert die Proliferation in COS-7-Zellen um 77 % im Vergleich zu den Kontrollzellen.

- (iii) Das ODF2-N2C-Fusionsprotein, das N-terminal deletiert ist und beide Leucin-Zipper beinhaltet, reduziert die Proliferation um 72 % im Vergleich zu den Kontrollzellen.

**Tabelle 12 Proliferativität der ODF2-überexprimierten Fusionsproteine**

Fusionsproteine	Reduktion der Proliferation
ODF2-NC-GFP 	um 4 %
ODF2-NC1-GFP, ODF2 $\Delta C_{429-591}$ 	um 33 %
ODF2-NC2-GFP, ODF2 $\Delta C_{375-591}$ 	um 77%
ODF2-N2C-GFP, ODF2 $\Delta N_{1-369}$ 	um 72 %

Da sowohl die Konstrukte, die die Leucin-Zipper-Motive beinhalten (-NC,-NC1,-N2C;), als auch das Konstrukt ODF2-NC2, das die Leucin-Zipper-Motive nicht trägt, das Wachstum der Zellen negativ regulieren, kann der anti-proliferative Effekt nicht auf die Anwesenheit der Leucin-Zipper-Motive zurückgeführt werden (Tabelle 12).

### 3.5.1 Reduktion der G2-Phase in *Odf2*-transfizierten HeLa-Zellen

Da das Proliferationsexperiment auf einen anti-proliferativen Effekt der ODF2-Fusionsproteine auf Säugerzellen hindeutete sollte untersucht werden, welche der Zellzyklusphasen betroffen sind. Die Methode der Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse des Zellzyklusverlaufs und Quantifizierung des DNS-Gehaltes einer Zelle (2.2.10.1). Zellen die aus der G0/G1-Phase in die Apoptose übergehen, zeigen als Folge der DNS Fragmentierung eine Abnahme des DNS-Gehaltes im Vergleich zu nicht apoptotischen Zellen. Der DNS-Gehalt zeigt bei asynchronen Zellen, wie die hier analysierten Zellen, die aus der S- bzw. G2-Phase in die Apoptose übergehen, keine signifikanten Reduktionen der DNS Menge im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Bestimmung des DNS-Gehaltes erlaubt somit auch eine Verifizierung der Eintrittsphase in die Apoptose.

Die Ergebnisse der Lebendzellaufnahmen (3.6) implizierten einen Arrest der transfizierten Zellen während des Zellzyklus, da auch nach einer deutlich verlängerten Zeitspanne, die die Literaturwerte zum Zellzyklusverlauf von HeLa-Zellen übertraf, keine Zellteilung beobachtet werden konnte. Die Zellen gingen nach 48 h in die Apoptose über (3.6.2; 3.6.3). Die Rohdaten zu jedem gemessenen Ereignis wurden als *list-mode* Datenfile FCS 2.0 (*Flow Cytometry Standard 2.0*) gespeichert und zur Weiterbearbeitung auf einen Standard-PC übertragen.

Die Kontrollen dienten dazu, ein standardisiertes und vergleichbares Messergebnis zu produzieren und die Grundeinstellung des Gerätes festzulegen. Zum Ausschluss von Zelldubletten bei den Messungen wurden die Pulsprozessoren verwendet. Pulsprozessoren können die Signalintensität (Höhe H), die Dauer eines Signals (Weite W) und das

Integral des Peaks (Fläche A) messen. Zelldoubletten übersteigen wegen ihrer Größe die Dimension des Laserstrahls. Im Vergleich zu einer Einzelzelle benötigen Doubletten mehr Zeit, den Laserstrahl zu passieren und induzieren ein größeres Weitensignal als Einzelzellen mit identischer Fluoreszenzmarkierung (Brockhoff, 2004).

Bei der Auftragung von Signal-Weite gegen Signal-Fläche, können in einer anschließenden Darstellung des DNS-Gehalts „unverfälschte“ Datenmessungen erhoben werden. Zur Identifizierung und Determinierung definierter Zellpopulationen, wie z.B. intakte Zellen, wurden in zweidimensionalen *Dot-* oder *Density*-Plots das Seitwärtsstreusignal (engl. SSC-Signal) bzw. die Fluoreszenz des Farbstoffes auf der Ordinate gegen das Vorwärtsstreusignal (engl. FSC-Signal) auf die Abszisse aufgetragen, graphisch dargestellt und statistisch ausgewertet (Abbildung 28). Zellaggregate und Zelldoubletten sind größer und granulärer als Einzelzellen, produzieren deshalb ein stärkeres FSC- und SSC-Signal. Zellaggregate werden diskriminiert und nur die Zellpopulationen von Interesse werden gemessen „gegatet“ und ausgewertet. Dabei wird eine Region (*Gate*) in das Streulichtdiagramm eingezeichnet, die nur die definierte Population an Zellen beinhaltet. Diese markierte, ausgewählte Region wird dann in weiteren Histogrammen dargestellt (Abbildung 28). Damit können zusätzliche Eigenschaften der Zellen, in diesem Fall GFP-positiv und gleichzeitig DNS-markiert, weiter untersucht werden.

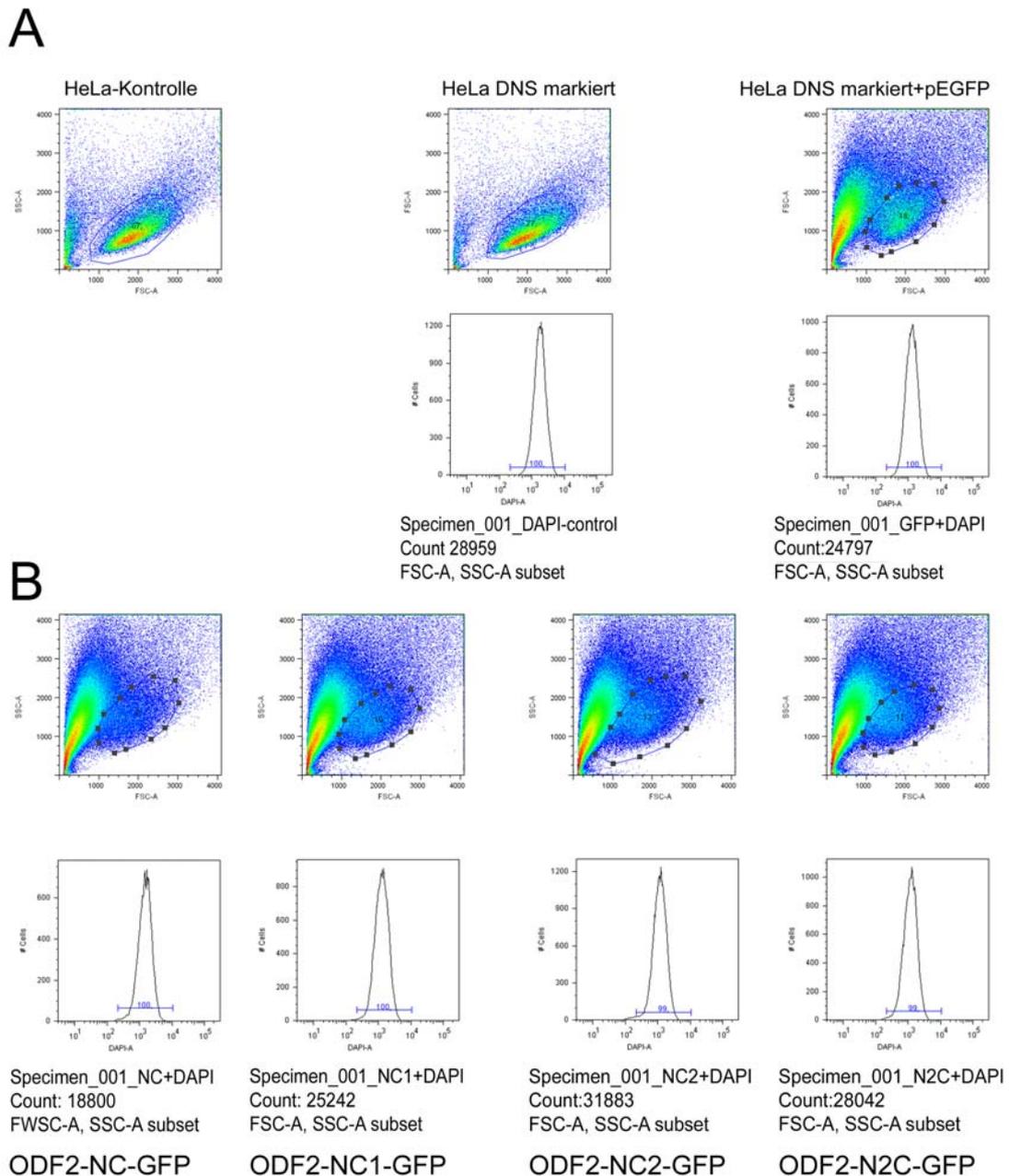
Das Fluochrom DAPI bindet an die DNS des Zellkerns, die Intensität des Fluoreszenzsignals ist proportional zum DNS-Gehalt der Zelle; je größer die Fluoreszenzintensität desto größer ist der DNS-Gehalt. Zellen besitzen unterschiedliche Mengen an DNS in Abhängigkeit vom Zellzyklus. Die Daten werden als zytometrisches Histogramm dargestellt (Abbildung 28). Für die Auftragung des Parameters DNS-Gehalt wird die Anzahl der Ereignisse auf der y-Achse gegen die Fluoreszenzintensität der Färbung auf der x-Achse aufgetragen und statistisch ausgewertet (Tabelle 13).

**Tabelle 13** Statistische Darstellung der Zellpopulation nach dem Gaten mit den Werten der Fluoreszenzintensität DAPI positiver Kontrollzellen und Proben

	Zellen im gemessenen Gate in Prozent	Anzahl der Ereignisse im Gate	Anteil der im Gate gemessenen DAPI-Fluoreszenzintensität	DAPI-Fluoreszenzintensität im Gate
HeLa-Zellen	66,5	27695	0,011	0
HeLa-Zellen DNS markiert	77,3	28895	99,9	2096
HeLa-Zellen DNS markiert+GFP	17,3	24764	99,5	1968
ODF2-NC-GFP+DAPI	8,4	18860	98,1	1930
ODF2-NC1-GFP+DAPI	10,5	25322	98,7	1958
ODF2-NC2-GFP+DAPI	12,3	31783	93,9	1910
ODF2-N2C-GFP+DAPI	11,2	28050	98,1	2018

Die geringe Transfektionsrate, die der Prozentsatz der Zellen im gemessenen Gate wiedergibt (Tabelle 13), hat keinen Einfluss auf die Auswertbarkeit der Daten, da ein Ereignis um 20000 im auswertbaren Grenzbereich liegt (pers. Mitteilung PD. Sopper).

Die nach dem Gaten ausgewählte Zellpopulation der transfizierten Zellen und der Kontrollen zeigen eine bis zu 99,9 %ige DAPI-Färbung und sind damit miteinander vergleichbar.



**Abbildung 28 Gating und Diskriminierung von Zelldebris.**

Die DAPI-Fluoreszenzintensität der Kontrollzellen und *Odf2*-transfizierter Zellen sind in einem Streulicht Dot-Plot dargestellt. Die Zellen werden nach ihrem Vorwärtsstreulicht (FSC) und ihrem Seitwärtsstreulicht (SSC) dargestellt. Man erkennt Anhäufungen von Zellen, Zelldebris die ähnliche Streulichteigenschaften haben; diese wurden diskriminiert (Markierung). Jeder Punkt entspricht einer gemessenen Zelle bzw. einem gemessenen Ereignis.

**(A)** Die definierte ausgewählte Zellpopulation wurde in ein Histogramm „gated“. Die gewünschte Population vitaler Zellen wird durch eine Region markiert. Die ausgewählten Zellen sind in einer Auftragung der Signal-Fläche gegen die Signal-Weite abgebildet. Die definierte Region wurde für die übrigen Proben übernommen. Der DNS-Gehalt der DAPI markierten Kontrollzellen und der Proben wird in einem Histogramm dargestellt und statistisch ausgewertet.

**(B)** Bei den transfizierten und DNS-markierten HeLa-Zellen wurde die definierte ausgewählte Zellpopulation gated und die ausgewählten Zellen in einer Auftragung der Signal-Fläche gegen die Signal-Weite abgebildet. Der DNS-Gehalt der Proben wird in einem zytometrischen Histogramm dargestellt und statistisch ausgewertet.

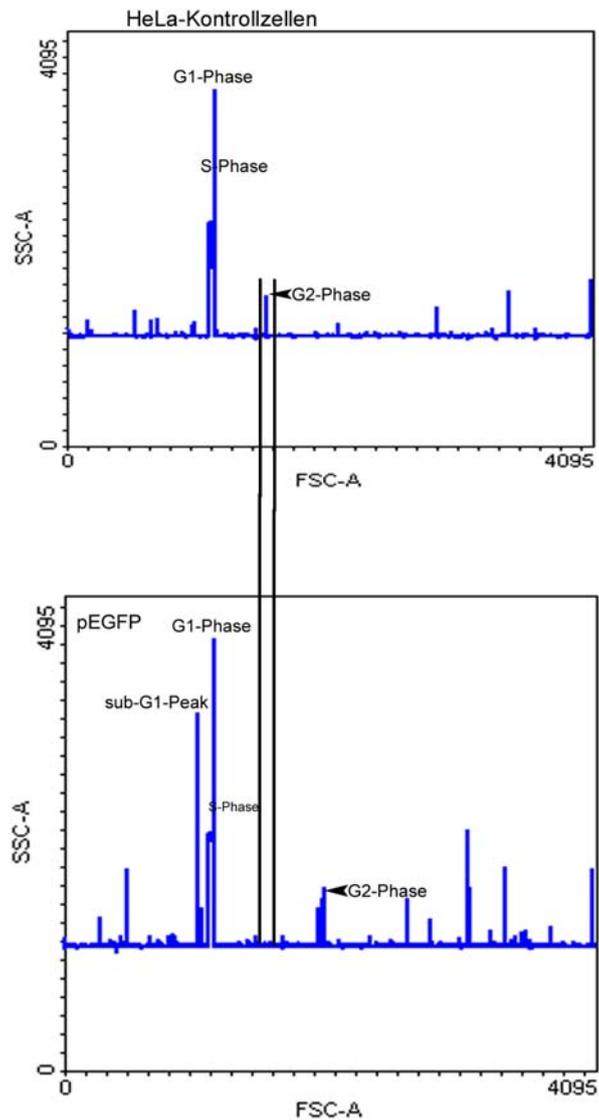
Der Zellzyklus ist ein sequenzielles Ereignis, in dem eine Zelle über Duplikation der DNS und Teilung der Zelle in zwei genetisch identische Tochterzellen übergeht.

Eukaryotische Zellen besitzen spezifische biochemische Kontrollsysteme zur Regulation des Zellzyklus. Der Zellzyklus ist unterteilt in vier Phasen: G1, S, G2 und M. Die DNS wird in der S-Phase dupliziert, die Trennung der Chromosomen erfolgt in der M-Phase. Die G1-Phase, *Gap* (engl.: Lücke), geht der Synthesephase, in der die Zelle ihre DNS vor der Teilung verdoppelt, voraus. In der G1-Phase stellt sie die Enzyme und Proteine her, die sie für den Vervielfältigungsprozess benötigt. In der G2-Phase erfolgt eine weitere Kontrolle des Zellzyklus. Kontrolliert wird, ob die Verdopplung der DNS vollständig und fehlerfrei ablief. Ist dies nicht der Fall, teilt sich die Zelle nicht. Bei einer erfolgreichen Vervielfältigung der DNS, stellt die Zelle in der G2-Phase einige der zur Teilung benötigten Proteine her. Im Anschluss an die G2-Phase teilt sich die Zelle.

Die Zellzyklusverteilung der DAPI-markierten *Odf2*-transfizierten HeLa-Zellen und Kontrollzellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert und mit der Programmsoftware WinMDI 2.8 berechnet. WinMDI 2.8 ermittelte die Peaks der Zellzyklusphasen G1 bzw. G2 symmetrisch und "Gauss-verteilt" und ordnet unter der Annahme von geringen Überlappungen den dazwischen liegenden Bereich der S-Phase zu (Abbildung 29; Abbildung 31).

Der in den HeLa-Zellen transfizierter pEGFP-Vektor zeigte eine Verschiebung des G2-Peaks mit gleichzeitigem Auftreten eines sub-G1-Peaks (Abbildung 29). Diese Verschiebung bleibt dennoch ohne Einfluss auf die Zellzyklusverteilung.

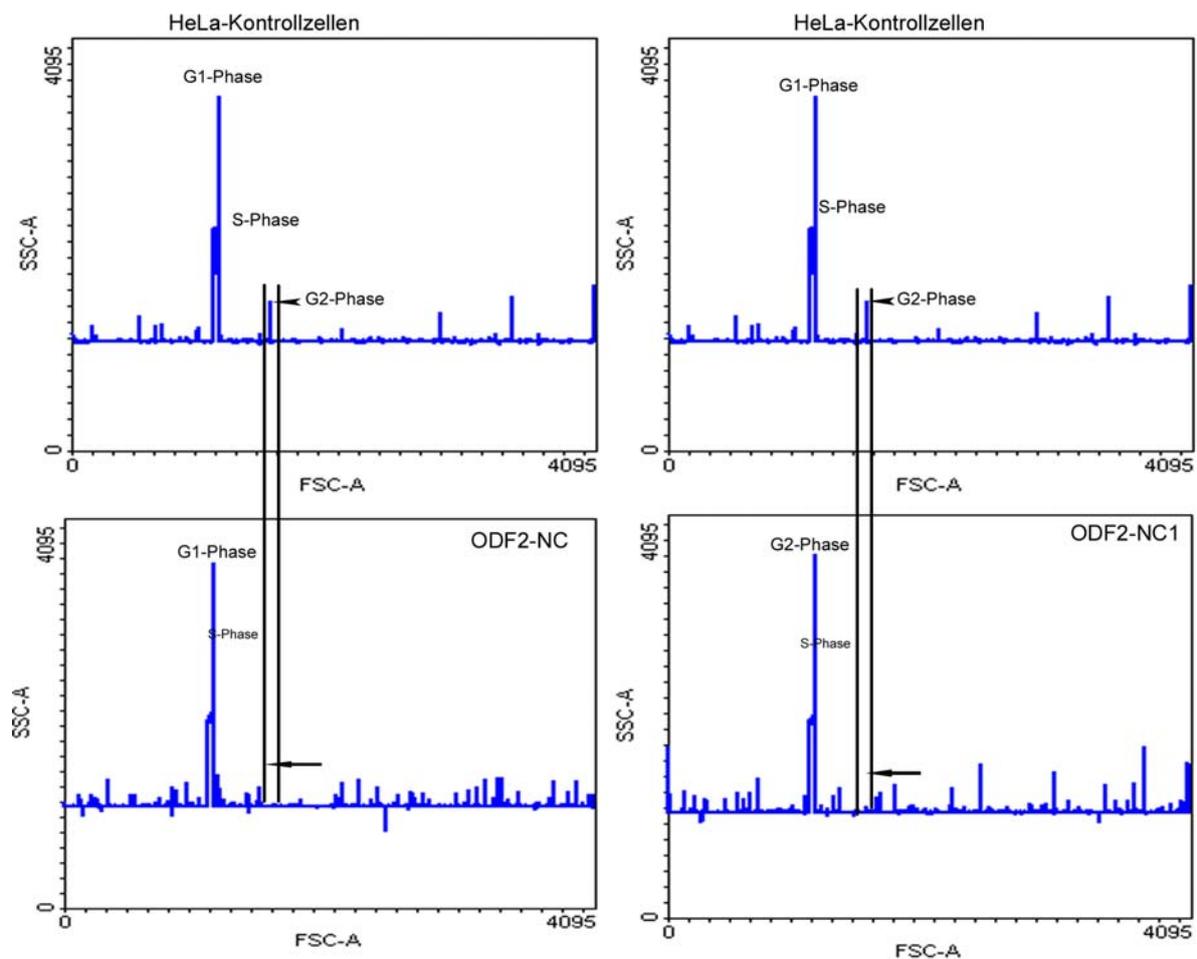
Die mit jeweils einem der vier *Odf2*-Konstrukte transfizierten HeLa-Zellen zeigten nach 48 h keinen sub-G1-Peak und keinen verschobenen G2-Peak. Die vier analysierten *Odf2*-transfizierten Konstrukte (2.2.8; 2.2.10.1) verloren nach 48 h den G2-Peak und zeigten dabei keinen bedeutsamen Unterschied bezüglich des DNS-Gehaltes zu den Kontrollzellen (Tabelle 13; Abbildung 30; Abbildung 29; Abbildung 31). Der DNS-Gehalt asynchroner Zellen, die aus der S- bzw. G2-Phase in die Apoptose übergehen, zeigen generell keine signifikante Reduktion der DNS Menge. Es kann daher vermutet werden, dass die Synthesephase ODF2-GFP-überexprimierender Zellen nicht beeinträchtigt wird, die Zellen nicht in die Teilungsphase übergehen können und somit den bei den *Odf2*-transfizierten Zellen beobachteten anti-proliferativen Effekt erklärt. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zeigen keine Akkumulation bzw. Arrest in einer der Phasen nach 48 h, es wurde aber ein Fehlen der G2-Phase wurde festgestellt (Abbildung 29; Abbildung 30; Abbildung 31). Vermutlich gehen die Zellen in die Apoptose über. Diese Annahme wird auch von den Ergebnissen der Lebendzellaufnahmen gestützt. Die videomikroskopischen Aufnahmen zeigen einen Übergang der *Odf2*-transfizierten Zelle in Apoptose-ähnliche Strukturen nach 45 h (3.6.3).



**Abbildung 29** Histogramme der Zellzyklusverteilung von pEGFP-transfizierten HeLa-Zellen und von Kontrollzellen.

Die Zellzyklusverteilung der DAPI-markierten HeLa-Kontrollzellen und die DAPI-markierte pEGFP-Probe wurden mit der Programmsoftware (WinMDI 2.8) berechnet; sie ermittelte die Peaks der Zellzyklusphasen G1 bzw. G2 symmetrisch und "Gauss-verteilt" und ordnet unter der Annahme von geringen Überlappungen den dazwischen liegenden Bereich der S-Phase Fraktion zu.

Die pEGFP-transfizierten HeLa-Zellen gingen nach 48 h in die G2-Phase und zeigten dabei eine Verschiebung des G2-Peaks und einen sub-G1-Peak .

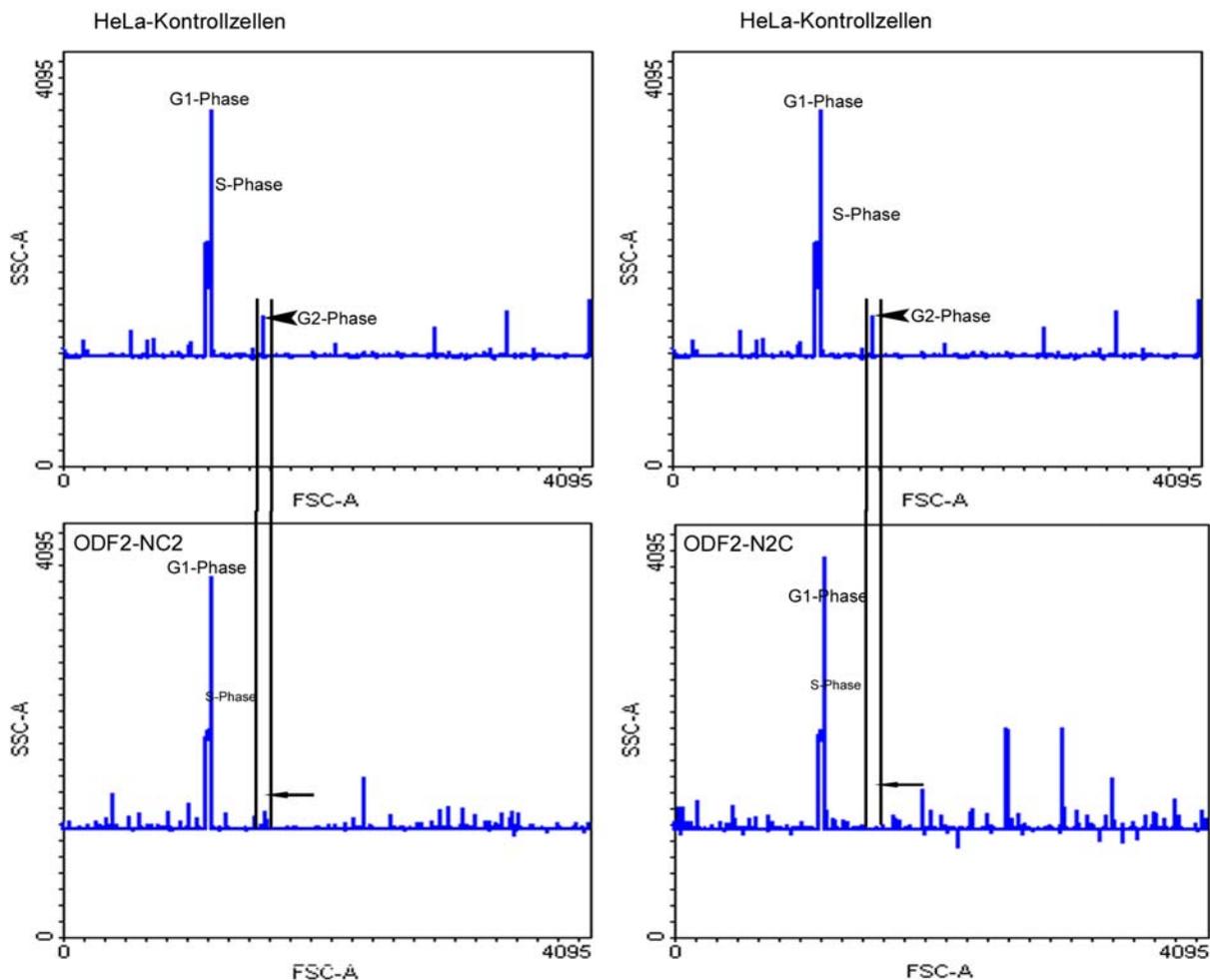


**Abbildung 30** Histogramme der Zellzyklusverteilung von ODF2-NC-GFP und ODF2-NC1-GFP-exprimierenden HeLa-Zellen.

Asynchrone HeLa-Zellen wurden mit den *Odf2*-Konstrukten transfiziert, nach 48 h mit dem DNS-Fluorochrom DAPI markiert und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Parallel dazu wurden DNS-markierte HeLa-Kontrollzellen verglichen.

Die Zellzyklusverteilung der DAPI-markierten HeLa-Kontrollzellen und Proben wurden mit der Programmsoftware (WinMDI 2.8) berechnet; sie ermittelte die Peaks der Zellzyklusphasen G1 bzw. G2 symmetrisch und "Gauss-verteilt" und ordnet unter der Annahme von geringen Überlappungen den dazwischen liegenden Bereich der S-Phase zu.

Die nach dem Gaten ausgewählte Zellpopulation der HeLa-Kontrollzellen zeigte eine typische Zellzyklusverteilung asynchroner Zellen, die sich etwa zu 80% in der G0/G1-Phase befanden, 10% in der S-Phase und 10 % in der G2-Phase. Die *Odf2*-NC und *Odf2*-NC1-transfizierten HeLa-Zellen gehen nach 48 h nicht in die G2-Phase. Die Histogramme zeigen ein „Verschwinden“ des G2-Peaks (Markierung; Pfeile).



**Abbildung 31** Histogramme der Zellzyklusverteilung von ODF2-NC2 und ODF2-N2C-überexprimierenden HeLa-Zellen

Asynchrone HeLa-Zellen wurden jeweils mit den *Odf2*-Konstrukten *Odf2*-NC2 und -N2C transfiziert, nach 48 h mit dem DNS-Fluorochrom DAPI markiert und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Parallel dazu wurden HeLa-Kontrollzellen verglichen. Die Zellzyklusverteilung der DAPI-markierten HeLa-Kontrollzellen und Proben wurden mit der Programmsoftware (WinMDI 2.8) berechnet; sie ermittelte die Peaks der Zellzyklusphasen G1 bzw. G2 symmetrisch und "Gauss-verteilt" und ordnet unter der Annahme von geringen Überlappungen den dazwischen liegenden Bereich der S-Phase zu. Die *Odf2*-NC2 und *Odf2*-N2C-transfizierten HeLa-Zellen gehen nach 48 h nicht in die G2-Phase. Die Histogramme zeigen ein „Verschwinden“ des G2-Peaks (Markierung; Pfeile).

### 3.6 Videomikroskopie von HeLa-Zellen und ODF2-überexprimierenden Zellen

Die in den immunzytologischen Versuchen an fixierten Zellen gewonnenen Ergebnisse ergaben ein heterogenes Bild hinsichtlich der subzellulären Lokalisation der jeweiligen exprimierten Fusionsproteine in der Zelle (3.3; Donkor et al., 2004). Vermutet wurde eine Zellzyklus-determinierte Lokalisation der ODF2-Fusionsproteine in HeLa- und COS-7-Zellen. Die Experimente zur Proliferation an *Odf2*-transfizierten Zellen belegten einen anti-proliferativen Effekt auf Zellen in Kultur. Lebendzellaufnahmen sollten die Ergebnisse zur Proliferation und Zellzyklusverteilung vervollkommen.

Die *Life-Cell-Imaging*-Vorrichtung (2.2.12) sollte reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse liefern, dazu wurden Kontrollen an nicht-transfizierten HeLa-Zellen durchgeführt, um die aus der Literatur bekannte Zellzyklusdauer zu überprüfen.

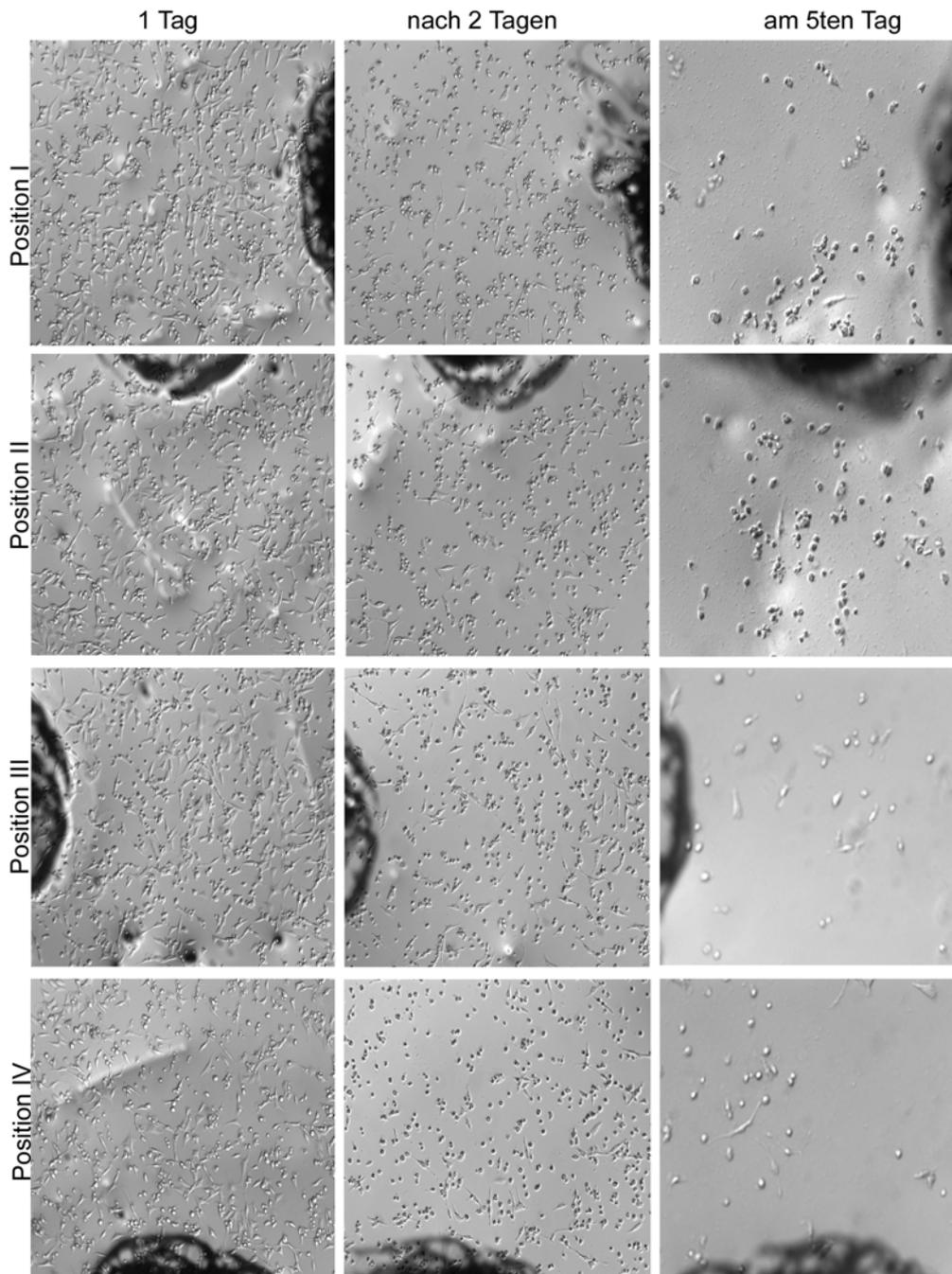
### 3.6.1 *Head over Bottom*

Aus technischen Gründen musste die mit HeLa-Zellen bewachsene Inkubationskammer während der mikroskopischen Langzeitbeobachtung über Kopf aufgestellt werden. Es erfolgten drei Versuche die klären sollten, inwiefern dieser Umstand einen Einfluss auf die lebenden Zellen haben könnte (2.2.12.1).

- (i) Zellen, die in der Orientierung *up-down* in der Inkubationskammer kultiviert wurden, zeigten qualitativ eine Abnahme der Zelldichte in einem beobachteten Zeitraum von fünf Tagen (Abbildung 32; 2.2.12.1).
- (ii) Wurde ähnlich angelegt wie Versuch (i) allerdings mit dem Unterschied, dass die Zellen in der Inkubationskammer *up-up* kultiviert wurden, d.h. die Adhäsionskräfte und die Schwerkraft wirken in eine Richtung. Es zeigte sich visuell eine qualitative Zunahme der Zelldichte (Abbildung 33; 2.2.12.1). Diese Zunahme zeigte sich nicht in dem Ausmaße, wie es erfahrungsgemäß mit Zellen in Zellkultur zu erwarten gewesen wäre.
- (iii) Auf die Zellen in der Inkubationskammer wurde eine Gaze gelegt und die Zellen weiter kultiviert. Die Inkubationskammer wurde dann in *up-down* Orientierung mikroskopiert (Abbildung 34).

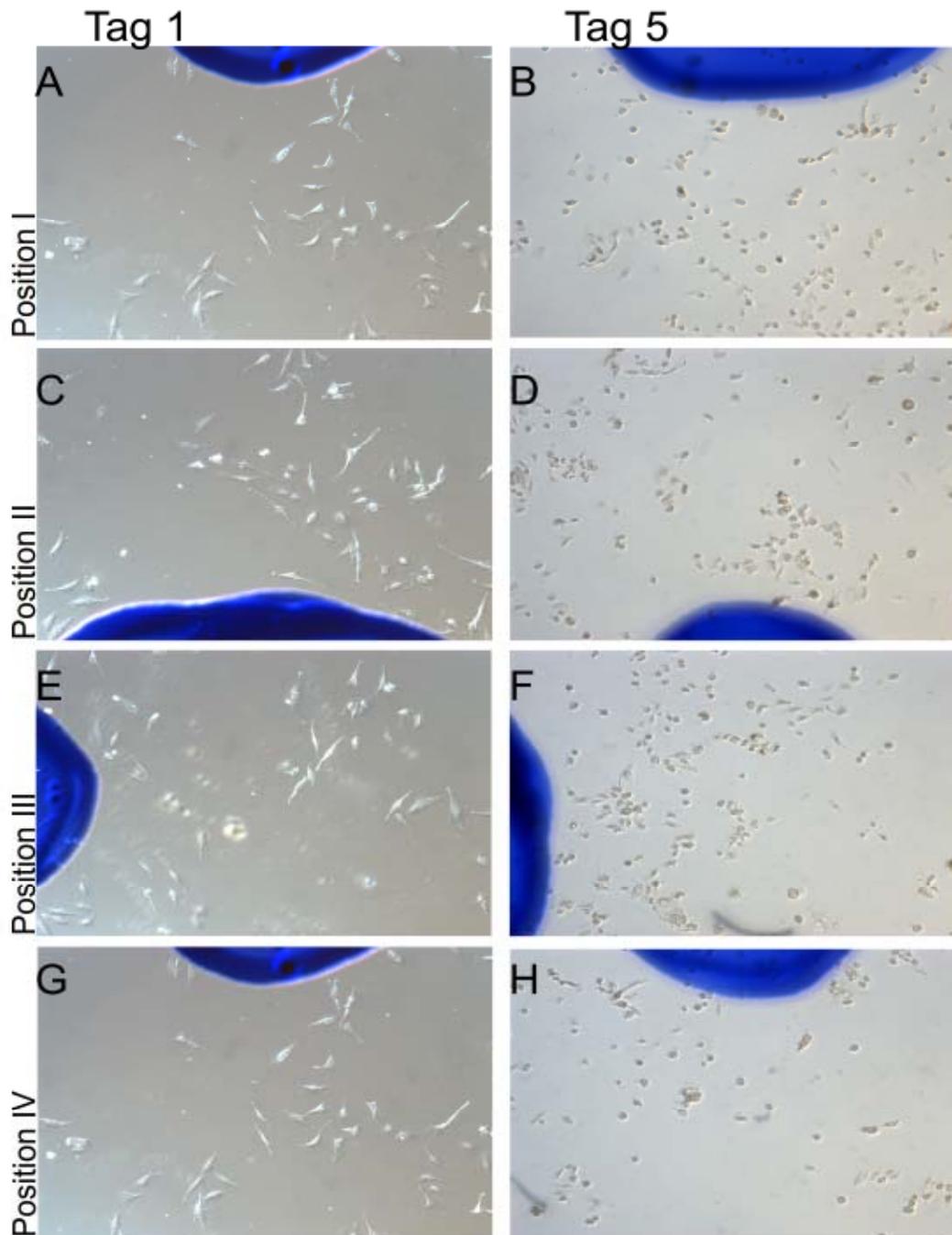
Während der Zellteilung erfolgt eine Umordnung der Aktin- und Myosinfilamente im Zellcortex. Dies kann zu einer Verminderung der Haftung an der extrazellulären Matrix im Gewebe oder an das Substrat, d.h. der Oberfläche der Zellkulturschale, führen. Erfolgt die Zellteilung nun „über Kopf“, d.h. in der Orientierung *up-down*, fallen aus diesem Grunde die sich teilenden Zellen nach „unten“ und können nicht weiter beobachtet werden; die Zelldichte nahm wie dokumentiert ab (Abbildung 32).

Die Experimente mussten in der Orientierung *up-down* vorgenommen werden. Eine technisch mögliche Lösung war das Einbringen einer Gaze mit einer Maschenweite von 30-50µm, die als Wachstumsorientierung der Zellen diente (Abbildung 34). Ein qualitativer Vergleich zeigte, dass die Zellen nun in ihrer Morphologie und ihrem Wachstumsverhalten Zellen in Zellkultur entsprachen (ohne Abbildung). Die Gaze wurde bei den weiteren Versuchen zur Langzeitmikroskopie beibehalten.



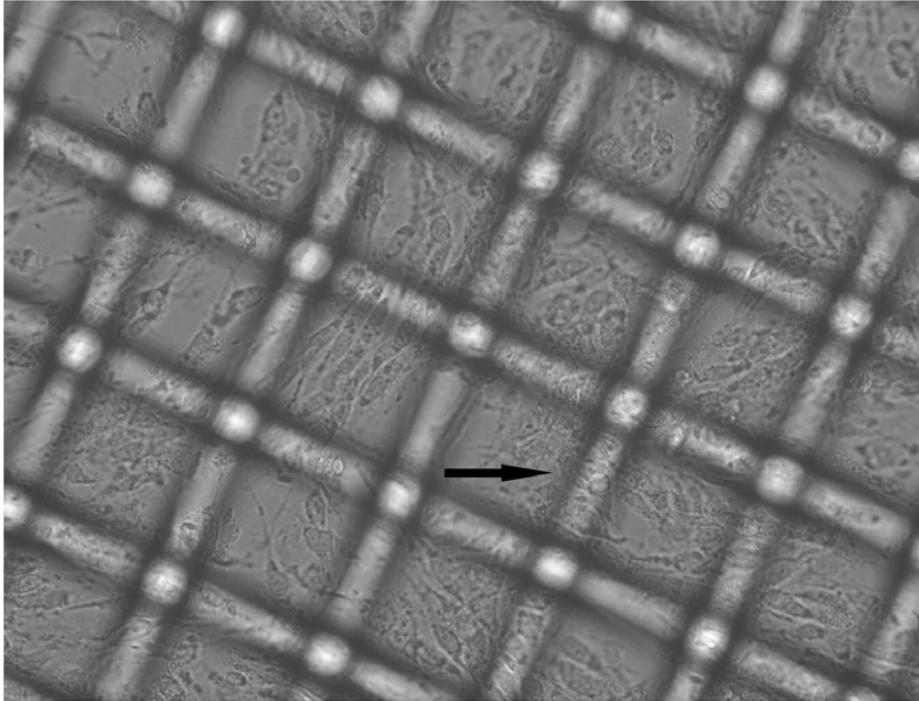
**Abbildung 32** Beobachtungen zur Zellproliferation. Die Zellen wurden über Kopf *up-down* kultiviert.

HeLa-Zellen wurden ausgesät und in der Inkubationskammer über Kopf kultiviert. Der beobachtete Abschnitt wurde markiert und die jeweilige Position I-IV beibehalten. Es erfolgte eine qualitative mikroskopische Auswertung nach zwei Tagen und am fünften Tag nach der Aussaat der Zellen. Wie hier dokumentiert werden kann, nimmt die Zelldichte ab.



**Abbildung 33 Beobachtungen zur Zellproliferation. Die Inkubationskammer mit den Zellen wurde in der Orientierung *up-up* kultiviert.**

HeLa-Zellen wurden ausgesät und in der Orientierung *up-up* kultiviert. Der beobachtete Abschnitt wurde markiert und die jeweilige Position I-IV beibehalten. Es erfolgte eine mikroskopische qualitative Auswertung nach einem Tag und am fünften Tag nach der Aussaat der Zellen. Die mikroskopische qualitative Auswertung zeigte eine Zunahme der Zelldichte.



**Abbildung 34** Einbringen einer Gaze mit einer Maschenweite von 30-50 µm in die Inkubationskammer.

Diese Gaze wurde von den Zellen als Wachstumsorientierung angenommen. Die Zellen wachsen auf und zwischen den Maschen der Gaze (Pfeil) in der Orientierung *up-down*. Sie zeigen ein morphologisch identisches Bild zu den Zellen, die parallel in Kulturschalen gehalten wurden.

Die eingebrachte Gaze war die technische Lösung. Nun sollte gezeigt werden dass diese Gaze wiederum keinen Einfluss auf die Zellteilung untransfizierter HeLa-Kontrollzellen ausübt. Dazu wurde in einem Vorversuch die Zellzyklusdauer an untransfizierten HeLa-Zellen bestimmt.

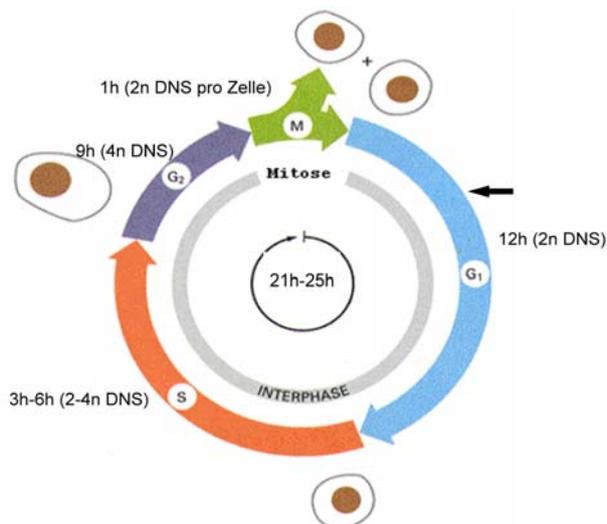
### 3.6.2 Videomikroskopie an HeLa-Zellen

Für die Lebendzellaufnahmen mussten aufwendige Vorversuche durchgeführt werden, da das System im Labor nicht etabliert war. So musste eine dauerhafte Sauerstoffzufuhr gewährleistet sein, ein gleichbleibender physiologischer pH-Wert, eine konstante Temperierung der Zellen und die Sicherstellung, dass die Zellen während des Beobachtungszeitraums nicht austrocknen. Im Vorwege sollte gezeigt werden, dass die Vorrichtung zur Lebendzellaufnahme (2.2.12;Abbildung 9; Abbildung 13) geeignet war, die aus der Literatur bekannte Zellzyklusdauer von HeLa-Zellen zu reproduzieren.

Es sollten Aufnahmen gemacht werden, die während der dynamischen Prozesse lebender Zellen stattfinden, um Einflüsse auf die transfizierten und ODF2-überexprimierenden Zellen in Kultur beobachten zu können. Dazu wurden in festen Intervallen Aufnahmen von lebenden Zellen gemacht, digital aufgezeichnet und ausgewertet. Die Visualisierung von Zellprozessen in lebenden Zellen über lange Zeitspannen und die Aufzeichnung transients Ereignisse sichert eine Reproduzierbarkeit der erhobenen Daten zu.

Die zu diesen Studien interdisziplinär in Zusammenarbeit mit dem Dipl. Physiker G.Hoch eingeführte und etablierte *Life-Cell-Imaging-Vorrichtung* (2.2.12; Abbildung 11; Abbildung 12; Abbildung 13) besteht aus dem Axioplan 2 Zeiss *image*, ein motorisiertes *upright* Mikroskop, einer Digitalkamera und einer Inkubationskammer für die Zellen, die eine Aufrechterhaltung der oben beschriebenen physiologischen Bedingungen erlaubt (2.2.12; Abbildung 10). Die Zellen wurden auf ein Deckgläschen umgesetzt und im entsprechenden Medium (2.1.15) bis zu einer Konfluenz von 40-60 % inkubiert. Daraufhin wurden sie transfiziert (2.2.8). Die transfizierten Zellen auf dem Deckgläschen wurden dann in die Inkubationskammer überführt, mit einer Gaze, die unmittelbar auf den Zellen zuliegen kam, versehen und die Inkubationskammer über den Bajonettverschluss geschlossen (2.2.12; 2.2.12.1). Es erfolgte daraufhin ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden dann in der Inkubationskammer mit dem  $\text{CO}_2$ -*Independent* Medium zur Langzeit-Mikroskopie weitergehalten (2.1.15).

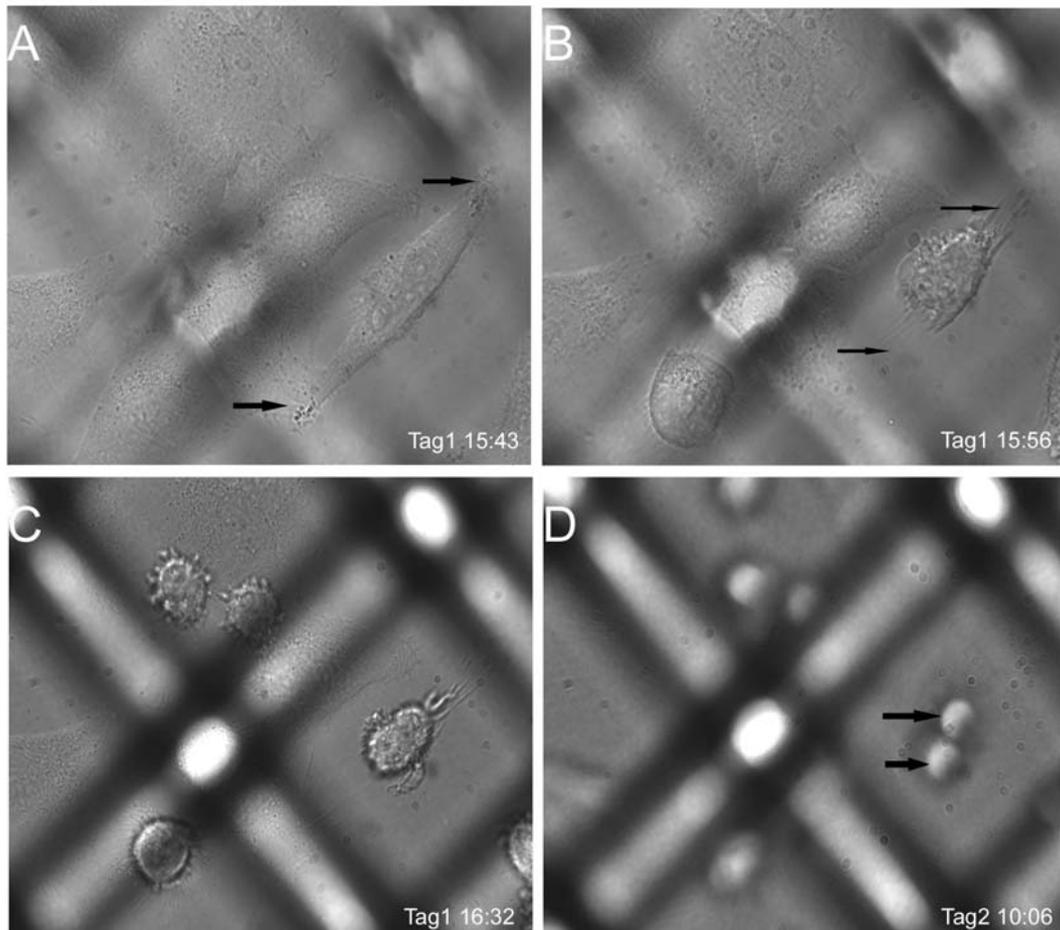
HeLa-Zellen in Zellkultur vermehren sich mit einer Verdopplungszeit von etwa 21-25 h. Der Zellzyklus oszilliert zwischen Interphase und Mitose, ein regelmäßiger, sich wiederholender Ablauf. Dabei nimmt die Interphase etwa 90% und die Mitose etwa 10% der Zeit ein.



**Abbildung 35 Proliferation einer eukaryotischen Zelle.**

Skizzierter Zellzyklus von HeLa-Zellen in Kultur. G1-Phase ist eine Wachstumsphase ohne Synthese der DNS. S-Phase, hier findet die Replikation der DNS statt. G2-Phase ist eine weitere Phase ohne DNS-Synthese. Bei der Differenzierung einer Zelle zur Dauerzelle verlässt sie den Zellzyklus und tritt in die G0-Phase ein, hier nicht skizziert. Pfeil markiert den Startpunkt, an dem vermutlich die Beobachtung der lebenden HeLa-Zelle ausging, da die experimentell beobachtete Zellzyklusdauer 18 h:42 min betrug (verändert nach H. Hupfeld)

Untransfizierte HeLa-Zellen, die für den Vorversuch eingesetzten Zellen, wurden in die Inkubationskammer eingebracht und beobachtet (2.2.12). Ausgehend von einer Zelle in der Interphase wurden aus einer Zelle zwei Zellen (Abbildung 36). Beobachtet wurde ein Zeitraum von 18 h:42 min. In diesem Zeitraum konnte die Zellteilung dokumentiert werden. Die Zelle proliferierte und am Ende waren zwei Zellen entstanden. Die Zelle zog sich zusammen und rundete sich ab; es erfolgte eine Umordnung der Aktin- und Myosinfilamente im Zellkortex. Die Zelle ging aus der Interphase in die Mitose über und gelangte zur Zytokinese (Abbildung 36 D).



**Abbildung 36 Videomikroskopie proliferierender HeLa-Zellen.**

Vier Ausschnitte der Videoaufzeichnung der Zellteilung von nicht-transfizierten HeLa-Zellen.

(A) Beginn der Aufzeichnung. Die Zelle ist mit Zellausläufern am Netz assoziiert (Pfeile).

(B) Bei dem Übergang in die Mitose rundet sich die Zelle ab und verbleibt eine Weile mit einigen Zellausläufern am Netz assoziiert (Pfeile).

(C) Die Zelle hat sich von der Assoziation mit der Gaze gelöst und rundet sich weiter ab.

(D) Am Ende der Aufzeichnung, nach 18 h:42 min, liegen zwei Zellen vor als Produkt der Proliferation (Pfeile).

Es ist gelungen, HeLa-Zellen in der Inkubationskammer über längere Zeit zu halten und gleichzeitig mikroskopisch zu beobachten (Abbildung 36; Video 1). Damit konnte gezeigt werden, dass die technischen Voraussetzungen, wie fortwährende Sauerstoffzufuhr, gleichbleibender physiologischer pH-Wert, konstante Temperierung der Zellen und die Sicherstellung, dass die Zellen während des Beobachtungszeitraums nicht austrocknen, optimal waren. Zum Ende der Aufzeichnung geriet das Objekt aus dem Fokus. Die Aufzeichnung im Bild 36 D wurde mit einem Scharfzeichner zur besseren Darstellung nachbearbeitet.

Die erhobenen Daten sind mit der in der Literatur bekannten Zellzyklusdauer von proliferierenden HeLa-Zellen nahezu identisch. Am Ende der Proliferation standen zwei Zellen. Es ist damit gelungen, mit den entsprechenden technischen Voraussetzungen in einem Beobachtungszeitraum von 18 h:42 min den Zellzyklus einer HeLa-Zelle zu beobachten. Die eingebrachte Gaze hatte keinen Einfluss auf die Zellteilung von HeLa-Zellen ausgeübt.

### 3.6.3 Überexpression von Testis-spezifischem ODF2 induziert Apoptose ähnliche Strukturen in HeLa-Zellen

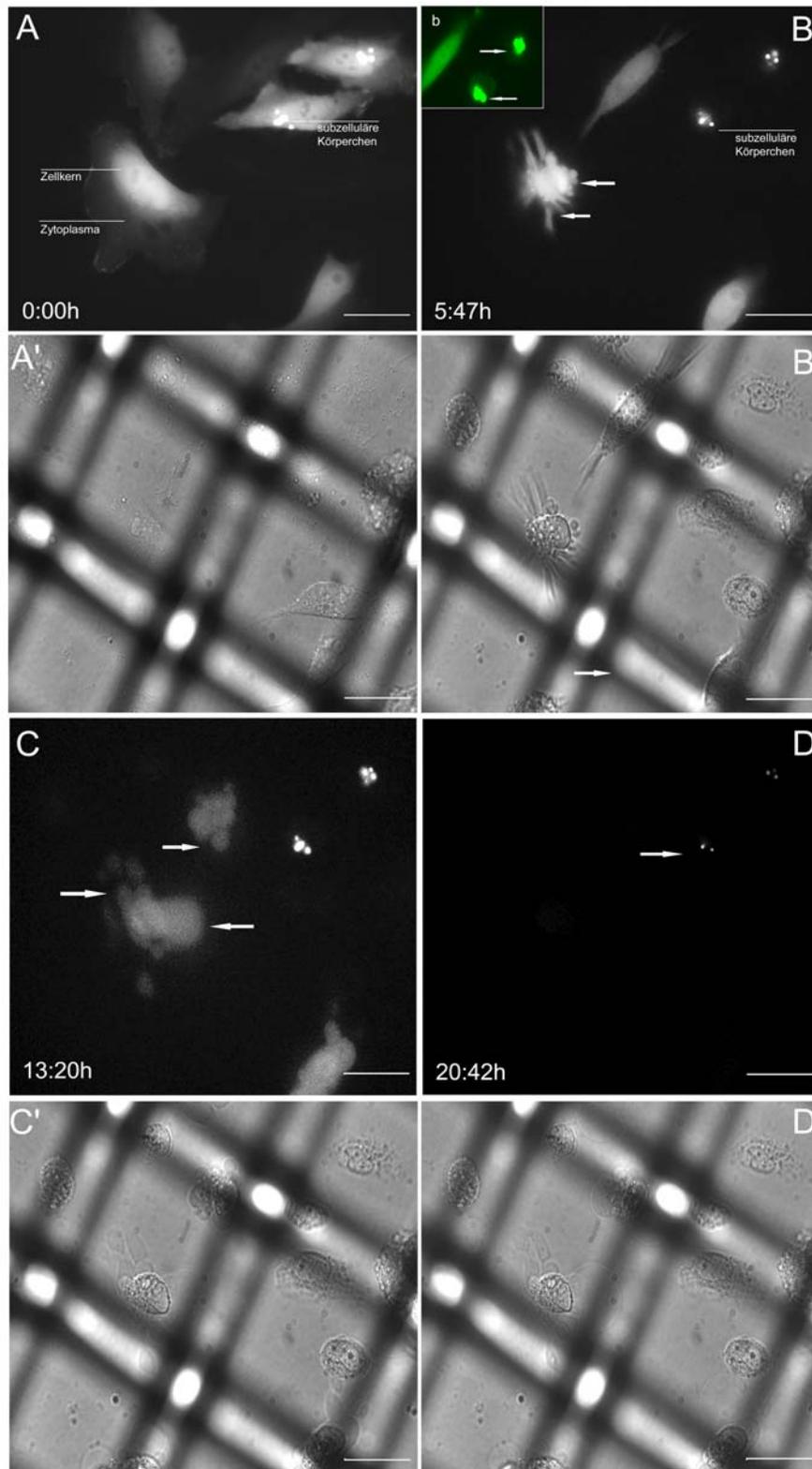
HeLa-Zellen wurden mit dem *Odf2*-NC-Konstrukt (2.2.5.1) transfiziert (2.2.8) und in die Inkubationskammer zur Lebendzell-Mikroskopie überführt (2.2.12). Es wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen sequenziell aufgezeichnet und dokumentiert. Die Zellen in der Inkubationskammer wurden präpariert und versorgt wie die Kontrollzellen im Vorversuch.

Zu Beginn der Aufzeichnung, die Zellen befinden sich in der Interphase, lokalisiert das Fusionsprotein der transfizierten HeLa-Zellen im Zytoplasma, im Zellkern und konzentriert in subzellulären Körperchen, die eine starke Fluoreszenz zeigten (Abbildung 37; Video 2). Nach 5 h:47 min runden sich die Zellen ab, das Fusionsprotein lokalisiert im Zellkern und konzentriert sich in den Kern-assoziierten Körperchen, die paarig orthogonal zueinander angeordnet waren und fibrilläre Ausläufer bildeten (Abbildung 39). Deren Anzahl von je vier pro Zelle änderte sich im Zellzyklusverlauf nicht.

Im Zellzyklusverlauf, nach 5 h:47 min, konzentrierte sich das Fusionsprotein in den asynchronen Zellen in den subzellulären Körperchen und in einem konzentrischen Kreis um den Zellkern herum (Abbildung 37 b). Etwa 2 h nach Beginn der Aufzeichnung persistierte und konzentrierte sich das Fusionsprotein ausschließlich in den subzellulären Körperchen. Diese, jeweils vier pro Zelle, ordneten sich paarig orthogonal zueinander an und zeigten fibrilläre Ausläufer (Abbildung 37 b; Abbildung 38 Abbildung 39).

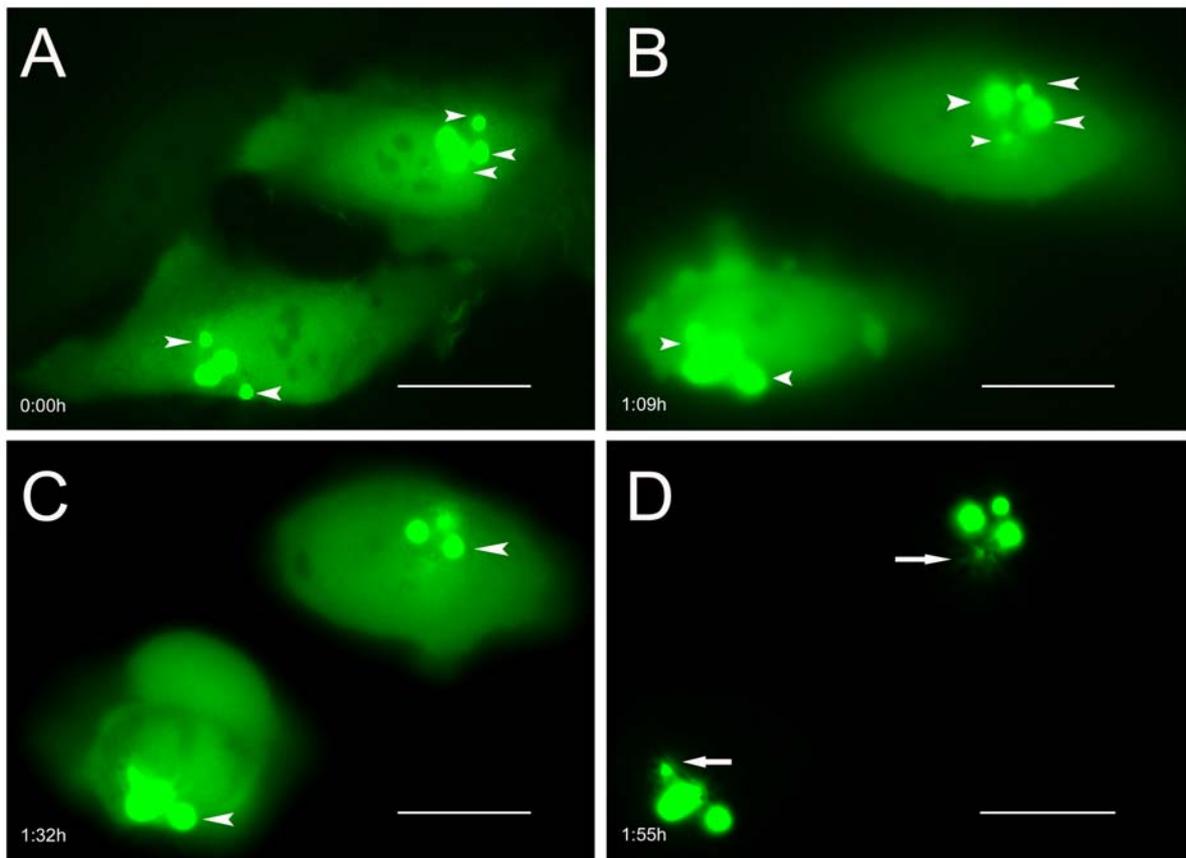
Nach 13 h:20 min schrumpften die transfizierten Zellen, das Fusionsprotein verlagerte sich in den Zellkern und in einen konzentrierten Kreis um den Zellkern (Abbildung 37 C). Die Zellen zeigten vesikelförmige Abschnürungen, zerfielen, und im Verlauf der Aufzeichnung wurde eine für die Apoptose charakteristische Zellschrumpfung beobachtet. Das Fluoreszenzsignal wurde schwächer; nur in den subzellulären Körperchen wurden weiterhin die stärksten Fluoreszenzsignale detektiert (Abbildung 37; Abbildung 39). Die Fluoreszenzintensität nahm ab und verblieb in den subzellulären Körperchen als stärkstes Signal noch nach 20 h:42 min erhalten, die Zelle ging in diesem Zeitraum nicht in die Mitose und anschließende Zytokinese über (Abbildung 37; Video 2).

Der beobachtete Zeitraum lag in dem von der Literatur ausgewiesenen Zeitraum einer Proliferation für HeLa-Zellen von 21-25 h. Der hier vorgenommene Vorversuch hatte gezeigt, dass untransfizierte HeLa-Zellen sich in einem Zeitraum von 18 h:42 min teilten, die Literaturdaten bestätigten und das die Versuchsbedingungen optimal gewählt waren. Innerhalb des verlängerten Beobachtungsabschnitts von 20h:42min konnte in ODF2-NC-überexprimierenden Zellen nun keine Zellteilung registriert werden. Die sich bis dahin nicht geteilten transfizierten Zellen zeigten typische Charakteristika der Apoptose wie Zellschrumpfung, Größenabnahme und Vesikelabschnürungen (Abbildung 37; Video 2). Diese Daten wurden übereinstimmend in fünf unabhängigen videomikroskopischen Analysen bestätigt. Da der Zeitraum sich noch nicht außerhalb der in der Literatur vermerkten Zellzyklusdauer von HeLa-Zellen bewegte, wurde der beobachtete Zeitraum einmalig in einem weiteren *Life Imaging* Versuch auf nahezu drei Tage ausgedehnt und gleichzeitig die DNS-markiert (Abbildung 40; Video 3).. Dies diente dazu, im Zellzyklusverlauf die Morphologie des Chromatins nachzuvollziehen. Damit stützen sich die erhobenen Daten auf sechs unabhängige Experimente.



**Abbildung 37 Videomikroskopie ODF2-NC-überexprimierende HeLa-Zellen im Zellzyklus**

**A)** ODF2-NC-exprimierende HeLa-Zellen zu Beginn der Aufzeichnung. Das Fusionsprotein lokalisierte im Zellkern, im Zytoplasma und in subzellulären Körperchen. **(A')** Zeigt die dazugehörige Durchlichtaufnahme. **(B)** Nach 5h:47min wurde ein intensives *membrane blebbing* an der Zytoplasmamembran (Pfeile) beobachtet. **(b)** Zeigt den Ausschnitt der rechts oben gelegenen Zellen in Abbildung (B). Das Fusionsprotein verblieb in den Bläschen und in einem Kreis um den Zellkern (Pfeile). **(B')** Zeigt die dazugehörige Durchlichtaufnahme. **(C)** 13h:20min nach Beginn der Aufzeichnung schrumpften die Zellen (Pfeile). Das Fluoreszenzsignal verblieb am stärksten in den subzellulären Körperchen. **(C')** Die dazugehörige Durchlichtaufnahme. **(D)** 20h:42min nach Beginn der Aufzeichnung wurde keine Zytokinese beobachtet. Das Fluoreszenzsignal blieb in den subzellulären Körperchen erhalten. **(C')** und **(D')** zeigen die entsprechenden Durchlichtaufnahme. Maßstab entspricht 10 µm.



**Abbildung 38 Subzelluläre Körperchen des ODF2-NC-Fusionsproteins im Zellzyklusverlauf**

Vergrößerter Ausschnitt der Aufzeichnung von Abbildung 37.

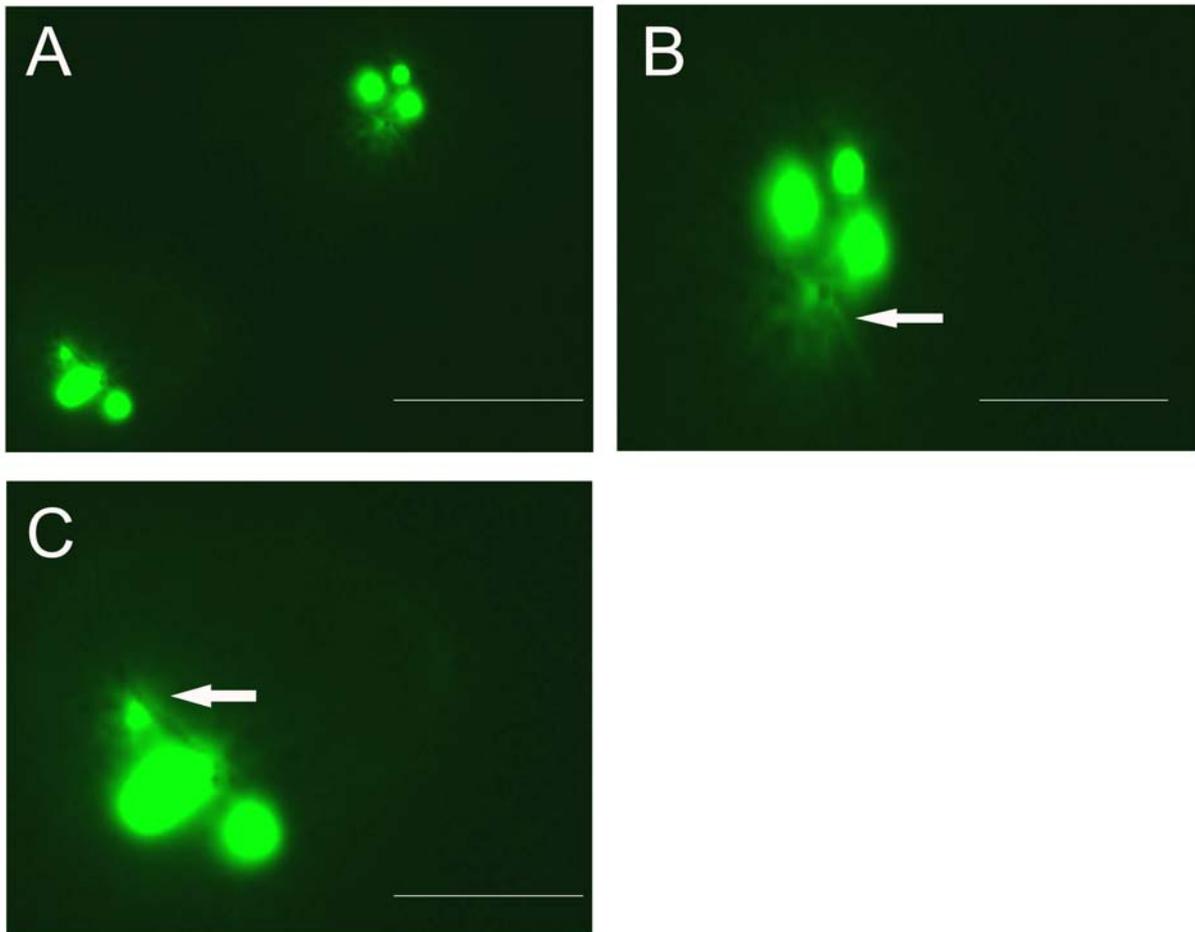
**(A)** Zu Beginn der Aufzeichnung lokalisierte das Fusionsprotein im Zellkern, im Zytoplasma und in den subzellulären Körperchen (Pfeile).

**(B)** 1:09 h später begann die Zelle sich abzurunden, das Signal konzentrierte sich im Zellkern und in den subzellulären Körperchen (Pfeile).

**(C)** 1:32 h später schnürte die untere linke Zelle Membranvesikel ab. Das Signal konzentrierte sich weiterhin im Zellkern und in den subzellulären Körperchen (Pfeile).

**(D)** 1:55 h ver schwand das Signal aus dem Zellkern und persistierte in den subzellulären Körperchen, die fibrilläre Ausläufer bildeten.

Maßstab entspricht 5  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 39 Lokalisation des ODF2-NC-Fusionsproteins in subzellulären Körperchen. Ausschnittvergrößerung.**

Im Zellzyklusverlauf änderte sich die Lokalisation des Fusionsproteins in transfizierten HeLa-Zellen. Das Fusionsprotein konzentrierte sich im Zellzyklusverlauf in den Zellkern assoziierten Körperchen, vier an der Zahl, die paarig orthogonal zueinander angeordnet waren. Ihre Anzahl veränderte sich nicht, aber die Fluoreszenzintensität nahm im Verlauf der Aufzeichnung ab (siehe dazu Abb. 46).

**(A)** Zeigt eine vergrößerte Ausschnitaufnahme der sequenziellen Aufzeichnung des Life Imaging von *Odf2*-NC-GFPtransfizierten HeLa-Zellen, 5 h:47 min nach Beginn der Aufzeichnung. Vergleiche dazu auch Abbildung 37. Das Fluoreszenzsignal konzentriert sich in den subzellulären Körperchen, die paarig orthogonal zueinander angeordnet waren.

**(B)** Zeigt eine weitere Vergrößerung der in Bild (A) rechts oben gelegenen Körperchen. Die Körperchen bildeten fibrilläre Ausläufer (Pfeil).

**(C)** Zeigt eine Vergrößerung der in Bild (A) links unten gelegenen Bläschen. Auch diese lagen paarig orthogonal zueinander angeordnet vor und bildeten fibrilläre Ausläufer (Pfeil).

Maßstab entspricht 10  $\mu\text{m}$ .



Es konnten keine morphologischen Auffälligkeiten des Chromatins beobachtet werden. Dies könnte auf die Beobachtungsmethode zurückgeführt werden. Die *Odf2*-NC-EGFP-transfizierten Zellen gingen auch nach 45 h:17 min, im erweiterten Aufzeichnungszeitraum, nicht in die Zytokinese, sondern in Apoptose ähnliche Strukturen über (Abbildung 40; Video 3).

## 4 Diskussion

### 4.1 Putative ODF2-Interaktionspartner

Von Interesse ist, welche Interaktionen das Mantelfaserprotein ODF2 bei der zellulären Organisation eingeht. Ziel war es, mit Hilfe des *Yeast-two-hybrid* Systems Interaktionspartner des ODF2-Proteins zu identifizieren, die zum einen in die Prozessen des Proteintransportes involviert sind und zum anderen die mediierte Bindung zu den Mikrotubuli begründen. Dazu wurde ein Protein-Protein Wechselwirkungsscreen mit der cDNS aus Rattenhirn durchgeführt (2.2.5; 3.1).

Die über Sequenzvergleich identifizierten annotierten putativen Interaktionspartner müssen durch weitere Sequenzierung überprüft und bestätigt werden, da sie bis jetzt nur einmal sequenziert wurden, können Sequenzierfehler nicht vollständig ausgeschlossen werden. Sequenzierte Bereiche und Grad der Übereinstimmung mit den putativen Interaktionspartner ist der Liste im Anhang und der Tabelle 4 zu entnehmen.

Auf einige eventuell relevante Kandidaten, die zur Charakterisierung der Funktion von ODF2 beitragen könnten, wird im Folgenden eingegangen.

Putative ODF2-Interaktionspartner beim Proteintransport wurde das *SNAP25 interacting protein* (SIP30) gefunden. Das SIP30 wird in der Hauptsache im Gehirn und zu einem geringeren Anteil auch im Testis exprimiert und ist als Synonym des *ZW10<sup>7</sup>-interacting protein 1* (Zwint-1) bekannt. Das Protein *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors* (SNAREs), das *synaptosome-associated proteins of 25 kDa* (SNAP25), syntaxin und das *vesicle-associated membrane protein* (VAMP) sind essentiell bei den regulatorischen Exocytose-Prozessen der Neurotransmission synaptischer Vesikel. Lee et al. (2002) identifizierten das *SNAP25 interacting protein* (SIP30), von dem sie annehmen, dass es beim intrazellulären Proteintransport über die direkte Bindung zum SNAP25 involviert ist. SIP30/Zwint-1 spezifiziert die Lokalisation des ZW10-Proteins an das Kinetochor. Wang et al. (2004) identifizieren in ihren Studien Zwint-1 als eine neue Komponente bei den mitotischen *check-point* Prozessen. Zellen, denen das Zwint-1-Protein fehlt, arretieren in der Mitose.

Als putativer ODF2-Interaktionspartner wurde die ADP-Ribosyltransferase (ART) identifiziert. ART transferieren die ADP-Ribose-Gruppe auf Zielproteine, während Nikotinamid freigesetzt wird. Die ADP-Ribosylierung induziert die Inaktivierung des Zielproteins. ART sind in Prozesse der intrazellulären sowie der extrazellulären Signalübermittlung involviert (Balduccii et al., 1999; Seman et al., 2004).

Der Rezeptor für die *hyaluronan-mediated motility* (RHAMM) ist ein Mikrotubuli bindendes Protein und wurde hier als putativer ODF2-Interaktionspartner identifiziert. RHAMM, ein *coiled-coil* Protein, lokalisiert im Centrosom und ist darüber hinaus für die Integrität der Mitosespindel verantwortlich (Evanko et al., 2004). Maxwell et al. (2003) sehen eine

---

<sup>7</sup> *Zeste White10* lokalisiert im Kinetochor und spielt eine essentielle Rolle bei den Zellzyklus-Kontrollprozessen. Das Protein ist notwendig zur Assemblierung des Dynein-Dynactin Komplexes an die Kinetochore. Die Assoziation mit SNARE-ähnlichen Komplexen lässt vermuten, dass das ZW10-Protein eine Rolle beim Membrantransport zwischen ER und dem Golgi-Aparat spielt (Hirose et al., 2004).

mögliche Funktion des RHAMM-Proteins bei der Verankerung centrosomaler Mikrotubuli über die direkte Interaktion mit den Mikrotubuli und der Assoziation mit Dynein. Sie dokumentieren eine Inhibition in der Mitose bei Deregulationen der RHAMM Expression. RHAMM könnte der Mediator für die Mikrotubulibindung des ODF2-Proteins sein, ein Kandidat, der mit Priorität weiter auf direkte Interaktion zum ODF2 untersucht werden sollte.

Das *Calmodulin regulated spectrin associated protein 1* gehört zur Familie der *microtubule-associated proteins 1B* (MAP 1B), die bei der Nukleation und Stabilisierung der Mikrotubuli eine Rolle spielen. MAP 1B ist ein neuronales zytoskelettales Protein und wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert. C Queiroz et al. (2006) konnten MAP 1B im Epididymis nachweisen. Die funktionelle Bedeutung von MAP 1B im Epididymis ist noch nicht geklärt. Es ist hier als ein putativer ODF2-Interaktionspartner identifiziert worden und steht eventuell im Kontext mit der von ODF2 ausgewiesenen Lokalisation in den subdistalen Anhängseln der maturen Centriole, deren mögliche Funktion in der Positionierung der Interphase-Mikrotubuli um das mature Centriol besteht (De Brabander et al., 1982; Gorgidze und Vorobjev, 1995; Piel et al., 2000; Ishikawa et al., 2005). Und könnte ein möglicherweise die Bindung von ODF2 an die MT vermitteln.

Es wurde als ODF2-Interaktionspartner das *voltage-dependent anion-selective channel 2* (VDAC2) identifiziert. VDAC-Proteine werden als *pore-forming* Proteine in der äußeren mitochondrialen Membran gefunden. VDAC2 und VDAC3 wiederum wurden in den zytoskelettalen Komponenten des Spermienschwanzes, den ODFs, identifiziert. Es wird spekuliert, dass VDAC2 und VDAC3 eine andere Funktion in den ODFs haben, da den ODFs keine membranöse Struktur nachgewiesen wurde. Eine mögliche Rolle des testikulären VDAC2 sehen die Autoren bei der Induktion von Apoptose in den männlichen Keimzellen (Hinsch et al., 2001; Hinsch et al., 2004). VDAC2 ist im Zusammenhang mit der bei ODF2-überexprimierten Säugerzellen beobachtete Übergang in Apoptose ähnlichen Strukturen, ein interessanter Kandidat den in weiteren Studien nachgegangen werden sollte.

## 4.2 ODF2 und der Proteintransport

Bei den zytologischen fluoreszenzmikroskopischen Experimenten an ODF2-exprimierenden Säugerzellen wurden Kolokalisationen mit dem Golgi-Apparat und dem ER detektiert. Es wurden an diesen Zellen in zwei Experimenten

- (i) der vesikuläre Proteintransport
- (ii) und der Mikrotubuli-abhängige Proteintransport untersucht (3.4).

Die ermittelten Ergebnisse dokumentieren eine partielle Kolokalisation des ODF2-NC- und ODF2-N2C-Fusionsproteins mit dem ER und dem Golgi-Apparat (Tabelle 8). Die beiden C-terminalen Konstrukte, ODF2-NC1 und ODF2-NC2 zeigten nur eine schwache Assoziation mit den beiden Zellorganellen. Das Ergebnis zeigte, dass bei Zugabe von BFA auf die kultivierten ODF2-NC-überexprimierenden Zellen sich das subzelluläre Körperchen in Richtung Zellperipherie verlagerte (3.4). Das subzelluläre Körperchen zeigte auch bei erhöhter BFA-Konzentration eine Verlagerung in Richtung Zellperipherie. Dies liefert den Hinweis, dass das ODF2-Protein passiv an dem zellulären vesikulären Proteintransport involviert ist.

Die Lokalisation von ODF2 im Golgi-Apparat wird möglicherweise über einen im C-terminalen Bereich kodierenden Abschnitt definiert, da die beiden N-terminalen Abschnitte, repräsentiert durch die Fusionsproteine ODF2-NC1 und ODF2-NC2 nur schwach mit dem Golgi-Apparat kolokalisierten (3.3.3; Tabelle 8). Folglich ist die Golgi-Lokalisation des ODF2-Proteins möglicherweise über eine strukturelle Komponente des C-terminalen Proteinabschnitts des ODF2-Proteins definiert.

Die Komplexität der Analyse zellulärer regulatorischer Netzwerke und Systeme zeigt sich dahingehend, dass Topologien und differentielle regulatorische Proteine in Wechselwirkungsbeziehungen stehen. Dabei werden Modelle der Proteinfunktionen über die sogenannten globulären Domänen beschrieben und charakterisiert. Zunehmend werden funktionelle Gruppen in "unstrukturierten", linearen Bereichen von Proteinen beschrieben. Die vergleichende Analyse solcher linearen systemischen Module am ODF2-Protein wurde mit Hilfe des ELM-Programms<sup>8</sup> durchgeführt und sollte der putativen funktionellen Strukturanalyse dienen. Über diese rechnerbasierenden Strukturanalysen konnten putative funktionelle Protein-Interaktions-Motive für Bindungspartner am ODF2-Protein identifiziert werden, die die Lokalisation des ODF2-Proteins im Golgi bzw. im ER erklären helfen und eine mögliche Funktion des ODF2-Proteins in der zellulären Organisation begründen.

Im C-terminalen Proteinabschnitt 305-309 (ERSGN) und im Bereich 434-438 (EYSAF) des ODF2-Proteins (Abbildung 41) befinden sich Bindungsmotive für Glykosaminoglykan.



**Abbildung 41 Skizze des ODF2-Fusionsproteins**

Das ODF2-NC-Protein umspannt den Bereich 1-593 mit zwei C-

terminalen Leucin-Zipper-Motiven an den Positionen AS 392-AS 413 und AS 530-AS 551. Die Zahlen definieren die AS-Position. Die blauen Markierungen definieren die Position der beiden Leucin-Zipper-Motive.

Die Gruppe der Glykosaminoglykane spielt eine Rolle beim enzymatischen zellulären intramolekularen Transport in den Golgi-Apparat. Die extrazellulären Glykane fungieren als Schlüsseldeterminanten bei den multizellulären Zell-Zell Interaktionen. Mechanismen der Glykan Biosynthese, bei der die Assoziation und Interaktionen mit vielseitigen Proteinen stattfindet, führt zur Regulation der Interaktionen und biomolekularen Kommunikation an der Zelloberfläche (De Graffenried und Bertozzi, 2004). Das Motiv TNRTLRL im Proteinabschnitt 200-205 des ODF2-Proteins, könnte nach den *in silico* Ananalysen eine Bindungsstelle sein, an den sich ein Glukosemolekül unter Wasserabspaltung anlagern kann (ELM <http://elm.eu.org/basicELM/cgimodel>)

Aminoständige Glykosylierung ist ein posttranslationaler Prozess der im ER stattfindet und über die die Qualitätskontrolle der Proteinfaltung erfolgt (Parodi, 2000). Über dieses Motiv könnte die beobachtete Kolokalisation des ODF2-Proteins mit dem ER vermittelt sein.

Die überexprimierten ODF2-Fusionsproteine in somatischen Säugerzellen zeigten eine

<sup>8</sup>(*Eukaryotic Linear Motif resource for functional sites in proteins*; <http://elm.eu.org/basicELM/cgimodel>)

- (i) Aggregation des ODF2-NC-Fusionsproteins in subzelluläre Strukturen, die zellkernnah assoziierten; (3.3.3; Abbildung 37).
- (ii) Die C-terminal deletierten Fusionsproteine lagen in dispersen Aggregaten im Zytoplasma vor, ODF2-NC1 und ODF2-NC2 (3.3.3; Abbildung 22; Abbildung 24).
- (iii) Das N-terminal deletierte Fusionsprotein zeigte keine dispersen punktierten Aggregate, und es wurde auch keine Aggregation in subzellulären und perinukleolären Strukturen beobachtet, ODF2-N2C (3.3.3; Abbildung 22; Abbildung 24).

Die Strukturen kolokalisierten nicht mit den Mitochondrien, zeigten nur eine schwache Assoziation mit dem ER und waren keine Komponenten, die über das Hsp47 Protein eindeutig markiert wurden. Hsp47 ist ein Protein, das in den Lumen des ER lokalisiert (Nagata, 2003; 3.3.3).

Diese dispersen punktierten Aggregate könnten Aggresom-ähnliche Strukturen sein, Strukturen von denen angenommen wird, eine generelle zelluläre Reaktion fehlgefalteter Proteine zu sein (Johnston et al., 1998), die in der Nähe des MTOC lokalisieren. Nach Garcia-Mata et al. (1999) inhibiert die Überexpression von p50/Dynamitin die Ausbildung aggresomaler Strukturen, gleichzeitig wird der vesikuläre ER-Golgi Transport von Aggresom-bildenden Proteinen nicht beeinflusst und die Anwesenheit großer aggresomaler Strukturen innerhalb der Zelle soll keinen Einfluss auf deren Vitalität haben. Diese Charakteristika treffen nicht auf die oben beschriebenen Aggregationen des ODF2-Fusionsproteins zu und bleiben Gegenstand weiterer Studien.

Bei den Untersuchungen zur Interaktion des ODF2-Proteins beim Motorprotein-abhängigen Transport wurde in ODF2-überexprimierenden Säugerzellen mit Hilfe der Überexpression der Dynein-Untereinheit Dynamitin der Mikrotubuli-abhängige retrograde Transport unterbrochen (3.4.1; Echeverri et al., 1996). Das subzelluläre Körperchen des ODF2-Proteins konnte dabei nicht detektiert werden. Die ermittelten Daten lassen vermuten, dass das ODF2-Protein möglicherweise passiv in den Dynein-abhängigen Transportwegen involviert ist.

Das Centrosom ist ein dynamisches Organell. Die Proteinkomposition und stöchiometrische Zusammensetzung variiert während des Zellzyklus (Doxsey, 2001; Bornens, 2002; Blagden und Glover, 2003). Von einigen Proteinen wie dem NuMA-Protein<sup>9</sup> und Pericentrin ist belegt, dass ihre centrosomale Lokalisation über den von zytoplasmatischen Dynein mediierten Transport realisiert wird (Zimmerman und Doxsey, 2000). Proteine assemblieren im Centrosom auch Dynein-unabhängig, wie das gamma-Tubulin dass beide möglichen Transportwege begehen kann (Khodjakov und Rieder, 1999; Young et al., 2000).

### 4.3 Mantelfaserproteine in somatischen Zellen

Die anfänglich in der Literatur als exklusiv testisspezifisch definierten zytoskelettalen Proteine wie ODF1, SPAG4, SPAG5, SPAG6 und ODF2 wurden nun auch in somatischen Zellen detektiert und beschrieben (Nakagawa et al., 2001; Sapiro et al., 2002; Xue et al., 2002; Bhullar et al., 2003; Zarsky et al., 2003; Fitzgerald et al., 2005; 3.3.1). Die oben

---

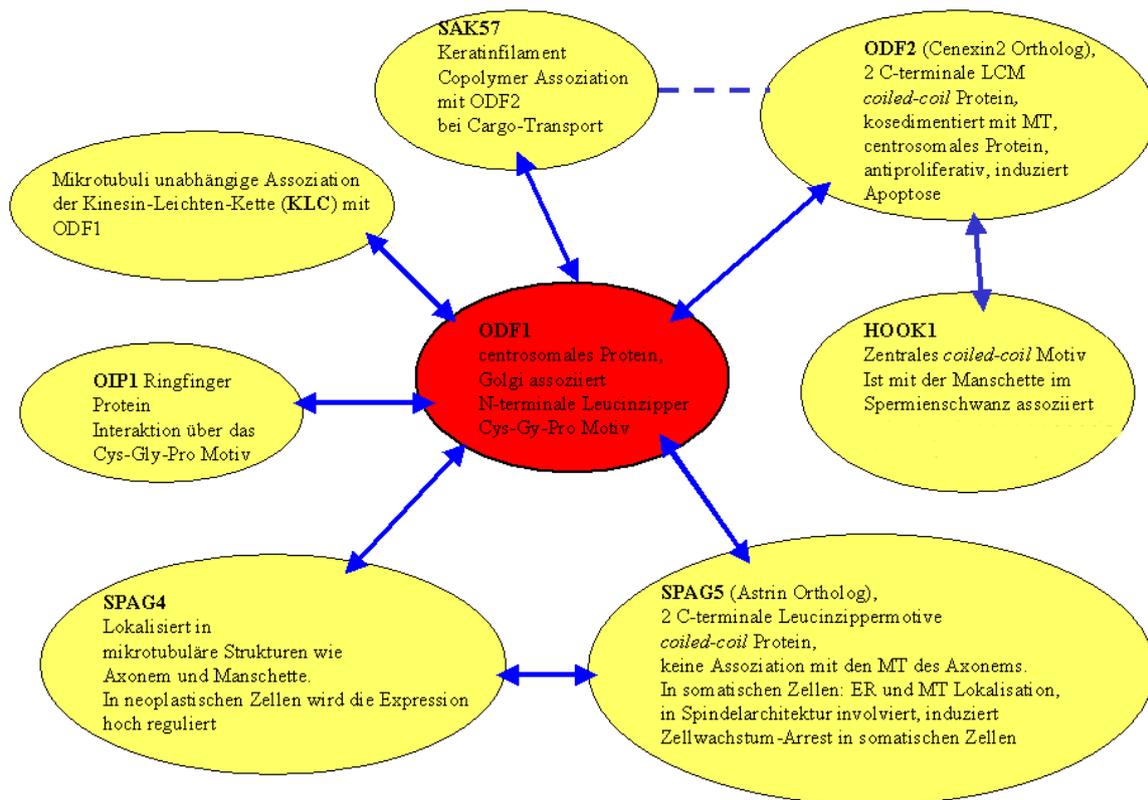
<sup>9</sup> *Nuclear Mitotic Apparatus* (NuMA) Protein ist bei der Aufrechterhaltung der Zellkernmorphologie involviert sowie bei der Assemblierung des mitotischen Spindelapparates. Während der Mitose ist das NuMA-Protein mit den mikrotubulären Motorproteinen assoziiert und hat eine essentielle Rolle bei der Organisation der Mikrotubulus (-) Enden am Spindel-Pol (Sun und Schatten 2006).

genannten Mantelfaserproteine könnten auch in somatischen Zellen eine Bedeutung bei der Aufrechterhaltung und Organisation zytoskelettaler Strukturen haben. In somatischen Zellen sind diese oben aufgezählten Mantelfaserproteine, wie z.B. das SPAG5-Protein, mit den unterschiedlichsten Zellorganellen assoziiert. SPAG5, das Astrin-Ortholog, zeigt in somatischen Zellen eine Assoziation mit dem ER (Fitzgerald et al., 2005), ist bei der Etablierung der Spindelarchitektur involviert und induziert einen Zellwachstumsarrest in somatischen Zellen (Gruber et al., 2002). Dem gegenüber steht die Beobachtung der gesteigerten Expression des *Spag4*-Gens in neoplastischen Zellen. Kennedy et al. (2004) diskutieren die erhöhte Transkriptionsrate als potentiellen Tumormarker.

Das axonemale Protein SPAG6 kolokalisiert in somatischen Zellen mit den Mikrotubuli (Sapiro et al., 2000). Wird das *spag6* mit Hilfe der homologen Rekombination ausgeschaltet, zeigen die so generierten Mausmutanten morphologische Defekte der Spermienköpfe, ein Fehlen des zentralen Mikrotubulipaars im Spermischwanz, eine Desorganisation der ODFs und der fibrösen Hülle. Diese Mausmutanten waren infertil (Sapiro et al., 2002). Somit kommt dem Spermischwanzprotein SPAG6 eine Rolle bei der strukturellen Integrität des Spermischwanzes zu.

Die eingangs bezeichneten Mantelfaserproteine stehen in vielseitiger Wechselwirkung zueinander, z.B. werden die Interaktionen des ODF1-Proteins mit dem ODF2 sowie den Spermatidspezifischen Axonem-bindenden Proteinen SPAG4 und SPAG5 über das Leucin-Zipper-Motiv vermittelt (Shao et al., 1997; Tarnasky et al., 1998; Shao et al., 2001; Abbildung 42). Das testikuläre SPAG5-Protein wird in den Spermatozyten und runden Spermatiden gefunden. Es zeigt Sequenzähnlichkeiten mit Astrin, einem Mikrotubuli-bindenden Spindelprotein (Gruber et al., 2002; Chang et al., 2001). Die Assoziation des SPAG5/Astrin Proteins mit den ODFs (und nicht mit den MT des Axonems in testikulären Zellen) steht der Assoziation mit dem ER und den Mikrotubuli in den somatischen Zellen gegenüber (Fitzgerald et al., 2005). Astrin, das Ortholog zu SPAG5, bewirkt bei Überexpression einen Arrest der Zellen, die dann in die Apoptose übergehen. Diskutiert wird, ob Astrin bei der Organisation des mitotischen Spindelapparates eine Rolle zukommt (Gruber et al., 2002).

Außerdem sind Interaktionen des ODF1-Proteins mit weiteren Proteinen bekannt, wie z.B. mit *kinesin-light-chain* (KLC, Motorprotein) oder OIP1, einem Ringfingerprotein (Bhullar et al., 2003; Zarsky et al., 2003). Die Funktion von *Oip1* bei der Spermiogenese ist bis jetzt noch nicht geklärt. Zarsky et al. (2003) beobachten eine hohe Expressionsrate der beiden Interaktionspartner OIP1 und ODF1 während der Spermiogenese und folgern daraus eine funktionelle Bedeutung.



**Abbildung 42 Wechselwirkungen und Interaktionspartner der Mantelfaserproteine**

Das testikuläre ODF1-Protein lokalisiert im Centrosom und interagiert, mediiert über die Leucin-Zipper Motive mit SPAG5, SPAG4 (einem Astrin-Ortholog), ODF2 und Sak57. (Kierszenbaum et al., 1996; Shao et al., 1997; Tarnasky et al., 1998; Kierszenbaum 2001; Nakagawa et al., 2001; Shao et al., 2001; Xue et al., 2002; Bhullar et al., 2003; Zarsky et al., 2003; Luiro et al., 2004; Fitzgerald et al., 2005; 3.3). Ebenso konnte in jüngster Zeit eine Assoziation mit der Kinesin-Leichten-Kette (KLC) detektiert werden (Bhullar et al., 2003). Über das Cys-Gly-Pro Motiv interagiert das ODF1-Protein mit dem OIP1-Ringfingerprotein (Zarsky et al., 2003).

Das ODF2-Protein steht über eine assoziative copolymerere Interaktion mit dem SAK57-Protein in Wechselwirkung (Kierszenbaum, 2001). Über die Interaktion von ODF2 mit Hook1 könnte die mediierte Bindung zu den Tubulinen erfolgen (4.4.2).

Doppelpfeile = wechselseitige Interaktion. Gestrichelte Linie = assoziative copolymerere Interaktion.  
LCM = Leucin-Zipper-Motiv

Das bereits bestätigte Interaktionspaar ODF1-ODF2 (Shao et al., 1999) wurde erstmalig in somatischen Zellen über die Koexpression der Gene immunzytologisch mit Hilfe der Dualchromophorenmikroskopie visualisiert (3.3; 3.3.2). Das ODF2-Protein generiert in somatischen Zellen eine fibrilläre Struktur (Donkor et al., 2004). Die Koexpression der zwei *Odf*-Gene in somatischen Zellen führt zur Ausbildung eines zytoskelettalen Proteinnetzwerkes, das sich durch die perlschnurartige Anordnung des ODF1-Proteins auf den ODF2-Fibrillen auszeichnet (3.3.2).

Auf der Grundlage der bereits bekannten Fakten über die Wechselwirkungsbeziehungen der Mantelfaserproteine und den in dieser Arbeit gewonnenen Daten, könnte dem ODF1-Protein eine mögliche zentrale Rolle bei der Komposition komplexer Proteinnetzwerke zukommen (Abbildung 42).

## 4.4 Testikuläres ODF2 und das Zytoskelett

*Odf2* wird während der Spermatidentwicklung in der Keimbahn, den testikulären Zellen, exprimiert. Die höchste Expression wird in elongierten Spermatozoen gefunden (Turner et al., 1997). Das testikuläre ODF2-Protein, das vermutlich bei der Stabilisierung der Spermenschwanzstruktur involviert ist und den Spermenschwanz bei der Passage durch den Nebenhoden vor physikalischen Scherkräften schützen soll, ist in somatischen Zellen im Zytoplasma, im Zellkern, im Centrosom und im Golgi-Apparat lokalisiert (Nakagawa et al. 2001; Hoyer-Fender et al., 2003; Donkor et al., 2004; 3.3.3). In den vorangegangenen Studien konnte eine Assoziation mit dem mitotischen Spindelapparat und dem Mikrotubuli-Netzwerk somatischer Zellen nachgewiesen werden (Donkor et al., 2004).

### 4.4.1 ODF2 assoziiert und kosedimentiert in somatischen Zellen mit Mikrotubuli

Die kodierenden Sequenzen für das testisspezifische *Odf2*-Gen, beschrieben von Brohmann et al. (1997), wurde in einen Expressionsvektor (2.2.1) eingebracht und in somatische Säugerzellen transfiziert. Die ODF2-Fusionsprodukte zeigten bei der zytologischen Immunfluoreszenzanalyse eine Kolo-kalisation und Assoziation mit dem Mikrotubuli-Netzwerk und dem mitotischen Spindelapparat (Donkor et al., 2004). Diese Assoziation wurde eingehend auf eine mögliche direkte physikalische Interaktion untersucht. Dazu wurden in Anlehnung an die Experimente von Vallee und Collins (1986) Mikrotubuli-Kosedimentationsversuche durchgeführt (2.2.13; 3.1; Donkor et al., 2004). Es konnte mit den Kosedimentationsexperimenten das ODF2-Protein bei den Bedingungen unter denen Mikrotubuli polymerisieren detektiert werden. Bei depolymerisierenden Bedingungen entfiel eine Assoziation mit den Mikrotubuli (3.1).

Die Nukleation der Mikrotubuli wird bei den Vertebraten über das Centrosom kontrolliert. Das Centrosom besteht aus einem Centriolenpaar, das mit einer amorphen Matrix assoziiert ist (1.2.2; Abbildung 43). Die beiden Centriolen sind nicht äquivalent. Das mature Centriol wird über die Anwesenheit distaler und subdistaler Anhängsel charakterisiert, in denen das ODF2-Protein lokalisiert ist (Paintrand et al., 1992; Nakagawa et al., 2001). Die Funktion der distalen Anhängsel ist noch nicht geklärt. Elektronenmikroskopische Aufzeichnungen der subdistalen Anhängsel legen den Schluss nahe, dass es sich um eine Verankerungsstruktur handelt, die es ermöglicht, Mikrotubuli um die mature Centriole zu positionieren (De Brabander et al., 1982; Gorgidze und Vorobjev, 1995; Piel et al., 2000). Die Kosedimentationseigenschaften von ODF2 (Mikrotubuli-polymerisierenden Bedingungen) steht möglicherweise im Zusammenhang mit der von Ishikawa et al. (2005) formulierten Beobachtung, dass bei ODF2-defizienten Säugerzellen ein Unvermögen bei der Ausbildung der primären Cilie vorliegt. Es kann vermutet werden, dass das ODF2 bei den centriolären Mechanismen involviert ist.

Mit Hilfe eines *microtubuli binding assays* konnte gezeigt werden, dass die Assoziation mit den Mikrotubuli über ein bis jetzt noch nicht identifiziertes Protein vermittelt wird (Donkor et al., 2004).

### 4.4.2 Die medierte Bindung des ODF2-Proteins an die Mikrotubuli

Die in einem Proteininteraktionsscreen nachgewiesene Interaktion des HOOK1-Proteins mit ODF2 (pers. Mitteilung Hoyer-Fender) könnte möglicherweise die vermutete medier-

te Bindung des ODF2-Proteins an die Mikrotubuli erklären. HOOK1 gehört zur Familie der Mikrotubulibindenden Proteine, die evolutiv bei Fliegen und Menschen konserviert sind. Experimente an dem Drosophila Homolog Hook1 lassen vermuten, dass es eine Rolle bei dem intramolekularen Vesikeltransport spielt (Kramer und Phistry, 1999). Es besteht die Annahme, dass das HOOK1-Protein am Mikrotubuli abhängigen endozytischen Membrantransport in somatischen Zellen beteiligt ist (Luiro et al., 2004). Weimer et al. (2005) zeigten kürzlich eine Interaktion von HOOK1 und Ankyrin G, einem Adaptor-Molekül, das sich an das Spectrin-Aktin Zytoskelett bindet und Proteine zur peripheren Zellmembran transportiert. Das HOOK1 Protein ist möglicherweise an den Prozesse des intramolekularen Proteintransports beteiligt. HOOK-Proteine werden unterschieden in HOOK1, HOOK2 und HOOK3. Diese Proteine besitzen drei verschiedene Proteindomänen:

- (i) Eine konservierte Mikrotubuli-Bindungsdomäne, die N-terminal lokalisiert ist,
- (ii) zentral ein *coiled-coil* Motiv, das vermutlich die Homodimerisierung vermittelt und
- (iii) eine diversifizierte C-terminale Domäne, die die Spezifität der Organellenbindung determiniert.

Immunohistochemische Analysen haben gezeigt, dass das HOOK1-Protein mit der mikrotubulären Manschette des Spermienschwanzes assoziiert ist, das Ausschalten des Gens zu Fehlpositionierung mikrotubulärer Strukturen in den Spermatiden führt und den *azh* (*abnormal spermatozoon head shape*) Phänotyp bei Mäusen begründet (Mendoza-Lujambio et al., 2002). Infertilität bei Männern wird zu einem hohen Prozentsatz auf defekte Spermienstrukturen zurückgeführt. Vor diesem Hintergrund könnten Experimente an *azh*-Maus-Mutanten, bei denen in immunhistologischen Reihenstudien die Lokalisation und Distribution von ODF2 analysiert wird, Hinweise auf eine funktionelle Interaktion der Proteine ODF2 und HOOK1 geben. Es ließen sich dann eventuell Erkenntnisse über die Ausbildung korrekter Spermien-Morphologien gewinnen, die möglicherweise in eine relevante Anwendung bei der klinischen Reproduktion münden könnten.

#### 4.5 Das testikuläre ODF1 in somatischen Zellen

Die als Interaktionspartner ausgewiesenen testikulären Proteine ODF1 und ODF2 (Shao et al., 1996; Shao et al., 2001) wurden in COS-7-Zellen zur Untersuchung ihrer Wechselwirkungsbeziehung in somatische Zellen sowohl einzeln als auch kotransfiziert (3.3.1; 3.3.2). Die durchgeführten Experimente sollten Aufschluss geben, inwieweit das von Shao et al., (1999) postulierte Modell eines molekulären Netzwerkes auch in somatischen Zellen visualisiert werden könnte.

Ausschlaggebend für die Untersuchung von Wechselwirkungsbeziehungen an Mantelfaserproteinen in somatischen Zellen war auch die Tatsache, dass in jüngster Zeit Transkripte von *Odf2* in unterschiedlichen somatischen Geweben gefunden wurden.

Die zellulären Immunfluoreszenzerggebnisse zeigte eine Lokalisation des ODF1-NC-Fusionsproteins im Zytoplasma und in subzellulären Strukturen, die nahe am Zellkern assoziierten. Diese Strukturen kolokalisierten mit centrosomalen Elementen und zeigten eine partielle Assoziation mit dem Golgi-Apparat. Das ODF1-Fusionsprotein generierte dabei keine fibrillären Strukturen (3.3.1).

#### 4.5.1 Das ODF1-Protein interagiert in somatischen Zellen mit ODF2 und generiert dabei ein zytoskelettales Netzwerk

Über das N-terminale Leucin-Zipper-Motiv des ODF1-Proteins soll die Interaktion mit ODF2 vermittelt sein und dabei das eingangs erwähnte molekulare Netzwerk generieren. Dieses Modell war Grundlage für die in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführte Kolo-kalisationsstudie (3.3.2). Dazu wurden die beiden Mantelfaserproteine in somatischen Zellen kotransfiziert und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet, um die Ausprägung der Wechselwirkungsbeziehung der beiden testikulären Proteine ODF1 und ODF2 in somatischen Zellen zu visualisieren (3.3; 3.3.2). Die dualchromophore konfokale Mikroskopie wurde als Grundlage zur experimentellen *in vivo* Analyse der interagierenden Proteine eingesetzt (2.2.8.1; 3.3.2). Die bei der Dualchromophorenmikroskopie eingesetzten Fluorophore ECFP und EYFP sind dafür ideal geeignet, da aufgrund ihrer Absorptions- und Emissionsspektren vernachlässigbar geringe Interferenzen entstehen und die emittierten Signale eindeutig differenziert werden können. Mögliche unliebsame Kreuzreaktionen wurden mit Hilfe der Emissionsfilter reduziert (3.3). Wird das *Odf1*-NC-ECFP mit den *Odf2*-NC-EYFP kotransfiziert, organisiert sich das ODF1-Protein entlang der ODF2-generierten Fibrillen und reiht sich perlenförmig daran auf (3.3.2). Die Distribution des ODF1-Protein verändert sich bei Anwesenheit von ODF2. Das ODF1-Protein nimmt dabei eine geordnete Struktur im Zytoplasma ein und folgt der zytoskelettalen Architektur (Abbildung 21) Das ODF1-Protein besitzt drei Proteindomänen:

- (i) Ein N-terminales Leucin-Zipper-Motiv (van der Horn et al., 1990).
- (ii) Ein C-terminales Cys-X-Cys Motiv (Higgy et al., 1994).
- (iii) Eine in der Mitte lokalisierte *alpha-crystallin-Hsps* Domäne (Fontaine et al., 2003).

ODF1 und ODF2 formieren sich zu organisierten zytoskelettalen Strukturen und generieren eine netzartige Struktur in somatischen Zellen (3.3.2). Unterstützt werden könnte dieses Netzwerk in den zellulären Kompartimenten der somatischen Zellen über die *alpha-crystalline* Domäne des ODF1-Proteins. Fontaine et al. (2003) finden Sequenzähnlichkeit mit der *alpha-crystallin* Domäne in den Mantelfaserproteinen der Säuger wieder. Computer-Strukturanalysen des ODF1-Proteins lokalisieren diese *alpha-crystallin* Domäne im mittleren Bereich des Proteins<sup>10</sup>.

Die sHSPs Proteine (*heat-shock protein*) der Säuger besitzen eine konservierte *alpha-crystallin* Domäne. Die sHsp Proteine sollen bei zytoskelettalen Funktionen eine Rolle spielen. Diese Proteine können mit den Intermediärfilamenten assoziieren und sind auch bei den Prozessen der IF-Polymerisierung involviert (Nicholl und Quinlan, 1994). Sie üben ebenfalls Einfluss auf das Tubulin-Netzwerk wie auch auf die Mikrofilamente aus. Die Aktin Polymerisierung wird *in vitro* von einigen sHSPs inhibiert; von anderen sHSPs wird das Aktinzytoskelett bei Hitze-induzierten Stressprozessen wiederum stabilisiert (Mounier und Arrigo, 2002).

Einige Zellen, die mit den beiden Mantelfaserproteinen kotransfiziert waren, zeigten neben dem oben beschriebenen Erscheinungsbild noch eine Akkumulation des ODF1-Fusionsproteins im Zytoplasma (3.3.2; Abbildung 20). Es ist vorstellbar, dass die *alpha-crystallin* Domäne des ODF1-Proteins eine zusätzliche Wechselwirkung mit dem Aktinzytoskelett der somatischen Zellen erfolgt.

<sup>10</sup> *in silico* Untersuchungen mit dem im Internet zur Verfügung stehenden Programm haben diese Datenlage erbracht (<http://elm.eu.org/basicELM/cgimodel>).

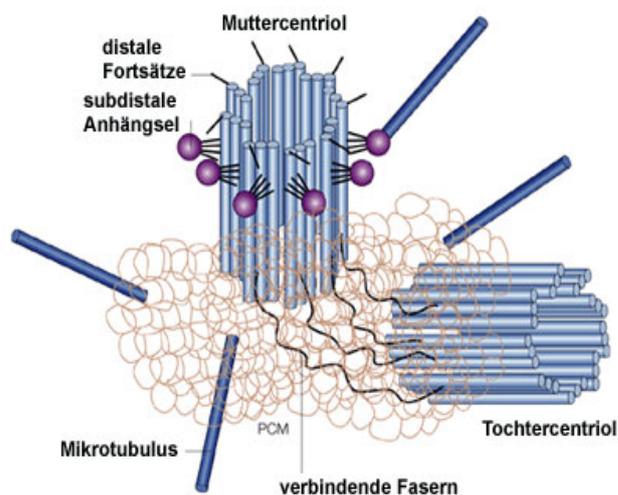
In somatischen Zellen konnte die gegenseitige Einflussnahme der ausgewiesenen Interaktionspartner ODF1 und ODF2 über die dualchromophore konfokale Mikroskopie nachgewiesen werden (3.3; 3.3.2). Die Wechselwirkung der Mantelfaserproteine ODF2 und ODF1 führt zur Etablierung eines zytoskelettalen Proteinnetzwerks.

## 4.6 ODF2 im Zellzyklusverlauf

Die bei Cilien und Flagellen im Zytoplasma eingebetteten Basalkörper zeigen strukturelle Analogien zu den Centriolen (Schatten, 1994). Die Centriolen bilden zusammen mit der pericentriolaren Matrix das MTOC<sup>11</sup>. Die Lokalisation von ODF2 in den murenen Centriolen und die Assoziation mit den Mikrotubuli des Spindelapparates von somatischen Zellen implizierte eine funktionelle Bedeutung bei den Zellzyklus-Prozessen (Lange und Gull 1995; Donkor, 2001; Nakagawa et al., 2001; Hoyer-Fender et al., 2003; Donkor et al., 2004).

### 4.6.1 Mögliche Bedeutung der ODF2-Lokalisation an den subdistalen Anhängseln der murenen Centriole

Das testikuläre ODF2-Protein, ein Cenexin-Ortholog, wurde mit Hilfe der Elektronenmikroskopie als eine Komponente der subdistalen Anhängsel der murenen Centriole identifiziert (Lange und Gull, 1995; Nakagawa et al., 2001). Der anti-proliferative Effekt des ODF2-Proteins auf die somatischen Zellen könnte auch im Kontext zur Lokalisation des Proteins in den subdistalen Anhängseln der murenen Centriole stehen (Abbildung 43).



**Abbildung 43 Aufbau des Centrosoms**

Die Centriolen sind umgeben von der amorphen pericentriolaren Matrix, diese beiden Elemente bilden das Centrosom, das MTOC. Die paarig angeordneten Centriolen sind orthogonal zueinander orientiert. Bei der Zellteilung erfolgt eine semi-konservative Verdoppelung der Centriolen. Ausgehend von der pericentriolaren Matrix polymerisieren die Mikrotubuli.

ODF2 wurde identifiziert und lokalisiert in den distalen und subdistalen Fortsätzen des murenen Centrosoms (Nakagawa et al., 2001).

Verändert nach Doxsey, 2001

Die mögliche Funktion der subdistalen Anhängsel besteht in der Positionierung der Interphase-Mikrotubuli um das mature Centriol (De Brabander et al., 1982; Gorgidze und Vorobjev, 1995; Piel et al., 2000; Ishikawa et al., 2005).

Die Experimente zur Proliferation in dieser Studie haben gezeigt, dass das ODF2-Protein offenbar in den Prozessen des Zellzyklusverlaufs involviert ist und einen anti-proliferativen Effekt auf somatische Zellen ausübt. Diese Beobachtung könnte im Zusammenhang zur möglichen Funktion der subdistalen Anhängsel stehen, in dem das ODF2-Protein lokalisiert wurde (Nakagawa et al., 2001), die sich im Falle einer Überex-

<sup>11</sup> Vom Centrosom geht die Orientierung und Polymerisierung der Mikrotubuli *in vivo* aus (Pickett-Heaps, 1969)

pression des ODF2-Proteins negativ auf die Mechanismen der Mikrotubulipositionierung auswirkt und so eventuell den anti-proliferativen Effekt auf die COS-7-Zellen begründet. Bei der Mitose stehen sich zwei Centrosome mit ihren jeweiligen Centriolenpaaren gegenüber, die den mitotischen Spindelapparat strukturieren. Diese entsteht aus dem Zusammenwirken der Mikrotubuli mit den Komponenten des Zytoskeletts. Die Struktur des Centrosoms, die den Spannungen, resultierend aus den einwirkenden Zug- und Druckkräften während der Mitose, standhalten kann (siehe dazu auch Abal et al., 2005), sorgt für einen korrekten Ablauf bei der Zellteilung. Den Centriolen bei der Einwirkung dieser mechanischen Kräfte während der Mitose Stand und Stabilität zu geben könnte eine mögliche Funktion des ODF2 in somatischen Zellen sein. Überexprimiert könnte diese Eigenschaft, Stabilisierung und Positionierung der centriolaren Strukturen, in der PCM überpointiert sein, sodass die flexiblen Komponenten, die auch die Zug- und Druckkräfte modellieren, zum Erstarren kommen und die Zelle sich nicht mehr teilt und somit den anti-proliferativen Effekt auf die somatische Zellen erklären könnte.

#### **4.6.2 Überexpression von ODF2 in Säugerzellen führt möglicherweise zu einer fehlenden Trennung der Centrosomen**

Die in dieser Arbeit beobachteten dispersen zytoplasmatischen und subzellulären Strukturen in ODF2-überexprimierenden Zellen im Falle des ODF2-NC-GFP- Fusionsproteins, die den gesamten Bereich des testikulären *Odf2-Gens* kodiert (2.2.1), lokalisierten und assoziierten zu zwei Paaren nahe am Zellkern (3.6.3). Diese Anordnung zeigte eine strenge Symmetrie. Das eine Paar stand sich parallel gegenüber und das zweite Paar ordnete sich ebenfalls jeweils gegenüberliegend, orthogonal zum ersten Paar an. Diese subzellulären Strukturen zeigten fibrilläre Ausläufer (Abbildung 39).

Es könnte davon ausgegangen werden, dass bei der Duplikation des Centrosoms bei Überexpression von ODF2 Fehler auftraten. Normalerweise besitzen die Zellen in der G1-Phase ein Centrosom mit zwei parentalen Centriolen (1.2.1; Abbildung 3). Bei dem Übergang von der G1- zur S-Phase trennen sich die parentalen Centriolen von einander, das eine wandert entlang der Mikrotubuli an den gegenüber liegenden Pol der Zelle. Seitlich aus der ursprünglichen Centriole wachsen die Procentriolen. Die Centrosomen duplizieren während der S-Phase. Vorstellbar ist nun, dass die Centriolen sich zwar noch voneinander trennten, aber die Wanderung zum gegenüber liegenden Pol der Zelle seitens einer der Centriolen nicht vollständig stattfand. Sie verblieben noch nahe beieinander assoziiert und duplizierten, dabei bildeten sie die beobachtete strenge Symmetrie aus. Diese Struktur persistierte in der Zelle und war unfähig sich voneinander zu lösen (3.6.3). Folge war, die Zelle ging nicht in die Mitose, die Zelle teilte sich nicht und im Zellzyklusverlauf „verschwand“ die G2-Phase (3.5.1) und die Zellen zeigten Apoptose ähnliche Charakteristika (3.6.3).

#### **4.7 ODF2 übt einen anti-proliferativen Effekt aus und induziert dabei Apoptose ähnliche Strukturen in HeLa-Zellen**

In einem deskriptiven Experiment wurde die Proliferationsrate von ODF2-GFP- überexprimierenden Säugerzellen mit COS-7-Kontrollzellen verglichen (3.5). Da Unterschiede in der Zahl der Ausgangszellen (Gründerpopulationseffekt) einen Einfluss auf die Pro-

liferationsrate haben könnte und das Experiment vergleichbar sein sollte, wurden die Kontrollzellen beim Start des Experiments mit der gleichen Zellzahl wie die jeweilige Probe eingesetzt. Das Medium über den Zellen wurde alle zwei Tage gewechselt, um eventuelle von den Zellen in das Medium abgegebene toxische Komponenten zu verwerfen, und somit eine Auswirkung auf die Proliferation ausschließen zu können.

Da das N-terminale NC2-Konstrukt ohne Leucin-Zipper-Motiv und das C-terminale N2C-Konstrukt mit den beiden Leucin-Zipper-Motiven die stärksten Effekte auf die Proliferation der COS-7-Zellen zeigten, kann der Effekt nicht auf die Anwesenheit oder Abwesenheit der Leucin-Zipper-Motive zurückgeführt werden (3.5).

Die Ergebnisse zeigten, dass die anti-proliferative Wirkung des ODF2-Proteins auf die kultivierten COS-7-Zellen möglicherweise auf die intrinsische *coiled-coil* Struktur des Proteins zurückgeführt werden kann.

Das Protein des AS3 Gens, das neben anderen Domänen ein *coiled-coil* Motiv und ein Leucin-Zipper besitzt, wurde als möglicher Kandidat bei der Regulation der androgen-induzierten Proliferationsarrests bei humanen Prostatazellen identifiziert (Geck et al., 2000). Das Proteinprodukt des Transkriptionsfaktors E2F1, das möglicherweise als positiver Regulator für den Eintritt der Zellen in die S-Phase während der Mitose verantwortlich ist, wird von Prohibitin, bekannt als potentieller Tumorsupressor, reprimiert und arretiert so die Zellproliferation (Joshi et al., 2003). Joshi et al. (2003) konnten unter anderem auch zeigen, dass diese putative Bindungsdomäne des Prohibitins *coiled-coil* Strukturen aufweist und diese mit E2F1 interagieren. Diese Interaktion soll die transkriptionelle Aktivität des E2F1 blockieren und die beobachtete Reduktion der Zellpopulation um 64 % bei Transfektion von Prohibitin in Zellkulturen erklären.

Diese Beispiele implizieren, dass einige Proteine offenbar allein aufgrund ihrer *coiled-coil* Struktur einen Einfluss auf die Proliferation nehmen. Syntetisch hergestellte Agentien, die die Peptidstruktur des ODF2-Proteins mit seiner *coiled-coil* Ausprägung besitzen, könnten möglicherweise in klinischen Studien eingesetzt werden und zur Regulierung von neoplastischen Zellen dienen.

Die Mikroskopie, unter Einsatz von Vitalfarbstoffen und fluoreszierenden Fusionsproteinen zur Visualisierung und Lokalisation der Organisationsstrukturen innerhalb der Zellkompartimente, vermittelt einen Eindruck in die Funktionsweise somatischer Zellen. Einen wesentlichen Einblick in die Dynamik der Zellprozesse bieten die mikroskopischen Lebendzellaufnahmen und die Durchflusszytometrie zur Analyse und Definition der Zellzyklusverläufe. Die Auswirkungen des anti-proliferativen Effekts auf die Zellen wurden in den Experimenten zu den mikroskopischen Lebendzellaufnahmen untersucht (3.6).

Die Versuchsbedingungen wurden in einem Vorversuch überprüft und es konnte eine in der Literatur beschriebene Zellzyklusdauer der HeLa-Zellen reproduziert werden (3.6.2). Der Beobachtungszeitraum der *Odf2*-NC-transfizierten Zellen betrug 20-21 h. In diesem Zeitraum konnte keine Zellteilung dokumentiert werden; die Zellen zeigten ein charakteristisches Bild apoptotischer Zellen. Der Beobachtungszeitraum wurde daraufhin in einem weiteren Experiment, bei gleichzeitiger Visualisierung des Chromatins über eine Hoechst Färbung, auf nahezu zwei Tage erweitert. Die Zellen teilten sich nicht, das Fusionsprotein persistierte in den beschriebenen subzellulären Strukturen. Die Zelle begann im Verlauf der Beobachtung sich abzurunden, schnürte dann aber nach geraumer Zeit

Vesikel ab und ging zur Zellschrumpfung über, das Fluoreszenzsignal wurde schwächer. Die Zellen waren unfähig, nach 45 h in die Mitosephase überzugehen und gelangten in die Apoptose (3.6.3; Video 3). Ermittelt wurde, aus welcher Phase des Zellzyklus der Eintritt in die Apoptose erfolgte. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte die Zellzyklusverteilung nachvollzogen werden, der Zellpopulation fehlte nach 48 h die G2-Phase. Dieses Ergebnis stützt die bei den Lebendzellaufnahmen ermittelten Daten und bildet damit auch eine mögliche Erklärung für den anti-proliferativen Effekt, den das ODF2-Protein auf die Säugerzellen ausübt und belegt den Eintritt in die Apoptose nach der S-Phase.

Außergewöhnlich war das bei den Lebendzellaufnahmen beobachtete Persistieren des Fusionsproteins in den subzellulären Körperchen, die auffällig symmetrisch formiert nahe am Zellkern lokalisierten. Spekulativ könnten diese Strukturen als Centrosomen gedeutet werden, die sich bei den Prozessen der Centrosomduplikation nicht vollständig räumlich getrennt hatten, sich jeweils duplizierten und nun mit zwei Paaren in einer Zelle existierten. Die Wanderung der Centriole ist Mikrotubuli-abhängig, die Centriole gelangt über dieses Netzwerk an den gegenüber liegenden Pol der Zelle.

Bei der Überexpression der Dynamitin-Untereinheit, wodurch die Dynaktin Funktion unterbunden wurde (Echiverri et al., 1996; 3.4), zeigte sich, dass das ODF2-Protein in diesen Prozessen des Proteintransportes involviert war. Die subzellulären Körperchen, diese auffälligen immer wiederkehrenden Strukturen, fehlten nun, d.h. bei Unterbrechen des minus-Ende gerichteten Transports könnten die vom ODF2-Protein generierten subzellulären Körperchen nicht in die Nähe des Centrosoms gelangen und würden eventuell bei der korrekten Trennung der Centriolen im Zellzyklusverlauf nicht interferieren.

Das Fusionsprotein könnte als Folge der Überexpression oder der intrinsischen Proteinstruktur in aggresomalen Strukturen in den Zellen abgelegt werden und dort akkumulieren. Die Folge wäre eventuell ein Fehlen des ODF2-Proteins bei den mitotischen zellulären Prozessen, und dies könnte zu den beobachteten Ausprägungen geführt haben. Den *Odf2*-transfizierten Zellen wäre es nicht möglich, einen normalen Zellzyklusverlauf zu prozessieren.

Ishikawa et al. (2005) haben in ihren Studien zur physiologischen Funktion der centriolären Anhängsel, Deletionen beider Allele des *Odf2*-Gens in Maus-F9-Zellen über eine homologe Rekombination generiert, um darüber die Expression des *Odf2*-Genproduktes zu reprimieren. Der ODF2-Protein defiziente Zustand in somatischen führte zu einem Fehlen der distalen/subdistalen Anhängsel der Centriolen. Sie beobachteten bei den *Odf2*-defizienten Zellpopulationen keine Änderungen im Zellzyklusverlauf und keine signifikanten Unterschiede im Zellwachstum im Vergleich zu den in der Studie verwendeten Kontrollzellen. Ein Fazit ihrer Untersuchungen ist, dass das ODF2-Protein keine Funktion bei den centriolären Zellzyklusprozessen einnimmt.

Der überexprimierte, im Gegensatz zum defizienten Zustand (Ishikawa et al., 2005) wirkt auf die Prozesse der Zellproliferation so, dass das Zellwachstum zum Erliegen kommt und die Zellen in die Apoptose geführt werden (3.6.3).

Eine Konzentration des Fusionsproteins in Aggresomen und ein dadurch resultierendes Fehlen des Proteins kann nicht der Grund für die dokumentierten Beobachtungen sein und wird nicht als mögliche Erklärung herangezogen.

Das ODF2-Fusionsprotein zeigte in den durchgeführten Experimenten im Durchflusszytometer zur Analyse des Zellzyklusverlaufs ein Fehlen des G2-Peaks bei gleicher

DNS-Menge im Vergleich zu den Kontrollzellen (3.5.1). Nun zeigen bei Auftreten von Apoptose asynchrone Zellen als Folge der DNS-Fragmentierung eine Abnahme des DNS-Gehalts im Vergleich zu nicht-apoptotischen Zellen. Diese Zellen sind in der Regel aus der G0/G1-Phase in die Apoptose übergegangen. Gehen nun Zellen, wie die hier analysierten Zellen, aus der G2- bzw. S-Phase in die Apoptose über, so können bei Bestimmung des DNS-Gehalts keine signifikanten Reduktionen der DNS-Menge im Vergleich zu den Kontrollzellen detektiert werden.

Die zugewiesene Rolle des testikulären zytoskelettalen ODF2-Proteins in somatischen Zellen könnte es sein, bei der Wanderung der Centriolen entlang der Mikrotubuli Einfluss zu nehmen; dies könnte Dynein-abhängig als auch -unabhängig realisiert werden. Das ODF2-Protein ist möglicherweise bei den Mechanismen der centriolaren Zellzyklusprozesse involviert und kann im überexprimierten Zustand die Zellen aus der G2-Phase in Apoptose ähnliche Zustände überführen.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwieweit dem testikulären ODF2-Protein in der zellulären Organisation der somatischen Zelle eine Bedeutung zukommt. Dazu sollten auch Wechselwirkungspartner identifiziert werden, die eventuell dabei involviert sind. Bei der Identifikation von Wechselwirkungspartnern des ODF2-Proteins wurden in einem *Yeast-two-hybrid* Screen putative Interaktionspartner beim Proteintransport, Mikrotubulibindungspartner und putative Interaktionspartner bei apoptotischen Prozessen gefunden. Der ausgewiesene ODF2-Interaktionspartner ODF1 (Shao et al., 1997) wurde hier in zellulären immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen in centrosomalen Strukturen lokalisiert. Kotransfektions Experimente mit *Odf2* und *Odf1* in somatischen Zellen zeigen, dass die koexprimierten Proteine im Zytoplasma ein fibrilläres molekulares Proteinnetzwerk generieren.

Immunzytologische Analysen an ODF2- und Dynamitin-überexprimierenden Zellen lieferten den Hinweis darauf, dass das ODF2-Protein bei Dynein-abhängigen Proteintransportwegen involviert ist.

Indirekte zelluläre Immunfluoreszenzexperimente belegen, dass das ODF2-Protein Assoziationen mit dem Golgi-Apparat und dem ER eingeht. Im C-terminalen Abschnitt des testikulären ODF2-Proteins konnte eine mögliche Organellen-bindende Region eingegrenzt werden. Zur Analyse intrazellulärer Proteintransporte wurden zeitlich unterschiedliche Brefeldin A Inkubationen an ODF2-überexprimierenden Zellen durchgeführt. Es wurde ähnliche aber nicht identische Ergebnisse reproduziert. Eine Kurzzeit Inkubation mit BFA zeigte unterschiede in der Auswirkung zur Langzeit Einwirkung.

ODF2-überexprimierende HeLa-Zellen zeigten einen signifikanten anti-proliferativen Effekt. Durchflusszytometrische Experimente an ODF2-überexprimierenden Zellen dokumentierten einen "Verlust" der G2-Phase im Zellzyklusverlauf. Mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Lebendzellaufnahmen an ODF2-überexprimierenden Zellen konnte visualisiert werden, dass bei Überexpression von ODF2 in HeLa-Zellen diese in für Apoptose charakteristische Strukturen übergehen.

Die hier gewonnenen Daten legen die Vermutung nahe, dass das testikuläre ODF2-Protein in somatischen Zellen möglicherweise beim G2/M Phasenübergang während des Zellzyklusprozesses eine Rolle zukommt und in centriolare Prozesse involviert ist.

## 6 Abstract

Outer dense fibre 2 was initially identified as a main component of the sperm tail cytoskeleton and was shown as a self-interacting centrosomal protein in somatic cells with affinity for microtubules.

ODF2 has different localization in somatic versus male germ cells suggesting the possibility of different function. It was an aim to understand how the testicular protein ODF2 is involved in the cellular organisation of somatic cells and at the same time to identify putative interaction partners which eventually take part in this process.

A yeast two hybrid screen enabled to identify putative ODF2-interaction partners which are expected to be involved in protein transport, microtubuli binding and apoptotic processes. The known ODF2-interactive partner ODF1 (Shao et al., 1997) co-localized in somatic cells with centrosomal structures. *Odf2/Odf1* cellular co-transfection experiments demonstrate a fibrillar molecular protein network generated by ODF1-ODF2 interaction event. ODF2 and dynamitin-overexpressing cells indicated an involvement of ODF2 in dynein-dependent protein assembly.

ODF2 associated in somatic cells with the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. Immunocytochemistry experiments with truncated ODF2-GFP fusion proteins suggested that the C terminal domain of ODF2 is thereby involved in binding to these specific organelles. Time series incubation of cells in culture with Brefeldin A (BFA) to analyse intracellular protein transport on ODF2 overexpressing cells were performed. Cells lead to similar but not identical results. Thus, the effects of short-term treatment with BFA was different from those of long-term treatment.

Proliferation assays and flow cytometry analyses demonstrated that ODF2 overexpressing cells lead to a significant decrease of proliferation by "losing" the G2-phase in cell-cycle processes. Life-cell-imaging of ODF2 overexpressing cells visualized morphological characteristics of apoptosis. The data suggest a potential invariant factor of ODF2 in cell-cycle progressing during G2/M transition and seems to be indispensable for cell-cycle-related centriolar functions.

## 7 Literatur- und Internetverzeichnis

### 7.1 Literaturverzeichnis

Abal M, Keryer G, Bornens M (2005) Centrioles resist forces applied on centrosomes during G2/M transition. *Biol Cell*, **97**(6):425-434.

Akhmanova A, Mausset-Bonnefont AL, van Cappellen W, Keijzer N, Hoogenraad CC, Stepanova T, Drabek K, van der Wees J, Mommaas M, Onderwater J, van der Meulen H, Tanenbaum ME, Medema RH, Hoogerbrugge J, Vreeburg J, Uringa EJ, Grootegoed JA, Grosveld F, Galjart N (2005) The microtubule plus-end-tracking protein CLIP-170 associates with the spermatid manchette and is essential for spermatogenesis. *Genes Dev*, **19**(20):2501-2515.

Allan VJ, Thompson HM and McNicen MA (2002) Motoring around the Golgi. *Nat Cell Biol*, **4**:E236-E242.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (2001) Grapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res*, **25**:3389-3402.

Alvarez C, Sztul ES (1999) Brefeldin A (BFA) disrupts the organization of the microtubule and the actin cytoskeletons. *Eur J Cell Biol*, **1**:1-14.

Asai DJ (1995) Multi-dynein hypothesis. *Cell Motil Cytoskeleton*, **2**:129-132.

Askham JM, Vaughan KT, Goodson HV and Morrison EE. (2002) Evidence that an interaction between EB1 and p150<sup>Glued</sup> is required for the formation and maintenance of a radial microtubule array anchored at the centrosome. *Mol Biol Cell*, **13**, 3627-3645.

Aumuller G, Seitz J (1988) Immunocytochemical localization of actin and tubulin in rat testis and spermatozoa. *Histochemistry*, **89**(3):261-267.

Baccetti B, Pallini V und Buuini AG (1973) The accessory fibers of the sperm tail. 1 Structure and chemical composition of the bull "Coarse fibers". *J Submicrose Cytol*, **5**:237-256.

Balducci E, Horiba K, Usuki J, Park M, Ferrans VJ, Moss J (1999) Selective expression of RT6 superfamily in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **21**(3):337-346.

Baker TG (1984) Primordial germ cells. *Reprod.Mammals 1: Germ Cells and Fertilisation. Cambridge University Press, Cambridge*, 1-13.

Bateman A, Birney E, Cerruti L, Durbin R, Etwiller L, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Howe KL, Marshall M and. Sonnhammer ELL (2002) The Pfam Protein Families Database *Nucleic Acids Research*, **30** (1) 276-280

- Bhullar B, Zhang Y, Junco A, Oko R and Frans A. van der Hoorn (2003) Association of Kinesin Light Chain with Outer Dense Fibers in a Microtubule-independent Fashion. *JBC Papers in Press*, DOI 10.1074/jbc.M213126200
- Blagden SP, Glover DM (2003) Polar expeditions provisioning the centrosome for mitosis. *Nat Cell Biol*, **5**(6):505-511.
- Bornberg-Bauer E, Rivals E, Vingron, M (1998) Computational Approaches to Identify Leucine Zippers. *Nucleic Acids Res*, **26**(11):2740-2746.
- Bornens M (2002) Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol*, **14**: 25-34
- Bresnick AR (1999) Molecular mechanism of nonmuscle myosin II regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **11**:26-33.
- Brady ST, Pfister KK (1991) Kinesin interactions with membrane bounded organelles in vivo and in vitro. *J Cell Sci Suppl*, **14**:103-108.
- Braun RE, Behringer RR, Peschon JJ, Brinster, RL und Palmiter RD (1989) Genetical haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature*, **337**:373-376.
- Brockhoff G (2004) DNA und Proliferationsmessungen in der Durchfluss-zytometrie. In: Angewandte Zytometrie. Sack U, Rothe G, Tarnok A (Hrsg.). In Druck.
- Brohmann H, Pinnecke S, Hoyer-Fender S (1997) Identification and characterisation of new cDNAs encoding outer dense fiber proteins of rat sperm. *J Biol Chem*, **272**:10327-10332.
- Brooks JE (1987) Properties and uses of restriction endonucleases. *Methods Enzymol*, **152**:113-129.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**(6):1513-1523.
- Burfeind P (1992) Charakterisierung von cDNA und Gen für ein "Outer Dense Fiber"-Protein in männlichen Keimzellen der Säuger. Dissertation, Göttingen.
- Burfeind P, Belgardt B, Szpirer C und Hoyer-Fender S (1993) Structure and chromosomal assignment of a gene encoding the major protein of rat sperm outer dense fibers. *Eur J Biochem*, **216**:497-505.
- Burfeind P, Hoyer-Fender S (1991) Sequence and developmental expression of mRNA encoding a putative protein of rat sperm outer dense fibers. *Dev Biol*, **148**:195-204.
- Burkhardt JK, Echeverri CJ, Nilsson T, and Vallee RB (1997) Overexpression of the Dynamitin (p50) Subunit of the Dynactin Complex Disrupts Dynein-dependent Maintenance of Membrane Organelle Distribution. *J Cell Biol*, **139**(2):469-484.
- Burmester S, Hoyer-Fender S (1996) Transcription and translation of the outer dense fiber gene (Odf1) during spermiogenesis in the rat. A study by in situ analysis and poly-some fractionation. *Mol Reprod Dev*, **45**:10-20.

C Queiroz DB, da Silva AM, Gutierrez-Ospina G, Porto CS, Grossman G, Petrusz P, Avellar MC (2006) Cells positive for microtubule-associated protein 1B (MAP 1B) are present along rat and human efferent ductules and epididymis. *Cell Tissue Res.* Mar 16; [Epub ahead of print]

Centonze VE, Borisy GG (1990) Nucleation of microtubules from mitotic centrosomes is modulated by a phosphorylated epitope. *J Cell Sci*, **95**:405-411.

Chang MS, Huang CJ, Chen ML, Chen ST, Fan CC, Chu JM, Lin WC, Yang YC (2001) Cloning and characterization of hMAP126, a new member of mitotic spindle-associated proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **287**(1):116-121.

Chen L, Liao G, Fujimoro M, Semmes OJ und Hayward SD (2001) Properties of two ebv mta nuclear export signal sequences. *Virology*, **288**:119-128.

Chi NC, Adam EJ und Adam SA (1995) Sequence and characterization of cytoplasmic nuclear protein import factor p97. *J Cell Biol*, **130**:265-274.

Chou YH, Skalli O und Goldman RD (1997) Intermediate filaments and cytoplasmic networking: new connections and more functions. *Curr Opin Cell Biol*, **9**:49-53.

Chun AC, Zhou Y, Wong CM, Kung HF, Jeang KT, Jin DY (2000) Coiled-coil motif as a structural basis for the interaction of HTLV type 1 Tax with cellular cofactors. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **16**(16):1689-1694.

Clark IB and Meyer DI (1999) Overexpression of normal and mutant Arp1alpha (centractin) differentially affects microtubule organization during mitosis and interphase. *J Cell Sci*, **112**: 3507-3518.

Clermont Y, Oko R, and Hermo L (1993) Cell biology of mammalian spermiogenesis. In: Cell and Molecular Biology of the Testis, Desjardins C and Ewing L (eds.), New York: Oxford University Press, 332–376.

Coleman AW, Maguire MJ and JR Coleman (1981) Mithramycin- and 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-DNA staining for fluorescence microspectrophotometric measurement of DNA in nuclei, plastids, and virus particles. *The Histomechical Society*, **29**(8):959-968.

Contegno F, Cioce M, Pelicci PG, Minucci S (2002) Targeting protein inactivation through an oligomerization chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**(4):1865-1869.

Correa LM und Miller MG (2001) Microtubule depolymerization in rat seminiferous epithelium is associated with diminished tyrosination of alpha-tubulin. *Biol Reprod*, **64**:1644-1652.

Coulombre PA und Omary BM (2002) „Hard“ and „Soft“ principles defining the structure, function, and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol*, **14**:110-122.

Courot M, Hocherea-de Reviers MT und Ortavant R (1970) Spermatogenesis. In : The Testis I (Johnson WR, Vandemark NL, ed.), *Development, Anatomy and Physiology*, Academic Press, New York.

- Dawid IB und Blackler AW (1972) Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondrial DNA in *Xenopus*. *Dev Biol*, **29**:152-161.
- De Brabander M, Geuens G, Nuydens R, Willebrords R and de Mey J (1982) Microtubule stability and assembly in living cells: the influence of metabolic inhibitors, Taxol and pH. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, **46**: 227-240
- De Graffenried CL, Bertozzi CR (2004) The roles of enzyme localisation and complex formation in glycan assembly within the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol*, **4**:356-363.
- Debold CR, Connor TB, Bird RE und Orth DN (1983) Formation in vitro of sperm pronuclei and mitotic chromosomes induced by amphibian ooplasmic components. *Science*, **220**:719-723.
- Delgehyr N, Sillibourne J, Bornens M (2005) Microtubule nucleation and anchoring at the centrosome are independent processes linked by ninein function. *J Cell Sci*, **118**:1565-1575.
- Dell KR (2003) Dynactin polices two-way organelle traffic. *J Cell Biol*, **160**(3):291-293.
- Desai A, Mitchison TJ (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**:83-117.
- Ding M, Feng Y und Vandre DD (1997) Partial characterization of the MPM-2 phosphoepitope. *Exp Cell Res*, **231**:3-13.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, and Mattick JS (1991) "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res*, **19**: 4008.
- Donkor FF (2001) Mutagenese von ODF1 und ODF2. Funktionelle Analyse der Proteindomänen und ihre Assoziation mit dem Zytoskelett. Diplomarbeit, Göttingen
- Donkor FF, Mönnich M, Czirr E, Hollemann T, Hoyer-Fender S (2004) Outer dense fibre protein 2 (ODF2) is a self-interacting centrosomal protein with affinity for microtubules. *J Cell Sci*, **117**:4643-51.
- Doxsey S (1998) The centrosome - a tiny organelle with big potential. *Nat Genet*, **20**: 104-106.
- Doxsey S (2001) Re-evaluating centrosome function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**:688-698.
- Dreier L and Rapoport TA (2000) In vitro formation of the endoplasmic reticulum occurs independently of microtubules by a controlled fusion reaction. *J Cell Biol*, **148**: 883-898
- Dym M (1994) Spermatogonial stem cells of the testis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**:11287-11289.
- Dym M, Fawcett DW (1971) Further observations on the number of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol Reprod*, **4**:195-215.

- Echeverri CJ, Paschal BM, Vaughan KT, and Vallee RB (1996) Molecular Characterization of the 50-kD Subunit of Dynactin Reveals Function for the Complex in Chromosome Alignment and Spindle Organization during Mitosis. *J Cell Biol*, **132**(4):617-633.
- Evanko SP, Parks WT, Wight TN (2004) Intracellular hyaluronan in arterial smooth muscle cells: association with microtubules, RHAMM, and the mitotic spindle. *J Histochem Cytochem*, **52**(12):1525-35.
- Evans L, Mitchison T, Kirschner M (1985) Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *J Cell Biol*, **100**:1185-1191.
- Fawcett DW (1954) The study of epithelial cilia and sperm flagella with the electron microscope. *Laryngoscope*, **64**(7):557-67.
- Fawcett DW (1975) The mammalian spermatozoon. *Dev Biol*, **44**(2):394-436.
- Félix MA, Antony C, Wright M und Maro B (1994) Centrosome assembly in vitro: role of  $\gamma$ -tubulin recruitment in *Xenopus* sperm aster formation. *J Cell Biol*, **124**:19-31.
- Field C, Li R und Oegema K (1999) Cytokinesis in eukaryotes: mechanistic comparison. *Curr Opin Cell Biol*, **11**:68-80.
- Fields S, Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**(6230):245-6.
- Fitzgerald CJ, Oko RJ, van der Hoorn FA (2005) Rat Spag5 associates in somatic cells with endoplasmic reticulum and microtubules but in spermatozoa with outer dense fibers. *Mol Reprod Dev*, **73**(1):92-100.
- Flickinger CJ, Rao J, Bush LA, Sherman NE, Oko RJ, Jayes FC und Herr JC (2001) Outer dense fiber proteins are dominant postobstruction autoantigens in adult Lewis rats. *Biol Reprod*, **64**:1451-1459.
- Fontaine JM, Rest JS, Welsh MJ, Benndorf R (2003) The sperm outer dense fiber protein is the 10th member of the superfamily of mammalian small stress proteins. *Cell Stress Chaperones*, **8**(1):62-9.
- Fouquet JP, Kann ML, Combeau C, Melki R (1998) Gamma-tubulin during the differentiation of spermatozoa in various mammals and man. *Mol Hum Repro*, **4**(12):1122-9.
- Fouquet JP, Kann ML, Souès S and Melki R (2000) ARP1 in Golgi organisation and attachment of manchette microtubules to the nucleus during mammalian spermatogenesis. *Journal of Cell Science*, **113**:877-886.
- Fuchs E and Cleveland DW (1998) A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science*, **279**:514-519.
- Fuchs E, Weber K (1994) Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Ann Rev Biochem*, **63**:345-382.

- Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y (1988) Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **263**(34):18545-52.
- Garcia-Mata R, Bebok Z, Sorscher EJ, Sztul ES (1999) Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol*, **146**(6):1239-54.
- Gastmann O, Burfeind P, Gunther E, Hameister H, Szpirer C, Hoyer-Fender S (1993) Sequence, expression, and chromosomal assignment of a human sperm outer dense fiber gene. *Mol Reprod*, **36**(4):407-18.
- Geck P, Maffini MV, Szelei J, Sonnenschein C, Soto AM (2000) Androgen-induced proliferative quiescence in prostate cancer cells: the role of AS3 as its mediator. *Proc Natl Acad Sci*, **97**(18):10185-90.
- Geck P, Szelei J, Jimenez J, Sonnenschein C, Soto AM (1999) Early gene expression during androgen-induced inhibition of proliferation of prostate cancer cells: a new suppressor candidate on chromosome 13, in the BRCA2-Rb1 locus. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **68**(1-2):41-50.
- Genzlinger A (1999) Apoptosebestimmung mittels 2-Parameter-Durchfluss-zytometrie, Agarose-Gelelektrophorese und Fluoreszenzmikroskopie nach Induktion durch alpha, beta-ungesättigte Aldehyde und Ketone, Dissertation des FB Biologie, Abt. Humanbiologie und Humangenetik, AG Zankl.
- Gergely F (2002) Centrosomal TACCtics. *Bioessays*, **24**(10):915-25.
- Gergely F, Karlsson C, Still I, Cowell J, Kilmartin J, Raff JW (2000) The TACC domain identifies a family of centrosomal proteins that can interact with microtubules. *Proc Natl Acad Sci*, **97**(26):14352-7.
- Gilbert SL, Pehrson JR, Sharp PA (2000) XIST RNA associates with specific regions of the inactive X chromatin. *J Biochem Chem*, **275**: 36491-36494
- Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC (1980) Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci*, **77**:6715-6719.
- Gorgidze LA and Vorobjev IA (1995) Centrosome and microtubules behavior in the cytoplasts. *J Submicrosc Cytol Pathol*, **27**:381-389.
- Gould RR, Borisy GG (1977) The pericentriolar material in Chinese hamster ovary cells nucleates microtubule formation. *J Cell Biol*, **73**:601-615.
- Green DP (1993) Mammalian fertilization as a biological machine: a working model for adhesion and fusion of sperm and oocyte. *Hum Reprod*, **8**(1):91-6.
- Gruber J, Harborth J, Schnabel J, Weber K, Hatzfeld M (2002) The mitotic-spindle-associated protein astrin is essential for progression through mitosis. *J Cell Sci*, **1**, 115(Pt 21):4053-9.
- Guo J, Yang Z, Song W, Chen Q, Wang F, Zhang Q, Zhu X (2005) Nudel contributes to microtubule anchoring at the mother centriole and is involved in both dynein-dependent and -independent centrosomal protein assembly. *Mol Biol Cell*, **17**(2):680-9.

- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**(4):557-80.
- Hatch V, Zhi G, Smith L, Stull JT, Craig R und Lehmann W (2001) Myosin light chain kinase binding to a unique site on F-actin revealed by three-dimensional image reconstruction. *J Cell Biol*, **154**:611-617.
- Hayano T, Kikuchi M (1995) Molecular cloning of the cDNA encoding a novel protein disulfide isomerase-related protein (PDIR). *FEBS Lett*, **372**(2-3):210-4.
- Heidemann SR und McIntosh JR (1980) Visualisation of the structural polarity of microtubules. *Nature*, **286**:517-519.
- Hinsch KD, Asmarinah, Hinsch E, Konrad L (2001) VDAC2 (porin-2) expression pattern and localization in the bovine testis. *Biochim Biophys Acta*, **1518**(3):329-33.
- Hinsch KD, De Pinto V, Aires VA, Schneider X, Messina A, Hinsch E (2004) Voltage-dependent anion-selective channels VDAC2 and VDAC3 are abundant proteins in bovine outer dense fibers, a cytoskeletal component of the sperm flagellum. *J Biol Chem*, **279**(15):15281-8.
- Hirose H, Arasaki K, Dohmae N, Takio K, Hatsuzawa K, Nagahama M, Tani K, Yamamoto A, Tohyama M, Tagaya M (2004) Implication of ZW10 in membrane trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi. *EMBO J*, **23**(6):1267-78.
- Higgy NA, Pastoor T, Renz C, Tarnasky HA, van der Hoorn FA (1994) Testis-specific RT7 protein localizes to the sperm tail and associates with itself. *Biol Reprod*, **50**:1357-1366.
- Hoyer-Fender S, Neesen J, Szpirer J, and Szpirer C (2003) Genomic organisation and chromosomal assignment of ODF2 (outer dense fiber 2), encoding the main component of sperm tail outer dense fibers and a centrosomal scaffold protein. *Cytogenet Genome Res*, **103**(1-2):122-127.
- Ikebe M, Komatsu S, Woodhead JL, Mabuchi K, Ikebe R, Saito J, Craig R und Higashihara M (2001) The tip of the coiled-coil rod determines the filament formation of smooth muscle and non-muscle myosin. *J Biol Chem*, **276**:30293-30300.
- Ishikawa H, Kubo A, Tsukita S, Tsukita S (2005) Odf2-deficient mother centrioles lack distal/subdistal appendages and the ability to generate primary cilia. *Nat Cell Biol*, **5**:517-24. Epub 2005 Apr 24.
- Jiaping X, Tarnasky HA, Rancourt DE, and van der Hoorn FA (2002) Targeted Disruption of the Testicular SPAG5/Deepest Protein Does Not Affect Spermatogenesis or Fertility. *Molecular and Cellular Biology*, **22** (7):1993–1997.
- Johnston JA, Ward CL, Kopito RR (1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*, **143**(7):1883-1898.
- Joshi B, Ko D, Ordonez-Ercan D, Chellappan SP (2003) A putative coiled-coil domain of prohibitin is sufficient to repress E2F1-mediated transcription and induce apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **312**(2):459-466.

- Kalt A, Schliwa M (1993) Molecular components of the centrosome. *Trends Cell*, **3**:118-128.
- Kellogg DR, Field CM, Alberts BM (1989) Identification of microtubule-associated proteins in the centrosome, spindle, and kinetochore of the early *Drosophila* embryo. *J Cell Biol*, **6**:2977-2991.
- Kennedy C, Sebire K, de Kretser DM, O'Bryan MK (2004) Human sperm associated antigen 4 (SPAG4) is a potential cancer marker. *Cell Tissue Res*, **315**(2):279-283.
- Khodjakov A and Rieder CL (1999) The sudden recruitment of gamma-tubulin to the centrosome at the onset of mitosis and its dynamic exchange throughout the cell cycle, do not require microtubules. *J Cell Biol*, **146**:585-596.
- Kierszenbaum AL (2001) Spermatid manchette: plugging proteins to zero into the sperm tail. *Mol Reprod Dev*, **59**:347-349.
- Kierszenbaum AL (2002) Keratins: unraveling the coordinated construction of scaffolds in spermatogenic cells. *Mol Reprod Dev*, **61**(1):1-2.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Fefer-Sadler S, Mertz JR, Tres LL (1996) Purification, partial characterization, and localization of Sak57, an acidic intermediate filament keratin present in rat spermatocytes, spermatids, and sperm. *Mol Reprod Dev*, **44**(3):382-94.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL (2003) The actin-based motor myosin Va is a component of the acroplaxome, an acrosome-nuclear envelope junctional plate, and of manchette-associated vesicles. *Cytogenet Genome Res*, **103**(3-4):337-44.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, and Tres LL (2004) Acroplaxome, an F-Actin–Keratin-containing Plate, Anchors the Acrosome to the Nucleus during Shaping of the Spermatid Head. *Molecular Biology of the Cell*, **14**:4628–4640.
- Kierszenbaum AL, Tres LL (2002) Bypassing natural sperm selection during fertilization: the *azh* mutant offspring experience and the alternative of spermiogenesis in vitro. *Mol Cell Endocrinol*, **187**(1-2):133-8.
- Kierszenbaum AL, Tres LL, Rivkin E, Kang-Decker N and van Deursen J M (2004) A The acroplaxome is the docking site of Golgi-derived myosin Va/Rab27a/b–containing proacrosomal vesicles in wild-type and *Hrb* mutant mouse spermatids. *Biology of Reproduction*, **70**:1400–1410.
- Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J (1992) Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol*, **116**(5):1071-80.
- Ko MK, Kay EP (1999) Hsp47-dependent and -independent intracellular trafficking of type I collagen in corneal endothelial cells. *Mol Vis*, **19**:5-17.
- Kochanski RS, Borisy GG (1990) Mode of centriole duplication and distribution. *J Cell Biol*, **110**(5):1599-605.
- Kramer H, Phistry M (1999) Genetic analysis of hook, a gene required for endocytic trafficking in *drosophila*. *Genetics*, **151**(2):675-84.

- Kull FJ, Endow SA (2002) Kinesin: switch I and II and the motor mechanisms. *J Cell Sci*, **115**: 15-23.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(5259):680-5.
- Lalli M, Clermont Y (1981) Structural changes of the head components of the rat spermatid during late spermiogenesis. *Am J Anat*, **160**: 419-434.
- Lange BM (2002) Integration of the centrosome cycle control, stress response and signal transduction pathways. *Curr Opin Cell Biol*, **14**:35-43.
- Lange BM, Gull K (1995) A molecular marker for centriole maturation in the mammalian cell cycle. *J Cell Biol*, **130**: 919-927.
- Leblond CP, Clermont Y (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci*, **4**:548-73
- Lee HK, Safieddine S, Petralia RS, Wenthold RJ (2002) Identification of a novel SNAP25 interacting protein (SIP30). *J Neurochem*, **81**(6):1338-47.
- Lemos CL, Sampaio P, Maiato H, Costa M, Omel'Yanchuk LV, Liberal V and Sunkel CE (2000) Mast, a conserved microtubule-associated protein required for bipolar mitotic spindle organization. *EMBO J*, **19**:3668-3682.
- Lengauer C, Kinzler KW und Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, **393**:643-649.
- Leung CL, Green KJ, Liem RK (2002) Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. *Trends Cell Biol*, **12**(1):37-45.
- Lever MA, Th'ng JP, Sun X und Hendzel MJ (2000) Rapid exchange of histone H1.1 on chromatin in living human cells. *Nature*, **408**:873-876.
- Ligon LA, Steward O (2000) Role of microtubules and actin filaments in the movement of mitochondria in the axons and dendrites of cultured hippocampal neurons. *J Comp Neurol*, **427**:351-361
- Lindmann CB (1996) Functional significance of the outer dense fibers of mammalian sperm examined by computer simulations with the geometric cluth model. *Cell Motil Cytoskeleton*, **34**:258-270.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky LS, Darnell J (2004) *Molecular Cell Biology Freeman and Company, New York, 5. Edition*
- Long CL, Duncan RP, Robl JM (1997) Isolation and characterization of MPM-2-reactive sperm proteins: homology to components of the outer dense fibers and segmented columns. *Biol Reprod*, **57**:246-254.
- Lu L, Tai G, Hong W (2004) Autoantigen Golgin97, an effector of Arl1 GTPase, participates in traffic from the endosome to the trans-golgi network. *Mol Biol Cell*, **15**(10):4426-43.

- Luiro K, Yliannala K, Ahtiainen L, Maunu H, Jarvela I, Kyttala A, Jalanko A (2004) Interconnections of CLN3, Hook1 and Rab proteins link Batten disease to defects in the endocytic pathway. *Hum Mol Genet*, **13**(23):3017-27.
- Lupas A (1996) Prediction and Analysis of Coiled-Coils Structures. *Meth Enzymology* **266**:513-525.
- Lupas A, van Dyke M, Stock J (1991) Predicting Coiled Coils from Protein Sequences. *Science*, **252**:1162-1164.
- Mack GJ, Compton DA (2001) Analysis of mitotic microtubule-associated proteins using mass spectrometry identifies astrin, a spindle-associated protein. *Proc Natl Acad Sci*, **98**(25):14434-9.
- Manandhar G, Simerly C, Salisbury JL, Schatten G (1999) Centriole and centrin degeneration during mouse spermiogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton*, **43**:137-144.
- Manandhar G, Simerly C, Schatten G (2000) Centrosome reduction during mammalian spermiogenesis. *Curr Top Dev Biol*, **49**:343-363.
- Manandhar G, Simerly C, Schatten G (2000) Highly degenerated distal centrioles in rhesus and human spermatozoa. *Hum Reprod*, **15**:256-263.
- Marushige K, Dixon GH (1969) Developmental changes in chromosomal composition and template activity during spermatogenesis in trout testis. *Dev Biol*, **19**:397-414.
- Matsumoto B. (Ed.) (1993) Cell biological application of confocal microscopy methods in cell Biology. *Academic Press*, San Diego.
- Maxwell CA, Keats JJ, Crainie M, Sun X, Yen T, Shibuya E, Hendzel M, Chan G, Pilarski LM (2003) RHAMM is a centrosomal protein that interacts with dynein and maintains spindle pole stability, *Mol Biol Cell*, **14**(6):2262-76.
- McNiven MA, Wang M and Porter KR (1984) Microtubule polarity and the direction of pigment transport reverse simultaneously in surgically severed melanophore arms. *Cell*, **37**:753-765.
- Mendoza-Lujambio I, Burfeind P, Dixkens C, Meinhardt A, Hoyer-Fender S, Engel W, Neesen J (2002) The Hook1 gene is non-functional in the abnormal spermatozoon head shape (azh) mutant mouse. *Hum Mol Genet*, **11**(14):1647-58.
- Mitchison T, Kirschnerl MW (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, **312**: 237-242.
- Mönnich M (2002) Untersuchungen zur Funktion des spermienchwanzproteins ODF2 (outer dense fiber 2) im Cytoskelett somatischer Zellen. Diplomarbeit, Göttingen.
- Morales CR, Oko R, Clermont Y (1994) Molecular cloning and developmental expression of an mRNA encoding the 27 kDa outer dense fiber protein of rat spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, **37**:229-240.
- Moritz M, Braunfeld MB, Sedat JW, Alberts B und Agard DA (1995) Microtubule nucleation by  $\gamma$ -tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature*, **378**:638-640.

- Mounier N, Arrigo AP (2002) Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress Chaperones*, **7**(2):167-76.
- Multigner L, Gagnon J, van Dorsselaer A und Job D (1992) Stabilization of sea urchin flagellar microtubules by histone H1. *Nature*, **360**:33-39.
- Murray AW und Kirschner MW (1989) Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature*, **3**:275-287.
- Nagata K (2003) HSP47 as a collagen-specific molecular chaperone: function and expression in normal mouse development. *Semin Cell Dev Biol*, **14**(5):275-82.
- Nakagawa Y, Yamane Y, Okanou T, Tsukita S und Tsukita S (2001) Outer dense fiber 2 is a widespread centrosome scaffold component preferentially associated with mother centrioles: Its identification from isolated centrosomes. *Mol Biol Cell*, **12**:1687-1697.
- Nakagomi T, Asai A, Kanemitsu H, Narita K, Kuchino Y, Tamura A und Kirino T (1996) Up-regulation of c-myc gene expression following focal ischemia in the rat brain. *Neurol Res*, **18**:559-563.
- Napolitano G, Mazzocco A, Fraldi A, Majello B, Lania L (2003) Functional inactivation of Cdk9 through oligomerization chain reaction. *Oncogene* **22**(31):4882-4888.
- Naz RK, Zhu X und Kadam AL (2001) Cloning and sequencing of cDNA encoding for a novel human testis-specific contraceptive vaccinogen: Role in immuno-contraception. *Mol Prod Dev*, **60**:116-127.
- Nicholl ID, Quinlan RA (1994) Chaperone activity of alpha-crystallins modulates intermediate filament assembly. *EMBO J*, **13**(4):945-53.
- Oakley CD, Oakley BR (1989) Identification of  $\gamma$ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature*, **338**:662-664.
- Ogawa K, Asai DJ, Brokaw CJ (1977) Properties of an antiserum against native dynein 1 from sea flagella. *J Cell Biol*, **73**:182-192.
- Oko R (1988) Comparative analysis of proteins from the fibrous sheath and outer dense fibers of rat spermatozoa. *Biol Reprod*, **39**(1):169-82.
- Oko R, Clermont Y (1988) Isolation, structure and protein composition of the perforatorium of rat spermatozoa. *Biol Reprod*, **39**(3):673-87.
- Olson GE, Sammons DW (1980) Structural chemistry of outer dense fibers of rat sperm. *Biol Reprod*, **22**(2):319-32.
- Ou Y und Rattner JB (2004) The centrosome in higher organisms: structure, composition, and duplication. *Int. Rev. Cytol*, **238**:119-182.
- Paintrand M, Moudjou M, Delacroix H und Bornens M (1992) Centrosome organization and centriole architecture: their sensitivity to divalent cations. *J. Struct. Biol.* **108**:107-128.

- Palazzo RE, Vaisberg EA, Weiss DG, Kuznetsov SA, Steffen W (1999) Dynein is required for spindle assembly in cytoplasmic extracts of *Spisula solidissima*. *J Cell Sci*, **112**, 1291–1302
- Parodi AJ (2000) Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem J*, **15**;348 Pt 1:1-13
- Pawley JB (2002) Limitations on optical sectioning in live-cell confocal microscopy. *Scanning*, **24**(5):241-6.
- Pelham HR (1991) Multiple targets for brefeldin A. *Cell*, **67**(3):449-51.
- Perez F, Diamantopoulos GS, Stalder R, Kreis TE (1999) CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell*, **19**:96(4):517-27.
- Petersen C (1999) Untersuchung zur molekularen Zusammensetzung der Mantelfasern, einer spermenschwanzspezifischen Struktur bei Säugetieren. *VFW Berlin*, 1. Auflage, ISBN 3-89700-211-6.
- Petersen C, Fuzesi L, Hoyer-Fender S (1999) Outer dense fibre proteins from human sperm tail: molecular cloning and expression analyses of two cDNA transcripts encoding proteins of approximately 70 kDa. *Mol Hum Reprod*, **5**(7):627-35.
- Phillips DM (1970) Insect sperm: their structure and morphogenesis. *J Cell Biol*, **44**:243-277.
- Pickett-Heaps JD (1969) The evolution of the mitotic apparatus: An attempt at comparative ultrastructural cytology in dividing plant cells. *Cytobios*, **3**:257-280.
- Piel M, Meyer P, Khodjakov A, Rieder CL and Bornens M (2000) The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *J Cell Biol*, **149**:317-330.
- Pinto-Correira C, Poccia DL, Chang T und Robl J (1994) Dephosphorylation of sperm midpiece antigens initiates aster formation in rabbit oocytes. *Proct Natl Acad Sci*, **91**:7894-7898.
- Piotrowska K und Zernicka-Goetz M (2001) Role for sperm in spatial patterning of the early mouse embryo. *Nature*, **409**:517-521.
- Povov AV, Pozniakowsky A, Arnal I, Antony C, Ashford AJ, Kinoshita K, Tournebize R, Hyman AA und Karsenti E (2001) XMAP215 regulates microtubule dynamics through two distinct domains. *EMBO J*, **20**:397-410.
- Quintyne NJ, Gill SR, Eckley DM, Crego CL, Compton DA and Schroer TA (1999) Dynein is required for microtubule anchoring at centrosomes. *J Cell Biol*, **147**:321-334.
- Raff JW (2002) Centrosomes and cancer: lessons from a TACC. *Trends Cell Biol*, **12**(5):222-5.
- Raff JW (2001) Centrosomes: Central no more? *Curr Biol*, **11**:R159-R161.

- Rieder CL (1982) The formation, structure, and composition of the mammalian kinetochore and kinetochore fiber. *Int Rev Cytol*, **79**:1-58.
- Ringel I, Horwitz SB (1987) Taxol is converted to 7-epitaxol, a biologically active isomer, in cell culture medium. *J Pharmacol Exp Ther*, **242**:692-698.
- Rothman JE, Orci L (1992) Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature*, **355**(6359):409-15.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230** (4732):1350-4.
- Sapiro R, Kostetskii I, Olds-Clarke P, Gerton GL, Radice GL, Strauss III JF (2002) Male infertility, impaired sperm motility, and hydrocephalus in mice deficient in sperm-associated antigen 6. *Mol Cell Biol*, **22**(17):6298-305.
- Sapiro R, Tarantino LM, Velazquez F, Kiriakidou M, Hecht NB, Bucan M, Strauss III JF (2000) Sperm Antigen 6 Is the Murine Homologue of the *Chlamydomonas reinhardtii* Central Apparatus Protein Encoded by the *PF16* Locus. *Biol Reprod*, **62**:511-518.
- Sawin KE, Mitchinson TJ (1991) Mitotic spindle assembly by two different pathways in vitro. *J Cell Biol*, **112**:925-939.
- Schafer DA, Gill SR, Cooper JA, Heuser JE und Schroer TA (1994) Ultrastructural analysis of the dynactin complex: an actin-related protein is a component of a filament that resembles F-actin. *J Cell Biol*, **126**:403-412.
- Schafer M, Borsch D, Hulster A, Schafer U (1993) Expression of a gene duplication encoding conserved sperm tail proteins is translationally regulated in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*, **13**(3):1708-18.
- Schalles U, Shao X, van der Hoorn FA und Oko R (1998) Developmental expression of the 84 kDa ODF sperm protein: Localization to both the cortex and medulla of outer dense fibers and to the connecting piece. *Dev Biol*, **199**:250-260.
- Schatten G (1994) The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Dev Biol*, **165**:299-335.
- Schmitz HD und Bereiter-Hahn J (2001) GFP associates with microfilaments in fixed cells. *Histochem Cell Biol*, **116**:89-94.
- Schneider T (2002) Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften aus Lagerlechfeld. Department Biologie II, Anthropologie und Humangenetik.
- Schrader M, Burkhardt J, Baumgart E, Lüers G, Spring H, Völkl A und Fahimi H (1996) Interaction of peroxisomes with microtubules. Tubular and spherical peroxisomes in HepG2 cells and their alterations induced by microtubule-active drugs. *Eur J Cell Biol*, **69**:24-35.
- Schroer TA (1996) Structure and function of dynactin. *Sem Cell Devel Biol*, **7**:321-328.

- Schroer TA, Sheetz MP (1991) Two activators of microtubule-based vesicle transport. *J Cell Biol*, **115**:1309–1318.
- Schuendeln MM, Piekorz RP, Wichmann C, Lee Y, McKinnon PJ, Boyd K, Takahashi Y, Ihle JN. (2004) The centrosomal, putative tumor suppressor protein TACC2 is dispensable for normal development, and deficiency does not lead to cancer. *Mol Cell Biol*, **24**(14):6403-9.
- Schultheiss R, Mandelkow E (1983) Three-dimensional reconstruction of tubulin sheets and re-investigation of microtubule surface lattice. *J Mol Biol*, **170**(2):471-96.
- Seman M, Adriouch S, Haag F, Koch-Nolte F (2004) Ecto-ADP-ribosyltransferases (ARTs): emerging actors in cell communication and signaling. *Curr Med Chem*, **7**:857-72.
- Shao X, Murthy S, Demetrick DJ, van der Hoorn FA (1998) Human outer dense fiber gene, ODF2, localizes to chromosome 9q34. *Cytogenet Cell Genet*, **83**(3-4):221-3.
- Shao X, Tarnasky HA, Lee JP, Oko R, and van der Hoorn FA (1999) Spag4, a novel sperm protein, binds outer dense-fiber protein Odf1 and localizes to microtubules of manchette and axoneme. *Dev Biol*, **211**:109–123.
- Shao X, Tarnasky HA, Schalles U, Oko R, and van der Hoorn FA (1997) Interactional cloning of the 84-kDa major outer dense fiber protein Odf84. Leucine zippers mediate associations of Odf84 and Odf27. *J Biol Chem*, **272**:6105–6113.
- Shao X and van der Hoorn FA (1996) Self-interaction of the major 27-kilodalton outer dense fiber protein is in part mediated by a leucine zipper domain in the rat. *Biol Reprod*, **55**:1343-1350.
- Shao X, Xue J and van der Hoorn FA (2001) Testicular protein Spag5 has similarity to mitotic spindle protein Deepest and binds outer dense fiber protein Odf1. *Mol Reprod Dev*, **59**:410–416.
- Shelanski ML, Gaskin F and Cantor C (1973) Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc Natl Acad Sci*, **70**:765-768.
- Song YH, Mandelkow E (1993) Recombinant kinesin motor domain binds to  $\beta$ -tubulin and decorates microtubules with a B surface lattice. *Proc Natl Acad Sci*, **90**:167.
- Sonnenfeld G (2002) The immune system in space and microgravity. *Med Sci Sports Exerc*, **34**(12):2021-7.
- Sorokin S (1962) Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *J Cell Biol*, **15**:363-77.
- Stearns T (2001) Centrosome duplication: A centriolar pas de deux. *Cell*, **105**:417-420.
- Stearns T, Evans L und Kirschner M (1991)  $\gamma$ -Tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell*, **65**:825-836.
- Stearns T, Kirschner M (1994) In vitro reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of gamma-tubulin. *Cell*, **76**:623-637.

Stenoien DL, Brady ST (1997) Immunochemical analysis of kinesin light chain function. *Mol Biol Cell*, **8**(4):675-89.

Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, **189**(1):113-130.

Sugimoto K, Yamada T, Muro Y, Himeno M (1994) Human centromere protein C (CENP-C) is a DNA-binding protein which possesses a novel DNA-binding motif. *J Biochem*, **116**:877-881.

Sugimoto K, Yamada T, Muro Y, Himeno M (1996) Human homolog of *Drosophila* heterochromatin-associated protein 1 (HP1) is a DNA-binding protein which possesses a DNA-binding motif with weak similarity to that of human centromere protein C (CENP-C). *J Biochem*, **120**:153-159.

Sun QY, Schatten H (2006) Role of NuMA in vertebrate cells: review of an intriguing multifunctional protein. *Front Biosci*, **11**:1137-1146

Sutovsky P, Manandhar G, Schatten G (1999) Biogenesis of centrosome during mammalian gametogenesis and fertilization. *Protoplasma*, **206**:249-262.

Sutovsky P, Schatten G (2000) Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion. *Int Rev Cytol*, **195**:1-65.

Tarnasky H, Gill D, Murthy S, Shao X, Demetrick DJ, van der Hoorn FA (1998) A novel testis-specific gene, SPAG4, whose product interacts specifically with outer dense fiber protein ODF27, maps to human chromosome 20q11.2. *Cytogenet Cell Genet*, **81**(1):65-67.

Taylor WE, Bhasin S, Lalani R, Datta A, Gonzalez-Cadavid NF (2002) Alteration of gene expression profiles in skeletal muscle of rats exposed to microgravity during a spaceflight. *J Gravit Physiol*, **9**(2):61-70.

Terasaki M (2000) Dynamics of the endoplasmic reticulum and golgi apparatus during early sea urchin development. *Mol Biol Cell*, **11**:897-914.

Terasaki M, Reese TS (1994) Interactions among endoplasmic reticulum, microtubules, and retrograde movements of the cell surface. *Cell Motil. Cytoskel*, **29**:291-300.

Tres LL, Kierszenbaum AL (1996) Sak57, an acidic keratin initially present in the spermatid manchette before becoming a component of paraaxonemal structures of the developing tail. *Mol Reprod Dev*, **44**(3):395-407.

Toshimori K, Ito C (2003) Formation and organization of the mammalian sperm head. *Arch Histol Cytol*, **66**(5):383-96.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1989) Immunoblotting in the clinical laboratory. *J Clin Chem Clin Biochem*, **27**(8):495-501

Turner KJ, Sharpe RM, Gaughan J, Millar MR, Foster PM, Saunders PT (1997) Expression cloning of a rat testicular transcript abundant in germ cells, which contains two leucine zipper motifs. *Biol Reprod*. **57**(5):1223-1232.

- Urbani L und Stearns T (1999) The centrosome. *Curr Biol*, **9**:R315-317.
- Vale RD und Fletterick RJ (1997) The design plan of kinesin motors. *Ann Rev Cell Dev Biol*, **8**:4-9.
- Vallee RB (1991) Molecular motors and the cytoskeleton. *Academic Press*, **196**:478-485.
- Vallee RB, Collins CA (1986) Purification of microtubules and microtubule-associated proteins from sea urchin eggs and cultured mammalian cells using taxol, and use of exogenous taxol-stabilized brain microtubules for purifying microtubule-associated proteins. *Methods Enzymol*, **134**:116-127.
- Vallee RB, Sheetz MP (1996) Targeting of motor proteins. *Science*, **271**(5255):1539-1544.
- Vanden Berghe P (2004) Fluorescent molecules as tools to study Ca<sup>2+</sup> signaling, mitochondrial dynamics and synaptic function in enteric neurons. *Verh K Acad Geneesk Belg*, **66**(5-6):407-425.
- Van den Hoff MJ, Moorman AF and Lamers WH (1992) Electroporation in „intracellular“ buffer increases cell survival. *Nucleic Acids Res*, **20**:2902-2908.
- Van den Hoff MJ, Christoffels VM, Labruyere WT, Moorman AF, Lamers WH (1995) Electrotransfection with "intracellular" buffer. *Methods Mol Biol*, **48**:185-197.
- Vandre DD, Centonze VE, Peloquin J, Tombes RM, Borisy GG (1991) Proteins of the mammalian mitotic spindle: phosphorylation/dephosphorylation of MAP-4 during mitosis. *J Cell Sci*, **98**:577-588.
- van der Hoorn FA, Tarnasky HA, Nordeen SK (1990) A new rat gene RT7 is specifically expressed during spermatogenesis. *Dev Biol*, **142**(1):147-154.
- Vera JC, Brito M, Zuvic T, Burzio LO (1984) Polypeptide composition of rat sperm outer dense fibers. A simple procedure to isolate the fibrillar complex. *J Biol Chem*, **259**(9):5970-5977.
- Vogl AW (1989) Distribution and function of organized concentrations of actin filaments in mammalian spermatogenic cells and Sertoli cells. *Int Rev Cytol*, **119**:1-56.
- Waggoner AS (1990) Fluorescent probes for cytometry. In: Flow Cytometry and Sorting. 2nd ed., Melamed MR, Mendelsohn ML (eds.), Wiley & Sons, New York.
- Walshaw J, Woolfson DN (2001) Socket: a program for identifying and analysing coiled-coil motifs within protein structures. *J Mol Biol*, **307**(5):1427-1450.
- Wang B, Zhang S, Wu XY (2003) Effects of microgravity on the gene expression and cellular functions of osteoblasts Department of Aerospace Biodynamics, *Space Med Med Eng* (Beijing), **16**(3):227-230.
- Wang H, Hu X, Ding X, Dou Z, Yang Z, Shaw AW, Teng M, Cleveland DW, Goldberg ML, Niu L, Yao X (2004) Human Zwint-1 specifies localization of Zeste White 10 to kinetochores and is essential for mitotic checkpoint signaling. *J Biol Chem* **279**(52):54590-54598.

- Wang S, Hazelrigg R (1994) Implications for bed mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature*, **369**:400-403.
- Weber KL, and Bement WM (2002) F-actin serves as a template for cyokeratin organization in cell free extracts. *J Cell Sci*, **115**:1373–1382.
- Weimer JM, Chattopadhyay S, Custer AW, Pearce (2005) Elevation of Hook1 in a disease model of Batten disease does not affect a novel interaction between Ankyrin G and Hook1. *Biochem Biophys Res Commun*, **330**(4):1176-1181.
- Wiese C und Zeng Y (1999)  $\gamma$ -Tubulin complexes and their interaction with microtubule-organizing centers. *Curr Opin Struct Biol*, **9**:250-259.
- Wilson T (ed.) (1990) Confocal microscopy. Academic Press, San Diego.
- Wittmann T, Hyman A und Desai A (2001) The Spindel: a dynamic assembly of microtubuls and motors. *Nature Cell Biol*, **3**:E28-E34.
- Woolley DM, Fawcett DW (1973) The degeneration and disappearance of the centrioles during the development of the rat spermatozoon. *Anat Rec*, **177**:289-301.
- Workman JL, Buchman AR (1993) Multiple functions of nucleosomes and regulatory factors in transcription. *Trends Biochem Sci*, **3**:90-95.
- Woycechowsky KJ, Raines RT (2003) The CXC motif: a functional mimic of protein disulfide isomerase. *Biochemistry*, **42**(18):5387-5394.
- Xue J, Tarnasky HA, Rancourt DE, van der Hoorn FA (2002) Targeted disruption of the testicular SPAG5/deepest protein does not affect spermatogenesis or fertility. *Mol Cell Biol*, **22**(7):1993-1997.
- Young A, Dichtenberg JB, Purohit A, Tuft R and Doxsey SJ (2000) Cytoplasmic dynein-mediated assembly of pericentrin and gamma-Tubulin onto centrosomes. *Mol. Biol Cell*, **11**:2047-2056.
- Zarsky HA, Tarnasky HA, Cheng M, van der Hoorn FA (2003) Novel RING finger protein OIP1 binds to conserved amino acid repeats in sperm tail protein ODF1. *Biol Reprod*, **68**(2):543-552.
- Zhang Y, Oko R, van der Hoorn FA (2004) Rat kinesin light chain 3 associates with spermatid mitochondria. *Dev Biol*, **275**(1):23-33.
- Zheng Y, Jung MK, Oakley BR (1991)  $\gamma$ -Tubulin is present in *Drosophila Melanogaster* and homo sapiens and is associated with the centrosome. *Cell*, **65**:817-823.
- Zheng Y, Wong LM, Alberts B, Mitchison T (1995) Nucleation of microtubule assembly by a  $\gamma$ -tubulin-containing ring complex. *Nature*, **378**:578-583.
- Zimmerman W and Doxsey SJ (2000) Construction of centrosomes and spindle poles by molecular motor-driven assembly of protein particles. *Traffic*, **1**:927-934.

Zimmermann W, Sparks CA, Doxsey SJ (1999) Amorphous no longer: The centrosome comes into focus. *Curr Opin Cell Biol*, **11**:122-128.

Zimmerman WC, Sillibourne J, Rosa J and Doxsey SJ (2004) Mitosis-specific anchoring of gamma-Tubulin complexes by pericentrin controls spindle organization and mitotic entry. *Mol Biol Cell*, **15**:3642-3657.

## 7.2 Internetverzeichnis

<http://www.essentialcellbiology.com/>

<http://www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/1775>

<http://www.neb.com/nebecomm/ManualFiles/manualE8000.pdf>

<http://www.hi.helsinki.fi/>

<http://www.zum.de/Faecher/Materialien/hupfeld/index.htm?/Faecher/Materialien/hupfeld/Cytologie/zell-zyklus/zell-zyklus.html>

<http://www.proweb.org/kinesin/kinesinStructure>

<http://facs.scripps.edu/>

<http://www.biologie.uni-regensburg.de/Zoologie/Schneuwly/Hofbauer/Hubio/hubi21.htm>

Protokolle der Fixierungsmethoden  
(<http://mitchison.med.harvard.edu/Protocols.htm>)

*in silico* Arbeiten:

BLAST (Altschul *et al.*, 1990), Swiss-Prot, Pfam (Bateman *et al.*, 2000)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

National Center for Biotechnology Information  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

ELM Eukaryotic Linear Motif resource for functional sites in proteins  
<http://elm.eu.org/basicELM/cgimodel>

Generunner-DNA sequence analysis software  
<http://www.generunner.com/>

Simple Modular Architecture Research Tool  
<http://smart.embl-heidelberg.de/>

2ZIP - Server  
<http://2zip.molgen.mpg.de/index.html>

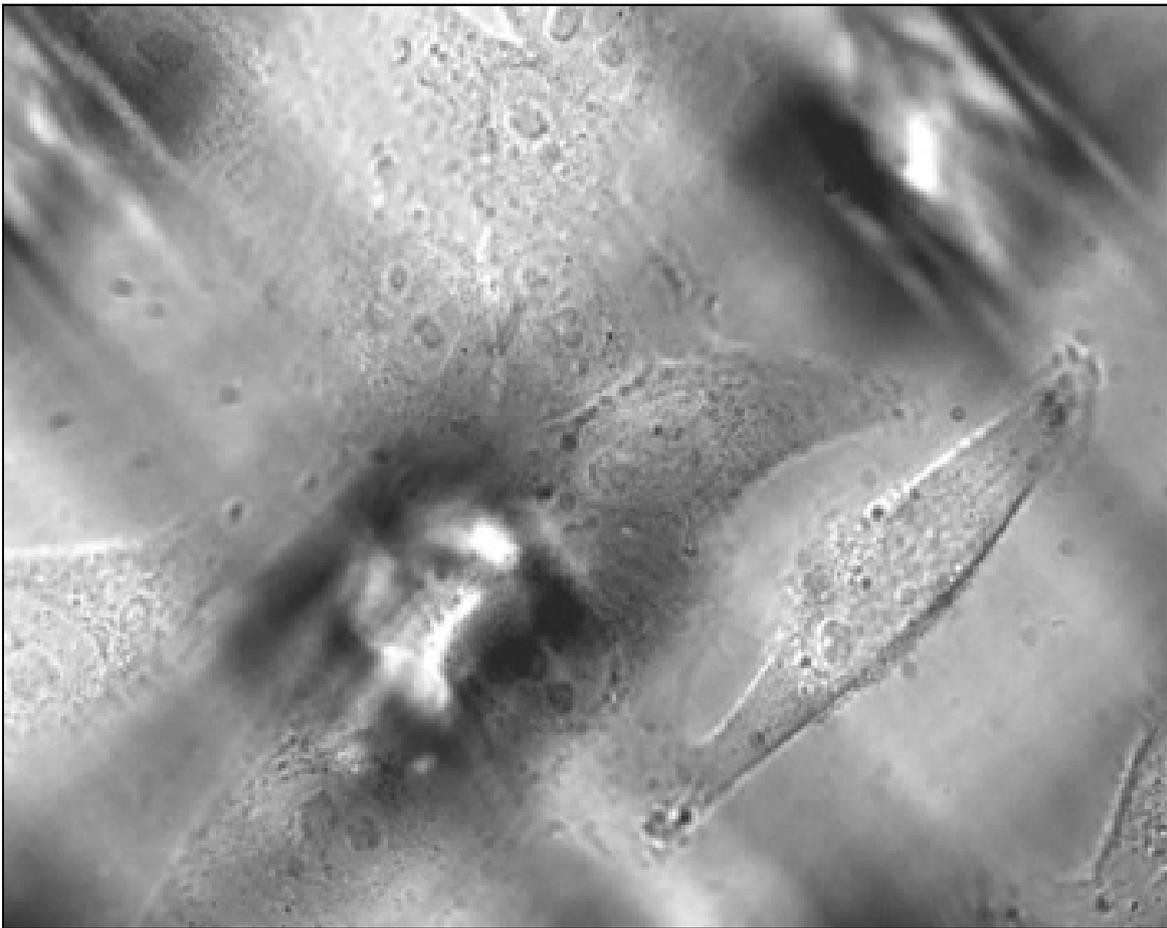
ExPASy Proteomics Server  
<http://www.expasy.ch/>

iHOP  
Information hyperlinked over proteins  
<http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/gs/95628.html>

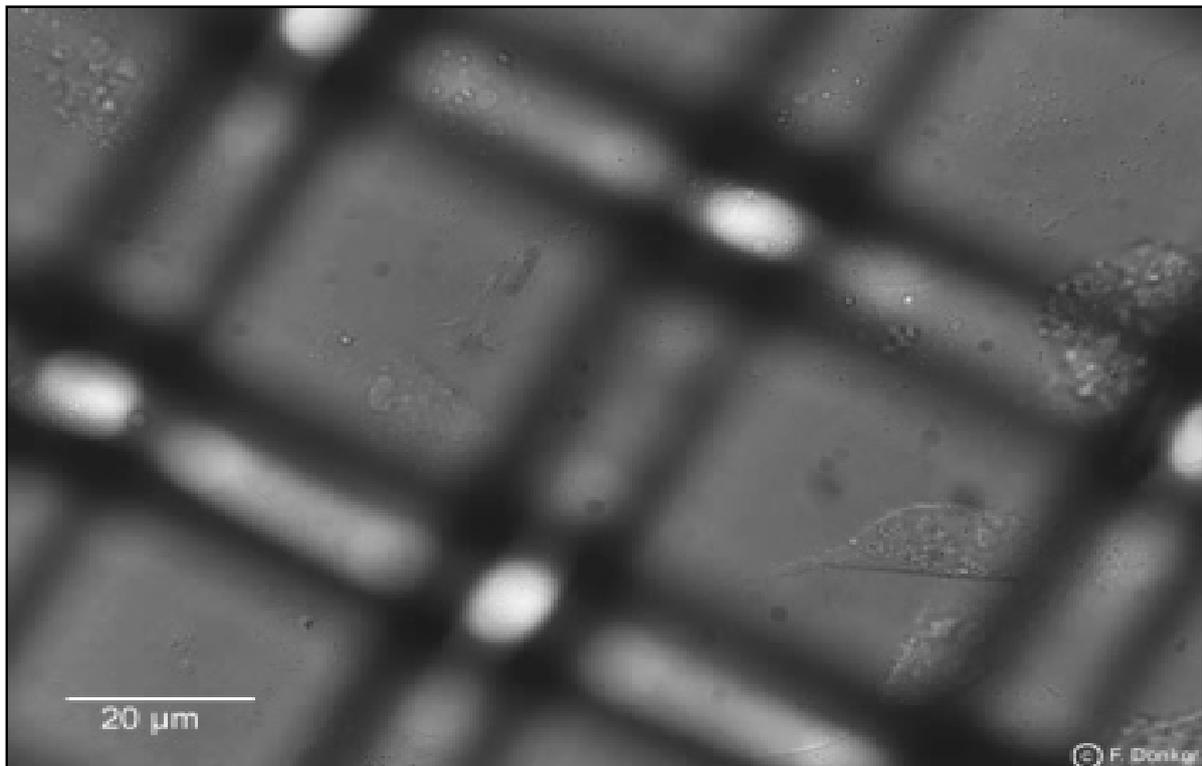
## Videomikroskopische Aufzeichnungen

In dieser Ausgabe befindet sich eine CD mit den videomikroskopischen Aufzeichnungen. Die CD muss aus einem DVD-Laufwerk heraus abgespielt werden. Die in Abschnitt 3.6 präsentierten Aufnahmen sind ausgewählte und zusammengefügte Sequenzen der jeweiligen Aufzeichnungen.

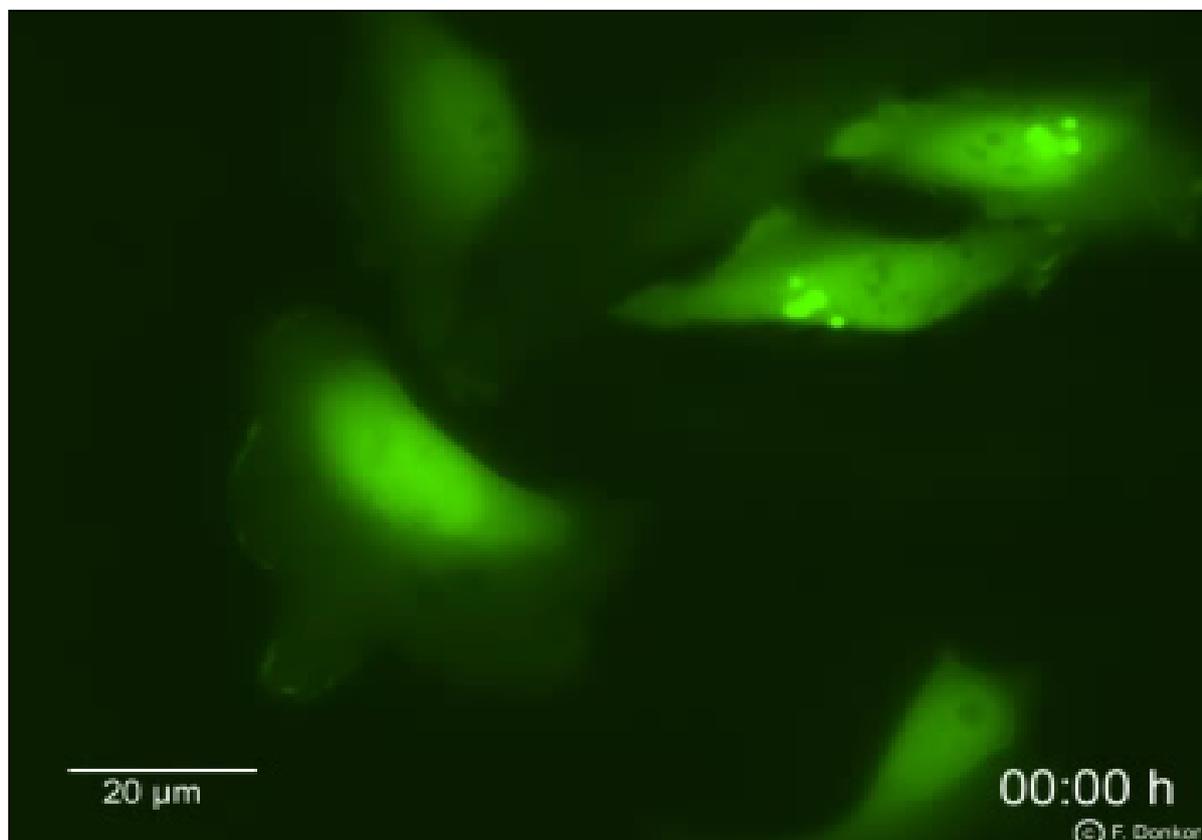
Video 1: es zeigt die Videomikroskopie an untransfizierten HeLa-Zellen und entspricht der Abbildung 36.



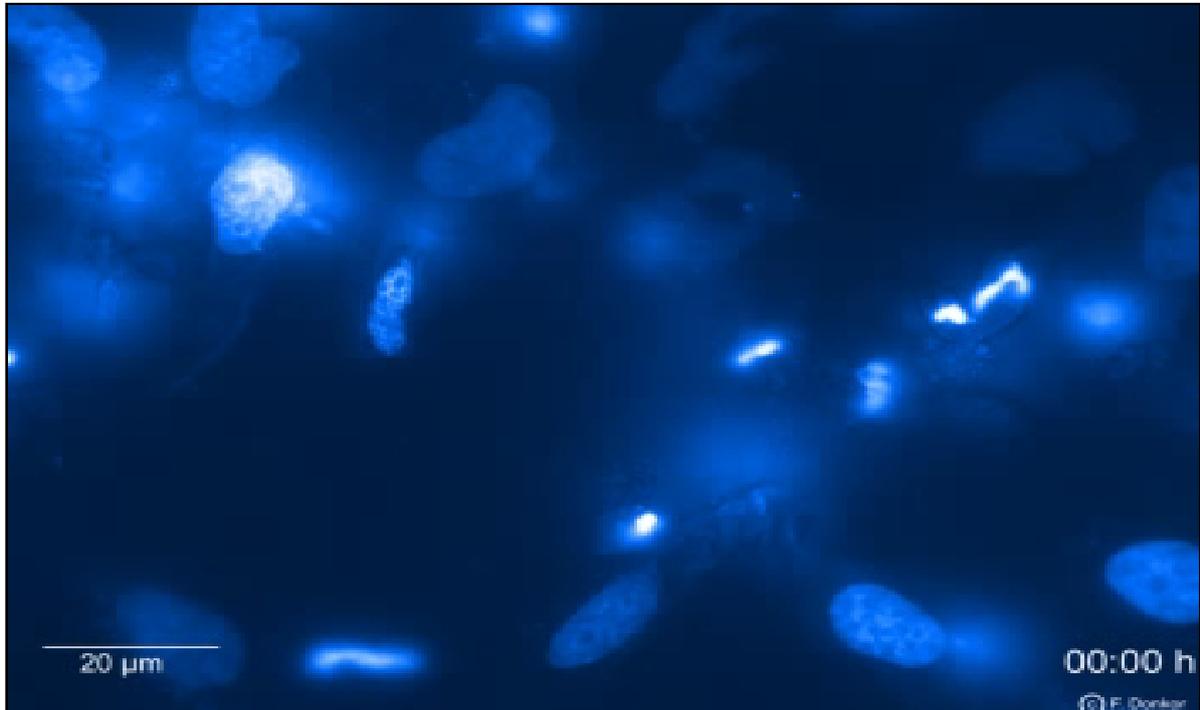
Video 2: es zeigt die Videomikroskopie ODF2-überexprimierender HeLa-Zellen und entspricht der Abbildung 37.



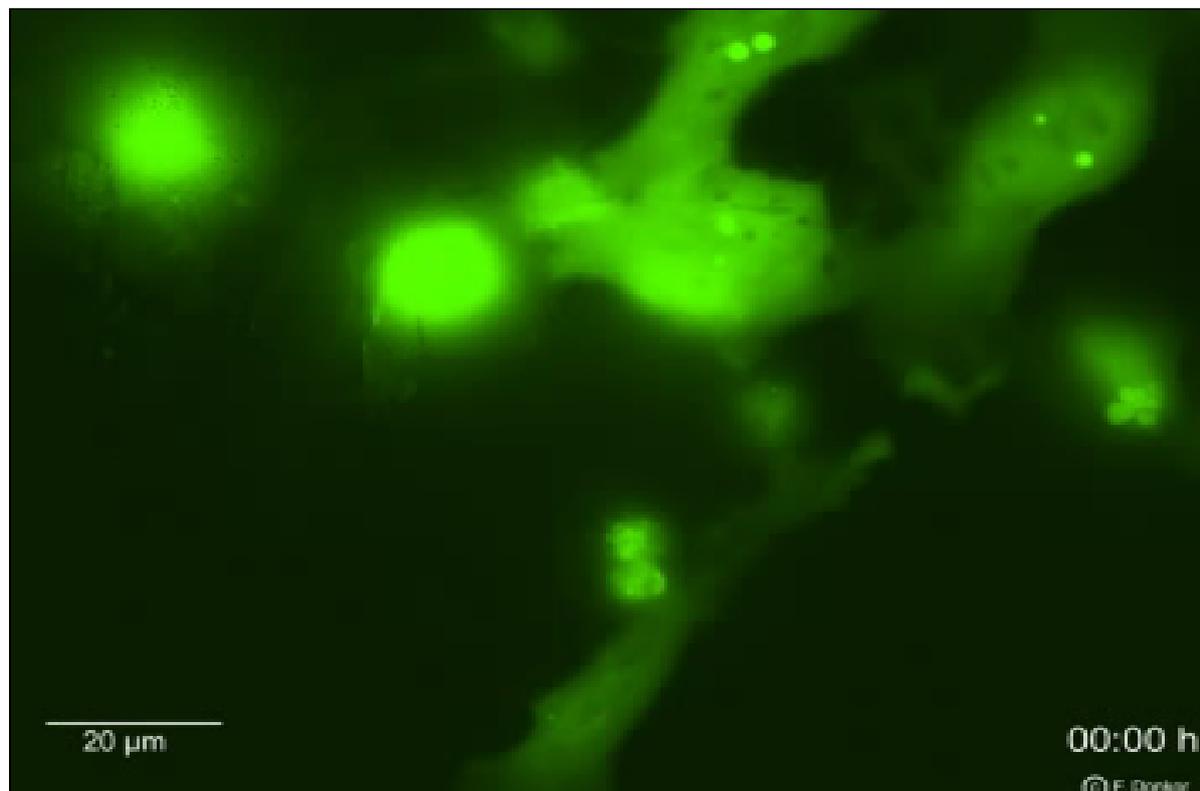
FITC = Fluoreszenzmikroskopische-Aufnahmen



Video 3: es zeigt die Videomikroskopie ODF2-überexprimierender, DNS markierter He-La-Zellen im erweiterten Beobachtungszeitraum und entspricht der Abbildung 40.



FITC = Fluoreszenzmikroskopische-Aufnahmen



## Anhang

Die **fett** und *kursiv* hervorgehobenen werden im Ergebnis- und Diskussionsabschnitt behandelt.

<i>Blast Hits on the query sequence</i>	Klon Bezeichnung	PCR-Größe(kb)	Sequenzierter Bereich/ <i>Score/ Identities %</i>	<i>BLAST Hit Accessionnr.</i>	Leserahmen + ja/ - nein	Annotiert als
<b>51</b>	<b>YTH1</b>	<b>1,2</b>	<b>8635-9320/1277/98</b>	<b>AY769440</b>	<b>+</b>	<b>cytochrome c oxidase subunit 3</b>
<b>&gt;50</b>	<b>YTH 2</b>	<b>1,0</b>	<b>30-704/1261/98</b>	<b>NM_019258</b>	<b>+</b>	<b>Rattus norvegicus cystatin 8 (Cst8), mRNA</b>
>50	YTH 3	1,2	8635-9293/1326/99	AY769440	-	cytochrome c oxidase subunit 3
1	YTH 4	0,4	9-44/44/91	AJ011418	-	ubiquitin activating enzyme
3	YTH 5	1,7	2-21/40/100	NM_006384	-	calcium and integrin binding 1 (calmyrin)"
>40	YTH 6	1,7	139-604/737/94	X04240	-	mature malate dehydrogenase
>50	YTH 7	1,2	2164-2805/2145/99	BC066661	-	eukaryotic translation elongation factor 2
>50	YTH 9	1,7	1542-2229/1350/99	NM_019288	-	amyloid beta (A4) precursor protein
>50	YTH 10	1,7	1597-1905/613/100	BC062082	-	Rattus norvegicus amyloid beta (A4) precursor protein, mRNA
24	YTH 13	0,4	3779-3976/234/90	BC054553	-	Mus musculus calmodulin regulated spectrin-associated protein 1
11	YTH 16	2,0	9-44/58/97	AJ011418	-	ubiquitin activating enzyme

## Anhang

<i>Blast Hits on the query sequence</i>	Klon Bezeichnung .	PCR-Größe(kb)	Sequenzierter Bereich/ Score/ Identities %	<i>BLAST Hit Accessionsnr.</i>	Leserahmen + ja/ - nein	Annotiert als
24	YTH 19	1,5	10-44/61/97	AJ011418	-	ubiquitin activating enzyme
50	YTH 29	2,0	16-317/599/100	BC063144	-	SNAP25 interacting protein 30 SNAPinter30.x.pdf
52	YTH 30	2,0	24-332/613/100	NM_147138	-	SNAP25 interacting protein 30
>50	YTH 35	0,6		AC137104		Mus musculus chromosome 1, clone RP23-241K20
<b>&gt;50</b>	<b>YTH 36</b>	<b>1,5</b>	<b>18-326/613/100</b>	<b>NM_031354</b>	<b>+</b>	<b>voltage-dependent anion channel 2 (Vdac2)</b>
>40	YTH 37	1,0	2426-2733/611/100	XM_342385	-	Rattus norvegicus similar to hypothetical protein FLJ13045 Ras family. Includes sub-families Ras, arf and myosin_head
14	YTH 40	0,4	265693-265816/125/88	AC109138		Mus musculus chromosome 19, clone RP23-41B18
13	YTH 41	0,4	265693-265816/125/88	AC109138		Mus musculus chromosome 19, clone RP23-41B18
>50	YTH 42	2,0	1597-1903/609/100	BC062082	-	amyloid beta (A4) precursor protein
>50	YTH 43	1,0	2426-2734/613/100	XM_342385	-	similar to hypothetical protein FLJ13045

## Anhang

<i>Blast Hits on the query sequence</i>	Klon Bezeichnung.	PCR-Größe(kb)	Sequenzierterbereich/ Score/ Identities %	<i>BLAST Hit Accessionsnr.</i>	Leserahmen + ja/ - nein	Annotiert als
>45	YTH 25		2426-2712/569/100	XM_342385	-	Rattus norvegicus similar to hypothetical protein FLJ13045
14	YTH 32		265693-265816/125/88	AC109138		Mus musculus chromosome 19, clone RP23-41B18
12	YTH 46		265693-265816/127/88	AC109138		Mus musculus chromosome 19, clone RP23-41B18
>50	YTH 47		1341-1632/547/98	AB027143	-	cell division control related protein 1. synonyms: Pnutl1, Cdcrel1, Cdcrel-1
>50	YTH 49		1-213/208/87	XM_223235	-	ADP-ribosyltransferase 3 (Art3), function="unknown" extracellular space
	YTH 50			NM_017245	-	Rattus norvegicus eukaryotic translation elongation factor 2 (Eef2), mRNA
14	YTH 51		407-284	AK018780		Mus musculus adult male cerebellum cDNA product:unknown EST

## Anhang

<i>Blast Hits on the query sequence</i>	Klon Bezeichnung	PCR-Größe(kb)	Sequenzierter Bereich/ Score/ Identities %	<i>BLAST Hit Accessionsnr.</i>	Leserahmen + ja/ - nein	Annotiert als
>50	YTH 52	1,2	1542-1832/577/100	NM_019288	-	amyloid beta (A4) precursor protein
>50	YTH 53	0,6		Y17323  U87983 AAB47997.1	-	<i>Rattus norvegicus</i> CDK109 mRNA. <i>Rattus norvegicus</i> receptor for hyaluronan-mediated motility mRNA "RHAMM"
>50	YTH 54	1,2	1542-1827/533/99	NM_019288	-	<i>Rattus norvegicus</i> amyloid beta (A4) precursor protein (App), mRNA
40	YTH 55	0,4	92-203/198/97	XM_355863	-	similar to MGC15476 protein
>50	YTH 56	0,9	18-307/575/100	NM_031354	+	<i>Rattus norvegicus</i> voltage-dependent anion channel 2 (Vdac2), mRNA
>40	YTH 58	1,0	1-214/424/100	XM_223235	+	<i>Rattus norvegicus</i> similar to ART3 mono(ADP-ribosyl)transferase
41	YTH A2	0,5	92-203/184/96	XM_355863	-	similar to MGC15476 protein

## Anhang

<i>Blast Hits on the query sequence</i>	Klon Bezeichnung	PCR-Größe(kb)	Sequenzierter Bereich/ Score/ Identities %	<i>BLAST Hit Accessionsnr.</i>	Leserahmen + ja/ - nein	Annotiert als
>40	YTH A3	0,5	67-344/484/97  272-1/464/97	Y17323  U87983	Keine Proteinsequenz (-)  -	Rattus norvegicus CDK109 mRNA.  Rattus norvegicus receptor for hyaluronan-mediated motility mRNA "RHAMM"
>50	YTH A5	1,2	1542-1823/559/100	NM_019288	-	amyloid beta (A4) precursor protein
>40	<b>YTH 48</b>	<b>1,2</b>	<b>2135-2419/565/100</b>	<b>XM_220544</b>	<b>+</b>	<b>Rattus norvegicus similar to sperm antigen HCMOGT-1 (LOC303208)</b>
31	YTH E	2,0	231-406/349/100	BC078725	-	Rattus norvegicus Estrogen-regulated protein CBL20, 20.4kD, mRNA
>50	YTH F	0,9	143-442/300/100  1986-1/381/99	Y17323  U87983	-  -	-Rattus norvegicus CDK109 mRNA -Rattus norvegicus receptor for hyaluronan-mediated motility mRNA
7	YTH G	< 0,4	211-337/119/100	XM_125703		PREDICTED: Mus musculus RIKEN cDNA 2210404O07 gene

## Anhang

<i>Blast Hits on the query sequence</i>	Klon Bezeichnung.	PCR-Größe(kb)	Sequenzierter Bereich/ Score/ Identities %	<i>BLAST Hit Accessionsnr.</i>	Leserahmen + ja/ - nein	Annotiert als
12	YTH H	0,9	1-21/42/100	NM_006384	-	calcium and integrin binding 1 (calmyrin)
37	YTH I	2,0	2-227/448/100	XM_223235	-	Rattus norvegicus similar to ART3 mono(ADP-ribosyl)transferase
>40	YTH L	2,5	2135-2433/593/100	XM_220544	-	Rattus norvegicus similar to sperm antigen HCMOGT-1 (LOC303208), mRNA
>40	YTH A24	2,5	24-314/577/100	NM_147138	-	Rattus norvegicus SNAP25 interacting protein 30 (Sip30), mRNA
	YTH A6	2,0				<b>No significant similarity found</b>
>50	YTH A7	1,5	1-216/428/100	XM_223235.	+	Rattus norvegicus similar to ART3 mono(ADP-ribosyl)transferase (LOC305235), mRNA

## Anhang

<i>Blast Hits on the query sequence</i>	Klon Bezeichnung	PCR-Größe(kb)	Sequenzierter Bereich/ Score/ Identities %	<i>BLAST Hit Accessionsnr.</i>	Leserahmen + ja/ - nein	Annotiert als
5	YTH A8	1,5	17-44/56/100 1-21/42/100 1-21/42/100	AJ011418 NM_006384 U85611	- - -	ubiquitin activating enzyme Homo sapiens calcium and integrin binding 1 (calmyrin) (CIB1), Human DNA-PK interaction protein (KIP) mRNA
13	YTH A9	0,8	17-44/56/100 1-21/42/100 1-21/42/100	AJ011418 NM_006384 U85611	- - -	ubiquitin activating enzyme Homo sapiens calcium and integrin binding 1 (calmyrin) (CIB1), <i>Human DNA-PK interaction protein (KIP) mRNA</i>
14	YTH A11	0,5	17-44/56/100 1-21/42/100 1-21/42/100	AJ011418 NM_006384 U85611	- - -	ubiquitin activating enzyme Homo sapiens calcium and integrin binding 1 (calmyrin) (CIB1), Human DNA-PK interaction protein (KIP) mRNA
13	YTH A12	0,5	17-44/56/100 1-21/42/100 1-21/42/100	AJ011418 NM_006384 U85611	- - -	ubiquitin activating enzyme calcium and integrin binding 1 (calmyrin) (CIB1), Human DNA-PK interaction protein (KIP) mRNA

## Danksagung

Danken möchte ich an dieser Stelle PD Dr. Hoyer-Fender für das Überlassen dieses entwicklungsbiologischen Themas und dafür, dass sie als Vorgesetzte Verständnis zeigte für die Realisierung der Vereinbarkeit von Familie und Beruf.

Prof. Dr. Grossbach für die Betreuung dieser Arbeit.

Institutsleiter Prof. Wimmer möchte ich für das Gewähren eines hausinternen Stipendiums danken.

Mein Dank gilt auch der Förderungseinrichtung der Naturwissenschaften in Forschung und Lehre, der Richard-Winter-Stiftung.

Dipl. Physiker Gerhard Hoch möchte ich für seine Kompetenzen bei der Etablierung des *Life-Cell-Imaging* am *upright* Mikroskop und das konstruktive freundschaftliche Arbeitsklima danken.

Den Arbeits- und Teamkollegen gilt mein Dank für Rat und Diskussionsbeiträge, der Arbeitsgruppe PD Sopper am Deutschen Primatenzentrum für ihre Einweisungen in die Methoden der Durchflusszytometrie.

Ich danke meiner Freundin Dr. Anke Lösch für ihren Blick von Außen, meiner Freundin Shereen Petersen für die Einweisung am Rechner (PDFs sind nun kein Geheimnis mehr),

Burkhard Rammner für die Multimedia Einblicke,

Dr. Harald Schlüter für das „PromoCoachen“,

meinem Hausbewohner Dipl. Physiker Frank Büttner für das freie Surfen im Internet,

Hans Riebensam und Christine Hinze für „den Blick nach Innen“,

meinem Vater für seine Gebete,

meinen Wahlfamilien Schwuchow und Scholz für das Mutmachen, Kinderbetreuen und ihre liebevolle Anteilnahme,

und meinen Kindern für die Wunder, an denen sie mich jeden Tag teilnehmen lassen.

*Our remedies often in ourselves do lie which we ascribe to heaven.*

*Shakespeare*

## Lebenslauf

Fatima Fosuaa Donkor  
Geb.: 28.8.1969 in Accra in Ghana  
Nach der Adoption 1977 in Deutschland aufgewachsen  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Gesch., 2 Kinder, 1995 und 1997 geboren

### Studium

- Seit 11 / 2001** Beginn der Promotionsarbeit, Thema: Interaktionen des testikulären *outer dense fibre protein 2* (ODF2) bei der zellulären Organisation  
Abgabetermin der Dissertation September 2006.
- 05 / 2004** Veröffentlichung der Arbeit *Outer dense fibre protein 2 (ODF2) is a self-interacting centrosomal protein with affinity for microtubules*. Journal of Cell Science 117 (20).
- 11 / 2001** Abgabe der Diplomarbeit, Thema: Mutagenese von ODF1 und ODF2: Funktionelle Analysen der Proteindomänen und ihr Bezug zum Cytoskelett.
- 10 / 1993** Studium der Biologie an der Georg August Universität in Göttingen mit den Fächern Anthropologie, Entwicklungsbiologie und Psychologie.
- 04 / 1993** Studium der Biologie und Chemie auf Lehramt in Hamburg.

### Berufspraxis

- 1999 –2005** Hilfskraft am Entwicklungsbiologischen Institut der Universität Göttingen.
- 1994 –1997** Hilfskraft am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin in Göttingen.
- 1989 –1992** Chemielaborantin an einer Forschungsabteilung des Uni-Lever Konzerns in Hamburg (Natec).

## **Berufsausbildung**

**1986-1989** Berufsausbildung zur Chemielaborantin bei der Natec in Hamburg.

## **Schulbildung**

**12 / 1992** Abitur am Abendgymnasium in Hamburg.

**1976-1986** Schulbesuch mit Realschulabschluss in Hamburg.

Göttingen, den 31 Oktober 2006