

Molekularcytologische Studien zur Chromosomendynamik  
in der meiotischen Prophase von Knockout- und transgenen Modellen der Maus  
(*Mus musculus*)

vom Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern  
zur Erlangung des akademischen Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von  
Diplom-Chemiker  
Bodo Liebe

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 18. Februar 2005

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. Dr. H. Zankl  
Erster Berichterstatter: Prof. Dr. H. Scherthan  
Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. J. Cullum

## **Danksagung**

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Harry Scherthan für die intensive Betreuung, die Anregungen und nicht zuletzt für seine Unterstützung danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. John Cullum für die Begutachtung dieser Arbeit.

Für die freundliche Bereitstellung eines Laborarbeitsplatzes gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dr. Heinrich Zankl und Herrn Prof. Dr. Hans-Hilger Ropers.

Herrn Prof. Dr. R.D. Camerini-Otero, Herrn Prof. Dr. A. Nussenzweig, Herrn Prof. Dr. R. Jessberger, Herrn Prof. Dr. C Höög, Herrn Prof. Dr. R. Benavente und Dr. T.Voet möchte ich für die Überlassung von Maustestisgewebe ausdrücklich danken.

Bedanken möchte mich natürlich auch bei Edgar Trelles-Sticken, Nils Hartmann, Caroline Adelfalk und Götz Lütjens.

Allen Mitgliedern der Abteilungen Humanbiologie in Kaiserslautern und der Abteilung Molekulare Humangenetik möchte ich für das angenehme Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft danken.



1	Einleitung .....	5
1.1	Meiose .....	5
1.2	Morphologie des Säugerhodens .....	6
1.2.1	Aufbau des Hodens .....	6
1.2.2	Aufbau eines Tubulus Seminiferus .....	6
1.2.3	Keimzellen und Spermatogenese .....	7
1.2.4	Sertoli-Zellen .....	9
1.3	Zytologische Aspekte der meiotischen Prophase I .....	9
1.3.1	Die Substadien der Prophase I .....	9
1.3.2	Die meiotische Chromosomenstruktur und der Synaptonemale Komplex .....	10
1.4	Molekulare Aspekte der Meiose .....	13
1.5	Zusammenhang zwischen molekularen und zytologischen Ereignissen .....	17
1.6	Der Leptotän-Zygotän Übergang: das Bukett-Stadium .....	19
1.7	Ziel und Fragestellung der Arbeit .....	23
2	Material und Methoden .....	24
2.1	Mausgenotypen .....	24
2.2	Testes Entnahme .....	24
2.2.1	Materialien .....	24
2.2.2	Durchführung .....	25
2.3	Herstellung einer Testis-Suspension .....	25
2.3.1	Materialien .....	25
2.3.2	Durchführung .....	26
2.4	Herstellung von strukturellerhaltenen Suspensionspräparaten .....	26
2.4.1	Materialien .....	26
2.4.2	Durchführung .....	26
2.5	Herstellung von Spreitpräparaten .....	27
2.5.1	Materialien .....	27
2.5.2	Durchführung .....	27
2.6	Herstellung von Tupfpräparaten .....	28
2.6.1	Materialien .....	28
2.6.2	Durchführung .....	29
2.7	Immunfärbung (IF) .....	29
2.7.1	Materialien .....	29
2.7.2	Verwendete Primärantikörper .....	30
2.7.3	Verwendete Sekundärantikörper .....	32
2.7.4	Durchführung .....	32
2.8	Immunfärbung mit anschließender FISH .....	34
2.8.1	Material .....	35
2.8.2	Durchführung .....	36
2.9	DNA-Sonden .....	37
2.9.1	Telomer-PNA-Sonde .....	37
2.9.2	Telomer-Biotin-Sonde .....	38
2.9.3	Centromer-Sonde .....	38
2.9.4	Chromosomenpaintsonden .....	38
2.9.5	MMU-8- und MMU-12-spezifische, repetitive Subsatelliten Sonden .....	38
2.9.6	Mini-Ringchromosomen-Sonde .....	38
2.10	Plasmid-Präparation .....	39
2.10.1	Materialien .....	39
2.10.2	Durchführung .....	39
2.11	Markierung der DNA-Sonden .....	39
2.11.1	Materialien .....	39

2.11.2	Durchführung .....	40
2.12	Tailing-Reaktion.....	40
2.12.1	Materialien .....	40
2.12.2	Durchführung .....	40
2.13	Überprüfung der Sondenmarkierungseffizienz mittels Dot-Blot-Test.....	41
2.13.1	Material .....	41
2.13.2	Durchführung .....	42
2.14	Hybridisierungsmix.....	43
2.14.1	Zusammensetzung des Hybridisierungsmixes (Hybmix) .....	43
2.14.2	Herstellung der Hybridisierungslösung und Sondenkonzentrationen.....	43
2.15	Vorbehandlung und Denaturierung der Präparate für die FISH .....	44
2.15.1	Materialien.....	44
2.15.2	Vorbehandlung und Denaturierung von Spreitpräparaten und von Präparaten mit dreidimensional erhaltenen Kernen .....	45
2.16	Sonden-Denaturierung und Hybridisierung .....	45
2.16.1	Aufbringen der Hybridisierungslösung auf die Präparate.....	46
2.17	Detektion der markierten Hybridmoleküle .....	46
2.17.1	Material zur Detektion der Hybridmoleküle .....	47
2.17.2	Detektion .....	48
2.18	Mikroskopische und computergestützte Auswertung .....	48
2.19	Dreidimensionale Mikroskopie und Auswertung .....	49
3	Ergebnisse .....	51
3.1	Untersuchungen an SCP3-defizienten Mausspermatocyten .....	54
3.1.1	SCP3-defiziente Telomere heften sich an die innere Kernperipherie.....	55
3.1.2	Spermatogenese Arrest in männlichen <i>Sycp3</i> <sup>-/-</sup> Mäusen .....	56
3.1.3	Veränderte Telomermorphologie bei Abwesenheit von SCP3 Protein.....	56
3.1.4	Die Anheftungsplatten der Chromosomen an die Kernperipherie beinhalten Telomersequenzen.....	59
3.1.5	Das Fehlen von SCP3 ändert nicht den telomerischen Protein Komplex.....	60
3.1.6	Störung der Chromosomenkondensation in SCP3-defizienten Spermatocyten.....	63
3.1.7	Unterschiedliche Telomer- und Centromer-Assoziationen homologer Chromosomen in SCP3-defizienten Spermatocyten .....	64
3.1.8	Fehlen von SCP3 führt zu veränderter Telomerdynamik.....	65
3.1.9	SCP1 kann homologe Sequenzen bei Abwesenheit von AEs verbinden.....	67
3.2	Smc1β: ein meiosespezifisches Cohesin.....	70
3.2.1	Smc1β wird für die Telomeranheftung an die Kernperipherie benötigt .....	71
3.2.2	Die Chromatinstruktur in SMC1β defizienten Spermatocyten ist gestört .....	73
3.3	Störung der Spermatogenese bei Abwesenheit von Typ A Laminen.....	77
3.3.1	Spermatogenese Arrest in LaminA defizienten Mäusen.....	78
3.3.2	Fehlen von Typ-A Laminen führt zu einer signifikanten Anreicherung von frühen und zu einer signifikanten Abnahme von späten Prophase I Substadien ..	79
3.3.3	Apoptose von LaminA-defizienten Spermatocyten ab dem mittleren Pachytän-Stadium.....	81
3.3.4	Die Telomeranheftung an die Kernhülle ist in der LaminA defizienten Spermatogenese nicht beeinträchtigt.....	83
3.3.5	Verlust von LaminA führt zu gestörter Gonosomenpaarung.....	85
3.4	Histon H2ax beeinflusst die meiotische Telomeraggregation.....	87
3.4.1	Die meiotische Autosomenkondensation in H2AX defizienten Spermatocyten ist nicht gestört .....	90
3.5	Die meiotische Prophase I transgener Mäuse .....	91
3.5.1	MCs besitzen ein aktives Centromer aber keine Telomere.....	92

3.5.2	MCs bilden SC-artige Strukturen aus.....	93
3.5.3	Telomer-unabhängige Homologenpaarung der MCs.....	98
3.5.4	MCs assoziieren mit dem XY-Body .....	102
3.6	Untersuchungen zur Änderung der Häufigkeit des mittleren Präleptotäns und der meiotischen Telomeraggregation in der Spermatogenese von Mausmutanten.....	104
3.6.1	Mittleres Präleptotän- und Bukett-Stadium sind in der Wildtyp-Spermatogenese kurzlebige Übergangsstadien .....	105
3.6.2	Das Mittlere Präleptotän- und das Bukett-Stadium sind voneinander unabhängige Ereignisse.....	106
3.6.3	Mittlere Präleptotän- und Bukett-Frequenzen hängen nicht von verschiedenen Mausstämmen ab.....	107
3.6.4	Spo11 wird für einen schnellen Eintritt in die Prophase I benötigt .....	112
3.6.5	Das Fehlen von Spo11 und DSBs führt zu einer Verlängerung des Bukett-Stadiums .....	113
3.6.6	ATM trägt zur schnellen Progression durch das mittlere Präleptotän Stadium bei und verbindet DSB Reparatur mit der Dauer des Bukett Stadiums .....	114
3.6.7	Mausmutanten mit gestörter Rekombination haben eine erhöhte mittlere-Präleptotän und Bukett-Frequenz.....	115
3.6.8	Hop2 wird für das Signalisieren des Fortschreitens der Rekombination an die meiotischen Telomere benötigt .....	116
3.6.9	Gadd45a und der NHEJ Reparaturweg spielen für die meiotische Telomeraggregation keine Rolle .....	119
3.6.10	Die Hr6B ubiquitinkonjugierte Enzymaktivität und das TRF1 Telomer-Protein werden für eine normale Chromosomendynamik benötigt.....	120
3.6.11	Mäuse mit Fehlern in der Spermiogenese zeigen eine normale Chromosomendynamik .....	120
4	Diskussion .....	122
4.1	Methodik .....	122
4.2	SCP3-defiziente Telomere heften sich mit einer flachen, diskusförmigen Platte an die innere Kernmembran .....	123
4.3	Telomer-unabhängige Homologenpaarung von Mini-Ringchromosomen (MC) ..	126
4.4	MCs lösen den Pachytän Checkpoint nicht aus .....	128
4.5	Kohäsion an meiotischen Telomeren .....	129
4.6	Gestörte Telomerdynamik bei Abwesenheit von AEs .....	130
4.7	SCP3 wird für die meiotische Chromosomenkondensation benötigt.....	131
4.8	AE-lose Chromosomen zeigen homologe Interaktionen .....	132
4.9	Fehlerhafte Homologenpaarung in der Lmna-defizienten Spermatogenese .....	133
4.10	Fehlerhafte Telomeranheftungen in Smc1 $\beta$ -defizienten Spermatozyten.....	134
4.11	Smc1 $\beta$ wird für die Chromatinorganisation und den Aufbau der AEs benötigt....	136
4.12	Das Fehlen des ATM-Zielmoleküls H2AX beeinflusst die meiotische Telomerdynamik .....	138
4.13	Rekombinationsproteine erleichtern den Eintritt in die Prophase I .....	139
4.14	Die Initiierung der DSB Reparatur und die Telomer-Aggregation sind unabhängige Ereignisse, die im Bukett-Stadium zusammenlaufen.....	141
4.15	Die meiotische Telomer-Aggregation ist unabhängig von Gadd45a und vom NHEJ Reparaturweg .....	143
4.16	Rekombination und die Auflösung des Bukett-Stadiums sind über Hop2 miteinander verbunden.....	144
4.17	Hr6B Ubiquitin-konjugierte Enzymaktivität wird für eine normale Chromosomendynamik benötigt .....	145
4.18	Verzögerter Eintritt in die Prophase I von Terf1 <sup>+/-</sup> Spermatozyten .....	146

4.19	Normaler Eintritt in die Prophase I und normale Telomerdynamik bei Mäusen mit defekter Spermio-genese .....	146
5	Zusammenfassung.....	148
6	Literaturverzeichnis.....	150

# 1 Einleitung

## 1.1 Meiose

Die Meiose ist eine spezialisierte Form der Zellteilung, bei der der diploide Chromosomensatz zu einem haploiden reduziert wird. Dadurch wird sichergestellt, dass bei der Verschmelzung zweier Gameten wieder ein diploider Chromosomensatz entsteht und somit der artspezifische Chromosomensatz erhalten bleibt (zur Übersicht siehe Petronczki et al., 2003). Bei Säugern findet die Meiose in spezialisiertem Gewebe, den Gonaden (Ovar und Hoden) statt.

Die Meiose ist in wohldefinierte Abschnitte gegliedert; sie beginnt mit einer verlängerten prämeiotischen Synthese (S)-Phase, gefolgt von der Prophase I, der sich zwei direkt aufeinanderfolgende Kernteilungen (Meiose I und II) anschließen. So entstehen aus einer diploiden Stammzelle (Oogonie oder Spermatogonie) vier haploide Gameten (Eizellen oder Spermien). Während der Prophase I müssen sich die replizierten homologen Chromosomen des väterlichen und mütterlichen Komplements finden, paaren und miteinander rekombinieren. In der darauffolgenden ersten Teilung (Meiose I) trennen sich die homologen Chromosomen voneinander (Reduktionsteilung). Die zweite Teilung entspricht einer mitotischen, equalen Teilung, bei der die Schwesterchromatiden segregiert werden. Durch Rekombination zwischen den homologen väterlichen und mütterlichen Chromosomen während der meiotischen Prophase I wird für die Durchmischung des Erbguts gesorgt, was eine Erweiterung des Genpools ermöglicht (zur Übersicht siehe Smith und Nicolas, 1998; Petronczki et al., 2003). Da sich die vorliegende Arbeit mit der Spermatogenese und im speziellen mit der Prophase I von Mausmutanten beschäftigt, werden im Folgenden die wichtigsten Aspekte zum Aufbau des Säugerhodens und den zytogenetischen und molekularen Ereignissen der Prophase I erläutert.



## **1.2 Morphologie des Säugerhodens**

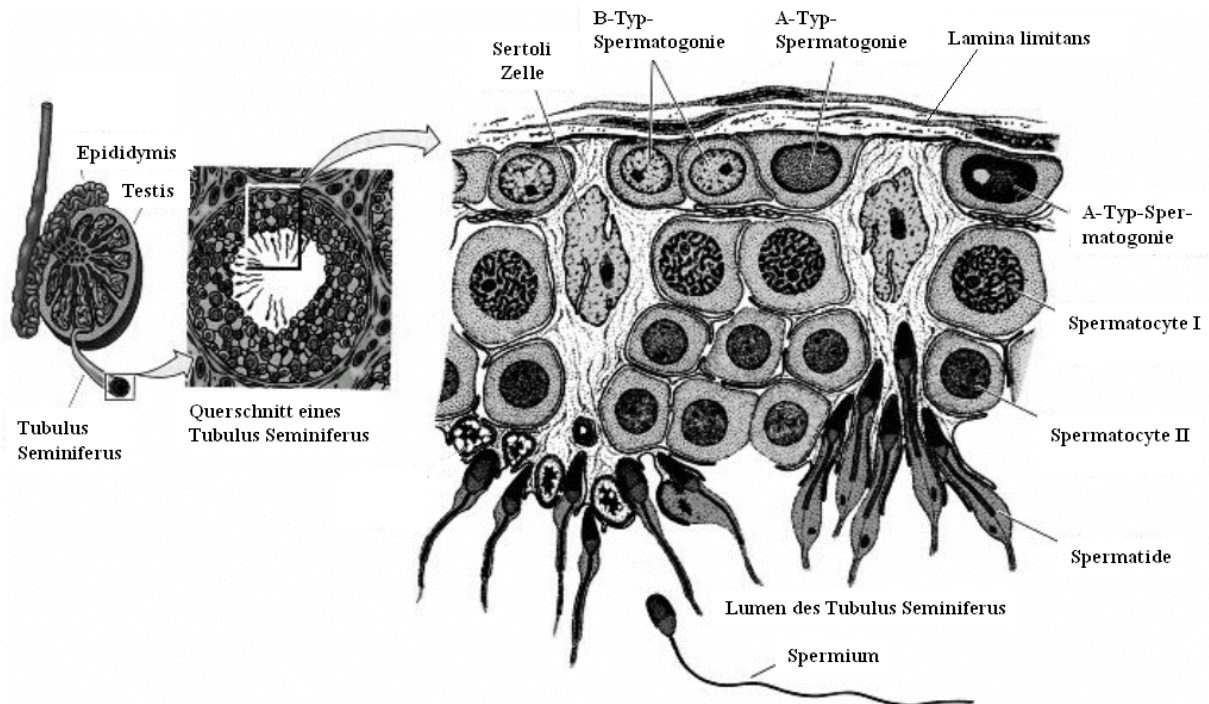
### **1.2.1 Aufbau des Hodens**

Der Säugerhoden ist von einer aus derben, faserigen kollagenösen Bindegewebe bestehenden Kapsel (Tunica albuginea) umgeben. Das durch die Tunica albuginea umschlossene Bindegewebe wird durch zarte bindegewebige Septen (Septula Testis) in bis zu 370 Hodenläppchen (Lobuli testis) unterteilt. Ein Lobulus testis besteht aus einem oder mehreren stark aufgewickelten Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti), die Schlaufen bilden. Deren Anfang und Ende öffnen sich in die Räume des Rete testis. Zwischen den Samenkanälchen findet man ein ausgedehntes interstitielles Gewebe, in dem hormonbildende Leydig-Zellen, Blutgefäße, Lymphgefäße und Nerven vorkommen (Hedinger und Weber, 1973).

### **1.2.2 Aufbau eines Tubulus Seminiferus**

Die Tubuli Seminiferi sind beim Menschen bis zu 30-70 cm lang und haben einen Durchmesser von 180-280 µm. Sie sind stark gewunden, so dass sie in den 2-3 cm langen Lobuli testis untergebracht werden können (Holstein, 1993).

Die Wand der Tubuli seminiferi besteht aus der Lamina limitans und dem Keimepithel (Epithelium Spermatogenicum) (Abb.1). Die Lamina limitans ist eine dünne Schicht aus mehreren Lagen von Myofibroblasten, Kollagenfasern und einer Basalmembran. Die Myofibroblasten haben die Eigenschaft von glatten Muskelzellen und sind kontraktile. Sie rufen rhythmische Kontraktionen hervor, die dem Transport der zunächst unbeweglichen Spermatozoen dienen.



**Abbildung 1:** Schematische Ansicht eines Schnittes durch einen Tubulus seminiferus (verändert; nach Dym, 1976).

### 1.2.3 Keimzellen und Spermatogenese

Die Spermatogenese ist der Prozess, in dessen Verlauf aus diploiden männlichen Stammzellen die Spermien hervorgehen (Sammenzellbildung). Es handelt sich um einen kontinuierlichen Prozess, der in den Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) der Hoden wellenförmig abläuft und mit der Geschlechtsreife beginnt (Oakberg, 1956).

Die Spermatogenese beginnt mit den Stamm-Spermatogonien, welche peripher an der Basalmembran der Samenkanälchen liegen (Abb.1). Die Spermatogonien werden in zwei Gruppen unterteilt: A-Typ- und B-Typ-Spermatogonien. A-Typ-Spermatogonien sind dadurch gekennzeichnet, dass sie der Basalmembran breitflächig aufsitzen und ovale Kerne mit großem Nukleolus haben. Teilt sich eine A-Typ-Spermatogonie mitotisch, so entsteht aus der einen Tochterzellen erneut eine A-Typ-Spermatogonie (Stammzellen), während aus der anderen eine B-Typ-Spermatogonie wird. Im Vergleich zu den A-Typ-Spermatogonien ist der

Nukleolus der B-Typ-Spermatogonien kleiner, der Kern rundet sich ab und der Kontaktbereich zur Basallamina verringert sich (De Kretser, 1969).

Die Spermatogonien-Entwicklung nimmt bei der Maus ungefähr sechs Tage in Anspruch, währenddessen die Zellen sechs Zyklen mitotischer Teilung durchlaufen. Aus den B-Typ-Spermatogonien gehen die primären Spermatozyten hervor, welche in die Prophase I der ersten meiotischen Teilung eintreten. Diese Zellzyklus-Phase beansprucht im Vergleich zu den nachfolgenden meiotischen Phasen sehr viel Zeit. Bei der Maus dauert sie ca. 13 Tage (Oakberg, 1956).

Ein gutes cytologisches Unterscheidungskriterium von Spermatogonien und Spermatozyten ist die Zellgröße. Letztere verfügen über größere Zellkerne und mehr Cytoplasma. Nach der ersten Reifeteilung entstehen aus einer primären Spermatozyte zwei haploide sekundäre Spermatozyten, die kurz darauf die zweite Reifeteilung durchlaufen ohne eine S-Phase zwischen zuschalten. Nach der zweiten Teilung entstehen vier haploide Spermatiden. Die Spermatiden sind die kleinsten Zellen des Keimepithels und liegen in der Nähe des Lumens der Samenkanälchen. Die Differenzierung der Spermatiden dauert bei der Maus nochmal ungefähr neun Tage. Die Spermien werden in das Lumen des Samenkanälchens entlassen und beenden ihre Reifung im Nebenhoden (Epididymis).

Die Maus-Spermatogenese stellt einen höchst regulierten, synchronen und kontinuierlichen Prozeß dar (Oakberg, 1956). Testesschnitte der Maus zeigen darum in Tubuli seminiferi immer konzentrisch angeordnete Keimzellen unterschiedlichen Typs (Epithelienzyklus). Der Epithelienzyklus wird in 12 Stadien eingeteilt. Aus den 12 Epithelienstadien ergeben sich die Stadien der vorliegenden Spermatozyten, Spermatogonien und Spermatiden (Russell, 1990).

### **1.2.4 Sertoli-Zellen**

Die Keimzellen sind von Sertoli-Zellen umgeben, die nach dem Mailänder Histologen Enrico Sertoli (1842-1910) benannt sind und welche eine unterstützende und ernährende Funktion ausüben. Man bezeichnet sie darum auch als Ammenzellen. Sertoli-Zellen fußen auf der Basalmembran und durchziehen das gesamte Keimepithel bis zum Lumen des Tubulus. Mit seitlichen Fortsätzen schieben sie sich zwischen die verschiedenen Generationen der Keimzellen und füllen die Zwischenräume vollständig aus. Benachbarte Sertoli-Zellen sind in ihrem basalen Drittel über Tight Junctions miteinander verbunden und bilden die Blut-Hoden-Schranke, eine effektive Diffusionsbarriere zwischen dem Basalkompartiment und dem Tubulus seminiferus. Diese Barriere schränkt den Stofftransport im interzellulären Raum stark ein und schützt die in der Meiose und Spermiogenese befindlichen Keimzellen.

Die Sertoli-Zelle hat einen großen gelappten Zellkern mit meistens zwei prominenten Nukleoli. In der Maus treten die Nukleoli in der DAPI Färbung deutlich als dunkle Region zwischen (meistens) zwei großen Chromozentren des perizentrischen Heterochromatins hervor (Brinkley et al., 1986). Im reifen Hoden teilen sich die Sertoli-Zellen nicht mehr. Ihre Anzahl in den Samenkanälchen bleibt somit konstant (Holstein, 1993).

## ***1.3 Zytologische Aspekte der meiotischen Prophase I***

### **1.3.1 Die Substadien der Prophase I**

Die verlängerte Prophase I zwischen prämeiotischer S-Phase und erster meiotischer (reduktiver) Teilung stellt sich für den Zytologen und Genetiker als äußerst interessant dar, da während dieser Zeit die Chromosomen rekombinieren und großen morphologischen Veränderungen unterworfen sind (Scherthan et al., 1996; Scherthan et al., 1998).

Die replizierten Chromosomen beginnen im Präleptotän zu kondensieren und erscheinen im Leptotän als dünne fädige Strukturen. In diesem Stadium müssen sich die homologen Chromosomen erkennen und aneinander anlagern. Im nachfolgenden Zygotän-Stadium beginnen sich die Homologen fest zu verbinden (Paarung, Synapse) (zur Übersicht siehe von Wettstein et al., 1984). Dabei bildet sich eine reißverschlussartige Verbindung zwischen den homologen Chromosomen aus, die nach vollständiger Paarung als Synaptonemaler Komplex (SC) bezeichnet wird (Abb.3). Das Pachytän-Stadium ist gekennzeichnet von der kompletten Synapse der homologen Chromosomenpaare der Meioocyte. Die homologen Chromosomenpaare werden auch als Bivalente bezeichnet und erscheinen auf Grund der fortgeschrittenen Chromosomenkondensation relativ dick. Im Diplotän wird der SC wieder abgebaut und die homologen Chromosomen trennen sich außer an den Chiasmata, die die Crossover Ereignisse darstellen. Die Chiasmata sind eine Voraussetzung für die korrekte Segregation der homologen Chromosomen in der sich anschließenden Diakinese (Petronczki et al., 2003). Allerdings ist die Ausbildung von Chiasmata nicht universell, denn die Chromosomen der männlichen Taufliege *Drosophila melanogaster* oder das Chromosomenpaar 4 der weiblichen Taufliegen beispielsweise sind achiasmatisch. Es zeigte sich, dass für die Segregation solcher achiasmatischen Chromosomen heterochromatische Elemente der Chromosomen und bestimmte Proteine wichtig sind (zur Übersicht siehe Page und Hawley, 2004).

### **1.3.2 Die meiotische Chromosomenstruktur und der Synaptonemal**

#### **Komplex**

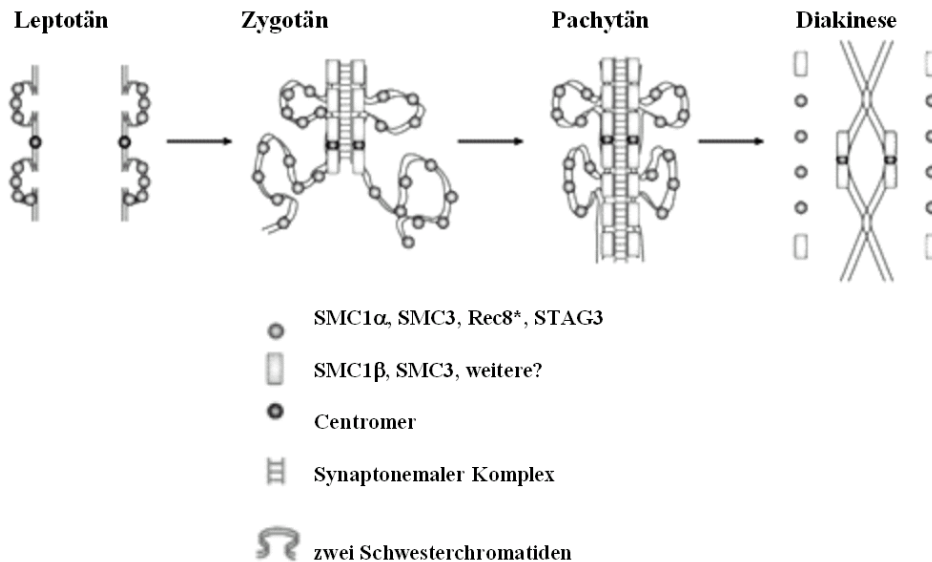
Die eukaryotischen, evolutionär hoch konservierten „Structural Maintenance of Chromosomes“ (SMC) Proteine spielen eine wichtige Rolle in den unterschiedlichsten Prozessen wie Chromosomenkondensation, Schwesterchromatidkohäsion, DNA

Rekombination und Reparatur sowie bei der Gendosiskompensation (zur Übersicht siehe Jessberger, 2002). Die Schwesterchromatidkohäsion mitotischer Säugerchromosomen wird von dem SMC1/SMC3-Heterodimer und den beiden nicht-SMC-Proteinkomplexen Rad21 und SA1 oder SA2 vermittelt. Eine weitere Funktion der SMC-Proteine besteht in der Kondensation bzw. schleifenförmigen Chromatinorganisation von mitotischen Chromosomen (zur Übersicht siehe Hirano et al., 1995; Strunnikov, 1998). Es wurde daher spekuliert, dass die SMC-Proteine auch in meiotischen Chromosomen für die schleifenförmige Chromatinorganisation (Abb.2 und 3) verantwortlich sind (Eijpe et al., 2000a).

Nach der prämeiotischen S-Phase werden die replizierten Schwesterchromatiden durch einen Cohesin-Komplex fest miteinander verbunden (Schwesterchromatidkohäsion) (zur Übersicht siehe Jessberger, 2002). Dieser besteht aus den vier Untereinheiten SMC1 $\alpha$ , SMC3, Rec8 und STAG3 (Eijpe et al., 2000a; Prieto et al., 2001; Eijpe et al., 2003). Kürzlich wurde ein weiteres meiosespezifisches Cohesin, SMC1 $\beta$  (eine Isoform von SMC1), entdeckt (Revenkova et al., 2001), das während der Prophase I im SC lokalisiert ist.

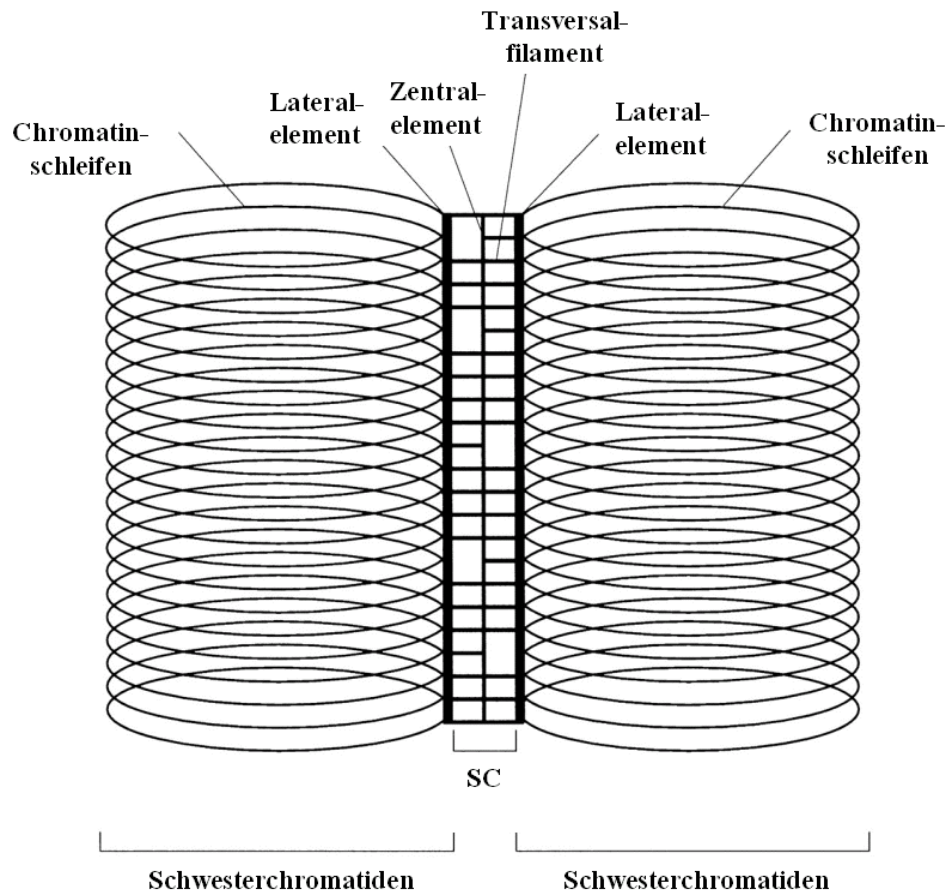
Nachdem sich entlang der replizierten Schwesterchromatiden der Cohesin-Komplex ausgebildet hat, beginnen sich im Leptotän die Axialelemente (AEs) an den Cohesin-Achsen aufzubauen (zur Übersicht siehe von Wettstein et al., 1984). Sie bestehen aus den Proteinen SCP2 (Offenberg et al., 1998) und SCP3 (Lammers et al., 1994; Schalk et al., 1998; Yuan et al., 2000). Im Zygotän-Stadium beginnt die Homologenpaarung und der SC bildet sich zwischen den schon gepaarten homologen Bereichen aus. Die ehemaligen AEs werden von jetzt an als Lateralelemente (LEs) bezeichnet. Die LEs der homologen Chromosomen werden durch Transversalfilamente (SCP1; Meuwissen et al., 1992; Schmekel et al., 1996) reißverschlussartig miteinander verknüpft. Auf den Transversalfilamenten bildet sich das sogenannte Zentralelement aus und so entsteht eine für den SC charakteristische, dreilagige proteinöse Struktur (siehe Abb.3) (Heyting, 1996), die im Diplotän-Stadium wieder abgebaut wird (von Wettstein et al., 1984). Die Untereinheiten SMC1 $\alpha$ , SMC3, Rec8 und STAG3 des

Cohesin-Komplexes wird vor der Anaphase I abgebaut (Buonomo et al., 2000), während das SMC1 $\beta$  Cohesin bis zum Beginn der Anaphase II an den Centromeren der Schwesterchromatiden zu finden ist und für die Kohäsion der Schwestercentromere verantwortlich ist (Abb.2) (Revenkova et al., 2001).



**Abbildung 2:** Schwesterchromatidkohäsion im zeitlichen Kontext der Prophase I (nach Jessberger, 2002). \*Rec8 tritt schon ab dem mittleren Präleptotän-Stadium an den Chromosomen auf (Eijpe et al., 2003).

Die Cohesin-Moleküle sind nicht nur für die Schwesterchromatidkohäsion verantwortlich. Darüber hinaus wurde in der Meiose von *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt, dass die Proteine Smc3 und Rec8 für den Aufbau von Axialelementen, für die Rekombination und zum Schutz vor Hyperresektion von DNA Doppelstrangbrüchen benötigt werden (Klein et al., 1999).



**Abbildung 3:** Schematischer Aufbau eines SCs. Der SC besteht aus den beiden Lateralelementen der beiden homologen Chromsomen, die durch Transversalfilamente miteinander verknüpft sind. Die Schwesterchromatiden sind schleifenartig längs des SCs aufgewickelt (nach Roeder, 1997).

## 1.4 Molekulare Aspekte der Meiose

DNA Doppelstrangbrüche (DSB) werden durch unterschiedlichste Quellen zufällig hervorgerufen (Strahlung, freie Radikale, o.ä.) oder sie sind Teil eines entwicklungsabhängigen Prozesses, wie zum Beispiel zu Beginn der Prophase I der Meiose.

In somatischen Zellkernen gibt es verschiedenen, genetisch unterschiedliche DSB Reparaturwege, wie die homologe Rekombination (HR) und „single-strand annealing“ (SSA) Reparatur, die beide von homologen DNA Einzelstrangvorlagen abhängig sind, oder den „Non-Homologous End-Joining“ (NHEJ) Reparaturweg, für den (fast) keine homologe DNA



Vorlage benötigt wird (Bannister und Schimenti, 2004). Der Unterschied zwischen HR und SAA liegt darin, dass bei der HR Reparatur der DNA Strang der Schwesterchromatide des homologen Chromosoms als Reparaturvorlage benutzt wird, während bei der SAA Reparatur die Schwesterchromatiden des beschädigten Chromosoms in der DSB Reparatur involviert sind.

Welchen Reparaturweg eine geschädigte somatische Zelle einschlagen wird, hängt von der Schwere des DNA Schadens, vom Zellzyklusstadium der Zelle beim Auftreten des Schadens oder auch vom Entwicklungsstadium der Zelle ab (zur Übersicht siehe (Bannister und Schimenti, 2004; Dudas und Chovanec, 2004) und Referenzen darin). HR findet überwiegend in G2-Phase und Prophase I, während in G1-Phase überwiegend NHEJ stattfindet. DSBs in meiotische Zellen von Wirbeltieren werden hauptsächlich über den HR Reparaturweg repariert (Goeddecke et al., 1999).

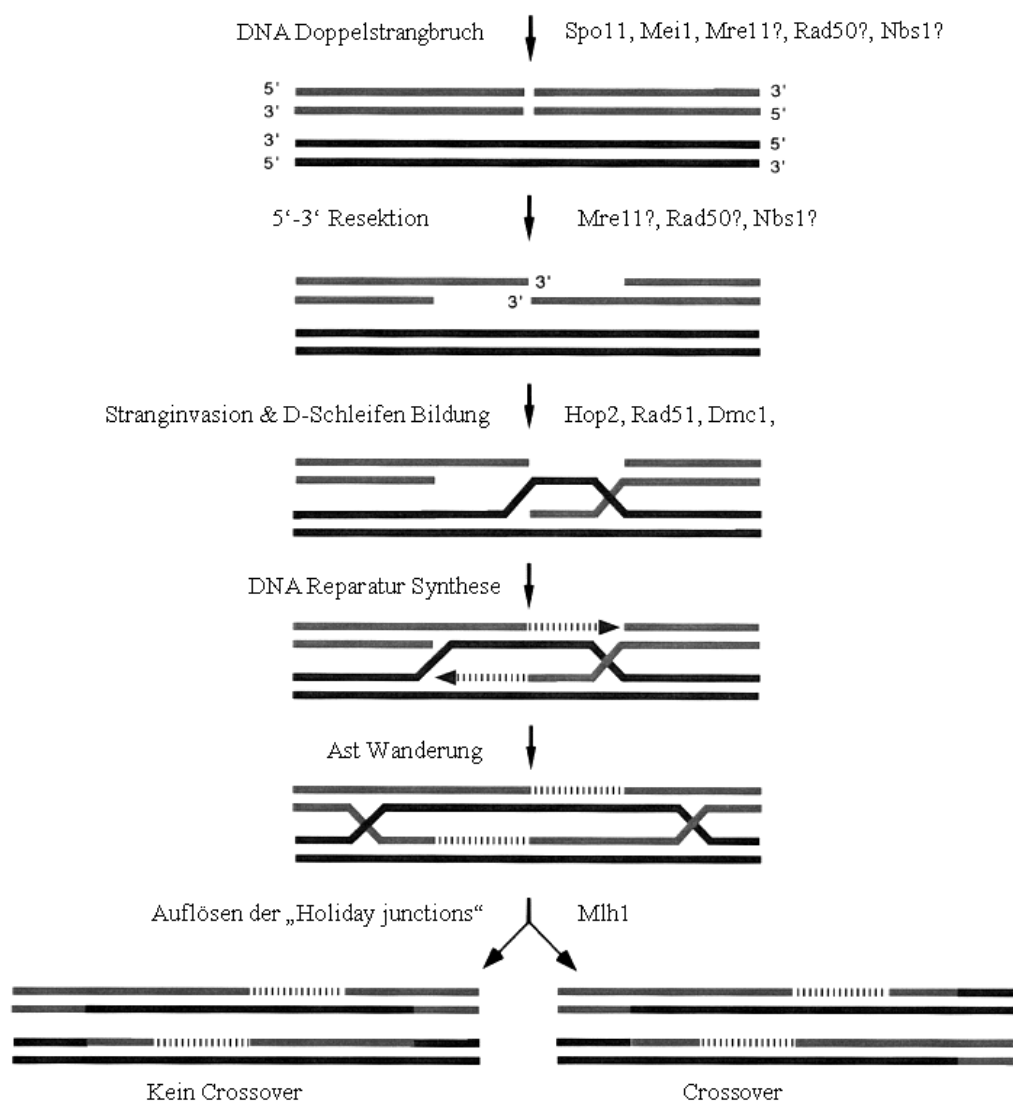
Die Grundlagen für das heutige Verständnis der HR in der Meiose (siehe Abb.4) wurden überwiegend durch molekularbiologische Experimente in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* erhalten. So wurde für die Meiose der Hefe gezeigt, dass die Rekombination durch die Bildung von Doppelstrangbrüchen (DSBs) initiiert wird (Padmore et al., 1991), wie es von Szostak und Kollegen 1983 vorgeschlagen wurde (Szostak et al., 1983). Bei der Analyse der DSBs in einem *rad50S/rad50S* Stammhintergrund der Bierhefe (Sun et al., 1991) konnte das Produkt von *SPO11* als das Protein mit der katalytischen Aktivität zur Erzeugung meiotischer DSBs identifiziert werden (Keeney et al., 1997). Meiotische DSBs sind in der Maus ebenfalls von der Transesterase Spo11 (Keeney et al., 1999; Romanienko und Camerini-Otero, 1999) abhängig, denn molekularzytologische Untersuchungen an *Spo11* Knockout-Mäusen zeigte, dass in gespreiteten Spermatozyten die HR/DSB-Marker Rad51 und Dmc1 fehlten (Romanienko und Camerini-Otero, 2000). *Spo11*<sup>-/-</sup> Meiozyten zeigten darüberhinaus Fehler in der Homologenpaarung und es wurde vorgeschlagen, dass die Initiierung der meiotischen DSB Reparatur in der Maus der Synapse zum einen vorrausgeht und zum anderen für sie

notwendig ist (Baudat et al., 2000). In der *mei1* Maus wurde ein Spo11-ähnlicher Phänotyp gefunden, d.h. in der Prophase I wurden Fehler in der Homologenpaarung und keine Rad51-Foci in Zygotän-Spermatocyten entdeckt (Libby et al., 2003). Darüber hinaus führten künstliche, durch Cisplatin hervorgerufene DSBs wieder zu einer Wildtyp-ähnlichen Verteilung der Rad51-Foci in Zygotän-Spermatocyten (Libby et al., 2003). Dies zeigte, dass auch *mei1* für das Einführen von meiotischen DSBs benötigt wird.

Weitere Gene, die für die Einführung der DSBs und die Prozessierung der Rekombinationsintermediate in der Hefe benötigt werden, sind *MRE11* (Johzuka und Ogawa, 1995), *XRS2* (Ivanov et al., 1992), *MEI4* (Menees und Roeder, 1989), *MER1* (Engebrecht und Roeder 1989) (Engebrecht und Roeder, 1989), *MER2* (Rockmill et al., 1995a), *MRE2* (Nakagawa und Ogawa, 1997), *REC102*, *REC104* und *REC114* (Bullard et al., 1996). Der MRX-Komplex der Hefe (Mre11/Rad50/Xrs2) bzw. der dazu homologe MRN-Komplex (Mre11/Rad50/Nbs1) in Wirbeltieren (Dolganov et al., 1996), wird mit vielen biologischen Prozessen in Verbindung gebracht. Dazu gehören die HRR und NHEJ Reparaturwege, das Signalisieren von DNA Schäden, DNA Replikation und Telomerlängenerhaltung (zur Übersicht siehe (Bannister und Schimenti, 2004) und Referenzen darin) und es gibt Hinweise darauf, dass der MRN Komplex (möglicherweise mit anderen Enzymen) die 5'-3' Resektion katalysiert (Connelly und Leach, 2002). Andererseits zeigten Immunfluoreszenz (IF) Experimente in der Maus, dass Mre11 und Rad50 in Leptotän- und frühen Zygotän-Spermatocyten überall im Chromatin zu finden sind und nicht (exklusiv) mit meiotischen Chromosomenachsen kolokalisieren (Eijpe et al., 2000b). Eijpe und Kollegen weisen dem MRN-Komplex darum eher eine Funktion für die Umstrukturierung des Chromatins (Chromatin Remodeling) zu (Eijpe et al., 2000b).

Für die Stranginvasion von 3'-Überhänge in intakte homologe Doppelstränge werden Genprodukte wie Rad51 benötigt, die sowohl in mitotischen Rekombinations- und Reparaturmechanismen als auch in der meiotischen homologen Rekombination eine Rolle

spielen. Rad51, ein zum bakteriellen RecA homologes Protein, katalysiert in vitro die Homologenpaarung und Strangaustausch-Reaktionen (Thompson und Schild, 2001; West, 2003). Neben diesen gibt es auch Proteine, deren Funktion meiosespezifisch ist. Dazu zählen Dmc1, das ebenfalls ein homologes zum bakteriellen RecA Protein ist (Habu et al., 1996; Pittman et al., 1998). Eine Übersicht der meiotischen Rekombinationsereignisse in Säugern ist in Abbildung 4 dargestellt (verändert nach Roeder, 1997).



**Abbildung 4:** Anhand zweier homologer DNA Doppelstränge (grau und schwarz) ist ein Modell für die meiotische Rekombination in Säugern dargestellt. Weiterhin sind einige der für die einzelnen Schritte erforderlichen bis jetzt identifizierten und für diese Arbeit relevanten Proteine/Gene genannt.

Danach verläuft die meiotische Rekombination über die Einführung eines Doppelstrangbruchs auf einem Homologen und nachfolgender Reparatur/Synthese, wobei ein Chromatid des anderen homologen Chromosoms als Vorlage für die Reparatur/Synthese benutzt wird (Abb. nach Roeder, 1997). Je nachdem wie die Rekombinationsintermediate aufgelöst werden, ergibt sich entweder ein Crossover Produkt (rechts) oder ein Nicht-Crossover Produkt (links).

*Dmc1*<sup>-/-</sup> Mäuse sind infertil, da die Synapse der Homologen stark beeinträchtigt ist (Pittman et al., 1998). Petukhova und Kollegen konnten kürzlich zeigen, dass das Hop2 Protein in der meiotischen Rekombination eine wichtige Rolle spielt. Hop2-defiziente Mauspermatocyten können meiotische DSBs ausbilden und prozessieren, aber nicht reparieren und man findet (fast) keine Synapse (Petukhova et al., 2003). Es gibt auch ein SC-Protein, Scp3, das für die meiotische homologe Rekombination benötigt wird. Yuan und Kollegen zeigten, dass in Scp3-defizienten Spermatocyten die Verteilung des Reparaturmarkers Rad51 und des Rekombinationsproteins RPA fehlerhaft ist. Darüber hinaus sind die männlichen *Scp3*<sup>-/-</sup> Mäuse infertil, da hier die Prophase I nach einem verlängerten Zygotän-Stadium arretiert (Yuan et al., 2000).

Für die Ausbildung von Crossover Ereignissen ist das Mlh1-Protein nötig, denn in der Mlh1-defizienten Spermatogenese trennen sich die homologen Chromosomen vorzeitig und die Spermatocyten arretieren während der ersten meiotischen Teilung (Baker et al., 1996).

## **1.5 Zusammenhang zwischen molekularen und zytologischen**

### **Ereignissen**

Rogakou und Kollegen entdeckten 1998 in Säugerzellen, dass durch Strahlung induzierte DSBs innerhalb kürzester Zeit die Phosphorylierung von Histon H2AX an den DSBs nach sich zieht (Rogakou et al., 1998). Mahadevaiah und Mitarbeiter untersuchten 2001 mittels  $\gamma$ -H2AX IF, der als subzellulärer Marker für DSBs verwendet wurde, an gespreiteten

Mausspermatocyten das Auftreten und die Prozessierung von meiotischen DSBs im zeitlichen Kontext der SC-Bildung. Es zeigte sich, dass DSBs im frühen Leptotän in die DNA eingefügt werden, bevor die homologen Chromosomen beginnen sich aneinander zuzulagern und zu paaren (Tab.1). Im Zygotän korreliert das Verschwinden von  $\gamma$ -H2ax zeitlich und räumlich mit dem Fortschreiten der Synapse (Mahadevaiah et al., 2001). In Pachytän- und Diplotän-Spermatocyten ist  $\gamma$ -H2ax im XY-Chromatin lokalisiert (Mahadevaiah et al., 2001), das im frühen Pachytän stark kondensiert (Solari, 1964) und dann den sogenannten XY-Body bildet.

Scherthan und Kollegen zeigten 1996 mittels Telomer-Centromer-FISH Experimenten an dreidimensional erhaltenen Spermatocyten in Querschnitten der Testistubuli der Maus, dass die Telomere und die Foci der pericentrischen Satelliten DNA von Typ-A-Spermatogonien im gesamten Kern verteilt vorliegen. Im mittleren Präleptotän-Übergangsstadium beginnen sich die Telomere an die innere Kernhülle (KH) anzuheften und die pericentromerische DNA legt sich schichtartig auf die innere KH (Tab.1). Im Leptotän-Stadium beginnen sich die AE zu entwickeln. Alle Telomere sind peripher an der KH verteilt und angeheftet. Die pericentromerische DNA liegt in durchschnittlich acht Clustern peripher an der Kernhülle verteilt vor (Scherthan et al. 1996). Im Leptotän-Zygotän-Übergangsstadium versammeln sich (fast) alle Telomere am Mikrotubulus-organisierenden Zentrum (MTOC, Centrosom), wodurch eine Polarisierung des Kerns und eine chromosomale Bukett-Struktur hervorgerufen wird (von Wettstein et al., 1984; Loidl, 1990; Dernburg et al., 1995; Scherthan, 2001). Zu Ende des Bukett-Stadiums sind die Axialelemente der Chromosomen vollständig ausgebildet (Scherthan et al., 1996). Die Telomeraggregation löst sich mit fortschreitendem Zygotän wieder auf, wobei die Telomere weiter an der Innenseite der KH angeheftet bleiben. Im Pachytän sind die Telomere weiter an der KH angeheftet. Die pericentromerische Satelliten DNA lokalisiert in etwa fünf großen Clustern an der Kernperipherie (Scherthan et al., 1996). Tabelle 1 zeigt eine vereinfachte schematische Übersicht auf die zytologischen und molekularen Ereignisse der Prophase I.

**Tabelle 1:** Vereinfachte schematische Übersicht von zytologische und molekulare Ereignisse während der Prophase I der Säugermeiose.

<i>Prophase I Stadium</i>	<i>Chromatindynamik und SC Morphogenese</i>	<i>Telomerdynamik</i>	<i>DSB Reparatur</i>	<i>Cytologische (Rekombinations-) Merkmale</i>
mittleres Präleptotän	Pericentromerische DNA ist an der Innenseite der Kernhülle (KH) verteilt	Telomere beginnen sich an die Innenseite der KH anzuheften		einige $\gamma$ -H2ax Foci im Kern verteilt;
Leptotän	Axialelemente beginnen sich zu entwickeln; ~8 Cluster pericentrischer DNA an der Kernhülle (KH)	alle Telomere sind an der Innenseite der Kernhülle angeheftet	DSBs bilden sich	$\gamma$ -H2ax im gesamten Chromatin; frühe Rekombinationsknötchen beginnen sich auszubilden (RAD51, DMC1)
Leptotän/Zygotän Übergang	die Axialelemente haben sich vollständig ausgebildet; ein peripherer pericentrischer DNA Cluster an der KH	Telomere clustern und bilden das Bukettstadium		
Zygotän	Homologe Chromosomen beginnen zu paaren und der SC bildet sich; 2-10 periphere pericentrische DNA Cluster an der KH	Telomere bleiben an der KH angeheftet, beginnen sich zu verteilen, bleiben aber noch teilweise geclustert	DSBs werden prozessiert	$\gamma$ -H2ax Foci; frühe Rekombinationsknötchen bilden sich (RPA)
Pachytän	alle homologen Chromosomen sind gepaart und der SC hat sich vollständig entwickelt; Chromosomen kondensieren; 5-10 periphere pericentrische DNA Cluster an der KH	Telomere sind an der Innenseite der KH verteilt	„Holliday junctions“ werden prozessiert	$\gamma$ -H2ax IF färbt das XY Chromatin; der sogenannte XY Body bildet sich; späte Rekombinationsknötchen bilden sich (Mlh1)

Die Tabelle basiert auf Arbeiten von (Baker et al., 1996; Scherthan et al., 1996; Barlow et al., 1997a; Moens et al., 1997; Plug et al., 1997; Scherthan et al., 1998; Tarsounas et al., 1999; Mahadevaiah et al., 2001).

### 1.6 Der Leptotän-Zygotän Übergang: das Bukett-Stadium

Das Bukett-Stadium stellt eine Chromosomenkonfiguration dar, die sich durch die Versammlung aller oder der meisten Telomere am Mikrotubulus organisierenden Zentrum

(MTOC) auszeichnet (Dernburg et al., 1995). Diese für die meiotische Prophase I spezifische Telomeraggregation konnte schon in vielen Organismen nachgewiesen werden, darunter so verschiedene wie Mensch, Maus, Rind (*Bos taurus*), Grashüpfer (z. B. *Brachostyla magna*), Spaltheife (*Schizosaccharomyces pombe*), Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), sowie Mais (*Zea mays L.*) und Roggen (*Secale cereale L.*) (Church, 1976; Rasmussen und Holm, 1978; Chikashige et al., 1994; Scherthan et al., 1994; Scherthan et al., 1996; Bass et al., 1997; Trelles-Sticken et al., 1999; Pfeifer et al., 2001; Carlton et al., 2003), und eine Reihe anderer Organismen (zur Übersicht siehe von Wettstein et al., 1984; Zickler und Kleckner, 1998; Scherthan, 2001).

Die Bukett-Bildung tritt bei allen untersuchten Organismen während des Leptotän-Zygotän-Übergangs auf, wenn die Homologensuche stattfindet und die homologen Chromosomenpaare beginnen sich über den SC stabil miteinander zu verbinden (Zickler und Kleckner, 1998). Die SC-Bildung an sich ist keine Voraussetzung für die Bukett-Bildung, denn Trelles-Sticken et al. (1999) zeigten, dass es in den diploiden Rekombinationsmutanten *rad50S* und *spo11Δ* von *S. cerevisiae*, die keine reifen SCs bilden (Loidl et al., 1994a), zur Bukettbildung kommt.

Die Bedeutung des Buketts für die Homologensuche bzw. -paarung konnte bis heute nicht eindeutig aufgeklärt werden. So könnte im Bukett eine räumlich begrenzte subterminale Homologieerkennung stattfinden, die den Prozess effektiver macht (Rhoades, 1961; Scherthan et al., 1996; Roeder, 1997). In der *ndj1* Mutante der Bierhefe wurde gezeigt, dass das Bukett-Stadium keine Voraussetzung für die Homologenpaarung ist, sondern tatsächlich eine katalytische Rolle bei der Homologenpaarung spielt (Trelles-Sticken et al., 2000).

Des Weiteren wird dem Bukett eine Rolle bei der Vermeidung oder Auflösung von eventuellen inter- oder intrachromosomalen Verhakungen (Interlockings) zugesprochen (Scherthan, 1997). Die Reduzierung der Bewegungsfreiheitsgrade im Bukett (Rhoades, 1961) und die Schleifenform der Chromsomen in diesem Stadium könnte die Auflösung der

Interlockings erleichtern und somit die Homologenpaarung effizienter gestalten (Scherthan, 1997).

Mit dem Bukett-Mechanismus könnte auch eine Art Kontrolle über den Paarungsprozess einhergehen. Dieser könnte chromosomalen Elementen, die bis dahin noch ungepaart geblieben sind, die Chance geben doch noch einen Paarungspartner zu finden (Scherthan, 1997) und somit eine Rolle im Mechanismus der distributiven Disjunction spielen (Loidl et al., 1994b).

In der Meiose der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* wurde in lebenden Zellen beobachtet, dass die meiotische Prophase hier von einer starken hin und her Bewegung des Kerns geprägt ist (Chikashige et al., 1994) und die starke Bewegung des meiotischen Kerns in *S. pombe* wurde als Sortierungsmechanismus für die Chromosomen während der asynaptischen Meiose von *S. pombe* interpretiert (Chikashige et al., 1994; Scherthan et al., 1994). Deletiert man in *S. pombe* das Gen *Taz1p*, das ein Telomerrepeat-bindendes Protein kodiert, kommt es zur Destabilisierung der Telomer-SPB Interaktionen, zu Anheftungsdefekten und das Bukett-Stadium bleibt aus. Weiterhin kommt es nur zu reduzierter homologer Rekombination und zu einer stark eingeschränkten Überlebensrate der Sporen, die auf eine zufällige Segregation der Chromosomen hinweist (Cooper et al., 1998).

Eine Anreicherung des Bukettmusters wurde in der Meiose von *Atm*<sup>-/-</sup> Mäusen gefunden (Pandita et al., 1999). Die Spermatogenese von *Atm*-defizienten Mäusen arretiert im Zygotän (Xu et al., 1996) und es scheint, dass in diesen Mäusen die Interaktionen zwischen Telomeren und der Kernmatrix gestört ist (Pandita et al., 1999). Weiterhin zeigte sich, dass in *Atm*<sup>-/-</sup>*p53*<sup>-/-</sup> Mäusen ebenfalls eine erhöhte Bukett-Anreicherung zu beobachten war, wobei sich wenige Spermatocyten bis ins Spermatiden-Stadium entwickelten. In den späten *Atm*<sup>-/-</sup>*p53*<sup>-/-</sup> Spermatocyten waren die Telomere relaxiert. Somit scheint die meiotische Telomeraggregation unabhängig von *Atm* zu sein und die Akkumulation von Bukett-Spermatocyten ist eher auf eine Verlangsamung der meiotischen Progression zu Beginn der



Prophase I und dem sich anschließenden Arrest und Absterben der Spermatocyten I zurückzuführen (Scherthan et al., 2000a).

Mittels einer Computersimulation wurde gezeigt, dass es sich bei der beobachteten Telomerbewegung in Roggenmeiocyten nicht um eine passive diffusions-vermittelte, sondern um eine gerichtete, aktive Bewegung handelt (Carlton et al., 2003).

## **1.7 Ziel und Fragestellung der Arbeit**

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die ATM Kinase, die die homologe Rekombination (HR) in der Säugermeiose kontrolliert (Scherthan et al., 2000a; Jerratsch, 2004), einen Einfluss auf die Telomer- und Chromosomendynamik während der Meiose hat. In der vorliegenden Arbeit sollte daher in geeigneten Knockout-Mausmodellen überprüft werden, welche Rolle Reparaturmechanismen wie homologe Rekombination oder Non-Homologous End-Joining (NHEJ) in der Regulation der meiotische Telomer- und Chromosomendynamik spielen. Ferner sollte untersucht werden, ob die Anheftung der Telomere an die meiotische Kernhülle von der Ausbildung meiosespezifischer Chromosomenstrukturen, wie beispielsweise Axial-/Lateralelementen oder Cohesinachsen abhängt. Durch das Studium von Mini-Ringchromosomen in der Keimbahn von transgenen Mäusen, sollte die Rolle von Telomerrepeats für den Telomer/Kernhüllenkontakt und die Homologenpaarung überprüft werden. Die dynamischen Veränderungen der Telomer- und Chromosomentopologie in der Spermatogenese der verschiedenen Knockout-Mausmodelle sollten mittels Immunfluoreszenzfärbungen (IF), Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (FISH) und dreidimensionaler (3D) Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Mausgenotypen**

In dieser Arbeit wurde von verschiedenen Mausmutanten und transgenen Mäusen Untersuchungen zur Chromosomen- und Telomerdynamik durchgeführt. Die Herkunft und Genotypen der Mäuse ist in Tabelle 2 angegeben. Die Testes der Mausmutanten wurden in den beteiligten Laboratorien entnommen, eingefroren und zur Verfügung gestellt oder selbst präpariert. Dazu wurden die Tiere durch cervikale Dislokation getötet; die Testes sofort reseziert und wie unter 2.2 beschrieben eingefroren.

### **2.2 Testes Entnahme**

Es ist wichtig, die Entnahme der Hoden schnell durchzuführen. Die entnommenen Testes wurden, um die Zellkernarchitektur zu erhalten, sofort für 5 min. in vorgekühltem Isopentan bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren und bis zum weiteren Gebrauch in Isopentan bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **2.2.1 Materialien**

- Flüssiger Stickstoff ( $\text{N}_2\text{-liq.}$ ) oder Trockeneis
- Isolierbehälter
- vorgekühltes Isopentan
- Maus
- mehrere Skalpelle
- Stecknadeln
- Eppendorfreaktionsgefäße

### 2.2.2 Durchführung

1. Maus in einen Glasbehälter setzen und durch Begasen mit CO<sub>2</sub> betäuben. Das betäubte Tier durch cervikale Dislokation töten.
2. Aus dem frisch getöteten Tier zügig die Testes freipräparieren, entnehmen und von anhaftendem Fettgewebe befreien.
3. Die Hoden in ein, mit -70°C vorgekühltem Isopentan gefülltes Eppendorfreaktionsgefäß geben und in Isopentan bis zum weiteren Gebrauch bei  $\leq -70^{\circ}\text{C}$  lagern.

### 2.3 Herstellung einer Testis-Suspension

Für die Herstellung einer Testis-Zellsuspension ist es wichtig, dass die Arbeitsschritte bei 4°C durchgeführt werden, um die strukturelle Integrität der Zellkerne zu erhalten (Scherthan et al., 1996).

#### 2.3.1 Materialien

- Eisgekühltes MEM-Medium [Life Technologies] mit Protease-Inhibitor (eine viertel Tablette pro Uhrglas) [Roche]
- Testes, frisch oder bei -70°C gelagert
- Nylonfilter (Maschenweite 70µm) [Nybolt]
- Skalpelle und Uhrglas (mit Alkohol entfettet)
- Eppendorfreaktionsgefäße
- Mini-Zentrifuge

### 2.3.2 Durchführung

1. Ein kleines Gewebestück eines Testis (etwa von der Größe eines Stechnadelkopfes) mittels zweier Skalpelle in einem Uhrglas mit ein wenig MEM-Medium (mit Protease-Inhibitor) zu einer homogenen Zellsuspension verarbeiten.
2. Zellsuspension durch das Nylonnetz in ein Eppendorfeaktionsgefäß (kurzes Anzentrifugieren des Eppendorfeaktionsgefäßes) überführen, dann auf Eis stellen und zügig weiterverarbeiten.

## 2.4 Herstellung von strukturellerhaltenen Suspensionspräparaten

Die Herstellung der strukturellerhaltenen Suspensionpräparate erfolgte nach dem modifizierten Protokoll von (Scherthan et al., 2000b).

### 2.4.1 Materialien

- frisch hergestellte Testiszellsuspension (auf Eis)
- Fixierungslösung (0,1M Sucrose [Serva], 3,7% Formaldehyd (säurefrei) [Merck] in 1xPBS (pH7,4)) (4°C)
- Plastik-Pipettenspitze
- in 70% Ethanol frisch gereinigte Superfrost/Plus Objektträger [Menzel]
- Umkehrmikroskop

### 2.4.2 Durchführung

1. Eine bestimmte Menge Zellsuspension auf einen Objektträger (OT) geben und Zelldichte unter dem Umkehrmikroskop beurteilen.
2. Gegebenenfalls die Zellsuspension ein wenig verdünnen, bis die Zellenkerne einzeln vorliegen
3. Die dreifache Menge Fixierungslösung zugeben und mit Hilfe der Pipettenspitze vorsichtig die Flüssigkeiten vermengen.

4. OT bei 4°C mindestens eine halbe Stunde antrocknen lassen.
5. OT an der Luft bei Raumtemperatur (RT) ganz trocken lassen.
6. Getrocknete Präparate bei -20°C bis zur weiteren Verwendung lagern.

## **2.5 Herstellung von Spreitpräparaten**

Die Detergentspreitung bewirkt eine zweidimensionale Ausbreitung der Zellkerne. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Protokoll basiert auf einer Modifikation der Methode von (Peters et al., 1997) und Scherthan et al.(2000).

### **2.5.1 Materialien**

- 1% Lipsol (L.I.P, England)
- Herstellung der Fixierungslösung: 1g para-Formaldehyd in 80ml Wasser lösen (erhitzen und gegebenenfalls ein wenig 1M NaOH zugeben und wieder auf RT abkühlen lassen); 10ml 50mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O (Borax) pH=9,2 zugeben; Fixativ-Lösung auf pH=9,2 Einstellen, 150µl TritonX-100 [Serva] zugeben und mit H<sub>2</sub>O auf 100ml auffüllen.
- Testeszellsuspension (4°C)
- Plastikpipettenspitzen
- in 70% Ethanol frisch gereinigte Superfrost-Plus Objektträger [Menzel]
- 0,1% Agepon (Agfa)
- Glasküvette

### **2.5.2 Durchführung**

1. 10µl Zellsuspension auf OT geben, 80µl 1%Lipsol zugeben und mit der Plastikpipettenspitze die Zellsuspension mit der Lipsollösung vorsichtig vermengen. Gegebenenfalls Zelldichte unter dem Umkehrmikroskop beurteilen. Es ist wichtig,

dass nur wenige vereinzelte Spermatozyten zu sehen sind, damit durch das Spreiten nicht das Chromatin der Kerne ineinander läuft (RT).

2. Nach 10 min. (RT) 90µl Fixierungslösung zugeben und den OT leicht hin und her schwenken, damit sich die Fixierungslösung mit der Zellsuspension vermengt.
3. Die Trocknung des OT sollte je nach Jahreszeit/Labor Klima in einer geöffneten, feuchten oder halb geschlossenen, feuchten Kammer erfolgen und möglichst genau 2 Stunden dauern (RT).
4. OT vier mal in 0,1% Agepon waschen und bis zur Verwendung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  lagern.

## **2.6 Herstellung von Tupfpräparaten**

Das Auftupfen von Hodengewebe auf einen OT führt zu angespreiteten Zellkernen, da beim Auftupfen die Zellkerne an der aminosilanylierten Glasoberfläche haften bleiben und beim Abziehen durch die sich aufbauende Spannung die Kernmembran aufreißt und der Kerninhalt auf der Glasoberfläche freigelegt wird.

### **2.6.1 Materialien**

- 1xPBS
- Fixierungslösung (3,7% Formaldehyd in 1xPBS)
- Glasküvetten
- frisch gereinigte Superfrost/Plus OTs [Menzel]
- flache Keramikpinzette
- Skalpell
- Uhrglas
- Testisgewebe ( $-70^{\circ}\text{C}$ )

## 2.6.2 Durchführung

1. Ein kleines Stück eines tiefgefrorenen Testis im Uhrglas (auf 4°C) mit Skalpell abschneiden und das übrige Testisgewebe unverzüglich wieder auf -70°C kühlen.
2. Mit der Pinzette das kleine Gewebestück aufnehmen und möglichst senkrecht, sanft und zügig auf den gereinigten OT (RT) auftupfen.
3. Den OT unverzüglich für 10 min. in eine Küvette mit Fixierlösung stellen.
4. Den OT bis zur Weiterverwendung (nicht länger als einige Stunden) in 1xPBS (4°C) aufbewahren.

## 2.7 Immunfärbung (IF)

### 2.7.1 Materialien

- Primäre und sekundäre Antikörper (siehe 2.7.2 und 2.7.3)
- PBTG: 1xPBS, 0.1% BSA [Sigma], 0.05% Tween 20 [Sigma], 0.5% Gelatine [Sigma] (37°C)
- 1xPBS, 0.5% Triton-X 100 (RT)
- 1x PBS, 0.5% Glycin (RT)
- optional Fixans: 1xPBS, 1% Formaldehyd (RT)
- hochreines H<sub>2</sub>O [Millipore Ultrapure]
- DAPI/Vectashield (Antifade; 1ml Vectashield [Vector Lab., England] + 1µl DAPI-Stocklsg.: 1mg DAPI [Sigma] /ml H<sub>2</sub>O)
- Küvette
- Deckgläschen (DG) oder Parafilm
- Tischzentrifuge



## 2.7.2 Verwendete Primärantikörper

Alle verwendeten Antikörper wurden unmittelbar vor Verwendung in PBTG und der entsprechenden Verdünnung aufgenommen. In dieser Arbeit wurden folgende affinitätsgereinigte, primäre Antikörper verwendet:

### **TRF1:**

- rabbit-anti-human-TRF1 (#371; (van Steensel und de Lange, 1997);  
Arbeitsverdünnung: 1:1000)
- rabbit-anti-mouse-Trf1 (#644; (Broccoli et al., 1997a) J. Karlseder und T. de Lange,  
unveröffentlicht; Verdünnung: 1:1000)

### **TRF2:**

- rabbit-anti-humanTRF2 (#647; (Zhu et al., 2000); Arbeitsverdünnung: 1:500)

### **RAP1:**

- rabbit-anti-human-RAP1 (#765; (Li et al., 2000a); Arbeitsverdünnung: 1:1000)

Die oben genannten Telomerantikörper wurden freundlicherweise von T. de Lange (Rockefeller University, USA) zur Verfügung gestellt.

### **TIN2:**

- rabbit-anti-human-TIN2 ([Imgenex]; (Kim et al., 1999); Verdünnung: 1:500)

### **SCP1:**

- rabbit-anti-rat-Scp1 ((Meuwissen et al., 1992; Liu et al., 1996); freundlicherweise von  
C. Heyting (Wageningen Agricultural University, Holland) zur Verfügung gestellt;  
Verdünnung: 1:1000)

### **SCP2:**

- rabbit-anti-rat-Scp2 ((Offenberg et al., 1998; Schalk et al., 1998); freundlicherweise von C. Heyting (Wageningen Agricultural University, Holland) zur Verfügung gestellt; Verdünnung: 1:500)

**SCP3:**

- rabbit-anti-rat-Scp3 ((Lammers et al., 1994); freundlicherweise von C. Heyting (Wageningen Agricultural University, Holland) zur Verfügung gestellt; Verdünnung: 1:1000)
- guinea pig-anti-rat-Scp3 ((Alsheimer und Benavente, 1996); freundlicherweise von R. Benavente (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt; Verdünnung: 1:100)

**STAG3:**

- rabbit-anti-human-STAG3 ((Pezzi et al., 2000); freundlicherweise von J. Barbero (UAM, Spanien) zur Verfügung gestellt; Verdünnung: 1:500)

**Histon H1t:**

- rabbit-anti-H1t ((Moens, 1995); freundlicherweise von P. B. Moens (York University, Toronto, Canada) zur Verfügung gestellt; Verdünnung: 1:250)

**XMR:**

- monoklonal, mouse-anti-Xmr ((Calenda et al., 1994); Verdünnung: 1:1000)

**$\gamma$ -H2AX:**

- rabbit-anti- $\gamma$ -H2AX ((Rogakou et al., 1999); [Upstate]; Verdünnung: 1:1000)
- monoklonal, mouse-anti- $\gamma$ -H2AX ((Rogakou et al., 1999); [Upstate]; Verdünnung: 1:1000)

**CREST:**

- human-anti-CREST Serum ([Acris Antibodies, Deutschland], Verdünnung: 1:500)

**$\gamma$ -Tubulin:**

- monoklonal, mouse-anti- $\gamma$ -Tubulin ([Sigma-Aldriche]; Verdünnung: 1:500)

Die Telomerantikörper TRF1, TRF2, RAP1 und TIN2 wurden mittels der sogenannten „Sandwich“-Detektion (Abschnitt 2.8) visualisiert. Dadurch wird die Signalintensität, aber auch die Hintergrundintensität amplifiziert.

### 2.7.3 Verwendete Sekundärantikörper

Zur Detektion der primären Antikörper wurden kommerzielle, sekundäre Antikörper verwendet:

- anti-rabbit-Cy3, anti-mouse-Cy3, anti-guinea pig-Cy3; Arbeitsverdünnung jeweils: 1:1000.
- anti-rabbit-FITC, anti-mouse-FITC, anti-guinea pig-FITC, anti-human-FITC; Verdünnung jeweils: 1:250.
- anti-rabbit-Cy5, anti-mouse-Cy5, anti-human-Cy5; Verdünnung jeweils 1:500.

Zur Absättigung möglicher freier Epitope wurde ein unmarkierter zweiter Antikörper verwendet:

- anti-rabbit- F(ab)<sub>2</sub>'-Fragmente (farblos); Verdünnung 1:100

Alle Antikörper wurden in individuellen Färbe-Experimenten auf ihre Spezifität getestet. Die Kontrollen ohne primäre Antikörper waren alle negativ.

### 2.7.4 Durchführung

**Achtung: OTs niemals trocken werden lassen! Antikörper (AK) und AK-Lösungen immer auf Eis (4°C) halten.**

- OT 2 mal 1min. in H<sub>2</sub>O waschen (RT)
- OT 30 min. (Spreitpräparate 20 min.) in PBS/ 0.5% TritonX100 extrahieren (RT)
- OT 5 min. in 1xPBS/ 0.5% Glycin waschen (RT)
- OT 10 min. (oder etwas länger) in PBTG waschen (37°C)
- **Primären AK** (Stammlösung) 1 min. bei 13 000 rpm zentrifugieren

- Primären AK von Oberfläche abpipettieren und in PBTG verdünnen (Verdünnung siehe 2.7.2)
- (\*) 100µl AK-Lösung auf OT geben und mit DG oder Parafilm gleicher Form (bei Gewebeschnitten) bedecken
- OT in feuchte Inkubationskammer legen und
  - a) Schnellfärbung:** 1.30h bei 37°C inkubieren
  - b) Detailfärbung:** über Nacht bei 4°C inkubieren
- DG abrutschen lassen bzw. Parafilm mit Pinzette vorsichtig von OT entfernen und OT 4 mal 3 min. in PBTG waschen (37°C)
- Sekundären, mit Fluorochrom markierten AK (Stammlösung) 1 min. bei 13000 rpm zentrifugieren
- Sekundären AK in PBTG verdünnen (Konzentrationen siehe 2.7.3)
- Pro OT 100µl AK-Lösung geben und mit DG oder Parafilm eindeckeln
- 30- 45 min. in feuchter Kammer inkubieren (37°C)
- DG abrutschen lassen bzw. Parafilm mit Pinzette vorsichtig von OT entfernen und 4 x 3 min. in Küvette mit PBTG waschen (37°C)
- OT aus Küvette nehmen und 16-18µl DAPI/Vectashield auftragen
- OT mit DG versehen und Überprüfung der IF am Fluoreszenz Mikroskop OT bei 4°C bzw. -20°C lagern, oder anschließend:

**Inkubation des zweiten primären AK:**

- Mikroskopieröl vom OT abtupfen, PBTG an die Kanten des Deckgläschens pipettieren und aufschwimmen lassen
- Vorsichtig DG mit Pinzette vom OT abheben (nicht abziehen!)
- OT zwei mal 1min in PBTG waschen (RT)

**Achtung:** Falls der zweite primäre AK aus dem gleichen Tier ist wie der erste primäre AK, müssen die noch freien Epitope des ersten primären AK zunächst mit einem nicht fluoreszenz-markierten sekundären AK abgesättigt und anschließend fixiert werden. Anderenfalls werden die nächsten acht Arbeitsschritte übersprungen.

- Sekundären, unmarkierten AK (Stammlösung) 1min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Sekundären AK in PBTG verdünnen (Konzentrationen siehe 2.7.3)
- Pro OT 100µl AK-Lösung geben und mit DG oder Parafilm eindeckeln
- 30- 45 min in feuchter Kammer inkubieren (37°C)
- DG abrutschen lassen bzw. Parafilm mit Pinzette vorsichtig von OT entfernen und 4 x 3min in Küvette mit PBTG waschen (37°C)
- OT 5 min. in Küvette mit Fixans (1x PBS, 1% Formaldehyd) stellen (RT)
- OT in PBS/Glycin 1x5 min waschen (RT)
- OT 5 min. in PBTG (37°C) waschen
- Den **zweiten primären AK** 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren und z.B. 1µl in PBTG verdünnen (siehe 2.7.2) und weiter s.o. unter (\*)

Entsprechend diesem Protokoll kann man zusätzlich einen weiteren **dritten primären Antikörper** inkubieren und mit einer dritten Farbe detektieren.

## **2.8 Immunfärbung mit anschließender FISH**

Durch Kombination von IF und FISH ist es möglich, DNA-Segmente und Proteine simultan sichtbar zu machen, was Aufschluss über die zeitlichen Zusammenhänge bestimmter chromosomaler Ereignisse im Verlauf der Differenzierung (Scherthan et al., 1996). Da durch die FISH Prozedur die Fluoreszenzintensität der Immunfärbung vermindert wird, müssen die Fluoreszenzsignale vorher amplifiziert werden. Dazu bedient man sich der sogenannten „Sandwich“-Detektion, bei der die freien Epitope des ersten primären Antikörpers mittels Biotinmolekülen amplifiziert werden (O'Carroll et al., 2000)

Die „Sandwich“-Detektionsmethode wurde auch angewendet, wenn sehr kleine Strukturen, wie zum Beispiel die Telomerproteine visualisiert werden sollen. Die folgenden Antikörper wurden für die „Sandwich“-Detektionsmethode verwendet:

### 2.8.1 Material

- anti-rabbit-Biotin, anti-mouse-Biotin, anti-human-Biotin; Verdünnung jeweils: 1:500
- ExtraAvidin-Cy3; Verdünnung: 1:1000
- ExtraAvidin-Cy5; Verdünnung 1:500-1:1000
- ExtraAvidin-FITC; Verdünnung: 1:250
- sekundäre Antikörper
- PBTG: 1xPBS, 0.1 % BSA [Sigma], 0.05 % Tween 20 [Sigma], 0.5 % Gelatine [Sigma], (37°C)
- 1xPBS, 0.5% Triton-X 100 (RT)
- 1x PBS, 0.5% Glycin (RT)
- optional Fixans: 1xPBS, 3,7% Formaldehyd (RT)
- hochreines H<sub>2</sub>O [Millipore Ultrapure]
- DAPI/Vectashield (Antifade; 1ml Vectashield [Vector Lab., England] und 1µl DAPI-Stocklsg.: 1mg DAPI [Sigma] /ml H<sub>2</sub>O)
- Küvette
- Deckgläschen (DG) oder Parafilm
- Tischzentrifuge

## 2.8.2 Durchführung

**Achtung: OTs niemals trocken werden lassen! Antikörper (AK) und AK-Lösungen immer auf Eis (4°C) halten**

- OT zwei Mal 1min. in H<sub>2</sub>O waschen (RT)
- OT 30 min (Spreitpräparate 20 min) in PBS/ 0.5% TritonX100 extrahieren (RT)
- OT 5 min in 1xPBS/ 0.5% Glycin waschen (RT)
- OT 10 min. (oder etwas länger) in PBTG waschen (37°C)
- Gewünschten **primären AK** (Stammlsg.) 1 min bei 13 000 rpm zentrifugieren
- Primären AK von Oberfläche abpipettieren und in PBTG verdünnen (Verdünnung siehe 2.7.1)
- (\*) 100µl AK-Lösung auf OT geben und mit DG oder Parafilm (bei Gewebeschnitten) bedecken
- OT in feuchte Inkubationskammer legen und
  - a) Schnellfärbung:** 1.30 h bei 37°C inkubieren
  - b) Detailfärbung:** über Nacht bei 4°C inkubieren
- DG abrutschen lassen bzw. Parafilm mit Pinzette vorsichtig von OT entfernen und OT 4 mal 3 min in PBTG waschen (37°C)
- Sekundären, mit Biotin markierten AK (Stammlösung) 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- **Entsprechenden Sekundären AK** in PBTG verdünnen (siehe 2.7.3)
- Pro OT 100µl AK-Lösung geben und mit DG oder Parafilm eindecken
- 45 min in feuchter Kammer inkubieren (37°C)
- DG abrutschen lassen bzw. Parafilm mit Pinzette vorsichtig von OT entfernen und 4 x 3 min in Küvette mit PBTG waschen (37°C)

**Detektion der Biotin-Moleküle:**

- Fluorochrom- markiertes Avidin (Stammlösung) 1 min bei 13 000 rpm zentrifugieren
- AK von Oberfläche abpipettieren und in PBTG verdünnen
- 100µl AK-Lösung auf OT geben und mit DG oder Parafilm (bei Gewebeschnitten) bedecken
- OT in feuchte Inkubationskammer legen
- 30 min in feuchter Kammer inkubieren (37°C)
- DG abrutschen lassen bzw. Parafilm mit Pinzette vorsichtig von OT entfernen und 4 x 3 min in Küvette mit PBTG waschen (37°C)

Bei den Präparaten, die nachfolgend einem FISH Experiment unterzogen werden sollen, müssen vor der FISH die Immunfluoreszenz im Kern fixiert werden:

- OT 10 min in 1xPBS, 3,7% Formaldehyd (RT) fixieren.
- OT 5 min in 1xPBS/ 0.5% Glycin waschen (RT)
- OT in 1xPBS (RT) bis zur FISH
- OT aus Küvette nehmen und 16-18µl DAPI/Vectashield auftragen
- OT mit DG versehen und Überprüfung der IF am Fluoreszenz-Mikroskop OT bei 4°C bzw. -20°C lagern, oder anschließend mit der FISH fortfahren (Abschnitt 2.15).

**2.9 DNA-Sonden****2.9.1 Telomer-PNA-Sonde**

Zur Detektion der Telomere wurde in einigen Experimenten ein kommerzielle, FITC-markierte (T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)-PNA-Sonde [DAKO, Dänemark] eingesetzt und nach dem Protokoll des Herstellers eingesetzt.



## 2.9.2 Telomer-Biotin-Sonde

Für die Telomer/Centromer-FISH Experimente wurden Biotin-markierte Telomersonden angefertigt, die folgende Sequenzen hatten (Scherthan et al. 1996):

- C-reich (TeloC): 5'-Biotin-(C<sub>3</sub>TA<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-3'
- G-reich (TeloG): 5'-Biotin-(T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)<sub>7</sub>-3'

## 2.9.3 Centromer-Sonde

Für die Visualisierung centromerischer Maus Major-Satelliten-DNA (Scherthan et al., 1996) wurde die folgende Sonde verwendet :

- 42 bp-Oligomer; Cy5-5'-AAG AAA ACT GAA AAT CAT GGA AAA TGA GAA  
ACA TCC ACT TGA-3'

## 2.9.4 Chromosomenpaintsonden

Um Chromosomenterritorien zu visualisieren (chromosome painting) wurden kommerzielle, markierte Sonden gegen die Mauschromosomen #1 (Biotin), #13 (FITC), #X (Cy3) und #Y (Biotin) benutzt [Cambio, England] und gemäß der Herstellervorschrift verfahren.

## 2.9.5 MMU-8- und MMU-12-spezifische, repetitive Subsatelliten Sonden

Die MMU-8-spezifische, repetitive Subsatelliten Klone (Boyle und Ward, 1992) und die MMU-12-spezifischen, repetitiven Subsatelliten Klone (Boyle und Ward, 1992) wurden freundlicherweise von D. C. Ward zur Verfügung gestellt.

## 2.9.6 Mini-Ringchromosomen-Sonde

Für die Visualisierung des artifiziellen, humanen Mini-Ringchromosoms (MC) wurde eine biotinylierte oder digoxigenierte alphaoide DNA-Sonde von T. Voet zur Verfügung gestellt (Voet et al., 2001).

## **2.10 Plasmid-Präparation**

### **2.10.1 Materialien**

- Qiagen Plasmid midi-Kit [Qiagen]
- Kompetente Zellen (*E.coli* DH5 $\alpha$ ) [Life technologies]
- LB-Medium: 0,5% Hefeextrakt (w/v), 1%Pepton (w/v), 1%NaCl, (w/v) pH7,5
- DOP-PCR-Master Kit [Roche]

### **2.10.2 Durchführung**

Alle Plasmide wurden in *E.coli* Zellen nach dem Herstellerprotokoll amplifiziert [Life technologies] und mit einem Plasmid Präparations-Kit nach den Herstellerangaben [Qiagen] isoliert. Die PCR-Bedingungen für die DOP-PCR-Reaktionen (Telenius et al., 1992a; Telenius et al., 1992b) wurden gemäß den Angaben des Herstellers [Roche] gewählt.

## **2.11 Markierung der DNA-Sonden**

Die Markierung der DNA-Sonden erfolgte durch den Einbau von biotinylierten bzw. digoxigenierten Nukleotiden mittels Nick Translation (Rigby et al., 1977) oder mit der Random Priming (Feinberg und Vogelstein, 1984) Markierungsmethode.

### **2.11.1 Materialien**

- Bio-Nick translations-System [GIBCO]
- Bio random prime labelling System [GIBCO]
- Nukleotidmix **A**: 0,2mM dNTP-Mix (0,2mM dATP, 0,2mM dGTP, 0,2mM dCTP, 0,1mM dTTP)
- Nukleotidmix **B**: 2mM dNTP-Mix (2mM dATP, 2mM dGTP, 2mM dCTP, 1mM dTTP)

### 2.11.2 Durchführung

Die Markierung mit Biotin erfolgte gemäß den Herstellerangaben der benutzten Markierungskits (Bio-Nick translation kit, GIBCO, bzw. Bio random Prime labelling Kit, GIBCO). Um die Sonden mit Digoxigenin zu markieren, wurden die mitgelieferten Nukleotidmische der Herstellerkits wie folgt ersetzt:

- Zur Nick Translation [GIBCO] wurde Nukleotidmix **A** benutzt.
- Zur Random Prime Markierung [GIBCO] wurde Nukleotidmix **B** benutzt.

Zusätzlich wurden die Ansätze mit Digoxigenin-11-dUTP [Roche] supplementiert.

### 2.12 Tailing-Reaktion

Die Telomersonden wurden mittels einer enzymatischen 3'-Tailing-Reaktion mit Biotinmolekülen markiert (Scherthan und Cremer, 1994). Die Reaktion wird für die TeloC- und TeloG-Sonden getrennt durchgeführt.

#### 2.12.1 Materialien

- 15pmol Oligonukleotide (ca. 160ng)
- 1nmol Biotin-11-dUTP
- 1,5nmol dATP
- 0,5µl CoCl<sub>2</sub>, 50 U terminale Transferase, 10µl 5xReaktionsmix [Boeringer]
- diesen Reaktionsansatz mit H<sub>2</sub>O auf 50µl auffüllen und vermengen

#### 2.12.2 Durchführung

1. Reaktionsansatz für 2 h bei 37°C inkubieren
2. 20mg *E.coli* Carrier-DNA zugeben
3. 3 Volumen Ethanol abs. zugeben und mixen
4. Präzipitation bei -20°C für mindestens 2 Stunden oder ü.N.
5. 30 min bei 13000 rpm zentrifugieren (-20°C)
6. Überstand verwerfen und Pellet einmal mit 70% Ethanol waschen

7. Pellet bei 65°C lufttrocknen (Heizblock)
8. Pellet in 16µl TE-Puffer aufnehmen

Die Kontrolle der Markierung erfolgt mittels der Dot-Blot-Reaktion (siehe 2.13)

## **2.13 Überprüfung der Sondenmarkierungseffizienz mittels Dot-Blot-Test**

Die Effizienz der Sondenmarkierungsreaktionen (Tailing Reaktion, random prime und Nick Translation) wurde mit dem Dot-Blot-Test überprüft (Scherthan und Cremer, 1994).

### **2.13.1 Material**

- 6xSSC (20xSSC: 175,3g NaCl, 88,2g Na-Citrat in 800ml H<sub>2</sub>O lösen, pH 7.0, auf 1Liter auffüllen)
- AP1-Puffer (100mM TrisHCl, 100mM NaCl, pH=7,5)
- AP1-BSA (AP1, 1% BSA)
- AP3 (100mM TrisHCl, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, pH=9,5)
- AK zum Nachweis von Digoxigenin-Markierungen: anti-dig-Alkalische-Phosphatase, 1:5000 in AP1, [Roche]
- AK zum Nachweis von Biotin-Markierung: Streptavidin-Alkalische-Phosphatase, 1:1000 in AP1 [Roche]
- Parafilm
- Transilluminator [Bachhofer]
- 70% Ethanol
- Färbelösung: 1 Tablette NBT/BCIP [Roche] in 10ml H<sub>2</sub>O lösen; Aufbewahrung im Dunkeln bei -20°C.

### 2.13.2 Durchführung

1. Verdünnungsreihe der markierten Sonde wie folgt herstellen:
2. 6 Tropfen mit je 9µl 6xSSC auf Parafilm vorlegen
3. 1µl der markierten Sonde in den ersten Tropfen 6xSSC pipettieren, mixen, 1µl entnehmen und in den zweiten 6xSSC pipettieren usw. (Verdünnungsstufen von 1:10 bis 1:10<sup>-6</sup>)
4. Je 1µl jeder Verdünnungsstufe auf eine Nylonmembran auftragen
5. Die Nylonmembran für 30 sec mit UV-Licht (254nm) bestrahlen, um die DNA auf der Nylonmembran zu fixieren
6. Nylonmembran 15 min mit AP1-BSA Lösung inkubieren (RT)
7. Nylonmembran 3 min in AP1 Lösung waschen (RT)
8. 5ml AK-Lösung auf die Membran geben und 30 min inkubieren (RT)
9. Nylonmembran 3 mal 3 min. in AP3-Lösung waschen
10. Nylonmembran in eine Plastiktasche legen, 1ml Färbelösung zugeben und Plastikfolie versiegeln
11. Die Farbreaktion 10-30 min im Dunkeln ablaufen lassen (RT, die Farbreaktion sollte so lange ablaufen, dass der blauschwarze Hintergrund auf der Nylonmembran nicht zu groß wird).
12. Zum Beenden der Farbreaktion Nylonmembran aus der Folie nehmen, Nylonmembran mit H<sub>2</sub>O und mit 70% Ethanol abspülen. Nylonmembran an der Luft trocknen lassen (RT)

Die Markierungseffizienz läßt sich aufgrund der Anzahl der Punkte („Dots“) beurteilen. Maßgebend für die Beurteilung einer guten DNA-Markierung ist der Nachweis von geringen DNA-Mengen, welcher durch die Intensität der Farbreaktion angezeigt wird. Bei einer guten Markierung sind die ersten zwei Punkte bereits nach 1-2 min Reaktionszeit sichtbar. Die

höheren Verdünnungen zeigen ungefähr nach 20 min eine Farbreaktion. Wird bei der zweiten oder dritten Verdünnungsstufe keine Farbreaktion erzielt, so ist die Markierung ungenügend, bzw. die Sondenkonzentration so niedrig, dass eine erfolgreiche Detektion nach einer FISH fraglich ist und die markierte DNA verworfen wird.

## **2.14 Hybridisierungsmix**

Um eine markierte DNA Sonde auf ein Präparat hybridisieren zu können, muss die DNA in einer Lösung aufgenommen werden. Die Lösung wird als Hybridisierungsmix bzw. Hybmix bezeichnet.

### **2.14.1 Zusammensetzung des Hybridisierungsmixes (Hybmix)**

- 50% deionisiertes Formamid
- 20% einer 50%igen (w/v) Dextransulfat-Lösung
- 20% Aqua dest.
- 10% 20xSSC (175,3g NaCl, 88,2g Na-Citrat in 800ml H<sub>2</sub>O lösen, pH 7,0, auf 1 Liter auffüllen)

### **2.14.2 Herstellung der Hybridisierungslösung und**

#### **Sondenkonzentrationen**

Die gewünschten Mengen an DNA Sonden (s.u.) werden zusammenpipettiert, 1/10 Volumen 1M NaAc (pH=5,2) und mit dem 3-fachem Volumen Ethanol 2 h bis über Nacht bei -20°C präzipitiert.

- TeloC- und TeloG-Sonde: je 1ng/μl Hybmix
- Maus-Centromer Sonde: 2ng/μl Hybmix
- MMU-8- und MMU-12-spezifische, repetitive Subsatelliten Sonden: 20ng/μl Hybmix und zusätzlich die 100fache Menge an Maus-Cot1-DNA [Invitrogen]

- Mini Chromosomen-Sonde (alphoide Satelliten-DNA): 3ng/μl Hybmix

Nach der Fällung wird die DNA in der vorgekühlten Zentrifuge bei -20°C 30 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Die DNA-Pellets werden mit 70% Ethanol gewaschen, bei 60°C im Heizblock getrocknet und dann im Hybridisierungsmix 30 min bei 60°C im Heizblock gelöst. Der Hybridisierungsmix sollte innerhalb von 3 Monaten verbraucht und bei -20°C gelagert werden.

## **2.15 Vorbehandlung und Denaturierung der Präparate für die FISH**

Um FISH-Experimente erfolgreich durchzuführen, müssen die ungefärbten bzw. die gefärbten Präparate einer Vorbehandlung unterzogen werden. Diese ist unerlässlich, weil das auf dem Objektträger fixierte Chromatin erst für die im Hybridisierungsmix gelösten DNA-Sonden zugänglich gemacht werden muss. Weiterhin sind in den Präparaten noch einzelsträngige RNAs präsent. Weil bei der FISH denaturierte und somit einzelsträngige DNA Moleküle eingesetzt werden, wird noch vorhandene RNA zu starkem unspezifischen Hintergrund führen. Deshalb ist ein gründlicher RNA-Verdau mittels RNase A unerlässlich.

### **2.15.1 Materialien**

- Spreitpräparate und Präparate mit strukturell erhaltenen Formaldehyd-fixierten Kernen.
- RNaseA Gebrauchslösung: RNaseA in einer Konzentration von 200μg/ml in 2xSSC gelöst
- 1M NaSCN [SIGMA]
- 70% Formamid in 2xSSC, pH7,4
- Heizblock
- Deckgläser (24x60mm)

### 2.15.2 Vorbehandlung und Denaturierung von Spreitpräparaten und von Präparaten mit dreidimensional erhaltenen Kernen

- Um Formaldehyd-fixiertes Chromatin aufzulockern und es somit für Sonden zugänglicher zu machen, wurde es für 15 min und bei 90°C mit Thiocyanat (NaSCN) behandelt. Hierzu wurde jeweils ein OT mit 100 µl Thiocyanat-Lösung versetzt, mit einem Deckglas (24x60mm) bedeckt und auf einen Heizblock gelegt.
- OT kurz in H<sub>2</sub>O waschen.
- Die Präparate einem RNaseA-Verdau unterziehen:
- Dazu werden auf das Präparat 100µl RNaseA-Gebrauchslösung gegeben.
- Das Präparat wird mit einem Deckglas eingedeckt und der Verdau bei 37°C für ≥ 2 h in einer feuchten Kammer durchgeführt.
- Nach dem RNaseA-Verdau werden die Objektträger in H<sub>2</sub>O gewaschen und sind dann bereit für die Denaturierung.
- Die Präparate werden mit Formamid-Lösung eingedeckt und 5 min auf dem Heizblock bei **a) 69°C** (gespreitete Kerne!) oder bei **b) 72°C** (strukturell erhaltene Kerne!) denaturiert.
- Das Deckglas abrutschen lassen und die Präparate bei Raumtemperatur ausgiebig in H<sub>2</sub>O waschen und lufttrocknen. Jetzt liegt die Ziel-DNA auf den Objektträgern einzelsträngig vor und kann mit markierter Sonden-DNA renaturieren.

### 2.16 Sonden-Denaturierung und Hybridisierung

- **Chromosomenterritorien-Sonden und MMU-8- und MMU-12-spezifische, repetitive Subsatelliten-Sonden:**
  1. Die DNA-Sonden werden 10 min bei 75°C im Heizblock denaturiert.



2. Danach muss die Hybridisierungslösung für 2 Stunden bei 37°C inkubiert werden (preannealing), damit die hochrepetitiven Sequenzen durch die in der Hybridisierungslösung enthaltenen Cot1-DNA-Fragmente abgesättigt werden und die Spezifität der FISH gewährleistet ist (Lichter et al., 1988; Pinkel et al., 1988).
  3. Die Hybridisierungslösungen werden anschließend direkt weiter verwendet.
- **TeloC-, TeloG-, Maus-Centromer- und Mini-Chromosmen-spezifische Sonden:**
    1. Die Sonden-DNAs in der Hybridisierungslösung werden 3 min bei 95°C im Heizblock denaturiert.
    2. Danach wird die Hybridisierungslösung für 1 min auf 4°C abgekühlt. Das stabilisiert die entstandenen Einzelstränge

### **2.16.1 Aufbringen der Hybridisierungslösung auf die Präparate**

Nachdem sowohl die Präparate aus 2.16.2 oder 2.16.3 als auch die Sonden-DNAs denaturiert vorliegen, wird die Hybridisierungslösung wie folgt auf das Präparat gebracht:

1. 1-2µl Hybridisierungslösung auf eine geeignete Stelle des Präparats pipettieren.
2. Die Stelle, an der die Hybridisierungslösung aufgetragen wurde, wird mit einem Deckglas entsprechender Größe luftblasenfrei eingedeckt.
3. Der Rand des Deckglases wird mit Fixogum (Collagekleber) versiegelt.
4. Die Präparate werden dann 2 Tage bei 37°C in einer trockenen Kammer zur Renaturierung der DNAs inkubiert, wobei die markierten Sonden-DNAs ihre homologen Zielsequenzen im Kern finden und an sie binden.

### **2.17 Detektion der markierten Hybridmoleküle**

Nach einer Hybridisierungsdauer von zwei Tagen werden die Präparate vom Fixogum befreit und unter stringenten Bedingungen gewaschen. Diese Stringenzwaschung hat den Zweck doppelsträngige Hybridmoleküle mit geringer Homologie voneinander zu trennen und

ungebundene Sondenmoleküle zu entfernen. Außerdem werden unspezifische Proteinbindungsstellen auf dem Präparat mit BSA abgesättigt, wodurch der Hintergrund bei der anschließenden immunozytochemischen Detektion möglichst klein gehalten wird (Scherthan und Cremer, 1994).

In dem verwendeten Protokoll macht man sich bei der Detektion der Biotin-markierten DNA-Fragmente die hohe Affinität von Avidin zu Biotin zu Nutze. In diesem Detektionssystem wurde eine Signalamplifikation für höhere Signalintensitäten durchgeführt (Pinkel et al., 1986). Das kannst du schon oben bei Avidin IF erwähnen.

Die Detektion von digoxigenierten Nukleotiden erfolgte mit Hilfe von Rhodamin-konjugierten anti-Digoxigenin-f(ab)<sub>2</sub>'-Fragmenten (Verdünnung: 1:500).

### 2.17.1 Material zur Detektion der Hybridmoleküle

- Antikörper mit den gewünschten Fluorochrommarkierungen
- 20xSSC (175,3g NaCl, 88,2g Na-Citrat in 800ml H<sub>2</sub>O lösen, mit 10N NaOH auf pH=7.0 einstellen und auf 1Liter auffüllen).
- BT-Puffer (0.15M NaHCO<sub>3</sub>, 0.1% Tween-20 (v/v), 0,6mM Na<sub>3</sub>-Citrat, pH=8.3).
- DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) [Sigma]. Stamm-Lösung: 1mg/mL in sterilem dH<sub>2</sub>O
- Vecta Shield Mounting medium (Eindeckmittel, Vector Laboratories)
- Glasküvetten
- Wasserbad
- Deckgläser

### **2.17.2 Detektion**

1. Fixogum vom Objektträger (OT) ziehen und die Deckgläser vorsichtig abschwimmen lassen oder nach dem ersten Waschen mit einer Pinzette entfernen.
2. OT 2x5 min in 0,05xSSC bei 42°C in einer Küvette waschen.
3. OT 5 min in BT-Puffer, 0,5% BSA(w/v) bei 37°C zum Blocken einstellen.
4. Sekundäre ExtraAvidin und/oder anti-digoxigenin-rhodamin AK (Stammlösung) 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
5. AK von Oberfläche abpipettieren und in BT verdünnen (Abschnitt 2.8)
6. Antikörperlösung auf den Objektträger geben, mit einem Deckglas luftblasenfrei eindecken und in einer feuchten Kammer 30-45 min bei 37°C inkubieren.
7. Deckglas abrutschen lassen und Objektträger 3x3 min bei 37°C in BT-Puffer waschen.
8. Die überschüssige Flüssigkeit von den Objektträgern ablaufen lassen und Objektträger in feuchtem Zustand mit 18µl DAPI-haltigem Vecta Shield Medium (1µg DAPI / 1ml Vecta Shield) eindecken.
9. Präparat im Fluoreszenzmikroskop auswerten.

### **2.18 Mikroskopische und computergestützte Auswertung**

Die Auswertung der Präparate erfolgte an einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop (Axioskop I), das zur simultanen Visualisierung roter und grüner Fluoreszenzen mit einem Doppelbandpassfilter ausgestattet war. Des weiteren waren Einzelbandpassfilter zur Darstellung blauer, grüner, roter und infraroter Fluoreszenzen installiert. Digitale Bilder wurden mit einer gekühlten CCD (Charge coupled device) Schwarzweiß-Kamera (Hamamatsu) aufgenommen. Mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms ISIS 3 (MetaSystems) wurden die verschiedenen Graubilder mit den Farben der eingesetzten

Fluorochrome belegt und überlagert. Dadurch war eine Darstellung von rot/grün/blau-Farben möglich.

Zur Analyse der Fluoreszenzintensitäten wurde die Profilanalysenfunktion des ISIS-Programms verwendet. Dabei wurden die Graustufenwerte der Pixel entlang einer selbst definierten Polygonlinie in den digitalten rot/grün/blau Kanälen ausgewertet. Das ISIS-Programm bestimmte die relativen Grauwerte in jedem Farbkanal aus drei Pixeln, die senkrecht zur ausgewählten Linie lagen und gab die relativen Variationen in der Fluoreszenzintensität entlang dieser Linie als Profilgraph an.

## **2.19 Dreidimensionale Mikroskopie und Auswertung**

Die 3D-Analysen der Präparate wurden zu Beginn der Arbeit mit einem Zeiss Axioskop Mikroskop, später mit einem Mikroskop des Typs Axiovert (Zeiss) durchgeführt. Das Fluoreszenz-Objektiv (100x-plan-neofluar Öl-Imm./NA 1.35; Zeiss) war an einen PIFOC Z-SCAN (Physik Instrumente) und eine 12-bit CCD-Kamera (SensiCam; PCO) gekoppelt. Die Kontrolle erfolgte durch die TILLvisION v4.0 Software an einem WindowsNT-PC (TILL-Photonics, Deutschland). Die Fluorochrome wurden über einen Polychrome IV Monochromator (TILL-Photonics, Deutschland) in Kombination mit einem Vierfachbandpass-Strahlenteiler und Sperrfilter (Chroma Technology Corp.) angeregt. Das erlaubte die sequentielle Aufnahme von blauen, grünen, roten, und infraroten Fluoreszenzen einer Z-Ebene. Der PIFOC Z-SCAN ermöglichte die sequentielle Aufnahme zum Beispiel eines Zellkerns mit frei wählbaren z-Abständen. Allerdings wirkte sich der benötigte Speicherplatz für die digitalen Bilddaten als limitierender Faktor aus. Die in dieser Arbeit angefertigten dreidimensionalen Bilderstapel wurden mit einem Abstand von 200nm aufgenommen.

Die Dekonvolution der Bilddaten erfolgte mit dem cMLE Algorithmus der Huygens 2.1.4-essential Software (Scientific Volume Imaging, Holland; (ab 2002 Version 2.6.0). Das

Digital Rendering (digitales Berechnen eines Bildes) zur 3D-Rekonstruktion von Zellkernen oder Strukturen aus Zellkernen wurde mit dem Programm Imaris 3.3.2 (Bitplane, Schweiz) durchgeführt.

Die nachträgliche Bildbearbeitungen sowie das Erstellen der Abbildungen erfolgte mit den Programmen: Adobe Photoshop 7.0 und Paintshop Pro Version 6.02.

### 3 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, in welcher Weise die Rekombinationsreparatur in der meiotischen Prophase die Umverteilung der Telomere beeinflusst. Hierzu wurden Untersuchungen an verschiedenen Mausmutanten und transgenen Mäusen zur Chromosomen- und Telomerdynamik durchgeführt. Die unterschiedlichen Mausmutanten kann man zur besseren Übersicht in verschiedene funktionelle Gruppen einteilen. Es wurden Mausmutanten *i*) mit Defekten in der DSB-Erkennung, *ii*) mit Fehlern in der homologen Rekombination (HR), *iii*) mit fehlerhafter Non-Homologous End-Joining (NHEJ) Reparatur, *iv*) deren p53-abhängige DNA Schadensantwort stromabwärts von ATM fehlerhaft ist, *v*) denen das Ubiquitin-konjugierte Enzym Hr6B fehlt, *vi*) die eine heterozygote Null-Mutation in *Terf1* (telomere repeat-binding factor 1) aufweisen, *vii*) mit Fehlern in der Spermien Differenzierung, *viii*) deren meiotische Chromosomenstruktur fehlerhaft ist, *ix*) denen eine meiosespezifische Kernhüllenkomponente fehlt und *x*) die ein oder zwei artifizielle Mini-Ringchromosomen besitzen, untersucht. Tabelle 2 zeigt die untersuchten Mausmutanten mit den jeweiligen Eigenschaften und Defekten (soweit bekannt) bzgl. ihrer Fertilität, Spermatogenese Progression, Synapse, Telomerlänge und Fähigkeit der DNA-Reparatur auf.

**Tabelle 2:** In der vorliegenden Arbeit untersuchte Mausmutanten und ihre Phänotypen in der Spermatogenese

<i>Genotyp</i>	<i>Fertilität</i>	<i>Spermatogenese-Arrest</i>	<i>Synapse</i>	<i>Telomerlänge</i>	<i>DNA-Reparatur</i>	<i>Gruppe</i>
<i>Atm</i> <sup>-/-</sup> (Barlow et al., 1996; Elson et al., 1996)	♀,♂ infertil (Xu et al., 1996)	Zygotän (Pandita et al., 1999)	unvollständig; teilweise heterolog (Xu et al., 1996)	verkürzt (Smilenov et al., 1997), extra-chromosomale T <sub>2</sub> AG <sub>3</sub> -Repeats (Hande et al., 2001)	gestört (Barlow et al., 1997b)	DSB-Erkennung
<i>Atm</i> <sup>-/-</sup> <i>p53</i> <sup>-/-</sup> (Barlow et al., 1997b)	♂ infertil (Barlow et al., 1997b); ♀ ?	Pachytän (Barlow et al., 1997b)	fehlerhaft; verkürzte SCs (Barlow et al., 1997b)	n.u.	gestört (Barlow et al., 1997b)	DSB-Erkennung
<i>H2ax</i> <sup>-/-</sup> (Petersen et al., 2001)	♂ infertil ♀ fertil (Celeste et al., 2002)	♂ Pachytän (Celeste et al., 2002)	normal, XY Paarung fehlerhaft (Celeste et al., 2002)	normal (Fernandez-Capetillo et al., 2003a)	fehlerhaft (Celeste et al., 2002)	Chromatin Modifikation nach DSB-Erkennung
<i>Spo11</i> <sup>-/-</sup> (Baudat et al., 2000; Romanienko und Camerini-Otero, 2000)	♀,♂ infertil (Baudat et al., 2000; Romanienko und Camerini-Otero, 2000)	♂ Zygotän, ♀ Diplotän (Baudat et al., 2000; Romanienko und Camerini-Otero, 2000)	♀,♂ fehlerhaft bzw. unvollständig (Baudat et al., 2000; Romanienko und Camerini-Otero, 2000)	n.u.	keine physiol. DSBs (Baudat et al., 2000; Romanienko und Camerini-Otero, 2000)	Homologe Rekombination (HR)
<i>Atm</i> <sup>-/-</sup> <i>Spo11</i> <sup>-/-</sup> (Bellani et al. 2004, MS in Vorbereitung)	♂ infertil	♂ wahrscheinlich Zygotän	n.u.	n.u.	n.u.	HR
<i>Spo11</i> <sup>-/-</sup> <i>Atm</i> <sup>+/-</sup> (Bellani et al. 2004, MS in Vorbereitung; Barchi et al., unveröffentlicht)	♂ infertil	♂ wahrscheinlich Zygotän	n.u.	n.u.	n.u.	HR
<i>mei1</i> (Libby et al., 2002)	♀,♂ infertil (Libby et al., 2002)	♂ Zygotän ♀ MI (Libby et al., 2002)	♀,♂ fehlerhaft (Libby et al., 2002)	n.u.	keine physiol. DSBs (Libby et al., 2003)	HR
<i>Dmcl1</i> <sup>-/-</sup> (Pittman et al., 1998)	♀,♂ infertil (Pittman et al., 1998)	♂ Zygotän ♀ Pachytän oder früher (Pittman et al., 1998)	♀,♂ keine Synapsis (Pittman et al., 1998)	n.u.	gestört (Pittman et al., 1998)	HR
<i>Hop2</i> <sup>-/-</sup> (Petukhova et al., 2003)	♀,♂ infertil (Petukhova et al., 2003)	♂ Zygotän (Petukhova et al., 2003) ♀ n.u.	♂ unvollständig (Petukhova et al., 2003)	n.u.	gestört (Petukhova et al., 2003)	HR
<i>Mlh1</i> <sup>-/-</sup> (Edelmann et al., 1996)	♀,♂ infertil (Baker et al., 1996)	♂ MI (Eaker et al., 2002) ♀ ?	normal (Baker et al., 1996)	n.u.	kein Crossover (Baker et al., 1996)	HR

(weiter nächste Seite)

<b>Genotyp</b>	<b>Fertilität</b>	<b>Spermatogenese-Arrest</b>	<b>Synapse</b>	<b>Telomerlänge</b>	<b>DNA-Reparatur</b>	<b>Gruppe</b>
<b>Gadd45<sup>-/-</sup></b> (Hollander et al., 1999)	♀,♂ fertil (Hollander et al., 1999)	nein	normal	n.u.	fehlerhaft (Bishop et al., 2003)	Zellzyklus-Arrest
<b>P53<sup>-/-</sup></b> (Donehower et al., 1992)	♀,♂ fertil	nein	normal	normal (Hande, 2004)	gestört (Lee und Bernstein, 1993)	keine meiotische Funktion
<b>Terf1<sup>+/-</sup></b> (Karlseder et al., 2003)	♀,♂ fertil	nein	normal	n.u.	normal	Telomer-Biologie
<b>Hr6B<sup>-/-</sup></b> (Roest et al., 1996)	♂ infertil ♀ fertil (Roest et al., 1996)	♂ postmeiotisch (Baarends et al., 2003)	normal, SCs an den Telomeren fehlerhaft (Baarends et al., 2003)	n.u.	fehlerhaft, erhöhte Crossover Frequenzen (Baarends et al., 2003)	Ubiquitin- konjugiertes Enzym
<b>Sycp3<sup>-/-</sup></b> (Yuan et al., 2000; Yuan et al., 2002)	♂ infertil ♀ subfertil (Yuan et al., 2000; Yuan et al., 2002)	♂ Zygotän (Yuan et al., 2000)	♀ normal ♂ gestört (Yuan et al., 2000; Yuan et al., 2002)	n.u.	fehlerhaft (Yuan et al., 2000; Yuan et al., 2002)	Meiotische Chromosomenstruktur
<b>Smc1β<sup>-/-</sup></b> (Revenkova et al., 2004)	♀,♂ infertil (Revenkova et al., 2004)	♂ Pachytän ♀ Metaphase II (Revenkova et al., 2004)	♀,♂ unvollständig (Revenkova et al., 2004)	n.u.	keine Chiasmata (Revenkova et al., 2004)	Meiotische Chromosomenstruktur
<b>Lmna<sup>-/-</sup></b> (Sullivan et al., 1999)	♂ infertil ♀ subfertil (Alsheimer et al., 2004)	♂ Pachytän (Alsheimer et al., 2004)	normal; XY Paarung fehlerhaft (Alsheimer et al., 2004)	n.u.	n.u.	meiosiespezifisches Kernhüllenprotein
<b>scid</b> (van Buul et al., 1998)	n.u.	nein	n.u.	verlängert (Hande et al., 1999)	n.u.	NHEJ-Reparatur
<b>Ku80<sup>-/-</sup></b> (Nussenzweig et al., 1997)	♀,♂ reduzierte Fertilität (Couedel et al., 2004)	nein	n.u.	verkürzt (Hande et al., 1999)	gestört (in <i>KU70<sup>-/-</sup></i> Mäusen gezeigt) (Ouyang et al., 1997)	NHEJ-Reparatur
<b>Asm<sup>-/-</sup></b> (Horinouchi et al., 1995)	♀,♂ reduzierte Fertilität (Butler et al., 2002)	nein	n.u.	n.u.	n.u.	Spermiogenese
<b>mGcl1<sup>-/-</sup></b> (Kimura et al., 2003)	♂ reduzierte Fertilität (Kimura et al., 2003)	nein	Normal	n.u.	n.u.	Spermiogenese
<b>TnPI<sup>-/-</sup></b> (Yu et al., 2000)	♂ reduzierte Fertilität (Yu et al., 2000)	nein	Normal	n.u.	n.u.	Spermiogenese
<b>IMC<sup>+</sup>,2MC<sup>+</sup></b> (Voet et al., 2001)	♀,♂ fertil (Voet et al., 2003a)	nein	Normal	n.u.	n.u.	transgene Maus mit Mini- Ringchromosom(en)

(n.u., betreffende Eigenschaft nicht untersucht)



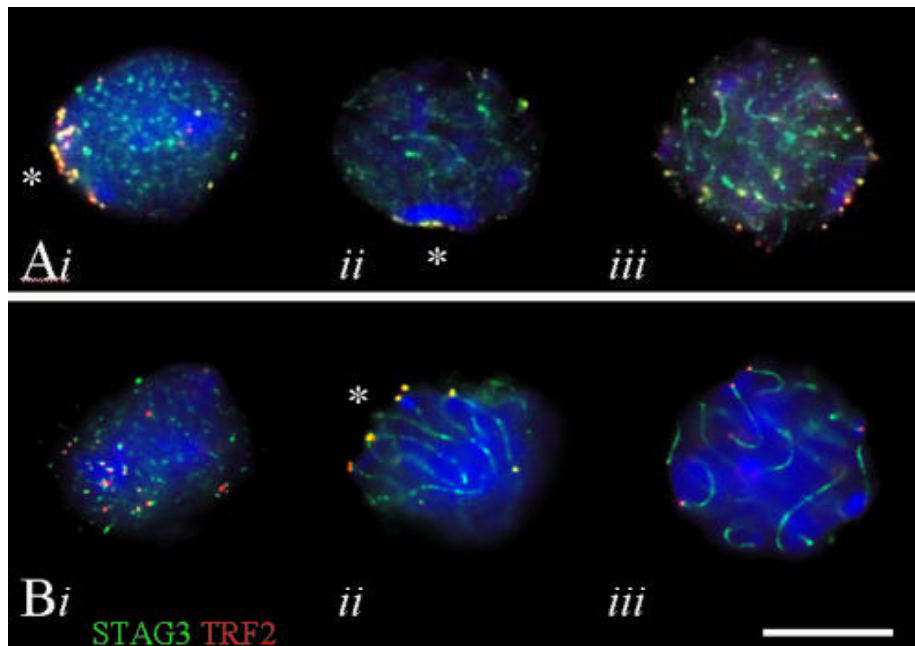
### 3.1 Untersuchungen an SCP3-defizienten Mausspermatocyten

Das meiosespezifische Protein SCP3 stellt die Hauptkomponente des axialen Elements (AE) des synaptonemalen Komplexes (SC) dar (Lammers et al., 1994; Schalk et al., 1998). Die AEs beginnen sich im Leptotän-Stadium an den Chromosomen auszubilden und die Enden der Chromosomen, die Telomere, heften sich an die innere Kernhülle an (Moenz, 1969; Esponda und Gimenez-Martin, 1972; Holm, 1977). Nachdem sich an den Chromosomen die AEs entwickelt haben, setzt im Zygotän-Stadium die Homologenpaarung ein. Gepaarte AEs werden nun im Kontext der SC-Bildung als Lateralelemente (LE) bezeichnet und nach vollständiger Paarung nennt man das Proteingerüst, das für die feste, reißverschußartige Verbindung zwischen den homologen Chromosomen verantwortlich ist, Synaptonemalen Komplex (zur Übersicht siehe von Wettstein et al., 1984; Page und Hawley, 2004). Yuan und Kollegen berichteten, dass SCP3-defiziente männliche Mäuse infertil sind, und dass sich die homologen Chromosomen in den mutanten Spermatocyten nicht paaren (Yuan et al., 2000). Weiterhin zeigten die Autoren, dass sich die *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatocyten nur bis in das Zygotän-Stadium entwickeln und durch Apoptose absterben. In weiblichen Mäusen führt das Fehlen von SCP3 zu erhöhter Aneuploidie in den Oocyten aufgrund fehlerhafter meiotischer Differenzierungskontrolle und Chromosomensegregation (Yuan et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit sollte u.a. untersucht werden, ob SCP3 während der männlichen Mausmeiose eine Rolle bei der Anheftung der AEs an die Kernhülle und/oder bei der meiotischen Telomeraggregation (Bukett-Bildung) eine Rolle spielt. Dazu wurden sowohl FISH-Experimente mit einer PNA-Sonde gegen telomerische (T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)<sub>n</sub> -Repeats in Kombination mit verschiedenen IF-Färbungen gegen STAG3 (meiosespezifisches Cohesin Protein), SCP2 (meiosespezifisches AE Protein) oder SCP1 (meiosespezifisches TF Protein) als auch Telomer-Centromer-FISH Experimente an strukturell erhaltenen Spermatocyten (Scherthan et al., 2000a) durchgeführt.

### 3.1.1 SCP3-defiziente Telomere heften sich an die innere Kernperipherie

Dreidimensionale (3D) Fluoreszenzmikroskopie an strukturell erhaltenen Spermatozyten, deren Telomere (TRF2) und Cohesinachsen (STAG3) mittels IF gefärbt waren, zeigte, dass die Telomere in prämeiotischen Wildtyp und *Sycp3*<sup>-/-</sup> Kernen im Kerninneren verteilt sind (Abb.1). Von Leptotän bis Pachytän (Wildtyp) bzw. von Leptotän bis spätem Zygotän (*Sycp3*<sup>-/-</sup>) waren die Telomere peripher angeordnet (Abb.5).



**Abbildung 5:** Immunfärbung (IF) der Cohesinachsen (STAG3, grün), Telomere (TRF2, rot) und DNA (DAPI, blau) in strukturell erhaltenen *Sycp3*<sup>-/-</sup> (A) und *Sycp3*<sup>+/+</sup> (B) Spermatozyten. Die Schärfenebenen der Bilder liegen in der Kernmitte (außer (Bi): oberer Teil des Kerns abgebildet). (Ai) *Sycp3*<sup>-/-</sup> Leptotän-Spermatozyte mit einer eng begrenzten Bukett-Basis an der Kernperipherie (\*) und kurzen STAG3 Cohesinfragmenten. (Aii) *Sycp3*<sup>-/-</sup> Zygotän-Spermatozyte (Bukett-Stadium; \*) mit STAG3 Achsen und Achsenfragmenten. (Aiii) *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatozyte im fortgeschrittenen Zygotän-Stadium mit STAG3 Achsen und an der Kernperipherie verteilten Telomeren. (Bi) *Sycp3*<sup>+/+</sup> Leptotän-Spermatozyte mit STAG3 Achsenfragmenten und den meisten Telomeren im unteren linken Bereich des Kerns. (Bii) Späte Zygotän-Spermatozyte (*Sycp3*<sup>+/+</sup>) mit langen STAG3 Achsen und aggregierten Telomeren (\*). (Biii) Pachytän-Spermatozyte mit gepaarten STAG3 Cohesinachsen und dispers an der Kernperipherie verteilten Telomeren. Die Telomeraggregation ist in den *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatozyten dichter und enger begrenzt als in den Wildtyp-Spermatozyten. Der Maßstab entspricht 10µm und ist für alle Kerne gültig. (Abbildung entnommen aus Liebe et al., 2004)

### 3.1.2 Spermatogenese Arrest in männlichen *Sycp3*<sup>-/-</sup> Mäusen

Neben den meiotischen Progressionsmarkern STAG3 (Cohesin-Komponente, Prieto et al., 2001), SCP2 (AE-Protein, Offenberg et al., 1998) und SCP1 (Transversalfilament-Protein, Liu et al., 1996) wurde zusätzlich eine IF mit dem meiosespezifischen Histon H1t durchgeführt. H1t kann als Markerprotein für späte Prophase I Substadien verwendet werden, da es ab dem mittleren Pachytän-Stadium mittels IF nachgewiesen werden kann (Moens, 1995; Drabent et al., 1996; Scherthan et al., 2000a) und solange exprimiert wird, bis die haploiden Spermatiden das Elongationsstadium erreichen (Drabent et al., 1996). Es zeigte sich, dass *Sycp3*<sup>-/-</sup> Kerne negativ für H1t Expression waren (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis bestätigte, dass *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatocyten vor Erreichen des mittleren Pachytän-Stadiums arretierten (Yuan et al., 2000).

### 3.1.3 Veränderte Telomermorphologie bei Abwesenheit von SCP3

#### Protein

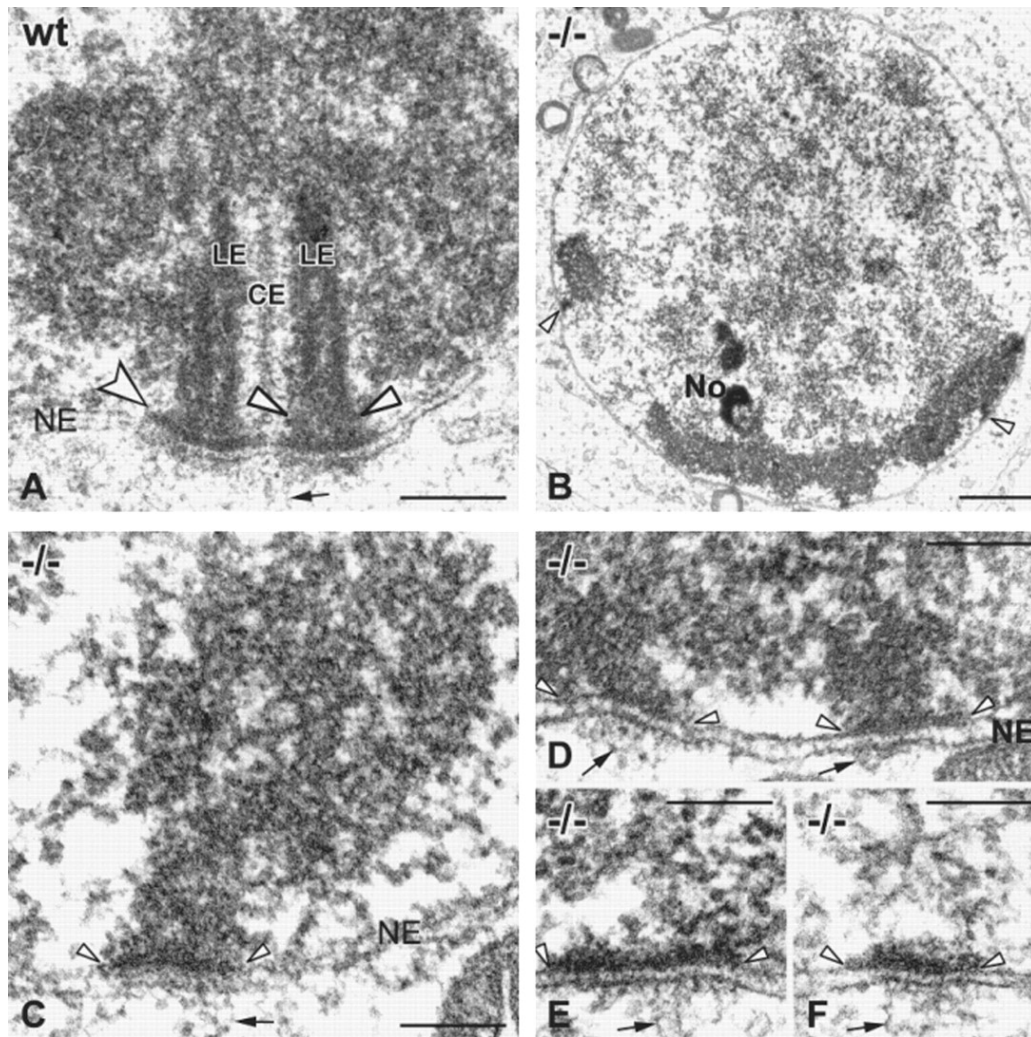
Um die Telomeranheftung an die Kernperipherie bei der Abwesenheit von SCP3 und axialen Elementen im Detail studieren zu können, wurde in Zusammenarbeit mit M. Alsheimer und R. Benavente (Universität Würzburg) transmissions-elektronenmikroskopische (TEM) Untersuchungen an *Sycp3*<sup>-/-</sup> und *Sycp3*<sup>+/+</sup> Spermatocyten in Testisgewebeschnitten durchgeführt. Wildtyp-SCs zeigten die typischen konischen Verdickungen an den Enden der LEs und waren, wie schon beschrieben (Esponda und Gimenez-Martin, 1972; von Wettstein et al., 1984), mit den breiten Enden dieser konischen Verdickungen an die innere Kernmembran angeheftet (Abb.6 A). Die konischen Verdickungen der LEs waren über eine elektronenreiche Platte mit der inneren Kernmembran verbunden (Abb.6 A). Die Anheftungsstellen der AEs an der inneren Kernperipherie in *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatocyten zeigten deutliche Unterschiede: In SCP3-defizienten Spermatocyten fehlte die elektronenreiche,

markante konische Verdickung an den Ende der AEs. Die AEs waren direkt mit der inneren Kernmembran über eine diskusförmige, elektronenreiche Platte (~200nm Durchmesser) mit der inneren Kernmembran assoziiert (Abb.6 B-F).

An den proximalen Telomeren konnte oft eine Art von „Stängel“ zwischen der scheibenförmigen Anheftungsplatte an der inneren Kernmembran und dem angrenzenden Heterochromatin beobachtet werden (Abb.6 B-D), die an den ultrastrukturellen Aufbau proximaler Telomere in Wildtyp-Spermatocyten erinnert (Stack, 1984). Die *Sycp3*<sup>-/-</sup> Anheftungsplatte distaler Telomere zeigte eine flache, elektronenreiche Struktur mit unstrukturiertem, angrenzendem Chromatin (Abb.6 E, F).

Weiterhin wurden in *Sycp3*<sup>+/+</sup> und *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatocyten fibrilläre Strukturen beobachtet, die ausgehend von der Chromosomenanheftungsplatte durch die Kernmembran hindurchgingen und bis in das Cytoplasma reichten (Abb.6 A,C-F). Diese Filamente sind 4-5 nm dick und wurden schon bei Zygotän- und Pachytän-Telomeren in anderen Spezies beschrieben, wobei ihr molekularer Aufbau und ihre Funktion bis heute ungeklärt sind (Esponda und Gimenez-Martin, 1972; Holm, 1977; Bojko, 1990; Benavente, 2004).

Zusammenfassend ergaben die TEM Untersuchungen, dass das SCP3-Protein einen entscheidenden Beitrag zum Aufbau der konischen Verdickung, die sich an der telomerischen Anheftungsplatte an der inneren Kernmembran der AEs/LEs ausbildet, leistete.



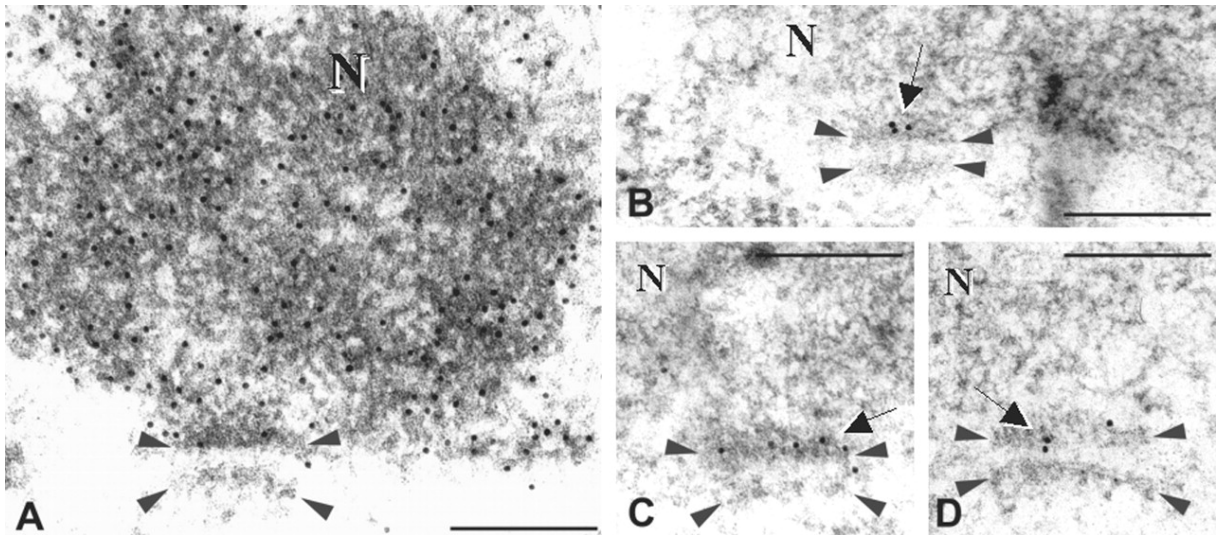
**Abbildung 6:** EM von Telomeranheftungen in *Sycp3*<sup>+/+</sup> (A) und *Sycp3*<sup>-/-</sup> (B-F) Kernen. (A) Elektronenreiche LEs eines SCs (CE, Zentralelement) einer *Sycp3*<sup>+/+</sup> Spermatocyte, die in Form von konischen Verdickungen (Pfeilspitzen) an der Innenseite der Kernmembran anliegen. Eine elektronenreiche Platte verbindet die konischen Verdickungen des LE mit der inneren Kernmembran (eingekerbter Pfeil). Der doppelstrangartige Aufbau des LE wurde nur in diesem Präparat gesehen, aber auch schon in Hamster-Spermatocyten beschrieben (Dresser und Moses, 1980). (B) Übersicht über eine *Sycp3*<sup>-/-</sup> Bukett Spermatocyte (Leptotän-Zygotän-Übergangsstadium), erkennbar durch das aggregierte, elektronenreiche Heterochromatin im unteren Bereich des Kerns. Auch einige Telomeranheftungsstellen sind zu sehen (Pfeilspitzen; No, Nukleolus). (C und D) Detaillierte Ansichten von *Sycp3*<sup>-/-</sup> Anheftungsplatten proximaler Telomere an der Innenseite der Kernmembran (jeweils zwischen den Pfeilspitzen sichtbar). (D) Zwei Telomeranheftungsplatten, die ~330nm voneinander entfernt sind. (E und F) Distale Telomeranheftungsstellen (ohne angrenzendes Heterochromatin) mit einer elektronenreichen Platte an der Innenseite der Kernmembran und angrenzendem unstrukturierten Chromatin (jeweils zwischen den Pfeilspitzen sichtbar). Die kleinen schwarzen Pfeile (6A und 6C-F) zeigen auf fibrilläre, unbekannte Strukturen, die ausgehend von der Telomeranheftungsplatte durch die Kernmembran hindurch gehend in das Cytoplasma reichen. Maßstäbe: (A, C-F) 0,2µm und (B) 2µm. (Abbildung entnommen aus Liebe et al., 2004)

### 3.1.4 Die Anheftungsplatten der Chromosomen an die Kernperipherie beinhalten Telomersequenzen

Es gibt nur wenige Informationen über spezifische Nukleinsäure-Sequenzen, die an der AE/LE-Anheftungsstelle beteiligt sind (Esponda und Gimenez-Martin, 1972; Scherthan et al., 1996; Franco et al., 2002). Es wurde vermutet, dass Telomer-Sequenzen  $(T_2AG_3)_n$  bei der Anheftung der Telomere an die innere Kernhülle eine Rolle spielen (Scherthan et al., 1996). In Zusammenarbeit mit M. Alsheimer und R. Benavente sollte darum in Ultradünnschnitten von *Sycp3*<sup>-/-</sup> Testes die SC-Anheftungsstellen auf das Vorhandensein von DNA und im speziellen auf das Vorhandensein von Telomerrepeats untersucht werden. Nach der Behandlung mit Terminaler Transferase / Digoxigenin-dUTP wurden DNA spezifische Goldmarkierungen exklusiv im Kernchromatin und in den Anheftungsplatten an der Innenseite der Kernmembran festgestellt (Abb.7 A).

Weiterhin wurde von M. Alsheimer und R. Benavente ein EM-ISH Experiment mit Digoxigenin markierten  $T_2AG_3$  Repeats durchgeführt. Die telomerspezifischen Repeats wurden ausschließlich in der Anheftungsplatte an der Innenseite der Kernmembran gefunden (Abb.7, B-F). Die geringe Dichte an Goldpartikeln (die markierten Telomerrepeats) scheint eine Eigenschaft der EM-ISH Prozedur zu sein (Steinmuller et al., 1993).

Die EM-ISH Vorbehandlung führte an der cytoplasmatischen Seite der Kernmembran an den Anheftungsstellen zu einer elektronenreiche Platte, die keine telomerspezifischen  $T_2AG_3$ -Repeats enthielten (Abb.7). Es ist wahrscheinlich, dass diese elektronenreiche Struktur durch kollabiertes, fibrilläres Material (Abb.6) entstanden ist, da diese Struktur bei anderen Präparationstechniken nicht aufgetreten ist (Esponda und Gimenez-Martin, 1972; Holm, 1977).



**Abbildung 7:** *In situ* DNA-Endenmarkierung in *Sycp3*<sup>-/-</sup> Kernen. (A) Ausschnitt eines Spermatocyten I Kerns (N) mit DNA spezifischen Goldkörnern, die auch an der Telomer-Anheftungsstelle zu finden sind (schwarze Pfeilspitzen). (B-D) Detaillierte Ansicht von Telomer-Anheftungsstellen nach einer EM-ISH mit T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>-Repeatsonden. Spezifische Telomerrepeat-Signale (schwarze Goldkörner, Pfeile) sind exklusiv an der Anheftungsplatte an der Innenseite der Kernmembran lokalisiert (schwarze Pfeilspitzen). Nur bei diesem Experiment zeigte sich auch eine elektronenreiche Platte an der cytoplasmatischen Seite der Telomeranheftungsstelle, was wahrscheinlich ein technischer Artefakt der EM-ISH Methode ist, der vielleicht durch einen „Kollaps“ des cytoplasmatischen fibrillären Materials (siehe Abb.6) verursacht wurde. Maßstab: 0,2µm. (Abbildung entnommen aus Liebe et al., 2004)

### 3.1.5 Das Fehlen von SCP3 ändert nicht den telomerischen Protein

#### Komplex

Um herauszufinden, ob die veränderte Ultrastruktur des SCP3-defizienten meiotischen Chromosomengerüsts den Aufbau der telomerischen Proteinzusammensetzung beeinträchtigt, wurden Zweifarben-IF Experimente mit verschiedenen Telomerproteinen (TRF1, TRF2 und mRAP1 Broccoli et al., 1997b; Li et al., 2000b) und dem meiosespezifischen STAG3 Cohesin (Pelttari et al., 2001) durchgeführt (Abb.5 und nicht gezeigt). Alle drei untersuchten Telomerproteine waren an den SCP3-defizienten Telomeren lokalisiert.

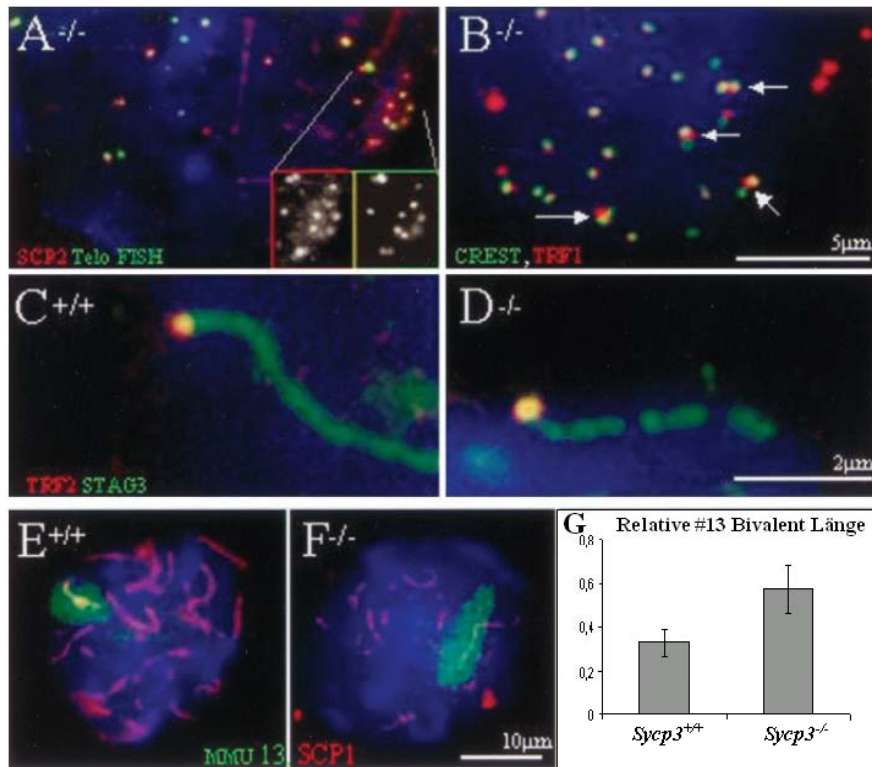
Dreidimensionale Fluoreszenzmikroskopie zeigte, dass sowohl in Wildtyp- als auch in SCP3-defizienten Spermatocyten die Enden der chromosomalen Cohesinachsen an der

Kernperipherie lokalisiert waren und mit allen drei Telomerproteinen kolokalisierten. Um zu überprüfen, ob an den *Sycp3*<sup>-/-</sup> Telomeren auch das Cohesinprotein STAG3 vorhanden ist, wurden Fluoreszenzprofilanalysen (Scherthan et al., 2000b) durchgeführt. In beiden Genotypen (*Sycp3*<sup>+/+</sup>, n=103 und *Sycp3*<sup>-/-</sup>, n=105) konnte eine perfekte Übereinstimmung der Enden des STAG3 Signals mit den TRF2 markierten Telomeren gefunden werden (Abb.8 C und D).

Weiterhin wurden *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatocyten mit einem Antikörper gegen das SCP2-Protein, einer weiteren Komponente der AEs (Offenberg et al., 1998; Schalk et al., 1998), gefärbt und danach die Telomere mittels PNA-Telomer-FISH in einer anderen Farbe detektiert (Abb.8 A), um herauszufinden, ob bei Abwesenheit von AEs, SCP2 an den Telomeren lokalisiert ist. 84% der punktierten SCP2-Signale (n=384) kolokalisierten mit den Telomer-FISH-Signalen.

Im Gegensatz dazu zeigten die *Sycp3*<sup>-/-</sup> Telomere (n=715) nur 13,4% Kolokalisation mit den Enden von SCP1-Achsfragmenten (insgesamt 50 analysierte *Sycp3*<sup>-/-</sup> Meioocyten, im Mittel ~14 SCP1-positive Achsenfragmente pro Meioocyte; nicht gezeigt).





**Abbildung 8:** (A) SCP2-Protein (grün, IF) und Telomere (rot, T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>-FISH) kolokalisierten in *Sycp3*<sup>-/-</sup> gespreiteten Spermatocyten. Die Detailansicht zeigt die Graukanäle des Ausschnitts. (B) Telomer- (TRF1, rot) und Kinetochor- (CREST, grün) IF in einer gespreiteten SCP3-defizienten Spermatocyte. Einige separierte Centromer-Signale zeigten ein gemeinsames Telomer-Signal dazwischen (Pfeile). Beachtenswert waren die vergrößerten Telomer-Signale an den CREST-Signaldubletten. Wahrscheinlich handelte es sich hier um gepaarte Telomer-Signale. (C und D) Detaillierte Ansicht einer Cohesin- (STAG3, grün) und Telomer- (TRF2, rot) IF von dreidimensional erhaltenen *Sycp3*<sup>-/-</sup> und *Sycp3*<sup>+/+</sup> Spermatocyten. (C) Die Cohesinachsen in *Sycp3*<sup>+/+</sup> Spermatocyten waren von ihrem Ende ausgehend kontinuierlich mit STAG3 angefärbt. (D) Im Gegensatz dazu zeigten die SCP3-defiziente Cohesinachsen eine diskontinuierliche Färbung mit mehreren Unterbrechungen in Nähe der Telomere. (E und F) SCP1-IF (rot) und Chromosome Painting (MMU13, grün) in gespreiteten *Sycp3*<sup>-/-</sup> und *Sycp3*<sup>+/+</sup> Spermatocyten. (E) Ein einziges MMU13-FISH-Signal zeigte ein *Sycp3*<sup>+/+</sup> MMU13-Bivalent mit der SCP1-Achse in der Mitte. (F) Ein ausgedehntes MMU13-Bivalent in einer *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatocyte mit einem SCP1-Achsenfragment. (G) *Sycp3*<sup>-/-</sup> MMU13-Bivalente sind ausgedehnter als die *Sycp3*<sup>+/+</sup> MMU13-Bivalente. Der Graph zeigt die relative Länge von je 20 untersuchten, gepaarten MMU13-Bivalenten. Die MMU13-Homologen der *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatocyten wurden als gepaart ausgewertet, wenn nur ein einziges FISH-Signal auftrat, um sie mit *Sycp3*<sup>+/+</sup>-Bivalenten vergleichen zu können. Die Länge der Bivalente wurde im Verhältnis zu den jeweiligen Kerndurchmessern (durch Auswertung des DAPI Signals ermittelt) gesetzt. Die Auswertung zeigte, dass die Chromosomenkondensation von MMU13-Bivalenten in *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatocyten signifikant gestört war (t-Test, p<0,001). (Abbildung entnommen aus Liebe et al., 2004)

### 3.1.6 Störung der Chromosomenkondensation in SCP3-defizienten

#### Spermatocyten

Obwohl das STAG3-Cohesin in strukturell erhaltenen Spermatocyten an allen *Sycp3*<sup>-/-</sup> Telomeren vorhanden war, zeigte sich eine diskontinuierliche, unterteilte Struktur in 33% der von den analysierten Telomeren (n=105) ausgehenden STAG3-Achsen (Abb.8 C und D). Die STAG3-Proteinachsen wurden ausgehend vom Telomer auf einer Länge von 0,7µm untersucht, da in den strukturell erhaltenen Kernen eine längere Achsenanalyse nicht möglich war. In *Sycp3*<sup>+/+</sup> Spermatocyten zeigten sich nur in 3% der untersuchten STAG3-Achsen in der Nähe der Telomere eine diskontinuierliche Struktur (n=103). Während in *Sycp3*<sup>+/+</sup> Spermatocyten überwiegend kontinuierliche STAG3-Achsen beobachtet wurden, zeigten *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatocyten generell eine unterbrochene Morphologie (siehe Abb.5).

Um zu überprüfen, ob die unterbrochenen Cohesinachsen einen Hinweis auf gestörte Chromosomenkondensation sein könnte, wurde auf gespreiteten *Sycp3*<sup>-/-</sup> und *Sycp3*<sup>+/+</sup> Spermatocyten eine IF mit SCP1 Antiserum in Kombination mit Chromosomen Painting für das Mausechromosom 13 (MMU13) angefertigt (Abb.8 E und F). Die maximale Länge der MMU13-Ausdehnung wurde ausgemessen und im Verhältnis zum jeweiligen Kerndurchmesser gesetzt, um Spreitungsvariationen zu kompensieren. Es zeigte sich, dass die *Sycp3*<sup>-/-</sup> MMU13-Chromosomen (n=20) fast zwei mal so lang wie die *Sycp3*<sup>+/+</sup> MMU13-Chromosomen waren (n=20; Abb.8 G). Dieser Unterschied war hoch signifikant (t-Test, p<0,001). Die gepaarten *Sycp3*<sup>-/-</sup> MMU13-Signale zeigten SCP1-Achsen bzw. Achsenfragmente. Somit ist es wahrscheinlich, dass die Beladung der Chromosomenachsen mit SCP3-Protein zur Kondensation der AEs und SCs beiträgt. Auch in weiblichen *Sycp3*<sup>-/-</sup> Pachytän-Oocyten waren die SCP1-Achsen (SCs) ungefähr doppelt so lang wie in *Sycp3*<sup>+/+</sup> Oocyten (Yuan et al., 2002).

### 3.1.7 Unterschiedliche Telomer- und Centromer-Assoziationen

#### homologer Chromosomen in SCP3-defizienten Spermatocyten

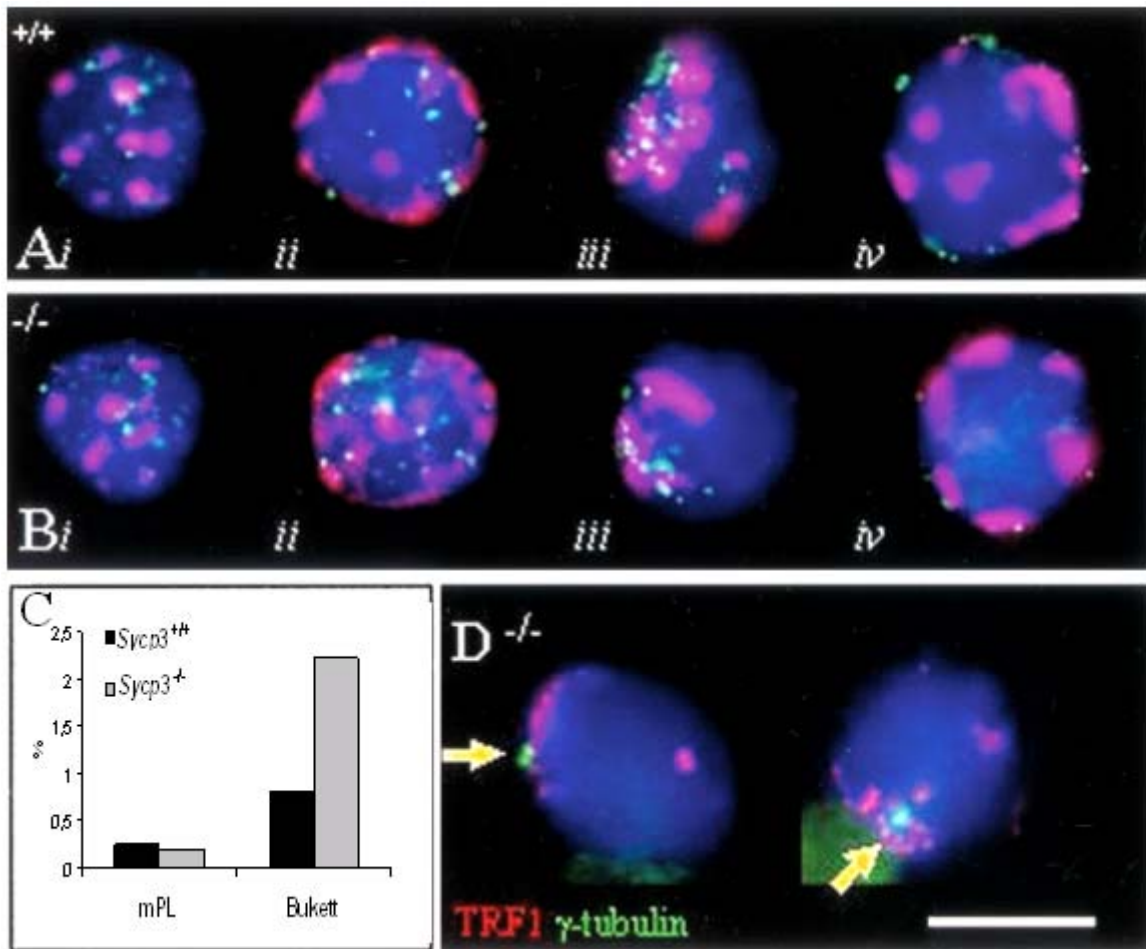
Um den Einfluss des SCP3-Proteins auf die Funktionalität der Homologenpaarung an den Telomeren und Centromeren zu untersuchen, wurden in gespreiteten *Sycp3<sup>-/-</sup>* und *Sycp3<sup>+/+</sup>* Spermatocyten das Telomerprotein TRF1, das Kinetochorprotein CREST und das Transversalfilament-Protein SCP1 simultan angefärbt. Zunächst wurden in mehr als 90 Spermatocyten pro Genotyp (*Sycp3<sup>+/+</sup>* Pachytän-Spermatocyten und fortgeschrittene *Sycp3<sup>-/-</sup>* Zygotän-Spermatocyten mit langen SCP1-Achsenfragmenten) die Anzahl der TRF1-Signale ausgezählt. In beiden Genotypen wurde eine ähnliche Anzahl an TRF1-Signalen festgestellt: Im Mittel wurden in *Sycp3<sup>+/+</sup>* Spermatocyten  $38,8 \pm 1,3$  und in *Sycp3<sup>-/-</sup>* Spermatocyten  $40,9 \pm 3,8$  Telomere pro Spermatocyte gefunden. Dies entspricht ungefähr der haploiden Anzahl Telomere pro Spermatocyte (theoretisch sind das 38 Telomer Signale für die 19 Autosomen plus 3 Telomer-Signale des XY-Bivalents, das nur an der Pseudoautosomalen Region gepaart ist, also insgesamt 41 Telomer-Signale pro Spermatocyte).

Dieses Ergebnis legte den Schluss nahe, dass in den fortgeschrittenen *Sycp3<sup>-/-</sup>* Zygotän-Spermatocyten, trotz Abwesenheit der AEs die Telomere, homolog paaren konnten. Das Auszählen der Centromer-Signale hingegen ergab einen hochsignifikanten Unterschied (t-Test,  $p < 0,001$ ) zwischen *Sycp3<sup>+/+</sup>* und *Sycp3<sup>-/-</sup>* Spermatocyten. In der Mutante wurden  $30,3 \pm 4,4$  und im Wildtyp  $21,5 \pm 1,0$  Centromer-Signale pro Spermatocyte gefunden (n=42, bzw. n=40). Weiterhin zeigte sich, dass in der Mutante oftmals nahe beieinander liegende, aber doch deutlich getrennte Centromer-Signale mit einem gemeinsamen Telomer-Signal assoziiert waren (Abb.8 B).

### 3.1.8 Fehlen von SCP3 führt zu veränderter Telomerdynamik

Es stellte sich die Frage, ob die Telomerpaarung in *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatozyten durch die meiotische Telomeraggregation vermittelt wurde, da das Bukett-Stadium vermutlich homologe Interaktionen fördert (zur Übersicht siehe Loidl, 1990; Scherthan, 2001). Mittels Telomer-Centromer-FISH Experimenten auf strukturell erhaltene Wildtyp- und Knockout-Spermatozyten (Abb.9 A-C) wurden die Bukett- und die mittleren Präleptotän-Frequenzen ausgezählt.

Die Frequenzen des mittleren Präleptotän-Stadiums waren in beiden Genotypen ungefähr gleich groß (*Sycp3*<sup>+/+</sup>=0,25%, n=2005 und *Sycp3*<sup>-/-</sup>=0,20%, n=2028). Dagegen wurde eine signifikante Erhöhung der Bukett-Frequenz in *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatozyten beobachtet (Abb.9 C). In der *Sycp3*<sup>+/+</sup> Spermatozyten-Suspension betrug die Bukett-Frequenz 0,8% (n=2005), während sie in der *Sycp3*<sup>-/-</sup> Suspension um das 2,8-fache erhöht war (2,2%, n=2028). Dieser Unterschied war statistisch hochsignifikant ( $\chi^2$ -Test, p<0,001).

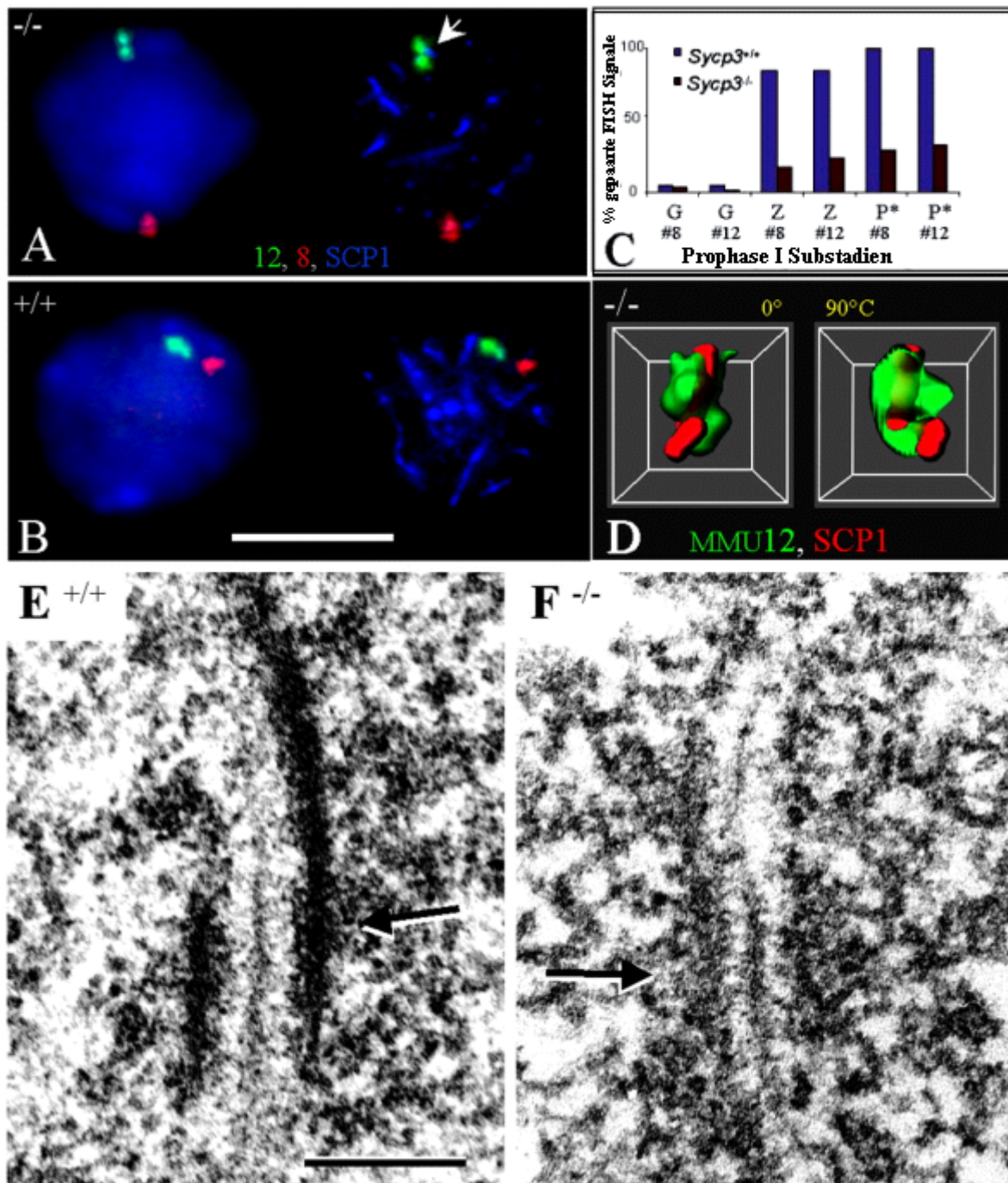


**Abbildung 9:** Telomer- (grün, T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>) und Centromer- (rot, Major-Satelliten-DNA) FISH-Muster in strukturell erhaltenen  $Sycp3^{-/-}$  und  $Sycp3^{+/+}$  Spermatocyten. (**Ai** und **Bi**) Prämeiotische Kerne (Schärfenebenen durch die Mitte der Kerne) mit internen Telomer- und Centromer-Signalen. (**Aii** und **Bii**) Mittlere Präleptotän-Spermatocyten mit peripherer lokalisierter Major-Satelliten-DNA und internen Telomeren (Schärfenebene durch die Mitte der Kerne). (**Aiii** und **Biii**) Leptotän-Zygotän-Spermatocyten (Schärfenebenen im oberen Teil der Kerne) mit einer Anhäufung von Telomer-Signalen (Bukett-Stadium) in einer eng begrenzten Region der Kernperipherie (Bukett-Basis). (**Aiv**)  $Sycp3^{+/+}$  Pachytän- und (**Biv**) fortgeschrittene  $Sycp3^{-/-}$  Zygotän-Spermatocyte (Schärfenebenen durch die Kernmitten) mit peripheren Telomer-Signalen und peripheren Major-Satelliten-DNA Anhäufungen. (**C**) Die Frequenzen der mittleren-Präleptotän-Spermatocyten war in beiden Genotypen ähnlich. Die Bukett-Frequenz war dagegen in  $Sycp3^{-/-}$  Spermatocyten (2,2%, n=2028 Spermatocyten) im Vergleich zu  $Sycp3^{+/+}$  Spermatocyten (0,8%, n=2005) 2,8-fach erhöht. Dieser Unterschied war statistisch hoch signifikant ( $\chi^2$ -Test,  $p < 0,001$ ). (**D**) Telomer- (TRF1, rot) und  $\gamma$ -Tubulin- (grün) IF in dreidimensional erhaltenen  $Sycp3^{-/-}$  Spermatocyten zeigte die räumliche Nähe der Bukett-Basis zum Centrosom (Pfeil). Der Maßstab in (D) ist 10 $\mu$ m lang und gilt auch für (A) und (B). (Abbildung entnommen aus Liebe et al., 2004)

Zweifarb-IF gegen das am Centrosom (das Centrosom entspricht dem Mikrotubulus organisierenden Zentrum, MTOC) lokalisierte  $\gamma$ -Tubulin und das Telomerprotein TRF1 bestätigte, dass sich die Bukett-Basis in *Sycp3<sup>+/+</sup>* und *Sycp3<sup>-/-</sup>* Spermatocyten in der Nähe des Centrosoms ausbildete (Scherthan, 2001) (Abb.9 D). Die erhöhte Bukett-Frequenz in der *Sycp3<sup>-/-</sup>* Spermatogenese, sowie das Vorkommen von Leptotän-Bukett-Spermatocyten (Abb.5 A), die in der *Sycp3<sup>+/+</sup>* Spermatogenese nicht vorkommen, deuteten auf eine gestörte Telomerdynamik bei der Abwesenheit von AEs hin.

### **3.1.9 SCP1 kann homologe Sequenzen bei Abwesenheit von AEs verbinden**

Das Transversalfilament-Protein (TF) SCP1 bildete in *Sycp3<sup>-/-</sup>* Spermatocyten kurze, irreguläre Proteinachsenfragmente aus (Abb.8 F und Yuan et al., 2000; Pelttari et al., 2001). Es blieb jedoch unklar, ob sich diese irregulären SCP1-Proteinstrukturen in Regionen homologer oder nicht-homologer Synapse ausbildeten (Yuan et al., 2000). Mittels zweifarb-FISH mit chromosomenspezifischen Sonden, die auf die Subsatellitenregionen der Mauschromosomen 8 und 12 kartieren (Boyle und Ward, 1992), sollten SCP1-positive, strukturell erhaltene *Sycp3<sup>-/-</sup>* Spermatocyten auf regionale homologe Wechselwirkung untersucht werden (Abb.10).



**Abbildung 10:** Untersuchungen zur Homologenpaarung in  $Sycp3^{-/-}$  und  $Sycp3^{+/+}$  Spermatocyten mittels FISH-Experimenten mit regionenspezifischen MMU8 (rot) und MMU12 (grün) DNA-Sonden in Kombination mit SCP1-IF (infrarot, blaue Falschfarbendarstellung). **(A)**  $Sycp3^{-/-}$  Spermatocyte (DNA, blau, Abbildung links) mit gepaarten MMU8- und MMU12-Signalen; das MMU12-Signal kolokalisierte mit einem SCP1-Achsenfragment (blau, rechte Abbildung, Pfeil). **(B)**  $Sycp3^{+/+}$  Spermatocyte mit gepaarten MMU8- und MMU12-Signalen (Schärfenebenen in A und B nahe des Kernäquators). Die SCP1-Achsen (blau) des Kerns sind im rechten Teil des Bildes zu sehen. Der Maßstab beträgt  $10\mu\text{m}$  und gilt für (A) und (B). **(C)** Die Frequenzen gepaarter MMU8- und MMU12-Signale in Spermatogonien (G), Zygotän- (Z) und Pachytän-Spermatocyten (P\*) (der Stern bezieht

sich auf die *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatocyten mit deutlich langen SCP1-Achsenfragmenten). **(D)** Dekonvolution und dreidimensionale Rekonstruktion eines gepaarten MMU12-Signals in einer fortgeschrittenen *Sycp3*<sup>-/-</sup> Zygotän-Spermatocyte. In rot sind SCP1-Achsenfragmente und in grün ist das SCP1-umschließende MMU12-Signal aus zwei unterschiedlichen Blinkwinkeln (0° und 90°) dargestellt. **(E)** Ausschnitt eines EM Bildes eines SCs einer *Sycp3*<sup>+/+</sup> Spermatocyte mit Transversalfilamenten, die die elektronenreichen LEs verknüpfen (Pfeil). **(F)** EM Bildausschnitt einer *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatocyte mit einem Transversalfilament-Fragment das eine Zentralelement-ähnliche Struktur (Pfeil) ausgebildet hatte. Eine Abfolge von geordnetem Chromatin schließt sich dieser Art Zentralelement an. Der Maßstab für (E) und (F) beträgt jeweils 0,2µm. (Abbildung entnommen aus Liebe et al., 2004)

Die Auswertung der zweifarben-FISH Experimente ergab in 4,2% der *Sycp3*<sup>-/-</sup> und *Sycp3*<sup>+/+</sup> Spermatogonien (n=56 bzw. n=48) gepaarte MMU8- oder MMU12-Signale. In *Sycp3*<sup>+/+</sup> Kernen mit punktaktigen SCP1-Signalen (Zygotän-Stadium) wurden 84% gepaarte MMU8- und MMU12-Signale beobachtet, während in der Mutante in nur 7% der Zygotän-Spermatocyten beide FISH-Signale gepaart vorlagen (Abb.10 C). Allerdings waren in 18% der *Sycp3*<sup>-/-</sup> Zygotän-Spermatocyten die MMU12-Signale gepaart und die MMU8-Signale getrennt, während 11% der Kerne gepaarte MMU8-Signale und ungepaarte MMU12-Signale zeigten. In *Sycp3*<sup>+/+</sup> Pachytän-Kernen (n=149) lagen alle MMU8- und MMU12-Signale gepaart vor. Dagegen waren nur in 19% der fortgeschrittenen *Sycp3*<sup>-/-</sup> Zygotän-Spermatocyten (n=86) beide FISH-Signale gepaart. In 14% der untersuchten fortgeschrittenen *Sycp3*<sup>-/-</sup> Zygotän-Spermatocyten waren die MMU8-Signale gepaart und die MMU12-Signale getrennt, während in 11% der Kerne die MMU8-Signale gepaart und die MMU12-Signale getrennt vorlagen. Dies implizierte, dass die Homologenpaarung in der SCP3-defizienten Spermatogenese verzögert war und regional ablief. Die erhöhte Frequenz an gepaarten MMU12-Signalen im Vergleich zu den gepaarten MMU8-Signalen war konsistent mit der Idee, dass kleine Chromosomen in der Prophase I früher paaren (zur Übersicht siehe Scherthan und Schonborn, 2001).



### 3.2 *Smc1 $\beta$* : ein meiosespezifisches Cohesin

Die eukaryotischen, evolutionär hoch konservierten Structural Maintenance of Chromosomes (SMC) Proteine spielen eine wichtige Rolle in den unterschiedlichsten Prozessen wie Chromosomenkondensation, Schwesterchromatidkohäsion, DNA Rekombination und Reparatur sowie bei der Gendosiskompensation (zur Übersicht siehe Jessberger, 2002). In den letzten Jahren wurden darüber hinaus Hinweise auf meiosespezifische SMC-Protein-Komplexkomponenten gefunden (Klein et al., 1999; Watanabe und Nurse, 1999; Prieto et al., 2001; Revenkova et al., 2001) und eine meiose- und säugerspezifische Isoform des SMC1-Proteins, das SMC1 $\beta$ -Protein, entdeckt und als Cohesin identifiziert (Revenkova et al., 2001). In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. R. Jessberger (Center for Gene Therapy and Molecular Medicine, Mount Sinai School of Medicine, New York, USA) wurde die Telomerpositionierung in der Prophase I von Smc1 $\beta$ -defizienten Spermatocyten untersucht, um neue Ergebnisse zur Funktion dieses meiosespezifischen Cohesin-Proteins zu erhalten.

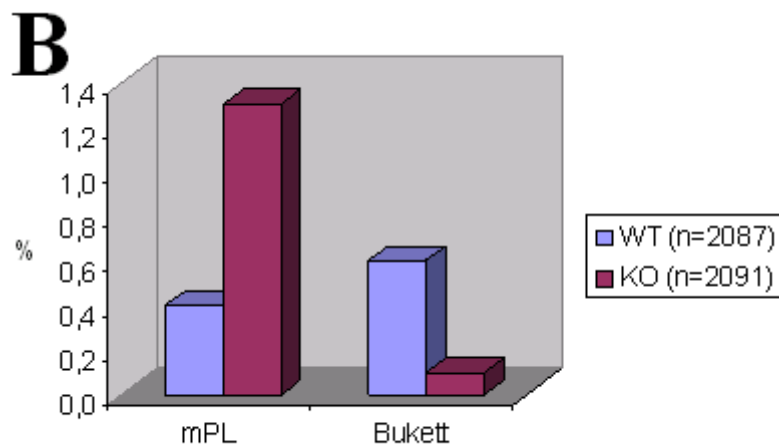
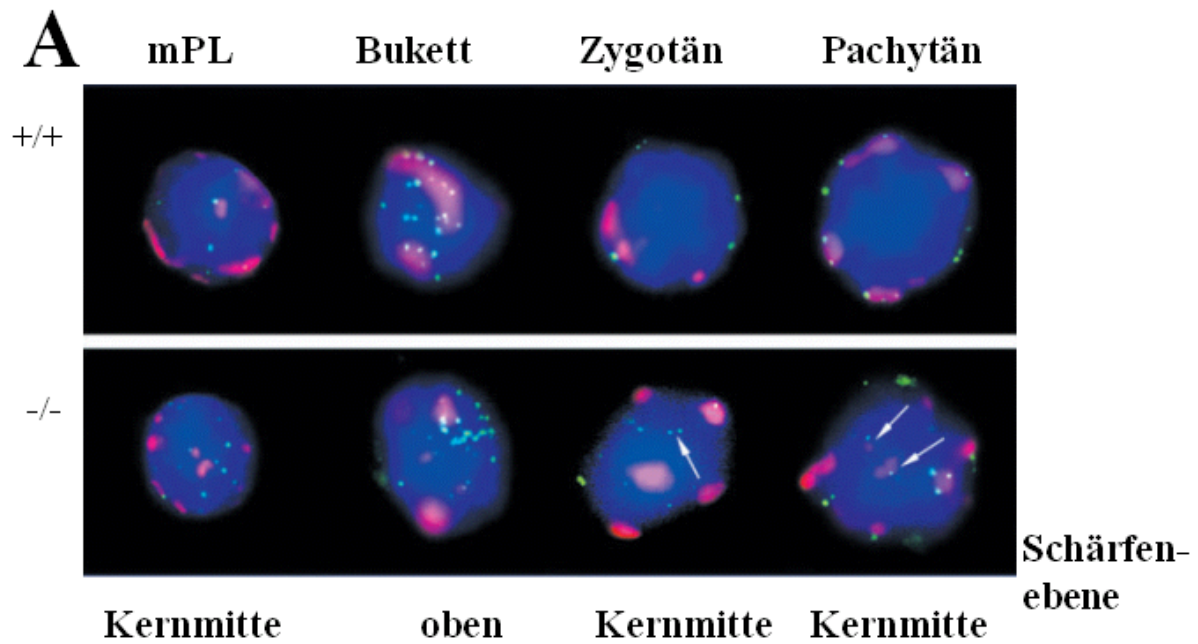
*Smc1 $\beta$* <sup>-/-</sup> Mäuse sind gesund und zeigen normales Paarungsverhalten, wobei sowohl die Männchen als auch die Weibchen infertil sind (Revenkova et al., 2004). Histologische Untersuchungen an *Smc1 $\beta$* <sup>-/-</sup> Testisschnitten in Kombination mit TUNEL Essays zeigten, dass sich Smc1 $\beta$ -defiziente Spermatocyten bis ins mittlere Pachytän entwickeln und nachfolgend durch Apoptose absterben. In früheren Prophase I Stadien Smc1 $\beta$ -defizienter Spermatocyten wurden keine Anzeichen für Verzögerungen, Arrest oder Apoptose gefunden (Revenkova et al., 2004). Um zu überprüfen, ob sich Smc1 $\beta$ -defiziente Spermatocyten bis in das mittlere Pachytän entwickelten, wurde eine IF mit Testes-spezifischen Histon H1t auf eine *Smc1 $\beta$* <sup>-/-</sup> Spermatocyten-Suspension durchgeführt (Moens, 1995; Scherthan et al., 2000a). Die Expression von H1t tritt ab dem mittleren Pachytän-Stadium auf und ist so lange vorhanden, bis haploide Spermatiden das Elongationsstadium erreichen (Drabent et al., 1996). Es zeigte

sich, dass in ungefähr 1% der *Smc1 $\beta$* -defizienten Spermatocyten eine H1t-positive Immunfluoreszenz vorlag (24 von 2014; nicht gezeigt). Dies bestätigte, dass sich *Smc1 $\beta$* -defiziente Spermatocyten bis ins mittlere Pachytän entwickelten.

### 3.2.1 *Smc1 $\beta$* wird für die Telomeranheftung an die Kernperipherie

#### benötigt

Um die Telomerpositionierung und Chromosomendynamik in der *Smc1 $\beta$* -defizienten Prophase I zu untersuchen, wurden in strukturell erhaltenen *Smc1 $\beta$* <sup>-/-</sup> und *Smc1 $\beta$* <sup>+/+</sup> Spermatocyten centromerische und telomerische DNA mittels FISH angefärbt (Abb. 3). Wie zuvor beschrieben (Scherthan et al., 1996) lokalisierten im Wildtyp ab dem frühen Leptotän bis zum frühen Diplotän alle Telomere und die assoziierten Pericentromere an der Kernperipherie. In *Smc1 $\beta$* <sup>-/-</sup> Spermatocyten dagegen konnte die erste Säugermutante identifiziert werden, deren Telomerpositionierung an die Kernperipherie beeinträchtigt war. Dreidimensionale Fluoreszenzmikroskopie zeigte, dass 2 bis 7 Telomere in *Smc1 $\beta$* -defizienten Spermatocyten im Inneren der Kerne (im Durchschnitt  $4,2 \pm 1,4$ ; n=29) lokalisiert waren (Abb.11 A) Centromerische DNA Loci wurden ebenfalls im Kerninneren gefunden. Aus diesen FISH Präparaten wurden auch die mittleren Präleptotän- und Bukett-Frequenzen ausgezählt (Abb.11 B). Es zeigte sich, dass die mittlere Präleptotän-Frequenz in der Mutante (1,3%, n=2091) signifikant höher als im Wildtyp (0,4%, n=2078) war ( $\chi^2$ -Test; p=0,003). Die Bukett-Frequenz der *Smc1 $\beta$* <sup>-/-</sup> Spermatocyten (0,1%, n=2091) war im Vergleich zur *Smc1 $\beta$* <sup>+/+</sup> Bukett-Frequenz (0,6%, n=2078) erniedrigt.



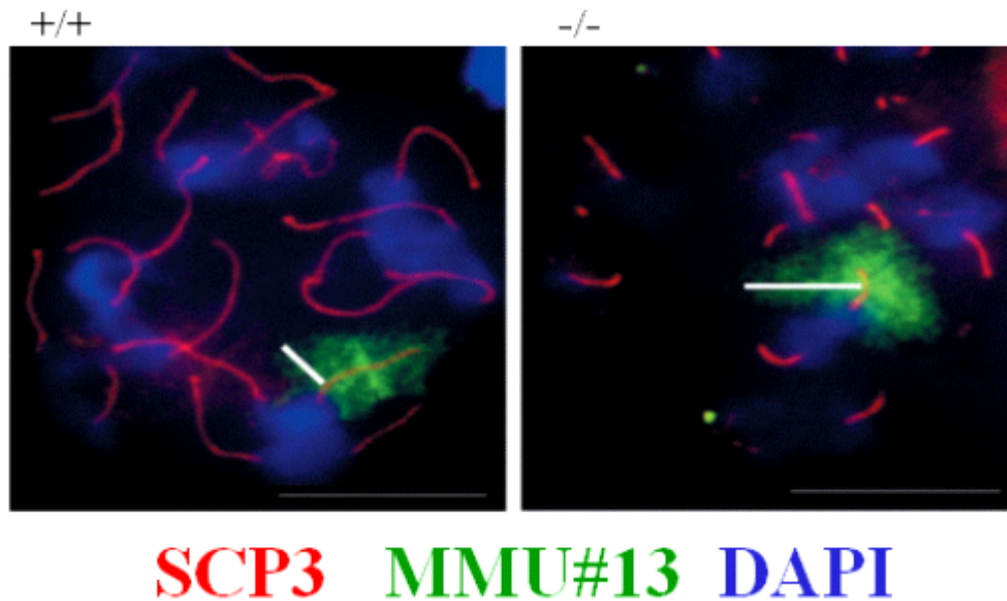
**Abbildung 11:** (A) Telomer (grün, T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub> Repeats) und Centromer (rot, pericentrische Major-Satelliten DNA) FISH auf strukturell erhaltene Spermatocyten (blau, DAPI). Die Pfeile zeigen auf telomerische und centromerische Fluoreszenz-Signale im Inneren von *Smc1β*<sup>-/-</sup> Spermatocyten. (B) Die mittlere Präleptotän- (mPL) und Bukett-Frequenzen in [%] der *Smc1β*<sup>-/-</sup> und *Smc1β*<sup>+/+</sup> Spermatogenese. Es zeigte sich, dass die mittlere Präleptotän-Frequenz in der Mutante signifikant erhöht ( $\chi^2$ -Test, p=0,003) und die Bukett-Frequenz erniedrigt war.

### 3.2.2 Die Chromatinstruktur in SMC1 $\beta$ defizienten Spermatocyten ist gestört

Reife SCs in SMC1 $\beta$ -defizienten Spermatocyten sind ungefähr 50% kürzer im Vergleich zu reifen Wildtyp-SCs (Revenkova et al., 2004). Werden die individuellen SC-Längen als Teil der Gesamtlänge aller SCs ausgedrückt, so findet sich allerdings kein Unterschied zu Wildtyp-SCs. Das bedeutet, dass alle Chromosomenachsen bei Abwesenheit von SMC1 $\beta$  um den gleichen Faktor (~50%) kürzer sind (Revenkova et al., 2004).

Es stellte sich die Frage, wie die Chromosomenstruktur mit solchen verkürzten SCs aussieht. Um dies näher zu untersuchen, wurde in weiteren Experimenten auf gespreitete SMC1 $\beta$ <sup>-/-</sup> und SMC1 $\beta$ <sup>+/+</sup> Spermatocyten die axialen/lateralen Elemente mittels SCP3 IF gefärbt und anschließend Chromosomen Painting für die Chromosomen MMU1 und MMU13 durchgeführt (Abb.12). Nun konnte die maximale Ausdehnung zwischen den äußersten Chromatin-Signalen und den korrespondierenden SCP3-Achsen in vollständig gepaarten Chromosomen ausgemessen werden. Diese Entfernung entspricht der maximalen Länge der meiotischen Chromatinschleifen (Chromatinloops, Abb.12; Heng et al., 1996).

Es zeigte sich, dass im Vergleich zum Wildtyp die Organisation der meiotischen Chromatinschleifen entlang des SC deutlich verändert war. Die Chromatinloops in der Mutante waren fast doppelt so lang wie die des Wildtyps (Tabelle 3). Der Unterschied war in beiden Chromosomen MMU1 und MMU13 hochsignifikant (t-Test; p<0,001).



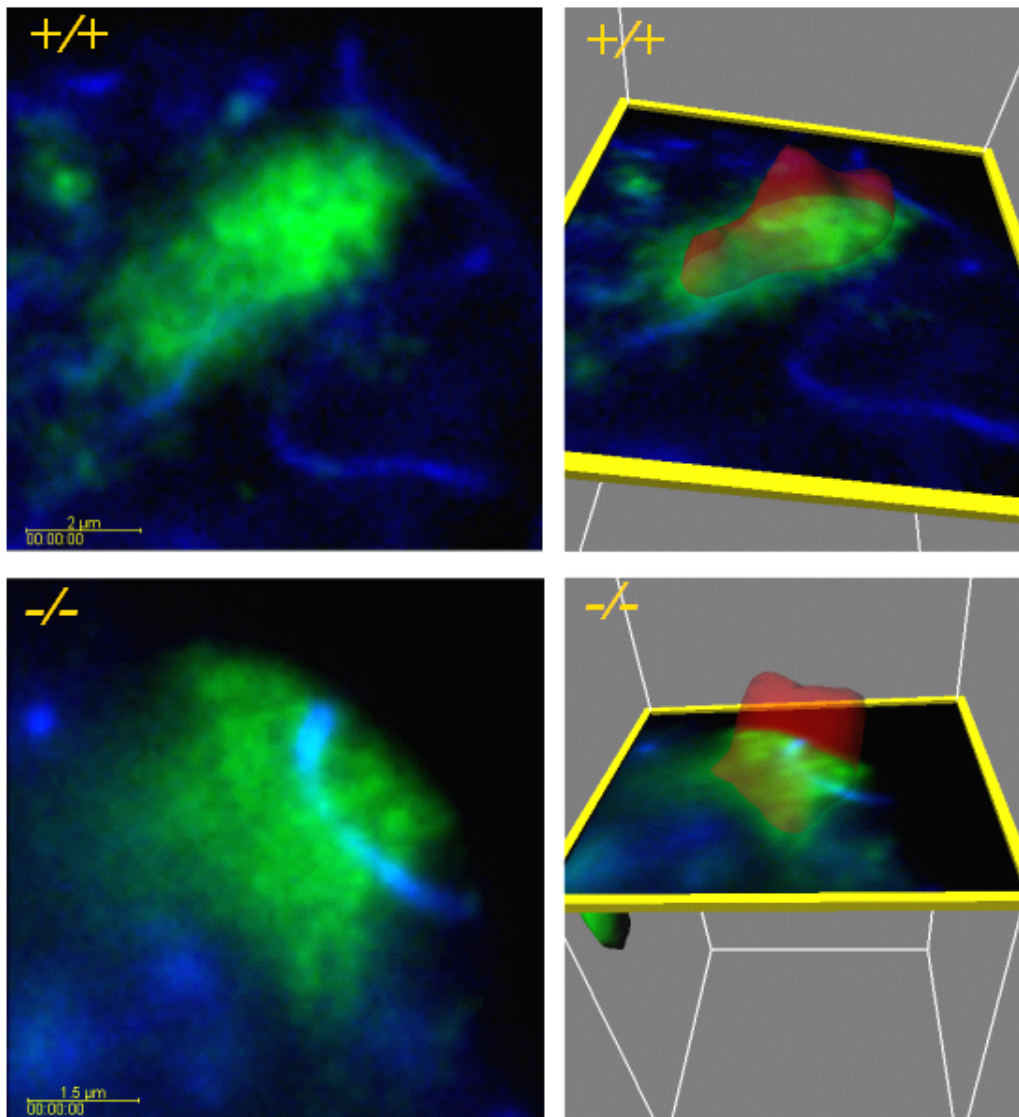
**Abbildung 12:** Geänderte Chromosomenstruktur in *Smc1β*<sup>-/-</sup> Spermatocyten. Bestimmung der maximalen Chromatin-Ausdehnung zwischen dem SC von Chromosom MMU13 (rot, SCP3 IF) und dem äußersten Rand des FISH Signals (weißer Balken) von Chromosom MMU13 (MMU13, grün) in gespreiteten *Smc1β*<sup>+/+</sup> und *Smc1β*<sup>-/-</sup> Spermatocyten. Maßstab: 10μm.

**Tabelle 3:** Maximale Chromatin-Ausdehnungen [μm] in *Smc1β*<sup>+/+</sup> und *Smc1β*<sup>-/-</sup> Chromosomen.

	<i>Smc1β</i> <sup>+/+</sup>	<i>Smc1β</i> <sup>-/-</sup>
Chromosom-1 (n=28)	3,14 ± 0,50	5,86 ± 1,3
Chromosom-13 (n=19)	2,60 ± 0,63	4,79 ± 1,2

Um die Interphasestruktur der *Smc1β*<sup>-/-</sup> Chromosomen zu überprüfen, sollten die Volumina der Chromosomterritorien MMU13 in strukturell erhaltenen *Smc1β*<sup>-/-</sup> und *Smc1β*<sup>+/+</sup> Spermatocyten bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden die axialen/lateralen Elemente

mittels SCP3 IF gefärbt und anschließend Chromsomen Painting von Chromosom MMU13 durchgeführt (Abb.13). Für die Auswertung wurden nur Chromosomenterritorien mit vollständig gepaarten SCs herangezogen und von je 20 Chromosomenterritorien MMU13 mittels 3D-Fluoreszenzmikroskopie Bilderstapel aufgenommen. Nach Dekonvolution und Rekonstruktion der Bivalente ergaben sich ihre Volumina aus dem Auswerteprogramm. Die Chromosomenterritorien *Smc1 $\beta$* -defizienter Spermatocyten waren im Durchschnitt fast 1,8 mal größer als die *Smc1 $\beta$ <sup>+/+</sup>* Chromsomenterritorien (Tabelle 4). Dieser Volumenunterschied war hochsignifikant (t-Test;  $p < 0,001$ ). Das Ergebnis führte zu der Frage, ob sich dieser drastische Größenunterschied der Chromosomenterritorien auch in den Kernvolumina der *Smc1 $\beta$* -defizienten Meioocyten widerspiegelte. Um dies zu beantworten, wurden an strukturell erhaltenen *Smc1 $\beta$ <sup>-/-</sup>* und *Smc1 $\beta$ <sup>+/+</sup>* Spermatocyten-Suspensionen eine SCP3-IF durchgeführt, um frühe Pachytän-Spermatocyten identifizieren zu können. Von je zwölf frühen Pachytän-Spermatocyten wurden mittels 3D-Fluoreszenzmikroskopie Bilderstapel der DAPI Fluoreszenz-Signale aufgenommen und nach der 3D-Rekonstruktion die Volumina der Spermatocytenkerne ermittelt. Es zeigte sich, dass die *Smc1 $\beta$* -defizienten frühen Pachytän-Spermatocyten ungefähr 1,3 mal kleiner als die Wildtyp-Spermatocyten waren (Tabelle 4). Dieser Unterschied war hochsignifikant (t-Test,  $p < 0,001$ ).



**Abbildung 13:** Volumenbestimmung von Chromosomenterritorien MMU13 strukturell erhaltener *Smc1β*<sup>+/+</sup> (obere Reihe) und *Smc1β*<sup>-/-</sup> (untere Reihe) Spermatozyten nach einer SCP3-IF (blau) und Chromosom MMU13 Painting (grün). Die linken Bilder zeigen einen Bildauszug eines 3D-Bilderstapels eines Chromosomenterritoriums MMU13 (grün) und den dazugehörigen SC (blau, SCP3); in den rechten Bildern ist das 3D-rekonstruierte Chromosomenterritorium in durchscheinendem rot dargestellt. Der Maßstab im Bild oben links ist 2µm und im Bild unten links 1,5µm lang.

**Tabelle 4:** Die Volumina der Chromosomenterritorien MMU13 und Volumina strukturell erhaltener *Smc1 $\beta$ <sup>+/+</sup>* und *Smc1 $\beta$ <sup>-/-</sup>* Spermatozyten [ $\mu\text{m}^3$ ].

<b>Volumina der Chromosomenterritorien MMU13 [<math>\mu\text{m}^3</math>]</b>		
	<i>Smc1<math>\beta</math><sup>+/+</sup></i>	<i>Smc1<math>\beta</math><sup>-/-</sup></i>
Chromosomenterritorium MMU13 (n=20)	18,3 $\pm$ 1,9	31,9 $\pm$ 2,2

<b>Volumina früher Pachytän-Kerne [<math>\mu\text{m}^3</math>]</b>		
	<i>Smc1<math>\beta</math><sup>+/+</sup></i>	<i>Smc1<math>\beta</math><sup>-/-</sup></i>
Frühe Pachytän- Spermatozyten (n=12)	1131,7 $\pm$ 85,5	877,3 $\pm$ 49,2

### 3.3 Störung der Spermatogenese bei Abwesenheit von Typ A

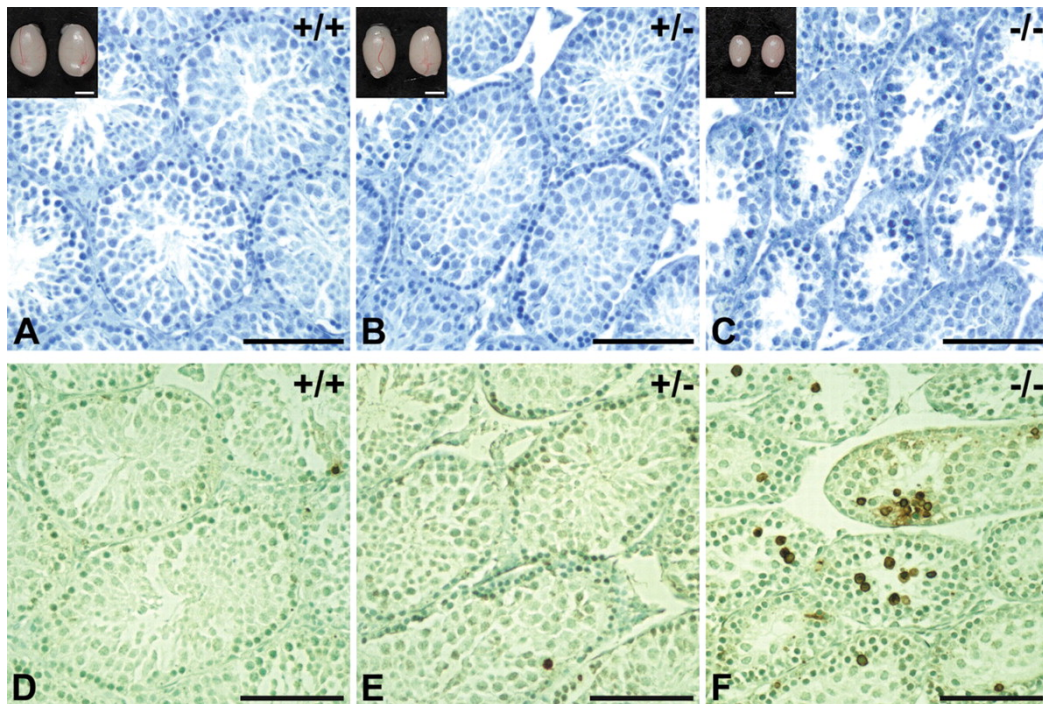
#### **Laminen**

Kernlamine sind strukturelle Proteinkomponenten der Kernhülle (Stuurman et al., 1998; Gruenbaum et al., 2000; Goldman et al., 2002). Mutationen im *LMNA*-Gen, das die Typ-A Lamine codiert, führen zu einigen menschlichen Erbkrankheiten (Laminopathien), zu denen die Emery-Dreifuss Muskeldystrophie, die späte Cardiomyopathie und die partielle Lipodystrophie gehören (zur Übersicht siehe Benedetti und Merlini, 2004). Entsprechend der menschlichen Erkrankungen wurde gezeigt, dass *Lmna*<sup>-/-</sup> Mäuse schwere Dystrophien des Muskel- und Fettgewebes aufweisen (Sullivan et al., 1999). In der Ratte wurde gezeigt, dass die Anheftungsstellen der meiotischen Chromosomen an der inneren Kernhülle in LaminC2-haltigen Domänen der Kernhülle eingebettet sind (Alsheimer et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit sollte in Zusammenarbeit mit R. Benavente und M. Alsheimer die Spermatogenese LaminA-defizienter Mäuse untersucht werden und ob die Abwesenheit von LaminC2, die meiotische Spleißvariante des *Lmna*-Gens, die dreidimensionale Verteilung und Anheftung der Telomere an die innere Kernhülle beeinflusst.

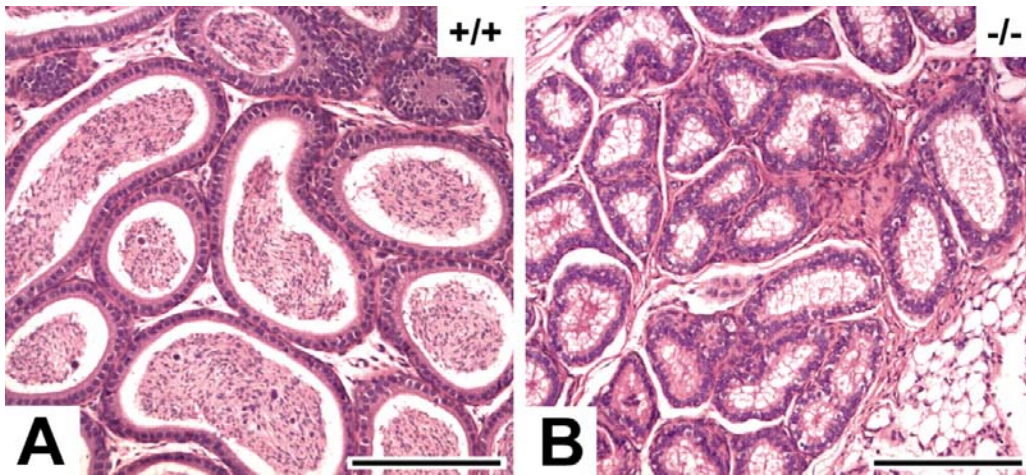


### 3.3.1 Spermatogenese Arrest in LaminA defizienten Mäusen

Die Untersuchung männlicher *Lmna*<sup>-/-</sup> Mäuse ergab, dass deren Testesentwicklung beeinträchtigt war. Die Testes von *Lmna*<sup>-/-</sup> Mäuse waren kleiner als die der heterozygoten und der Wildtyp-Geschwister (Abb.14 A-C). In LaminC2-defizienten Tubuli seminiferi wurden weniger Spermatozyten I gefunden und postmeiotische Stadien (Spermatiden und Spermien) fehlten weitgehend in *Lmna*<sup>-/-</sup> Testes (Abb.14 C) und Epididymis (Abb.15 B).



**Abbildung 14:** Lichtmikroskopische Bilder von Testesschnitten (Hematoxylinfärbung) 31-Tage alter Wildtyp- (A), heterozygoter (B) und *Lmna*<sup>-/-</sup> Mäuse (C). Die eingefügten Bilder zeigen die vollständigen Testes. (D-F) TUNEL Essay auf 31-Tage alte Wildtyp-, heterozygote und homozygote *Lmna*<sup>-/-</sup> Testesschnitte und Methylgrün Gegenfärbung. Der Maßstab ist jeweils 100μm lang, in den eingefügten Bildern 2mm lang. (Abbildung entnommen aus Alsheimer et al., 2004)



**Abbildung 15:** Lichtmikroskopische Bilder von adulten Wildtyp- (A) und  $Lmna^{-/-}$  (B) Epididymisschnitten nach Hematoxylin/Eosin Färbung. Die Knockout Epididymis enthält keine Spermien. Der Maßstab ist 50µm lang. (Abbildung entnommen aus Alsheimer et al., 2004)

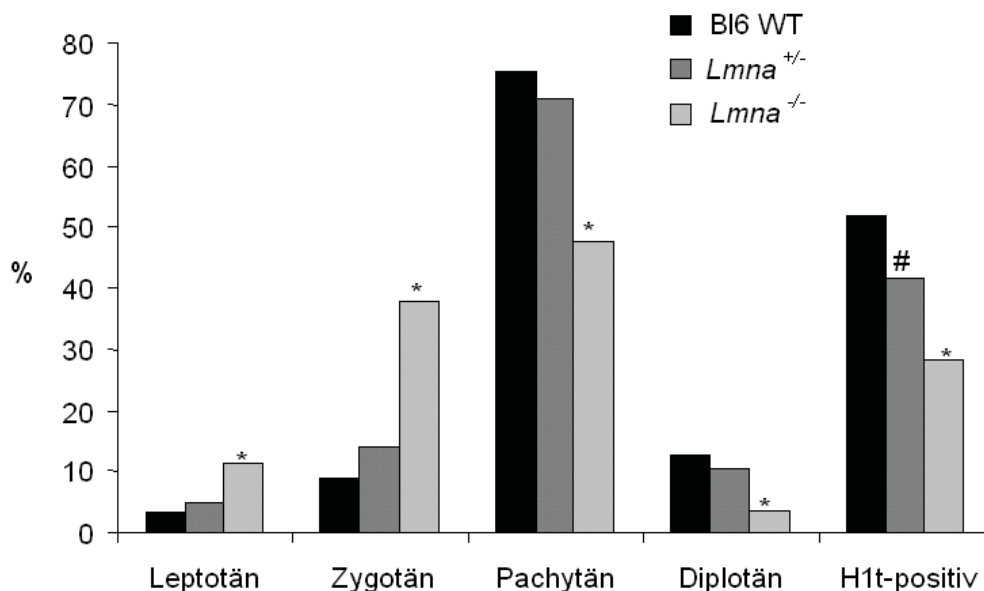
In den Tubuli seminiferi der  $Lmna^{-/-}$  Maus, in denen überwiegend Prophase I Spermatocyten vorlagen, wurde eine hohe Frequenz von absterbenden bzw. abgestorbenen Zellen beobachtet (Abb.14 C und Abb.17 E), die mit Hematoxylin deutlich gefärbt waren und morphologische Veränderungen zeigten. Dagegen wurden in heterozygoten und Wildtyp-Testesschnitten nur vereinzelt abgestorbene oder tote Zellen gefunden.

### 3.3.2 Fehlen von Typ-A Laminen führt zu einer signifikanten Anreicherung von frühen und zu einer signifikanten Abnahme von späten Prophase I Substadien

Ausgehend von dem oben aufgeführten Ergebnis, sollte die Progression der LaminA-defizienten Spermatocyten durch die Prophase I untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Spreitpräparate von Testes-Suspensionen angefertigt, eine IF gegen das AE/LE Protein SCP3 (Lammers et al., 1994) und das Telomer-Protein TRF1 (Chong et al., 1995; Bianchi et al., 1997; Broccoli et al., 1997a) durchgeführt (Abb.21) und die Prophase I Stadien ausgezählt. In der  $Lmna^{-/-}$  Testis-Suspension konnte eine hochsignifikante Anreicherung von Leptotän- ( $\chi^2$ -

Test,  $p < 0,001$ ) und Zygotän- ( $\chi^2$ -Test,  $p < 0,001$ ) Spermatozyten im Vergleich zur Wildtyp-Spermatogenese festgestellt werden (Abb.16). Die beobachtete Reduzierung von Pachytän- und Diplotän-Spermatozyten in der *Lmna*<sup>-/-</sup> Testis-Suspension im Vergleich zur Wildtyp-Testis-Suspension war ebenfalls hochsignifikant ( $\chi^2$ ,  $p < 0,001$  für Pachytän und Diplotän; Abb.13).

Zur Überprüfung der Reduzierung später Prophase I Frequenzen in der *Lmna*<sup>-/-</sup> Spermatogenese wurden Immunfärbungen gegen das Testis-spezifische Histon H1t auf Spermatozyten-Suspensionen durchgeführt (Abschnitt 3.1.2). In der *Lmna*<sup>-/-</sup> Suspension wurden 28% (Abb.16), in der Wildtyp-Suspension 52% und in der *Lmna*<sup>+/-</sup> Suspension 42% H1t-positive Spermatozyten gefunden. Der Unterschied zwischen der *Lmna*<sup>-/-</sup> und der *Lmna*<sup>+/-</sup> Spermatogenese war signifikant ( $\chi^2$ -Test,  $p < 0,01$ ) und zwischen der *Lmna*<sup>-/-</sup> und der Wildtyp-Spermatogenese hochsignifikant ( $\chi^2$ -Test,  $p < 0,001$ ).



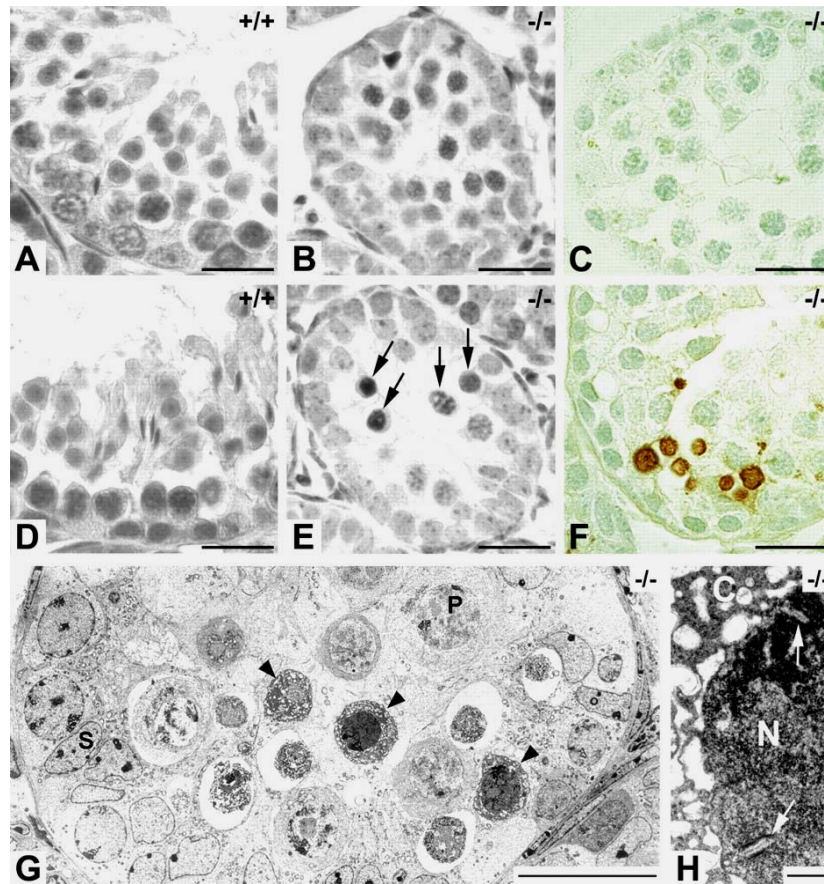
**Abbildung 16:** Bestimmung der Häufigkeit der Prophase I Stadien in adulter Wildtyp-, in der *Lmna*<sup>+/-</sup> und *Lmna*<sup>-/-</sup> Spermatogenese nach SCP3 IF Experimenten auf gespreitete Spermatozyten. Es wurden mindestens 200 Kerne pro Genotyp ausgewertet. Das Fehlen von LaminC2 führt zu einer hochsignifikanten Anreicherung der frühen Prophase I Stadien, während die späten Prophase I Stadien hochsignifikant reduziert sind. In der heterozygoten Maus bestätigt sich dieser Trend, allerdings nicht

signifikant. H1t IF Experimente bestätigen die hochsignifikante Verminderung der späten Stadien ( $n > 200$  für alle drei Genotypen) in der Knockout-Spermatogenese; während in der heterozygoten Spermatogenese eine signifikante Reduzierung der späten Stadien vorliegt. \*Hochsignifikanter Unterschied ( $\chi^2$ ,  $p < 0,001$ ) und #signifikanter Unterschied ( $\chi^2$ ,  $p < 0,01$ ).

### 3.3.3 Apoptose von LaminA-defizienten Spermatocyten ab dem mittleren Pachytän-Stadium

Mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und TUNEL Essays an mutanten Testesschnitten sollte in Zusammenarbeit mit M. Alsheimer genauer bestimmt werden, wann bzw. in welchem Stadium die LaminC2-defizienten Spermatocyten absterben. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der SCP3 IF auf gespreitete Spermatocyten wurde in den mutanten Tubuli seminiferi augenscheinlich normale Leptotän-, Zygotän- und mittlere Pachytän-Spermatocyten gefunden (Abb.17G). Die TEM Untersuchung zeigte, dass die mutanten Spermatocyten ab dem Pachytän-Stadium abstarben. Tote Spermatocyten mit SC-artigen Strukturen (Abb.17H) fanden sich in Regionen der Tubuli seminiferi gruppiert, die auch normale Pachytän-Spermatocyten beinhalteten.

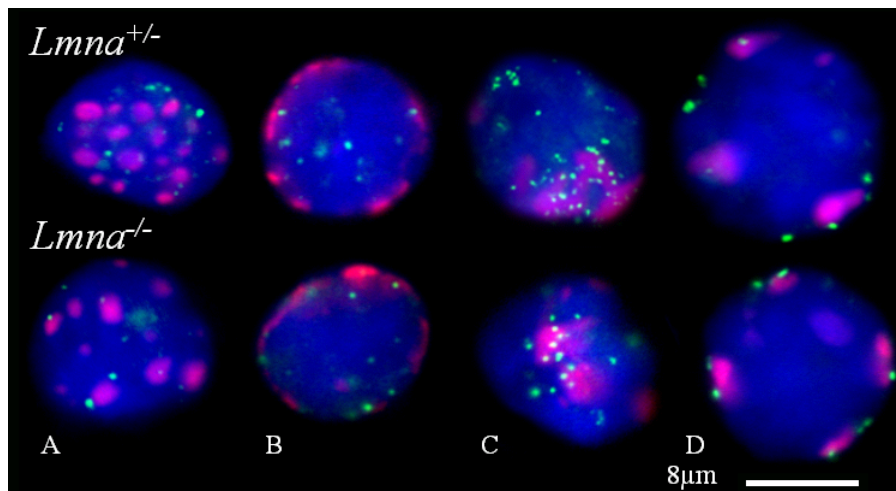
Der TUNEL Essay zeigte, dass die LaminC2-defizienten Spermatocyten durch Apoptose abstarben (Abb.14D-F, Abb.17F). Weiterhin zeigte sich, dass die Tubuli seminiferi der *Lmna*<sup>-/-</sup> Maus bis zum Stadium V des Epitheliumzyclus (Oakberg, 1956; Russell, 1990) keine apoptotischen Zellen enthielten (Abb.17B,C). Tubuli seminiferi späterer Stadien enthielten dagegen viele apoptotische Spermatocyten (Abb.17E,F). Dies zeigte, dass der Zelltod ab dem mittleren Pachytän-Stadium einsetzte.



**Abbildung 17:** Testisschnitte von adulten Wildtyp- (A,D) und *Lmna*<sup>-/-</sup> (B,C,E,F) Mäusen. Die Schnitte sind mit Hematoxylin (A,B,D,E) oder in situ mittels TUNEL Essey und Methylgrün Gegenfärbung (C,F) angefärbt. (A-C) Stadium V und (D-F) Stadium VII des Epitheliumzyclus. (G) TEM eines *Lmna*<sup>-/-</sup> Tubulus einer 22 Tage alten Maus. S, Sertoli Zelle; P, Pachytän-Spermatocyte. Die Pfeile in E und die Pfeilspitzen in G zeigen auf abgestorbene Spermatocyten. (H) Vergrößerte Ansicht einer abgestorbenen Spermatocyte. N, Spermatocytenkern; C, Cytoplasma. Die Pfeile deuten auf SC-artige Strukturen. Der Maßstab ist 20µm (A-G) und in (H) 0,5µm lang. (Abbildung entnommen aus Alsheimer et al., 2004)

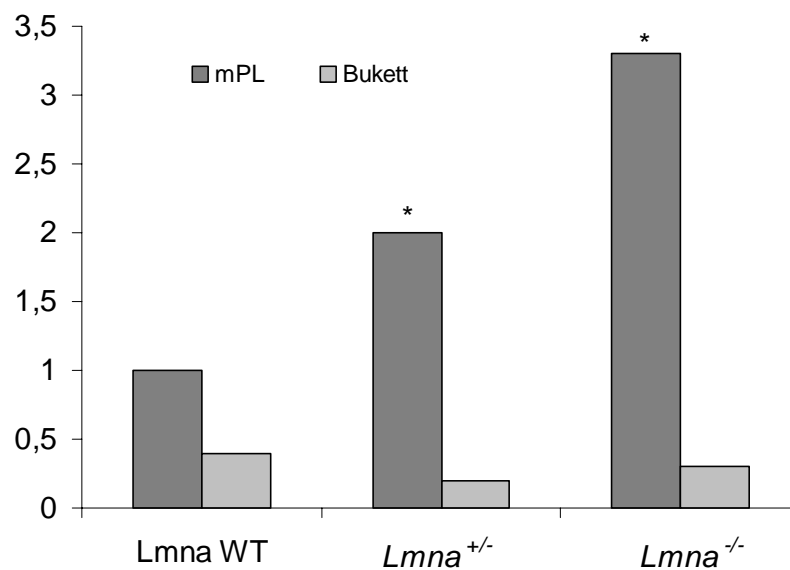
### 3.3.4 Die Telomeranheftung an die Kernhülle ist in der LaminA defizienten Spermatogenese nicht beeinträchtigt

Da vermutet wurde, dass LaminA bzw. die meiotische Spleissvariante LaminC2 eine Rolle für die Telomeranheftung meiotischer Chromosomen spielen könnte (Alsheimer et al., 1999), wurden Telomer-Centromer-FISH Experimente auf strukturell erhaltenen Spermatocyten der drei Genotypen durchgeführt. Die dreidimensionale Auswertung der Telomer-Centromer-FISH Präparate ergab, dass bei allen drei Genotypen die Telomere der Spermatocyten I an der Kernhülle lokalisiert waren (Abb.18).



**Abbildung 18:** Telomer (grün) -Centromer (rot) -FISH Muster in strukturell erhaltenen *Lmna*<sup>+/-</sup> (obere Bildreihe) und *Lmna*<sup>-/-</sup> (untere Bildreihe) Spermatocyten. (A) Prämeiotische Kerne mit internen Telomer-Signalen (Schärfenebenen durch die Kernmitten). (B) mittlere Präleptotän-Spermatocyten mit dem typischen Major-Satelliten DNA Muster an der inneren Kernhülle und mit internen und peripheren Telomeren (Schärfenebenen durch die Kernmitten). (C) Aufsicht auf Bukett-Spermatocyten mit aggregierten Telomeren. (D) Pachytän-Spermatocyten mit peripher verteilten Telomer-Signalen (Schärfenebene durch die Kernmitten). Die Telomer-Centromer-FISH Muster zeigen keine Unterschiede zwischen den heterozygoten und den Knockout Spermatocyten bzw. zu Wildtyp-Spermatocyten (nicht gezeigt). Der Maßstab ist 8μm lang. (Abbildung entnommen aus Alsheimer et al., 2004)

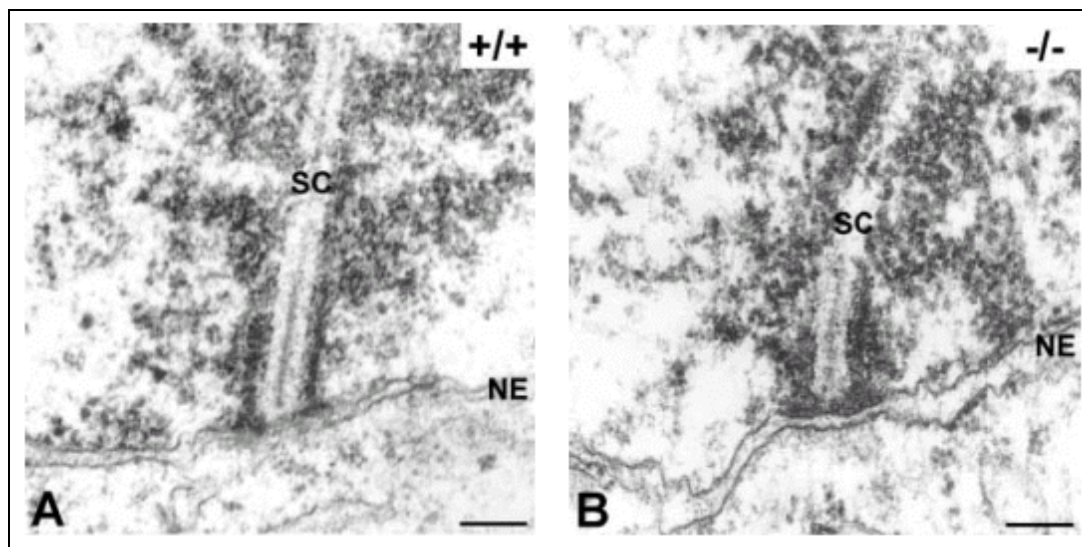
Aus den Telomer-Centromer-FISH Präparaten wurden auch die mittleren-Präleptotän- und die Bukett-Frequenzen ermittelt (Abb. 18). Die Bukett-Analyse ergab keine Unterschiede zwischen der Wildtyp- (0,4%, n=1956), der heterozygoten (0,2%, n=2029) und der LaminA-defizienten (0,3%, n=2535) Bukett-Frequenz. Dieses Ergebnis zeigte, dass die meiotische Telomerdynamik in den Mutanten nicht verändert war. Allerdings waren die mittleren Präleptotän-Frequenzen in der homozygoten (3,3%, n=2535) und heterozygoten (2,0%, n=2029) Spermatogenese im Vergleich zur Wildtyp-Spermatogenese (1,0%, n=1956) hochsignifikant erhöht ( $\chi^2$ ;  $p < 0,001$  für beide Mutanten). Somit war LaminC2 ein wichtiger Faktor für einen schnellen Eintritt in die Prophase I.



**Abbildung 19:** mittlere Präleptotän- und Bukett-Frequenzen in adulter *Lmna*<sup>+/+</sup> (n=1956), *Lmna*<sup>+/-</sup> (n=2029) und *Lmna*<sup>-/-</sup> (n=2535) Spermatogenese nach Telomer-Centromer-FISH Experimenten. \*hochsignifikante Anreicherung der mittleren Präleptotän-Frequenz ( $\chi^2$ ,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zur *Lmna*<sup>+/+</sup> Frequenz.

Obwohl das Fehlen von LaminC2 die Telomerdynamik nicht beeinflusst hatte, wurde in Zusammenarbeit mit M. Alsheimer die Ultrastruktur von LaminC2-defizienten Telomeren und die Anheftungsstellen an die innere Kernhülle elektronenmikroskopisch untersucht. Es

wurden keine Unterschiede in der Morphologie der Telomere und der Telomeranheftungsstellen an die innere Kernhülle festgestellt. Das Fehlen von LaminC2 bzw. der LaminC2-haltigen Domänen an den Telomeranheftungsstellen (Alsheimer et al., 1999) wirkte sich somit nicht auf die Struktur der meiotischen Telomeranheftungsstellen aus (Abb.20).



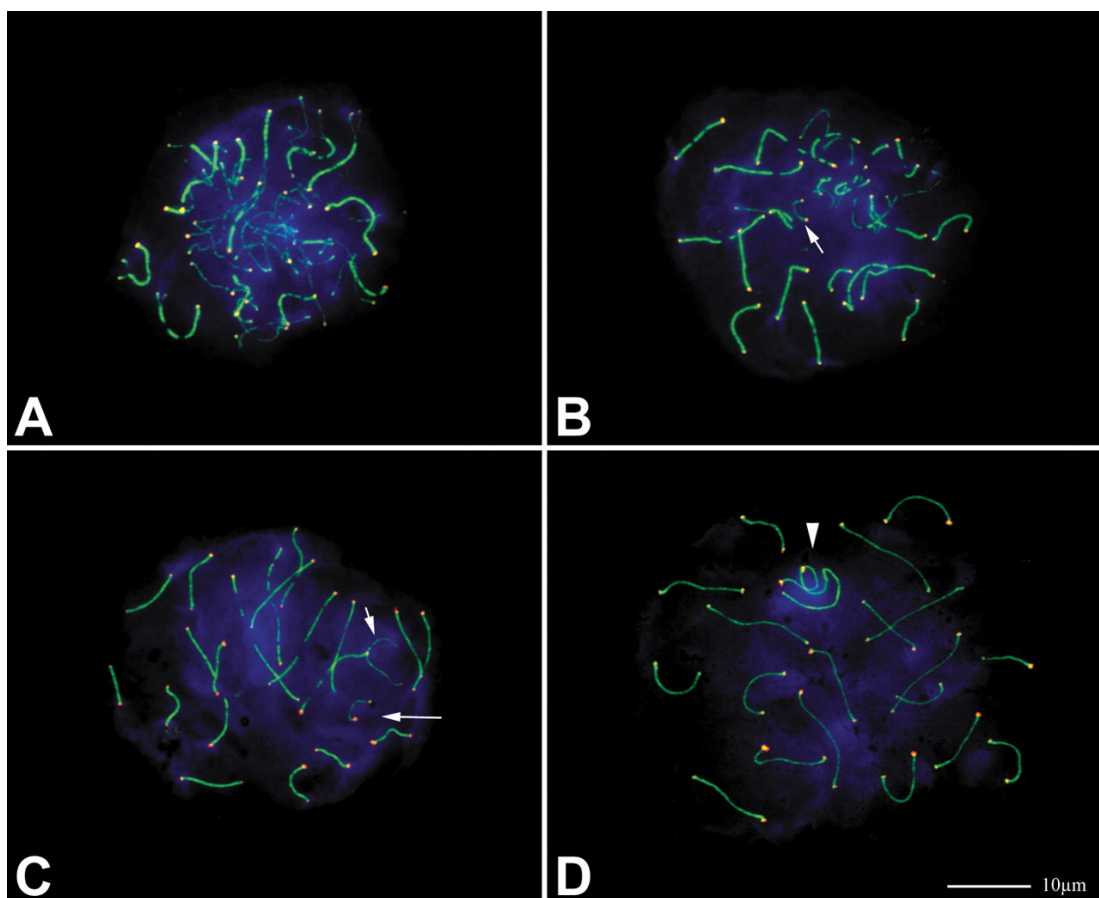
**Abbildung 20:** EM von meiotischen Telomeranheftungsstellen. Die Anheftungsstellen der LEs von autosomalen Bivalenten an die innere Kernhülle 22 Tage alter Wildtyp- (A) und *Lmna*<sup>-/-</sup> (B) Mäuse zeigen keine strukturellen Unterschiede (SC, Synaptonemaler Komplex; NE, Kernhülle). Der Maßstab ist jeweils 0,2µm lang. (Abbildung entnommen aus Alsheimer et al., 2004)

### 3.3.5 Verlust von LaminA führt zu gestörter Gonosomenpaarung

Da der strukturelle Aufbau des Telomerkomplex und seine Interaktion mit der Kernhülle anscheinend normal waren, und da postuliert wurde, dass es einen Checkpoint für Synapse in der männlichen Prophase I geben könnte (Odorisio et al., 1998), wurde die Homologenpaarung in der homozygoten und heterozygoten Spermatogenese mittels zweifarben IF von SCP3 und TRF1 auf gespreiteten Spermatocyten untersucht (Abb.21). Es zeigte sich, dass in der *Lmna*<sup>-/-</sup> Spermatogenese 87% (n=24) anormale Zygotän-Spermatocyten vorlagen, die 5 bis 15 komplette SCs und einige sehr lange oder auch kurze



ungepaarte AEs aufwiesen (Abb.21A und B). In der Wildtyp-Spermatogenese wurden solche anormalen Zygotän-Spermatocyten nicht beobachtet. Darüber hinaus zeigte fast jede zweite Pachytän-Spermatocyte (45%, n=27) univalente Gonosomen (Abb.21C). In heterozygoten (5%, n=39) (Abb.21D) und in C57Bl/6 Wildtyp-Spermatocyten (0,7%, n=149) wurden nur selten univalente Gonosomen beobachtet. Terminale X-Autosomen Assoziationen wurden in 15% (n=27) der untersuchten LaminC2-defizienten Pachytän-Spermatocyten beobachtet (nicht abgebildet). Heterozygoten Spermatocyten zeigten in 5% (n=26) und Wildtyp-Spermatocyten in nur 0,5% (n=200) solche Assoziationen. Somit scheint LaminC2 ein wichtiger Faktor für Homologenassoziationen bzw. -paarung und im speziellen für die Gonosomenpaarung zu sein.



**Abbildung 21:** SCP3 (grün) und TRF1 (rot) IF auf gespreitete, adulte *Lmna*<sup>-/-</sup> (A-C) und *Lmna*<sup>+/-</sup> (D) Spermatozyten. (A) und (B) zeigen aberrante *Lmna*<sup>-/-</sup> Zygotän-Spermatozyten mit einigen langen ungepaarten AEs; der Pfeil in (B) deutet auf ein univalentes Chromosom. (C) *Lmna*<sup>-/-</sup> Pachytän-

Spermatocyte mit ungepaartem X (Pfeil) und Y (langer Pfeil) Chromosom. (D) *Lmna*<sup>+/-</sup> Pachytän-Spermatocyte mit normalen SCs und XY-Bivalent (Pfeilspitze). Der Maßstab beträgt 10µm. (Abbildung entnommen aus Alsheimer et al., 2004)

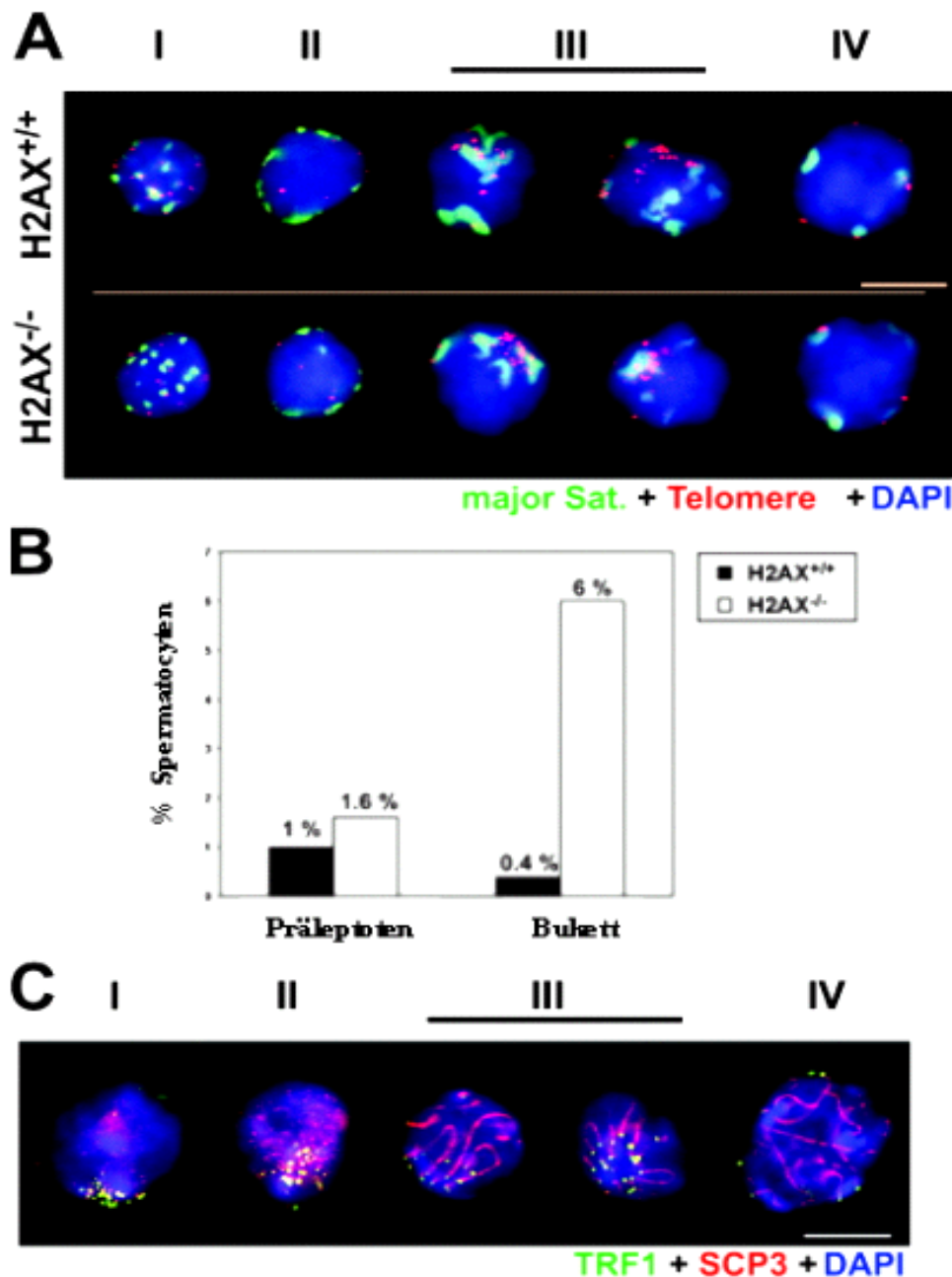
### **3.4 Histon H2ax beeinflusst die meiotische Telomeraggregation**

Die ATM Kinase ist das bis dato einzige Protein, das in der Säugermeiose mit der Regulierung des Bukett-Stadiums in Verbindung gebracht werden konnte (Pandita et al., 1999; Scherthan et al., 2000a; Jerratsch, 2004). Bei *Atm*<sup>-/-</sup> Mäusen wurde eine 32-fache Erhöhung der Bukett-Frequenz festgestellt, wobei nur einige wenige Spermatocyten das mittlere Pachytän-Stadium erreichten (Scherthan et al., 2000a). Ein Ziel Protein der ATM Kinase ist das Histon H2AX (Burma et al., 2001), das nach der Phosphorylierung  $\gamma$ -H2ax genannt wird. Diese Reaktion findet sowohl direkt nach der Bildung von meiotischen oder strahleninduzierten DSBs als auch nach V(D)J (variable, diversity, joining) rekombinationsinduzierten DSBs statt (zur Übersicht siehe Fernandez-Capetillo et al., 2004). Somit stellt die ATM vermittelte Phosphorylierung von H2AX eine wichtige DSB-Reparatur-assoziierte Chromatinveränderung dar (Celeste et al., 2003). H2ax-defiziente Mäuse sind strahlungssensitiv, kleinwüchsig und immundefizient. Aber es zeigt sich, dass das Vorhandensein von H2ax nicht essentiell für die Aktivierung strahlen-induzierter Zellzyklus Kontrollstellen ist (Celeste et al., 2002). Männliche *H2ax*<sup>-/-</sup> Mäuse sind im Gegensatz zu den Weibchen infertil (Celeste et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit sollte herausgefunden werden, ob das Histon H2ax ein ATM-untergeordneter Regulator der meiotischen Telomerbewegung ist. Hierzu wurden auf strukturell erhaltenen *H2ax*<sup>-/-</sup> und *H2ax*<sup>+/+</sup> Spermatocyten-Suspensionen Telomer-Centromer-FISH Experimente durchgeführt (Abb.22) und die Frequenzen von Spermatocyten im mittleren Präleptotän- und im Bukett-Stadium ermittelt. Die mittleren Präleptotän-Frequenzen zeigten keine signifikanten Unterschiede (1,0% in der *H2ax*<sup>+/+</sup> Spermatogenese [n=2772] und

1,6% in der *H2ax*<sup>-/-</sup> Spermatogenese [n=2567];  $\chi^2$ -Test, p=0,1; Abb. 22B). Die Untersuchung zeigte weiterhin, dass das Fehlen von H2ax sich nicht auf die Telomerpositionierung an die innere Kernhülle ausgewirkt hat (siehe Abb.). In *H2ax*<sup>-/-</sup> Spermatocyten ergab die Auszählung eine 15-fache Erhöhung der Bukett-Frequenz (6%, n=2567) gegenüber der *H2ax*<sup>+/+</sup> Bukett-Frequenz (6%, n=2567). Dieser Unterschied war statistisch hochsignifikant ( $\chi^2$ -Test; p<0,0001; Abb. 22B). Es zeigte sich somit, dass ähnlich wie in der *Atm*<sup>-/-</sup> Meiose, auch in der *H2ax*<sup>-/-</sup> Spermatogenese die Telomerdynamik drastisch geändert war.

Im Wildtyp findet das Bukett-Stadium während dem Leptotän-Zygotän-Übergang statt (Scherthan et al., 1996). Es stellte sich die Frage, ob die gestörte Telomermobilität in den H2ax-defizienten Spermatocyten frühere bzw. spätere Prophase I Stadien mit einer Bukett-Topologie nach sich ziehen. Dazu wurde eine zweifarben IF gegen das Telomer Protein TRF1 (Broccoli et al., 1997a) und das AE/LE Protein SCP3 (Lammers et al., 1994) (Abb.22C) auf strukturell erhaltenen *H2ax*<sup>-/-</sup> Spermatocyten angefertigt. Die SCP3 IF wurde für die Klassifizierung der Prophase I Stadien und die TRF1 IF für die Topologie der Telomer-Verteilung herangezogen. Überraschender Weise zeigte die dreidimensionale Analyse Bukett-Spermatocyten im Leptotän-, Zygotän- und frühen Pachytän-Stadium (Abb.22C).

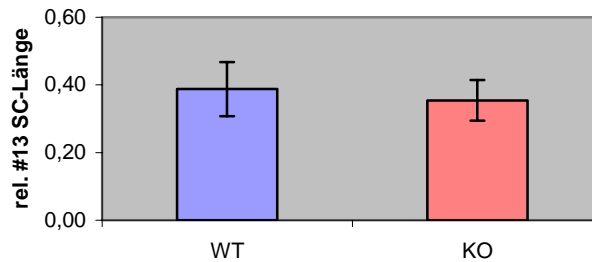


**Abbildung 22:** Telomeraggregation in H2ax-defizienten Spermatocyten. (A) Telomer- (rot) und Centromer- (grün) FISH auf strukturell erhaltenen Spermatocyten. (I) Prämeiotische Spermatocyten mit internen Telomer- und Centromer-Signalen (Bildschärfenebenen durch den Kernäquator). (II) Mittlere Präleptotän-Kerne mit peripheren Major-Satelliten DNA Anhäufungen. (III) Zwei Bukett-Spermatocyten mit aggregierten Telomeren (Bukett-Stadium; Schärfenebenen am oberen Rand der Kerne). (IV) Pachytän-Spermatocyten mit peripher verteilten Telomer- und Centromer-Signalen (Schärfenebenen durch den Kernäquator). (B) Mittlere Präleptotän- und Bukett-Frequenzen. Die *H2ax*<sup>-/-</sup> Bukett-Frequenz war im Vergleich zum Wildtyp 15-fach erhöht. (C) IF gegen SCP3 (rot) und TRF1 (grün) auf drei-dimensional erhaltene *H2ax*<sup>-/-</sup> Spermatocyten (DAPI, blau). (I) Frühe Leptotän-Spermatocyte mit enger Telomeraggregation an der Kernperipherie und mit wenigen, punktartigen

SCP3-Signalen. **(II)** Weiter fortgeschrittener Leptotän-Spermatocyte mit zusammengelagerten Telomeren und kurzen SCP3 Achsenfragmenten. **(III)** Zwei Spermatocyten im späten Zygotän-/frühen Pachytän-Stadium mit relaxierter Telomeraggregation und U-förmigen SCs, die in das Kerninnere fortlaufen. **(IV)** Pachytän-Spermatocyte mit dispers verteilten, peripheren Telomeren und reifen SCs. Der Maßstab beträgt 10  $\mu\text{m}$ . (Abbildung entnommen aus Fernandez-Capetillo et al., 2003a)

### 3.4.1 Die meiotische Autosomenkondensation in H2AX defizienten Spermatocyten ist nicht gestört

Es war bekannt, dass in der *H2ax*<sup>-/-</sup> Spermatogenese die Kondensation der Gonosomen gestört ist, die Bildung des XY-Body ausbleibt, die Meiotic Sex Chromosome Inactivation (MSCI) nicht initiiert wird und die Paarung der Geschlechtschromosomen fehlerhaft ist (Fernandez-Capetillo et al., 2003b). Da das Auflösen der Telomeraggregation mit der meiotischen Chromosomenkondensation in Verbindung gebracht wurde (Moens, 1974; Scherthan et al., 1996; Bass et al., 1997), sollte in einem weiteren Experiment überprüft werden, ob die Autosomenkondensation in *H2ax*-defizienten, frühen Pachytän-Spermatocyten gestört ist. Hierfür wurden IF Experimente gegen das AE/LE Protein SCP3 in Verbindung mit Chromosomen Painting für das Mauschromosom MMU13 auf gespreitete Spermatocyten durchgeführt. Das Kriterium für das frühe Pachytän-Stadium war einerseits die Abwesenheit eines ausgereiften XY-Body und andererseits das Vorhandensein vollständig gepaarter SCs. Zur Bestimmung der Chromosomenausdehnung wurden die maximalen Längen der SCs der Chromosomen MMU13 ausgemessen und im Verhältnis zum jeweiligen Kerndurchmesser gesetzt, um Spreitungsvariationen zu kompensieren. Die relativen SC-Längen beider Genotypen zeigten keinen Unterschied. In der Mutante ergab sich eine relative MMU13 SC-Länge von  $0,35 \pm 0,06$  (n=20) und im Wildtyp eine relative MMU13 SC-Länge von  $0,39 \pm 0,08$  (n=17) (Abb.23). Das Fehlen von H2ax wirkt sich somit nicht auf die meiotische Autosomenkondensation aus.



**Abbildung 23:** Die meiotische Autosomenkondensation in  $H2ax^{-/-}$  Spermatocyten. Die relativen MMU13 SC-Längen von frühen Pachytän-Spermatocyten zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Wildtyp (blau, n=17) und der  $H2ax^{-/-}$  Mutante (rot, n=20).

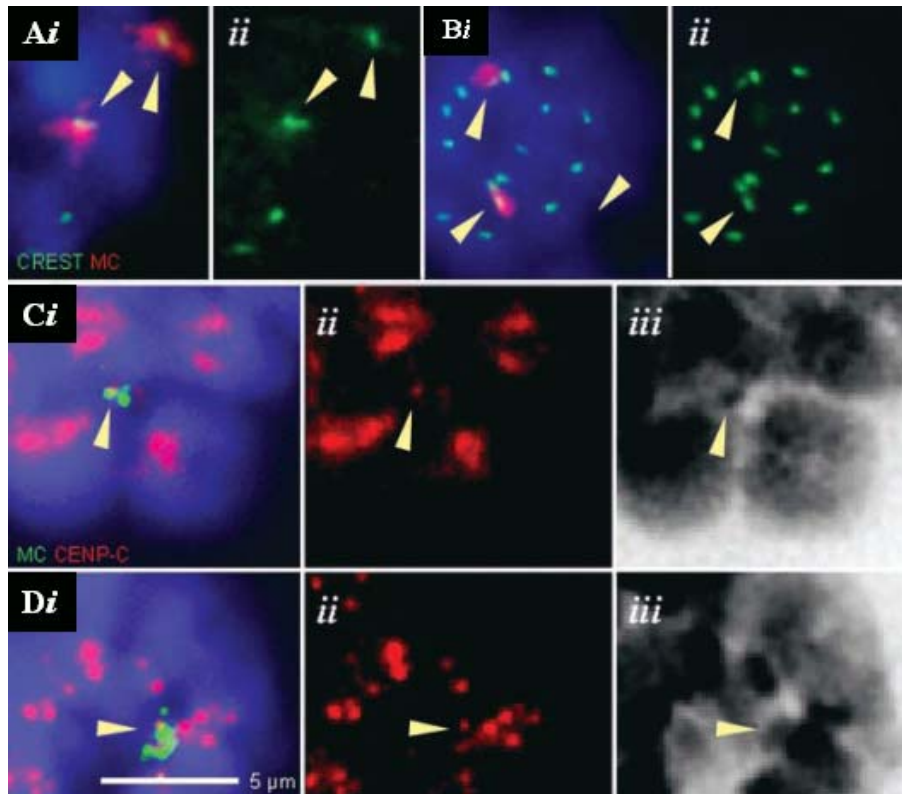
### 3.5 Die meiotische Prophase I transgener Mäuse

Vor Kurzem wurden transchromosomale Mäuse gezüchtet, die einen chromosomalen Vektor in Form eines menschlichen Mini-Ringchromosoms (MC) enthalten ( $MC^+$  Mäuse) (Voet et al., 2001). Das MC besteht hauptsächlich aus alphoiden, centromerischen Sequenzen des menschlichen Chromosoms 20 und einem Fragment aus dem menschlichen Chromosom 1p22. Das MC besitzt keine telomerischen Sequenzen (Voet et al., 2001) und hat eine geschätzte Größe von 10-15Mb. Überraschender Weise übertragen männliche und weibliche  $MC^+$  Mäuse das MC sehr effizient an ihre Nachkommen (Voet et al., 2003b). Siebzehn männliche Mäuse, die eine Kopie des MCs in sich trugen, zeugten 1115 Nachkommen, von denen 308 das MC erbten. Die Kreuzung zweier  $MC^+$  Mäuse ergab Nachkommen, die eine zweite Kopie des MC in sich trugen (Voet et al., 2003a). Im Folgenden werden die Mäuse, die eine Kopie des MC besitzen, als monosomische, und die Mäuse mit zwei Kopien des MC als disomische Mäuse bezeichnet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, wie und wann in der Prophase I von  $MC^+$  Mäusen die Paarung der telomerlosen MCs durchgeführt wird und wie die MCs erfolgreich die meiotische Prophase I durchlaufen können.

### 3.5.1 MCs besitzen ein aktives Centromer aber keine Telomere

Mittels MC-spezifischer FISH in Kombination mit einer CREST oder CENP-C IF (Tomkiel et al., 1994) wurde zunächst überprüft, ob die MCs während der Meiose mit einem funktionellen Centromer ausgestattet waren. In beiden Experimenten zeigten sich punktartige Signale an den MCs (Abb.24C-F).

Frühere FISH Experimente mit einer PNA Telomer-Sonde auf mitotische und meiotische Metaphase Chromosomen ergaben keine Telomer FISH-Signale an den MCs (Voet et al., 2003a). Auch IF Experimente mit einem TRF1 Antikörper (Broccoli et al., 1997b) bzw. mit einem RAP1 (Li et al., 2000a) Antikörper, die beide an meiotischen Telomeren lokalisiert sind (Scherthan et al., 2000b), zeigten keine Telomersignale an den MCs (nicht gezeigt). Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass das artifizielle Minichromosom eine ringförmige Struktur ausbildete und mit einem funktionellen Centromer, aber nicht mit Telomeren ausgestattet war.

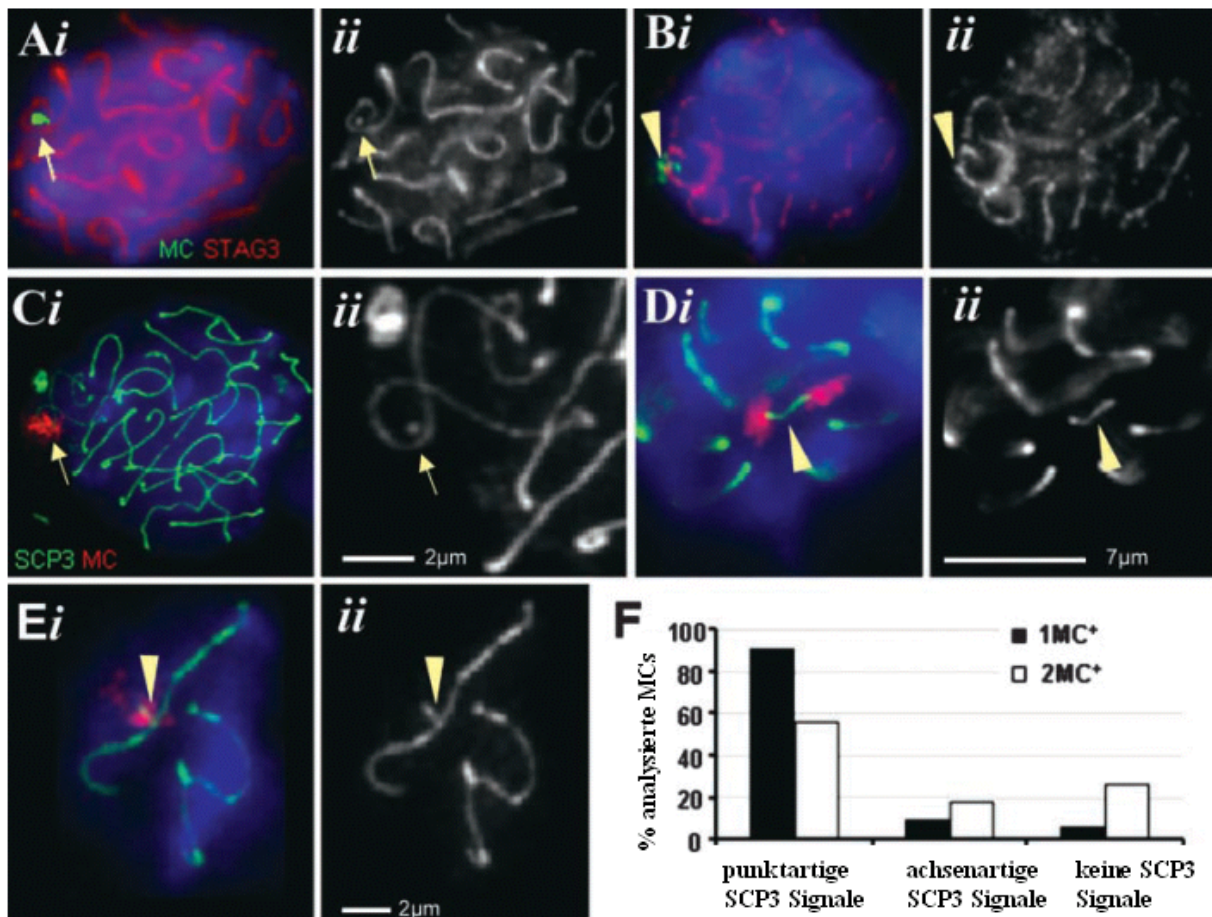


**Abbildung 24:** MC-Centromere. (**Ai** und **Bi**) IF Färbung mit CREST (grün) in Kombination mit  $\alpha$ -Satelliten MC-spezifischer FISH (rot) auf MI (**A**) und MII (**B**) Kerne. (**Aii** und **Bii**) nur der grüne Kanal mit den CREST Signalen. (**C** und **D**) CENP-C IF-Signale (rot) kolokalisieren mit den FISH markierten MCs (grün) in Prometaphase I (**C**) und II (**D**) Kernen. Die Pfeilspitzen in A-D markieren die MC-spezifischen FISH-Signale bzw. die dazugehörigen Kinetochor Signale. (**Cii** und **Dii**) zeigt nur die CENP-C Signalen. (**Ciii** und **Diii**) zeigen die invertierten grauskalierten DAPI Kanäle. (Abbildung entnommen aus Voet et al., 2003a)

### 3.5.2 MCs bilden SC-artige Strukturen aus

Um zu untersuchen, ob die MCs meiotische Chromosomenstrukturen ausbildeten, wurden MC spezifische FISH Experimente in Kombination mit STAG3 (meiosespezifische Cohesinkomponente), SCP3 (AE bzw. LE Protein) oder SCP1 (TF Protein) IF auf angespreitete mono- und disomische Pachytän-Spermatocyten durchgeführt (Abb.25).



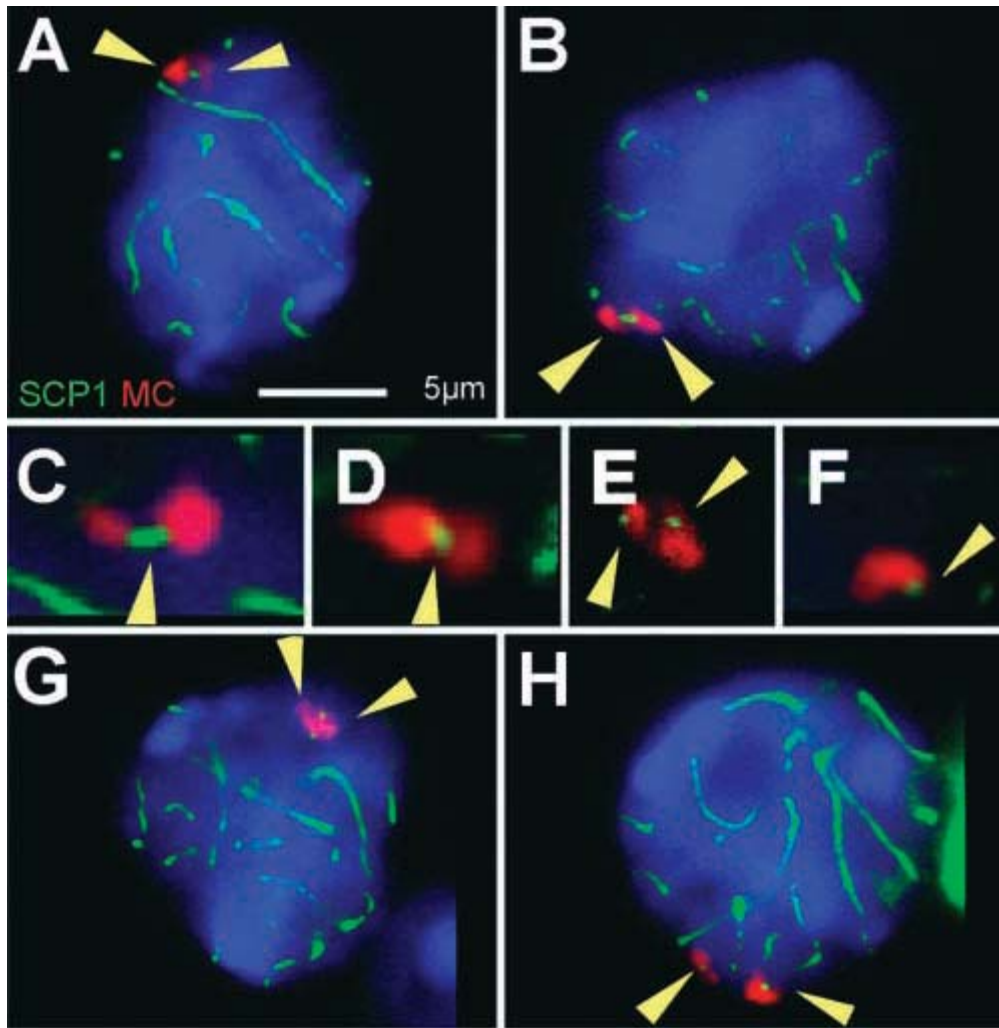


**Abbildung 25:** Cohesin- und AE-Proteine an MCs. (A) IF Färbung mit STAG3 (rot) in Kombination mit einer MC-spezifischen FISH (grün) auf einem monosomischen Pachytän-Kern. (Aii und Eii) Grauskalierte Ansichten der entsprechenden Chromosomenachsen; die Pfeilspitzen und Pfeile zeigen auf die jeweiligen MC-Achsen. (B) Eine STAG3-MC-Proteinachse in einer monosomischen Spermatocyte ist mit einem benachbarten Bivalent verbunden. (C-E) IF mit SCP3 (grün) in Kombination mit einer MC-spezifischen FISH (rot) auf Pachytän-Kerne. (C) Ein punktartiges SCP3-Signal (Pfeil) an einem MC einer monosomischen Spermatocyte nahe am AE des X Chromosoms. (Cii) Vergrößerte Detailansicht von (Ci); der Pfeil zeigt auf eine MC-Achse. (D) Eine SCP3-Achse (Pfeilspitzen) verbindet 2 MCs in einer disomischen Spermatocyte. Dies war die längste beobachtete MC-verbindende SCP3-Achse. (E) Eine stäbchenförmige SCP3-Struktur (Pfeilspitze) verbindet ein MC einer monosomischen Spermatocyte mit dem SC eines anderen Bivalents. (A-E) Die Bilder wurden aus dreidimensionalen Bildserien angespreiteter Spermatocyten ausgewählt, sodass die Schärfeebenen mit der Position der SCP3- oder STAG3-Signale übereinstimmt. Die Maßstäbe in (Cii) und (Eii) sind 2  $\mu\text{m}$ , der Maßstab in (Dii) ist 7  $\mu\text{m}$  lang. (F) Die Frequenzen der punkt- oder stäbchenförmigen SCP3-Signale ( $n \geq 50$  Spermatocyten). (Abbildung entnommen aus (Voet et al., 2003a))

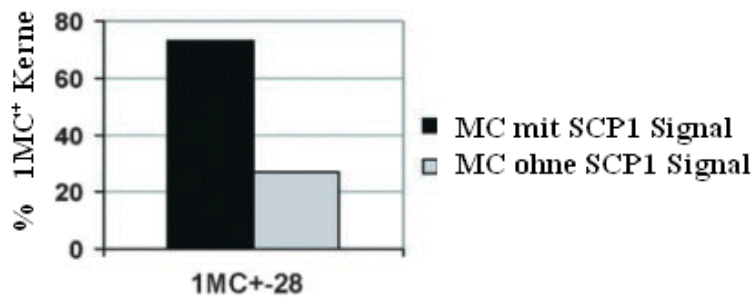
In 82% der monosomischen Spermatocyten (n=40) wurden punktartige STAG3-Signale (Abb.25A) beobachtet, wobei sich in 15% dieser Kerne ein STAG3-Signal zwischen dem univalenten MC und einer benachbarten STAG3-Achse eines Bivalentes ausbildete (Abb.25B). In 83% der disomischen Spermatocyten (n=18) wurden zwei punktartige Signale an den MCs beobachtet, während in den verbleibenden 17% der Kerne eine kurze, stäbchenförmige STAG3-Achse zwischen beiden MCs aufgefunden wurde.

Eine SCP3 IF ergab an den MCs mono- und disomischer Spermatocyten punktartige SCP3-Signale (Abb.25C und F). Eine detaillierte mikroskopische Untersuchung dieser SCP3-Signale ergab, dass sich in 18% der disomischen Pachytän-Spermatocyten stäbchenförmige SCP3-Signale zwischen zwei assoziierten MCs (Abb.25D und F) ausgebildet hatten. Die Länge dieser stäbchenförmigen SCP3-Signale betrug im Durchschnitt  $0,6\mu\text{m}$  ( $0,6 \pm 0,06 \mu\text{m}$ ; n=65). Interessanter Weise wurden auch in 14% der monosomischen Pachytän-Spermatocyten (n=50) stäbchenförmige SCP3-Signale gefunden, die ein univalentes MC und ein benachbartes Bivalent verbanden (Abb.25E und F).

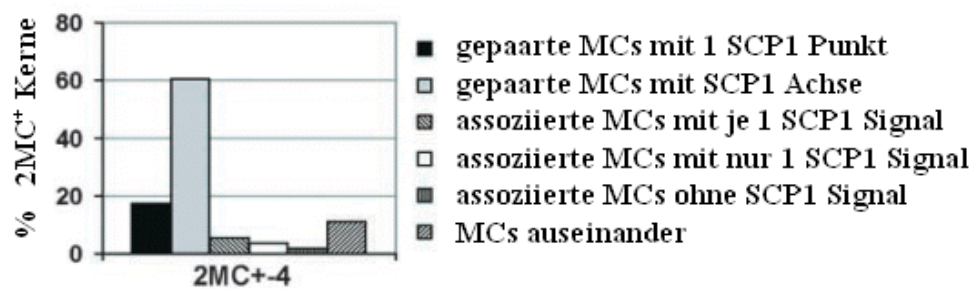
Ein IF Experiment mit SCP1, ein Marker für Synapse (Meuwissen et al., 1992; Dobson et al., 1994), zeigte in 73% der analysierten, monosomischen Pachytän-Spermatocyten (n=100) ein punktförmiges SCP1-Signal am MC (Abb.26F und I). Dies legte den Schluss nahe, dass die univalenten MCs sich einer Art Selbst-Synapse unterzogen.



**I SCP1 Signale in 1MC<sup>+</sup> Pachytän Spermatocyten**



**J SCP1 Signale in 2MC<sup>+</sup> Pachytän Spermatocyten**



**Abbildung 26:** SCP1-Signale an MCs. (**A-E, G und H**) SCP1 IF(grün, Pfeilspitzen in **C-F**) und MC-spezifische FISH (rot, Pfeilspitzen in **A, B, G und H**) in disomische Pachytän Spermatocyten zeigen entweder punktartige SCP1-Signale bei weit auseinanderliegenden (**H**), bei nahe beieinanderliegenden (**E**) und bei gepaarten (**G**) MCs oder stäbchenförmige SCP1 Signale (**B und C**) und punktartige SCP1-Signale (**A und D**) zwischen den MCs. Der Maßstab in (**A**) ist 5µm lang und gilt auch für (**B, G und H**). (**F**) Ein punktartiges SCP1-Signale (Pfeilspitze) an einem MC einer monosomischen Pachytän-Spermatocyte. (**I und J**) Frequenzen der unterschiedlichen SCP1-Muster in mono- und disomischen Pachytän-Spermatocyten (n=100 bzw. n=109 analysierte Spermatocyten). (Abbildung entnommen aus (Voet et al., 2003a))

Eine IF mit SCP1 auf disomische MC<sup>+</sup> Spermatocyten in Kombination mit einer MC-spezifischen FISH zeigte, dass SCP1-positive Achsen die zwei MCs in 61% der untersuchten Spermatocyten verbanden (n=109). Die SCP1-Achsen (Abb.26A-D und J) waren im Durchschnitt 0,64 µm lang (SD ± 0,066 µm; n=66). Diese gemessene Länge ergab somit die gleiche Größenordnung, wie die gemessenen SCP3-Achsen (s.o.). In 17% der untersuchten Kerne wurde ein punktartiges SCP1-Signal (<0,5µm Länge; Abb. 3A,D und J) zwischen zwei gepaarten MCs gefunden, während in 5% der Kerne die gepaarten bzw. miteinander assoziierten MCs zwei punktförmige SCP1-Signale zeigten. In 11% der untersuchten Kerne lagen die beiden MCs getrennt voneinander vor und nur eines der beiden MCs zeigte ein punktförmiges SCP3-Signal. In 4% der Kerne waren die beiden MCs miteinander assoziiert, wobei nur eines der beiden MCs ein punktartiges SCP1-Signal zeigte. In den restlichen 2% der Kerne lagen die beiden MCs gepaart und ohne ein SCP1-Signal vor (Abb.26J). Die hohe Frequenz an disomischen Spermatocyten mit stäbchenförmigen SCP1-Signalen legt den Schluss nahe, dass sich die faserartigen SCP1-Signale zwischen den punktförmigen SCP3-Signalen ausbilden könnten, da in nur 18% der untersuchten disomischen Spermatocyten stäbchenförmige SCP3-Signale gefunden wurden.

Disomische Spermatocyten, in denen die MCs keine SCP1-postiven Strukturen ausbildeten, könnten das Potential besitzen, den vermutlichen Pachytän-Checkpoint auszulösen, was Apoptose nach sich zieht (Odorisio et al., 1998).

Mittels TUNEL Essays auf Testesschnitten wurde das Vorkommen von apoptotischen Spermatozyten untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Tubuli-Stadien I bis XI des Epitheliumcyclus auf das Auftreten von apoptotischen Spermatozyten analysiert, da nur in diesen Tubuli-Stadien Pachytän-Spermatozyten vorliegen (Oakberg, 1956; Russell, 1990). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp-, monosomischen und disomischen Tubuli der Stadien I – XI gefunden (Tabelle 5).

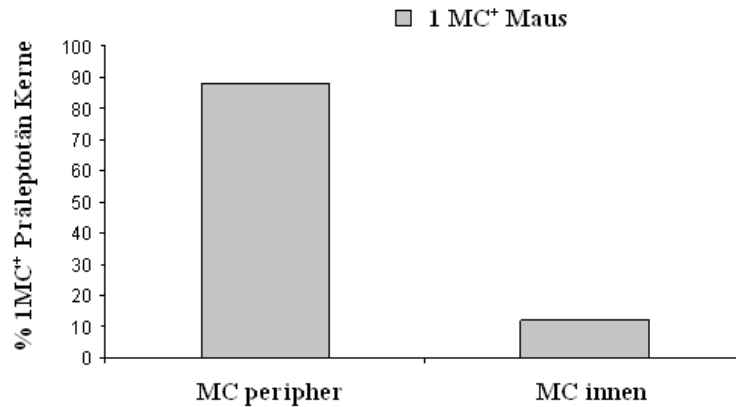
**Tabelle 5:** Mono- oder disomische MCs lösen den Pachytän Kontrollpunkt nicht aus. (Abbildung entnommen aus (Voet et al., 2003a))

Mäuse		Durchschnittliche Anzahl an apoptotischen Kernen in Epitheliumcyclus I-XI Tubuli	Anzahl untersuchter Epitheliumcyclus I-XI Tubuli
Wildtyp	MC <sup>-</sup> -75	2.2	22
	MC <sup>-</sup> -79	1.4	23
Monosomisch	1MC <sup>+</sup> -64	1	21
	1MC <sup>+</sup> -66	0.5	20
	1MC <sup>+</sup> -73	2.4	21
Disomisch	2MC <sup>+</sup> -4	1.9	10
	2MC <sup>+</sup> -6	1.25	20

### 3.5.3 Telomer-unabhängige Homologenpaarung der MCs

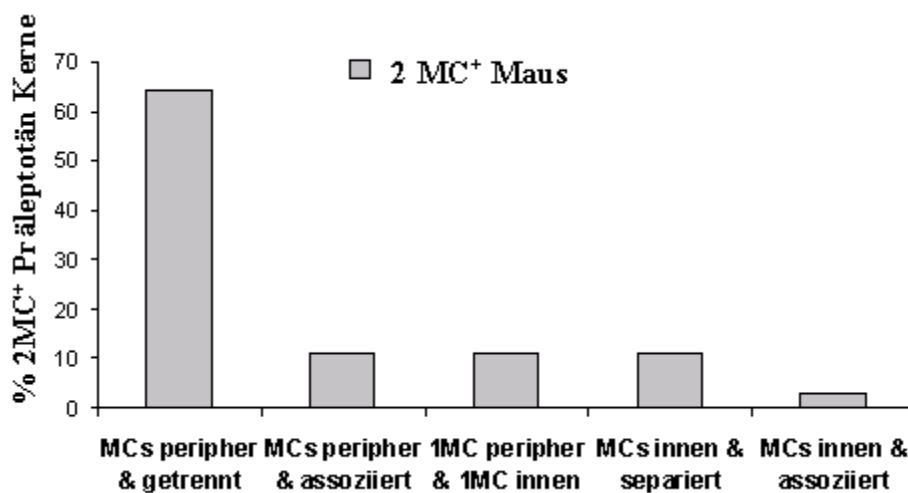
Die Paarung der MCs wirft die Frage auf, wie und wann die MCs während der meiotischen Prophase I miteinander assoziieren und paaren. Um dies zu untersuchen wurden Telomer-MC-FISH Experimente auf strukturell erhaltene monosomische und disomische Spermatozyten durchgeführt und dreidimensional ausgewertet. MC<sup>+</sup> Spermatozyten im mittleren Präleptotän-Stadium zeigten, dass in 88% der monosomischen (n=26, Abb.27) und 75% der disomischen (n=28, Abb.28) mittleren Präleptotän-Spermatozyten das bzw. die MCs

an der Kernperipherie lokalisiert waren. Dies stand im Einklang mit Wildtyp-Centromeren, die sich zu Beginn des Präleptotän-Stadiums an die Kernperipherie anlagern (Scherthan et al., 1996).



**Abbildung 27:** MC-Lokalisation in monosomischen mittleren Präleptotän-Spermatocyten (n=26).

Im disomischen Fall waren die beiden MCs in 14% der untersuchten mittleren Präleptotän-Spermatocyten (n=28) miteinander assoziiert, während sie in den restlichen 86% der Spermatocyten separiert vorlagen (Abb.28).



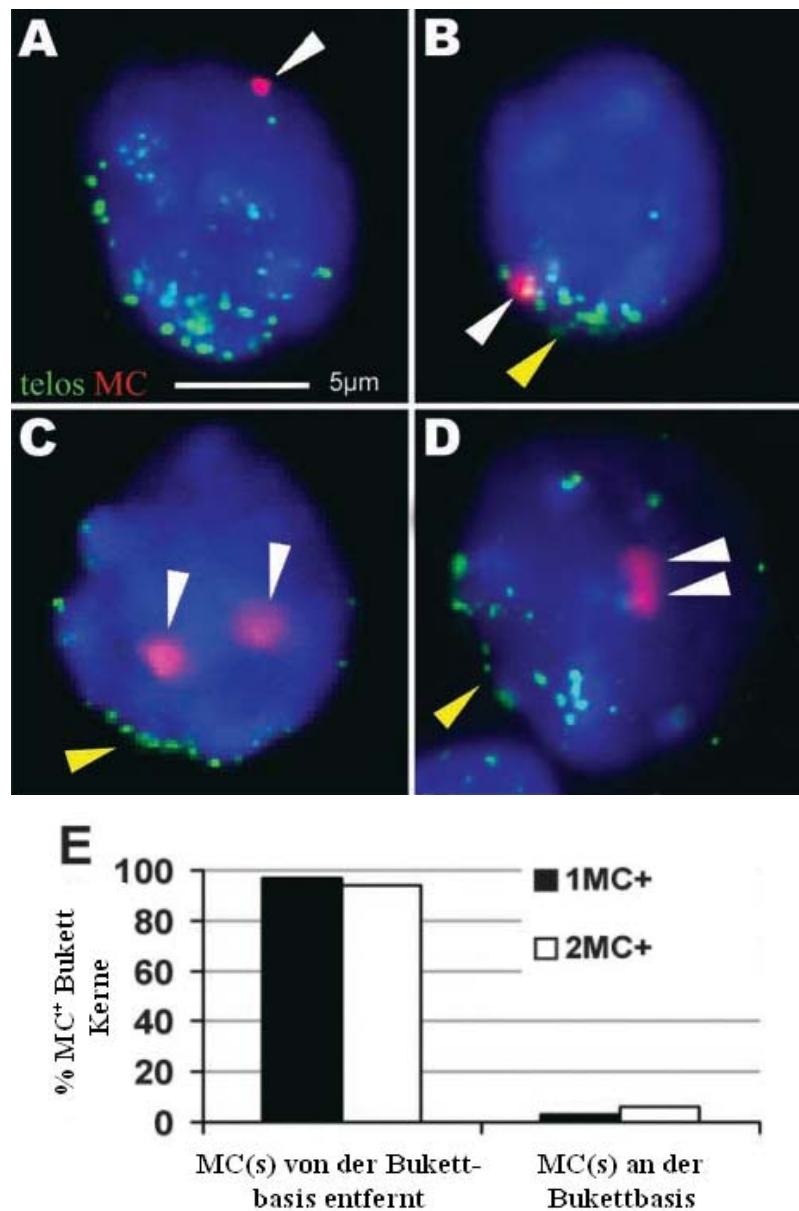
**Abbildung 28:** MC-Lokalisation in disomischen mittleren Präleptotän-Spermatocyten (n=28).

Ein möglicher Mechanismus und Zeitpunkt für die Initiierung der meiotischen Chromosomenpaarung könnte die meiotische Telomeraggregation, also das Bukett-Stadium,

---

sein, das während dem Leptotän-Zygotän-Übergang auftritt (Dernburg et al., 1995; Scherthan, 2001). Aus diesem Grund wurde von 12 Tage alten monosomischen und disomischen MC<sup>+</sup> Mäusen Testis-Suspensionen angefertigt. In diesem Alter findet sich eine Anreicherung an Bukett-Spermatocyten (Scherthan et al., 1996), da die meiotische Prophase I erst bis zum frühen Pachytän-Stadium fortgeschritten ist (Oakberg, 1956).

Auf diese Suspensionen wurden zur Identifizierung der Bukett-Spermatocyten (Scherthan et al., 1996) und zur Lokalisierung der MCs zweifarben-FISH Experimente mit einer (T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)<sub>n</sub> Repeat- und einer MC-spezifischen Sonde durchgeführt. In 97% der analysierten monosomischen Bukett-Spermatocyten (n=34) wurde das MC von der Bukett-Basis entfernt aufgefunden (Abb.29A und E). In den restlichen Kernen war das MC an der Bukettbasis lokalisiert (Abb.29B und E). In fünfzehn von sechzehn untersuchten disomischen Bukett-Spermatocyten waren die MCs nicht an der Bukett-Basis lokalisiert (Abb.29C–E), wobei in 50% dieser Bukett-Spermatocyten die MCs miteinander assoziiert waren.

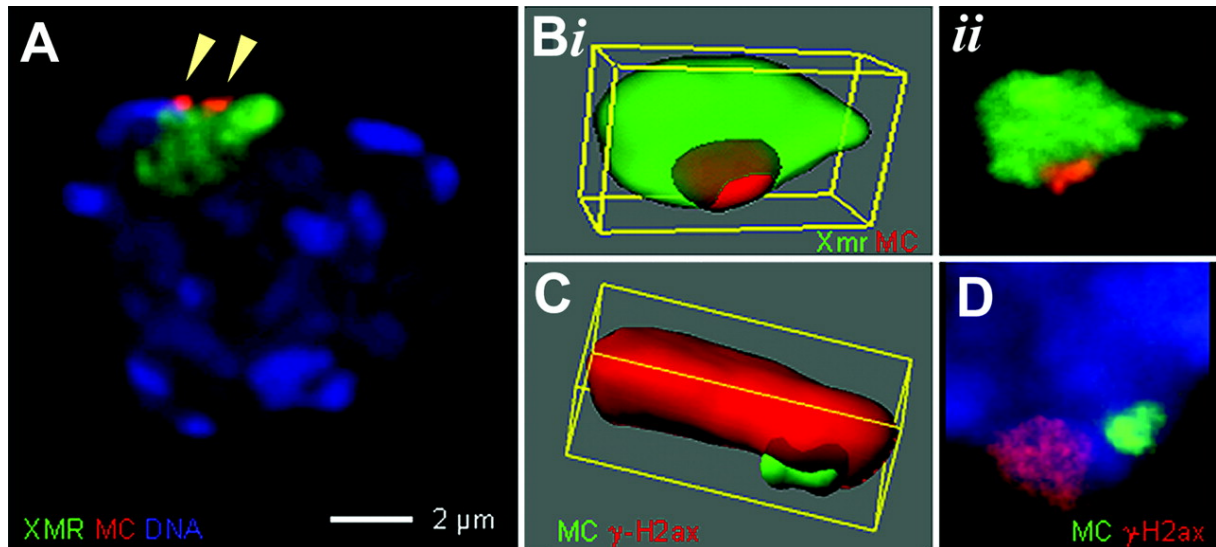


**Abbildung 29:** Die MCs lokalisieren nicht an der Bukettbasis. (**A** und **B**) Telomer- (grün) und MC-spezifische- (rot, weiße Pfeilspitze) FISH auf monosomische Bukett-Spermatocyten. (**A**) Monosomische Bukett-Spermatocyte; das MC ist von der Bukett-Basis entfernt oben im Kern lokalisiert (weiße Pfeilspitze). (**B**) Monosomische Bukett-Spermatocyte; das MC (weiße Pfeilspitze) ist nahe an der Bukett-Basis (gelbe Pfeilspitze) lokalisiert. (**C** und **D**) Telomer- (grün) und MC-spezifische- (rot, weiße Pfeilspitze) FISH auf Disomische Bukett-Spermatocyten. (**C**) Zwei getrennt-vorliegende MCs (weiße Pfeilspitzen), die nicht an der Bukett-Basis (gelbe Pfeilspitze) lokalisiert sind. (**D**) Disomische Spermatocyte mit relaxierter Telomeraggregation (gelbe Pfeilspitze) und zwei assoziierten MCs (weiße Pfeilspitzen), die ein großes FISH-Signal im Inneren des Kerns zeigen. Der Maßstab in (**A**) ist 5 μm lang und gilt für die Abbildungen (**A-D**). (**E**) Frequenzen und Lokalisierung der MCs in Bezug zur Bukett-Basis. (Abbildung entnommen aus (Voet et al., 2003a))



### 3.5.4 MCs assoziieren mit dem XY-Body

Da die beiden MCs in nur 50% der untersuchten disomischen Bukett-Spermatocyten miteinander assoziiert waren, scheinen die MCs unabhängig vom Bukett-Stadium paaren zu können. Die ähnlichen Frequenzen apoptotischer Zellen in mono-, disomischen und Wildtyp-Tubuli der Stadien I-XI (Tabelle 5) deuteten darauf hin, dass die MCs die (möglichen) Synapse und/oder DNA Reparatur Kontrollstellen (Roeder und Bailis, 2000; Cohen und Pollard, 2001) umgehen konnten. In Spermatocyten I gibt es eine Region im Kern, der sogenannte XY-Body, in dem asynaptische Chromosomen toleriert werden (Jablonka und Lamb, 1988; Turner et al., 2000). Um zu untersuchen, ob die MCs im Pachytän-Stadium mit XY-Chromatin assoziieren, wurden MC-spezifische FISH Präparate in Kombination mit einer XMR IF, die das gesamte XY Chromatin im Pachytän anfärbt (Calenda et al., 1994), angefertigt. Dreidimensionale Fluoreszenzmikroskopie in Verbindung mit Dekonvolution und dreidimensionale Rekonstruktion der Bildersequenzen zeigte, dass die MCs in 97% (n=35) der monosomischen bzw. in 94% (n=34) der disomischen Pachytän-Spermatocyten an der Peripherie oder zum Teil im Chromatin der XY-Body lokalisiert waren (Abb.30 A und B). MC-spezifische FISH in Kombination mit  $\gamma$ -H2ax IF ergab vergleichbare Ergebnisse (siehe Abb. 5 C).  $\gamma$ -H2ax ist die phosphorylierte Form des Histons H2ax, das in Leptotän Spermatocyten den Beginn der meiotischen DSB Reparatur markiert und später in Pachytän-Spermatocyten exklusiv im XY Chromatin vorkommt (Mahadevaiah et al., 2001), wo es für die meiotische Gonosomen Inaktivierung (MSCI) benötigt wird (Fernandez-Capetillo et al., 2003b). Mono- oder disomische MCs, die nicht mit dem XY-Body assoziiert waren, zeigten kein  $\gamma$ -H2ax Signal.



**Abbildung 30:** MC-XY-Body Assoziationen. (A) Disomische Pachytän-Spermatocyte nach XMR IF (grün) und MC-spezifischer FISH (rot, MCs separiert, Pfeilspitzen). Das Bild ist eine Projektion von 10 optischen Schnitten, die den XY-Body enthielten und mittels 3D-Mikroskopie aufgenommen wurden. Der Maßstab ist 2  $\mu\text{m}$  groß. (Bi) Dekonvolutierte dreidimensionale Rekonstruktion eines XY-Bodys (grün) einer disomischen Spermatocyte. Die zwei gepaarten MCs (ein Signal, rot) befinden sich teilweise im XY-Chromatin. (Bii) Dieses Bild zeigt die Projektion eines XY-Bodys vor der Dekonvolution. (C) Rekonstruktion des  $\gamma$ -H2ax gefärbten XY-Bodys (rot) und den beiden assoziierten MCs (grün). Die beiden MCs sind teilweise in das XY-Chromatin eingebettet. (D) Disomische Spermatocyte (DNA blau, Bildausschnitt), bei der die gepaarten MCs (grün) nicht mit dem  $\gamma$ -H2ax gefärbten XY-Body (rot) assoziiert sind. Die gepaarten MCs zeigen kein  $\gamma$ -H2ax Signal. (Abbildung entnommen aus (Voet et al., 2003a))

In 74% disomische Spermatocyten ( $n=34$ ) mit einer MC-XY-Body Assoziation lagen die beiden MCs gepaart vor (Abb.30, B und C), während in den verbleibenden 20% der Spermatocyten die MCs separiert waren (Abb.30 A). In jeweils 3% der untersuchten disomischen Spermatocyten waren die beiden MCs entweder nicht mit dem XY-Chromatin assoziiert oder komplett innerhalb des XY-Chromatins lokalisiert. In 97% der untersuchten monosomischen Kerne ( $n=35$ ) war das MC mit dem XY Body assoziiert, während in den

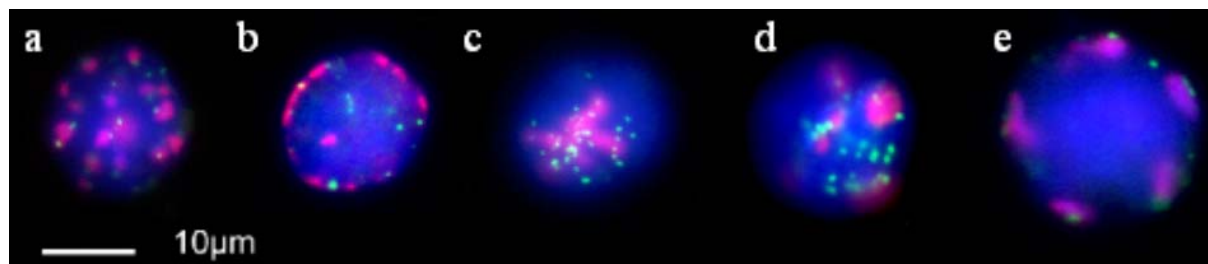
restlichen 3% das MC innerhalb des XY Body gefunden wurde. Dies zeigt, dass eine Art Interaktion zwischen den MCs und der Peripherie des XY-Bodys stattfand und die MCs sich so vor den (möglichen) Kontrollstellen, die Synapse und/oder DSB Reparatur kontrollieren, verstecken konnten.

### **3.6 Untersuchungen zur Änderung der Häufigkeit des mittleren Präleptotäns und der meiotischen Telomeraggregation in der Spermatogenese von Mausmutanten**

Es wird angenommen, dass die Bukett-Bildung ein rekombinationsunabhängiger Mechanismus für die Homologenpaarung ist, da er die Chromosomenenden räumlich nahe zusammen führt und somit beginnende homologe Interaktionen erleichtern kann (Loidl, 1990; Zickler und Kleckner, 1998; Scherthan, 2001; Bass, 2003). Die Dauer des Bukett-Stadiums variiert sowohl zwischen den Spezies, als auch zwischen den Geschlechtern innerhalb einer Spezies (Belar, 1928; Pfeifer et al., 2003; Roig et al., 2004), was auf eine stringente Kontrolle der zeitlichen Dauer des Bukett-Stadiums hindeutet. In der Prophase I der männlichen Maus ist das Bukett-Stadium sehr kurzlebig, nur ca. 0,4% einer Wildtyp-Testis-Suspension zeigen diese Telomeraggregation während dem Leptotän-Zygotän-Übergang (zur Übersicht siehe (Scherthan, 2003). Das mittlere Präleptotän-Stadium ist ebenfalls ein kurzlebiges Übergangsstadium (Scherthan, 2003), dass sich durch peripher angeordnete Major-Satelliten DNA auszeichnet und sich direkt an die prämeiotische DNA Replikationsphase anschließt (Scherthan et al., 1996).

### **3.6.1 Mittleres Präleptotän- und Bukett-Stadium sind in der Wildtyp-Spermatogenese kurzlebige Übergangsstadien**

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit sollte durch Telomer-Centromer-FISH Untersuchungen (Scherthan et al., 2000a) die mittleren Präleptotän- und Bukett-Frequenzen von verschiedenen Mausmutanten bestimmt werden. In Abb.31 sind die typischen Telomere-Centromer-FISH Muster von strukturell erhaltenen Mausspermatocyten in der Prophase I dargestellt. Prämeiotische Spermatocyten zeigen interne, getrennte Telomer- und Centromer-Signale. Mittlere Präleptotän-Spermatocyten zeichnen sich durch peripher angeordnete Major-Satelliten DNA aus, die die Innenenseite des Kerns auskleidet. Die Telomere sind überwiegend im Kerninneren lokalisiert. Bukett-Spermatocyten zeigen peripheralisierte Telomere, die an einem engbegrenzten Sektor der Kernhülle versammelt sind. Spätere Prophase I Stadien sind durch periphere, dispers verteilte Telomer-Signale und geclusterte, an der Kernperipherie verteilte Major-Satelliten DNA-Signale zu erkennen. Zur Bestimmung der mittleren Präleptotän- und Bukett-Frequenzen wurde die Anzahl dieser Stadien in einer Testissuspension ausgezählt und zur Gesamtzahl an Spermatocyten I des jeweiligen Genotyps in Beziehung gesetzt. Das mittlere-Präleptotän- und das Bukett-Stadium sind relativ kurzlebige Übergangsstadien (Scherthan, 2003), was zur Folge hat, dass in einer Testis-Suspension nur wenige mittlere Präleptotän- und Bukett-Kerne vorliegen (Abschnitt 3.6.3). Zur Bestimmung der Häufigkeiten dieser beiden Übergangsstadien wurden aus diesem Grund mindestens 4000 Prophase I Spermatocyten des jeweiligen Genotyps untersucht.



**Abbildung 31:** Diagnostische Telomere-Centromer-FISH Muster in der Prophase I. Die Telomere sind in grün und die pericentromerische Major-Satelliten DNA ist in rot visualisiert. **(a)** Prämeiotische Spermatozyte mit internen Telomer- und Major-Satelliten DNA-Signalen (Bildschärfenebene durch den Kernäquator). **(b)** Mittlere Präleptotän-Spermatozyte mit peripher-lokalisierter Major-Satelliten DNA. Einige Telomer-Signale sind schon an der Kernhülle, die restlichen Telomere sind noch im Kerninneren lokalisiert (Bildschärfenebene durch den Kernäquator). **(c)** Bukett-Topologie einer Leptotän-Zygotän-Spermatozyte. Die Telomere und pericentromerische DNA sind in einer begrenzten Region an der Kernperipherie versammelt (Schärfenebene an der Kernoberseite). **(d)** Bukett-Spermatozyte mit gepaarten größeren, gepaarten Telomersignalen (Schärfenebene an der Kernoberseite). **(e)** Pachytän-Spermatozyte mit peripheren, dispers verteilten Telomer-Signalen und geclusterten Major-Satelliten DNA-Signalen, die ebenfalls an der Kernperipherie verteilt sind (Bildschärfenebene durch den Kernäquator).

### 3.6.2 Das Mittlere Präleptotän- und das Bukett-Stadium sind voneinander unabhängige Ereignisse

Telomer-Centromer-FISH Experimente auf *Lmna*<sup>-/-</sup> Testis-Suspensionen ergaben eine signifikant erhöhte mittlere Präleptotän- und eine Wildtyp-ähnliche Bukett-Frequenz (Tab.7 und Abb.32). Genau das Umgekehrte wurde in der *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatozytogenese beobachtet. Hier wurde eine Wildtyp-ähnliche mittlere-Präleptotän- und eine signifikant erhöhte Bukett-Frequenz beobachtet (Tab.7 und Abb.32). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Eintritt in die Prophase I (definiert über die mittlere Präleptotän-Frequenz) und die Progression durch das Bukett-Stadium (definiert über die Bukett-Frequenz) zwei voneinander unabhängige Ereignisse sind. Allerdings findet man in beiden Mausmutanten Apoptose von

späten Zygotän- bzw. Pachytän-Spermatocyten (Yuan et al., 2000; Alsheimer et al., 2004; Liebe et al., 2004) und es stellte sich die Frage, ob eine unterschiedliche Zellularität der Testis-Suspensionen (d.h. eine Änderung der Gesamtzahl an Spermatocyten, verursacht durch das Fehlen späterer Prophase I Spermatocyten) zu einer Erhöhung der mittleren-Präleptotän- und der Bukett-Frequenzen führen könnte. Die Wildtyp-ähnliche Häufigkeit von Bukett-Spermatocyten in der LaminA-defizienten Spermatogenese und die Wildtyp-ähnliche Häufigkeit von mittleren-Präleptotän-Spermatocyten in der SCP3-defizienten Spermatogenese zeigten aber, dass die unterschiedliche Zellularität in den Testis-Suspensionen nicht zu einer signifikanten Erhöhung dieser Übergangsstadien führte. Diese Ergebnisse wurden durch Telomer-Centromer-FISH Untersuchungen an der *Hop2*<sup>-/-</sup> Maus, bei der in späte Zygotän-Spermatocyten Apoptose auftritt (Petukhova et al., 2003), bekräftigt. Eine Wildtyp-ähnliche Häufigkeit an Bukett-Spermatocyten (Tab.7 und Abb.32) bestätigte, dass die unterschiedliche Zellularität der Testis-Suspensionen keinen signifikanten Einfluss auf die Häufigkeiten des Bukett-Stadiums hatte. Eine erhöhte Häufigkeit eines oder beider Übergangsstadien in einer Testis-Suspension einer Mausmutante wird darum als Verlangsamung der Progression durch das entsprechende Übergangsstadium, infolge eines Bedürfnisses des fehlenden Proteins während diesem oder dem vorangehenden Stadium, angesehen (Scherthan, 2003).

### **3.6.3 Mittlere Präleptotän- und Bukett-Frequenzen hängen nicht von verschiedenen Mausstämmen ab**

Am Anfang dieser Untersuchungen sollte überprüft werden, ob die Spermatogenese unterschiedlicher Mausstämmen vergleichbare mittlere Präleptotän- und Bukett-Frequenzen aufweisen. Hierfür wurden Telomer-Centromer-FISH Experimente auf strukturell erhaltene Testissuspensionen durchgeführt und die Häufigkeiten der mittleren Präleptotän- und Bukett-Spermatocyten ausgezählt. Es zeigte sich, dass alle vier Mausstämmen C57BL/6,

BL6x129/SV, FVB/N und 129SV/PAS sehr ähnliche mittlere Präleptotän- und Bukett-Frequenzen aufwiesen (Tab.6). Nach der Analyse von insgesamt 36490 Wildtyp-Spermatocyten ergab sich eine mittlere Präleptotän-Frequenz von  $0,6 \pm 0,23$  % und eine Bukett-Frequenz von  $0,41 \pm 0,17$  %.

**Tabelle 6:** mittlere Präleptotän- und Bukett-Frequenzen untersuchter Wildtypstämme

<b>Stammhintergrund</b>	<b>% mPL</b>	<b>% Bukett</b>	<b>n=</b>
C57BL/6	0,25	0,80	2005
C57BL/6	0,29	0,39	1022
C57BL/6	0,45	0,19	4187
C57BL/6	0,43	0,58	2078
C57BL/6	1,08	0,43	2772
C57BL/6	0,37	0,28	2143
BL6x129/SV	0,36	0,36	1956
BL6x129/SV	0,50	0,60	1002
BL6x129/SV	0,41	0,51	987
BL6x129/SV	0,69	0,30	1010
BL6x129/SV	0,38	0,28	4264
BL6x129/SV	0,88	0,59	1020
BL6x129/SV	0,57	0,35	4009
FVB/N	0,87	0,35	4024
129SV/PAS	0,62	0,37	4011
<b>Durchschnitt</b>	<b><math>0,60 \pm 0,23</math></b>	<b><math>0,41 \pm 0,17</math></b>	<b>36490</b>

Die Telomer-Centromer-FISH Analysen der in Tab.6 aufgelisteten Mausmutanten zeigten, dass in rekombinations-defizienten Mausmutanten eine signifikante Erhöhung der mittleren-Präleptotän- und Bukett-Frequenzen vorlag. Mausmutanten mit Fehlern im Non-Homologous End-Joining (NHEJ) Reparaturweg, sowie haploid-spezifischen Mausmutanten zeigten dagegen keine signifikante Erhöhung der mittleren-Präleptotän- und Bukett-

Frequenzen. In Tab.7 und Abb.32 sind die relativen Änderungen der mittleren-Präleptotän- und Bukett-Frequenzen der untersuchten Mausmutanten angegeben. Sie beziehen sich auf die gemittelten Wildtypfrequenzen (0,6% für das mittlere Präleptotän- und 0,41% für das Bukett-Stadium, Tab.6). Abb.32 zeigt die prozentualen mittleren Präleptotän- und Bukett-Frequenzen der untersuchten Mausmutanten.



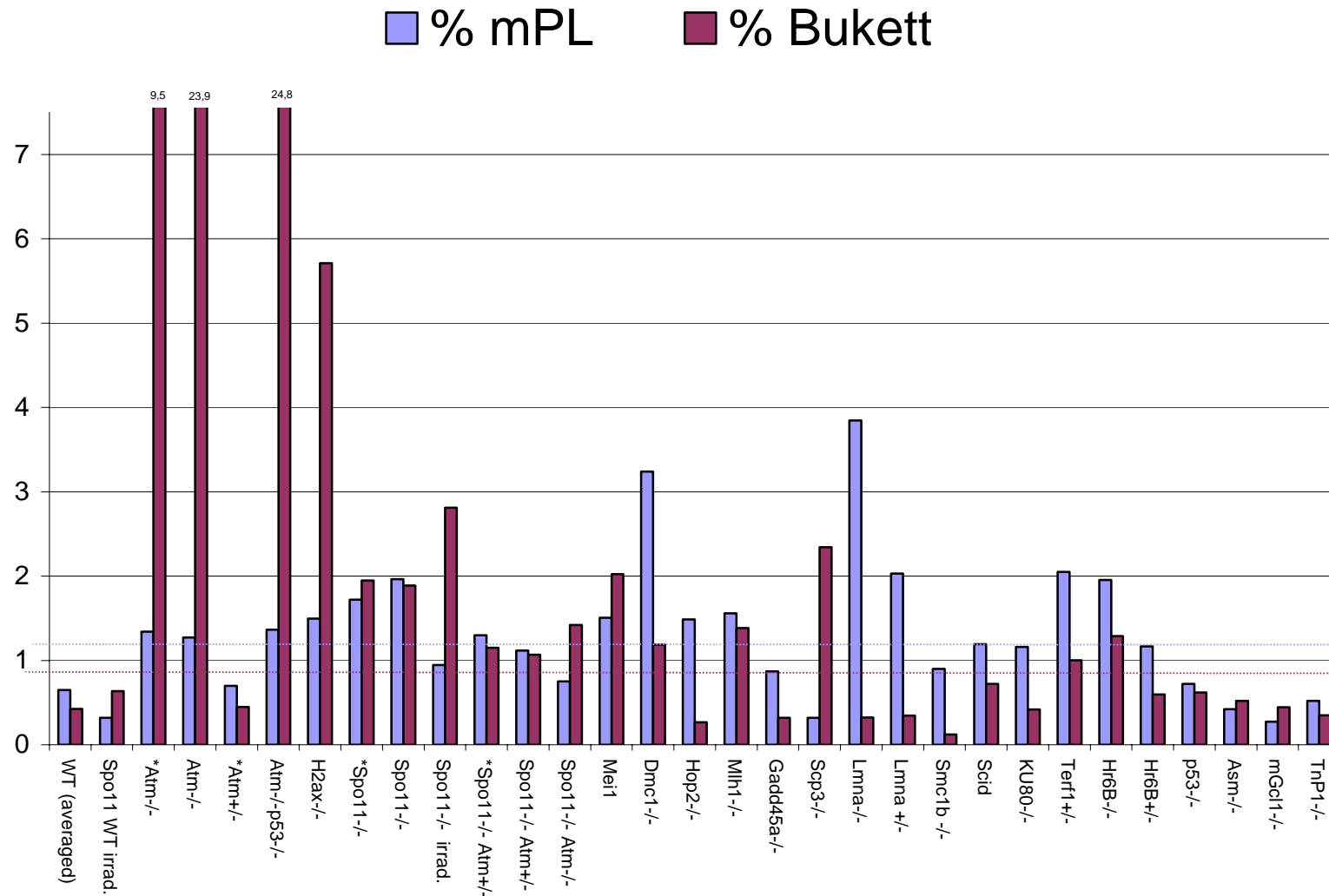
**Tabelle 7:** Relativen Änderungen der mittleren-Präleptotän- und Bukett-Frequenzen der untersuchten Mausmutanten

<i>Genotyp</i>	<b>n</b>	<b>relative Änderung der mittleren Präleptotän- Frequenz<sup>(a)</sup></b>	<b>relative Änderung der Bukett- Frequenz<sup>(a)</sup></b>	<b>Mausstamm</b>	<b>Referenz</b>
<i>WT irradi.</i>	4079	0,5	1,5	C57BL/6	(Romanienko und Camerini-Otero, 2000)
<i>Atm<sup>-/-</sup></i>	4022	2,1*	22,7**	129S6/SvEvTac	(Barlow et al., 1996)
<i>Atm<sup>-/-</sup></i>	4010	2,0*	56,8**	129/SvEv × NIH Black Swiss	(Elson et al., 1996)
<i>Atm<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup></i>	4033	2,1*	59,1**	129SvEv×Black Swiss	(Scherthan et al., 2000a)
<i>H2ax<sup>-/-</sup></i>	4081	2,3**	13,6**	C57BL/6	(Petersen et al., 2001)
<i>Spo11<sup>-/-</sup></i>	4008	2,6**	4,6**	C57BL/6	(Romanienko und Camerini-Otero, 2000)
<i>Spo11<sup>-/-</sup></i>	4025	3,0**	4,5**	C57BL/6	(Baudat et al., 2000)
<i>Spo11<sup>-/-</sup>irrad.<sup>(b)</sup></i>	4021	1,5	6,7**	C57BL/6	(Romanienko und Camerini-Otero, 2000)
<i>Spo11<sup>-/-</sup>Atm<sup>+/-</sup></i>	4029	1,7	2,5**	C57BL/6	Barchi et al., unpublished
<i>Spo11<sup>-/-</sup>Atm<sup>+/-</sup></i>	4004	2,0*	2,7**	mixed background 129S6/C57BL	Bellani et al. 2004, MS in preparation
<i>Spo11<sup>-/-</sup>Atm<sup>+/-</sup></i>	4022	1,2	3,4**	mixed background 129S6/C57BL	Bellani et al. 2004, MS in preparation
<i>meil</i>	4053	2,3**	4,8**	C57BL/6	(Libby et al., 2002)
<i>Dmcl<sup>-/-</sup></i>	4044	5,0**	2,8**	129/Sv <sup>Jae</sup> × C57BL/6J	(Pittman et al., 1998)
<i>Hop2<sup>-/-</sup></i>	4101	2,3**	0,6	C57BL/6	(Petukhova et al., 2003)
<i>Mlh1<sup>-/-</sup></i>	4045	2,4**	3,3**	C57BL/6	(Edelmann et al., 1996)
<i>Gadd45<sup>-/-</sup></i>	4029	1,3	0,8	129Sv <sup>Jae</sup> ×Black Swiss	(Hollander et al., 1999)
<i>p53<sup>-/-</sup></i>	4027	1,1	1,5	129SvEv×Black Swiss	(Scherthan et al., 2000a)
<i>Terf1<sup>+/-</sup></i>	4098	3,2**	2,4*	129SV/PAS	(Karlseder et al., 2003)
<i>Hr6B<sup>-/-</sup></i>	4041	3,0**	3,1**	FVB/N	(Baarends et al., 2003)
<i>Hr6B<sup>+/-</sup></i>	4032	1,8	1,4	FVB/N	(Baarends et al., 2003)
<i>Smc1β<sup>-/-</sup></i>	4111	1,4	0,3	C57BL/6	(Revenkova et al., 2004)
<i>Sycp3<sup>-/-</sup></i>	4056	0,5	5,6**	C57BL/6	(Yuan et al., 2000)
<i>Lmna<sup>-/-</sup></i>	4031	5,9**	0,8	C57Bl/6×129/S1	(Sullivan et al., 1999)
<i>Lmna<sup>+/-</sup></i>	4037	3,1	0,8	C57Bl/6×129/S1	(Sullivan et al., 1999)
<i>scid</i>	4021	1,8	1,7	CB-17	(van Buul et al., 1998)
<i>Ku80<sup>-/-</sup></i>	4048	1,8	1,0	(C57BL/6–29/Sv)	(Nussenzweig et al., 1997)
<i>Asm<sup>-/-</sup></i>	4036	0,6	1,2	C57BL/6/JX	(Horinouchi et al., 1995)
<i>mGcl1<sup>-/-</sup></i>	4041	0,4	1,1	C57BL/6	(Kimura et al., 2003)
<i>TnPI<sup>-/-</sup></i>	4027	0,8	0,8	129/Sv-C57BL/6	(Yu et al., 2000)

<sup>(a)</sup>bezogen auf die gemittelten Wildtypfrequenzen (0,6% für das mittlere Präleptotän- und 0,41% für das Bukett-Stadium, siehe Tabelle durchschnitt)

<sup>(b)</sup>Die Bukett Frequenz der bestrahlten *Spo11<sup>-/-</sup>* Mäuse ist gegenüber der unbestrahlten *Spo11<sup>-/-</sup>* Maus des gleichen Mausstamms signifikant erhöht.

Die Sterne kennzeichnen signifikante bzw. hochsignifikante Unterschiede:  $\chi^2$ -Test; \*p<0.01; \*\*p<0.001.



**Abbildung 32:** Prozentualer Anteil von mittleren Präleptotän-(blaue Balken) und Bukettspermatocyten (rote Balken) der Mausmutanten nach Telomer-Centromer-FISH Analysen. Die gepunkteten Linien geben die Signifikanzlevel ( $\chi^2$ ;  $p < 0,001$ ) für die mittleren Präleptotän- (blau) und Bukett-Frequenzen (rot) im Vergleich zum gemittelten Wildtyp (Tabelle 6) an. Die Sterne kennzeichnen Mäuse des gleichen Mausstammes (Romanienko und Camerini-Otero, 2000).

### 3.6.4 Spo11 wird für einen schnellen Eintritt in die Prophase I benötigt

Die meiotische Rekombination wird durch DSBs eingeleitet, die durch die Transesterase Spo11 in die leptotän DNA eingefügt werden (zur Übersicht siehe Keeney, 2001). Untersuchungen in der Meiose der Bäckerhefe zeigten, dass das Spo11 Protein schon in der prämeiotischen S-Phase mit Chromatin assoziiert ist (Cha et al., 2000; Borde et al., 2004). Die Analyse der Telomer-Centromer-FISH Experimente in zwei verschiedenen *Spo11*<sup>-/-</sup> Mausstämmen (Baudat et al., 2000; Romanienko und Camerini-Otero, 2000) ergab sehr ähnliche mittlere-Präleptotän- und Bukett-Frequenzen. Die mittleren Präleptotän-Frequenzen waren gegenüber dem Wildtyp 3,0-fach bzw. 2,6-fach und die Bukett-Frequenz 4,5-fach bzw. 4,6-fach erhöht (der erste Wert bezieht sich auf die Spo11 Mutante von Baudat et al., 2000, der zweite Wert auf die Mutante von Romanienko und Camerini-Otero, 2000). Beide Frequenzen waren im Vergleich zum Wildtyp hochsignifikant erhöht (Tab.7 und Abb.32).

*mei1* ist ein meiosespezifisches Gen, das für eine erfolgreiche Gametogenese in beiden Geschlechtern der Maus benötigt wird (Libby et al., 2002). *mei1* Spermatocyten zeigen einen Spermatogenese Arrest am Ende des Zygotän-Stadiums und die Bildung von SCs ist gestört. Sie laden kein Rad51 Protein in die meiotischen Chromosomen, da keine DSB gebildet werden (Libby et al., 2003). Ihr meiotischer Phänotyp ähnelt somit dem *Spo11*<sup>-/-</sup> Phänotyp. Die Telomer-Centromer-FISH Analyse der *mei1* Spermatogenese ergab, wie in der Spo11-defizienten Meiose gefunden, eine signifikante Erhöhung der mittleren Präleptotän-Frequenz. Sie war im Vergleich zur Wildtypfrequenz 2,3-fach erhöht (Tab.7).

### 3.6.5 Das Fehlen von Spo11 und DSBs führt zu einer Verlängerung des Bukett-Stadiums

In der Meiose der Bäckerhefe und *Sordaria* führt das Fehlen von Spo11, und damit verbunden, das Fehlen von DSBs, zu einer Anreicherung von Bukett-Spermatocyten (Trelles-Sticken et al., 1999; Storlazzi et al., 2003). Dies impliziert eine Verbindung zwischen Rekombination und der Dauer des Bukett-Stadiums, oder eine Rekombinations-unabhängige Rolle des Spo11 Proteins. Die Telomer-Centromer-FISH Untersuchung der *Spo11*<sup>-/-</sup> Spermatogenese ergab eine hochsignifikante, 4,5-fache bzw. 4,6-fache Anreicherung an Bukett-Spermatocyten (Tab.7 und Abb.32). Somit scheint es auch in der Säugermeiose eine Verbindung zwischen der Dauer des Bukett-Stadiums und Rekombination zu geben. Die Initiierung des meiotischen Telomeraggregation und die Initiierung der meiotischen Rekombination scheinen dagegen unabhängige Ereignisse zu sein, ähnlich wie in der Bäckerhefe (Trelles-Sticken et al., 1999). Um herauszufinden, ob DSBs selbst die Dauer des Bukett Stadiums bei Abwesenheit von Spo11 beeinflussen können, wurden in Zusammenarbeit mit R.D.Camerini-Otero (NHI, Bethesda, USA) *Spo11*<sup>-/-</sup> Mäuse  $\gamma$ -Strahlung ausgesetzt (3Gy) und nach weiteren 26h die Testes entnommen und analysiert. Die Telomer-Centromer-FISH Untersuchung ergab eine signifikante Erhöhung der Bukett-Frequenz im Vergleich mit (unbestrahlten) *Spo11*<sup>-/-</sup> und *Spo11*<sup>+/+</sup> Mäusen. Die Bukett-Frequenz der bestrahlten Spo11 Mutante war 6,7-fach und die der unbestrahlten Mutante 4,6-fach gegenüber dem Wildtyp erhöht (Tab.7 und Abb.32).

Dieses Ergebnis zeigte, dass DSBs und ihre Prozessierung das Potential zur Verlängerung des Bukett-Stadiums haben und dass es in der Säugermeiose einen weiteren, DSB-unabhängigen Beitrag von Spo11 zur Persistenz der Telomeraggregation zu geben scheint, wie es auch in *Sordaria* (Storlazzi et al., 2003) und der Bäckerhefe (Trelles-Sticken et al., 1999) festgestellt wurde.

Die Analyse der *meil* Spermatogenese, bei der wie in der *Spo11*-defizienten Spermatogenese keine DSBs gebildet werden (Libby et al., 2003), zeigte ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Bukett Frequenz. Sie war 4,8-fach höher als im Wildtyp (Tab.7 und Abb.32).

### **3.6.6 ATM trägt zur schnellen Progression durch das mittlere Präleptotän Stadium bei und verbindet DSB Reparatur mit der Dauer des Bukett Stadiums**

Es wurde vorgeschlagen, dass die ATM-abhängige DNA Schadensüberwachung der Hauptregulator für das schnelle Durchlaufen des Bukett Übergangstadiums ist (zur Übersicht siehe Pandita, 2002; Scherthan, 2003). Um die Rolle von ATM in den frühen chromosomalen Ereignissen detaillierter untersuchen zu können wurde von *Atm*<sup>-/-</sup>, *Atm*<sup>+/-</sup>*Spo11*<sup>-/-</sup> and *Atm*<sup>-/-</sup>*Spo11*<sup>-/-</sup> Mäusen mittels Telomer-Centromer-FISH Experimenten die mittlere-Präleptotän- und Bukett-Frequenzen bestimmt (Tab.7 und Abb.32). In der *Atm*<sup>-/-</sup> Spermatogenese war die mittlere-Präleptotän-Frequenz signifikant erhöht (2,1-fach für die *Atm*<sup>-/-</sup> Mutante, Mausstamm 129S6/SvEvTac bzw. 2,0-fach für die *Atm*<sup>-/-</sup> Mutante, Mausstamm 129SvEv x NIH Black Swisse) (Tab.7 und Abb.32). Die mittlere-Präleptotän-Frequenz in der *Atm*<sup>+/-</sup>*Spo11*<sup>-/-</sup> Maus (Camerini Labor, NIH, Bethesda, USA) war ebenfalls 2,0-fach erhöht und in der *Atm*<sup>+/-</sup>*Spo11*<sup>-/-</sup> Maus 1,7-fach erhöht (Keeney Labor, Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA) (Tab.7 und Abb.32). Die *Atm*<sup>-/-</sup>*Spo11*<sup>-/-</sup> Maus (Camerini Labor, NIH, Bethesda, USA) zeigte eine Wildtyp-ähnliche mittlere-Präleptotän-Frequenz (1,5-fach erhöht) (Tab.7 und Abb.32). Für die erhöhte mittlere-Präleptotän-Frequenz in der *Spo11*<sup>-/-</sup> Spermatogenese könnte somit das Vorhandensein von ATM verantwortlich sein.

Die Inaktivierung von ATM alleine führte zu einer drastischen Erhöhung der Bukett Frequenz (Scherthan et al., 2000a). Obwohl das Ausmaß der beobachteten Bukett-

Anreicherung in zwei verschiedenen Mausstämmen variierte (22,7-fache [Mausstamm 129S6/SvEvTac] gegenüber 56,8-fache Erhöhung [Mausstamm 129SvEv x NIH Black Swisse]), zeigten beide *Atm*<sup>-/-</sup> Mäuse die mit Abstand höchste Bukett-Frequenz unter allen analysierten Mausmutanten (Tab.7 und Abb.32).

In den beiden *Atm*<sup>+/-</sup>*Spo11*<sup>-/-</sup> Doppelmutanten wurde ebenfalls eine Erhöhung der Bukett-Frequenzen gefunden, allerdings viel schwächer als in der *Atm*<sup>-/-</sup> Maus. In der *Atm*<sup>+/-</sup>*Spo11*<sup>-/-</sup> Mutante (Mausstamm 129S6/C57BL) war die Bukett-Frequenz 2,0-fach (signifikante Erhöhung) und in der *Atm*<sup>+/-</sup>*Spo11*<sup>-/-</sup> Mutante (Mausstamm C57Bl6) 1,7-fach (nicht signifikant) erhöht (Tab.7 und Abb.32).

### **3.6.7 Mausmutanten mit gestörter Rekombination haben eine erhöhte mittlere-Präleptotän und Bukett-Frequenz**

Zu den frühen meiotischen Rekombinationsereignissen gehört die Rad51/Dmc1 vermittelte Homologensuche gefolgt von der Einzelstrangeinführung des intakten homologen Chromosomenstrangs (Hunter und Kleckner, 2001; Lichten, 2001). Da in *mei1* und in *Spo11* Spermatocyten keine Rad51/DMC1 Foci auf den Chromosomenachsen gefunden werden (Baudat et al., 2000; Libby et al., 2003), könnte das verlängerte Bukett-Stadium durch ein Signal ausgelöst werden, das Probleme beim Beladen der Chromosomenachsen bzw. einzelsträngige DNA-Enden mit Rad51/DMC1 signalisiert. Die Analyse der mittleren Präleptotän- und Bukett-Frequenzen in der *Dmc1*<sup>-/-</sup> Spermatogenese, die eine gestörte Synapse und fehlerhafte DSB Reparatur zeigt (Pittman et al., 1998; Yoshida et al., 1998), ergab eine hochsignifikante Anreicherung an mittleren Präleptotän- (5,0-fach erhöht, Tab.7) und an Bukett-Spermatocyten (2,8-fach erhöht, Tab.7).

Es wurde gezeigt, dass sich das Mlh1 Protein an die Crossover Foci anlagert (Edelmann et al., 1996; Anderson et al., 1999; Froenicke et al., 2002; Marcon und Moens, 2003) und

stellt somit einen Marker für späte Schritte der Rekombinationsreparatur dar. Die Männchen und Weibchen *Mlh1*-defizienter Mäuse sind infertil, da sie keine Crossover ausbilden und auch die Spindeln für die meiotischen Teilungen gestört sind (Edelmann et al., 1996; Woods et al., 1999). Die mittlere Präleptotän-Frequenz (2,4-fache Erhöhung, Tab.7) und die Bukett-Frequenz (3,3-fach erhöht, Tab.7) von *Mlh1*<sup>-/-</sup> Mäusen war signifikant erhöht.

### **3.6.8 Hop2 wird für das Signalisieren des Fortschreitens der Rekombination an die meiotischen Telomere benötigt**

Hop2-defiziente Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*) zeigen einen Pachytän-Arrest, da die Homologe Synapse gestört ist und resektierte DSBs nicht repariert werden können (Leu und Roeder, 1999; Tsubouchi und Roeder, 2002). In *Hop2*<sup>-/-</sup> Spermatocyten werden die AE vollständig aufgebaut. Die Synapse von homologen Chromosomen ist allerdings stark beeinträchtigt (stärker als in *mei1*<sup>-/-</sup> oder *Dmc1*<sup>-/-</sup> Mäusen). Persistierende Rad51/Dmc1 und  $\gamma$ -H2ax Foci deuten darauf hin, dass DSBs gebildet werden, aber nicht richtig repariert werden können (Petukhova et al., 2003). Die Telomer-Centromer-FISH Analyse der Hop2-defizienten Spermatogenese ergab eine signifikante Erhöhung der mittleren-Präleptotän-Frequenz (2,3-fach erhöht, Tab.7 und Abb.32), aber überraschenderweise keine erhöhte, sondern eine Wildtyp-ähnliche Bukett-Frequenz (Tab.7 und Abb.32), trotz fehlerhafter DSB Reparatur und Homologenpaarung.

Es wurde beobachtet, dass in der Rekombinations-defizienten Spermatogenese von *Spo11*<sup>-/-</sup>, *mei1*, *Dmc1*<sup>-/-</sup>, und *Hop2*<sup>-/-</sup> Mäusen die Spermatocyten während einem verlängerten Zygotän-Stadium durch Apoptose absterben (Pittman et al., 1998; Baudat et al., 2000; Romanienko und Camerini-Otero, 2000; Libby et al., 2002; Petukhova et al., 2003). Um zu überprüfen, ob in diesen Mutanten tatsächlich keine Spermatocyten das mittlere Pachytän-Stadium (oder spätere Stadien) erreichen, wurden IF Experimente mit Testes-spezifischem

Histon H1t (Moens, 1995; Drabent et al., 1996; Scherthan et al., 2000a) oder mit XMR (Calenda et al., 1994) durchgeführt. Das Histon H1t-Protein wird in Spermatocyten ab dem mittleren Pachytän exprimiert (Drabent et al., 1996). Die IF mit H1t auf strukturell erhaltenen Kerne ergab, dass alle untersuchten *Spo11*<sup>-/-</sup>, *mei1*, *Dmc1*<sup>-/-</sup>, und *Hop2*<sup>-/-</sup> Spermatocyten negativ für diesen Marker waren (nicht gezeigt). In frühen Pachytän-Spermatocyten lokalisiert das XMR-Protein exklusiv mit dem Chromatin der Geschlechtschromosomen (Calenda et al., 1994), die im frühen Pachytän-Stadium kondensieren und ab dem mittleren Pachytän-Stadium als sogenannter XY-Body im Kern vorliegen (Solari, 1969; Solari, 1970). Die IF mit XMR auf strukturell erhaltene *Spo11*<sup>-/-</sup>, *mei1*, *Dmc1*<sup>-/-</sup>, und *Hop2*<sup>-/-</sup> Spermatocyten zeigte das Fehlen von XY-Bodies in den Spermatocyten (nicht gezeigt). Diese beiden Ergebnisse demonstrierten, dass in den Testis-Suspensionen dieser Mausmutanten tatsächlich keine Spermatocyten vorlagen, die bis in das mittlere Pachytän-Stadium (oder in spätere Stadien) segregierten, und dass die Zellularität in diesen Testis-Suspensionen sehr ähnlich war. Der Vergleich der Bukett-Frequenzen der *Spo11*<sup>-/-</sup>, *mei1*- und *Dmc1*<sup>-/-</sup>-Spermatogenese mit der *Hop2*<sup>-/-</sup> Bukett-Frequenz ergab hochsignifikante Unterschiede (Tab.8).



**Tabelle 8:** Relative Änderungen der Bukett-Frequenzen Rekombinations-defizienter Mausmutanten

<i>Genotyp</i>	<b>relative Änderung der Bukett- Frequenz</b> <sup>(a)</sup>	<b>Mausstamm</b>	<b>Referenz</b>
<i>Spo11</i> <sup>-/-</sup>	7,2**	C57BL/6	(Romanienko und Camerini-Otero, 2000)
<i>Spo11</i> <sup>-/-</sup>	7,0**	C57BL/6	(Baudat et al., 2000)
<i>mei1</i>	7,5**	C57BL/6	(Libby et al., 2002)
<i>Dmc1</i> <sup>-/-</sup>	4,4**	129/Sv <sup>lac</sup> × C57BL/6J	(Pittman et al., 1998)

<sup>(a)</sup>bezogen auf die *Hop2*<sup>-/-</sup> Bukett-Frequenz (Bukett-Frequenz: 0,27%; Tab.7)

Die Sterne kennzeichnen hochsignifikante Unterschiede:  $\chi^2$ -Test;

\*\*p<0.001.

Die Bukett-Aggregation in der *Spo11*-defizienten Spermatogenese war im Vergleich mit der *Hop2*-defizienten Spermatogenese um das 7-fache erhöht, ähnlich wie in der *mei1* Spermatogenese, bei der die Bukett-Aggregation um das 7,5-fache erhöht war (Tab.8). Die Bukett-Aggregation in der *Dmc1*-defizienten Spermatogenese war im Vergleich zu der *Hop2*-defizienten Spermatogenese um das 4,4-fache erhöht (Tab.8). Da die *Hop2*<sup>-/-</sup> Maus die einzige untersuchte Rekombinationsmutante war, bei der die Bukett-Frequenz Wildtyp-ähnlich war, und da die anderen frühen Rekombinationsmutanten (*Spo11*<sup>-/-</sup>, *mei1* und *Dmc1*<sup>-/-</sup>) im Vergleich zur *Hop2*<sup>-/-</sup> Maus eine hochsignifikante Bukett-Aggregation zeigten, könnte *Hop2* bei der Signalübermittlung über den Stand der Rekombinationsreparatur an die meiotischen Telomere eine Rolle spielen.

### 3.6.9 Gadd45a und der NHEJ Reparaturweg spielen für die meiotische Telomeraggregation keine Rolle

Gadd45a ist ein untergeordnetes Zielprotein des ATM/p53 Signalwegs und spielt eine Rolle im Zellzyklusarrest und bei der Instandhaltung der Genomstabilität (Kastan et al., 1992; Hollander et al., 1993). Die Telomer-Centromer-FISH Analyse der *Gadd45a*<sup>-/-</sup> Spermatogenese ergab eine Wildtyp-ähnliche mittlere Präleptotän- und Bukett-Frequenz (Tab.7 und Abb.32). Die beobachtete wildtyp-ähnliche mittlere Präleptotän- und Bukett-Frequenz in der p53-defizienten Spermatogenese (Tab.7 und Abb.32) und die Fertilität beider Mutanten deutete daraufhin, dass dieser Zweig in der ATM/p53 DNA Schadensantwort nicht an der Regulierung der meiotischen Telomeraggregation involviert war.

Der non-homologous end-joining (NHEJ) Reparaturmechanismus hängt von der DNA Proteinkinase (DNA-PK) und dem Heterodimer KU70/KU80 ab (zur Übersicht siehe Downs und Jackson, 2004). Dem NHEJ Reparaturmechanismus wird eine Schutzfunktion für somatische Telomere zugeschrieben (Goytisolo et al., 2001; Smogorzewska et al., 2002) und scKU80 könnte eine Rolle in der Telomeranheftung an die Kernperipherie vegetativer Hefekerne (*Saccharomyces cerevisiae*) spielen (Laroche et al., 1998). Die Telomer-Centromer-FISH Analyse von SCID (Severe Combined Immunodeficiency) Mausmutaten, die eine Mutation in der katalytischen Untereinheit der DNA-PK aufweisen (DNA-PKcs) (Blunt et al., 1996), zeigte eine schwach signifikante Erhöhung der mittleren Präleptotän-Frequenz ( $p=0.012$ ;  $\chi^2$ -Test; Tab.7 und Abb.32). Die Bukett-Frequenz war nicht erhöht (Tab.7 und Abb.32). Auch in der *Ku80*<sup>-/-</sup> Spermatogenese war die mittlere Präleptotän-Frequenz schwach, aber nicht signifikant erhöht und die Bukett-Frequenz war Wildtyp-ähnlich (Tab.7 und Abb.32).

### **3.6.10 Die Hr6B ubiquitinkonjugierte Enzymaktivität und das TRF1 Telomer-Protein werden für eine normale Chromosomendynamik benötigt**

Hr6B ist ein ubiquitinkonjugiertes Enzym, das für die Fertilität männlicher Mäuse benötigt wird (Roest et al., 1996), da es u.a. für die meiotische Chromatinorganisation eine wichtige Rolle spielt (Baarends et al., 2003). Die Telomer-Centromer-FISH Analyse der *Hr6b*<sup>-/-</sup> Spermatogenese ergab eine signifikante Erhöhung sowohl der mittleren Präleptotän- (3,0-fache Erhöhung) als auch der Bukett-Frequenz (3,1-fache Erhöhung) (Tab.7 und Abb.32).

Das TRF1 Telomer-Protein spielt in der Telomer-Längenregulation (Chong et al., 1995) eine wichtige Rolle und ist für die Embrionalentwicklung der Maus essentiell (Karlseder et al., 2003). Die Telomer-Centromer-FISH Analyse der heterozygoten *Terf1*<sup>+/-</sup> Spermatogenese ergab eine signifikante Erhöhung der mittleren Präleptotän- (3,2-fache Erhöhung) und der Bukett-Frequenz (2,4-fache) (Tab.7 und Abb.32). Die Anheftung der meiotischen Telomere an die innere Kernhülle war nicht beeinträchtigt (nicht gezeigt).

### **3.6.11 Mäuse mit Fehlern in der Spermiogenese zeigen eine normale Chromosomendynamik**

Abschließend wurde die Chromosomendynamik von drei Mausmutanten (*mGcl-1*<sup>-/-</sup>, *Tnp1*<sup>-/-</sup> und *Asm*<sup>-/-</sup>) mit Fehlern in der Spermiogenese untersucht. *Asm* Knockout Mäusen fehlt die Sphingomyelinase Säure und sie sind aufgrund von Membrandefekten subfertil (Horinouchi et al., 1995; Butler et al., 2002). Mäuse, denen das Übergangprotein 1 (transition protein 1, TP1) fehlt, sind infertil, da sie Fehler im Spermienchromatinumbau haben (Yu et al., 2000; Meistrich et al., 2003). *mGcl-1* ist das Mausehomologe des Drosophila Gens *gcl-1* (germ cell less 1 Kimura et al., 1999; Leatherman et al., 2000). Das Protein ist an der

Kernhülle lokalisiert, da es mit dem LAP2- $\beta$  (lamina-associated polypeptide 2-beta) Protein interagiert (Nili et al., 2001). *mGcl-I*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen eine fehlerhafte Spermienchromatinkondensation, da die Protamin Expression gestört ist (Kimura et al., 2003). Alle drei Mausmutanten zeigten eine Wildtyp-ähnliche mittlere Präleptotän- und Bukett-Frequenz (Tab.7 und Abb.32). Dies deutete darauf hin, dass sich Defekte, die der Prophase I nachgelagert sind, nicht auf die Telomeraggregation oder Chromosomendynamik auswirken.

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodik

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Umverteilung der meiotischen Telomere in der Prophase zur Meiose I Teilung in der Spermatogenese der Maus durch Signale aus der Rekombinationsreparatur beeinflusst wird. Hierzu wurden die Testes von einer großen Zahl an Knockout-Mäusen (Tabelle 2) einer Interphase-FISH-Analyse unterzogen, wie sie von Scherthan und Mitarbeitern im Jahre 2000 entwickelt worden war (Scherthan et al., 2000a). Ferner wurde der Einfluss meiosespezifischer Struktur-Proteine, wie das Axialelement- (AE) Protein SCP3, das meiotische Cohesin Smc1 $\beta$  und das LaminC2, auf die Anheftung der Telomere an die meiotische Kernhülle, auf die Bukett-Aggregation und auf die Chromosomendynamik untersucht. Durch das Studium von Mini-Ringchromosomen in der Keimbahn von transgenen Mäusen konnte die Rolle von Telomerrepeats für den Telomer/Kernhüllenkontakt und die Homologenpaarung untersucht werden.

Die Meiose ist eine spezialisierte Form der Zellteilung und findet bei Säugern im Hoden oder dem Ovar statt. Die männliche Meiose beginnt mit dem Einsetzen der Geschlechtsreife (Pubertät) und läuft während des gesamten Lebens ab (Oakberg, 1956). Die Meiose ist in wohldefinierte Abschnitte gegliedert; sie beginnt mit einer verlängerten prämeiotischen Synthese (S)-Phase, gefolgt von der Prophase I, der sich zwei direkt aufeinanderfolgende Kernteilungen (Meiose I und II) anschließen. Während der Prophase I müssen sich die homologen Chromosomen finden, paaren und rekombinieren.

Dieser Prozess geht mit einer weitreichenden Umstrukturierung der Kernarchitektur einher (zur Übersicht siehe von Wettstein et al., 1984; Scherthan et al., 1996), die mittels Telomer-Centromer-FISH beobachtet werden kann (Scherthan et al., 2000a). Vor Eintritt in die Prophase I liegen die Telomere und Centromere zufällig im Kern verteilt vor (Abb.31,

Tab.1). Im Präleptotän lagern sich zuerst die Centromere an die Kernperipherie an und kleiden im mittleren Präleptotän-Übergangsstadium kurzzeitig die Innenseite der Kernperipherie aus. Die Telomere lagern sich ab dem mittleren Präleptotän-Stadium an die Kernhülle an. Das Leptotän-Zygotän-Übergangsstadium ist durch die Telomeraggregation (Bukett-Stadium) gekennzeichnet. Spätere Prophase I Stadien sind durch periphere, dispers verteilte Telomer-Signale und geclusterte, an der Kernperipherie verteilte Major-Satelliten DNA-Signale zu identifizieren (Abb.31, Tab.1). Zur Bestimmung der mittleren Präleptotän- und Bukett-Frequenzen wurde die Anzahl dieser Stadien in einer Testis-Suspension ausgezählt und zur Gesamtzahl an Spermatozyten I des jeweiligen Genotyps in Beziehung gesetzt (Abschnitt 3.6.1 und 3.6.2).

Eine andere Möglichkeit zur Klassifizierung von Prophase I Spermatozyten ist die IF von SCP3, einem meiosespezifischen Protein, das die Hauptkomponente der AEs des Synaptonemalen Komplexes darstellt (Lammers et al., 1994; Schalk et al., 1998). Die AEs beginnen sich im Leptotän-Stadium an den Chromosomen auszubilden und die Enden der Chromosomen, die Telomere, heften sich an die innere Kernhülle an (Moens, 1969; Esponda und Gimenez-Martin, 1972; Holm, 1977). Nachdem sich an den Chromosomen die AE entwickelt haben, setzt im Zygotän-Stadium die Homologenpaarung ein.

#### **4.2 SCP3-defiziente Telomere heften sich mit einer flachen, diskusförmigen Platte an die innere Kernmembran**

Das SCP3-Protein ist die Hauptkomponente der axialen/lateralen Elemente (AEs/LEs) (Lammers et al., 1994; Yuan et al., 2000), die mit einer konischen, elektronenreichen Verdickung an der inneren Kernhülle angeheftet sind (Moens, 1969; Esponda und Gimenez-Martin, 1972; Holm, 1977). Mit der Untersuchung der *Sycp3*<sup>-/-</sup> Maus (Yuan et al., 2000) stand ein Mausmodell zur Verfügung, um zu Überprüfen, ob AE/LE für die meiotische

Telomeranheftung eine Rolle spielen. Sowohl Telomer-Centromer-FISH Experimente, als auch IF mit Telomer-spezifischen Proteinen (TRF1, TRF2 oder RAP2) (Broccoli et al., 1997a; Broccoli et al., 1997b; Li et al., 2000a) in Kombination mit der Cohesinkomponente STAG3 (Pezzi et al., 2000; Prieto et al., 2001) auf strukturell erhaltene *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatocyten ergaben nach dreidimensionaler Analyse, dass, wie zuvor schon für die Wildtyp-Spermatogenese beschrieben (zur Übersicht siehe Scherthan et al., 1996), die Telomere in SCP3-defizienten Spermatogonien dispers im Kerninneren verteilt vorlagen und ab dem Leptotän-Stadium an der Kernhülle lokalisiert waren (Abschnitt 3.1.1, Abb.5 und Abschnitt 3.1.8, Abb.9).

Um die Struktur der Telomeranheftungsstellen AE-loser Chromosomen detaillierter analysieren zu können, wurde in Zusammenarbeit mit M. Alsheimer und R. Benavente transmissions-elektronenmikroskopische (TEM) Untersuchungen an *Sycp3*<sup>-/-</sup> und *Sycp3*<sup>+/+</sup> Spermatocyten in Testisgewebeschnitten durchgeführt (Abschnitt 3.1.3). Die Enden der LEs von *Sycp3*<sup>+/+</sup> Pachytän-Chromosomen zeigen in ihrer Ultrastruktur konische, elektronendichte Verdickungen, die mit den breiten Enden an der inneren Kernmembran haften (Woollam et al., 1966; Esponda und Gimenez-Martin, 1972; Holm, 1977; Liebe et al., 2004). Meiotische Chromosomenenden, denen das SCP3-Protein und AEs fehlen, bilden die beschriebene konische Verdickung an den AE-Enden nicht aus, sondern heften sich mit einer flachen, scheibenförmigen Platte an die innere Kernmembran an (Abschnitt 3.1.3). Somit scheint das SCP3-Protein für die strukturelle Ausbildung der konischen Verdickungen der AE-Enden, aber nicht für die Anheftung der Telomere an die innere Kernhülle, notwendig zu sein (Liebe et al., 2004).

Das Fehlen der konischen, elektronendichten Verdickungen an den meiotischen *Sycp3*<sup>-/-</sup> Telomeren erlaubte, die Telomeranheftungsstellen auf das Vorhandensein von DNA und speziell von T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>-Repeats zu untersuchen. EM in situ DNA Markierungen und Telomerrepeat-EM-ISH strukturell erhaltenen *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatocyten zeigten, dass die

Telomeranheftungsplatte T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub> Telomerrepeats enthält (Liebe et al., 2004). Dies legt nahe, dass Telomerrepeats an dem Prozess der Telomeranheftung an die innere Kernmembran involviert sein könnten. Das Vorhandensein von TRF1, TRF2 und RAP1 an *SCP3*<sup>-/-</sup> Telomeren (Abschnitt 3.1.5) deutet auf einen Wildtyp Telomer-Proteinkomplex an AE-defizienten meiotischen Chromosomen hin. Dies steht im Einklang mit der Vermutung, dass in Säugern die Telomer-assoziierten TRF Proteine für den Prozess der Telomeranheftung benötigt werden (Scherthan et al., 2000b).

Die Bedeutung von Telomerrepeats für die Meiose wurden durch genetische Studien in der Hefe *Kluyveromyces lactis* und in *Schizosaccharomyces pombe* bestätigt (Naito et al., 1998; Maddar et al., 2001). Tel1<sup>+</sup> Mutanten der Spaltheefe, ein ATM homologes Gen, das bei der Längenregulation der Telomere eine Rolle spielt (Lustig und Petes, 1986), verlieren ihre Telomerrepeats, zeigen stark beeinträchtigt mitotisches Wachstum, können aber keine Meiose durchführen (Naito et al., 1998). In Telomerase RNA Mutanten der Knosphefe *Kluyveromyces lactis* wurde gezeigt, dass die Struktur der terminalsten Telomerrepeats kritisch für die Meiose ist (Maddar et al., 2001). Es ist auch denkbar, dass telomergebundene Proteine oder analog zu *Schizosaccharomyces pombe* ein TRF-assoziiertes Protein wie RAP1 die Anheftung der meiotischen Telomere an die innere Kernmembran vermittelt (Kano und Ishikawa, 2001). Dies würde in Einklang mit der punktförmigen Lokalisation von MTBP (Membrane Telomere Binding Protein, ein TRF2 ähnliches Protein) an der Kernhülle von Frosch Oocyten stehen (Podgornaya et al., 2000). Die Anwesenheit von Telomerrepeats in den Telomer/Kernhüllen-Anheftungsplatten passt auch zu weiteren Beobachtungen in Hefe, die zeigen, dass Telomerrepeats und ihre assoziierten Proteine unabdingbar für die Anheftung der meiotischen Chromosomenenden an die innere Kernhülle sind (Rockmill und Roeder, 1998; Trelles-Sticken et al., 2000; Chikashige und Hiraoka, 2001; Kano und Ishikawa, 2001; Maddar et al., 2001).



### **4.3 Telomer-unabhängige Homologenpaarung von Mini-Ringchromosomen (MC)**

Vor Kurzem wurden transchromosomale Mäuse gezüchtet, die einen chromosomalen Vektor in Form eines menschlichen Mini-Ringchromosoms (MC) enthalten (MC<sup>+</sup> Mäuse) (Voet et al., 2001), der von männliche und weibliche MC<sup>+</sup> Mäusen effizient an ihren Nachwuchs vererbt wurde (Voet et al., 2003b). Das MC besteht hauptsächlich aus alphoiden, centromerischen Sequenzen des menschlichen Chromosoms 20 und einem Fragment aus dem menschlichen Chromosom 1p22. Das MC besitzt keine telomerischen Sequenzen (Voet et al., 2001) und hat eine geschätzte Größe von 10-15Mb. Der einzigartige MC<sup>+</sup> Karyotyp erlaubte zum ersten Mal zu untersuchen, ob Telomere für das meiotische Telomerclustern (Bukett-Stadium) erforderlich sind und welchen Beitrag sie für den homologen Paarungsprozess in Mausspermatocyten liefern. Die Untersuchungen zeigten, dass die telomerlosen MCs sowohl im mono- (97%) als auch im disomischen (94%) MC<sup>+</sup> Karyotyp meist entfernt von der Bukettbasis lokalisierten. Das seltene Auffinden eines ringförmigen MCs an der Bukettbasis könnte von einer MC-Heterochromatin-Assoziation herrühren. Somit belegen diese Untersuchungen, dass Telomere für die Teilnahme am meiotischen Bukett-Stadium benötigt werden. Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen in Maispflanzen mit einem Ringchromosom, das überwiegend an der Bukettbasis gefunden wurde (Carlton und Cande, 2002). Eine Erklärung für diesen Gegensatz könnte darin liegen, dass in dem Ringchromosom noch interstitielle Telomersequenzen vorhanden waren, die die Anheftung des Ringchromosoms an die Kernhülle vermitteln konnten.

Die Beobachtungen der MC<sup>+</sup> Meiose stehen darüber hinaus im Einklang mit Untersuchungen zur Meiose von *Schizosaccharomyces pombe* in der gezeigt wurde, dass funktionelle Telomere für die Ausbildung des Bukettstadiums generell und für die Teilnahme eines linearen MC an der Bukettbasis gebraucht werden (Shimanuki et al., 1997; Cooper et

al., 1998; Chikashige und Hiraoka, 2001; Kanoh und Ishikawa, 2001). Untersuchungen zur Meiose eines telomerhaltigen MCs könnten weitere Erkenntnisse über die MC-Dynamik während der frühen meiotischen Prophase liefern. Da die MCs offensichtlich nicht an Telomeraggregationen beteiligt waren, würde man erwarten, dass homologe MCs nicht paaren, da das Bukett-Stadium mit der Initiierung der Homologenpaarung zusammenfällt (zur Übersicht siehe (Cowan et al., 2001; Scherthan, 2001; Yamamoto und Hiraoka, 2001). Erstaunlicherweise zeigte sich aber in Pachytän-Spermatocyten in 74% der untersuchten Kerne gepaarte MCs. Dies bedeutet, dass es (zumindest für kleine Mini-Ringchromosomen) einen telomer-unabhängigen Paarungsmechanismus geben sollte. Um dies zu klären wurde die MC Lokalisierung in MC<sup>+</sup> Spermatocyten mit FISH und IF untersucht. Es wurde beobachtet, dass die MCs sowohl in mono- als auch in disomischen MC<sup>+</sup> Pachytän-Spermatocyten überwiegend an der Peripherie des XY-Bodys lokalisieren.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte darin liegen, dass die MCs durch passive Bewegungen, die durch generelle Kern- und Chromosomenbewegungen, die während dem Leptotän- und Zygotän-Stadium in der Säugetier Meiose auftreten (Parvinen und Soderstrom, 1976; Scherthan et al., 1996), zur Umverteilung der MCs und zu ihrer Assoziation an der Peripherie des XY-Body geführt haben. Die Alternative, dass somatische MC-Assoziationen zur meiotischen Paarung beitragen, ist sehr unwahrscheinlich, da in 86% der analysierten disomischen, Spermatogonien ungepaarte bzw. nicht-assoziierte MCs vorlagen. Das Vorhandensein von räumlich getrennten Chromosomenregionen beim Eintritt in die meiotische Prophase wurde auch schon für die Meiose anderer Säugetiere berichtet (Scherthan et al., 1996; Pfeifer et al., 2001; Scherthan und Schonborn, 2001; Liebe et al., 2004).

#### **4.4 MCs lösen den Pachytän Checkpoint nicht aus**

Untersuchungen in Knockout-Mäusen und Hefen zeigten, dass die Progression durch die meiotische Prophase unter strenger Kontrolle steht (zur Übersicht siehe (Roeder und Bailis, 2000; Cohen und Pollard, 2001)). Der sogenannte Pachytän-Checkpoint überwacht wahrscheinlich die zeitliche Komplettierung der DSB-Reparatur und löst Apoptose in Mauspermatocyten aus, falls zum Beispiel defekte Rekombination vorliegt (Odorisio et al., 1998; Cohen und Pollard, 2001). Überraschenderweise deuteten aber die gleichen Mengen an apoptotischen Zellen in den Testes Tubuli der Stadien I-XI und vergleichbare Testes-Gewichte von  $MC^+$  und Kontrollmäusen darauf hin, dass die MCs diesen Überwachungsmechanismus umgehen. Dies könnte durch den Aufbau eines meiotischen Proteingerüsts an dem MC vermittelt werden, dass das meiosespezifische Cohesin STAG3 (Prieto et al., 2001), das AE/LE Protein SCP3 (Lammers et al., 1994; Schalk et al., 1998; Yuan et al., 1998) und die Hauptkomponente der TF Proteine SCP1 (Meuwissen et al., 1992; Schmekel et al., 1996) beinhaltet. Die Anwesenheit von SCP1-Protein an univalenten MCs legt die Vermutung nahe, dass sie sich einer Art Selbst-Synapse unterziehen. Selbst-Synapse wurde auch beim univalenten X Chromosom in weiblichen X0 Mäusen (Speed, 1986) und an ungepaarten XY-Achsen (Eaker et al., 2001) festgestellt und findet sich auch bei der haploiden Meiose (Levan, 1942; Loidl et al., 1991) der Hefe. Im disomischen Fall deuten die kurzen SCP1-Achsen zwischen 2 MCs auf eine authentische Synapse hin. Darüber hinaus könnte die Assoziation eines bzw. beider MCs mit dem XY-Body ungepaarte AEs vor dem zellulären Überwachungsmechanismus verbergen, da in diesem Bereich des Spermatocytenkerns die Anwesenheit von ungepaarten Chromosomenachsen toleriert wird (Jablonka und Lamb, 1988). Es scheint, dass die Assoziationen von mono- und disomischen MCs mit dem XY-Body eine entscheidende Eigenschaft für ihre Transmission durch die Keimbahn ist und erklärt so die Fertilität der  $MC^+$  Mäuse (Voet et al. 2003). Das Durchlaufen der Meiose im Menschen mit einem überzähligen Chromosom 21 (bis zum MI Stadium)

wurde ebenfalls durch die Assoziation mit dem XY-Body vermittelt (Johannisson et al., 1983).

#### **4.5 Kohäsion an meiotischen Telomeren**

Die IF Experimente an SCP3-defizienten Telomeren ergaben, dass die Telomerproteine TRF1, TRF2 und RAP1 (Broccoli et al., 1997a; Broccoli et al., 1997b; Li et al., 2000a) mit dem AE-Protein SCP2 (Offenberg et al., 1998) kolokalisierten (Liebe et al., 2004). Die Auszählung von Telomer- und CREST-IF-Signalen in gespreiteten SCP3 Knockout-Spermatocyten ergab eine haploide Telomer-Anzahl. Im Gegensatz dazu zeigte die Auszählung der Centromer-Signale, dass die Centromere nicht auf die haploide Anzahl reduziert waren. Da die Telomer-Signale sowohl mit SCP2, als auch mit dem meiosespezifischen Cohesin STAG3 (Pezzi et al., 2000) kolokalisierten (Liebe et al., 2004), scheint es wahrscheinlich, dass die beobachteten Telomer-Telomer-Interaktionen durch eine Art Kohäsion vermittelt wurden. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass SCP2 mit den Cohesinen SMC1 und SMC3 interagiert (Eijpe et al., 2000a). Abgesehen von dieser Cohesin-SCP2-Interaktion könnte die beobachtete Telomerpaarung auch durch T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>-Repeat-bindende Proteine wie TRF1 und TIN2 vermittelt werden, da *in vitro* gezeigt wurde, dass TRF1 und TIN2 bzw. TRF2 und TIN2 die Paarung von Telomersequenzen vermitteln (Griffith et al., 1998; Kim et al., 2003; Kim et al., 2004) und sich faserartige TRF1-Proteinfäden zwischen eng benachbarten meiotischen Säugertelomeren ausbilden (Scherthan et al., 2000b).

Allerdings scheint es, dass die Qualität der Telomer-Interaktionen im Vergleich zur Synapse unterschiedlich ist, da das Transversfilamentprotein SCP1 (Meuwissen et al., 1992) nicht mit den gepaarten Telomeren bzw. mit den Telomer-assoziierten Proteinen in den SCP3-Knockout-Spermatocyten kolokalisiert. Dies spiegelt die Situation in *Caenorhabditis elegans*

wieder, dessen Telomere ebenfalls eine von der Synapse unabhängige Paarungskapazität zeigen (MacQueen et al., 2002). Darüber hinaus könnte die Telomerkohäsion auch noch für weitere Funktionen dienen. Im Metaphase I -Stadium ist das Telomer, zumindest bei Insekten, die letzte Region für den Abbau der Schwesterchromatidkohäsion (Suja et al., 1999; LaFountain et al., 2002).

#### **4.6 Gestörte Telomerdynamik bei Abwesenheit von AEs**

Es stellte sich die Frage, ob die Telomerpaarung in *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatozyten durch die meiotische Telomeraggregation vermittelt wurde, da das Bukett-Stadium vermutlich homologe Interaktionen fördert (zur Übersicht siehe Loidl, 1990; Scherthan, 2001). Telomer-Centromer-FISH Experimente auf strukturell erhaltene *Sycp3*<sup>+/+</sup> und *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatozyten zeigten, dass die Bukett-Frequenzen in der *Sycp3*<sup>-/-</sup> Maus fast 6-mal höher als in der *Sycp3*<sup>+/+</sup> Maus war (Liebe et al., 2004). Dieses Ergebnis legt nahe, dass das Leptotän-Zygotän-Übergangsstadium bei Abwesenheit von SCP3 bzw. von AEs verlängert ist und dass die AE-Bildung für die Auflösung der Telomeraggregation in irgendeiner Form wichtig ist. Eine fehlerhafte Rekombination könnte zu der beobachteten Erhöhung der Bukett-Frequenz geführt haben, denn die Verteilung der Rekombinationsproteine Rad51 und RPA ist in *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatozyten gestört (Yuan et al., 2000), in *Sycp3*<sup>-/-</sup> Oocyten sind die SCs verlängert und die Crossover-Verteilung verändert (Yuan et al., 2002). In Mutanten verschiedener Tier- und Pflanzenarten, wie Maus (*Mus musculus*), Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*), Roggen (*Secale cereale L.*) und Mais (*Zea mays L.*) führen Fehler in der Rekombination (beispielsweise fehlerhafte Prozessierung der DSBs) zu einer Verlängerung des Bukett-Stadiums (bzw. zu einer Anreicherung der Bukett-Frequenz) (Pandita et al., 1999; Trelles-Sticken et al., 1999; Mikhailova et al., 2001; Golubovskaya et al., 2002; Bass, 2003).

## **4.7 SCP3 wird für die meiotische Chromosomenkondensation**

### **benötigt**

Eine weitere Möglichkeit für die oben beschriebene (Abschnitt 4.4) Anreicherung von Bukett-Spermatocyten in der SCP3-defizienten Spermatogenese könnte eine fehlerhafte Chromosomenkondensation sein, denn es wurde vermutet, dass die Auflösung der meiotischen Telomeraggregation durch die meiotische Chromosomenkondensation passiv unterstützt werden könnte (Scherthan et al., 1996). Diese Annahme steht in Einklang mit Beobachtungen in Säugetier-Oocyten, deren SCs im Vergleich zu den SCs in Spermatocyten der gleichen Art länger sind und ein verlängertes Bukett-Stadium aufzeigen (Barlow und Hulten, 1997; Pfeifer et al., 2003; Roig et al., 2004). Die Untersuchungen an gespreiteten, SCP3-defizienten, späten Zygotän-Spermatocyten mittels Chromosomen Painting von Mauschromosom MMU13 ergab, dass die Ausdehnung der Chromosomen MMU13 in mutierten Spermatocyten ungefähr doppelt so groß war wie die Wildtyp-Chromosomen MMU13 (Liebe et al., 2004). Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass bei Abwesenheit von AEs/LEs die meiotische Chromosomenstruktur derart geändert ist, dass die Chromosomenkondensation hier schwächer oder fehlend ist. Weiterhin zeigen fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen von IF, dass weibliche AEs nur schwach und dünner mit SCP3-Antiserum angefärbt werden als männliche AEs (Barlow und Hulten, 1997; Pfeifer et al., 2003). Dies impliziert, dass das SCP3-Protein an der Vermittlung der meiotischen Chromosomenkondensation eine Rolle spielt. Die Verminderung der Chromosomenausdehnung in den *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatocyten könnte somit in Einklang mit dem beobachteten verlängerten Bukett-Stadium stehen. Allerdings zeigt der Vergleich mit der H2AX-defizienten Spermatogenese, dass die defekte Chromosomenkondensation nur einen untergeordneten Einfluss auf die Telomerdynamik haben kann. Die Autosomenkondensation ist in der H2ax-defizienten Spermatogenese nicht beeinträchtigt, aber die Bukett-

Anreicherung ist hier deutlich höher als in der SCP3-defizienten Spermatogenese (Abschnitt 3.4.1 Abb.23).

#### **4.8 AE-lose Chromosomen zeigen homologe Interaktionen**

Es stellte sich die Frage, ob SCP3 und folglich AEs eine Rolle bei der Homologenerkennung und Homologenpaarung spielen. Die FISH-Analyse von interstitiellen MMU8- und MMU12-Loci zeigten, dass zwar eine reduzierte, aber immer noch signifikante Anzahl an gepaarten FISH-Signalen in späten *Sycp3*<sup>-/-</sup> Zygotän-Spermatocyten vorlagen (Liebe et al., 2004). In gespreiteten SCP3-defizienten Spermatocyten zeigte Chromosomen Painting des Mauschromosom MMU13 in Kombination mit einer SCP1-IF in einigen späten Zygotän-Kernen ein Signal für das Chromosom-13 mit einem SCP1-Achsenfragment in der Mitte (Abschnitt 3.1.5 Abb.8 F). Die Kolokalisierung von SCP1-Achsenfragmenten mit gepaarten MMU8- und MMU12-spezifischen Signalen bzw. mit einem MMU13 Chromosomen-Signal legte den Schluss nahe, dass SCP1 in Abwesenheit von AEs homologe Sequenzen miteinander verbinden kann. Die mittels FISH nachgewiesenen homologen Interaktionen in der SCP3-defizienten Spermatogenese zeigen, dass die AEs eine Rolle in der Herstellung von homologen Interaktionen spielen könnten oder für die Verankerung von Transversalfilamenten an den AE/LE benötigt werden. Die EM-Analyse von *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatocyten ergab, dass Chromatin durch die Ausbildung transversalfilamentartiger Strukturen, die dem Centralelement des SC ähnlich waren, miteinander verbunden hatte (Liebe et al., 2004). Darüber hinaus könnte nicht-homologe Synapse erst ab dem späten Pachytän-Stadium stattfinden (Moses et al., 1984), ein Stadium, das in der *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatogenese gar nicht erreicht wird (Yuan et al., 2000). Homologe Interaktionen in der *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatogenese, selbst bei Abwesenheit von SCP1 Achsenfragmenten, erinnert an die *zip1* Mutante der Bierhefe (Sym et al., 1993), bei der Homologenpaarung ohne Synapse

stattfindet (Nag et al., 1995; Rockmill et al., 1995b). Eine *Sycp1*-Knockoutmaus, die bis dato allerdings noch nicht gezüchtet wurde, sollte nach diesen Ergebnissen homologe Chromosomenpaarung ausbilden.

Die unterschiedlichen Häufigkeiten von gepaarten telomerischen und interstitiellen Chromosomenregionen in den *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatocyten (Abschnitt 3.1.9, Abb.10) legt nahe, dass es sich beim Telomeraggregation und bei der Homologenpaarung um zwei unterschiedliche Prozesse handeln könnte. Diese Interpretation steht im Einklang mit der Beobachtung an der *ndj1* Mutante der Hefe, die ihre Telomere nicht an die Kernhülle anheften kann, kein Telomerclustern zeigt, aber erfolgreich, wenn auch verspätet Homologenpaarung durchführt (Trelles-Sticken et al., 2000). Somit scheint das SCP3-Protein eine strukturelle Hauptkomponente meiotischer Chromosomen zu sein, das einen festen Rahmen für die Koordinierung von Telomer- und Chromosomenbewegungen mit Homologenpaarung und meiotischer DNA-Reparatur bereitstellt.

## **4.9 Fehlerhafte Homologenpaarung in der *Lmna*-defizienten**

### ***Spermatogenese***

Die Kernlamine gehören zur Gruppe der Intermediärfilamente und sind mit der Oberfläche der inneren Kernmembran assoziiert. Meiotische Telomeranheftungsstellen sind in LaminC2-haltige Domänen eingebettet (Alsheimer et al., 1999). LaminC2 ist eine meiosespezifische Spleißvariante des LaminA. Die Untersuchung von LaminA-defizienten Mäusen (*Lmna*<sup>-/-</sup> Mäuse) (Sullivan et al., 1999) zeigte, dass die Gametogenese in den männlichen, aber nicht in den weiblichen Mäusen beeinträchtigt ist (Alsheimer et al., 2004). Telomer-Centromer-FISH Analysen zeigten eine hochsignifikante, fast 6-fache Anreicherung von mittleren Präleptotän-Spermatocyten in der LaminA-defizienten Spermatogenese (siehe Tab.7, Abb.32). Diese Anreicherung deutet darauf hin, dass LaminC2 für ein schnelles



Passieren des Präleptotän-Stadiums benötigt wird. Es könnte sein, dass es sich hier um einen nicht-autonomen zellulären Effekt handelt, der durch eine mögliche Abwesenheit von Faktoren, die für die Spermatocyten-Differenzierung benötigt werden, hervorgerufen wird, oder dass LaminC2 direkt in den frühen meiotischen Stadien benötigt wird (Scherthan, 2003). Es wurde vermutet, dass LaminC2 für die Telomeranheftungen während der Prophase I benötigt werden könnte (Alsheimer et al., 1999). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen der *Lmna*<sup>-/-</sup> Spermatogenese widerlegen diese Vermutung, denn die Telomer-Centromer-FISH Untersuchung in LaminA-defizienten, strukturell erhaltenen Spermatocyten zeigte, dass die Telomere an der Kernhülle lokalisiert waren (Alsheimer et al., 2004). IF Experimente mit SCP3 auf gespreitete *Lmna*<sup>-/-</sup> Spermatocyten ergaben, dass die AE-Bildung in den LaminA-defizienten Spermatocyten nicht gestört ist. Es zeigte sich, dass die meisten *Lmna*<sup>-/-</sup> Spermatocyten im Pachytän arretierten und durch Apoptose zugrunde gingen, da die autosomale und gonosomale Synapse fehlerhaft war (Alsheimer et al., 2004). Ob die synaptischen Paarungsprobleme aus den veränderten Eigenschaften der Kernperipherie resultieren, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Telomer-Centromer-FISH Untersuchungen auf LaminC2-defizienten Spermatocyten ergaben eine Wildtyp-ähnliche Bukett-Frequenz. Somit scheinen sich univalente Gonosomen, ungepaarte AEs und die damit verbundene Apoptose der Spermatocyten *per se* nicht auf das Telomeraggregation auszuwirken.

#### **4.10 Fehlerhafte Telomeranheftungen in *Smc1β*-defizienten**

##### ***Spermatocyten***

Der Cohesinkomplex in Säuger-Meiozyten besteht aus den heterodimeren SMC Proteinen SMC1 und SMC3 und aus zwei nicht SMC-Untereinheiten REC8 und STAG3

(Prieto et al., 2001; Revenkova et al., 2001; Eijpe et al., 2003). Kürzlich wurde gezeigt, dass in Säugern zusätzlich zu SMC1, das nun SMC1 $\alpha$  genannt wird und in somatischen und meiotischen Zellkernen zu finden ist, auch ein meiosespezifisches SMC1 Protein, Smc1 $\beta$ , vorhanden ist (Revenkova et al., 2001). Die drei-dimensionale Untersuchung strukturell erhaltener, Smc1 $\beta$ -defizienter Spermatocyten, deren Telomere und Centromere mittels FISH gefärbt waren, ergab, dass in den mutierten Spermatocyten die Telomeranheftung an die innere Kernhülle beeinträchtigt war. In *Smc1 $\beta$ <sup>-/-</sup>* Spermatocyten waren zwei bis sieben Telomere nicht an der Kernhülle angeheftet, sondern im Kerninneren lokalisiert, während in den untersuchten *Smc1 $\beta$ <sup>+/+</sup>* Spermatocyten alle Telomere an der Kernperipherie lokalisierten (Revenkova et al., 2004). Dies ist die erste Säugermutante mit einer fehlerhaften Telomeranheftung in meiotischen Prophase I Spermatocyten. Ob das Smc1 $\beta$  Protein direkt für die Telomerperipheralisierung eine Rolle spielt, oder ob die um ca. 50% verkürzten AEs (Abschnitt 4.11) die Telomeranheftung indirekt beeinträchtigen, ist nicht klar. Die verkürzten AEs könnten darüber hinaus zu den Paarungsdefekten (Abschnitt 4.11) in *Smc1 $\beta$ -defizienten* Spermatocyten beitragen und ein Abtrennen der Telomere von der Kernhülle nach sich ziehen, denn an einigen *Smc1 $\beta$ -defizienten* Telomeren fehlte das RAP1 IF Signal (Revenkova et al., 2004). Alternativ oder zusätzlich könnte das Smc1 $\beta$ -Cohesin eine Funktion für den strukturellen Aufbau meiotischer Telomere besitzen, bei dem Aufbau der meiotischen Telomer/Kernhüllen Anheftungsplatten eine Rolle spielen oder bei der Ausbildung der telomerischen Chromatinloops involviert sein. Weitere Untersuchungen an *Smc1 $\beta$ <sup>-/-</sup>* Spermatocyten sind nötig, um den Grund für die beeinträchtigte Telomerperipheralisierung herauszufinden.

#### **4.11 *Smc1 $\beta$* wird für die Chromatinorganisation und den Aufbau der AEs benötigt**

Es wurde vermutet, dass Cohesine nicht nur für die Aufrechterhaltung der Schwesterchromatidkohäsion benötigt werden, sondern auch wichtig für die Ausbildung der meiotischen Chromatinloops der AEs sein könnten (Eijpe et al., 2000a). Somit könnte das Fehlen einer meiosespezifischen Cohesinkomponente die AE-Struktur beeinträchtigen. Die Untersuchung von *Smc1 $\beta$* -defizienten AEs zeigte, dass sie ungefähr um die Hälfte kürzer als die wildtyp-AEs waren (Revenkova et al., 2004). Bei den verkürzten AEs handelte es sich nicht um AE-Fragmente, denn sie besaßen je ein Centromer und waren an ihren Enden mit Telomeren ausgestattet (Revenkova et al., 2004). Um die maximale Ausdehnung der Chromatinloops zu bestimmen, wurde Chromosomen-Painting der Chromosomen MMU1 und MMU13 in Kombination mit einer SCP3-IF in gespreiteten Spermatozyten durchgeführt. Als Maß für die maximale Größe der Chromatinloops wurde die Entfernung der äußersten Signale der Chromosomen-Signale und den zugehörigen SCs bestimmt. Im Vergleich zu den wildtyp-Chromatinloops waren die Chromatinloops *Smc1 $\beta$* -defizienter Chromosomen fast doppelt so lang (Revenkova et al., 2004). Um die Interphasestruktur der *Smc1 $\beta$* <sup>-/-</sup> Chromosomen zu überprüfen, wurden Volumenmessungen der Chromosom MMU13-Territorien in strukturell erhaltenen Spermatozyten mittels dreidimensionaler Mikroskopie und anschließender Dekonvolution der digitalen Bilddaten durchgeführt. Die Chromosomterritorien MMU13 in *Smc1 $\beta$* -defizienten Spermatozyten waren fast doppelt so groß wie die Chromosomterritorien MMU13 von Wildtyp-Spermatozyten (Revenkova et al., 2004). Um zu überprüfen, ob die vergrößerten Chromosomen MMU13 in den *Smc1 $\beta$* -defizienten Spermatozyten veränderte Kernvolumina verursachen, wurden von strukturell erhaltenen, frühen Pachytän-Spermatozyten von *Smc1 $\beta$* <sup>-/-</sup> und *Smc1 $\beta$* <sup>+/+</sup> Mäusen mittels dreidimensionaler Mikroskopie und anschließender Dekonvolution der digitalen Bilddaten die Kernvolumina bestimmt. Die

Kernvolumina strukturell erhaltener früher *Smc1 $\beta$* <sup>-/-</sup> Pachytän-Spermatocyten waren erstaunlicherweise um etwa ein Drittel kleiner als die Wildtyp-Spermatocytenkerne. Da in Säugerzellkernen die Chromosomen ab dem frühen Leptotän in diskreten, voneinander getrennten Territorien vorliegen (Scherthan et al., 1998), könnte der beobachtete Gegensatz zwischen der Größe der Kernvolumina und der Größe der Chromosomenterritorien MMU13 damit erklärt werden, dass sich die Chromosomen in der Mutante durch die offensichtlich gestörte Chromosomenorganisation miteinander vermengen, wodurch verkleinerte Spermatocytenvolumina resultieren.

Es wird vermutet, dass in der Maus und in anderen Organismen Cohesinkomplexe eine Proteingerüst für den AE-Aufbau bereitstellen (Pelttari et al., 2001; Eijpe et al., 2003). In *Smc1 $\beta$* -defizienten Spermatocyten könnten die AEs wenige Anheftungsstellen für die Chromatinloops zur Verfügung stellen, so dass sich längere Chromatinloops ausbilden müssen. Dies würde im Einklang mit dem „dual-loop-model“ stehen, das eine direkte, positive Korrelation zwischen der Anzahl der Chromatinloops und der Länge der AEs vorhersagt (Kleckner et al., 2003). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die verkürzten AEs und die größere Ausdehnung der Chromatinloops in *Smc1 $\beta$* -defizienten Spermatocyten voneinander unabhängige Auswirkungen der *Smc1 $\beta$*  Mutation sind.

#### **4.12 Das Fehlen des ATM-Zielmoleküls H2AX beeinflusst die meiotische Telomerdynamik**

Histone sind Proteine, die für die Komprimierung von DNA in Form von Chromatin benötigt werden. Die Histon H2A Variante H2AX wird durch ATM als Antwort auf DSBs unterschiedlichen Ursprungs phosphoryliert (zur Übersicht siehe (Richardson et al., 2004). Bis zum Beginn dieser Arbeit war das ATM-Protein das einzige bekannte Säugerprotein, das in der Regulierung der meiotischen Telomeraggregation involviert ist (Pandita et al., 1999; Scherthan et al., 2000a). Um herauszufinden, ob das ATM-Zielmolekül H2AX in der meiotischen Telomermotilität ebenfalls eine Rolle spielt, wurden auf strukturell erhaltene, H2ax-defiziente Spermatocyten-Suspension Telomer-Centromer-FISH Experimente durchgeführt. Es zeigte sich, dass in der H2ax-defizienten Spermatogenese eine 15-fache Erhöhung an Bukett-Spermatocyten im Vergleich zur *H2ax*<sup>+/+</sup> Spermatogenese vorliegt (Abschnitt 3.4). Die mikroskopische Untersuchung von dreidimensional erhaltenen H2ax-defizienten Spermatocyten, die einer IF gegen den meiotischen Progressionsmarker SCP3 (Lammers et al., 1994) und das telomerassoziierte Protein TRF1 (Broccoli et al., 1997a) unterzogen worden waren, ergab, dass frühe Leptotän- bis frühe Pachytän-Bukettspermatocyten in der H2ax-defizienten Spermatogenese vorkommen. Dies steht im Gegensatz zur Wildtyp-Spermatogenese, bei der die Telomeraggregation nur innerhalb eines kurzen Zeitfensters, nämlich während dem Leptotän-Zygotän-Übergangsstadiums, vorkommt (Scherthan et al., 1996). Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass die Abwesenheit von H2ax zu einer verlangsamten Telomerdynamik führt. IF Experimente auf gespreitete wildtyp-Maus-spermatocyten zeigen im Leptotän und frühen Zygotän eine massive H2ax Phosphorylierung als Antwort auf Spo11-induzierte DSBs (Mahadevaiah et al., 2001). In gespreiteten Atm-defizienten Leptotän- bzw. Zygotän-Spermatocyten zeigt die  $\gamma$ -H2ax IF fast keine Signale (Fernandez-Capetillo et al., 2003a). Dies zeigt, dass die meiotische, durch DSBs

verursachte  $\gamma$ -H2ax Bildung von ATM abhängt und dass H2AX stromabwärts in der ATM Signalkette, die die meiotische Telomeraggregation kontrolliert (Scherthan et al., 2000a), liegt.

#### **4.13 Rekombinationsproteine erleichtern den Eintritt in die**

##### ***Prophase I***

Um zu untersuchen, ob Proteine, die in der homologen Reparatur (Abschnitt 1.4) eine Rolle spielen, einen Einfluss auf die meiotischen Telomer- und Chromosomenbewegungen haben, wurden in dieser Arbeit von einer Reihe von Rekombinations-defizienten Knockout-Mäusen (Tab.2) Telomer-Centromer-FISH Experimente auf strukturell erhaltenen Spermatozyten-Suspensionen durchgeführt. Mindestens 4000 Spermatozyten eines jeden Genotyps wurden dreidimensional analysiert und die Häufigkeiten der mittleren Präleptotän- und Bukett-Spermatozyten aus der Gesamtheit der untersuchten Spermatozyten I bestimmt. In Wildtyp-Suspensionen findet man nur wenige mittlere Präleptotän- und Bukett-Spermatozyten (Tab.6), da das mittlere Präleptotän- und das Bukett-Stadium kurzlebige Übergangsstadien sind (Scherthan et al., 1996; Scherthan et al., 2000a; Scherthan, 2003).

Das Einfügen von meiotischen Doppelstrangbrüchen (DSBs) in frühes Leptotän-Chromatin durch die Transesterase Spo11 leitet den Beginn der homologen Rekombination ein (Bergerat et al., 1997; Keeney et al., 1997). Die Untersuchung von *Spo11*<sup>-/-</sup> Mäusen (Baudat et al., 2000; Romanienko und Camerini-Otero, 2000) ergab eine hochsignifikante Anreicherung von mittleren Präleptotän-Spermatozyten (Tab.7, Abb.32 und Abschnitt 3.6.4). In der *mei1* Spermatogenese (Libby et al., 2002) bilden sich, wie in der Spo11-defizienten Spermatogenese, keine meiotischen DSBs (Libby et al., 2003). Die Telomer-Centromer-FISH Untersuchungen von *mei1*-Spermatozyten ergaben eine hochsignifikante Anreicherung der mittleren Präleptotän-Frequenz (Tab.7, Abb.32 und Abschnitt 3.6.4). Dmc1 und Hop2 spielen

in der frühen homologen Rekombination bei der Einzelstranginvasion eine Rolle (Habu et al., 1996; Pittman et al., 1998; Petukhova et al., 2003). Das Mlh1-Protein ist erst später in der homologen Rekombination bei der Ausbildung von Crossover Ereignissen involviert (Baker et al., 1996). Telomer-Centromer-FISH Untersuchungen zeigten, dass in der Prophase I der Spermatogenese von *Dmc1*<sup>-/-</sup>, *Hop2*<sup>-/-</sup> und *Mlh1*<sup>-/-</sup> Mäusen (Edelmann et al., 1996; Pittman et al., 1998; Petukhova et al., 2003) eine hochsignifikante Anreicherung von mittleren Präleptotän-Spermatocyten zu finden war (Tab.7, Abb.32 und Abschnitt 3.6.7).

Da in der Spermatogenese aller untersuchten Rekombinations-defizienten Mäuse eine hochsignifikante Anreicherung von mittleren Präleptotän-Spermatocyten vorlag, scheinen Rekombinationsproteine den Eintritt in die Prophase I zu erleichtern. Vermutlich werden diese Proteine für die Bildung von rekombinationskompetentem Chromatin benötigt. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterlegt, dass sich Spo11 in prämeiotisches Chromatin während der prämeiotischen S-Phase eingelagert hat (Cha et al., 2000; Borde et al., 2004). Auch in der Bäckerhefe wurde die Bildung von Spo11- und Mre11-haltigem Prä-Rekombinationskomplexe während der prämeiotischen S-Phase beobachtet (Murakami et al., 2003; Arora et al., 2004; Borde et al., 2004). Untersuchungen zur Spermatogenese des Wassermolchs *Cynops pyrrhogaster* zeigen, dass die Expression von *DMC1* mRNA in Präleptotän-Spermatocyten einsetzt (Yazawa et al., 2000).

Da in der Doppelknockout-Maus *Atm*<sup>-/-</sup>*Spo11*<sup>-/-</sup> aber nicht in der *Spo11*<sup>-/-</sup> Spermatogenese eine Wildtyp-ähnliche mittlere Präleptotän-Frequenz beobachtet wurde (Tab.7, Abb.32 und Abschnitt 3.6.6), scheint der Zustand von prä-DSB-Chromatin und die Dauer des mittleren Präleptotän-Stadiums von ATM kontrolliert zu werden.

Eine erhöhte mittlere-Präleptotän-Frequenz, allerdings kurz unterhalb der Signifikanzgrenze, wurde auch in der Prophase I der Spermatogenese von Mausmutanten gefunden, bei denen die NHEJ Reparatur defekt ist (*scid*- und *Ku80*<sup>-/-</sup>-Mäuse). Dieses

Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass diese Proteine eine untergeordnete Rolle für den zeitgerechten Eintritt in die Prophase I spielen (Abschnitt 4.15).

#### **4.14 Die Initiierung der DSB Reparatur und die Telomer-Aggregation sind unabhängige Ereignisse, die im Bukett-Stadium zusammenlaufen**

Es wird angenommen, dass das Bukett-Stadium die synaptische Homologenpaarung durch die Aggregation der Chromosomenenden am Leptotän-Zygotän-Übergang (Telomer-Aggregation) erleichtern könnte (zur Übersicht siehe Loidl, 1990; Scherthan, 2001; Bass, 2003). Eine Verbindung von DSB-abhängiger Homologensuche und meiotischer Telomer-Aggregation würde dieses Szenario unterstützen. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit Telomer-Centromer-FISH Analysen zur Untersuchung der Bukett-Aggregation in der Prophase I von *Spo11*<sup>-/-</sup> und *mei1* Mäusen durchgeführt (Tabelle 2). In der Prophase I der Spo11-defizienten Spermatogenese fehlt die DSB-induzierte Homologenpaarung und SC-Bildung (Baudat et al., 2000; Romanienko und Camerini-Otero, 2000; Mahadevaiah et al., 2001). In der Prophase I der *mei1* Spermatogenese werden ebenfalls keine DSBs gebildet und die SC-Bildung ist gestört (Libby et al., 2002; Libby et al., 2003). Die Analyse der Telomer-Centromer-FISH Experimente ergab in beiden Mausgenotypen eine hochsignifikante, fast 5-fache Anreicherung von Bukett-Spermatocyten (Tab.7, Abb.32 und Abschnitt 3.6.5).

Dies weist darauf hin, dass es sich auch in der Säuger-Spermatogenese bei der Telomer-Aggregation und dem Beginn der meiotischen DSB Reparatur um zwei voneinander unabhängige Ereignisse handelt, wie es auch schon in der Meiose von *spo11* Mutanten der Bierhefe (Trelles-Sticken et al., 1999) und *Sordaria* (Storlazzi et al., 2003) sowie in der achiasmatischen Meiose des weiblichen *Seidenspanners* (Rasmussen, 1982) und in der asynaptischen Meiose von *S. pombe* (Chikashige et al., 1994) beobachtet wurde.



Um herauszufinden, ob DSBs selbst und die Reparatur von DSBs die Dauer des Bukett-Stadiums verlängern, wurde von  $\gamma$ -bestrahlten, Spo11-defizienten Spermatocyten und von Wildtyp-Spermatocyten des gleichen Mausstamms Telomer-Centromer-FISH Experimente durchgeführt und die Bukett-Frequenz bestimmt (Abschnitt 3.6.5). In der Prophase I von  $\gamma$ -bestrahlten, Spo11-defizienten Mäusen war die Bukett-Frequenz fast 7-fach erhöht (Tab.7, Abb.32 und Abschnitt 3.6.5). Im Vergleich mit den Bukett-Frequenzen von unbestrahlten Spo11-defizienten Spermatocyten (4,6-fache Bukett-Anreicherung) und  $\gamma$ -bestrahlten Wildtyp-Spermatocyten (1,5-fache Bukett-Anreicherung) war die Bukett-Anreicherung in der  $\gamma$ -bestrahlten, Spo11-defizienten Prophase I signifikant erhöht (Tab.7, Abb.32 und Abschnitt 3.6.5). Dies zeigt, dass sowohl DSBs als auch die Reparatur von DSBs die Dauer des Bukett-Stadiums verlängern.

Das verlängerte Bukett-Stadium, das in den  $\gamma$ -bestrahlten *Spo11*<sup>-/-</sup> Spermatocyten gefunden wurde, legt die Vermutung nahe, dass die DSBs die Eigenschaft besitzen, ein Signal zu bilden, das die Telomer-Aggregation in Abwesenheit von Spo11 verlängert. Das Signal, dass das Beenden der Telomer-Aggregation signalisiert, könnte von meiotischen DSBs und ATM abhängig zu sein, da die Bukett-Frequenzen in der Prophase I von *Atm*<sup>-/-</sup> Spermatocyten sehr stark erhöht waren, während die Bukett-Anreicherung in der Prophase I der *Atm*<sup>-/-</sup>*Spo11*<sup>-/-</sup> Spermatogenese im Vergleich dazu vermindert war, aber immer noch signifikant höher als in der Wildtyp-Spermatogenese (Tab.7, Abb.32 und Abschnitt 3.6.6). Auch das Spo11 Protein scheint selbst einen Beitrag zur Dauer des Bukett-Stadiums zu liefern, da die Anzahl an Bukett-Spermatocyten in *Spo11*<sup>-/-</sup> Testes signifikant erhöht war, allerdings nicht so stark erhöht wie in ATM- oder H2ax-defizienten Testes (Tab.7, Abb.32 und Abschnitt 3.4). Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung (Scherthan et al., 2000a), dass das Durchlaufen des kurzzeitigen Bukett-Stadiums von ATM-Signalen (bzw. vom ATM-Signalweg), die das Fortschreiten der DSB-Reparatur signalisieren, abhängt. Zudem wurde kürzlich berichtet

(Roig et al., 2004), dass in der humanen weiblichen Meiose die DSB Reparatur verzögert ist und mit einem verlängerten Bukett-Stadium korreliert.

#### **4.15 Die meiotische Telomer-Aggregation ist unabhängig von Gadd45a und vom NHEJ Reparaturweg**

Gadd45a ist ein Zielprotein der ATM/p53-Signalkaskade und wird für die DNA Schadensantwort in der G1-Phase und für die genomische Stabilität in somatischen Zellen benötigt (Hollander et al., 1999). Gadd45a<sup>-/-</sup> Mäuse sind fertil und zeigen keine Störungen in der Prophase I (Hollander et al., 1999). Die Telomer-Centromer-FISH Untersuchungen von Gadd45a<sup>-/-</sup> Spermatozyten-Suspensionen ergaben Wildtyp-ähnliche mittlere Präleptotän- und Bukett-Frequenzen (Tab.7, Abb.32 und Abschnitt 3.6.9). Dies impliziert, dass dieser Zweig der ATM-Signalkaskade (siehe zur Übersicht Pandita, 2002) nicht in der Regulation des meiotischen Telomeraggregation involviert ist. In der Prophase I der Spermatogenese von *scid* und *Ku80*<sup>-/-</sup> Mäusen, bei denen der NHEJ Reparaturweg und die Telomerintegrität beeinträchtigt sind (siehe zur Übersicht Xin und Broccoli, 2004) wurden ebenfalls Wildtyp-ähnliche Bukett-Frequenzen gefunden (Tab.7, Abb.32 und Abschnitt 3.6.9). Dies deutet darauf hin, dass der NHEJ Reparaturweg nicht in der Regulation der meiotischen Telomer-Aggregation involviert ist und steht im Einklang mit der Herunterregulierung des NHEJ Reparaturmechanismus während der frühen Prophase I (Goedecke et al., 1999). Allerdings scheint der NHEJ Reparaturmechanismus in prämeiotischen Zellen, möglicherweise während der prämeiotischen S-Phase, benötigt zu werden, da eine erhöhte mittlere Präleptotän-Frequenz (nahe der Signifikanzgrenze,; p=0,017 für *Ku80*<sup>-/-</sup> und p=0,012 für *scid*,  $\chi^2$ -Test) in der Spermatogenese von *Ku80*<sup>-/-</sup> und *scid* Mäusen beobachtet wurde. Es könnte sein, dass die fehlende NHEJ Reparaturaktivität (siehe zur Übersicht Downs und Jackson, 2004) zu einem

„Übertrag“ von replikations-induzierten DNA Schäden in das das mittlere Präleptotän-Stadium führt und den Durchgang durch dieses Stadium verzögert.

#### **4.16 Rekombination und die Auflösung des Bukett-Stadiums sind über Hop2 miteinander verbunden**

DSBs, die durch die Transesterase Spo11 in die Leptotän DNA eingefügt werden, leiten den Beginn der meiotischen homologen Rekombination ein (zur Übersicht siehe Keeney, 2001). Zu den frühen meiotischen Rekombinationsereignissen gehört die Rad51/Dmc1 vermittelte Homologensuche gefolgt von der Einzelstrangeinführung des intakten homologen Chromosomenstrangs (Hunter und Kleckner, 2001; Lichten, 2001). In *Hop2*<sup>-/-</sup> Spermatozyten werden die AEs vollständig aufgebaut. Persistierende Rad51/Dmc1 und  $\gamma$ -H2ax Foci deuten darauf hin, dass DSBs gebildet werden, aber nicht richtig repariert werden können (Petukhova et al., 2003). Die Synapse von homologen Chromosomen ist allerdings stark beeinträchtigt (stärker als in der Prophase I von *Spo11*<sup>-/-</sup> oder *Dmc1*<sup>-/-</sup> Mäusen), und es wurde vorgeschlagen, dass Hop2 durch die Begünstigung der Einzelstrangeinführung entweder die Rad51- und/oder Dmc1-abhängige D-Schleifen Bildung initiiert oder ein notwendiger Faktor für Rad51 und/oder Dmc1 ist (Petukhova et al., 2003).

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die frühen Rekombinationsereignisse auf die Telomer-Aggregation haben, wurde die Prophase I von *Spo11*<sup>-/-</sup>, *mei1*, *Dmc1*<sup>-/-</sup> und *Hop2*<sup>-/-</sup> Mäusen mittels Telomer-Centromer-FISH Experimenten untersucht. Die *Spo11*<sup>-/-</sup>, *mei1* und die *Dmc1*<sup>-/-</sup> Spermatogenese zeigte eine hochsignifikante Anreicherung von Bukett-Spermatozyten (Tab.7, Abb.32, Abschnitt 3.6.5 und 3.6.7). In der *Hop2*<sup>-/-</sup> Spermatogenese wurde dagegen eine Wildtyp-ähnliche Bukett-Frequenz festgestellt (Tab.7, Abb.32 und Abschnitt 3.6.8). Eine Überprüfung der Zellularität der *Spo11*<sup>-/-</sup>, *mei1*, *Dmc1*<sup>-/-</sup> und *Hop2*<sup>-/-</sup> Testes-Suspensionen mittels H1t bzw. XMR IF zeigte, dass in keiner der vier Testes-

Suspensionen mittlere Pachytän- oder spätere Prophase I Spermatocyten vorlagen (Abschnitt 3.6.8) und somit eine vergleichbare Zellularität in den Testes-Suspensionen vorhanden war. Der Vergleich der Telomeraggregation in der Prophase I der *Spo11*<sup>-/-</sup>, *meil* und *Dmcl*<sup>-/-</sup> Mäuse mit der *Hop2*<sup>-/-</sup> Bukett-Aggregation zeigte für alle drei Genotypen eine hochsignifikante Anreicherung des Bukett-Stadiums (Tabelle 8). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es sich bei Hop2 um eine Proteinkomponente einer möglichen Signalkaskade handelt, die das Fortschreiten der DSB-Reparatur mit der Dauer der meiotischen Telomeraggregation verbindet.

#### **4.17 *Hr6B* Ubiquitin-konjugierte Enzymaktivität wird für eine normale Chromosomendynamik benötigt**

*Hr6B* ist ein ubiquitin-konjugiertes Enzym, homolog zum RAD6/UBC2 Komplex in der Hefe. In der Hefe spielt es in der post-replikations-DNA Reparatur und bei der Sporulation eine Rolle (Montelone et al., 1981), in der Maus wird es für die männliche Fertilität benötigt (Roest et al., 1996). Es wurde beobachtet, dass männliche *Hr6B*<sup>-/-</sup> Mäuse aufgrund von Spermidefekten infertil sind, dass die SC-Struktur dieser Mäuse nahe an den Telomeren geändert ist und dass sie eine höhere Rekombinationsrate haben, was durch die Bestimmung der Menge von Crossover-assoziierten MLH1 Foci in Pachytän-Spermatocyten ermittelt wurde (Baarends et al., 2003). Die Telomer-Centromer-FISH Analyse von *Hr6B*<sup>-/-</sup> Spermatocytensuspensionen zeigte eine signifikante Erhöhung der mittleren Präleptotän- und der Bukett-Frequenzen (Tab.7, Abb.32 und Abschnitt 3.6.10). Die Erhöhung der mittleren Präleptotän-Frequenz könnte daher kommen, dass es eine zelluläre Antwort auf nicht-prozessierte DNA-Fehler nach der prämeiotischen S-Phase gibt, und/oder dass die Chromosomenstruktur bei Abwesenheit von *Hr6B* geändert ist. Die erhöhte Bukett-Frequenz

könnte aus der erhöhten Crossover- bzw. Rekombinationsrate (Baarends et al., 2003) resultieren.

#### **4.18 Verzögerter Eintritt in die Prophase I von *Terf1*<sup>+/-</sup>**

##### ***Spermatocyten***

Das TRF1 Protein (telomere repeat-binding factor 1) wird für die Telomerregulation benötigt (Chong et al., 1995). Darüber hinaus ist es für die Embryonalentwicklung essentiell (Karlseder et al., 2003). Die Telomer-Centromer-FISH Analyse strukturell erhaltener *Terf1*<sup>+/-</sup> Testes-Suspensionen ergaben signifikant erhöhte mittlere Präleptotän- und Bukett-Frequenzen (Tab.7, Abb.32 und Abschnitt 3.6.10). Die dreidimensionale Untersuchung der *Terf1*<sup>+/-</sup> Spermatocyten zeigte, dass die Telomeranheftung an die innere Kernhülle nicht gestört war. Die Ursache für die erhöhte Bukett-Frequenz könnte an einer veränderten Telomer-Funktionalität liegen. Das ausgedehnte mittlere Präleptotän-Stadium weist auf einen Bedarf an TRF1 für den Eintritt in die Prophase I hin und könnte auch ein Hinweis auf einen Checkpoint zu Beginn der Prophase I sein, der die Telomer-Replikation oder die Telomer-Integrität überprüft. Diese Vermutung wird durch Beobachtungen in Telomerase-Knockout Testes gestützt, da in den späten Generationen (G4-G7) dieser Knockout-Mäuse Apoptose in prämeiotischer Kernen mit kurzen Telomeren auftritt (Hemann et al., 2001).

#### **4.19 Normaler Eintritt in die Prophase I und normale**

##### ***Telomerdynamik bei Mäusen mit defekter Spermiogenese***

Um zu prüfen, ob eine dysfunktionale Spermatogenese *per se* zu veränderten Prophasefrequenzen führen kann, wurden die mittleren Präleptotän- und Bukett-Frequenzen von drei Knockout-Mäusen (*mGcl-1*<sup>-/-</sup>, *Tnp1*<sup>-/-</sup> und *Asm*<sup>-/-</sup>) mit intakter Prophase I, aber mit defekter Spermiogenese (Tabelle 2), mittels Telomer-Centromer-FISH Experimenten

untersucht. Die dreidimensionale Telomer-Centromer-FISH Analyse der Prophase I der drei Knockout-Mäuse (*mGcl-1*<sup>-/-</sup>, *Tnp1*<sup>-/-</sup> und *Asm*<sup>-/-</sup>) ergab in allen drei Genotypen Wildtyp-ähnliche mittlere Präleptotän- und Bukett-Frequenzen (Tab.7, Abb.32 und Abschnitt 3.6.11) und keine Störung in der Telomeranheftung an die innere Kernhülle. Somit scheinen sich (zumindest in diesen Mausmutanten) Fehler in der Spermiogenese nicht auf den Eintritt in die Prophase I und auf die Progression durch die Prophase I auszuwirken.

## 5 Zusammenfassung

Während der verlängerten Prophase I der Meiose findet in Meiozyten eine bemerkenswerte Chromosomen- und Telomerdynamik statt: Zu Beginn der meiotischen Prophase, bevor die homologe Rekombination einsetzt, heften sich Centromere und Telomere an die innere Kernhülle an. Danach versammeln sich die Telomere kurzzeitig an einer eng begrenzten Region der Kernhülle und bilden damit ein sogenanntes chromosomales Bukett aus. Zur gleichen Zeit beginnt die Paarung der homologen Chromosomen und die Rekombination. In der vorliegenden Arbeit wurde an einer großen Zahl an Testesgeweben von Knockout-Modellen der Maus mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (FISH), Immunfärbungen (IF) und dreidimensionaler (3D) Fluoreszenzmikroskopie untersucht, welchen Einfluss DNA Reparaturmechanismen wie homologe Rekombination (HR) und Non-Homologous End-Joining (NHEJ) sowie meiosespezifische Struktur-Proteine wie das Axialelement- (AE) Protein SCP3, das meiotische Cohesin Smc1 $\beta$  und das LaminC2 auf die Chromosomendynamik und Telomeraggregation haben.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in der Spermatogenese der Maus die Einleitung der HR und die Bukett-Bildung unabhängige Ereignisse sind, wohingegen Fehler in der HR zu einem verlängerten Bukett-Stadium führen. Knockout-Mausmodelle mit Defekten in der HR (*Spo11*<sup>-/-</sup>, *Dmc1*<sup>-/-</sup>, *mei1*, *Hop2*<sup>-/-</sup> und *Mlh1*<sup>-/-</sup> Mäuse) zeigten eine intakte Telomer/Kernhülle-Anheftung, einen verzögerten Eintritt in die Prophase I der Spermatogenese und, bis auf die *Hop2*<sup>-/-</sup> Maus, eine hochsignifikante Anreicherung von Bukett-Spermatocyten. Des Weiteren wurde beobachtet, dass NHEJ Reparaturfehler (*scid* und *Ku80*<sup>-/-</sup> Mäuse) und Fehler in der Spermio-genese (*Asm*<sup>-/-</sup>, *mGcl1*<sup>-/-</sup> und *TnPI*<sup>-/-</sup> Mäuse) die meiotische Telomer/Kernhülle-Anheftung und Bukett-Bildung nicht beeinflussen. Dagegen zeigten *Smc1 $\beta$* <sup>-/-</sup> Spermatocyten, denen das meiosespezifische Cohesin Smc1 $\beta$  fehlt, eine defekte Telomer/Kernhülle-Lokalisierung. In Gegensatz dazu führte das Fehlen von axialen Elementen in *Sycp3*<sup>-/-</sup>

Spermatocyten zu einer signifikanten Anreicherung von Bukett-Spermatocyten und zu einer fehlerhaften Chromosomenkondensation. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Histon H2AX ein der ATM-Kinase nachgeschalteter Regulator der meiotischen Telomerbewegung ist, denn die Telomer-FISH-Untersuchung der H2ax-defizienten Spermatogenese zeigte eine hochsignifikante Anreicherung von Bukett-Spermatocyten. FISH- und IF-Untersuchungen der *Lmna*<sup>-/-</sup> Spermatogenese ergaben, dass LaminC2 für einen schnellen Transit durch das Präleptotän-Stadium benötigt wird und eine wichtige Rolle für die Gonosomenpaarung spielt.



## 6 Literaturverzeichnis

- Alsheimer, M., and R. Benavente. 1996. Change of karyoskeleton during mammalian spermatogenesis: expression pattern of nuclear lamin C2 and its regulation. *Exp Cell Res.* 228:181-8.
- Alsheimer, M., B. Liebe, L. Sewell, C.L. Stewart, H. Scherthan, and R. Benavente. 2004. Disruption of spermatogenesis in mice lacking A-type lamins. *J Cell Sci.* 117:1173-8.
- Alsheimer, M., E. von Glasenapp, R. Hock, and R. Benavente. 1999. Architecture of the nuclear periphery of rat pachytene spermatocytes: distribution of nuclear envelope proteins in relation to synaptonemal complex attachment sites. *Mol Biol Cell.* 10:1235-45.
- Anderson, L.K., A. Reeves, L.M. Webb, and T. Ashley. 1999. Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics.* 151:1569-79.
- Arora, C., K. Kee, S. Maleki, and S. Keeney. 2004. Antiviral protein Ski8 is a direct partner of Spo11 in meiotic DNA break formation, independent of its cytoplasmic role in RNA metabolism. *Mol Cell.* 13:549-59.
- Baarends, W.M., E. Wassenaar, J.W. Hoogerbrugge, G. van Cappellen, H.P. Roest, J. Vreeburg, M. Ooms, J.H. Hoeijmakers, and J.A. Grootegoed. 2003. Loss of HR6B ubiquitin-conjugating activity results in damaged synaptonemal complex structure and increased crossing-over frequency during the male meiotic prophase. *Mol Cell Biol.* 23:1151-62.
- Baker, S.M., A.W. Plug, T.A. Prolla, C.E. Bronner, A.C. Harris, X. Yao, D.M. Christie, C. Monell, N. Arnheim, A. Bradley, T. Ashley, and R.M. Liskay. 1996. Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat Genet.* 13:336-42.
- Bannister, L.A., and J.C. Schimenti. 2004. Homologous recombinational repair proteins in mouse meiosis. *Cytogenet Genome Res.* 107:191-200.
- Barlow, A.L., F.E. Benson, S.C. West, and M.A. Hulten. 1997a. Distribution of the Rad51 recombinase in human and mouse spermatocytes. *Embo J.* 16:5207-15.
- Barlow, A.L., and M.A. Hulten. 1997. Sequential immunocytogenetics, molecular cytogenetics and transmission electron microscopy of microspread meiosis I oocytes from a human fetal carrier of an unbalanced translocation. *Chromosoma.* 106:293-303.

- Barlow, C., S. Hirotsune, R. Paylor, M. Liyanage, M. Eckhaus, F. Collins, Y. Shiloh, J.N. Crawley, T. Ried, D. Tagle, and A. Wynshaw-Boris. 1996. Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell*. 86:159-71.
- Barlow, C., M. Liyanage, P.B. Moens, C.X. Deng, T. Ried, and A. Wynshaw-Boris. 1997b. Partial rescue of the prophase I defects of Atm-deficient mice by p53 and p21 null alleles. *Nat Genet*. 17:462-6.
- Bass, H.W. 2003. Telomere dynamics unique to meiotic prophase: formation and significance of the bouquet. *Cell Mol Life Sci*. 60:2319-24.
- Bass, H.W., W.F. Marshall, J.W. Sedat, D.A. Agard, and W.Z. Cande. 1997. Telomeres cluster de novo before the initiation of synapsis: a three-dimensional spatial analysis of telomere positions before and during meiotic prophase. *J Cell Biol*. 137:5-18.
- Baudat, F., K. Manova, J.P. Yuen, M. Jasin, and S. Keeney. 2000. Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Mol Cell*. 6:989-98.
- Belar, K. 1928. Chromosomenreduktion. Die cytologischen Grundlagen der Vererbung. In Handbuch der Vererbungswissenschaft. Vol. 1. M. Hartmann, editor Geb. Borntraeger, Berlin. 168-201 pp.
- Benavente, R., Alsheimer, M., and von Glasenapp, E. 2004. The nuclear envelope at the attachment sites of mammalian meiotic telomeres. *Chrom. Today*. 14:(in press).
- Benedetti, S., and L. Merlini. 2004. Laminopathies: from the heart of the cell to the clinics. *Curr Opin Neurol*. 17:553-60.
- Bergerat, A., B. de Massy, D. Gadelle, P.C. Varoutas, A. Nicolas, and P. Forterre. 1997. An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature*. 386:414-7.
- Bianchi, A., S. Smith, L. Chong, P. Elias, and T. de Lange. 1997. TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *Embo J*. 16:1785-94.
- Bishop, A.J., M.C. Hollander, B. Kosaras, R.L. Sidman, A.J. Fornace, Jr., and R.H. Schiestl. 2003. Atm-, p53-, and Gadd45a-deficient mice show an increased frequency of homologous recombination at different stages during development. *Cancer Res*. 63:5335-43.
- Blunt, T., D. Gell, M. Fox, G.E. Taccioli, A.R. Lehmann, S.P. Jackson, and P.A. Jeggo. 1996. Identification of a nonsense mutation in the carboxyl-terminal region of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the scid mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:10285-90.

- Bojko, M. 1990. Synaptic adjustment of inversion loops in *Neurospora crassa*. *Genetics*. 124:593-8.
- Borde, V., W. Lin, E. Novikov, J.H. Petrini, M. Lichten, and A. Nicolas. 2004. Association of Mre11p with double-strand break sites during yeast meiosis. *Mol Cell*. 13:389-401.
- Boyle, A.L., and D.C. Ward. 1992. Isolation and initial characterization of a large repeat sequence element specific to mouse chromosome 8. *Genomics*. 12:517-25.
- Brinkley, B.R., S.L. Brenner, J.M. Hall, A. Tousson, R.D. Balczon, and M.M. Valdivia. 1986. Arrangements of kinetochores in mouse cells during meiosis and spermiogenesis. *Chromosoma*. 94:309-17.
- Broccoli, D., L. Chong, S. Oelmann, A.A. Fernald, N. Marziliano, B. van Steensel, D. Kipling, M.M. Le Beau, and T. de Lange. 1997a. Comparison of the human and mouse genes encoding the telomeric protein, TRF1: chromosomal localization, expression and conserved protein domains. *Hum Mol Genet*. 6:69-76.
- Broccoli, D., A. Smogorzewska, L. Chong, and T. de Lange. 1997b. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet*. 17:231-5.
- Bullard, S.A., S. Kim, A.M. Galbraith, and R.E. Malone. 1996. Double strand breaks at the HIS2 recombination hot spot in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:13054-9.
- Buonomo, S.B., R.K. Clyne, J. Fuchs, J. Loidl, F. Uhlmann, and K. Nasmyth. 2000. Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell*. 103:387-98.
- Burma, S., B.P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa, and D.J. Chen. 2001. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*. 276:42462-7.
- Butler, A., X. He, R.E. Gordon, H.S. Wu, S. Gatt, and E.H. Schuchman. 2002. Reproductive pathology and sperm physiology in acid sphingomyelinase-deficient mice. *Am J Pathol*. 161:1061-75.
- Calenda, A., B. Allenet, D. Escalier, J.F. Bach, and H.J. Garchon. 1994. The meiosis-specific Xmr gene product is homologous to the lymphocyte Xlr protein and is a component of the XY body. *Embo J*. 13:100-9.
- Carlton, P.M., and W.Z. Cande. 2002. Telomeres act autonomously in maize to organize the meiotic bouquet from a semipolarized chromosome orientation. *J Cell Biol*. 157:231-42.

- Carlton, P.M., C.R. Cowan, and W.Z. Cande. 2003. Directed motion of telomeres in the formation of the meiotic bouquet revealed by time course and simulation analysis. *Mol Biol Cell*. 14:2832-43.
- Celeste, A., O. Fernandez-Capetillo, M.J. Kruhlak, D.R. Pilch, D.W. Staudt, A. Lee, R.F. Bonner, W.M. Bonner, and A. Nussenzweig. 2003. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol*. 5:675-9.
- Celeste, A., S. Petersen, P.J. Romanienko, O. Fernandez-Capetillo, H.T. Chen, O.A. Sedelnikova, B. Reina-San-Martin, V. Coppola, E. Meffre, M.J. Difilippantonio, C. Redon, D.R. Pilch, A. Olaru, M. Eckhaus, R.D. Camerini-Otero, L. Tessarollo, F. Livak, K. Manova, W.M. Bonner, M.C. Nussenzweig, and A. Nussenzweig. 2002. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*. 296:922-7.
- Cha, R.S., B.M. Weiner, S. Keeney, J. Dekker, and N. Kleckner. 2000. Progression of meiotic DNA replication is modulated by interchromosomal interaction proteins, negatively by Spo11p and positively by Rec8p. *Genes Dev*. 14:493-503.
- Chikashige, Y., D.Q. Ding, H. Funabiki, T. Haraguchi, S. Mashiko, M. Yanagida, and Y. Hiraoka. 1994. Telomere-led premeiotic chromosome movement in fission yeast. *Science*. 264:270-3.
- Chikashige, Y., and Y. Hiraoka. 2001. Telomere binding of the Rap1 protein is required for meiosis in fission yeast. *Curr Biol*. 11:1618-23.
- Chong, L., B. van Steensel, D. Broccoli, H. Erdjument-Bromage, J. Hanish, P. Tempst, and T. de Lange. 1995. A human telomeric protein. *Science*. 270:1663-7.
- Church, K. 1976. Arrangement of chromosome ends and axial core formation during early meiotic prophase in the male grasshopper *Brachystola magna* by 3D, E.M. reconstruction. *Chromosoma*. 58:365-76.
- Cohen, P.E., and J.W. Pollard. 2001. Regulation of meiotic recombination and prophase I progression in mammals. *Bioessays*. 23:996-1009.
- Connelly, J.C., and D.R. Leach. 2002. Tethering on the brink: the evolutionarily conserved Mre11-Rad50 complex. *Trends Biochem Sci*. 27:410-8.
- Cooper, J.P., Y. Watanabe, and P. Nurse. 1998. Fission yeast Taz1 protein is required for meiotic telomere clustering and recombination. *Nature*. 392:828-31.
- Couedel, C., K.D. Mills, B. Marco, L. Shen, A. Olshen, R.D. Johnson, A. Nussenzweig, J. Essers, R. Kanaar, G.C. Li, F.W. Alt, and M. Jasin. 2004. Collaboration of homologous recombination and nonhomologous end-joining factors for the survival and integrity of mice and cells. *Genes Dev*. 18:1293-304.

- Cowan, C.R., P.M. Carlton, and W.Z. Cande. 2001. The polar arrangement of telomeres in interphase and meiosis. Rab1 organization and the bouquet. *Plant Physiol.* 125:532-8.
- De Kretser, D.M. 1969. Ultrastructural features of human spermiogenesis. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 98:477-505.
- Dernburg, A.F., J.W. Sedat, W.Z. Cande, and H.W. Bass. 1995. Cytology of telomeres. In *Telomeres*. E.H. Blackburn and C.W. Greider, editors. Cold Spring Harbor Press, New York. 295-338.
- Dobson, M.J., R.E. Pearlman, A. Karaiskakis, B. Spyropoulos, and P.B. Moens. 1994. Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J Cell Sci.* 107 ( Pt 10):2749-60.
- Dolganov, G.M., R.S. Maser, A. Novikov, L. Tosto, S. Chong, D.A. Bressan, and J.H. Petrini. 1996. Human Rad50 is physically associated with human Mre11: identification of a conserved multiprotein complex implicated in recombinational DNA repair. *Mol Cell Biol.* 16:4832-41.
- Donehower, L.A., M. Harvey, B.L. Slagle, M.J. McArthur, C.A. Montgomery, Jr., J.S. Butel, and A. Bradley. 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature.* 356:215-21.
- Downs, J.A., and S.P. Jackson. 2004. A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:367-78.
- Drabent, B., C. Bode, B. Bramlage, and D. Doenecke. 1996. Expression of the mouse testicular histone gene H1t during spermatogenesis. *Histochem Cell Biol.* 106:247-51.
- Dresser, M.E., and M.J. Moses. 1980. Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). IV. Light and electron microscopy of synapsis and nucleolar development by silver staining. *Chromosoma.* 76:1-22.
- Dudas, A., and M. Chovanec. 2004. DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutat Res.* 566:131-67.
- Dym, M. 1976. The mammalian rete testis--a morphological examination. *Anat Rec.* 186:493-523.
- Eaker, S., J. Cobb, A. Pyle, and M.A. Handel. 2002. Meiotic prophase abnormalities and metaphase cell death in MLH1-deficient mouse spermatocytes: insights into regulation of spermatogenic progress. *Dev Biol.* 249:85-95.
- Eaker, S., A. Pyle, J. Cobb, and M.A. Handel. 2001. Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *J Cell Sci.* 114:2953-65.

- Edelmann, W., P.E. Cohen, M. Kane, K. Lau, B. Morrow, S. Bennett, A. Umar, T. Kunkel, G. Cattoretti, R. Chaganti, J.W. Pollard, R.D. Kolodner, and R. Kucherlapati. 1996. Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. *Cell*. 85:1125-34.
- Eijpe, M., C. Heyting, B. Gross, and R. Jessberger. 2000a. Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes. *J Cell Sci*. 113 ( Pt 4):673-82.
- Eijpe, M., H. Offenberg, W. Goedecke, and C. Heyting. 2000b. Localisation of RAD50 and MRE11 in spermatocyte nuclei of mouse and rat. *Chromosoma*. 109:123-32.
- Eijpe, M., H. Offenberg, R. Jessberger, E. Revenkova, and C. Heyting. 2003. Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3. *J Cell Biol*. 160:657-70.
- Elson, A., Y. Wang, C.J. Daugherty, C.C. Morton, F. Zhou, J. Campos-Torres, and P. Leder. 1996. Pleiotropic defects in ataxia-telangiectasia protein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:13084-9.
- Engbrecht, J., and G.S. Roeder. 1989. Yeast mer1 mutants display reduced levels of meiotic recombination. *Genetics*. 121:237-47.
- Esponda, P., and G. Gimenez-Martin. 1972. The attachment of the synaptonemal complex to the nuclear envelope. An ultrastructural and cytochemical analysis. *Chromosoma*. 38:405-17.
- Feinberg, A.P., and B. Vogelstein. 1984. "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem*. 137:266-7.
- Fernandez-Capetillo, O., A. Lee, M. Nussenzweig, and A. Nussenzweig. 2004. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)*. 3:959-67.
- Fernandez-Capetillo, O., B. Liebe, H. Scherthan, and A. Nussenzweig. 2003a. H2AX regulates meiotic telomere clustering. *J Cell Biol*. 163:15-20.
- Fernandez-Capetillo, O., S.K. Mahadevaiah, A. Celeste, P.J. Romanienko, R.D. Camerini-Otero, W.M. Bonner, K. Manova, P. Burgoyne, and A. Nussenzweig. 2003b. H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell*. 4:497-508.
- Franco, S., M. Alsheimer, E. Herrera, R. Benavente, and M.A. Blasco. 2002. Mammalian meiotic telomeres: composition and ultrastructure in telomerase-deficient mice. *Eur J Cell Biol*. 81:335-40.

- Froenicke, L., L.K. Anderson, J. Wienberg, and T. Ashley. 2002. Male mouse recombination maps for each autosome identified by chromosome painting. *Am J Hum Genet.* 71:1353-68.
- Goedecke, W., M. Eijpe, H.H. Offenberg, M. van Aalderen, and C. Heyting. 1999. Mre11 and Ku70 interact in somatic cells, but are differentially expressed in early meiosis. *Nat Genet.* 23:194-8.
- Goldman, R.D., Y. Gruenbaum, R.D. Moir, D.K. Shumaker, and T.P. Spann. 2002. Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev.* 16:533-47.
- Golubovskaya, I.N., L.C. Harper, W.P. Pawlowski, D. Schichnes, and W.Z. Cande. 2002. The pam1 gene is required for meiotic bouquet formation and efficient homologous synapsis in maize (*Zea mays* L.). *Genetics.* 162:1979-93.
- Goytisolo, F.A., E. Samper, S. Edmonson, G.E. Taccioli, and M.A. Blasco. 2001. The absence of the dna-dependent protein kinase catalytic subunit in mice results in anaphase bridges and in increased telomeric fusions with normal telomere length and G-strand overhang. *Mol Cell Biol.* 21:3642-51.
- Griffith, J., A. Bianchi, and T. de Lange. 1998. TRF1 promotes parallel pairing of telomeric tracts in vitro. *J Mol Biol.* 278:79-88.
- Gruenbaum, Y., K.L. Wilson, A. Harel, M. Goldberg, and M. Cohen. 2000. Review: nuclear lamins--structural proteins with fundamental functions. *J Struct Biol.* 129:313-23.
- Habu, T., T. Taki, A. West, Y. Nishimune, and T. Morita. 1996. The mouse and human homologs of DMC1, the yeast meiosis-specific homologous recombination gene, have a common unique form of exon-skipped transcript in meiosis. *Nucleic Acids Res.* 24:470-7.
- Hande, M.P. 2004. DNA repair factors and telomere-chromosome integrity in mammalian cells. *Cytogenet Genome Res.* 104:116-22.
- Hande, M.P., A.S. Balajee, A. Tchirkov, A. Wynshaw-Boris, and P.M. Lansdorp. 2001. Extra-chromosomal telomeric DNA in cells from *Atm*(-/-) mice and patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mol Genet.* 10:519-28.
- Hande, P., P. Slijepcevic, A. Silver, S. Bouffler, P. van Buul, P. Bryant, and P. Lansdorp. 1999. Elongated telomeres in scid mice. *Genomics.* 56:221-3.
- Hedinger, C., and E. Weber. 1973. [Arrangement of seminiferous tubules in human testes]. *Z Anat Entwicklungsgesch.* 139:217-26.

- Hemann, M.T., K.L. Rudolph, M.A. Strong, R.A. DePinho, L. Chin, and C.W. Greider. 2001. Telomere dysfunction triggers developmentally regulated germ cell apoptosis. *Mol Biol Cell*. 12:2023-30.
- Heng, H.H., J.W. Chamberlain, X.M. Shi, B. Spyropoulos, L.C. Tsui, and P.B. Moens. 1996. Regulation of meiotic chromatin loop size by chromosomal position. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:2795-800.
- Heyting, C. 1996. Synaptonemal complexes: structure and function. *Curr Opin Cell Biol*. 8:389-96.
- Hirano, T., T.J. Mitchison, and J.R. Swedlow. 1995. The SMC family: from chromosome condensation to dosage compensation. *Curr Opin Cell Biol*. 7:329-36.
- Hollander, M.C., I. Alamo, J. Jackman, M.G. Wang, O.W. McBride, and A.J. Fornace, Jr. 1993. Analysis of the mammalian gadd45 gene and its response to DNA damage. *J Biol Chem*. 268:24385-93.
- Hollander, M.C., M.S. Sheikh, D.V. Bulavin, K. Lundgren, L. Augeri-Henmueller, R. Shehee, T.A. Molinaro, K.E. Kim, E. Tolosa, J.D. Ashwell, M.P. Rosenberg, Q. Zhan, P.M. Fernandez-Salguero, W.F. Morgan, C.X. Deng, and A.J. Fornace, Jr. 1999. Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nat Genet*. 23:176-84.
- Holm, P.B.a.R., S.W. 1977. Human meiosis I. The human pachytene karyotype analyzed by three-dimensional reconstruction of the synaptonemal complex. *Carlsberg Res Commun*. 24:283-323.
- Holstein, A.F. 1993. Männliche Geschlechtsorgane. Urban und Schwarzberg, München. Seite 69-114 pp.
- Horinouchi, K., S. Erlich, D.P. Perl, K. Ferlinz, C.L. Bisgaier, K. Sandhoff, R.J. Desnick, C.L. Stewart, and E.H. Schuchman. 1995. Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. *Nat Genet*. 10:288-93.
- Hunter, N., and N. Kleckner. 2001. The single-end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-holliday junction transition of meiotic recombination. *Cell*. 106:59-70.
- Ivanov, E.L., V.G. Korolev, and F. Fabre. 1992. XRS2, a DNA repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is needed for meiotic recombination. *Genetics*. 132:651-64.
- Jablonka, E., and M.J. Lamb. 1988. Meiotic pairing constraints and the activity of sex chromosomes. *J Theor Biol*. 133:23-36.
- Jerratsch, M. 2004. Vergleichende Analyse der meiotischen Telomere in der Spermatogenese von Maus, Ratte und Mensch: Proteinzusammensetzung, Umverteilung in Relation zu



- den Kernporen und Bedeutung für die meiotische Homologenpaarung. In Fachbereich Humanbiologie. Universität Kaiserslautern.
- Jessberger, R. 2002. The many functions of SMC proteins in chromosome dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:767-78.
- Johannisson, R., A. Gropp, H. Winking, W. Coerd, H. Rehder, and E. Schwinger. 1983. Down's syndrome in the male. Reproductive pathology and meiotic studies. *Hum Genet.* 63:132-8.
- Johzuka, K., and H. Ogawa. 1995. Interaction of Mre11 and Rad50: two proteins required for DNA repair and meiosis-specific double-strand break formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 139:1521-32.
- Kanoh, J., and F. Ishikawa. 2001. spRap1 and spRif1, recruited to telomeres by Taz1, are essential for telomere function in fission yeast. *Curr Biol.* 11:1624-30.
- Karlseder, J., L. Kachatrian, H. Takai, K. Mercer, S. Hingorani, T. Jacks, and T. de Lange. 2003. Targeted deletion reveals an essential function for the telomere length regulator Trf1. *Mol Cell Biol.* 23:6533-41.
- Kastan, M.B., Q. Zhan, W.S. el-Deiry, F. Carrier, T. Jacks, W.V. Walsh, B.S. Plunkett, B. Vogelstein, and A.J. Fornace, Jr. 1992. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell.* 71:587-97.
- Keeney, S. 2001. Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr Top Dev Biol.* 52:1-53.
- Keeney, S., F. Baudat, M. Angeles, Z.H. Zhou, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, K. Manova, and M. Jasin. 1999. A mouse homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* meiotic recombination DNA transesterase Spo11p. *Genomics.* 61:170-82.
- Keeney, S., C.N. Giroux, and N. Kleckner. 1997. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell.* 88:375-84.
- Kim, S.H., C. Beausejour, A.R. Davalos, P. Kaminker, S.J. Heo, and J. Campisi. 2004. TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres. *J Biol Chem.*
- Kim, S.H., S. Han, Y.H. You, D.J. Chen, and J. Campisi. 2003. The human telomere-associated protein TIN2 stimulates interactions between telomeric DNA tracts in vitro. *EMBO Rep.* 4:685-91.
- Kim, S.H., P. Kaminker, and J. Campisi. 1999. TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet.* 23:405-12.

- Kimura, T., C. Ito, S. Watanabe, T. Takahashi, M. Ikawa, K. Yomogida, Y. Fujita, M. Ikeuchi, N. Asada, K. Matsumiya, A. Okuyama, M. Okabe, K. Toshimori, and T. Nakano. 2003. Mouse germ cell-less as an essential component for nuclear integrity. *Mol Cell Biol.* 23:1304-15.
- Kimura, T., K. Yomogida, N. Iwai, Y. Kato, and T. Nakano. 1999. Molecular cloning and genomic organization of mouse homologue of *Drosophila* germ cell-less and its expression in germ lineage cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 262:223-30.
- Kleckner, N., A. Storlazzi, and D. Zickler. 2003. Coordinate variation in meiotic pachytene SC length and total crossover/chiasma frequency under conditions of constant DNA length. *Trends Genet.* 19:623-8.
- Klein, F., P. Mahr, M. Galova, S.B. Buonomo, C. Michaelis, K. Nairz, and K. Nasmyth. 1999. A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell.* 98:91-103.
- LaFountain, J.R., Jr., R.W. Cole, and C.L. Rieder. 2002. Partner telomeres during anaphase in crane-fly spermatocytes are connected by an elastic tether that exerts a backward force and resists poleward motion. *J Cell Sci.* 115:1541-9.
- Lammers, J.H., H.H. Offenbergh, M. van Aalderen, A.C. Vink, A.J. Dietrich, and C. Heyting. 1994. The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol.* 14:1137-46.
- Laroche, T., S.G. Martin, M. Gotta, H.C. Gorham, F.E. Pryde, E.J. Louis, and S.M. Gasser. 1998. Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres. *Curr Biol.* 8:653-6.
- Leatherman, J.L., K.H. Kaestner, and T.A. Jongens. 2000. Identification of a mouse germ cell-less homologue with conserved activity in *Drosophila*. *Mech Dev.* 92:145-53.
- Lee, J.M., and A. Bernstein. 1993. p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:5742-6.
- Leu, J.Y., and G.S. Roeder. 1999. Splicing of the meiosis-specific HOP2 transcript utilizes a unique 5' splice site. *Mol Cell Biol.* 19:7933-43.
- Levan, A. 1942. Studies on the mechanism of haploid rye. *Hereditas.* 28:177-211.
- Li, B., S. Oestreich, and T. de Lange. 2000a. Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell.* 101:471-83.
- Li, Y.W., H.J. Li, H. Liang, S.X. Tang, S.E. Jia, T.M. Shen, Z.S. Li, and X. Jia. 2000b. [Fluorescence in situ hybridization applied to the meiotic analysis and spontaneous

- chromosome translocation in the pollen mother cells of hybrids of *Triticum-Haynaldia*]. *Yi Chuan Xue Bao*. 27:317-24.
- Libby, B.J., R. De La Fuente, M.J. O'Brien, K. Wigglesworth, J. Cobb, A. Inselman, S. Eaker, M.A. Handel, J.J. Eppig, and J.C. Schimenti. 2002. The mouse meiotic mutation *mei1* disrupts chromosome synapsis with sexually dimorphic consequences for meiotic progression. *Dev Biol*. 242:174-87.
- Libby, B.J., L.G. Reinholdt, and J.C. Schimenti. 2003. Positional cloning and characterization of *Mei1*, a vertebrate-specific gene required for normal meiotic chromosome synapsis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:15706-11.
- Lichten, M. 2001. Meiotic recombination: breaking the genome to save it. *Curr Biol*. 11:R253-6.
- Lichter, P., T. Cremer, J. Borden, L. Manuelidis, and D.C. Ward. 1988. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet*. 80:224-34.
- Liebe, B., M. Alsheimer, C. Hoog, R. Benavente, and H. Scherthan. 2004. Telomere attachment, meiotic chromosome condensation, pairing, and bouquet stage duration are modified in spermatocytes lacking axial elements. *Mol Biol Cell*. 15:827-37.
- Liu, J.G., L. Yuan, E. Brundell, B. Bjorkroth, B. Daneholt, and C. Hoog. 1996. Localization of the N-terminus of SCP1 to the central element of the synaptonemal complex and evidence for direct interactions between the N-termini of SCP1 molecules organized head-to-head. *Exp Cell Res*. 226:11-9.
- Loidl, J. 1990. The initiation of meiotic chromosome pairing: the cytological view. *Genome*. 33:759-78.
- Loidl, J., F. Klein, and H. Scherthan. 1994a. Homologous pairing is reduced but not abolished in asynaptic mutants of yeast. *J Cell Biol*. 125:1191-200.
- Loidl, J., K. Nairz, and F. Klein. 1991. Meiotic chromosome synapsis in a haploid yeast. *Chromosoma*. 100:221-8.
- Loidl, J., H. Scherthan, and D.B. Kaback. 1994b. Physical association between nonhomologous chromosomes precedes distributive disjunction in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:331-4.
- Lustig, A.J., and T.D. Petes. 1986. Identification of yeast mutants with altered telomere structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:1398-402.

- MacQueen, A.J., M.P. Colaiacovo, K. McDonald, and A.M. Villeneuve. 2002. Synapsis-dependent and -independent mechanisms stabilize homolog pairing during meiotic prophase in *C. elegans*. *Genes Dev.* 16:2428-42.
- Maddar, H., N. Ratzkovsky, and A. Krauskopf. 2001. Role for telomere cap structure in meiosis. *Mol Biol Cell.* 12:3191-203.
- Mahadevaiah, S.K., J.M. Turner, F. Baudat, E.P. Rogakou, P. de Boer, J. Blanco-Rodriguez, M. Jasin, S. Keeney, W.M. Bonner, and P.S. Burgoyne. 2001. Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet.* 27:271-6.
- Marcon, E., and P. Moens. 2003. MLH1p and MLH3p localize to precociously induced chiasmata of okadaic-acid-treated mouse spermatocytes. *Genetics.* 165:2283-7.
- Meistrich, M.L., B. Mohapatra, C.R. Shirley, and M. Zhao. 2003. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma.* 111:483-8.
- Menees, T.M., and G.S. Roeder. 1989. MEI4, a yeast gene required for meiotic recombination. *Genetics.* 123:675-82.
- Meuwissen, R.L., H.H. Offenbergh, A.J. Dietrich, A. Riesewijk, M. van Iersel, and C. Heyting. 1992. A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *Embo J.* 11:5091-100.
- Mikhailova, E.I., S.P. Sosnikhina, G.A. Kirillova, O.A. Tikholiz, V.G. Smirnov, R.N. Jones, and G. Jenkins. 2001. Nuclear dispositions of subtelomeric and pericentromeric chromosomal domains during meiosis in asynaptic mutants of rye (*Secale cereale* L.). *J Cell Sci.* 114:1875-82.
- Moens, P.B. 1969. The fine structure of meiotic chromosome polarization and pairing in *Locusta migratoria* spermatocytes. *Chromosoma.* 28:1-25.
- Moens, P.B. 1974. Quantitative electron microscopy of chromosome organization at meiotic prophase. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 38:99-107.
- Moens, P.B. 1995. Histones H1 and H4 of surface-spread meiotic chromosomes. *Chromosoma.* 104:169-74.
- Moens, P.B., D.J. Chen, Z. Shen, N. Kolas, M. Tarsounas, H.H. Heng, and B. Spyropoulos. 1997. Rad51 immunocytology in rat and mouse spermatocytes and oocytes. *Chromosoma.* 106:207-15.
- Montelone, B.A., S. Prakash, and L. Prakash. 1981. Recombination and mutagenesis in rad6 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for multiple functions of the RAD6 gene. *Mol Gen Genet.* 184:410-5.

- Moses, M.J., M.E. Dresser, and P.A. Poorman. 1984. Composition and role of the synaptonemal complex. *Symp Soc Exp Biol.* 38:245-70.
- Murakami, H., V. Borde, T. Shibata, M. Lichten, and K. Ohta. 2003. Correlation between premeiotic DNA replication and chromatin transition at yeast recombination initiation sites. *Nucleic Acids Res.* 31:4085-90.
- Nag, D.K., H. Scherthan, B. Rockmill, J. Bhargava, and G.S. Roeder. 1995. Heteroduplex DNA formation and homolog pairing in yeast meiotic mutants. *Genetics.* 141:75-86.
- Naito, T., A. Matsuura, and F. Ishikawa. 1998. Circular chromosome formation in a fission yeast mutant defective in two ATM homologues. *Nat Genet.* 20:203-6.
- Nakagawa, T., and H. Ogawa. 1997. Involvement of the MRE2 gene of yeast in formation of meiosis-specific double-strand breaks and crossover recombination through RNA splicing. *Genes Cells.* 2:65-79.
- Nili, E., G.S. Cojocaru, Y. Kalma, D. Ginsberg, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, N.A. Jenkins, R. Berger, S. Shaklai, N. Amariglio, F. Brok-Simoni, A.J. Simon, and G. Rechavi. 2001. Nuclear membrane protein LAP2beta mediates transcriptional repression alone and together with its binding partner GCL (germ-cell-less). *J Cell Sci.* 114:3297-307.
- Nussenzweig, A., K. Sokol, P. Burgman, L. Li, and G.C. Li. 1997. Hypersensitivity of Ku80-deficient cell lines and mice to DNA damage: the effects of ionizing radiation on growth, survival, and development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:13588-93.
- Oakberg, E.F. 1956. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am J Anat.* 99:391-413.
- O'Carroll, D., H. Scherthan, A.H. Peters, S. Opravil, A.R. Haynes, G. Laible, S. Rea, M. Schmid, A. Lebersorger, M. Jerratsch, L. Sattler, M.G. Mattei, P. Denny, S.D. Brown, D. Schweizer, and T. Jenuwein. 2000. Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol Cell Biol.* 20:9423-33.
- Odorisio, T., T.A. Rodriguez, E.P. Evans, A.R. Clarke, and P.S. Burgoyne. 1998. The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis. *Nat Genet.* 18:257-61.
- Offenberg, H.H., J.A. Schalk, R.L. Meuwissen, M. van Aalderen, H.A. Kester, A.J. Dietrich, and C. Heyting. 1998. SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Res.* 26:2572-9.

- Ouyang, H., A. Nussenzweig, A. Kurimasa, V.C. Soares, X. Li, C. Cordon-Cardo, W. Li, N. Cheong, M. Nussenzweig, G. Iliakis, D.J. Chen, and G.C. Li. 1997. Ku70 is required for DNA repair but not for T cell antigen receptor gene recombination In vivo. *J Exp Med.* 186:921-9.
- Padmore, R., L. Cao, and N. Kleckner. 1991. Temporal comparison of recombination and synaptonemal complex formation during meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell.* 66:1239-56.
- Page, S.L., and R.S. Hawley. 2004. The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:525-58.
- Pandita, T.K. 2002. ATM function and telomere stability. *Oncogene.* 21:611-8.
- Pandita, T.K., C.H. Westphal, M. Anger, S.G. Sawant, C.R. Geard, R.K. Pandita, and H. Scherthan. 1999. Atm inactivation results in aberrant telomere clustering during meiotic prophase. *Mol Cell Biol.* 19:5096-105.
- Parvinen, M., and K.O. Soderstrom. 1976. Chromosome rotation and formation of synapsis. *Nature.* 260:534-5.
- Pelttari, J., M.R. Hoja, L. Yuan, J.G. Liu, E. Brundell, P. Moens, S. Santucci-Darmanin, R. Jessberger, J.L. Barbero, C. Heyting, and C. Hoog. 2001. A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells. *Mol Cell Biol.* 21:5667-77.
- Peters, A.H., A.W. Plug, M.J. van Vugt, and P. de Boer. 1997. A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome Res.* 5:66-8.
- Petersen, S., R. Casellas, B. Reina-San-Martin, H.T. Chen, M.J. Difilippantonio, P.C. Wilson, L. Hanitsch, A. Celeste, M. Muramatsu, D.R. Pilch, C. Redon, T. Ried, W.M. Bonner, T. Honjo, M.C. Nussenzweig, and A. Nussenzweig. 2001. AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching. *Nature.* 414:660-5.
- Petronczki, M., M.F. Siomos, and K. Nasmyth. 2003. Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell.* 112:423-40.
- Petukhova, G.V., P.J. Romanienko, and R.D. Camerini-Otero. 2003. The Hop2 protein has a direct role in promoting interhomolog interactions during mouse meiosis. *Dev Cell.* 5:927-36.
- Pezzi, N., I. Prieto, L. Kremer, L.A. Perez Jurado, C. Valero, J. Del Mazo, A.C. Martinez, and J.L. Barbero. 2000. STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic

- chromosome pairing and location of STAG3-related genes flanking the Williams-Beuren syndrome deletion. *Faseb J.* 14:581-92.
- Pfeifer, C., H. Scherthan, and P.D. Thomsen. 2003. Sex-specific telomere redistribution and synapsis initiation in cattle oogenesis. *Dev Biol.* 255:206-15.
- Pfeifer, C., P.D. Thomsen, and H. Scherthan. 2001. Centromere and telomere redistribution precedes homologue pairing and terminal synapsis initiation during prophase I of cattle spermatogenesis. *Cytogenet Cell Genet.* 93:304-14.
- Pinkel, D., J. Landegent, C. Collins, J. Fuscoe, R. Segraves, J. Lucas, and J. Gray. 1988. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:9138-42.
- Pinkel, D., T. Straume, and J.W. Gray. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:2934-8.
- Pittman, D.L., J. Cobb, K.J. Schimenti, L.A. Wilson, D.M. Cooper, E. Brignull, M.A. Handel, and J.C. Schimenti. 1998. Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell.* 1:697-705.
- Plug, A.W., A.H. Peters, Y. Xu, K.S. Keegan, M.F. Hoekstra, D. Baltimore, P. de Boer, and T. Ashley. 1997. ATM and RPA in meiotic chromosome synapsis and recombination. *Nat Genet.* 17:457-61.
- Podgornaya, O.I., E.A. Bugaeva, A.P. Voronin, E. Gilson, and A.R. Mitchell. 2000. Nuclear envelope associated protein that binds telomeric DNAs. *Mol Reprod Dev.* 57:16-25.
- Prieto, I., J.A. Suja, N. Pezzi, L. Kremer, A.C. Martinez, J.S. Rufas, and J.L. Barbero. 2001. Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat Cell Biol.* 3:761-6.
- Rasmussen, S.W., and P.B. Holm. 1982. The meiotic prophase in *Bombyx mori*. In *Insect Ultrastructure*. Vol. 1. Kluwer Academic/Plenum.
- Rasmussen, S.W., and P.B. Holm. 1978. Human Meiosis II. Chromosome pairing and recombination nodules in human spermatocytes. *Carlsberg research communications.* 43:275-327.
- Revenkova, E., M. Eijpe, C. Heyting, B. Gross, and R. Jessberger. 2001. Novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1. *Mol Cell Biol.* 21:6984-98.

- Revenkova, E., M. Eijpe, C. Heyting, C.A. Hodges, P.A. Hunt, B. Liebe, H. Scherthan, and R. Jessberger. 2004. Cohesin SMC1beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat Cell Biol.* 6:555-62.
- Rhoades, M.M. 1961. Meioses. *In* In The Cell: Biochemistry, Physiology, and Morphology. Vol. 3, Meiosis and Mitosis. J. Brachet and A.E. Mirsky, editors. Academic Press, New York. 1-75.
- Richardson, C., N. Horikoshi, and T.K. Pandita. 2004. The role of the DNA double-strand break response network in meiosis. *DNA Repair (Amst).* 3:1149-64.
- Rigby, P.W., M. Dieckmann, C. Rhodes, and P. Berg. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol.* 113:237-51.
- Rockmill, B., J.A. Engebrecht, H. Scherthan, J. Loidl, and G.S. Roeder. 1995a. The yeast MER2 gene is required for chromosome synapsis and the initiation of meiotic recombination. *Genetics.* 141:49-59.
- Rockmill, B., and G.S. Roeder. 1998. Telomere-mediated chromosome pairing during meiosis in budding yeast. *Genes Dev.* 12:2574-86.
- Rockmill, B., M. Sym, H. Scherthan, and G.S. Roeder. 1995b. Roles for two RecA homologs in promoting meiotic chromosome synapsis. *Genes Dev.* 9:2684-95.
- Roeder, G.S. 1997. Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev.* 11:2600-21.
- Roeder, G.S., and J.M. Bailis. 2000. The pachytene checkpoint. *Trends Genet.* 16:395-403.
- Roest, H.P., J. van Klaveren, J. de Wit, C.G. van Gulp, M.H. Koken, M. Vermeij, J.H. van Roijen, J.W. Hoogerbrugge, J.T. Vreeburg, W.M. Baarends, D. Bootsma, J.A. Grootegoed, and J.H. Hoeijmakers. 1996. Inactivation of the HR6B ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme in mice causes male sterility associated with chromatin modification. *Cell.* 86:799-810.
- Rogakou, E.P., C. Boon, C. Redon, and W.M. Bonner. 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol.* 146:905-16.
- Rogakou, E.P., D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova, and W.M. Bonner. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.* 273:5858-68.
- Roig, I., B. Liebe, J. Egozcue, L. Cabero, M. Garcia, and H. Scherthan. 2004. Female-specific features of recombinational double-stranded DNA repair in relation to synapsis and telomere dynamics in human oocytes. *Chromosoma.*



- Romanienko, P.J., and R.D. Camerini-Otero. 1999. Cloning, characterization, and localization of mouse and human SPO11. *Genomics*. 61:156-69.
- Romanienko, P.J., and R.D. Camerini-Otero. 2000. The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell*. 6:975-87.
- Russell, L.D., Ettlin, R. A., Sinha Hikim, A. P. and Clegg, E. D. 1990. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Clearwater: Cache River Press.
- Schalk, J.A., A.J. Dietrich, A.C. Vink, H.H. Offenberg, M. van Aalderen, and C. Heyting. 1998. Localization of SCP2 and SCP3 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Chromosoma*. 107:540-8.
- Scherthan, H. 1997. Chromosome behaviour in earliest meiotic prophase. *In Chromosomes today*. Vol. 12. H. Gill, J.S. Parker, and M. Puertas, editors. Chapman and Hall, London, UK. 217-248.
- Scherthan, H. 2001. A bouquet makes ends meet. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:621-7.
- Scherthan, H. 2003. Knockout mice provide novel insights into meiotic chromosome and telomere dynamics. *Cytogenet Genome Res*. 103:235-44.
- Scherthan, H., J. Bahler, and J. Kohli. 1994. Dynamics of chromosome organization and pairing during meiotic prophase in fission yeast. *J Cell Biol*. 127:273-85.
- Scherthan, H., and T. Cremer. 1994. Nonisotopic in Situ Hybridization in Paraffin-Embedded Tissue Sections. *In Methods in molecular Genetics*. Vol. 5. K.W. Adolph, editor. Academic Press, San Diego. 223-238.
- Scherthan, H., R. Eils, E. Trelles-Sticken, S. Dietzel, T. Cremer, H. Walt, and A. Jauch. 1998. Aspects of three-dimensional chromosome reorganization during the onset of human male meiotic prophase. *J Cell Sci*. 111 ( Pt 16):2337-51.
- Scherthan, H., M. Jerratsch, S. Dhar, Y.A. Wang, S.P. Goff, and T.K. Pandita. 2000a. Meiotic telomere distribution and Sertoli cell nuclear architecture are altered in Atm- and Atm-p53-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 20:7773-83.
- Scherthan, H., M. Jerratsch, B. Li, S. Smith, M. Hulten, T. Lock, and T. de Lange. 2000b. Mammalian meiotic telomeres: protein composition and redistribution in relation to nuclear pores. *Mol Biol Cell*. 11:4189-203.
- Scherthan, H., and I. Schonborn. 2001. Asynchronous chromosome pairing in male meiosis of the rat (*Rattus norvegicus*). *Chromosome Res*. 9:273-82.
- Scherthan, H., S. Weich, H. Schwegler, C. Heyting, M. Harle, and T. Cremer. 1996. Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J Cell Biol*. 134:1109-25.

- Schmekel, K., R.L. Meuwissen, A.J. Dietrich, A.C. Vink, J. van Marle, H. van Veen, and C. Heyting. 1996. Organization of SCP1 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Exp Cell Res.* 226:20-30.
- Shimanuki, M., F. Miki, D.Q. Ding, Y. Chikashige, Y. Hiraoka, T. Horio, and O. Niwa. 1997. A novel fission yeast gene, *kms1+*, is required for the formation of meiotic prophase-specific nuclear architecture. *Mol Gen Genet.* 254:238-49.
- Smilenov, L.B., S.E. Morgan, W. Mellado, S.G. Sawant, M.B. Kastan, and T.K. Pandita. 1997. Influence of ATM function on telomere metabolism. *Oncogene.* 15:2659-65.
- Smith, K.N., and A. Nicolas. 1998. Recombination at work for meiosis. *Curr Opin Genet Dev.* 8:200-11.
- Smogorzewska, A., J. Karlseder, H. Holtgreve-Grez, A. Jauch, and T. de Lange. 2002. DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2. *Curr Biol.* 12:1635-44.
- Solari, A.J. 1964. The Morphology and Ultrastructure of the Sex Vesicle in the Mouse. *Exp Cell Res.* 36:160-8.
- Solari, A.J. 1969. Changes in the sex chromosomes during meiotic prophase in mouse spermatocytes. *Genetics.* 61:Suppl:113-20.
- Solari, A.J. 1970. The spatial relationship of the X and Y chromosomes during meiotic prophase in mouse spermatocytes. *Chromosoma.* 29:217-36.
- Speed, R.M. 1986. Oocyte development in XO fetuses of man and mouse: the possible role of heterologous X-chromosome pairing in germ cell survival. *Chromosoma.* 94:115-24.
- Stack, S.M. 1984. Heterochromatin, the synaptonemal complex and crossing over. *J Cell Sci.* 71:159-76.
- Steinmuller, J., E. Schleiermacher, and H. Scherthan. 1993. Direct detection of repetitive, whole chromosome paint and telomere DNA probes by immunogold electron microscopy. *Chromosome Res.* 1:45-51.
- Storlazzi, A., S. Tesse, S. Gargano, F. James, N. Kleckner, and D. Zickler. 2003. Meiotic double-strand breaks at the interface of chromosome movement, chromosome remodeling, and reductional division. *Genes Dev.* 17:2675-87.
- Strunnikov, A.V. 1998. SMC proteins and chromosome structure. *Trends Cell Biol.* 8:454-9.
- Stuurman, N., S. Heins, and U. Aebi. 1998. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol.* 122:42-66.

- Suja, J.A., C. Antonio, A. Debec, and J.S. Rufas. 1999. Phosphorylated proteins are involved in sister-chromatid arm cohesion during meiosis I. *J Cell Sci.* 112 ( Pt 17):2957-69.
- Sullivan, T., D. Escalante-Alcalde, H. Bhatt, M. Anver, N. Bhat, K. Nagashima, C.L. Stewart, and B. Burke. 1999. Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol.* 147:913-20.
- Sun, H., D. Treco, and J.W. Szostak. 1991. Extensive 3'-overhanging, single-stranded DNA associated with the meiosis-specific double-strand breaks at the ARG4 recombination initiation site. *Cell.* 64:1155-61.
- Sym, M., J.A. Engebrecht, and G.S. Roeder. 1993. ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis. *Cell.* 72:365-78.
- Szostak, J.W., T.L. Orr-Weaver, R.J. Rothstein, and F.W. Stahl. 1983. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell.* 33:25-35.
- Tarsounas, M., T. Morita, R.E. Pearlman, and P.B. Moens. 1999. RAD51 and DMC1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and synaptonemal complexes. *J Cell Biol.* 147:207-20.
- Telenius, H., N.P. Carter, C.E. Bebb, M. Nordenskjold, B.A. Ponder, and A. Tunnacliffe. 1992a. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics.* 13:718-25.
- Telenius, H., A.H. Pelmear, A. Tunnacliffe, N.P. Carter, A. Behmel, M.A. Ferguson-Smith, M. Nordenskjold, R. Pfragner, and B.A. Ponder. 1992b. Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer.* 4:257-63.
- Thompson, L.H., and D. Schild. 2001. Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat Res.* 477:131-53.
- Tomkiel, J., C.A. Cooke, H. Saitoh, R.L. Bernat, and W.C. Earnshaw. 1994. CENP-C is required for maintaining proper kinetochore size and for a timely transition to anaphase. *J Cell Biol.* 125:531-45.
- Trelles-Sticken, E., M.E. Dresser, and H. Scherthan. 2000. Meiotic telomere protein Ndj1p is required for meiosis-specific telomere distribution, bouquet formation and efficient homologue pairing. *J Cell Biol.* 151:95-106.
- Trelles-Sticken, E., J. Loidl, and H. Scherthan. 1999. Bouquet formation in budding yeast: initiation of recombination is not required for meiotic telomere clustering. *J Cell Sci.* 112 ( Pt 5):651-8.

- Tsubouchi, H., and G.S. Roeder. 2002. The Mnd1 protein forms a complex with hop2 to promote homologous chromosome pairing and meiotic double-strand break repair. *Mol Cell Biol.* 22:3078-88.
- Turner, J.M., S.K. Mahadevaiah, R. Benavente, H.H. Offenberg, C. Heyting, and P.S. Burgoyne. 2000. Analysis of male meiotic "sex body" proteins during XY female meiosis provides new insights into their functions. *Chromosoma.* 109:426-32.
- van Buul, P.P., L. Abramsson-Zetterberg, I.M. Zandman, and A. van Duyn-Goedhart. 1998. Further characterization of the radiosensitivity of the scid mouse. *Int J Radiat Biol.* 74:35-41.
- van Steensel, B., and T. de Lange. 1997. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature.* 385:740-3.
- Voet, T., B. Liebe, C. Labaere, P. Marynen, and H. Scherthan. 2003a. Telomere-independent homologue pairing and checkpoint escape of accessory ring chromosomes in male mouse meiosis. *J Cell Biol.* 162:795-807.
- Voet, T., E. Schoenmakers, S. Carpentier, C. Labaere, and P. Marynen. 2003b. Controlled transgene dosage and PAC-mediated transgenesis in mice using a chromosomal vector. *Genomics.* 82:596-605.
- Voet, T., J. Vermeesch, A. Carens, J. Durr, C. Labaere, H. Duhamel, G. David, and P. Marynen. 2001. Efficient male and female germline transmission of a human chromosomal vector in mice. *Genome Res.* 11:124-36.
- von Wettstein, D., S.W. Rasmussen, and P.B. Holm. 1984. The synaptonemal complex in genetic segregation. *Annu Rev Genet.* 18:331-413.
- Watanabe, Y., and P. Nurse. 1999. Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature.* 400:461-4.
- West, S.C. 2003. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:435-45.
- Woods, L.M., C.A. Hodges, E. Baart, S.M. Baker, M. Liskay, and P.A. Hunt. 1999. Chromosomal influence on meiotic spindle assembly: abnormal meiosis I in female Mlh1 mutant mice. *J Cell Biol.* 145:1395-406.
- Woollam, D.H., E.H. Ford, and J.W. Millen. 1966. The attachment of pachytene chromosomes to the nuclear membrane in mammalian spermatocytes. *Exp Cell Res.* 42:657-61.
- Xin, Z., and D. Broccoli. 2004. Manipulating mouse telomeres: models of tumorigenesis and aging. *Cytogenet Genome Res.* 105:471-8.

- Xu, Y., T. Ashley, E.E. Brainerd, R.T. Bronson, M.S. Meyn, and D. Baltimore. 1996. Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Dev.* 10:2411-22.
- Yamamoto, A., and Y. Hiraoka. 2001. How do meiotic chromosomes meet their homologous partners?: lessons from fission yeast. *Bioessays.* 23:526-33.
- Yazawa, T., T. Yamamoto, Y. Nakayama, S. Hamada, and S. Abe. 2000. Conversion from mitosis to meiosis: morphology and expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Dmc1 during newt spermatogenesis. *Dev Growth Differ.* 42:603-11.
- Yoshida, K., G. Kondoh, Y. Matsuda, T. Habu, Y. Nishimune, and T. Morita. 1998. The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol Cell.* 1:707-18.
- Yu, Y.E., Y. Zhang, E. Unni, C.R. Shirley, J.M. Deng, L.D. Russell, M.M. Weil, R.R. Behringer, and M.L. Meistrich. 2000. Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:4683-8.
- Yuan, L., J.G. Liu, M.R. Hoja, J. Wilbertz, K. Nordqvist, and C. Hoog. 2002. Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science.* 296:1115-8.
- Yuan, L., J.G. Liu, J. Zhao, E. Brundell, B. Daneholt, and C. Hoog. 2000. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell.* 5:73-83.
- Yuan, L., J. Pelttari, E. Brundell, B. Bjorkroth, J. Zhao, J.G. Liu, H. Brismar, B. Daneholt, and C. Hoog. 1998. The synaptonemal complex protein SCP3 can form multistranded, cross-striated fibers in vivo. *J Cell Biol.* 142:331-9.
- Zhu, X.D., B. Kuster, M. Mann, J.H. Petrini, and T. de Lange. 2000. Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet.* 25:347-52.
- Zickler, D., and N. Kleckner. 1998. The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu Rev Genet.* 32:619-97.

## **Publikationen aus dieser Arbeit**

- Voet T, Liebe B, Labaere C, Marynen P, Scherthan H (2003). Telomere-independent homologue pairing and checkpoint escape of accessory ring chromosomes in male mouse meiosis. *J Cell Biol.* 162(5):795-807.
- Fernandez-Capetillo O, Liebe B, Scherthan H, Nussenzweig A (2003). H2AX regulates meiotic telomere clustering. *J Cell Biol.* 163(1):15-20.
- Hausmann M, Liebe B, Perner B, Jerratsch M, Greulich KO, Scherthan H (2003). Imaging of human meiotic chromosomes by scanning near-field optical microscopy (SNOM). *Micron* 34(8):441-7.
- Alsheimer M, Liebe B, Sewell L, Stewart CL, Scherthan H, Benavente R (2004). Disruption of spermatogenesis in mice lacking A-type lamins. *J Cell Sci.* 117:1173-8.
- Revenkova E, Eijpe M, Heyting C, Hodges CA, Hunt PA, Liebe B, Scherthan H, Jessberger R (2004). Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat Cell Biol.* 6(6):555-62.
- Roig I, Liebe B, Egozcue J, Cabero L, Garcia M, Scherthan H (2004). Female-specific features of recombinational double-stranded DNA repair in relation to synapsis and telomere dynamics in human oocytes. *Chromosoma* 113(1):22-33.
- Liebe B, Alsheimer M, Hoog C, Benavente R, Scherthan H (2004). Telomere attachment, meiotic chromosome condensation, pairing, and bouquet stage duration are modified in spermatocytes lacking axial elements. *Mol Biol Cell.* 15(2):827-37.
- Roig I, Robles P, Garcia R, Martínez-Flores I, Egozcue J, Liebe B, Scherthan H, Garcia M (eingereicht). Chromosome 18 pairing behavior in human trisomic oocytes. *Reproduction.*

## 1 Tagungsbeiträge

Liebe L, Alsheimer M, Höög, C, Benavente R, Scherthan H. Disruption of the meiotic chromosome core alters telomere dynamics. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Leipzig, Oktober 2002.