

**Analyse des RHO-SMOK1-Signalnetzwerkes
bei der nicht-mendelschen Vererbung
in der Maus**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sabrina Schindler
aus Neuruppin

Dezember, 2012

Diese Arbeit wurde in der Zeit von August 2008 bis Dezember 2012
unter der Leitung von Prof. Dr. Bernhard G. Herrmann
am Max Planck Institut für molekulare Genetik, Berlin verfasst.

Gutachter: 1) Prof. Dr. Bernhard G. Herrmann
Max Planck Institut für molekulare Genetik, Berlin

2) Prof. Dr. Rupert Mutzel
Freie Universität, Berlin

Disputation am: 11. März 2013

Für meine Familie

Für Marcello

Danksagung

In erster Linie bedanke ich mich bei Prof. Dr. Bernhard G. Herrmann für die Möglichkeit im Verlaufe meiner Promotion ein hoch interessantes Thema in seiner Abteilung am Max-Planck Institut für molekulare Genetik bearbeiten zu dürfen. Außerdem bedanke ich mich bei Ihm für die kontinuierlich gute und enge Betreuung während meiner Zeit in der Abteilung und für seine Unterstützung bei Fragestellungen und Diskussionen. Mein Dank geht ebenfalls an Prof. Dr. Rupert Mutzel für seine Zeit und für seine Bereitschaft die Beurteilung meiner Dissertation als Gutachter zu übernehmen. Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Ulrich Stelzl, Dr. Josephine Worseck und Dr. Mareike Weimann für ihre Bereitschaft zur Kooperation, für die Durchführung der umfangreichen Hefe-Zwei-Hybrid Analysen zur Identifikation neuer Bindungspartner im Signalweg der nicht-mendelschen Vererbung in der Maus und für eine sehr herzliche Arbeitsatmosphäre. Zusätzlich möchte ich auch Dr. Rudi Lurz und Beatrix Fauler für ihre Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen und für ein sehr angenehmes und herzliches Arbeitsklima danken. Ich bedanke mich des Weiteren bei Dr. Hermann Bauer, Dr. Yves Charron, Barica Kusecek, Jürgen Willert und Karina Schöfisch für die angenehme und herzliche Atmosphäre im Labor. Ich bedanke mich auch für die Unterstützung in technischen Fragen und für die stetigen Anregungen und fachbezogenen Diskussionen während meiner Zeit im Labor. Mein Dank geht ebenfalls an meine ehemalige Kollegin und Betreuerin Dr. Nathalie Véron für die schöne gemeinsame Zeit während meines Praktikums in der Abteilung Herrmann. Mein zusätzlicher Dank gilt Carolin Willke für die kontinuierliche Betreuung der Tiere und für eine gute und schnelle Zusammenarbeit. Ich möchte mich ebenfalls ganz herzlich bei der gesamten Abteilung Herrmann bedanken für die wunderbaren und lehrreichen Jahre während meiner Promotion, für die uneingeschränkte Unterstützung in allen technischen und nicht technischen Belangen und für das angenehme Arbeitsumfeld.

Zum Abschluss möchte ich mich bei meinen Eltern Karin und Jörg Schindler bedanken, die mich auf diesem langen Weg der Promotion immer unterstützt und ermutigt haben. Ebenfalls großer Dank geht an meine Freunde sowie an Marcello Wegener für den Rückhalt und für die Möglichkeit mich neben der Promotion auch mit anderen Themen zu befassen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Entstehung, Wirkung und Mechanismus des t-Komplexes in der Maus	1
1.1.1	Der <i>t</i> -Komplex: Ein egoistisches Chromosom führt zur Verschiebung der Vererbungsrate in der Maus	1
1.1.2	Genetische Grundlagen des Maus <i>t</i> -Komplexes	3
1.1.3	Die Verschiebung der Vererbungsrate ausgelöst durch einen veränderten Signalmechanismus	5
1.2	Das Hodengewebe der Maus	12
1.2.1	Der strukturelle Aufbau vom Hodengewebe	12
1.2.2	Die Entstehung von Spermatozoen	14
1.3	Entstehung der Flagellenbewegung und Spermienmotilität	15
1.3.1	Spermienmotilität	15
1.3.2	Flagellum - Ultrastruktur als Basis für Spermienmotilität . . .	17
1.3.3	Der Motor der Spermienmotilität - das Axonem	19
1.3.4	Regulation der Spermienmotilität	22
1.4	Zielsetzung der Arbeit	27
2	Ergebnisse (A) Identifikation von Bindungspartnern für <i>t</i>-Komplex Faktoren mit dem Hefe-Zwei-Hybrid System	28
2.1	Konstrukte für die Hefe-Zwei-Hybrid Analyse	30
2.2	Identifikation von SMOK1-Bindungspartnern	32
2.3	Identifikation von Bindungspartnern für die <i>t</i> -Komplex-Distorter Proteine	33
2.4	Netzwerk zwischen <i>t</i> -Komplex Faktoren und identifizierten Bindungspartnern	34
2.5	Interaktion von Bindungspartnern mit zwei <i>t</i> -Komplex Faktoren . . .	36
2.6	Klassifizierung der identifizierten Bindungspartner	37
3	Ergebnisse (B) Molekulare Analyse von identifizierten SMOK1-Interaktionspartnern	41
3.1	Auswahl von wichtigen SMOK1-Bindungspartnern	41
3.2	mRNA Expressionsanalyse von SMOK1-Interaktionspartnern in der Maus	43
3.3	Lichtmikroskopische Proteinexpressionsanalyse von SMOK1-Interaktionspartnern in der Maus	46

3.4	Elektronenmikroskopische Lokalisation von SMOK1-Interaktionspartnern in Spermatozoen des Cauda Epididymis	53
4	Ergebnisse (C) Validierung von Protein-Protein-Interaktionen	61
4.1	Lumineszenz basierte IP Analyse	61
4.2	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation	72
4.3	Pull-Down Analysen <i>in vitro</i>	81
5	Ergebnisse (D) Interaktion zwischen SMOK1 und Proteinen der RHO-Familie	85
5.1	Expression von RHO-Proteinen in Spermatozoen der Maus	85
5.2	Direkte Interaktion von SMOK1 mit RHOA und RAC1 <i>in vitro</i>	87
6	Diskussion	91
6.1	SMOK1 interagiert direkt mit Proteinen der RHO-Familie	95
6.2	AKAP9 als Gerüstprotein und Organisationszentrum der <i>Fibrous Sheath</i>	99
6.3	RHPN1 als mögliches Gerüstprotein der <i>Outer Dense Fibers</i>	102
6.4	AMMECR1-SPATA22-Komplex: eine „Brücke“ zum Axonem	105
6.5	Die Veränderung der Spermienmotilität durch die Lokalisation der SMOK1-Kinase an einem axonemalen Dynein	108
6.6	Modell eines RHO-SMOK1-Signalnetzwerkes	114
7	Material und Methoden	117
7.1	Allgemeine molekularbiologische Arbeiten	118
7.1.1	Agarose-Gelelektrophorese	118
7.1.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	118
7.1.3	Verwendung von Restriktionsendonukleasen	118
7.1.4	Gelextraktion und Aufreinigung von DNA	118
7.1.5	Dephosphorylierung von Vektoren	118
7.1.6	Ligation von DNA-Fragmenten	119
7.1.7	Transformation von Plasmiden in Bakterien	119
7.1.8	Blau-Weiß-Untersuchung von Plasmiden in E.coli	119
7.1.9	Isolation von Plasmid aus Bakterienkultur	120
7.1.10	Präparation von Plasmid für Zellkultur	120
7.1.11	Polymerase-Kettenreaktion	120
7.1.12	Sequenzierung von DNA-Proben	120
7.2	Herstellung von Vektoren	121
7.2.1	Herstellung von ENTRY-Vektoren	121
7.2.2	Herstellung von Destinationsvektoren	123

7.2.3	Expressionsvektoren für SMOK1	123
7.2.4	Erzeugung von Expressionsvektoren für RAC1, CDC42 und RHOA	124
7.3	Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	125
7.3.1	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	127
7.3.2	Expressionsvektoren für das Hefe-Zwei-Hybrid System	128
7.3.3	Transformation von Plasmiden in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	129
7.3.4	Autoaktivierungstest	131
7.3.5	Analyse mit dem Hefe-Zwei-Hybrid System	132
7.3.6	Wiederholungstest	132
7.4	Arbeiten mit Mausgewebe	133
7.4.1	Isolation von Spermien	133
7.4.2	Gefrierschnitte von Maushodengewebe	134
7.4.3	Vorbehandlung von Gefrierschnitten	134
7.4.4	<i>In Situ</i> Hybridisierung	135
7.4.5	Immunfluoreszenzfärbung	136
7.4.6	Immunogoldmarkierung und Elektronenmikroskopie	137
7.5	Zellbiologische Arbeiten	138
7.5.1	Kultivierung und Expansion von Zellkulturen	138
7.5.2	Einfrieren von Zellkulturen	138
7.5.3	Transiente Transfektion von Zellkulturen	139
7.5.4	Herstellung von Proteinextrakt aus Zellkulturen	139
7.6	Protein- und biochemische Arbeiten	139
7.6.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten	140
7.6.2	Analyse von Proteinen mit SDS-PAGE	140
7.6.3	Western-Blot-Analyse	140
7.6.4	Herstellung rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i>	141
7.6.5	<i>In vitro</i> Transkription und Translation	142
7.6.6	Aufreinigung von <i>in vitro</i> Transkription/Translation-Reaktionen	142
7.6.7	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation	142
7.6.8	Lumineszenz basierten IP Analyse	144
7.7	RNA-Arbeiten	146
7.7.1	RNA Extraktion	146
7.7.2	cDNA Synthese mit Reverser Transkriptase	146
7.7.3	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	146
7.7.4	Herstellung von RNA-Sonden	147
7.7.5	<i>In vitro</i> Transkription	148

Inhaltsverzeichnis

8 Zusammenfassung	149
8.1 Deutsch	149
8.2 Englisch	150
9 Literaturverzeichnis	152
10 Publikationsverzeichnis	166
11 Anhang	167

Abkürzungsverzeichnis

Smok1	Sperm motility kinase 1
Fgd2	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 2
Tagap1	T-cell activation GTPase activating protein 1
Tiam2	T-cell lymphoma invasion and metastasis 2
Nme3	Nucleoside diphosphate kinase 3
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Ammecr1	Alport syndrome, mental retardation, midface hypoplasia and elliptocytosis chromosomal region gene 1
Akap9	A kinase PKA anchoring protein 9
Rhpn1	Rhopilin, Rho GTPase binding protein 1
Dnali1	Dynein, axonemal, light intermediate chain 1
Spata22	Spermatogenesis associated 22
TRD	Transmission Ratio Distortion
Tcr	<i>t</i> -Komplex Responder
Tcd	<i>t</i> -Komplex Distorter
<i>wt; +</i>	wildtyp
<i>t</i>	<i>t</i> -Haplotyp
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells)
NIH3T3	Embryonale Mausfibroblasten-Zellen (mouse embryonic fibroblasts)
E.coli	Escherichia coli
V5	N-GKPIPPLLGLDST-C (RNA Polymerase α Untereinheit des Simian Virus 5)
Myc	N-EQKLISEEDL-C (c-Myc Epitop)
6xHis	N-HHHHHH-C (Sechsfach-Histidin Epitop)
GST	N-MSPIL[...]GGDHP-C (Glutathion-S-Transferase Epitop)
IP	Immunpräzipitation
RT	Raumtemperatur
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Boten-RNA
h	Stunden
min	Minuten
sec	Sekunden
bp, kb	Basenpaare, Kilobasen

1 Einleitung

1.1 Entstehung, Wirkung und Mechanismus des t-Komplexes in der Maus

1.1.1 Der *t*-Komplex: Ein egoistisches Chromosom führt zur Verschiebung der Vererbungsrate in der Maus

Die von Gregor Mendel im 19. Jahrhundert beschriebenen und scheinbar universell geltenden Regeln der Vererbungslehre wurden bereits im 20. Jahrhundert in ihrer Absolutheit erschüttert. Der Grund hierfür war das Auftreten von Abweichungen von der 2. mendelschen Regel während der Keimzellbildung (Spaltungsgesetz).

Auf Grund der Tatsache, dass Gene in Säugetierzellen in doppelter Form, lokalisiert auf homologen Chromosomen, zur Verfügung stehen (Diploidie), wird sichergestellt, dass während der Entstehung der haploiden Gameten keine Erbinformation verloren geht. Durch die Befruchtung der haploiden Eizelle mit einer haploiden Samenzelle wird die Diploidität des Organismus wieder hergestellt. Im Detail werden bei der Bildung der Gameten in einer ersten meiotischen Teilung die homologen Chromosomen voneinander getrennt (1. Reifeteilung) und in einer zweiten meiotischen Teilung die Chromatiden eines Chromosoms in zwei Keimzellen verpackt (2. Reifeteilung). Für die Weitergabe an die nächste Generation bedeutet dies, dass jedes Allel mit gleicher Wahrscheinlichkeit vererbt wird. Welches Allel dabei an die nächste Generation weiter gegeben wird, entscheidet dabei der Zufall. Eine erste Abweichung von dieser zufälligen Vererbung der Allele an die nächste Generation wurde im Jahre 1942 von Marcus M. Rhoades durch seine Forschungen am Mais publiziert (Rhoades et al., 1942). Nur 15 Jahre später kamen erstmals die Bezeichnungen *Meiotic Drive* und *Segregation Distortion* für diese Anomalien auf (Sandler & Novitski, 1957).

Eine ebenfalls sehr bekannte Abweichung von der Regel der zufälligen Vererbung eines Allels zeigt sich bei der nicht-mendelschen Vererbung in der Maus. Die hier beobachtete Schwankung bei der Vererbung von Merkmalen wird durch eine große chromosomale Region auf dem proximalen Teil von Chromosom 17 hervorgerufen (Lyon, 1984).

Diese Anomalie wurde 1932 in Mauspopulationen entdeckt, in der es zu Abweichungen bei der Vererbung eines Merkmals kam, welches die Schwanzlänge beeinflusst

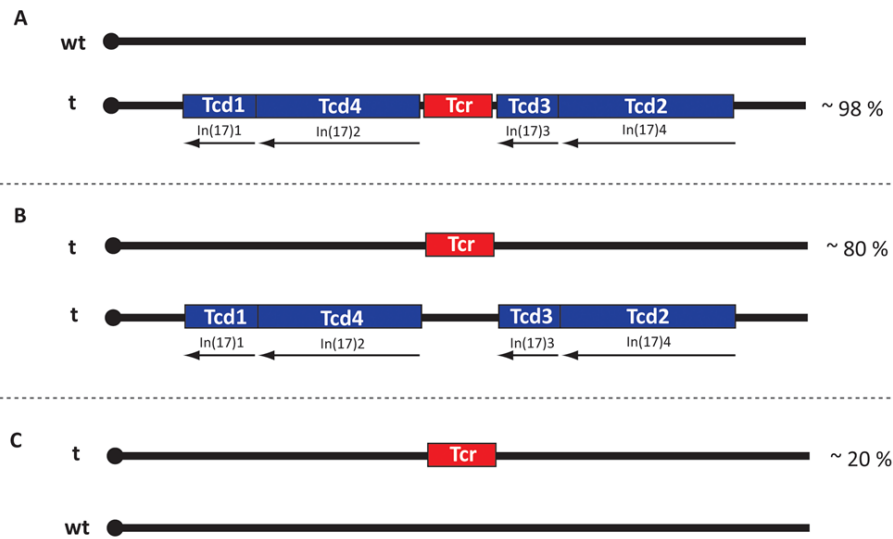
(Dobrovolskaia-Zavadskaia & Koboziëff, 1932; Chesley & Dunn, 1936). Die damaligen Beobachtungen ließen die Vermutung zu, dass das Merkmal Schwanzlänge in der Maus durch die Verknüpfung eines chromosomalen Bereiches (t) mit dem Gen *Brachyury* (T) zustande kommt.

Phänotypisch besitzen heterozygote $t/+$ -Mäuse einen normal langen Schwanz, in $T/+$ -Tieren ist der Schwanz verkürzt. Dieser Phänotyp wird in T/t -Mäusen durch die Anwesenheit des chromosomalen Bereiches t verstärkt, sodass diese ohne Schwanz zur Welt kommen. Nach Kreuzungen von männlichen T/t -Mäusen mit $+/+$ -Weibchen kamen nach Beobachtung mehr als 85 % der Nachkommen mit einem normal langen Schwanz zur Welt (Chesley & Dunn, 1936). Nach Mendel müssten erwartungsgemäß 50 % der Nachkommen mit einem normal langen Schwanz ($t/+$) und 50 % der mit einem verkürzten Schwanz ($T/+$) geboren werden. Die Verteilung dieses Merkmals folgte allem Anschein nach nicht den mendelschen Regeln. Wurden dagegen T/t -Weibchen mit $+/+$ -Männchen gekreuzt, zeigten 50 % der Nachkommen eine normale ($t/+$) und 50 % eine verkürzte ($T/+$) Schwanzlänge (Chesley & Dunn, 1936). In diesem Fall der Kreuzung kam es zu keiner Abweichung von den Vererbungsregeln.

Fälschlicher Weise wurde t anfänglich als Allel von *Brachyury* (T) beschrieben und das Phänomen der Störung der mendelschen Vererbung somit einem Gen zugeordnet. Erst später wurde klar, dass t eine chromosomale Region von 30 bis 40 Mb ist, die die nicht-mendelsche Vererbung in der Maus verursacht und die Nomenklatur wurde von t -Allel in t -Komplex geändert (Silver, 1985; Lyon et al., 1988; Hammer et al., 1989).

In wild lebenden Mauspopulationen existiert der t -Komplex in zwei Varianten, der wt -Form und als mutierter t -Haplotyp (Silver, 1985). Ist ein männliches Tier heterozygot für den gesamten t -Komplex und trägt beide, sowohl die wt -Form ($+$) als auch den t -Haplotyp (t), dann produziert dieses Mausmännchen zwar in gleichem Maße t - und $+$ -tragende Spermien, der t -Haplotyp wird jedoch mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit von bis zu 98 % an die Nachkommen weiter gegeben (Lyon, 1984; Olds-Clarke, 1986; Schimenti, 2000; Lyon, 2005). Die nicht-mendelsche Vererbung in der Maus (*Transmission Ratio Distortion*) beschreibt demnach den Umstand, dass die Merkmale t und $+$ eines heterozygoten Mausmännchens ($t/+$) bei der Befruchtung einer Zygote ungleich weitergegeben werden. Das Merkmal t (hier t -Komplex), wird in diesem Fall von Männchen bevorzugt an die nächste vererbt. Man spricht in diesem Zusammenhang auch vom egoistischen t -Komplex des Chromosoms 17 der Maus.

1.1.2 Genetische Grundlagen des Maus *t*-Komplexes



Schimenti et al. 2000, Lyon et al. 2003 (modifiziert)

Abbildung 1: Genetische Organisation verschiedener *t*-Haplotypen. *Tcd*1-4 (blau): *t*-Komplexes Distorter, *Tcr* (rot): *t*-Komplexes Responder. *In(17)*1-4: Inversionen genomischer Regionen im *t*-Komplex. A: Genetischer Vergleich des *wt*-Chromosoms und des vollständigen *t*-Komplexes, bestehend aus *Tcds* und *Tcr*, von Chromosom 17 der Maus führt in einem Mausmännchen zur bevorzugten Vererbung des *t*-Allels (98 %). B: Genetischer Vergleich zweier partieller *t*-Haplotypen. Der *Responder* (*Tcr*-tragender *t*-Haplotyp) und die *Distorter* (*Tcd*-tragender *t*-Haplotyp) liegen auf unterschiedlichen Chromosomen. Die Kombination dieser partieller *t*-Haplotypen in einem Mausmännchen führt zur erhöhten Vererbung (ca. 80 %) des *Tcr*-tragenden Chromosoms. *Tcr* wirkt dabei in *cis*, *Tcds* dagegen in *trans*. C: Genetischer Vergleich eines partiellen *Tcr*-tragenden *t*-Haplotyps und eines *wt*-Chromosomen. Die Kombination dieser Chromosomen in einem Mausmännchen führt zur verminderten Vererbung (ca. 20 %) des *Tcr*-tragenden Chromosoms (Schimenti et al.,2000, Lyon et al.,2003).

Wie bereits beschrieben kann der *t*-Komplex auf Chromosom 17 der Maus in zwei Varianten auftreten, als *wt*-Form und als *t*-Haplotyp (Silver, 1985). Trotz seiner Größe von fast einem Drittel des proximalen Teils von Chromosom 17 kommen Rekombinationen zwischen dem mutierten *t*-Haplotyp und der *wt*-Form sehr selten vor während der Meiose (Hammer et al., 1989). Die geringe Rekombinationsrate lässt sich auf genetischer Ebene durch vier große Inversionen chromosomaler Bereiche innerhalb des *t*-Komplexes (*In(17)*1 bis *In(17)*4, Abbildung 1, A) begründen (Silver & Artzt, 1981). Durch diese geringe Rekombinationsrate wird der *t*-Komplex in der Regel als genetische Einheit an die nächste Generation weiter gegeben, wodurch die

Kombination der für *Transmission Ratio Distortion* relevanten funktionellen Einheiten erhalten bleibt.

In seltenen Fällen kam es jedoch zu Rekombinationen zwischen dem mutierten *t*-Haplotyp und der *wt*-Form, wodurch sogenannte partielle *t*-Haplotypen entstanden sind. So wird ein vollständiger *t*-Haplotyp zum Beispiel an bis zu 98 % der Nachkommen weiter gegeben und besitzt die höchste erreichbare Vererbungsrate (Abbildung 1, A). Andere partielle *t*-Haplotypen weisen, je nachdem welche chromosomalen Bereiche des *t*-Haplotyps deletiert sind, verringerte Vererbungsrate auf. Dies führt zwangsläufig zu der Annahme, dass die hohe Vererbungsrate des *t*-Komplexes durch eine Kombination verschiedener funktioneller Einheiten verursacht wird (Lyon, 1984; Lyon, 1987, Lyon 1990; Silver & Buck, 1993).

Basierend auf genetischen Studien wurden die funktionellen Einheiten des *t*-Haplotyps charakterisiert und schließlich in zwei Arten von Genen eingeteilt (Lyon, 1984). Mary Lyon beschreibt nach ihren genetischen Analysen, dass mehrere mutierte *Distorter* Gene (*Tcds* für *t-complex distorters*) additiv auf einen sogenannten *Responder* (*Tcr* für *t-complex responder*) wirken (Lyon, 1984). Die Ergebnisse der Analysen machten deutlich, dass der *Responder* dabei ausschließlich in *cis* wirkt und somit nur die Weitergabe der Spermienzellen beeinflusst, die auch den *Responder*-Genlocus tragen (Abbildung 1, B). Diese *t*-Form des *Responders* nimmt in Lyons Modell eine entscheidende Rolle ein und muss in heterozygoter Form anwesend sein, um *Transmission Ratio Distortion* bewirken zu können (Lyon, M. F. 1984). Doch der *Responder* allein führt nicht zu der stark erhöhten Vererbungsrate des *t*-Komplexes von bis zu 98 %. Im Gegenteil, der *Responder* ohne die *Distorter* Gene führt zu einer verringerten Vererbung des *Responder* tragenden Chromosoms von nur 20 %. Dieser Effekt wird auch als *t-low* Effekt (Abbildung 1, C) bezeichnet (Lyon, M. F. 1984). Daraus kann man schließen, dass erst durch die *Distorter*-Gene in Kombination mit *Tcr*, die selektiven Eigenschaften des *Responder* ans Tageslicht kommen und somit die Kombination der zwei Arten von Genen zu *Transmission Ratio Distortion* führt.

Die *Distorter* Gene wirken im Gegensatz zum *Responder* in *cis* und in *trans*. Dies hat zur Folge, dass die *Distorter* nicht zwangsläufig auf demselben Chromosom wie der *Responder* lokalisiert sein müssen, um die Wirkung des *Responders* zu entfalten (Abbildung 1, B).

Ein interessanter Aspekt ist, dass Homozygotie einiger *Distorter* Sterilität mit sich bringt (Lyon, 1986; Lyon, 1987). Die einzeln wirkenden *Distorter* scheinen zusammengekommen eine so negative Wirkung zu besitzen, dass selbst der *Responder*

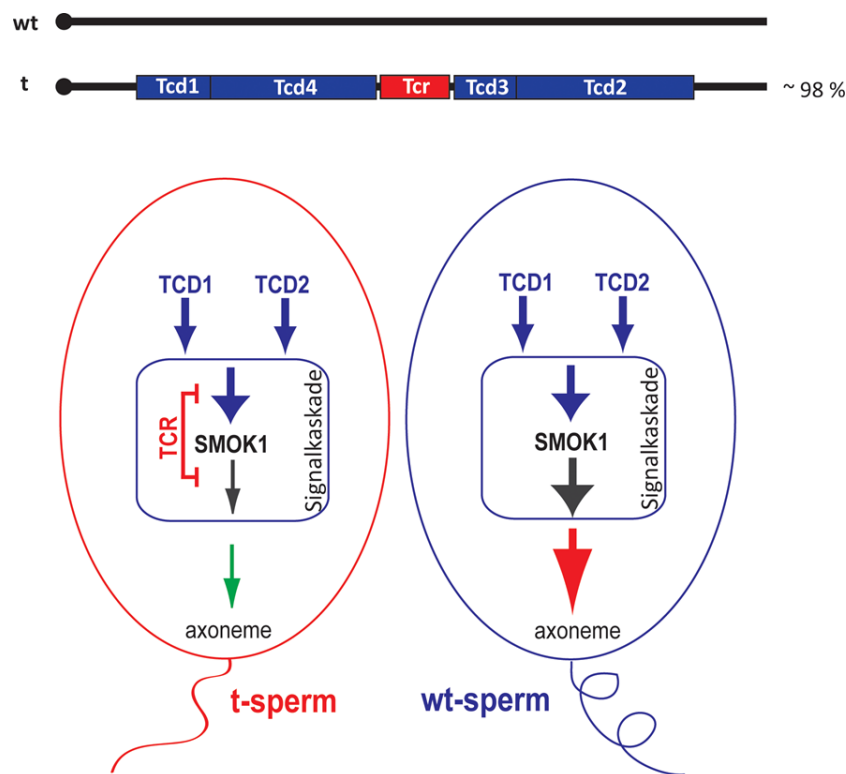
nicht mehr in der Lage ist, diese auszugleichen. Männliche Tiere, homozygot für den gesamten *t*-Haplotyp, sind nicht lebensfähig. Homozygotie für alle *Distorter* scheint mit Lethalitätsfaktoren verbunden zu sein, die sterile Männchen aus der Population eliminieren (Lyon, 1986). Eine Spekulation ist, dass eben die *Distorter*, die für *Transmission Ratio Distortion* verantwortlich sind, auch Sterilität bewirken können – ein Grund warum sich der *t*-Haplotyp evolutionär nicht in der gesamten Mauspopulation ausbreiten konnte (Lyon, 1986).

Diese Beobachtungen führten zur Entwicklung eines Modells, welches basierend auf genetischen Daten das Phänomen der nicht-mendelschen Vererbung des *t*-Haplotyps in *t/+*-Männchen erklärt (Lyon, 1984; Lyon, 1986). Die *Distorter*-Gene schädigen auf unbekannte Weise die gesamte Spermienpopulation von *wt*- und *t*-Spermien durch ihre Wirkung in *trans* und setzen die Befruchtungswahrscheinlichkeit herab. Die Spermien die den in *cis* wirkenden *Responder*-Locus tragen, werden jedoch selektiv vor dieser nachteiligen Wirkung geschützt. Dies hat zur Folge, dass in dem Teil der Spermienpopulation, die unter *Distorter*- und *Responder*-Einfluss steht, die Befruchtungswahrscheinlichkeit positiv beeinflusst wird und erhalten bleibt (Lyon, 1984; Lyon, 1986).

1.1.3 Die Verschiebung der Vererbungsrate ausgelöst durch einen veränderten Signalmechanismus

Der nächste Schritt zur Aufklärung des Phänomens *Transmission Ratio Distortion* erfolgte durch die Klonierung und Charakterisierung des *Responders* (*Tcr*) im Jahr 1999 durch Bernhard G. Herrmann.

Der *Responder* ist die mutierte Form einer Spermien-Motilitäts-Kinase (SMOK1), einer neuen Klasse von Serin/Threonin-Proteinkinasen, und wird auch als SMOK^{TCR} oder kurz als TCR bezeichnet. Genauer kodiert der *Responder* für ein Fusionstranskript, welches durch genetische Rekombination der Loci des *Rsk3*- und des *Smok1*-Gens entstanden ist (Kispert et al., 1999; Herrmann et al., 1999). Im Vergleich zu der *wt*-SMOK1 besitzt diese mutierte *Responder*-Kinase eine stark verringerte Aktivität, aufgrund von Mutationen in der Kinase-Domäne (Herrmann et al., 1999). Protein-Kinasen sind global gesehen Signalüberträger. Dies hatte zur Folge, dass der molekulare Mechanismus einer veränderten Signaltransduktion dieser Kinase erstmals als Grundlage für die hohe Vererbungsrate des *t*-Haplotyps postuliert wurde (Herrmann et al., 1999).



Herrmann et al. 1999 (modifiziert)

Abbildung 2: Molekulares Zusammenspiel der *t*-Komplex Faktoren. Oben: Genetischer Vergleich des *wt*-Chromosoms und des *t*-Haplotyps, bestehend aus *Tcd1* bis *Tcd4* und dem *Responder* (*Tcr*). Der *t*-Komplex führt in einem heterozygoten Mausmännchen (*t/+*) zur bevorzugten Vererbung des *t*-Allels. Unten: Hypothese der TRD-Signalkaskade. Die TCDs stehen oberhalb von SMOK1 und führen, sowohl in *wt*-Spermien, als auch in *t*-Spermien zur verstärkten Aktivierung der SMOK1-Kinase (Hyperaktivierung). Hyperaktiviertes SMOK1 wirkt in unbekannter Art auf das Axonem und führt zu einer gestörten Flagellenbewegung. In *t*-Spermien, nicht aber in *wt*-Spermien, kann das *Responder*-Protein (TCR) die gesteigerte SMOK1-Kinaseaktivität ausgleichen. Dies führt lediglich in den *t*-Spermien zu einer normal regulierten Flagellenfunktion (Herrmann et al., 1999).

Dieses erweiterte Modell (Abbildung 2) besagt, dass die Spermien-Motilitäts-Kinase (SMOK1) das zentrale Molekül des TRD-Signalwegs darstellt. Die *Distorter*-Proteine stehen im Signalweg oberhalb der Kinase und regulieren diese auf unbekannte Weise, was zu einer verstärkten Aktivität von SMOK1 führt. Das *Responder*-Protein wirkt hingegen als dominant-negatives Molekül und ist in der Lage diese verstärkte Aktivierung in Zellen, die den *Responder*-Lokus tragen, auszugleichen. Wenn TCR nicht

anwesend ist, kann die verstärkte Aktivität von SMOK1 jedoch nicht normalisiert werden. Die in erhöhtem Maße aktivierte Kinase wirkt dann direkt oder indirekt auf Strukturen im Axonem, wodurch es zu Änderungen in der Flagellenfunktion und zu einer negativen Verschiebung der Befruchtungswahrscheinlichkeit in diesen Spermien kommt (Herrmann et al., 1999). Durch dieses molekular Modell von Bernhard G. Herrmann konnte auch der *t-low-effect* (Abbildung 1, C), welcher bereits von Mary Lyon beobachtet wurde, erstmals molekular erklärt werden.

Die Besonderheit in diesem veränderten Signalmechanismus bildet demnach das *Responder*-Protein (TCR), welches spezifisch nur in den Zellen wirkt, die auch das *Responder*-Gen tragen. Wie ist es jedoch möglich, dass die Genprodukte des *Responders* und somit deren positiver Einfluss für einen Teil der Spermienpopulation exklusiv ist?

Spermienvorläuferzellen sind während der Bildung von Spermatozoen durch zytoplasmatische Brücken in einem Synzytium miteinander verbunden (Huckins, 1978). Durch diese Brücken können Genprodukte wie Proteine und mRNA zwischen benachbarten Zellen ausgetauscht werden (Ventelä et al., 2003). Genetisch verschiedene Zellen sind somit den selben Faktoren unterlegen und folglich phänotypisch identisch (Ventelä et al., 2003). Zellulär müssen die *Responder*-Genprodukte von diesem Austausch zwischen benachbarten Zellen ausgeschlossen sein, um selektiv auf die Spermien wirken zu können, die den *Responder*-Locus tragen.

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Genprodukte des *Responders* nur in 50 % der Keimzellpopulation nachweisbar sind (Véron et al., 2009). Das *Responder*-Transkript ist in runden Spermatiden in der Hälfte dieser Zellen lokalisiert und das *Responder*-Protein wurde in reifen Spermatozoen ebenfalls in 50 % der Zellpopulation nachgewiesen (Véron et al., 2009). Zudem konnte die Expression des *Responder*-Transkripts erst vergleichsweise spät in haploiden runden Spermatiden gezeigt werden. Das *Responder*-Protein wurde in Flagellen bereits elongierter Spermatiden im Lumen eines Hodenkanälchens beobachtet (Véron et al., 2009). Scheinbar unterliegt die Synthese des *Responder*-Proteins zusätzlich einer noch nicht geklärten translationellen Kontrolle. Wahrscheinlich spielt bei der Restriktion des Proteins das ungewöhnlich lange 5'UTR des *Responder* eine entscheidende Rolle (Véron et al., 2009).

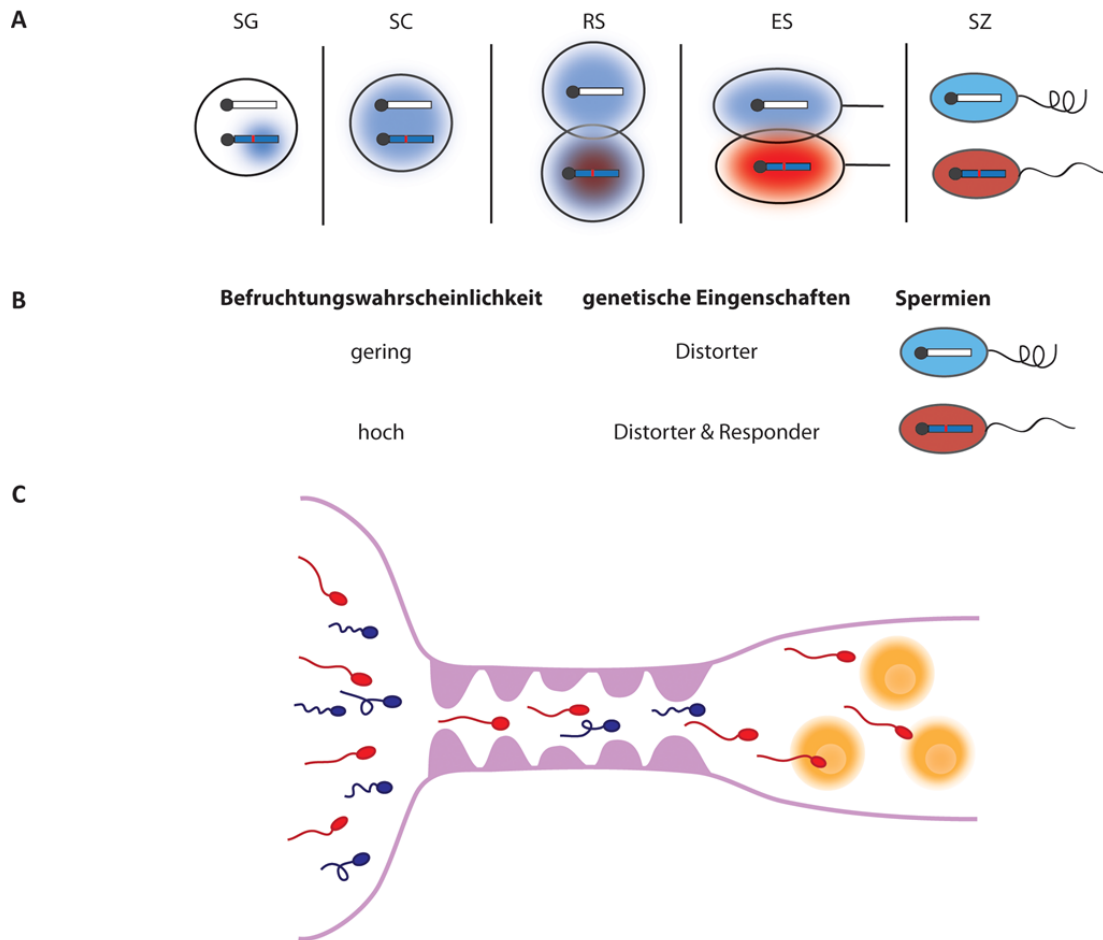


Abbildung 3: Zelluläre Expression und Organisation der *t*-Komplex Faktoren. A: *Distorter* Genprodukte (blau), *Responder*-Genprodukte (rot), SG: Spermatogonium, SC: Spermatocyte, RS: runde Spermatiden, ES: elongierte Spermatiden, SZ: Spermatozoen. *Distorter* Genprodukte werden früh in der Spermatogenese exprimiert und können über zelluläre Brücken zwischen benachbarten Zellen ausgetauscht werden (Huckins, 1978). Die *Tcd*-Genprodukte wirken folglich in *trans*. *Responder*-Genprodukte werden später in der Spermatogenese exprimiert und nicht zwischen benachbarten Zellen ausgetauscht, sie wirken in *cis* (Véron et al., 2009). B: In diesem Fall der Spermatogenese entwickeln sich demzufolge zwei Populationen von Spermien (Olds-Clarke, 1989). Blaues *wt*-Spermium: Einfluss von *Tcds*, gestörte Flagellenfunktion und folglich geringe Befruchtungswahrscheinlichkeit. Rotes *t*-Spermium: Einfluss von *Tcds* und *Tcr*, normale Flagellenfunktion und folglich hohe Befruchtungswahrscheinlichkeit. C: Schematische Darstellung eines Eileiters mit *t*-Spermien (rot) und *wt*-Spermien (blau). Durch die normale Flagellenbewegung der *t*-Spermien, haben diese einen Vorteil gegenüber den *wt*-Spermien und können die Eizelle mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit befruchten (Olds-Clark et al., 1997).

Die *Responder*-tragenden Spermien besitzen somit einen Vorteil gegenüber den Spermien, die lediglich unter *Distorter*-Einfluss stehen und können somit die Eizelle mit einer hohen Wahrscheinlichkeit befruchten. Dies deutet zwangsläufig auf die Bildung von zwei genetisch und phänotypisch unterschiedlichen Spermienpopulationen.

Die Präsenz von zwei Populationen mit unterschiedlichen Merkmalen bezüglich der Schwimmeigenschaften in einem heterozygoten *t/+*-Männchen, wurde bereits im Jahr 1993 von Patricia Olds-Clarke beobachtet. Dabei konnte Olds-Clarke qualitative Unterschiede hinsichtlich der Geschwindigkeit und Linearität der Schwimmbewegung zwischen diesen zwei Spermienpopulationen zeigen (Olds-Clarke & Johnson, 1993). Eine detaillierte Zuordnung dieser Spermienpopulationen mit ihren Phänotypen zu den entsprechenden Genotypen konnte experimentell jedoch nicht gezeigt werden. Dennoch liegt die Vermutung nahe, dass *t*-Spermien unter *Responder*- und *Distorter*-Einfluss eine normale Beweglichkeit aufweisen. *Wildtyp*-Spermien, welche allein unter dem Einfluss der *Distorter* stehen, zeigen eine gestörte Motilität. Die *t*-Spermien besitzen somit eine bessere Beweglichkeit und folglich eine erhöhte Fertilisationswahrscheinlichkeit gegenüber den *wt*-Spermien (Abbildung 3).

Das Phänomen der Verschiebung der Vererbungsrate durch den *t*-Haplotyp wurde weiterhin durch die Klonierung und Charakterisierung des ersten *Distorters*, welcher innerhalb des genomischen Bereiches für *Tcd1* lokalisiert ist, vorangetrieben (Bauer et al., 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass *Tagap1* (*T-cell activation Rho GTPase-activating protein*) als *Distorter* funktionell ist und die Vererbungsrate beeinflussen kann. Männchen, die wildtyp *Tagap1* überexprimierten, waren verglichen zu nicht *Tagap1* überexprimierenden Männchen in der Lage, einen *Responder*-tragenden partiellen *t*-Haplotyp stärker zu vererben (Bauer et al., 2005). Die Expression von wildtyp TAGAP1 phänokopiert demnach die Funktion eines *Distorters* im *t*-Haplotyp (Bauer et al., 2005). Durch die genetischen Daten der Transgen-Analysen konnte geschlossen werden, dass *Tagap1* im *t*-Haplotyp als Hypermorph vorliegt (Bauer et al., 2005). Tatsächlich ist der Locus für *Tagap1*-Varianten im *t*-Haplotyp viermal vorhanden, was auf eine gesteigerte Aktivität von *Tagap1*-Genprodukten schließen lässt.

Tagap1 kodiert für ein G-Protein aktivierendes Molekül (*GTPase activating protein* oder *GAP*), welches als Komponente des RHO-Signalweges ebenfalls Teil einer Signalübertragung ist. Biochemische Experimente zeigten, dass TAGAP1 als GTPase aktivierendes Protein die Hydrolyse von RHOA-GTP zu RHOA-GDP verstärkt und somit RHOA inhibiert (Bauer et al., 2005). Neben der Auflösung des Rätsels des

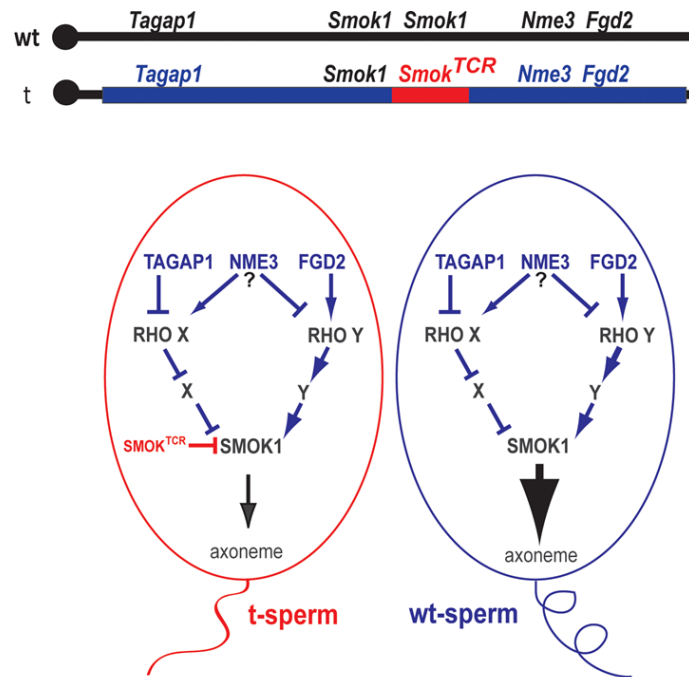
ersten *Distorters* konnte somit die Wichtigkeit von kleinen G-Proteinen im TRD-Signalweg erstmals gezeigt werden. Ein Zusammenhang zwischen RHOA und der nicht-mendelschen Vererbung in der Maus wurde genetisch jedoch nicht gezeigt.

Der zweite *Distorter*, *Fgd2* (*Rho guanine nucleotide exchange factor 2*) ist innerhalb der genomischen Region von *Tcd2* lokalisiert (Bauer et al., 2007) und auch eine Komponente von RHO-Signalwegen (Huber et al., 2008). FGD2 ist als GTP-Austauschfaktor (*guanine nucleotide exchange factor* oder *GEF*) in der Lage das kleine G-Protein CDC42 zu aktivieren (Huber et al., 2008). Der Funktionsverlust, das heißt der *Knock-out* von *Fgd2* führt zu einer Reduktion der Vererbung des *t*-Haplotyps, was direkt den Zusammenhang mit dem Signalweg von TRD verdeutlicht (Bauer et al., 2007).

Ein weiterer *Distorter*, *Nme3* (*Nucleoside diphosphate kinase 3*) ist genetisch im Locus *Tcd1* des *t*-Haplotyps lokalisiert und wurde kürzlich publiziert (Bauer et al., 2012). Dieser *Distorter* kodiert für eine Nukleosid-Diphosphat-Kinase, die durch Phosphorylierung in der Lage ist, GDP in GTP umzuwandeln und somit direkt den Aktivator kleiner G-Proteine zu bilden. Der *Knock-out* des *Nme3*-Gens führt zu einer Reduktion der Vererbungsrate und phänotypisiert somit die Funktion eines *Distorters* im *t*-Haplotyp (Bauer et al., 2012).

Die Genprodukte der *Distorter* verhalten sich im Vergleich zu den Genprodukten des *Responders* erwartungsgemäß während der Spermatogenese. Für die *Distorter* kommt es zu einer in der Spermatogenese frühen Expression der mRNA (Bauer et al., 2005; Bauer et al., 2007; Bauer et al., 2012). Die genetischen Daten zeigen, dass diese Genprodukte zwischen benachbarten Zellen ausgetauscht werden (Lyon, 1984; Lyon, 1990; Bauer et al., 2005; Bauer et al., 2007; Bauer et al., 2012).

Durch die Klonierung und Charakterisierung des *Responders* (Herrmann et al., 1999; Véron et al., 2009) und der *Distorter* (Bauer et al., 2005; Bauer et al., 2007; Bauer et al., 2012) konnte das molekulare Modell, welches die Verschiebung der Vererbungsrate im *t*-Haplotyp in großen Teilen erklärt, schließlich um die kleinen RHO-GTPasen erweitert werden (Abbildung 4).



Bauer et al. 2012 (modifiziert)

Abbildung 4: Molekulares Zusammenspiel der *t*-Komplex Faktoren. Oben: Genetischer Vergleich des *wt*-Chromosoms und des vollständigen *t*-Komplexes, bestehend aus den publizierten *Tcds* (*Tagap1*, *Nme3* und *Fgd2*) und *SMOK^{Tcr}*, führt in einem Mausmännchen zur bevorzugten Vererbung des *t*-Allels. Unten: Hypothese der TRD-Signalkaskade, basierend auf genetischen Daten (Bauer et al., 2005; Bauer et al., 2007, Bauer et al., 2012). TAGAP1, FGD2 und NME3 führen, sowohl in *wt*-Spermien, als auch in *t*-Spermien, über kleine RHO-Proteine auf separaten Signalwegen, zur verstärkten Aktivierung der SMOK1-Kinase (Hyperaktivierung). Hyperaktiviertes SMOK1 wirkt in unbekannter Art auf das Axonem und führt zu einer gestörten Flagellenbewegung (Herrmann et al., 1999). In *t*-Spermien, nicht aber in *wt*-Spermien, kann der *Responder* *SMOK^{Tcr}* die gesteigerte SMOK1-Kinaseaktivität ausgleichen (Véron et al., 2009; Herrmann et al., 1999). Dies führt lediglich in den *t*-Spermien zu einer normal regulierten Flagellenfunktion.

Im Mittelpunkt dieses Modells steht, wie im Modell von Bernhard G. Herrmann die Spermien-Motilitäts-Kinase, die ihrerseits auf nicht bekannte Weise die Spermienbeweglichkeit beeinflusst (Herrmann et al., 1999).

TAGAP1 inhibiert ein RHO-Protein, welches wiederum direkt oder indirekt über weitere molekulare Schalter hemmend auf SMOK1 wirkt. Durch die Inhibition eines Inhibitors kommt es zu einer verstärkten Aktivierung von SMOK1.

FGD2 dagegen aktiviert eine GTPase, die ihrerseits ebenfalls als Aktivator wirkt. Auch mit dieser zweiten Signalkaskade wird eine Aktivierung von SMOK1 erreicht. Folglich wird SMOK1 von den zwei bekannten *Distorter*-Proteinen, die oberhalb des

Signalweges stehen, in hohem Maße aktiviert (Bauer et al., 2007).

Die Zuordnung des dritten *Distorter*-Proteins NME3, zu dem aktivierenden bzw. dem inhibierenden Zweig der Signalkaskade, ist nicht eindeutig geklärt (Bauer et al., 2012). Dennoch lässt sich vermuten, dass durch die gezielte Bildung von GTP eventuell der aktivierende Signalweg verstärkt beeinflusst wird (Bauer et al., 2012). Das *Responder*-Protein ist jetzt in der Lage in dem Teil der Spermien, die den *Tcr*-Locus tragen, ein normales Niveau an SMOK1-Aktivität herzustellen. Spermien, die den *Tcr*-Locus nicht tragen, profitieren von diesem Effekt jedoch nicht. In *Tcr*-tragenden Spermien ist nach Einfluss des *Responders* ein normales Niveau an SMOK1-Kinaseaktivität, eine normale Flagellenbewegung und somit eine höhere Befruchtungswahrscheinlichkeit dieses Spermientyps vorhanden. Die anderen Spermien besitzen dagegen noch immer eine stark erhöhte SMOK1-Aktivität, was zu einer Beeinträchtigung der Motilität und zu einer geringen Befruchtungswahrscheinlichkeit führt.

Wie SMOK1 die Beweglichkeit eines Spermatozoon beeinflusst bzw. auf welche Faktoren die Kinase wirkt, ist bis zum heutigen Zeitpunkt unklar. Spekulationen deuten auf eine Wirkung der SMOK1-Kinase am Axonem bzw. an axonemalen Strukturen des Spermischwanzes (Herrmann et al., 1999, Véron et al., 2009). Die Identifikation und anschließende Analyse von möglichen SMOK1-Interaktionspartnern in Spermatozoen der Maus könnte weitere Einblicke in die Regulation der Spermienmotilität liefern und würde letztlich zum verbesserten Verständnis des TRD-Signalwegs führen.

1.2 Das Hodengewebe der Maus

1.2.1 Der strukturelle Aufbau vom Hodengewebe

Die Spermatogenese – die Entstehung von männlichen Keimzellen – ist ein komplexer Prozess im Hodengewebe, der in der Maus postnatal nach einem Zeitraum von etwa 35 Tagen abgeschlossen ist. In diesem Intervall werden aus undifferenziierten und diploiden Spermatogonien, die an der Basalmembran des Hodenkanälchens liegen, diploide Spermatocyten gebildet, welche sich durch Meiotische Teilung (Reduktionsteilung) zu haploiden, runden Spermatiden entwickeln. Im weiteren Prozess differenzieren runde zu elongierte Spermatide und bilden schließlich durch Reifung des Spermienkopfes und des Flagellums reife Spermatozoen (Abbildung 5 und Abbildung 6) mit einem haploiden Chromosomensatz (Oakberg, 1956; Moens & Hugenholz, 1975; Russell et al., 1990). Die reifen Spermienzellen wandern durch das

Lumen in den Rete Testis und schließlich weiter in den Nebenhoden (Epididymis), wo sie weitere Reifungsprozesse durchlaufen und gespeichert werden.

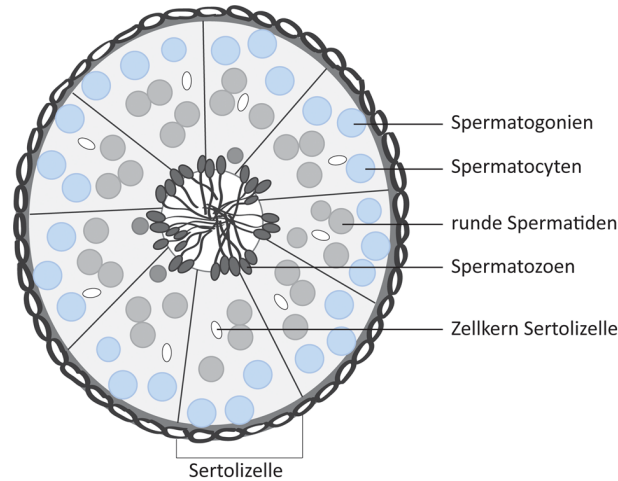


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Querschnitts durch ein Hodenkanälchen. Die Reifung der undifferenzierten Spermato gonien, zu Spermato cyten und runden Spermatiden bis hin zu reifen Spermatozoen erfolgt beginnend am Rand der Sertolizelle (Außen) nach Innen des Hodenkanälchens (Lumen).

Der Hoden selbst kann in zwei Hauptkompartimente unterteilt werden, dem Stroma (Interstitium) und den Samenkanälchen (Tubuli seminiferi). Das Interstitium, das Gewebe zwischen den gewundenen Samenkanälchen besteht vornehmlich aus Bindegewebe, Blut- und Lymphgefäßen, Leydigzellen und Macrophagen (Fawcett et al., 1973; Mori & Christensen, 1980; Hutson, 1994). Die Samenkanälchen, die Orte der Spermatogenese sind umgeben von einer Bindegewebshülle mit Myofibroblasten und einer Basalmembran (Fawcett et al., 1973; Dym & Fawcett, 1970). Sertoli-Zellen erstrecken sich von der Peripherie des Samenkanälchens bis zum *Lumen* und bilden die Epithelumgebung für die Reifung der verschiedenen Keimzellstadien. Mit ihren Zellausläufern umfassen Sertoli-Zellen die einzelnen Keimzelltypen mehr oder weniger vollständig. Sie sind etwas oberhalb der Basalmembran miteinander über *tight junctions* verbunden, sodass sich innerhalb der Sertoli-Zelle eine basale Zone (enthält Spermato gonien) und eine luminale Zone (enthält alle übrigen Stadien der Spermatogenese) ergeben. Spermato gonien, Spermato cyten und Spermatide sind im Verlauf der Spermatogenese über zytoplasmatische Brücken in einem Synzytium miteinander verbunden, da sich die Zellteilungen unvollständig vollziehen (Abbildung 6). Genprodukte wie mRNA oder Proteine können somit zwischen benachbarten Keim-

zellen ausgetauscht werden (Moens & Hugenholtz, 1075; Huckins, 1978; Ventelä et al., 2003).

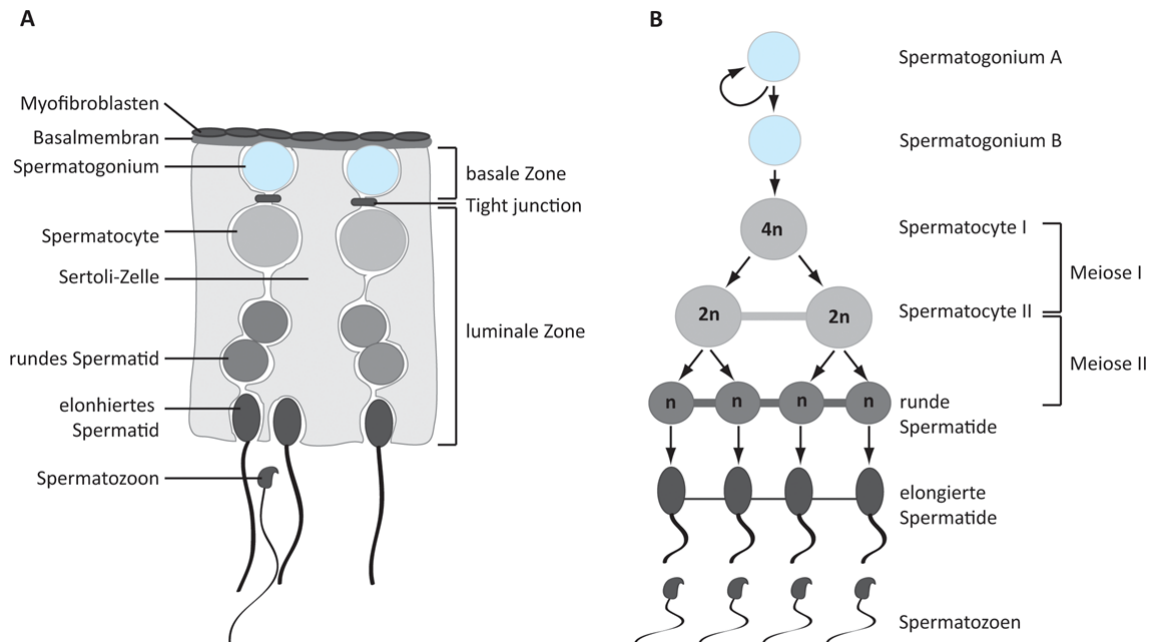


Abbildung 6: Darstellung der Spermatogenese in einem kleinen Ausschnitt eines Hodenkanälchens (A) und schematisch mit Differenzierung der Keimzellen von Spermatogonien bis Spermatozoen (B).

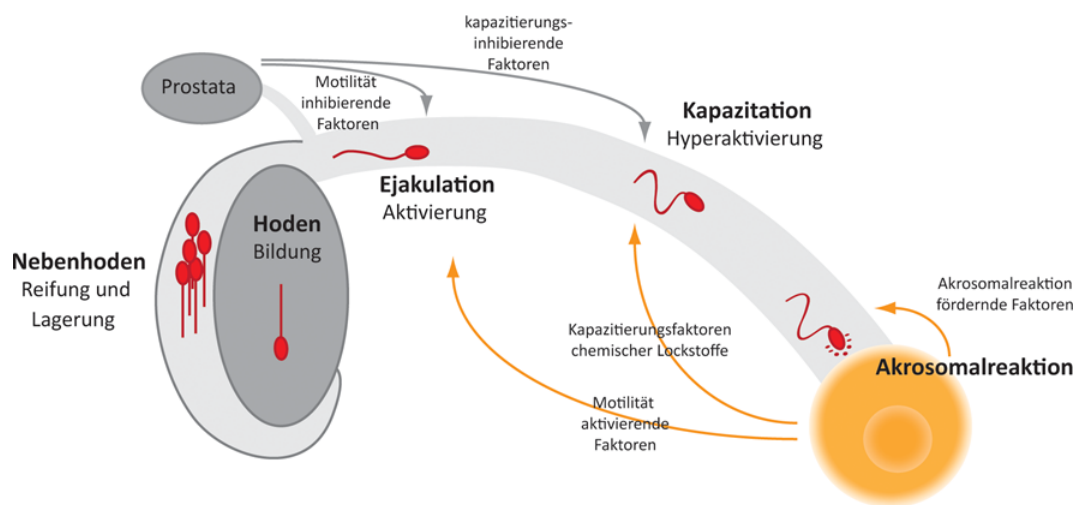
1.2.2 Die Entstehung von Spermatozoen

Die Spermatogenese wird grundlegend in drei Phasen unterteilt. Einer proliferativen Phase, in der durch Mitotische Teilung eine Vermehrung der undifferenzierten Spermatogonien innerhalb eines Synzytiums erreicht wird. Dieser Phase schließt sich die meiotische Phase an. Hier entstehen nach Reorganisation des genetischen Materials homologer Chromosomen (*crossing-over*) aus primären diploiden Spermatocyten, sekundäre haploide Spermatocyten (Meiose I), indem die homologen Chromosomen voneinander getrennt werden. Diese Prophase der Meiose I dauert bei der Maus ca. zwei Wochen. Im weiteren Verlauf der meiotische Phase werden die Chromatiden eines Chromosoms voneinander getrennt und schließlich in Spermatozoen verpackt (Meiose II). Die letzte der drei Phasen bildet die postmeiotische Phase (Spermiogenese), in der die haploiden Spermatozoen zu befruchtungsfähigen Spermatozoen komplettiert werden (Russel et al., 1990). In dieser Zeit bilden sich das Flagellum und das Akrosom aus. Außerdem wird der haploide Zellkern von seiner runden Form in eine deutlich kleinere, kondensierte, hakenförmige Struktur gebracht.

1.3 Entstehung der Flagellenbewegung und Spermienmotilität

1.3.1 Spermienmotilität

Die Bildung der Spermatozoen erfolgt im Hoden während der Spermatogenese und Spermio-genese. Durch Modifikationen und Aktivierung der Beweglichkeit reifen die noch unbeweglichen Spermienzellen erst im Verlauf der Befruchtung vollständig, um schließlich nach erfolgreicher Akrosomenreaktion mit der Eizelle zu verschmelzen.



Yoshida et al., 2008 (modifiziert)

Abbildung 7: Schematische Darstellung der Spermienmotilität vom Hoden bis zur Befruchtung der Eizelle. von links nach rechts: Bildung der Spermienzellen in den Hoden, Lagerung und Reifung im Nebenhoden, mit Ejakulation erfolgt die normale Aktivierung der Flagellenbewegung und weitere Reifungsprozesse, mit Kapazitätion erfolgt die Hyperaktivierung, nach Akrosomalreaktion endet die Befruchtung mit der Verschmelzung von Samen- und Eizelle. Die Beweglichkeit der Spermienzellen wird durch chemische Lockstoffe, Kapazitätionsfaktoren und Motilitätsfaktoren beeinflusst (Yoshida et al., 2008).

Im Nebenhoden, der mit dem jeweiligen Hoden über den *Ductuli efferentes* verbunden ist, werden die noch nicht vollständig gereiften und unbeweglichen Spermienzellen gelagert und über den Samenleiter als Ejakulat abgegeben. In den meisten Säugetieren, wie zum Beispiel der Maus oder dem Mensch lassen sich zwei Arten von Spermienmotilitäten unterscheiden – eine normal gerichtete Beweglichkeit von Spermatozoen nach Ejakulation und eine Hyperaktivierung der Spermienzellen im

Inneren des weiblichen Genitaltrakts.

Die normale Motilität von Spermien zeichnet sich durch eine gleichmäßig symmetrische Wellenbewegung des Flagellums mit geringer Amplitude aus, wodurch sich eine relativ gerichtete Bewegung der Spermienzelle in leicht viskosen Medien ergibt (Yanagimachi, 1994). Diese Form der Spermienbeweglichkeit ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die Antriebskraft für die kontinuierliche Bewegung der Spermien durch den weiblichen Genitaltrakt (Turner, 2006). Die Kapazitation ist ein weiterer wichtiger Schritt bei der Befruchtung der Oozyte durch die Samenzelle. Es handelt sich dabei um einen Reifungsprozess bzw. einen biochemischen Umbauprozess der Samenzellen, bei dem äußere Glykoproteine des Spermiums entfernt und Proteine im Kopf aktiviert werden.

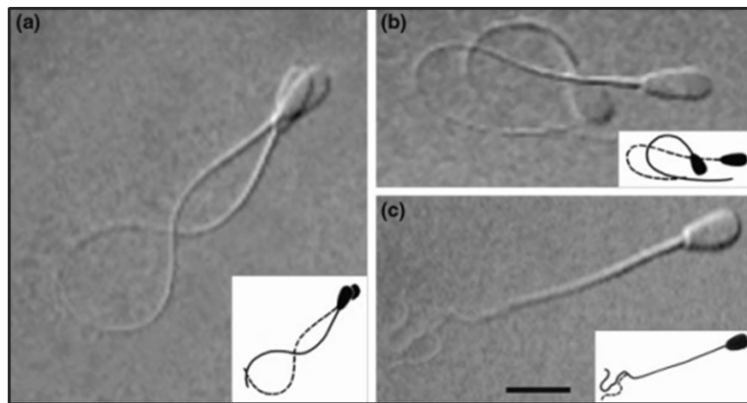


Abbildung 8: Vergleich normal aktivierter und hyperaktivierter Bullen-Spermatozoen. Maßstab: 10 µm. In den mikroskopischen Aufnahmen, rechts unten: schematische Darstellung der jeweils gezeigten Flagellenbewegung. (a) normal aktivierte Spermatozoen mit gleichmäßiger Flagellenbewegung. (b) hyperaktivierte Spermatozoen mit asymmetrischer Flagellenbewegung. (c) progressive Schwimmbewegung von hyperaktivierten Spermatozoen in viskosem Medium (Yanagimachi, 1994; Ho & Suarez, 2001).

Mit Erreichen des Eileiters und erfolgter Kapazitierung vollzieht sich die Änderung von der normalen hin zu einer verstärkten Aktivierung der Flagellenbewegung. Diese zeichnet sich, im Vergleich zur normalen Beweglichkeit, durch eine ungleichmäßige Wellenbewegung des Flagellums mit einer vergrößerten Amplitude aus, wodurch sich die Spermienzellen in wässrigen Medien kreisförmig oder in acht-förmigen Bahnen bewegen (Yanagimachi, 1970; Yanagimachi, 1994; Ishijima et al., 2002). Diese

verstärkte Aktivierung der Beweglichkeit – auch Hyperaktivierung genannt – ist nötig damit sich Spermien vom Epithel des Eileiters lösen, die Eizelle erreichen und diese schließlich befruchten (Suarez & Katz, 1991; Strauss et al., 1995; Ho & Suarez, 2001). In Nagern konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Hyperaktivierung und der *in vitro* Befruchtungsfähigkeit von Eizellen hergestellt werden (Fraser & Quinn, 1981; Boatman & Robbins, 1991). Obwohl mit Beginn der Kapazitierung auch die Hyperaktivierung der Spermienzellen verbunden ist, konnte gezeigt werden, dass diese beiden Prozesse unabhängig voneinander ablaufen können (Olds-Clarke, 1989; Marquez & Suarez, 2004). Die Hyperaktivierung von Spermatozoen wurde weiterführend auch als zweiphasige Aktivierung beschrieben. Die Spermien wechseln entsprechend den Beobachtungen zwischen der normalen Aktivierung und der Hyperaktivierung, wodurch sich eventuell ein *on/off* Mechanismus der Hyperaktivierung ableiten lässt (Johnson et al., 1981; Tessler & Olds-Clarke, 1985). Eine vollständige Klärung dieser Zweiphasen-Hyperaktivierungs-Theorie bleibt jedoch abzuwarten.

1.3.2 Flagellum - Ultrastruktur als Basis für Spermienmotilität

Wesentlich für die Funktionsfähigkeit und Motilität von Spermatozoen ist der korrekte Aufbau des Spermenschwanzes und dessen Ultrastrukturen (Abbildung 9). Das Flagellum kann in vier Hauptstrukturen unterteilt werden - das Verbindungsstück, das Mittelstück, das Hauptstück und das Endstück (Fawcett et al., 1975). Direkt mit dem Spermienkopf verbunden ist das Verbindungsstück (Basalplatte), welches die Basis des Axonems bildet. Das Axonem erstreckt sich beginnend am Kopf über die gesamte Länge des Flagellums bis hin zum Endstück. Es stellt demnach die Struktur dar, die allen Hauptstrukturen des Flagellums gemeinsam ist. Bestehend aus einem Ring von neun Mikrotubuli-Dubletts und einem zentralen Mikrotubulipaar bildet diese Zytoskelett-Struktur den Kern des Spermenschwanzes ($9 \times 2 + 2$ Struktur), an dem Dyneinarme lokalisiert sind, die durch Spaltung von ATP eine gegeneinander Verschiebung der Mikrotubulistränge bewirken und somit die Flagellenbewegung auslösen. Weiterhin befinden sich T-förmige *Radial Spoke* Proteine, ausgehend von den äußeren Mikrotubuli-Dubletts hin zum zentralen Paar, innerhalb des Axonems (Fawcett, 1975). Die nächste proximale Einheit nach dem Verbindungsstück des Flagellums ist das Mittelstück, welches ca. 1/4 bis 1/3 der Länge des Spermenschwanzes ausmacht.

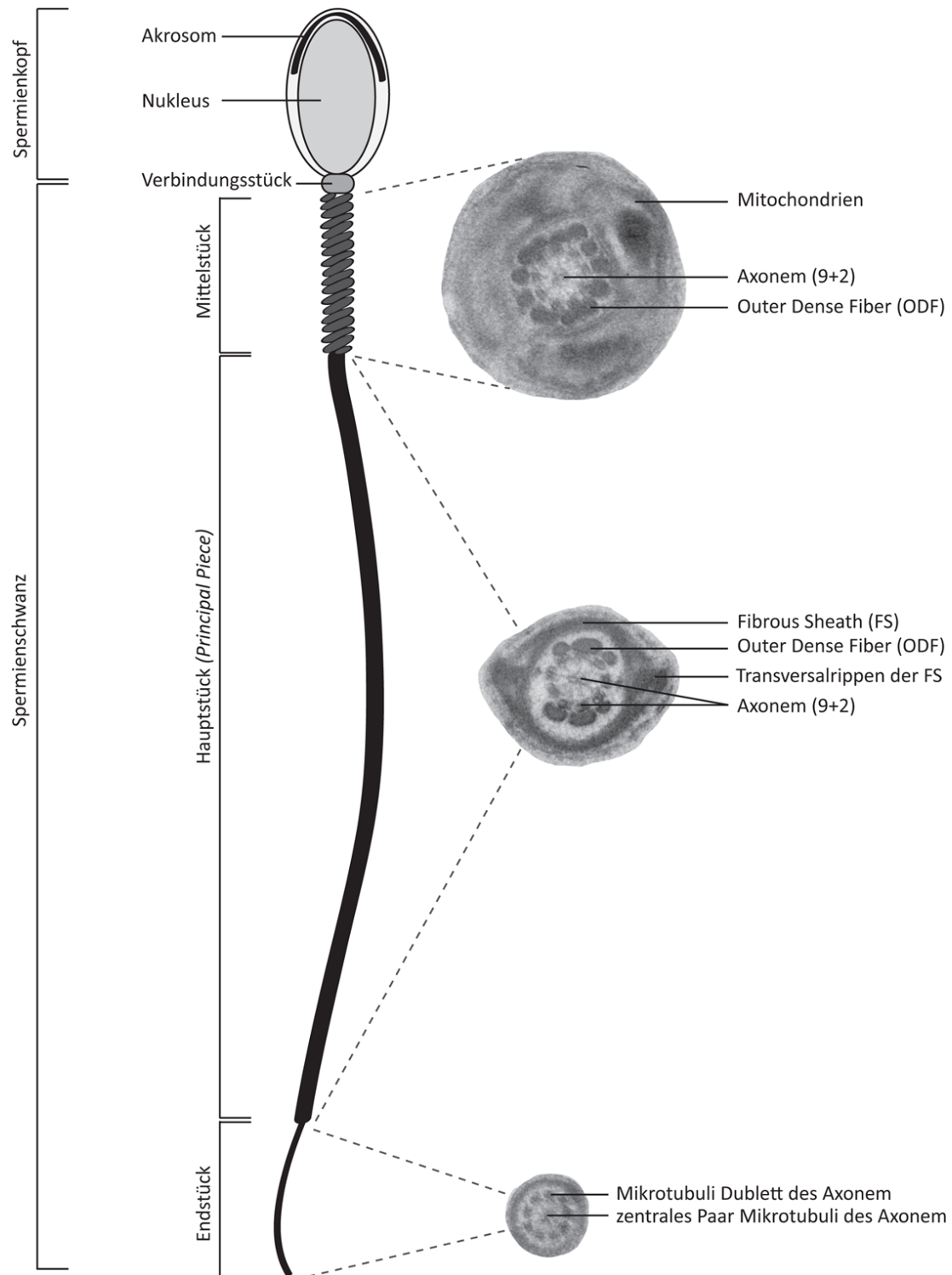


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Säugerspermatozoen. Links: schematische Darstellung des gesamten Spermatozoen mit Benennung der Einzelstrukturen. Rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch das Mittelstück, Hauptstück und Endstück eines Spermienschwanzes mit Benennung der Einzelstrukturen.

Das Mittelstück ist gekennzeichnet durch das Auftreten von neun *Outer Dense Fibers*, die gleichmäßig um die äußeren Mikrotubuli-Dubletts angeordnet sind. Den äußeren Abschluss des Mittelstücks bildet ein Mitochondrien-Paket (mitochondriale Scheide), welches spezifisch für das Mittelstück des Spermischwanzes ist. Sieben der *Outer Dense Fibers* erstrecken sich über das Mittelstück bis in das Hauptstück des Flagellums. Der Übergang zwischen Mittelstück und Hauptstück wird als *Annullus* bezeichnet. Zwei der *Outer Dense Fibers* enden mit dem Mittelstück und werden im Hauptstück von der *Fibrous Sheath* abgelöst. Die Längsröhren der *Fibrous Sheath* verlaufen bis zum Ende des Hauptstückes und werden stabilisiert von umlaufenden Transversalrippen. Das Gerüst der *Fibrous Sheath*, das größtenteils aus Strukturproteinen besteht (Eddy et al., 2003), schützt so die innen liegenden *Outer Dense Fibers* und das Axonem und stabilisiert die Flagellenbewegung (Fawcett, 1975; Eddy, 2007). Das Mitochondrien-Paket, die *Outer Dense Fibers* und die *Fibrous Sheath* sind Strukturen, die ausschließlich im Flagellum von Säugerspermien zu finden sind. Im Endstück, dem letzten Abschnitt des Spermischwanzes ist lediglich noch das Axonem vorhanden, umgeben von der Plasmamembran. Strukturen wie *Outer Dense Fibers* und *Fibrous Sheath* enden mit Abschluss des Hauptstückes.

1.3.3 Der Motor der Spermienmotilität - das Axonem

Die Beweglichkeit des Flagellums eines Spermatozoen ist ein komplexer Prozess und maßgeblich entscheidend für die Motilität der Samenzelle und somit für deren Fertilität.

Die Antriebskraft eines eukaryotischen Flagellums ist das Axonem, welches als Struktur am Kopf des Spermatozoen beginnt und bis zum Endstück des Spermischwanzes reicht. Die Zusammensetzung des Axonems aus axonemalen Proteinen und dem Axonem assoziierter Moleküle ist sehr komplex und bis heute am besten in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* analysiert worden. In diesem Organismus konnte gezeigt werden, dass Mutationen in axonemalen Proteinen zum veränderten Aufbau dieser Zytoskelettstruktur oder zu einer gestörten Flagellenbewegung führen können (Luck et al., 1977; Dutcher, 1995; Yagi & Kamiya, 1995; Smith & Lefebvre, 1996). Die hervorstechendsten Proteine des Axonems sind α - und β -Tubulin. Die Anzahl gut charakterisierter axonemaler Proteine in Säugern ist jedoch gering.

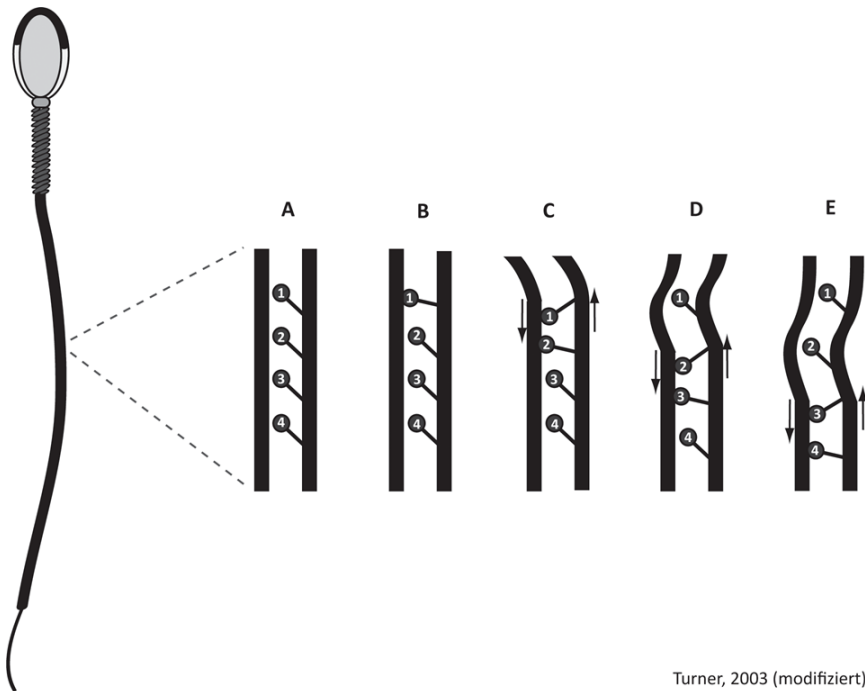
Eine weitere charakterisierte Familie axonemaler Proteine sind die Motorproteine des Axonems – die Dyneine.

Innerhalb des Axonems sind sie an den äußeren Mikrotubuli-Dubletts (genauer am A-Tubulus) lokalisiert und tragen maßgeblich zur Bewegung des Flagellums bei. Durch Phosphorylierung der Dyneinarme werden diese aktiviert und wandeln nach Hydrolyse von ATP die entstandene Energie in eine mechanische Kraft um (Tash, 1989). Dadurch kommt es zu einer kurzzeitigen Interaktion der aktivierten Dynein-ATPase mit dem direkt benachbarten äußeren Mikrotubuli-Dublett, was zu einer Verschiebung dieses angrenzenden Dubletts führt (Satir, 1968; Summers & Gibbons, 1971; Brokaw, 1972; Brokaw, 1989).

Durch die Verschiebung der Mikrotubuli-Dubletts und durch die Tatsache, dass Mikrotubuli-Dubletts untereinander über Nexinbrücken (nexin-DRC für *nexin dynein regulatory complex*) miteinander verbunden sind (Heuser et al., 2009), sowie durch die Begebenheit, dass das Axonem am Spermienkopf verankert ist, kommt es zum Abknicken bzw. zur Beugung des Spermischwanzes. Die Dephosphorylierung der Dynein-Arme durch Phosphatasen kehrt diesen Prozess um, wodurch das Axonem wieder in die Ausgangsposition gelangt.

Einzelne Dyneine generieren eine eindirektionale Bewegung (Sale & Satir, 1977). Erst die gezielte und asynchrone Phosphorylierung und Dephosphorylierung, und damit einhergehend die Aktivierung und Deaktivierung von Dynein-Armen entlang der gesamten Länge und des Umfangs des Axonems, führt zu der normalen Flagellenbewegung (Wargo & Smith, 2003). Diese gezielte und streng koordinierte Aktivierung und Deaktivierung der Dynein-Komplexe über die gesamte Länge des Spermischwanzes ist hoch komplex und nicht bis ins letzte Detail verstanden. Dennoch müssen diese Vorgänge innerhalb des Falgellums gleichzeitig und lokalisiert an vielen verschiedenen Dyneinen ablaufen, um die Bewegung des Flagellums zu generieren.

Eine stark vereinfachte und schematische Darstellung der Entstehung der Flagellenbewegung ist in der Abbildung 10 gezeigt und beschrieben.



Turner, 2003 (modifiziert)

Abbildung 10: Die Entstehung der Flagellenbewegung in einem Säugerspermatozoen. links: Säugerspermatozoen bestehend aus Kopf und Flagellum. A-E: sehr stark vereinfachte und schematische Darstellung von zwei nebeneinander liegenden Mikrotubuli-Dubletts (ein Dublett wurde aus Gründen der Vereinfachung als schwarzer Balken dargestellt) und daran lokalisierte Dynein-Arme (1-4). A: keine Bewegung des Flagellums. B: Dynein 1 des rechten Mikrotubuli-Stranges wird aktiviert und bindet das benachbarte linke Mikrotubuli-Dublett. C: Die aktivierte Dynein-ATPase (Dynein 1) interagiert mit dem benachbarten Mikrotubuli-Strang und verschiebt diesen relativ zum Dynein-tragenden Mikrotubuli-Dublett. Die Verbindung dieser Mikrotubuli-Dubletts durch N-DRC bewirkt ein Abknicken des Spermischwanzes. Gleichzeitig wird auch Dynein 2 des Dynein-tragenden Mikrotubuli-Dubletts aktiviert und es kommt zur Bindung des benachbarten Mikrotubuli-Dubletts unterhalb von Dynein 1. D: Dynein-ATPase (Dynein 1) wird deaktiviert, wodurch die Bindung zum benachbarten Mikrotubuli-Strang aufgehoben und das Abknicken des Flagellums rückgängig gemacht wird. Zusätzlich interagiert die aktivierte Dynein-ATPase (Dynein 2) mit dem benachbarten Mikrotubuli-Strang und verschiebt diesen relativ zum Dynein-tragenden Mikrotubuli-Dublett was zum Abknicken des Spermischwanzes an dieser Stelle führt. Gleichzeitig wird auch Dynein 3 des rechten Mikrotubuli-Dubletts aktiviert und es kommt zur Bindung des benachbarten Mikrotubuli-Dubletts unterhalb von Dynein 2. E: Zwei Dynein-ATPasen (Dynein 1 & 2) sind deaktiviert. Die Bindung zum benachbarten Mikrotubuli-Strang ist aufgehoben. Dennoch interagiert die aktivierte Dynein-ATPase (Dynein 3) mit dem benachbarten Mikrotubuli-Strang und verschiebt diesen relativ zum Dynein-tragenden Mikrotubuli-Dublett was zu einem Absinken des Mikrotubuli-Stranges und zum Abknicken des Spermischwanzes an dieser Stelle führt. Gleichzeitig wird auch Dynein 4 des Dynein-tragenden Mikrotubuli-Dubletts aktiviert und es kommt zur Bindung des benachbarten Mikrotubuli-Dubletts unterhalb des Dynein-Arm 3 (modifiziert nach Turner et al., 2003)

1.3.4 Regulation der Spermienmotilität

Der Calcium-Signalweg und der cAMP/PKA Signalweg sind die zwei Signalkaskaden, die sich im Laufe von vielen Jahren Forschungsarbeit als zentrale Mechanismen zur Kontrolle der Spermienmotilität herausgestellt haben (Suarez et al., 1987; Tash & Means, 1987; Lindemann & Goltz, 1988; White & Aitken, 1989; Brokaw, 1991; Yanagimachi, 1994; Ho et al., 2002).

Die Regulation der Flagellenbewegung eines Spermatozoon geht unabdingbar einher mit der Lokalisation motilitäts-relevanter Proteine am Ort der zu generierenden Bewegung - dem Spermischwanz.

Die Proteinklasse der AKAPs (*A-kinase PKA anchoring proteins*) sind Strukturproteine, die ein Gerüst darstellen können für Moleküle von Signalkaskaden, um diese an ihrem Wirkort, zum Beispiel einer Mikrostruktur, zu halten. Wie der Name bereits andeutet sind AKAPs in der Lage die Kinase PKA zu binden. Im Flagellum sind AKAPs vornehmlich am Hauptstück des Spermischwanzes, genauer an der *Fibrous Sheath*, lokalisiert. Durch die Bindung von PKA an diese Spermienstruktur sind sowohl PKA, als auch eventuelle weitere motilitäts-relevante Proteine des PKA Signalwegs nahe ihrem Wirkort, dem Axonem, gebunden (Carrera et al., 1994; Mei et al., 1997; Miki & Eddy, 1998; Mandal et al., 1999; Vijayaraghavan et al., 1999). AKAP4 zum Beispiel ist als Strukturprotein ein wesentlicher Bestandteil der *Fibrous Sheath* und in der Lage ein zweites Protein dieser Klasse, AKAP3, zu binden (Carrera et al., 1994; Brown et al., 2003). So konnte gezeigt werden, dass Spermien ohne AKAP4-Protein eine stark verringerte Motilität besitzen, eine Reduktion weiterer AKAP bindender Proteine im Flagellum aufweisen und unfruchtbar sind (Carrera et al., 1994). Neben einer strukturellen Funktion besitzt diese Proteinklasse scheinbar auch eine funktionelle Rolle bei der Entstehung der Flagellenbewegung und somit bei der Regulation der Spermienmotilität (Carrera et al., 1994; Brown et al., 2003).

Der cAMP/PKA Signalweg: In Säugerspermien ist die cAMP abhängige Phosphorylierung von Proteinen des Flagellums ein bedeutender Aspekt für das Auslösen der Flagellenbewegung und den Erhalt der Motilität eines Spermatozoons (Tash & Means, 1982, 1983; San Agustin & Witman, 1994).

Ein bedeutendes nachgeschaltetes Molekül von cAMP ist die Serin/Threonin Kinase PKA (Visconti et al., 1997), welche über AKAPs an der Fibrillenscheide des Flagellums gebunden ist (Abschnitt oben). Die Bedeutung dieser Kinase wird klar, durch eine Studie in der gezeigt werden konnte, dass die gezielte Deletion der katalyti-

schen Untereinheit von PKA zur Unfruchtbarkeit führt und dass dies mit geringer Motilität des Spermiums verbunden ist (Skalhegg et al., 2002). Es ist jedoch nicht eindeutig geklärt, ob PKA auf unterschiedlichen Signalwegen auf die Spermienbewegung wirkt. Ein Zielprotein der Protein Kinase A ist axonemales Dynein, welches durch PKA phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung von Dyneinen am Axonem des Spermatozoons ist ein wesentlicher Punkt bei der Entstehung der Flagellenbewegung und wurde bereits beschrieben (Tash, 1989). Weiterhin könnten auch bis jetzt unbekannte Zielmoleküle oder Kinasen, die am Axonem lokalisiert sind und dort direkt die Spermienbewegung beeinflussen, durch PKA-Phosphorylierung aktiviert werden (Leclerc et al., 1996; Si & Olds-Clarke, 2000; Turner, 2006).

Essentiell für die Regulation der Flagellenbewegung ist, neben der Phosphorylierung, die Dephosphorylierungen von Dyneinen oder anderen axonemalen Komponenten (Tash, 1989; Tash & Bracho, 1994). In somatischen Zellen sind auch hier AKAPs die Gerüstgeber, um neben Kinasen, auch Phosphatasen am Wirkort zu binden (Coghlan et al., 1995; Klauck et al., 1996). Sofern dieser Regulationsmechanismus in Spermatozoen ähnlich funktioniert, wären AKAPs ein Organisationszentrum für Kinasen und Phosphatasen und somit für Phosphorylierung und Dephosphorylierung von axonemalen Strukturen essentiell (Turner, 2006).

Eine PKA unabhängige Regulation der Spermienbewegung durch cAMP ist eine weitere Möglichkeit der Motilitätskontrolle. Spekulationen, dass zum Beispiel CNG-Kanäle (*Cyclic nucleotide-gated ion channels*) oder GTP-Austauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factors*, GEFs) ebenfalls von cAMP aktiviert werden können, umgehen eine PKA abhängige Regulation der Flagellenbewegung (Burton et al., 1999). Zusätzlich sind auch Tyrosin-Phosphorylierungen, neben Serin/Threonin Phosphorylierungen, mit Spermienmotilität assoziiert (Tash & Bracho, 1998).

Der Calcium-Signalweg: Der Calcium-Signalweg galt lange als der Signalmechanismus zur Regulation der Spermienmotilität. Er reguliert sowohl die normale, als auch hyperaktivierte Motilität von Spermatozoen (Suarez et al., 1987; Tash & Means, 1987; Lindemann & Goltz, 1988; White & Aitken, 1989; Yanagimachi, 1994; Ho et al., 2002).

Eine zytosolische Adenylatcyclasen (sAC), die sensitiv ist für Calcium, wird durch das Kation reguliert und generiert cAMP, welches wiederum PKA aktiviert und somit in den cAMP/PKA-Signalweg mündet (Buck et al., 1999; Wuttke et al., 2001). Zusätzlich gibt es Hinweise auf eine PKA-unabhängige Regulation der Motilität durch Calcium. So sind wahrscheinlich intrazelluläre Ca^{2+} -Lager für die Hyperaktivierung wichtig (Ho & Suarez, 2003). Aber auch extrazelluläre Ca^{2+} -Signale, die

durch Membrankanäle in das Zellinnere des Flagellums gelangen, scheinen für die Regulation der Motilität eine Rolle zu spielen (Wiesner et al., 1998; Westenbroek & Babcock, 1999). CNG-Kanäle reagieren in erster Linie auf cGMP, aber auch auf cAMP, wodurch cAMP als Signalmolekül neben dem cAMP/PKA Signalweg auch zum Calcium-Signalweg zugehörig ist (Wiesner et al., 1998).

Ca^{2+} ist des Weiteren durch Bindung an den intrazellulären Ca^{2+} -Rezeptor Calmodulin (CaM) in der Lage die Asymmetrie der Wellenbewegung des Flagellums zu verstärken und somit die Motilität zu verändern (Tash & Means, 1982). Die Calmodulin-Kinase (CaMK) ist ein direktes Zielmolekül des Ca^{2+} -Rezeptors Calmodulin (CaM). Nach Inhibition der Calmodulin-Kinase sinkt die Motilität von Spermien (Ignotz & Suarez, 2005; Marin-Briggiler et al., 2005). Des Weiteren führt die direkte Inhibition von Calmodulin ebenfalls zu einer verringerten Spermienmotilität (White & Aitken, 1989; Ahmad et al., 1995; Si & Olds-Clarke, 2000). Mit der Abnahme der Motilität geht zusätzlich eine Abnahme von Protein-Phosphorylierungen einher, welche vermittelt wird durch eine Calcium/Calmodulin-abhängige Phosphatase Namens Calcineurin (Means et al., 1982; Tash & Means, 1987; Tash et al., 1988). Dadurch stellt CaM/CaMK/Calcineurin die zweite wichtige Achse der Regulation von Spermienmotilität in Säugerspermien dar.

Regulation über kleine G-Proteine: Neben den Regulationsmechanismen über cAMP/PKA und Ca^{2+} /CaM spielen unter anderem auch die Regulation des pH-Wertes (Yanagimachi, 1994) und die Kontrolle durch heterotrimere G-Proteine bzw. durch G-Proteine gesteuerte Signalwege (Hinsch et al., 1993; Nakamura et al., 1999; Fujita et al., 2000; Carr et al., 2001) bei der Spermienmotilität eine wichtige Rolle. G-Proteine bezeichnet eine Gruppe Guaninnucleotid-bindender Proteine, welche als molekulare Schalter eine Schlüsselposition in der Signalweiterleitung zwischen einem Rezeptor und einem *second messenger* einnehmen. Hier unterscheidet man zwischen heterotrimeren G-Proteine, die aus den Untereinheiten α , β und γ bestehen und zwischen monomeren G-Proteinen, auch GTPasen genannt.

Die monomeren G-Proteine können in die Subfamilien RAS, RHO, RAB, SAR1/ARF und RAN unterteilt werden. Sie sind durch alternierende Bindung von entweder GTP (aktivierte-Form) oder GDP (inaktive Form) in der Lage Signale innerhalb der Zelle zu übermitteln. Die Aktivierung und Deaktivierung dieser Moleküle erfolgt über GTP-Austauschfaktoren (GEFs) beziehungsweise über GTPase aktivierende Proteine (GAPs).

Die RHO-Subfamilie der kleinen monomeren G-Proteine, zu denen unter anderem die Proteine RHOA, RAC1 und CDC42 zählen, ist dabei besonders wichtig für die Organisation des Zytoskeletts der Zelle, der Zellpolarität und der Migration, also der gerichteten Bewegung von somatischen Zellen wie zum Beispiel Fibroblasten oder Tumorzellen (Wittmann & Waterman-Storer, 2001; Kaibuchi et al., 1999). Es liegt demnach die Vermutung nahe, dass Signalwege, die in Körperzellen eine Bewegung hervorrufen, auch in Spermatozoen die Bewegung des Flagellums und somit die Spermienmotilität beeinflussen können.

So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die kleinen G-Proteine RHOA, CDC42 und RAC1 und einige ihrer Effektoren wie zum Beispiel PI(4)P5K und ROCK-1 in Säugerspermatozoen im Spermienkopf und im Flagellum lokalisiert sind, wodurch deren mögliche Funktion in Signalwegen wie der Akrosomalreaktion oder der Spermienmotilität widerspiegelt wird (Ducummon & Berger, 2006). Auch die Charakterisierung des RHOA bindenden Proteins Rhoophilin und dessen direktem Interaktionspartner Ropporin, als flagellare Moleküle deuten in diese Richtung (Nakamura et al., 1999; Fujita et al., 2000). Ein direkter Beweis für die Involvierung von RHO-Proteinen liefert eine Studie aus dem Jahr 1993, welche direkt die Inhibition der Spermienmotilität mit der ADP-Ribosylierung von RHOA, B und C in Verbindung bringt (Hinsch et al., 1993).

Ein weiteres Argument für die Regulation der Flagellenbewegung über G-Proteine bzw. G-Protein gesteuerte Signalwege liefert der Signalmechanismus, welcher zu *Transmission Ratio Distortion* führt. Bei den bislang publizierten *Distorter*-Proteinen TAGAP1, FGD2 und NME3 handelt es sich ohne Ausnahme um G-Protein regulierende Moleküle (Bauer et al., 2005, Bauer et al., 2007, Bauer et al., 2012). TAGAP1 (*T cell activation GTPase activating protein 1*) zum Beispiel ist ein GTPase aktivierendes Protein (GAP), welches über eine RHO-GAP-Domäne die Hydrolyse von GTP zu GDP für RHOA verstärkt und somit als Inhibitor wirkt (Bauer et al., 2005). Ein weiterer *Distorter*, der mit RHO-Signalwegen verbunden ist, ist FGD2 (*FYVE, RhoGEF and PH domain containing 2*). FGD2 bewirkt als GTP-Austauschfaktor (GEF) die Aktivierung von CDC42 durch Austausch von GDP zu GTP (Bauer et al., 2007; Huber et al. 2008).

Eine Ergänzung zu den bereits beschriebenen *Distorter*-Molekülen TAGAP1 und FGD2 bildet NME3 (*Nucleoside diphosphate kinase 3*) (Bauer et al., 2012). Als Nucleosid-Diphosphat-Kinase bewirkt NME3 die Umwandlung von GDP zu GTP durch Phosphorylierung, generiert somit den Aktivator für kleine G-Proteine und stellt dadurch die Verbindung zu den zwei anderen *Distortern* her.

Durch die Kombination der im *t*-Haplotyp mutierten *Distorter*-Proteine wird die Spermien-Motilitäts-Kinase in erhöhten Maße aktiviert, was zu einer veränderten Spermienbewegung führt. Erst die mutierte Form dieser Kinase (SMOK1^{TCR} bzw. TCR) kann diese Hyperaktivierung in dem Teil der Spermienpopulation ausgleichen, der Träger des *Responder*-Gens ist (Olds-Clarke & Johnson, 1993; Véron et al., 2009) (Abbildung 4).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Der *t*-Haplotyp, eine veränderte Form des Chromosom 17, wird von heterozygoten *t/+*-Männchen bevorzugt an die nächste Generation vererbt. Mehrere im *t*-Haplotyp vorhandene *Distorter*-Loci schädigen in *trans* die gesamte Spermienpopulation (*wt*- und *t*-Spermien). Die *t*-Spermien werden durch den *Responder*, der ausschließlich in *cis* wirkt, alleinig geschützt (Lyon, 1984). Erst durch das Zusammenwirken der *Distorter* und des *Responders* kommt es zur bevorzugten Vererbung des *t*-Haplotyps. Basierend auf der Klonierung und Charakterisierung der Spermien-Motilitäts-Kinase (SMOK1) sowie des *Responder*-Proteins (SMOK1^{TCR} bzw. TCR) (Herrmann et al., 1999; Véron et al., 2009), durch die genetische Studien der *Distorter* (Bauer et al., 2005; Bauer et al., 2007; Bauer et al., 2012) und durch die Beobachtung von Spermienpopulationen mit unterschiedlichen Schwimmeigenschaften in heterozygoten *t/+*-Männchen (Olds-Clarke & Johnson, 1993) entstand im Laufe der letzten Jahre ein molekulares Modell zur Klärung des Phänomens der nicht-mendelschen Vererbung in der Maus (Herrmann et al., 1999; Bauer et al., 2012). Dieses Modell beschreibt die Wechselwirkung der *Distorter*-Proteine mit kleinen monomeren G-Proteinen, die mögliche Wirkung dieser RHO-Proteine entweder indirekt oder direkt auf SMOK1 und den regulierenden Einfluss von SMOK1 auf die Motilität von Spermatozoen. Dennoch ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht klar, wie SMOK1 die Flagellenbewegung und die Motilität, d.h. die gerichtete Bewegung eines Spermatozoons beeinflussen kann.

Ziel dieser Arbeit war es, das Modell des RHO-SMOK1-Signalnetzwerkes näher zu untersuchen und neue Interaktionspartner in dem Prozess der Signalweiterleitung zu identifizieren. Dafür sollten mit Hilfe einer umfangreichen Hefe-Zwei-Hybrid Analyse bislang unbekannte flagelläre Faktoren, die in dem Prozess der nicht-mendelschen Vererbung in der männlichen Maus eine Rolle spielen, identifiziert werden. Weiterführend sollten speziell SMOK1-Bindungspartner, die in der Analyse in *Saccharomyces cerevisiae* gefunden wurden, *in vivo* molekular untersucht werden. Zusätzlich war es notwendig die identifizierten SMOK1-Interaktionen durch verschiedene Protein-Protein-Interaktionsanalysen zu verifizieren. Abschließend sollten Interaktionsstudien zwischen den kleinen G-Proteinen RAC1, CDC42, RHOA und der Spermien-Motilitäts-Kinase durchgeführt werden. Durch die Ergebnisse dieser Analysen sollte schließlich der Signalweg von *Transmission Ratio Distortion* um neue Proteine erweitert werden.

2 Ergebnisse (A) Identifikation von Bindungspartnern für *t*-Komplex Faktoren mit dem Hefe-Zwei-Hybrid System

Das molekulare Modell, welches die Wirkungsweise von *Transmission Ratio Distortion* erklärt, basiert in erster Linie auf der Klonierung und Charakterisierung der Spermien-Motilitäts-Kinase und des *Responders* (Herrmann et al., 1999; Véron et al., 2009), auf den gewonnenen genetischen und biochemischen Daten der *Distorter*-Studien (Bauer et al., 2005; Bauer et al., 2007; Bauer et al., 2012) und auf der Beobachtung und Analyse von zwei Spermienpopulationen mit unterschiedlichen Schwimmigenschaften (Geschwindigkeit und Linearität) in heterozygoten *t/+*-Mausmännchen (Olds-Clarke & Johnson, 1993). Die Kombination dieser Beobachtungen und die Kombination der genetischen Daten führte zu dem Modell, in dem SMOK1 über die *Distorter*-Proteine in verstärktem Maße aktiviert wird und auf bislang unbekannte Faktoren wirkt, welche wiederum mit hoher Wahrscheinlichkeit die Motilität einer Samenzelle beeinflussen (Herrmann et al., 1999). Welche diese Faktoren sind und ob diese Beeinflussung der Motilität direkt oder indirekt erfolgt ist nicht geklärt, da bis heute keine Bindungspartner für SMOK1 bekannt sind.

Die Methode der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse stellt eine Technik dar, mit der es möglich ist, Protein-Protein-Interaktionen in größerem Umfang und direkt in dem Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* zu analysieren. In Kollaboration mit Dr. Ulrich Stelzl, Dr. Josephine Wörseck und Dr. Mareike Weimann wurde eine umfangreiche Hefe-Zwei-Hybrid Analyse für alle im Signalweg bekannten Faktoren, welche *Transmission Ratio Distortion* beeinflussen, durchgeführt (Abbildung 11).

Im üblichen Ablauf einer Hefe-Zwei-Hybrid Analyse werden die zu untersuchenden *Baits* einzeln gegen einen oder verschiedene *Preys* getestet. Eine positive Protein-Protein-Interaktion von *Bait* und *Prey* zeigt sich dann durch Wachstum der Hefe auf einem Selektionsnährboden. Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen kam eine weiterentwickelte Hefe-Zwei-Hybrid Analyse zum Einsatz. Es wurden alle zu testenden *Baits* in einem gebündelten Ansatz gegen alle vorhandenen *Preys* getestet (*Pooled Screen*) und interagierende *Preys* im nächsten Schritt, mit Hilfe des *next generation sequencing* identifiziert. Diese Weiterentwicklung stellt eine Verbesserung dar, weil ein höherer Durchsatz an zu testenden Interaktionen mit weniger zeitlichem Aufwand analysiert werden kann. Die umfangreiche *Prey*-Bibliothek, wel-

che in dieser Hefe-Zwei-Hybrid Analyse zum Einsatz kam und von Dr. Ulrich Stelzl zur Verfügung gestellt wurde, beinhaltet ~ 17000 humane und sequenzverifizierte Volle-Länge-ORFs (ORF, *open reading frame*). Demzufolge wurden in dieser Hefe-Zwei-Hybrid Analyse mausspezifische *Baits*-Konstrukte gegen eine humane *Prey*-Bibliothek getestet.

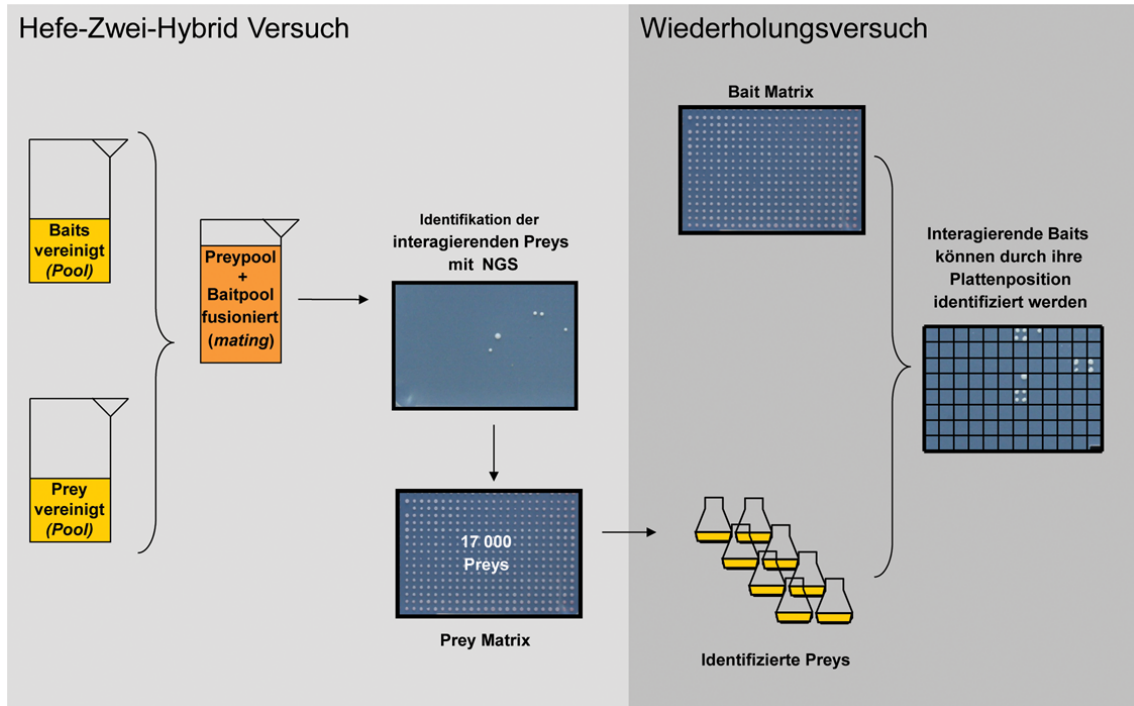


Abbildung 11: Ablauf der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse. links: Transformation von *Baits* und *Preys* in die jeweiligen Hefestämme MATa (*Bait-Pool*) und MAT α (*Prey-Pool*) mit anschließender Fusion dieser Stämme (*mating*). Ausplattieren der verpaarten Hefen auf Selektionsnährboden. Identifikation von interagierenden *Preys* mittels *next generation sequencing* (NGS). rechts: Wiederholungstest der identifizierten *Preys* (entnommen einer Hefe-Bank) einzeln gegen die *Baits* als Matrix. Die Identifikation der *Baits* erfolgt hier durch die Plattenposition in der Matrix.

Vor Beginn der eigentlichen Hefe-Zwei-Hybrid Analyse wurden alle *Baits* auf ihre Autoaktivierungseigenschaften in Selektionsmedium getestet. Die in dieser ersten Analyse positiv getestete *Bait*-Hefen wurden aussortiert. Die im Autoaktivierungstest als negativ identifizierten *Bait*-Hefen wurden schließlich mit der *Prey*-Bibliothek in einem *Pool* verpaart. Nach der Paarung der *Bait*- und *Prey*-Hefen, wurde der gesamte Hefeansatz auf Selektionsnährboden plattiert und positive Interaktion isoliert. Im nächsten Schritt schloss sich eine Anreicherung der interagierenden *Preys* mit

Prey-spezifischen Oligonukleotiden (pACT-5p: CCAAAGCTTCTGAATAAGCC & pACT-3p: AATTAATTCCCGAGCCTCCA) an. Die Identifikation der interagierenden *Preys* erfolgte schließlich mit der Hochdurchsatzsequenzierung (NGS, *next generation sequencing*) in Zusammenarbeit mit Dr. Bernd Timmermann. Auch in diesem Schritt bietet die weiterentwickelte Analyse mittels *next generation sequencing* den Vorteil, dass sehr viele Proben (*Preys*) gleichzeitig und mit zeitlich geringem Aufwand identifiziert werden können. Zum Abschluss der Analysen wurden die gefundenen Paarungen erneut in einem Wiederholungstest gegeneinander getestet. Jeder *Bait* wurde dann einzeln gegen die identifizierten *Preys*, welche als Matrix angeordnet waren, getestet und nur Interaktionen, die erneut in dieser Untersuchung positiv getestet werden konnten, wurden als positive und möglicherweise biologische relevante Interaktionen angesehen.

2.1 Konstrukte für die Hefe-Zwei-Hybrid Analyse

Um mögliche Interaktionspartner für die im TRD-Signalweg involvierten Moleküle zu identifizieren, wurden alle Faktoren als Volle-Länge-Konstrukte (abgekürzt FL für *Full Length*) generiert. Zusätzlich wurden Konstrukte hergestellt, welche einzelne Proteindomänen bzw. Proteindomänenkombinationen beinhalten (Abbildung 12). Dabei entstanden zum Teil auch überlappende Konstrukte, die in einer oder in mehreren Domänen identisch sind. Alle generierten Konstrukte wurden durch Sequenzierung verifiziert. Da eine große Anzahl von Konstrukten generiert wurde, kam für die Klonierungsstrategie das *Gateway*-System zur Anwendung. Durch Subklonierung der *Bait*-Konstrukte in den pENTR/D-TOPO Vektor, konnten diese anschließend in Destinationsplasmide entsprechend der jeweiligen Anwendung umgesetzt werden. Langwierige enzymbasierte Klonierungsstrategien wurden so umgangen. Die verwendeten Destinationsvektoren für die Hefe-Zwei-Hybrid Analyse sind 14-pACT4-DM (Goehler, et al., 2004) und pBTM 116 D9 (Goehler, et al., 2004) und wurden von Dr. Ulrich Stelzl zur Verfügung gestellt.

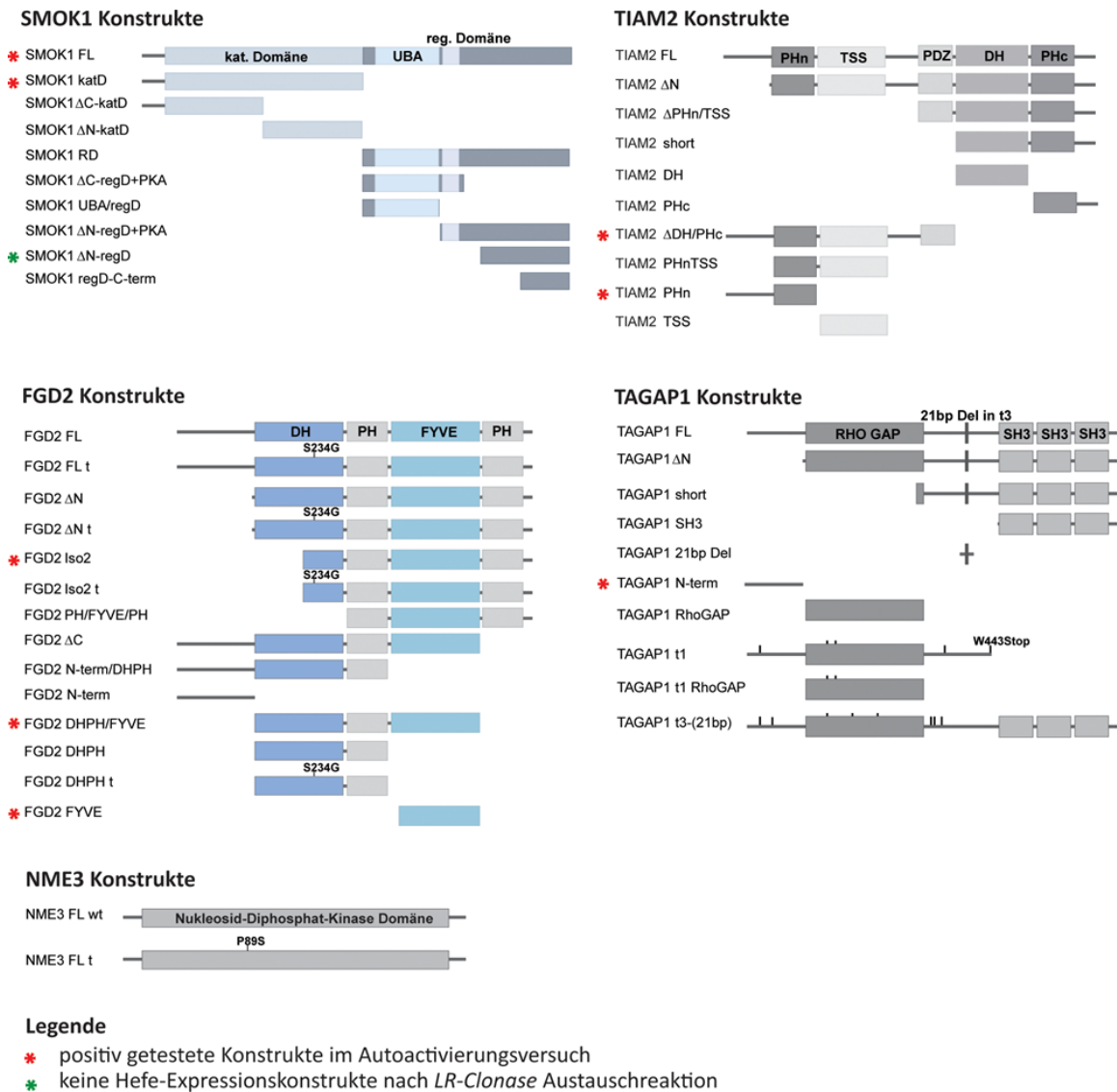


Abbildung 12: Schematische Darstellung der klonierten Konstrukte für Smok1, Fgd2, Tagap1, Nme3 und Tiam2. Dargestellt sind jeweils die Strukturen der Proteindomänen. Mit rotem Stern markierte Konstrukte wurden im Autoaktivierungstest positiv getestet und fanden keine Verwendung in der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse. Für das mit grünem Stern markierte Konstrukt konnten keine ENTRY Klone und somit keine Hefe-Expressionsklone erzeugt werden. Für dieses Konstrukt entfiel ebenfalls die Hefe-Zwei-Hybrid Analyse








Für eines der SMOK1-Konstrukte (SMOK1 Δ N-regD) war die Austauschreaktion in den Hefe-Destinationsvektor nach zweimaligem Durchführen nicht erfolgreich. Dieser Klon konnte demnach nicht im Autoaktivierungstest getestet werden. Folglich entfiel die Analyse dieses Klons auch in der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse. Der Autoaktivierungstest der verbliebenen *Bait*-Konstrukte auf Selektionsnährboden zeigt für die Konstrukte SMOK1 FL und SMOK1 CD ein Hefewachstum. Scheinbar besitzt die vollständige katalytische Domäne von SMOK1 eine autoaktivierende Wirkung in der Hefe. Die Konstrukte FGD2 Iso2, FGD2 DHPH/FYVE und FGD2 FYVE sind in diesem ersten Autoaktivierungstest ebenfalls positiv getestet worden. Ein weiterer *Distorter*-Kandidat namens TIAM2 (persönliche Mitteilung von Y. Charron, H. Bauer & B. G. Herrmann) wurde in diese Hefe-Untersuchungen miteinbezogen. Für Tiam2 Δ DH/PHc und TIAM2 PHn sowie für TAGAP1 N-term zeigte sich ebenfalls ein positives Ergebnis durch Hefewachstum. Für diese positiv getesteten Konstrukte entfiel die Analyse im Hefe-Zwei-Hybrid System.

Nach Analyse mit dem Hefe-Zwei-Hybrid System und nach Durchführung des Wiederholungstests konnten neue Bindungspartner sowohl für die SMOK1 (Abbildung 13), als auch für die *Distorter*-Proteine TAGAP1, FGD2, NME3 und TIAM2 (Abbildung 14), identifiziert werden.

2.2 Identifikation von SMOK1-Bindungspartnern

Eine übersichtliche Darstellung aller identifizierten SMOK-Bindungspartner, mit Auflistung der Interaktionsstärke, der eingesetzten *Bait*-Proteindomäne von SMOK1 und deren Proteinstruktur, sowie eine Auflistung der jeweiligen *Prey*-Interaktoren findet sich in Abbildung 13. Da die *Bait-Prey*-Paarungen entweder als Vierfach- oder Zweifachbestimmung im Wiederholungstest analysiert wurden, kann die Angabe der Interaktionsstärke als Maß für die Stringenz der Protein-Protein-Interaktion herangezogen werden. Für eine Vierfachbestimmung bedeutet die Interaktionsstärke 1 zum Beispiel, dass der getesteten *Bait* mit dem jeweiligen *Prey* in jedem der vier Replikate interagiert hat. Die Interaktionsstärke 0,5 hingegen bedeutet, dass der getesteten *Bait* mit dem jeweiligen *Prey* in zwei von vier Replikaten interagiert hat. Die Bindungen von SMOK1-Interaktionspartnern erfolgt ausschließlich mit der regulatorischen Proteindomäne und deren Subdomänenstrukturen. Das Konstrukt SMOK1 Δ C-regD+PKA nimmt hier eine besondere Stellung ein, da $\sim 82\%$ der gefundenen *Preys* mit dieser Domäne interagieren. An die gesamte regulatorische Domäne (SMOK1 RD) binden lediglich noch $\sim 14\%$ der identifizierten *Preys*. Ein *Prey* (AM-

MECR1) dagegen bindet gleich an zwei überlappende SMOK1-Konstrukte (SMOK1 Δ N-regD+PKA und SMOK1 regD-C-term) und ist somit für die Bindung an den C-Terminalen Bereich von SMOK1 spezifisch.

Interaktionsstärke*)	Bait	Bait Proteindomäne	Bait Proteinstruktur	Prey
—	SMOK1	SMOK1 FL		—
0,25	SMOK1	SMOK1 RD		MAEL, PRMT2, CORO2A, NEK2, RHPN1, TRIM69
1	SMOK1	SMOK1 Δ C-regD+PKA		SERTAD4, UTP6, GPN2, HMG20B, PPP2R5E, RASSF1, TRIM69, CBTB24, C10ORF137, C2ORF27B, ZNF557, CDCA4
0,75	SMOK1	SMOK1 Δ C-regD+PKA		CCDC151, CCNL1, MTF2, PLB1, SPATA22, SPRY2, VWASA, WWOX, ZNF483
0,5	SMOK1	SMOK1 Δ C-regD+PKA		C5ORF36, STX11, STYX, ZNF554, KLHL20, DNAJA3, LCK, LHX8, SNF8, EIF3F, FAM46B, MLST8, PKNOX1, TH1L, AKAP9
0,5	SMOK1	SMOK1 Δ N-regD+PKA		AMMECR1
1	SMOK1	SMOK1 regD-C-term		AMMECR1

*) Interaktionsstärke 1 bedeutet, dass das untersuchte Bait-Prey-Paar in jedem getesteten Replikat (Vierfach- und Zweifachbestimmung) ein positives Interaktionsergebnis, durch Hefewachstum, zeigt

Abbildung 13: Zusammenfassende Darstellung der Smok-Prey Interaktionen aus der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse, unter Angabe der Interaktionsstärke. Dargestellt sind das Symbol des Bait Proteins, die Symbole der Bait Proteindomänen, die Bait Proteinstrukturen und die Symbole der interagierenden Preys.

2.3 Identifikation von Bindungspartnern für die *t*-Komplex-Distorter Proteine

Eine übersichtliche Darstellung aller identifizierten *Distorter*-Bindungspartner, mit Auflistung der Interaktionsstärke der eingesetzten *Bait*-Proteindomäne des jeweiligen *Distorters* und dessen Proteinstruktur, sowie eine Auflistung der identifizierten *Prey*-Proteine findet sich in Abbildung 14. Die Auflistung der *Preys*, die zum Beispiel an TAGAP1 binden, macht deutlich, dass die Interaktionspartner in erster Linie mit dem C-Terminus des TAGAP1-Proteins wechselwirken. Für das FGD2-Protein zeigt sich im Gegensatz zu TAGAP1, eine bevorzugte Bindung der *Prey*-Proteine an den N-Terminus. Für TIAM2 und NME3 wurde, für die Volle-Länge-Varianten, jeweils ein Interaktionspartner gefunden.

Interaktionsstärke*)	Bait	Bait Proteindomäne	Bait Proteinstruktur	Prey
—	TAGAP1	TAGAP1 FL		—
1	TAGAP1	TAGAP1 short		BAG3, IL16
0,75	TAGAP1	TAGAP1 short		WWOX
0,25	TAGAP1	TAGAP1 short		RHPN1
1	TAGAP1	TAGAP1 SH3		BAG3, SIAH1, WWTR1, WWP2
0,5	TAGAP1	TAGAP1 SH3		AKAP9, C10ORF137
1	NME3	NME3 FL (B6)		AMMECR1
0,5	NME3	NME3 FL (129)		AMMECR1
—	FGD2	FGD2 FL		—
1	FGD2	FGD2 N-term		DNALI1
0,5	FGD2	FGD2 DHPH t1		SPATA22
0,5	TIAM2	TIAM2 FL		ZNF557

*) Interaktionsstärke 1 bedeutet, dass das untersuchte Bait-Prey-Paar in jedem getesteten Replikat (Vierfach- und Zweifachbestimmung) ein positives Interaktionsergebnis, durch Hefewachstum, zeigt

Abbildung 14: Zusammenfassende Darstellung der *Distorter*-Prey Interaktionen aus der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse, unter Angabe der Interaktionsstärke. Dargestellt sind die Symbole der Bait Proteine, die Symbole der Bait Proteindomänen, die Bait Proteinstrukturen und die Symbole der interagierenden Preys.

2.4 Netzwerk zwischen *t*-Komplex Faktoren und identifizierten Bindungspartnern

Die identifizierten Proteine aus der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse können zusammenfassend in einem Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk dargestellt werden, wobei die Spermien-Motilitäts-Kinase, SMOK1, als zentrales Molekül dargestellt wird (Abbildung 15). Zusätzlich sind die jeweiligen Interaktionsstärken von Protein-Protein-Interaktionen angegeben und alle *Preys*, die mit mehr als einem *t*-Komplex Faktor interagieren, durch Unterstreichen hervorgehoben. In diesem Netzwerk wird deutlich, dass insbesondere für SMOK1 neue Bindungspartner gefunden wurden. Die *Distorter*-Proteine FGD2, NME3 und TAGAP1 konnten mit dem SMOK-Netzwerk verbunden werden, TIAM2 dagegen nicht.

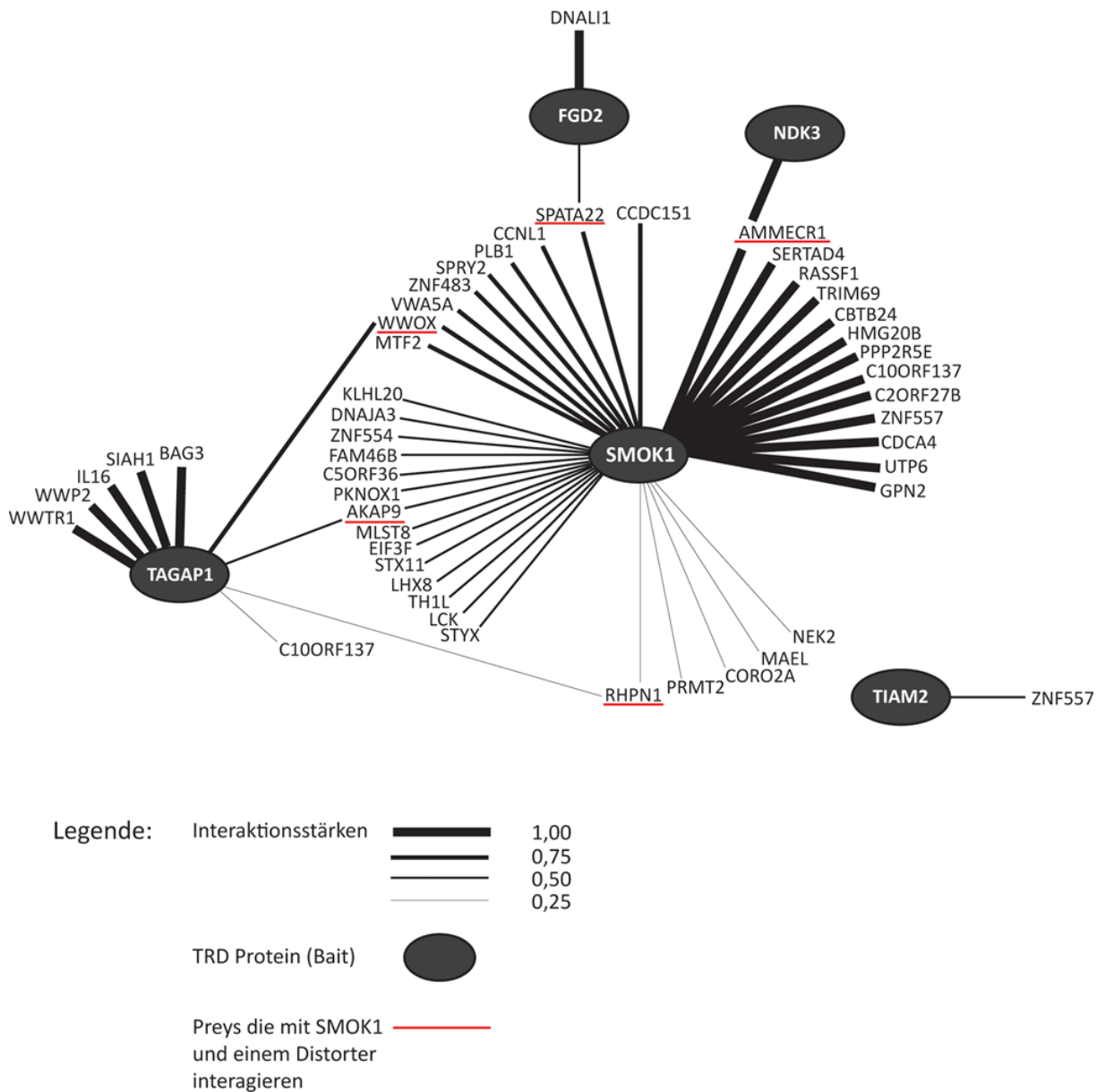


Abbildung 15: Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk zwischen *t*-Komplex Faktoren und den identifizierten Bindeproteinen (Hefe-Zwei-Hybrid Analyse) unter Berücksichtigung der Interaktionsstärke.

2.5 Interaktion von Bindungspartnern mit zwei *t*-Komplex Faktoren

Nach einem Vergleich der identifizierten SMOK1-Bindungspartner und den Interaktionspartnern, die mit den *Distortern* wechselwirken, zeigt sich, dass einige Proteine mit jeweils zwei *t*-Komplex Faktoren interagieren (Abbildung 16).

SPATA22 (*Spermato-genesis-associated protein 22*) zum Beispiel bindet an SMOK1 Δ C-regD+PKA und im selben Hefe-Zwei-Hybrid Test auch an die DHPH Domäne von FGD2.

Ähnliches gilt für den *Prey*-Interaktionspartner RHPN1 (*Rhophilin, Rho GTPase binding protein 1*). RHPN1 interagiert ebenfalls mit SMOK1 Δ C-regD+PKA und zusätzlich mit dem *Distorter* TAGAP1, genauer mit der Proteindomäne TAGAP1 short. Die Interaktionsstärke liegt für beide RHPN1-Interaktionen bei jeweils niedrigen 0,25.

Ein weiterer Bindungspartner für SMOK1 Δ C-regD+PKA und TAGAP1 short ist WWOX (*WW domain containing oxidoreductase*). Hier liegt die jeweilige Interaktionsstärke jedoch bei 0,75.

AKAP9 (*A-kinase PKA anchoring protein 9*) ist ein weiterer Interaktionspartner, der sowohl mit SMOK1 Δ C-regD+PKA als auch mit TAGAP1, genauer TAGAP1 SH3, wechselwirkt.

Der letzte Bindungspartner, der sich aus der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse ergibt und mit zwei *t*-Komplex Faktoren interagiert ist AMMECR1 (*AMME syndrome candidate gene 1 protein*). Wie bereits beschrieben bindet AMMECR1 zwei überlappende Domänen (Abbildung 16) des C-Terminus von SMOK1. Zusätzlich tritt AMMECR1 aber auch mit der *wt*-Form von NME3 in Wechselwirkung.

Die Tatsache, dass einige der nachgewiesenen Interaktionspartner (*Preys*) der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse parallel mit zwei *t*-Komplex Faktoren Protein-Protein-Interaktionen eingehen, lässt vermuten, dass diese Bindungspartner eine größere Rolle im TRD-Signalweg spielen, als andere Interaktoren.

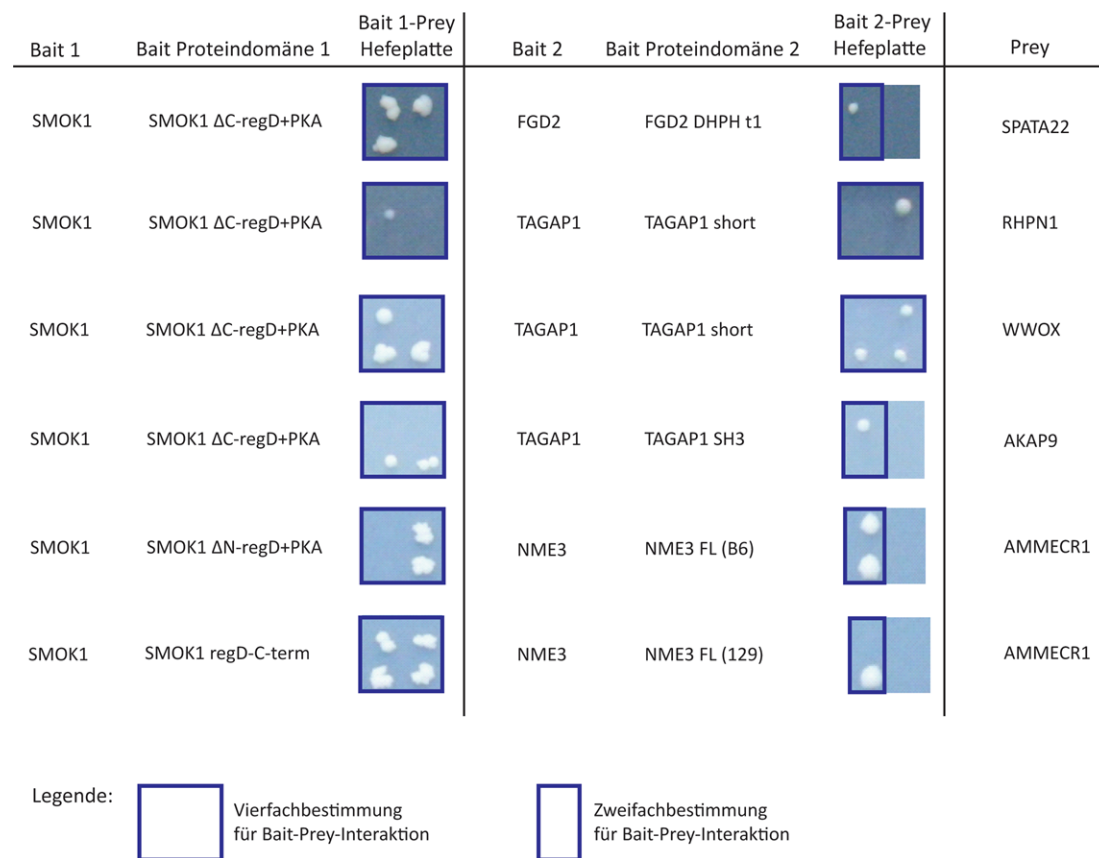


Abbildung 16: Zusammenfassende Darstellung der Preys, die neben SMOK1 parallel einen *Distorter* binden. Dargestellt sind die Symbole der Bait Proteine, die Symbole der Bait Proteindomänen, die Interaktionen der Preys und Baits auf den Hefeplatten und die Symbole der interagierenden Preys.

2.6 Klassifizierung der identifizierten Bindungspartner

Um im Detail besonders relevante Interaktionsmoleküle zu identifizieren, wurden die *Prey*-Proteine unter Zuhilfenahme der aktuellen Literatur auf ihre Expression (Huttlin et al., 2010) in Testis und auf eine bekannte Funktion in Spermatozoen untersucht und klassifiziert. Eine weitere Klassifizierungen ergibt sich durch die *Preys*, die in der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse mit zwei *t*-Komplex Faktoren interagiert haben (Abbildung 17).

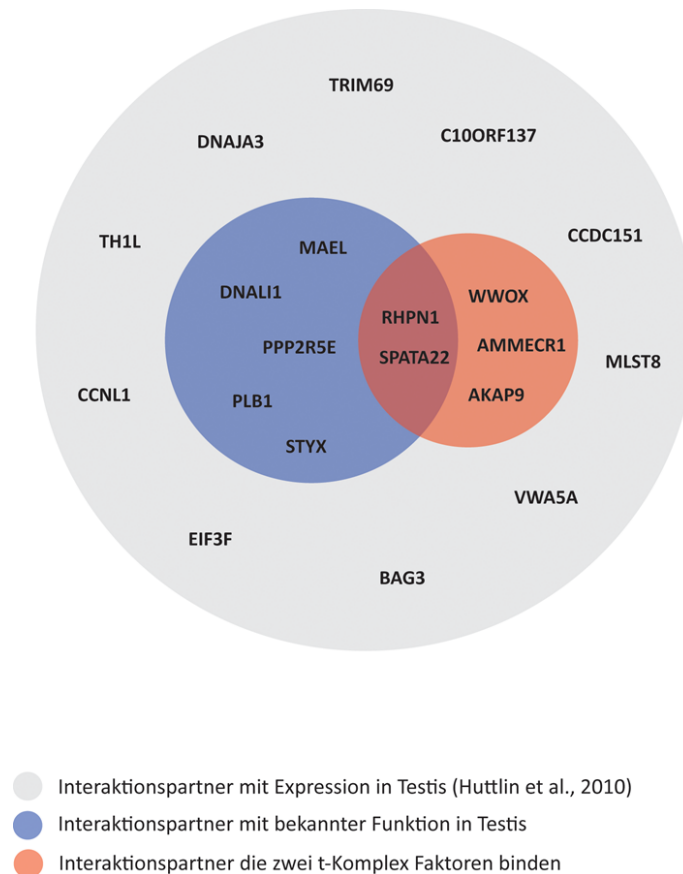


Abbildung 17: Klassifizierung der identifizierten Bindungspartner. Vergleich der im Hefe-Zwei-Hybrid Ansatz identifizierten Preys, die mit zwei *t*-Komplex Faktoren interagieren und derer, die eine Funktion in Spermien besitzen. Proteine, welche in der Schnittmenge liegen sind RHPN1 und SPATA22.

Die Expression auf Proteinebene konnte zum Beispiel für die Proteine DNAJA3, TRIM69, C10ORF137, CCNL1, CCDC151, MLST8, VWA5A, BAG3, EIF3F und TH1L gezeigt werden (Huttlin et al., 2010).

Eine weitere Untergruppe aus diesen in Testis exprimierten Proteinen bildet die Gruppe derer, die auch für eine Funktion im Hoden oder Spermatozoen bekannt sind.

Das Protein MAEL (*Protein maelstrom homolog*) zum Beispiel spielt eine Rolle bei der Spermatogenese und bei dem Erhalt der Keimzellintegrität (Xiao et al., 2010). Ein weiteres Protein DNALI1 (*Dynein, axonemal, light intermediate chain 1*) ist Bestandteil eines inneren Dynein-Komplexes und über die Bindung an Mikrotubulie ein essentieller Bestandteil des Axonems (LeDizet & Piperno, 1995a; LeDizet &

Piperno, 1995b; Hayashi et al., 2002; Rashid et al., 2006). Somit ist DNALI1 direkt mit einer flagellären Ultrastruktur assoziiert, die maßgeblich an der Bewegung des Spermenschwanzes beteiligt ist und somit Motilität beeinflusst (Hayashi et al., 2002).

Bei dem Protein PPP2R5E (*Serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit epsilon isoform*) handelt es sich um eine regulatorische Untereinheit der Serin/Threonin Protein Phosphatase 2 A. PP2A steht mit der Regulation der Hyperaktivierung durch Dephosphorylierung von Dyneinen und somit mit Motilität in Verbindung (Tash & Bracho, 1994; Suzuki et al., 2010).

Die Funktion des Proteins CCDC151 (*Coiled-coil domain containing 151*) ist bislang nicht bekannt. Dennoch wurde in Proteomstudien von Mausspermien die Präsenz dieses Proteins und anderer Proteine dieser Proteinklasse gezeigt (Dorus et al., 2010). Zusätzlich ist bekannt, dass Proteine dieser Familie, die ebenfalls eine *coiled coil* Domäne besitzen, wie zum Beispiel CCDC40 und CCDC39, für die Motilität von Zilien bzw. für den Aufbau der inneren Dynein Arme und des Dynein regulatorischen Komplex essentiell notwendig sind (Becker-Heck et al., 2011; Merveille et al., 2011).

Ein weiteres Protein PLB1 (*Phospholipase B1*) ist im Nebenhoden von Meerschweinchen exprimiert und besitzt möglicherweise eine Funktion bei der Reifung und Aktivierung von Spermien (Delagebeaudeuf et al., 1998).

STYX (*Serine/threonine/tyrosine interacting protein*) ist ebenfalls ein Protein mit einer Funktion in Spermien. Dieses Protein beeinflusst in der Spermatogenese die Reifung von Spermatiden zu Spermatozoen (Wishart & Dixon, 2002).

Auch die Gruppe der *Prey*-Interaktoren, die mit zwei *t*-Komplex Faktoren wechselwirken, enthält Proteine mit einer Funktion in Spermien.

Neuste Ergebnisse haben zeigt, dass SPATA22 ein wirbeltierspezifisches Gen ist und eine Funktion bei der meiotischen Teilung in der Spermatogenese besitzt (La Salle et al., 2012).

RHPN1, ein RHO-bindendes Molekül, ist im Hauptteil des Spermienflagellums exprimiert und lokalisiert an den Ultrastrukturen *Outer Dense Fibers* und an der Fibrillenscheide (Nakamura et al., 1999; Fujita et al., 2000), weshalb es auch als ODF5 bezeichnet wird.

Das AKAP9 Protein ist bis jetzt nur durch die Studie von Huttlin und Kollegen aus dem Jahr 2012 als Testisprotein bekannt (Huttlin et al., 2010). Des Weiteren sind andere Moleküle dieser Proteinfamilie wie AKAP4 und AKAP3 ein wesentlicher Bestandteil der *Fibrous Sheath* im Spermenschwanz und als Strukturproteine, bekannt

(Carrera et al., 1994; Brown et al., 2003). Zusätzlich scheint AKAP9 mit dem Protein ODF2 eine Protein-Protein-Interaktion einzugehen, was die Rolle von AKAP9 in Spermien unterstreicht (STRING Datenbank *Known and Predicted Protein-Protein Interactions*).

Eine Überlappung wird aus den beiden Gruppen, *Preys* die mit zwei *t*-Komplex Faktoren wechselwirken und *Preys*, die eine bekannte Funktion in Spermien besitzen, gebildet. Diese Überlappung beinhaltet die Proteine SPATA22 und RHPN1.

3 Ergebnisse (B) Molekulare Analyse von identifizierten SMOK1-Interaktionspartnern

3.1 Auswahl von wichtigen SMOK1-Bindungspartnern

Aus der Vielzahl von identifizierten Bindungspartnern wurden im nächsten Schritt interessante Interaktionspartnern ausgewählt und für die nachfolgenden molekularen Analysen *in vivo* herangezogen. Die Auswahl der zu untersuchenden Bindungspartner erfolgt nach folgenden Gesichtspunkten.

Es wurden in erster Linie *Preys* untersucht, die in der Hefe-Analyse eine direkte Interaktion mit SMOK1 gezeigt haben. Der Grund für diese Herangehensweise ist die zentrale Stellung der hodenspezifischen Kinase SMOK1 als Signalüberträger im TRD-Signalweg (Herrmann et al., 1999) und die Tatsache, dass SMOK1 bis zum heutigen Zeitpunkt einzig und allein mit dem TRD-Signalweg in Verbindung gebracht werden kann (Herrmann et al., 1999). Des Weiteren wurden vornehmlich *Preys* untersucht, die zusätzlich zur SMOK1-Interaktionen mit einer weiteren Komponente des TRD-Signalwegs, zum Beispiel einem *Distorter*, in Wechselwirkung getreten sind. Die Wahrscheinlichkeit dieser Kandidaten in dem TRD-Signalweg eine Rolle zu spielen, ist durch die Interaktion mit zwei TRD-relevanten Faktoren deutlich erhöht. Neben diesen Kriterien wurden zusätzlich Informationen aus der Literatur herangezogen, um die Auswahl der Kandidaten zu erleichtern. Ein *Prey* wurde in die molekularen Analysen eingeschlossen, wenn er neben den oben genannten Kriterien auch für eine biochemische Funktion bei der Signalweiterleitung oder sogar für eine Expression im Hoden bekannt ist.

Nach Anwendung dieser Kriterien kommen fünf *Preys* für weitere Analysen in Frage (Tabelle 1).

Für AMMECR1 ist in der Literatur bislang keine Funktion in Spermien bekannt. Dennoch wird dieses Protein als Interaktionspartner weiter untersucht, weil es sehr spezifisch mit zwei überlappenden SMOK1-Domänen am C-Terminalen Bereich der Kinase interagiert hat. Neben dieser Interaktion mit SMOK1 konnte zusätzlich eine Wechselwirkung mit dem *Distorter*-Protein NME3 beobachtet werden.

Tabelle 1: Übersicht der wichtigsten identifizierten *Preys*

Prey	Protein-ID	Gename
AMMECR1	hAMMECR1-CCSB10837	<i>AMME syndrome candidate gene 1 protein</i>
AKAP9	hAKAP9-CCSB14138	<i>A-kinase PKA anchoring protein (yotiao) 9</i>
RHPN1	hRHPN1-CCSB8341	<i>Rhopilin, Rho GTPase binding protein 1</i>
SPATA22	hSPATA22-CCSB2101	<i>Spermatogenesis-associated protein 22</i>
DNALI1	hDNALI1-CCSB11636	<i>Dynein, axonemal, light intermediate chain 1</i>

Das zweite Protein, welches näher untersucht werden soll und mit SMOK1 und einem *Distorter* interagiert hat, ist AKAP9. Gründe für die Auswahl sind die Interaktion von AKAP9 mit SMOK1 und dem *Distorter*-Protein TAGAP1 und funktionelle Daten über die Proteinfamilie der AKAPs aus der Literatur. Diese Gerüstproteine lokalisieren eine Vielzahl von relevanten Signalkomponenten am Wirkort innerhalb der Spermienzelle. So sind bereits AKAP4 und AKAP3 wesentliche Bestandteile der *Fibrous Sheath* im Spermienschwanz und als Strukturproteine und Organisationszentren für Signalmoleküle, bekannt (Carrera et al., 1994; Brown et al., 2003).

Ein weiteres Molekül, welches als Ergebnis der sinnvollen Auswahl bestimmt wurde, ist RHPN1. In der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse wurde eine Interaktion von RHPN1 mit SMOK1 und TAGAP1 identifiziert. Diese Wechselwirkungen besaßen zwar eine geringe Interaktionsstärke von 0,25, aber RHPN1 ist ein RHO-bindendes Molekül und im Hauptteil des Spermienschwanzes exprimiert (Nakamura et al., 1999). RHPN1 lokalisiert an den Substrukturen *Outer Dense Fibers* und an der *Fibrous Sheath* des Spermienschwanzes (Fujita et al., 2000), weshalb es auch als ODF5 bezeichnet wird. Es ist somit ein potentiell guter Kandidat für weitere Analysen.

SPATA22 hat in der Hefe-Analyse neben der Interaktion mit SMOK1 zusätzlich eine Wechselwirkung mit FGD2 gezeigt. Zum Zeitpunkt der Hefe-Untersuchungen gab es zwar über die Funktion von SPATA22 im Hoden keine Angaben, dennoch wurde durch den Gennamen (*Spermatogenesis associated 22* auch bekannt als *Testes development-related NYD-SP20*) ein Zusammenhang mit Spermien und Hodengewebe impliziert. Neuste Untersuchungen haben gezeigt, dass *Spata22* ein wirbeltier-spezifisches Gen und in Spermienzellen exprimiert ist (La Salle et al., 2012). Das Protein besitzt eine Funktion bei der meiotischen Teilung in der Spermatogenese (La Salle et al., 2012) und wurde zudem als Phosphoprotein beschrieben (Buchold, 2012). Somit ist auch SPATA22 ein guter Kandidat für weitere molekulare Analysen.

Das letzte Protein, welches für weitere Untersuchungen in Betracht kommt, ist DNALI1. Dieses Protein hat in der vorangegangenen Hefe-Analyse, sehr spezifisch mit dem *Distorter*-Protein FGD2 interagiert und ist somit nicht direkt mit der Spermien-Motilitäts-Kinase, SMOK1, verbunden. Dennoch können aus der Literatur wichtige Erkenntnisse über die Funktion dieses *Preys* gewonnen werden. DNALI1 ist ein Bestandteil der inneren Dyneinarme. Über die Bindung an Mikrotubuli ist dieses Protein ein essentieller Bestandteil des Axonems (LeDizet & Piperno, 1995a; LeDizet & Piperno, 1995b; Hayashi et al., 2002; Rashid et al., 2006). Somit ist DNALI1 direkt mit einer flagellären Substruktur assoziiert, die maßgeblich an der Bewegung des Spermenschwanzes beteiligt ist und Motilität beeinflussen kann (Hayashi et al., 2002).

Für WWOX konnte in der Hefe-Analyse zwar eine Interaktion mit sowohl SMOK1 als auch TAGAP1 gezeigt werden, dennoch ist für dieses *Prey*-Protein eine Funktion bislang nur in Zusammenhang mit Krebs bekannt (Hezova et al., 2007).

3.2 mRNA Expressionsanalyse von SMOK1-Interaktionspartnern in der Maus

Im folgenden Abschnitt werden die Transkripte (mRNA) der Gene *Ammecr1*, *Akap9*, *Rhpn1*, *Spata22* und *Dnali1* mittels RT-PCR und durch *In Situ* Hybridisierung auf Expression im relevanten Gewebe, dem Hoden analysiert.

Die Analyse der Transkripte durch RT-PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden zeigt die Expression der mRNA für die Gene *Ammecr1*, *Akap9*, *Rhpn1*, *Spata22* und *Dnali1* im Hodengewebe von *wildtyp* und *t*-haplotyp Tieren (Abbildung 18). Als interne Negativkontrolle dienten jeweils eine Wasserprobe und eine Reaktion ohne Reverse Transkriptase Enzym. Eine Positivkontrolle wurde durch das Haushaltsgen *Gapdh* dargestellt. Eine weitere Positivkontrolle war *Rhpn1*. Für dieses Gen ist die Expression von mRNA im Maushoden postnatal ab Tag 18 bekannt (Anhang, Abbildung 58). Diese erste Analyse zeigt eine Expression der mRNA der untersuchten *Preys* in dem Gewebe in dem auch *Smok1*-mRNA exprimiert ist.

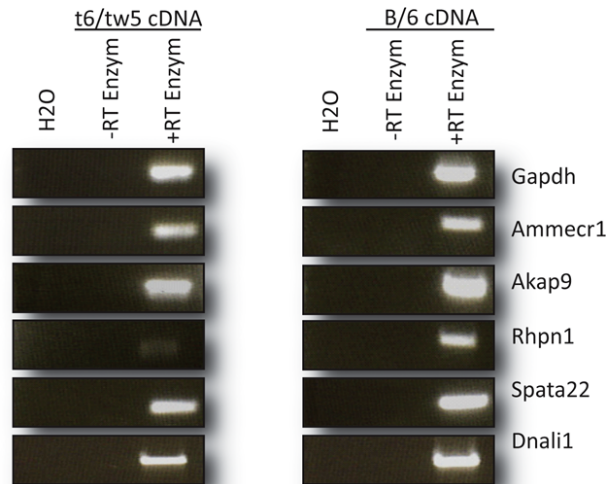


Abbildung 18: RT-PCR Analyse der Gene *Ammecr1*, *Akap9*, *Rhpn1*, *Spata22* und *Dnali1*. mRNA wurde aus *wt*- und *t*-Testis isoliert; *Gapdh* fungierte als Positivkontrolle; Wasser (H₂O) fungierte als interne Negativkontrolle; +/- RT-Enzym: mit/ohne reverse Transkriptase bei der cDNA Synthese der RNA Probe.

Des Weiteren wurden die mRNA-Transkripte für *Ammecr1*, *Akap9*, *Rhpn1*, *Spata22* und *Dnali1* mit *In Situ* Hybridisierung untersucht. Durch Verwendung von spezifischen *anti-sense*-Sonden gegen die zu analysierenden mRNAs zeigen sich für die unterschiedlichen Transkripte auch unterschiedliche Signale im Querschnitt eines *wt* Hodenkanälchens (Abbildung 19). *Ammecr1*-Transkript konnte nur sehr schwach detektiert werden. Hier zeigt sich eine leichte Färbung der frühen Keimzellstadien (differenzierte Spermatogonien und Spermatocyten). Die Färbung des *Akap9*-Transkripts konnte im Vergleich zum *Ammecr1*-Transkript besser dargestellt werden. Hier zeigen sich Signale für *Akap9*-mRNA bereits im frühesten Stadium der Keimzellendifferenzierung, in undifferenzierten Spermatogonien (Typ A) und in differenzierten Spermatogonien (Typ B). *Rhpn1*-Transkript ist in der frühen Keimzellpopulation der Typ A Spermatogonien nicht zu finden. Hier ist die Expression in differenzierten Typ B Spermatogonien, Spermatocyten und etwas schwächer auch in runden Spermatiden zu erkennen. Eine ähnliche Expression lässt sich auch für das *Spata22*-Transkript feststellen. Auch hier zeigt sich die Expression der mRNA in differenzierten Spermatogonien, Spermatocyten und Spermatiden. Wobei sich die Expression der *Spata22*-mRNA gleichmäßig stark in diesen Keimzellstadien darstellt. Das *Dnali1*-Transkript lässt sich ebenfalls in differenzierten Spermatogonien und Spermatocyten anfärben. Für alle analysierten mRNAs beginnt die Transkription somit in prämeiotischen Keimzellstadien.

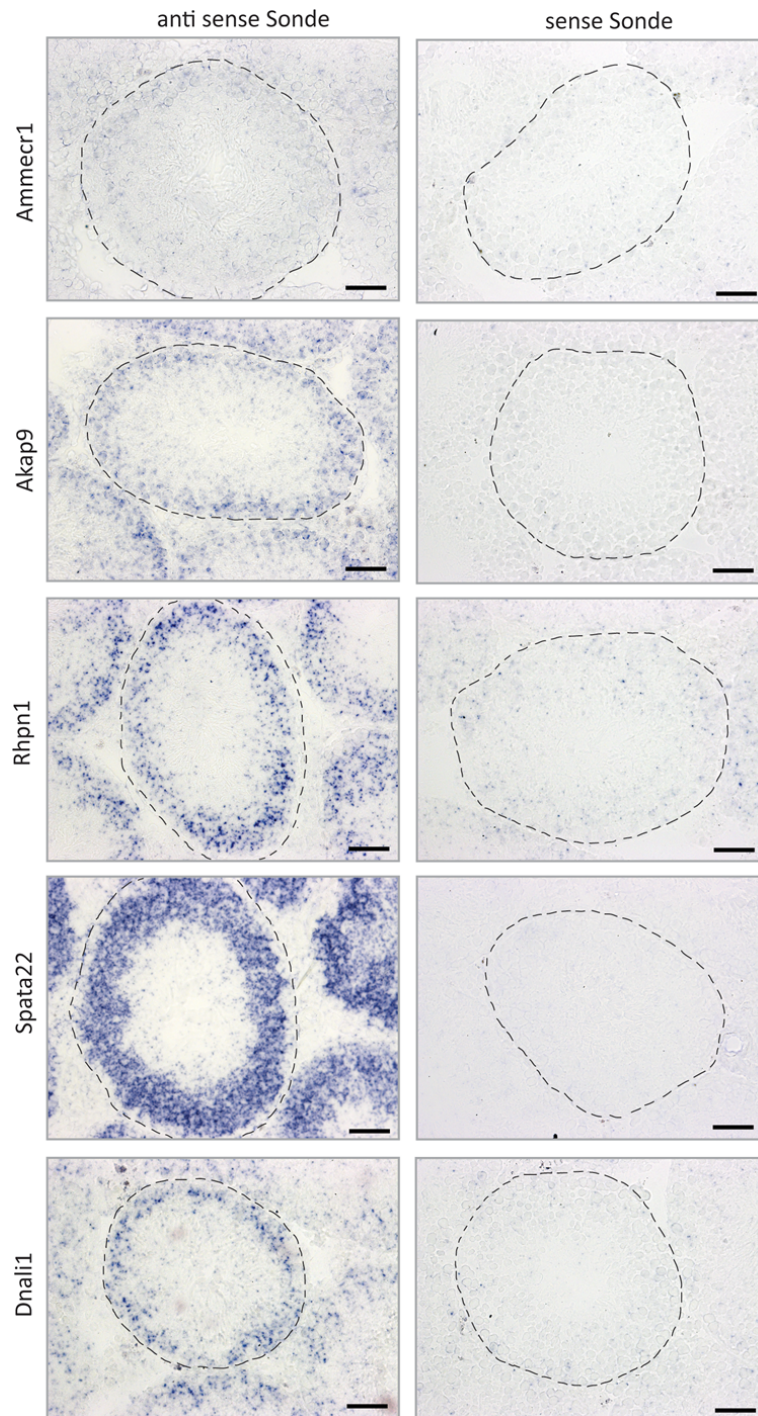


Abbildung 19: *In Situ* Hybridisierungs-Analyse für *Ammecr1*, *Akap9*, *Rhpn1*, *Spata22* und *Dnali1* mRNA in Hoden-Querschnitten. links: *In Situ* Hybridisierungen, jeweils inkubiert mit der *anti-sense* Sonde; rechts: *In Situ* Hybridisierungen, jeweils inkubiert mit der *sense* Sonde (interne Kontrolle); Maßstab: 50 µm.

3.3 Lichtmikroskopische Proteinexpressionsanalyse von SMOK1-Interaktionspartnern in der Maus

In der weiteren molekularen Analyse wurde auch die Expression der Proteine AMMECR1, AKAP9, SPATA22 und DNALI1 in Testisgewebeschnitten und in isolierten Spermatozoen des *Cauda Epididymis* von *wt*-Männchen mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht (Abbildung 20 bis Abbildung 24). Diese Analyse soll zeigen ob und wo die *Prey*-Protein innerhalb des relevanten Gewebes exprimiert sind.

Die hierfür verwendeten kommerziellen Primärantikörper wurden im Kaninchen hergestellt und sind gegen die humanen Proteine gerichtet. Da die Mausproteine im Vergleich zu den menschlichen Proteinen eine sehr hohe Ähnlichkeit in ihrer Aminosäuresequenz besitzen, konnten die jeweiligen Primärantikörper auch gegen die Nager-Proteine eingesetzt werden.

TUBULIN wurde als Gegenfärbung bzw. als Marker des Axonems eingesetzt und zeigt im Hodengewebe eine Färbung in allen Zellen des Hodenkanälchens. In isolierten Spermien ist, für die TUBULIN-Färbung, eine deutliche Markierung des Spermenschwanzes zu erkennen.

Als Kontrolle wurde der, in den Färbungen verwendete, 2. Antikörper als Negativkontrolle mitgeführt. Für diese Kontrolle ist keine Färbung in tubulären Zellen erkennbar. Des Weiteren ist, für die Sekundärantikörperkontrolle, keine Markierung in Spermatozoen des Nebenhodens sichtbar. Signale, welche für diese Negativkontrolle im Hodenkanal zu erkennen sind, können Strukturen des Interstitiums zugeordnet werden. Diese Markierungen werden somit als Hintergrundfärbung angesehen (Abbildung 20).

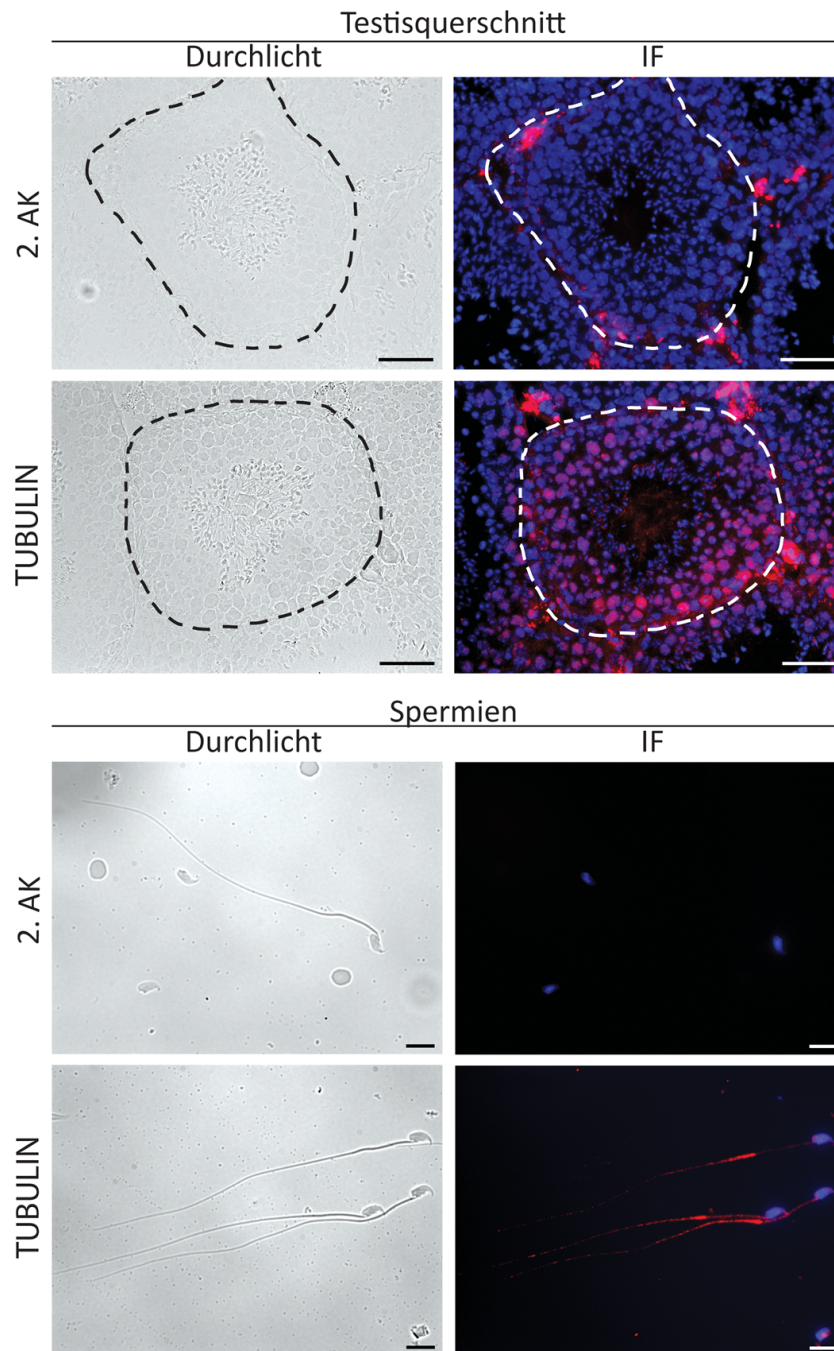


Abbildung 20: Lokalisationsanalyse von TUBULIN und vom Sekundärantikörper (rot) in Testisquerschnitten und in isolierten wt Spermatozoen des Nebenhodens durch Immunfluoreszenzfärbung. Gezeigt sind jeweils die Durchlicht- (l) und die Immunfluoreszenzaufnahmen (r); DAPI (blau): Kernfärbung; Maßstab Testisquerschnitte: 50 μm ; Maßstab Spermien: 10 μm

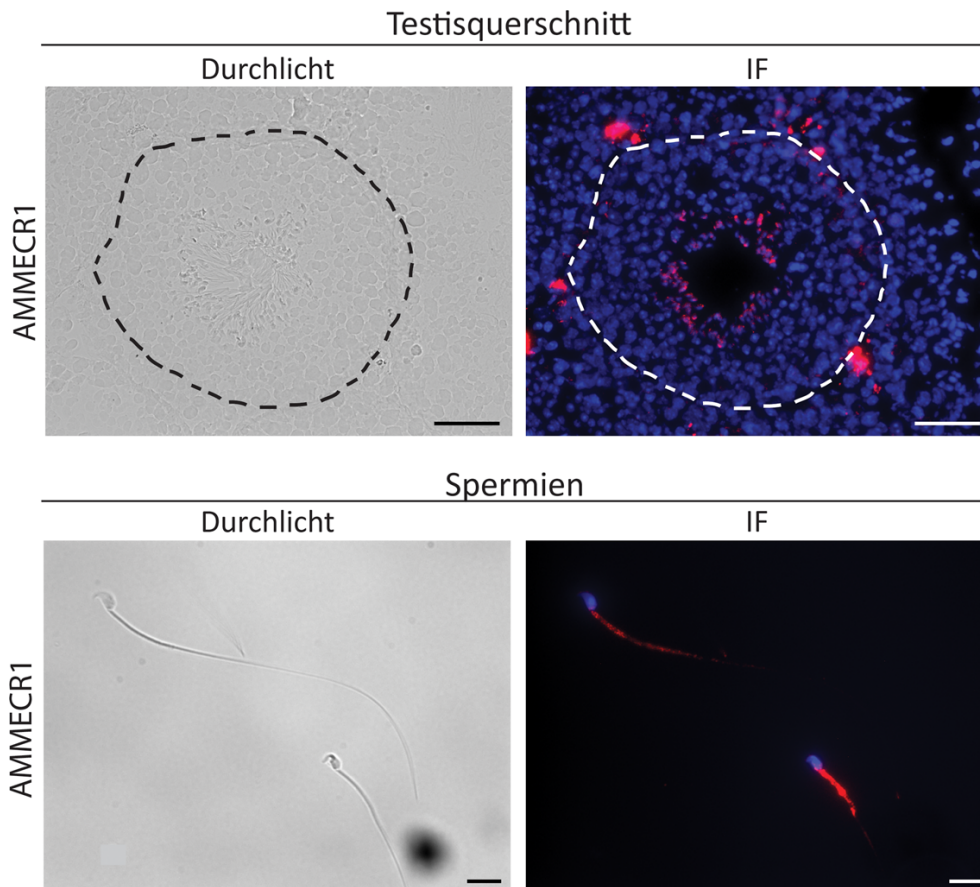


Abbildung 21: Lokalisationsanalyse von AMMECR1 (rot) in Testisquerschnitten und in isolierten wt Spermatozoen des Nebenhodens durch Immunfluoreszenzfärbung. Gezeigt sind jeweils die Durchlicht- (l) und die Immunfluoreszenzaufnahmen (r); DAPI (blau): Kernfärbung; Maßstab Testisquerschnitte: 50 μm ; Maßstab Spermien: 10 μm

Das AMMECR1-Protein kann im inneren Bereich des Hodenkanälchens, an elongierten Spermatiden nahe dem Lumen, dargestellt werden. Die Immunfluoreszenzanalyse von isolierten Spermatozoen des Nebenhodens macht deutlich, dass AMMECR1 stark am Mittelstück (*Mid Piece*) und schwächer am Hauptteil (*Principal Piece*) des Spermenschwanzes lokalisiert ist.

Auch das AKAP9-Protein zeigt im Hodenquerschnitt eine Färbung an dem späten Keimzellstadium der elongierten Spermatide. Die Färbung der isolierten Spermatozoen zeigt für AKAP9 starke Signale an der akrosomalen Region des Spermienkopfes (Abbildung 22, weißer Pfeil). Eine zweite Expressionsdomäne für AKAP9 zeigt sich schwächer im Spermenschwanz (Abbildung 22, weiße Pfeilspitzen).

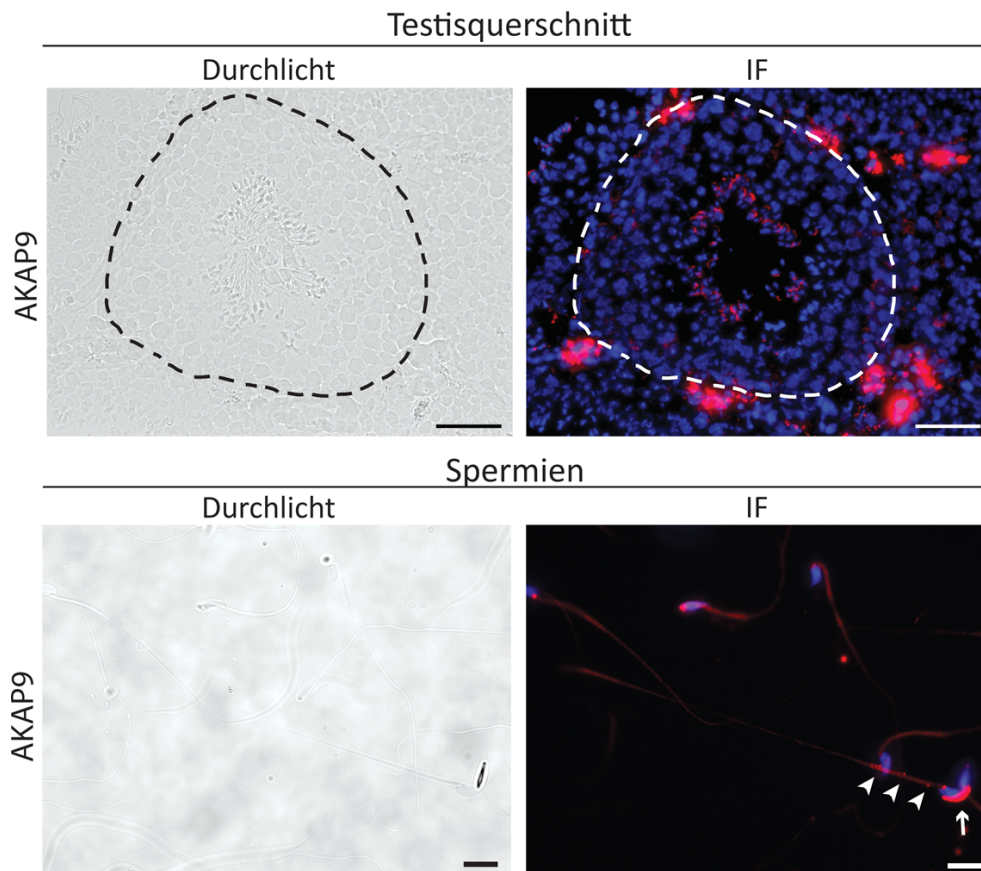


Abbildung 22: Lokalisationsanalyse von AKAP9 (rot) in Testisquerschnitten und in isolierten wt Spermatozoen des Nebenhodens durch Immunfluoreszenzfärbung. Gezeigt sind jeweils die Durchlicht- (l) und die Immunfluoreszenzaufnahmen (r); DAPI (blau): Kernfärbung; Maßstab Testisquerschnitte: 50 μ m; Maßstab Spermien: 10 μ m

Für das SPATA22-Protein konnte im Querschnitt eines Hodenkanälchens keine Expression gezeigt werden. In isolierten Spermatozoen zeigen sich jedoch zwei Expressionsdomänen für SPATA22. Deutlich erkennbar sind hier die Markierung der akrosomalen Region am Spermienkopf (Abbildung 23, weiße Pfeilspitze) und die Färbung des Verbindungsstücks zwischen Spermienkopf und Spermienchwanz (Abbildung 23, weißer Pfeil). Eine klare Expression im Flagellum ist hier nicht erkennbar (Abbildung 23).

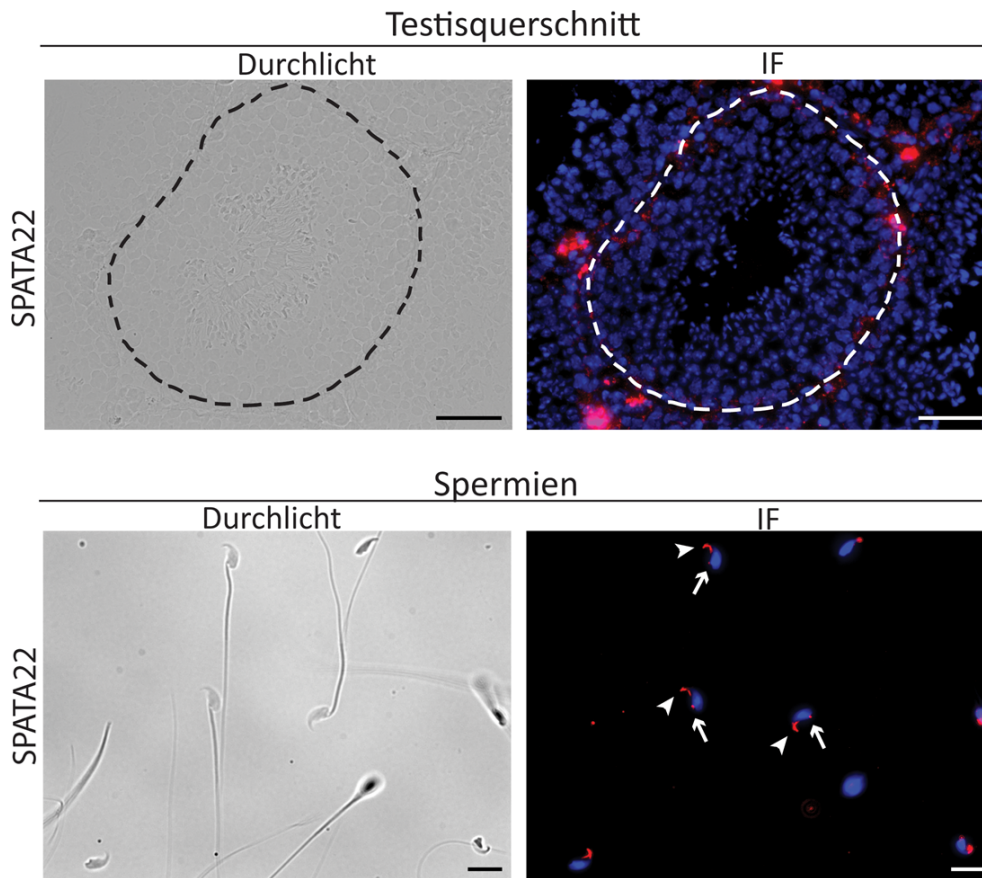


Abbildung 23: Lokalisationsanalyse von SPATA22 (rot) in Testisquerschnitten und in isolierten wt Spermatozoen des Nebenhodens durch Immunfluoreszenzfärbung. Gezeigt sind jeweils die Durchlicht- (l) und die Immunfluoreszenzaufnahmen (r); DAPI (blau): Kernfärbung; Maßstab Testisquerschnitte: 50 μm ; Maßstab Spermien: 10 μm

Im Hodenquerschnitt konnten DNALI1 Proteinsignale in frühen (differenzierte Spermatogonien) und späten Keimzellstadien (eligierte Spermatide) detektiert werden. Die Expression des Proteins DNALI1 zeigt sich in isolierten Spermatozoen stärker im Mittelteil (*Mid Piece*) und schwächer im Hauptteil (*Principal Piece*) des Spermienchwanzes (Abbildung 23).

Die Expression des RHPN1-Proteins in Spermatozoen wurde bereits hinreichend untersucht (Nakamura et al., 1999) und zeigt die Lokalisation von RHPN1 im Hauptstück (*Principal Piece*) des Spermienflagellums in der Maus (Anhang, Abbildung 58).

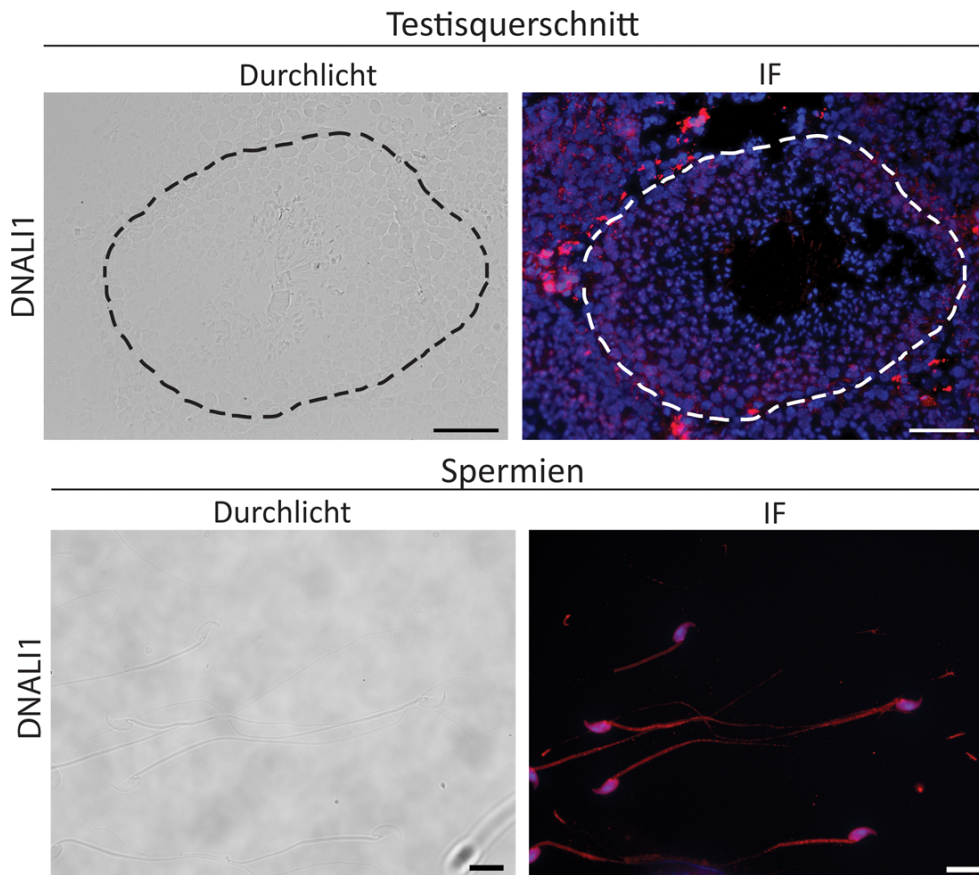


Abbildung 24: Lokalisationsanalyse von DNALI1 (rot) in Testisquerschnitten und in isolierten wt Spermatozoen des Nebenhodens durch Immunfluoreszenzfärbung. Gezeigt sind jeweils die Durchlicht- (l) und die Immunfluoreszenzaufnahmen (r); DAPI (blau): Kernfärbung; Maßstab Testisquerschnitte: 50 μm ; Maßstab Spermien: 10 μm

Somit zeigen die untersuchten Proteine eine Expression an Strukturen des Spermienchwanzes. Diese Beobachtung ist von entscheidender Bedeutung für die in der Hefe identifizierten Protein-Protein-Interaktionen, da auch der *Responder* (SMOK1^{TCR}) und folglich mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auch SMOK1 im Flagellum von Spermien exprimiert sind (Anhang, Abbildung 59; Véron et al., 2009). Die Interaktionspartner (*Preys*) und SMOK1 sind somit koexprimiert und an den gleichen Strukturen von Spermatozoen, an Flagellen, lokalisiert.

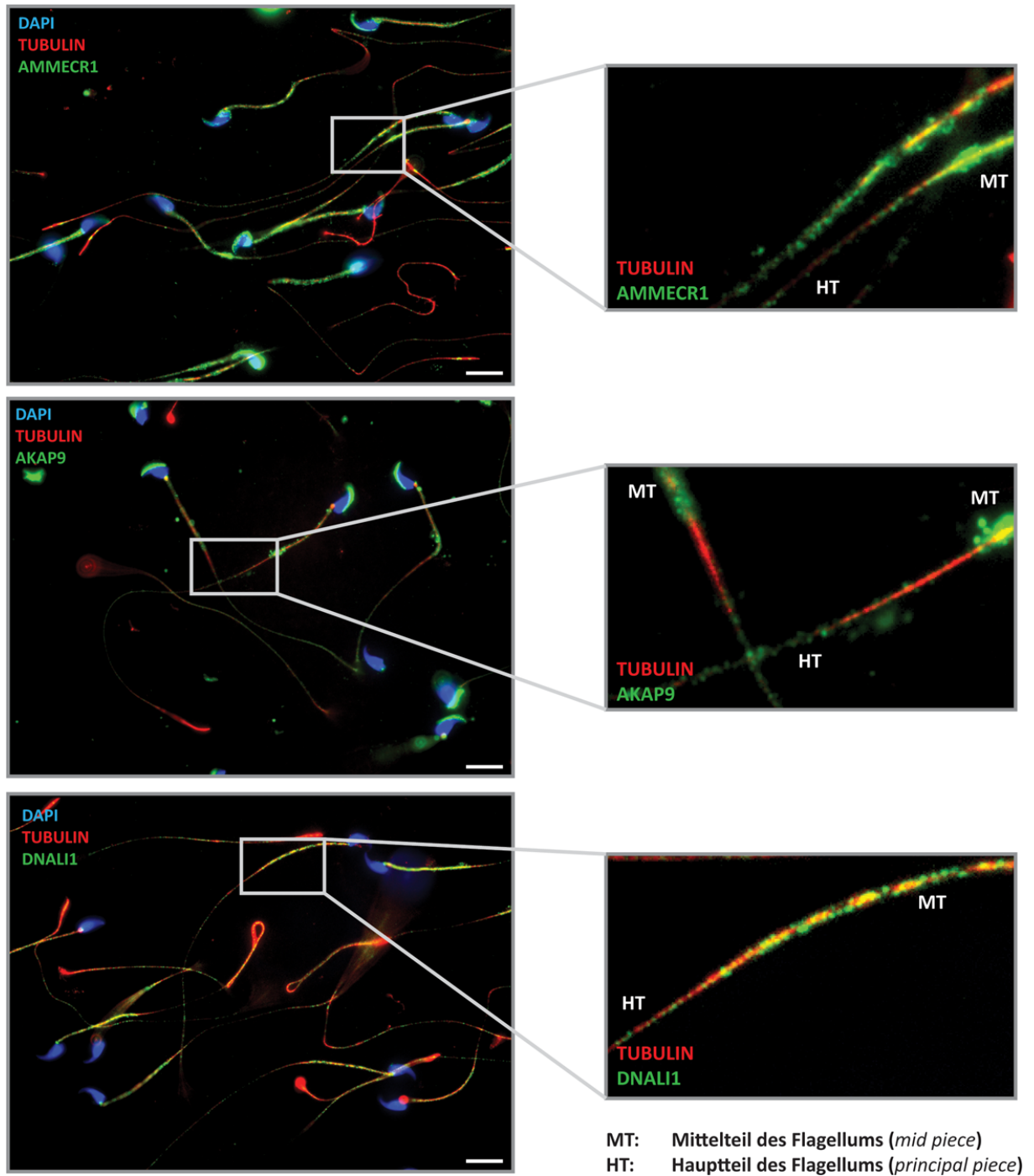


Abbildung 25: Lokalisationsanalyse der Proteine AMMECR1, AKAP9 und DNALI1 (grün) in isolierten wt Spermatozoen des Nebenhodens durch Immunfluoreszenzfärbung. Rahmen: Ausschnitt aus der Aufnahme und Vergrößerung dieser Region (rechts); DAPI (blau): Kernfärbung; TUBULIN (rot): Markierung des Axonems; Maßstab: 10 µm

Für die Proteine AMMECR1, AKAP9 und DNALI1, welche eine gut erkennbare Färbung entlang des Flagellums eines Spermatozoons zeigen, wurden weiterführend Doppelfärbungen mit TUBULIN durchgeführt. Durch diese Färbungen sollte analysiert werden, ob die untersuchten Proteine mit TUBULIN kolokalisieren und somit an axonemalen Strukturen zu finden sind (Abbildung 25).

Wie in der Fluoreszenzaufnahme deutlich wird, sind Proteinsignale für AMMECR1 und AKAP9 an flagellären Strukturen des Mittelstücks (*Mid Piece*) und des Hauptteils (*Principal Piece*) zu erkennen. Eine klare Kolokalisation mit TUBULIN wird jedoch nicht deutlich. Die Proteinsignale zeigen für AMMECR1 und AKAP9 eine Färbung der äußeren Schwanzstrukturen im Mittelstück (Mitochondrien oder *Outer Dense Fibers*) und Hauptteil (*Fibrous Sheath* oder *Outer Dense Fibers*) und eine zentrale Färbung für TUBULIN (Axonem) entlang des Flagellums. Für die Doppelfärbung von DNALI1 und TUBULIN zeigt sich ein anderes Bild. Hier lässt sich eine Kolokalisation der beiden Proteine besonders im Mittelstück (*Mid Piece*) und zum Teil auch im Hauptteil (*Principal Piece*) des Spermischwanzes erkennen. Da TUBULIN als Marker für die zentrale Ultrastruktur Axonem eingesetzt wurde, bestätigt die Beobachtung der Kolokalisation, dass DNALI1 am Axonem gebunden ist.

3.4 Elektronenmikroskopische Lokalisation von SMOK1-Interaktionspartnern in Spermatozoen des Cauda Epididymis

Bei der Immunfluoreszenzfärbung von *wt*-Spermatozoen wurden die SMOK1-Interaktionspartner an flagellären Strukturen nachgewiesen. Um eine genaue Aussage über die subzelluläre Lokalisation der Interaktionspartner machen zu können, wurde im weiteren Verlauf untersucht an welchen Feinstrukturen innerhalb des Flagellums die Proteine gebunden sind (Abbildung 26, 27 und 28). Immunogoldmarkierung und anschließende elektronenmikroskopische Untersuchungen von Ultradünnschnitten eines *wt*-Nebenhodens, welcher als Lagerstätte für reife Spermatozoen dient, sollte Aufschluss über die genaue Lokalisation der Proteine innerhalb des Spermischwanzes geben. Für diese Analyse wurden dieselben kommerziellen Primärantikörper benutzt, die bereits in der Immunfluoreszenzfärbung zur Anwendung kamen. Die Analyse der Goldsignale erfolgte sowohl in Querschnitten des Hauptteils, als auch in Querschnitten des Mittelteils, da sich diese Abschnitte des Schwanzes strukturell besonders in ihrem äußeren Aufbau unterscheiden. Um eindeutig die subzellulären

Strukturen zu bestimmen, an denen die zu untersuchenden Proteine gebunden sind, wurde zusätzlich die prozentuale Verteilung der Proteine TUBULIN, AMMECR1, AKAP9, SPATA22 und DNALI1 im Flagellum von *wt*-Spermatozoen des Nebenhodens untersucht (Abbildung 29). Hierfür wurden willkürlich mind. 20 Querschnitte des Hauptteils und 20 Querschnitte des Mittelteils von Flagellen ausgezählt und die Immunogoldsignale den Flagellenstrukturen Mitochondrien, *Fibrous Sheath*, *Outer Dense Fibers* und Axonem zugeordnet bzw. im Harz vorkommende Immunogoldsignale als Hintergrund erfasst. Dann wurde der prozentuale Anteil bezogen auf die Goldgesamtmenge für jedes der Proteine errechnet. Strukturen, deren prozentualer Anteil des Goldsignals mindestens zweifach über dem prozentualen Wert des Hintergrunds liegt, stellen den potentiellen Ort der Lokalisation dar.

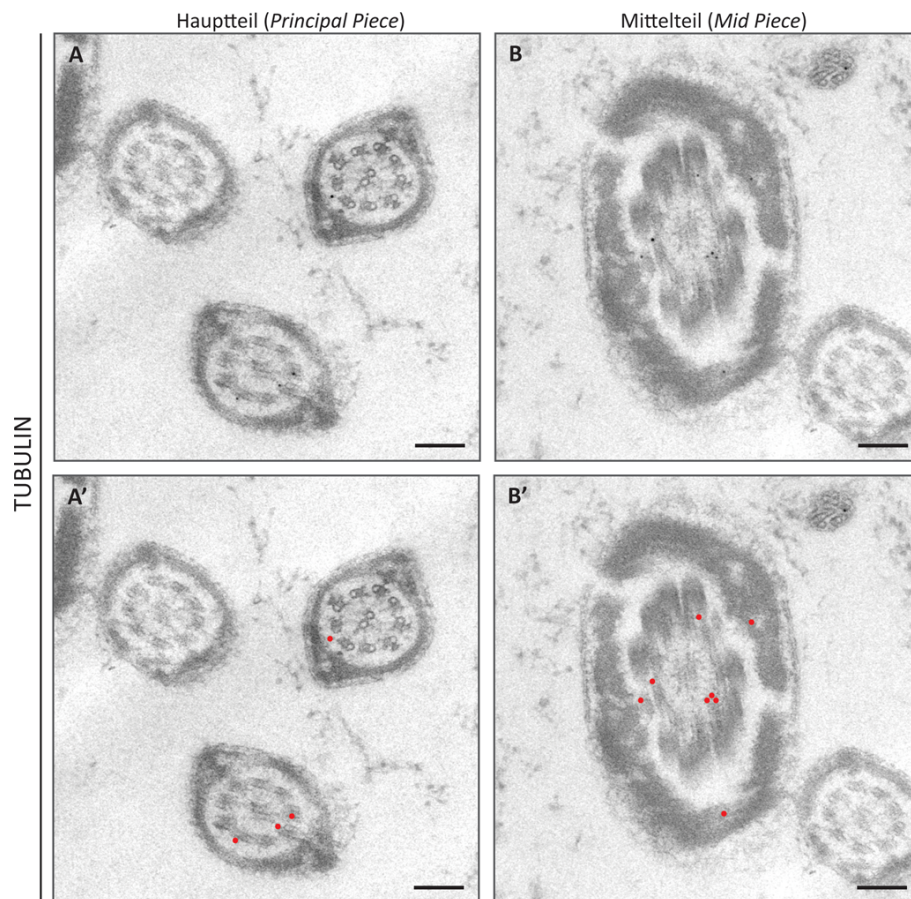


Abbildung 26: Subzelluläre Lokalisationsanalyse von TUBULIN im Flagellum von *wt*-Spermatozoen durch Immunogoldmarkierungen auf Ultradünnschnitten vom Nebenhoden. A: Querschnitte durch den Hauptteil eines Spermatozoen. B: Querschnitte durch den Mittelteil eines Spermatozoen. A und B: unbearbeitete Aufnahme. A' und B': bearbeitete Aufnahme mit rot hervorgehobenen Immunogoldmarkierungen. Maßstab: 150 nm

Bei dieser Untersuchung wurden Goldsignale für TUBULIN im Hauptteil am Axonem und im Mittelteil am Axonem und den Mitochondrien detektiert (Abbildung 26). Die Auswertung der prozentualen Verteilung ergibt jedoch eine Bindung von Tubulin nur am Axonem, da die Menge der Signale mit 70 % weit über dem Wert vom Hintergrund liegt (Abbildung 29). Die Anzahl der Goldsignale an den Mitochondrienstrukturen des Mittelstücks liegt dagegen unter dem des Hintergrundwertes. Die Mitochondrien stellen demnach keine Bindedomäne für TUBULIN dar. Die subzelluläre Analyse von AMMECR1 zeigt Signale an der Fibrillenscheide und den *Outer Dense Fibers* innerhalb des Hauptteils des Spermienschwanzes und an den Mitochondrien und *Outer Dense Fibers* des Mittelstückes (Abbildung 27). Durch die Auszählung der Goldsignale wird dieses Bild bestätigt (Abbildung 29). Das AMMECR1-Protein lokalisiert somit an den äußeren Strukturen des Spermienschwanzes, wie den Mitochondrien, *Outer Dense Fibers* und *Fibrous Sheath*. Die in der Immunfluoreszenz gestellte Vermutung konnte durch die Immunogoldfärbung bestätigt werden. Für AKAP9 wurden Goldsignale in erster Linie an der Fibrillenscheide des Hauptstückes und den Mitochondrien des Mittelstückes des Flagellums detektiert (Abbildung 27). Nach statistischer Auszählung der Signale lassen sich diese Ultrastrukturen als Bindedomänen bestätigen und zusätzlich in geringerem Maße die *Outer Dense Fibers* als Ort der Lokalisation beobachten (Abbildung 29). Die in der Immunfluoreszenz aufgestellte Vermutung, dass AKAP9-Protein eher an den äußeren flagellären Strukturen lokalisiert ist, konnte ebenfalls durch die Immunogoldfärbung bestätigt werden. Goldsignale für SPATA22 wurden im Hauptteil verstärkt an den *Outer Dense Fibers* und in geringerem Ausmaße an den *Fibrous Sheath* beobachtet. Auch am Mittelstück des Flagellums konnten vermehrt Goldsignale an den *Outer Dense Fibers* und zusätzlich an den Mitochondrien gezählt werden (Abbildung 28). Der Eindruck der verstärkten Bindung von SPATA22 an die ODFs und an die mitochondriale Scheide und schwächer an die *Fibrous Sheath* wurde durch die Bestimmung der prozentualen Verteilung untermauert (Abbildung 29). Ein anderes Bild in der Verteilung der Signale zeigt sich für DNALI1. Hier wurden Signale am Axonem (Mittel- und Hauptteil des Flagellums) und an den Mitochondrienstrukturen (Mittelteil) lokalisiert (Abbildung 28). Die statistische Auswertung zeigt, dass das Axonem und die Mitochondrienscheide die zwei Hauptbindedomänen für DNALI1 sind (Abbildung 29). Die erste Beobachtung der Kolo-kalisation von DNALI1 und TUBULIN am Axonem, die sich aus den Ergebnissen der Immunfluoreszenzfärbung ergab, wurde hier bestätigt.

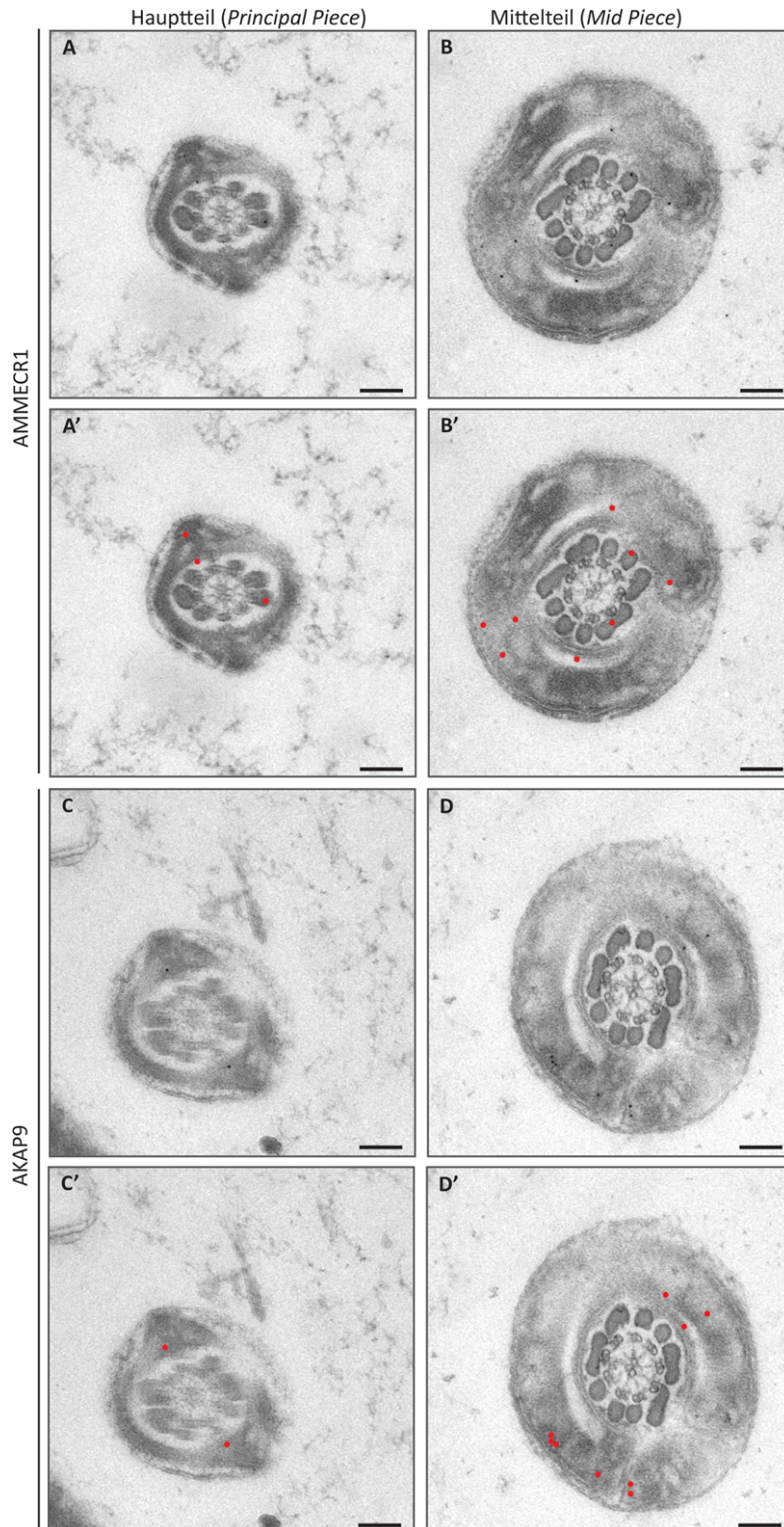


Abbildung 27: Subzelluläre Lokalisationsanalyse der Proteine AMMECR1 (A, B) und AKAP9 (C,D) im Flagellum von wt-Spermatozoen durch Immunogoldmarkierungen auf Ultradünnschnitten vom Nebenhoden. A und C: Querschnitte durch den Hauptteil eines Spermatozoen. B und D: Querschnitte durch den Mittelteil eines Spermatozoen. A,B,C,D: unbearbeitete Aufnahme. A',B',C',D': bearbeitete Aufnahme mit rot hervorgehobenen Immunogoldmarkierungen. Maßstab: 150 nm

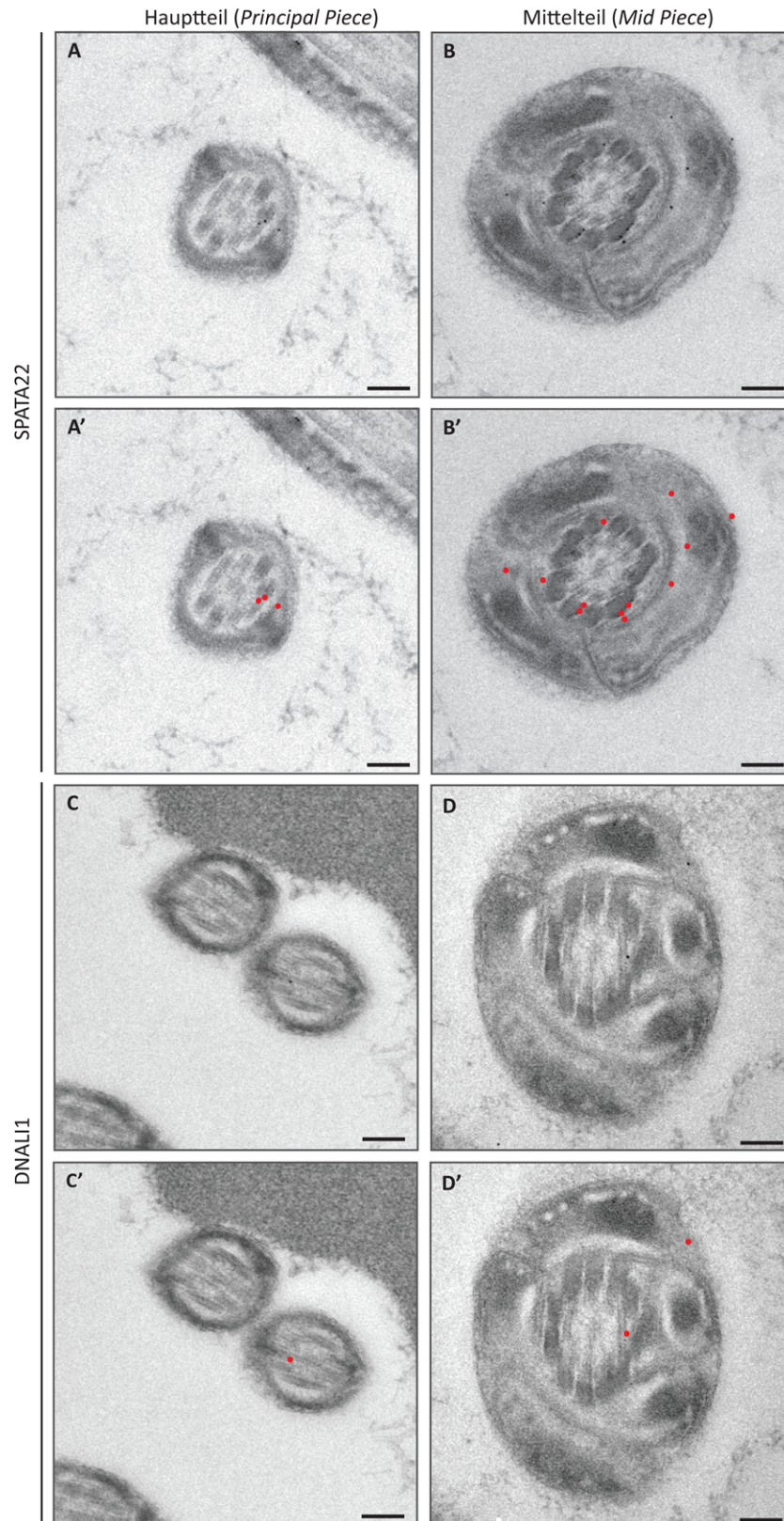


Abbildung 28: Subzelluläre Lokalisationsanalyse der Proteine SPATA22 (A, B) und DNALI1 (C,D) im Flagellum von wt-Spermatozoen durch Immunogoldmarkierungen auf Ultradünnschnitten vom Nebenhoden. A und C: Querschnitte durch den Hauptteil eines Spermatozoen. B und D: Querschnitte durch den Mittelteil eines Spermatozoen. A,B,C,D: unbearbeitete Aufnahme. A',B',C',D': bearbeitete Aufnahme mit rot hervorgehobenen Immunogoldmarkierungen. Maßstab: 150 nm

Die Lokalisation von RHPN1-Protein an Ultrastrukturen des Spermienschwanzes wurde bereits eingehend untersucht und zeigt, dass RHPN1 verstärkt an den *Outer Dense Fibers* und in geringerem Maße an der *Fibrous Sheath* lokalisiert ist (Anhang, Abbildung 58; Nakamura et al., 1999). Die SMOK1-Interaktionspartner sind demnach zum größten Teil an den gleichen Ultrastrukturen lokalisiert wie der *Responder* SMOK1^{TCR} und SMOK1 (Anhang, Abbildung 59; Véron et al., 2009). Die biologische Relevanz der SMOK1-Interaktionspartner aus der Hefe wird somit durch die Ergebnisse der Proteinexpressionsanalysen und durch die Resultate der Lokalisationsstudien stark untermauert.

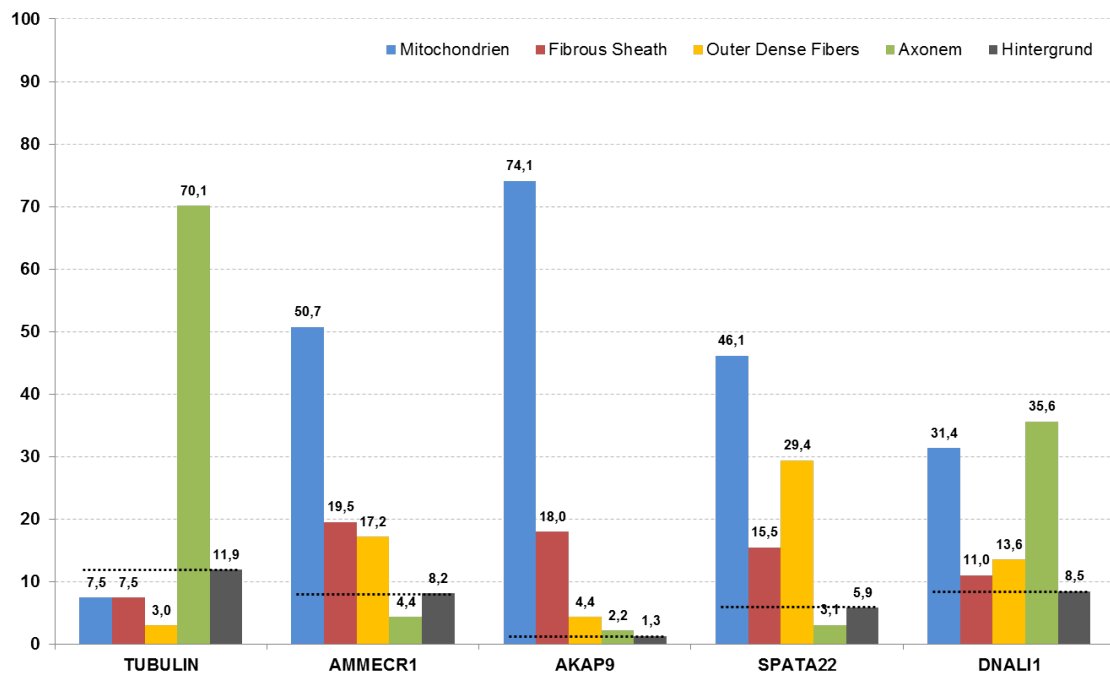


Abbildung 29: Prozentuale Verteilung der Proteine TUBULIN, AMMECR1, AKAP9 und DNALI1 im Flagellum von wt-Spermatozoen des Nebenhodens. Willkürliche Auszählung von mind. 20 Querschnitten des Hauptteils und 20 Querschnitten des Mittelteils von Flagellen; Immunogoldsignale wurden den Flagellenstrukturen Mitochondrien, Fibrous Sheath, Outer Dense Fibers und Axonem zugeordnet bzw. im Harz vorkommende Immunogoldsignale als „Hintergrund“ erfasst und der prozentuale Anteil bezogen auf die Goldgesamtmenge für ein Protein errechnet.

Aus den Daten der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse und den molekularen Untersuchungen kann zusammenfassend ein Interaktionsnetzwerk generiert werden, welches die Wechselwirkungen der untersuchten Proteine zusammenfasst (Abbildung 30).

Es umfasst die bekannten *t*-Komplex Faktoren SMOK1, TAGAP1, FGD2 und NME3, den *Distorter*-Kandidaten TIAM2 (persönliche Mitteilung von Y. Charron, H. Bauer und B. G. Herrmann) sowie die *Preys*, die nach der molekularen Analyse die Wechselwirkungen der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse bekräftigen.

Da RHO-Proteine eine entscheidende Rolle im Signalweg von *Transmission Ratio Distortion* spielen, wurde zusätzlich, unter zu Hilfenahme der aktuellen Literatur untersucht, ob die *Preys* und die *t*-Komplex Faktoren möglicherweise Protein-Protein-Interaktionen mit Rho-GTPasen eingehen können. FGD2 zum Beispiel ist als GTP-Austauschfaktor (GEF) in der Lage CDC42 durch Austausch von GDP durch GTP zu aktivieren (Huber et al., 2008). TIAM2, ebenfalls ein GEF und ein *Distorter*-Kandidat des TRD-Signalweges (persönliche Mitteilung von Y. Charron, H. Bauer & B.G. Herrmann), aktiviert biochemisch die kleine RHO-GTPase RAC1 (Matsuo et al., 2002; Matsuo et al., 2003). TAGAP1, der erste bekannte *Distorter* im TRD-Signalweg, ist dagegen in der Lage als GTPase aktivierendes Protein (GAP) die Hydrolyse von RHOA-GTP zu verstärken (Bauer et a., 2005). Zusätzlich ist RHPN1, aus der Gruppe der *Preys*, bekannt für die Bindung der kleinen GTPase RHOA (Nakamura et al., 1999).

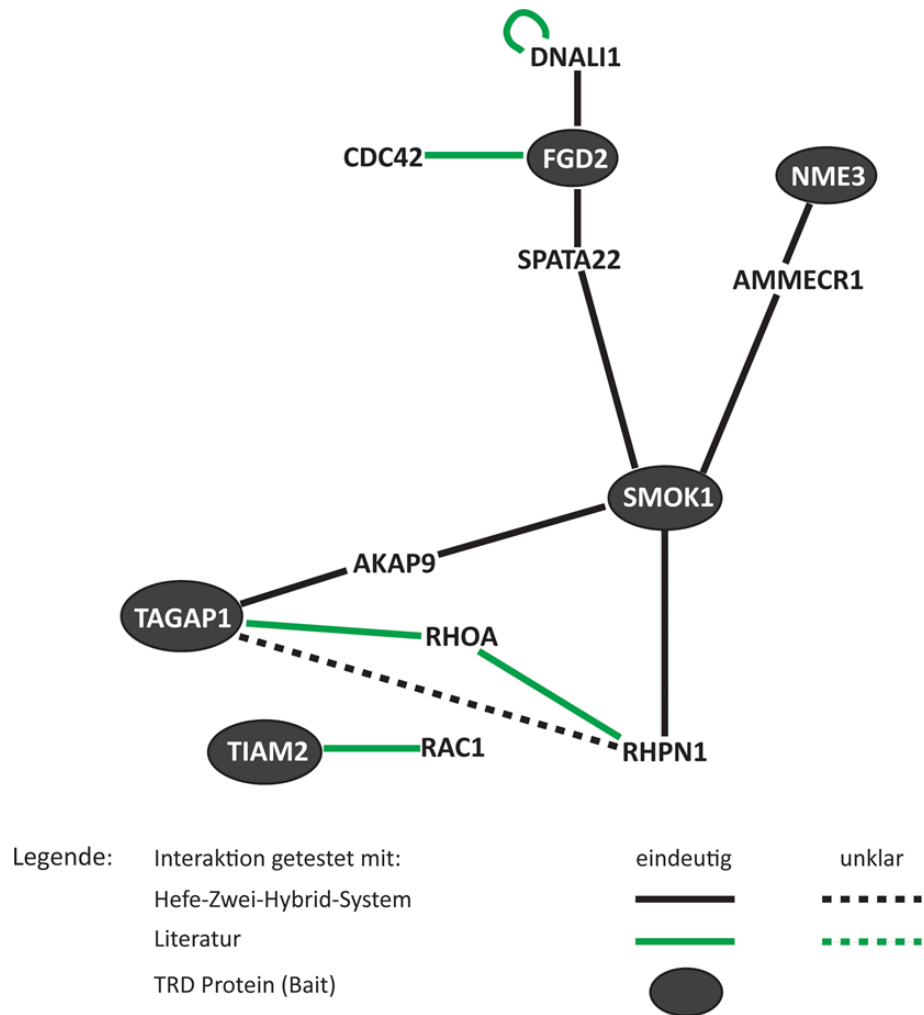


Abbildung 30: Verkleinertes Interaktionsnetzwerk zwischen *t*-Komplex Faktoren und Hefe-Bindeproteinen (schwarz), erweitert um bekannte Interaktionen mit kleinen RHO-GTPasen (grün). Eindeutige Interaktionen: durchgezogene Verbindungslinie. Unklare Interaktionen: unterbrochene Verbindungslinie.

4 Ergebnisse (C) Validierung von Protein-Protein-Interaktionen

Mit Hilfe der Lumineszenz basierte IP Analyse in HEK293T Zellen sollten die identifizierten Hefeinteraktionen zwischen SMOK1 und den *Prey*-Proteinen AMMECR1 und RHPN1 *in vitro* in Säugerzellen analysiert werden. Zusätzlich wurden die identifizierten *Prey*-Proteine SPATA22, DNALI1 und AKAP9 auf Interaktionen getestet. Hierfür wurden die zu untersuchenden Protein-Paarungen in eine Vertiefung einer 96 *Well*-Platte transient kotransfiziert. Ein Protein dieser Paarung ist dabei N-Terminal mit einem ProteinA-Epitop fusioniert. Das zweite Protein der Paarung besitzt am N-Terminus ein V5/Fire Epitop. 48 h nach der Kotransfektion werden die Zellen lysiert und Bruchstücke wie Zelltrümmer pelletiert. Proteine die mit dem ProteinA-Epitop fusioniert sind, werden anschließend durch Inkubation an eine IgG-Matrix gebunden. Nach mehrfachem Waschen der Matrix sind lediglich noch die ProteinA-Moleküle und mögliche V5/Fire-Interaktionspartner an der Matrix gebunden. Die Interaktionen von Protein-Paarungen können dann, nach Substratzugabe, durch das Lumineszenzsignal des Bindungspartners (V5/Fire-Epitop) detektiert werden.

4.1 Lumineszenz basierte IP Analyse

Mit Hilfe der Protein-Protein-Interaktionsstudien in der Hefe konnten neue Bindungspartnern für SMOK1 identifiziert werden. Die Beobachtungen des vorhergehenden Kapitels zeigen zudem, dass diese neuen Bindungspartner, sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene, im Hodengewebe und in reifen Spermatozoen exprimiert sind. Des Weiteren konnte, durch die elektronenmikroskopischen Analysen, die subzelluläre Lokalisation dieser neuen SMOK1-Bindungspartner identifiziert werden. Aus den erlangten Ergebnissen zeigt sich, dass SMOK1 und die neu identifizierten Interaktionspartner mit hoher Wahrscheinlichkeit an den gleichen Strukturen innerhalb des Spermienflagellums kolokalisiert sind.

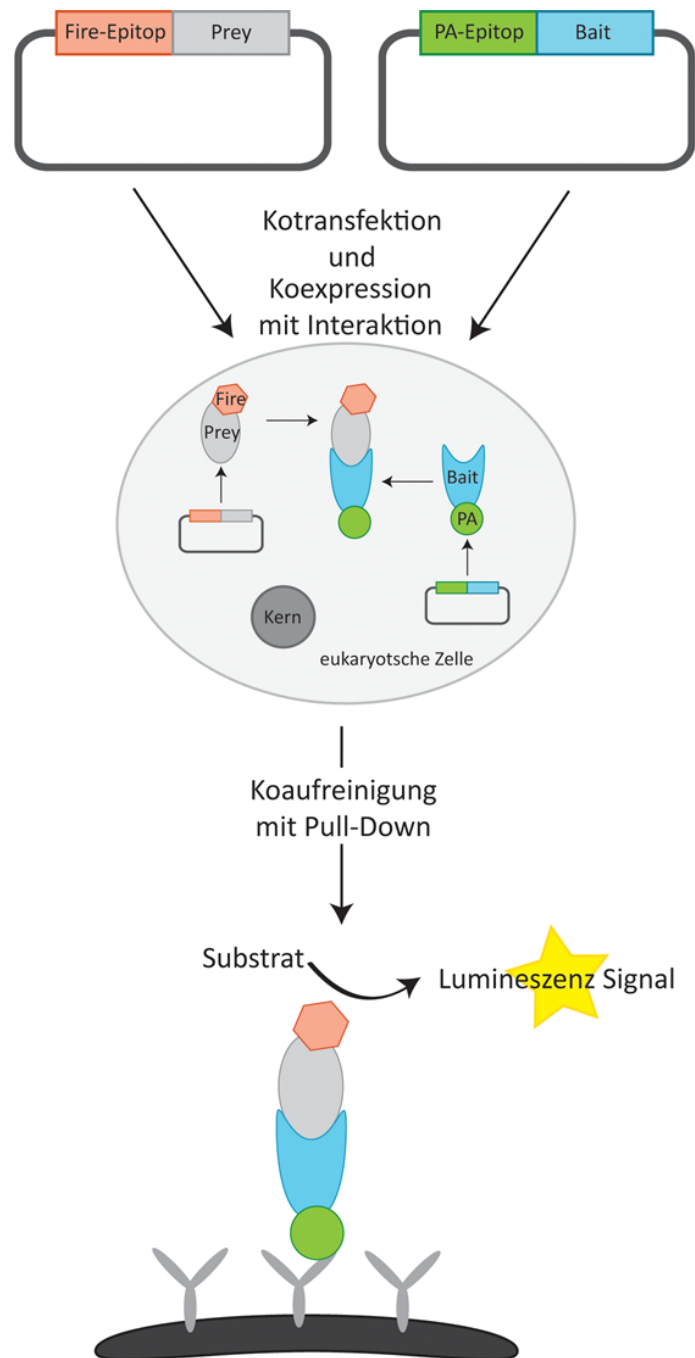


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Lumineszenz basierte IP Analyse. Diese Darstellung ist an eine Illustration von Dr. Frank Schwarz, vom German Cancer Research Center, angelehnt.

Vor Versuchsbeginn wurden alle hergestellten V5/Fire-Fusionsproteine auf ihre Expression in HEK293T-Zellen getestet. Hierfür wurden die V5/Fire-Konstrukte transient in HEK293T-Zellen transfiziert. Das Luciferase-Signal konnte dann nach 48 h, durch Zugabe eines Luciferase-Substrats zum Proteinlysate, gemessen werden. Hier konnte für alle V5/Fire-Konstrukte, ausgenommen der Konstrukte V5/Fire-SMOK FL und V5/Fire-FGD2 N-term, ein stabiles Signal generiert werden. Die Expression der Konstrukte V5/Fire-SMOK FL und V5/Fire-FGD2 N-term war in diesem Vorversuch mit einer nicht transfizierten Probe vergleichbar. Dies bedeutet, dass die Konstrukte V5/Fire-SMOK FL und V5/Fire-FGD2 N-term nicht ausreichend exprimiert werden.

Die Expression der ProteinA-Varianten wurde nicht zusätzlich im Western-Blot untersucht. Hier wird angenommen, dass aufgrund der stabilen Expression der V5/Fire-Fusionsproteine auch eine stabile Expression der ProteinA-Varianten sehr wahrscheinlich ist. Da für die Konstrukte V5/Fire-SMOK FL und V5/Fire-FGD2 N-term im Vortest kein Luciferase-Signal gemessen werden konnte, wird im Umkehrschluss angenommen, dass neben den Fire-Konstrukten auch die ProteinA-Varianten nicht exprimiert sind. Die beiden Konstrukte ProteinA-SMOK FL und ProteinA-FGD2 N-term wurden in den durchgeführten Experimenten als Negativkontrollen eingesetzt.

Die gemessenen Werte werden für eine Protein-Protein-Interaktion (*RLU Output*) gegen den Expressionswert des transfizierten V5/Fire-Konstruktes (*RLU Input*) normalisiert und im Anschluss ins Verhältnis zur verwendeten Negativkontrolle gesetzt, um den Wert der relativen Bindung zu erhalten.

Für die Messungen der Protein-Protein-Wechselwirkungen wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Eine Protein-Protein-Interaktion muss mindestens den Wert 2 für die relative Bindung erreichen (zweifach über dem Wert der Negativkontrolle), um als positive Interaktion gewertet werden zu können. Wenn der Wert der relative Bindung zwischen 1,5 und 2 liegt, wird die Interaktion als unklar, jedoch mit einer positiven Tendenz in Richtung Proteinbindung, eingestuft.

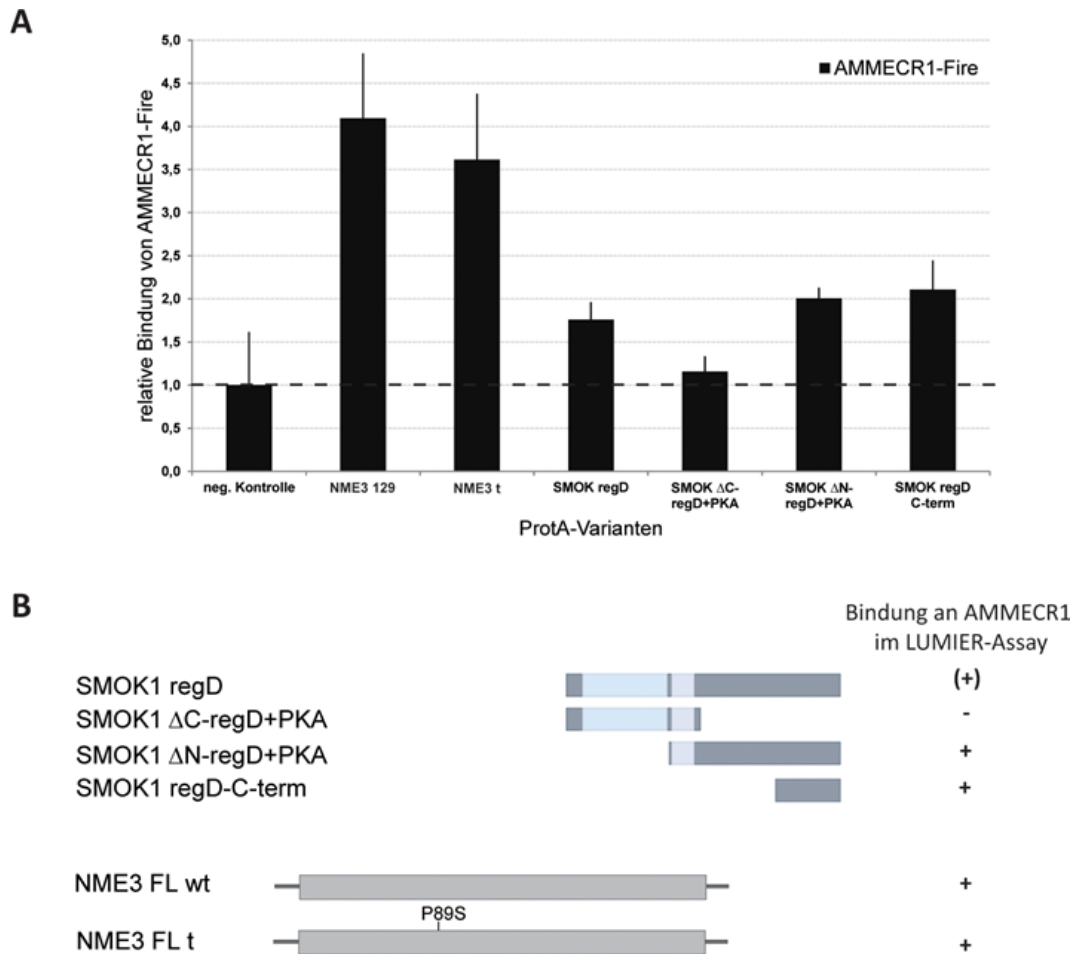


Abbildung 32: Lumineszenz basierte IP Analyse zwischen AMMECR1-V5/Fire und SMOK-ProtA-Varianten, sowie zwischen AMMECR1-V5/Fire und NME3-ProtA. A: Kotransfektionen von Ammecr1-Fire und Smok-ProtA-Konstrukten bzw. Nme3-ProtA-Konstrukten in HEK293-Zellen mit anschließender lumineszenz basierte IP Analyse zeigt, dass die Proteinvarianten Smok RD, Smok1 ΔN-regD+PKA und Smok regD-C-term, sowie NME3 Fl *wt* und NME3 FL *t* an AMMECR1 binden können. B: Darstellung der verwendeten SMOK und NME3-Konstrukte mit tabellarischer Zusammenfassung der identifizierten AMMECR1-Interaktionen.

Die erste Versuchsanordnung zeigt die getesteten Interaktionen zwischen dem Fusionsprotein V5/Fire-AMMECR1 und ProteinA-SMOK1-Domänenvarianten bzw. zwischen dem Fusionsprotein V5/Fire-AMMECR1 und dem ProteinA-NME3 (Abbildung 32). Hier wird deutlich, dass die SMOK1 Variante SMOK1 ΔC-regD+PKA vergleichbar mit dem Wert der Negativkontrolle ist und demnach nicht an AMMECR1 bindet. Eine andere ProteinA-SMOK1-Domänenvariante, SMOK1 RD, zeigt mit einem Wert von 1,8 für die relative Bindung bereits eine positive Tendenz bezogen auf die Bindung an SMOK1, dennoch wird diese Interaktion als unsicher ein-

gestuft. Der Wert der SMOK1 RD-AMMECR1-Interaktion liegt knapp unter dem Wert der Negativkontrolle. Die Domänen SMOK1 Δ N-regD+PKA und SMOK1 regD-C-term zeigen eine Bindung an AMMECR1. Wie in der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse kann aus diesen Ergebnissen geschlussfolgert werden, dass AMMECR1 mit dem C-Terminalen Bereich der regulatorischen Domäne von SMOK1 eine Bindung eingeht. Auch das ProteinA-NME3 zeigt, sowohl in der *wt*-Form, als auch in der mutierten *t*-haplotyp-Form, eine Interaktion mit AMMECR1. Hier liegen die Werte der relativen Bindung sogar 4x (NME3 *wt*) und 3,5x (NME3 *t*) über der Negativkontrolle. Somit konnten auch hier die Ergebnisse der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse bestätigt werden. Die Tatsache, dass die bestätigten Interaktionen für SMOK1 und AMMECR1 nur zweifach über dem Wert der Negativkontrolle liegen, könnte generell auf eine instabile bzw. schwache Interaktion deuten.

Im zweiten Versuchsansatz wurden die Interaktionen von SMOK1 und TAGAP1 mit RHPN1 näher untersucht (Abbildung 33). Die getesteten Domänen SMOK1 RD und SMOK1 Δ C-regD+PKA zeigen keine Interaktion mit RHPN1 im Vergleich zur Negativkontrolle. An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass die Interaktion zwischen RHPN1 und SMOK1 Δ C-regD+PKA bzw. TAGAP1 short bereits in der Hefe nur eine Interaktionsstärke von 0,25 gezeigt haben. Vermutlich handelt es sich bei der SMOK1-RHPN1 Interaktion um eine sehr schwache oder transiente Bindung, die mit dieser Art Versuchsansatz nicht bestätigt werden kann. TAGAP1 short und TAGAP1 FL binden mit einem Wert der relativen Bindung über 1,5 vergleichbar an das V5/Fire-RHPN1 Protein. Dennoch liegen die Werte der relativen Bindung der Interaktion mit $\sim 1,7$ (TAGAP1 FL) und $\sim 1,6$ (TAGAP1 short) unter der Forderung, dass für eine eindeutige Bindung dieser Wert 2x über dem der Negativkontrolle liegen muss. Für TAGAP1 zeichnet sich für die Interaktion mit RHPN1 demnach eine tendenzielle Richtung ab. Dennoch kann die TAGAP1-RHPN1 Interaktion nicht als eindeutig bewertet werden. Allein die Tatsache, dass diese Interaktion bereits in der Hefe gefunden wurde, ebenfalls als schwache Interaktion, könnte auf eine biologische Relevanz dieser Wechselwirkung deuten. Mit TAGAP1 SH3 konnte für RHPN1 keine Interaktion festgestellt werden. Hier liegt der Wert der relativen Bindung unter dem Wert der Negativkontrolle. Die positive Tendenz einer Bindung von RHPN1 an zwei TAGAP1-Domänen könnte auf eine Bindungsstelle für RHPN1 zwischen dem C-Terminus der RHO-GAP Domäne und den SH3-Domänen am C-Terminus von TAGAP1 deuten.

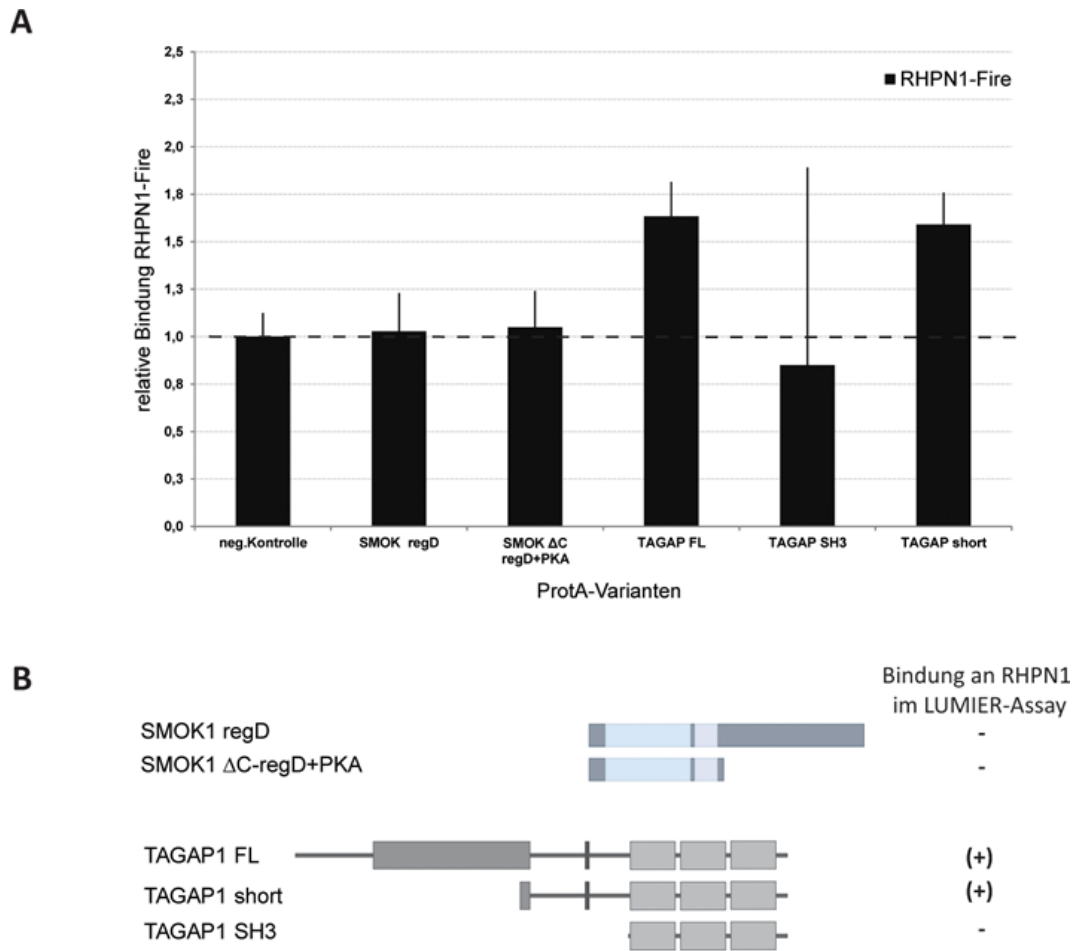


Abbildung 33: Lumineszenz basierte IP Analyse zwischen RHPN1-V5/Fire und SMOK- bzw. TAGAP1-ProtA-Varianten. A: Kotransfektionen von RHPN1-Fire und Smok-ProtA-Konstrukten bzw. RHPN1-Fire und TAGAP1-ProtA-Konstrukten in HEK293-Zellen mit anschließender lumineszenz basierte IP Analyse zeigt, dass das TAGAP1 FL und TAGAP1 short *in vitro* die Tendenz zeigen mit RHPN1 interagieren zu können. B: Darstellung der verwendeten SMOK- bzw. Tagap-Konstrukte mit tabellarischer Zusammenfassung der identifizierten RHPN1-Interaktionen.

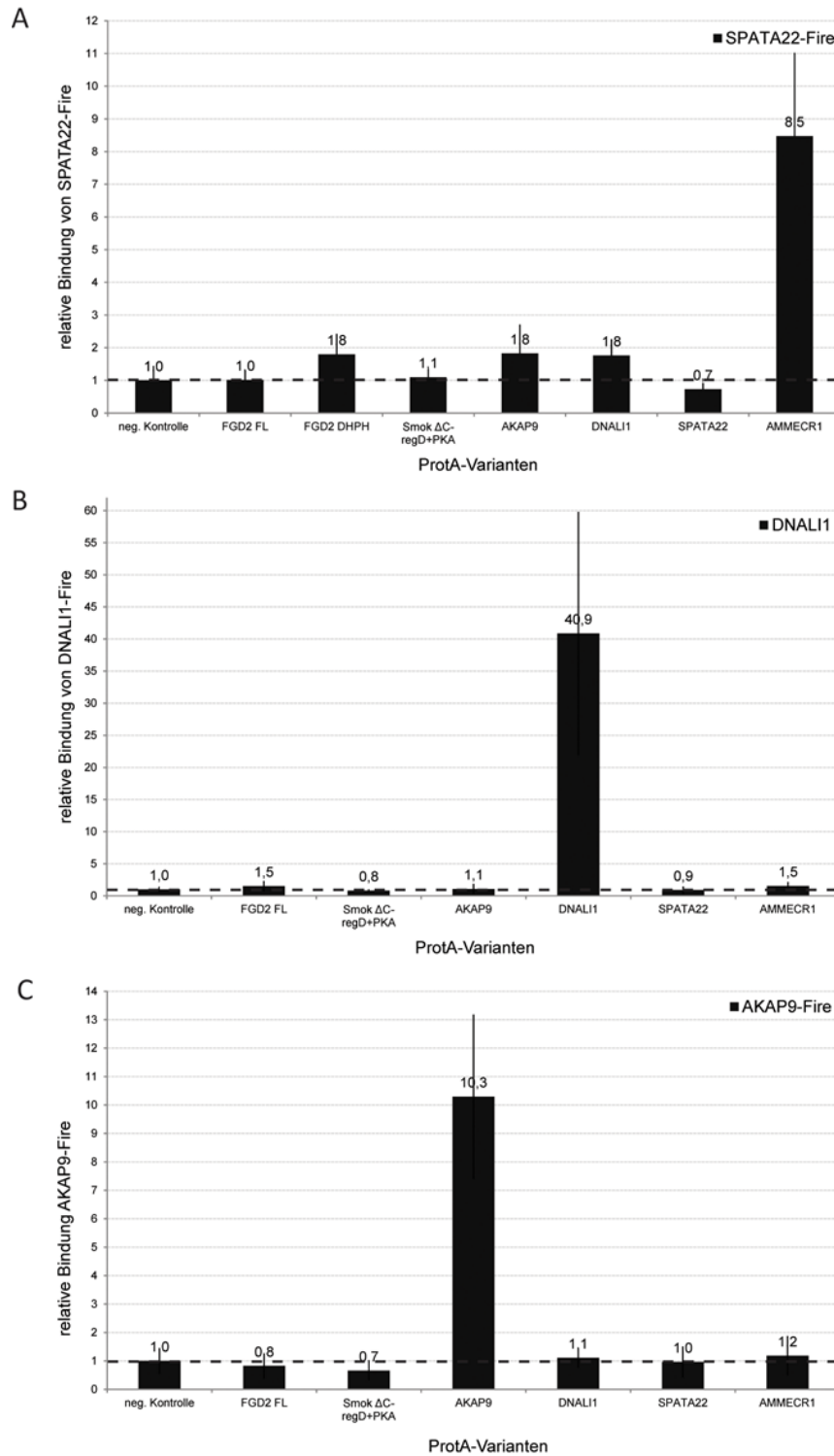


Abbildung 34: Lumineszenz basierte IP Analyse. A: Kotransfektion von SPATA22-Fire mit verschiedenen ProtA-Konstrukten zeigt, dass SPATA22 mit AMMECR1 *in vitro* interagiert und tendenziell auch FGD2, AKAP9 und DNALI1 binden kann. B: Kotransfektion von DNALI1-Fire mit verschiedenen ProtA-Konstrukten zeigt, dass DNALI1 *in vitro* dimerisiert. Tendenzuell lässt sich eine Interaktion zwischen DNALI1 und FGD2 und zwischen DNALI1 und AMMECR1 vermuten. C: Kotransfektion von AKAP9-Fire mit verschiedenen ProtA-Konstrukten zeigt, dass AKAP9 *in vitro* dimerisiert.

Im letzten Versuchsansatz zur Lumineszenz basierten IP Analyse wurden die verbleibenden V5/Fire-Proteine SPATA22, DNALI1 und AKAP9 gegen verschiedene ProtA-Bindungspartner getestet. FGD2 FL wurde auf eine mögliche Bindung der V5/Fire-Proteine SPATA22, DNALI1 und AKAP9 untersucht, weil in der Hefe Interaktionen zwischen FGD2 und SPATA22, sowie zwischen FGD2 und DNALI1 identifiziert wurden. Die Interaktionen zwischen SMOK1 und SPATA22, sowie zwischen SMOK1 und AKAP9, welche bereits in der Hefe mit dem Konstrukt SMOK1 Δ C-regD+PKA gefunden wurden, wurden in diesem Versuchsaufbau ebenfalls analysiert. Zusätzlich wurden die *Preys* auch auf mögliche Interaktionen untereinander getestet (Abbildung 34).

Das Fusionsprotein V5/Fire-SPATA22 zeigt in dieser Analyse eine eindeutige, bislang nicht bekannte Interaktion mit dem Protein AMMECR1. Hier liegt der Wert der relativen Bindung mit 8,5 weit über dem Wert der Negativkontrolle. Zusätzlich zeigt sich auch die Tendenz einer Bindung zwischen SPATA22 und FGD2 DHPH (1,8), zwischen SPATA22 und AKAP9 (1,8) und zwischen SPATA22 und DNALI1 (1,8). Diese Bindungen sind auf Grund der Werte der relativen Bindungen als nicht eindeutig einzustufen. Die Wechselwirkung zwischen SPATA22 und FGD2 DHPH ist eine Interaktion, die bereits in der Hefe-Analyse identifiziert wurde. Dieses erste Hefe-Ergebnis wurde demnach durch die positive Tendenz einer Bindung in der Lumineszenz basierten IP Analyse bestärkt. Die Tendenzen der Bindungen zwischen SPATA22 und AKAP9 bzw. DNALI1 sind bislang nicht beobachtet worden und bilden mögliche neue Verknüpfungen innerhalb des Interaktionsnetzwerks.

Das Fusionsprotein V5/Fire-DNALI1 zeigt eine stabile und starke Interaktion mit der DNALI1 ProteinA-Variante (relative Bindung von DNALI1 40,9). Dies bedeutet, dass DNALI1 in der Lage ist zu Dimerisieren. Ebenfalls eine Tendenz für eine Interaktion zeigt FGD2 FL mit DNALI1. Diese Bindung ist mit einem Wert von 1,5 für die relative Bindung an DNALI1 als unsicher einzustufen. Interessanterweise zeigt auch AMMECR1 eine Tendenz für eine bislang unbekannte Protein-Bindung mit DNALI1. Hier liegt der Wert der relativen Bindung ebenfalls bei 1,5. Folglich muss auch diese Interaktion als unsicher eingestuft werden.

Für das V5/Fire-AKAP9 Protein konnte eine starke Bindung mit dem ProtA-AKAP9 Protein gezeigt werden. Auch hier kann es zu einer Dimerisierung von AKAP9 kommen. Weitere Tendenzen von Bindungen mit AKAP9 wurden nicht beobachtet.

Ergebnisse

Eine Zusammenfassung aller in der Lumineszenz basierten IP-Analyse getesteten Protein-Protein-Wechselwirkungen ist in der Abbildung 35 dargestellt.

Protein1	Protein1 Domäne	Protein2 Domäne	Bindung	
SMOK1	SMOK1 regD	AMMECR1	(+)	
	SMOK1 ΔC-regD+PKA	AMMECR1	-	
	SMOK1 ΔN-regD+PKA	AMMECR1	+	
	SMOK1 regD-C-term	AMMECR1	+	
	SMOK1 regD	RHPN1	-	
	SMOK1 ΔC-regD+PKA	RHPN1	-	
	SMOK1 ΔC-regD+PKA	DNALI1	-	
	SMOK1 ΔC-regD+PKA	SPATA22	-	
	SMOK1 ΔC-regD+PKA	AKAP9	-	
TAGAP1	TAGAP1 FL	RHPN1	(+)	
	TAGAP1 SH3	RHPN1	-	
	TAGAP1 short	RHPN1	(+)	
FGD2	FGD2 FL	SPATA22	-	
	FGD2 DHPH	SPATA22	(+)	
	FGD2 FL	DNALI1	(+)	
	FGD2 FL	AKAP9	-	
NME3	wt-NME3 FL	AMMECR1	+	
	t-NME3 FL	AMMECR1	+	
AMMECR1	AMMECR1	SMOK1 regD	(+)	
	AMMECR1	SMOK1 ΔC-regD+PKA	-	
	AMMECR1	SMOK1 ΔN-regD+PKA	+	
	AMMECR1	SMOK1 regD-C-term	+	
	AMMECR1	wt-NME3 FL	+	
	AMMECR1	t-NME3 FL	+	
	AMMECR1	SPATA22	+	
	AMMECR1	DNALI1	(+)	
	AMMECR1	AKAP9	-	
DNALI1	DNALI1	FGD2 FL	(+)	
	DNALI1	SMOK1 ΔC-regD+PKA	-	
	DNALI1	AKAP9	-	
	DNALI1	DNALI1	+	
	DNALI1	SPATA22	-	
	DNALI1	AMMECR1	(+)	
SPATA22	SPATA22	FGD2	-	
	SPATA22	FGD2 DHPH	(+)	
	SPATA22	SMOK1 ΔC-regD+PKA	-	
	SPATA22	AKAP9	(+)	
	SPATA22	DNALI1	(+)	
	SPATA22	SPATA22	-	
	SPATA22	AMMECR1	+	
AKAP9	AKAP9	FGD2	-	
	AKAP9	SMOK1 ΔC-regD+PKA	-	
	AKAP9	AKAP9	+	
	AKAP9	DNALI1	-	
	AKAP9	SPATA22	(+)	
	AKAP9	AMMECR1	-	
RHPN1	RHPN1	SMOK1 regD	-	
	RHPN1	SMOK1 ΔC-regD+PKA	-	
	RHPN1	TAGAP1 FL	(+)	
	RHPN1	TAGAP1 SH3	-	
	RHPN1	TAGAP1 short	(+)	

Legende:
 + positive Bindung
 (+) Bindung unklar
 - keine Bindung

Protein: **Protein ID:**
 AMMECR1 = hAMMECR1-CCSB10837
 AKAP9 = hAKAP9-CCSB14138
 RHPN1 = hRHPN1-CCSB8341
 SPATA22 = hSPATA22-CCSB2101
 DNALI1 = hDNALI1-CCSB11636

Abbildung 35: Zusammenfassung der Lumineszenz basierten IP-Analyse mit Angabe der Domänen der getesteten Proteine und mit Beurteilung der Bindung.

Durch die Kombination der Daten aus dem Hefe-Zwei-Hybrid System und den Ergebnissen der Lumineszenz basierten IP Analyse konnten einzelne Protein-Protein-Interaktionen zwischen den *Preys* und SMOK1 und zwischen den *Preys* und *Distorter*-Proteinen bestätigt und ergänzend im Interaktionsnetzwerk dargestellt werden (Abbildung 36).

Die eindeutigen Protein-Protein-Interaktionen wurden mit einer durchgezogenen Linie dargestellt. Außerdem wurden unklare bzw. nicht eindeutige Protein-Protein-Interaktionen mit einer unterbrochenen Linie in dieses Netzwerk mit einbezogen.

Neben der eindeutigen Bestätigung von Interaktionen zwischen AMMECR1 und SMOK1 und zwischen AMMECR1 und NME3 wurden weitere eindeutige Wechselwirkungen in diesem Netzwerk identifizierte - die Interaktion zwischen AMMECR1 und SPATA22, sowie die Dimerisierung von AKAP9 und DNALI1.

Zudem wurden mit der Lumineszenz basierten IP Analyse auch Wechselwirkungen gemessen, die unklar bleiben. Die TAGAP1-RHPN1-Wechselwirkung muss zum Beispiel als unsicher eingestuft werden, da die Werte der relativen Bindung für die Varianten TAGAP1-FL und TAGAP1-short bei 1,7 liegen. Zwischen dem Protein SPATA22 und den *Preys* AKAP9, DNALI1 und FGD2 zeigen sich Interaktionen mit einer relativen Bindung von jeweils 1,8. Diese Bindung sind ebenfalls nicht eindeutig positiv. Das Protein DNALI1 geht mit den Molekülen AMMECR1 und FGD2 ebenfalls unsichere Bindungen ein (Werte der relativen Bindung liegen bei 1,5). Diese unklaren Protein-Protein-Interaktionen sind wie bereits erwähnt durch unterbrochene Verbindungslinien im Netzwerk dargestellt dargestellt (Abbildung 36).

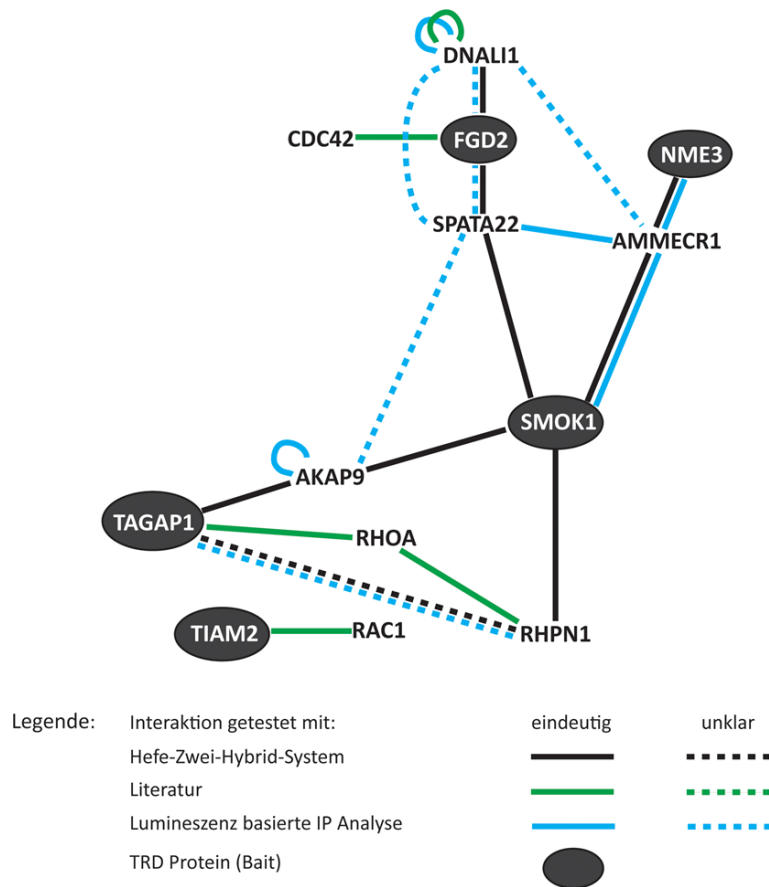


Abbildung 36: Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk zwischen *t*-Komplex Faktoren und Bindeproteinen, basierend auf den identifizierten Hefe-Interaktionen (schwarz), validiert durch Lumineszenz basierte IP-Analysen (blau), erweitert um publizierte Interaktionen mit kleinen RHO-GTPasen (grün). Eindeutige Interaktion: durchgezogene Verbindungslinien, Unsichere Interaktionen: unterbrochene Verbindungslinien.

4.2 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation

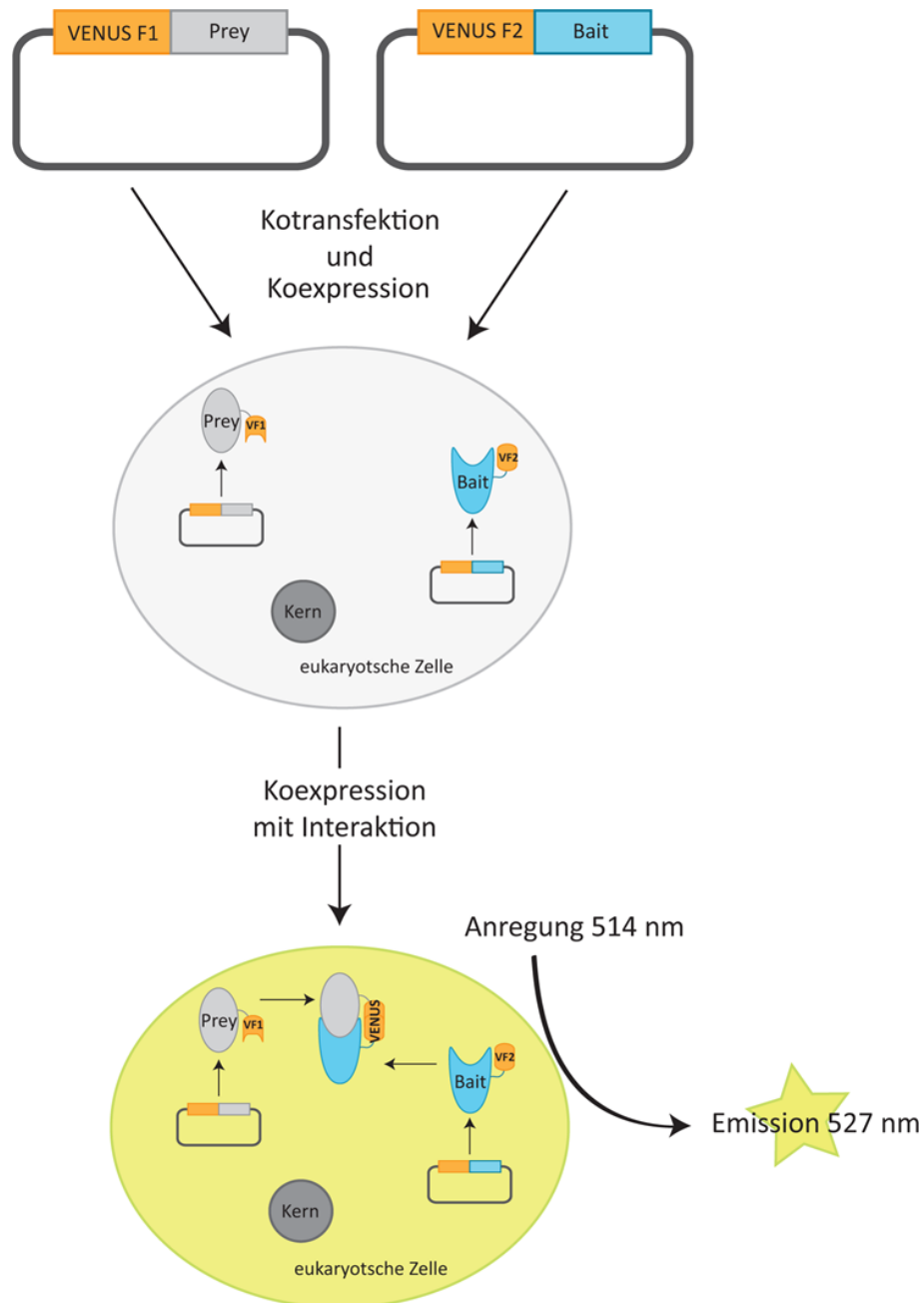


Abbildung 37: Schematische Darstellung der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation.

Die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation bietet eine zusätzliche Möglichkeit um Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* zu bestätigen oder um schwache und unsichere Wechselwirkungen zu untermauern. Ein Protein der Paarung ist für diesen

Versuchsansatz mit dem Fragment 1 des VENUS-Proteins (YFP Variante) entweder am N- oder C-Terminus fusioniert. Das zweite Protein der zu testenden Paarung wird ebenfalls am N- oder C-Terminus mit dem zweiten Fragment des VENUS-Proteins fusioniert. Die zu untersuchenden Protein-Paarungen werden in eukaryotischen Zellen koexprimiert. Im Falle einer direkten Protein-Protein-Interaktion zwischen den zu untersuchenden Protein-Paaren verbinden sich auch das VENUS Fragment 1 und das VENUS Fragment 2 zu einem vollständigen VENUS-Protein, welches nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 514 nm detektiert werden kann (VENUS Emission 527nm). Auch bei Protein-Paarungen, die in der Zelle durch Komplexbildung mit weiteren zellulären Komponenten oder Proteinen in räumliche Nähe zueinander treten, können die einzelnen VENUS-Fragmente durch Bindung aneinander ein vollständiges funktionstüchtiges VENUS-Protein bilden. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass nach Bildung des vollständigen VENUS-Proteins die entstandene Protein-Protein-Interaktion bzw. Protein-Komplexe nicht wieder gelöst werden. So werden auch transiente Interaktionen zwischen Proteinen, die normalerweise nur kurzzeitig in der Zelle gebildet werden, durch Anreicherung des VENUS-Signals sichtbar gemacht.

Bei dieser Studie wurden die zu testenden Protein-Paarungen in allen möglichen Kombinationen hinsichtlich der Fusion der VENUS Fragmente 1 und 2 an den N- bzw. C-Terminus des Proteins in HEK293 Zellen transient kotransfiziert und nach 24 bis 48 h Inkubation durch mikroskopische Auswertung analysiert. Als jeweilige Kontrollreaktionen wurde zum Beispiel ein Protein der Paarung fusioniert mit dem VENUS Fragment 1 zusammen mit dem zugehörigen Vektor für das VENUS Fragment 2, das jedoch kein Fusionsprotein enthält, kotransfiziert. Diese Kontrolle wurde für beide Proteine der zu testenden Paarungen durchgeführt. Eine Interaktion lässt sich als positiv bewerten, sobald 24 bis 48 h nach der Transfektion VENUS-positive Zellen bei einer Protein-Paarung beobachtet werden können, die Kontrollreaktionen jedoch zum gleichen Zeitpunkt kein Fluoreszenzsignal zeigen.

Der erste Versuchsaufbau zeigt, dass SMOK1-Proteinvarianten eine Protein-Protein-Interaktionen mit AMMECR1 eingehen können (Abbildung 38). Des Weiteren bindet SMOK1, in der bimolekulare Fluoreszenzkomplementationsanalyse, auch an die *Preys* RHPN1, AKAP9 und DNALI1 (Abbildung 39). In den jeweiligen Kontrollexperimenten sind für diese Analysen keine VENUS-Signale zu erkennen, was bedeutet, dass die Kontrollansätze negativ sind.

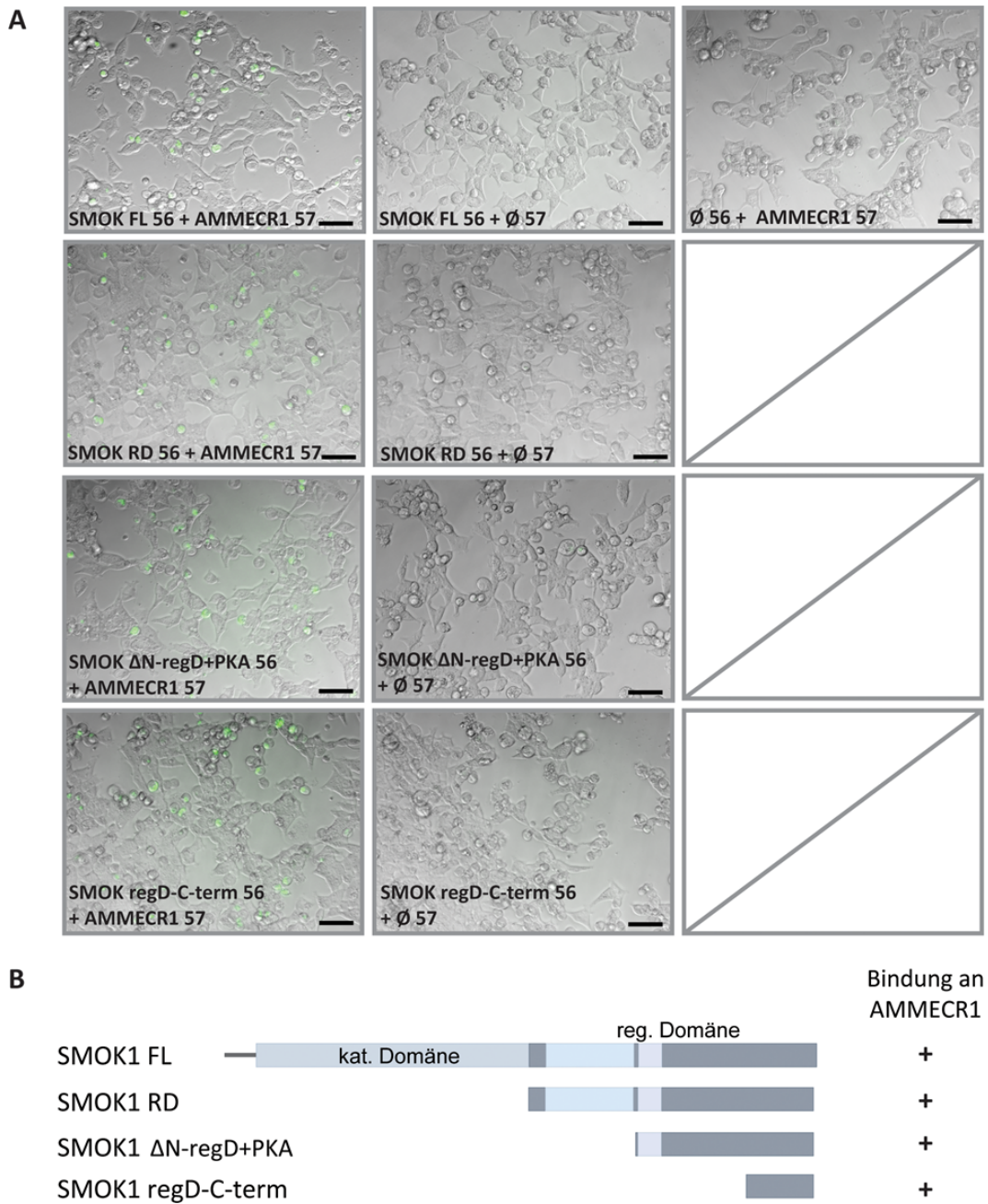


Abbildung 38: Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation für SMOK1-AMMECR1-Interaktionen. Analyse 24h nach Kotransfektionen von VEN-F1 (56, 58) und VEN-F2 (55, 57) Plasmidvarianten. Linke Spalte: getestete Interaktionen. Mittlere Spalte: Kontroll-Reaktion. Rechte Spalte: Kontroll-Reaktion. Maßstab: 50 μ m. A: Interaktion zwischen SMOK1 Varianten und AMMECR1. B: Zusammenfassung der Interaktion zwischen SMOK1 und AMMECR1 mit Darstellung der SMOK1 Proteindomänen.

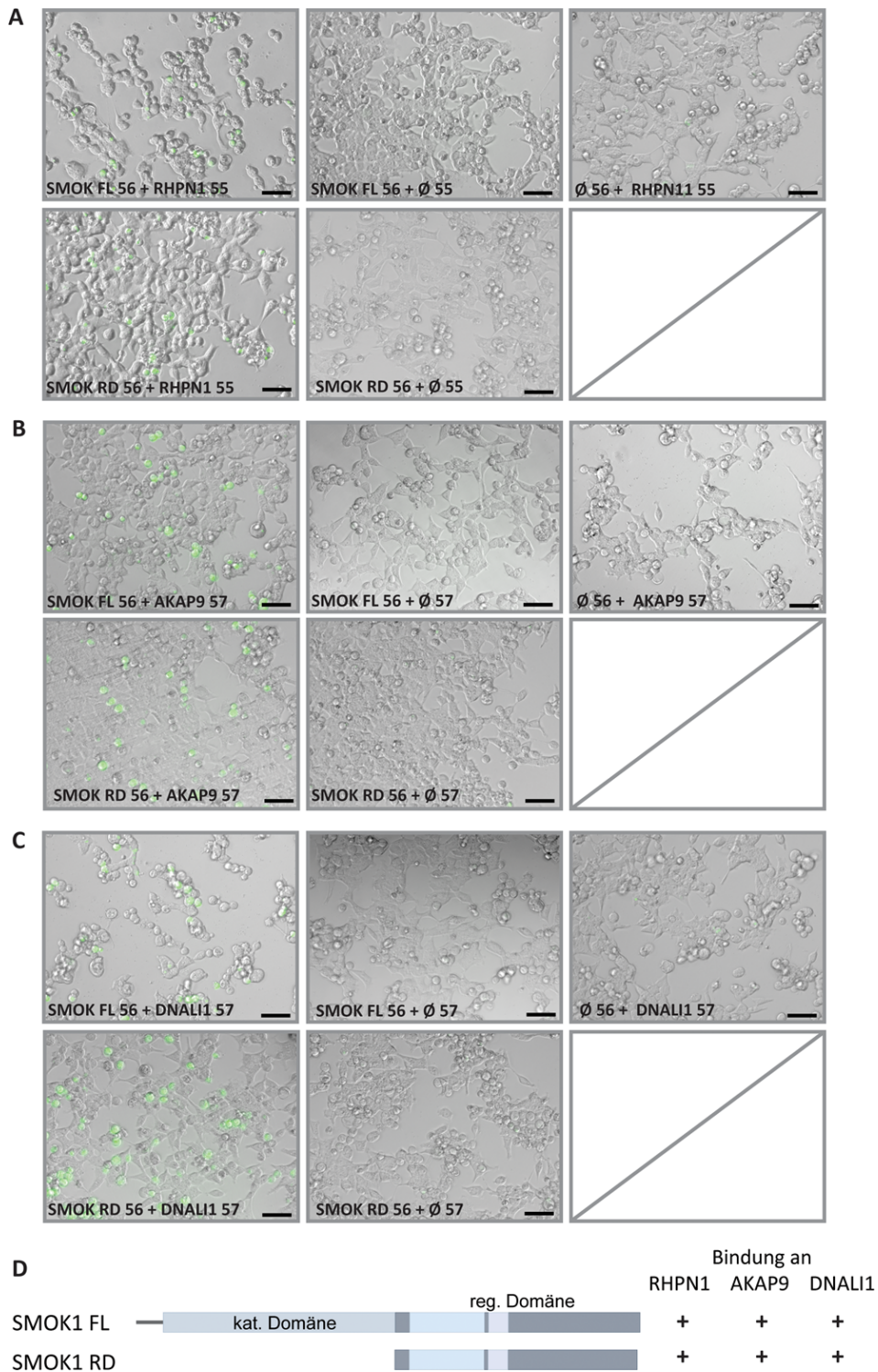


Abbildung 39: Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation für SMOK1-Interaktionen. Analyse 24h nach Kotransfektionen von VEN-F1 (56, 58) und VEN-F2 (55, 57) Plasmidvarianten. Linke Spalte: getestete Interaktionen. Mittlere und rechte Spalte: Kontroll-Reaktionen. A: Interaktion zwischen SMOK1 Varianten und RHPN1. B: Interaktion zwischen SMOK1 Varianten und AKAP9. C: Interaktion zwischen SMOK1 Varianten und DNALI1. Maßstab: 50 µm. D: Zusammenfassung der Interaktionen mit Darstellung der SMOK1 Proteindomänen.

Als zusätzliche Bestätigung konnte die bereits validierte Interaktion zwischen AMMECR1 und SMOK1 auch in dem System der bimolekulare Fluoreszenzkomplementation gezeigt werden (Abbildung 38). Die Bindung vom AMMECR1 erfolgt sehr spezifisch an die regulatorische Domäne von SMOK1 und sogar an den C-terminalen Bereich der Kinase (Abbildung 38). Die Interaktionsuntersuchungen zwischen AMMECR1 und SMOK1 bekräftigen somit die Hefe-Zwei-Hybrid Daten und die Ergebnisse der Lumineszenz basierten IP Analyse.

Die Interaktionen zwischen RHPN1 und SMOK1 sowie zwischen AKAP9 und SMOK1, die in der Hefe beobachtet wurden, aber mit der Lumineszenz basierten IP Analyse nicht gezeigt werden konnten, lassen sich mit der bimolekulare Fluoreszenzkomplementation darstellen (Abbildung 39). Dies lässt vermuten, dass RHPN1 und AKAP9 schwache oder transiente Bindungspartner für SMOK1 sind. Es wäre ebenfalls denkbar, dass ein zusätzliches hodenspezifisches Molekül die Interaktion verstärken könnte. Interessant ist, dass mit diesem System erstmals eine Interaktion zwischen SMOK1 und DNALI1 gezeigt werden kann (Abbildung 39). Diese Bindung war weder in der Hefe, noch in der Lumineszenz basierten IP Analyse beobachtet worden. Für die Wechselwirkungen zwischen SMOK1 und den Proteinen RHPN1, AKAP9 und DNALI1 konnte ebenfalls eine Bindung an die regulatorische Domäne der Kinase festgestellt werden (Abbildung 39).

Die überraschende Tatsache, dass DNALI1 als axonemales Protein in der Lumineszenz basierten IP Analyse unerwartet Tendenzen für eine potentielle Interaktion mit dem Protein AMMECR1 dieses Netzwerkes gezeigt hat, fordert eine weiterführende Analyse der DNALI1-Protein-Interaktionen mit der bimolekulare Fluoreszenzkomplementation. Die Beobachtung, dass DNALI1 in der Lumineszenz basierten IP Analyse in der Lage ist zu dimerisieren (Abbildung 34) konnte mit der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation bestätigt werden (Abbildung 40). Auch die in der Hefe identifizierte Interaktion zwischen FGD2 und DNALI1, welche in der Lumineszenz basierten IP Analyse als Tendenz gezeigt werden konnte, zeigt in der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation ein positives Ergebnis und bestärkt somit die in der Hefe gewonnenen Daten (Abbildung 40). Zusätzlich konnte die Interaktion zwischen AMMECR1 und DNALI1, die in der Lumineszenz basierten IP Analyse ebenfalls als Tendenz einer Wechselwirkung zum Ausdruck kam, mit der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation bestärkt werden (Abbildung 40). Zwei neue in diesem System als positiv getestete Interaktionen ergeben sich aus der Paarung DNALI1 und NME3 sowie DNALI1 und AKAP9 (Abbildung 40). In der getesteten Interaktion zwischen

DNALI1 und NME3 waren jedoch deutlich weniger grün leuchtende Zellen zu erkennen (Abbildung 40, A), als zum Beispiel bei anderen Paarungen mit DNALI1 (Abbildung 40, B und C). Dennoch wird diese Interaktion als positiv gewertet.

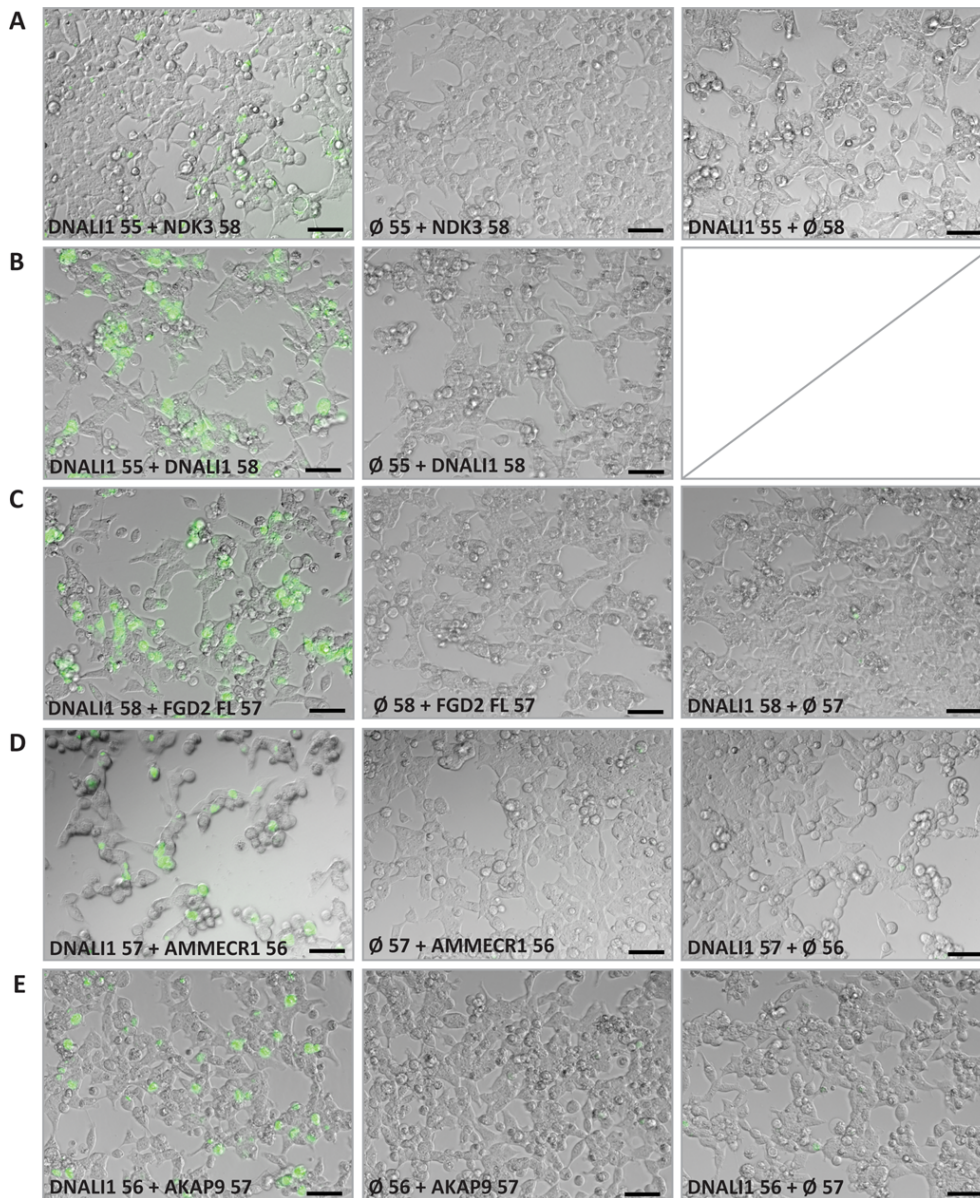


Abbildung 40: Bimolekulare Fluoreszenzkomplementations-Analyse für DNALI1-Interaktionen. Bimolekulare Fluoreszenzkomplementations-Analyse 24h nach Kotransfektionen von VEN-F1 (56, 58) und VEN-F2 (55, 57) Plasmidvarianten. Linke Spalte: getestete Interaktionen. Mittlere Spalte: Kontroll-Reaktion. Rechte Spalte: Kontroll-Reaktion. A: Interaktion zwischen DNALI1 und NME3. B: Dimerisierung von DNALI1. C: Interaktion zwischen DNALI1 und FGD2 FL. D: Interaktion zwischen DNALI1 und AMMECR1. E: Interaktion zwischen DNALI1 und AKAP9. Maßstab: 50 µm

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, nimmt die Proteinfamilie der AKAPs eine besondere Stellung bei der Regulation der Spermienmotilität ein. Aus diesem Grund wurde nicht nur die Dimerisierung von AKAP9 getestet, sondern auch die *Distorter* als weitere Komponenten des TRD-Signalweges auf mögliche Interaktionen mit AKAP9 untersucht. Die Ergebnisse aus diesem Experiment zeigten positive Interaktionen zwischen AKAP9 und FGD2, zwischen AKAP9 und TAGAP1 sowie zwischen AKAP9 und TIAM2 (Abbildung 41).

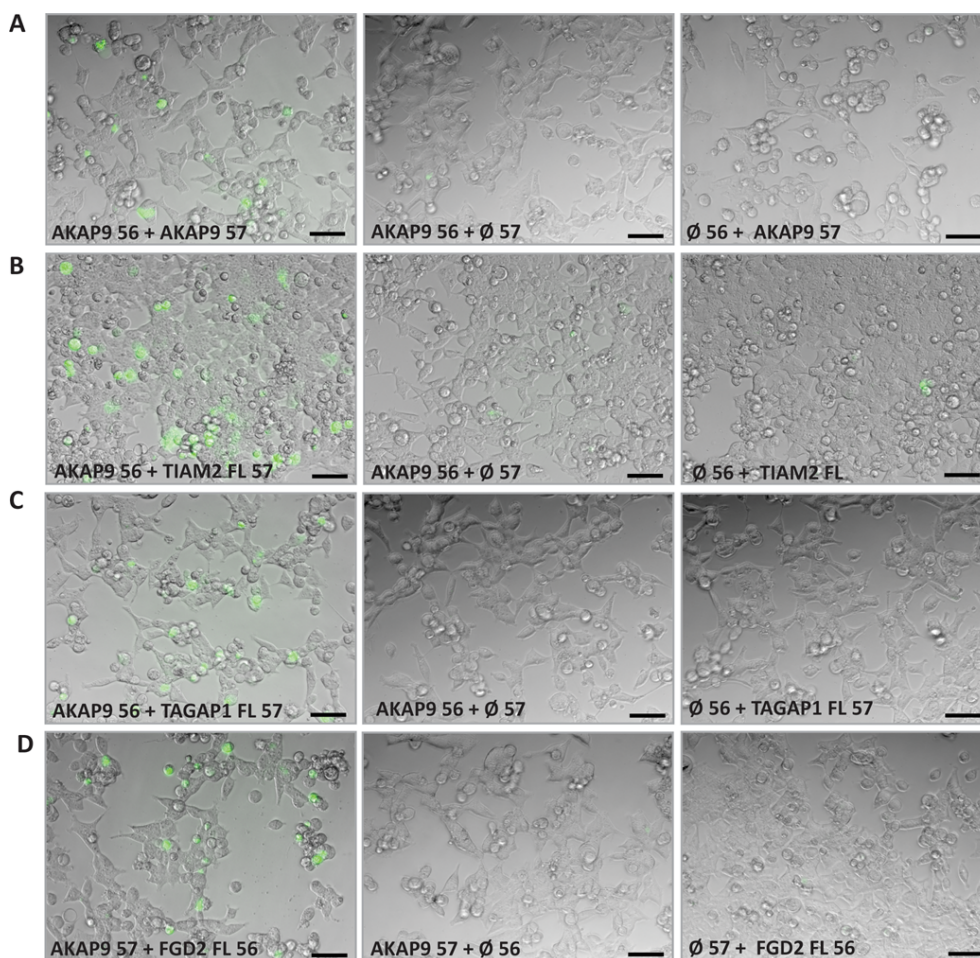


Abbildung 41: Bimolekulare Fluoreszenzkomplementations-Analyse für AKAP9-Interaktionen. Bimolekulare Fluoreszenzkomplementations-Analyse 24h nach Kotransfektionen von VEN-F1 (56, 58) und VEN-F2 (55, 57) Plasmidvarianten. Linke Spalte: getestete Interaktionen. Mittlere Spalte: Kontroll-Reaktion. Rechte Spalte: Kontroll-Reaktion. A: Dimerisierung von AKAP9. B: Interaktion zwischen AKAP9 und TIAM2 FL. C: Interaktion zwischen AKAP9 und TAGAP1. D: Interaktion zwischen AKAP9 und FGD2 FL. Maßstab: 50 μ m

Eine Zusammenfassung der identifizierten Protein-Protein-Interaktionen, die mit der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation analysiert wurden, ist in der nachfolgenden Übersicht dargestellt (Abbildung 42).

Protein1	Protein1 Domäne	Protein2 Domäne
SMOK1	SMOK1 FL	AMMECR1
	SMOK1 regD	AMMECR1
	SMOK1 Δ N-regD+PKA	AMMECR1
	SMOK1 regD-C-term	AMMECR1
	SMOK1 FL	RHPN1
	SMOK1 regD	RHPN1
	SMOK1 FL	AKAP9
	SMOK1 regD	AKAP9
	SMOK1 FL	DNALI1
	SMOK1 regD	DNALI1
DNALI1	DNALI1	SMOK1 FL
	DNALI1	SMOK1 regD
	DNALI1	wt-NME3 FL
	DNALI1	DNALI1
	DNALI1	FGD2 FL
	DNALI1	AMMECR1
	DNALI1	AKAP9
AKAP9	AKAP9	SMOK1 FL
	AKAP9	SMOK1 regD
	AKAP9	AKAP9
	AKAP9	TIAM2
	AKAP9	TAGAP1
	AKAP9	FGD2

Protein: Protein ID:
 AMMECR1 = hAMMECR1-CCSB10837
 AKAP9 = hAKAP9-CCSB14138
 RHPN1 = hRHPN1-CCSB8341
 DNALI1 = hDNALI1-CCSB11636

Abbildung 42: Zusammenfassung der positiv getesteten Interaktionen in der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation mit Angabe der Domänen der Protein 1 und 2.

Die bislang generierten Daten aus der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse und die Beobachtungen der Lumineszenz basierten IP Analyse können durch die Ergebnisse der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation erweitert werden.

So zeigte sich mit der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation eine Bindung zwischen AKAP9 und TAGAP1 sowie zwischen AKAP9 und SMOK1. Weitere Interaktionen ergaben sich für SMOK1 mit den Proteinen RHPN1 und AMMECR1. Für

DNALI1 wurden die Bindungen an FGD2 und AMMECR1 bestätigt. Zusätzlich wurden die Dimerisierung von DNALI1 und die Dimerisierung von AKAP9 verifiziert. Die Relevanz dieser Wechselwirkungen, die bereits in der Hefe und zum Teil mit der Lumineszenz basierten IP Analyse beobachtet wurden, konnte somit untermauert werden.

Durch neu identifizierte Protein-Protein-Interaktionen konnten zusätzlich weitere Verbindungen in diesem Netzwerk geknüpft werden (Abbildung 43). Diese Verbindungen sind im Netzwerk durch die Wechselwirkung zwischen AKAP9 und den *Distorter*-Proteinen FGD2 und TIAM2, durch die mögliche Bindung von AKAP9 und DNALI1, durch die Interaktion zwischen NME3 und DNALI1 und durch die Verknüpfung von DNALI1 mit SMOK1 dargestellt.

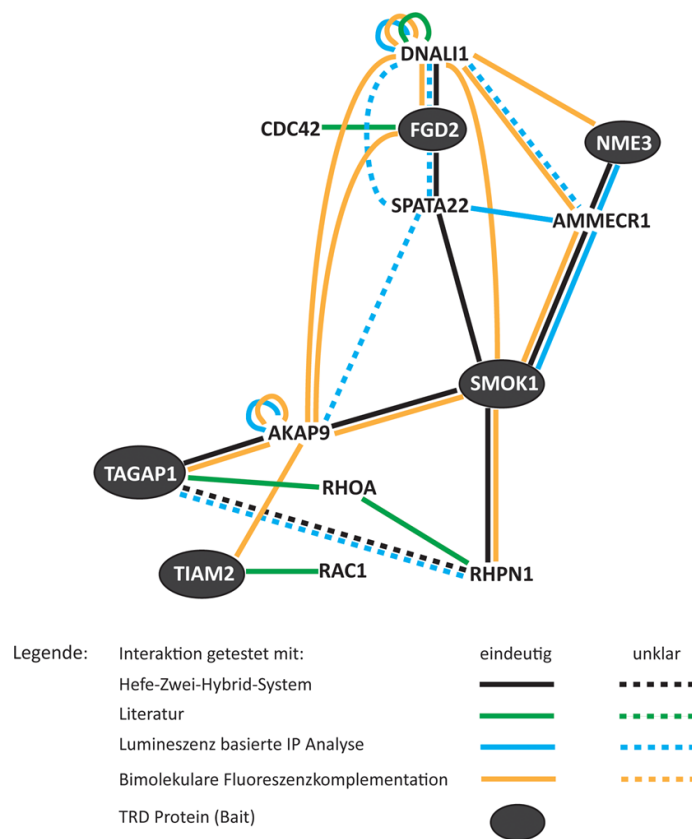


Abbildung 43: Protein-Protein-Interaktions-Netzwerk zwischen *t*-Komplex Faktoren und Bindeproteinen, basierend auf den identifizierten Hefe-Interaktionen (schwarz), validiert durch Lumineszenz basierte IP Analysen (blau) und Bimolekulare Fluoreszenzkomplementationsanalysen (orange), erweitert um publizierte Interaktionen mit kleinen RHO-GTPasen (grün). Eindeutige Interaktion: durchgezogene Verbindungslinien. Unklare Interaktionen: unterbrochene Verbindungslinien.

4.3 Pull-Down Analysen *in vitro*

Eine klassische Methode um Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen ist die Pull-Down Analyse. Bei dieser Technik werden zwei interagierende Proteine *in vitro* hergestellt. Die Herstellung der rekombinanten Proteinen kann entweder in *E. coli*, *in vitro* durch eine Transkription/Translation-Reaktion im Reaktionsgefäß oder durch die gezielte Überexpression der zu testenden Proteine in Säugerzellen erfolgen. Anschließend kann der gebildete Protein-Komplex über Bindung eines dieser Proteine an eine Matrix präzipitiert werden. Zum Abschluss wird der Protein-Komplex mittels SDS-PAGE und Western-Blot auf die gewünschten Bindungspartner untersucht. Mit dieser Methode soll analysiert werden, ob sich einzelne SMOK1-Protein-Interaktionen verifizieren lassen. Eine Analyse der Protein-Protein-Interaktionen direkt im Hodengewebe der Maus (*in vivo* Immunpräzipitation), war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da keine SMOK1 spezifischen Antikörper generiert werden konnten. Auch kommerziell sind keine spezifischen Antikörper gegen SMOK1 erhältlich.

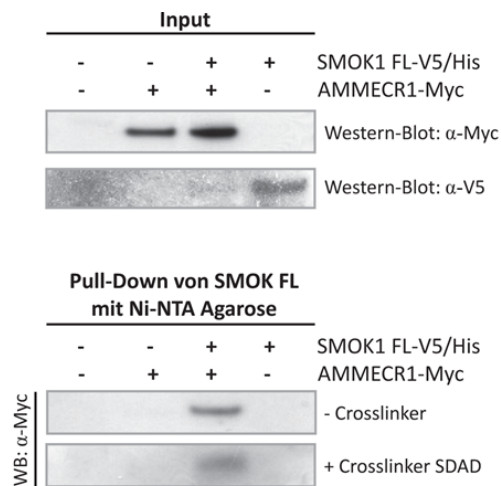


Abbildung 44: SMOK1 FL und AMMECR1 interagieren *in vitro*. Kotransfektion von SMOK1 FL-V5/His und Ammecer1-Myc Überexpressionsvektoren in HEK293-Zellen; Pull-Down von SMOK1 FL mit Ni-NTA Agarose 24 h nach der Transfektion mit und ohne Behandlung der Zellen mit einem Crosslinker (SDAD); oberer Western-Blot: Input der Pull-Down Reaktionen; unterer Western-Blot: Pull-Down, Bindung von Ammecer1 Protein and SMOK1 FL nach Pull-Down mit Ni-NTA Agarose ohne und mit Verwendung eines Crosslinkers.

Die klassische Pull-Down Analyse zeigt in zwei unabhängigen Untersuchungen und in zwei verschiedenen Zelllinien eine Interaktion zwischen SMOK1 und AMMECR1 (Abbildung 44 und Abbildung 45). Für diese Interaktionsstudie wurde C-Terminal markiertes SMOK1 (V5/6xHis) und C-Terminal markiertes AMMECR1 (6xMyc) verwendet. Da die Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen als eher schwach eingeschätzt wurde (Abbildung 32), wurden die kotransfizierten Zellen einmal mit dem membranpermeablen *Crosslinker* SDAD (Diazirin Reagentz: Succinimidyl 2-([4,4-azipentanamido]ethyl)-1,3-dithiopropionate) inkubiert, um Protein-Komplexe innerhalb der Zellen zu fixieren, und vergleichsweise einmal ohne *Crosslinker* untersucht. In beiden Ansätzen zeigt sich eine Bande für AMMECR1-MYC nach der Präzipitation von V5/6xHis-SMOK FL mittels Ni-NTA Agarose (Abbildung 44).

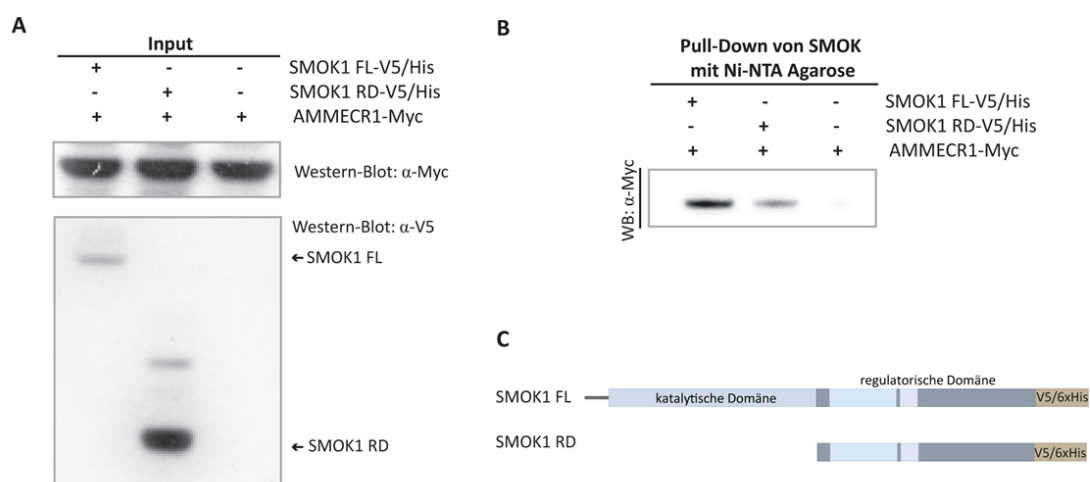


Abbildung 45: SMOK1 FL bzw. SMOK1 RD und AMMECR1 interagieren *in vitro*. Kotransfektion von Smok1 FL-V5/His und Ammecr1-Myc, sowie Smok1 RD-V5/His und Ammecr1-Myc Überexpressionsvektoren in NIH3T3-Zellen; Pull-Down von SMOK1-Varianten mit Ni-NTA Agarose 24 h nach der Transfektion; A: Input der Pull-Down Reaktionen; B: Pull-Down, Bindung von Ammecr1 Protein and SMOK1 FL und SMOK1 RD nach Pull-Down mit Ni-NTA. C: Darstellung der verwendeten SMOK-Konstrukte SMOK1 FL und SMOK1 RD als Proteindomänen.

In einem zweiten Versuch wurde untersucht, ob die regulatorische Domäne von SMOK1 ebenso in der Lage ist AMMECR1-Protein zu binden (Abbildung 45). Hier konnten die bereits gesammelten Erkenntnisse bestätigt werden. Wie im Hefe-System und in der Lumineszenz basierten IP Analyse, bindet AMMECR1-Protein nicht nur an das Voll-Länge-SMOK1, sondern auch an den C-Terminalen Bereich des Proteins – der regulatorischen Domäne (Abbildung 45). In diesem zweiten Ansatz wurde auf die Verwendung eines *Crosslinkers* verzichtet.

Eine weitere interessante Interaktion, welche in der Hefe und in der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation identifiziert wurde, ist die Bindung von RHPN1 an SMOK1. RHPN1 ist an den *Outer Dense Fibers* und an den *Fibrous Sheath* des Hauptteils des Spermischwanzes lokalisiert (Anhang, Abbildung 58; Nakamura et al., 1999). Zudem wurde in der Hefe gezeigt, dass RHPN1 ein RHO bindendes Protein ist (Nakamura et al., 1999). Da kleine G-Proteine wie RHOA, RAC1 und CDC42 auch eine wichtige Rolle in der TRD-Signalkaskade einnehmen (Bauer et al., 2005; Bauer et al., 2007; Bauer et al., 2012) stellt RHPN1 eine weitere Verbindung zu diesen kleinen GTPasen dar. Aus diesem Grund wurde auch die Interaktion zwischen SMOK1 und RHPN1 mit der klassischen Pull-Down Analyse verifiziert (Abbildung 46).

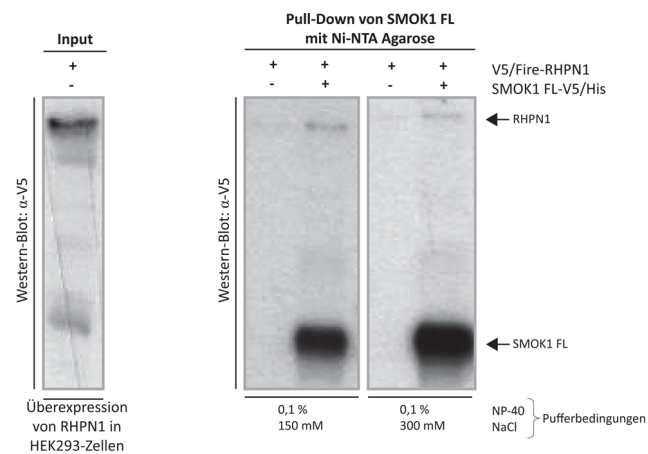


Abbildung 46: SMOK1 FL und RHPN1 interagieren *in vitro*. Rekombinantes SMOK1 FL-Protein (IVT) gebunden an Ni-NTA Agarose wurde mit RHPN1-Lysat (Überexpression in HEK293-Zellen) unter Rotation inkubiert und mittels Western-Blot analysiert; linker Western-Blot: Input, RHPN1-Lysat; rechte Western-Blots: zwei Pull-Down Analysen, Protein-Protein-Interaktion zwischen SMOK1 FL und RHPN1 in zwei unterschiedlichen Puffersystemen.

Rekombinantes SMOK1 FL Protein wurde im Reaktionsgefäß mittels Transkription/ Translation-Reaktion erzeugt (IVT), an eine Ni-NTA Matrix gebunden und anschließend mit einem V5/Fire-RHPN1-Überexpressionslysate aus HEK293-Zellen inkubiert. Nach mehrfachem Waschen wurde die Ausbildung eines RHPN1-SMOK1 Komplexes im Western-Blot untersucht. Die Ergebnisse zeigen in zwei unterschiedlichen Pufferbedingungen eine Bande in der SMOK1-RHPN1 Pull-Down Reaktion. In der Kontrollreaktion, welche nur RHPN1-Protein enthält, ist lediglich der Schatten einer Bande zu erkennen (Abbildung 46). Durch eine Erhöhung der Stringenz im Interaktionspuffer (Konzentrationserhöhung von NP-40) konnte die Stärke der

RHPN1-Bande in der Pull-Down Reaktion auf das Maß der Negativkontrolle reduziert werden (nicht dargestellt in Abbildung 46). Die schwache Protein-Protein-Bindung zwischen SMOK1 und RHPN1 zeigt sich somit auch in diesen Versuchsansatz.

Die Protein-Bindung zwischen SMOK1 und AMMECR1 sowie zwischen SMOK1 und RHPN1 konnten demnach mit der klassischen Pull-Down Analyse verifiziert werden. Das bereits bestehende Interaktionsnetzwerk verstärkt sich demnach an zwei bestehenden Knotenpunkten (Abbildung 47).

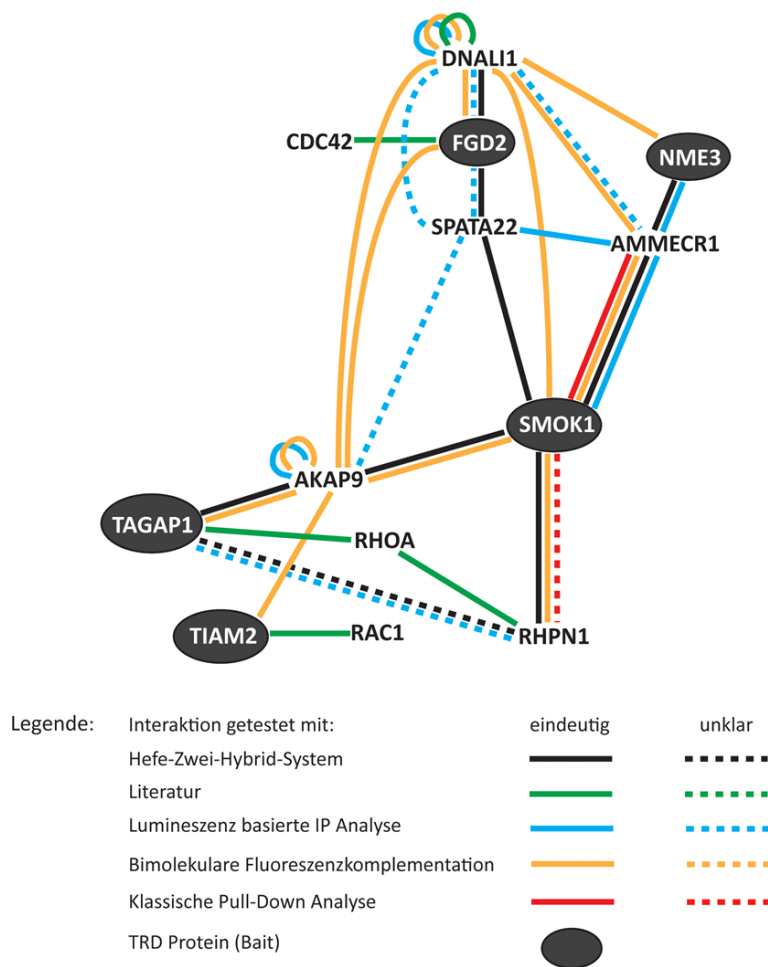


Abbildung 47: Protein-Protein-Interaktions-Netzwerk zwischen *t*-Komplex Faktoren und Bindeproteinen, basierend auf den identifizierten Hefe-Interaktionen (schwarz), validiert durch Lumineszenz basierte IP Analysen (blau), Bimolekulare Fluoreszenzkomplementationsanalysen (orange) und klassische Pull-Down Analysen (rot), erweitert um publizierte Interaktionen mit kleinen RHO-GTPasen (grün). Eindeutige Interaktion: durchgezogene Verbindungslinien, Unsichere Interaktionen: unterbrochene Verbindungslinien.

5 Ergebnisse (D) Interaktion zwischen SMOK1 und Proteinen der RHO-Familie

G-Proteine bzw. durch G-Proteine gesteuerte Signalwege spielen bei der Entstehung der unterschiedlichen Spermienpopulationen (unterschiedlich hinsichtlich der Schwimmfähigkeit der beiden Gruppen) und somit bei der zentralen Signalkaskade, welche zum Phänomen TRD führt, eine zentrale Rolle (Olds-Clarke & Johnson, 1993; Bauer et al., 2005; Bauer et al., 2007; Bauer et al., 2012). Auch die Betrachtung des bis jetzt validierten Netzwerkes zwischen *t*-Komplex Faktoren und den neuen Interaktionspartnern zeigt bereits bekannte Interaktionen von *Distorter*-Proteinen (Bauer et al., 2005; Huber et al. 2008; Matsuo et al., 2002; Matsuo et al., 2003) und von RHPN1 (Nakamura et al, 1999) mit RHO-GTPasen (Abbildung 47). Aus diesem Grund soll im folgenden Abschnitt im Detail untersucht werden, ob die kleinen RHO-GTPasen RHOA, RAC1 und CDC42 *in vitro* Protein-Protein-Interaktionen mit rekombinantem SMOK1-Protein eingehen können.

5.1 Expression von RHO-Proteinen in Spermatozoen der Maus

Eine mögliche Interaktion der kleinen G-Proteine mit SMOK1 setzt die Expression dieser Moleküle im Hoden der Maus bzw. in Spermatozoen voraus, da SMOK1 spezifisch in diesem Gewebe exprimiert ist. In der Literatur konnte bereits gezeigt werden, dass die kleinen G-Proteine RHOA, CDC42 und RAC1 und einige ihrer Effektoren, wie zum Beispiel PI(4)P5K und ROCK-1, in Säugerspermatozoen, sowohl im Spermienkopf als auch im Flagellum lokalisiert sind (Ducummon & Berger, 2006). Diese Tatsache spiegelt eine mögliche Funktion dieser Moleküle in Signalwegen wie der Akrosomalreaktion oder der Spermienmotilität wider (Ducummon & Berger, 2006). Um diese Daten zu untermauern, wurde die Expression und Lokalisation von RHOA/B/C, RAC1 und CDC42 in Testisschnitten eines *wt*-Männchens mittel Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen die Expression der kleinen G-Proteine in elongierten Spermatiden, welche als morphologisch vollständig entwickelte Spermatozoen in das Lumen des Hodenkanälchens abgegeben werden (Abbildung 48). Die Signale, welche sich durch die Kontrollfärbung mit dem sekundären Antikörper ergeben und gleichmäßig das Stroma (*Interstitium*) markieren, werden als unspezifische Hintergrundfärbung dieses Antikörpers gewertet. In den Vergrößerungen der Tubulusquerschnitte ist die Färbung der flagellären

Strukturen der elongierten Spermatiden deutlich zu erkennen (Abbildung 48, Bilder rechts). Folglich sind die untersuchten G-Proteine RHOA/B/C, CDC42 und RAC1 im Spermischwanz von Spermatozoen lokalisiert und kommen als potentielle Interaktionspartner für SMOK1 in Frage.

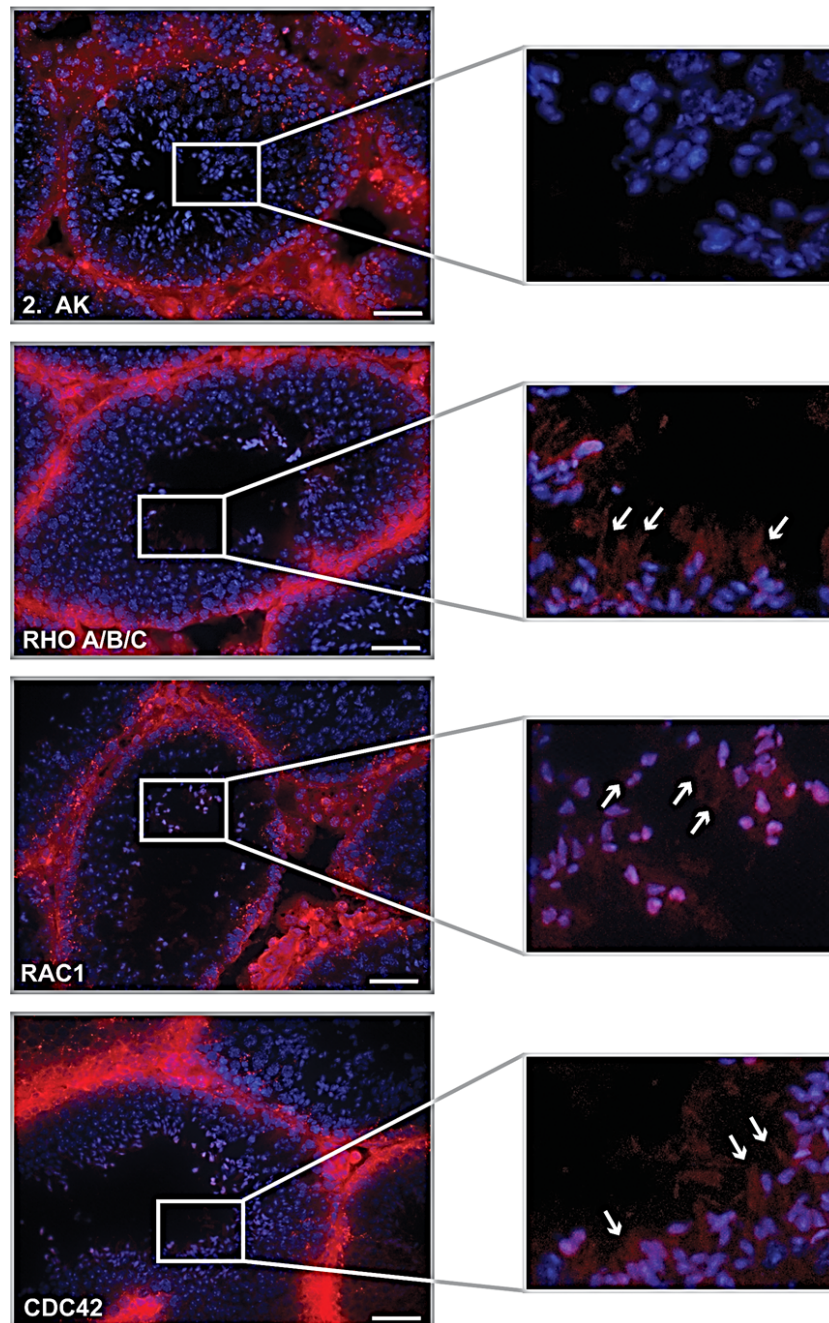


Abbildung 48: Expression der Protein RAC1, RHOA und CDC42 im Querschnitt eines Hodenkanälchens. linke Spalte: Lokalisation der RHO-GTPasen RAC1, RHOA/B/C und CDC42 (rot) in elongierten Spermatiden durch Immunfluoreszenzfärbung; Rahmen: vergrößerter Ausschnitt aus der Aufnahme zeigt die Färbung an elongierten Spermatiden (weiße Pfeile) für die getesteten Proteine; DAPI (blau): Kernfärbung. Maßstab: 50 μ m

5.2 Direkte Interaktion von SMOK1 mit RHOA und RAC1 *in vitro*

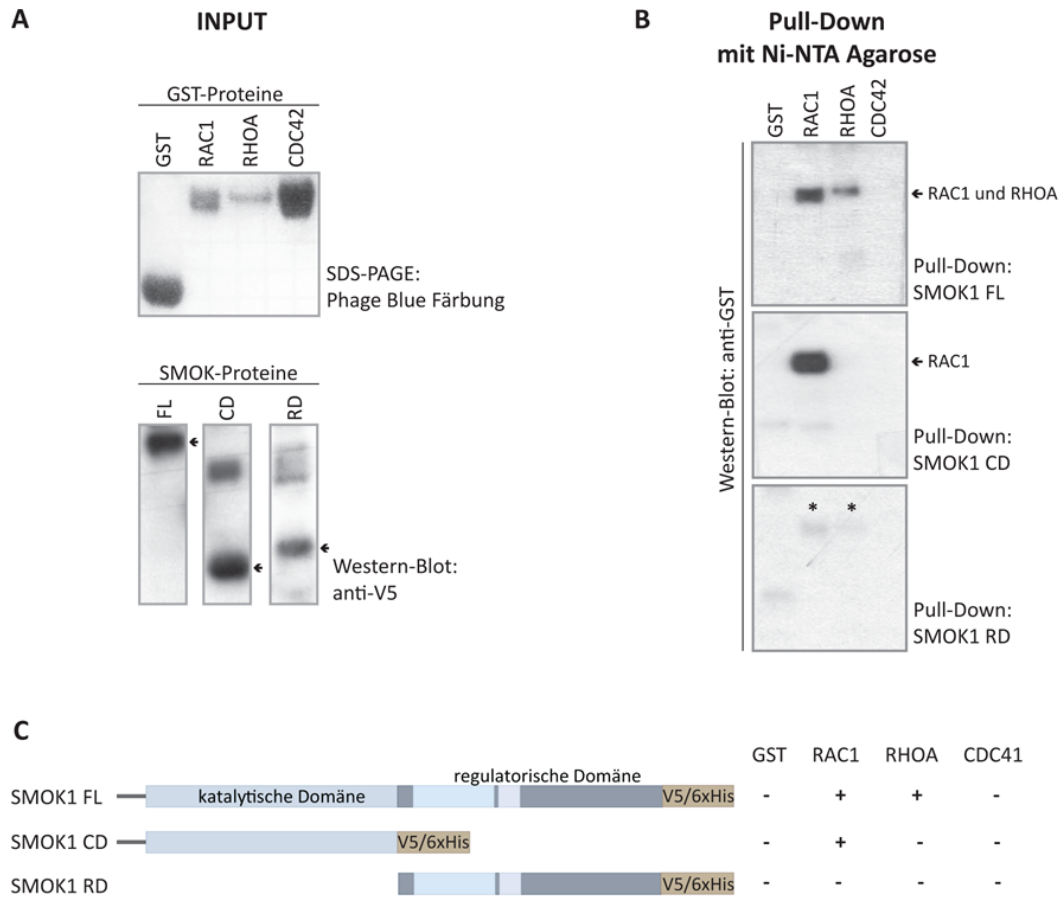


Abbildung 49: Interaktion von SMOK1 mit RHOA und RAC1 *in vitro*. A: rekombinante Proteine, die für den Pull-Down eingesetzt wurden (*Input*), oben: SDS-PAGE (Phage Blue Färbung) für GST-Proteine hergestellt in *E.coli*, unten: Western-Blot mit anti-V5 Antikörper für SMOK-Varianten hergestellt durch IVT-Reaktion und Pull-Down mit Ni-NTA Agarose; B: Pull-Down Ergebnisse zwischen GST-Proteinen und SMOK-Varianten zeigen Interaktionen zwischen RHOA bzw. RAC1 und SMOK FL, sowie eine Interaktion zwischen RAC1 und SMOK katD; C: Darstellung der verwendeten SMOK-Konstrukte mit tabellarischer Zusammenfassung der identifizierten Interaktionen.

Da die kleinen G-Proteine RAC1, RHOA und CDC42 in Spermatozoen exprimiert und im Flagellum lokalisiert sind, wurde die direkte Interaktion von SMOK1 mit diesen Proteinen mittels klassischer Pull-Down Analyse mit rekombinanten Proteinen *in vitro* überprüft (Abbildung 49). Die Proteine RAC1, RHOA und CDC42 wurden als GST-Fusionsproteine in *E.coli* hergestellt, über Glutathione Sepharose als Matrix aufgereinigt, eluiert und im SDS-PAGE analysiert. Die verwendeten SMOK1-Proteine (SMOK1 FL, SMOK1 CD und SMOK1 RD) wurden als rekombinante Proteine durch eine *in vitro* Transkription/Translation-Reaktion hergestellt, an eine Ni-NTA Matrix gebunden und durch Waschen partiell von kontaminierenden Proteinen aufgereinigt. Im Anschluss wurden die SMOK1-Proteine mit den GST-Proteinen inkubiert und die möglichen Interaktionen, nach Waschen der Komplexe, im Western-Blot analysiert.

Die Untersuchungen zeigen eine Interaktion von RAC1-GST und von RHOA-GST mit SMOK1 FL, während mit dem GST-Kontrollprotein keine Interaktionsbande zu erkennen ist (Abbildung 49, B oben). Das Protein RAC1 bindet zusätzlich auch an die SMOK1 CD-Domäne des SMOK1-Proteins (Abbildung 49, B mitte). Über die Bindung der SMOK1 RD-Domäne an die kleinen G-Proteine RAC1 und RHOA kann hier keine genaue Aussage gemacht werden, da nur sehr schwache Interaktionsbanden in diesen Proben erkennbar sind, die in ihrer Intensität der GST-Negativkontrolle ähneln (Abbildung 49, B unten, Markierung der Banden mit *). In der zusammenfassenden Darstellung (Abbildung 49, C) wurden diese "Schattenbanden" zwischen SMOK1 RD und RAC1 bzw. RHOA, als negativ bezüglich einer Wechselwirkung gewertet. Die kleine GTPase CDC42 zeigt in dieser Untersuchung keine Wechselwirkung mit den Proteinen SMOK1 FL, SMOK1 RD und SMOK1 CD.

Eine Darstellung der Interaktionen, die mittels klassischer Pull-Down Analysen untersucht wurden, ist in der Abbildung 50 zusammengefasst. Diese Übersicht beinhaltet die Wechselwirkungen zwischen SMOK1 und den Proteinen AMMECR1 und RHPN1 sowie die Ergebnisse aus den Interaktionsanalysen zwischen der Kinase und den kleinen RHO-GTPasen (RAC1, RHOA und CDC42).

Protein1	Protein1 Domäne	Protein2 Domäne	Bindung
AMMECR1	SMOK1	SMOK1 FL	+
		SMOK1 regD	+
RHPN1	SMOK1	SMOK1 FL	(+)
RAC1	SMOK1	SMOK1 FL	+
		SMOK1 katD	+
		SMOK1 regD	-
RHOA	SMOK1	SMOK1 FL	+
		SMOK1 katD	-
		SMOK1 regD	-
CDC42	SMOK1	SMOK1 FL	-
		SMOK1 katD	-
		SMOK1 regD	-

Protein: Protein ID:
 AMMECR1 = hAMMECR1-CCSB10837
 RHPN1 = hRHPN1-CCSB8341

Abbildung 50: Zusammenfassung der getesteten Interaktionen mittels klassischer Pull-Down Analyse mit Angabe der Domänen der Protein 1 und 2.

Aus den Pull-Down Untersuchungen zwischen der Kinase und den kleinen RHO-GTPasen ergeben sich weitere Verknüpfungen in dem Protein-Protein-Netzwerk zwischen SMOK1 und RAC1 sowie zwischen SMOK1 und RHOA (Abbildung 51). Diese direkten Wechselwirkungen verbinden bekannte *Distorter*-Proteine direkt mit der Spermien-Motilitäts-Kinase, SMOK1.

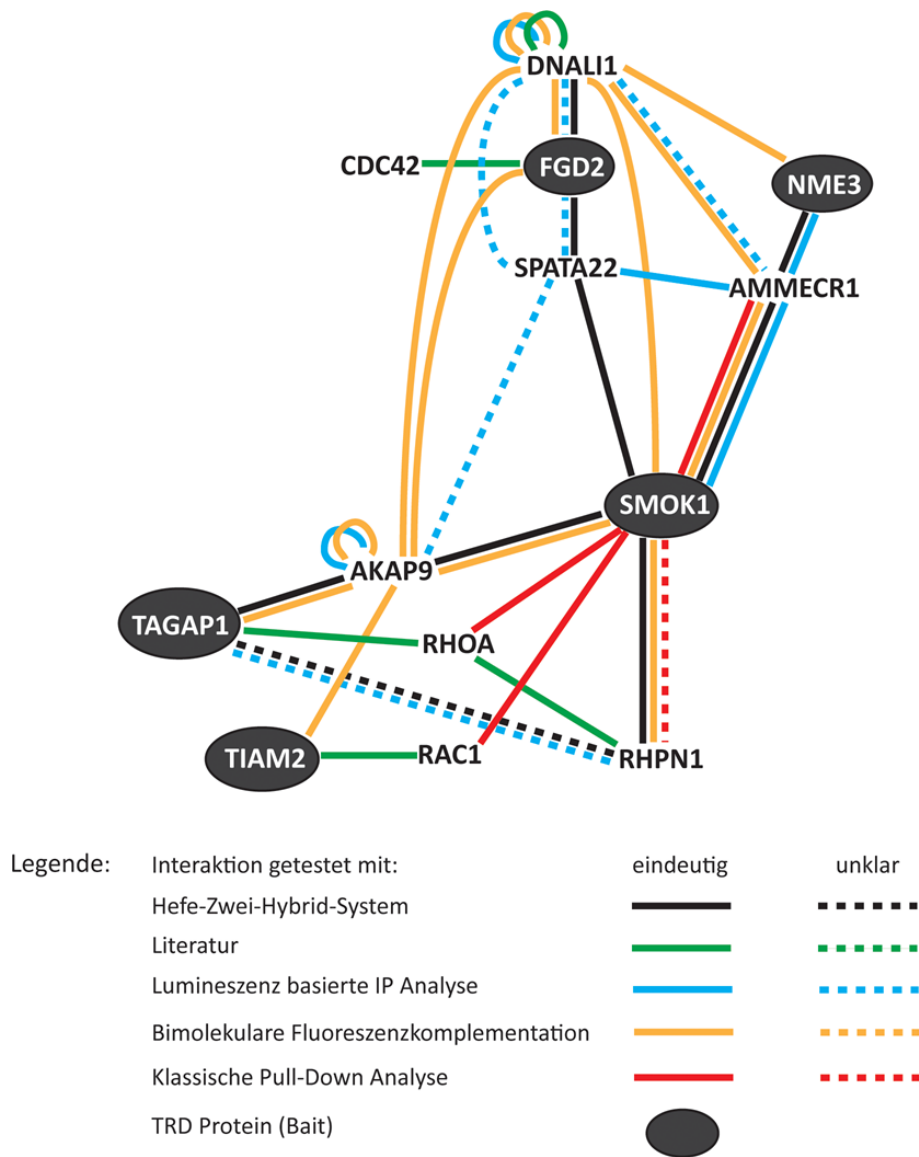


Abbildung 51: Protein-Protein-Interaktions-Netzwerk zwischen *t*-Komplex Faktoren und Bindeproteinen, basierend auf den identifizierten Hefe-Interaktionen (schwarz), validiert durch Lumineszenz basierte IP Analysen (blau), Bimolekulare Fluoreszenzkomplementationsanalysen (orange) und klassische Pull-Down Analysen (rot), erweitert um publizierte Interaktionen mit kleinen RHO-GTPasen (grün). Eindeutige Interaktion: durchgezogene Verbindungslinien, Unsichere Interaktionen: unterbrochene Verbindungslinien.

6 Diskussion

Der *t*-Haplotyp (*t*) in der Maus, eine variante Form des Chromosoms 17, wird in heterozygoten Männchen (*t/+*) an bis zu 98 % der Nachkommen vererbt und verursacht somit eine Verschiebung der Vererbungsrate zu seinen Gunsten. Diese Verschiebung von Merkmalen ist demnach eine Abweichung von der 2. mendelschen Regel. Die nicht-mendelsche Vererbung in der Maus wird durch das Zusammenwirken von mehreren schädlich wirkenden *Distortern* und einem entgegen wirkenden *Responder* verursacht (Lyon, 1984). Die Tatsache, dass nur männliche Tiere von diesem Phänomen betroffen sind, macht den direkten Zusammenhang zwischen der nicht-mendelschen Vererbung und der Funktion der Spermienzelle deutlich. Molekular wirken die *Distorter* additiv und in *trans* über RHO-Signalwege in allen Spermienzellen auf die Spermien-Motilitäts-Kinase (SMOK1) was zur Hyperaktivierung der Kinase und zu einer geringen Befruchtungswahrscheinlichkeit aller Spermienzellen führt. Nur in *Responder*-Locus tragenden Spermien wird die übermäßige Aktivierung von SMOK1 durch das *Responder*-Protein neutralisiert. In diesen Zellen erreicht die SMOK1-Aktivität somit ein normales Niveau und die Spermienzellen eine erhöhte Befruchtungswahrscheinlichkeit (Lyon, 1984; Lyon, 1986; Herrmann et al., 1999). Das Vorkommen von zwei Spermienpopulationen in heterozygoten *t/+*-Männchen mit Motilitätsunterschieden bezüglich der Geschwindigkeit und der Linearität der Bewegung deutet darauf hin, dass SMOK1 in der Lage ist die Flagellenbewegung bzw. die Spermienmotilität zu beeinflussen (Olds-Clarke, 1989).

Wie die Kinase die Beweglichkeit von Spermatozoen verändert bzw. auf welche Faktoren sie innerhalb des Flagellums wirkt, ist unklar. Bisläng konnten keine direkten Interaktionspartner für SMOK1 identifiziert werden, die auf diese Fragen eine Antwort liefern könnten. Dabei ist die Aufklärung dieses Zusammenhanges essentiell notwendig, um das Phänomen der nicht-mendelschen Vererbung zu verstehen.

Um neue Bindungspartner, für die im TRD-Signalweg wichtigen Faktoren wie SMOK1 (Herrmann et al., 1999), TAGAP1 (Bauer et al., 2005), FGD2 (Bauer et al., 2007), NME3 (Bauer et al., 2012) und TIAM2 (persönliche Mitteilung von Y. Charron, H. Bauer und B. G. Herrmann) zu identifizieren, wurden verschiedene Protein-Protein-Interaktionsstudien durchgeführt.

Eine umfangreiche Hefe-Zwei-Hybrid Analyse stand am Anfang der Analysen. Mit dieser Methode wurden 49 bislang unbekannte Interaktionspartner für SMOK1 oder die *Distorter*-Proteine in der Hefe identifiziert (Kapitel: Ergebnisse (A), Netzwerk

zwischen *t*-Komplex Faktoren und identifizierten Bindungspartnern).

Im nächsten Schritt erfolgte eine Auswahl von besonders interessanten Kandidaten (*Preys*), die im weiteren Verlauf der Arbeit analysiert werden sollten. Folgende Kriterien wurden für die Auswahl der Kandidaten herangezogen.

Es wurden in erster Linie *Preys* untersucht, die in der Hefe-Analyse eine direkte Interaktion mit SMOK1 gezeigt haben. Der Grund für diese Herangehensweise ist die zentrale Stellung der Kinase SMOK1 als Signalüberträger im TRD-Signalweg (Herrmann et al., 1999). Des Weiteren wurden vornehmlich *Preys* untersucht, die zusätzlich zur SMOK1-Interaktionen mit einer weiteren Komponente des TRD-Signalwegs, zum Beispiel einem *Distorter*, in Wechselwirkung getreten sind. Die Wahrscheinlichkeit dieser Kandidaten in dem TRD-Signalweg eine Rolle zu spielen, ist durch die Interaktion mit zwei TRD-relevanten Faktoren deutlich erhöht. Neben diesen Kriterien wurden zusätzlich Informationen aus der Literatur herangezogen, um eine Auswahl der Kandidaten zu erleichtern. Ein *Prey* wurde in die molekularen Analysen eingeschlossen, wenn er neben den oben genannten Kriterien auch für eine biochemische Funktion bei der Signalweiterleitung oder sogar für eine Expression im Hoden bekannt war.

Die nach dieser Auswahl besten Kandidaten - AMMECR1, AKAP9, RHPN1, SPATA22 und DNALI1 wurden weiterführend molekular untersucht.

Die Analyse auf Transkriptebene (mRNA) zeigte mit zwei unterschiedlichen Techniken, dass alle ausgewählte Kandidatengene im Hoden von männlichen Tieren exprimiert sind und somit potentiell als Interaktionspartner in Betracht gezogen werden können (Kapitel: Ergebnisse (B), mRNA Expressionsanalyse von SMOK1-Interaktionspartnern in der Maus).

Eine weiterführende Untersuchung auf Proteinebene machte deutlich, dass die untersuchten Proteine in flagellären Strukturen von Spermatozoen exprimiert sind (Kapitel: Ergebnisse (B), Lichtmikroskopische Proteinexpressionsanalyse von SMOK1-Interaktionspartnern in der Maus).

Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Techniken wurde die Verteilung der identifizierten SMOK1-Bindungspartner an Ultrastrukturen innerhalb des Spermien-schwanzes im Detail untersucht (Kapitel: Ergebnisse (B), Elektronenmikroskopische Lokalisation von SMOK1-Interaktionspartnern in Spermatozoen des Cauda Epididymis). Hier zeigten sich für die verschiedenen Proteine auch unterschiedliche subzelluläre Lokalisationsdomänen. So wurden AMMECR1, AKAP9 und SPATA22 bevorzugt in Strukturen wie der *Fibrous Sheath* und den *Outer Dense Fibers* des

Hauptteils des Flagellums lokalisiert. Die bevorzugte Lokalisation von RHPN1 wurde bereits im Jahr 2000 von Fujita und Kollegen vornehmlich an den *Outer Dense Fibers* und in geringerem Maße auch an der *Fibrous Sheath* des Spermischwanzes beschrieben. RHPN1 ist somit auch bevorzugt an den peripheren axonemalen Strukturen präsent (Nakamura et al., 1999; Fujita et al., 2000). Das Protein DNALI1 bildet eine entscheidende Ausnahme, da es im Hauptteil des Flagellums ausschließlich am Axonem lokalisiert ist und keine Expressionsdomänen an den peripheren Strukturen im Hauptteil des Flagellums besitzt (Abbildung 29).

Die Ergebnisse der molekularen Untersuchungen zeigten zusammengefasst, dass die ausgewählten *Preys* mit hoher Wahrscheinlichkeit als Interaktionspartner von SMOK1 *in vivo* infrage kommen.

Unter Anwendung verschiedener Techniken wie der Lumineszenz basierten IP Analyse (Barrios-Rodiles et al., 2005; Vizoso Pinto et al., 2009), der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (Remy & Michnick, 2004; Kerppola, 2006; Michnick et al., 2007) sowie der klassischen Pull-Down Untersuchung wurden die Protein-Protein-Interaktionen aus der Hefe-Analyse in Säugerzellen und *in vitro* verifiziert, und schließlich in einem Interaktionsnetzwerk zusammengefügt (Kapitel: Ergebnisse (C)). Zusätzlich konnten durch diese Interaktionsstudien auch neue Wechselwirkungen innerhalb des Netzwerkes identifiziert werden, die in der Hefe nicht gefunden wurden. Eine Zusammenfassung dieser Protein-Protein-Interaktionen findet sich in der folgenden Abbildung. Die bereits aus der Literatur bekannten Interaktionen wurden, in dieser Auflistung, ebenfalls berücksichtigt.

Diskussion

Protein	Protein-Protein-Interaktionen identifiziert mit				
	Literatur	Hefe-Zwei-Hybrid Analyse	Lumineszenz basierte IP Analyse	Biomolekulare Fluoreszenzkomplementation	Pull-Down Untersuchung
SMOK1	—	AMMECR1 RHPN1 AKAP9 SPATA22	AMMECR1	AMMECR1 RHPN1 AKAP9 DNALI1	AMMECR1 (RHPN1) RHOA RAC1
TAGAP1	RHOA ¹	AKAP9 (RHPN1)	(RHPN1)	AKAP9	—
FGD2	CDC42 ²	DNALI1 SPATA22	(DNALI1) (SPATA22)	DNALI1 AKAP9	—
NME3	NME2 ³ NME1 ⁴	AMMECR1	AMMECR1	DNALI1	—
TIAM2	RAC1 ⁵	—	—	AKAP9	—
AMMECR1	—	SMOK1 NME3	SMOK1 NME3 SPATA22 (DNALI1)	SMOK1 DNALI1	SMOK1
DNALI1	DNALI1 ⁶	FGD2	DNALI1 (FGD2) (SPATA22) (AMMECR1)	DNALI1 FGD2 AMMECR1 NME3 AKAP9 SMOK1	—
SPATA22	—	SMOK1 FGD2	AMMECR1 (FGD2) (DNALI1) (AKAP9)	—	—
AKAP9	—	SMOK1 TAGAP1	AKAP9 (SPATA22)	SMOK1 TAGAP1 AKAP9 FGD2 TIAM2 DNALI1	—
RHPN1	RHOA ⁷	SMOK1 (TAGAP1)	(TAGAP1)	SMOK1	(SMOK1)

Quellen:

- | | |
|-----------------------|-------------------------|
| 1 Bauer et al., 2005 | 5 Hoshino et al., 1999 |
| 2 Huber et al., 2008 | 6 Rashid et al., 2006 |
| 3 Stelzl et al., 2005 | 7 Nakamura et al., 1999 |
| 4 Rual et al., 2005 | |

Protein:

- | | |
|---------|-------------------------------------|
| AMMECR1 | Protein ID:
= hAMMECR1-CCSB10837 |
| AKAP9 | = hAKAP9-CCSB14138 |
| RHPN1 | = hRHPN1-CCSB8341 |
| SPATA22 | = hSPATA22-CCSB2101 |
| DNALI1 | = hDNALI1-CCSB11636 |

Abbildung 52: Zusammenfassung der Interaktionen zwischen *t*-Komplex Faktoren und *Prey*-Proteinen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse, der Lumineszenz basierte IP Analysen, der Biomolekulare Fluoreszenzkomplementationsanalysen und aus den Pull-Down Untersuchungen. Zusätzlich sind in der Spalte „Literatur“ die Interaktionen gezeigt, die bereits bekannt waren. Die Interaktionen für Proteine in Klammern sind nicht eindeutig bewiesen.

Ob es sich bei den identifizierten Protein-Protein-Interaktionen um direkte oder indirekte Wechselwirkungen handelt, kann mit den Methoden, die auf Kotransfektionen basieren nicht im Detail geklärt werden. Die Bestätigung der Hefe-Zwei-Hybrid Interaktionen mit anderen Analysetechniken und die Expressionsuntersuchungen in Spermatozoen untermauern zusammen jedoch die Glaubhaftigkeit dieser Protein-Protein-Interaktionen im Hodengewebe der Maus. Die möglichen Funktionen der unterschiedlichen SMOK1-Interaktionspartner werden im weiteren Verlauf der Diskussion im Detail erörtert. Ein weiterer Punkt dieser Arbeit stellte die Analyse von Interaktionen zwischen SMOK1 und Proteinen der RHO-Familie dar. Dieser Aspekt wird im folgenden Abschnitt näher betrachtet.

6.1 SMOK1 interagiert direkt mit Proteinen der RHO-Familie

Für die kleinen RHO-GTPasen RAC1, RHOA/B/C und CDC42 wurde die Expression auf Proteinebene im Maushodengewebe getestet. Diese Analyse zeigte die Expression der kleinen GTPasen deutlich in den flagellären Strukturen elongierter Spermatozoen, welche als entwickelte Spermien später in das Lumen des Hodenkanälchens abgegeben werden (Kapitel: Ergebnisse (D), Expression von RHO-Proteinen in Spermatozoen der Maus). Diese Immunfluoreszenzanalyse von Hodengewebe bekräftigt die Beobachtungen von Ducummon & Berger, dass die Proteine RHOA, CDC42 und RAC1 in Säugerspermatozoen im Flagellum lokalisiert sind (Ducummon & Berger, 2006; Huttlin et al., 2010).

Die Tatsache, dass die bekannten *Distorter*-Proteine TAGAP1, FGD2 und NME3 direkt mit Signalwegen kleiner G-Proteine verbunden sind, deutet bereits auf die Anwesenheit der kleinen G-Proteine im Hodengewebe sowie im Signalweg, welcher zur nicht-mendelschen Vererbung in der Maus führt, und verdeutlicht die Funktion dieser Proteine bei der Steuerung der Spermienmotilität (Bauer et al., 2005, Bauer et al., 2007, Bauer et al., 2012).

Die Hypothese, dass diese G-Proteine eventuell auch Interaktionen mit der Kinase SMOK1 eingehen können, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit geprüft. Mit Hilfe von klassischen Pull-Down Analysen und rekombinanten Proteinen wurden Interaktionsanalysen zwischen RAC1, RHOA, CDC42 und der Spermien-Motilitäts-Kinase durchgeführt (Kapitel: Ergebnisse (D), Direkte Interaktion von SMOK1 mit RHOA und RAC1 *in vitro*). Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass die Volle-Länge-

Kinase SMOK1 in der Lage ist die kleinen G-Proteine RAC1 und RHOA direkt zu binden. Für CDC42 konnte dagegen keine Interaktion festgestellt werden. Speziell für RAC1 konnte eine Bindung an die katalytische Domäne von SMOK1 gezeigt werden. Eine eindeutige Bindung von RHOA an die katalytische oder die regulatorische Domäne von SMOK1 wurde nicht beobachtet. Man könnte vermuten, dass durch die Aufspaltung des SMOK1-Proteins in die katalytische und regulatorische Unter-einheit, die Bindedomäne von RHOA zerstört worden ist. Ob für die Bindung von RHOA letztlich eine Sekundärstruktur oder eine Aminosäuresequenz relevant sein könnte, lässt sich nicht sagen.

RHO-Proteine spielen in somatischen Zellen eine essentielle Rolle bei einer Vielzahl von unterschiedlichen Prozessen wie der Organisation und Reorganisation des Zellzytoskeletts (Aktin- und Mikrotubuli-Organisation), bei der Zellmigration, bei der Zellproliferation und Zellteilung, beim Membrantransport, bei der Regulation von Zell-Zell-Kontakten und bei der Kontrolle der Transkription, um nur einige Beispiele zu nennen (Van Aelst & D'Souza-Schorey, 1997; Jaffe & Hall, 2005). Dementsprechend wirken diese kleinen GTPasen auch auf eine große Zahl verschiedenster Effektorproteine wie Gerüstproteine unterschiedlichster Art, verschiedene Kinasen oder aber direkt auf Zytoskelettkomponenten wie Tubulin bzw. Aktin (Nakamura et al., 1999; Tzima, 2006; Bustelo et al., 2007). Alle diese Klassen von Effektorproteinen spielen auch im Aufbau und in der Funktion von Spermienzellen, speziell im Aufbau und in der Funktion eines Flagellums, eine wesentliche Rolle.

Gerüstproteine bilden, wie der Name es bereits andeutet ein Gerüst für verschiedene Komponenten und Moleküle eines Signalweges. Die Proteine sind somit zellulär in einem geringen Abstand zueinander und im idealen Fall direkt an ihrem Wirkort lokalisiert. Gerüstproteine sind in Flagellen von Säugerspermatozoen für alle subzelluläre Strukturen des Hauptteils wie der *Fibrous Sheath*, den *Outer Dense Fibers* und dem Axonem beschrieben (Carrera et al., 1994; Colledge & Scott, 1999; Nakamura et al., 1999; Fujita et al., 2000; Brown et al., 2003; Luconi et al., 2011).

Die Anwesenheit von Kinasen und Phosphatasen spielt innerhalb des Axonems des Spermienflagellums ebenfalls eine ausschlaggebende Rolle. Axonemale Dyneine werden durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung in ihrer Aktivität gezielt durch Kinasen und Phosphatasen reguliert, was zu einem direkten Einfluss dieser Moleküle in der Flagellenbewegung und der Spermienmotilität führt (Tash, 1989; Tash & Bracho, 1994; Yang et al., 2000).

Die GTPasen, die bereits in somatischen Zellen für die Kontrolle des Zytoskeletts und die Kontrolle der Motilität in Form von Migration eine Rolle spielen (Wittmann & Waterman-Storer, 2001; Kaibuchi et al., 1999), können global auch flagelläre Strukturen von Spermatozoen regulieren und die Motilität von Spermien beeinflussen (Hinsch et al., 1993). Die Tatsache, dass zwei der getesteten RHO-GTPasen *in vitro* in der Lage sind direkt mit dem zentralen Molekül (SMOK1) innerhalb des Signalweges zu interagieren, zeigt klar den direkten Zusammenhang zwischen den *Distorter*-RHO-Signalwegen und dem Phänomen, das zur nicht-mendelschen Vererbung in der Maus führt. Möglicherweise ist SMOK1 ein neuer bislang unbekannter und hodenspezifischer Effektor von RHOA und RAC1.

Der erste bekannte *Distorter* TAGAP1 ist ein GAP-Protein (GTPase aktivierendes Protein), das biochemisch die Hydrolyse von RHOA-GTP zu RHOA-GDP verstärkt und somit inhibitorisch auf die RHOA-Signalweiterleitung wirkt (Bauer et al., 2005). In den biochemischen Analysen von Bauer konnte ein Effekt nur für die Hydrolyse von RHOA beobachtet werden (Bauer et al., 2005). Dennoch ist für TAGAP1 eine Regulation anderer, nicht getesteter RHO-GTPasen ebenfalls denkbar. Mit der biochemischen Funktion von TAGAP1 zeigte sich erstmals auch ein Zusammenhang zwischen RHO-Signalwegen und *Transmission Ration Distortion* (Bauer et al., 2005), wobei eine mögliche Funktion von RHOA im TRD-Signalweg genetisch nicht gezeigt wurde. Mit den Pull-Down Untersuchungen zwischen SMOK1 und RHOA konnte eine direkte Interaktionen zwischen diesen beiden Proteinen gezeigt werden (Abbildung 49). Wie RHOA die Aktivität der Spermien-Motilitäts-Kinase biochemisch beeinflussen könnte, deutet sich an, wenn man das Modell des TRD-Signalweges betrachtet.

Im *t*-Haplotyp (*t*) liegt der *Distorter* TAGAP1 als Hypermorph vor (Bauer et al., 2005). Dies führt in den *t*-Spermien zu einer erhöhten Funktion des GAP-Proteins und zu einer erhöhten Aktivität von SMOK1 (Bauer et al., 2005). Diese gesteigerte Kinaseaktivität, die erst durch den *Responder* neutralisiert wird, führt letztlich zu einer Veränderten Motilität (Herrmann et al., 1999). Das bedeutet, dass der Funktionsgewinn von TAGAP1 im *t*-Komplex die SMOK1-Aktivität durch Inhibierung eines RHO-Proteins steigert und die Motilität somit negativ beeinflusst (Bauer et al., 2005; Herrmann et al., 1999).

Biochemisch wurde die inhibierende Wirkung von TAGAP1 auf RHOA bereits gezeigt (Bauer et al., 2005). Durch die Ergebnisse der Pull-Down Untersuchungen, die eine Bindung von RHOA an SMOK1 zeigen, könnte man somit eine Funktion von RHOA im TRD-Signalweg vermuten. Laut Modell müsste RHOA in *t*-Spermien

inhibiert sein, weil TAGAP1 eine erhöhte Aktivität als GAP besitzt. Folglich ist das Verhältnis von GTP- zu GDP-RHOA auf die Seite der GDP-gebundenen Form verschoben. RHOA-GDP wäre somit nicht mehr in der Lage die Kinase zu inhibieren. Die Hydrolyse von RHOA würde demnach bedeuten, dass der Inhibitor von SMOK1 gehemmt wird, was die Kinase folglich in stärkerem Maße aktiviert. Sollte RHOA tatsächlich als direkter und alleiniger Zwischenschritt zwischen TAGAP1 und SMOK1 stehen, müsste demnach die RHOA-GTP Form in der Lage sein, die SMOK1-Aktivität zu senken. Da die Messung von SMOK1-Aktivität grundsätzlich möglich ist (Herrmann et al., 1999), könnten Untersuchungen der SMOK1-Aktivität eine Lösung für die hier aufgestellte Vermutung sein, dass RHOA das G-Protein ist, welches TAGAP1 und SMOK1 verknüpft.

Für den zweiten publizierten *Distorter* FGD2 (Bauer et al., 2007) ist bekannt, dass dieser für das Molekül CDC42 als GTP-Austauschfaktor (Huber et al. 2008) und somit aktivierend wirkt. Damit reiht sich FGD2 in die Reihe anderer FGD-Proteine dieser Familie, welche ebenfalls CDC42 aktivieren (Estrada et al., 2001; Hayakawa et al., 2008).

Da CDC42 in der Interaktionsanalyse nicht an SMOK1 gebunden hat, liegt hier die Vermutung nahe, dass ein weiteres bis jetzt unbekanntes Molekül zwischen SMOK1 und CDC42 geschaltet sein könnte. Hier könnte es sich um einen bereits bekannten CDC42 Effektor handeln, der im Hoden bzw. in Spermien der Maus exprimiert sein muss. Die Zwischenschaltung eines weiteren Proteins im Signalweg, zwischen SMOK1 und CDC42, ist jedoch nicht bewiesen und zum heutigen Zeitpunkt eine Vermutung.

Eine weitere Bindung die mit Hilfe der klassischen Pull-Down Analysen gezeigt werden konnte, ist die Interaktion von RAC1 und SMOK1. Die Diskussion dieser Interaktion macht es notwendig TIAM2, einen neuen und bislang nicht publizierten *Distorter*-Kandidat, der im TRD-Signalweg eine Rolle spielen könnte, vorzustellen (persönliche Mitteilung von Y.Charron, H. Bauer und B. G. Herrmann). Biochemische Untersuchungen von TIAM2 zeigen, dass das wt-Protein als GEF (GTP-Austauschfaktor) die Aktivierung von RAC1 bewirkt (Hoshino et al., 1999; Matsuo et al., 2002; Matsuo et al., 2003). RAC1 ist zudem in der Lage direkt mit SMOK1 zu interagieren (Pull-Down Analysen). Diese GTPase könnte möglicherweise einen neuen *Distorter*-Kandidaten direkt mit SMOK1 verbinden. Ob RAC1 biochemisch in der Lage ist die SMOK1-Aktivität zu verändern, wurde nicht analysiert. Hier könnten SMOK1-Aktivitätsmessungen Antworten liefern. Außerdem ist RAC1 in

der Lage über *Crosstalk* die Signalwege der kleinen G-Proteine RHOA und CDC42 zu regulieren und zu beeinflussen (Sander et al., 1999; Iden & Collard; 2008) und möglicherweise somit den TRD-Signalweg zu regulieren.

Zusammenfassend konnte über eine direkte Bindung der Proteine RAC1 und RHOA an SMOK1 die Vermutung einer molekularen Verbindung von RHO-Signalwegen mit dem Phänomen der nicht-mendelschen Vererbung in der Maus bestätigt werden. Ob die Bindung dieser GTPasen mit einer Aktivitätsänderung der Kinase verbunden ist, wurde in beiden Fällen (RHOA und RAC1) nicht überprüft. Die direkte Interaktion von SMOK1 mit RAC1 und RHOA lässt die Vermutung zu, dass weitere zwischengeschaltete Interaktoren ausgeschlossen werden können. Mit den Ergebnissen der Pull-Down Analysen lässt sich das molekulare Modell von Bauer und Herrmann aus dem Jahr 2012 bekräftigen (Bauer et al., 2012).

6.2 AKAP9 als Gerüstprotein und Organisationszentrum der *Fibrous Sheath*

Das Ziel dieser Arbeit war es das RHO-SMOK1-Netzwerk molekular zu analysieren und neue, bislang unbekannte Bindungspartner im Signalweg, der zur nicht-mendelschen Vererbung in der Maus führt, zu identifizieren, um dadurch die Funktion von SMOK1 in diesem Signalweg genauer zu verstehen.

Ein Interaktionspartner, der als *Prey* im Hefe-Zwei-Hybrid System gefunden wurde, ist AKAP9 (identifizierter Klon hAKAP9-CCSB14138 entspricht der CG-NAP Isoform). AKAP9 wurde in der Hefe-Analyse sowohl mit einer Domäne von SMOK1 (SMOK1 Δ C-regD+PKA), als auch mit einer Domäne von TAGAP1 (TAGAP1 SH3) identifiziert. Beide Interaktionen besaßen eine Interaktionsstärke von 0,5. Diese Tatsache bedeutet, dass der identifizierte Klon hAKAP9-CCSB14138 sowohl an ein *Distorter*-Protein, als auch an das zentrale Molekül des TRD-Signalwegs gebunden hat. Allein diese Tatsache zeigt die mögliche Relevanz von AKAP9 in diesem Signalweg.

Zusätzlich wurde durch Untersuchungen auf mRNA-Ebene gezeigt, dass AKAP9 im Hodengewebe der Maus transkribiert wird. Analysen auf Protein-Ebene zeigten, dass AKAP9 sowohl Expressionsdomänen in der akrosomalen Region des Spermienkopfes, als auch entlang des Flagellums besitzt. Durch zusätzliche elektronenmikroskopische Techniken und Lokalisationsstudien wurde die Verteilung von AKAP9-Protein in Querschnitten von Flagellen untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass AKAP9

vorrangig an den Mitochondrien des Mittelteils, an der *Fibrous Sheath* des Hauptteils und zu einem geringen Anteil auch an den *Outer Dense Fibers* des Hauptteils des Flagellums lokalisiert ist.

Die Lokalisation von AKAP9-Protein *in vivo* innerhalb des Spermienschwanzes ist essentiell von Bedeutung für die mögliche Bindung an SMOK1. Im Jahr 2009 konnte Véron zeigen, dass die mutierte dominant negative Form der SMOK-Kinase (SMOK1^{TCR} oder TCR) auf Proteinebene an eben diesen Strukturen, der *Fibrous Sheath* und den *Outer Dense Fibers* lokalisiert ist (Véron et al., 2009). Da der *Responder* und *Smok1* sich auf mRNA-Ebene identisch verhalten, ist anzunehmen, dass auch die Proteine sich ähnlich verhalten bzw. an denselben Ultrastrukturen des Flagellums gebunden sind (Véron et al., 2009). Folglich sind AKAP9 und SMOK1 wahrscheinlich an den subzellulären Strukturen *Fibrous Sheath* und *Outer Dense Fibers* kolokalisiert. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion zwischen SMOK1 und AKAP9 für den TRD-Signalweg womöglich eine wichtige Rolle spielen könnte.

Mit Hilfe von biochemischen Analysen zur Protein-Protein-Interaktionsbestimmung wurden die Interaktionen zwischen AKAP9 und SMOK1 und zwischen AKAP9 und TAGAP1 *in vitro* verifiziert. Zusätzlich konnten neue Wechselwirkungen zwischen AKAP9 und den *Distortern* FGD2 und TIAM2 sowie zwischen AKAP9 und einem anderen identifizierten *Prey* (DNALI1) beobachtet werden. Die Interaktion zwischen AKAP9 und SPATA22 zeigte zwar eine Tendenz für eine positive Interaktion, diese Wechselwirkung wird jedoch als unsicher bewertet.

Interessanterweise stellte sich durch zwei unabhängige Methoden die mögliche Dimerisierung von AKAP9 heraus. Scheinbar ist AKAP9 in der Lage mit sich selbst zu interagieren. Die Dimerisierung von AKAP9 konnte mit der Lumineszenz basierten IP Analyse und mit der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation beobachtet werden (Abbildung 34 und Abbildung 41).

Die Interaktion zwischen DNALI1 und AKAP9 wurde nur mit der Methode der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation beobachtet (Abbildung 40). Die Bindungen zwischen den *Distorter*-Proteinen FGD2 bzw. TIAM2 und AKAP9 sowie zwischen SMOK1 und AKAP9 wurden ebenfalls nur mit der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation gezeigt (Abbildung 39 und Abbildung 40). Dies könnte darauf deuten, dass essentielle Proteine, die die Bildung dieser AKAP9-Komplexe fördern eventuell nicht in ausreichenden Mengen in den verwendeten humanen Zellen vorhanden sind. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass entweder schwache Interaktionen

zwischen den *Distorter*-Proteinen und AKAP9 oder, dass transiente Interaktionen bestehen, die nur kurzzeitig geschlossen und schnell wieder getrennt werden. Diese Hypothese lässt sich wie folgt begründen.

Die Lumineszenz basierte IP Analyse ist eine auf dem Prinzip des Pull-Downs basierende stringente Methode zur Studie von Protein-Protein Interaktionen. Schwache oder nur transiente Interaktionen können mit dieser Methode sehr schwer bzw. nicht analysiert werden. Mit der Lumineszenz basierte IP Analyse konnten die Wechselwirkungen zwischen AKAP9 und SMOK1 sowie zwischen AKAP9 und den Distorter-Proteinen TAGAP1, FGD2 und TIAM2 nicht gezeigt werden. Die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation dagegen ist eine weniger stringente Methode und sowohl für die Detektion starker, als auch für die Analyse schwacher und kurzzeitiger Protein-Protein-Bindungen geeignet. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass nach Bildung des gesamten und funktionellen VENUS-Proteins sich die entstandenen Protein-Protein-Interaktionen nicht wieder lösen. So werden auch transiente Interaktionen zwischen Proteinen, die normalerweise nur kurzzeitig in Bruchteilen von Sekunden in der Zelle gebildet werden, durch Anreicherung des VENUS-Signals sichtbar gemacht. Mit dieser Methode war es möglich die Interaktionen zwischen AKAP9 und SMOK1 sowie zwischen AKAP9 und den *Distorter*-Proteinen TAGAP1, FGD2 und TIAM2 zu beobachten.

Neben den dargestellten Ergebnissen muss im Falle von AKAP-Proteinen zusätzlich auf die Literatur verwiesen werden. AKAP-Proteine (*A-kinase anchoring proteins*) sind Gerüstproteine, die sowohl Kinasen, als auch Phosphatasen binden können und dadurch Komponenten von Signalkaskaden an einem bestimmten Ort in der Zelle lokalisieren können (Colledge & Scott, 1999; Langeberg & Scott, 2005). Zudem sind AKAPs dafür bekannt, dass sie die regulatorische Untereinheit von PKA binden (Carrera et al., 1994; Mei et al., 1997; Miki & Eddy, 1998; Mandal et al., 1999; Vijayaraghavan et al., 1999). Zusätzlich können neben PKA auch andere Kinasen wie PKN oder Phosphatasen wie PP1 und PP2A von AKAP9 (CG-NAP Isoform) gebunden werden (Takahashi et al., 1999; Diviani & Scott, 2001). Durch die gezielte Verankerung von diesen Enzymen werden Moleküle eines Signalweges in direkter Umgebung zueinander in Komplexen vereinigt und der Ablauf von Signalkaskaden gesteuert. Neben der Funktion als Gerüstprotein andere Proteine zu binden, bilden AKAPs also auch Organisationszentren für Prozesse und Signalwege.

In der Spermienzelle sind AKAP-Proteine wesentlich am Aufbau und an der Funktion der Strukturen des Spermenschwanzes beteiligt. So sind die Proteine AKAP3

und AKAP4 essentiell für den Aufbau und Erhalt der Zytoskelett-Struktur der *Fibrous Sheath* (Carrera et al., 1994; Brown et al., 2003).

Neben dieser flagellären Struktur wurden AKAP-Proteine aber auch innerhalb des Axonems an mikrotubuli-assoziierten Strukturen identifiziert, welche direkt mit der Flagellenbewegung und somit mit der Spermienmotilität in Verbindung stehen. Das Protein RSP3 (AKAP97), welches am Aufbau des *Radial Spoke* Proteins beteiligt ist, beinhaltet eine AKAP-Domäne zur Bindung der regulatorischen Untereinheit von PKA und kann Dimere bilden (Gaillard et al., 2001; Wirschell et al., 2008). Neben den 23 *Radial Spoke* Proteinen, die am Aufbau der *Radial Spoke* Struktur beteiligt sind, gibt es einen weiteren Komplex der wahrscheinlich eines der *Radial Spokes* am Mikrotubuli-Dubletts verankert – der Calmodulin und *Spoke* assoziierte Komplex. Auch in diesem Komplex ist ein Protein mit einer AKAP-Domäne identifiziert worden (Pigino & Ishikawa, 2012). Des Weiteren wurde ein AKAP-Protein (AKAP240) an einem der zentralen Mikrotubuli-Paare, genauer am C2 Mikrotubuli, identifiziert (Gaillard et al., 2001).

AKAPs sind innerhalb des Flagellums an einer Vielzahl von unterschiedlichen nicht axonemalen und axonemalen Strukturen lokalisiert. Die Tatsache, dass AKAP9-mRNA im Hoden exprimiert ist und in Flagellen von Spermatozoen auf Proteinebene lokalisiert wurde (Huttlin et al., 2010; Abbildung 25; Abbildung 27) und die Tatsache, dass AKAP9 bevorzugt an den selben Ultrastrukturen wie SMOK1 gebunden ist (*Fibrous Sheath*), zeigt deutlich die Relevanz des identifizierten Proteins AKAP9 in dem Signalweg, der zur nicht-mendelschen Vererbung in der Maus führt. Zusätzlich verdeutlicht die Tatsache, dass AKAP9 drei *Distorter*-Proteine bindet (TAGAP1, FGD2, TIAM2) die Funktion dieses Proteins als Gerüstprotein und Organisationszentrum.

6.3 RHPN1 als mögliches Gerüstprotein der *Outer Dense Fibers*

Ein weiteres Molekül, das im Hefe-Zwei-Hybrid System mit der gesamten regulatorischen Domäne von SMOK1 (SMOK1 RD) und dem *Distorter*-Protein TAGAP1 (TAGAP1 short) identifiziert wurde, ist RHPN1 (identifizierter Klon hRHPN1-CCSB8341). Hier muss jedoch angemerkt werden, dass die Interaktionsstärke zwischen dem *Prey* RHPN1 und den *Baits* jeweils bei schwachen 0,25 lag. Im Normalfall werden lediglich Interaktionen, die eine Stärke von 0,5 und mehr in einer Hefe-Zwei-Hybrid Analyse besitzen (Schwellenwert) weiter untersucht, weil dadurch die Strin-

genz der Methode erhöht wird. Hier wurde für das Protein RHPN1 aufgrund der bereits bekannten Informationen bezüglich der Charakterisierung und Expressionsanalyse in Spermatozoen eine Ausnahme gemacht (Nakamura et al., 1999; Fujita et al., 2000). Als Effektorprotein von RHOA ist RHPN1 im Hauptteil von Spermatozoen vorrangig an den *Outer Dense Fibers* und in geringerem Maße auch an der *Fibrous Sheath* des Flagellums lokalisiert (Fujita et al., 2000). Neben der Bindung von RHOA interagiert RHPN1 mit einem weiteren spermien-spezifischen Protein Namens Ropporin (ROPN1), welches an den Innenseiten der *Fibrous Sheath* nahe den *Outer Dense Fibers* lokalisiert ist und wiederum eine Wechselwirkung mit dem Protein AKAP3 eingehen kann (Fujita et al., 2000). Dies lässt die Vermutung zu, dass RHPN1 zusammen mit ROPN1 einen Komplex bildet und ebenfalls als Gerüstprotein der *Outer Dense Fibers* und in der *Fibrous Sheath* fungieren könnte.

Für *Rhpn1* wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen auf mRNA-Ebene durchgeführt, die eindeutig belegen, dass die mRNA dieses Gens im Maushoden exprimiert ist. Genauer konnte das Transkript in differenzierten Spermatogonien, in Spermatozyten und schwächer auch in runden Spermatisiden nachgewiesen werden. Weiterführende Analysen auf Proteinebene wurden nicht durchgeführt. In diesem Fall zeigen die Studien von Fujita und Kollegen aus dem Jahr 2000, die Lokalisation von RHPN1 im Hauptteil des Flagellums von Spermatozoen, vorrangig an den periaxonemalen Strukturen (Fujita et al., 2000) (Absatz oben und Abbildung 58 im Anhang).

Die Validierung der identifizierten Protein-Protein-Interaktionen erfolgte in einem ersten Ansatz mit der Lumineszenz basierten IP Analyse. Die Interaktion zwischen RHPN1 und TAGAP1 musste nach Analyse mit dieser Methode als unklar eingestuft werden, obwohl eine Tendenz in Richtung einer positiven Bindung von TAGAP1 an RHPN1 zu erkennen ist. Die Interaktionen zwischen dem *Distorter*-Protein TAGAP1 und RHPN1 scheint folglich von schwacher oder transientser Natur zu sein. Die Wechselwirkung mit der Kinase wurde nicht bestätigt. Die SMOK1-Interaktion wurde erst mit der weniger stringenten bimolekularen Fluoreszenzkomplementation bekräftigt.

Abschließend wurde die SMOK1-RHPN1-Interaktion mit Hilfe der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation und der klassischen Pull-Down Analyse untersucht. Mit der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation konnte die Bindung von SMOK1 an RHPN1 gezeigt werden. In der Pull-Down Untersuchung zeigte sich eine schwache

Interaktionsbande für RHPN1 in der SMOK1-PHPN1-Probe im Vergleich zu der Negativkontrolle, die lediglich RHPN1-Protein und kein SMOK1 enthalten hatte. Die Tatsache, dass diese Interaktionsbande nach Veränderung der Pufferbedingungen verloren ging (Konzentrationserhöhung von NP-40), zeigt wie schwach diese Bindung zu sein scheint (Daten nicht gezeigt). Es wäre denkbar, dass RHOA - RHOA interagiert mit SMOK1 (Abbildung 49) und bekanntlich auch mit RHPN1 (Nakamura et al., 1999) - die Interaktion zwischen RHPN1 und SMOK1 verstärkt und eine Brücke für diese Interaktion bildet.

Weiterhin konnte die Tendenz einer Interaktion zwischen TAGAP1 und RHPN1 sowohl in der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse, als auch in der Lumineszenz basierten IP Analyse beobachtet werden. Diese Interaktion musste für beide Methoden als unsicher eingestuft werden. Dennoch wurde die schwache Tendenz einer Protein-Protein-Interaktion mit zwei unterschiedlichen Methoden beobachtet.

Durch die Pull-Down Ergebnisse, welche eine Interaktion zwischen SMOK1 und RHOA sowie eine schwache Interaktion zwischen RHPN1 und SMOK1 zeigten (Abbildung 46 und Abbildung 49), in Kombination mit der Lumineszenz basierten IP Analyse, welche eine schwache Interaktionen zwischen RHPN1 und TAGAP1 unterstützt (Abbildung 33), und der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation, die ebenfalls die Bindung von SMOK1 und RHPN1 untermauert, konnte eine direkte Verbindung zwischen diesen Proteinen hergestellt werden. Dazu kommt das Wissen, dass TAGAP1 als GAP auf RHOA wirkt (Bauer et al., 2005). TAGAP1, RHOA und SMOK1 können somit in einen direkten Zusammenhang gebracht werden, wobei RHPN1 als Gerüstprotein fungieren könnte. Der inhibierende Signalweg (TAGAP1-Achse) könnte über RHPN1 und RHOA an den *Outer Dense Fibers* lokalisiert sein und SMOK1 inhibieren. RHOA kann wiederum über eine direkte Protein-Protein-Bindung mit der zentralen Spermien-Motilitäts-Kinase wechselwirken und eventuell deren Aktivität beeinflussen. Somit müssten nicht nur SMOK1, sondern auch das bekannte *Distorter*-Protein TAGAP1 des inhibierenden Signalwegs und RHOA an den *Outer Dense Fibers* lokalisiert sein. Dadurch wären essentielle Komponenten der TRD-Signalkaskade zusammengeführt. RHPN1 könnte somit als Gerüstprotein für RHOA, SMOK1 und TAGAP1 fungieren, die Interaktionen zwischen diesen Faktoren koordinieren und den Signalweg, der zu *Transmission Ratio Distortion* führt, in unmittelbarer Nähe zum Axonem an den *Outer Dense Fibers* lokalisieren.

6.4 AMMECR1-SPATA22-Komplex: eine „Brücke“ zum Axonem

Zwei weitere Proteine, die mit der Analyse in der Hefe identifiziert wurden, sind AMMECR1 (identifizierter Klon hAMMECR1-CCSB10837) und SPATA22 (identifizierter Klon hSPATA22-CCSB2101). AMMECR1 wurde als *Prey* mit dem *Distorter* NME3 und mit zwei überlappenden Klonen von SMOK1 (SMOK1 Δ N-regD+PKA & SMOK1 regD-C-term) identifiziert. Dieses Protein ist durch Gendelektion und die Ausbildung eines Krankheitsbildes beim Menschen bekannt (Vitelli et al., 1999; Vitelli et al., 2000). Die genaue Funktion ist jedoch unklar. SPATA22 dagegen trat in der Hefe mit dem *Distorter* FGD2 (FGD2 DHPH t1) und mit der Kinase SMOK1 (SMOK1 Δ C-regD+PKA) in Wechselwirkung.

Beide Gene sind nach Analysen auf mRNA-Ebene im Hoden von Mäusen exprimiert. Auch die Untersuchungen auf Proteinebene zeigen für AMMECR1 die Expression entlang des gesamten Flagellums. Für SPATA22 konnten in der Immunfluoreszenzanalyse deutliche Expressionsdomänen an der akrosomalen Region am Spermienkopf und am Verbindungsstück zwischen Spermienkopf und Spermischwanz gezeigt werden. Die subzelluläre Verteilung der Proteine im Hauptteil des Flagellums zeigt, dass AMMECR1 in gleichem Maße an der *Fibrous Sheath* und an den *Outer Dense Fibers* lokalisiert ist. SPATA22 zeigt dagegen eine bevorzugte Bindung an den *Outer Dense Fibers* und eine etwas abgeschwächte Bindung an der *Fibrous Sheath*.

Die Bindung von AMMECR1-Protein an SMOK1 und an den *Distorter* NME3, konnte mit der Lumineszenz basierten IP Analyse bestätigt werden. Interessanter Weise wurde ebenfalls eine starke Interaktion zwischen AMMECR1 und SPATA22 gezeigt. Die Interaktion zwischen AMMECR1 und DNALI1, die mit der Lumineszenz basierten IP Analyse eine Tendenz für eine Interaktion gezeigt hatte, muss dennoch als unsicher eingestuft werden.

Mit der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation wurden die AMMECR1-SMOK1 und die AMMECR1-DNALI1 Interaktionen bekräftigt.

Mit Hilfe der klassischen Pull-Down Analyse wurde die Wechselwirkung zwischen AMMECR1 und SMOK1 ebenfalls bestätigt (Abbildung 32). Diese Interaktion konnte zusätzlich auf die Bindung von AMMECR1 an die regulatorische Domäne von SMOK1 eingegrenzt werden. Die Pull-Down Analysen bestätigen somit eindeutig die ersten Untersuchungen in der Hefe.

Für SPATA22 konnte mit der Lumineszenz basierten IP Analyse die Bindungen zwischen FGD2 und SPATA22 bestätigt werden. Zusätzlich wurden Bindungen, zwischen SPATA22 und DNALI1, AKAP9 bzw. FGD2, identifiziert die auf Grund ihrer relativen Bindung an SPATA22 als unsicher eingestuft werden müssen, dennoch zeigten sich in der Lumineszenz basierten IP Analyse Tendenzen für positive Interaktionen.

Da sowohl AMMECR1, als auch SPATA22 mit dem *Prey* DNALI1 wechselwirken und miteinander eine starke Bindung eingehen können, besteht die Möglichkeit, dass diese zwei Proteine als Komplex zwischen den *Outer Dense Fibers* und den Strukturen des Axonems (DNALI1) pendeln. Eine Vermutung ist, dass diese Proteintranslokation durch Aktivierung der Spermatozoen im Genitaltrakt des Weibchens oder durch andere äußere Faktoren beeinflusst wird. Dies würde bedeuten, dass sich auch die an AMMECR1 und SPATA22 gebundenen Faktoren zwischen den *Outer Dense Fibers* und den Strukturen des Axonems hin und her bewegen können. Die elektronenmikroskopischer Untersuchung zur Analyse der prozentualen Verteilung der *Prey*-Proteine an den subzellulären Strukturen des Hauptteils des Flagellums wurden an reifen, aber nicht aktivierten Spermien des Nebenhodens durchgeführt (Abbildung 29). Eine weiterführende Untersuchung mit aktivierten Spermien könnte Aufschluss über eine mögliche Proteintranslokation, von AMMECR1 und SPATA22, zwischen den *Outer Dense Fibers* und den Strukturen des Axonems liefern.

Das AMMECR1-Protein hat in der Hefe an zwei überlappende SMOK1-Proteindomänen des C-Terminalen Bereiches gebunden. Trotz der Interaktion mit AMMECR1 könnte die katalytische Domäne von SMOK1 somit ungebunden und potentiell funktionell sein. Zudem sind SMOK1 und AMMECR1 an denselben subzellulären Strukturen gebunden (periaxonemalen Strukturen wie *Outer Dense Fibers* und *Fibrous Sheath*). Diese Tatsachen rücken den SMOK1-Interaktionspartner AMMECR1 in ein besonderes Licht.

Das AMMECR1-Protein besteht aus zwei unterschiedlich großen Subdomänen, welche schwach über eine Peptidschleife verbunden sind (Tajika et al., 2005). Diese Verbindung zwischen den Domänen könnte auf eine flexible Interaktion von AMMECR1 mit Proteinen deuten. Ob SMOK1 an diese Struktur im AMMECR1-Protein binden, konnte mit Hilfe der Protein-Protein-Interaktionsstudien jedoch nicht geklärt werden. Dennoch ist es vorstellbar, dass nach Bindung von SMOK1 eine dynamische

Bewegung der AMMECR1-Subdomänen möglich bleibt. Neben der Möglichkeit der Aktivierung von Spermien und dadurch der gezielten Translokation des AMMECR1-Proteins hin zum Axonem, könnte AMMECR1 möglicherweise auch an den *Outer Dense Fibers* gebunden sein und als „Brücke“ fungieren, um die gebundenen Proteine flexibel und nahe dem Axonem zu lokalisieren. AMMECR1 wäre damit in der Lage den TRD-Signalweg zu regulieren. Dies würde bedeuten, dass bei einem *Knock-Out* vom *Ammecr1*-Locus und somit beim Verlust des AMMECR1-Proteins diese Signaltransduktion unterbrochen wäre. Dies hätte zur Folge, dass SMOK1 nicht mehr an seinem Funktionsort lokalisiert wäre.

Eine Interaktion konnte mit der bimolekularen Fluoreszenzkomplementationsanalyse auch zwischen dem Dyneinbestandteil DNALI1 und NME3 sowie zwischen AMMECR1 und NME3 beobachtet werden (Abbildung 41). Die Tatsache, dass das *Distorter*-Protein NME3 mit AMMECR1 interagiert und demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit auch an den *Outer Dense Fibers* nahe dem Axonem oder der *Fibrous Sheath* lokalisiert ist, ist ein interessanter Aspekt. NME3 wäre damit in der Lage GTP, den Aktivator kleiner GTPasen, in der Nähe des Axonems zu generieren und somit den aktivierenden FGD2-Signalweg mit GTP zu versorgen.

Aus der Literatur sind bereits axonemale Proteine bekannt, die neben anderen Domänen auch NDK-Domänen besitzen. So wurde gezeigt, dass das Protein RSP23 (*Radial spoke protein 23*) eine NDK-Domäne besitzt, die positiv für NDK-Aktivität getestet wurde (Pigino & Ishikawa, 2012; Patel-King et al., 2004). Nukleosid-Diphosphat-Kinasen, wie NME3 bilden durch Hexamerisierung funktionelle Strukturen aus sechs Monomeren, wobei auch verschiedene Proteine der NME Familie miteinander Interaktionen eingehen können (Stelzl et al., 2005; Rual et al., 2005). In Hefe-Zwei-Hybrid Analysen konnten zum Beispiel Wechselwirkungen zwischen den humanen Proteinen NME3 und NME1 bzw. NME2 gezeigt werden (Stelzl et al., 2005; Rual et al., 2005). Weitere NDK-Domänen sind auch für andere axonemale Proteine in anderen Organismen beschrieben worden. In Seeigeln sind zum Beispiel drei NDK-Domänen im IC1 (*intermediate chain 1 polypeptide*) des äußeren Dynein-Arms identifiziert worden (Ogawa et al., 1996). Ob NME3 bzw. die mutierte Form des *t*-Haplotyps, NME3-*t*, auch mit der NDK-Domänen anderer Proteine Wechselwirken kann und somit zum Beispiel direkt an den *Radial Spokes* lokalisiert sein könnte, kann nicht beantwortet werden.

Alle diese Hinweise deuten auf eine wahrscheinlich generelle Funktion von Nukleosid-Diphosphat-Kinasen wie NME3 in Flagellen von Spermien bzw. in der Spermienbewegung hin.

6.5 Die Veränderung der Spermienmotilität durch die Lokalisation der SMOK1-Kinase an einem axonemalen Dynein

Ein weiteres Molekül, welches mit dem *Bait* FGD2 N-term im Hefe-Zwei-Hybrid System identifiziert wurde, ist DNALI1 (Klon hDNALI1-CCSB11636). DNALI1, *dynein, axonemal, light intermediate chain 1*, ist ein Bestandteil innerer Dyneinarme und somit direkt am Axonem lokalisiert.

Dyneine sind Motorproteine, welche entlang des Axonems an Mikrotubuli gebunden sind. Entlang des Tubulinstranges (A-Tubulus) unterscheidet man grundsätzlich die äußeren von den inneren Dyneinarmen. DNALI1 ist in *Chlamydomonas reinhardtii* bekannt als p28 und wurde bereits als ein Bestandteil der inneren Dyneine (IDA für *inner dynein arms*) identifiziert (LeDizet & Piperno, 1995a; LeDizet & Piperno, 1995b). Generell bestehen die inneren Dyneinarme aus schweren Motorfragmenten (HC für *heavy chain*), intermediären Ketten (IC für *intermediate chain*) und leichten Ketten (LC für *light chain*). Nach Brokaw und Kamiya sind die inneren Dyneinarme notwendig und ausreichend um die Flagellenbewegung zu generieren (Brokaw & Kamiya, 1987). Die äußeren Dyneinarme (ODA für *outer dynein arms*) werden lediglich der Verstärkung der Bewegungsfrequenz zugeordnet (Brokaw & Kamiya, 1987). Man unterteilt die inneren Dyneinarme in sieben Subspezies (I1 bis I7 oder a bis g) entsprechend ihrem molekularen Aufbau und ihrer Position relativ zu den *Radial Spoke* Proteinen. Von diesen Isoformen enthalten sechs Aktin als eine Untereinheit (Yanagisawa & Kamiya, 2001). Die Isoform I1 (auch f), die kein Aktin enthält, ist mit zwei Motorkomplexen (HC) den äußeren Dyneinarmen am ähnlichsten und wird auch als zweiköpfiger Dyneinarm bezeichnet. Dieser Isoform können die Proteine Dynein f α und f β zugeordnet werden. Die anderen sechs Dyneinarme bestehen jeweils aus einer schweren Motordomäne, einer intermediären und einer leichten Kette. Die komplexe Anordnung der inneren Dyneinarme erfolgt innerhalb eines 96 nm Abschnittes, welcher sich entlang des Axonem kontinuierlich wiederholt (Anhang, Abbildung 60).

Strukturstudien in *Chlamydomonas reinhardtii* haben gezeigt, dass das Protein p28 wesentlich am Aufbau der inneren Dyneinarme I2 (a/d), I3 (c) und I5 (a/d) beteiligt ist (Lin et al., 2012; Mizuno et al., 2012; Pigino & Ishikawa, 2012). Die Funktion von p28 zeigte sich durch Mutationsstudien in *Chlamydomonas reinhardtii*. So bewirkt

die Mutation mit Namen *ida4* den Verlust der Isoformen I2 (a/d), I3 (c) und I5 (a/d), in denen p28 als leichte Kette ein essentieller Bestandteil ist (Kamiya et al., 1991; Kagami and Kamiya, 1992). Diese *ida4*-Mutation führt phänotypisch zu einem langsameren Schwimmverhalten und einer ineffizienten Wellenbewegung dieser Grünalgen im Vergleich zur *wt*-Alge (Kamiya et al., 1991; Kamiya, 1995; Pigino & Ishikawa, 2012). Durch Elektroporationen von rekombinantem p28 Protein konnte dieser Motilitätsphänotyp wieder rückgängig gemacht werden (Hayashi et al., 2002). Die Untersuchungen in *Chlamydomonas reinhardtii* zeigen, dass p28 essentiell an der Motilität von Flagellen und Cilien beteiligt ist. Auch das orthologe Protein p33 des Seeiegels zeigte nach eingehender Analyse einen vergleichbaren Motilitätsphänotyp (Gingras et al., 1996). Reaktivierte Spermien ohne Membran zeigten nach Inkubation mit einem Antikörper gegen p33 eine verringerte Beweglichkeit (Gingras et al., 1996). Neben diesem Ortholog des Seeiegels wurde auch das humane Transkript von *hp28* (*Dnali1*) unter anderem in Geweben detektiert, welche Cilia oder Flagellen besitzen (Kastury et al., 1997). Folglich könnte auch das homologe Protein DNALI1 potentiell am Schwimmverhalten von Spermatozoen beteiligt sein und die Motilität beeinflussen. Humanes p28 (*Dnali1*) wurde neben anderen Genen als potentieller Kandidat für primäre ziliäre Dyskinesie (*primary ciliary dyskinesia*), eine Störung der Beweglichkeit von Cilien, beschrieben (Kastury et al., 1997; Morillas & Zariwala & Knowles, 2007).

Die identifizierte Hefe-Interaktion zwischen DNALI1 und FGD2 deutet darauf hin, dass der aktivierende Signalweg, welcher wahrscheinlich über FGD2 und CDC42 (Huber et al., 2008) auf SMOK1 wirkt (Bauer et al., 2007), direkt mit dem Axonem assoziiert ist. In der Hefe wurde neben der Interaktion von DNALI1 und FGD2 keine zusätzliche Wechselwirkung von DNALI1 mit einer weiteren Komponente des TRD-Signalwegs wie zum Beispiel SMOK1 oder einem weiteren *Distorter*-Protein festgestellt. Dennoch wurde dieser *Prey* in den molekularen Analysen auf mRNA- und Protein-Expression im relevanten Gewebe näher untersucht. Das *DNALI1* mRNA-Transkript konnte mit zwei unabhängigen Methoden im Maushodengewebe identifiziert werden. Auch das Protein wurde unter anderem in isolierten Spermatozoen des Epidydimis detektiert. Anders als alle anderen identifizierten *Preys* konnte das Protein DNALI1 entlang des Flagellums zusammen mit TUBULIN kolokalisiert werden (Abbildung 25). Zusätzlich zeigte die Analyse der Verteilung der Proteinsignale im Mittelteil und Hauptteil des Flagellums eine prozentuale Häufung von DNALI1 direkt am Axonem (Abbildung 29). Dieses Ergebnis war zu erwarten, da Rashid und Kollegen DNALI1 bereits im Jahr 2006 als flagelläres Protein in Maus-Spermien cha-

rakterisiert hatten (Rashid et al., 2006). Und wie bereits erwähnt, wurde p28 (DNALI1) auch im Modellorganismus *Chlamydomonas reinhardtii* entlang des Axonems als flagellärer Bestandteil der inneren Dyneinarme identifiziert (LeDizet & Piperno, 1995). In den sich anschließenden Protein-Protein-Interaktionsstudien zur Verifizierung der isolierten Hefe-Wechselwirkungen wurde DNALI1 somit eingeschlossen.

Die Lumineszenz basierte IP Analyse zeigte eine sehr eindeutige Interaktion von DNALI1 mit sich selbst. DNALI1 ist demnach in der Lage Dimere zu bilden (Abbildung 34). Tatsächlich gibt es bereits Hinweise auf eine mögliche Dimerisierung von DNALI1-Molekülen (Yanagisawa & Kamiya, 2001; Rashid et al., 2006), die mit der hier durchgeführten Analyse bestätigt werden konnten. Es wurde vermutet, dass die *Coiled Coil*-Domäne im DNALI1-Protein für die Dimerisierung verantwortlich ist (Rashid et al., 2006).

Neben dieser sehr eindeutigen Dimerisierung von DNALI1 wurden weitere Tendenzen von Interaktionen zwischen DNALI1 und den Proteinen FGD2, AMMECR1 und SPATA22 beobachtet. Diese werden aufgrund der Werte ihrer relativen Bindung mit DNALI1 (zwischen 1,5 und 2) jedoch als unsicher angesehen. Dennoch, durch die positive Tendenz zwischen FGD2 und DNALI1 wurde die Hefe-Interaktion zwischen diesen Proteinen bestärkt.

Ebenfalls interessant sind die nicht eindeutigen Interaktionen zwischen DNALI1 und den *Preys* AMMECR1 und SPATA22 in der Lumineszenz basierte IP Analyse, weil mit dieser Technik gezeigt werden konnte, dass die Moleküle AMMECR1 und SPATA22 auch untereinander eine starke Bindung eingehen können. Beide Komponenten des AMMECR1-SPATA22-Komplexes zeigen positive Tendenzen für eine Interaktion mit dem Bestandteil des inneren Dyneinarms, DNALI1.

In einem nächsten Schritt wurden verschiedene Bindungen mit der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation untersucht. Auch hier konnte die Dimerisierung von DNALI1 beobachtet werden. Zusätzlich wurden die Interaktionen zwischen DNALI1 und FGD2 sowie zwischen DNALI1 und AMMECR1 bestätigt. Neue und bislang nicht identifizierte Interaktionen konnten mit dieser Methode zwischen DNALI1 und den Proteinen AKAP9, NME3 sowie SMOK1 beobachtet werden.

Die Interaktion zwischen DNALI1 und dem *Distorter*-Protein NME3, könnte durch die Bindung von NME3 an AMMECR1 ermöglicht werden und bekräftigt die Vermutung, dass NME3 wahrscheinlich benötigt wird, um GTP für den aktivierenden FGD2-Signalweg zur Verfügung zu stellen, da auch der *Distorter*-FGD2 (aktivierender Zweig) direkt mit DNALI1 wechselwirken kann.

Interessant ist, dass ebenfalls eine Interaktion zwischen AKAP9 und DNALI1 beobachtet werden konnte. Dies könnte bedeuten, dass AKAP9 in der Lage ist als Gerüstprotein für Komponenten des TRD-Signalweges zu fungieren und als Organisationszentrum weitere relevante Moleküle zu binden. Mit der Bindung an DNALI1 ständen AKAP9 selbst und die mit AKAP9 assoziierten *Distorter*-Proteine wie TAGAP1 und TIAM2 in räumlicher Nähe zu axonemalen Strukturen und zu den axonemalen Motorproteinen. Somit wären weitere essentielle Komponenten des TRD-Signalweges nahe dem Axonem lokalisiert.

Die wahrscheinlich bedeutendste Interaktion, die im Rahmen der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation identifiziert wurde, ist jedoch die Wechselwirkung von DNALI1 und der Spermien-Motilitäts-Kinase, SMOK1 (Abbildung 40). Die Tatsache, dass diese Interaktion lediglich in dem nicht stringenten Test der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation beobachtet wurde, deutet auf eine transiente oder schwache Wechselwirkung zwischen den zwei Proteinen hin. Die Möglichkeit wie ein AMMECR1-SPATA22-Komplex die Kinase in die räumliche Nähe des Proteins DNALI1 ans Axonem bringt, wurde im vorangegangenen Abschnitt diskutiert. Dennoch ist nicht geklärt welche Bedeutung diese mögliche Interaktion haben könnte. Die Spermien-Motilitäts-Kinase (SMOK1) ist eine Kinase und in der Lage Substrate zu phosphorylieren. Dieses Potential von SMOK1 wurde 1999 durch Phosphorylierung des Myelin-Basischen Proteins gezeigt (Herrmann et al., 1999). Dies bedeutet, dass SMOK1 potentiell in der Lage ist nicht nur mit den identifizierten *Preys* zu interagieren, sondern diese eventuell auch zu modifizieren, genauer zu phosphorylieren. Dieses Potential spielt für die Interaktion von SMOK1 und DNALI1 eine entscheidende Rolle, da in der Literatur bereits bekannt ist, dass durch Phosphorylierung von Dyneinen die Flagellenbewegung und somit die Spermienmotilität beeinflusst werden kann (Tash, 1989).

DNALI1 bzw. p28 ist als leichte Kette für den strukturellen Zusammenhalt der verschiedenen Dyneine (I2, I3 und I5) essentiell und am Aufbau der inneren Dyneinarme beteiligt (Kamiya et al., 1991; Kagami and Kamiya, 1992; Yanagisawa & Kamiya, 2001). Zusammen mit einer schweren Kette (HC) als Motorregion und zusammen mit Aktin ist DNALI1 ein Bestandteil der inneren Dyneinarme (*light chain*). DNALI1 ist nicht in der Motor- oder Kopffregion lokalisiert und folglich nicht direkt an der Kontaktausbildung zweier Mikrotubuli-Dubletts und deren relative Verschiebung zueinander beteiligt. Dennoch ist vorstellbar, dass die Modifikation bzw. die gezielte Phosphorylierung von DNALI1 durch SMOK1 eine veränderte Beweglich-

keit in den Spermatozoen der Maus zur Folge haben könnte.

Die Analyse der übermäßigen Phosphorylierung von IC138 (*Inner dynein arm I1 intermediate chain IC138*) – ein Bestandteil des inneren Dyneinarms I1 - führte zum Beispiel zu dem Schluss, dass sich durch diese verstärkte Phosphorylierung von IC138 auch die Motilität der Spermien verändert (Habermacher & Sale, 1997; Porter & Sale, 2000; Wirschell et al., 2007). Die gesteigerte Phosphorylierung der Untereinheit IC138 führte zu einer Inaktivierung der gesamten Dynein-ATPase I1, was bedeutet, dass die Bewegung die durch Gegeneinanderverschiebung der Mikrotubulistränge generiert wird, eingeschränkt ist (King & Dutcher, 1997; Porter & Sale, 2000; Smith & Yang, 2004; Wirschell et al., 2007). Diese bewirkt letztlich einen Verlust der Spermienmotilität. Die Phosphorylierung von Substrukturen des inneren Dyneinarms I1 ist also direkt mit der Inhibierung der Dyneinarme und dem Verlust der Motilität verbunden.

In Bezug auf das eben beschriebene Beispiel könnte also auch die Phosphorylierung von DNALI1 durch die Spermien-Motilitäts-Kinase zu einem Aktivitätsverlust der inneren Dyneinarme I2, I3 und I5 führen und somit direkt einen Einfluss auf die Beweglichkeit und die Motilität von Spermatozoen besitzen. Zum jetzigen Zeitpunkt sind für diese Hypothesen keine Untersuchungen speziell für DNALI1 durchgeführt worden und die Phosphorylierung von DNALI1 durch SMOK1 ist eine Vermutung, die auf wissenschaftlichen Ergebnissen bezüglich der Dyneinisoform I1 basieren. Dennoch ist das Potential von SMOK1, das Protein DNALI1 zu phosphorylieren nicht reine Mutmaßung, da in dieser Arbeit erstmals eine Interaktion zwischen SMOK1 und diesem Bestandteil der inneren Dyneinarmen gezeigt werden konnte, wobei die Interaktion wahrscheinlich über eine Komplexbildung mit weiteren Komponenten wie AMMECR1 und SPATA22 ermöglicht wird.

Unterstützt wird die Vermutung, dass SMOK1 durch Phosphorylierung von DNALI1 die Motilität von Spermatozoen herabsetzen könnte durch Untersuchungen und Beobachtungen aus dem Jahre 1993 (Olds-Clarke & Johnson, 1993). Nach Analysen von heterozygoten *t/+*-Mausmännchen konnten zwei Spermienpopulationen in diesen Männchen beobachtet werden, die unterschiedliche Schwimmeigenschaften hinsichtlich der Geschwindigkeit und Linearität zeigten (Olds-Clarke & Johnson, 1993). Eine Population besaß eine geringere Schwimgeschwindigkeit und eine wenig lineare Schwimmbewegung (wahrscheinlich *wt*-Spermien durch *Distorter*-Einfluss) (Olds-Clarke & Johnson, 1993). Die zweite Spermienpopulation war gekennzeichnet durch eine höhere Schwimgeschwindigkeit und eine lineare Schwimmbewegung

(wahrscheinlich *t*-Spermien durch *Distorter*- und *Responder*-Einfluss) (Olds-Clarke & Johnson, 1993).

Diese Beobachtungen von Olds-Clarke und die Beobachtung, dass DNALI1 und SMOK1 *in vitro* wechselwirken können, deutet darauf hin, dass der von Olds-Clarke beobachtete Motilitätsphänotyp zurückzuführen sein könnte auf die gesteigerte Phosphorylierung (Hyperphosphorylierung) von DNALI1 durch die hyperaktivierte Kinase SMOK1. Somit ließe sich das Phänomen, welches zur nicht-mendelschen Vererbung in der Maus führt, auf eine veränderte Phosphorylierung von Dyneinstrukturen durch SMOK1 zurückführen. Diese Hyperphosphorylierung von DNALI1 könnte angelehnt an die Ergebnisse der IC138 Analysen zur Inhibierung der inneren Dyneinarme I2, I3 und I5 und zu einer reduzierten Mikrotubulerverschiebung führen, was phänotypisch eine verringerte oder gestörte Motilität dieser Spermien zur Folge hätte. Der Phänotyp, der sich nach Olds-Clarke's Analysen beobachten lässt, zeigte in einer Spermienpopulation der *t/+*-Männchen eine geringere Schwimmgeschwindigkeit und eine wenig lineare Schwimmbewegung (Olds-Clarke & Johnson, 1993). Ein ähnlicher Phänotyp wurde auch in der *Chlamydomonas reinhardtii* Mutation *ida4* beobachtet. In dieser Mutante kam es nach Verlust von p28 (DNALI1) phänotypisch ebenfalls zu einem langsameren Schwimmverhalten und einer ineffizienter Wellenbewegung (Kamiya et al., 1991; Kamiya, 1995; Pigino & Ishikawa, 2012).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Protein-Protein-Interaktionsstudien (Abbildung 40), die Analysen des I1 Dyneinarms (Habermacher & Sale, 1997; Porter & Sale, 2000; Wirschell et al., 2007), die Beobachtungen von Olds-Clarke (Olds-Clarke & Johnson, 1993) und die Analysen in *Chlamydomonas reinhardtii* (Kamiya et al., 1991; Kamiya, 1995; Pigino & Ishikawa, 2012) darauf hin, dass das Phänomen der nicht-mendelschen Vererbung direkt mit einer Hyperphosphorylierung des DNALI1-Proteins durch SMOK1 zusammenhängen könnte.

6.6 Modell eines RHO-SMOK1-Signalnetzwerkes

Aus den Ergebnissen, die durch diese Arbeit erzielt wurden, konnte ein Modell zur Wirkung von SMOK1 auf Komponenten des Axonems erstellt werden. Die Komponenten des Signalnetzwerkes, welches zur nicht-mendelschen Vererbung in der Maus führt, sind mit hoher Wahrscheinlichkeit über Gerüst- bzw. Strukturproteine entlang der Flagellen von Spermatozoen gebunden und somit direkt am Ort ihrer Wirkung lokalisiert.

AKAP9 stellt hier vornehmlich eine Gerüststruktur der *Fibrous Sheath* dar und bindet alle essentiellen Moleküle, wie die Spermien-Motilitäts-Kinase selbst und die *Distorter*-Proteine TAGAP1, FGD2 und TIAM2. Sowohl über das Gerüstprotein RHPN1 als auch in geringerem Maße über AKAP9 werden die Bestandteile des TRD-Signalweges auch an den *Outer Dense Fibers* gebunden und somit in räumliche Nähe zum Axonem gebracht. Über RHPN1 ist des Weiteren das *Distorter*-Protein TAGAP1 und die GTPase RHOA des TRD-Signalweges ebenfalls an den *Outer Dense Fibers* lokalisiert (Nakamura et al., 1999; Fujita et al., 2000). Diese Moleküle wirken inhibierend auf die SMOK1-Aktivität, wobei die Inhibierung vermutlich direkt über RHOA erfolgt. Ein bislang nicht publiziertes *Distorter*-Protein TIAM2 (persönliche Mitteilung von Y. Charron, H. Bauer und B. G. Herrmann) wirkt über RAC1 entweder direkt oder indirekt auf SMOK1 und erhöht die Aktivität der Kinase. Das *Distorter*-Protein FGD2 ist neben der Bindung an AKAP9 auch an eine Komponente der inneren Dyneinarme (DNALI1) gebunden und wirkt wahrscheinlich über CDC42 indirekt auf SMOK1 um die Kinase zu aktivieren. Die Summe dieser inhibierenden und aktivierenden Prozesse führt schließlich zu einer übermäßigen Aktivierung von SMOK1. Ein weiteres *Distorter*-Protein und ein weiterer Regulator von G-Proteinen ist NME3. NME3 wird innerhalb des gesamten Komplexes wahrscheinlich über AMMECR1 ans Axonem transportiert. Für die direkte Bindung von NME3 ans Axonem spricht zusätzlich die Wechselwirkung von NME3 und DNALI1 in einer der Protein-Protein-Interaktionsstudien. NME3 generiert somit direkt am Axonem das Nukleosidtriphosphat GTP, welches als Aktivator für kleine G-Proteine wie RHOA, RAC1 und CDC42 dient und beeinflusst somit quantitativ die Menge an GTP innerhalb dieser Struktur. Die Spermien-Motilitäts-Kinase ist nach Analysen von Véron an den *Outer Dense Fibers* und an der *Fibrous Sheath* des Flagellums von nicht aktivierten Spermatozoen gebunden (Véron et al., 2009). Die Ergebnisse der Protein-Protein-Interaktionsstudien zeigen, dass *in vitro* auch eine Bindung zwischen SMOK1 und DNALI1 möglich ist. Eine Hypothese, die sich aus den Ergebnis-

sen der hier durchgeführten Untersuchungen ergibt, ist, dass SMOK1 über Bindung an AMMECR1 bzw. über einen AMMECR1-SPATA22-Komplex in die unmittelbare Umgebung von DNALI1 gelangt. Dies könnte durch Protein-Translokation des Komplexes nach Aktivierung der Spermatozoen oder durch flexible Strukturveränderungen von Komplexkomponenten wie AMMECR1 ermöglicht werden. Die hyperaktivierte Kinase wäre somit in räumlicher Nähe der inneren Dyneinarme lokalisiert (DNALI1) und könnte diese phosphorylieren. Die Phosphorylierung von DNALI1, ein Bestandteil der inneren Dyneinarme I2, I3 und I5 könnte zur Deaktivierung der Motorbestandteile dieser Dyneinkomplexe führen. Dies könnte wiederum bedeuten, dass die Motorregionen dieser Dyneine nicht mit den benachbarten Mikrotubuli-Strängen wechselwirken und somit keine Verschiebung dieser Stränge zueinander bewirkt wird. Folglich würde es zur Störung der Beweglichkeit dieser Flagellen kommen.

Durch Anwesenheit des *Responders* im *t*-Komplex, der *Responders* besitzt eine sehr geringe Kinaseaktivität verglichen zu SMOK1 (Herrmann et al., 1999), kommt es in diesen *Responder*-tragenden Spermien zu einer Konkurrenz zwischen SMOK1 und TCR. Im Falle einer Bindung von TCR in diesem Protein-Komplex würde es nicht zur übermäßigen Phosphorylierung des Dyneinbestandteils DNALI1 kommen. Dies hätte dann eine normale Flagellenbewegung und somit eine unveränderte Spermienmotilität zur Folge. Somit würden die *Responder*-tragenden Spermien bevorzugt vererbt werden und die Spermien, die unter SMOK1 Einfluss stehen nicht. Dieses Modell würde folglich bedeuten, dass alle *Preys*, die mit SMOK1 interagiert haben, im Komplex auch mit TCR Wechselwirken müssten. Untersuchungen und Protein-Protein-Interaktionsstudien zwischen den *Preys* und dem *Responder*-Protein könnten hier Aufschluss geben.

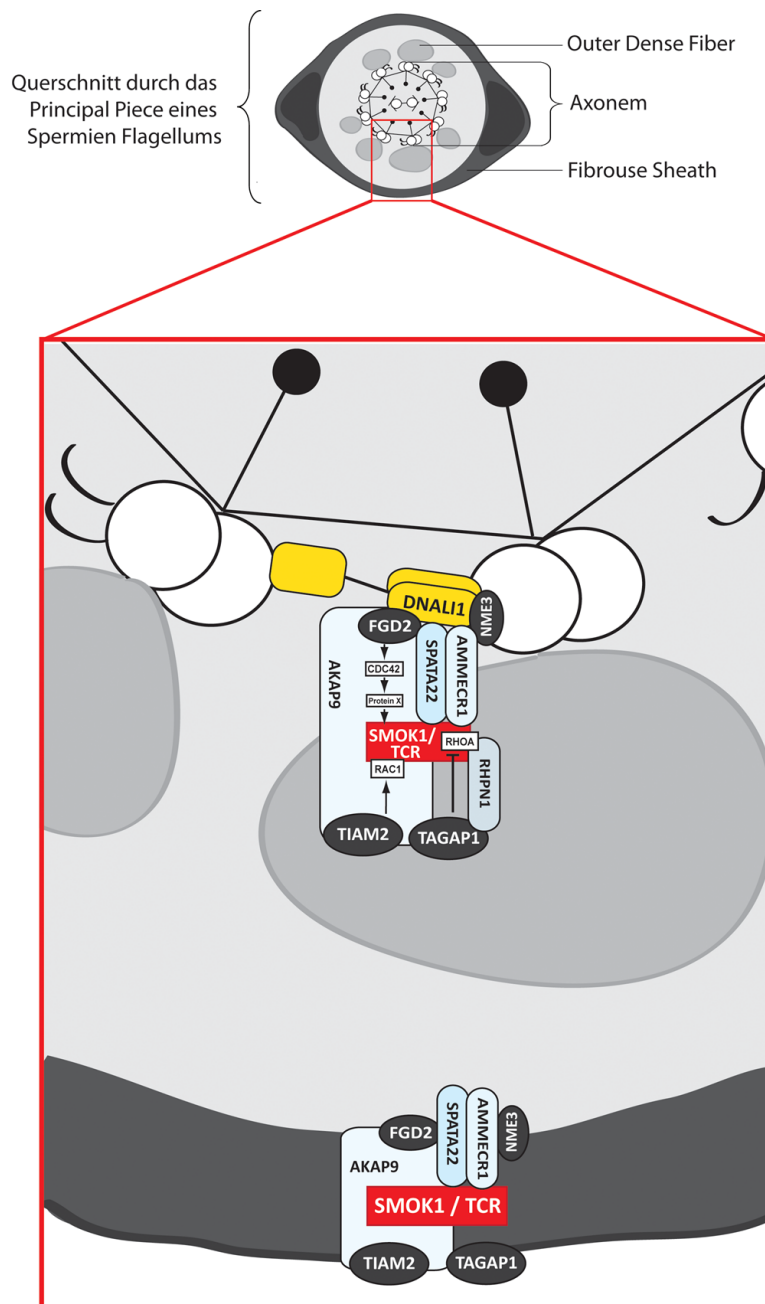


Abbildung 53: Hypothese eines erweiterten SMOK1-RHO-Signalnetzwerkes, basierend auf den Interaktions- und Lokalisationsstudien der neuen SMOK-Interaktionspartner. oben: Schematische Darstellung eines Querschnittes durch das *Principal Piece* eines Spermien Flagellums. unten: Vergrößerung des im Querschnitt angedeuteten Rahmens mit einem möglichen RHO-SMOK1-Signalnetzwerk. SMOK1 wird über AKAPs/AMMECR1 an der *Fibrouse Sheath* gebunden. An den *Outer Dense Fibers* erfolgt die Bindung von SMOK1 vornehmlich über RHPN1, wo auch der inhibierende Zweig des TRD-Signalweges (TAGAP1) lokalisiert ist. Über AMMECR1, als „Brücke“ kann SMOK1 direkt am Axonem, wo auch der aktivierende Zweig des TRD-Signalweges (FGD2) aktiv ist, wirken und DNALI1 phosphorylieren. Dies führt zu einer gestörten Flagellenfunktion in Spermien.

7 Material und Methoden

Übersicht häufig verwendete Abkürzungen

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-T	PBS mit Tween 20
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	TBS mit Tween 20
SSC	Standard Salz-Citrat-Lösung
MABT	Äpfelsäure-Puffer mit Tween-20
NTMT	NaCl, Tris, MgCl, Tween-20
DAPI	4,6-diamino-2-phenylindol
NGS	Normales Ziegenserum
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
TEA	Triethylenamin-Lösung
DIG	Digoxigenin
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
MOPS	3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure
MES	2-(N-Morpholino)Ethansulfonsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
EtOH	Ethanol
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
PFA	Paraformaldehyd
FCS	Fötale Kälberserum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
IVT	In vitro Transkription/Translation
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

7.1 Allgemeine molekularbiologische Arbeiten

7.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Größenauftrennung von DNA- und RNA-Proben wurden erforderliche Konzentrationen zwischen 0,8 und 2 % Agarose (life technologies, Biozym) bei RT in TAE-Puffer suspendiert und in einer Mikrowelle aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Die Agaroselösung wurde anschließend mit Ethidiumbromidlösung (Roth) versetzt und in eine Elektrophoresekammer gegossen. Nach Polymerisierung der Agarose erfolgte die Elektrophorese in TAE-Puffer entsprechend der Größe der Nukleinsäuren nach unterschiedlichen Laufzeiten.

7.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Proben erfolgte im NanoPhotometer (Implen) oder mit dem Qubit 2.0 Fluorometer (life technologies).

7.1.3 Verwendung von Restriktionsendonukleasen

Soweit nicht anders vermerkt, wurden Restriktionsendonukleasen von Promega, New England Biolabs oder Fermentas den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

7.1.4 Gelextraktion und Aufreinigung von DNA

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde das *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) nach Herstellerangaben verwendet. Die Elution der Nukleinsäure erfolgte je nach DNA-Menge in 15 bis 50 µl destilliertem, nuklease-freiem Wasser.

7.1.5 Dephosphorylierung von Vektoren

Vektoren, welche für klassische Klonierungen verwendet wurden, wurden vor der Ligation mit Shrimp-Alkaline-Phosphatase (Fermentas) nach Herstellerangaben behandelt.

7.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligationen von DNA-Fragmenten wurden sowohl *T4 DNA Ligase* (NEB), als auch *Quick DNA Ligase* (NEB) nach Herstellerangaben verwendet. Hierfür wurden etwa 25 ng des entsprechenden Vektors sowie etwa die dreifache molare Menge DNA-Fragment in einen Ligationsansatz von 10 oder 20 µl gegeben. Die Ligation wurde einem langsam ansteigenden Temperaturgradienten ausgesetzt oder eine Stunde bei RT bei *T4 DNA Ligase* bzw. 15 min bei *Quick DNA Ligase* inkubiert.

7.1.7 Transformation von Plasmiden in Bakterien

Für eine chemische Transformation wurden 10 bis 20 µl DNA-Lösung oder Ligationsansatz verwendet. Für eine elektrische Transformation mittels Elektroporator (Bio Rad) wurden 2 bis 5 µl einer DNA-Lösung oder eines Ligationsansatzes eingesetzt, nach Herstellerprotokoll in *E.coli*-Zellen transformiert und auf LB-Platten mit dem zur Selektion benötigten Antibiotikum (Sigma) ausplattiert. Die Inkubation der transformierten Bakterien erfolgte über Nacht bei 37°C.

7.1.8 Blau-Weiß-Untersuchung von Plasmiden in *E.coli*

Für eine Blau-Weiß-Selektion der ligierten Plasmide wurden die LB-Platten mit dem zur Selektion benötigten Antibiotikum mit IPTG- und X-Gal-Lösung (AppliChem) behandelt. Die transformierten Bakterien wurden ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurden nur weiße bzw. zart blaue Bakterienkolonien isoliert und in 2 bis 4 ml Flüssigmedium angeimpft.

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme

Bakterienstamm	Kompetenz
<i>E.coli</i> DH5α	chemisch kompetent
<i>E.coli</i> DH5α	elektrokompetent
<i>E.coli</i> XL10-Gold	chemisch kompetent

7.1.9 Isolation von Plasmid aus Bakterienkultur

Zwischen 2 und 4 ml Bakterienkultur wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß pelletiert und in Puffer-P1 (Qiagen) suspendiert. Die alkalische Lyse der Bakterien erfolgte mit Puffer-P2 (Qiagen) für wenige Minuten bei RT. Die Lysereaktion wurde durch Zugabe von Puffer-P3 (Qiagen) neutralisiert. Das entstandene Präzipitat konnte durch Zentrifugation vom Überstand abgetrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Durch Fällung des Überstandes mit 0,7 Volumeneinheiten Isopropanol (Merck) und einem anschließenden Waschschrift mit Ethanol (Merck) konnte die Plasmid-DNA präzipitiert werden. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und anschließend in zweifach destilliertem Wasser suspendiert. Die Isolierte Plasmid-DNA konnte nun mittels Restriktionsendonukleasen, Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Sequenzierung auf Richtigkeit überprüft werden.

7.1.10 Präparation von Plasmid für Zellkultur

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen erfolgte für Zellkulturexperimente mit dem *Qiagen Plasmid Midi oder Mini Kit* oder mit dem *GenElute HP Plasmid Midiprep Kit* von Sigma nach Herstellerangaben.

7.1.11 Polymerase-Kettenreaktion

Für alle Polymerase-Kettenreaktionen (PCRs) wurde der *Mastercycler* (Eppendorf) verwendet. Falls nicht anderes erwähnt, wurde die anfängliche Dissoziation doppelsträngiger DNA bei 95°C für 3 min durchgeführt. Jeder Zyklus beginnt mit 15 sec 95°C, gefolgt von 5 bis 15 sec Anlagerungszeit (abhängig von der Polymerase) bei einer vom Primerpaar abhängigen individuellen Temperatur. Anschließend erfolgte die Elongation der DNA bei 72°C je nach verwendeter Polymerase und Länge des DNA-Fragments. Die Zahl der Zyklen lag zwischen 30 und 38. Abschließend wurden die Proben 5 min bei 72°C gehalten.

7.1.12 Sequenzierung von DNA-Proben

Die Sequenzierung der DNA-Proben oder Plasmid-Präparationen wurde in einem externen Labor der Firma Eurofins MWG Operon oder von AGOWA durchgeführt.

7.2 Herstellung von Vektoren

Tabelle 3: Übersicht der verwendete Plasmide

Plasmid	Herkunft	Bemerkung
pENTR/D-TOPO	life technologies	Gateway-System TOPO-Klonierung
14-pACT4-DM	Dr. Ulrich Stelzl	Gateway-System
pBTM 116 D9	Dr. Ulrich Stelzl	Gateway-System
06-pcDNA3.1-PA-D57	Dr. Ulrich Stelzl	Gateway-System
16-pFire-V5-DM	Dr. Ulrich Stelzl	Gateway-System
55-pVEN-F2C	Dr. Ulrich Stelzl	Gateway-System
56-pVEN-F1N	Dr. Ulrich Stelzl	Gateway-System
57-pVEN-F2N	Dr. Ulrich Stelzl	Gateway-System
58-pVEN-F1C	Dr. Ulrich Stelzl	Gateway-System
pDEST-475-V5 (N)	pDEST-474 (Dr. Phillip Grote)	Gateway-System
pDEST-475-MYC (N)	pDEST-474 (Dr. Phillip Grote)	Gateway-System
pEF6-V5/His-TOPO (C)	life technologies	TOPO-Klonierung
pEF6-V5/His (N)	Modifikation pEF6-V5/His (C)	klassische Klonierung

7.2.1 Herstellung von ENTRY-Vektoren

Tabelle 4: Übersicht der verwendete Primer für Smok1 Konstrukte

Gen	Primername	Primersequenz
Smok1	Smok1 FL s	caccGAAAATTTTCATGCTC
	Smok1 FL as	ttaTTTTTTTGGGGAGACTC
	Smok1 katD s	caccTACGTGATGCTAGAGA
	Smok1 katD as	tcaGACCCAGGGATGCACCA
	Smok1 Δ C-katD as	tcaCATAATATTGTCAGGTT
	Smok1 Δ N-katD s	caccGTAGAAAAAGATGGAA
	Smok1 regD s	caccACAGAAGGCTCAGGGG
	Smok1 UBA/regD as	tcaTTTTTTCAGTAGACAAT
	Smok1 Δ C-regD+PKA as	tcaCGTGGGTTTCAGTCTCTC
	Smok1 Δ N-regD+PKA s	ccacTTCCCTTCCCTTGTTG
	Smok1 Δ N-regD s	caccACGAGTCTCAGATTAT
	Smok1 regD-C-term	caccATGTTTTGCACAATAC

Tabelle 5: Übersicht der verwendete Primer für die *Distorter* Konstrukte

Gen	Primernamen	Primersequenz
Nme3	Nme3 FL s	caccATGATCTGTCTGGTGCTGACC
	Nme3 FL as	ctaCTCATATAGCCAATGTCCG
Fgd2	FGD2 N-term s	caccGAGCGAGCCTGTGAGAA
	Fgd2 N-term as	tcaGCTGACCCCAGGCTGACA
	Fgd2 Iso2 s	caccTACAGCGAGTACGTGAA
	Fgd2 Iso2 as	tcaGTCAGACACATCTTCTTC
	Fgd2 PH/FYVE/PH s	caccACCCTGCTCCGAGAGGG
	Fgd2 Δ C as	tcaAGTGAGAAATGTGTAGC
	Fgd2 N-term/DHPH as	tcaCTGGTCAATGGCTGCCT
	Fgd2 DHPH/FYVE s	caccTGTCAGCCTGGGGTCAGC
	Fgd2 FYVE s	caccGACAAGATGGTGACCAT
Tagap1	Tagap1 FL s	caccGAGACATTAATTGAATG
	Tagap1 FL as	tcaAATGTAGGATTCTCTAG
	Tagap1 RhoGAP s	caccCAACCCTTGTCGATCA
	Tagap1 RhoGAP as	tcaCCCAAATATCTCAAAGCA
	Tagap1 N-term as	tcaTTGGTCAAACAGCGACAC
	Tagap1 SH3 s	ccacGCTTTCTCCAGATCCT
	Tagap1 t1 as	tcaATTCTTTATTTTCAAATC
	Tagap1 short s	caccGAATTCCTCATTGACA
	Tagap1 N-term as	tcaTTGGTCAAACAGCGACAC
	Tagap1 21bp Del s	caccAAGCTAACAAGGAGTG
	Tagap1 21bp Del as	tcaTGCTGGGAAGACTTCCT
Tiam2	Tiam2 FL s	caccGGGAACTCCGAGAGTCAATAT
	Tiam2 FL as	tcaTGATTTGCCATGGCTCTGT
	Tiam2 short s	caccATGGAAGCACCAACAGAGA
	Tiam2 short as	tcaTGATTTGCCATGGCTCTGTG
	Tiam2 Δ N s	caccCTCGAAATGAGCAGGAGCAACAC
	Tiam2 Δ PHn/TSS s	caccGACCTGCATCTGTATGGCTCCGC
	Tiam2 PHn/TSS as	tcaTCTCTTCTCCCTCCCCTTTCTTG
	Tiam2 DH s	caccCTCCGGAAAGTCATCCAGGA
	Tiam2 DH as	tcaAACCAGTATGACAGCTCTCTTA
	Tiam2 TSS s	caccTTTGCAAAAAGCACGGAAAGGA
	Tiam2 TSS as	tcaTCTGGAACACACCAGAGCATGGA
	Tiam2 Δ DH/PHc s	caccATGGGAACTCCGAGAGTCAATA
	Tiam2 Δ DH/PHc as	tcaCTTTTCCCTGTGGGGCACTTGAT
	Tiam2 PHn as	tcaTGCACACGCCGAGTGGATG
	Tiam2 PHc s	caccGAGCTGTCCATGGGGGAACTTCT

Die zu erzeugenden Gene und Genfragmente wurden mittels PCR-Reaktion mit einem CACC-Überhang am 5' Sequenzende amplifiziert. Zur Größenkontrolle wurden sie in einem Agarosegel von unspezifischen Nebenprodukten getrennt und mit

dem *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* aufgereinigt. Die gereinigten PCR-Produkte konnten nun direkt in einer direktionalen Reaktion in den pENTR/D-TOPO Vektor von *life technologies* kloniert werden. Die Reaktion wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Als Matrize für die DNA-Fragmente standen sequenzverifizierte Plasmide mit den jeweiligen cDNAs zur Verfügung. Die Reaktionen wurden für 5 bis 30 min bei RT inkubiert, in chemisch kompetente *E.coli*-Zellen transformiert und auf LB-Medium mit Antibiotikum ausplattiert. Am Folgetag konnten Einzelkolonien isoliert und in flüssigem Medium angeimpft werden. Nach Anwachsen der Kolonie wurde die Plasmid-DNA isoliert und anschließend mittels Restriktionsendonukleasen auf Richtigkeit überprüft. Die Validierung der Sequenzen erfolgte extern durch Eurofins MWG Operon. Die Konstrukte FGD2 FL, FGD2 FLt, FGD2 Δ N und FGD2 DHPH wurden von Dr. Sigrid Scharper hergestellt und lagen bereits im pDONR221-Vektor sequenzverifiziert vor. Von Dr. Yves Charron wurden die TIAM2 Konstrukte im pENTR/D-TOPO Vektor hergestellt und verifiziert.

7.2.2 Herstellung von Destinationsvektoren

Für die Erzeugung von Expressionsvektoren wurde eine Austauschreaktion zwischen dem gewünschten ENTRY Vektor und einem aufnahmefähigen Destinationsvektor entsprechend den Herstellerangaben mit dem *Gateway LR Clonase II Enzymmix* (*life technologies*) durchgeführt. Die Reaktionen wurden für mehrere Stunden oder über Nacht bei RT inkubiert, in chemisch kompetente *E.coli*-Zellen transformiert und auf LB-Medium mit Antibiotikum ausplattiert. Am Folgetag konnten Einzelkolonien isoliert und als Flüssigkultur angeimpft werden. Nach Anwachsen der Bakterien wurde die Plasmid-DNA isoliert und anschließend mittels Restriktionsendonukleasen auf Richtigkeit überprüft.

7.2.3 Expressionsvektoren für SMOK1

Für die Expression von SMOK1-Protein in Säugerzellen oder für die Herstellung von rekombinantem Protein mit dem *TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System* (Promega) wurden die Plasmide pEF-His/V5 (N) und pEF-His/V5 (C) (*life technologies*) verwendet. Diese Expressionsplasmide tragen einen konstitutiven moderaten EF1 α Promotor (Human elongation factor-1 alpha), sowie einen Ampicillin Marker und eine Blasticidin Resistenzkassette zur Selektion in Bakterien bzw. Zellkulturen. Beide Plasmide unterscheiden sich in der Position der beiden Epitop-

sequenzen 6xHis und V5 relativ zum Expressionsprodukt. Im Vektor pEF-His/V5 (N) sind die Epitopsequenzen an den N-Terminus, im Vektor pEF-His/V5 (C) an den C-Terminus des zu exprimierenden Proteins fusioniert. Die Bezeichnung *DNA* stellt eine beliebige zu exprimierende DNA dar (hier SMOK1). Das DNA-Fragment, welches für die Herstellung von Protein verwendet werden soll, wurde durch PCR erzeugt, in den pBSKS-Vektor subkloniert und nach Fragmentisolation und anschließender Aufreinigung in einen der pEF-Vektoren ligiert. Dabei wurden für die Klonierungen in den pEF-His/V5 (N) Vektor Primer gewählt, welche 5' BamHI und 3' NotI Überhangsequenzen besitzen (Abb. 54). Für die Klonierungen in den pEF-His/V5 (C) Vektor stand nicht der TOPO-Vektor, sondern ein Ausgangsvektor mit einer *DNA* zur Verfügung. Hier wurden 5' KpnI und 3' NotI Überhangsequenzen für die Klonierung verwendet (Abb. 54).

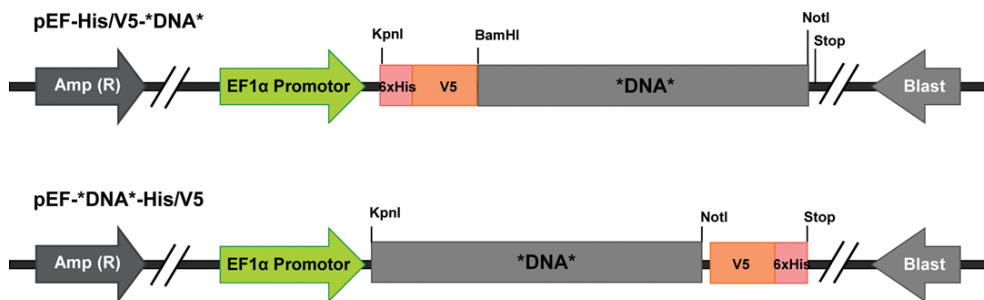


Abbildung 54: Schematische Darstellung der pEF-His/V5 (N) und pEF-His/V5 (C) Vektoren. Wichtige Elemente dieser Expressionsplamide sind die Ampicillin- und Blastocidin-Resistenzkassetten, der EF1 α Promotor, sowie die 6xHis und V5 Epitopsequenzen relativ zur exprimierenden *DNA*. Dargestellt sind zusätzlich die verwendeten Restriktionsendonukleasen.

7.2.4 Erzeugung von Expressionsvektoren für RAC1, CDC42 und RHOA

Die wt DNA-Sequenzen der kleinen RHO-GTPasen RAC1, CDC42 und RHOA wurden in den pGEX-Vektor *in-frame* mit einer GST-Epitopsequenz kloniert und anschließend auf Richtigkeit überprüft. Diese Plasmide wurden von Dr. Sigrid Scharper hergestellt und standen zur Proteinexpression in *E.coli* zur Verfügung.

7.3 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

Alle Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*, die im Zuge dieser Arbeit durchgeführt wurden, erfolgten in Kooperation mit Dr. Ulrich Stelzl, Dr. Josephine Wörseck und Dr. Mareike Weimann in den Otto-Warburg-Laboratorien am MPI für molekulare Genetik (Wörseck et al., 2012; Weimann, 2012). Die für diese Versuche verwendeten Medien und Lösungen (Tabelle 6) wurden nach der Herstellung durch Autoklavieren von jeglichen Keimen befreit. Für die Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae* wurden folgende Hefe-Stämme verwendet (Goehler et al., 2004).

L40ccU: MATa (für *Bait*-Plasmide)

MATa his3 Δ 200 trp1-901 leu2-3,112 LYS2::(lexAop)₄-HIS3 ura3::(lexAop)₈-lacZ
ADE2::(lexAop)₈-URA3 GAL4 gal 80 can 1 cyh 2

L40cc: MAT α (für *Prey*-Plasmide)

MAT α his3 Δ 200 trp1-910 leu2-3,112 ade2 LYS2::(lexAop)₄-HIS3 URA3::(lexAop)₈-
lacZ GAL4 gal 80 can1 cyh2

L40ccU MATa und L40cc MAT α sind auxotroph für Leucin (leu2-3,112) und Tryptophan (trp1-901). In L40cc MAT α Hefen ist das ADE2 Gen deletiert.

Die Herstellung der entsprechenden Medien wird im folgenden beschrieben. Die Medien werden benannt nach den Aminosäuren/Nukleosiden, die dem Medium nicht zugeführt sind und nach denen, die verwendet wurden. Die Aminosäuren/Nukleosiden werden wie folgt abgekürzt „H“ für Histidin, „A“ für Adenin, „U“ für Uracil, „L“ für Leucin und „T“ für Tryptophan. Anabolite, welche nicht verwendet wurden sind mit einem Minus (-) versehen und durch einen Schrägstrich (/) von den verwendeten Aminosäuren/Nukleosiden getrennt. Die Reihenfolge beider Seiten des Schrägstrichs ist immer HAULT.

Tabelle 6: Medien und Lösungen für Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

Medium	Zusammensetzung	
1,25x YPD Flüssigmedium	5 g Hefeextrakt, Bacto 10 g Pepton, Bacto ad 400 ml H ₂ O	
1,25x YPD Agar	5 g Hefeextrakt, Bacto 10 g Pepton, Bacto 10 g Agar, Bacto ad 400 ml H ₂ O	
2,5x Hefemedium fl. (NB)	6,7 g Hefe-Stickstoffbase ad 400 ml H ₂ O	
1,25x Hefemedium fl. (NB)	3,35 g Stickstoffbase ad 400 ml H ₂ O	
1,25x Lagermedium (NBG)	3,35 g Hefe-Stickstoffbase 250 ml Glycerin (99 %) 29,44 g Betain ad 400 ml H ₂ O	
2,5x Agar	10 g Agar, Bacto ad 200 ml H ₂ O	
20x Glukose-Lösung	200 g Glukosemonohydrat ad 500 ml H ₂ O	
100x Aminosäure/Nukleosid Lsg.		
100x Leucin	10 g/l Leucin	final 100 mg/l Leucin
100x Histidin	2 g/l Histidin	final 20 mg/l Histidin
100x Adenin	2 g/l Adenin	final 20 mg/l Adenin
100x Uracil	2 g/l Uracil	final 20 mg/l Uracil
100x Tryptophan	2 g/l Tryptophan	final 20 mg/l Tryptophan

1. Flüssigmedium

Für die Herstellung von 500 ml Flüssigmedium wurden 25 ml einer 20x Glukose-Lösung, 5 ml der jeweils notwendigen 100x Aminosäure/Nukleosid Lösung zu 400 ml 1,25 x flüssiges Hefemedium (NB) oder 1,25x Lagermedium (NBG) gegeben und auf 500 ml mit sterilem Wasser aufgefüllt.

2. Agar für Hefe-Platten

Für die Herstellung von 500 ml Agar für Hefe-Platten wurden 25 ml der 20x Glukose-Lösung, 5 ml der jeweils notwendigen 100x Aminosäure/Nukleosid Lösung, 200 ml vom 2,5x flüssiges Hefemedium (NB) und 200 ml des 2,5x Agars vermischt und auf 500 ml mit sterilem Wasser aufgefüllt, in der Mikrowelle geschmolzen, auf ca. 60°C abgekühlt und unter sterilen Bedingungen in die Platten verteilt.

3. YPD Flüssigmedium

Für die Herstellung von 500 ml YPD Flüssigmedium wurden 25 ml einer 20x Glukose-Lösung, 5 ml der jeweils notwendigen 100x Aminosäure/Nukleosid Lösung und 400 ml 1,25x YPD Flüssigmedium vermischt und auf 500 ml mit sterilem Wasser aufgefüllt.

4. YPD Agar

Für die Herstellung von 500 ml YPD Agar wurden 25 ml der 20x Glukose-Lösung, 5 ml der jeweils notwendigen 100x Aminosäure/Nukleosid Lösung und 400 ml 1,25x YPD Agar vermischt, auf 500 ml mit sterilem Wasser aufgefüllt, in der Mikrowelle geschmolzen, auf ca. 60°C abgekühlt und unter sterilen Bedingungen in die Platten verteilt.

7.3.1 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Für die durchgeführten Experiment mit *Saccharomyces cerevisiae* war es notwendig die Hefe sowohl in flüssigem, als auch auf festem Medium (Agar) zu kultivieren. *Saccharomyces cerevisiae* kann dabei direkt vom flüssigen zu festem Medium, vom festen zum flüssigen Medium und von flüssigen zu flüssigen Medium transferiert werden. Eine direkte Übertragung vom festen zum festen Medium ist nicht möglich. Hier wird die Hefe vom festen zum flüssigen und dann wieder zum festen Medium übertragen, um ein besseres Wachstum zu gewährleisten und um ein Verklumpen der Hefe zu unterbinden. Dies hat eine bessere Selektion der Hefe zur Folge.

Um zum Beispiel flüssige Hefe-Kulturen zu generieren wurde die notwendige Menge an flüssigem Medium mit einer Hefe-Kolonie beimpft und anschließend gut durchmischt. Die Hefen wurden für 16 bis 20 h bei 250 rpm und einer Temperatur von 30°C schüttelnd inkubiert. Für die Kultivierung auf Hefe-Platten können gut durchmischte flüssige Hefe-Kulturen entweder ausgestrichen (Impföse), getropft (Pipette) oder gestempelt (Nadelstempel) werden. Anschließend werden die Hefe-Platten in Klarsichtfolie verpackt und bei 30°C für 2 bis 7 d inkubiert.

Abhängig von der gewünschten Lagerung wurden entweder *Glycerol-Stocks* der Hefen in NBG Lagermedium angelegt und bei -80°C langfristig eingefroren oder für eine kurzzeitige Lagerung auf Hefe-Platten ausgestrichen, bei 30°C für wenige Tage inkubiert und schließlich bei 4°C gelagert. *Glycerol-Stocks* dürfen nur maximal zweimal aufgetaut werden. Gelagerte Hefen müssen vor Verwendung auf Hefe-Platten repliziert werden, bevor eine Hefe-Zwei-Hybrid Analyse durchgeführt wird.

Nicht transformierte Hefen werden dabei auf YDP Agar oder in YDP Flüssigme-

dium kultiviert und transformierte Hefen werden in bzw. auf den entsprechenden Selektionsmedien kultiviert.

7.3.2 Expressionsvektoren für das Hefe-Zwei-Hybrid System

Für die Hefe-Zwei-Hybrid Analyse wurden *Gateway*-kompatible Hefe-Vektoren verwendet (Goehler et al., 2004). Der pBTM 116 D9 Vektor beinhaltet eine N-Terminale DNA bindende Domäne (LexA Domäne) und ist ein Derivat des Clontech-Vektors pBTM 116. Das Plasmid 14-pACT4-DM beinhaltet eine N-Terminale Aktivierungsdomäne (GAL4 Domäne) und basiert auf dem Clontech-Vektor pACT2. Diese Vektoren besitzen einen bakteriellen Replikationsursprung, einen Resistenzmarker und jeweils den verkürzten ADH1 Promotor (Abbildung 55). Zu untersuchende *Bait*-DNA-Sequenzen wurden in den pBTM 116 D9 Vektor kloniert, welcher durch die Anwesenheit eines Tryptophan Selektionsmarkers (TRP1) eine Selektion nach erfolgreicher Hefe-Transformation gewährleistet. Die zu untersuchenden *Prey*-DNA-Sequenzen wurden entsprechenden in das Plasmid 14-pACT4-DM kloniert, welches durch die Anwesenheit eines Leucin Markers (LEU2) die Selektion der erfolgreich transformierten Hefen erlaubt. Die verwendeten *Bait*-Sequenzen schließen entsprechend der Verwendung einer N-Terminalen Epitopsequenz (LexA Domäne) alle mit einem Stop-Codon ab. Für die *Preys* (Bibliothek von ~ 17000 humanen Volle-Länge-ORFs) kamen Sequenzen mit und ohne Stop-Codon zum Einsatz. Für die Fälle, der *Preys* ohne Stop-Codon beinhaltet der Vektor 14-pACT4-DM direkt nach der attB2 Sequenz ein Stop und verhindert somit die weitere Translation.

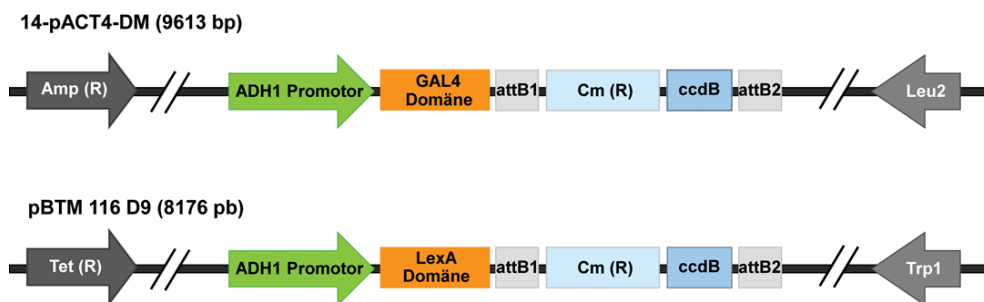


Abbildung 55: Verwendete Hefe-Expressionsvektoren. Amp(R)/Tet(R)/Cm(R): Selektionskassetten; Leu2/Trp1: Hefeselektionskassetten; ADH1: Hefepromotor des Adh1 Gens; GAL4-Domäne: Aktivierungsdomäne, LexA-Domäne: DNA-binde Domäne; attB1/attB2: Rekombinationsstellen; ccdB: *ccdB*-Gen.

7.3.3 Transformation von Plasmiden in *Saccharomyces cerevisiae*

Tabelle 7: Lösungen für die Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Lösung	Zusammensetzung
10x Tris/EDTA Puffer pH 7,5 (10 x TE)	100 mM Tris pH 7,5 10 mM EDTA pH 8,0
<i>Carrier</i> DNA	5 mg <i>Salmon sperm DNA</i> 1 ml 1x TE
Mix 1	1 ml einer LiOAc (1 M) 0,5 ml TE (10x) 5 ml Sorbitol (2 M) ad 10 ml H ₂ O
Mix 2	6 ml einer LiOAc (1 M) 6 ml TE (10x) 40 ml PEG 3350 (60 %) ad 60 ml H ₂ O

Haploide MAT α Hefen wurden mit den *Bait*-Plasmiden und halpoide MAT α Hefen mit den *Prey*-Plasmiden transformiert. Die Transformation erfolgte für die *Preys* und *Baits* jeweils im 96 *Well* Format.

Für die Selektion von transformierten Hefen mit *Bait*-Plasmiden, welche TRP1 als Selektionsmarker im Vektor besitzen, wurde -AT/HUL Medium verwendet. Für die Selektion von transformierten *Prey*-Hefen, welche LEU2 als Marker im Vektor besitzen wird -L/HAUT verwendet. Bei dem Hefe-Stamm L40cc musste Adenin zusätzlich zum Medium zugeführt werden. Des Weiteren werden neben den *Bait*- und *Prey*-Vektoren auch das leer *Prey*-Plasmid transformiert, da dieses für den Autoaktivierungsversuch der *Bait*-Hefen benötigt wurde.

Tabelle 8: Zusammenfassung für *Preys* und *Baits*

<i>Bait</i>	<i>Prey</i>
Vektor: pBTM 116 D9 Derivat des Clontech Vektors pBTM 116	Vektor: 14-pACT4-DM Derivat des Clontech Vektors pACT2
Epitop: N-Terminale DNA bindende Domäne → LexA Domäne	Epitop: N-Terminale Aktivierungsdomäne → GAL4 Domäne
Hefestamm: L40ccU MATa	Hefestamm: L40cc MATα
Auxothrophie: LEU2; Leucin (leu2-3,112) TRP1; Tryptophan (trp1-901)	Auxothrophie: LEU2; Leucin (leu2-3,112) TRP1; Tryptophan (trp1-901)
Deletion: -	Deletion: ADE2 Gen deletiert
Selektionsmarker: pBTM 116 D9 mit TRP1 Marker	Selektionsmarker: 14-pACT4-DM mit LEU2 Marker
Selektionsmedium: -TA/HUL	Selektionsmedium: -L/HAUT
Erklärung: Tryptophan nicht im Medium enthalten Adenin nicht im Medium enthalten Histidin im Medium enthalten Uracil im Medium enthalten Leucin im Medium enthalten	Erklärung: Leucin nicht im Medium enthalten Histidin im Medium enthalten Adenin im Medium enthalten Uracil im Medium enthalten Tryptophan im Medium enthalten

Für die Transformation wurde jeweils ein Ansatz flüssiges YPD Medium mit den L40ccU MATa-Hefen und ein Ansatz mit den L40cc MATα-Hefen beimpft und gut durchmischt. Die verwendeten Hefe mussten zuvor jeweils auf YDP Agarplatte gewachsen sein. Im Anschluss wurden die Hefen für 15 bis 18 h bei 30°C schüttelnd inkubiert. Ausgehend von diesen Übernachtkulturen wird am nächsten Tag erneut flüssiges YPD Medium beimpft, wobei die verdünnten Kulturen anfänglich eine OD₆₀₀ von 0,1 bis 0,15 besitzen sollte. Diese Kulturen werden dann ebenfalls bei 30°C bis zur einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 schüttelnd inkubiert.

Parallel werden die DNA-Plasmide (*Preys* und *Baits*) in 96 *Well*-Platten vorgelegt (5 µl), kurz zentrifugiert und mit *Carrier*-DNA (5 µl) versetzt. Sobald die Hefekulturen die gewünschte OD₆₀₀ erreicht haben, werden sie pelletiert (805x g für 5 min) und einmal mit 1x TE gewaschen, erneut pelletiert und in Mix 1 suspendiert.

Zu jedem *Well* Plasmid- und *Carrier*-DNA werden jetzt 11 μ l Hefe-Mix 1 gegeben und durchmischt. Im Anschluss werden 58 μ l Mix 2 dazu gegeben. Es folgte eine Inkubation von 30 min bei 30°C. Nach Zugabe von 8 μ l DMSO werden die Platten verschlossen und 1 min durchmischt. Es folgt eine erneute Inkubation der Platten bei 42°C für 7 min. Die *Baits* und *Preys* können nun auf die entsprechenden Selektionsplatten -TA/HUL und -L/HAUT gestempelt werden. Alternativ kann auch mit einer Pipette oder mit einem Pipettier-Roboter gearbeitet werden. Beim Ausplattieren der transformierten Hefen werden vier Replikate auf vier verschiedenen Selektionsplatten hergestellt. Nach kurzem Trocknen der ausplattierten Hefe werden die Platten verschlossen und bei 30°C für 3 Tage inkubiert.

Kolonien die nach der Transformation mit *Bait*- bzw. *Prey*-Vektoren erhalten wurden, mussten mindestens einmal vom festen zum flüssigen und dann wieder zum festen Medium übertragen werden (fest-flüssig-fest), bevor der Autoaktivierungstest durchgeführt werden konnte. Die Flüssigkultur wurde dabei in Lagermedium (NBG) angesetzt, was die Möglichkeit bietet den verbleibenden Rest dieser Kultur bei -80°C zu lagern.

7.3.4 Autoaktivierungstest

Autoaktive *Baits* induzieren eine konstitutive Aktivierung der Reportergene auch ohne die Anwesenheit eines positiv interagierenden Gal4-*Prey*-Proteins und müssen aus dem *Screen* eliminiert werden, weil diese *Baits* falsch-positive Interaktionen generieren. Besonders in dem hier verwendeten *Pooled-Screen* würden somit echte Interaktionen anderer *Baits* überdeckt.

Alle vier hergestellten Replikate (transformierte *Bait*-Platten) wurden zu diesem Zweck jeweils mit dem Hefestamm verpaart, der mit dem leeren *Prey*-Plasmid transformiert wurde. Die verpaarten Hefen wurden im Anschluss auf -HAULT Medium gestempelt. *Baits*, die unter diesen Bedingungen ein Wachstum zeigten, wurden nicht für die Hefe-Zwei-Hybrid Analyse verwendet.

Für die Verpaarung wurde der Hefestamm, der das leere *Prey*-Plasmid beinhaltet, in -L/HAUT Medium einen Tag vor dem Autoaktivierungstest angeimpft und bei 30°C ca. 16 bis 20 h geschüttelt. 100 μ l dieser *Prey*-Hefen wurden in jede Vertiefung einer 96 *Well*-Platte verteilt und mit den *Bait*-Hefen, die zuvor frisch auf Selektionsagar gewachsen waren, beimpft. Diese *Bait-Prey*-Hefemixtur konnte dann direkt im Anschluss auf YPD Agar gestempelt und für ca 2 Tage bei 30°C inkubiert werden. Gewachsene Hefekolonien wurden dann in -ALT/HU Flüssigmedium suspendiert und auf -ALT/HU Agarplatten gestempelt (fest-flüssig-fest), um für diploide *Bait-Prey*-

Hefen zu selektionieren. Nach vier Tagen Wachstum bei 30°C wurden die Hefen auf –HAULT Agarplatten übertragen (fest-flüssig-fest über –ALT/HU Flüssigmedium), weitere fünf Tage bei 30°C inkubiert und somit auf Reporterogenaktivität überprüft. Hefen die hier nicht auf –ALT/HU Agarplatten gewachsen sind, wurden ebenso aus dem Test entfernt wie die Hefen, die auf –HAULT Agarplatten ein Wachstum zeigten.

7.3.5 Analyse mit dem Hefe-Zwei-Hybrid System

Für die Hefe-Zwei-Hybrid Analyse wurden die *Baits* nicht einzeln gegen eine zuvor erstellte *Prey*-Matrix getestet (*Array-Screen*), wodurch die Identifizierung der interagierenden *Preys* über die Plattenposition ermöglicht wird (Worseck et al., 2012). Die für dieser Arbeit durchgeführte Hefe-Zwei-Hybrid Analyse basiert auf einem *Pooled-Screen* mit anschließender Sequenzanalyse der *Preys* mittels *Next generation sequencing*. Eine detaillierte Beschreibung dieser Hefe-Zwei-Hybrid Methode findet sich in der Dissertation von Dr. Mareike Weimann (Weimann, 2012). Kurz und zusammenfassend dargestellt, wurden alle *Baits* in den Hefestamm L40ccU MAT α und alle *Preys* in den Stamm L40cc MAT α transformiert und separat herangezogen. Alle *Baits* und *Preys* sind für diesen Test somit einzeln gewachsen und wurden erst im Anschluss zu einem *Bait-Pool* bzw. einem *Prey-Pool* vereinigt. Ein geringes Volumen des hochkonzentrierten *Bait-Pools* wurde dann mit einem geringen Volumen des hochkonzentrierten *Prey-Pools* (~ 17000 humane Volle-Länge-ORFs) verpaart (*mating*). Dieser *Bait-Prey-Mix* wurde in eine Mikrotiterplatte überführt und anschließend vollständig auf YDP Agarplatten ausplattiert. Die diploiden Hefen (*Bait-Prey-Hefen*) konnten dann auf –HAULT Agarplatten ausplattiert und auf Reporteraktivität untersucht werden. Alle gewachsenen Hefekolonien wurden im Anschluss isoliert. Zur Identifizierung der *Preys* wurde von allen gewachsenen Hefe-Kolonien die Plasmid-DNA isoliert, das *Prey-Insert* mit den Oligonukleotiden pACT-5p: CCAAAGCTTCTGAATAAGCC & pACT-3p: AATTAATTCCCGAGCCTCCA amplifiziert und schließlich mit Hilfe der Hochdurchsatzsequenzierung (*Next generation sequencing*) in einem Solexa HighSeq2000 identifiziert.

7.3.6 Wiederholungstest

Nach der eigentlichen Hefe-Zwei-Hybrid Analyse wurde ein Wiederholungsversuch durchgeführt um die Interaktionen der *Preys* zu verifizieren (Worseck et al., 2012; Weimann, 2012). Kurz und zusammenfassend dargestellt, wurden für den Wiederho-

lungstest die zu testenden *Baits* in einer Matrix angeordnet und mit den einzelnen *Preys* verpaart. Die in der Sequenzierung identifizierten *Preys* konnten ausgehend von der cDNA-Bibliothek isoliert, angeimpft und schließlich mit der generierte *Bait*-Matrix verpaart werden (*mating*). Die Verpaarten Hefen wurden anfänglich auf YPD Agarplatten gebracht um ein Wachstum der Hefen zu ermöglichen und anschließend auf Selektionsplatten umgesetzt. Die Selektion von positiven Interaktionen erfolgte auch in diesem Wiederholungstest durch Analyse der Reportergenaktivität auf -HAULT Selektionsnährböden. Für die weiteren molekularen und proteinbiochemischen Analysen wurden nur *Preys* verwendet, die im Wiederholungstest eine Interaktion mit einem *Bait* gezeigt haben.

7.4 Arbeiten mit Mausgewebe

7.4.1 Isolation von Spermien

Für die Isolation von reifen Spermien wurden ein bis zwei Nebenhoden (*Cauda Epididymis*) aus dem zu untersuchenden männlichen Tier isoliert und in eine Petrischale mit 1 ml Kapazitierungsmedium (EKRB-Medium) überführt. Die Nebenhoden wurden vom umliegenden Fettgewebe befreit und anschließend mit einer Schere und Pinzette zerkleinert. Das Kapazitierungsmedium wurde mit den Gewebestücken und einer weit eröffneten Pipettenspitze in ein Reaktionsgefäß überführt, die Kulturschale erneut mit Kapazitierungsmedium gespült und mit der Gewebesuspension vereinigt. Die Spermien kapazitierten in einem 30 min Inkubationsschritt bei 30°C aus dem Gewebe in das Medium. Um die Spermien zu gewinnen wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Spermien wurden bei RT und 1.000xg für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde möglichst schnell entfernt und das Pellet zweimal mit PBS (Lonza) gewaschen. Die Spermien wurden nun für weitere Analysen entweder in PBS suspendiert und auf *SuperFrost Ultra Plus*® Objektträger (Menzel-Gläser) ausgestrichen.

Tabelle 9: Reagenzien für Arbeiten mit Mausgewebe

Lösung	Molarität	Substanz
EKRB-Medium	119,4 mM	NaCl
	4,8 mM	KCl
	1,0 mM	CaCl ₂
	1,2 mM	MgSO ₄
	1,2 mM	KH ₂ PO ₄
	5,0 mM	Glucose
	21,0 mM	Natriumlaktat
	0,25 mM	Natriumpyruvat
	25,0 mM	NaHCO ₃

7.4.2 Gefrierschnitte von Maushodengewebe

Die Hoden wurden aus dem zu untersuchenden Tier entnommen, in Aluminiumschalen überführt und mit Hilfe eines Trockeneis-Isopropanol-Gemisches (Merck) für wenige Minuten schockgefroren. Dabei war darauf zu achten, dass die Hoden nicht in Kontakt mit dem Trockeneis-Isopropanol-Gemisch kommen. Die gefrorenen Hoden konnten entweder bei -80°C gelagert oder direkt in *Tissue-Tek*® OCT Einbettmedium (Sakura) fixiert und bei ca. -10°C in ca. 10 µm dicke Längsschnitte prozessiert werden. Entsprechend der Größe des Hodens wurden 3 bis 4 Gewebeschnitte auf einem Objektträger aufgezogen und wenige Sekunden getrocknet. Die weitere Behandlung der Gewebeschnitte erfolgte entsprechend dem Versuchsansatz.

7.4.3 Vorbehandlung von Gefrierschnitten

Um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden wurden RNA-Arbeiten an einem sauberen, mit 1 % SDS-Lösung oder mit RNaseZap (Ambion) gereinigten, Arbeitsplatz durchgeführt. Benötigte Pinzetten, Pipetten oder Inkubationskammern wurden ebenfalls mit RNaseZap behandelt. Es wurden sterile und gestopfte Einwegpipetten verwendet (Biozym), mit Handschuhen gearbeitet und alle verwendeten Lösungen wurden mit DEPC-Wasser angesetzt. Die Fixierung der Gewebeschnitte erfolgte sofort nach einem kurzen Trocknen der Gefrierschnitte auf dem Objektträger bei 55°C mit 4 % PFA/PBS (Sigma, Roche). Die Objektträger wurden zusätzlich mit einem Stück Parafilm in der Größe des Objektträgers abgedeckt. Zudem wurden alle erhaltenen Schnitte gemeinsam für 20 min in 4 % PFA in PBS inkubiert. Es folgten zwei kurze Waschstritte in 0,9 % NaCl-Lösung (Sigma) für 2 min. Anschlie-

bend wurden die Schnitte per Hand acetyliert. Die Acetylierung erfolgte in 240 ml 0,1 M TEA (Triethylenamin-Lösung, pH 8,0), welches kurz zuvor frisch hergestellt und mit 550 µl Acetanhydrid (Sigma) versetzt wurde. Die Schnitte wurden 5 min auf einem Magnetrührer mit Rührfisch zur Durchmischung acetyliert. Nach 5 min wurde erneut frisches Acetanhydrid zugefügt und 5 min acetyliert. Die Schnitte durchliefen nach einem anschließenden Waschschrift in PBS und 0,9 % NaCl-Lösung mehrere Dehydrierungsschritte: 2 min in 30 % EtOH, 2 min in 50 % EtOH, 2 min in 70 % EtOH, 2 min in 80 % EtOH, 2 min in 95 % EtOH und zweimal 2 min in 100 % EtOH (Merck). Danach wurden die Objektträger an der Luft getrocknet, in Schnittkästen mit Silica Gel (Roth) zur Minimierung von lokaler Luftfeuchtigkeit verpackt und bei -80°C gelagert. Die Schnitte wurden für *in situ* Hybridisierungen oder Immunfluoreszenzfärbungen verwendet, wobei sie geschlossen bei Raumtemperatur aufgetaut wurden. Die Schnitte dürfen maximal einmal aufgetaut und wieder eingefroren werden, da sonst keine ausreichende Signalstärke beim Nachweis von RNA und Protein erreicht wird.

7.4.4 *In Situ* Hybridisierung

Tabelle 10: Reagenzien für In Situ Hybridisierung und deren Vorbereitung

Lösung	Zusammensetzung
Hybridisierlösung	10 mM Tris pH 7,5 600 mM NaCl 1 mM EDTA 2 % SDS 10 % Dextran Sulfate (50 % solution) 1x Denhardt's 250 µg/ml Hefe tRNA 100 µg/ml Heparin 2 % RNase freies BSA (Blockierung) 5x SSC pH 4,5 (citric acid) 50 % Formamid
MABT-Puffer	100 mM Maleic Acid 100 mM Maleic Acid 150 mM NaCl mit NaOH auf pH 7,5 einstellen 0,1 % Tween-20
NTMT-Lösung	100 mM NaCl 100mM Tris pH 9,5 50 mM MgCl ₂ 0,1 % Tween-20

Gefrierschnitte wurden bei RT im geschlossenen Schnittkasten möglichst schonend aufgetaut. Anschließend wurden die Objektträger mit je 100 µl Hybridisierlösung und einem Stück Parafilm bedeckt und in einem Schnittkasten für 1 bis 3 h bei 65°C im Hybridisierofen (Thermo Electron Corporation) präinkubiert. Der Schnittkasten wurde mit einem in 50 % Formamid (Merck) und 5xSSC getränkten Zellstoff feucht gehalten. Nach der Vorinkubation wurde der Parafilm mit Hilfe einer Pinzette von den Objektträgern angehoben und die Schnitte erneut mit 100 µl DIG-markierte RNA-Snode in Hybridisierlösung (Konzentration der Probe etwa 20 ng/100 µl), bedeckt. Die Objektträger wurden wie bei der Vorinkubation in einem feuchten Schnittkasten für etwa 15 bis 18 h bei 65°C hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger bei RT kurz in 5xSSC getaucht, um den Parafilm abzulösen und sie in Glasküvetten (*Copeland Jars*) einzusortieren. Alle folgenden Waschschriffe erfolgten bei 65°C in vorgewärmten Lösungen (65°C) und Glasküvetten. Der erste Waschschriff erfolgte mit 50 % Formamid (Merck) und 1x SSC für 30 min. Danach wurde einmal 20 min in 2x SSC und zweimal in 0,2x SSC gewaschen. In MABT wurden die Schnitte zweimal 5 min äquibriert. Die Blockierung der Schnitte erfolgte mit 20 % inaktiviertem Lammserum (vector labs) in MABT in einer feuchten Kammer bei RT für mindestens 1 h. Die Lösung wurde entfernt und die Schnitte mit einem alkalische Phosphatase gekoppelten Anti-Dig (Anti-DIG-AP Antikörper, Roche) in 5 % Lammserum/MABT über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Antikörperlösung wurde anschließend mit drei Waschschriffen von je mindestens 5 min in MABT entfernt. Die Entwicklung der Färbung erfolgte mit NBT/BCIP (Roth) als Substrat der alkalischen Phosphatase. Zur Entwicklung des Signals mittels alkalischer Phosphatase wurden die hybridisierten Schnitte für 10 min in NTMT äquibriert und danach in einer feuchten Kammer mit etwa 400 µl NBT/BCIP verdünnt in NTMT für mehrere Tage bei 4°C oder RT entwickelt. Dabei musste etwa einmal täglich die NBT/BCI-Lösung gewechselt und die Färbung unter einem Binokular (Leica) beobachtet werden. Das Stoppen der Färbung erfolgte durch Waschen in NTMT und dann in PBS. Es folgte eine Nachfixierung des Farbstoffes mit 4 % PFA in 1xPBS für 30 min und drei Waschschriffe in PBS. Die Objektträger wurden zum Schluss in Kaisers Glycerolgelatine (Merck) eingedeckelt.

7.4.5 Immunfluoreszenzfärbung

Die Fixierung des Gewebes erfolgte mit 4 % PFA/PBS für 20 min bei RT mit anschließender Inkubation der Proben in einem eiskalten Methanol-Aceton-Gemisch (Merck) für 5 min bei -20°C. Im Anschluss wurden die Proben in Glasküvetten zwei-

mal für 5 min bei RT mit PBS (Roche) ohne Bewegung gewaschen. Die Blockierung des Gewebes erfolgte mit 5 % normalem Ziegen Serum (NGS, vector labs) in PBS-T (0,2 % Tween-20, Sigma) für 1h bei RT in einer feuchten Kammer. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer, wurde der überschüssige Antikörper durch zweimaliges Waschen mit PBS-T für 5 min bei RT entfernt. Der fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper wurde in einer dunklen, feuchten Kammer für ca. 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde erneut zweimal für 5 min mit PBS-T gewaschen. Für den Fall einer direkten Immunfluoreszenz mit einem bereits fluoreszenzgekoppelten Primärantikörper erfolgte die Inkubation ebenfalls über Nacht. Um die Zellkerne zu markieren wurden die Proben mit einer DAPI-Lösung (life technologies) für 5 min bei RT im Dunkeln gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift in PBS konnten die Proben mit *Vector Shield* (vector labs) eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt werden. Die Analyse und Dokumentation der Präparate erfolgte mit dem Mikroskop Zeiss Observer.

7.4.6 Immunogoldmarkierung und Elektronenmikroskopie

Für die subzelluläre Lokalisation von Proteinen in Spermien wurden Nebenhoden aus Mausmännchen (B/6) isoliert, direkt in 4 % PFA/PBS überführt und für ca. 20 min fixiert. Anschließend wurden die Nebenhoden in kleine Gewebeselemente zerschnitten und erneut für 20 min bei RT in 4 % PFA/ 2 % Glutaraldehyd/ PBS fixiert, schrittweise dehydriert und in LR-White sowie LR-Gold Harz (Sigma) eingebettet. Zum Aushärten des Harzes wurde dieses mit UV-Licht bestrahlt. Die Gewebestücke wurden in 80 nm dicke Proben geschnitten und auf beschichtete Nickelgitter aufgezogen. Die Gewebeschnitte wurden dann mit Blockierungspuffer (1 ml Immunolabelling-Puffer + 40 µl BSA, Aurion 10 %) für 30 min in einer feuchten Kammer blockiert und mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Erstantikörper wurden dabei sowohl unverdünnt, als auch 1:5 verdünnt eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem gold-markierten sekundären Antikörper für 1 h bei RT. Nach erneuten Waschschriften erfolgte eine Nachkontrastierung mit Osmiuntetroxid (Roth) für wenige Sekunden. Die mit Gold markierten Ultradünnschnitte wurden mittels Phillips-Elektronenmikroskop analysiert und mittels Digitalfotographie dokumentiert.

7.5 Zellbiologische Arbeiten

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer sterilen Werkbank ausgeführt. Für diese Arbeiten wurden sterile Einmalpipetten und Kulturschalen verwendet. Materialien wie Medien und andere für die Versuche benötigten Lösungen wurden steril geliefert oder mit Filter der Porengröße 0,2 μm (Millipore) sterilisiert. Zur Kontrolle des Wachstums wurde ein Inversmikroskop von Leica verwendet. Zum Zentrifugieren der Zellen wurde eine Eppendorf Zentrifuge verwendet. Folgende Zelllinien wurden für zellbiologische Arbeiten verwendet.

1. HEKT293 humane embryonale Nieren-Zelllinie, die mit fragmentierter DNA eines Adenovirus Typ5 transformiert wurde, Überexpression des SV40T Antigens, adhären
2. NIH3T3 Fibroblasten-Zellline aus Embryonalgewebe der Maus, Zellen sind spontan immortalisiert , adhären

7.5.1 Kultivierung und Expansion von Zellkulturen

Die Kultivierung der adhären Zellen erfolgte in DMEM-Medium (Lonza) mit 10 % FCS (Pan Biotech) und 1 % L-Glutamin (Gibco) bei 37°C in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxidanteil in einem Binder-Inkubator. Auf die Zugabe von Antibiotikum zum Nährmedium wurde verzichtet. Bei Erreichen eines konfluenten Monolayers auf einer Kulturschale wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA (Gibco) 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in Nährmedium aufgenommen und in ein Plastikröhrchen (Greiner) überführt. Im Falle einer Zellzahlbestimmung wurde die Gesamtzellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und eines Inversmikroskops (Leica) ermittelt. Die gesamte Zellsuspension wurde bei 1.000xg für 5 min pelletiert, der Überstand wurde mittels einer Absaugvorrichtung entfernt, die Zellen in frischem Nährmedium resuspendiert und in der gewünschten Menge auf neue Zellkulturschalen verteilt.

7.5.2 Einfrieren von Zellkulturen

Die Lagerung von Zellkulturzellen erfolgte in Einfriermedium bestehend aus DMEM-Medium, 20 % FCS und 20 % DMSO (Sigma) bei -80°C oder für eine längere Lagerung in flüssigem Stickstoff.

7.5.3 Transiente Transfektion von Zellkulturen

Die Zellen wurden in der entsprechenden Zellzahl auf die gewünschten Kulturschalen verteilt. Die transiente Transfektion der Kulturzellen erfolgte mit Hilfe von *Lipofectamin2000* (*life technologies*) ca. 4 bis 6 h, spätestens aber 24 h nach der Aussaat entsprechend der Größe der Kulturschale mit den vom Hersteller angegebenen Plasmid-Mengen. Die Plasmid-DNA für die Transfektionen wurde mit den Produkten von Qiagen oder Sigma isoliert, um dem Standard sterilen Arbeitens zu entsprechen. Die Zellen wurden weitere 24 bis 48 h kultiviert und dem jeweiligen Versuch entsprechend weiter behandelt.

7.5.4 Herstellung von Proteinextrakt aus Zellkulturen

Zellen wurden in Gewebe-Lysis-Puffer (0,1 % Tween-20/PBS + Complete) für 30 min auf Eis inkubiert und durch anschließendes Auf- und Abpipettieren lysiert. Das Zellysate wurde für 10 min bei 4°C und 1.000xg zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand abgenommen. Die Proteinextrakte wurden bei -80°C eingefroren.

7.6 Protein- und biochemische Arbeiten

Tabelle 11: Übersicht über verwendete Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Firma
anti-V5	Maus, monoklonal	Invitrogen
anti-V5-HRP	Maus, monoklonal	Invitrogen
anti-MYC [4A6]	Maus, monoklonal	Millipore
anti-MYC	Kaninchen, affinitätsgereinigt	Sigma
anti-GST	Ziege, polyklonal	GE Healthcare
anti-TUBULIN [YOL1/34]	Ratte, monoklonal	Abcam
anti- β -TUBULIN-Cy3 [TUB2.1]	Maus, monoklonal	Abcam
anti-AMMECR1	Kaninchen, polyklonal	GeneTex
anti-DNALI1	Kaninchen, affinitätsgereinigt	Sigma
anti-AKAP9	Kaninchen, affinitätsgereinigt	Sigma
anti-SPATA22	Kaninchen, polyklonal	Proteintech
anti-RAC1	Maus, monoklonal	Cytoskeleton
anti-CDC42	Maus, monoklonal	Cytoskeleton
anti-RHOA/B/C [55]	Maus, monoklonal	Millipore

7.6.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten

Zur Messung der Konzentration der Proteinlysate wurde das BCA-Proteinbestimmungs-Kit (Thermo Fisher Scientific) oder das Qubit-Protein-Quantifikationssystem (life technologies) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

7.6.2 Analyse von Proteinen mit SDS-PAGE

Zur Gelelektrophorese von Proteinen wurden NuPAGE Bis-Tris Gele (life technologies) mit NuPAGE Laufpuffer (life technologies) benutzt. Die Proteinlysate wurden mit 4xNuPage Ladepuffer (life technologies) und DTT versetzt und bei 75°C für 15 min denaturiert, danach auf Eis gekühlt, kurz zentrifugiert und in die entsprechende Geltasche geladen. Als Proteingrößenmarker dienten die Proteingrößenmarker See Blue Plus 2 oder Pre Sharp (life technologies). Die Proteine wurden bei 150 bis 190 V etwa 45 bis 60 min nach Größe getrennt.

7.6.3 Western-Blot-Analyse

Zur Übertragung von Proteinen auf eine Membran diente das *I-Blot-System* (life technologies). Dazu wurden das Protein-Gel und eine zusätzlich aktivierte PVDF-Membran (Millipore, 0,45 µm Porengröße) für 5 bis 10 min in reinem Wasser auf einem Schüttler equilibriert. Die Membran und das Gel wurden entsprechend den Herstellerangaben angeordnet und luftblasenfrei geschichtet. Der Proteintransfer wurde mit dem Pogramm #3 bei 20 V für 8 min durchgeführt. Nach dem Proteintransfer wurden auf der Membran die Konturen und Taschen des Gels, sowie der Proteingrößenmarker markiert. Mit PonceauS-Farbstoff wurde die Qualität des Proteintransfers überprüft. Das Blockieren der Membran erfolgte in 10 ml 5 % Milchpulver (Fluka) gelöst in TBS-T (0,2 % Tween-20) für 60 min bei RT. Die Blockierung und Antikörperinkubationen wurden in 50 ml Plastikröhrchen (Greiner) auf einem Roller durchgeführt, um eine gleichmäßige Verteilung der Lösungen auf der Membran zu gewährleisten. Die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde in TBS-T oder 5 % Milchpulver/TBS-T für 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht durchgeführt. Die jeweiligen Antikörper wurden entsprechend den Herstellerangaben verdünnt. Nach der Inkubation des Primärantikörpers wurde dreimal für je 10 min bei RT mit TBS-T gewaschen. Im Anschluss wurde der mit Merrettichperoxidase gekoppelte Sekundärantikörper (Jackson ImmunoResearch) in TBS-T oder 5 % Milchpulver/TBS-T für 1 h bei RT mit der Membran inkubiert. Nach diesem Inku-

bationsschritt wurde erneut dreimal für je 10 min mit TBS-T gewaschen. Die Länge und Anzahl der Waschschrte variierte auf Grund der verwendeten Antikörper nur in wenigen Fällen. Zur Entwicklung der antikörperspezifischen Signale wurde etwa 1 ml fertiges Substrat verwendet. Die Detektion der Signale erfolgte mittels Belichtung mit biolumineszenssensiblen Filmen (GE Healthcare) in einer Dunkelkammer für einen Zeitraum von wenigen Sekunden bis 60 min. Die Entwicklung der Filme wurde in einer Entwicklermaschine (Ernst Christiansen GmbH) vorgenommen.

7.6.4 Herstellung rekombinanter Proteine in *E.coli*

Die Herstellung rekombinanter Proteine wie GST, GST-RAC1, GST-RHOA oder GST-CDC42 erfolgte in BL21 (DE3) RIPL Zellen (Stratagene). Eine 50 ml Starterkultur wurde mit einer Einzelkolonie inokuliert und bei 30°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen konnte die Bakterienkultur 1:10 verdünnt und bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bis 0,8 weiter inkubiert werden. Die Proteinsynthese wurde mit IPTG (0,5 mM final, AppliChem) induziert und für 3 bis 4 h bei 30°C weiter geführt. Die Bakterien wurden pelletiert und das Bakteriensediment anschließend in 10 ml Lysispuffer (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 0,5 mg/ml Lysozym, 1% TritonX100, 1x *Complete Protease Inhibitor*) aufgeschlossen. Die Zellen wurden schließlich durch Ultraschall (Laufzeit: 8 bis 10 min, Pulsamplitude: 20 %, Puls an: 30 sec, Puls aus: 45 sec) endgültig lysiert. Das Lysat, welches vor dem Aufschluss weißlich und undurchsichtig trüb aussah, erschien nach der Lyse bräunlich und etwas durchscheinender. Das aufgeschlossene Lysat wurde nun bei ca. 13.000 rpm für 60 min zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand schließlich in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von ca. 500 µL äquibrierter Glutathion Sepharose (500 µl Säulenvolumen, GE Healthcare) wurden diese zusammen mit dem proteinhaltigen Überstand über Nacht bei 4°C inkubiert um die GST-Proteine an der Matrix zu binden. Die Sepharose wurde anschließend sechsmal in Waschpuffer (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% TritonX100, 1x *Complete Protease Inhibitor*) gewaschen. Zur Lagerung der Proteine an der Matrix wurden diese mit Glycerol (Sigma) versetzt, in kleinen Mengen abgefüllt und bei -80°C gelagert. Die Elution der Proteine von der Matrix erfolgt mit frisch angesetzten Elutionspuffer (50 mM Glutathion in 50 mM Tris und *Complete Protease Inhibitor*, pH 8,0) für 2h bei RT. Anschließend wurden die rekombinanten Proteine im SDS-PAGE analysiert.

7.6.5 *In vitro* Transkription und Translation

Für eine *in vitro* Transkription mit anschließender Translation zur Herstellung von rekombinanten Proteinen (IVT) wurde das *TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System* von Promega verwendet. Eine Standardreaktion von 50 µl wurde mit 1 µg ungeschnittenem Plasmid, 1 µl Methionin (1 mM), 1 µl *T7 TNT PCR Enhancer*, 40 µl *TNT T7 Quick Master Mix* und nuklease-freiem Wasser versetzt und für 90 min bei 30°C inkubiert. Im Anschluss an diese Reaktion wurden die Proben entweder im SDS-PAGE und Western-Blot analysiert oder über eine Matrix aufgereinigt und anschließend analysiert.

7.6.6 Aufreinigung von *in vitro* Transkription/Translation-Reaktionen

Da die Proteine, welche in der IVT-Reaktion hergestellt wurden ein 6xHis Epitop besitzen, konnten diese über eine Ni-NTA Agarose Matrix (Qiagen) partiell aufgereinigt werden. Diese Aufarbeitung wurde im kleinen Maßstab in Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Hierfür wurde ein kleines Säulenvolumen Ni-NTA Agarose Matrix (10 bis 25 µl) fünfmal in 0,5 ml IVT-Waschpuffer äquilibriert und die Ni-NTA Matrix schließlich mit 0,8 ml Waschpuffer (Qiagen), sowie der IVT-Reaktion versetzt. Dieser Ansatz wurde dann für 1,5 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde die Ni-NTA Matrix mit den gebundenen Proteinen dreimal mit 0,8 ml IVT-Waschpuffer gewaschen. Eine Elution erfolgte, wenn gewünscht, in Elutionspuffer (Qiagen) für 30 min bei 4°C. Im Anschluss wurden die Proben im SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

7.6.7 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation

Die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen erfolgte für die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (Remy & Michnick, 2004; Kerppola, 2006; Michnick et al., 2007) im 96 *Well*-Maßstab. Alle zu exprimierenden DNAs oder DNA-Fragmente wurden zuvor in die gateway-kompatiblen Plasmide 55-pVEN-F2C, 56-pVEN-F1N, 57-pVEN-F2N und 58-pVEN-F1C kloniert, die von Dr. Ulrich Stelzl zur Verfügung gestellt wurden (Quelle Vektoren: Eduard Stefan - University of Innsbruck). Dabei musste beachtet werden, dass Volle-Länge-DNAs bzw. DNA-Fragmente mit einem *Stopcodon* lediglich in N-Terminal markierten Vektoren 56-pVEN-F1N und 57-pVEN-F2N gebracht werden konnten. Volle-Länge-DNAs oder DNA-Fragmente ohne *Stopcodon* konnten dagegen in alle Expressionsplasmide kloniert werden.

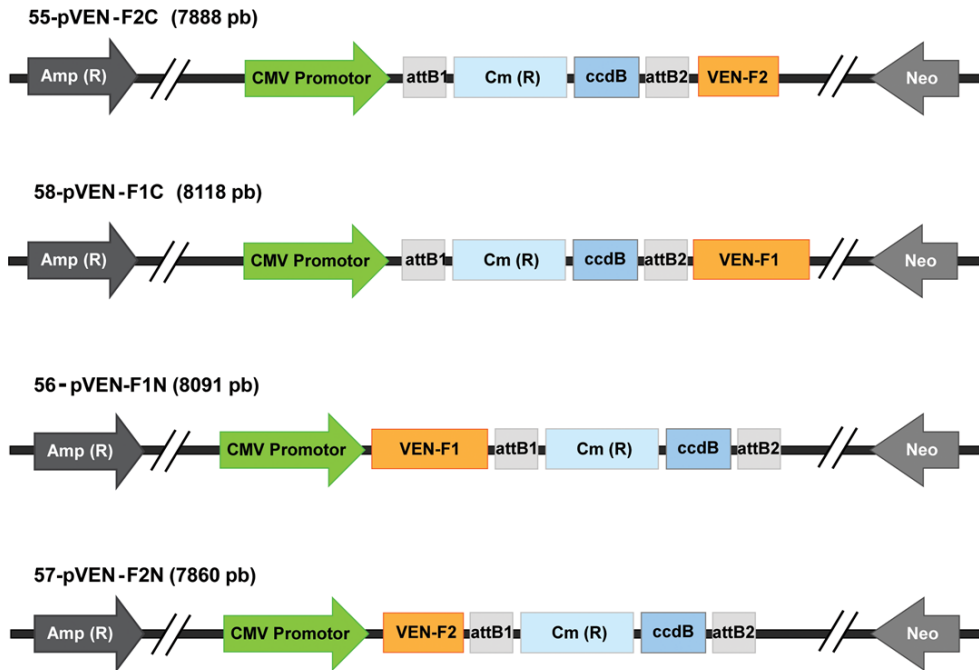


Abbildung 56: Verwendete Vektoren für die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation. Amp(R)/Cm(R)/Neo: Selektionskassetten; CMV: Cytomegalo-Virus Promotor zur konstitutiv starken Expression in Säugerzellen; VEN-F1: N- bzw. C-terminales Venus fragment 1; VEN-F2: N- bzw. C-terminales Venus fragment 2; attB1/attB2: Rekombinationsstellen; *ccdB*: *ccdB*-Gen.

Um Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen, wurden jeweils eine DNA A, fusioniert mit dem Venus Fragment 1 und eine DNA B, fusioniert mit dem Venus Fragment 2, in eine Vertiefung der 96 *Well*-Lochplatte zusammen transfiziert. Als Kontrollexperimente wurden zusätzlich die DNA A, fusioniert an Venus Fragment 1, und das entsprechende leeren Plasmid mit dem Venus Fragment 2 kotransfiziert bzw. DNA B, fusioniert an Venus Fragment 2, und das entsprechende leeren Plasmid mit dem Venus Fragment 1 zusammen in die Zellen gebracht. Hierfür wurden ca. $3 \cdot 10^4$ HEK293 Zellen pro Vertiefung einer 96 *Well*-Zellkulturplatte ausplattiert. Nach 4 bis 6 h erfolgt die gleichzeitige Transfektion zweier Plasmid-DNAs durch Lipofektion. Die Auswertung der Protein-Protein-Interaktionen wurde 24 bis 48 h nach der Transfektion mit dem Mikroskop Zeiss Observer durchgeführt und mit Hilfe digitaler Fotografie dokumentiert. Eine positive Protein-Protein-Interaktion ließ sich nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 510 nm durch eine Emissionsstrahlung bei 530 nm als grünes Leuchtsignal in der Zelle detektieren. Sollte kein grünes Leuchtsignal in der Zelle aufgetreten sein, wurde entsprechend keine Interaktion zwischen den Proteinen festgestellt.

7.6.8 Lumineszenz basierten IP Analyse

Für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mit einer Lumineszenz basierten IP Analysemethode (Barrios-Rodiles et al., 2005; Vizoso Pinto et al., 2009) wurden alle zu exprimierenden volle Länge DNAs und DNA-Fragmente in die gateway-kompatiblen Plasmide 06-pcDNA3.1-PA-D57 und 16-pFire-V5-DM kloniert, die von Dr. Ulrich Stelzl zur Verfügung gestellt wurden (Palidwor et al., 2009). Diese Vektoren beinhalten N-Terminal lokalisierte Epitopsequenzen, wonach alle zu testenden DNAs, unabhängig von einem *Stopcodon*, verwendet werden konnten.

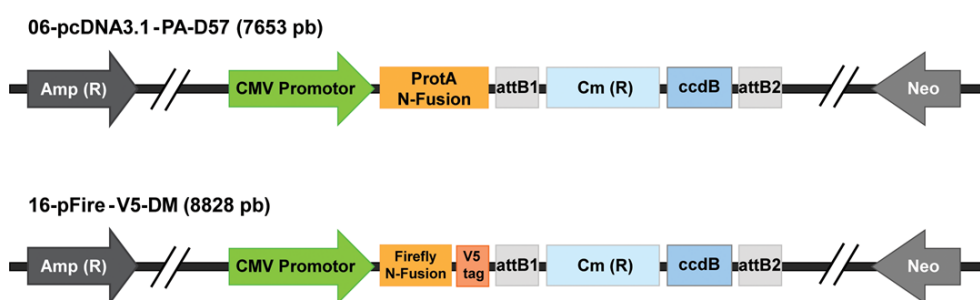


Abbildung 57: Verwendete Vektoren für die Lumineszenz basierte IP Analyse. Amp(R)/Cm(R)/Neo: Selektionskassetten; CMV: Cytomegalo-Virus Promotor zur konstitutiv starken Expression in Säugerzellen; ProtA: N-terminales Protein A Epitop zur Bindung an eine Matrix, Firefly/V5: N-terminales Firefly Luciferase/V5 Epitop; attB1/attB2: Rekombinationsstellen; ccdB: *ccdB*-Gen.

Die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen erfolgte für die Lumineszenz basierten IP Analyse ebenfalls im 96 *Well*-Maßstab. Dafür wurden ca. $3 \cdot 10^4$ HEK293 Zellen pro Vertiefung ausplattiert und 24 h nach der Aussaat mit *Lipofectamin2000* transient transfiziert. Für jede zu testende Interaktion wurden eine DNA A im 06-pcDNA3.1-PA-D57 Vektor mit einer DNA B im 16-pFire-V5-DM Vektor zusammen in eine Vertiefung der 96 *Well*-Zellkulturplatte transfiziert. Pro Protein-Protein-Interaktion wurden zusätzlich immer drei Vertiefungen (technische Triplikate) transfiziert. Der LUMIER-Versuch wurde dann 48 h nach der Transfektion durchgeführt. Dafür wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 100 µl LUMIER-Puffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % Glycerin, 1 % Triton X-100 + Complete) für 30 min auf Eis unter Schwenken lysiert. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 4.000 rpm.

Für einen ersten Expressionstest der 16-pFire-V5-DM-Konstrukte wurden 40 µl Pro-

teinlysate mit 40 µl Luciferase Substrat vermischt und im TECAN InfiniteM200 vermessen.

Für die eigentlichen Interaktionsmessungen wurden für die Analyse der Fire-Expression zu Beginn 5 µl Proteinlysate, 35 µl PBS und 40 µl Luciferase Substrat (Tab. 12) in einer unbeschichteten 96 *Well*-Platte (Cellstar, weiß und schwach bindend) vermischt und ebenfalls im TECAN InfiniteM200 vermessen. Für den Protein-Protein-Interaktionstest wurden 70 µl Proteinlysate in eine IgG-beschichtete 96 *Well*-Platte (Greiner, weiß, high binding) überführt und mindestens 1 h auf Eis unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurden die Vertiefungen zweimal mit 1xPBS gewaschen und nach Zugabe von 40 µl *Bright Glow Luciferase* Substrat (Promega) mit dem TECAN InfiniteM200 vermessen.

Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Reagenzien und Volumina zur Herstellung von 10 ml Luciferase Substrat

Reagenzien	Volumen [ml]
1 M Glycylglycerin	0,25
0,5 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 8,0)	0,3
0,5 M EGTA	0,08
0,5 M ATP	0,04
1 M DTT	0,01
1M MgSO ₄	0,15
1,25 mM CoA	0,8
10 mM Luciferin	0,075
H ₂ O	8,3

Für die Herstellung der eingesetzten IgG-beschichteten 96 *Well*-Platte wurde diese zunächst über Nacht bei 4°C unter konstantem Schütteln mit einer Beschichtungslösung bestehend aus Carbonat-Puffer und Schaf Gamma Globulin (1:1.000, Jackson ImmunoResearch) inkubiert. Nach Entfernung der Beschichtungslösung folgte ein Inkubationsschritt mit einer 1 % BSA-Lösung entweder 1 h bei RT oder ebenfalls über Nacht bei 4°C unter konstantem Schütteln. Im nächsten Schritt wurden die Platten dreimal mit TBS-T (0,05 % Tween-20) je 5 min gewaschen. Es folgte ein zusätzlicher Inkubationsschritt mit einer Abfang-Lösung bestehend aus Carbonat-Puffer und Kaninchen anti-Schaf-IgG (1:750, Jackson ImmunoResearch) über Nacht bei 4°C. Zum Abschluss wurden die Platten erneut dreimal mit TBS-T (0,05 %) je 5 min gewaschen, in Folie verpackt und bei 4°C bis zu 6 Monate gelagert.

7.7 RNA-Arbeiten

7.7.1 RNA Extraktion

Die Isolation von Gesamt-RNA aus dem Hodengewebe erfolgte durch klassische RNA-Isolation mit Phenol. Dafür wurde ein halber Hoden direkt nach der Entnahme aus dem Tier mit Trizol (life technologies) überschichtet, mit Hilfe eines RNase freien Stößels zerkleinert und nach Phenol-Chloroform-Extraktion durch Zugabe von 70 %igen Ethanol gewaschen. Im Anschluss wurde das Pellet in nuklease-freiem Wasser (Promega) suspendiert und ein DNA-Verdau mit dem *DNA-free DNase Treatment and Removal Reagent Kit* (life technologies) durchgeführt. Die Konzentration der RNA erfolgte mittels Nanodrop. Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert oder direkt für die Synthese der cDNA verwendet.

7.7.2 cDNA Synthese mit Reverser Transkriptase

Alle Pipettierarbeiten wurden an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom und unter Verwendung von DNA-Away und *RNaseZap* durchgeführt, um Nukleotidkontaminationen an allen Flächen und Pipettierhilfen zu minimieren. Die Synthese der cDNA aus bereits isolierter Gesamt-RNA erfolgte in 0,5 ml Eppendorfgefäßen mit dem *Super Script First Strand Synthese Kit* (life technologies). Um eine Umschreibung von mRNA in cDNA zu erzielen, wurden Oligo dT-Primer verwendet. Entsprechend der eingesetzten Oligonukleotide wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Damit die Anwesenheit von RNA in der synthetisierten cDNA-Probe ausgeschlossen werden konnte, wurde zuletzt ein RNaseH-Verdau bei 37°C für 20 min durchgeführt.

7.7.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Nach der Synthese der cDNA (Abschnitt 7.7.2) wurde der RT-PCR-Ansatz an einer Laminar-Flow-Werkbank pipettiert. Für die RT-PCR wurde Taq-Polymerase nach Herstellerangaben verwendet (life technologies). Zur Herstellung von *anti-sense* Sonden gegen die mRNAs der Gene *Ammecr1*, *Dnali1*, *Spata22*, *Akap9*, *Rhpn1* und *Gapdh* wurden die in der Tabelle 13 beschriebenen Primerpaare verwendet.

Tabelle 13: Übersicht der verwendete Oligonukleotide für die RT-PCR

Gen	Primernamen	Primersequenz
AMMECR1	Ammecr1 s	ACCAATGACAAGGGATGAGC
	Ammecr1 as	CTGGCGATGAGCAAGGTATT
Akap9	Akap9 s	CTTCACTGATGATCGGACTAGAAAT
	Akap9 as	TTTCGTAGTTCAGCTTTTAGCTTGT
Rhpn1	Rhpn1 s	ACCTGACATCTGTCCAGATCAAC
	Rhpn1 as	GTTCTTGGTTGAAAACACAGACAAG
Spata22	Spata22 s	CTTACCTGGACATAAAGAAGCTGAA
	Spata22 as	CTAATCAGTCTTGGAAAGTTCACGAT
Dnali1	Dnali1 s	ATGATACCCCCAGCAGACTC
	Dnali1 as	TCACTTCTTCGGTGCATAA
Gapdh	Gapdh s	TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG
	Gapdh as	ACCACCCTGTTGCTGTAGCC

Die Bedingungen dieser PCR-Reaktionen waren wie folgt: Die initiale Dissoziation doppelsträngiger DNA wurde bei 94°C für 5 min durchgeführt. Jeder Zyklus begann mit 30 sec 94°C, gefolgt von einer 30 sec Anlagerungszeit bei 55°C bis 60°C, entsprechend der Oligonukleotidpaarung. Anschließend erfolgte die Elongation der DNA bei 72°C für 30 bis 45 sec, entsprechend der Fragmentlänge. Es wurden 35 Zyklen verwendet, um die jeweiligen DNAs zu amplifizieren.

7.7.4 Herstellung von RNA-Sonden

Für die Herstellung von RNA-Sonden für die *In Situ* Hybridisierung wurden die in Tabelle 14 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Die erhaltenen cDNAs wurden aufgearbeitet und in den Vektor pCR2.1-TOPO subkloniert. Die gleichzeitige Herstellung von *anti-sense* und *sense* Sonden war mit diesem Subklonierungsvektor nicht möglich. Um parallel *anti-sense* und *sense* Sonden generieren zu können, wurden die cDNAs für Akap9, Rhpn1, Spata22 und Dnali1 mit der Restriktionsendonuklease EcoRI herausgeschnitten und in den mit EcoRI linearisierten Vektor pBSKS ligiert. Ammecr1 wurde mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und EcoRV aus dem pCR2.1-TOPO herausgeschnitten, der BamHI-Nukleotidüberhang entfernt und blunt in den pBSKS ligiert. Die Richtigkeit der Sequenzen wurde durch eine abschließende Sequenzierung verifiziert.

Tabelle 14: Übersicht der verwendete Oligonukleotide für die Herstellung der RNA-Sonden

Gen	Primernamen	Primersequenz
AMMECR1	Ammecr1 s	ACCAATGACAAGGGATGAGC
	Ammecr1 as	CTGGCGATGAGCAAGGTATT
Akap9	Akap9 s	CTTCACTGATGATCGGACTAGAAAT
	Akap9 as	TTTCGTAGTTCAGCTTTTAGCTTGT
Rhpn1	Rhpn1 s	ACCTGACATCTGTCCAGATCAAC
	Rhpn1 as	GTTCTTGGTTGAAAACACAGACAAG
Spata22	Spata22 s	CTTACCTGGACATAAAGAAGCTGAA
	Spata22 as	CTAATCAGTCTTGGAAGTTCACGAT
Dnali1	Dnali1 s	ATGATACCCCCAGCAGACTC
	Dnali1 as	TCACTTCTTCGGTGCGATAA

Die cDNA-Fragmente der Gene *Ammecr1*, *Akap9*, *Rhpn1*, *Spata22* und *Dnali1* im pBSKS Vektor wurden als Matrize verwendet und mit den Oligonukleotiden M13 for (TGT AAA ACG ACG GCC AGT) und M13 rev (CAG GAA ACA GCT ATG ACC) amplifiziert. Diese PCR-Ansätze waren Grundlage für die im nächsten Abschnitt beschriebene *in vitro* Transkriptions-Reaktion.

7.7.5 *In vitro* Transkription

Für die *in vitro* Transkription wurden 10 µl eines PCR-Ansatzes verwendet. Zu der DNA-Matrize wurden 6 µl 5xPuffer (Promega), 4 µl dATP, dCTP, dGTP Mix (10 mM pro NTP, Roche), 0,75 µl DIG-UTP-Mix (Roche), 3 µl DTT (100 mM), 1,5 µl RNase Inhibitor (Roche), entsprechend 1,5 µl T3 oder T7 Polymerase (Promega), sowie nuclease-freies Wasser bis 50 µl zugefügt und 2,5 h bei 37°C inkubiert. 3 µl RNase-freie DNase (Roche) wurden nach der Transkription zugefügt und nochmals 15 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend durch Zugabe von 1,2 ml Glycogen (20 mg/ml), 12 µl 10mM Ammoniumacetat und 150 µl 100 % EtOH gefällt, das Pellet mit 150 µl 70 % EtOH gewaschen und schließlich in DEPC-Wasser/Formamid Gemisch gelöst. Die Überprüfung der intakten RNA erfolgte, durch die Analyse weniger µl der Probe in einem 1 % Agarosegel in RNase-freiem TAE-Puffer.

8 Zusammenfassung

8.1 Deutsch

Der *t*-Haplotyp der Maus (*t*), eine variante Form des Mausechromosoms 17, bewirkt in heterozygoten *t/+*-Männchen eine Verschiebung der Vererbungsrate zu seinen Gunsten. Diese nicht-mendelsche Vererbung ist das Ergebnis eines Signalweges, in dem mehrere *Distorter* additiv auf die Spermien-Motilitäts-Kinase, SMOK1, wirken und diese in allen Spermienzellen übermäßig stark aktivieren. Diese Hyperaktivierung wird durch die Wirkung des *t*-Komplex Responders, TCR, nur in den Spermienzellen normalisiert, die auch den *Responder*-Genlocus tragen. Die Spermien, die zusätzlich zu den *Distortern* auch unter dem Einfluss des *Responders* stehen, besitzen somit einen Vorteil, was zu einer höheren Befruchtungswahrscheinlichkeit führt. Wie dieser Vorteil genau erreicht wird, ist nicht bekannt, da bislang keine direkten Interaktionspartner oder Zielmoleküle für SMOK1 beschrieben waren.

Mit Hilfe der Hefe-Zwei-Hybrid Methode konnten in dieser Arbeit sowohl Bindungspartner (*Preys*) für SMOK1 als auch für mehrere *Distorter*-Proteine identifiziert werden. Weiterführend und basierend auf einer Auswahl wurden fünf dieser *Preys* (*Ammecr1*, *Akap9*, *Rhpn1*, *Spata22*, *Dnali1*) auf ihre mRNA- und Protein-Expression im Hodengewebe und in Spermatozoen untersucht. Durch elektronenmikroskopische Studien, die den genauen Expressionsort der *Prey*-Proteine zeigen, konnte die Kolokalisation von TCR bzw. SMOK1 und den *Preys* an subzellulären Strukturen des Spermenschwanzes, wie der *Fibrous Sheath* und den *Outer Dense Fibers*, abgeleitet werden. Ein Teil der Hefe-Zwei-Hybrid Interaktionen wurde schließlich durch Interaktionsstudien in Säugerzellen, wie der Lumineszenz basierten IP Analyse und der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation, sowie der klassischen Pull-Down Untersuchung untermauert. Zusätzlich wurden neue Verknüpfungen beobachtet, die in der Hefe nicht identifiziert wurden. In einer weiteren Analyse konnte eine direkte Bindung von SMOK1 an die GTPasen RAC1 und RHOA aber nicht an CDC42 gezeigt werden. Diese Bindungen lassen vermuten, dass RAC1 und RHOA zum Teil direkt die Aktivität von SMOK1 beeinflussen könnten.

Die identifizierten Protein-Protein-Interaktionen wurden abschließend in einem vergrößerten Netzwerk zusammengefasst. Sie zeigen, dass sowohl SMOK1 als auch die *Distorter*- und RHO-GTPasen über *Scaffold*-Proteine wie AKAP9 und RHPN1 an flagellären Strukturen gebunden sein können. Die direkten Bindungen von zwei der

getesteten GTPasen (RAC1 und RHOA) an SMOK1, konnte die im molekularen Modell dargestellte *Distorter*-RHO-SMOK1 Verknüpfung erstmals bestätigen. Die *Distorter*-RHO-Komplexe könnten demzufolge direkt mit SMOK1 in Verbindung stehen. Zudem konnte eine Interaktion von SMOK1 mit einem Bestandteil der inneren Dyneinarme (DNALI1) beobachtet werden, die möglicherweise über einen SMOK1-AMMECR1-Komplex erreicht wird. Die Verbindung zwischen SMOK1 und DNALI1 zeigt zum ersten Mal, dass die Kinase in der Lage sein könnte am Axonem mit der Komponente eines Dyneinkomplexes zu interagieren. Durch eine gezielte Wirkung von SMOK1 am Dyneinbestandteil DNALI1 könnte diese Interaktion die Flagellenbewegung beeinflussen und somit eine gestörte Motilitätsphänotyp verursachen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen somit dazu bei den Signalweg, der zur nicht-mendelschen Vererbung in der Maus führt, besser zu verstehen.

8.2 Englisch

The *t*-haplotype of the mouse (*t*), which is a variant form of mouse chromosome 17, causes the preferred transmission of the *t* allele from heterozygous males (*t/+*). This non-Mendelian inheritance results from effects on a signalling pathway, where the presence of several *distorter* genes additively hyperactivate the sperm motility kinase, SMOK1, in the whole sperm population. This hyperactivation is balanced by the *t*-complex responder, TCR, only in spermatozoa carrying the responder gene. Spermatozoa influenced by the *distorters* and by the *responder* have a motility advantage, resulting in a higher probability for fertilization. It is still unclear how this advantage is manifested, as no interaction partners or targets are yet known for SMOK1.

New binding partners for SMOK1 and for the *distorters* were identified in this study using the yeast two-hybrid method. Based on selection criteria, five prey candidate genes (*Ammecr1*, *Akap9*, *Rhpn1*, *Spata22*, *Dnali1*) were tested for mRNA and protein expression in testis and spermatozoa, respectively. The co-localization of SMOK1 or TCR with the prey proteins could be deduced within subcellular structures, such as the fibrous sheath and the outer dense fibers of the sperm flagellum, using electron microscopy. The protein-protein interactions identified by yeast two-hybrid were, in part, verified in a mammalian system using a luminescence-based immunoprecipitation analysis and a bimolecular fluorescence complementation assay, as well as classical pull-down studies. In addition, new protein-protein interactions were ob-

served, which were not identified by the yeast two-hybrid analysis. Further studies revealed the direct interaction between SMOK1 and the GTPases RAC1 and RHOA, but not CDC42. This evidence gives rise to the idea that the GTPases RAC1 and RHOA are able to modify SMOK1 activity by binding to it directly.

Finally, the identified protein-protein interactions were summarized in an interaction network. The interaction studies showed that SMOK1, as well the distorters and RHO proteins, are bound to flagella via scaffolding proteins like AKAP9 or RHPN1. Furthermore, the direct binding of two GTPases (RAC1 and RHOA) to SMOK1 confirm the link between distorters, RHO-proteins and SMOK1, which is predicted by the molecular model of TRD. The novel interaction of SMOK1 to a component of the inner dynein arms (DNALI1) was additionally observed. This interaction could potentially be generated by a SMOK1-AMMECR1 complex. The specific modification of DNALI1 by SMOK1 could negatively affect the movement of the sperm flagellum, and therefore generate the motility phenotype, leading to non-Mendelian inheritance in males.

In summary, the results of these studies clarify our understanding of the signalling pathway leading to non-Mendelian inheritance of the *t*-haplotype.

9 Literaturverzeichnis

- Ahmad, K.**, Bracho, G. E., Wolf, D. P., and Tash, J. S. (1995). Regulation of human sperm motility and hyperactivation components by calcium, calmodulin, and protein phosphatases. *Arch. Androl.* 35, 187–208.
- Barrios-Rodiles, M.**, Brown, K. R., Ozdamar, B., Bose, R., Liu, Z., Donovan, R. S., Shinjo, F., Liu, Y., Dembowy, J., Taylor, I. W., et al. (2005). High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science (New York, N. Y.)*, 307, 1621-5.
- Bauer, H.**, Willert, J., Koschorz, B., and Herrmann, B. G. (2005). The t complex-encoded GTPase-activating protein Tagap1 acts as a transmission ratio distorter in mice. *Nature genetics*, 37, 969-73.
- Bauer, H.**, Véron, N., Willert, J., and Herrmann, B. G. (2007). Guanine nucleotide exchange factor Fgd2 reveals that two opposing signaling pathways promote transmission ratio distortion in the mouse. *Genes & development*, 143-147.
- Bauer, H.**, Schindler, S., Charron, Y., Willert, J., Kusecek, B., and Herrmann, B. G. (2012). The Nucleoside Diphosphate Kinase Gene Nme3 Acts as Quantitative Trait Locus Promoting Non-Mendelian Inheritance. *PLoS Genetics*, 8, e1002567.
- Beckerheck, A.**, Zohn, I., Okabe, N., Pollock, A., Baker, K., Sullivan-brown, J., Mcsheene, J., Loges, N. T., Olbrich, H., Haeffner, K., et al. (2011). The coiled-coil domain containing protein CCDC40 is essential for motile cilia function and left-right axis formation. *Nature genetics*, 43, 79-84.
- Boatman, E.** (1991). Bicarbonate : Regulation and of Sperm Hyperactivated Acrosome. *Biology of reproduction*, 44, 806-813.
- Bracho, E.** (1994). Regulation of Sperm Motility : Emerging Evidence for a Major Role for Protein Phosphatases. *Journal of andrology*, 15, 505-509.
- Brokaw, C. J.** (1972). Flagellar Movement: A Sliding Filament Model. *Science*, 178, 455-462.
- Brokaw, C. J. and Kamiya, R.** (1987). Bending patterns of Chlamydomonas flagella: IV. Mutants with defects in inner and outer dynein arms indicate differences in dynein arm function. *Cell Mozil. Cytoskeleton* 8, 68-75.
- Brokaw, C. J.** (1989). Direct measurements of sliding between outer doublet microtubules in swimming sperm flagella. *Science (New York, N. Y.)*, 243, 1593-6.
- Brokaw, C. J.** (1991). Calcium sensors in sea urchin sperm flagella. *Cell motility and the cytoskeleton*, 18, 123-30.

- Brown, P. R.**, Miki, K., Harper, D. B., and Eddy, E. M. (2003). A-kinase anchoring proteins in 4 binding proteins in the fibrous sheath of the sperm flagellum. *Biology of reproduction*, 68, 2241-8.
- Buchold, G. M.** (2012). Meiotic genetics moves forward with SPATA22 (repro42). *Biology of reproduction*, 86, 42.
- Buck, J.**, Sinclair, M. L., Schapal, L., Cann, M. J., and Levin, L. R. (1999). Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 79-84.
- Burton, K. A.**, Treash-Osio, B., Muller, C. H., Dunphy, E. L., and McKnight, G. S. (1999). Deletion of type II regulatory subunit delocalizes protein kinase A in mouse sperm without affecting motility or fertilization. *The Journal of biological chemistry*, 274, 24131-6.
- Bustelo, X. R.**, Vincent, S., and Berenjano, I. M. (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioassays*, 29, 356-370.
- Carr, D. W.**, Fujita, a, Stentz, C. L., Liberty, G. a, Olson, G. E., and Narumiya, S. (2001). Identification of sperm-specific proteins that interact with A-kinase anchoring proteins in a manner similar to the type II regulatory subunit of PKA. *The Journal of biological chemistry*, 276, 17332-8.
- Carrera, A.**, Gerton, G. L., and Moss, S. B. (1994). The major fibrous sheath polypeptide of mouse sperm: structural and functional similarities to the A-kinase anchoring proteins. *Developmental biology*, 165, 272-84.
- Chesley, P. and Dunn, L. C.** (1936) The inheritance of taillessness (anury) in the house mouse. *Genetics*, 21(5):525-536.
- Christensen, A. K.** (1975). Leydig cells. In: Handbook of Physiology, vol. 3. D.W. Kamilton, D.Pfaff, R. W. Goy eds. *American Physiol. Soc.*, 57-94.
- Coghlan, V. M.**, Perrino, B. a, Howard, M., Langeberg, L. K., Hicks, J. B., Gallatin, W. M., and Scott, J. D. (1995). Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science (New York, N.Y.)*, 267, 108-11.
- Colledge, M.**, Scott, J. D., and Road, P. (1999). AKAPs : from structure to function. *Cell*, 9, 216-221.
- Diviani, D. and Scott, J. D.** (2001). AKAP signaling complexes at the cytoskeleton. *Journal of cell science*, 114, 1431-7.
- Dobrovol'skaia-Zawadskaia, N. and Kobozieff, N.** (1932) Les souris anoures et la queue filiforme qui se reproduisent entres elles sans disjunction. *C. R. Soc. Biol.*, 110:182-18.

- Dorus, S.**, Wasbrough, E. R., Busby, J., Wilkin, E. C., and Karr, T. L. (2010). Sperm proteomics reveals intensified selection on mouse sperm membrane and acrosome genes. *Molecular biology and evolution*, 27, 1235-46.
- Ducummon, C. C. and Berger, T.** (2006). Localization of the Rho GTPases and some Rho effector proteins in the sperm of several mammalian species. *Zygote (Cambridge, England)*, 14, 249-57.
- Dutcher, K. S.** (1995). Flagellar assembly in two hundred and fifty easy-to-follow steps. *Elsevier Science Reviews*, 11, 398-404.
- Eddy, E. M.**, Toshimori, K. and O'Brien, D. A. (2003). Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech*, 61(1):103–115.
- Eddy, E. M.** (2007). The scaffold role of the fibrous sheath. *Soc Report Fertil Suppl*, 65, 45-62
- Edwards, D. C.**, Sanders, L. C., Bokoch, G. M., and Gill, G. N. (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nature cell biology*, 1, 253-9.
- Estrada, L.**, Caron, E., and Gorski, J. L. (2001). Fgd1, the Cdc42 guanine nucleotide exchange factor responsible for faciogenital dysplasia, is localized to the subcortical actin cytoskeleton and Golgi membrane. *Human molecular genetics*, 10, 485-95.
- Fawcett, D. W.** (1975). The mammalian spermatozoon. *Dev. Biol.* 44, 394–436.
- Fraser, L. R. and Quinn, P. J.** (1981). A glycolytic product is obligatory for initiation of the sperm acrosome reaction and whiplash motility required for fertilization in the mouse. *Journal of reproduction and fertility*, 61, 25-35.
- Fujita, A.**, Nakamura, K., Kato, T., Watanabe, N., Ishizaki, T., Kimura, K., Mizoguchi, A., and Narumiya, S. (2000). Ropporin, a sperm-specific binding protein of rhophilin, that is localized in the fibrous sheath of sperm flagella. *Journal of cell science*, 113, 103-12.
- Gaillard, A. R.**, Diener, D. R., Rosenbaum, J. L., and Sale, W. S. (2001). Flagellar radial spoke protein 3 is an A-kinase anchoring protein (AKAP). *The Journal of cell biology*, 153, 443-8.
- Gingras, D.**, White, D., Garin, J., Multigner, L., Job, D., Cosson, J., Huitorel, P., Zingg, H., Dumas, F., Gagnon, C. (1996). Purification, cloning, and sequence analysis of a Mr = 30,000 protein from sea urchin axonemes that is important for sperm motility. Relationship of the protein to a dynein light chain. *J. Biol. Chem*, 271: 12807 - 13.
- Goehler, H.**, Lalowski, M., Stelzl, U., Waelter, S., Stroedicke, M., Worm, U., Droege, A., Lindenberg, K. S., Knoblich, M., Haenig, C., Herbst, M., Suopanki, J., Scherzinger,

E., Abraham, C., Bauer, B., Hasenbank, R., Fritzsche, A., Ludewig, A. H., Bussow, K., Coleman, S. H., Gutekunst, C. A., Landwehrmeyer, B. G., Lehrach, H. and Wanker, E. E. (2004): A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington's disease. *Mol Cell*, 15, 853-65.

Habermacher, G. and Sale, W. S. (1997). Regulation of flagellar dynein by phosphorylation of a 138-kD inner arm dynein intermediate chain. *The Journal of cell biology*, 136, 167-76.

Hammer, M. F., Schimenti, J., and Silver, L. M. (1989). Evolution of mouse chromosome 17 and the origin of inversions associated with t haplotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 3261-5.

Hayakawa, M., Matsushima, M., Hagiwara, H., Oshima, T., Fujino, T., Ando, K., Kikugawa, K., Tanaka, H., Miyazawa, K., and Kitagawa, M. (2008). Novel insights into FGD3, a putative GEF for Cdc42, that undergoes SCF(FWD1/beta-TrCP)-mediated proteasomal degradation analogous to that of its homologue FGD1 but regulates cell morphology and motility differently from FGD1. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, 13, 329-42.

Hayashi, M., Yanagisawa, H.-A., Hirono, M., and Kamiya, R. (2002). Rescue of a Chlamydomonas inner-arm-dynein-deficient mutant by electroporation-mediated delivery of recombinant p28 light chain. *Cell motility and the cytoskeleton*, 53, 273-80.

Herrmann, B. G., Koschorz, B., Wertz, K., McLaughlin, K. J., and Kispert, A (1999). A protein kinase encoded by the t complex responder gene causes non-mendelian inheritance. *Nature*, 402, 141-6.

Heuser, T., Raytchev, M., Krell, J., Porter, M. E., Nicastro, D., (2009). The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella. *Jbc*, 6, 921-933.

Hezova, R., Ehrmann, J., and Kolar, Z. (2007). WWOX , A NEW POTENTIAL TUMOR SUPPRESSOR GENE. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 151, 11-15.

Hinsch, K., Habermann, B., Just, I., Hinsch, E., Pfisterer, S., Schill, W.-bernhard, and Aktories, K. (1993). ADP-ribosylation of Rho proteins inhibits sperm motility. *FEBS*, 334, 32-36.

Ho, H.-C. and Suarez, S. S. (2001). Review Hyperactivation of mammalian spermatozoa : function and regulation. *Reproduction*, 122, 519-526.

Ho, H.-C., Granish, K. A., and Suarez, S. S. (2002). Hyperactivated Motility of Bull Sperm Is Triggered at the Axoneme by Ca²⁺ and Not cAMP. *Developmental biology*, 217,

208-217.

Ho, H.-C. and Suarez, S. S. (2003). Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biology of reproduction*, 68, 1590-6.

Hoshino, M., Sone, M., Fukata, M., Kuroda, S., Kaibuchi, K., Nabeshima, Y., and Hama, C. (1999). Identification of the stef gene that encodes a novel guanine nucleotide exchange factor specific for Rac1. *The Journal of biological chemistry*, 274, 17837-44.

Huber, C., Mårtensson, A., Bokoch, G. M., Nemazee, D., and Gavin, A. L. (2008). FGD2, a CDC42-specific exchange factor expressed by antigen-presenting cells, localizes to early endosomes and active membrane ruffles. *The Journal of biological chemistry*, 283, 34002-12.

Huckins, C. (1978). Spermatogonial intercellular bridges in whole-mounted seminiferous tubules from normal and irradiated rodent testes. *The American journal of anatomy*, 153, 97-121.

Hutson, J. C. (1994). Testicular macrophages. *Int Rev Cytol*, 149, 99-143.

Huttlin, E. L., Jedrychowski, M. P., Elias, J. E., Goswami, T., Rad, R., Beausoleil, S. a, Villén, J., Haas, W., Sowa, M. E., and Gygi, S. P. (2010). A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell*, 143, 1174-89.

Iden, S. and Collard, J. G. (2008). Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. Nature reviews. *Molecular cell biology*, 9, 846-59.

Ignotz, G. G. and Suarez, S. S. (2005). Calcium/calmodulin and calmodulin kinase II stimulate hyperactivation in demembrated bovine sperm. *Biology of reproduction*, 73, 519-26.

Ishijima, S., Baba, S. a, Mohri, H., and Suarez, S. S. (2002). Quantitative analysis of flagellar movement in hyperactivated and acrosome-reacted golden hamster spermatozoa. *Molecular reproduction and development*, 61, 376-84.

Jaffe, A. B. and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annual review of cell and developmental biology*, 21, 247-69.

Johnson, L. L., Katt, D. F., and Overstreet, J. W. (1981). The Movement Characteristics of Rabbit Spermatozoa Before and After Activation. *Gamete Research*, 282, 275-282.

Kagami, O. and Kamiya, R. (1992). Translocation and rotation of microtubules caused by multiple species of Chlamydomonas inner-arm dynein. *Journal of cell science*, 664, 653-664.

- Kaibuchi, K.**, Kuroda, S., and Amano, M. (1999). REGULATION OF THE CYTOSKELETON AND CELL ADHESION BY THE RHOF FAMILY GTPASES IN MAMMALIAN CELLS. *Annual review of biochemistry*, 459-486.
- Kamiya, R.**, E. Kurimoto, and E. Muto. (1991) . Two types of Chlamydomonas flagellar mutants missing different components of inner-arm dynein . *J. Cell Biol*, 112 :441-447.
- Kamiya, R.** (1995). Exploring the function of inner and outer dynein arms with Chlamydomonas mutants. *Cell Motil Cytoskeleton*, 32(2):98–102.
- Kastury, K.**, Taylor, W. E., Shen, R., Arver, S., Gutierrez, M., Fisher, C. E., Coucke, P. J., Van Hauwe, P., Van Camp, G., and Bhasin, S. (1997). Complementary deoxyribonucleic acid cloning and characterization of a putative human axonemal dynein light chain gene. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 82, 3047-53.
- Kerppola, T. K.** (2006). Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nature protocols*, 1, 1278-86.
- King, S. J. and Dutcher, S. K.** (1997) Phosphoregulation of an inner dynein arm complex in Chlamydomonas reinhardtii is altered in phototactic mutant strains. *J. Cell Biol*,136:177–191.
- Kispert, A.**, Stoger, R. J., Caparros, M. and Herrmann B. G. (1999). The mouse rsk3 gene maps to the leh66 elements carrying the t-complex responder tcr. *Mamm Genome*, 10(8):794–802.
- Langeberg, L. K. and Scott, J. D.** (2005). A-kinase-anchoring proteins. *Journal of cell science*, 118, 3217-20.
- La Salle, S.**, Palmer, K., O'Brien, M., Schimenti, J. C., Eppig, J., and Handel, M. A. (2012). Spata22, a novel vertebrate-specific gene, is required for meiotic progress in mouse germ cells. *Biology of reproduction*, 86, 45.
- LeDizet, M. and Piperno, G.** (1995a). The light chain p28 associates with a subset of inner dynein arm heavy chains in Chlamydomonas axonemes. *Molecular biology of the cell*, 6, 697-711.
- LeDizet, M. and Piperno, G.** (1995b). ida4-1, ida4-2, and ida4-3 are intron splicing mutations affecting the locus encoding p28, a light chain of Chlamydomonas axonemal inner dynein arms. *Molecular biology of the cell*, 6, 713-23.
- Lin, J.**, Heuser, T., Carbajal-González, B. I., Song, K. and Nicastro, D. (2012). The structural heterogeneity of radial spokes in cilia and flagella is conserved. *Cytoskeleton*, 69, 88–100.

- Lindemann, C. B. and Goltz, J. S.** (1988). Calcium regulation of flagellar curvature and swimming pattern in triton X-100-extracted rat sperm. *Cell motility and the cytoskeleton*, 10, 420-31.
- Luck, D.**, Piperno, G., Ramanis, Z., and Huang, B. (1977). Flagellar mutants of *Chlamydomonas*: studies of radial spoke-defective strains by dikaryon and revertant analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 3456-60.
- Luconi, M.**, Cantini, G., Baldi, E., and Forti, G. (2011). Role of a-kinase anchoring proteins (AKAPs) in reproduction. *Frontiers in Bioscience*, 16, 1315-1330.
- Lyon, M. F.** (1984). Transmission ratio distortion in mouse t-haplotypes is due to multiple distorter genes acting on a responder locus. *Cell*, 37, 621-8.
- Lyon, M. F.** (1986). Male sterility of the mouse t-complex is due to homozygosity of the distorter genes. *Cell*, 44 (2): 357 – 63.
- Lyon, M. F.** (1987). Distorter genes of the mouse t-complex impair male fertility when heterozygous. *Genet Res*, 49(1):57–60.
- Lyon, M. F.**, Zenthon, J., Evans, E. P., Burtenshaw, M. D., and Willison, K. R. (1988). Extent of the mouse t complex and its inversions shown by in situ hybridization. *Immunogenetics*, 27, 375-82.
- Lyon, M. F.** (1990). Search for differences among t haplotypes in distorter and responder genes. *Genet Res*, 55(1):13–19.
- Lyon, M. F.** (2003). Transmission ratio distortion in mice. *Annual review of genetics*, 37, 393-408.
- Lyon, M. F.** (2005). Elucidating mouse transmission ratio distortion. *Nature genetics*, 37, 924-5.
- Mandal, A.**, Naaby-Hansen, S., Wolkowicz, M. J., Klotz, K., Shetty, J., Retief, J. D., Coonrod, S. a, Kinter, M., Sherman, N., Cesar, F., et al. (1999). FSP95, a testis-specific 95-kilodalton fibrous sheath antigen that undergoes tyrosine phosphorylation in capacitated human spermatozoa. *Biology of reproduction*, 61, 1184-97.
- Marín-Briggiler, C. I.**, Jha, K. N., Chertihin, O., Buffone, M. G., Herr, J. C., Vazquez-Levin, M. H., and Visconti, P. E. (2005). Evidence of the presence of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in human sperm and its involvement in motility regulation. *Journal of cell science*, 118, 2013-22.
- Marquez, B. and Suarez, S. S.** (2004). Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biology of reproduction*, 70, 1626-33.

- Matsuo, N.**, Hoshino, M., Yoshizawa, M., and Nabeshima, Y.-ichi (2002). Characterization of STEF, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1, required for neurite growth. *The Journal of biological chemistry*, 277, 2860-8.
- Matsuo, N.**, Terao, M., Nabeshima, Y.-ichi, and Hoshino, M. (2003). Roles of STEF/Tiam1, guanine nucleotide exchange factors for Rac1, in regulation of growth cone morphology. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24, 69-81.
- Means, A. R.**, Tash, J. S., and Chafouleas, J. G. (1982). Physiological implications of the presence, distribution, and regulation of calmodulin in eukaryotic cells. *Physiol. Rev.*, 62, 1-39.
- Mei, X.**, Singh, I. S., Erlichman, J., and Orr, G. a (1997). Cloning and characterization of a testis-specific, developmentally regulated A-kinase-anchoring protein (TAKAP-80) present on the fibrous sheath of rat sperm. *European journal of biochemistry / FEBS*, 246, 425-32.
- Merveille, A.-C.**, Davis, E. E., Becker-Heck, A., Legendre, M., Amirav, I., Bataille, G., Belmont, J., Beydon, N., Billen, F., Clément, A., et al. (2011). CCDC39 is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex and for normal ciliary motility in humans and dogs. *Nature genetics*, 43, 72-8.
- Michnick, S. W.**, Ear, P. H., Manderson, E. N., Remy, I., and Stefan, E. (2007). Universal strategies in research and drug discovery based on protein-fragment complementation assays. *Nature reviews. Drug discovery*, 6, 569-82.
- Mizuno, N.**, Taschner, M., Engel, B. D., and Lorentzen, E. (2012). Structural Studies of Ciliary Components. *Journal of molecular biology*, 422, 163-180.
- Morillas, H. N.**, Zariwala, M., and Knowles, M. R. (2007). Genetic causes of bronchiectasis: primary ciliary dyskinesia. *Respiration; international review of thoracic diseases*, 74, 252-63.
- Nakamura, K.**, Fujita, A., Murata, T., Watanabe, G., Mori, C., Fujita, J., Watanabe, N., Ishizaki, T., Yoshida, O., and Narumiya, S. (1999). Rhophilin, a small GTPase Rho-binding protein, is abundantly expressed in the mouse testis and localized in the principal piece of the sperm tail. *FEBS letters*, 445, 9-13.
- Ogawa, K.**, Takai, H., Ogiwara, a, Yokota, E., Shimizu, T., Inaba, K., and Mohri, H. (1996). Is outer arm dynein intermediate chain 1 multifunctional? *Molecular biology of the cell*, 7, 1895-907.
- Olds-Clarke, P.** (1986). Motility characteristics of sperm from the uterus and oviducts of female mice after mating to congenic males differing in sperm transport and fertility. *Biology of reproduction*, 34, 453-67.

- Olds-Clarke, P.** (1989). Sperm from tw32/+ mice: capacitation is normal, but hyperactivation is premature and nonhyperactivated sperm are slow. *Developmental biology*, 131, 475-82.
- Olds-Clarke, P. and Johnson, L. R.** (1993). *t* Haplotyps in the Mouse compromise Sperm Flagellar Fuction. *Developmental biology*, 155, 14-25.
- Olds-Clarke, P.** (1997). Models for male infertility: the t haplotypes. *Reviews of reproduction*, 2, 157-64.
- Palidwor, G. A.,** Shcherbinin, S., Huska, M. R., Rasko, T., Stelzl, U., Arumughan, A., Foulle, R., Porras, P., Sanchez-Pulido, L., Wanker, E. E., Andrade-Navarro, M. A. (2009): Detection of alpha-rod protein repeats using a neural network and application to huntingtin. *PLoS Comput Biol*, 5, 1000304.
- Patel-King, R. S.,** Gorbatyuk, O., Takebe, S., and Stephen, M. K. (2004). Flagellar Radial Spokes Contain a Ca^{2+} - stimulated Nucleoside Diphosphate Kinase. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 3891-3902.
- Pigino, G. and Ishikawa, T.** (2012). Axonemal radial spokes 3D structure, function and assembly. *The Journal of cell biology*, 195, 673-87.
- Porter, M. E. and Sale, W. S.** (2000). The 9 + 2 axoneme anchors multiple inner arm dyneins and a network of kinases and phosphatases that control motility. *The Journal of cell biology*, 151, F37-42.
- Rashid, S.,** Breckle, R., Hupe, M., Geisler, S., and Doerwald, N. (2006). The Murine Dnalil Gene Encodes a Flagellar Protein That Interacts With the Cytoplasmic Dynein Heavy Chain 1. *Reproduction*, 794, 784-794.
- Remy, I. & Michnick, S. W.** (2004). Regulation of Apoptosis by the Ft1 Protein , a New Modulator of Protein Kinase B / Akt. *Society*, 24, 1493-1504.
- Rhoades, M. M.** (1941). Preferential Segregation in Maize. *Genetics*, 395-407.
- Rual, J.-F.,** Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot, A., Li, N., Beriz, G. F., Gibbons, F. D., Dreze, M., Ayivi-Guedehoussou, N., et al. (2005). Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature*, 437, 1173-8.
- Russell, L.,** Ettlín, R., Hikim,A., and Clegg, E. (1990). Histological and histopathological evaluation of the testis. *Cache River Press*, 1990.
- San Agustin, J. T.** and Witman, G. B. (1994). Role of cAMP in the reactivation of demembranated ram spermatozoa. *Cell motility and the cytoskeleton*, 27, 206-18.
- Sander, E. E.,** ten Klooster, J. P., van Delft, S., van der Kammen, R. a, and Collard,

- J. G. (1999). Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *The Journal of cell biology*, 147, 1009-22.
- Sandler, L. and Novitski, E.** (1957). Meiotic Drive as an Evolutionary Force. *The American Naturalist*, 91, 105-110.
- Sale, W. S. and Satir, P.** (1977). Direction of active sliding of microtubules in Tetrahymena cilia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 2045-9.
- Satir, P.** (1968). Studies on cilia. 3. Further studies on the cilium tip and a sliding filament model of ciliary motility. *The Journal of cell biology*, 39, 77-94.
- Schimenti, J.** (2000). Segregation distortion of mouse t-haplotypes the molecular basis emerges. *Trends in genetics: TIG*, 16, 240-3.
- Si, Y. and Olds-Clarke, P.** (2000). Evidence for the involvement of calmodulin in mouse sperm capacitation. *Biology of reproduction*, 62, 1231-9.
- Silver, L. M.** (1985). Mouse t-Haplotypes. *Annual review of genetics*, 179-208.
- Silver, L. M. and Artzt, K.** (1981). Recombination suppression of mouse t-haplotypes due to chromatin mismatching. *Nature*, 290(5801):68-70.
- Silver, L. M. and Buck, C.** (1993). The mouse t complex distorter-3 (tcd-3) locus and transmission ratio distortion. *Genet Res*, 62(2):133-137.
- Skålhegg, B. S., Huang, Y., Su, T., Idzerda, R. L., McKnight, G. S., and Burton, K. a** (2002). Mutation of the Calpha subunit of PKA leads to growth retardation and sperm dysfunction. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 16, 630-9.
- Smith, E. F. and Lefebvre, P. A.** (1996). PF16 Encodes a Protein with Armadillo Repeats and Localizes to a Single Microtubule of the Central Apparatus in Chlamydomonas Flagella. *The Journal of cell biology*, 132, 359-370.
- Smith, E. F. and Yang, P.** 2004. The radial spokes and central apparatus: Mechanochemical transducers that regulate flagellar motility. *Cell Motil Cytoskeleton*, 57(1):8-17.
- Stauss, C. R., Votta, T. J., and Suarez, S. S.** (1995). Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biology of reproduction*, 53, 1280-5.
- Stelzl, U., Worm, U., Lalowski, M., Haenig, C., Brembeck, F. H., Goehler, H., Stroedicke, M., Zenkner, M., Schoenherr, A., Koeppen, S., et al.** (2005). A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell*, 122, 957-68.
- Suarez, S. S., Vincenti, L., and Ceglia, M. W.** (1987). Hyperactivated motility induced

in mouse sperm by calcium ionophore A23187 is reversible. *The Journal of experimental zoology*, 244, 331-6.

Suarez, S. S. and Katz, F. (1991). Evidence for the of Hyperactivated Motility in Sperm1 of California. *Biology of reproduction*, 381, 375-381.

Summers, K. E. and Gibbons, I. R. (1971). Adenosine triphosphate-induced sliding of tubules in trypsin-treated flagella of sea-urchin sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68, 3092-6.

Suzuki, T., Fujinoki, M., Shibahara, H., and Suzuki, M. (2010). Regulation of hyperactivation by PPP2 in hamster spermatozoa. *Reproduction (Cambridge, England)*, 139, 847-56.

Szczepanowska, J. (2009). Involvement of Rac/Cdc42/PAK pathway in cytoskeletal rearrangements. *Acta biochimica Polonica*, 56, 225-34.

Tajika, Y., Sakai, N., Tamura, T., Yao, M., Watanabe, N., and Tanaka, I. (2005). Crystal structure of PH0010 from *Pyrococcus horikoshii*, which is highly homologous to human AMMECR1C-terminal region. *Proteins*, 58, 501-3.

Takahashi, M., Shibata, H., Shimakawa, M., Miyamoto, M., Mukai, H., and Ono, Y. (1999). Characterization of a novel giant scaffolding protein, CG-NAP, that anchors multiple signaling enzymes to centrosome and the golgi apparatus. *The Journal of biological chemistry*, 274, 17267-74.

Tash, J. S. (1982). Regulation of Sperm of Protein Phosphorylation Monophosphate and Motility and Calcium by Cyclic Adenosine reviews. *Biology of reproduction*, 763, 745-763.

Tash, J. S. and Means, A. R. (1987). Ca²⁺ regulation of spermaxonemal motility. *Methods Enzymol.*, 139, 808-823.

Tash, J. S., Krinks, M., Patel, J., Means, R. L., Klee, C. B., and Means, a R. (1988). Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. *The Journal of cell biology*, 106, 1625-33.

Tash, J. S. (1989). Views and Reviews - Protein Phosphorylation: The Second Messenger Signal Transducer of Flagellar Motility. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 339, 332-339.

Tash, J S. and Bracho, G. E. (1994). Regulation of Sperm Motility : Emerging Evidence for a Major Role for Protein Phosphatases Minireview Second Messenger Pathways The Microtubule Motor , Dynein , as a Target for Second Messenger Regulation Motility and Phosphorylation Changes Produced by C. *Journal of Andrology*, 15, 505-509.

Tash, J. S. and Bracho, G. E. (1998). Identification of phosphoproteins coupled to initiation of motility in live epididymal mouse sperm. *Biochemical and biophysical research*

communications, 251, 557-63.

Tessler, S. and Olds-Clarke, P. (1985). Linear and Nonlinear Mouse Sperm Motility Patterns patterns. *Journal of andrology*, 6, 35-44.

Turner, R. M. (2006). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, fertility, and development*, 18, 25-38.

Tzima, E. (2006). Role of small GTPases in endothelial cytoskeletal dynamics and the shear stress response. *Circulation research*, 98, 176-85.

Vadlamudi, R. K., Bagheri-Yarmand, R., Yang, Z., Balasenthil, S., Nguyen, D., Sahin, A. a, den Hollander, P., and Kumar, R. (2004). Dynein light chain 1, a p21-activated kinase 1-interacting substrate, promotes cancerous phenotypes. *Cancer cell*, 5, 575-85.

Van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes & Development*, 11, 2295-2322.

Ventelä, S., Toppari, J., and Parvinen, M. (2003). Intercellular organelle traffic through cytoplasmic bridges in early spermatids of the rat: mechanisms of haploid gene product sharing. *Molecular biology of the cell*, 14, 2768-80.

Véron, N., Bauer, H., Weisse, A. Y., Lüder, G., Werber, M., and Herrmann, B. G. (2009). Retention of gene products in syncytial spermatids promotes non-Mendelian inheritance as revealed by the t complex responder. *Genes & development*, 23, 2705-10.

Vijayaraghavan, S., Liberty, G. a, Mohan, J., Winfrey, V. P., Olson, G. E., and Carr, D. W. (1999). Isolation and molecular characterization of AKAP110, a novel, sperm-specific protein kinase A-anchoring protein. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 13, 705-17.

Visconti, P. E., Johnson, L. R., Oyaski, M., Fornés, M., Moss, S. B., Gerton, G. L., and Kopf, G. S. (1997). Regulation, localization, and anchoring of protein kinase A subunits during mouse sperm capacitation. *Developmental biology*, 192, 351-63.

Vitelli, F., Piccini, M., Caroli, F., Franco, B., Malandrini, a, Pober, B., Jonsson, J., Sorrentino, V., and Renieri, a (1999). Identification and characterization of a highly conserved protein absent in the Alport syndrome (A), mental retardation (M), midface hypoplasia (M), and elliptocytosis (E) contiguous gene deletion syndrome (AMME). *Genomics*, 55, 335-40.

Vitelli, F., Meloni, I., Fineschi, S., Favara, F., Tiziana Storlazzi, C., Rocchi, M., and Renieri, a (2000). Identification and characterization of mouse orthologs of the AMMECR1 and FACL4 genes deleted in AMME syndrome: orthology of Xq22.3 and MmuXF1-F3. *Cytogenetics and cell genetics*, 88, 259-63.

Vizoso Pinto, M. G., Villegas, J. M., Peter, J., Haase, R., Haas, J., Lotz, A. S., Mun-

tau, A. C., and Baiker, A. (2009). LuMPIS-a modified luminescence-based mammalian interactome mapping pull-down assay for the investigation of protein-protein interactions encoded by GC-low ORFs. *Proteomics*, 9, 5303-8.

Wang, R.-A., Zhao, M., Meistrich, M. L., and Kumar, R. (2005). Stage-specific expression of dynein light chain-1 and its interacting kinase, p21-activated kinase-1, in rodent testes: implications in spermiogenesis. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 53, 1235-43.

Wargo, M. J. and Smith, E. F. (2003). Asymmetry of the central apparatus defines the location of active microtubule sliding in *Chlamydomonas* flagella. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 137-42.

Weimann, M. (2012). A proteome-wide screen utilizing second generation sequencing for the identification of lysine and arginine methyltransferase protein interactions. *Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I, Humboldt-Universität zu Berlin*, Seiten 38-41 & 47-49.

Westenbroek, R. E. and Babcock, D. F. (1999). Discrete Regional Distributions Suggest Diverse Functional Roles of Calcium Channel $\alpha 1$ Subunits in Sperm. *Developmental biology*, 469, 457-469.

White, D. R. and Aitken, R. J. (1989). Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete research*, 22, 163-77.

Wiesner, B., Weiner, J., Middendorff, R., Hagen, V., and Kaupp, U. B. (1998). Cyclic Nucleotide-gated Channels on the Flagellum Control Ca^{2+} Entry into Sperm. *The Journal of Biological Chemistry*, 142, 473-484.

Wirschell, M., Hendrickson, T., and Sale, W. S. (2007). Keeping an eye on I1: I1 dynein as a model for flagellar dynein assembly and regulation. *Cell motility and the cytoskeleton*, 64, 569-79.

Wirschell, M., Zhao, F., Yang, C., Yang, P., Diener, D., Gaillard, A., Rosenbaum, J. L., and Sale, W. S. (2008). Building a radial spoke: flagellar radial spoke protein 3 (RSP3) is a dimer. *Cell motility and the cytoskeleton*, 65, 238-48.

Wishart, M. J. and Dixon, J. E. (2002). The archetype STYX/dead-phosphatase complexes with a spermatid mRNA-binding protein and is essential for normal sperm production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 2112-7.

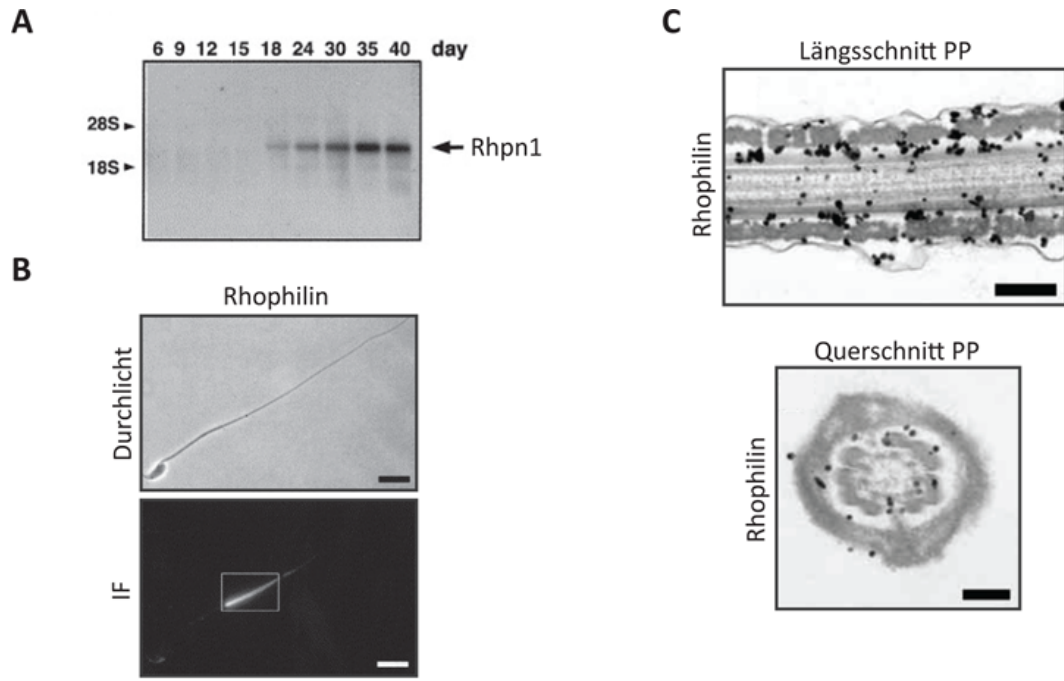
Wittmann, T. and Waterman-Storer, C. M. (2001). Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *Journal of cell science*, 114, 3795-803.

- Worseck, J. M.**, Grossmann, A., Weimann, M., Hegele, A., and Stelzl, U. (2012). Two Hybrid Technologies. *Methods in Molecular Biology*, 812, 63-87.
- Wuttke, M. S.**, Buck, J., and Levin, L. R. (2001). Bicarbonate-regulated soluble adenylyl cyclase. *JOP : Journal of the pancreas*, 2, 154-8.
- Xiao, L.**, Wang, Y., Zhou, Y., Sun, Y., Sun, W., Wang, L., Zhou, C., Zhou, J., and Zhang, J. (2010). Identification of a novel human cancer/testis gene MAEL that is regulated by DNA methylation. *Molecular biology reports*, 37, 2355-60.
- Yagi, T. and Kamiya, R.** (1995). Novel Mode of Hyper-Oscillation in the Paralyzed Axoneme of a Chlamydomonas Mutant Lacking the central-Pair Microtubules. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 31, 207-214.
- Yanagimachi, R.** (1970). THE MOVEMENT OF GOLDEN HAMSTER. *J. Reprod. Fertil.*, 23, 193-196.
- Yanagimachi, R.** 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil, E. and Neil, J.D., editors. *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition. New York: Raven Press. p. 189-317.
- Yanagisawa, H. a and Kamiya, R.** (2001). Association between actin and light chains in Chlamydomonas flagellar inner-arm dyneins. *Biochemical and biophysical research communications*, 288, 443-7.
- Yang, P.**, Fox, L., Colbran, R. J., and Sale, W. S. (2000). Protein phosphatases PP1 and PP2A are located in distinct positions in the Chlamydomonas flagellar axoneme. *Journal of cell science*, 113 (Pt 1, 91-102.
- Yoshida, M.**, Kawano, N., and Yoshida, K. (2008). Control of sperm motility and fertility: diverse factors and common mechanisms. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65, 3446-57.
- Yoshida, S.** (2010). Stem cells in mammalian spermatogenesis. *Development, growth & differentiation*, 52, 311-7.
- Zhang, B.**, Chernoff, J., and Zheng, Y. (1998). Interaction of Rac1 with GTPase-activating Proteins and. *journal of biological chemistry*, 273, 8776-8782.

10 Publikationsverzeichnis

Bauer, H., **Schindler, S.**, Charron, Y., Willert, J., Kusecek, B., and Herrmann, B. G. (2012). The Nucleoside Diphosphate Kinase Gene *Nme3* Acts as Quantitative Trait Locus Promoting Non-Mendelian Inheritance. *PLoS Genetics*, 8, e1002567.

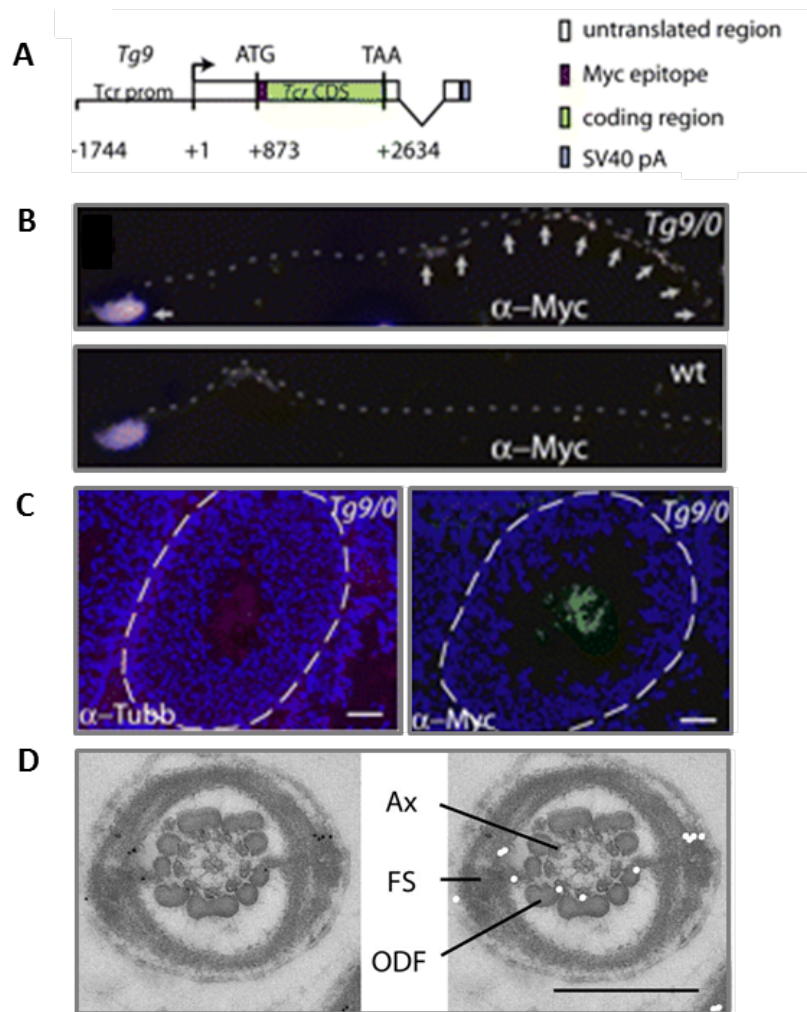
11 Anhang



Nakamura et al., 1999 (modifiziert)

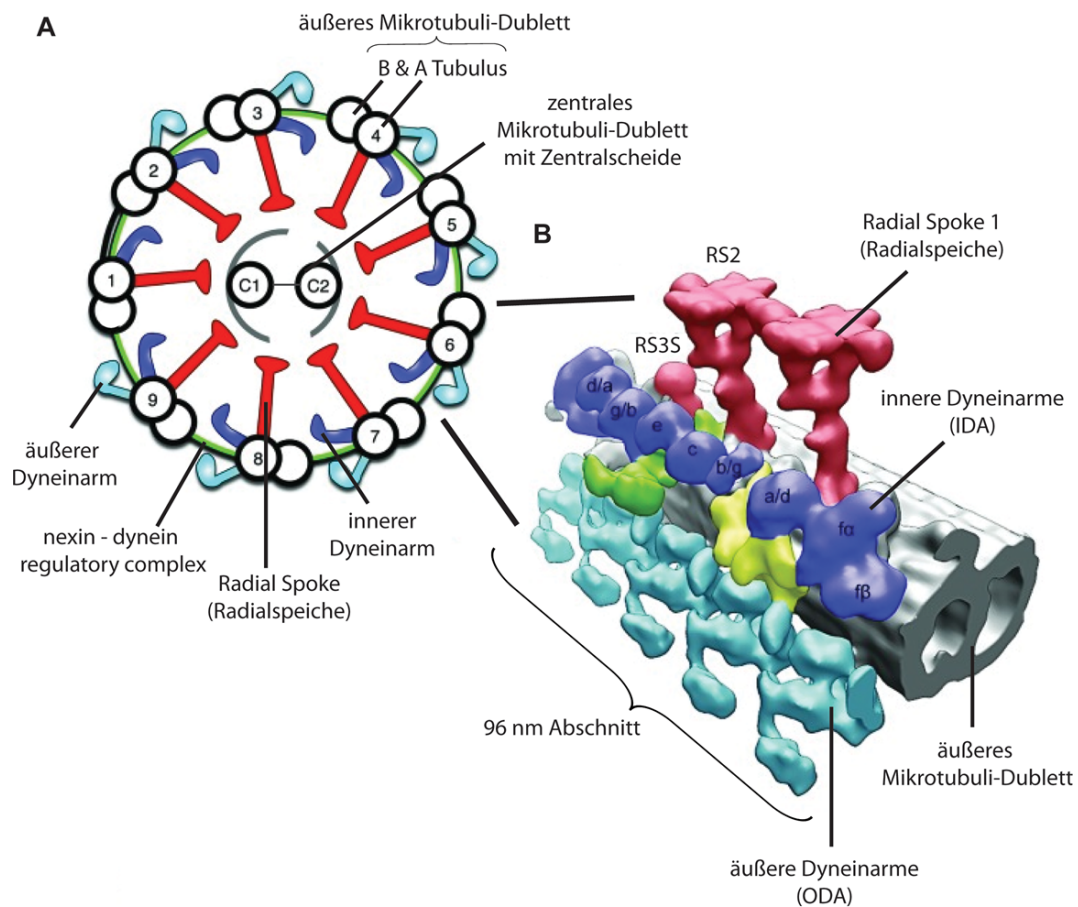
Fujita et al., 2000 (modifiziert)

Abbildung 58: Expression von Rhp1 mRNA im Maushoden und RHPN1 Protein im Spermienflagellum. A: Expression von Rhp1 mRNA während der Hodenentwicklung in der Maus, Verwendung von 1 µg poly(A)⁺ RNA aus Maushoden verschiedener postnataler Stadien zeigt Rhp1 mRNA Expression ab Tag 18 (Nakamura et al., 1999); B: Lokalisation von RHPN1 Protein im Hauptteil (*Principial Piece*) des Spermienflagellums durch Immunfluoreszenzfärbung mit einem affinitätsgereinigten anti-Rhp1 Antikörper, Maßstab: 10 µm (Nakamura et al., 1999). C: Subzelluläre Lokalisation von RHPN1 Protein vornehmlich an den *Outer Dense Fibers*, zu einem kleineren Prozentsatz auch an den *Fibrouse Sheath* im Flagellum, Maßstab: 200 nm (Fujita et al., 2000).



Véron et al., 2009 (modifiziert)

Abbildung 59: Molekulare Eigenschaften des TCR-Proteins (*Responder*). A: Aufbau des Myc-Tcr Transgens *Tg9*. B: Lokalisation des Tcr-Proteins (gelb) im Principal Piece von Spermatozoen eines *Tg9/0* Männchens mittels Immunfluoreszenz mit einem anti-Myc Antikörper, als Negativkontrolle dient die Lokalisation in *wt*-Spermatozoen, DAPI (blau): Kernfärbung C: Lokalisation des TCR-Proteins (grün) in Querschnitten von Hodenkanälchen eines *Tg9/0* Männchens mittels Immunfluoreszenz mit einem anti-Myc Antikörper zeigt, dass das TCR-Protein an Spermatozoen (Lumen) des Hodenkanälchens lokalisiert ist. Als Positivkontrolle für Spermatozoen wurde ein anti-Tubulin Antikörper verwendet (rot), DAPI (blau): Kernfärbung D: Subzelluläre Lokalisation des TCR-Proteins an den *Fibrouse Sheath* und an den *Outer Dense Fibers* im Querschnitt des Hauptstücks [*Principal Piece*] eines *Tg9/0* Spermatozoen durch Immunogoldmarkierung und Elektronenmikroskopie, Maßstab: 500 nm. (Véron et al., 2009)



Pigino and Ishikawa, 2012 (modifiziert)

Abbildung 60: Schematische Querschnittsdarstellung eines Axonems (A) und Anordnung der äußeren Dyneinarme, der inneren Dyneinarme und der *Radial Spokes* entlang eines 96 nm Abschnittes am äußeren Mikrotubuli-Dublett (B). A: Querschnitt eines Axonems. 1-9: äußere Mikrotubuli-Dubletts bestehend aus A und B Tubulus, mit Dyneinen jeweils am A-Tubulus. C1/C2: inneres oder zentrales Mikrotubuli-Dublett mit Zentralscheide. hell blau: äußere Dyneinarme (ODAs). dunkel blau: innere Dyneinarme (IDAs). grün: Nexin-Dynein regulatorischer Komplex. rot: *Radial Spokes*. B: komplexe Anordnung der äußeren Dyneinarme (ODAs), der inneren Dyneinarme (IDAs) und der *Radial Spokes* (RS) entlang eines 96 nm Abschnittes am äußeren Mikrotubuli-Dublett. grau: äußere Mikrotubuli-Dubletts bestehend aus A und B Tubulus. hell blau: äußere Dyneinarme (ODAs). dunkel blau: innere Dyneinarme bzw. Isoformen a bis f (IDAs). grün: Nexin-Dynein regulatorischer Komplex. rot: *Radial Spokes* (RS1, RS2 und das verkürzte RS3S) (Pigino & Ishikawa, 2012).

Abbildungsverzeichnis

1	Genetische Organisation verschiedener <i>t</i> -Haplotypen	3
2	Molekulares Zusammenspiel der <i>t</i> -Komplex Faktoren	6
3	Zelluläre Expression und Organisation der <i>t</i> -Komplex Faktoren	8
4	Molekulares Zusammenspiel der <i>t</i> -Komplex Faktoren	11
5	Schematische Darstellung eines Querschnittes durch ein Hodenkanälchen . .	13
6	Darstellung der Spermatogenese	14
7	Schematische Darstellung der Spermienmotilität vom Hoden bis zur Befruchtung der Eizelle	15
8	Vergleich normal aktivierter und hyperaktivierter Bullen-Spermatozoen . .	16
9	Schematische Darstellung eines Säugerspermatozoen	18
10	Die Entstehung der Flagellenbewegung	21
11	Ablauf des Hefe-Zwei-Hybrid Ansatzes	29
12	Schematische Darstellung der klonierten Konstrukte für Smok1, Fgd2, Tagap1, Nme3 und Tiam2	31
13	Zusammenfassende Darstellung der Smok-Prey Interaktionen aus der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse, unter Angabe der Interaktionsstärke	33
14	Zusammenfassende Darstellung der <i>Distorter</i> -Prey Interaktionen aus der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse, unter Angabe der Interaktionsstärke	34
15	Protein-Protein-Interaktions-Netzwerk zwischen <i>t</i> -Komplex Faktoren und den identifizierten Bindeproteinen	35
16	Zusammenfassende Darstellung der Preys, die neben SMOK1 parallel einen <i>Distorter</i> binden	37
17	Klassifizierung der identifizierten Bindungspartner	38
18	RT-PCR Analyse der Gene <i>Ammecr1</i> , <i>Akap9</i> , <i>Rhpn1</i> , <i>Spata22</i> und <i>Dnali1</i>	44
19	<i>In Situ</i> Hybridisierungs-Analyse für <i>Ammecr1</i> , <i>Akap9</i> , <i>Rhpn1</i> , <i>Spata22</i> und <i>Dnali1</i> mRNA in Hoden-Querschnitten	45
20	Lokalisationsanalyse von TUBULIN und vom Sekundärantikörper in Testisquerschnitten und in isolierten wt Spermatozoen des Nebenhodens	47
21	Lokalisationsanalyse von AMMECR1 in Testisquerschnitten und in isolierten wt Spermatozoen des Nebenhodens	48
22	Lokalisationsanalyse von AKAP9 in Testisquerschnitten und in isolierten wt Spermatozoen des Nebenhodens	49
23	Lokalisationsanalyse von SPATA22 in Testisquerschnitten und in isolierten wt Spermatozoen des Nebenhodens	50
24	Lokalisationsanalyse von DNALI1 in Testisquerschnitten und in isolierten wt Spermatozoen des Nebenhodens	51
25	Lokalisationsanalyse der Proteine AMMECR1, AKAP9 und DNALI1 in isolierten wt Spermatozoen des Nebenhodens	52

26	Subzelluläre Lokalisationsanalyse von TUBULIN im Flagellum von wt-Spermien	54
27	Subzelluläre Lokalisationsanalyse der Proteine AMMECR1 und AKAP9 im Flagellum von wt-Spermatozoen	56
28	Subzelluläre Lokalisationsanalyse der Proteine SPATA22 und DNALI1 im Flagellum von wt-Spermatozoen	57
29	Prozentuale Verteilung der Proteine TUBULIN, AMMECR1, AKAP9 und DNALI1 im Falgellum von wt-Spermatozoen des Nebenhodens	58
30	Verkleinertes Interaktions-Netzwerk zwischen <i>t</i> -Komplex Faktoren und Bindeproteinen, erweitert um publizierte Interaktionen mit kleinen RHO-GTPasen	60
31	Schematische Darstellung der Lumineszenz basierte IP Analyse	62
32	Lumineszenz basierte IP Analyse zwischen AMMECR1-V5/Fire und SMOK-ProtA-Varianten, sowie zwischen AMMECR1-V5/Fire und NME3-ProtA .	64
33	Lumineszenz basierte IP Analyse zwischen RHPN1-V5/Fire und SMOK- bzw. TAGAP1-ProtA-Varianten	66
34	Lumineszenz basierte IP Analyse für SPATA22, DNALI1 und AKAP9 . . .	67
35	Zusammenfassung der Lumineszenz basierten IP-Analyse	69
36	Protein-Protein-Interaktions-Netzwerk zwischen <i>t</i> -Komplex Faktoren und Bindeproteinen, basierend auf den identifizierten Hefe-Interaktionen, validiert durch Lumineszenz basiert IP-Analysen, erweitert um publizierte Interaktionen mit kleinen RHO-GTPasen	71
37	Schematische Darstellung der bimolekulare Fluoreszenzkomplementation . .	72
38	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation für SMOK1-AMMECR1-Interaktionen	74
39	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation für SMOK1-Interaktionen	75
40	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation für DNALI1-Interaktionen . . .	77
41	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation AKAP9-Interaktionen	78
42	Zusammenfassung der positiv getesteten Interaktionen in der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation	79
43	Protein-Protein-Interaktions-Netzwerk zwischen <i>t</i> -Komplex Faktoren und Bindeproteinen, validiert durch Lumineszenz basiert IP-Analysen und Bimolekulare Fluoreszenzkomplementationsanalysen, erweitert um publizierte Interaktionen mit kleinen RHO-GTPasen	80
44	SMOK1 FL und AMMECR1 interagieren <i>in vitro</i>	81
45	SMOK1 FL bzw. SMOK1 RD und AMMECR1 interagieren <i>in vitro</i>	82
46	SMOK1 FL und RHPN1 interagieren <i>in vitro</i>	83
47	Protein-Protein-Interaktions-Netzwerk zwischen <i>t</i> -Komplex Faktoren und Bindeproteinen, validiert durch Lumineszenz basiert IP-Analysen, Bimolekulare Fluoreszenzkomplementations-Analysen und Pull-Down Untersuchungen, erweitert um publizierte Interaktionen mit kleinen RHO-GTPasen	84
48	Expression der Protein RAC1, RHOA und CDC42 im <i>wt</i> -Testis.	86
49	Interaktion von SMOK1 mit RHOA und RAC1 <i>in vitro</i>	87

50	Zusammenfassung der getesteten Interaktionen mittels klassischer Pull-Down Analyse	89
51	Protein-Protein-Interaktions-Netzwerk zwischen <i>t</i> -Komplex Faktoren und Bindeproteinen, validiert durch Lumineszenz basiert IP-Analysen, Bimolekulare Fluoreszenzkomplementations-Analysen und Pull-Down Untersuchungen, erweitert um publizierte Interaktionen mit kleinen RHO-GTPasen	90
52	Zusammenfassung der Interaktionen zwischen <i>t</i> -Komplex Faktoren und <i>Prey</i> -Proteinen	94
53	Hypothese eines erweiterten SMOK1-RHO-Signalnetzwerkes	116
54	Schematische Darstellung der pEF-His/V5 (N) und pEF-His/V5 (C) Vektoren. Wichtige Elemente dieser Expressionsplamide sind die Ampicillin- und Blasticidin-Resistenzkassetten, der EF1 α Promotor, sowie die 6xHis und V5 Epitopsequenzen relativ zur exprimierenden *DNA*. Dargestellt sind zusätzlich die verwendeten Restriktionsendonukleasen.	124
55	Verwendete Hefe-Expressionsvektoren	128
56	Verwendete Vektoren für die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation . .	143
57	Verwendete Vektoren für die Lumineszenz basierte IP Analyse	144
58	Expression von <i>Rhpn1</i> mRNA im Maushoden und RHPN1 Protein im Spermienflagellum	167
59	Molekulare Eigenschaften des Tcr-Proteins (<i>Responder</i>)	168
60	Schematische Querschnittdarstellung eines Axonems und Anordnung der äußeren Dyneinarme, der inneren Dyneinarme und der <i>Radial Spokes</i> entlang eines 96 nm Abschnittes am äußeren Mikrotubuli-Dublett	169

Tabellenverzeichnis

1	Übersicht der wichtigsten identifizierten <i>Preys</i>	42
2	Übersicht der verwendeten Bakterienstämme	119
3	Übersicht der verwendete Plasmide	121
4	Übersicht der verwendete Primer für Smok1 Konstrukte	121
5	Übersicht der verwendete Primer für die <i>Distorter</i> Konstrukte	122
6	Medien und Lösungen für Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	126
7	Lösungen für die Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	129
8	Zusammenfassung für <i>Preys</i> und <i>Baits</i>	130
9	Reagenzien für Arbeiten mit Mausgewebe	134
10	Reagenzien für In Situ Hybridisierung und deren Vorbereitung	135
11	Übersicht über verwendete Primärantikörper	139
12	Übersicht der verwendeten Reagenzien und Volumina zur Herstellung von 10 ml Luciferase Substrat	145
13	Übersicht der verwendete Oligonukleotide für die RT-PCR	147
14	Übersicht der verwendete Oligonukleotide für die Herstellung der RNA- Sonden	148