



Institut für Biologische Informationsverarbeitung

***Molekularbiologische und immunologische
Charakterisierung von Chemorezeptoren in
Säugetier-Spermien***

Steffen Klaus Meurer

***Molekularbiologische und immunologische
Charakterisierung von Chemorezeptoren in
Säugetier-Spermien***

Steffen Klaus Meurer

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4002

ISSN 0944-2952

Institut für Biologische Informationsverarbeitung Jül-4002

D 38 (Diss., Köln, Univ., 2002)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Berichterstatter: Privatdozent Dr. Arnd Baumann

Professorin Dr. Sigrun Korsching

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2002

Kurzfassung

Molekularbiologische und immunologische Charakterisierung von Chemorezeptoren in Säugetier-Spermien

Die Chemotaxis von Invertebraten-Spermien ist gut dokumentiert (Morisawa, 1994). Das chemotaktisch wirkende Eizellpeptid Resact der Seeigelart *Arbacia punctulata* bindet an eine membranständige Rezeptor-Guanylylzyklase (Ward *et al.*, 1985; Shimomura *et al.*, 1986). Säugetier-Spermien reagieren chemotaktisch auf Substanzen, die von der Eizelle selbst und/oder vom weiblichen Genitaltrakt stammen (Eisenbach & Tur-Kaspa, 1999). Bislang konnten jedoch weder die chemotaktisch wirksamen Substanzen noch die entsprechenden membranständigen Rezeptoren identifiziert werden. Derzeitige Hypothesen über die chemotaktische Signalkette orientieren sich an den Signalwegen zur Wahrnehmung von Duftstoffen in Riechzellen. Demnach könnten Duftstoffrezeptoren (OR) oder die membranständige Guanylylzyklase-D eine Rolle bei der Chemotaxis von Säugetier-Spermien spielen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden 12 verschiedene putative OR durch RT-PCR in Keimzellen von männlichen Mäusen identifiziert. Vier OR wurden vollständig kloniert. Die 12 OR stammen aus 10 verschiedenen Subfamilien. Dies bedeutet, daß die im Hoden exprimierten OR keine eigene Subfamilie von hodenspezifischen OR bilden. Mit Ausnahme von TOR8, der zur Klasse I (Fisch-ähnliche) der OR zu rechnen ist, gehören die anderen OR der Klasse II (Säugetier-ähnliche) an. Alle untersuchten OR sind auch in Riechzellen exprimiert. 6 OR sind darüber hinaus auch in verschiedenen weiteren Geweben (z.B. Gehirn, Herz) nachweisbar. Für die meisten der untersuchten OR konnten Transkripte bereits im präpubertären Hoden nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, daß OR nicht nur eine Funktion in reifen Spermien haben könnten, sondern bereits während der Entwicklung bzw. der Organisation des Keimzellepithels.

Durch Northernblot-Experimente konnte nachgewiesen werden, daß zwei OR, TOR13 und TORS1, höher exprimiert sind als die anderen OR. Transkripte von TOR13 konnten durch *in situ* Hybridisierung in Spermatogonien und Spermatozyten lokalisiert werden. Die Klonierung von TOR13 und TORS1 zeigte, daß es sich bei TOR13 um einen C-terminal verkürzten OR handelt. Es ist unbekannt, ob ein OR, dem die 7. transmembranale Domäne und der C-Terminus fehlen, funktionell ist. Aus diesem Grund wurde nur TORS1 charakterisiert. Eine Southernblot-Analyse von genomischer DNA zeigte, daß TORS1 das

einziges Gen einer neuen Subfamilie darstellt. TORS1 ist auf Chromosom 11 lokalisiert. Das TORS1-Gen ließ sich nicht funktionell heterolog exprimieren, obwohl das Rezeptorprotein in den Wirtszellen synthetisiert und auch posttranslational modifiziert wurde. Mit TORS1 konnte ein OR-Gen identifiziert werden, das für einen konditionalen Gen *knock-out* geeignet wäre. Mit einem Gen *knock-out* könnte man vielleicht Hinweise auf die physiologische Funktion der OR in Spermien erhalten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde $G_{\alpha\text{olf}}$, der Wechselwirkungspartner von OR in Riechzellen, aus Hoden-cDNA kloniert. Durch Westernblot-Experimente konnte $G_{\alpha\text{olf}}$ in Spermien detektiert werden. Immunhistochemische-Versuche zeigten, daß $G_{\alpha\text{olf}}$ im akrosomalen Bereich der Spermien lokalisiert ist. Die Adenylylzyklase III, der Effektor von G_{olf} in Riechzellen, ließ sich durch Westernblot-Analyse nicht in Spermien nachweisen. Dies bedeutet, daß OR in Spermien nicht, wie in Riechzellen, über $G_{\alpha\text{olf}}$ die ACIII aktivieren können. Die OR müssen in Spermien einen anderen Signalweg aktivieren.

Im dritten Teil wurde schließlich untersucht, ob eine membranständige Rezeptor-Guanylylzyklase und ein cGMP-gesteuerter Ionenkanal (CNG-Kanal) in Maus-Spermien exprimiert sind. Eine cGMP-vermittelte Signalkaskade könnte - ähnlich wie in Seeigelspermien - das chemotaktische Verhalten regulieren. Mit Hilfe von RT-PCR konnten aus Keimzellen-cDNA Transkripte der Guanylylzyklase-D amplifiziert werden. Ebenfalls konnten Transkripte der α -Untereinheit mCNGA3 und der modulatorischen β -Untereinheit mCNGB3 nachgewiesen werden. In immunhistochemischen Experimenten wurde die GC-D in den Flagellen der Spermien lokalisiert. Die GC-D und der CNG-Kanal könnten Bestandteile eines cGMP-Signalwegs sein, der das Schwimmverhalten von Säugetier-Spermien reguliert.

Abstract

Molecular and immunological characterization of chemoreceptors in mammalian sperm

Chemotaxis of sperm is well established in marine invertebrates, such as sea urchin (Morisawa, 1994). The chemotactic egg-derived peptide resact of the sea urchin *Arbacia punctulata* binds to a membrane-bound receptor-guanylyl cyclase. Mammalian sperm show chemotactic behaviour in response to factors released by the egg itself and/or the female reproductive tract. Neither the chemotactic factors nor the respective membrane receptors of sperm have been identified. Current hypotheses on the chemotactic signaling pathways rely on models for odorant sensation in olfactory sensory neurons (OSN). Thus, G-protein coupled odorant receptors (OR) or the receptor guanylyl cyclase-D might play a role in chemotaxis of mammalian sperm.

In the first part of this PhD Thesis, 12 different putative OR have been identified by RT-PCR in germ cells of male mice. Four complete OR genes were cloned from genomic DNA. The twelve amplified ORs are members of ten subfamilies revealing that testicular ORs do not constitute a specific subfamily. Except for TOR8 that belongs to class I OR (fish-like), the other receptors are members of class II OR (mammalian-like). All ORs are also expressed in OSN. Furthermore 6 ORs are expressed in additional tissues (i.e. heart, brain). Most ORs are already expressed in the prepubertal testis. This finding points out that – in addition to a functional role in mature sperm – ORs may be involved in the development and organization of the germ cell epithelium.

Northernblot experiments revealed that two ORs (TOR13 and TORS1) are more abundantly expressed than the other ORs. By *in situ* hybridization-experiments transcripts of TOR13 were localized to spermatogonia and spermatocytes. Cloning of the TOR13 and TORS1 genes showed that the TOR13 gene codes for a C-terminal truncated receptor protein. Because it is unknown whether an OR lacking the seventh transmembrane domain and the C-terminus is functional, only the TORS1 gene was further characterized. Southernblot analysis revealed that TORS1 is the only gene of a new cluster. The gene could be assigned to chromosome 11. TORS1 could not be functionally expressed in a heterologous system although the receptor protein was synthesized and posttranslationally modified in the host cells. In conclusion, TORS1 is a candidate for a conditional gene *knock-out*. This approach might provide a deeper insight into the function of ORs in sperm cells.

In the second part, $G_{\alpha_{olf}}$, the interaction partner of OR in OSN, has been cloned from testicular cDNA. By Westernblot experiments, $G_{\alpha_{olf}}$ could be detected in sperm. $G_{\alpha_{olf}}$ was immunohistochemically localized to the acrosomal part of the head. Adenylyl cyclase III (ACIII), the effector of G_{olf} in OSN, could not be detected in sperm by Westernblot experiments. Thus unlike in OSN, OR in sperm do not activate ACIII by means of $G_{\alpha_{olf}}$. Consequently, in sperm ORs must participate in a different signaling cascade.

In the third part, I investigated whether a receptor GC and a cGMP-regulated ion channel (CNG-channel) are expressed in sperm. A signaling cascade comprising a receptor GC could be involved in chemotaxis such as in sea urchin sperm. Transcripts of the GC-D could be identified in cDNA of sperm precursor cells. The ion channel α -subunit mCNGA3 und the modulatory β -subunit mCNGB3 have been also amplified from germ cell cDNA. In immunohistochemical experiments, the GC-D was localized to the *principal piece* of the sperm tail. Thus, it is tempting to speculate that the GC-D and the CNG ion channel are components of a signaling pathway that regulates the swimming behaviour of mammalian sperm cells.

I Inhalt

I	Inhalt	I
II	Abkürzungsverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
1.1	Chemotaxis	1
1.1.1	Chemotaxis von Spermien	2
1.1.1.1	Chemotaxis von Invertebraten-Spermien	3
1.1.1.2	Chemotaxis von Säugetier-Spermien	5
1.2	Zielsetzung der Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.2	Versuchstiere	14
2.3	<i>Escherichia coli</i> -Zellkultur	15
2.3.1	Verwendete <i>E. coli</i> K12-Bakterienstämme	15
2.3.2	Verwendete Plasmid-Vektoren	15
2.3.3	Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für <i>E. coli</i>	16
2.3.4	Anzucht von <i>E. coli</i> -Bakterienkulturen	16
2.3.4.1	Anzucht von <i>E. coli</i> -Zellen zur Plasmidpräparation	16
2.3.4.2	Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation mit Plasmid-DNA	16
2.3.4.3	Herstellung von „Mg ²⁺ -Zellen“ zur Infektion mit λ-FIX [®] II-Phagen-DNA	17
2.4	DNA-Präparationen	17
2.4.1	Plasmid-DNA-Präparationen	17
2.4.1.1	Minipräparation durch alkalische Lyse nach Birnboim & Doly (1979)	17
2.4.1.2	Alkalische LiCl-Minipräparation	17
2.4.1.3	Alkalische LiCl-Präparation im großen Maßstab	18
2.4.2	Isolierung von genomischer DNA	18
2.4.3	Isolierung von λ-FIX [®] II-genomischer-Phagen DNA (Santos, 1991)	19
2.5	Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren	20

2.5.1	Phenol/Chloroformextraktion	20
2.5.2	Ethanol-Präzipitation	20
2.5.3	Quantifizierung von Nukleinsäuren	20
2.5.3.1	DNA-Größen- und Mengenstandard	20
2.5.3.2	Konzentrationsbestimmung mit Hilfe von Agarosegelen	20
2.5.3.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	21
2.5.4	Trennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese	21
2.5.5	Reinigung von DNA aus Agarosegelen	22
2.6	Manipulation von Nukleinsäuren	22
2.6.1	Restriktion von DNA durch Restriktionsendonukleasen	22
2.6.2	Modifizierung von DNA-Fragmenten	22
2.6.2.1	Glätten überhängender Einzelstrang-Enden von DNA-Fragmenten	22
2.6.2.2	Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten	23
2.6.2.3	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	23
2.6.3	Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren	24
2.6.3.1	Ligation	24
2.6.3.2	Transformation von Ligationsprodukten	24
2.7	Arbeiten mit λ -FIX [®] II-Phagen-genomische-Bibliotheken	24
2.7.1	Titerbestimmung einer λ -FIX [®] II-Phagen-genomische-Bibliothek	24
2.7.2	Ausplattieren von λ -FIX [®] II-Phagen	25
2.7.3	Isolierung von λ -FIX [®] II-Phagen	25
2.8	Nachweis spezifischer Nukleinsäuren	26
2.8.1	Nachweis von DNA	26
2.8.1.1	Transfer und Immobilisierung von DNA auf Nylonmembranen („Southernblot“)	26
2.8.1.2	Transfer und Immobilisierung von λ -FIX [®] II-Phagen-DNA	26
2.8.1.3	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	26
2.8.1.4	Hybridisierung von immobilisierter DNA mit DNA-Sonden und Autoradiographie	27
2.9	Isolierung und Nachweis von RNA	28
2.9.1	Präparation von Geweben zur Isolierung von Poly (A) ⁺ RNA	28
2.9.1.1	Präparation von olfaktorischem Epithel sowie von inneren Organen aus Mäusen	28
2.9.1.2	Präparation von Maus-Hoden und Anreicherung von Keimzellen	28
2.9.2	Isolierung von polyadenylierter RNA	29

2.9.3	Trennung von RNA durch Gelelektrophorese	29
2.9.4	Transfer von RNA auf Membranen („Northernblot“)	30
2.9.5	Herstellung markierter RNA-Sonden	30
2.9.5.1	Radioaktive Markierung von RNA-Sonden	31
2.9.5.2	Nicht-radioaktive Markierung von RNA-Sonden	32
2.9.5.2.1	Digoxigenin Markierung von RNA-Sonden	32
2.9.5.2.2	Psoralen-Biotin Markierung von RNA-Sonden	33
2.9.5.3	Test der Markierung von nicht-radioaktiv markierten RNA-Sonden	33
2.9.6	Hybridisierung immobilisierter RNA mit RNA-Sonden	34
2.9.7	<i>In situ</i> Hybridisierung	35
2.9.7.1	Einbettung von Maus-Hoden in Paraffin	35
2.9.7.2	<i>In situ</i> Hybridisierung an paraffineingebetteten Maus-Hodenschnitten	36
2.10	Synthese von komplementärer DNA (cDNA)	37
2.11	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	38
2.11.1	Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden	38
2.11.2	Bedingungen für die PCR	39
2.11.2.1	PCR mit Plasmid-DNA als Matrize	40
2.11.2.2	Verschachtelte PCR („nested PCR“) mit cDNA als Matrize	40
2.11.2.3	Amplifikation von Sequenzen mit einem hohen Anteil an GC-Nukleotiden	40
2.11.2.4	Reinigung der PCR-Produkte	40
2.12	DNA-Sequenzierung	41
2.12.1	Sequenzierreaktion	41
2.12.2	PCR zur Sequenzierung	41
2.12.3	Acrylamid-Gelelektrophorese zur Sequenzierung	42
2.13	Chromosomale Lokalisierung von Genen mit Hilfe des „radiation hybrid mappings“ (Goss & Harris, 1975)	42
2.14	Membranproteinpräparationen	44
2.14.1	Präparation von Membranproteinen aus COS-1 Zellen	44
2.14.2	Präparation von Membranen aus Hoden sowie Nebenhoden- Spermien der Maus	44
2.15	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	45
2.15.1	Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976)	45
2.15.2	Konzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz	46
2.16	Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese	46
2.16.1	Verwendete Proteinmarker für die SDS-PAGE	47

2.16.2	Färben von SDS-PAGE-Gelen mit der Coomassie-Blaufärbung	47
2.17	Transfer und Nachweis von Proteinen auf Membranen („Westernblot“)	47
2.18	Heterologe Genexpression	48
2.18.1	Kulturbedingungen für HEK 293-Zellen und COS-1 Zellen	48
2.18.2	Transiente Transfektion von HEK 293-/COS-1 Zellen	49
2.19	Immunzytochemie	50
2.19.1	Antikörper	50
2.19.1.1	Primäre Antikörper	50
2.19.1.2	Sekundäre Antikörper	52
2.19.2	Immunzytochemie an transfizierten COS-1 Zellen	52
2.19.3	Immunzytochemie an Nebenhoden-Spermien der Maus	53
2.19.4	Immunhistochemie an paraffineingebetteten Maus-Hodenschnitten	54
2.20	Durchlicht-, Fluoreszenz- und konfokale Mikroskopie	54
3	Ergebnisse	56
3.1	Molekularbiologische Expressionsanalyse von <i>OR</i> -Genen	57
3.1.1	Nachweis von <i>OR</i> -Genen im Maus-Hoden	57
3.1.2	Expression von <i>OR</i> -Transkripten während der Entwicklung des Keimzellepithels	59
3.1.3	Analyse von <i>OR</i> -Transkripten in ausgewählten Geweben	61
3.1.3.1	Expression der <i>OR</i> -Gene im olfaktorischen Epithel	61
3.1.3.2	Expression von <i>OR</i> -Transkripten in Geweben außerhalb des olfaktorischen Epithels	63
3.1.4	Northernblot-Nachweis von <i>OR</i> -Transkripten aus Maus-Hoden	64
3.1.5	Lokalisierung von <i>OR</i> -Transkripten im adulten Maus-Hoden	67
3.1.6	Genomische Klonierung, chromosomale Lokalisierung und heterologe Expression von Duftstoffrezeptoren aus Keimzellen	70
3.1.6.1	Isolierung von Duftstoffrezeptor-Genen	71
3.1.6.1.1	Analyse des <i>TOR13</i> -Gens	71
3.1.6.1.2	Analyse des <i>TORS1</i> -Gens	73
3.1.6.1.3	Chromosomale Lokalisierung des <i>TORS1</i> -Gens	75
3.1.6.1.4	Heterologe Expression des Duftstoffrezeptors TORS1	76
3.1.6.1.5	Westernblot-Analyse des heterolog exprimierten Rezeptors TORS1	79

3.2	Nachweis von Komponenten eines cAMP-vermittelten Signaltransduktionsweges in männlichen Keimzellen	80
3.2.1	Klonierung und immunologischer Nachweis von $G_{\alpha olf}$	80
3.2.2	Immunologische Experimente zum Nachweis der ACIII in männlichen Keimzellen	84
3.3	Nachweis von Signalkomponenten eines cGMP-vermittelten Signalweges	86
3.3.1	Klonierung und immunologischer Nachweis der Guanylylzyklase-D	86
3.3.2	Klonierung der mCNGA3-Untereinheit	92
3.3.3	Klonierung der mCNGB3-Untereinheit	94
4	Diskussion	96
4.1	Nachweis von <i>OR</i> -Transkripten mit Hilfe von RT-PCR	96
4.2	Expression von <i>OR</i> -Genen im präpubertären Maus-Hoden	97
4.3	Molekularbiologische Analyse von <i>OR</i> -Genen im Hoden	98
4.4	An welchen Signalweg koppeln <i>OR</i> in reifen Spermien?	100
4.5	Sind <i>OR</i> Chemorezeptoren in reifen Spermien?	102
4.6	cGMP: Botenstoff einer chemosensorischen Signalkette in Säugetier-Spermien?	103
4.7	Ausblick	105
4.7.1	Duftstoffrezeptor <i>knock out</i>	105
4.7.2	cGMP-vermittelter Signalweg	105
5.1	Zusammenfassung	106
5.2	Abstract	108
6	Literaturliste	110
7	Anhang	125
7.1	Duftstoffrezeptoren	125
7.2	$G_{\alpha olf}$	128
7.3	Adenylylzyklase III	129
7.4	Guanylylzyklase-D	132
7.5	Zapfensehzellen α -Untereinheit (mCNGA3)	134
7.6	Zapfensehzellen β -Untereinheit (mCNGB3)	136

II Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylzyklase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
bCNGA	α -Untereinheit eines CNG-Kanals aus dem Rind („ <u>b</u> ovine“)
bCNGB	β -Untereinheit eines CNG-Kanals aus dem Rind („ <u>b</u> ovine“)
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	3', 5'-zyklisches Adenosinmonophosphat
cCNGA	α -Untereinheit eines CNG-Kanals aus dem Huhn („ <u>c</u> hicken“)
cDNA	revers transkribierte Desoxynukleinsäure
cGMP	3', 5'-zyklisches Guaninmonophosphat
Ci	Curie
CNG	<i>cyclic nucleotide gated</i>
CNGA	α -Untereinheit eines zyklisch-Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals
CNGB	β -Untereinheit eines zyklisch-Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals
CNG-Kanal	Zyklisch-Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal
cNMP-Bindestelle	Bindestelle für zyklische Nukleotide
COS-Zellen	CV-1 Nierenzellen der Affenart <i>Cercopithecus aethiops</i>
cpm	Zählereignisse pro Minute („ <u>c</u> ounts per <u>m</u> inute“)
C-Terminus	Carboxyl-Terminus einer Polypeptidkette
CTP	Cytidintriphosphat
DAB	Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat

DTE	Erythro-1,4-dimercapto-2,3-butandiol
DTT	Threo-1,4-dimercapto-2,3-butandiol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDAC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)Carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoldiamintetraacetat
ETOH	Ethanol
g	Gramm/Erdbeschleunigung
GTP	Guanintriphosphat
GC	Guanylylzyklase
h	Stunde(n)
hCNGA	α -Untereinheit eines CNG-Kanals aus dem Menschen („ <u>h</u> uman“)
HEK 293-Zellen	Zellen der menschlichen embryonalen Nierenzelllinie 293 („ <u>h</u> uman <u>e</u> mbryonic <u>k</u> idney“)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinmethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase („ <u>h</u> orse- <u>r</u> adish- <u>p</u> eroxydase“)
IP₃	Inositoltrisphosphat
KAc	Kalium-Acetat
kB(p)	Kilo-Basenpaar(e)
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
M	molar
mCNGA	α -Untereinheit eines CNG-Kanals aus der Maus („ <u>m</u> ouse“)
mCNGB	β -Untereinheit eines CNG-Kanals aus der Maus („ <u>m</u> ouse“)
min	Minute(n)
MOE	olfaktorisches Epithel („ <u>m</u> ain <u>o</u> lfactory <u>e</u> pithelium“)
MOPS	3-(N- <u>M</u> orpholino)-propansulfonsäure
M_r	relative Molmasse
mRNA	messenger RNA
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
N-Terminus	Amino-Terminus einer Polypeptidkette
OD_n	Extinktion bei der als Index n angegebenen Wellenlänge und einer Schichtdicke von 1 cm
Oligo-dA	Oligo-Desoxyadenylyl
Oligo-dT	Oligo-Desoxythymidyl

OSN	Olfaktorisches-sensorisches Neuron
³²P	radioaktives Phosphorisotop
p.A.	pro analysi
PA	Paraformaldehyd
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid- <u>G</u> e <u>l</u> elektrophorese
PB	0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7.4
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
PCR	Polymerasekettenreaktion („ <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction“)
PDE	Phosphodiesterase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
5'-RACE	„ <u>R</u> apid- <u>a</u> mplification of 5'- <u>c</u> DNA- <u>e</u> nds“
rCNGA	α -Untereinheit eines CNG-Kanals aus der Ratte („ <u>r</u> at“)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde(n)
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Silan	3-Aminopropyltriethoxy Silan
t	Zeit
T	Temperatur
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetram <u>e</u> thylethylend <u>a</u> min
Triethanolamin	2,2',2''-Nitrilotriethanol
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Enzymeinheit (<u>U</u> nit)
ü.N.	über Nacht
ÜNK	„Über-Nacht-Kultur“
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
W	Watt

Es wurden die üblichen Abkürzungen des „Système International“ und dessen Vorsätze zur Bezeichnung von dezimalen Vielfachen und Teilen verwendet.

Aminosäuren sind nach dem Einbuchstabenkode abgekürzt:

Alanin	A	Leucin	L
Arginin	R	Lysin	K
Asparagin	N	Methionin	M
Aspartat	D	Phenylalanin	F
Cystein	C	Prolin	P
Glutamin	Q	Serin	S
Glutamat	E	Threonin	T
Glycin	G	Tryptophan	W
Histidin	H	Tyrosin	Y
Isoleucin	I	Valin	V

Nukleotide innerhalb einer Nukleinsäuresequenz sind durch die Anfangsbuchstaben der Basen bezeichnet (A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin und T: Thymin).

Bezeichnungen von Duftstoffrezeptor-Proteinen sind in Normalschrift, während Duftstoffrezeptor-Gene kursiv dargestellt sind.

1 Einleitung

Der wichtigste Beitrag zur Arterhaltung in höheren eukaryotischen Lebewesen ist die geschlechtliche Fortpflanzung. Sie setzt die Befruchtung der Eizelle durch das Spermium voraus. Das Zusammentreffen der beiden Gameten wird durch chemische Faktoren vermittelt, die von der Eizelle selbst oder vom weiblichen Genitaltrakt stammen. Diese Faktoren steuern das Schwimmverhalten der Spermien in der Nähe der Eizelle und bewirken eine gerichtete Bewegung des Spermiums auf die Eizelle hin. Diesen Prozeß nennt man Chemotaxis.

1.1 Chemotaxis

Chemotaxis ist für prokaryotische und eukaryotische Zellen dokumentiert (Zur Übersicht: Falke *et al.*, 1997; Chung *et al.*, 2001). Unter Chemotaxis versteht man die Orientierung einer Zelle in einem chemischen Gradienten eines Lockstoffs (*attractant*) oder eines abweisenden Stoffs (*repellent*), die dazu führt, daß sich die Zelle auf die Quelle des *attractants* zu oder von der Quelle des *repellents* weg bewegt.

Am besten untersucht ist die Chemotaxis von Bakterien. Sie bewegen sich durch Rotation ihrer Flagellen fort. Bakterien zeigen chemotaktisches Verhalten in Anwesenheit z.B. von Zuckern oder Aminosäuren (Lockstoffe). Die Lockstoffe werden von membranständigen Rezeptoren der Bakterien gebunden (Falke & Hazelbauer, 2001). Die Chemotaxis von Bakterien wird durch ein „zwei Komponenten-System“ gesteuert. Dieses besteht aus einer Histidin-Kinase (Che A) und einer Aspartat-Kinase (Che Y). Hat der membranständige Rezeptor keinen Lockstoff gebunden, aktiviert er Che A. Dieses phosphoryliert sich daraufhin selbst an einem Histidinrest (1. Autophosphorylierung). Diese Phosphorylgruppe wird von Che Y auf einen Aspartatrest in der eigenen Aminosäurekette übertragen (2. Autophosphorylierung). Phosphoryliertes Che Y koppelt an den Flagellenmotor und bewirkt die Rotation der Flagellen im Uhrzeigersinn. Dies führt zum Taumeln der Bakterien. Wenn der membranständige Rezeptor einen Lockstoff gebunden hat, wird Che A nicht aktiviert. Che A autophosphoryliert sich nicht und Che Y bleibt dephosphoryliert. Im nicht-phosphorylierten Zustand von Che Y findet die Kopplung an den Flagellenmotor nicht statt und die Flagellen rotieren gegen den Uhrzeigersinn. In diesem Fall schwimmen die Bakterien geradeaus.

1.1.1 Chemotaxis von Spermien

Spermien schwimmen mit Hilfe eines Flagellums. Anders als bei Bakterien wird die Fortbewegung nicht durch Rotation, sondern durch eine Biegung des Flagellums erreicht, die sich sinusförmig fortpflanzt. Das Flagellum enthält ein zentrales Axonem mit der für Eukaryoten typischen „9+2“-Mikrotubuli-Struktur. Assoziiert mit den Proteinen des Axonems sind Motorproteine (Dyneine), die ATPase-Aktivität besitzen. Durch Hydrolyse von ATP ändert das Dynein seine Konformation und bewirkt, daß benachbarte Mikrotubuli-Dubletts aneinander entlang gleiten. Da im Flagellum die Mikrotubuli-Dubletts von Querverbindungen zusammengehalten werden, können die Mikrotubuli nicht aneinander entlang gleiten. Es kommt statt dessen zu einer Biegung des Flagellums. Wie die Flagellenbewegung genau reguliert wird, ist unklar. cAMP und Ca^{2+} -Ionen scheinen jedoch eine wichtige Rolle zu spielen (Tash, 1989; Brokaw, 1991).

Lockstoffe, die von der Eizelle selbst oder vom weiblichen Genitaltrakt freigesetzt werden, können die Geschwindigkeit des Spermiums (Chemokinesis) und die Richtung, in die das Spermium schwimmt (Chemotaxis), steuern. Die Lockstoffe binden an membranständige Rezeptoren (siehe 1.1.1.1).

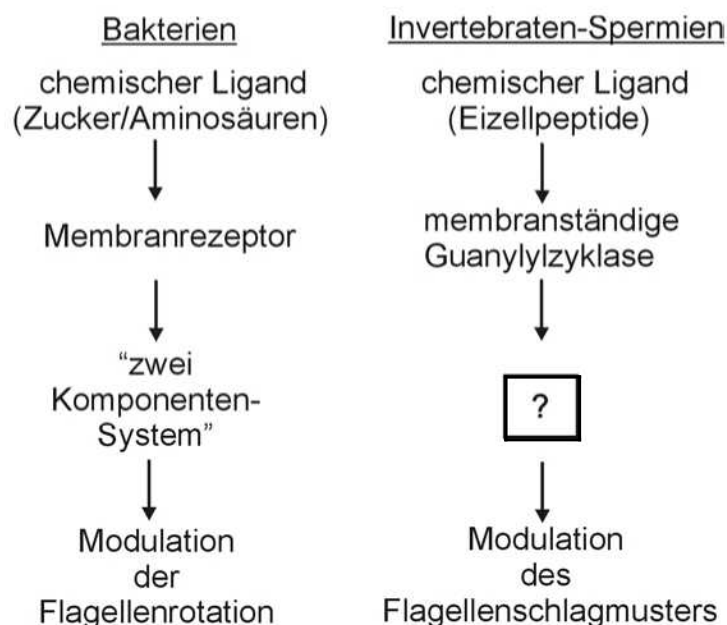


Abb. 1: Vergleich der Signalwege, die eine Chemotaxis von Bakterien bzw. von Invertebraten-Spermien vermitteln. Erläuterungen siehe Text.

Die Signalverarbeitung beruht bei den Invertebraten-Spermien nicht - wie bei den Bakterien - auf einem Phosphoryltransfer, sondern wird durch die sekundären Botenstoffe cGMP, cAMP

und Ca^{2+} (1.1.1.1) vermittelt. Während man schon einige Details der Signalkette, die die Chemotaxis von Invertebraten-Spermien vermittelt, kennt, sind die molekularen Mechanismen der Signalkette, die die Chemotaxis von Säugetier-Spermien vermittelt, völlig unklar.

1.1.1.1 Chemotaxis von Invertebraten-Spermien

Bei marinen Invertebraten, die die Eizellen und Spermien in das Meerwasser abgeben (externe Befruchtung), ist die Chemotaxis gut dokumentiert (Cosson, 1990; Morisawa, 1994). Bereits Anfang des letzten Jahrhunderts wurde von wasserlöslichen Faktoren berichtet, die das Bewegungsmuster (Lillie, 1913) und den Stoffwechsel (Gray, 1928) von Seeigel-Spermien beeinflussen. Diese Eizellstoffe wurden als Peptide identifiziert, die vornehmlich artspezifisch wirken (Hansbrough & Garbers, 1981; Suzuki *et al.*, 1981; Suzuki *et al.*, 1984; Suzuki, 1995). Obwohl mehr als siebzig verschiedene Peptide - hauptsächlich von den Stämmen der *Cnidaria* und *Echinodermata* - identifiziert wurden, sind die membranständigen Rezeptoren der meisten Peptide unbekannt. Außerdem ist ungeklärt, ob all diese Peptide chemotaktisch wirken.

Gut untersucht sind die Eizellpeptide Resact der Seeigel-Art *Arbacia punctulata* und Speract von *Strongylocentrotus purpuratus*. Für Resact konnte eine chemotaktische Wirkung zweifelsfrei nachgewiesen werden (Ward *et al.*, 1985). Für das chemotaktische Verhalten ist ein Ca^{2+} -Einstrom notwendig, da *A. punctulata*-Spermien in Ca^{2+} -freiem Seewasser zwar beweglich sind, aber keine Chemotaxis mehr zeigen. Speract verändert zwar unter speziellen experimentellen Bedingungen das Schwimmverhalten von *S. purpuratus*-Spermien (Cook *et al.*, 1994), seine chemotaktische Wirksamkeit konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die Peptide lösen in Spermien mehrere biochemische Reaktionen aus (Tabelle 1).

Effekt	Referenz
Erhöhung der intrazellulären cAMP/ cGMP-Konzentration	z.B. Hansbrough <i>et al.</i> , 1980; Suzuki <i>et al.</i> , 1981
Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration	z.B. Schackman & Chock, 1986; Cook <i>et al.</i> , 1994
Änderung des pH-Wertes	z.B. Cook & Babcock, 1993a
Änderung der Membranspannung	z.B. Cook & Babcock, 1993a
Steigerung der Respirationsrate	z.B. Shimomura & Garbers, 1986

Tabelle 1: Eizellpeptid-induzierte Effekte in Spermien von Seeigeln (*A. punctulata*, *S. purpuratus*, *Lytechinus pictus*, *Hemicentrotus pulcherrimus*).

Obwohl die Wirkung von Resact und Speract intensiv untersucht wurde (z.B. Repaske & Garbers, 1983; Schackmann & Chock, 1986; Shimomura & Garbers, 1986; Cook & Babcock, 1993; Cook *et al.*, 1994), sind die zeitliche Abfolge der biochemischen Reaktionen und die meisten der beteiligten Signalkomponenten immer noch unklar.

Shimomura und Mitarbeiter identifizierten 1986 den Rezeptor für Resact als eine membranständige Guanylylzyklase, was nahelegte, daß der intrazelluläre Botenstoff cGMP ist (Shimomura & Garbers, 1986). Zeitlich aufgelöste Messungen von intrazellulären Botenstoffen an *S. purpuratus*-Spermien bestätigen diese Annahme. Die Stimulierung von *S. purpuratus*-Spermien mit Speract bewirkt in weniger als 200 ms einen starken Anstieg der cGMP-Konzentration und einen deutlich langsameren (nach ~ 800 ms) und geringeren (~ 4 fachen) Anstieg der cAMP-Konzentration (Godde, Dissertation, Regensburg, 1996).

Die Stimulierung mit Resact bzw. Speract führt zu einem Ca^{2+} -Einstrom (Schackman & Chock, 1986; Cook & Babcock, 1993b, Cook *et al.*, 1994). Der Ca^{2+} -Einstrom wird größer und dauert länger, wenn die Spermien mit Substanzen inkubiert werden, die den Abbau von cGMP und cAMP in der Zelle verhindern (Cook & Babcock, 1993b). Es ist noch unbekannt, durch welchen Ionenkanal der zyklisch-Nukleotid-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom erfolgt.

Picomolare Konzentrationen von Speract führen in *S. purpuratus*-Spermien dazu, daß K^{+} -selektive Ionenkanäle öffnen (Babcock *et al.*, 1992), mutmaßlich durch eine Erhöhung der cGMP-Konzentration (Cook & Babcock, 1993a; Galindo *et al.*, 2000). Der Ausstrom von K^{+} -Ionen führt zur Hyperpolarisation der Spermienzelle. Die Hyperpolarisation aktiviert einen $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ -Austauscher (Lee & Garbers, 1986), der Protonen aus dem Spermium transportiert, wodurch der intrazelluläre pH-Wert ansteigt. Dies führt zur Stimulierung der Adenylylzyklase (AC) (Cook & Babcock, 1993b). Infolge dessen kommt es zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration (Cook & Babcock, 1993a, b). Einer anderen Arbeitsgruppe nach wird die AC direkt - wie die AC aus Paramecium (Schultz *et al.*, 1992) - durch die Hyperpolarisation der Zelle aktiviert (Beltran *et al.*, 1996).

Bei Speract-Konzentrationen über 100 pM folgt dem cGMP-vermittelten K^{+} -Ausstrom ein Einstrom von Na^{+} - und Ca^{2+} -Ionen. *S. purpuratus*-Spermien enthalten einen cAMP-regulierten Ionenkanal, der für K^{+} - und Na^{+} -Ionen permeabel ist (Labarca *et al.*, 1996). Dieser Kanal entspricht wahrscheinlich einem hyperpolarisations-aktivierten, zyklisch-Nukleotid-regulierten Kanal (SPIH), der in den Flagellen von *S. purpuratus*-Spermien nachgewiesen wurde (Gauss *et al.*, 1998). Eine Aktivierung dieses Kanals könnte zu einem Na^{+} -Einstrom führen, der die Spermienzelle depolarisiert. In Folge der Depolarisation könnten dann spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle aktiviert werden. In Seeigelspermien sind

verschiedene spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle exprimiert, die jedoch vorwiegend mit der akrosomalen Exozytose in Verbindung gebracht werden (Übersicht: Darszon *et al.*, 1999).

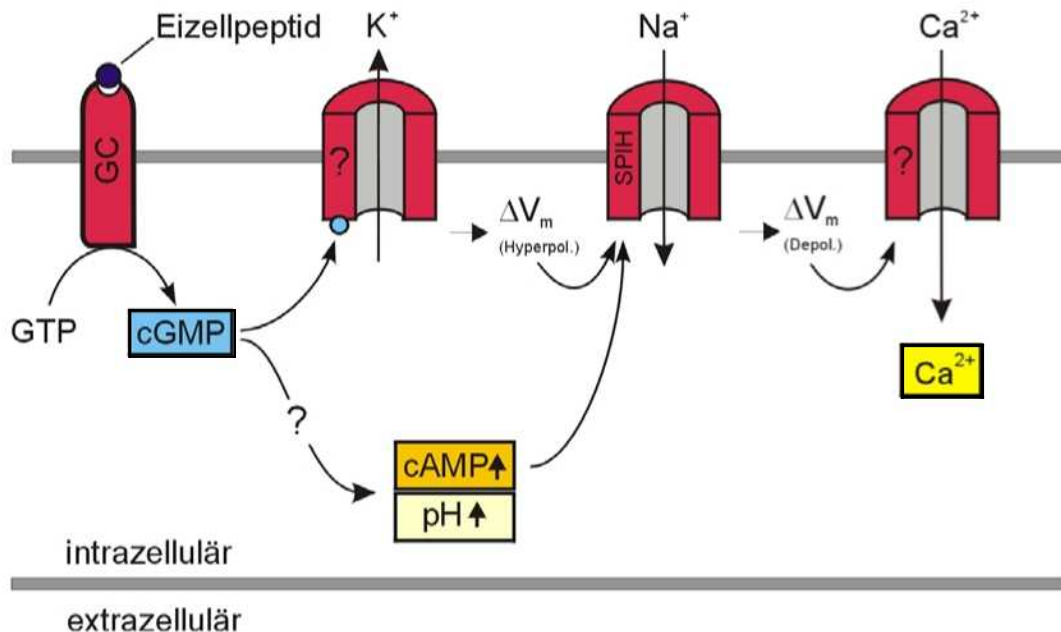


Abb. 2: Modell zur Eizellpeptid-induzierten Signaltransduktion in Seeigel-Spermien.

Das Eizellpeptid bindet an einen Rezeptor, der – im Falle von Resact – eine membranständige Guanylylzyklase (GC) ist. Die GC wird durch Bindung des Peptids aktiviert, wodurch die intrazelluläre cGMP-Konzentration ansteigt. Infolge dessen kommt es durch einen K^+ -Ausstrom zu einer Hyperpolarisation der Zelle. Der SPIH-Kanal wird durch Hyperpolarisation geöffnet, Na^+ -Ionen strömen zelleinwärts und die Spermienzelle depolarisiert. Hierdurch öffnen spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle und die Ca^{2+} -Konzentration steigt an. Welche Rolle dem Anstieg des pH-Wertes und der cAMP-Konzentration in der oben geschilderten Signalkette zukommt wird zur Zeit kontrovers diskutiert. (Einzelheiten siehe Text).

1.1.1.2 Chemotaxis von Säugetier-Spermien

Bei Säugetieren werden die Spermien direkt in den weiblichen Genitaltrakt abgegeben (Abb. 3). Von der Vagina aus passieren die Spermien zunächst den Uterus und dann den Isthmus des Eileiters. Sie treffen in der Ampulle des Eileiters auf die Eizelle. Von etwa $4 - 40 \times 10^7$ Spermien, die in die menschliche Vagina abgegeben werden, erreichen weniger als 1000 die Ampulle des Eileiters.

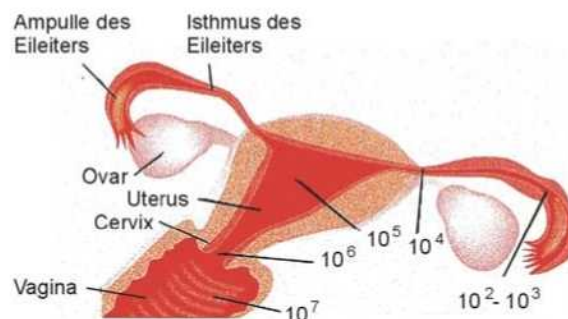


Abb. 3: Darstellung des weiblichen Genitaltraktes. Angegeben ist die Anzahl an Spermien, die in den Abschnitten des weiblichen Genitaltraktes (Mensch) nach der Ejakulation zu finden ist. (Verändert nach: Eisenbach & Tur-Kaspa, 1999).

Über die Chemotaxis von Säugetier-Spermien ist noch sehr wenig bekannt. Es wurde gezeigt, daß menschliche Spermien (Ralt *et al.*, 1994; Cohen-Dayag *et al.*, 1994) wie auch Mäuse-Spermien (Giojalas & Rovasio, 1998; Oliveira *et al.*, 1999) auf Follikelflüssigkeit chemotaktisch reagieren. Bisher sind weder die chemotaktisch wirksamen Faktoren noch die entsprechenden membranständigen Rezeptoren in Spermien identifiziert worden. Eine experimentelle Schwierigkeit besteht darin, daß nur etwa 10 % der Spermien zu einem gegebenen Zeitpunkt chemotaktisch reagieren (Cohen-Dayag *et al.*, 1994; Giojalas & Rovasio, 1998). Es handelt sich um sogenannte *kapazitierte* Spermien (Cohen-Dayag *et al.*, 1995). Unter Kapazitierung versteht man eine Reifung der Spermien im Eileiter, die sie befähigt, das Ei zu befruchten. Diese Fähigkeit erlangen Spermien nur vorübergehend (50 min – 4 h, Cohen-Dayag *et al.*, 1994). Der geringe Prozentsatz an Spermien, die zu einem gegebenen Zeitpunkt chemotaktisch aktiv sind, erschwert es, eine zuverlässige statistische Aussage über das Schwimmverhalten zu machen (Zur Übersicht: Eisenbach, 1999).

Über die molekularen Mechanismen, die der Chemotaxis von Säugetier-Spermien zu Grunde liegen, kann nur spekuliert werden. Man nimmt an, daß der Signalweg, der die Chemotaxis vermittelt, letztlich dazu führt, daß die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ansteigt. Ca^{2+} -Ionen spielen nämlich eine wichtige Rolle bei der Flagellenbewegung (Brokaw, 1991). Zudem findet eine Chemotaxis von Seeigel-Spermien nur nach einem Ca^{2+} -Einstrom statt (Ward *et al.*, 1985).

Derzeitige Hypothesen orientieren sich an den Mechanismen der Chemorezeption in olfaktorischen sensorischen Neuronen (OSN) (siehe Box).

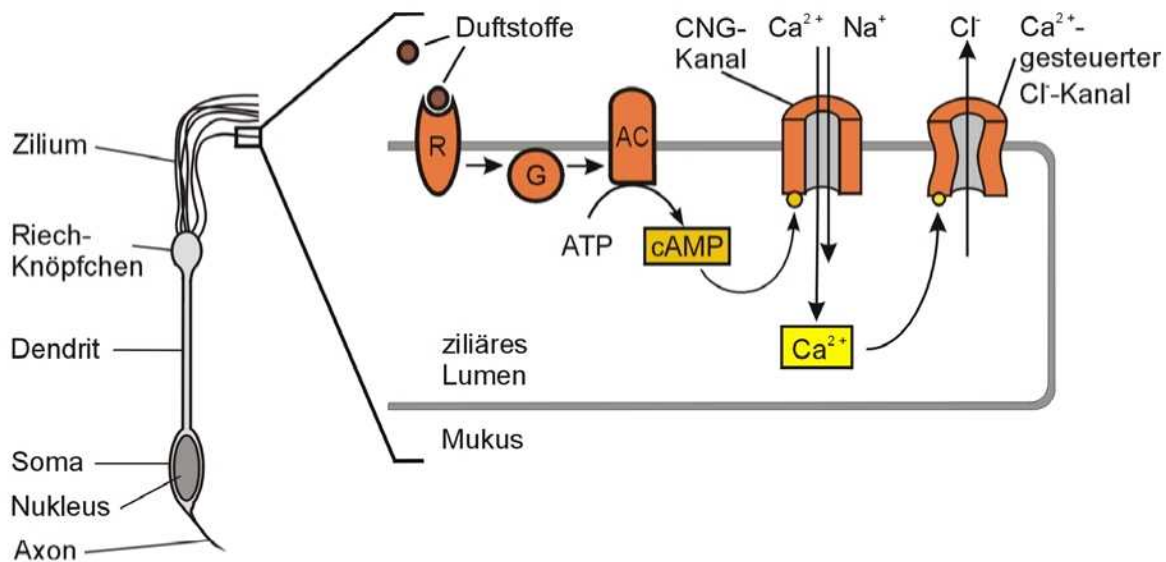
In den meisten OSN binden die Duftstoffe an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (odorant receptors, OR). Diese aktivieren einen cAMP-vermittelten Signalweg (Box, a, Abb. 4)

In einer Subpopulation von OSN stellen sehr wahrscheinlich membranständige Guanylylzyklasen (GC) die Duftstoffrezeptoren dar (Box, b, Abb. 5). Die GC steht am Anfang eines cGMP-vermittelten Signalweges.

Box: Signaltransduktion in Riechzellen

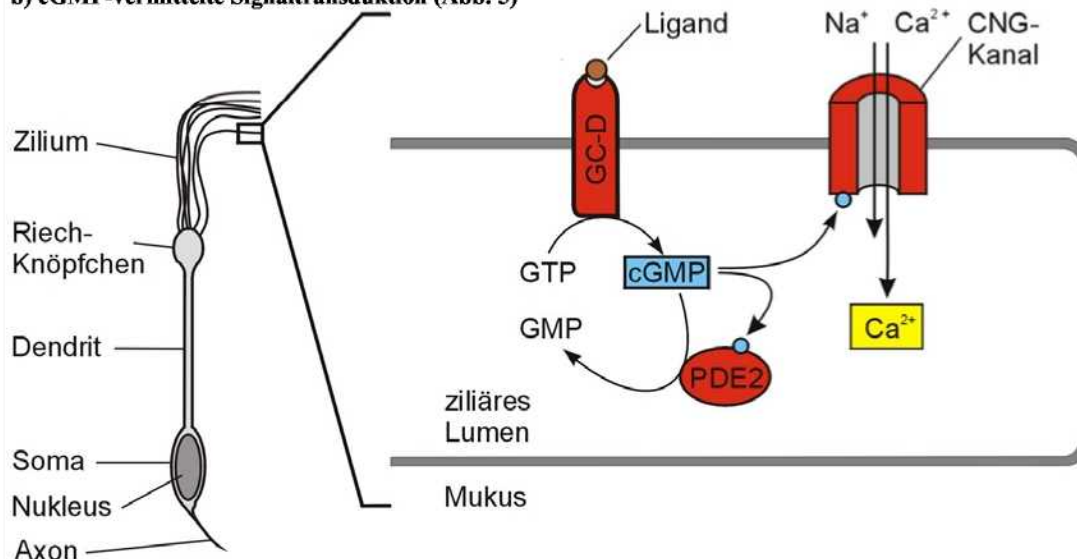
a) cAMP-vermittelte Signaltransduktion (Abb. 4)

Die Wahrnehmung von Duftstoffen wird in Wirbeltieren durch spezialisierte Neurone (OSN, olfactory sensory neuron) vermittelt. OSN sind bipolare Neurone, die einen chemischen Reiz (Duftstoff) in ein elektrisches Signal (Depolarisierung) umwandeln. Die Signaltransduktion findet in den Zilien statt.



Die Duftstoffe lösen sich im Mukus und binden an Duftstoffrezeptoren (R), die sich in der Zilienmembran befinden. Der aktivierte Duftstoffrezeptor aktiviert ein stimulatorisches G-Protein, G_{olf} (G). G_{olf} aktiviert seinerseits die Adenylzyklase vom Typ III (AC), was zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt. Dadurch werden zyklisch-Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle, die von den CNG-Kanal Untereinheiten A2, A4 und B1b gebildet werden, in der Zilienmembran geöffnet. Es kommt zu einem Einstrom von Na⁺- und Ca²⁺-Ionen in die Zilien, wodurch die Riechzelle depolarisiert. Die Depolarisation wird durch einen Ausstrom von Cl⁻-Ionen verstärkt. Der Cl⁻-Ausstrom erfolgt durch Ca²⁺-gesteuerte Cl⁻-Kanäle. Die durch den Cl⁻-Ausstrom verstärkte Depolarisation (*Rezeptorpotential*) löst schließlich ein Aktionspotential aus. Dieses wird über das Axon an übergeordnete Neurone im olfaktorischen Bulbus weitergeleitet (Übersicht: Gold, 1999; Nakamura, 2000; Frings, 2001).

b) cGMP-vermittelte Signaltransduktion (Abb. 5)



In einigen Arbeiten wurde eine Duftstoff-induzierte Erhöhung der cGMP-Konzentration in OSN festgestellt (Breer *et al.*, 1992; Kroner *et al.*, 1996; Moon *et al.*, 1998). Unklar ist, ob cGMP eine Rolle bei der Signaltransduktion in den prototypischen OSN (siehe a) spielt. In einer kleinen Subpopulation von OSN scheint

cGMP der alleinige Botenstoff zu sein (Juilfs *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2000). In diesen Riechzellen wird eine Rezeptor-Guanylylzyklase exprimiert (GC-D), die zur Familie der Peptid-aktivierten Guanylylzyklasen gehört (Fülle *et al.*, 1995). Ferner ist in diesen OSN eine cGMP-stimulierte PDE (PDE2: Juilfs *et al.*, 1997) und ein selektiv durch cGMP regulierter CNG-Kanal (Untereinheit A3) exprimiert (Meyer *et al.*, 2000). Die Komponenten des prototypischen, cAMP-vermittelten Signalweges, G_{olf} , ACIII sowie die CNG-Kanal Untereinheiten A2 und B1b konnten in dieser Subpopulation von OSN nicht nachgewiesen werden (Juilfs *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2000). Über den Liganden der GC-D und die Funktion dieser Neurone kann zur Zeit nur spekuliert werden. Es wird vermutet, daß diese OSN nicht an der Wahrnehmung von Duftstoffen teilnehmen, sondern Faktoren (Pheromone) erkennen, die das Reproduktions-/Sozialverhalten beeinflussen. Hinweise hierauf gibt die Verknüpfung der „GC-D“-OSN mit den sogenannten atypischen Glomeruli (*necklace* Glomeruli) (Juilfs *et al.*, 1997), denen in Rattenjungen eine Funktion beim Säugetverhalten zugeschrieben wird (Teicher *et al.*, 1980; Greer *et al.*, 1982).

1. Hypothese: In den männlichen Keimzellen unterschiedlicher Spezies kommen Duftstoffrezeptoren (OR) vor (Parmentier *et al.*, 1992; Vanderhaeghen *et al.*, 1993; Walensky *et al.*, 1995; Asai *et al.*, 1996; Vanderhaeghen *et al.*, 1997a, b; Walensky *et al.*, 1998; Branscomb *et al.*, 2000). Die OR könnten Lockstoffrezeptoren darstellen. Die Liganden der OR in Keimzellen sind unbekannt. Die OR gehören zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Sie repräsentieren die zur Zeit größte bekannte Gen-Familie mit bis zu 1000 Genen in Nagern (Buck, 1992, Carmel *et al.*, 2001). Man schätzt, daß etwa 50 OR-Gene in den männlichen Keimzellen von Nagern exprimiert werden (Vanderhaeghen *et al.*, 1997b). OR-Gene besitzen keine Introns und sind in Gruppen (*Clusters*) auf verschiedene Chromosomen verteilt (Sullivan *et al.*, 1996, Fuchs *et al.*, 2001). Außer in Riech- und Keimzellen werden OR auch in verschiedenen anderen Geweben exprimiert (Zur Übersicht: Dreyer, 1998).

Die Rezeptorproteine besitzen einen extrazellulären N- und einen intrazellulären C-Terminus, sowie 7 transmembranale Domänen (TM, Abb. 6). Die transmembranalen Domänen 3 – 5 zeichnen sich durch eine besonders hohe Variabilität der Aminosäuren aus (Pilpel & Lancet, 1999). Wahrscheinlich sind die transmembranalen Domänen an der Ligandenbindung beteiligt (Strader *et al.*, 1994). Neben den hoch-variablen Aminosäure-Bereichen lassen sich in den Rezeptoren auch konservierte Aminosäuresequenz-Motive erkennen (Skoufos, 1999; Pilpel & Lancet, 1999). Die konservierten Aminosäuresequenz-Motive in I2/I3 und dem C-Terminus sind sehr wahrscheinlich an der Kopplung zwischen dem aktivierten Rezeptor und einem G-Protein beteiligt (siehe Box, a).

Als potentielle Zielproteine für cAMP in Spermien kommen mehrere Proteine in Frage:

- Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) II wurde immunzytochemisch in Flagellen von Maus-Spermien (Burton *et al.*, 1999) lokalisiert. Eine cAMP-vermittelte Phosphorylierung von Flagellenproteinen spielt eine Rolle bei der Regulation der Motilität (Tash, 1989).
- Die Aktivität von kleinen monomeren GTPasen wird durch sogenannte Guanine nucleotide exchange factors (GEFs) reguliert. Vor kurzem wurde eine neue Klasse von GEFs identifiziert, die durch cAMP aktiviert werden (de Rooji *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998). Monomere GTPasen sind an der akrosomalen Exozytose (Rab3a, Iida *et al.*, 1999; Yunes *et al.*, 2000; Michaut *et al.*, 2000) und an der Spermienmotilität (Rho, Hinsch *et al.*, 1993) beteiligt. Es ist allerdings noch unbekannt, ob cAMP-regulierte GEFs in Spermien vorkommen.
- Ein weiteres Zielprotein könnte ein zyklisch-Nukleotid-regulierter Ionenkanal sein. Vor kurzem wurden in Flagellen von Mäuse-Spermien Ionenkanal-Untereinheiten (CatSper, Ren *et al.*, 2001; CatSper2, Quill *et al.*, 2001) lokalisiert, die eine große Ähnlichkeit zu einer einzelnen Domäne von spannungsaktivierten Ca^{2+} -Kanälen haben. In Spermien von Mäusen kann durch Applikation von Membran-permeablen Analoga von cAMP oder cGMP ein Ca^{2+} -Einstrom induziert werden. Dieser ist in Mäusen, denen die CatSper Kanaluntereinheit fehlt, nicht mehr festzustellen. Die Spermien der *knock-out* Mäuse besitzen eine reduzierte Motilität und die Mäuse sind infertil (Ren *et al.*, 2001). CatSper und CatSper2 selbst besitzen keine Bindestelle für zyklische Nukleotide; vielleicht sind CatSper und CatSper2 Untereinheiten eines noch unbekannten zyklisch-Nukleotid-regulierten Ca^{2+} -Kanals.
- Es gibt Hinweise darauf, daß das Gen eines hyperpolarisations-aktivierten, cAMP-regulierten Ionenkanals (HCN4-Kanal) im Hodengewebe von Säugetieren transkribiert wird (Seifert *et al.*, 1999). Der HCN4-Kanal ist verwandt mit dem SPIH-Kanal, der in den Flagellen von *S. purpuratus*-Spermien nachgewiesen wurde (1.1.1.1). Die Aktivierung eines HCN-Kanals könnte zu einer Depolarisation der Spermienzelle und infolge dessen zum Öffnen von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen führen, die in Spermien nachgewiesen werden konnten (Westenbroek *et al.*, 1999; Wennemuth *et al.*, 2000). Unbekannt ist, ob ein Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle tatsächlich an der Regulation der Chemotaxis von Säugetier-Spermien beteiligt ist.

Abb. 7 zeigt zusammenfassend die hypothetischen cAMP-vermittelten Signalwege, die zu einem Ca^{2+} -Einstrom in Säugetier-Spermien führen könnten.

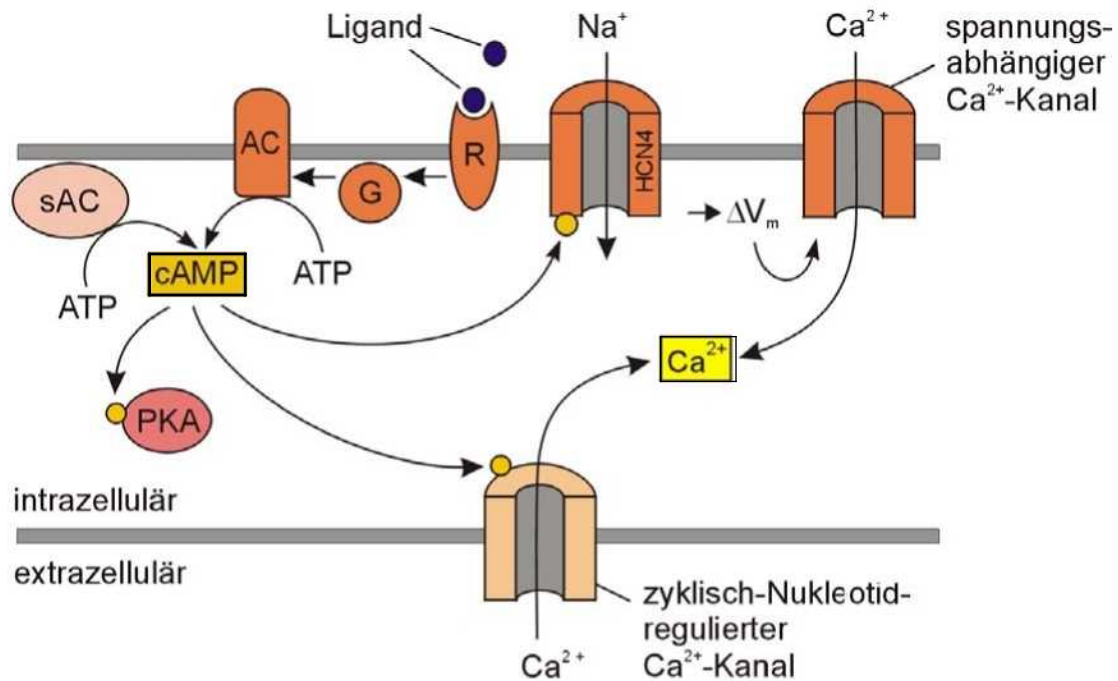


Abb.7: Schematische Darstellung von cAMP-vermittelten Signalwegen in Säugetier-Spermien.

cAMP könnte einerseits zur Aktivierung der Protein-Kinase A (PKA) und andererseits zu einem Ca^{2+} -Einstrom durch zyklisch-nukleotid-regulierte Ca^{2+} -Kanäle oder spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle führen. Die Signalwege sind im Text beschrieben. R: Duftstoffrezeptor, G: G-Protein (G_{olf}), ACIII: Adenylatcyclase III, HCN4: Hyperpolarisations-aktivierter, cAMP-regulierter Ionenkanal Typ 4, PKA: Protein Kinase A, sAC: lösliche Adenylatcyclase.

2. Hypothese: Eine alternative Arbeitshypothese basiert auf Rezeptor-Guanylylzyklasen (GC) als Lockstoffrezeptoren. In Spermien des Seeigels *A. punctulata* wurde eine membranständige GC als Rezeptor für das chemotaktisch wirksame Peptid Resact identifiziert (Ward *et al.*, 1985; Shimomura *et al.*, 1986, siehe 1.1.1.1). In den Flagellen von menschlichen Spermien konnte eine Rezeptor-Guanylylzyklase vom Typ A (ANP-Rezeptor, atrial natriuretic peptide-Rezeptor) lokalisiert werden (Silvestroni *et al.*, 1992). ANP ist Bestandteil der menschlichen Follikelflüssigkeit (Sundsford *et al.*, 1989; Steegers *et al.*, 1990) und es wirkt chemotaktisch und chemokinetisch auf menschliche Spermien (Zamir *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1995). ANP scheint allerdings nicht der genuine chemotaktisch wirksame Faktor zu sein, da die chemotaktische Wirksamkeit der Follikelflüssigkeit nicht mit ihrer ANP-Konzentration korreliert ist (Anderson *et al.*, 1995).

In Analogie zur cGMP-vermittelten Signaltransduktion in OSN könnte auch eine GC-D als „Lockstoff“-Rezeptor in Spermien fungieren. Sie könnte durch die Bindung von chemotaktisch wirksamen Faktoren aktiviert werden und cGMP synthetisieren. cGMP könnte seinerseits Ca^{2+} -permeable Ionenkanäle in den Spermien öffnen:

In den Flagellen von Rinder-Spermien konnte ein cGMP-gesteuerter Ionenkanal nachgewiesen werden (bCNGA3) (Weyand *et al.*, 1994; Wiesner *et al.*, 1998). Aktiviert man diese Kanäle mit cGMP, kommt es zu einem Ca^{2+} -Einstrom (Wiesner *et al.*, 1998). Auch in Maus-Spermien konnte durch Applikation von Membran-permeablen Analoga von zyklischen Nukleotiden ein Ca^{2+} -Einstrom ausgelöst werden, der deutlich empfindlicher für cGMP als für cAMP ist (Kobori *et al.*, 2000). Der Ca^{2+} -Einstrom könnte das Schwimmverhalten der Spermien während der Chemotaxis regulieren.

In Abb. 8 ist der hypothetische cGMP-vermittelte Signalweg aus Säugetier-Spermien dargestellt.

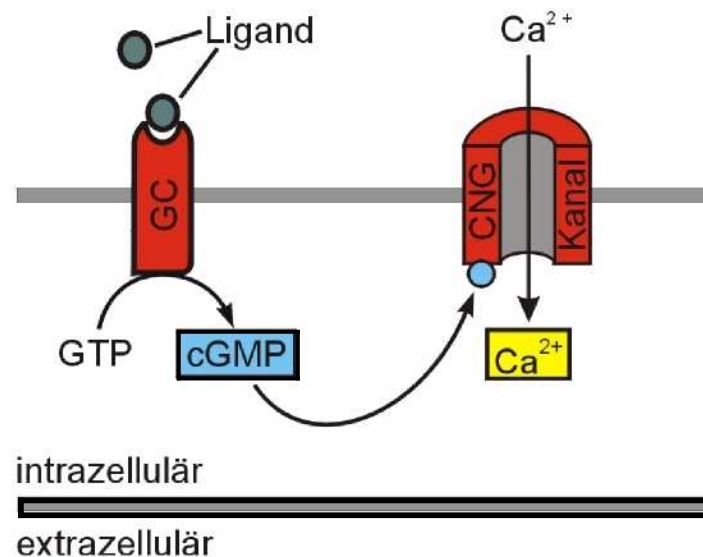


Abb. 8: cGMP-vermittelter Signalweg in Säugetier-Spermien. Der cGMP-vermittelte Signalweg könnte durch Aktivierung eines CNG-Kanals zu einem Ca^{2+} -Einstrom führen. GC: Guanylylzyklase, CNG-Kanal: zyklisch-Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal.

1.2 Zielsetzung

Säugetier-Spermien reagieren chemotaktisch auf Faktoren, die von der Follikelflüssigkeit stammen. Bislang konnten weder die chemotaktisch wirksamen Faktoren noch die entsprechenden membranständigen Rezeptoren der Spermien identifiziert werden. Derzeitige Hypothesen über die chemotaktische Signalkette in Spermien orientieren sich an den Signalwegen zur Wahrnehmung von Duftstoffen in Riechzellen. So werden G-Protein gekoppelte Duftstoffrezeptoren als Chemorezeptoren in Säugetier-Spermien diskutiert.

Mit Hilfe eines Gen *knock outs* könnte man Hinweise auf die Funktion von Duftstoffrezeptoren in Spermien erhalten. Um ein geeignetes Duftstoffrezeptor-Gen für einen *knock out* zu identifizieren, soll mit molekularbiologischen Methoden die Expression von Duftstoffrezeptor-Genen im Hoden untersucht werden. Es soll untersucht werden, ob mehrere Duftstoffrezeptor-Gene in Keimzellen exprimiert sind und ob ein Gen am stärksten exprimiert ist. Die Transkripte dieses Duftstoffrezeptor-Gens sollen durch *in situ* Hybridisierung zellulär lokalisiert und das entsprechende Gen kloniert und chromosomal kartiert werden.

Die chemotaktische Signalkette in Spermien muß neben Duftstoffrezeptoren weitere Signalkomponenten umfassen. Durch molekularbiologische und immunologische Experimente soll untersucht werden, ob - so wie in Riechzellen - stimulatorische G-Proteine und die Adenylylzyklase III in Spermien exprimiert sind.

Alternativ zu den Duftstoffrezeptoren könnten, so wie in Invertebraten-Spermien, membranständige Guanylylzyklasen als Rezeptoren für chemotaktisch wirksame Faktoren fungieren. Mittels molekularbiologischer und immunologischer Methoden soll untersucht werden, ob eine membranständige Guanylylzyklase in Spermien exprimiert ist.

2 Material & Methoden

Alle in dieser Arbeit benutzten Methoden wurden, soweit nicht anders vermerkt, aus SAMBROOK *et al.* (1989) übernommen oder in Anlehnung daran modifiziert.

2.1 Material

Die verwendeten Chemikalien wurden in p.A.-Qualität von den Firmen Ambion (Austin/USA), Amersham (Braunschweig), Appli-Chem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Biorad (München), Biozym (Oldendorf), Difco (Detroit/USA), Invitrogen (Leek, Niederlande), Merck (Darmstadt), MWG (Ebersberg), Pharmacia (Freiburg), Pierce (über KMF, Bonn), Qiagen (Hilden), Renner (Darmstadt), Riedel-de Haën (Seelze), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Enzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von Fermentas (Produkte werden durch NEB vertrieben), GIBCO BRL (Eggenstein), ITC (Heidelberg), NEB (Schwalbach), Pharmacia (Freiburg), Promega (Heidelberg), Roche (Mannheim), Santa Cruz (Heidelberg), Stratagene (Heidelberg) und USB (Bad Homburg) geliefert.

Für den Transfer von Nukleinsäuren wurden Membranen von Qiagen (Hilden) verwendet. Proteine wurden auf die PVDF-Membran Immobilon P der Firma Millipore (Eschborn) transferiert.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang aufgeführt.

2.2 Versuchstiere

Proteine und DNA bzw. RNA wurden aus Mäusen der Stämme 129/SV J (Jackson) und P (Pasteur) isoliert.

Zur Präparation von RNA aus Hoden (2.9.1.2) wurden zusätzlich die Mausstämme NMRI, C3H und B6 eingesetzt.

2.3 *Escherichia coli*-Zellkultur

2.3.1 Verwendete *E. coli* K12-Bakterienstämme

XL1-Blue: *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac,*
[F' *proAB, lacI^qZ M15, Tn10(tet^r)*]; dieser Stamm wurde zur An-
reicherung von Plasmid-DNA eingesetzt.

XL1-Blue MRA: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1$
gyrA96 relA1 lac; dieser Stamm wurde zur Ausplattierung der λ -
FIX[®]II-genomische-Bibliothek verwendet.

2.3.2 Verwendete Plasmid-Vektoren

Das Plasmid pBluescript-SK⁻ bzw. -KS⁻ (SHORT *et al.*, 1988) wurde als Plasmid-Vektor für die Klonierung von rekombinanter DNA und PCR-Fragmenten verwendet.

Für die Synthese von Sonden, die in Northernblot- bzw. in *in situ* Hybridisierungs-Experimenten (3.1.4, 3.1.5) eingesetzt wurden, wurde ein modifiziertes pBluescript-KS⁻ Plasmid verwendet. In diesem Vektor waren die GC reichen Sequenzen der *multiple cloning site* (MCS) entfernt (3.1.4). Die Bezeichnung dieses Vektors ist pBISH. Die Klonierung in diesen Vektor konnte über die Schnittstellen HindIII und EcoRI (5' überhängende Enden, *sticky*) oder über die zwischen diesen Schnittstellen gelegene EcoRV Erkennungsstelle (glatte Enden, *blunt*) erfolgen.

Zur Transfektion eukaryotischer Zellen wurden die Vektoren pSVL und pcDNAI/Amp (Pharmacia bzw. Invitrogen) eingesetzt. Als Zelllinien wurden die adenovirustransformierte Nierenzelllinie 293 (HEK 293; GRAHAM *et al.*, 1977) sowie COS-1 Zellen (Gething & Sambrook, 1981) verwendet.

2.3.3 Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für *E. coli*

Zur Kultivierung von *E. coli* wurden folgende Medien verwendet:

<u>LB (Luria Bertani)- Medium</u>	<u>LB-Agar-Platten</u>	<u>NZY-Medium</u>	<u>NZY-Top-Agar</u>	<u>NZY-Agarplatten</u>
1 % Baktotrypton	LB-Medium	1 % NZ-Amine	NZY-Medium	NZY-Medium
0,5 % Hefeextrakt	1,5 % Agar	0,5 % Hefeextrakt	0,75 % Agarose	1,5 % Agar
1 % NaCl		0,5 % NaCl		
		0,2 % MgSO ₄ ·7H ₂ O		

Die Flüssigmedien wurden autoklaviert (20 min, 121 °C) und bei 4 °C gelagert. Die Lösungen für die Agarplatten wurden autoklaviert und auf Petrischalen verteilt. Bei Bedarf wurde Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) kurz vor dem Gießen der Platten in den auf 60 °C temperierten Agar gegeben. Die Platten wurden zunächst ü.N. bei RT, danach bei 4 °C gelagert. NZY-Top-Agar wurde autoklaviert und aufgeteilt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.3.4 Anzucht von *E. coli*-Bakterienkulturen

2.3.4.1 Anzucht von *E. coli*-Zellen zur Plasmidpräparation

E. coli-Zellen einer Bakterienkolonie oder einer Vorkultur wurden 12 h in 5 - 250 ml LB-Medium bei 37 °C in einem Rotationsinkubator (New Brunswick) oder in einem Warmluftschüttler (Braun-Dissel) vermehrt. Zur Selektion der Plasmidvektoren wurde das Medium mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt.

2.3.4.2 Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation mit Plasmid-DNA

Kompetente Zellen wurden durch eine Modifikation der CaCl₂-Methode nach Mandel & Higa (1970) hergestellt. Eine frisch inokulierte *E. coli*-Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,4 angezüchtet, auf Eis abgekühlt und nach Zentrifugation (5 min, 3.000 g, 4 °C) in 1/2 Kulturvolumen eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut sedimentiert, in 1/10 Kulturvolumen eiskalter 100 mM CaCl₂, 25 % Glycerin-Lösung resuspendiert und für ca. 4 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden bei –80 °C gelagert.

2.3.4.3 Herstellung von „Mg²⁺-Zellen“ zur Infektion mit λ-FIX[®] II-Phagen-DNA

E. coli-Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1,0 in LB-Medium mit 10 mM MgSO₄, 0,2 % Maltose angezüchtet, zentrifugiert (5 min, 3.000 g, RT) und in 10 mM MgSO₄ resuspendiert, so daß die Lösung eine OD₆₀₀ von 10 aufwies. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.4 DNA-Präparationen

2.4.1 Plasmid-DNA-Präparationen

Die DNA wurde grundsätzlich in TE bzw. TE/RNase aufgenommen:

TE: 10 mM Tris/HCl pH 7,5 - 8,0, 1 mM EDTA

TE/RNase: TE mit RNasemix (5 µl/ml) (Ambion, Austin/USA).

2.4.1.1 Minipräparation durch alkalische Lyse nach Birnboim & Doly (1979)

Die Bakterienzellen (1,5 ml einer Übernachtkultur, ÜNK) wurden durch Zentrifugation pelletiert (1 min, 17.000 g, 4 °C) und in 50 µl Lösung I resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 60 µl Lösung II lysiert. Proteine, chromosomale DNA und SDS wurden mit 75 µl Lösung III gefällt und durch Zentrifugation (10 min, 17.000 g, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand wurde gegebenenfalls mit Phenol extrahiert (2.5.1). Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 550 µl Ethanol präzipitiert und durch Zentrifugation (10 min, 17.000 g, 4 °C) sedimentiert. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen (2 min, 17.000 g, 4 °C). Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl TE aufgenommen.

Lösung I: 50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl pH 8,0

Lösung II: 0,2 M NaOH, 1 % SDS

Lösung III: 3 M KAc pH 4,8

2.4.1.2 Alkalische LiCl-Minipräparation

Die Bakterienzellen (5 ml einer ÜNK) wurden pelletiert (1 min, 17.000 g, 4 °C) und in 150 µl Lösung I resuspendiert. Durch Zugabe von 180 µl Lösung II wurden die Zellen lysiert. Proteine, chromosomale DNA und SDS wurden durch Zugabe von 225 µl Lösung III

präzipitiert und dann abzentrifugiert (5 min, 17.000 g, 4 °C). Die Plasmid-DNA wurde mit 1,5 ml Ethanol aus dem Überstand präzipitiert (5 min, 17.000 g, 4 °C). Das Pellet wurde in 60 µl 30 mM Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert. Durch Zugabe von 100 µl 4 M LiCl und anschließender Zentrifugation (5 min, 17.000 g, 4 °C) wurde die RNA abgetrennt. Die DNA des Überstandes wurde mit 500 µl eiskaltem Ethanol präzipitiert und abzentrifugiert (5 min, 17.000 g, 4 °C). Nach Waschen mit 70 % Ethanol wurde das Pellet in 20 µl TE/RNase aufgenommen und 20 min bei 37 °C inkubiert.

2.4.1.3 Alkalische LiCl-Präparation im großen Maßstab

Die DNA wurde aus 250 ml Bakterienkultur präpariert. Die Bakterienzellen wurden pelletiert (10 min, 5.000 g, 4 °C), in 20 ml Lösung I resuspendiert und mit 24 ml Lösung II lysiert. Proteine, chromosomale DNA und SDS wurden durch Zugabe von 30 ml Lösung III gefällt und pelletiert (10 min, 5.000 g, 4 °C). Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen an Isopropanol versetzt und zentrifugiert (10 min, 5.000 g, 4 °C). Anschließend wurde das Nukleinsäure-Pellet in 1,45 ml Wasser resuspendiert. Durch Zugabe von 2,5 ml 4 M LiCl und 50 µl Tris/HCl pH 7,5 wurde die RNA gefällt und durch Zentrifugation abgetrennt (10 min, 5.000 g, 4 °C). Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 10 ml Ethanol aus dem Überstand gefällt. Nach Zentrifugation (15 min, 5.000 g, 4 °C) wurde das Pellet in 500 µl TE/RNase resuspendiert und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch Phenol-Extraktion (2.5.1) und Ethanol-Präzipitation (2.5.2) gereinigt. Das Pellet wurde getrocknet und in 300 µl TE aufgenommen.

2.4.2 Isolierung von genomischer DNA

Eine adulte Maus (älter als 6 Wochen) wurde durch Isofluran narkotisiert und anschließend dekapitiert. Der Schädel wurde von dem Hinterhauptsloch her geöffnet und das Gehirn entnommen. Das Gehirn wurde dreimal in eiskaltem PBS gewaschen, in 2 ml Aufschlußpuffer überführt und mit 200 µl SDS (10 %) versetzt. Das Gewebe wurde mit einem Teflon-Glas-Homogenisator aufgeschlossen. Das Volumen des Ansatzes wurde mit Aufschlußpuffer auf 5 ml erweitert. 20 µl Proteinase K (Roche, 19 mg/ml) wurden dazu gegeben und es wurde 5 h bei 37 °C unter Rotieren inkubiert. Es wurde das gleiche Volumen Phenol zugegeben, 30 min bei 37 °C unter Rotieren inkubiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 5.000 g, 4 °C). Die wässrige (obere) Phase wurde über Nacht gegen 2 L TEN dialysiert (Der Dialyseschlauch hatte ein Ausschlußvolumen von 10 kDa). Die DNA-haltige

Lösung wurde in einen Meßzylinder überführt, LiCl (4 M) bis zu einer Endkonzentration von 300 mM zugegeben und die Lösung vorsichtig mit dem dreifachen Volumen Ethanol überschichtet. Die an der Phasengrenze ausfallenden Nukleinsäuren wurden auf einen Glasstab aufgewickelt (4 h), mit 70 % Ethanol gewaschen und in 2 ml TE gelöst.

Aufschlußpuffer:

0,05 M Tris/HCl pH 7,4

0,1 M EDTA

0,2 M NaCl

TEN:

10 mM Tris/HCl pH 7,5

1 mM EDTA

50 mM NaCl

2.4.3 Isolierung von λ -FIX[®] II-Phagen DNA (Santos, 1991)

Es wurden je 50 μ l Mg^{2+} -Zellen (XL1-Blue MRA) mit unterschiedlichen Verdünnungen des Phageneluates versetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Es wurden 5 ml NZY-Medium zugegeben und die Suspension bis zur Lyse (Klärung der Suspension) bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde in ein neues 11 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (5 min, 5.000 g, 4 °C). Zum Überstand wurden 2 μ l DNase I (1 mg/ml) und 2 μ l RNase-Cocktail (Ambion) pipettiert und maximal 30 min bei 37 °C inkubiert. Es wurden 20 μ l $ZnCl_2$ (2 M) zugegeben und das Lysat weitere 5 min bei 37 °C belassen. Die Suspension wurde zentrifugiert (5 min, 5.000 g, 4 °C), das Pellet in 500 μ l TES-Puffer resuspendiert und der Ansatz 15 min bei 60 °C inkubiert. Nach Zugabe von 60 μ l Kaliumacetat (3 M) wurde erneut zentrifugiert (3 min, 17.000 g, 4 °C). Der Überstand wurde je zweimal Phenol/Chloroform-extrahiert. Durch Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol wurde die Phagen-DNA präzipitiert und durch Zentrifugation pelletiert (5 min, 17.000 g, 4 °C). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in 30 μ l TE resuspendiert.

TES-Puffer:

100 mM Tris/HCl pH 8,0

100 mM EDTA

0,3 % SDS

2.5 Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren

2.5.1 Phenol/Chloroformextraktion

Verunreinigungen von DNA-Lösungen mit Proteinen und Lipiden wurden durch Phenolextraktion entfernt. Das eingesetzte Phenol wurde zuvor mit TE pH 8,0 gesättigt. DNA-Lösungen wurden mit dem gleichen Volumen einer 1:1-Mischung aus Phenol und Chloroform gemischt und zur Trennung zentrifugiert (3 min, 15.000 g, RT). Die obere wässrige Phase wurde mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert, um Phenolreste zu entfernen. Die DNA wurde anschließend mit Ethanol präzipitiert (2.5.2).

2.5.2 Ethanol-Präzipitation

Um DNA-Lösungen zu konzentrieren oder umzupuffern, wurden sie nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 und dem 2,5 - 3 fachen Volumen an absolutem Ethanol durch Zentrifugation (10 min, 17.000 g, 4 °C) pelletiert. Das Präzipitat wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in TE oder Wasser aufgenommen.

2.5.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.5.3.1 DNA-Größen- und Mengenstandard

DNA-Größenstandard :

λ (c185ind1Sam7)-DNA, HindIII/EcoRI geschnitten (MBI Fermentas, Vilnius/Litauen): Die Konzentration betrug 67 ng/ μ l.

Fragmentgrößen (in Bp): 21.226, 5.148, 4.268, 3.530, 2.027, 1.904, 1.584, 1.375, 947, 831, 564, 125

2.5.3.2 Konzentrationsbestimmung mit Hilfe von Agarosegelen

Die Menge an DNA, die auf ein Ethidiumbromid-Agarosegel (2.5.4) aufgetragen wurde, konnte durch Vergleich mit einem aufgetragenen Größen- und Mengenstandard (2.5.3.1) anhand der Intensität der Banden abgeschätzt werden.

2.5.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Zur Bestimmung der Menge und Reinheit von Nukleinsäuren wurde die Extinktion von DNA- bzw. RNA-Lösungen bei 260 und 280 nm (Schichtdicke: 1 cm) mit einem UV/VIS-Spektralphotometer („U-1100“, Hitachi) bestimmt. Für die Berechnung der Konzentration wurden folgende Werte zugrunde gelegt:

doppelsträngige DNA	50 µg/ml entspricht einer $OD_{260} = 1$
RNA	40 µg/ml entspricht einer $OD_{260} = 1$
Oligonukleotide	33 µg/ml entspricht einer $OD_{260} = 1$

Als Indikator für die Reinheit wurde der Quotient OD_{260}/OD_{280} herangezogen. Er sollte bei reinen Nukleinsäurelösungen nicht unter 1,8 liegen.

2.5.4 Trennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Agarosegele verwendet. Die Agarosekonzentration wurde dem jeweiligen Trennproblem angepaßt: sie variierte zwischen 0,5 % (zur Trennung von Fragmenten > 3.000 Bp) und 2 % (zur Trennung von Fragmenten < 500 Bp). Die Agarose wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,5) durch Aufkochen gelöst und auf 60 °C abgekühlt. Vor dem Gießen wurde zur Gellösung Ethidiumbromid (Endkonzentration: 1 µg/ml) pipettiert. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Vol. DNA-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde bei 60 bis 140 V bis zum Erreichen der erforderlichen Trennung der Fragmente durchgeführt. Als Elektrophoresepuffer diente ebenfalls TAE. Aufgrund der Interkalierung von Ethidiumbromid konnte die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

50 x TAE pH 7,5:	2 M Tris, 50 mM EDTA pH 8.0
10 x TAE-Probenpuffer:	0,25 % Xylencyanol, 50 % Glyzerin, 10 x TAE

2.5.5 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Reinigung von DNA aus Agarosegelen erfolgte entweder durch Zentrifugation nach Heery *et al.* (1990) oder durch Adsorption an „QIAEX II“-Material. Die „QIAEX II“-Methode wurde in Anlehnung an das Protokoll des Herstellers (Qiagen, Hilden) mit den mitgelieferten Puffern durchgeführt. Das ausgeschnittene Gelstück wurde zerkleinert und mit 300 µl QX1-Puffer/100 mg Gelmaterial versetzt und gemischt bis die Gelstücke vollständig gelöst waren. Nach Zugabe von 10 µl „QIAEX II“-Suspension wurde die Lösung für 10 min bei 50 °C inkubiert. Durch Zentrifugation (30 sek, 12.000 g, RT) wurde das „QIAEX II“-Material mit der daran gebundenen DNA pelletiert und je zweimal mit 500 µl QX2-Puffer und 500 µl QX3-Puffer gewaschen. Nach 5 - 10 min Trocknung bei 37 °C wurde die DNA mit 20 µl 0,5 × TE für 10 min bei 37 °C eluiert.

2.6 Manipulation von Nukleinsäuren

2.6.1 Restriktion von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Es wurden Restriktionsenzyme der Firmen NEB (Schwalbach) und Roche (Mannheim) verwendet. Die DNA wurde in 1 x Inkubationspuffer (jeweils vom Hersteller mitgeliefert) bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Restriktionen mit mehreren Enzymen wurden nach Möglichkeit in einem Ansatz durchgeführt. Anderenfalls wurde der Reaktionsansatz nach der ersten Restriktion durch Ethanol-Präzipitation (2.5.2) umgepuffert. Es wurden 2 U Enzym/µg DNA eingesetzt. Maximal wurden 10 Volumenprozent Enzymlösung zugesetzt. Analytische Restriktionsansätze mit DNA aus Minipräparationen (2.4.1.1) wurden in einem Volumen von 15 µl mit 0,1 µl RNasemix (Ambion, Austin/USA) durchgeführt. Das Volumen präparativer Ansätze betrug 30 - 40 µl.

2.6.2 Modifizierung von DNA-Fragmenten

2.6.2.1 Glätten überhängender Einzelstrang-Enden von DNA-Fragmenten

Überhängende Enden wurden mit dem Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I durch die 5' – 3'-Polymeraseaktivität aufgefüllt. Durch die 3' – 5'-Exonukleaseaktivität des Enzyms wurden überhängende 3'-Enden abgeschnitten. Es wurden 2 U Klenow-Enzym/µg DNA und 0,1 mM dNTPs in Restriktionspuffer A, B, M, L, H (Roche) 30 min bei 37 °C

inkubiert. Falls eine besonders hohe Ausbeute an geglätteten Enden erforderlich war, wurde die T4-DNA-Polymerase verwendet (5 U Enzym, 15 min bei 12 °C in einem der Restriktionspuffer mit 0,2 mM dNTP). Das Enzym wurde danach 10 min bei 68 °C inaktiviert.

2.6.2.2 Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten

PCR-Fragmente besitzen keine endständigen 5'-Phosphatreste und müssen phosphoryliert werden, bevor sie ligiert werden können. Das Enzym T4-Polynukleotidkinase katalysiert die Übertragung des endständigen Phosphatrestes von ATP auf freie 5'-Hydroxylgruppen einer Nukleotidkette. Der Reaktionsansatz (5 - 10 U Enzym/μg DNA, Inkubationspuffer des Herstellers, 0,1 mM ATP) wurde 30 min bei 37 °C und anschließend 10 min bei 65 °C inkubiert, um die Kinase zu inaktivieren. Wenn vor der Phosphorylierungsreaktion eine Klenow-Reaktion (siehe 2.6.2.1) durchgeführt worden war, wurden die Desoxynukleotide durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.5.4) entfernt, da sie die Polynukleotidkinase inhibieren.

2.6.2.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Geschnittene Vektor-DNA mit kompatiblen überhängenden oder glatten Enden wurde zur Vermeidung der Religation mit alkalischer Phosphatase (Roche) dephosphoryliert. Die DNA wurde mit 0,04 U alkalischer Phosphatase in dem mitgelieferten Phosphatase-Puffer (Roche) 1 h bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von EGTA (25 mM) und eine 15 minütige Inkubation bei 65 °C wurde die Reaktion gestoppt. Nach zweimaliger Phenol/Chloroform- und Chloroformextraktion wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.5.4) und anschließend isoliert (siehe 2.5.5).

2.6.3 Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

2.6.3.1 Ligation

Zur Ligation wurden geschnittener bzw. dephosphorylierter Plasmidvektor und ein 3 - 5 facher molarer Überschuß an DNA-Fragment in 1 x Ligasepuffer gemischt. Wenn die Fragmente komplementäre überhängende Einzelstrang-Enden aufwiesen, wurde mit 0,5 U T4-DNA-Ligase (Roche) 30 min bei 22 °C ligiert. Zur Ligation von glatten Enden wurde mit 5 U T4-DNA-Ligase (Pharmacia, Uppsala/Schweden) ü.N. bei 16 °C inkubiert. In beiden Fällen betrug das Volumen des Ligationsansatzes 15 µl. Es wurde der 10 x Ligasepuffer des Herstellers (Roche) verwendet.

2.6.3.2 Transformation mit Ligationsprodukten

7,5 µl des Ligationsansatzes wurden mit 10 µl 10 x CM-Puffer gemischt, mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt und auf Eis gekühlt. Dazu wurden 100 µl kompetente Zellen (2.3.4.2) gemischt und die Suspension für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzepuls (1 min, 42 °C) und einer Abkühlungsphase (20 min auf Eis) wurden 300 µl LB-Medium (2.3.3) zugegeben und der Ansatz für 45 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach dieser Regenerationszeit, die der Ausprägung der Antibiotika-Resistenz dient, wurden die Zellen auf LB-Agar mit geeignetem Antibiotikum (2.3.3) ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert.

10 x CM: 100 mM CaCl_2 , 400 mM MgCl_2

2.7 Arbeiten mit λ -FIX[®] II-Phagen-genomische-Bibliotheken

2.7.1 Titerbestimmung einer λ -FIX[®] II-Phagen-genomische-Bibliothek

Es wurden verschiedene Verdünnungen einer Phagensuspension in SM^+ -Puffer hergestellt. Jeweils 1 µl wurde mit 50 µl „ Mg^{2+} -Zellen“ (2.3.4.3) für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien-Phagen-Suspensionen wurden mit je 5 ml NZY-Topagar (auf 48 °C vorgewärmt) gemischt und auf NZY-Agarplatten ($\varnothing$ 8,6 cm) ausgebracht. Die Platten wurden bei 30 °C bis zur Lyse der Bakterien inkubiert (9 - 14 h). Anhand der Anzahl der gebildeten Plaques wurde der Titer der eingesetzten Phagensuspension bestimmt.

SM⁺-Puffer: 10 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 0,01 % Gelatine, 50 mM Tris/HCl pH 7,5

2.7.2 Ausplattieren von λ-FIX[®] II-Phagen

Die λ-FIX[®] II-Phagen-genomische-Bibliothek wurde in einer geeigneten Verdünnung (in SM⁺-Puffer) auf NZY-Agarplatten ausplattiert. In der nachfolgenden Tabelle sind die Zahl der plaquebildenden Einheiten, das verwendete Volumen an „Mg²⁺-Zellen“, sowie die Größe der verwendeten NZY-Agarplatten für die erste Hybridisierungsrunde („Grobscreen“) und die nachfolgende Vereinzelungsrunde („Feinscreen“) aufgeführt:

Hybridisierungsschritt	Mg ²⁺ -Zellen	NZY-Topagar	Plaque-bildende Einheiten	NZY-Plattengröße
Grobscreen	300 µl	10 ml	30.000 – 50.000	Ø 14,5 cm
Feinscreen	50 µl	5 ml	30 – 200	Ø 8,6 cm

Die weiteren Arbeitsschritte zur Identifizierung spezifischer Klone ("Plaquelifting", Immobilisierung auf Nylonmembranen, Hybridisierung mit radioaktiven Sonden und Autoradiographie) werden unter 2.8.1.2 – 2.8.1.4 beschrieben.

2.7.3 Isolierung von λ-FIX[®] II-Phagen

Nach der Autoradiographie (2.8.1.4) wurden die Signale auf dem Röntgenfilm den entsprechenden λ-FIX[®] II-Phagen-Plaques auf den Agarplatten zugeordnet. Die entsprechenden Regionen wurden mit Pasteurpipetten ausgestochen und mit 500 µl SM⁺-Puffer eluiert. Zur Vereinzelung wurden die eluierten Phagen erneut ausplattiert („Feinscreen“, 2.7.2). Es wurden zwei Vereinzelungsrunden durchgeführt. Die Isolierung der Phagen-DNA ist in (2.4.3) beschrieben.

2.8 Nachweis spezifischer Nukleinsäuren

2.8.1 Nachweis von DNA

2.8.1.1 Transfer und Immobilisierung von DNA auf Nylonmembranen („Southernblot“)

DNA, die auf eine Nylonmembran übertragen werden sollte, wurde in einem Agarosegel aufgetrennt (2.5.4). Das Gel wurde 15 min in Denaturierungslösung und 15 min in Neutralisierungslösung inkubiert. Die DNA wurde durch gerichtete Diffusion mit 20 x SSC in 1 bis 12 h auf eine Nylonmembran („Qiabrane“ von Qiagen, Hilden) transferiert. Die Nukleinsäuren wurden auf den Nylonmembranen in einem „Stratalinker“ (Stratagene, Heidelberg) durch UV-Licht ($\lambda=254$ nm, $0,12$ J/cm²) immobilisiert.

Denaturierungslösung:	Neutralisierungslösung:	20 x SSC:
0,5 M NaOH	0,5 M Tris/HCl pH 7,5	0,3 M NaCitrat pH 7,0
1,5 M NaCl	1,5 M NaCl	3 M NaCl

2.8.1.2 Transfer und Immobilisierung von λ -FIX[®] II-Phagen-DNA

Die λ -Phagen-DNA wurde durch „Plaquelifting“ nach Benton und Davis (1977) von Agarplatten auf Nylonmembranen („Qiabrane“) überführt. Die Orientierung der Filter auf den Agarplatten wurde durch Einstiche durch die Filter in den Agar markiert. Die Filter wurden nach 5 min von den Platten abgezogen, 5 min denaturiert und 5 min neutralisiert (2.8.1.1). Die Nukleinsäuren wurden auf den Nylonmembranen in einem „Stratalinker“ (Stratagene, Heidelberg) durch UV-Licht ($\lambda=254$ nm, $0,12$ J/cm²) immobilisiert.

2.8.1.3 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Nukleinsäuren wurden durch DNA-Sonden nachgewiesen, die mit der „Random priming“-Methode nach Feinberg & Vogelstein (1983) radioaktiv markiert wurden. Die Markierung wurde mit dem "Megaprime DNA Labeling Kit" (Amersham Life Science, Little Chalfont/England) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Radionuklid diente [α -³²P]-dCTP (spezifische Aktivität > 6.000 Ci/mM). Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Gelfiltration mit Sephadex G75 (Pharmacia, Uppsala/Schweden) abgetrennt. Die

Markierungseffizienz wurde in einem Szintillationszähler („Tricarb 2000 CA“, Packart) bestimmt.

2.8.1.4 Hybridisierung von immobilisierter DNA mit DNA-Sonden und Autoradiographie

Die Bedingungen für die Hybridisierung an „Southernblots“ (2.8.1.1) bzw. an immobilisierter λ -FIX[®] II -Phagen-DNA (2.8.1.2) mit radioaktiv markierten DNA-Sonden (2.8.1.3) sind hier zusammengefaßt. Es wurde mit hoher Stringenz gearbeitet (65 °C). Für den Southernblot (bei der Cluster-Analyse) wurde zusätzlich eine Hybridisierung unter geringer Stringenz durchgeführt (55 °C). In Anlehnung an die Hybridisierungstemperatur wurde auch die Temperatur der Waschschritte herabgesetzt (55 °C).

Prähybridisierung: In 5 x SET, 5 x Denhardt's Reagenz, 0,1 % SDS, 0,2 mg/ml Heringssperma-DNA für 1 - 4 h
Hybridisierung: In Prähybridisierungslösung mit ³² P-markierter DNA-Sonde (1 x 10 ⁶ cpm/ml) für 2 - 14 h
Waschen (2 x): 1 x SET, 0,1 % SDS für 30 min

1 x SET: 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl pH 7,4

1 x Denhardt's Reagenz: je 0,02 % Rinderserum-Albumin, Ficoll 400, und Polyvinylpyrrolidon

1 x SET kann durch 1 x SSC (2.8.1.1) ersetzt werden. Spezifische Hybride, die aus Nukleinsäuren und radioaktiv markierten DNA-Sonden bestanden, wurden bei -80 °C unter Verwendung von Verstärkerfolien durch Autoradiographie 1 - 24 h („XAR5“-Röntgenfilm, Kodak) nachgewiesen.

2.9 Isolierung und Nachweis von RNA

2.9.1 Präparation von Geweben zur Isolierung von Poly (A)⁺ RNA

2.9.1.1 Präparation von olfaktorischem Epithel sowie von inneren Organen aus Mäusen

Adulte Mäuse wurden durch Isofluran narkotisiert und anschließend dekapitiert. Der vordere Teil des Schädels (Nasenhöhle) wurde freipräpariert und das olfaktorische Epithel entnommen. Das Gewebe wurde bis zur Poly (A)⁺ RNA Isolierung bei –80 °C aufbewahrt. Zur Präparation von Gehirnen wurde der Schädel von Mäusen vom Hinterhauptsloch her geöffnet und das freigelegte Gehirn ausgeschält. Zur Entnahme von inneren Organen wurde die Bauchhöhle und der Brustkorb von Mäusen geöffnet und die entsprechenden Organe wurden entnommen. Die entfernten Organe wurden bis zur Präparation der Poly (A)⁺ RNA bei –80 °C aufbewahrt.

2.9.1.2 Präparation von Maus-Hoden und Anreicherung von Keimzellen

Die Hoden und Nebenhoden von Mäusen (adulte sowie präpubertär) wurden aus dem hinteren Teil der Bauchhöhle am Anus freipräpariert. Die Nebenhoden wurden für die Präparation von Nebenhoden-Spermien (2.14.2) verwendet. Die Hoden wurden entweder für eine RNA Isolierung bei –80 °C gelagert oder frisch für eine Isolierung von Keimzellen eingesetzt. Die Methode zur Dissoziation von Hodenzellen wurde modifiziert nach Bellvé *et al.* (1977). Zunächst wurde die Tunika Albuginea entfernt und das Hodengewebe in PBS⁺/Collagenase Typ IA (1 mg/ml, Sigma) 30 min unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Die Samenkanäle bleiben hierbei intakt, die Basalmembran wird verdaut und die interstitiellen Zellen dissoziieren. Durch dreimaliges Waschen der Samenkanäle mit PBS⁺ wurden die interstitiellen Zellen entfernt. Die Samenkanäle wurden nachfolgend in PBS⁺/Trypsin Typ XIII (0,5 mg/ml, Sigma)/DNase I (5 µg/ml) (30 min, unter leichtem Schütteln, RT) inkubiert. Trypsin dissoziiert die Keimzellen in den Samenkanälen. DNase baut die aus lysierten Zellen austretende DNA ab und verhindert so das Aggregieren von Keimzellen infolge der austretenden DNA. Um ein besseres Ausspülen der Keimzellen aus den Samenkanälen zu ermöglichen, wurden diese durch mechanische Scherkräfte mit Hilfe von Auf- und Abpipettieren zerbrochen. Die Suspension wurde durch ein Nylonnetz (100 µm Maschenweite) filtriert, um die Bruchstücke der Samenkanäle von den ausgespülten

Keimzellen zu trennen. Die Zellen wurden pelletiert (10 min, 5.000 g, 4 °C) und weiterverwendet (2.9.2).

PBS⁺:

Phosphatpuffer PB (pH 7,4)

10 mM Na₂HPO₄

1,8 mM KH₂PO₄

Dem Phosphatpuffer wurden folgende Salze zugesetzt:

150 mM NaCl

5 mM KCl

2 mM MgSO₄

1,3 mM CaCl₂

30 mM Glukose

2.9.2 Isolierung von polyadenylierter RNA

Es wurde das „Fast Track 2.0“-Kit (Invitrogen, Groningen/Niederlande) verwendet und dem Protokoll des Herstellers gefolgt. Die polyadenylierte RNA wird durch Bindung an Oligo-dT-Zellulose affinitätschromatographisch gereinigt (Aviv & Leder, 1972). Die RNA wurde nach Elution vom Chromatographiematerial mit Ethanol gefällt und bei –80 °C aufbewahrt. Aus dem Riechepithel von 20 Mäusen konnten etwa 8 µg, aus 6 Maus-Hoden etwa 90 µg Poly (A)⁺ RNA isoliert werden. Die RNA wurde für Northernblots (2.9.4) bzw. cDNA-Synthesen (2.10) verwendet.

2.9.3 Trennung von RNA durch Gelelektrophorese

Die RNA (10 µg) (2.9.2) wurde in 4,2 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Davon wurden 0,4 µl zur Konzentrationsbestimmung photometrisch vermessen (2.5.3.3). Die restliche Probe wurde jeweils mit 12,9 µl RNA-Denaturierungspuffer versetzt und 10 min bei 60 °C inkubiert. Danach wurden 3,4 µl 10 x RNA-Probenpuffer zugesetzt. Die Proben wurden auf ein denaturierendes Formaldehyd-Agarosegel gegeben (1,1 % Formaldehyd, 1,2 % Agarose in 1 x MOPS-Puffer). Zusätzlich wurden 3,75 µl RNA-Standard mit 3,4 µl RNA-Probenpuffer und 1 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) vermischt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte

bei einer Spannung von 50 - 55 V für 4 h. Danach wurde das Gel zweimal mit DEPC-Wasser gespült und die RNA auf eine Membran transferiert (2.9.4).

DEPC-Wasser: Bidest. Wasser wurde mit 0,01 % DEPC versetzt, ü.N. gerührt und anschließend autoklaviert (60 min, 121 °C).

Verwendeter RNA-Standard (in kB): 9,49, 7,49, 4,40, 2,37, 1,35, 0,24 (1 µg/µl; GIBCO BRL, Eggenstein).

1 x MOPS-Puffer:	10 x RNA-Probenpuffer:	RNA-Denaturierungspuffer
20 mM MOPS pH 7,0	50 % Glycerin	1,29 x MOPS-Puffer
1 mM EDTA pH 8,0	10 x TAE-Puffer	8,36 % Formaldehyd
5 mM Natriumacetat	0,25 % Bromphenolblau	64,5 % Formamid
	0,25 % Xylencyanol	

2.9.4 Transfer von RNA auf Membranen („Northernblot“)

Der Transfer von RNA auf Membranen („Northernblot“) wurde durchgeführt, wie von Meinkoth & Wahl (1984) beschrieben. Die RNA wurde, wie in 2.8.1.1 für DNA beschrieben, durch gerichtete Diffusion mit 20 x SSC auf eine Membran („Qiabrane“) transferiert und durch Bestrahlung mit UV-Licht immobilisiert. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei 80 °C „gebacken“. Die immobilisierte RNA wurde zur Hybridisierung eingesetzt (2.9.6).

2.9.5 Herstellung markierter RNA-Sonden

Für die Herstellung von RNA Sonden wurden in dieser Arbeit rekombinante Klone von pBISH verwendet (2.3.2). Die entsprechenden cDNA-Fragmente der Duftstoffrezeptoren wurden durch Restriktion mit EcoRI und HindIII aus den pBluescript-Klonen herausgeschnitten und in pBISH umgesetzt.

2.9.5.1 Radioaktive Markierung von RNA-Sonden

Radioaktive RNA-Sonden wurden durch *in vitro*-Transkription (IVT) hergestellt. Das zu transkribierende Plasmid wurde für eine Transkription mit T7-RNA-Polymerase durch HindIII und für eine Transkription mit T3-RNA-Polymerase durch EcoRI linearisiert. Es wurden die *in vitro*-Transkriptions-Chemikalien von Promega (Heidelberg) verwendet und dem Protokoll des Herstellers gefolgt. Die Transkription wurde zunächst in einem 10 µl-Ansatz getestet und durch Gelelektrophorese (2.5.4) überprüft. Bei erfolgter Transkription wurde eine *in vitro*-Transkription in einem 20 µl-Ansatz durchgeführt. Die Ansätze wurden 3 h bei 37 °C inkubiert.

Ein 20 µl Transkriptionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

DNA	1 µg
DTT	10 mM
Transkriptionspuffer (Promega)	50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 6 mM MgCl ₂ , 2,0 mM Spermidin, 10 mM NaCl
ATP, GTP, UTP	0,5 mM
[α ³² P]-CTP (800 Ci/mmol)	6,25 µM
RNA guard (Pharmacia)	18,25 U
T7- bzw. T3-RNA-Polymerase (Promega)	20 U

Die Matrizen-DNA wurde durch 7 U RNasefreie DNase (Roche) für 30 min bei 37 °C abgebaut. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Filtration mit einem „Centricon 10“-Konzentrator (Amicon, Witten) entfernt.

2.9.5.2 Nicht-radioaktive Markierung von RNA-Sonden

2.9.5.2.1 Digoxigenin Markierung von RNA-Sonden

Digoxigenin-Markierung für *in situ* Hybridisierungs-Experimente

Ein 30 µl Transkriptionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

DNA	1 µg
DTT	10 mM
Transkriptionspuffer (Promega)	50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 6 mM MgCl ₂ , 2,0 mM Spermidin, 10 mM NaCl
ATP, CTP, GTP,	1 mM
UTP	0,65 mM
Dig-UTP	0,35 mM
RNA guard (Pharmacia)	18,25 U
T7- bzw. T3-RNA-Polymerase (Promega)	20 U

Zur Kontrolle der Transkription wurde 1 µl des Ansatzes auf ein 1 % iges Agarosegel aufgetragen. War die Transkription erfolgreich, wurde die Matrizen-DNA durch 7 U RNasefreie DNase (Roche) für 30 min bei 37 °C abgebaut. Die RNA-Sonde wurde durch Zugabe von 4 µl 4 M LiCl, 4 µl 0,5 M EDTA pH 8.0 und 125 µl Ethanol präzipitiert und durch Zentrifugation pelletiert (30 min, 18.300 g, 4 °C). Die RNA-Sonde wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in 50 µl TE resuspendiert.

2.9.5.2.2 Psoralen-Biotin Markierung von RNA-Sonden

Psoralen-Biotin Markierung von RNA-Sonden für Northern-Blot-Experimente

Die Ansätze für diese Markierung waren identisch mit den Ansätzen für die Digoxigenin-Markierung, mit der Ausnahme, daß nur unmarkierte Nukleotide (ATP, CTP, GTP, UTP alle 1 mM) eingesetzt wurden. Zur Kontrolle der Transkription wurde 1 µl des Ansatzes auf ein 1 % iges Agarosegel aufgetragen. War die Transkription erfolgreich, wurde die Matrizen-DNA durch 7 U RNasefreie DNase (Boehringer, Mannheim) für 30 min bei 37 °C abgebaut. Die Ansätze wurden durch Zugabe von TE auf ein Volumen von 100 µl gebracht und Phenol/Chloroform extrahiert. Die RNA-Sonde wurde durch Zugabe von 10 µl 5 M Ammoniumacetat pH 4.8 und 100 µl Isopropanol präzipitiert und durch Zentrifugation pelletiert (1 h, 18.300 g, 4 °C). Die RNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in 50 µl TE resuspendiert. Die RNA Konzentration wurde photometrisch bestimmt (2.5.3.3). Die Markierung der RNA-Sonde wurde unter Lichtausschluß in einer nicht beschichteten Mikrotiterplatte in einem Volumen von 11 µl durchgeführt. Bei der Markierung wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren (Ambion, BrightStar™ Psoralen-Biotin *Nonisotopic Labeling Kit*).

Ansatz:

DNA: 500 ng/(10 µl)

Psoralen-Biotin Reagenz: 1 µl

Durch Bestrahlung mit einer UV Lampe (UV-21 Compact UV Lamp, 365 nm, 4 Watt) auf Eis für 1 h wurde das Psoralen-Biotin Reagenz kovalent an die RNA-Sonde gekoppelt. Nicht gebundenes Psoralen-Biotin wurde durch zweimalige Extraktion mit H₂O-gesättigtem n-Butanol entfernt.

2.9.5.3 Test der Markierung von nicht-radioaktiv markierten RNA-Sonden

Es wurden unterschiedliche Mengen der Psoralen-Biotin- bzw. Digoxigenin-markierten RNA-Sonde auf eine Nylonmembran („Qiabran“) aufgetropft. Die Nukleinsäuren wurden auf den Nylonmembranen mit einem „Stratalinker“ (Stratagene, Heidelberg) durch UV-Licht ($\lambda=254$ nm, 0,12 J/cm²) immobilisiert. Der Nachweis der Psoralen-Biotin markierten RNA-Sonde wurde mit den Lösungen des BrightStar™ BioDetect™ Systems (Ambion) nach Angaben des

Herstellers durchgeführt und wird hier nur kurz beschrieben. Die Membran wurde zunächst mehrfach alternierend mit dem Blockierungsreagenz und dem Waschpuffer inkubiert. Die Sonde wurde mit einem Streptavidin-Alkalische Phosphatase Konjugat nachgewiesen (30 min, RT, 1: 40.000). Die Membran wurde erneut blockiert und gewaschen. Die Detektion der Sonde erfolgte mit Hilfe von Chemilumineszenz nach Applikation des Phosphatase Substrates CDP-Star (Ambion) durch Schwärzung eines Röntgenfilms.

Für den Nachweis der Digoxigenin markierten RNA-Sonden wurde die Membran zunächst kurz in Puffer 1 (1 min) gewaschen und anschließend in Puffer 2 (30 min) blockiert. Zum Nachweis der Sonde wurde die Membran mit einem anti-Digoxigenin F_{ab} Fragment-Alkalische Phosphatase Konjugat (Boehringer, 1: 5.000 verdünnt in Puffer 2) für 1 h inkubiert. Die Membran wurde in Puffer 1 (10 min) und in Puffer 3 (1 min) gewaschen. Die Detektion erfolgte nach Zugabe des Substrates der Alkalischen Phosphatase durch einen violetten Farbniederschlag. Die Reaktion wurde mit TE gestoppt.

Puffer 1:	Puffer 2:	Puffer 3:
0,1 M Tris/HCl pH 7,5	Puffer 1/0,5 % Blocking	0,1 M Tris/HCl pH 9,5
150 mM NaCl	Reagenz (Boehringer)	100 mM NaCl
		50 mM MgCl ₂

2.9.6 Hybridisierung immobilisierter RNA mit RNA-Sonden

Die Hybridisierung immobilisierter RNA mit RNA-Sonden erfolgte wie in 2.8.1.4 beschrieben. Die Prähybridisierungslösung (Ambion, ULTRAhyb™) enthielt jedoch zusätzlich 50 % Formamid. Die Prähybridisierung erfolgte für 2 h bei 68 °C. Die immobilisierte RNA wurde mit der radioaktiv markierten Sonde (1×10^6 cpm/ml) bzw. mit Biotin markierten Sonden (~ 5 ng/ml) jeweils gelöst in der Prähybridisierungslösung ü.N. bei 68 °C hybridisiert. Die Membran wurde zweimal für 5 min bei 68 °C mit 2 x SSC, 0,1 % SDS und dreimal 15 min bei 68 °C mit 0,1 x SSC, 0,1 % SDS gewaschen. Der Nachweis der radioaktiv markierten Sonde erfolgte durch Autoradiographie (2.8.1.4). Der Nachweis der Psoralen-Biotin markierten Ribosonde wurde wie in 2.9.5.3 beschrieben durchgeführt.

2.9.7 *In situ* Hybridisierung

2.9.7.1 Einbettung von Maus-Hoden in Paraffin

Für die *in situ* Hybridisierung (2.9.7.2) sowie für immunhistochemische Nachweise (2.19.4) wurden Hoden der Maus (adult und präpubertär) mit Bouin'scher Fixierlösung (Bouin, 1897) immersionsfixiert und in Paraffin eingebettet (Romeis B., Mikroskopische Technik, 1968). Bei diesem Verfahren wird die wässrige Lösung aus dem Gewebe entfernt und zur besseren Gewebserhaltung durch Paraffin ersetzt. Die Hoden der Maus wurden entnommen (2.9.1.2) und mit einer Kanüle an beiden Polen angestochen, damit das Fixiergemisch effizienter infiltrieren konnte. Die Hoden wurden 15 min „anfixiert“, in zwei Hälften geschnitten und entweder für weitere 15 min bei RT oder ü.N. bei 4 °C fixiert.

Entwässerung des Gewebes

Lösungsmittel	Temperatur	Dauer
70 % Isopropanol	4 °C	ü.T. 4 x wechseln
80 % Isopropanol	4 °C	ü.N. 2 x wechseln
90 % Isopropanol	4 °C	ü.T. 2 x wechseln
100 % Isopropanol	4 °C	ü.N. 2 x wechseln
50 % Isopropanol/50 % Paraffin	60 °C	ü.T. 5 x wechseln
100 % Paraffin	60 °C	ü.T. 4 x wechseln

Die Paraffin-Blöcke wurden langsam bei RT abgekühlt und anschließend bei 4 °C aufbewahrt.

Mit einem Mikrotom (Reichert & Jung, Modell 1130; Messer „S“ und Halter von Feather, Japan) wurden für die Immunhistochemie 6 µm dünne und für *in situ* Hybridisierungen 4 µm dünne Querschnitte von Maus-Hoden angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und ü.N. bei 45 °C getrocknet.

2.9.7.2 *In situ* Hybridisierung an paraffineingebetteten Maus-Hodenschnitten

Für die *in situ* Hybridisierung wurden die Hodenschnitte auf silanisierte Objektträger aufgezogen.

Silanisierung:

Die Objektträger wurden 10 min in Ethanol gewaschen und bei 150 °C getrocknet. Die Objektträger wurden 15 min silanisiert (250 ml Aceton, 5 ml Silan, Sigma). Anschließend wurden die Objektträger 10 min in Aceton sowie 10 min in H₂O gewaschen und ü.N. bei 60 °C getrocknet.

Vorbereitung der paraffineingebetteten Gewebeschnitte für eine *in situ* Hybridisierung:

Lösungsmittel	Dauer
Roticlear	2 x 15 min
100 % Ethanol	2 x 5 min
95 % Ethanol	1 min
80 % Ethanol	1 min
60 % Ethanol	1 min
10 % H ₂ O ₂ in 60 % Methanol	2 x 20 min
4 % Paraformaldehyd in PBS	20 min
0,2 N HCl in PBS	20 min
Triethanolamin (Sigma) (100 mM) pH 8,0	3 min
Essigsäureanhydrid 0,25 %	15 min
Proteinase K (Roche) 2 µg/ml	30 min

Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Schnitte je zweimal 5 min mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe (60 %, 80 %, 95 %, 100 %) für je 2 min entwässert. Die Schnitte wurden 5 min in Chloroform inkubiert und getrocknet. Danach wurden die Schnitte wieder in wässriges Lösungsmittel überführt (95 %, 80 %, 60 % Ethanol je 2 min) und für 20 min in 0,1 % Triton X-100 in PBS inkubiert. Die Schnitte wurden 2 x 5 min in PBS gewaschen und anschließend bei 50 °C für 1 h in einer feuchten Kammer (20 x SSC) prähybridisiert (50 % Formamid, 4 x SSC, 1 x Denhardt's Lösung, 125 µg/ml t-RNA und gescherte, einzelsträngige Heringssperma-DNA). Die Hybridisierung erfolgte ü.N. in Prähybridisierungslösung, die zusätzlich 10 % Dextransulfat und 0,5 µg/ml Digoxigenin-markierte RNA-Sonde enthielt, bei 50 °C in einer feuchten Kammer (20 x SSC). Vor der Hybridisierung wurde die RNA-Sonde 10 min bei 70 °C denaturiert. Die Schnitte wurden 20 min in 1 x SSC/50 % Formamid, 30 min in 2 x SSC und 30 min in 0,2 x SSC bei 50 °C gewaschen. Die Detektion der gebundenen RNA-Sonde erfolgte mit einem anti-Digoxigenin-Antikörper, der an alkalische Phosphatase gekoppelt war (Roche). Die Schnitte wurden kurz in Puffer I (1 min) gewaschen, 30 min abgesättigt (Puffer I, 0,5 % Blocking Reagenz, Roche) und erneut in Puffer I gewaschen. Es folgte die Antikörperinkubation (1: 500 in Puffer I) ü.N. bei 4 °C in einer feuchten Kammer (Puffer I). Die Schnitte wurden in Puffer I (3 x 15 min) und in Puffer III (2 min) gewaschen und mit der Färbelösung inkubiert. Die Reaktion wurde durch Waschen der Schnitte in PBS abgestoppt. Die Schnitte wurden anschließend in Eukitt (Riedel-de Haën) eingedeckt.

Proteinase K Puffer:

50 mM Tris/HCl pH 7,4

5 mM EDTA pH 7,4

Puffer I:

100 mM Tris/HCl pH 7,9

150 mM NaCl

Puffer III:

100 mM Tris/HCl pH 9,5

100 mM MgCl₂

2.10 Synthese von komplementärer DNA (cDNA)

RNA (5 µg Gesamt-RNA oder 1 µg Poly (A)⁺ RNA) wurden zunächst DNase behandelt (5 U, 1 h, 37 °C). Hierdurch sollten Kontaminationen von genomischer DNA entfernt werden. Der Ansatz wurde zweimal Phenol/Chloroform-extrahiert (2.5.1) und Ethanol präzipitiert (2.5.2).

Etwa 70 ng der DNase behandelten RNA wurden für eine Kontroll-PCR aufbewahrt. Bei der Verwendung von genspezifischen Primern zum Start der cDNA-Synthese wurde die AMV-Reverse Transkriptase (Roche) bei einer Synthese Temperatur von maximal 55 °C eingesetzt.

Bei der Verwendung des Oligo-(dT)₁₅ Primers oder hexameren Oligonukleotiden („random priming“) zum Start der cDNA-Synthese wurde die AMV bzw. M-MLV Reverse Transkriptase bei einer Temperatur von 42 °C eingesetzt. Für die Synthesen wurde das „cDNA-Synthesis-Kit“ (GIBCO BRL) verwendet und das Protokoll des Herstellers befolgt. Mit Hilfe des „cDNA-Purification Kit“ (Roche) wurden die Primer abgetrennt.

Als Kontrolle für eine mögliche Kontamination der RNA-Präparation mit genomischer DNA wurde eine PCR (45 Zyklen) mit der DNase behandelten RNA als Matrize durchgeführt. Hierfür wurden Actin Primer verwendet, die im gleichen Exon des Beta-Actin-Gens der Maus binden (# 2311/# 1190).

Zur Kontrolle der cDNA Synthese wurde eine PCR (mit 25 Zyklen) mit Primern gegen das β -Actin-Gen (# 1190/# 736) durchgeführt. Diese Primer überspannen ein Intron, so daß man eine Amplifikation mit cDNA bzw. genomischer DNA als Matrize unterscheiden kann.

2.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit der PCR (Mullis *et al.*, 1986) können DNA-Fragmente spezifischer Länge und Sequenz amplifiziert werden. Die Matrizen-DNA („Template“) wurde hitzedenaturiert und mit geeigneten Oligonukleotiden („Primern“) hybridisiert. Die Primer wurden mit Hilfe einer hitzestabilen Polymerase (Taq-Polymerase, Roche) verlängert.

2.11.1 Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide wurden mit einem DNA-Synthesizer 391 (Applied Biosystems) synthetisiert. Für die Reinigung der Oligonukleotide wurde das Säulenmaterial in Ammoniak überführt und 15 h bei 55 °C inkubiert. Das Säulenmaterial wurde durch Zentrifugation abgetrennt (1 min, 17.000 g, 4 °C). Der Überstand wurde lyophilisiert. Die Oligonukleotide wurden in H₂O resuspendiert und mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 sowie dem dreifachen Volumen Ethanol gefällt. Das Oligonukleotid-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang aufgeführt.

2.11.2 Bedingungen für die PCR

Als Matrizen-DNA wurden 1 bis 10 ng Plasmid-DNA oder 10 bis 20 ng einzelsträngige cDNA verwendet. Die Reaktionen wurden in einem "DNA Thermal Cycler" (Perkin Elmer) oder in einem "TRIO-Thermoblock" (Biometra) durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 4 min bei 94 °C denaturiert und dann für 15 - 50 Zyklen folgendermaßen inkubiert:

Zyklusschritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	94 °C	50 sek
Hybridisierung	(je nach Primer)	50 sek
Polymerisierung	72 °C	1 min pro 1000 BP

Die Hybridisierungstemperatur wurde so gewählt, daß sie der niedrigeren Schmelztemperatur der beiden Primer entsprach. Die Schmelztemperatur (T_m) der Primer wurde anhand der folgenden Formel bestimmt:

$$T_m = (G/C) \times 4 \text{ °C} + (A/T) \times 2 \text{ °C} - \text{Fehlbasenpaarung} \times 4 \text{ °C}$$

Anschließend wurde ein verlängerter Polymerisationsschritt (final extension: 5 - 10 min, 72 °C) durchgeführt, um nicht vollständig synthetisierte Fragmente aufzufüllen. Die Enden von PCR-Fragmenten, die ohne vorherige Restriktion in Plasmidvektoren subkloniert werden sollten, wurden zunächst mit Klenow-Enzym geglättet (2.6.2.1) und dann phosphoryliert (2.6.2.2).

2.11.2.1 PCR mit Plasmid-DNA als Matrize

Ein 100 µl PCR-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

- 1 - 10 ng Plasmid-DNA
- je 300 ng spezifischer Primer
- 10 µl 10 x PCR-Puffer für die jeweilige Polymerase
- 1 µl 20 mM dNTP
- 1 - 2,5 U hitzestabile Polymerase

Es wurden maximal 15 Zyklen durchgeführt.

2.11.2.2 Verschachtelte PCR („nested PCR“) mit cDNA als Matrize

Diese PCR wurde zur Klonierung seltener Sequenzen aus cDNA (2.10) eingesetzt. Es wurden zwei Oligonukleotidpaare verwendet. Das zweite „innere“ Primerpaar lag innerhalb der Nukleinsäuresequenz, die durch das erste „äußere“ Oligonukleotidpaar begrenzt wird. Nach einer ersten PCR (45 Zyklen) mit dem „äußeren“ Oligonukleotidpaar wurde mit 1/10 des Ansatzes eine zweite PCR (45 Zyklen) durchgeführt, bei der die beiden „inneren“ Oligonukleotide verwendet wurden.

2.11.2.3 Amplifikation von Sequenzen mit einem hohen Anteil an GC-Nukleotiden

Zur Amplifikation von cDNA-Molekülen der GC-D wurde zusätzlich ein spezielles PCR System verwendet („GC-Rich PCR System“, Roche). Es wurden PCR-Reaktionen ohne, mit 0,5 M oder mit 1 M *resolution solution* durchgeführt. Es wurde je 1 U Polymerase in einem 25 µl Ansatz eingesetzt. Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben angesetzt. Die Bedingungen der PCR sind 2.11.2 zu entnehmen.

2.11.2.4 Reinigung der PCR-Produkte

PCR-Produkte wurden durch Phenolextraktion (2.5.1) und Ethanol-Präzipitation (2.5.2) gereinigt. Um PCR-Produkte in Plasmidvektoren zu klonieren, wurde die gereinigte DNA auf ein Agarosegel aufgetragen (2.5.4) und die Fragmente aus dem Gel isoliert (2.5.5).

2.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mit einem Sequenziergerät („LICOR DNA Sequencer Long ReadIR 4200" von MWG-Biotech, Ebersberg). Die Sequenziermethode beruht auf der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.* 1977). Die DNA-Markierung erfolgte durch eine PCR (2.11) mit IRD800-Fluorophor-markierten Oligonukleotiden (2.12.2). Zur Sequenzauswertung wurde die Software des Herstellers sowie die Programme PC/Gene und PC/Supp (Dr. W. Bönigk) eingesetzt.

2.12.1 Sequenzierreaktion

Es wurde das „Thermo Sequenase“-Kit von Amersham (Little Chalfont/England) verwendet und dem Protokoll des Herstellers gefolgt. Pro kB der zu sequenzierenden DNA wurden ca. 100 ng DNA eingesetzt. 1,2 pmol IRD800-Fluorophor-markierter Primer wurden zugefügt. Zur Relaxation der Matrizen-DNA wurde der Ansatz mit 0,7 µl 50 % DMSO versetzt und anschließend mit Wasser auf ein Endvolumen von 7 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde zu je 1,5 µl auf vier PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Je 0,75 µl der vier Terminationsmixe wurden mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und jeweils zu einem der vier 1,5 µl-Aliquots gegeben. Die Ansätze wurden mit 20 µl „Chill-out 14 Liquid“-Wachs (MJ Research) überschichtet und in der PCR (2.12.2) eingesetzt. Zur Sequenzierung von G/C-Nukleotid reicher DNA wurde das SequiTherm EXCEL II Sequenzier Kit (BIOzym) verwendet. Pro kB der zu sequenzierenden DNA wurden ca. 100 ng DNA eingesetzt. Zu der DNA wurden 4 µl Sequenzierpuffer, 1,1 µl IRD800-Fluorophor-markierter Primer (2 pmol/µl) gegeben und der Ansatz mit H₂O auf 7,8 µl aufgefüllt. Hierzu wurden 0,5 µl SequiTherm EXCEL II DNA Polymerase (5 U/µl) pipettiert und je 2 µl dieses Ansatzes zu je 1 µl der vier Terminationsmixe gegeben. Die Ansätze wurden mit 20 µl „Chill-out 14 Liquid“-Wachs (MJ Research) überschichtet und für eine PCR (2.12.2) verwendet.

2.12.2 PCR zur Sequenzierung

Die PCR wurde mit den Sequenzieransätzen (2.12.1) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 2 min 94 °C, 32 Zyklen (50 sec bei 94 °C, 50 sec bei 53 °C und 1 min bei 70 °C). Nach der PCR wurden die Ansätze mit 3 µl Stoppuffer gemischt. Es wurde der Stoppuffer des Sequenzierkits (2.12.1) von Amersham (Little Chalfont/England) benutzt, dem Xylencyanol in einer Endkonzentration von 0,2 % zugesetzt wurde. Die Proben wurden auf

ein Sequenziergel (2.12.3) aufgetragen. Für die Sequenzierung wurden die Sequenzieroligos # 9001 (hybridisiert an den T3 Promoter) und # 9002 (hybridisiert an den T7 Promoter) verwendet.

2.12.3 Acrylamid-Gelelektrophorese zur Sequenzierung

Es wurden 60 ml einer 4,6 % Gellösung (s.u.) mit 350 µl 10 % APS und 50 µl TEMED versetzt. Die Gellösung wurde mit einer Plastikspritze zwischen die Gelplatten eingebracht und dabei durch einen Sterilfilter (Porengröße 0,45 µm) gedrückt. Ein Plastikamm wurde in das Gel eingeschoben, um eine glatte Oberfläche zu erzeugen. Nach 1 h war die Polymerisation der Gellösung abgeschlossen. Nach dem Befestigen des Gels in der Kammer des LICOR-Gerätes wurden die Pufferkammern mit 1 x TBE gefüllt. Nach einem Vorlauf (30 min) wurden je 1,6 µl der PCR-Proben (2.12.2) mit Hilfe eines "Haifischzahn"-Kamms aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte ü.N bei 45 W und 45 °C. Die Leseweiten betrugen zwischen 600-1000 Bp.

10 x TBE: 1,34 M Tris, 25 mM EDTA, 450 mM Borsäure pH 8,5

4,6 % Gellösung (60 ml): 21 g Harnstoff, 5 ml 10 x TBE, 0,5 ml DMSO, 30,5 ml Wasser und 5,6 ml Acrylamid („Rapid Gel XL“ von USB, Bad Homburg)

2.13 Chromosomale Lokalisierung von Genen mit Hilfe des „radiation hybrid mappings“ (Goss & Harris, 1975)

Die Lokalisierung von Genen mit dieser Methode erfolgte durch PCR, bei der genomische DNA aus Hybrid-Zellen als Matrize verwendet wurde. Zur Erzeugung dieser Hybrid-Zellen wurde die genomische DNA der Spenderzellen mit Röntgenstrahlen fragmentiert. Diese genomischen DNA-Fragmente wurden mit Empfänger-Zellen fusioniert. Es entstanden unterschiedliche Zelllinien, die sich durch integrierte genomische-Fragmente der Spenderzelle unterschieden. Für den in dieser Arbeit verwendeten Goodfellow T31 Panel (Research Genetics, Huntsville, AL) wurden embryonale Primärzellen (129aa) als Spenderzellen und eine Hamster Zelllinie (A23) als Empfängerzellen zur Erzeugung der Hybride eingesetzt (McCarthy *et al.*, 1997). Die Bestrahlung der Spenderzell-DNA mit 3000 Rad erzeugte DNA-Fragmente von durchschnittlich 9,8 Mb Länge. Der T31 Panel umfaßt 100 unterschiedliche

Zelllinien. Bevor PCR-Versuche mit der genomischen DNA der Hybrid-Zellen durchgeführt werden konnten, mußten Kontroll-PCR's gemacht werden, um die Spezifität der Primer zu verifizieren. Es wurde genomische DNA aus Maus-, Hamster- und einer Mischung aus Maus- und Hamsterzellen als Matrize eingesetzt. Wurde nur mit der Mauszell-genomischen-DNA und dem Mix beider genomischen DNA's das erwartete Fragment amplifiziert, konnten die Primer verwendet werden. Mit der genomischen DNA der unterschiedlichen Zelllinien als Matrize wurden PCR-Reaktionen durchgeführt und es wurde ein spezifisches Bandenmuster erhalten. Die Auswertung wurde mit Hilfe des servers des *Whitehead Institutes, MIT* (Massachusetts Institute of Technology; http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/mouse_rh/rhmap-auto/rhmapper.cgi, Multipoint Analyse, Boehnke *et al.*, 1991) durchgeführt. Eine höher aufgelöste chromosomale Lokalisierung des Markers, der am nächsten zum untersuchten Gen liegt, wurde mit der Software des servers des *NCBI* (National Center for Biotechnology Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/hum_srch?chr=mouse_chr.inf) erzielt.

PCR-Bedingungen:

Zyklusschritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	94 °C	35 sec
Primerbindung	60 °C (<i>TORS1</i>)	35 sec
Synthese	72 °C	40 sec

Dieser Zyklus wurde für Rezeptor *TORS1* 35 mal wiederholt. Für *TORS1* wurden in den Versuchen die Primer # 2512/# 2513 verwendet.

Die PCR-Reaktionen (10 µl) wurden zu Beginn 4 min bei 94 °C denaturiert und nach Beendigung der Zyklen wurden die Fragmente für 2 min bei 72 °C aufgefüllt. Der gesamte PCR-Ansatz wurde in einem 1 % igen Agarosegel aufgetrennt (2.5.4).

2.14 Membranproteinpräparationen

2.14.1 Präparation von Membranproteinen aus COS-1 Zellen

Für die heterologe Expression von Proteinen in COS-1 Zellen wurde das Plasmid pSVL (Pharmacia) eingesetzt (2.3.2). Die Zellen von einer Ø 9 cm Schale wurden am 2. Tag nach der Transfektion 3 x mit jeweils 5 ml PBS gewaschen, mit einem Gummispatel abgeschabt und zentrifugiert (15 min, 300 g, 4 °C). Dann wurden die Zellen in 2 ml Puffer A resuspendiert und in einem Teflon-Glas-Homogenisator lysiert. Zellreste und Zellkerne wurden durch Zentrifugation entfernt (7 min, 100 g, 4 °C). Der lösliche Überstand wurde auf Eis belassen. Das Pellet wurde erneut in 1 ml Puffer A resuspendiert, homogenisiert und zentrifugiert (7 min, 100 g, 4 °C). Die löslichen Überstände der beiden Zentrifugationen wurden vereinigt und ultrazentrifugiert (20 min, 50.000 g, 4 °C). Das Pellet wurde zum hypertonischen Waschen in 1 ml Puffer B resuspendiert und dann ultrazentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Puffer C aufgenommen und bei –80 °C gelagert. Die Konzentration an Protein wurde durch die Amidoschwarz-Methode (2.15.2) bestimmt. Die Ausbeute betrug ~ 300 µg Protein pro Ø 9 cm Schale.

<u>Puffer A (hypotonisch):</u>
20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4 mit Proteaseinhibitoren (<u>m</u> ammalian <u>P</u> rotease <u>I</u> nhibitor <u>C</u> ocktail mPIC 1: 400)
<u>Puffer B (hypertonisch):</u> wie Puffer A, jedoch 500 mM NaCl
<u>Puffer C (isotonisch):</u> wie Puffer A, jedoch 150 mM NaCl und 2 % Triton X-100

2.14.2 Präparation von Membranen aus Hoden sowie Nebenhoden-Spermien der Maus

Die Hoden von Mäusen wurden, wie unter 2.9.1.2 beschrieben, präpariert.

Die Nebenhoden von Mäusen wurden präpariert (2.9.1.2) und mit einer Schere in kleine Stücke zerschnitten. Diese Stücke wurden in PBS⁺ (je 2 ml/Nebenhoden) unter ständigem Invertieren für 2 – 3 h bei RT inkubiert. Die Nebenhoden-Spermien wurden so aus dem Nebenhoden ausgespült. Die Nebenhoden-Spermien wurden entweder pelletiert (10 min, 1.000 g, 4 °C) und für eine Membranpräparation eingesetzt oder direkt für immunzytochemische Nachweise verwendet (2.19.3).

Die Hoden bzw. Spermien wurden in Puffer A ohne DTT (2.14.1) resuspendiert. Die eingesetzten Volumina betrugen:

1 ml Puffer A für einen Maus-Hoden bzw. Nebenhoden-Spermien aus 4 Nebenhoden.

Die Zellen wurden mit einem Glas-Teflon-Homogenisator aufgebrochen, zweimal abwechselnd eingefroren und aufgetaut und 3 x 10 sek ultrabeschallt. Zellreste und Zellkerne wurden durch Zentrifugation entfernt (7 min, 100 g, 4 °C). Das Pellet wurde erneut in Puffer A resuspendiert, homogenisiert, zweimal abwechselnd eingefroren und aufgetaut und ultrabeschallt (3 x 10 sek). Zellreste und Zellkerne wurden erneut durch Zentrifugation entfernt (7 min, 100 g, 4 °C). Die Überstände der beiden Zentrifugationsschritte wurden ultrazentrifugiert (20 min, 50.000 g, 4 °C). Das Pellet wurde in Puffer B (siehe oben, ohne DTT) resuspendiert und ultrazentrifugiert (20 min, 50.000 g, 4 °C). Die Membranen wurden in Puffer C mit 1 % Triton X-100 resuspendiert.

Die Ausbeute an Proteinen betrug:

Maus-Spermien (4 Nebenhoden) ~ 400 µg und Maus-Hoden (2 Hoden) 7 mg.

2.15 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

2.15.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976)

Es wurde das „Protein Assay“-Farbreagenz von BioRad (München) verwendet. Die zu vermessende Proteinprobe wurde mit Wasser auf ein Volumen von 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Farbreagenz vermischt. Danach wurde die OD₅₉₅ bestimmt. Eine Kalibrierungskurve wurde mit BSA (NEB, Schwalbach) erstellt. Im linearen Bereich der Kalibrierungskurve (1 - 10 µg Protein) entspricht eine OD₅₉₅ von 0,06 ca. 1 µg BSA.

2.15.2 Konzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz

Die Konzentration von Proteinlösungen, die Detergentien oder Lipide enthalten, kann nicht durch die Methode nach Bradford (2.15.1) bestimmt werden. Die Protein-Konzentration solcher Proben wurde mit der Amidoschwarz-Methode bestimmt. Dabei wurde der „Amidoschwarz 10B“-Farbstoff von Merck (Darmstadt) verwendet. Die zu vermessende Probe wurde mit Wasser auf 200 µl aufgefüllt und mit 20 µl 10 % SDS vermischt, um Proteine zu solubilisieren. Danach wurden 30 µl 1 % SDS, 1 M Tris/HCl pH 7,5 hinzu gegeben. Nach dem Mischen wurden 60 µl 104 % (w/v) TCA zur Fällung der Proteine hinzu gegeben und der Ansatz nochmals gemischt. Die Proben wurden 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf einen Membranfilter (Filter HA, Porengröße 0,45 µm von Millipore, Eschborn), der zuvor mit 3 x 1 ml 6 % TCA gewaschen wurde, aufgetragen. Die Filter wurden erneut mit 3 x 1 ml 6 % TCA gewaschen und für 5 min mit Färbelösung gefärbt. Danach wurden die Filter kurz mit Wasser gespült und dreimal für 1 min in Entfärbelösung gelegt. Aus den getrockneten Filtern wurden die gefärbten Filterbereiche ausgeschnitten. Danach wurden die Filterstücke in je 1 ml Elutionslösung für 20 min bei RT geschüttelt. Es wurde die OD₆₃₀ bestimmt. Eine Kalibrierungskurve wurde mit BSA (NEB, Schwalbach) erstellt. Im linearen Bereich der Kalibrierungskurve (1 - 15 µg Protein) entspricht eine OD₆₃₀ von 0,03 ca. 1 µg BSA.

Färbelösung:

0,5 % Amidoschwarz B10
45 % Methanol
10 % Essigsäure

Entfärbelösung:

90 % Methanol
2 % Essigsäure

Elutionslösung:

50 % Ethanol
25 mM NaOH
50 µM EDTA

2.16 Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese

Proteine wurden durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) getrennt. Für analytische Zwecke wurden „Minigel Twin“-Elektrophorese-Kammern (Gelmaße: 0,15 x 8 x 10 cm) von Biometra verwendet. Die Trennung erfolgte mit 15 mA im Sammelgel und 20 mA im Trenngel und dauerte ca. 90 min. Es wurden 7,5 - 12,5 %ige Trenngele und 5,4 %ige Sammelgele verwendet.

4 x SDS-Probenpuffer: 0,01 % Bromphenolblau, 4 % β -Mercaptoethanol, 50 % Glycerin, 6,4 % SDS, 200 mM Tris/HCl pH 6,8

10 x SDS-Laufpuffer: 1,92 M Glyzin, 250 mM Tris, 1 % SDS

2.16.1 Verwendete Proteinmarker für die SDS-PAGE

Es wurden Marker von Pharmacia (Uppsala/Schweden) für den niedrigen („LMW: Low molecular weight calibration kit“) und den hohen („HMW: High molecular weight calibration kit“) Molekulargewichtsbereich verwendet.

Niederer Molekulargewichtsbereich: 94, 67, 43, 30, 20 und 14,4 kD.

Hoher Molekulargewichtsbereich: 212, 170, 116, 76 und 53 kD.

2.16.2 Färben von SDS-PAGE-Gelen mit der Coomassie-Blaufärbung

Das Färben von SDS-PAGE-Gelen wurde in Anlehnung an Meyer & Lamberts (1965) durchgeführt. Es wurde der Farbstoff Coomassie Blue R 250 von Serva (Heidelberg) verwendet. Die Gele wurden für 1 - 2 h oder ü.N. in Färbelösung gelegt. Anschließend wurden die Gele bis zum Erreichen des gewünschten Färbegrades in Entfärbelösung gelegt und auf Whatman-Papier getrocknet.

Färbelösung: 0,2 % Coomassie Blue R 250, 30 % Ethanol (vergällt), 10 % Essigsäure

Entfärbelösung: 30 % Ethanol (vergällt), 10 % Essigsäure

2.17 Transfer und Nachweis von Proteinen auf Membranen („Westernblot“)

Die Proteine wurden in SDS-PAGE-Gelen aufgetrennt (2.16) und in Anlehnung an Towbin *et al.* (1979) auf PVDF-Membranen („Immobilon P“ von Millipore, Eschborn) transferiert. Der Transfer wurde bei 2,5 mA/cm² in einem „Milliblot-Graphit-Elektroblot“-System Millipore (Eschborn) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Transfer wurde durch reversible Färbung der Proteine mit 0,2 % Ponceau S (Sigma, Deisenhofen) in 2 % Essigsäure überprüft. Gegebenenfalls wurde die Blotmembran in Streifen geschnitten. Die Streifen mit den immobilisierten Proteinen wurden 1 h bei RT mit 5 % Magermilchpulver (Marke: „Glücksklee“) oder ü.N. bei 4 °C mit 1 % Magermilchpulver in PBS abgesättigt. Danach wurden die Streifen zweimal für jeweils 5 min mit PBS/0,02 % Tween-20 (Sigma, Deisenhofen) gewaschen und für 1 h mit geeigneten Antikörperverdünnungen in PBS/0,02 % Tween-20 inkubiert. Die Membranstreifen wurden zweimal gewaschen und mit Zweit-Antikörper (meist 1: 5.000 verdünnt) in PBS/0,02 % Tween-20 für 30 min inkubiert. Abschließend wurde zweimal 5 min mit PBS/0,02 % Tween-20 und zweimal 5 min mit PBS

gewaschen. Alle Schritte wurden (bis auf das Absättigen der Blotmembran) bei RT durchgeführt. Die eingesetzten sekundären Antikörper (Amersham, Little Chalfont/England) waren mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Der Nachweis der spezifischen Komplexe aus Erst- und Zweitantikörper erfolgte mit dem SuperSignal™ ULTRA Chemiluminescent Substrate (Pierce) nach Herstellerangaben. Für den photographischen Nachweis der Lumineszenzsignale wurde „ECL Hyperfilm“ des selben Herstellers verwendet. Immobilisierte Proteine konnten nachträglich durch Amidoschwarz gefärbt werden (2.15.2).

PBS (pH 7,4 - 7,5): 137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄

2.18 Heterologe Genexpression

2.18.1 Kulturbedingungen für HEK 293-Zellen und COS-1 Zellen

Für die heterologe Expression von cDNA wurde die menschliche, embryonale Nierenzelllinie HEK 293 (HEK 293-Zellen) verwendet. Diese mit einem Adenovirus transformierten Zellen wurden in dem Nährmedium M10 [Minimal Essential Medium (MEM), fötales Kälberserum (10 %), L-Glutamin (2 mM), Antibiotika/Antimykotika (1 %), nicht essentielle Aminosäuren (1 %), GIBCO BRL)] bei 37 °C, 5 % CO₂ und ~ 95 % Luftfeuchtigkeit in Petrischalen (Ø 9 cm) kultiviert. Die Verdopplungszeit der HEK 293-Zellen betrug ca. 24 h. Bei einer Dichte von ~ 10⁷ Zellen/Ø 9 cm Schale (entsprechend 90 % Konfluenz) wurden die Zellen abgelöst und auf neue Schalen verteilt. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 6 - 9 ml PBS gewaschen und dann mit 1 ml Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %, GIBCO BRL) bei 37 °C abgelöst. Die Zellen wurden in 8 - 10 ml M10-Medium resuspendiert. In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zelldichte der Suspension bestimmt. Ein Teil der Zellen wurde für die Zellerhaltung zu ~ 6 - 13·10⁵ Zellen (entsprechend 10 - 20 % Konfluenz) auf Ø 9 cm Schalen mit frischem M10-Medium ausgesät. Die verbleibenden Zellen wurden für die Transfektion zu 2·10⁵ Zellen auf Ø 5 cm Schalen oder zu 6 - 9·10⁵ Zellen auf Ø 9 cm Schalen ausplattiert. Nach 25 Passagen wurden die HEK 293-Zellen verworfen und ein neues Aliquot tiefgefrorener Zellen für die Aussaat vorbereitet.

Ferner wurde die COS-1 Zelllinie (COS-1 Zellen) für die heterologe Expression von cDNA verwendet. COS-1 Zellen sind abgeleitet von CV-1 Nierenzellen der Neuweltaffenart *Cercopithecus aethiops*. Sie wurden unter fast den gleichen Bedingungen wie die HEK 293-

Zellen kultiviert. Der Unterschied ist, daß nicht M10, sondern D10 [Dulbeccos Modified Eagle's Medium, low Glukose, fötales Kälberserum (10 %), L-Glutamin (2 mM), Antibiotika/Antimykotika (1 %), GIBCO BRL] als Nährmedium verwendet wurde.

2.18.2 Transiente Transfektion von HEK 293-/COS-1 Zellen

Für die transiente Transfektion wurde der entsprechende Expressionsklon von *TORS1* in pSVL und pcDNAI-amp verwendet. Es wurde ein Transfektionsreagenz von Roche (FuGENE™ 6 Transfection Reagent) verwendet.

Für immunzytochemische (siehe 2.19.2) Untersuchungen wurden 2×10^5 Zellen ($\varnothing$ 5 cm Schalen, HEK 293-Zellen), 1×10^5 Zellen ($\varnothing$ 3 cm Schalen, COS-1 Zellen), 4×10^5 Zellen ($\varnothing$ 5 cm Schalen, COS-1 Zellen) und für Membranpräparationen (siehe 2.14.1) $6 - 9 \times 10^6$ Zellen ($\varnothing$ 9 cm Schalen, COS-1 Zellen) transfiziert. Die Transfektionsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

	Pro well einer 6er Multiwellschale	9 cm Schale
Volumen der Zellsuspension	2 ml	10 ml
Medium	97 μ l	727,5 μ l
FuGENE	3 μ l	22,5 μ l
DNA	1 μ l (1 μ g)	7,5 μ l (7,5 μ g)

Zunächst wurde das Transfektionsreagenz direkt in vorgelegtes, serumfreies Medium pipettiert und diese Mischung für 5 min bei RT inkubiert. Die Lösung wurde tropfenweise zur vorgelegten DNA gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Hiernach wurde die Lösung tropfenweise zu den Zellen pipettiert. Die Inkubation mit dem Transfektionreagenz betrug 24 h. Die Zellen wurden 1 - 2 x mit PBS gewaschen und mit 2 ml (pro well einer 6er Multiwellschale) PBS/Trypsin (0,05 % Trypsin) abgelöst. Die Zellen wurden in geeigneter Dichte in eine 24er Multiwellschale ausgesät. Weitere 24 h nach der Umsetzung wurden die Zellen für die Immunzytochemie oder für die Membranpräparation weiterverwendet.

2.19 Immunzytochemie

2.19.1 Antikörper

2.19.1.1 Primäre Antikörper

a) *tag*-Antikörper

Für den Nachweis des heterolog exprimierten Duftstoffrezeptors wurde ein Antikörper verwandt, der ein *tag*, d.h. ein fremdes Sequenzmotiv erkennt, das dem N-Terminus des Duftstoffrezeptors angehängt wurde (siehe 3.1.6.1.4). Verwendet wurde ein polyklonaler, affinitätschromatographisch gereinigter Ratten-Antikörper, der gegen ein Peptid (YPYDVPDYA) aus dem Influenza Hämagglutinin-Protein gerichtet ist.

Die verwendeten Antikörper von Santa-Cruz wurden alle in Kaninchen erzeugt.

b) Adenylylzyklase III-Antikörper

Für den Nachweis der Adenylylzyklase III wurde der Antikörper C-20 von Santa-Cruz verwendet. Dieser ist gegen die C-terminalen Aminosäuren 1125 – 1144 (RPAAFPNGSSVTLPHQVVDN) gerichtet. Dieser Antikörper ist spezifisch für die Adenylylzyklase vom Typ III und kreuzreagiert mit den Zyklasen aus Maus und Ratte.

c) $G\alpha_{olf}$ -Antikörper

Zum Nachweis von $G\alpha_{olf}$ wurde ein affinitätschromatographisch gereinigter polyklonaler Antikörper gegen die Aminosäuren 87 – 105 (**KDALVTIISAMSTII**) von $G\alpha_{olf}$ der Ratte verwendet. Die Bezeichnung des Antikörpers ist K-19. Der Antikörper kreuzreagiert mit Maus $G\alpha_{olf}$.

d) $G\alpha_s/G\alpha_{olf}$ -Antikörper

Für den Nachweis von stimulatorischen G-Proteinen ($G\alpha_s$ und $G\alpha_{olf}$) wurde der anti- $G_{s/olf}$ -Antikörper von Santa-Cruz benutzt. Dieser affinitätschromatographisch gereinigte polyklonale Antikörper ist gegen die Aminosäuren 377 - 394 (**NDCRDIIQRMHLRQYELL**) von $G\alpha_s$ der Ratte gerichtet. Die entsprechende Sequenz von $G\alpha_{olf}$ (**NDCRDIIQRMHLKQYELL**) unterscheidet sich von der $G\alpha_s$ -Sequenz nur durch einen konservativen Aminosäureaustausch. Der Antikörper erkennt nach Angaben des Herstellers $G\alpha_s$ und $G\alpha_{olf}$ und ist mit Gewebe aus Ratte, Maus und Mensch getestet. Der Antikörper hat die Bezeichnung C-18.

e) Antikörper 66 gegen die α -Untereinheit des Zapfenkanals

Dieser polyklonale Kaninchen-Antikörper ist gegen die letzten 90 Aminosäuren der Ratten rCNGA3-Untereinheit gerichtet (K581 – D670) (Meyer *et al.*, 2000). Es wurde sowohl das Serum (FPc66) wie auch affinitätschromatographisch gereinigter Antikörper verwendet (PPc66).

f) Antikörper gegen die Guanylylzyklase Typ D (GC-D)

Für den Nachweis der GC-D wurde ein polyklonaler Kaninchen Antikörper eingesetzt. Der Antikörper I055 ist gegen ein intrazelluläres Epitop der GC-D gerichtet. Der Antikörper wurde mir freundlicherweise von Dr. D. Garbers (Dallas, USA) überlassen.

g) Rhodopsin Antikörper B6–30

Der monoklonale Maus-Antikörper ist gerichtet gegen die ersten 15 Aminosäuren des Rinder-Rhodopsins (Adamus *et al.*, 1988). Der Antikörper wurde mir freundlicherweise von Dr. P.A. Hargrave (Gainesville, USA) überlassen.

2.19.1.2 Sekundäre Antikörper

a) Immunzytochemie

Es wurden Affen-anti-rabbit-Alexa-488 sowie Affen-anti-mouse-Alexa-488 Antikörper 1: 400 eingesetzt (Molecular Probes).

b) Westernblot-Analysen

Es wurden Affen-anti-rabbit-HRP (Amersham) und Ziege-anti-rat-HRP Konjugate (Jackson-Laboratories) verwendet.

c) *In situ* Hybridisierung

Für *in situ* Hybridisierungen wurden Schaf-anti-Digoxigenin F_{ab}-Fragmente (1: 500) eingesetzt, die an Alkalische-Phosphatase gekoppelt sind (Roche).

2.19.2 Immunzytochemie an transfizierten COS-1 Zellen

Transfizierte Zellen wurden 10 min mit Paraformaldehyd (4 %) in Phosphatpuffer (PB: 0,1 M, pH 7,4) auf den Glasplättchen fixiert und dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einer Lösung aus normalem Ziegen Serum (NGS: 10 %), Rinderserum-Albumin (BSA: 5 %) und Triton X-100 (0,5 %) in PBS 1 h präinkubiert. Die Immunreaktion wurde mit einer Verdünnung des primären Antikörpers in PBS mit 1 % NGS, 0,5 % BSA und 0,05 % NaN₃ für 1 h bei RT durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen (jeweils 5 min) mit PBS wurden die Zellen mit dem sekundären, Fluorophor-gekoppelten Antikörper verdünnt in PB mit 1 % BSA (siehe 2.19.1.2) für 30 min bei RT inkubiert und wieder 3 mal mit PB gewaschen. Die Glasplättchen mit den Zellen wurden auf Objektträgern

eingedeckt (Eindeckmedium: Prolong, Molecular Probes). Nachdem das Eindeckmedium getrocknet war ($\sim 2 - 3$ h), wurden die Zellen mikroskopiert.

2.19.3 Immunzytochemie an Nebenhoden-Spermien der Maus

Für die immunzytochemischen Färbungen wurden Nebenhoden-Spermien auf beschichteten Plättchen ausplattiert.

Concanavalin A Beschichtung:

In Ethanol gelagerte Deckgläschen (50 Stück) wurden über der Flamme sterilisiert und in ein 50 ml Kunststoff Reaktionsgefäß gegeben. Die Deckgläschen wurden 15 min unter ständigem Invertieren in PBS⁺/EDAC (5 ml PBS⁺, 150 mg EDAC, Sigma) inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Deckgläschen für 1 h in PBS⁺/Concanavalin A (5 ml PBS⁺, 40 mg Concanavalin A, Typ V, Sigma) bei RT unter ständigem Invertieren inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Deckgläschen mehrfach in PBS⁺ gewaschen und trocken bei 4 °C aufbewahrt.

Gelatine Beschichtung:

In Ethanol gelagerte Deckgläschen wurden getrocknet (60 °C) und ca. 30 sek in eine Gelatinelösung (0,5 %, 50 °C) getaucht. Die Deckgläschen wurden ü.N. bei 60 °C getrocknet.

Die beschichteten Deckgläschen wurden in eine 24-well Schale gelegt und jeweils ein Tropfen der verdünnten Nebenhoden-Spermien Lösung auf die Deckgläschen gesetzt. Nachdem die Spermien 30 min sedimentiert waren, wurden die Spermien für 5 min mit 4 % Paraformaldehyd in PB fixiert und dreimal mit PBS gewaschen. Es folgte eine Präinkubation (10 % NGS, 5 % BSA, 0,5 % Triton X-100 in PBS) für 30 min bei RT und anschließend die Inkubation mit dem Erstantikörper (verdünnt in 1 % NGS, 0,5 % BSA in PBS) ü.N. bei 4 °C. Die Spermien wurden dreimal 5 min mit PBS gewaschen und für 1 h bei RT mit dem Zweitantikörper (verdünnt in 1 % BSA in PB) inkubiert. Die Deckgläschen mit den Zellen wurden auf Objektträgern eingedeckt.

2.19.4 Immunhistochemie an paraffineingebetteten Maus-Hodenschnitten

Für die immunhistochemischen Versuche wurde zunächst das Paraffin im Gewebe durch wässrige Lösung ersetzt.

Arbeitsschritte:

Lösungsmittel	Dauer
Roticlear	2 x 10 min
100 % Ethanol	10 min
90 % Ethanol	5 min
80 % Ethanol	5 min
70 % Ethanol	5 min
H ₂ O	5 min
PBS	15 min

Die Schnitte wurden für 30 min präinkubiert (10 % NGS, 5 % BSA, 0,5 % Triton X-100 in PBS) und anschließend in einer feuchten Kammer bei 4 °C ü.N. mit dem Erstantikörper inkubiert (1 % NGS, 0,5 % BSA in PBS). Die Schnitte wurden 3 x 5 min in PBS gewaschen und mit dem Zweitantikörper (1 % BSA in PB) bei RT in einer feuchten Kammer für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 5 min mit PBS gewaschen und eingedeckt.

2.20 Durchlicht-, Fluoreszenz- und konfokale Mikroskopie

Zur Mikroskopie wurde ein inverses konfokales Lasermikroskop (TCS SP, Leica) eingesetzt. Das Mikroskop war sowohl für Durchlicht-, Fluoreszenz-, als auch für konfokale Lasermikroskopie geeignet. Für die Durchlichtmikroskopie war das Mikroskop mit einer gewöhnlichen spannungsgesteuerten Lichtquelle ausgestattet. Zur Kontrasterzeugung besaß das Mikroskop wahlweise Phasenkontrastoptik und Differential-Interferenz-Kontrast-Optik (DIC-Optik). Als Lichtquelle für die Fluoreszenzmikroskopie stand eine Hg-Höchstdrucklampe zur Verfügung. Zur Unterscheidung der Fluoreszenzsignale der

Fluorophore FITC (bzw. Alexa-488) und Cy3 wurden unterschiedliche Filtersätze verwendet, deren Eigenschaften nachfolgend aufgelistet sind.

Fluorophor	FITC/Alexa-488	Cy3
Anregungsfilter	450 nm – 490 nm	546 nm
Strahlenteiler	510 nm	580 nm
Sperrfilter	> 520 nm	> 590 nm

Zur konfokalen Lasermikroskopie war das Mikroskop mit einem Ar/Kr-Laser ausgerüstet. Dieser Laser emittiert Spektrallinien verschiedener Wellenlänge, von denen zwei zur Anregung der Fluorophore verwendet wurden: 488 nm für FITC und Alexa-488 und 568 nm für Cy3.

3 Ergebnisse

Das Wissen über die Chemotaxis von Säugetier-Spermien ist dürftig. Obwohl eine potentielle Quelle für Lockstoffe - die Follikelflüssigkeit - identifiziert werden konnte, war es bislang nicht möglich einen chemotaktisch aktiven Faktor zu isolieren, geschweige denn einen entsprechenden membrangebundenen Rezeptor des Spermiums zu identifizieren.

Das Kapitel „Ergebnisse“ gliedert sich in drei Abschnitte.

1) Sogenannte Duftstoffrezeptoren (OR), die in Spermien lokalisiert sind, könnten als Lockstoffrezeptor fungieren. Um einen Hinweis auf die Funktion der OR in Spermien zu erlangen, wurde die gezielte Entfernung (konditionaler *knock out*) eines OR-Gens in Spermien geplant. Ein geeignetes OR-Gen sollte mit Hilfe einer vergleichenden Expressionsanalyse von verschiedenen im Hoden exprimierten OR identifiziert werden. Im ersten Abschnitt wird die Identifizierung von 12 unterschiedlichen OR cDNA's aus dem Maushoden beschrieben. In einer Expressionsanalyse mit Hilfe von RT-PCR- und Northernblot-Experimenten konnten zwei OR identifiziert werden, die für ein *knock out* Experiment geeignet wären. Diese Rezeptoren wurden genomisch kloniert und charakterisiert.

2) In Spermien müssen zusätzlich zu den OR Wechselwirkungspartner exprimiert sein. In Riechzellen wechselwirken OR mit dem stimulatorischen G-Protein G_{olf} das seinerseits die ACIII aktiviert (siehe 1.1.1.2, Box). In Spermiovorläuferzellen wurden G_{olf} und die ACIII nachgewiesen. Die veröffentlichten Daten zur Expression der ACIII sind jedoch widersprüchlich. Unklar ist auch, ob diese Proteine zusammen mit den Duftstoffrezeptoren in reifen Spermien exprimiert sind.

Im zweiten Abschnitt wird die Klonierung potentieller Wechselwirkungspartner von Duftstoffrezeptoren aus dem Maus-Hoden beschrieben. Durch Lokalisation der Wechselwirkungspartner im Hoden sowie in Nebenhoden-Spermien sollte untersucht werden, ob sie prinzipiell mit Duftstoffrezeptoren wechselwirken können.

3) In Invertebraten-Spermien binden membranständige Rezeptor-Guanylylzyklasen die chemotaktisch wirksamen Faktoren. Mit Hilfe einer Datenbankrecherche¹ (Altschul *et al.*, 1997) konnte ein Hinweis auf die Expression einer membranständigen Guanylylzyklase, GC-D, im Maus-Hoden gefunden werden. Die Klonierung und Lokalisation der GC-D sollte zeigen, ob eine Funktion der GC-D bei der Chemotaxis von Säugetier-Spermien denkbar ist.

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>, Datenbank: Mouse EST

3.1 Molekularbiologische Expressionsanalyse von *OR*-Genen

Es kann als gesichert angesehen werden, daß mehr als ein *OR*-Gen im adulten Hoden einer Spezies exprimiert wird (Vanderhaeghen *et al.*, 1993, 1997a, b; Walensky *et al.*, 1995; Kebekus, Dissertation, Hannover, 1998). Expressionsanalysen in verschiedenen Spezies zeigen, daß die im Hoden exprimierten *OR*-Gene unterschiedlich häufig transkribiert werden (Vanderhaeghen *et al.*, 1993, 1997b). Ein *OR*-Gen des Hundes (DTMT) ist nur im Hoden und nicht in anderen Geweben exprimiert (Parmentier *et al.*, 1992; Vanderhaeghen *et al.*, 1993). Ziel der Expressionsanalyse war es, im Maus-Hoden ein *OR*-Gen zu identifizieren, das stärker als die anderen *OR*-Gene transkribiert wird und nur im Hoden exprimiert ist.

3.1.1 Nachweis von *OR*-Genen im Maus-Hoden

Aus einer Duftstoffrezeptor Datenbank² konnten 15 unterschiedliche cDNA-Fragmente ermittelt werden, die mit Maus-Hoden-cDNA amplifiziert worden waren (Vanderhaeghen *et al.*, 1997b). Diese Ergebnisse sollten zunächst durch PCR-Experimente mit Hoden-cDNA aus dem Mausstamm 129/SV verifiziert werden. Für die cDNA-Synthese (2.10) wurde Poly (A)⁺ RNA aus Maus-Hoden isoliert (2.9.2). Für die 15 Rezeptoren wurden genspezifische Primer ausgesucht (7.1, Tabelle 5). Um außer den veröffentlichten cDNA-Fragmenten weitere *OR*-Fragmente zu amplifizieren, wurde ein Primerpaar (# 2270/# 2271) ausgesucht, das gegen zwei konservierte Aminosäuresequenzbereiche innerhalb der *OR*-Familie gerichtet ist (Abb. 9)

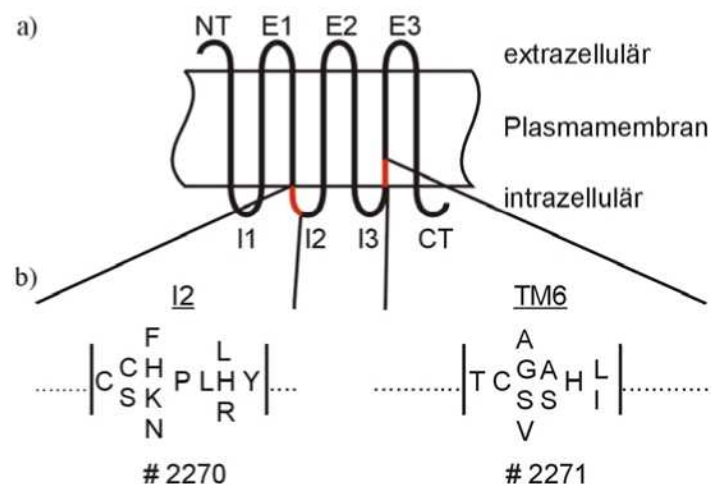


Abb. 9: Hoch konservierte Aminosäure-Sequenzmotive der *OR*-Familie. (Siehe auch Abb. 6, 1.1.1.2).

a) Schematische Darstellung eines *OR*. Der N-Terminus sowie die Verbindungsschleifen E1 – E3 sind extrazellulär lokalisiert. Die 7 transmembranalen Segmente durchspannen die Plasmamembran. Die Verbindungsschleifen I1 – I3 sowie der C-Terminus sind intrazellulär lokalisiert. b) Für das Primerpaar # 2270/# 2271 wurden konservierte Bereiche in I2 und TM6 ausgewählt. Die Aminosäuren sind mit dem Einbuchstabenkode gekennzeichnet.

² <http://ycmi.med.yale.edu/senselab/ordb/>

Die verwendeten Primer, Hybridisierungspositionen und Hybridisierungstemperaturen sind im Anhang (7.1, Tabelle 5) zusammengestellt.

Die amplifizierten cDNA-Fragmente wurden in pBluescript-SK⁻ kloniert (2.6.3). Die Sequenzanalyse (2.12) von rekombinanten Klonen ergab, daß mit den genspezifischen Primerpaaren unter stringenten PCR-Bedingungen (7.1, Tabelle 5) nur jeweils das *OR* cDNA-Fragment amplifiziert wurde, für das die Primer ausgesucht worden waren. Fünf der publizierten *OR*-Fragmente (TPCR 05, 06, 09, 11, 53, 56, Vanderhaeghen *et al.*, 1997) konnten nach 45 PCR-Zyklen nicht amplifiziert werden und wurden daher nicht weiter untersucht. Mit dem Primerpaar # 2270/# 2271, das gegen konservierte Sequenzbereiche gerichtet ist, konnten unter gering stringenten Bedingungen neben den bekannten *OR* cDNA-Fragmenten zwei neue amplifiziert werden. In dieser Arbeit verwendete ich folgende Nomenklatur für die *OR*: *TOR* (*Testis Odorant Receptor*) und eine Ziffer stehen für die veröffentlichten bzw. *S1* und *S3* für die neuen *OR*-Fragmente. Eine Zuordnung zu der von Vanderhaeghen *et al.* (1997b) gewählten Nomenklatur ist dem Anhang (7.1, Tabelle 4) zu entnehmen.

Die Translation der cDNA-Fragmente ergibt in allen Fällen ein durchgehendes Leseraster. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen (~ 120 Aminosäuren aus dem Bereich zwischen TM 3 und TM 7) wurden verglichen und die Verwandtschaftsbeziehungen in einem Dendrogramm (Abb. 10) graphisch dargestellt.

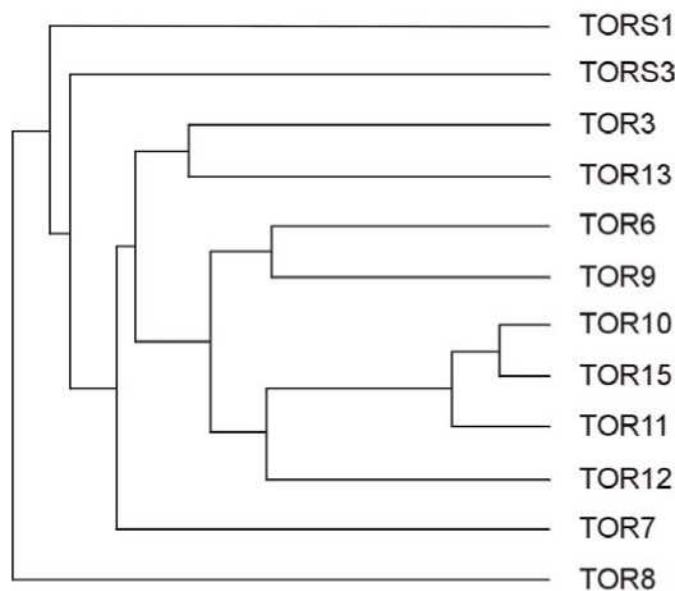


Abb. 10: Dendrogramm von putativen OR aus Maus-Hoden.

Das Dendrogramm basiert auf einem Vergleich der identischen Aminosäuren. Verglichen wurden die Bereiche zwischen TM 3 und TM 7 der Rezeptoren. Erstellt wurde das Dendrogramm mit dem Programm Clustal, Version 1.20, PC/Gene, Version 6.70, IntelliGenetics Inc.. Das Präfix TOR bedeutet *Testis Odorant Receptor*.

Aufgrund ihrer Homologie werden OR in Familien (> 40 % identische Aminosäuren) und Subfamilien (> 60 % identische Aminosäuren) eingeteilt (Lancet *et al.*, 1993). Nach diesen

Kriterien gehören TOR10, 11 und 15 mit mindestens 76 % identischen Aminosäuren zu einer Subfamilie. Alle anderen Rezeptoren stellen Mitglieder unterschiedlicher Subfamilien dar, da bereits die beiden nächst verwandten Sequenzen, TOR 10 und TOR 12, nur noch eine Aminosäure-Identität von 54 % besitzen. Dies zeigt, daß OR, die im Hoden exprimiert sind, keine spezielle Subfamilie bilden, sondern aus unterschiedlichen Subfamilien stammen.

Um zu überprüfen, ob die 12 OR in Keimzellen exprimiert sind, wurden PCR-Experimente mit cDNA aus einer Mischung von Spermatogonien, Spermatozyten und Spermatiden durchgeführt. Die aus den gereinigten Keimzellen isolierte RNA wurde mir von Prof. Darszon (Guernavaca, Mexico) überlassen. Es konnte ein cDNA-Fragment für jeden Rezeptor mit der Keimzell-cDNA amplifiziert werden (nicht gezeigt).

3.1.2 Expression von OR-Transkripten während der Entwicklung des Keimzellepithels

Es gibt Hinweise darauf, daß OR bei Entwicklungsprozessen eine Rolle spielen. So sind OR an der zielgerichteten Verknüpfung von Axonen der OSN mit Neuronen des olfaktorischen Bulbus beteiligt (Mombaerts *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998). Denkbar ist auch eine Funktion bei der Organogenese, da Duftstoffrezeptoren während der embryonalen Entwicklung des Rattenherzens nachgewiesen werden konnten (Drutel *et al.*, 1995). OR könnten also - neben ihrer Funktion als Rezeptor für Lockstoffe - im Hoden auch eine Funktion bei der Ausbildung des Keimzellepithels oder der Entwicklung der Keimzellen (Spermatogenese) innehaben.

Die Reifung der Keimzellen (Spermatogenese) läßt sich in drei Abschnitte unterteilen. Die *Proliferationsphase* wird durch schnelle mitotische Teilungen von Spermatogonien charakterisiert. Es gibt drei Typen von Spermatogonien. Die Stammzellen (A_{is}^3) teilen sich selten. Sie erzeugen neue Stammzellen und proliferierende Spermatogonien (A_{pr}^4 , A_{al}^5). Diese erzeugen durch mehrere mitotische Teilungen sich differenzierende Spermatogonien ($A_1 - 4$, Intermediate, B). In der letzten mitotischen Teilung entstehen aus B-Spermatogonien primäre Spermatozyten, die in die *Meiotische-Phase* eintreten. Nach der ersten meiotischen Teilung hat die Rekombination und die Reduktion des genetischen Materials stattgefunden. Die entstandenen haploiden, sekundären Spermatozyten erfahren die zweite meiotische Teilung und treten als Spermatiden in die *Differenzierungs-Phase* (Spermiogenese) ein. In dieser Phase findet die Umwandlung von Spermatiden in Hodenspermien statt (Übersicht: Bellvé, 1977; Austin & Short, 1982).

³ is: isolated, ⁴ pr: paired, ⁵ al: aligned.

Die Expression von *OR*-Genen wurde bisher mit cDNA aus adultem Hoden (dieser enthält alle Keimzellstadien) (Vanderhaeghen *et al.*, 1993, 1997b; Asai *et al.*, 1996) oder mit cDNA aus haploiden Keimzellen (Spermatiden) (Parmentier *et al.*, 1992; Walensky *et al.*, 1995) untersucht. Die Lokalisierung von *OR*-Transkripten *in situ* (Kebekus, Dissertation, Hannover, 1998) sowie immunzytochemische Nachweise der Rezeptorproteine (Vanderhaeghen *et al.*, 1993; Walensky *et al.*, 1995) zeigten, daß die untersuchten OR ausschließlich in haploiden Keimzellen exprimiert sind. Daten zur Expression von OR in diploiden Keimzellen sind nicht veröffentlicht. Um dies zu untersuchen, wurden aus unterschiedlich alten Mäusen (7 Tage-, 14 Tage-, 21 Tage-postnatal, sowie adulte Mäuse) Hoden entnommen (2.9.1.2) und es wurde die Poly (A)⁺ RNA isoliert (2.9.2). Aus der Poly (A)⁺ RNA wurde cDNA hergestellt (2.10), die in PCR-Experimenten (2.11) eingesetzt wurde (Abb. 11).

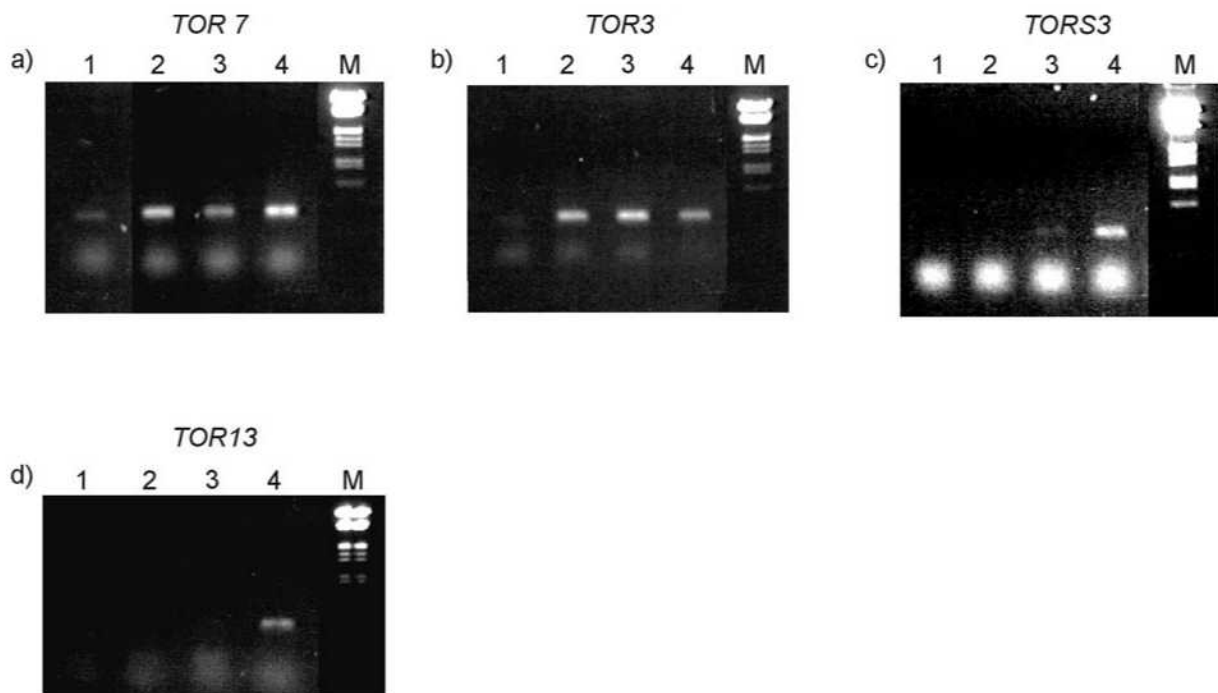


Abb. 11: PCR-Analyse von *OR*-Transkripten während der Hodenentwicklung (postnatal).

Die Zuordnung der Spuren ist in a) – d) identisch. Es wurden cDNA's aus Maus-Hoden folgenden Alters verwendet: 1) 7 Tage, 2) 14 Tage, 3) 21 Tage und 4) adulter Maus-Hoden. M) Größenstandard: λ -DNA EcoRI/HindIII geschnitten. Die PCR's wurden mit genspezifischen Primern unter stringenten Bedingungen durchgeführt. Der gesamte PCR-Ansatz (25 μ l) wurde auf ein Gel aufgetragen.

Die PCR-Ergebnisse zeigen, daß *OR*-Gene nicht nur in späten Keimzellstadien des adulten Hodens exprimiert sind. Die *OR*-Gene lassen sich in vier Gruppen einteilen. Abbildung 11 zeigt das Expressionsmuster je eines Vertreters der vier Gruppen. Während *TOR7* in allen Entwicklungsstadien exprimiert ist (a), lassen sich *TOR3* nach 14 Tagen (b) und *TORS3* erst nach 21 Tagen (c) nachweisen. *TOR13* ist nur im adulten Hoden exprimiert (d). Im Maus-Hoden sind bis zum 7. Tag nach der Geburt ausschließlich Spermatogonien zu finden.

Zu diesem Zeitpunkt setzt die Teilungsaktivität der Spermatogonien ein und es entstehen bis zum 14. Tag nach der Geburt diploide Spermatozyten unterschiedlicher Stadien. Ab etwa dem 21. Tag nach der Geburt treten die ersten haploiden Spermatozyten sowie Spermatiden auf (zur Übersicht: Bellvé, 1977). Demzufolge ist Rezeptor *TOR7* bereits in Spermatogonien und die Rezeptoren *TOR3*, 8 und 9 sehr wahrscheinlich in diploiden Spermatozyten exprimiert. *TOR11* und *S3* sind mit dem Auftreten der ersten haploiden Spermatozyten nachweisbar. Diese Ergebnisse zeigen, daß Duftstoffrezeptor-Transkripte bereits während der präpubertären Hodenentwicklung gebildet werden, und daß einzelne Rezeptorgene differentiell im Verlauf der Entwicklung aktiv werden. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Die Rezeptoren *TOR10*, 12, 15 und *S1* konnten nicht in die Tabelle einbezogen werden, da die Ergebnisse der einzelnen Versuche (n = 4) nicht reproduzierbar waren. Für diese Rezeptoren ist die Expression ausschließlich in Keimzellen des adulten Hodens gesichert.

Rezeptor	Hoden 7 Tage	Hoden 14 Tage	Hoden 21 Tage	Hoden adult
<i>TOR7</i>	+	+	+	+
<i>TOR3</i>	-	+	+	+
<i>TOR8</i>	-	+	+	+
<i>TOR9</i>	-	+	+	+
<i>TOR11</i>	-	-	+	+
<i>TORS3</i>	-	-	+	+
<i>TOR6</i>	-	-	-	+
<i>TOR13</i>	-	-	-	+

Tabelle 2: Expression der *OR*-Gene während der Keimzellepithel-Entwicklung.

+ und – bedeuten, daß die Rezeptor-Transkripte nachgewiesen werden konnten bzw. nicht nachweisbar waren. Angegeben sind die postnatalen Zeitpunkte, zu denen die Gewebe entnommen wurden.

3.1.3 Analyse von *OR*-Transkripten in ausgewählten Geweben

Für eine *knock out* Strategie ist es essentiell zu wissen, ob das Gen außer im „Ziel“-Gewebe noch in anderen Geweben exprimiert ist.

3.1.3.1 Expression der *OR*-Gene im olfaktorischen Epithel

OR-Transkripte wurden erstmals in Riechzellen nachgewiesen (Buck & Axel, 1991). Für einige der in 3.1.1 untersuchten Gene wurde bereits eine vergleichende Expressionsanalyse im Hoden und im olfaktorischen Epithel durchgeführt (RPA, Ribonuklease protection assay;

Vanderhaeghen *et al.*, 1997b). Diese Daten lassen sich jedoch nicht ohne weiteres auf andere Mausstämme übertragen. Der von Vanderhaeghen *et al.* als Hoden-spezifisch eingestufte *OR* TPCR 53 ist nicht im Hoden des Mausstammes 129/SV (3.1.1), jedoch im olfaktorischen Epithel des Mausstammes C57Bl/6J exprimiert (Bezeichnung mE3, Krautwurst *et al.*, 1998). Ob die in 3.1.1 identifizierten *OR* auch im olfaktorischen Epithel des Mausstammes 129/SV exprimiert werden, sollte durch PCR untersucht werden.

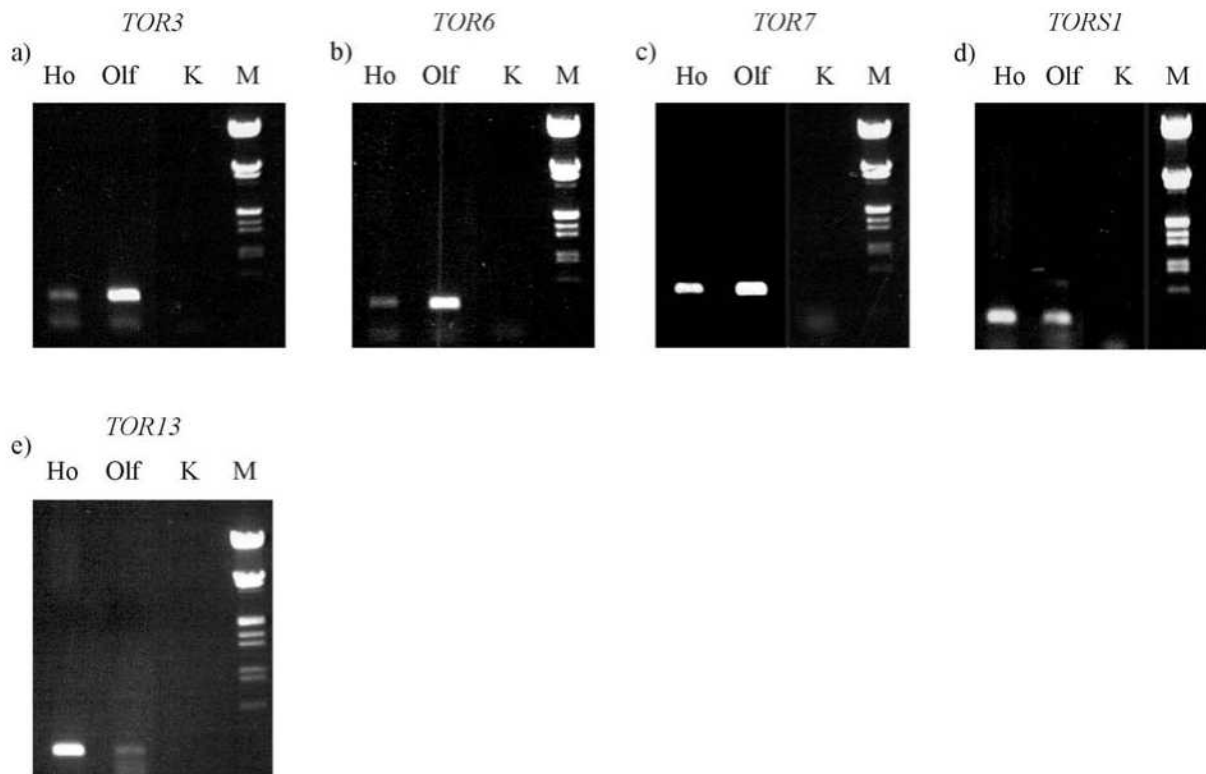


Abb. 12: Vergleichende PCR-Analyse mit cDNA aus olfaktorischem Epithel und Hoden der Maus.

Ho) Hoden-cDNA, Olf) Olfaktorische cDNA, K) Kontroll PCR mit H₂O M) Größenstandard: λ-DNA EcoRI/HindIII geschnitten. a) *TOR3* (341 Bp), b) *TOR6* (355 Bp), c) *TOR7* (307 Bp), d) *TORS1* (290 Bp), e) *TOR13* (353 Bp). Der gesamte PCR-Ansatz (25 µl) wurde in einem 2 % igen Gel aufgetrennt.

Für die vergleichende Expressions-Untersuchung der *OR* im Hoden und im olfaktorischen Epithel wurden die entsprechenden Organe aus adulten Mäusen (älter als 6 Wochen) entnommen (2.9.1) und die Poly (A)⁺ RNA isoliert (2.9.2). Aus der Poly (A)⁺ RNA wurde cDNA synthetisiert (2.10), die in PCR-Experimenten (2.11) (Abb. 12) als Matrize eingesetzt wurde. Die verwendeten Primer und Hybridisierungstemperaturen sind in Tabelle 5 (7.1) aufgelistet. Es wurden cDNA-Fragmente von allen *OR* mit beiden cDNA's amplifiziert. Daß heißt, keiner der untersuchten *OR* ist ausschließlich im Hoden exprimiert. Die cDNA-Fragmente der Rezeptoren *TOR3*, 6, 9 und 15 wurden mit olfaktorischer cDNA besser als mit Hoden-cDNA amplifiziert, wie es exemplarisch für *TOR3* und *TOR6* gezeigt ist (Abb. 12a, b).

Die cDNA-Fragmente der Rezeptoren *TOR7*, *8*, *10*, *11*, *12*, *S1* und *S3* ließen sich gleich stark mit beiden cDNA's amplifizieren, wie für *TOR7* (Abb. 12c) und *TORS1* (Abb. 12d) gezeigt. Das cDNA-Fragment von *TOR13* ließ sich besser mit Hoden-cDNA als mit olfaktorischer cDNA amplifizieren (Abb. 12e).

3.1.3.2 Expression von *OR*-Transkripten in Geweben außerhalb des olfaktorischen Epithels

OR sind nicht nur im Riechepithel und im Hoden exprimiert. *OR*-Transkripte konnten in den unterschiedlichsten Geweben nachgewiesen werden (Thomas *et al.*, 1996; Nef & Nef, 1997; Dreyer, 1998; Raming *et al.*, 1998). Es wurde durch PCR-Experimente untersucht, ob die 12 *OR* außer im Riechepithel und im Hoden (3.1.3.1) noch in anderen Geweben exprimiert sind. Es wurden aus adulten Mäusen (älter als 6 Wochen) Gehirn, Herz, Leber und Niere entnommen (2.9.1.1) und die Poly (A)⁺ RNA isoliert (2.9.2). Aus der Poly (A)⁺ RNA wurde cDNA synthetisiert (2.10). Die PCR-Versuche mit diesen cDNA's als Matrize ergaben für die einzelnen Rezeptoren sehr unterschiedliche Expressionsmuster, die von gewebsspezifisch bis annähernd ubiquitär-exprimiert reichten (Tabelle 3). Transkripte der Rezeptoren *TOR3*, *6*, *12*, *13*, *S1* und *S3* konnten in keinem der zusätzlich untersuchten Gewebe nachgewiesen werden. Die PCR-Ergebnisse zur Expressionsanalyse der Duftstoffrezeptoren (3.1.1 – 3.1.3.2) sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Rezeptor	Hoden	Keimzellen	Olf.-Epithel	Gehirn	Herz	Leber	Niere
<i>3</i>	+	+	+	-	-	-	-
<i>6</i>	+	+	+	-	-	-	-
<i>12</i>	+	+	+	-	-	-	-
<i>13</i>	+	+	+	-	-	-	-
<i>S1</i>	+	+	+	-	-	-	-
<i>S3</i>	+	+	+	-	-	-	-
<i>7</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>11</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>15</i>	+	+	+	-	-	+	-
<i>8</i>	+	+	+	+	+	-	+
<i>9</i>	+	+	+	-	+	-	+
<i>10</i>	+	+	+	+	+	-	-

Tabelle 3: Expressionsmuster der *OR*-Gene in verschiedenen Geweben der Maus.

+ bzw. - bedeuten, daß die Rezeptor-Transkripte nachgewiesen bzw. nicht nachgewiesen werden konnten. Die Rezeptoren wurden in drei Gruppen aufgeteilt. Rezeptoren, die nur im Hoden und im Riechepithel nachgewiesen wurden (*TOR3*, *6*, *12*, *13*, *S1* und *S2*), die in einem weiteren Gewebe nachgewiesen wurden (*TOR7*, *11*, *15*) und die in mehr als einem weiteren Gewebe identifiziert wurden (*TOR8*, *9*, *10*).

Die bisherigen Ergebnisse (3.1.1 – 3.1.3.2) lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Durch RT-PCR-Experimente konnten im Maus-Hoden 12 unterschiedliche *OR* identifiziert werden (3.1.1). Einige der *OR* lassen sich bereits während der präpubertären Hodenentwicklung nachweisen (3.1.2). Die *OR* werden außer in Keimzellen auch noch in Riechzellen und verschiedenen anderen Geweben exprimiert (3.1.3.1, 3.1.3.2). Ein *OR* (*TOR13*) wird im Hoden stärker als im Riechepithel exprimiert. Ein *OR*, der ausschließlich im Hoden exprimiert wird, konnte nicht identifiziert werden.

3.1.4 Northernblot-Nachweis von *OR*-Transkripten aus Maus-Hoden

Da *OR*-Gene in der Regel niedrig exprimiert werden, werden sehr empfindliche Methoden wie der RPA oder die RT-PCR zum Nachweis von *OR*-Transkripten eingesetzt (Vanderhaeghen *et al.*, 1993, 1997b; Walensky *et al.*, 1995; Asai *et al.*, 1996). Aufgrund des hohen Amplifikationsfaktors in PCR-Experimenten können allerdings Unterschiede in der Transkriptmenge nivelliert werden. Die Northernblot-Methode beinhaltet keinen Amplifikationsschritt und ist aus diesem Grund weniger empfindlich, spiegelt jedoch direkt die Transkriptmenge wider. Bisher wurde nur zum Nachweis des *OR DTMT*, einem im Hunde-Hoden sehr hoch exprimierten *OR*, ein Northernblot-Nachweis durchgeführt (Parmentier *et al.*, 1992).

Die Northernblot-Experimente wurden durchgeführt in der Annahme, daß sich aufgrund der geringeren Empfindlichkeit nur hoch exprimierte *OR* nachweisen lassen, geringer exprimierte *OR* jedoch nicht. Eine quantitative Analyse setzt voraus, daß die Sonden ähnliche Hybridisierungseigenschaften aufweisen und gleich stark markiert sind (siehe unten). Bei der *in vitro* Transkription (2.9.5) von Sondentemplates, die in den Vektor pBluescript kloniert werden (3.1.1), werden den Sonden Sequenzen aus der *multiple cloning site* (MCS) des Vektors angefügt. Es ist bekannt, daß diese GC-reichen Sequenzen zur unspezifischen Hybridisierung der Sonden mit Hodentranskripten führen können (Millar *et al.*, 1994). Um dies zu vermeiden, wurde für die Herstellung von RNA-Sonden ein modifiziertes pBluescript-KS⁻-Plasmid verwendet (pBISH, Abb. 13). Sonden, die mit diesem Vektor präpariert werden, enthalten keine vektoriellen, GC-Nukleotid reichen Sequenzen. In einem ersten Schritt wurde der MCS-Bereich zwischen KpnI und ClaI (Abb. 13, I) durch Restriktion (2.6.1) entfernt. Der Restriktionsansatz wurde in einem Agarosegel aufgetrennt (2.5.4) und das Vektor-Fragment ausgeschnitten (2.5.5). Die Enden des geschnittenen Vektors wurden mit dem Klenow-Enzym geglättet (2.6.2.1) und anschließend ligiert (2.6.3.1). Der Ligationsansatz wurde mit XhoI (I)

geschnitten (2.6.1) und für eine Transformation von XL1-Blue (2.6.3.2) eingesetzt. Vektoren, in denen der Bereich zwischen den Schnittstellen KpnI und ClaI nicht entfernt worden war, sollten durch diese Restriktion wieder linearisiert werden, so daß sie von den Bakterien nicht aufgenommen werden können. Aus transformierten Bakterien wurde die DNA präpariert (2.4.1) und durch Verdau mit XhoI wurde kontrolliert, ob der KpnI-ClaI-Vektorbereich deletiert war. Die Vektor-DNA der positiven Klone wurde in einem zweiten Schritt mit PstI und SacI geschnitten (Abb. 13, II). Bis zur Ligation wurde wie in Schritt I beschrieben verfahren. Der Ligationsansatz wurde mit XbaI (II) geschnitten und für eine Transformation von XL1-Blue verwendet. Aus transformierten Bakterien wurde die DNA präpariert und durch Verdau mit den Enzymen XhoI und XbaI wurde kontrolliert, ob die Vektorbereiche entfernt waren.

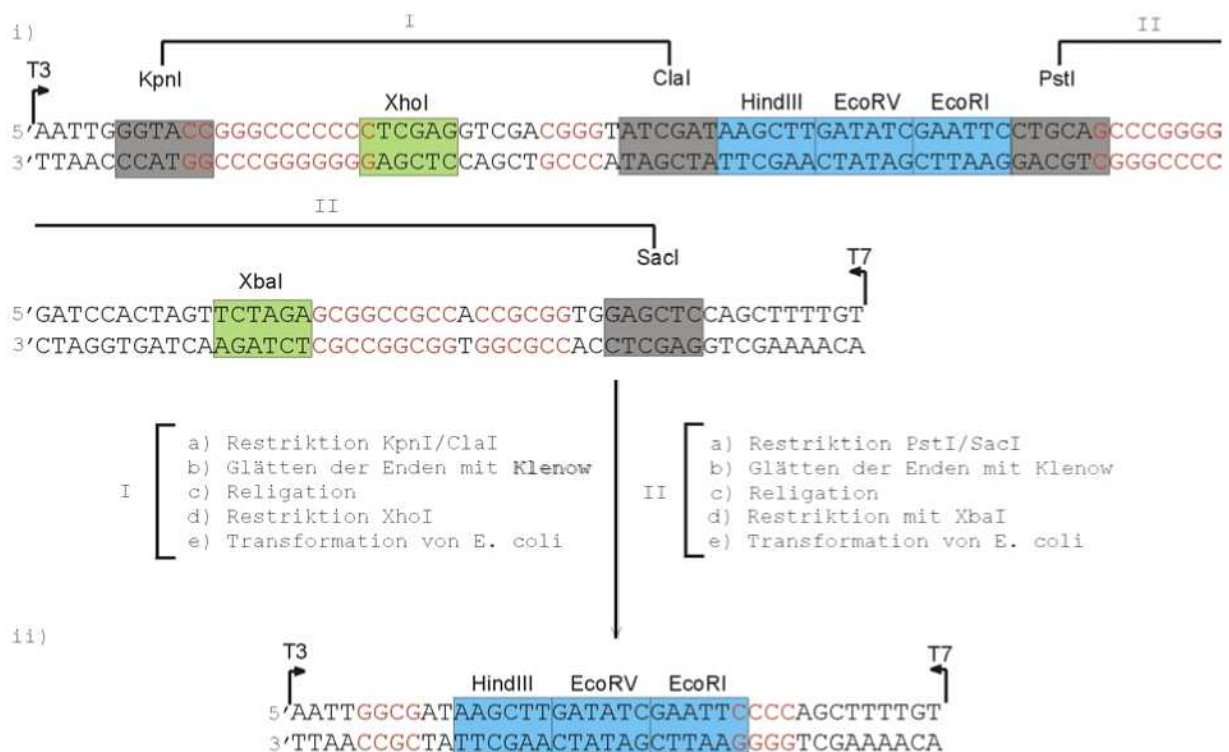


Abb. 13: Konstruktion des modifizierten Vektors pBISH.

Im oberen Teil der Abbildung ist die MCS des Vektors pBluescript-KS' zwischen den Promotoren T3 und T7 dargestellt (i). Die GC-Nukleotid reichen Abschnitte (I, II, rot) wurden zwischen den KpnI/ClaI- (I) und PstI/SacI-Schnittstellen (II) (grau unterlegt) entfernt. Die Deletion der Vektorbereiche wurde durch Restriktion mit den Enzymen XhoI/XbaI (grün unterlegt) indirekt nachgewiesen. In der MCS des modifizierten Vektors pBISH (ii) sind die Schnittstellen für die Enzyme HindIII, EcoRV und EcoRI (blau unterlegt) verblieben. Eine detaillierte Beschreibung der Konstruktion ist dem Text zu entnehmen.

Die cDNA-Fragmente der Rezeptoren wurden durch Restriktion mit EcoRI und HindIII aus den pBluescript-SK' Klonen (3.1.1) herausgeschnitten und in den modifizierten pBISH kloniert.

Für die Northernblot-Experimente wurden die RNA-Sonden mit Biotin markiert (2.9.5.2.2). Die Detektion der Sonden erfolgte mit einem Streptavidin-alkalische-Phosphatase Konjugat und einem anschließenden Chemilumineszenz Nachweis (2.9.5.3). Um zu überprüfen, ob die Biotin-Markierung der einzelnen Sonden vergleichbar war, wurde ein Tüpfeltest (2.9.5.3) durchgeführt (Abb. 14a). Hierfür wurden Verdünnungen der RNA-Sonden auf einen Filter aufgetropft und die *in vitro* Transkripte (2.9.5.2.2) wurden durch UV-Bestrahlung mit dem Filter kreuzvernetzt.

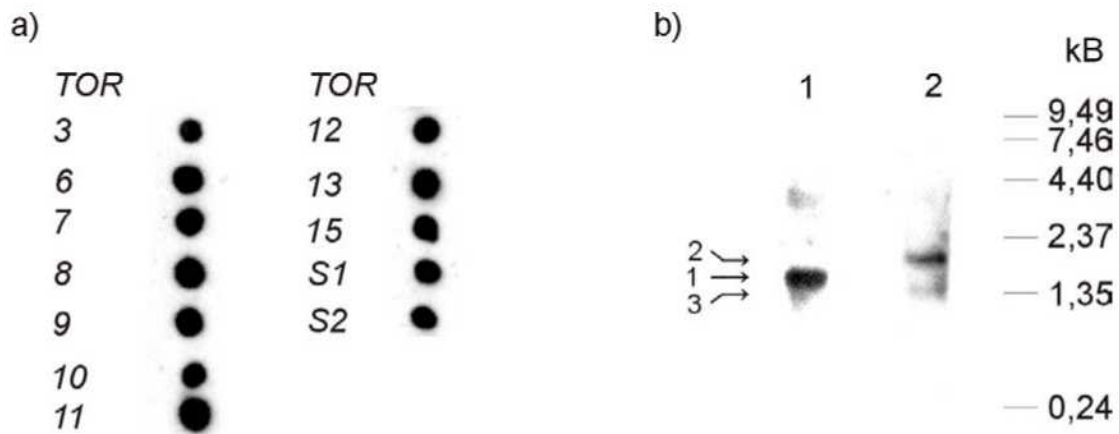


Abb. 14:

a) Tüpfeltest von RNA-Sonden, die in der Northernblot-Analyse verwendet wurden.

Es wurden jeweils 5 pg der entsprechenden RNA-Sonde auf eine Nylonmembran aufgetropft und anschließend durch UV-Bestrahlung mit dem Filter kreuzvernetzt. Die Sonden wurden mit Streptavidin-alkalischer-Phosphatase und nachfolgendem Chemilumineszenz Nachweis detektiert.

b) Northernblot-Analyse von Poly (A)⁺ RNA aus Hoden.

Jeweils 10 µg Poly (A)⁺ RNA wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membranstreifen wurden mit den RNA-Sonden von *TOR13* (1) und *TORS1* (2) unter stringenten Bedingungen (65 °C) hybridisiert. Rechts aufgetragen ist der RNA-Größenstandard (GIBCOBRL). Die Pfeile markieren die Hybridisierungssignale von *TOR13* (1) und *TORS1* (2, 3).

Abbildung 14 (a) zeigt, daß alle RNA-Sonden ähnlich stark markiert waren. In der Northernblot-Analyse wurden mit zwei RNA-Sonden Hybridisierungssignale erhalten (Abb. 14b). Die RNA-Sonde von Rezeptor *TOR13* erkennt in Poly (A)⁺ RNA aus Hoden ein Transkript mit einer Größe von etwa 1,7 kB (Abb. 14b, Spur 1). Die RNA-Sonde von Rezeptor *S1* erkennt zwei Transkripte von 1,4 kB und 1,9 kB (Abb. 14b, Spur 2). Die Intensität des Signals von *TOR13* ist deutlich stärker als die der Signale von *TORS1*. Die detektierten Transkripte sind groß genug, um eine kodierende Region von ~ 900 Bp zu enthalten. Der Größenunterschied der beiden Transkripte von *TORS1* könnte durch Verwendung unterschiedlicher Polyadenylierungssignale bzw. posttranskriptionale Modifikation zustande kommen (zur Übersicht: Walker *et al.*, 1999). *TOR13* und *TORS1* sind demnach im

Maus-Hoden höher exprimiert als die anderen Rezeptor-Gene, deren Transkripte ebenfalls durch PCR identifiziert worden waren.

3.1.5 Lokalisierung von *OR*-Transkripten im adulten Maus-Hoden

Zur Lokalisierung der Duftstoffrezeptor-Transkripte im adulten Maus-Hoden wurden *in situ* Hybridisierungsexperimente (2.9.7.2) mit paraffineingebetteten Hodenschnitten (2.9.7.1) durchgeführt. Zum besseren Verständnis soll hier die Hodenmorphologie kurz eingeführt werden.

Bei Säugetieren entwickeln sich die männlichen Keimzellen im Hoden, der von einer rigiden Membran, der Tunika Albuginea, umgeben ist (Abb. 15a).

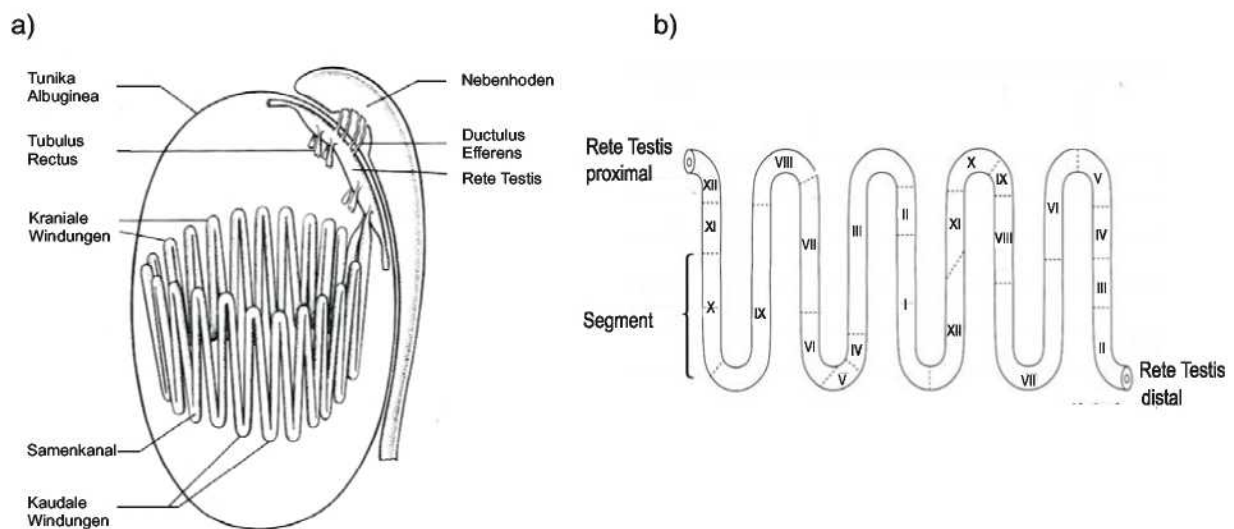


Abb. 15a: Schematische Darstellung eines Säugetier-Hodens.

Gezeigt ist ein Samenkanal (Entnommen aus Austin & Short „Germ Cells and Fertilization“, 1982).

Abb. 15b: Schematische Darstellung eines Samenkanals der Maus. Erklärung siehe Text.

In der Maus gibt es 12 stages (I – XII). (Modifiziert nach Russel *et al.*, „Evaluation of the Testis“, 1990).

Das Hodengewebe (Abb. 16a) lässt sich in das intertubuläre (Interstitium) und das Samenkanal-Kompartiment unterteilen. Das Interstitium wird gebildet vom lymphatischen Raum, den Blutgefäßen und den Leydigzellen (Abb. 16b).

Die Samenkanäle lassen sich in Segmente unterteilen (Abb. 15b). In jedem Segment findet die gesamte Abfolge der Keimzellentwicklung statt. Diese ist in benachbarten Segmenten zeitlich nicht synchronisiert. Im Verlaufe der Keimzellentwicklung lassen sich in einem Querschnitt eines Segmentes unterschiedliche, charakteristische Zellassoziationen (*Stages*) unterscheiden. In der Maus wurden 12 *Stages* definiert. Das Durchlaufen der 12 *Stages* in einem Segment wird Zyklus genannt.

Die Samenkanäle werden von einer Basalmembran (*Lamina Propria*) umhüllt (Abb. 16b), die aus mehreren aufeinander folgenden Schichten von Kollagenfasern und glatten Muskelzellen besteht.

Das Gewebe in den Samenkanälen umfaßt zwei Zelltypen, die Keimzellen und die Sertolizellen, die wie die Leydigzellen somatischen Ursprungs sind (Abb. 16b). Sertolizellen stellen die Matrix dar, in der sich die Keimzellen entwickeln, und sind essentiell für die Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse der Keimzellen (Spermatogenese). Im Verlauf der Spermatogenese entwickelt sich eine Spermatogonie (Stammzelle) zu einem Spermatozoon (reife Keimzelle) (Abb. 16c). Die einzelnen Schritte dieser Entwicklung nennt man „*steps of spermatogenesis*“.

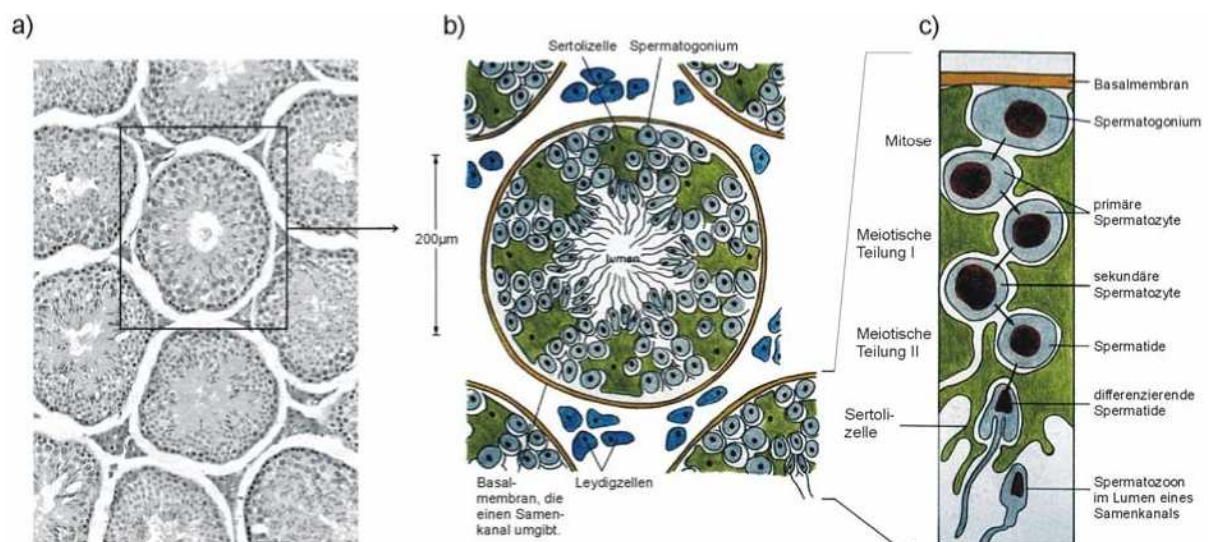


Abb. 16: Darstellung des Hodengewebes.

a) Lichtmikroskopische Aufnahme eines Hodenquerschnitts (Entnommen aus „Pathology of the mouse“, 1999). Die Aufnahme zeigt mehrere angeschnittene Samenkanäle. b) Schematische Darstellung eines Ausschnitts aus a). Gezeigt ist der Querschnitt eines Samenkanals. c) Schematische Darstellung des Verlaufs der Keimzellentwicklung in einem Samenkanal ausgehend von der Basalmembran (*Lamina Propria*) zum Lumen hin. Erklärung siehe Text.

Für den Nachweis wurden RNA-Sonden der Rezeptoren *TOR13* und *TORS1* präpariert (siehe Tabelle 7, Anhang 7.1). Zur Herstellung dieser Sonden wurden die entsprechenden rekombinanten Klone von pBISH verwendet. Es wurden bei der *in situ* Hybridisierung Digoxigenin markierte sense- und antisense-RNA-Sonden (2.9.5.2.1) eingesetzt.

Die Hybridisierung wurde unter stringenten Bedingungen durchgeführt (2.9.7.2). Der Nachweis von Hybriden erfolgte mit Hilfe eines anti-Digoxigenin-Antikörpers (1: 500), der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war (2.19.1.2). Die Substratzugabe (NBT; BCIP) erzeugte einen blau-violetten Niederschlag.

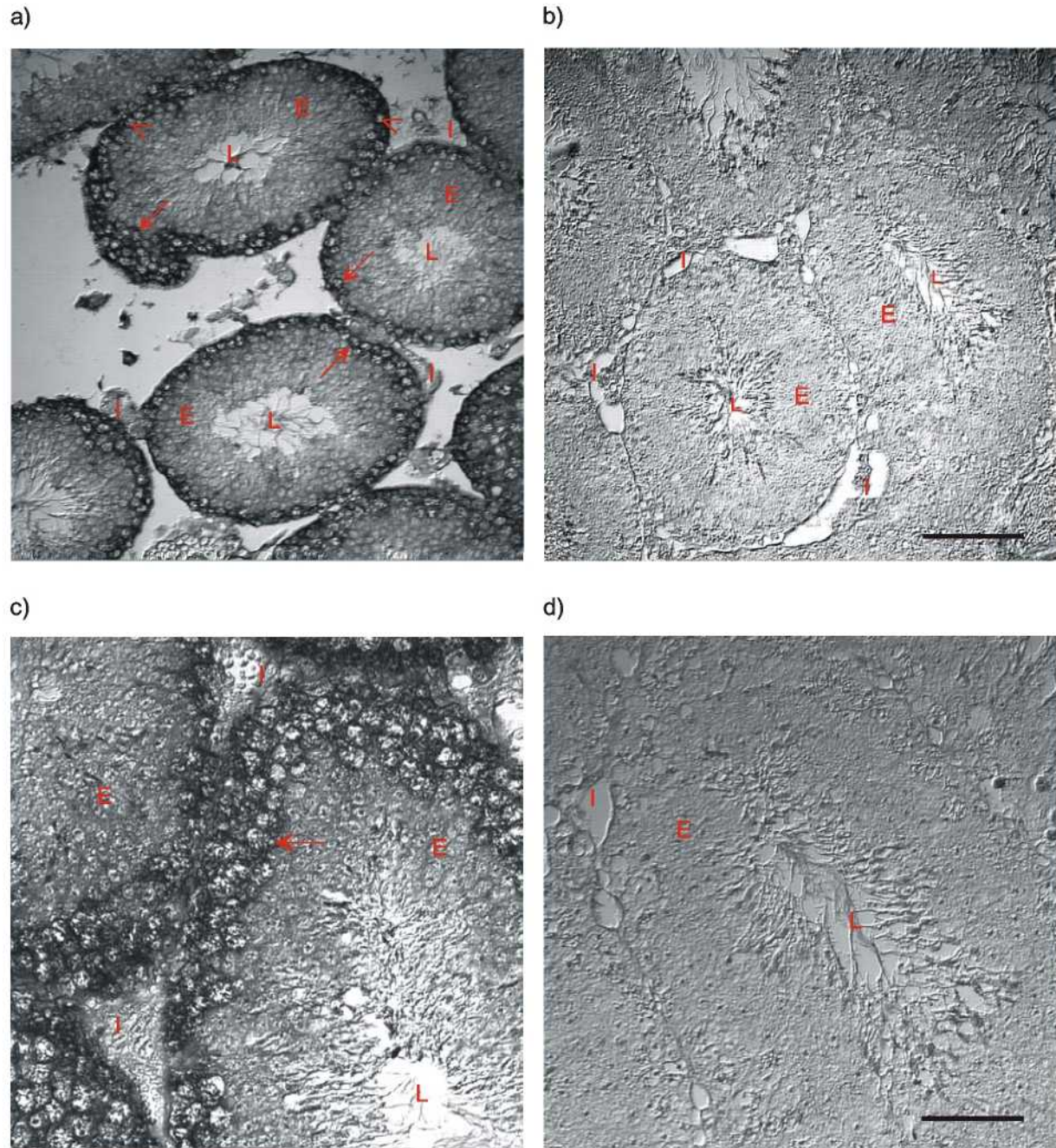


Abb. 17: *In situ* Hybridisierung an Maus-Hodenschnitten.

Verwendet wurden 4 μm dünne Paraffinschnitte, die entweder mit der antisense-Sonde (a und c) oder mit der sense-Sonde (b und d) von *TOR13* hybridisiert wurden. Die Hybridisierungsbedingungen sind in 2.9.7.2 aufgeführt. Die Aufnahmen wurden mit der DIC-Optik an einem konfokalen Lasermikroskop angefertigt. Mit den Pfeilspitzen gekennzeichnet sind die Kerne von Spermatozyten. Die Pfeile kennzeichnen den Zytoplasmasaum von Spermatozyten. E, Keimzellepithel; L, Lumen der Samenkanäle; I, Interstitium. Der Größenbalken entspricht 100 μm (b) bzw. 50 μm (d).

Die *TOR13* antisense-Sonde ergab sehr starke Hybridisierungssignale (Abb. 17a, c). Gefärbt wurde der zytoplasmatische Saum um den Zellkern von Spermatogonien und Spermatozyten unterschiedlicher Stadien (Pfeile). Zellkerne sind von der Färbung ausgespart (Pfeilspitzen).

Spermatiden, Sertolizellen sowie die Zellen des Interstitiums (I) wurden ebenfalls nicht gefärbt. Die entsprechende *TOR13* sense-Sonde (Negativ Kontrolle) ergab keine Markierung an Hodenschnitten (Abb.17b, d). Die Authentizität des Signals der antisense-Sonde konnte durch eine weitere Kontrolle untermauert werden. Durch einen Überschuß von nicht markierter sense-Sonde (Zielmolekül in Lösung) in der Hybridisierungslösung konnte das Signal der markierten antisense-Sonde unterdrückt werden (nicht gezeigt). Der Nachweis von *TOR13*-Transkripten in frühen Keimzellen schließt nicht aus, daß der OR in reifen Spermien exprimiert ist. In Keimzellen können Transkription und Translation zeitlich entkoppelt sein (Spirin, 1994). So werden Protamin-Gene in frühen Spermatiden transkribiert und in späten Spermatiden werden die Transkripte translatiert (Goldberg, 1996; Steger *et al.*, 2000). Man schätzt, daß etwa 70 % aller Transkripte, die während der Spermatogenese gebildet werden, einer Translationskontrolle unterliegen (Walker *et al.*, 1999).

Mit der *TORS1* RNA-Sonde ließen sich keine Transkripte im Hoden nachweisen. *TORS1* Transkripte konnten auch unter gering stringenten Hybridisierungsbedingungen (30 % Formamid, 45 °C Hybridisierungstemperatur) nicht nachgewiesen werden, da unter diesen Bedingungen der unspezifische Hintergrund erhöht war.

Zusammenfassend kann man sagen:

Aus den PCR-Analysen geht hervor, daß die Rezeptoren *TOR13* und *TORS1* ausschließlich im olfaktorischen Epithel und im Hoden exprimiert sind (3.1.1 – 3.1.3.2). Durch Northernblot-Analysen waren nur zwei von 12 untersuchten *OR*, nämlich *TOR13* und *TORS1*, in Hoden-RNA nachweisbar. Diese beiden *OR* sind somit im Hoden höher exprimiert als die anderen *OR* (3.1.4). Die *TOR13*-Transkripte konnten durch *in situ* Hybridisierungsexperimente im Hoden zellulär lokalisiert werden (3.1.5).

3.1.6 Genomische Klonierung, chromosomale Lokalisierung und heterologe Expression von Duftstoffrezeptoren aus Keimzellen

Da die Expressionsanalyse die Rezeptoren *TOR13* und *TORS1* als geeignete Kandidaten für einen Gen *knock out* auswies, wurden diese Rezeptor-Gene zur weiteren Charakterisierung aus genomischer DNA kloniert (2.7). Homologie-Vergleiche⁶ mit publizierten Duftstoffrezeptorsequenzen zeigten außerdem, daß *TORS1* ein Vertreter einer neuen *OR*-Subfamilie ist, die bislang noch nicht charakterisiert wurde.

⁶ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

3.1.6.1 Isolierung von Duftstoffrezeptor-Genen

PCR-Fragmente der Rezeptoren *TOR13* und *TORS1* (3.1.1) (Tabelle 5, Anhang 7.1) wurden als Sonde eingesetzt, um eine genomische Maus DNA-Bibliothek (Stratagene, Lambda FIX[®] II Library, Mausstamm 129/SVJ) zu durchsuchen (2.7). Die PCR-Fragmente wurden mit [α -³²P]-dCTP radioaktiv markiert (2.8.1.3). Es wurden ca. 1 Mio. Plaque-bildende Einheiten (PBE) der genomischen Bibliothek ausplattiert (2.7.2). Filterabzüge der Platten wurden mit den Sonden unter stringenten Bedingungen (65 °C) hybridisiert (2.8.1.4). Nach zwei Vereinzelungsrunden konnten einzelne Phagen isoliert (2.7.3) und deren DNA präpariert werden (2.4.3). Die angereicherte DNA der isolierten Phagen wurde weiter charakterisiert.

3.1.6.1.1 Analyse des *TOR13*-Gens

Die DNA des isolierten Phagen wurde mit Restriktionsenzymen (XbaI, XbaI/ EcoRI, EcoRI) geschnitten (2.6.1) und in einem Agarosegel aufgetrennt (2.5.4). Die DNA wurde auf eine Membran transferiert (2.8.1.1). Die Membran wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde unter stringenten Bedingungen (65 °C) hybridisiert.

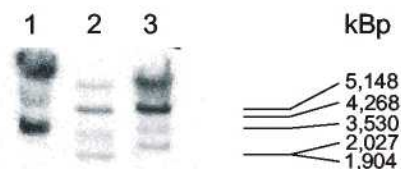


Abb. 18: Southernblot-Analyse der DNA eines isolierten λ -Phagen mit einer *TOR13*-spezifischen Sonde (# 2330/# 2331). In jeder Spur wurden ~ 200 ng der λ -Phagen DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die DNA wurde vor dem Auftrag mit XbaI (1), XbaI/EcoRI (2) und EcoRI (3) geschnitten. Die Membran wurde unter stringenten Bedingungen hybridisiert (65 °C). Rechts angegeben ist der DNA Größenstandard: λ -DNA EcoRI/HindIII geschnitten. Die Membran wurde 30 min bei -80 °C exponiert.

Es wurden in der Southernblot-Analyse mehrere Hybridisierungssignale erhalten (Abb. 18). Dies deutete darauf hin, daß nicht nur ein Gen der *mOR37*-Subfamilie (Kubick *et al.*, 1997) im Phagen enthalten war. Eine Datenbankrecherche (*nr*, non redundant sequences, Datenbank des NCBI, National Center for Biotechnology Information) hatte gezeigt, daß der Rezeptor *TOR13* zu einer größeren *OR*-Subfamilie (*mOR37*) gehört, die mindestens 4 Mitglieder umfaßt (A – D) (Kubick *et al.*, 1997). Diese Subfamilie wurde in der Ratte, der Maus, dem Rind und dem Menschen nachgewiesen (Kubick *et al.*, 1997). Die Hybridisierungssignale konnten entsprechenden Restriktionsfragmenten zugeordnet werden. Es wurde ein etwa 2,7

kBp und ein 5 kBp großes Restriktionsfragment (beide mit XbaI/EcoRI geschnitten) aus dem Gel ausgeschnitten (2.5.5) Das 2,7 kBp Fragment wurde in pBluescript-SK⁻ kloniert (2.6.3) und rekombinante Klone wurden sequenziert (2.12). Das genomische DNA-Fragment enthielt den offenen Leserahmen des Gens *mOR37e*. Die kodierende Region des *mOR37e*-Gens ist 83 % identisch mit der kodierenden Region des *mOR37d*-Gens (*TOR13*). Dies erklärt warum das *mOR37e*-Gen selbst unter stringenten Bedingungen von der *TOR13*-Sonde erkannt wurde.

Das 5 kBp Restriktionsfragment wurde mit HindIII in kleinere Fragmente geschnitten, die in pBluescript-SK⁻ kloniert wurden. Einer der rekombinanten Klone wurde sequenziert. Der Klon beinhaltete den größten Teil der kodierenden Region des *TOR13*-Gens. Vom 5'-Bereich der kodierenden Region des *TOR13*-Gens fehlten etwa 180 Bp. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte, daß der Genbereich, der für die dritte extrazelluläre Schleife kodiert, eine sogenannte nonsense Mutation enthält. Der Austausch von Adenosin (Position 868) gegen Thymidin erzeugt an dieser Stelle ein Stoppsignal (AAG, Kodon für Lysin wird zu TAG, Stoppkodon). Dies führt dazu, daß die Translation vorzeitig abbricht. Dem Protein fehlen die 7. transmembranale Domäne und der C-Terminus. Im Laufe meiner Arbeit wurde eine Veröffentlichung publiziert, in der die Mutation in der genomischen Sequenz des *TOR13*-Gens aus 129/SV Mäusen bestätigt wurde (Strotmann *et al.*, 1999). Das entsprechende PCR-Fragment, das von Vanderhaeghen und Mitarbeitern (1997b) kloniert worden war, wies diese Mutation nicht auf. Die Gründe hierfür können ein Synthese-Fehler während der PCR sein, oder daß die Mutation nur im Mausstamm 129/SV auftritt. Um dies zu überprüfen, wurden Hoden von Mäusen drei weiterer Mausstämme (NMRI, B6 und C3H) präpariert. Aus den Hoden wurde die Poly (A)⁺ RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In PCR-Versuchen (2.11) mit den Primern # 2330 und # 2682 (Bereich zwischen den Nukleotiden 516 – 1.029 des *TOR13*-Gens) wurde mit den drei cDNA's als Matrize ein Fragment von *TOR13* amplifiziert. Die Sequenzanalyse der cDNA-Fragmente bestätigte die Mutation in den drei Mausstämmen. Diese Ergebnisse sprechen für einen PCR-Fehler in der Sequenz, die von Vanderhaeghen *et al.* (1997b) publiziert wurde. Die Klonierung der gesamten kodierenden Region des *TOR13*-Transkriptes (# 2688/# 2682) aus Hoden-cDNA zeigte, daß nur diese eine Punktmutation in der kodierenden Region vorliegt.

Nach derzeitigem Wissen ist unklar, ob G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ohne C-Terminus mit G-Proteinen wechselwirken können (Prado *et al.*, 1998; Faussner *et al.*, 1998). Zwar wurden für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren neben G-Proteinen weitere Wechselwirkungspartner beschrieben (zur Übersicht: Hall *et al.*, 1999), aber der C-Terminus

scheint auch die Faltung und Membranlokalisierung des Rezeptorproteins zu beeinflussen (Oksche *et al.*, 1998). Aus diesen Gründen wurde kein *knock out* mit dem *TOR13*-Gen durchgeführt, obwohl *TOR13* aufgrund der Expressionsanalyse zuerst als ein geeigneter Kandidat für ein *knock out*-Experiment erschien. Im folgenden wird die Charakterisierung des ebenfalls hoch im Hoden exprimierten *TORS1* beschrieben.

3.1.6.1.2 Analyse des *TORS1*-Gens

Es wurde die DNA der isolierten λ -Phagen mit verschiedenen Restriktionsenzymen (XbaI, XbaI/ EcoRI, EcoRI) geschnitten (2.6.1), in einem Gel aufgetrennt (2.5.4) und einem Southernblot unterzogen (2.8.1.1). Die Membran wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde von *TORS1* unter stringenten Bedingungen (65 °C) hybridisiert.

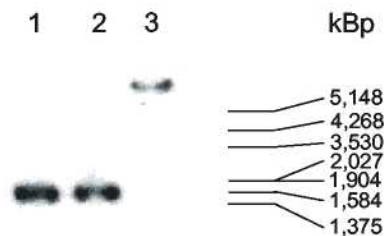


Abb. 19: Southernblot-Analyse der DNA eines isolierten λ -Phagen mit einer *TORS1*-spezifischen Sonde (# 2339/# 2340). In jeder Spur wurden ~ 200 ng der λ -Phagen DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die DNA wurde vor dem Auftrag mit XbaI (1), XbaI/EcoRI (2) und EcoRI (3) geschnitten. Die Membran wurde unter stringenten Bedingungen hybridisiert (65 °C). Rechts angegeben ist der DNA Größenstandard: λ -DNA EcoRI/HindIII geschnitten. Die Membran wurde 30 min bei -80 °C exponiert.

Ein 1,6 kbp großes genomisches Restriktionsfragment (geschnitten beidseitig mit Xba I; Abb. 19, Spur 1) von Rezeptor *TORS1* wurde in pBluescript-SK⁻ kloniert (2.6.3). Die Sequenzanalyse (2.12) von rekombinanten Klonen zeigte, daß das DNA-Fragment die gesamte kodierende Region des *TORS1*-Gens beinhaltete. Zusätzlich umfaßte das genomische DNA-Fragment 492 Bp 5'- und 255 Bp 3'- nicht-kodierende Sequenzen. Das Gen kodiert für ein Protein von 309 Aminosäuren mit einer errechneten Molmasse von 34,3 kDa. *TORS1* gehört zur Klasse II (Säugetier-ähnliche) der Duftstoffrezeptoren. Die höchste Homologie mit anderen OR liegt bei 51 % identischen Aminosäuren mit einem menschlichen Rezeptor, OR1-25 (Rouquier *et al.*, 1998, kloniert aus dem olfaktorischen Epithel). Die nächst verwandten Maus OR haben mit *TORS1* eine Aminosäure-Identität von 43 %. Hierbei handelt es sich um zwei putative OR (BAB30564.1; BAB30304.1), die aus adultem Hoden kloniert wurden (Carninci *et al.*, 2000) sowie um zwei OR, die aus dem olfaktorischen Epithel kloniert

wurden (Rezeptoren T2 und T3, Lane *et al.*, 2001). Dies bedeutet, daß Rezeptor TORS1 zu einer eigenen neuen Subfamilie zu zählen ist.

Um zu prüfen, ob diese Subfamilie weitere Mitglieder umfaßt, wurde genomische DNA aus Mausgehirnen isoliert und in einem Southernblot-Experiment mit einer *TORS1*-spezifischen Sonde hybridisiert. Die genomische DNA wurde mit XbaI geschnitten, so daß für *TORS1* ein Fragment von 1,6 kBp (XbaI) zu erwarten war.

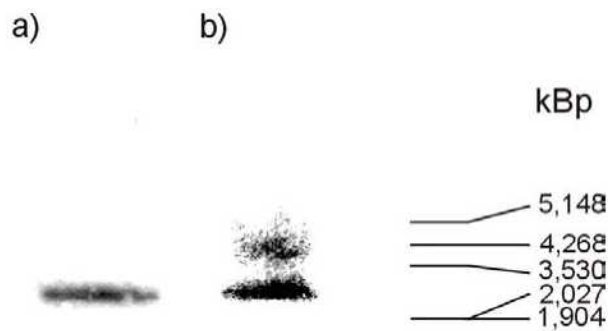


Abb. 20: Southernblot-Analyse von genomischer DNA mit einer *TORS1*-spezifischen Sonde (# 2339/ # 2340). In jeder Spur wurden 11 µg genomische DNA aus Mausgehirn gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die DNA wurde vor dem Auftrag mit XbaI geschnitten. Die Membran in a) wurde unter stringenten Bedingungen hybridisiert (65 °C). Die Membran in b) wurde unter gering stringenten Bedingungen hybridisiert (55 °C). Rechts angegeben ist der DNA Größenstandard: λ-DNA EcoRI/HindIII geschnitten. Die Expositionsdauer betrug 1 Woche bei – 80 °C.

Das einzige markierte DNA-Fragment (Abb. 20a, b) war allerdings etwa 2,7 kBp groß. Dieser genetische Unterschied (Polymorphismus) läßt sich sehr wahrscheinlich durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen, nicht isogenen 129/SV Maussubstämmen für die Klonierung von *TORS1* (129/SV J genomische Bibliothek) und den Southernblot-Nachweis (129/SV P genomische DNA aus Gehirnen) begründen (Threadgill, 1997). Durch Herabsetzen der Stringenz von 65 °C Hybridisierungstemperatur auf 55 °C wurden keine weiteren Signale erhalten (Abb. 20b). Der diffuse Hintergrund ist auf eine unspezifische Kreuzreaktivität der Sonde mit genomischer DNA aufgrund der geringen Stringenz zu begründen. Aus diesem Southernblot-Experiment (*Cluster-Analyse*) kann man ableiten, daß *TORS1* das einzige Gen dieser Subfamilie ist.

3.1.6.1.3 Chromosomale Lokalisierung des *TORS1*-Gens

Die chromosomale Lokalisierung des Gens von *TORS1* wurde mit Hilfe des *radiation hybrid mappings* durchgeführt (2.13). Die Lokalisierung erfolgt durch PCR mit genspezifischen Primern (Abb. 21). Als Matrize wird in diesen PCR's genomische DNA aus Hybridom-Zellen eingesetzt (2.13). In den PCR-Ansätzen wird jeweils die DNA einer der 100 unterschiedlichen Hamster/Maus Hybridom-Zelllinien (T31 Panel, Research Genetics Inc., 2130 Memorial Parkway SW, Huntsville, AL 35801, USA) verwendet. Die jeweiligen Zelllinien unterscheiden sich durch stabil integrierte Fragmente des Mausgenoms (2.13). Für jede Zelllinie erhält man in den PCR-Experimenten entweder ein positives oder ein negatives Resultat. Die chromosomale Zuordnung erfolgt durch Vergleich der erhaltenen PCR-Daten mit den PCR-Resultaten von Markern (DNA-Sequenzen), deren chromosomale Lokalisierung bekannt ist.

Das Gen von Rezeptor *TORS1* ist auf Chromosom 11 lokalisiert, 8,3 cR vom Marker D11Mit208 (DNA segment, Chr 11, Massachusetts Institute of Technology 208) entfernt. Die genetische Position (durch Kopplungs-Analysen bestimmt) des Markers auf Chromosom 11 ist 33 cM. Dieser Bereich des Maus-Chromosoms 11 entspricht dem menschlichen Chromosomenabschnitt 17p11.2. Auf dem Maus-Chromosom 11 wurden bisher zwei weitere *OR*-Cluster (*olfr1*, *olfr10*) identifiziert. *TORS1* ist zwischen den Clustern *olfr1* und *olfr10* lokalisiert. Das Cluster *olfr1* hat die genetische Position 44 cM und beinhaltet mindestens 13 Gene (Sullivan *et al.*, 1996; Lapidot *et al.*, 2001). Das synthäne *OR*-Cluster des Menschen ist auf dem Chromosomenabschnitt 17p13.3 lokalisiert (Ben-Arie *et al.*, 1994; Glusmann *et al.*, 1996, 2000). Für Mitglieder dieses Clusters wurden orthologe Gene ebenfalls in Primaten beschrieben (Sharon *et al.*, 1999). Das Cluster *olfr10* hat die genetische Position 30 cM auf Chromosom 11. In diesem Cluster konnte ein Gen lokalisiert werden (L45, Sullivan *et al.*, 1996).

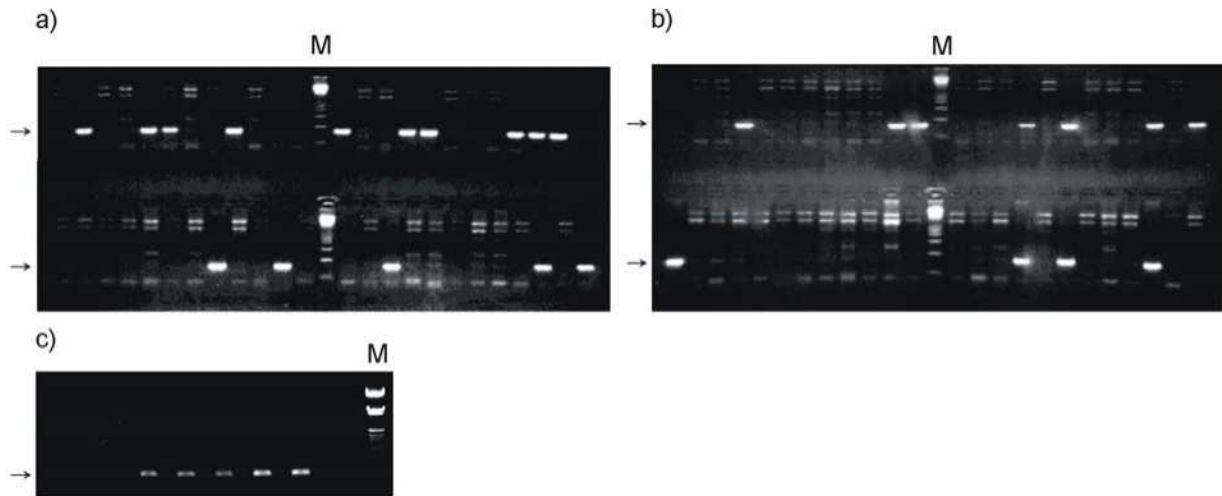


Abb. 21: PCR-Experimente zur chromosomalen Lokalisierung des *TORS1*-Gens.

a – c) PCR-Ansätze mit *TORS1*-spezifischen Primern (# 2512/# 2513, 326 Bp). Als Matrice wurde in den PCR's die DNA von je einer der 100 Hybridzelllinien eingesetzt (T31 Panel, Research Genetics Inc., 2130 Memorial Parkway SW, Huntsville, AL 35801, USA). Die PCR-Bedingungen sind in 2.13 aufgelistet. Der gesamte PCR-Ansatz (10 µl) wurde auf das Gel aufgetragen. Die PCR Amplifikate sind mit einem Pfeil markiert (links). Die Spuren, in denen der Größenstandard aufgetragen wurde, sind mit M gekennzeichnet. Verwendet wurde λ-DNA, HindIII geschnitten (a,b) und λ-DNA, EcoRI/HindIII geschnitten (c).

3.1.6.1.4 Heterologe Expression des Duftstoffrezeptors *TORS1*

TORS1 ist nicht nur in Keimzellen, sondern auch im olfaktorischen Epithel exprimiert (3.1.3.1). Es sollte deshalb prinzipiell möglich sein, den heterolog exprimierten Rezeptor *TORS1* mit einem Duftstoff funktionell zu aktivieren. Aus der chemischen Natur des Duftstoffes lassen sich dann vielleicht Rückschlüsse auf die Klasse der Ligandenmoleküle in Keimzellen ziehen.

Die Aminosäuresequenz des neu klonierten Rezeptors *TORS1* ist in Abbildung 22 dargestellt. Der Rezeptor enthält im N-Terminus eine potentielle Glykosylierungsstelle (fett gedruckt). In der Sequenz sind sieben hydrophobe Bereiche zu finden, die sehr wahrscheinlich α-helikale, membrandurchspannende Domänen ausbilden (TM, überstrichen). Hervorgehoben sind Sequenzmotive, die in der Duftstoffrezeptor-Familie hoch konserviert sind (grau unterlegt). Diese Motive spielen sehr wahrscheinlich unter anderem eine Rolle bei der Wechselwirkung mit G-Proteinen wie G_{olf} (Pilpel & Lancet, 1999, Skoufos, 1999).

TORS1	MKTPS	<u>N</u> STEADFILLGLFSHTANS	LLLSVVLVI	FTASLMGNT	- 47	
				TM 1		
TORS1	LMILLICRDPRL	HAPMY	<u>FLLS</u> QLSLMDMMLVSTIVPKMAANYLTSTRSISPAGCGSQIFL	-103		
				TM 2		
TORS1	FLTLAGGECFLLA	AMS	<u>YDRYVAIC</u> FPLRYHVL	MNPKLCAYLTVGSWLLGAADGLMQAGTI	-163	
				TM 3	TM 4	
TORS1	LSFPFCHSRTIN	HFFCEAPSLVRLACADTKV	FEFFMYICCI	MLLIPLSLV	LASYSLILA	-223
					TM 5	
TORS1	TVLRMRSSAARK	<u>KAF</u> TTCS	SHLAVVGLFYGAII	FIYMRPKSHQPGKSDKVVSAFYTI	FTP	-283
					TM 6	
TORS1	VLNPLI	YSVRN	KEVKGALRKWLQKTV	-309	TM 7	

Abb. 22: Darstellung der abgeleiteten Aminosäuresequenz von TORS1 aus Maus-Hoden.

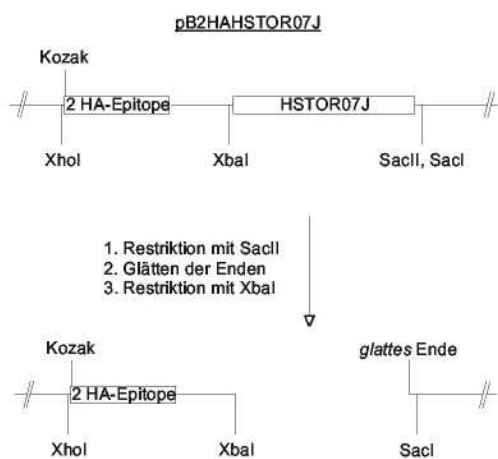
Überstrichen sind die transmembranalen Segmente TM 1 – 7 (Programm: Helixmem, PC/Gene Version 6.70). Fett und unterstrichen ist die potentielle Glykosylierungsstelle des Rezeptors im N-Terminus. Die eingerahmten Peptid-Motive sind in der Duftstoffrezeptor-Superfamilie hoch konserviert (Skoufos, 1999; Pilpel & Lancet, 1999). Blau markiert sind Cysteine, die an dieser Position in allen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu finden sind und sehr wahrscheinlich eine Disulfidbindung ausbilden. Rechts angegeben sind die Aminosäurepositionen beginnend mit dem Startmethionin (rot markiert).

Eine funktionelle Aktivierung von TORS1 setzt voraus, daß der Rezeptor in die Plasmamembran der Wirtszelle eingebaut wird. Für die heterologe Expression in HEK 293-Zellen (*human embryonic kidney*) und COS-1 Zellen (2.18) wurde der Vektor pSVL (Pharmacia) verwendet. Die Transkription in diesem Vektor wird über den *SV 40 late* Promoter reguliert (Tempelton & Eckhart, 1984). Im Falle von zellschädigenden Proteinen, zu denen vermutlich Duftstoffrezeptoren zählen, ist es für die Wirtszelle vorteilhaft, wenn das fremde Protein erst spät im Zellzyklus exprimiert wird. Auf diese Weise werden durch die Aussaat gestreßte Wirtszellen nicht zeitgleich durch toxische Genprodukte belastet. Der Rezeptor TORS1 wurde mit einer Peptidsequenz aus dem Influenza Hämagglutinin-Protein (HA-Epitop, Aminosäuren 98 – 108, YPYDVPDYASL) versehen, um den Rezeptor mit monoklonalen anti-HA-Epitop-Antikörpern nachweisen zu können.

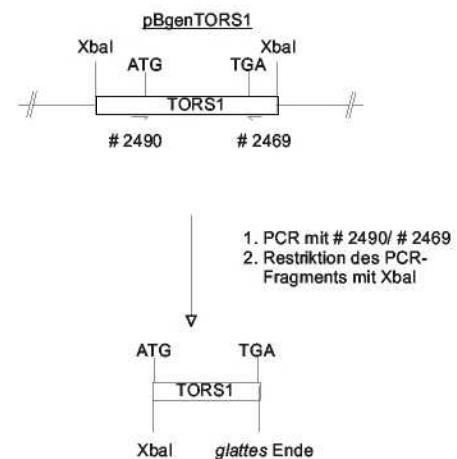
Ausgangsklon für die Konstruktion des Expressionsplasmids war pB2HAHSTOR07J (Abb. 23). Dieser Klon beinhaltet die kodierende Region eines menschlichen Duftstoffrezeptors (HSTOR07J, Kebekus, Dissertation, Hannover, 1998), an dessen N-Terminus zwei HA-Epitope angehängt waren. Dieses Plasmid wurde mit SacII linearisiert und die Enden wurden mit dem Klenow-Enzym geglättet. Das *HSTOR07J*-Gen wurde anschließend mit XbaI aus dem Vektor herausgeschnitten. Die kodierende Region des Rezeptors TORS1 wurde mit dem Primer #

2490, der eine XbaI Schnittstelle enthält, und # 2469 als Gegenprimer amplifiziert. Als Matrize in dieser PCR diente der rekombinante genomische Klon von *TORS1* (pBgen*TORS1*). Das PCR-Fragment wurde mit XbaI geschnitten und in den geschnittenen Vektor mit den beiden HA-Epitopen eingesetzt. Rekombinante Klone wurden durch Sequenzierung überprüft. Das Insert (2HA-TORS1) eines dieser rekombinanten Klone wurde mit den Enzymen XhoI und SacI herausgeschnitten und in den kompatibel geschnittenen Vektor pSVL eingefügt (Expressionsplasmid: pSVL2HATORS1).

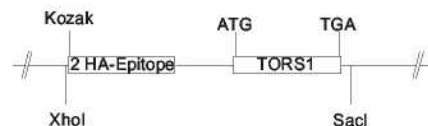
I Vorbereitung des HA-Epitop Vektors



II Vorbereitung der kodierenden Region von TORS1

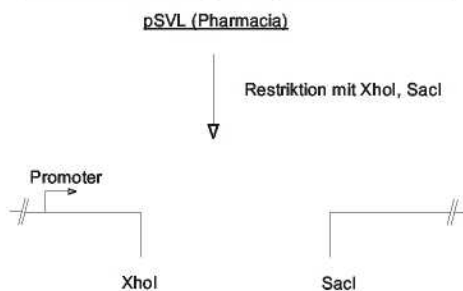


Ligation



1. Sequenzierung
2. Restriktion mit XhoI, SacI

III Vorbereitung des pSVL-Vektors



Ligation

pSVL2HATORS1

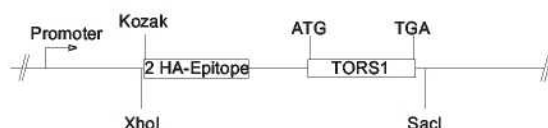


Abb. 23: Schematische Darstellung der Konstruktion des Expressionsplasmids pSVL2HATORS1 (Erklärung siehe Text).

3.1.6.1.5 Westernblot-Analyse des heterolog exprimierten Rezeptors TORS1

Für die heterologe Expression des Rezeptors wurden HEK 293-Zellen und COS-1 Zellen mit pSVL2HATORS1 transient transfiziert (2.18.2). Der Nachweis des Proteins erfolgte mit einem anti-HA-Epitop-Antikörper. Der Erstantikörper wurde mit einem Fluorophor-gekoppelten Zweitantikörper durch konfokale Lasermikroskopie nachgewiesen (2.20). Bei der transienten Transfektion von HEK 293-Zellen wurden weniger als 1 % der Zellen, bei der transienten Transfektion von COS-1 Zellen ~ 40 % der Zellen gefärbt. Es wurden ausschließlich zytoplasmatische Bereiche angefärbt. Auch die Verwendung des Rhodopsin N-Terminus‘ als eine Signalsequenz für die Insertion des ORs in die Plasmamembran (Krautwurst *et al.*, 1998) bzw. die Verwendung eines anderen Promoters, der früh im Zellzyklus aktiviert wird (CMV-Promoter), führte nicht zur Membraninsertion des Rezeptors (Daten nicht gezeigt).

Durch Westernblot-Experimente sollte untersucht werden, ob von den Wirtszellen (COS-1 Zellen) ein Protein der erwarteten Molmasse synthetisiert wird und ob dieses Protein von den Wirtszellen posttranslational modifiziert wird. Für diese Experimente wurden Membranproteine aus Zellen präpariert (2.14.1), die transient mit pSVL2HATORS1 transfiziert worden waren. Nach Abtrennung der Zellkerne wurden die Membranproteine in Triton X-100 solubilisiert. Die Membranproteine wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (2.16) und auf eine Membran übertragen (2.17). Der Nachweis des Rezeptors erfolgte indirekt über das N-terminal an TORS1 angehängte HA-Marker-Peptid mit dem anti-HA-Epitop-Antikörper. Als Nachweissystem diente ein Chemilumineszenz-System (ECL, Amersham).

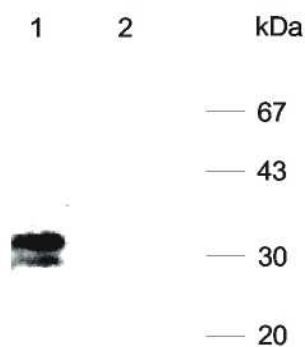


Abb. 24: Westernblot-Analyse von Membranproteinen aus transfizierten COS-1 Zellen.

Es wurden jeweils 60 µg Membranproteine aus COS-1 Zellen, die mit pSVL2HATORS1 (1), oder als Kontrolle mit pSVL/K1Ct (2), einer menschlichen Duftstoffrezeptor-cDNA (Kebekus, Dissertation, Hannover, 1998), transfiziert waren, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit dem anti-HA-Epitop-Antikörper (1:200). Als Marker wurde der „Low molecular weight marker (LMW)“ (Pharmacia) verwendet.

Die Westernblot-Analyse ist in Abb. 24 dargestellt. Es werden zwei Proteine mit einer Molmasse von etwa 29 kDa und 33 kDa markiert (Spur 1). In einer

Membranproteinpräparation aus Kontrollzellen, die mit einer Kontroll-cDNA transfiziert worden waren, wird kein Protein detektiert (Spur 2). Die errechnete Molmasse von TORS1 beträgt 34,2 kDa. Apparente Molmassen von Duftstoffrezeptoren zwischen 25 – 32 kDa in der SDS-PAGE wurden bereits von anderen Autoren beobachtet (Gat *et al.*, 1994; Krieger *et al.*, 1994; Nekrasova *et al.*, 1996; Menco *et al.*, 1997; Monastyrskaia *et al.*, 1999). Sehr wahrscheinlich repräsentiert die untere Bande das nicht posttranslational modifizierte Rezeptorprotein. Die größere Bande stellt vermutlich den glykosylierten Rezeptor dar (Erkennungsstelle für N-Glykosylierung: N⁶, siehe Abb. 22). Eine Glykosylierung von OR konnte *in vitro* (Gat *et al.*, 1994; persönliche Mitteilung Dr. I. Weyand) und *in vivo* (Krieger *et al.*, 1994) indirekt durch PNGase F Behandlung der Rezeptorproteine nachgewiesen werden.

Die Versuche zur heterologen Expression von OR haben gezeigt, daß die entsprechenden Proteine von den Wirtszellen synthetisiert und sehr wahrscheinlich auch posttranslational modifiziert werden (3.1.6.1.5).

3.2 Nachweis von Komponenten eines cAMP-vermittelten Signaltransduktionsweges in männlichen Keimzellen

In den Riechzellen koppeln Duftstoffrezeptoren an das stimulatorische G-Protein G_{olf} (Jones & Reed, 1989; Belluscio *et al.*, 1998). G_{olf} aktiviert seinerseits die Adenylzyklase (AC) vom Typ III (Bakalyar & Reed, 1990; Wong *et al.*, 2000). Die Wechselwirkungspartner von OR in Spermien sind unbekannt. Es gibt Hinweise, daß G_{olf} und ACIII in Spermien-Vorläuferzellen exprimiert werden (Zigmann *et al.*, 1993; Defer *et al.*, 1998; Gautier-Courteille *et al.*, 1998). Von verschiedenen Arbeitsgruppen konnten stimulatorische G-Proteine in reifen Spermien bisher nicht nachgewiesen werden (Hildebrandt *et al.*, 1985; Kopf *et al.*, 1986; Bentley *et al.*, 1986, Hinsch *et al.*, 1992; Merlet *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu diesen Autoren war es Fraser und Adeoya-Osiguwa (1999) mit Hilfe von Westernblot-Experimenten möglich G_{αs} in Spermien nachzuweisen.

3.2.1 Klonierung und immunologischer Nachweis von G_{αolf}

G_{olf} ist nicht nur in Riechzellen, sondern auch in verschiedenen anderen Geweben exprimiert (Drinnan *et al.*, 1991; Zigman *et al.*, 1993; Glatt & Snyder, 1993; Hervé *et al.*, 1993, 1995). G_{αolf}-Transkripte wurden durch Northernblot-Experimente mit menschlicher Hoden-RNA

(Zigman *et al.*, 1993) nachgewiesen. In Westernblot-Experimenten konnten G-Proteine mit der Molmasse von $G_{\alpha\text{olf}}$ im Säugetier-Hoden nachgewiesen werden (Zigman *et al.*, 1993; Defer *et al.*, 1998). Mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungs-Experimenten konnten Transkripte der α -Untereinheit des G_{olf} in menschlichen Spermatozyten lokalisiert werden (Kebekus, Dissertation, Hannover, 1998).

Zum Nachweis von $G_{\alpha\text{olf}}$ in Keimzellen der Maus sollte zunächst die kodierende Region der cDNA mit Hilfe von PCR (2.11) kloniert werden. Publiziert waren Partialsequenzen (7.2, Tabelle 10) des Maus- $G_{\alpha\text{olf}}$ -Transkriptes. Die Primer zur Klonierung des $G_{\alpha\text{olf}}$ wurden deshalb anhand der Ratten $G_{\alpha\text{olf}}$ cDNA-Sequenz (Jones & Reed, 1989) ausgesucht (zur Homologie der Gene siehe 7.2, Tabelle 10). Mit den Primern # 2825 und # 2826 (spezifisch für $G_{\alpha\text{olf}}$; 7.2, Tabelle 11) konnte mit Keimzell-cDNA (2.9.1.2) ein 1143 Bp großes cDNA-Fragment amplifiziert werden (7.2, Abb. 39). Dieses beinhaltete das gesamte offene Leseraster von $G_{\alpha\text{olf}}$. Das Transkript kodiert für ein Protein von 381 Aminosäuren mit einer errechneten Molmasse von 44,3 kDa. Das $G_{\alpha\text{olf}}$ der Maus teilt mit dem $G_{\alpha\text{olf}}$ der Ratte 96 % identische Nukleinsäuren und 99,5 % identische Aminosäuren.

Zum Nachweis des Proteins wurden Westernblot-Experimente durchgeführt. Eingesetzt wurde der Antikörper C-18 (Santa Cruz). Dieser ist gegen ein Epitop aus der α -Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins ($G_{\alpha\text{s}}$) der Ratte gerichtet (Aminosäuren 377 – 394). Im Maus $G_{\alpha\text{olf}}$ liegt in diesem Bereich ein konservativer Austausch vor (Position 389 R ($G_{\alpha\text{s}}$) => K ($G_{\alpha\text{olf}}$)).

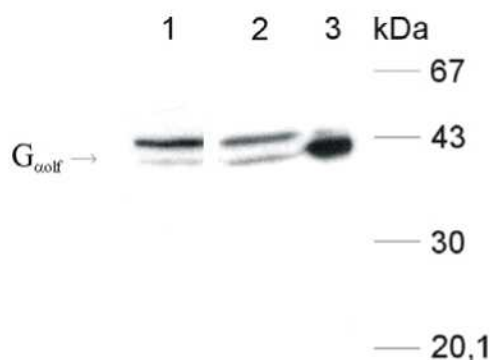


Abb. 25: Westernblot-Analyse von Proteinen aus olfaktorischen Zilien der Ratte sowie Membranproteinen aus Hoden und Nebenhoden-Spermien der Maus.

Verwendet wurde AK C-18 (Santa Cruz) (1: 2.500). Aufgetragen wurden Membranproteine aus Hoden (1; 140 µg), Nebenhoden-Spermien (2; 80 µg) der Maus und Proteine aus olfaktorischen Zilien der Ratte (3; 3 µg). Der Pfeil markiert die Position von $G_{\alpha\text{olf}}$. Als Molmassenstandard diente der LMW-Marker (Pharmacia).

In Abb. 25 ist die Westernblot-Analyse mit dem Antikörper C-18 dargestellt. Der Antikörper erkennt $G_{\alpha\text{olf}}$ (~ 42 kDa) in Proteinen aus Rattenzilien (Spur 3). Zusätzlich wird ein Protein von etwa 45 kDa schwach markiert. Proteine mit einer Molmasse von ~ 42 kDa und ~ 45 kDa

werden ebenfalls in Hoden- (Spur 1) und Nebenhoden-Spermien-Membranproteinen (Spur 2) erkannt. Bei dem Protein mit einer Molmasse von 45 kDa handelt es sich wahrscheinlich um die längere Spleiß-Variante von $G_{\alpha s}$ (~ 45 kDa) (Rius *et al.*, 1994).

Zur zellulären Lokalisation von $G_{\alpha olf}$ im adulten Hoden sowie in Nebenhoden-Spermien wurden immunhistochemische Experimente (2.19.3; 2.19.4) durchgeführt. Der Erstantikörper C-18 wurde mit Hilfe eines Fluorophor-gekoppelten Zweitantikörpers und einer anschließenden konfokalen Lasermikroskopie nachgewiesen.

In der Immunhistochemie (2.19.4) an Paraffinschnitten des adulten Hodens (2.9.7.1) wird mit dem Antikörper C-18 eine sehr starke Färbung von Leydigzellen (Abb. 26a, Pfeilspitze) und Zellen der Gefäßwände (Abb. 26a, Pfeil) sowie eine sehr schwache Färbung von Muskelzellen in der *Lamina Propria* beobachtet. Wie an den vier angeschnittenen Samenkanälen zu sehen ist (Abb. 26a, 1 - 4), färbt der Antikörper keine Keimzellstrukturen. In Kontrollexperimenten, in denen kein Erstantikörper verwendet wurde, wurden keine Strukturen angefärbt (nicht gezeigt). In immunzytochemischen Experimenten mit dem Antikörper C-18 an menschlichen, paraffineingebetteten Hodenschnitten werden die gleichen Strukturen angefärbt (persönliche Mitteilung Dr. Ralf Middendorff, UKE Hamburg). Bei der Anfärbung handelt es sich sehr wahrscheinlich um den Nachweis des Proteins, das in der Westernblot-Analyse eine Molmasse von 45 kDa zeigte, da diese Bande deutlich intensiver als die $G_{\alpha olf}$ Bande (~ 42 kDa) war.

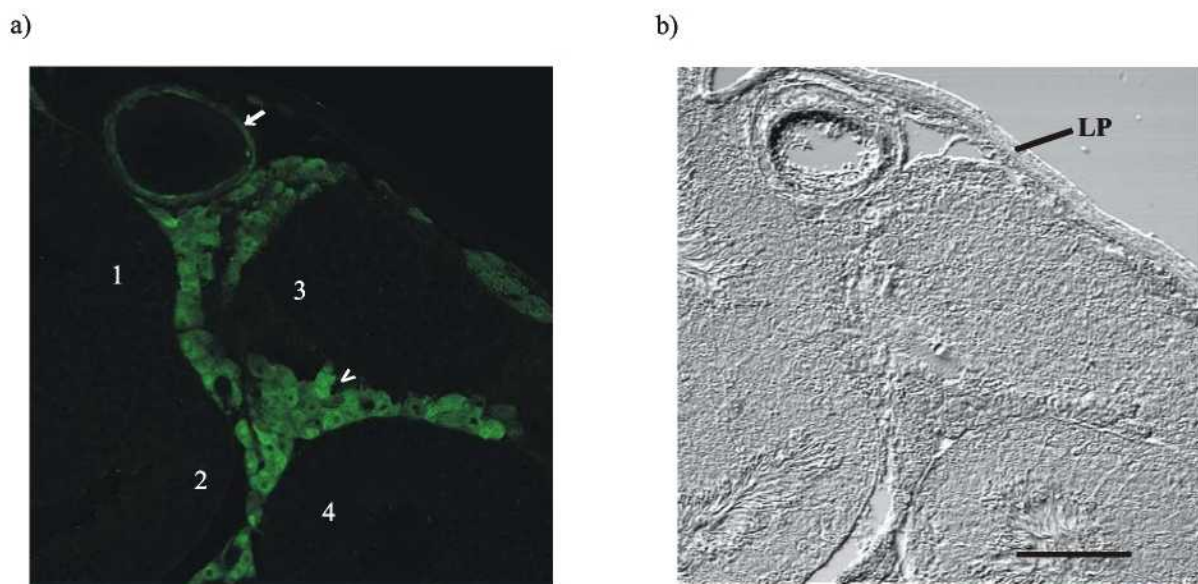


Abb. 26: Immunzytochemische Färbung von Paraffinschnitten des Maus-Hodens.

Für den Nachweis wurde der Antikörper C-18 ($G_{\alpha s/\alpha olf}$, 1: 25, Santa Cruz, (a)) eingesetzt. Die Detektion des Erstantikörpers erfolgte mit einem Fluorophor-gekoppelten Zweitantikörper (Anti-rabbit-Alexa-488, 1: 400) und anschließender konfokaler Lasermikroskopie. Der Pfeil in a) markiert ein Blutgefäß. Die Pfeilspitze markiert die Lage der Leydigzellen. Mit Zahlen versehen sind die vier angeschnittenen Samenkanäle. b) Differential-Interferenz-Kontrast (DIC) Aufnahme von a). LP: *Lamina Propria*. Der Größenbalken entspricht 100 μm (b).

Für die Immunzytochemie an Nebenhoden-Spermien (2.19.3) wurde ebenfalls der Antikörper C-18 ($G_{as/\alpha olf}$) eingesetzt. Der Antikörper färbt an Nebenhoden-Spermien deutlich die akrosomale Region an (Abb. 27a, c, Pfeil). Die Flagellen der Nebenhoden-Spermien zeigten nur Hintergrundfärbung. In Kontrollexperimenten, in denen kein Erstantikörper eingesetzt wurde, war keine Färbung zu beobachten (nicht gezeigt).

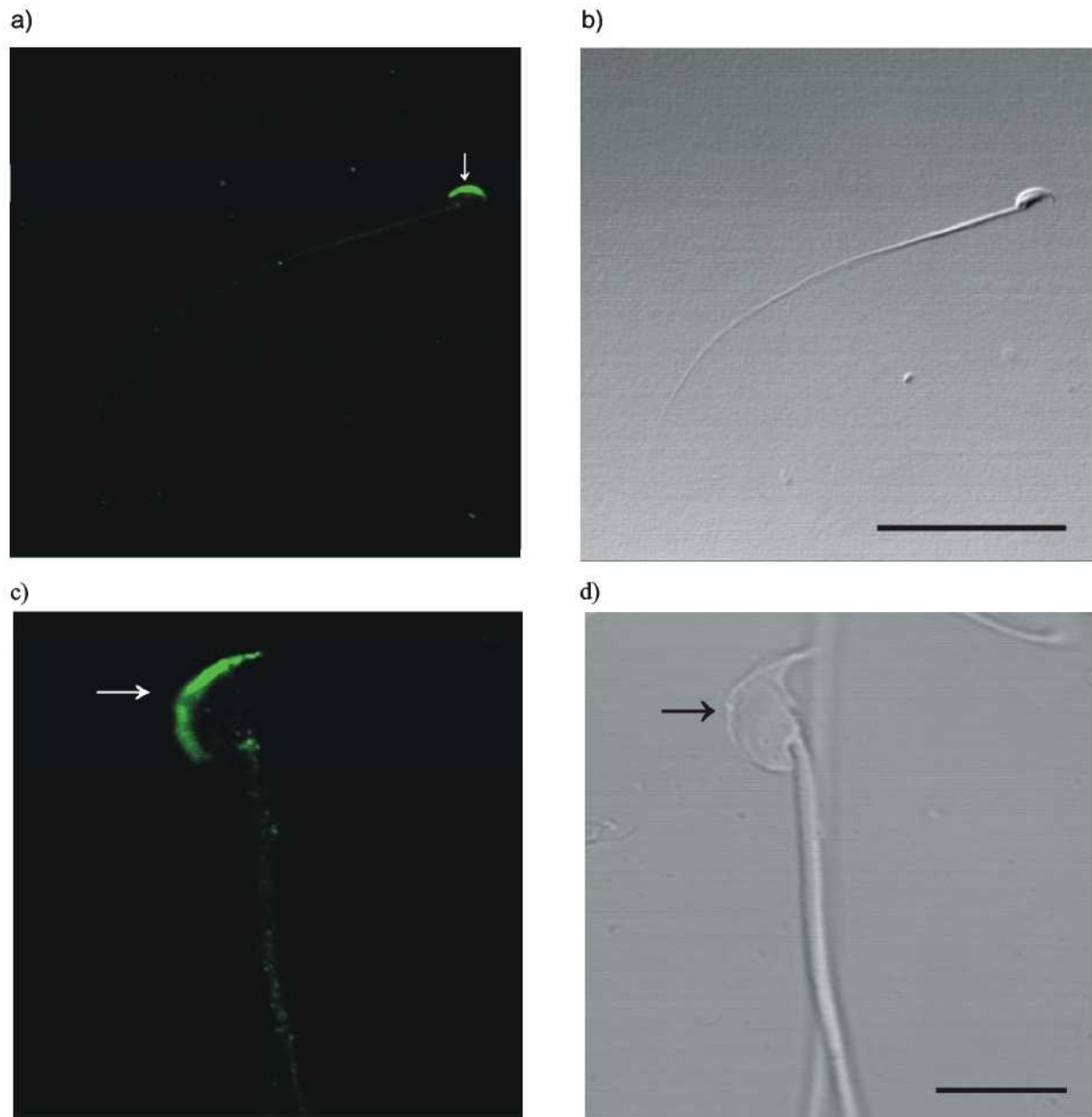


Abb. 27: Immunzytochemische Färbung von Nebenhoden-Spermien.

Für den Nachweis wurden Paraformaldehyd (4 %, 5 min) fixierte Nebenhoden-Spermien der Maus eingesetzt. a), c) Verwendet wurde der Antikörper C-18 ($G_{as/\alpha olf}$, 1: 50). b), d) DIC Aufnahme von a) und c). Der Erstantikörper wurde mit einem Fluorophor-gekoppelten Zweitantikörper (Anti-rabbit-Alexa-488, 1: 400) detektiert. Die Aufnahmen wurden mit konfokaler Lasermikroskopie gemacht. Der Pfeil kennzeichnet die akrosomale Region. Der Größenbalken entspricht 100 μm (b) bzw. 10 μm (d).

In den immunzytochemischen Experimenten mußte der Antikörper C-18 (1: 25, Abb. 26; 1: 50, Abb. 27) im Vergleich zur Westernblot-Analyse (1: 2.500, Abb. 25) deutlich höher konzentriert eingesetzt werden. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich in der Fixierung der Zellen zu suchen. Die Experimente in Abb. 26 und Abb. 27 zeigen, daß der Antikörper C-18 empfindlich gegenüber der Fixiermethode bzw. der Fixierungsdauer ist. Während bei Nebenhoden-Spermien, die 5 min mit Paraformaldehyd fixiert wurden, eine Antikörperverschüttung von 1: 50 verwendet werden kann, muß der Antikörper für den Nachweis an Hodenschnitten, die 30 min in Bouin fixiert wurden, 1: 25 verdünnt eingesetzt werden. G_{olf} kann mit Hilfe der Westernblot-Analyse in Nebenhoden-Spermien-Proteinen nachgewiesen werden. In immunzytochemischen Experimenten ist G_{olf} allerdings nur im akrosomalen Bereich nachweisbar. Da OR im *mid piece* von Spermien lokalisiert sind (Vanderhaeghen *et al.*, 1993; Walensky *et al.*, 1995), ist eine Wechselwirkung von G_{olf} mit Duftstoffrezeptoren unwahrscheinlich.

3.2.2 Immunologische Experimente zum Nachweis der ACIII in männlichen Keimzellen

G_{olf} koppelt in Riechzellen an die Adenylylzyklase (AC) vom Typ III (Bakalyar & Reed, 1989). Die ACIII ist außer in den Riechzellen in weiteren neuronalen und nichtneuronalen Zelltypen exprimiert (Xia *et al.*, 1992; Gautier-Courteille *et al.*, 1998; Ferrand *et al.*, 1999; Ishikawa *et al.*, 2000). Die Expression der ACIII in Spermien-Vorläuferzellen von Ratte und Maus (Defer *et al.*, 1998; Gautier-Courteille *et al.*, 1998) wirft die Frage auf, ob das Enzym auch in reifen Spermien exprimiert ist.

Zum Nachweis des ACIII-Polypeptids wurden Westernblot-Experimente durchgeführt. Es wurde ein Antikörper (C-20, Santa Cruz) verwendet, der spezifisch die ACIII erkennt. Der Antikörper ist gegen die letzten 19 Aminosäuren (1125 – 1144) des Ratten-Enzyms gerichtet. Durch die Klonierung der kodierenden cDNA-Sequenz der ACIII aus der Maus (siehe 7.3, Abb. 40) konnte gezeigt werden, daß das Epitop der Ratten ACIII identisch mit dem der Maus ACIII ist.

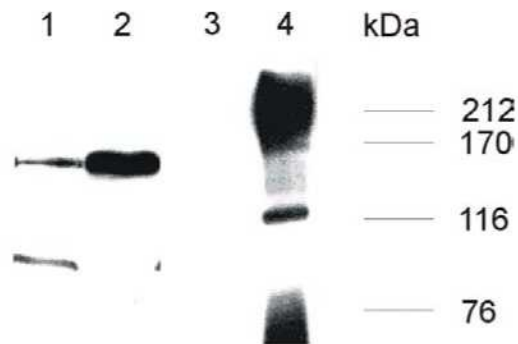


Abb. 28: Westernblot-Analyse von Proteinen aus Hoden und Nebenhoden-Spermien der Maus sowie von Proteinen aus olfaktorischen Zilien der Ratte.

Aufgetragen wurden Hoden-Membranproteine (Spur 1, 140 µg), hypotonisch extrahierte Hoden-Proteine (Spur 2, 140 µg) und Nebenhoden-Spermien-Membranproteine (Spur 3, 60 µg) der Maus. Als Positiv-Kontrolle wurden Proteine aus olfaktorischen Zilien der Ratte aufgetragen (Spur 4, 6 µg). Rechts angegeben ist ein HMW Molmassenstandard (Pharmacia). Die Detektion des Erstantikörpers C-20 (1: 1000) erfolgte mit dem SuperSignal™ULTRA Chemiluminescent Substrate (Pierce). Die Dauer der Exponierung betrug 15 sec.

Der Antikörper C-20 erzeugt mit olfaktorischen Zilien der Ratte ein deutliches Signal im Molmassenbereich von ~ 170 bis ~ 240 kDa (Abb. 28, Spur 4). Die breite Bande ist auf die Glykosylierung der ACIII zurückzuführen (Bakalyar & Reed, 1990). Der Antikörper erkennt zusätzlich ein ~ 120 kDa Protein und eine diffuse Bande bei 53 bis 76 kDa (Spur 4). Bei dem ~ 120 kDa Protein könnte es sich um die nicht glykosylierte Form der ACIII handeln (theoretische Molmasse ~129 kDa). Da Zilienproteine sehr Proteolyse-empfindlich sind (Dr. I. Boekhoff persönliche Mitteilung), handelt es sich bei der 53 bis 76 kDa Bande wahrscheinlich um proteolytisch abgebaute Fragmente der ACIII. In Membranproteinen aus Maus-Hoden werden zwei Proteine markiert (Spur 1). Bei dem Protein mit einer Molmasse von ~ 155 kDa handelt es sich um ein lösliches Protein, da in einem hypotonischen Proteinextrakt aus Maus-Hoden ein Protein mit gleicher Molmasse erkannt wird (Spur 2). Neben dem ~ 155 kDa-Protein wird noch ein Protein mit einer Molmasse von ~ 98 kDa (Spur 1) erkannt. In Membranproteinen aus Nebenhoden-Spermien der Maus (Spur 3) wird ausschließlich ein Protein mit einer Molmasse ~ 53 kDa markiert (nicht gezeigt). Die ACIII ist weder im Maus-Hoden noch in Nebenhoden-Spermien in der Westernblot-Analyse nachweisbar. In immunhistochemischen Experimenten wurden Hodenschnitte von adulten Mäusen mit dem Antikörper C-20 untersucht. Es wurden die akrosomalen Bereiche von runden und elongierten Spermatiden gefärbt (Daten nicht gezeigt). Eine Anfärbung dieser Strukturen mit dem Antikörper C-20 wurde auch von Gautier-Courteille *et al.* (1998) beobachtet. Diese Färbung ist allerdings nicht auf die ACIII sondern sehr wahrscheinlich auf die Kreuzreaktion mit dem 155 kDa Protein zurückzuführen. Die ACIII scheidet aus diesen Gründen als Effektormolekül für die Duftstoffrezeptoren in Spermien aus.

Zusammenfassend läßt sich sagen:

Transkripte von $G_{\alpha olf}$ konnten in Keimzell-cDNA nachgewiesen werden. $G_{\alpha olf}$ konnte mit Westernblot-Experimenten in Nebenhoden-Spermien detektiert werden. $G_{\alpha olf}$ wurde im akrosomalen Bereich von Nebenhoden-Spermien immunologisch lokalisiert (3.2.1). Transkripte der ACIII konnten in der cDNA von angereicherten Keimzellen identifiziert werden. Das ACIII-Protein konnte jedoch weder in Hoden-Keimzellen noch in Nebenhoden-Spermien der Maus nachgewiesen werden (3.2.2). Falls OR die Rezeptoren für chemotaktisch wirksame Substanzen darstellen, dann vermitteln sie das Signal in Spermien nicht über die klassische - aus Riechzellen bekannte - cAMP-Signalkaskade.

3.3 Nachweis von Signalkomponenten eines cGMP-vermittelten Signalweges

3.3.1 Klonierung und immunologischer Nachweis der Guanylylzyklase-D

In Spermien von Seeigeln stellen membranständige Guanylylzyklasen die Rezeptoren für chemotaktisch wirksame Peptide dar (Fülle & Garbers, 1994). Die GC-A ist die einzige membrangebundene Guanylylzyklase, die bislang in Spermien von Säugetieren lokalisiert wurde (1.1.1.2, Silvestroni *et al.*, 1992). Der Ligand der GC-A ist ANP. ANP scheidet als chemotaktisch wirksame Substanz aus (siehe 1.1.1.2). Um zu prüfen, ob weitere membranständige Guanylylzyklasen in Spermien von Säugetieren exprimiert werden, wurde zunächst eine Datenbankrecherche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>; Datenbank Maus EST's, *expressed sequence tag*) mit den cDNA-Sequenzen aller bekannten Säugetier Rezeptor GC's durchgeführt. Mit Hilfe dieser Recherche konnte ein EST der Maus Guanylylzyklase-D (GC-D, Fülle *et al.*, 1995) identifiziert werden, das aus Hoden-cDNA stammte. EST's werden aus cDNA kloniert und sind somit ein Hinweis auf die Expression eines Gens im jeweiligen Gewebe.

Die GC-D ist im olfaktorischen Epithel in einer Subpopulation von OSN exprimiert. Diese Subpopulation ist wahrscheinlich für die Erkennung von Liganden verantwortlich, die das Reproduktions- und Sozialverhalten steuern (Fülle *et al.*, 1995; Juilfs *et al.*, 1997). Die Liganden der GC-D sind unbekannt. Von dem GC-D-Gen der Maus waren sowohl genomische Fragmente (nr Datenbank NCBI, Tabelle 14a, 7.4), als auch EST-Fragmente aus Thymus und Hoden (EST Datenbank NCBI, Tabelle 14b, 7.4) bekannt. Die genomischen Fragmente enthielten Sequenzen, die für das Signalpeptid, die extrazelluläre Domäne und das Transmembransegment kodieren. Die EST's aus dem Thymus kodieren für Bereiche aus der

intrazellulären Domäne (Abb. 29). Das EST aus dem Maus-Hoden kodiert für die letzten 22 Aminosäuren aus dem C-Terminus der GC-D und enthält nicht-kodierende Sequenzen direkt im Anschluß an das Stoppkodon.

Um die vollständige cDNA-Sequenz der Maus GC-D zu isolieren, wurden verschachtelte PCR-Experimente durchgeführt (Abb. 29). Die Primer # 2650, # 2651 und # 2612 wurden anhand der Ratten cDNA-Sequenz, die übrigen Primer anhand der Maussequenzen ausgewählt.

In PCR-Experimenten konnten mit den Primerkombinationen # 2650/# 2651 und # 2612/# 2823 (7.4, Tabelle 15a) aus Keimzell-cDNA zwei überlappende cDNA-Fragmente amplifiziert werden. Die cDNA-Fragmente wurden in pBlueskript-KS⁻ kloniert und die rekombinanten Klone sequenziert. Die Sequenzierung zeigte, daß die Fragmente für einen großen Teil der intrazellulären Domäne der GC-D kodieren (Abb. 29, entspricht den Aminosäuren 562 – 1099 der Ratten GC-D).

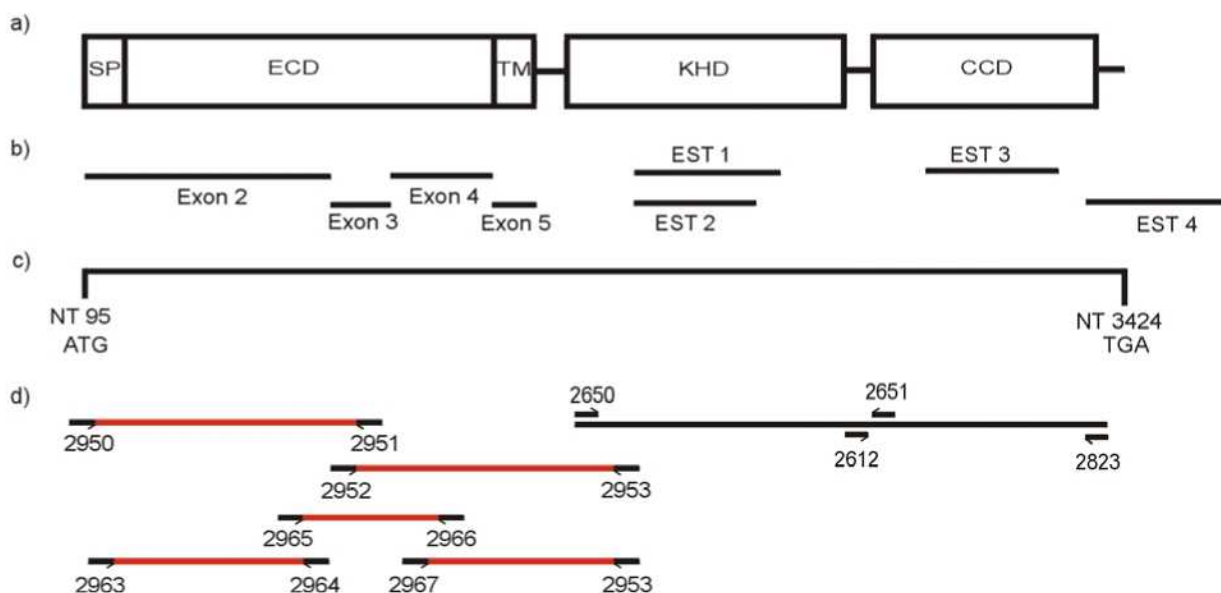


Abb. 29: Klonierungsstrategie für die cDNA der Maus GC-D.

a) Darstellung der funktionellen Domänen des GC-D Proteins, b) Bisher veröffentlichte cDNA-Sequenzen der Maus GC-D (siehe 7.4), c) Länge der klonierten cDNA der Ratten GC-D, d) PCR-Strategie zur Amplifikation der Maus GC-D-cDNA. Rechts ist der Teil der cDNA-Sequenz mit entsprechenden Primern abgebildet, der amplifiziert werden konnte. Im linken Teil sind in rot die cDNA-Sequenzen dargestellt, die bislang nicht in PCR-Versuchen amplifiziert werden konnten. SP: Signalpeptid, ECD: Extrazelluläre-Domäne, TM: Transmembran-Domäne, KHD: Kinase-Homologie-Domäne, CCD: Katalytische-Domäne. NT: Nukleotid, ATG: Startkodon, TGA: Stoppkodon.

PCR-Versuche zur Amplifikation der cDNA-Sequenz, die für die extrazelluläre Domäne kodiert, blieben erfolglos. Dies ist erstaunlich, da die Primer anhand der publizierten Maussequenzen ausgesucht wurden (Abb. 29) und somit eine Fehlpaarung zwischen Primer

und cDNA-Matrize ausgeschlossen werden kann. Um auszuschließen, daß Sekundärstrukturen der cDNA die DNA-Synthese während der PCR behindern, wurde das „GC-Rich“ PCR-kit (Roche) verwendet. Auch mit diesem PCR-kit konnte die 5'-terminale Hälfte der cDNA-Sequenz nicht amplifiziert werden.

Um zu überprüfen, ob die GC-D auch im Hoden anderer Spezies exprimiert wird, wurden PCR-Experimente durchgeführt. Eingesetzt wurde cDNA aus dem Hoden des Menschen. Die Primer (# 3023/# 3024, 7.4, Tabelle 15b) wurden anhand zwei konservierter Bereiche der cyclase catalytic domain (CCD) ausgesucht (Abb. 30).

		3023	
RATGCD	-	CAGTTCAAAGCATCAACCAAGGCAAGAGACAAGTGTGCTGACTCCATGCTGCGGATGCTGGAGAAGTATCCCAAAGCCTGGAAGTCTGGTCCAGG	- 2642
SV129GCDPA	-	CAGTTCAAAGCATCAACCAAGGCAAGAGACAAGTGTGTAAGCTCCATGCTGCGGATGCTGGAGAAGTATCCCAAAGCCTGGAAGATCTGGTCCAGG	- 855
HumGCD	-	CAGTTCAAAGCATCAACCAAGGCAAGAGACAAGTGTGCTGACTCCATGCTGTTGCTGGAGAAATATCCCAAAGCCTGGAAGATCTGATTCAGG	- 100
RATGCD	-	AGCGGACTGAGGAGCTGGAACCTGGAGAGGCGGAAGACAGAGAGGCTGCTCTCAGATGCTCCCCCGTCTGTCGCCATGCTCTAAGATGGGAACAAC	- 2742
SV129GCDPA	-	AGCGGACTGAGGAGCTGGAACCTGGAGAGGCGGAAGACAGAGAGGCTGCTCTCAGATGCTCCCCCGTCTGTCGCCATGCTCTAAGATGGGGACAAC	- 955
HumGCD	-	AGCAGACTGAGGAACCTGGAGCTAAGAGAGAGAGAGACAGAAAGGCTGCTCTGTCAGATGATTCGCCAGCTGTGGCTGAAGCTCGGAATATGGGGACAAC	- 200
RATGCD	-	TGTGGAGCCCGAGTACTTTGACCAAGTCACCATCTATTTCAGTGACATCGTGGGCTTACCACCATCTCAGCCTTGAAGTGAAGCCATTGAGGTGGTGGGC	- 2842
SV129GCDPA	-	AGTGGAGCCCGAGTACTTTGACCAAGTCACCATCTATTTCAGTGACATCGTGGGCTTACCACCATCTCAGCCTTGAAGTGAAGCCATTGAGGTGGTGGGC	- 1055
HumGCD	-	TGTGGAGCCCGAGTACTTTGACCAAGTACCATATCTTCAGTGACATCGTGGGCTTACCACCATCTCAGCCTTGAAGTGAAGCCATTGAGGTGGTGGGC	- 300
RATGCD	-	TTCTCTCAATGATCTCTACACGATGTTTGATGCTGTTCT	- 2880
SV129GCDPA	-	TTCTCTCAATGATCTCTACACGCTGTTTGATGCTGTTCT	- 1093
HumGCD	-	TTGCTCAACGATCTCTACATGCTGTTTGATGCTGTTCT	- 338
		3024	

Abb. 30: DNA-Sequenzvergleich eines Abschnitts aus der katalytischen-Domäne der GC-D unterschiedlicher Spezies. Verglichen wurden ~ 340 Bp aus der katalytischen-Domäne (CCD) der GC-D aus Ratte (RATGC-D), Maus (SV129GCDPA) und Mensch (HumGCD). Grau unterlegt sind die konservierten Bereiche anhand derer die Primer # 3023 und # 3024 ausgesucht wurden. Rechts angegeben sind die Nukleotidpositionen. Die Abweichung eines Nukleotids an einer Position von den entsprechenden Nukleotiden der beiden anderen Sequenzen an dieser Position ist rot markiert.

Es konnte ein PCR-Fragment der errechneten Größe amplifiziert werden (Abb. 31).

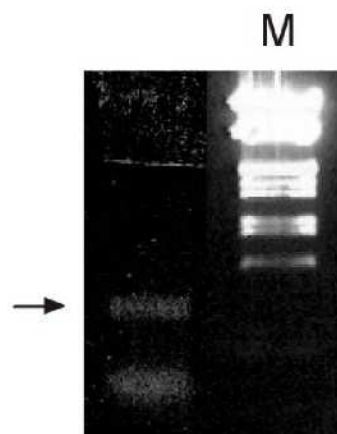


Abb. 31: PCR-Nachweis von GC-D-Transkripten im menschlichen Hoden.

Der PCR-Versuch wurde mit random geprimter Hoden-cDNA des Menschen durchgeführt. Eingesetzt wurden die Primer # 3023 und # 3024. Der gesamte PCR-Ansatz (25 µl) wurde in einem 1,5 % Gel aufgetrennt. Mit einem Pfeil markiert ist das cDNA-Fragment der menschlichen GC-D (411 Bp). Rechts aufgetragen ist der Größenstandard: λ-DNA EcoRI/HindIII geschnitten.

Der bisher klonierte Bereich der Maus GC-D ist 94,1 % identisch mit dem entsprechenden Bereich der Ratten cDNA-Sequenz. Auf Proteinebene beträgt die Identität 95,5 %.

SV129GCDPA-	VPAFLEHTNVALYQGEWVWLKKFEAGVAPDLRPSLSFLRLKREMRHENVTAFLGLFVGPGVSAMVLEHCARGSLLEDLLQENLRLLW	- 88
RATGCD	- SFQSVIQGSTRSVFPAFLEHTNVALYQGEWVWLKKFEAGTAPDLRPSLSLLRLKREMRHENVTAFLGLFVGPEVSAMVLEHCARGSLLEDLLRNEDLRLLW	- 650
KHD		
SV129GCDPA-	TFKASLLLDLIRGLRYLHHRFFPHGRKSRNCVVDTRFVLKITDHGYAEFLESHCSSRPQPAPEELLNTAFELLRGFGGFE---KATFKGDVFSLAIILQ	- 185
RATGCD	- TFKASLLLDLIRGLRYLHHRFFPHGRKSRNCVVDTRFVLKITDHGYAEFLESHCSSRPQPAPEELLNTAFELLRGFGFGWFGKATFKGDVFSLGIILQ	- 750
CCD		
SV129GCDPA-	EVLTRDPFYCSWGLSABEIIIRKVASPPFLCRPLVSPDQGFLECIQLMQLCWEEAPDDRPSLDQIYTFQKSIHQKNTSVVDSMLRMLEKYSQSLDLVQE	- 285
RATGCD	- EVLTRDPFYCSWGLSABEIIIRKVASPPFLCRPLVSPDQGFLECIQLMQLCWEEAPDDRPSLDQIYTFQKSIHQKNTSVVDSMLRMLEKYSQSLDLVQE	- 850
HumGCD	-	QFKSIHQKNTSVVDSMLRMLEKYSQSLDLVQE - 34
SV129GCDPA-	RTEELELRKTERLLSQMLPFSVAHALKMGTTVEPEYFDQVTIYFSDIVGFTTISALSEPIEVVGFNDLYTMFDAVLDSHDVYKVTIGDAYMVASGL	- 385
RATGCD	- RTEELELRKTERLLSQMLPFSVAHALKMGTTVEPEYFDQVTIYFSDIVGFTTISALSEPIEVVGFNDLYTMFDAVLDSHDVYKVTIGDAYMVASGL	- 950
HumGCD	- QTEELELRKTERLLSQMIFPTVAEARKMGATVEPEYFDQVTIYFSDIVGFTTISALSEPIEAVGLNDLYMLFDAVLDSHDVYKVTIGDAYMVASGL	- 125
SV129GCDPA-	PRRNGNRHAAEIANLALDILSYAGNFRMRHAPDVFIRVRAGLHSGFCVAGVGLTMFRYCLFGDTVNTASRMESTGLPYRIHVSQSTVQALLSLDBGYKI	- 485
RATGCD	- PRRNGNRHAAEIANMALEILSYAGNFRMRHAPDVFIRVRAGLHSGFCVAGVGLTMFRYCLFGDTVNTASRMESTGLPYRIHVSQSTVQALLSLDBGYKI	- 1050
SV129GCDPA-	DVRGQTELGKGLLEETWLTGKVGFCRPLPTPLSIKPGDPWQDRINQEI	- 534
RATGCD	- DVRGQTELGKGLLEETWLTGKVGFCRSLPTPLSIKPGDPWQDHINQEIIRTGFAKLARVC	- 1110

Abb. 32: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Maus (partial), Ratten und menschlichen (partial) GC-D. Für den Sequenzvergleich wurde der klonierte cDNA-Bereich der Maus GC-D translatiert (SV129GCDPA) und mit dem entsprechenden Proteinabschnitt der Ratten GC-D (RATGCD) sowie einem Bereich aus der menschlichen GC-D (HumGC-D, translatiert wurde EST: BF513152) verglichen. Rechts angegeben sind die Aminosäurepositionen der Ratten GC-D und des Mauspeptids. Sequenzunterschiede sind in der Maussequenz rot markiert. Die Kinase-Homologie-Domäne (KHD) sowie die C-terminale katalytische-Domäne (CCD) sind überstrichen. Die Grenzen dieser Bereiche wurden von Fülle *et al.*, 1995 übernommen.

Zum Nachweis des GC-D Proteins im Hoden und in Nebenhoden-Spermien wurden Westernblot-Experimente (2.17) durchgeführt. Es wurden Hodenmembranen (140 µg Protein) und Membranen von Nebenhoden-Spermien (100 µg Protein) in diesen Experimenten eingesetzt. Als Kontrolle dienten Zilien-Proteine aus dem Riechepithel der Ratte (30 µg Protein). Für den Nachweis wurde der Antikörper I055 eingesetzt (Juilfs *et al.*, 1997), der gegen ein intrazelluläres Peptid der Ratten GC-D gerichtet ist. Mit Hilfe der Westernblot-Analyse konnte die GC-D weder in Zilien der Ratte noch im Hoden bzw. in Spermien der Maus nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Zur zellulären Lokalisation der GC-D im adulten Hoden sowie in Nebenhoden-Spermien der Maus wurden immunhistochemische Experimente (2.19.3; 2.19.4) durchgeführt. Für den Nachweis des Proteins in Hodenschnitten wurde der Antikörper I055 eingesetzt.

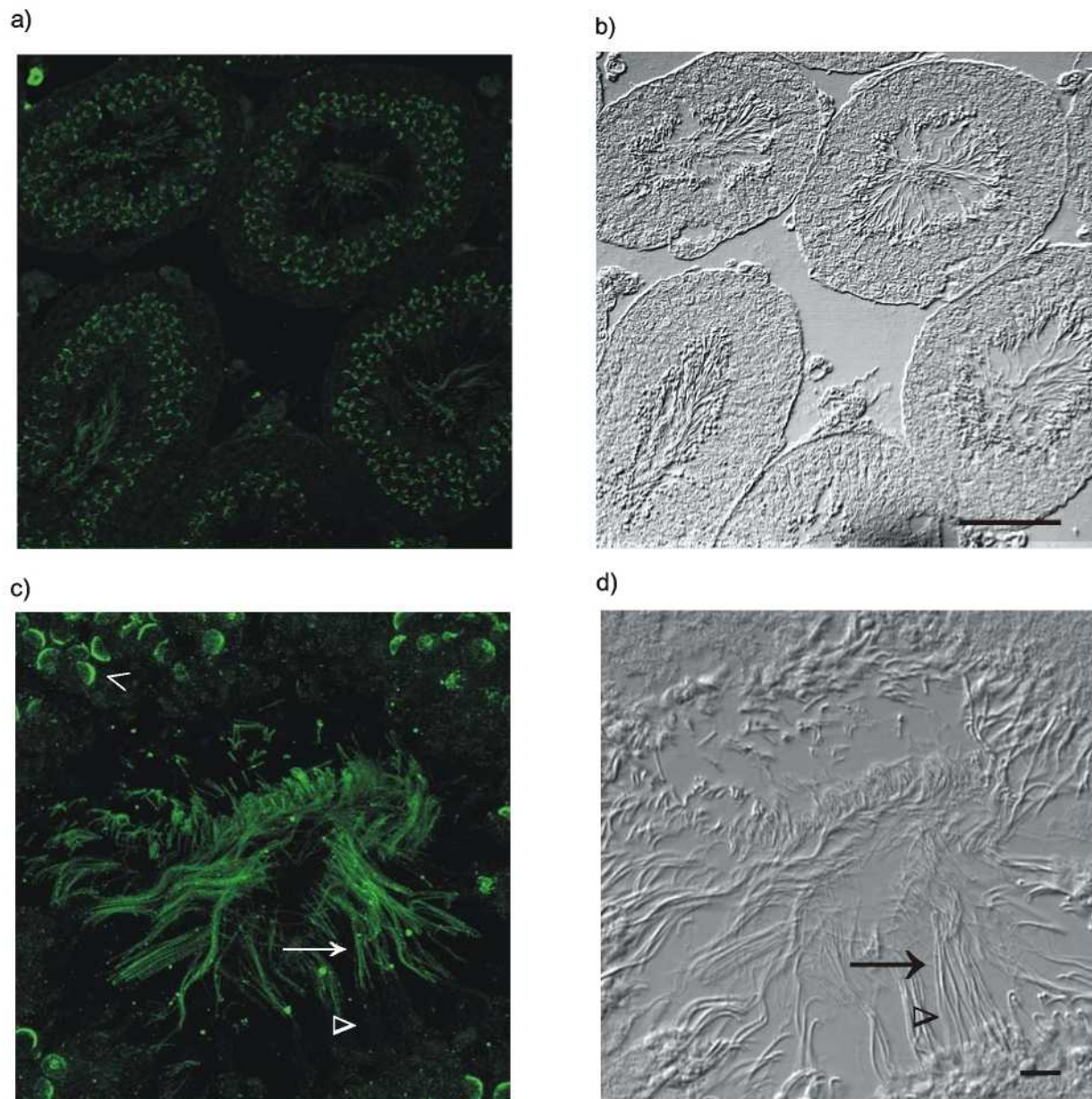


Abb. 33: Immunzytochemischer Nachweis der GC-D in Hodenschnitten der Maus.

Die Experimente wurden an Paraffinschnitten von Mäuse-Hoden durchgeführt. Für den Nachweis wurde der Antikörper I055 (1: 25) verwendet (a, c). In (b) und (d) ist die jeweilige DIC-Optik Aufnahme von (a) und (c) dargestellt. Gefärbt werden akrosomale Bereiche von frühen Spermatiden und das *principal piece* von Hoden-Spermien (a, c). Das *principal piece* ist mit einem Pfeil und das *mid piece* mit einer geschlossenen Pfeilspitze gekennzeichnet (c, d). Die Akrosomenregion ist mit einer offenen Pfeilspitze markiert (c). Der Nachweis des Erstantikörpers erfolgte mit Hilfe eines Fluorophor-gekoppelten Zweitantikörpers (1: 400) und konfokaler Lasermikroskopie. Der Größenbalken entspricht 100 μm (b) bzw. 10 μm (d).

Der Antikörper I055 markiert das *principal piece* von Hoden-Spermien (Abb. 33c, Pfeil), während das *mid piece* nicht gefärbt wird (Abb. 33c, geschlossene Pfeilspitze). Zudem werden akrosomale Bereiche von frühen Spermatiden (Abb. 33c, offene Pfeilspitze) sowie Erythrozyten in Blutgefäßen (nicht gezeigt) angefärbt. In Kontrollexperimenten mit Präimmunserum an Hodenschnitten werden ebenfalls akrosomale Bereiche von frühen

Spermatiden angefärbt. In Kontrollexperimenten ohne Erstantikörper war an Hodenschnitten keine Färbung zu sehen (nicht gezeigt).

Für die Immunzytochemie an Nebenhoden-Spermien (2.19.3) wurde der Antikörper I055 eingesetzt.

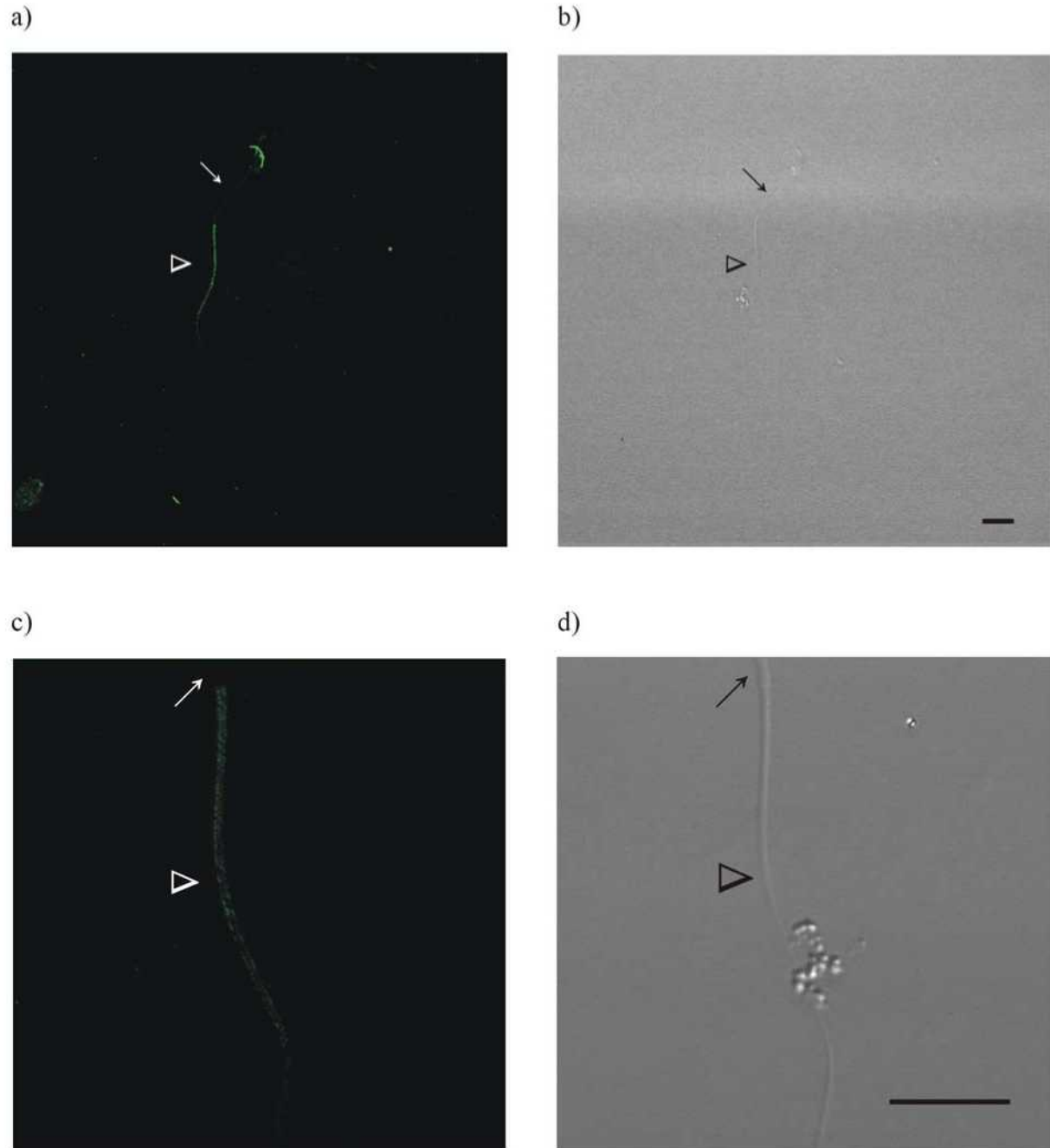


Abb. 34: Immunzytochemische Färbung von Nebenhoden-Spermien.

Für den Nachweis wurden Paraformaldehyd (4 %, 5 min) fixierte Nebenhoden-Spermien der Maus eingesetzt. a), c) Verwendet wurde der Antikörper I055 (1: 1000). b), d) DIC Aufnahme von a) und c). Der Erstantikörper wurde mit einem Fluorophor-gekoppelten Zweitantikörper (Anti-rabbit-Alexa-488, 1: 400) detektiert. Die Aufnahmen wurden mit konfokaler Lasermikroskopie gemacht. Der Pfeil kennzeichnet das *mid piece*. Die Pfeilspitze markiert den proximalen Teil des *principal pieces*. Der Größenbalken entspricht 10 μm (b, d).

Der Antikörper färbt an Nebenhoden-Spermien deutlich die akrosomale Region, den proximalen Bereich des *principal pieces* (Abb. 34a, c, Pfeilspitze) und das *end piece* an. Das *mid piece* wird vom Antikörper I055 nicht gefärbt (Abb. 34a, c, Pfeil). In Kontrollexperimenten, in denen kein Erstantikörper bzw. das Präimmunserum eingesetzt wurde, war keine Färbung zu beobachten (nicht gezeigt).

3.3.2 Klonierung der mCNGA3-Untereinheit

Die α -Untereinheit des CNG-Kanals aus Sehzapfen (CNGA3) ist in den Flagellen von Rinderspermien exprimiert (Weyand *et al.*, 1994; Wiesner *et al.*, 1998). Im Hoden der Ratte konnten mit Hilfe von PCR-Experimenten zwei Spleißvarianten der CNGA3-Untereinheit nachgewiesen werden (Meyer, Dissertation, Köln, 1999). Diese Ergebnisse deuten auf eine spezieübergreifende Rolle der Kanaluntereinheit in männlichen Keimzellen hin. Ob die CNGA3-Untereinheit ebenfalls in Keimzellen der Maus exprimiert wird, sollte zunächst durch PCR untersucht werden.

Vor kurzem wurde aus der Maus-Retina eine CNGA-Untereinheit kloniert (Hirano *et al.*, 2000), die auf DNA-Ebene 92 % identisch mit CNGA3 der Ratte ist. Anhand der cDNA-Sequenz wurden zwei Primerpaare ausgewählt (7.5, Tabelle 17), mit denen die gesamte kodierende Region (7.5, Abb. 42) des CNGA3-Transkriptes in zwei überlappenden Fragmenten amplifiziert werden sollte. In PCR-Experimenten (2.11) mit Keimzell-cDNA (2.10) und den Primern # 2840/# 2841 konnte ein cDNA-Fragment amplifiziert werden (NT 947 – 2039, 7.5, Abb. 42). Mit dem Primerpaar # 2876/# 2877 wurden zwei unterschiedlich lange cDNA-Fragmente amplifiziert. Die drei cDNA-Fragmente wurden ausgeschnitten (2.5.5) und in pBluescript-KS⁻ kloniert (2.6.3).

Die Sequenzierung (2.12) der rekombinanten Klone zeigte, daß das 3'-Fragment (# 2840/# 2841) für den C-Terminus der CNGA3-Untereinheit kodiert. Die 5'-terminalen Fragmente (# 2876/# 2877) stellen Spleißvarianten dar, die für zwei unterschiedlich lange N-Termini kodieren (Abb. 35).

MAUSCONE	CTGTGCAGAGATGGCAAAGGTGAACACCCAGTGTTCACAGCCCTCCCGACCCAACTTTCAATAAAGAATGCGGACAGAG	- 90
mCNGA3s	CTGTGCAGAGATGGCAAAGGTGAACACCCAGTGTTCACAGCCCTCCCGACCCAACTTTCAATAAAGAATGCGGACAGAG	- 450
mCNGA3l	CTGTGCAGAGATGGCAAAGGTGAACACCCAGTGTTCACAGCCCTCCCGACCCAACTTTCAATAAAGAATGCGGACAGAG	- 90
MAUSCONE	ATCTCGACCACGTAGAGAACGGCCTGGGCAGG	- 122
mCNGA3s	ATCTCGACCACGTAGAGAACGGCCTGGGCAGG	- 482
mCNGA3l	ATCTCGACCACGTAGAGAACGGCCTGGGCAGGTCTCACTCACCATGTGAGGAGACATCTTCCACACTGCAGCAAGGGATC	- 170
MAUSCONE		GTGTCACGCCTCAT - 136
mCNGA3s		GTGTCACGCCTCAT - 496
mCNGA3l	GCCATGGAGACCCGAGGACTGGCTGGATCCGCACGGAGCGTAGTCACAAGCCAGGGACCAGCCAGGGTGTACGCCTCAT	- 250
MAUSCONE	CATCTCGATTTCGTGCGTGGGCCTCCAGGCACTTACACGATGAAGACCAGACACCTGACTCCTTTTGGATCGATTTCATG	- 216
mCNGA3s	CATCTCGATTTCGTGCGTGGGCCTCCAGGCACTTACACGATGAAGACCAGACACCTGACTCCTTTTGGATCGATTTCATG	- 576
mCNGA3l	CATCTCGATTTCGTGCGTGGGCCTCCAGGCACTTACACGATGAAGACCAGACACCTGACTCCTTTTGGATCGATTTCATG	- 330
MAUSCONE	GATCTGAGCTTAAGGAAGTCTCCACCCGGGAAGCAATGCCAGCCCAACCCAGGAGAACAGAAGCCACCAGACGGAGGG	- 296
mCNGA3s	GATCTGAGCTTAAGGAAGTCTCCACCCGGGAAGCAATGCCAGCCCAACCCAGGAGAACAGAAGCCACCAGACGGAGGG	- 656
mCNGA3l	GATCTGAGCTTAAGGAAGTCTCCACCCGGGAAGCAATGCCAGCCCAACCCAGGAGAACAGAAGCCACCAGACGGAGGG	- 410
MAUSCONE	GAAGGCAAGGAGGAGGCCATTGTGGTGGACCCCTCCAGCAACATCTACTGCCGCTGGCTGACTGCCATCGCGCTCCC	- 373
mCNGA3s	GAAGG---GAAGGAGGAGGCCATTGTGGTGGACCCCTCCAGCAACATCTACTACCCTGGCTGACTGCCATCGCGCTCCC	- 736
mCNGA3l	GAAGG---GAAGGAGGAGGCCATTGTGGTGGACCCCTCCAGCAACATCTACTACCCTGGCTGACTGCCATCGCGCTCCC	- 487

Abb. 35: Sequenzvergleich der 5'-terminalen cDNA-Abschnitte der CNGA3-Untereinheit der Maus. Verglichen wurden die Sequenzen von Hirano *et al.* (2000, MAUSCONE), sowie die kurze (CNGA3s) und die lange (CNGA3l) Spleißvariante aus Maus-Hoden. Die Nukleotide sind in 5' → 3' Richtung numeriert. Das Startkodon ist grün markiert. Die Sequenzunterschiede sind in rot dargestellt. Die lange Spleißvariante (CNGA3l) hebt sich durch einen Einschub von 114 Nukleotiden (blau markiert) von der kurzen Spleißvariante (CNGA3s) ab. Die erste Transmembrandomäne (S1) ist durch einen Balken über der Sequenz markiert.

Im Hoden der Maus, wie in der Ratte (Meyer, Dissertation, Köln, 1999), sind zwei Spleißvarianten des CNGA3-Transkriptes nachweisbar. Die cDNA-Sequenzen weichen an zwei Positionen von der cDNA-Sequenz von Hirano *et al.* (2000) ab (Abb. 35).

Die cDNA von mCNGA3s (*short*) kodiert für ein Protein mit 630 Aminosäuren und einer errechneten Molmasse von 72,5 kDa. Die cDNA von mCNGA3l (*long*) kodiert für ein Protein mit 668 Aminosäuren und einer errechneten Molmasse von 76,4 kDa. Die Spleißvariante CNGA3l unterscheidet sich von mCNGA3s durch einen Einschub von 38 Aminosäuren zwischen den Aminosäurepositionen 34 (Arginin) und 35 (Valin) der mCNGA3s (Abb. 35). Durch diesen Einschub in mCNGA3l wird eine potentielle Calmodulin-Bindestelle unterbrochen. Calmodulin-Bindestellen bestehen aus etwa 20 Aminosäuren. Die Bindestellen zeichnen sich durch ein „1-5-8-14“-Motiv aus (O’Neil & DeGrado, 1990; Crivici & Ikura, 1995). An den Positionen 1 und 14 befinden sich häufig aromatische oder aliphatische Aminosäuren, an den Positionen 5 und 8 häufig hydrophobe Aminosäuren.



Abb. 36: Sequenz der putativen Calmodulin-Bindestellen der mCNGA3-Untereinheiten aus Maus-Hoden. Dargestellt ist die Calmodulin-Bindestelle der mCNGA3s-Untereinheit. Die Aminosäuren, die das „1-5-8-14“-Motiv bilden, sind blau markiert. Die putative Calmodulin-Bindestelle wird in der mCNGA3l-Untereinheit durch die rot markierten Aminosäuren unterbrochen. Ein Vergleich der putativen Calmodulin-Bindestellen anderer CNGA3-Untereinheiten ist im Anhang (7.5, Abb. 43) abgebildet.

Für den Nachweis des mCNGA3-Proteins wurden Membranproteine aus Nebenhoden-Spermien in einer Westernblot-Analyse untersucht. Zur Lokalisation des Proteins wurden immunzytochemische Experimente an Maushodenschnitten und Nebenhoden-Spermien durchgeführt. Zum immunologischen Nachweis des Proteins wurde ein polyklonales Antiserum, FPc66, eingesetzt, das durch Immunisierung von Kaninchen mit einer C-terminalen Domäne (Aminosäuren K581 – D670) aus rCNGA3 gewonnen wurde (Meyer *et al.*, 2000). Neben dem Serum FPc66 wurde auch ein affinitätschromatographisch gereinigter Antikörper PPc66 eingesetzt. Das Antigen aus dem Ratten-Kanal teilt 89 % identische Aminosäuren mit dem entsprechenden Bereich aus dem Maus-Kanal.

mCNGA3 konnte bisher mit dem Antiserum FPc66 und dem gereinigten Antikörper PPc66 nicht eindeutig nachgewiesen werden. Das Antiserum FPc66 markiert in der Westernblot-Analyse von Nebenhoden-Spermien-Membranproteinen ein Protein mit einer Molmasse von ~ 77 kDa, der gereinigte Antikörper PPc66 dagegen ein Protein von ~ 75 kDa. In immunzytochemischen Experimenten mit Mäuse-Hoden und Nebenhoden-Spermien wurden von dem Antiserum FPc66 und von dem gereinigten Antikörper PPc66 keine Strukturen markiert.

3.3.3 Klonierung der mCNGB3-Untereinheit

Native CNG-Kanäle stellen heterooligomere-Proteine aus α - und β -Untereinheiten dar (zur Übersicht: Kaupp & Seifert, zur Veröffentlichung eingereicht). In Zapfensehzellen der Maus konnte neben der mCNGA3-Untereinheit eine Zapfen-spezifische β -Untereinheit (mCNGB3) (Gerstner *et al.*, 2000) identifiziert werden. Northernblot-Experimente lassen darauf schließen, daß die β -Untereinheit aus Zapfen (mCNGB3) auch im Hoden exprimiert ist

(Gerstner *et al.*, 2000). Um dies zu verifizieren, sollte der für das Protein kodierende Bereich der cDNA kloniert werden.

Die Primer (7.6, Tabelle 19) wurden anhand der Maus mCNGB3-cDNA ausgesucht. In PCR-Experimenten mit cDNA aus angereicherten Keimzellen ließen sich zwei überlappende cDNA-Fragmente amplifizieren, die das gesamte offene Leseraster der mCNGB3-Untereinheit beinhalten (7.6, Abb. 44). Die zusammengesetzte cDNA kodiert für ein Protein mit 694 Aminosäuren und mit einer errechneten Molmasse von 79,75 kDa. Im Vergleich zur cDNA-Sequenz von mCNGB3 von Gerstner *et al.* (2000) liegt in 50 % der analysierten cDNA-Fragmente ein Nukleotid-Austausch vor (Position 548, A (mCNG6) => G). Im mCNGB3-Protein führt dies zu einem Austausch von Glutamin (mCNG6) in Arginin. Ob dieser Austausch einen Fehler während der PCR oder einen Polymorphismus in diesem Gen darstellt, ist unklar. Auffällig war, daß etwa 50 % aller amplifizierten cDNA-Fragmente falsch bzw. unvollständig gespleißte Produkte darstellten. Die gleiche Beobachtung konnte auch für die rCNGB3 aus der Retina der Ratte gemacht werden (persönliche Mitteilung Dr. W. Bönigk). Demnach scheint die Prozessierung von CNGB3 Transkripten generell schwierig und mit einer großen Fehlerrate behaftet zu sein.

Die Ergebnisse der Kapitel 3.3.1 – 3.3.3 sollen hier zusammengefaßt werden.

So ist die GC-D in den Flagellen von Maus-Spermien lokalisiert. Es konnten aus cDNA von Keimzellen auch zwei Spleißvarianten der mCNGA3-Untereinheit und das Transkript der modulatorischen mCNGB3-Untereinheit kloniert werden.

4. Diskussion und Ausblick

4.1 Nachweis von *OR*-Transkripten mit Hilfe von RT-PCR

In dieser Arbeit konnten 10 *OR* im Hoden des Mausstammes 129/SV durch PCR-Experimente (genspezifische Primer, 45 Zyklen) nachgewiesen werden. Fünf *OR* (*TOR1*, 4, 5, 14, 16), die nach Vanderhaeghen *et al.* (1997b) im Mäuse-Hoden exprimiert sind, konnten nach 45 PCR-Zyklen nicht amplifiziert werden.

TOR1 konnte erst nach 90 PCR-Zyklen (theoretischer Amplifikationsfaktor: $1,2 \times 10^{30}$) schwach mit Riechzell- und mit Hoden-cDNA amplifiziert werden. Möglicherweise werden die wenigen *TOR1* Transkripte im Hoden durch „illegitime“ Transkription (Chelly *et al.*, 1989; Chelly *et al.*, 1991) gebildet. Eine „illegitime“ Expression von Genen kann in Spermatiden auftreten. Während der Spermatogenese werden die Histone im Zellkern durch die Protamine ausgetauscht (Fuentes-Mascorro *et al.*, 2000). Die DNA ist im Zellkern mit Histonen assoziiert (Wolffe & Guschin, 2000; Ridgway & Almouzni, 2001). Die Histone wechselwirken mit regulatorischen Sequenzen von Genen. Dies verhindert, daß generelle Transkriptionsfaktoren, die in jeder Zelle konstitutiv exprimiert werden, an die regulatorischen Sequenzen binden können und die Transkription gestartet werden kann (Svaren & Hörz, 1993; Li *et al.*, 1997; Berger & Felsenfeld, 2001). Werden Histone kurzzeitig von der DNA entfernt, können die Transkriptionsfaktoren an die regulatorischen Sequenzen binden und das Gen wird transkribiert. Diese „illegitime“ Transkription von Genen wird vermutlich dadurch erleichtert, daß Spermatiden eine bis zu hundertfach höhere Menge von Proteinen des RNA-Polymerase II Transkriptionskomplexes im Vergleich zu somatischen Zellen enthalten (Schmidt & Schibler, 1995; Schmidt, 1996; Sassone-Corsi, 1997).

TOR4 und *TOR16* ließen sich nach 90 PCR-Zyklen nur mit Riechzell-cDNA amplifizieren. Die Rezeptoren *TOR5* und *TOR14* konnten nach 90 PCR-Zyklen weder mit Riechzell-cDNA noch mit Hoden-cDNA amplifiziert werden.

Die Rezeptoren *TOR4*, 5, 14, 16 konnten zwar von Vanderhaeghen *et al.* (1997b), jedoch nicht in dieser Arbeit im Mäuse-Hoden nachgewiesen werden. Da bei der Anreicherung von Poly(A)⁺ RNA geringe Mengen von genomischer DNA mit gereinigt werden, ist die aus der

RNA umgeschriebene cDNA mit genomischer DNA kontaminiert. Enthält ein Gen, das man mit PCR amplifizieren möchte, Introns, werden die Primer so gewählt, daß sie ein Intron überspannen. Dies ermöglicht es, zwischen PCR-Fragmenten zu unterscheiden, die mit genomischer DNA als Matrize amplifiziert wurden (mit Introns), und kürzeren Fragmenten (ohne Introns), die mit cDNA als Matrize amplifiziert wurden. Bei den *OR*-Genen, die keine Introns enthalten, ist diese Unterscheidung nicht möglich.

Die RNA, die zur Herstellung der cDNA verwendet wurde, wurde deshalb mit DNaseI behandelt (Vanderhaeghen *et al.*, 1997b, 30 min Behandlung, 5 U DNaseI; vorliegende Arbeit 1 h Behandlung, 5 U DNaseI). In Kontrollexperimenten mit DNaseI behandelter RNA konnte ich mit einem Kontroll-Primerpaar (β -Actin-Gen, # 2311/# 1190) kein DNA-Fragment amplifizieren. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, daß die in dieser Arbeit verwendeten cDNA's keine genomische DNA mehr enthalten. Vielleicht stammen die von Vanderhaeghen *et al.* (1997b) publizierten *OR*-Fragmente aus genomischer DNA.

4.2 Expression von *OR*-Genen im präpubertären Maus-Hoden

Die Expression von *OR*-Genen wurde bisher ausschließlich mit cDNA aus Zellen des adulten Hodens untersucht (Parmentier *et al.*, 1992; Vanderhaeghen *et al.*, 1993, 1997b; Walensky *et al.*, 1995; Asai *et al.*, 1996). *OR*-Transkripte wurden durch *in situ* Hybridisierungs-Experimente in Spermatiden (Kebekus, Dissertation, Hannover, 1998) und *OR*-Proteine immunzytochemisch in reifen Spermien (Vanderhaeghen *et al.*, 1993; Walensky *et al.*, 1995) nachgewiesen. Die *OR* sollen in reifen Spermien eine Funktion bei der Chemotaxis haben. In der vorliegenden Arbeit konnten Transkripte von *OR* nicht nur im adulten Hodengewebe, sondern bereits im Hoden von präpubertären Mäusen nachgewiesen werden. So sind *OR*-Transkripte nicht nur in Spermatiden des adulten Hodens, sondern bereits in Spermatogonien und Spermatozyten von nicht geschlechtsreifen Mäusen exprimiert. Dies bedeutet, daß einige *OR*, die im Hoden exprimiert sind, sehr wahrscheinlich keine Rolle bei der Chemotaxis von Spermien spielen. Vielmehr könnten diese *OR* im präpubertären Hoden in die Organisation des Keimzellepithels (siehe 3.1.5) und in die Entwicklung der Keimzellen (siehe 3.1.2) involviert sein.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben durch ihre Untersuchungen untermauert, daß *OR* eine Rolle bei der Entwicklung von Geweben/Organen spielen könnten. Drutel *et al.* (1995) konnten *OR*-Transkripte im embryonalen Rattenherzen nachweisen. *OR* werden ebenfalls während der embryonalen Entwicklung in Zellen des olfaktorischen Epithels von Hühnern

exprimiert (Nef *et al.*, 1996; Nef & Nef, 1997). Ein *OR* (*COR7b*) wird vorübergehend im Notochord (Mesoderm) von embryonalen Hühnern exprimiert (Nef & Nef, 1997). In Mausembryonen konnten Transkripte des Rezeptors *OR3* in Strukturen des CNS (Telencephalon) detektiert werden (Nef *et al.*, 1992).

Prozesse der Entwicklung finden nicht nur in embryonalen Geweben statt, sondern auch in adulten, regenerationsfähigen Geweben. Hierzu gehören das Hodengewebe und auch das olfaktorische Epithel. Riechzellen zählen zu den wenigen Nervenzellen, die etwa alle 60 Tage durch Teilung und Differenzierung von Vorläuferzellen (Basalzellen) ersetzt werden (Costanzo, 1991). Während dieser Differenzierung projiziert jede Riechzelle ein Axon zum olfaktorischen Bulbus. Axone von Riechzellen, die identische OR exprimieren, konvergieren auf dieselbe sekundäre Nervenzelle im olfaktorischen Bulbus (Ressler *et al.*, 1994; Vassar *et al.*, 1994; Mombaerts *et al.*, 1996). OR sind in den Riechzellen nicht nur in Zilien, sondern auch in den Axonen exprimiert. Experimentelle Befunde belegen, daß OR, die in den Axonen lokalisiert sind, eine wichtige Rolle bei der Verknüpfung der Axone mit den sekundären Nervenzellen spielen (Mombaerts *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998).

4.3 Molekularbiologische Analyse von *OR*-Genen im Hoden

Durch eine Northernblot-Analyse konnten zwei *OR* (*TOR13*, *TORS1*) identifiziert werden, die im Hoden hoch exprimiert sind. Die RNA-Sonde von Rezeptor *TOR13* erkannte in Poly (A)⁺ RNA aus Hoden ein Transkript mit einer Größe von etwa 1,7 kB. Die RNA-Sonde von Rezeptor *S1* erkannte zwei Transkripte von 1,4 kB und 1,9 kB. Der Größenunterschied der beiden verschieden langen Transkripte von *TORS1* könnte durch Transkriptions-Kontrolle z.B. durch Verwendung von zwei unterschiedlichen Promotoren zu Stande kommen. Eine Alternative wäre eine unterschiedliche Modifikation der *TORS1* Transkripte durch differentielles Spleißen (Zur Übersicht: Walker *et al.*, 1999). Es gibt Hinweise, daß *OR*-Transkripte von unterschiedlichen Promotoren gebildet werden können (Asai *et al.*, 1996). Zudem können *OR*-Transkripte gespleißt werden (Asai *et al.*, 1996; Walensky *et al.*, 1998). Es liegt die Vermutung nahe, daß verschieden große *TORS1* Transkripte im Hoden ebenfalls durch transkriptionale bzw. posttranskriptionale Modifikationen entstehen.

Die *TOR13*-Transkripte wurden im adulten Hoden *in situ* in Spermatogonien und Spermatozyten lokalisiert (3.1.5). In präpubertären Hoden konnten keine Transkripte von *TOR13* nachgewiesen werden, obwohl beide Zelltypen vorkommen (siehe 3.1.2). Spermatogonien und Spermatozyten zeigen somit während der Entwicklung des Hodens ein

unterschiedliches *TOR13*-Expressionsmuster: *TOR13* wird nur in Zellen des adulten Hodens exprimiert.

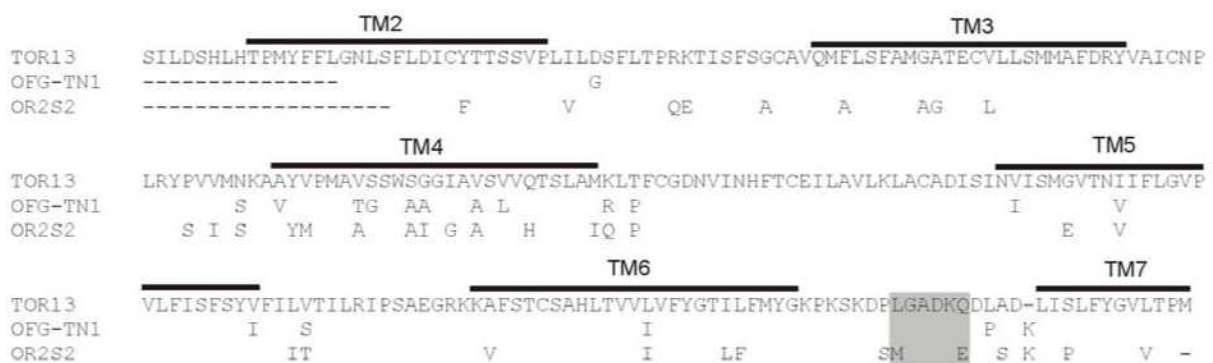


Abb. 37: Vergleich von Partialsequenzen des TOR13 Proteins aus Maus, Ratte und Mensch.

Es ist ungewöhnlich, daß ein *OR*-Gen in der Maus ein Pseudogen darstellt und im Menschen nicht. Der Anteil von Pseudogenen im menschlichen „*OR*-Subgenom“ ist mit 40 – 75 % (Buettner *et al.*, 1998; Rouquier *et al.*, 1998; Lapidot *et al.*, 2001) deutlich höher als in der Maus mit ~ 7 – 30 % (Xie *et al.*, 2000; Lapidot *et al.*, 2001). Auffällig ist, daß im *TOR13*-Gen nur eine Mutation vorliegt, da sich in vielen Fällen in inaktivierten Genen Mutationen aufgrund des fehlenden Selektionsdrucks anhäufen. Ob *TOR13* wirklich ein Pseudogen ist, kann nicht abschließend gesagt werden. Pseudogene lassen sich in zwei Klassen einteilen. Bei Genen, deren regulatorische Elemente durch Mutationen inaktiviert wurden, lassen sich keine Transkripte mehr nachweisen. Da Transkripte von *TOR13* nachgewiesen werden konnten, sind die regulatorischen Elemente des Gens intakt. Die zweite Klasse umfaßt Gene, deren kodierende Region Mutationen angesammelt hat. Durch die Mutation in *TOR13* bricht die Translation vorzeitig ab. Dem Protein fehlen das 7. transmembranale Segment und der C-Terminus. Die Membrantopologie des Rezeptors sollte durch die Mutation nicht beeinflusst werden. Möglicherweise koppelt dieser verkürzte Rezeptor im Hoden nicht an G-Proteine, sondern an andere Wechselwirkungspartner (Hall *et al.*, 1999; Heuss & Gerber, 2000; siehe auch 4.4).

4.4 An welchen Signalweg koppeln OR in reifen Spermien?

Der cAMP-vermittelte Signalweg bestehend aus Duftstoffrezeptoren, G_{olf} und Adenylylzyklase III scheint ein konservierter Signalweg zu sein. So wird postuliert, daß OR, G_{olf} und ACIII außer in Riechzellen auch im embryonalen Rattenherzen (Ferrand *et al.*, 1999) und im Säugetier-Hoden einen funktionellen Signalweg bilden (Defer *et al.*, 1998). Stimulatorische G-Proteine (G_{α_s} , $G_{\alpha_{olf}}$) konnten im Hoden durch ADP-Ribosylierung mit Cholera-Toxin bisher nicht nachgewiesen werden (Hildebrandt *et al.*, 1985; Bentley *et al.*, 1986; Kopf *et al.*, 1986). Ich konnte mit cDNA aus Spermien-Vorläuferzellen die kodierende Region des $G_{\alpha_{olf}}$ -Transkriptes amplifizieren. Das $G_{\alpha_{olf}}$ -Protein konnte durch Westernblot-Experimente in Hoden- und Spermienproteinen nachgewiesen werden. Durch immunhistochemische Experimente konnte $G_{\alpha_{olf}}$ im akrosomalen Bereich von Spermien lokalisiert werden.

Es wurden widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Expression der ACIII im Hoden publiziert. Während Defer *et al.* (1998) mit einem ACIII spezifischen Antikörper (C20) ein 130 kDa Protein nachwies, besitzt das von Gautier-Courteille *et al.* (1998) mit dem gleichen Antikörper nachgewiesene Protein eine Molmasse von 170 kDa. Entgegen den

Ergebnissen dieser Arbeitsgruppen konnte ich mit dem Antikörper C20 in Hodenproteinen weder ein Protein mit 130 kDa noch ein Protein mit 170 kDa detektieren. Auch in Spermien wurde von dem Antikörper C20 kein Protein mit der Molmasse der ACIII erkannt. Weder G_{olf} noch die ACIII sind somit in den Flagellen exprimiert, in denen OR lokalisiert wurden (Vanderhaeghen *et al.*, 1993; Walensky *et al.*, 1995). G_{olf} und die ACIII scheiden demnach als Wechselwirkungspartner für OR in Spermien aus.

Ein weiteres stimulatorisches G-Protein, $G_{\alpha s}$, konnte bisher nur von einer Arbeitsgruppe durch Westernblot-Experimente in Spermien nachgewiesen werden (Fraser & Adeoya-Osiguwa, 1999). Allerdings konnten verschiedene andere Arbeitsgruppen das $G_{\alpha s}$ -Protein in Spermien durch Westernblot-Experimente nicht nachweisen (Hinsch *et al.*, 1992; Merlet *et al.*, 1999).

In heterologen Expressionssystemen wurde gezeigt, daß ein Duftstoff ein Ca^{2+} -Signal erzeugen kann, das durch Mitglieder der $G_{q/11}$ -Familie vermittelt wird (Krautwurst *et al.*, 1998; Wetzell *et al.*, 2001). In Spermien konnten G-Proteine der $G_{q/11}$ Klasse durch Westernblot- und immunzytochemische Experimente detektiert werden (Merlet *et al.*, 1999). $G_{q/11}$ ist allerdings im äquatorialen Bereich des Akrosoms im Spermium lokalisiert (Merlet *et al.*, 1999). Dort ist $G_{q/11}$ sehr wahrscheinlich an einem IP_3 -vermittelten Ca^{2+} -Einstrom beteiligt (Walensky & Snyder, 1995). $G_{q/11}$ scheidet somit als Wechselwirkungspartner für OR in Spermien ebenfalls aus.

Studien an Riechzellen deuten an, daß OR auch mit Mitgliedern der $G_{i/o}$ -Familie wechselwirken können (Boekhoff *et al.*, 1990; Schandar *et al.*, 1998). G_i -Proteine konnten in Spermien durch Pertussis Toxin-vermittelte ADP-Ribosylierung (Bentley *et al.*, 1986; Kopf *et al.*, 1986; Glassner *et al.*, 1991) und durch Westernblot-Experimente (Hinsch *et al.*, 1992; Merlet *et al.*, 1999) detektiert werden. G_i -Proteine sind im Kopf und in den Flagellen von Spermien lokalisiert (Glassner *et al.*, 1991; Merlet *et al.*, 1999). OR könnten in Flagellen von Spermien an G_i koppeln. G_i -Proteine inhibieren verschiedene Typen von Adenylzyklasen (zur Übersicht: Defer *et al.*, 2000). Diese wiederum regulieren die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Durch eine Änderung der cAMP-Konzentration könnte die Aktivität der PKA in Spermienflagellen (Horowitz *et al.*, 1984) kontrolliert werden.

Als Wechselwirkungspartner für G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) wurden außer G-Proteinen verschiedene andere Signaltransduktionskomponenten beschrieben (zur Übersicht: Hall *et al.*, 1999; Bockaert & Pin, 1999). So können kleine G-Proteine wie z.B. Rho direkt durch GPCR aktiviert werden. Rho-Proteine wurden in Invertebraten-Spermien (Castellano *et al.*, 1997) und in Säugetier-Spermien (Hinsch *et al.*, 1993) nachgewiesen. Rho-Proteine sind

an der Regulation der Spermienmotilität beteiligt (Hinsch *et al.*, 1993). Entscheidend für die Interaktion des G-Proteins mit dem Rezeptor ist das Peptid NPXXY in der 7. transmembranalen Domäne der GPCR (Mitchell *et al.*, 1998). Diese Peptidsequenz kommt in der 7. transmembranalen Domäne von TORS1 - wie auch von vielen weiteren OR (Fuchs *et al.*, 2001) - vor (siehe Abb. 22, 3.1.6.1.4). Somit wäre nach diesem Kriterium für TORS1 eine Interaktion mit Rho vorstellbar.

4.5 Sind OR Chemorezeptoren in reifen Spermien?

OR wurden immunzytochemisch in Flagellen von Säugetier-Spermien lokalisiert (Vanderhaeghen *et al.*, 1993; Walensky *et al.*, 1995). Alle im Maus-Hoden exprimierten OR sind zumindest auch im olfaktorischen Epithel exprimiert (siehe 3.1.1 – 3.1.3.2). Es stellt sich die Frage, ob ein OR in zwei verschiedenen Geweben unterschiedliche Liganden binden kann?

OR binden im olfaktorischen Epithel Duftstoffe (Krautwurst *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 1998; Touhara *et al.*, 1999; Malnic *et al.*, 1999). Duftstoffe sind kleine, organische Moleküle, die überwiegend hydrophob und schlecht wasserlöslich sind. Sie haben eine Molmasse von weniger als 400 Da, was etwa einer Molmasse von drei Aminosäuren entspricht. Ein OR kann verschiedene Duftstoffe binden, da OR sowohl unterschiedliche funktionelle Gruppen als auch Änderungen im Kohlenstoffgerüst des Liganden tolerieren (Malnic *et al.*, 1999; Araneda *et al.*, 2000; Kaluza & Breer, 2000; Kajiya *et al.*, 2001; Wetzel *et al.*, 2001).

Das chemotaktisch wirksame Peptid Resact der Seeigelart *Arbacia punctulata* (Ward *et al.*, 1985) besteht aus 14 Aminosäuren mit einer Molmasse von ~ 1,8 kDa. Dieses Peptid besitzt im Vergleich zu Duftstoffen (Beets, 1970; Malnic *et al.*, 1999; Wetzel *et al.*, 2001) eine deutlich größere Molmasse. Resact hat zudem andere physikochemische Eigenschaften als die „klassischen“ Duftstoffe. Es löst sich z.B. gut in wässrigen Lösungen. Versuche zur Charakterisierung der chemotaktisch wirksamen Substanz in der menschlichen Follikelflüssigkeit deuten darauf hin, daß es sich ebenfalls um ein Peptid handelt (Manor, 1994, Phd Thesis; Ralt *et al.*, 1994). Da die Eibefruchtung in einem wässrigen Milieu stattfindet, ist anzunehmen, daß die chemotaktisch wirksame Substanz wasserlöslich ist.

Es ist unwahrscheinlich, daß ein OR in Riechzellen eine kleine, hydrophobe Substanz (Duftstoff) bindet, während der identische OR in Spermien eine größere, hydrophile Substanz (Peptid) binden soll.

4.6 cGMP: Botenstoff einer chemosensorischen Signalkette in Säugetier-Spermien?

In Säugetier-Spermien sind die Membranrezeptoren, die chemotaktische Substanzen binden, unbekannt. Nicht identifiziert ist bisher auch der intrazelluläre Botenstoff der chemotaktischen Signalkette.

Bei Invertebraten-Spermien ist cGMP der Botenstoff der chemotaktischen Signalkette. Eine membranständige Guanylylzyklase (tmGC's, Garbers, 1999; Gibson & Garbers 2000) stellt in der Seeigelart *Arbacia punctulata* den Rezeptor für das chemotaktisch wirksame Peptid Resact dar (Ward *et al.*, 1985; Shimomura *et al.*, 1986).

Im Nematoden *Caenorhabditis elegans* konnten insgesamt 26 tmGC's identifiziert werden (Yu *et al.*, 1997). Viele dieser tmGC's sind in chemosensorischen Neuronen von *C. elegans* lokalisiert (Yu *et al.*, 1997; Birnby *et al.*, 2000). Nematoden, in denen das Gen *daf 11* mutiert ist, zeigen Defekte bei der Wahrnehmung von flüchtigen (Duftstoffen) und nicht flüchtigen Chemikalien (Vowels & Thomas, 1994). Das Gen *daf 11* kodiert für eine tmGC (Birnby *et al.*, 2000).

Aus dem Riechepithel der Ratte wurde eine tmGC kloniert (GC-D, Fülle *et al.*, 1995), die in einer Subpopulation von Riechzellen der Ratte und der Maus (Juilfs *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2000) exprimiert ist. Man vermutet, daß die GC-D Pheromone erkennt (Juilfs *et al.*, 1997). Ein Ligand konnte bisher allerdings nicht identifiziert werden. Die cDNA der Maus-GC-D wurde bislang nicht kloniert.

Mit Hilfe von PCR-Versuchen konnte die intrazelluläre Domäne der GC-D aus Hoden-cDNA der Maus amplifiziert werden. Der klonierte Bereich umfaßt die in tmGC's hoch konservierte Kinase-Homologie-Domäne und die katalytische-Domäne. Die extrazelluläre-Domäne der GC-D konnte nicht amplifiziert werden. Möglicherweise ist dies auf Sekundärstrukturen in der mRNA zurückzuführen, die eine korrekte reverse Transkription des 5'-Bereiches des Transkriptes verhinderten. Ebenfalls denkbar wäre, daß im Hoden eine Spleißvariante der GC-D exprimiert wird. Der N-Terminus dieser Spleißvariante könnte von hodenspezifischen Exons kodiert werden. Da Liganden durch den extrazellulären N-Terminus gebunden werden (van den Akker, 2001), könnte die GC-D im Hoden andere Ligandenbindungs-Eigenschaften als die GC-D in Riechzellen besitzen.

Mit dem Antikörper I055 (gerichtet gegen ein Peptid aus der intrazellulären Domäne) konnte die GC-D im *principal piece* von Flagellen lokalisiert werden. Das *mid piece* der Flagellen wurde von dem Antikörper nicht gefärbt. Im *principal piece* von Maus-Spermien sind

ebenfalls die Ionenkanal-Untereinheiten CatSper und CatSper2 lokalisiert (Ren *et al.*, 2001; Quill *et al.*, 2001).

Es liegen einige Daten vor, die auf einen cGMP-vermittelten Signalweg in Säugetier-Spermien hindeuten. Das Atrial-Natriuretic-Peptide (ANP) löst die Akrosomreaktion und ein chemotaktisches Verhalten von Säugetier-Spermien aus (Anderson *et al.*, 1994, 1995; Zamir *et al.*, 1993, 1995). Der ANP-Rezeptor, die Guanylylzyklase A (Chinkers *et al.*, 1989), konnte in den Flagellen von menschlichen Spermien lokalisiert werden (Silvestroni *et al.*, 1992). Inkubiert man Spermien mit ANP, steigt die cGMP-Konzentration an (Anderson *et al.*, 1995; Zamir *et al.*, 1995). Die Akrosomreaktion kann auch durch membrangängige cGMP-Analoga, wie z.B. 8-Br-cGMP, ausgelöst werden (Santos-Sacchi & Gordon, 1980; Zamir *et al.*, 1995). Membrangängige cGMP-Analoga lösen einen Ca^{2+} -Einstrom im Kopf und den Flagellen von Säugetier-Spermien aus (Wiesner *et al.*, 1998; Kobori *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2001). Sowohl die Akrosomreaktion als auch die Chemotaxis von Invertebraten-Spermien werden durch einen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen reguliert (Santos-Sacchi & Gordon, 1980; Ward *et al.*, 1985; Zamir *et al.*, 1995; Guraya, 2000).

In den Flagellen von Säugetier-Spermien sind Untereinheiten von Ionenkanälen exprimiert, deren Aktivität durch cGMP reguliert wird. So konnten vor kurzem in Flagellen von Mäuse-Spermien die Ionenkanal-Untereinheiten CatSper (Ren *et al.*, 2001) und CatSper2 (Quill *et al.*, 2001) lokalisiert werden. Diese haben eine große Ähnlichkeit zu einer einzelnen Domäne von spannungsaktivierten Ca^{2+} -Kanälen. Membrangängige Analoga von cGMP und cAMP können in Mäusen, denen die CatSper Kanaluntereinheit fehlt, keinen Ca^{2+} -Einstrom mehr auslösen. Die Spermien der *knock-out* Mäuse besitzen eine reduzierte Motilität und die Mäuse sind infertil (Ren *et al.*, 2001). CatSper und CatSper2 selbst besitzen keine Bindestelle für zyklische Nukleotide; vielleicht sind CatSper und CatSper2 Untereinheiten eines noch unbekannten zyklisch-Nukleotid-regulierten Ca^{2+} -Kanals.

In einer Subpopulation von Nager-Riechzellen sind, neben der GC-D (siehe oben), cGMP-gesteuerte Ionenkanäle exprimiert (Meyer *et al.*, 2000). Der cGMP-gesteuerte Kanal stellt das Ortholog zu einem Ionenkanal (CNGA3) dar, der aus Rinder-Hoden kloniert wurde (Weyand *et al.*, 1994) und in den Flagellen von Rinder-Spermien lokalisiert ist (Wiesner *et al.*, 1998). Durch PCR-Experimente mit Maus-cDNA aus Spermien-Vorläuferzellen konnten zwei Spleißvarianten der CNGA3-Untereinheit amplifiziert werden. Zusätzlich konnten durch PCR-Experimente Transkripte einer modulatorischen β -Untereinheit (CNGB3) identifiziert werden.

Falls die GC-D der Rezeptor für chemotaktische Faktoren in Maus-Spermien darstellt, würde die Aktivierung der GC zu einer Erhöhung der cGMP-Konzentration führen. Hierdurch könnten cGMP-regulierte Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran der Spermien geöffnet werden und Ca^{2+} -Ionen in die Zelle einströmen. Durch die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration könnte das Schwimmverhalten der Spermien reguliert werden.

4.7 Ausblick

4.7.1 Duftstoffrezeptor *knock out*

Das Gen des Rezeptors TORS1 wäre für einen konditionalen *knock-out* geeignet. Es müssen allerdings zuvor weitere Kenntnisse über die Expression des Rezeptor-Gens erlangt werden. Die Lokalisierung der Transkripte *in situ* ist eine essentielle Vorbedingung für die Strategie eines *knock-out* Versuchs. Mit Hilfe der *in situ* Daten kann ein geeigneter Promoter für die CRE-Rekombinase gewählt werden, der zeitlich vor dem Promoter des *TORS1* Gens aktiviert wird. Ebenfalls müßte ein receptorspezifischer Antikörper erzeugt werden. Mit diesem Antikörper kann man zum einen den Rezeptor in Wildtyp Mäusen lokalisieren. Des weiteren muß mit diesem Antikörper an *knock-out* Mäusen der Beweis erbracht werden, daß das Rezeptorprotein nicht mehr exprimiert wird.

4.7.2 cGMP-vermittelter Signalweg

Die extrazelluläre-Domäne der GC-D konnte durch PCR-Experimente nicht amplifiziert werden. Man könnte diesen Bereich der cDNA isolieren, indem man eine Hoden/Keimzell-cDNA Bibliothek durchsucht. Durch die Klonierung der GC-D kann untersucht werden, ob im Hoden eine Spleißvariante der GC-D exprimiert ist. Mit Hilfe der vollständigen cDNA-Sequenz kann die GC-D heterolog exprimiert werden. Das heterolog exprimierte Enzym kann funktionell charakterisiert werden. Bislang ist für die GC-D kein Ligand identifiziert worden. Potentielle Quellen für Faktoren, die chemotaktisch auf Säugetier-Spermien wirken, stellen z.B. die Oviduktflüssigkeit und die Follikelflüssigkeit dar. Es könnte untersucht werden, ob die GC-D mit den genannten Flüssigkeiten aktiviert werden kann. Durch Fraktionierung dieser Flüssigkeiten ließe sich möglicherweise der chemotaktisch wirksame Faktor isolieren.

5.1 Zusammenfassung

Die Chemotaxis von Invertebraten-Spermien ist gut dokumentiert (Morisawa, 1994). Das chemotaktisch wirkende Eizellpeptid Resact der Seeigelart *Arbacia punctulata* bindet an eine membranständige Rezeptor-Guanylylzyklase (Ward *et al.*, 1985; Shimomura *et al.*, 1986). Säugetier-Spermien reagieren chemotaktisch auf Substanzen, die von der Eizelle selbst und/oder vom weiblichen Genitaltrakt stammen (Eisenbach & Tur-Kaspa, 1999). Bislang konnten jedoch weder die chemotaktisch wirksamen Substanzen noch die entsprechenden membranständigen Rezeptoren identifiziert werden. Derzeitige Hypothesen über die chemotaktische Signalkette orientieren sich an den Signalwegen zur Wahrnehmung von Duftstoffen in Riechzellen. Demnach könnten Duftstoffrezeptoren (OR) oder die membranständige Guanylylzyklase-D eine Rolle bei der Chemotaxis von Säugetier-Spermien spielen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden 12 verschiedene putative OR durch RT-PCR in Keimzellen von männlichen Mäusen identifiziert. Vier OR wurden vollständig kloniert. Die 12 OR stammen aus 10 verschiedenen Subfamilien. Dies bedeutet, daß die im Hoden exprimierten OR keine eigene Subfamilie von hodenspezifischen OR bilden. Mit Ausnahme von TOR8, der zur Klasse I (Fisch-ähnliche) der OR zu rechnen ist, gehören die anderen OR der Klasse II (Säugetier-ähnliche) an. Alle untersuchten OR sind auch in Riechzellen exprimiert. 6 OR sind darüber hinaus auch in verschiedenen weiteren Geweben (z.B. Gehirn, Herz) nachweisbar. Für die meisten der untersuchten OR konnten Transkripte bereits im präpubertären Hoden nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, daß OR nicht nur eine Funktion in reifen Spermien haben könnten, sondern bereits während der Entwicklung bzw. der Organisation des Keimzellepithels.

Durch Northernblot-Experimente konnte nachgewiesen werden, daß zwei OR, TOR13 und TORS1, höher exprimiert sind als die anderen OR. Transkripte von TOR13 konnten durch *in situ* Hybridisierung in Spermatogonien und Spermatozyten lokalisiert werden. Die Klonierung von TOR13 und TORS1 zeigte, daß es sich bei TOR13 um einen C-terminal verkürzten OR handelt. Es ist unbekannt, ob ein OR, dem die 7. transmembranale Domäne und der C-Terminus fehlen, funktionell ist. Aus diesem Grund wurde nur TORS1 charakterisiert. Eine Southernblot-Analyse von genomischer DNA zeigte, daß TORS1 das einzige Gen einer neuen Subfamilie darstellt. TORS1 ist auf Chromosom 11 lokalisiert. Das TORS1-Gen ließ sich nicht funktionell heterolog exprimieren, obwohl das Rezeptorprotein in den Wirtszellen synthetisiert und auch posttranslational modifiziert wurde. Mit TORS1 konnte ein OR-Gen identifiziert werden, das für einen konditionalen Gen *knock-out* geeignet

wäre. Mit einem Gen *knock-out* könnte man vielleicht Hinweise auf die physiologische Funktion der OR in Spermien erhalten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde $G_{\alpha olf}$, der Wechselwirkungspartner von OR in Riechzellen, aus Hoden-cDNA kloniert. Durch Westernblot-Experimente konnte $G_{\alpha olf}$ in Spermien detektiert werden. Immunhistochemische-Versuche zeigten, daß $G_{\alpha olf}$ im akrosomalen Bereich der Spermien lokalisiert ist. Die Adenylylzyklase III, der Effektor von $G_{\alpha olf}$ in Riechzellen, ließ sich durch Westernblot-Analyse nicht in Spermien nachweisen. Dies bedeutet, daß OR in Spermien nicht, wie in Riechzellen, über $G_{\alpha olf}$ die ACIII aktivieren können. Die OR müssen in Spermien einen anderen Signalweg aktivieren.

Im dritten Teil wurde schließlich untersucht, ob eine membranständige Rezeptor-Guanylylzyklase und ein cGMP-gesteuerter Ionenkanal (CNG-Kanal) in Maus-Spermien exprimiert sind. Eine cGMP-vermittelte Signalkaskade könnte - ähnlich wie in Seeigelspermien - das chemotaktische Verhalten regulieren. Mit Hilfe von RT-PCR konnten aus Keimzellen-cDNA Transkripte der Guanylylzyklase-D amplifiziert werden. Ebenfalls konnten Transkripte der α -Untereinheit mCNGA3 und der modulatorischen β -Untereinheit mCNGB3 nachgewiesen werden. In immunhistochemischen Experimenten wurde die GC-D in den Flagellen der Spermien lokalisiert. Die GC-D und der CNG-Kanal könnten Bestandteile eines cGMP-Signalwegs sein, der das Schwimmverhalten von Säugetier-Spermien reguliert.

5.2 Abstract

Chemotaxis of sperm is well established in marine invertebrates, such as sea urchin (Morisawa, 1994). The chemotactic egg-derived peptide resact of the sea urchin *Arbacia punctulata* binds to a membrane-bound receptor-guanylyl cyclase. Mammalian sperm show chemotactic behaviour in response to factors released by the egg itself and/or the female reproductive tract. Neither the chemotactic factors nor the respective membrane receptors of sperm have been identified. Current hypotheses on the chemotactic signaling pathways rely on models for odorant sensation in olfactory sensory neurons (OSN). Thus, G-protein coupled odorant receptors (OR) or the receptor guanylyl cyclase-D might play a role in chemotaxis of mammalian sperm.

In the first part of this PhD Thesis, 12 different putative OR have been identified by RT-PCR in germ cells of male mice. Four complete OR genes were cloned from genomic DNA. The twelve amplified ORs are members of ten subfamilies revealing that testicular ORs do not constitute a specific subfamily. Except for TOR8 that belongs to class I OR (fish-like), the other receptors are members of class II OR (mammalian-like). All ORs are also expressed in OSN. Furthermore 6 ORs are expressed in additional tissues (i.e. heart, brain). Most ORs are already expressed in the prepubertal testis. This finding points out that – in addition to a functional role in mature sperm – ORs may be involved in the development and organization of the germ cell epithelium.

Northernblot experiments revealed that two ORs (TOR13 and TORS1) are more abundantly expressed than the other ORs. By *in situ* hybridization-experiments transcripts of TOR13 were localized to spermatogonia and spermatocytes. Cloning of the TOR13 and TORS1 genes showed that the TOR13 gene codes for a C-terminal truncated receptor protein. Because it is unknown whether an OR lacking the seventh transmembrane domain and the C-terminus is functional, only the TORS1 gene was further characterized. Southernblot analysis revealed that TORS1 is the only gene of a new cluster. The gene could be assigned to chromosome 11. TORS1 could not be functionally expressed in a heterologous system although the receptor protein was synthesized and posttranslationally modified in the host cells. In conclusion, TORS1 is a candidate for a conditional gene *knock-out*. This approach might provide a deeper insight into the function of ORs in sperm cells.

In the second part, $G_{\alpha_{olf}}$, the interaction partner of OR in OSN, has been cloned from testicular cDNA. By Westernblot experiments, $G_{\alpha_{olf}}$ could be detected in sperm. $G_{\alpha_{olf}}$ was immunohistochemically localized to the acrosomal part of the head. Adenylyl cyclase III (ACIII), the effector of $G_{\alpha_{olf}}$ in OSN, could not be detected in sperm by Westernblot

experiments. Thus unlike in OSN, OR in sperm do not activate ACIII by means of $G_{\alpha olf}$. Consequently, in sperm ORs must participate in a different signaling cascade.

In the third part, I investigated whether a receptor GC and a cGMP-regulated ion channel (CNG-channel) are expressed in sperm. A signaling cascade comprising a receptor GC could be involved in chemotaxis such as in sea urchin sperm. Transcripts of the GC-D could be identified in cDNA of sperm precursor cells. The ion channel α -subunit mCNGA3 und the modulatory β -subunit mCNGB3 have been also amplified from germ cell cDNA. In immunohistochemical experiments, the GC-D was localized to the *principal piece* of the sperm tail. Thus, it is tempting to speculate that the GC-D and the CNG ion channel are components of a signaling pathway that regulates the swimming behaviour of mammalian sperm cells.

6 Literatur

- ADAMUS, G., ARENDT, A., ZAM, Z.S., MCDOWELL, J.H., HARGRAVE, P.A., (1988). Use of Peptides to Select for Anti-Rhodopsin Antibodies with the Desired Amino Acid Sequence Specificities. *Peptide Research* 1 (1), 42-47.
- AIZAWA, K., AKAHIRA, S., AKIMURA, T., ARAI, A., ARAKAWA, T., CARNINCI, P., HANAGAKI, T., HAYATSU, N., HIRAOKA, T., HIROZANE, T., HODOYAMA, Y., IMOTANI, K., ISHII, Y., ITOH, M., IZAWA, M., KAWAI, J., KOJIMA, Y., KONNO, H., KUSAKABE, M., MATSUYAMA, T., MIYAZAKI, A., NAKAMURA, M., NISHI, K., NOMURA, K., NUMAZAKI, R., OKAZAKI, Y., OKIDO, T., OWA, C., SAKAI, C., SAKAI, K., SASAKI, D., SATO, K., SHIBATA, K., SHIBATA, Y., SHINAGAWA, A., SHIRAKI, T., SOGABE, Y., SUZUKI, H., TAGAWA, A., TAKAHASHI, F., TANAKA, T., TOYA, T., WATAHIKI, A., YAMAMURA, T., YASUNISHI, A., YOSHIDA, K., YOSHIKI, A., MURAMATSU, M., HAYASHIZAKI, Y., (2000). RIKEN Mouse ESTs (Aizawa, K. *et al.* 2000). Unpublished
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z. *ET AL.*, (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nukl. Acids Res* 25, 3389-3402.
- ANDERSON, R.A., FEATHERGILL, K.A., DRISDEL, R.C., RAWLINS, R.G., MACK, S.R., ZANEVELD, L.J.D., (1994). Atrial Natriuretic Peptide (ANP) as a Stimulus of the Human Acrosome Reaction and a Component of Ovarian Follicular Fluid: Correlation of Follicular ANP Content with *In Vitro* Fertilization Outcome. *J. Androl.* 15(1), 61-68.
- ANDERSON, R.A., FEATHERGILL, K.A., RAWLINS, R.G., MARCK, S.R., ZANEVELD, L.J.D., (1995). Atrial natriuretic peptide: a chemoattractant of human spermatozoa by a guanylate cyclase pathway. *Mol. Reprod. Dev.* 40, 371-378.
- ARANEDA, R.C., KINI, A.D., FIRESTEIN, S., (2000). The molecular receptive range of an odorant receptor. *Nature Neurosci.* 3(12), 1248-1255.
- ASAI, H., KASAI, H., MATSUDA, Y., YAMAZAKI, N., NAGAWA, F., SAKANO, H., TSUBOI, A., (1996). Genomic Structure and Transcription of a Murine Odorant Receptor Gene: Differential Initiation of Transcription in the Olfactory and Testicular Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221, 240-247.
- AUSTIN, C.R., SHORT, R.V., (1982). *Reproduction in mammals* (second edition). Book 1: Germ cells and fertilization. Cambridge University Press ISBN 0-521-28861-4.
- AVIV, H.; LEDER, P., (1972). Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 1408-1412.
- BABCOCK, D.F., BOSMA, M.M., BATTAGLIA, D.E., DARSZON, A., (1992). Early persistent activation of sperm K^+ channels by the egg peptide speract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6001-6005.
- BAKALYAR, H.A. & REED, R.R., (1990). Identification of a Specialized Adenylyl Cyclase That May Mediate Odorant Detection. *Science* 250, 1403-1406.
- BELLUSCIO, L., GOLD, G.H., NEMES, A., AXEL, R., (1998). Mice deficient in G_{olf} are anosmic. *Neuron* 20, 69-81.
- BELLVE, A.R., MILLETTE, C.F., BHATNAGAR, Y.M., O'BRIEN, D.A., (1977). Dissociation of the mouse testis and characterization of isolated spermatogenic cells. *J. Histochem. Cytochem.* 25 (7):480-494
- BELTRAN, C., ZAPATA, O., DARSZON, A., (1996). Membrane Potential Regulates Sea Urchin Sperm Adenylyl cyclase. *Biochemistry* 35, 7591-7598.

- BEN-ARIE, N., LANCET, D., TAYLOR, C., KHEN, M., WALKER, N., LEDBETTER, D.H., CARROZZO, R., PATEL, K., SHEER, D., LEHRACH, H., NORTH, M.A., (1994). Olfactory gene cluster on human chromosome 17: possible duplication of an ancestral receptor repertoire. *Hum. Mol. Genet.* 3, 229-235.
- BENTLEY, J.K., GARBERS, D.L., DOMINO, S.E., NOLAND, T.D., VAN DOP, C., (1986). Spermatozoa contain a guanine nucleotide-binding protein ADP-ribosylated by pertussis toxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138, 728-734.
- BENTON, W.D. & DAVIS, R.W., (1977). Screening λ -gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* 196, 180-182.
- BERGER, S.L., FELSENFELD, G., (2001). Chromatin Goes Global. *Molecular Cell* 8, 263-268.
- BEETS, M.G.J., (1970). The Molecular Parameters Of Olfactory Response. *Pharm. Reviews* 22(1), 1-40.
- BIRNBOIM, H.C., DOLY, J., (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523.
- BIRNBY, D.A., MALONE LINK, E., VOWELS, J.J., TIAN, H., COLACURCIO, P.L., THOMAS, J.H., (2000). A Transmembrane Guanylyl Cyclase (DAF-11) and Hsp90 (DAF-21) Regulate a Common Set of Chemosensory Behaviors in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 155: 85-104.
- BOCKAERT, J., PIN, J.P., (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 18 (7), 1723-1729.
- BOEKHOFF, I., TAREILUS, E., STROTMANN, J., BREER, H., (1990). Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants. *EMBO J.* 9 (8), 2453-2458.
- BOEHNKE, M., LANGE, K., COX, D.R., (1991). Statistical methods for multipoint radiation hybrid mapping. *Am J Hum Genet.* 49(6):1174-88.
- BONALDO, M.F., LENNON, G., SOARES, M.B., (1996) Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery. *Genome Res.* 6 (9): 791-806.
- BÖNIGK, W., ALTENHOFEN, W., MÜLLER, F., DOSE, A., ILLING, M., MOLDAY, R.S. & KAUPP, U.B., (1993). Rod and cone photoreceptor cells express distinct genes for cGMP-gated channels. *Neuron* 10, 865-877.
- BÖNIGK, W., BRADLEY, J., MÜLLER, F., SESTI, F., BOEKHOFF, I., RONNET, G., KAUPP, U.B. & FRINGS, S., (1999). The native rat olfactory cyclic nucleotide-gated channel is composed of three distinct subunits. *J. Neurosci.*, 19 (13):5332-47.
- BÖNIGK, W., MÜLLER, F., MIDDENDORFF, R., WEYAND, I. & KAUPP, U.B., (1996). Alternatively spliced forms of the cGMP-gated channel α -subunit from photoreceptor are expressed in the chick pineal organ. *J. Neurosci.* 16, 7458-7468.
- BOUIN, P., (1897). Etudes sur l'évolution normale et l'involution du séminifère. *A. Anat. Micr.* 1, 225-339.
- BRADFORD, M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254.
- BRANSCOMB, A., SEGER, J., WHITE, R.L., (2000). Evolution of Odorant Receptors Expressed in the Mammalian Testes. *Genetics* 156: 785-797.
- BREER, H., KLEMM, T., BOEKHOFF, I., (1992). Nitric oxide mediated formation of cyclic GMP in the olfactory system. *Neuroreport* 3 (11), 1030-1032.
- BROKAW C.H.J. (1991). Calcium Sensors in Sea Urchin Sperm Flagella. *Cell Mot. Cytosk.* 18:123-130.
- BUCK, J., SINCLAIR, M.L., SCHAPAL, L., CANN, M.J., LEVIN, L.R., (1999). Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 79-84.

- BUCK, LB., (1992). The olfactory multigene family. *Curr. Biol.*, 2467-473.
- BUCK, LB. & AXEL, R., (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65, 175-187.
- BUETTNER, J.A., GLUSMAN, G., BEN-ARIE, N., RAMOS, P., LANCET, D., EVANS, G.E., (1998). Organization and Evolution of Olfactory Receptor Genes on Human Chromosome 11. *Genomics* 53, 56-68.
- BULLOCK, W.O., FERNANDEZ, J.M. & SHORT, J.M., (1987). X11-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-378.
- BURTON, K.A., TREASH-OSIO, B., MULLER, C.H., DUNPHY, E.L., MCKNIGHT, G.S., (1999). Deletion of Type II α Regulatory Subunit Delocalizes Protein Kinase A in Mouse Sperm without Affecting Motility or Fertilization. *J. Biol. Chem.* 274, 24131-24136.
- CARMEL, L., HAREL, D., LANCET, D., (2001). Estimating the size of the olfactory repertoire. *Bull Math Biol.* 63 (6):1063-78.
- CARNINCI, P., HAYASHIZAKI, Y., (1999). High-efficiency full-length cDNA cloning. *Meth. Enzymol.* 303, 19-44.
- CARNINCI, P., SHIBATA, Y., HAYATSU, N., SUGAHARA, Y., SHIBATA, K., ITOH, M., KONNO, H., OKAZAKI, Y., MURAMATSU, M., HAYASHIZAKI, Y., (2000). Normalization and subtraction of cap-trapper-selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes. *Genome Res.* 10 (10), 1617-1630.
- CASTELLANO, L.E., MARTINEZ-CADENA, G., LOPEZ-GODINEZ, J., OBREGON, A., GARCIA-SOTO, J., (1997). Subcellular localization of the GTP-binding protein Rho in the sea urchin sperm. *Eur. J. Cell Biol.* 74, 329-335.
- CHELLY, J., CONCORDET, J.P., KAPLAN, J., KAHN, A., (1989). Illegitimate transcription: Transcription of any gene in any cell type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2617-2621.
- CHELLY, J., HUGNOT, J.P., CONCORDET, J.P., KAPLAN, J., KAHN, A., (1991). Illegitimate (or ectopic) transcription proceeds through the usual promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 553-557.
- CHEN, Y., CANN, M.J., LITVIN, T.N., IOURENKO, V., SINCLAIR, M.L., LEVIN, L.R., BUCK, J., (2000). Soluble Adenylyl Cyclase as an Evolutionarily Conserved Bicarbonate Sensor. *Science* 289, 625-628.
- CHEN, C. & OKAYAMA, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molec. Cell. Biol.* 7, 2745-2752.
- CHINKERS, M., GARBERS, D.L., CHANG, M.S., LOWE, D.G., CHIN, H.M., GOEDDEL, D.V., SCHULZ, S., (1989). A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature* 338(6210):78-83.
- CHUNG, C.Y., FUNAMOTO, S., FIRTEL R. A., (2001). Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. *TRENDS in Biochemical Sciences* 26 (9), 557-565.
- COHEN-DAYAG, A., RALT, D., TUR-KASPA, I., MANOR, M., MAKLER, A., DOR, J., MASHIACH, S., EISENBACH, M., (1994). Sequential Acquisition of Chemotactic Responsiveness by Human Spermatozoa. *Biol. Reprod.* 50: 786- 790.
- COHEN-DAYAG, A., TUR-KASPA, I., DOR, J., MASHIACH, S., EISENBACH, M., (1995). Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11039-11043.
- COOK, S.P., BROKAW, C.J., MULLER, C.H., BABCOCK, D.F., (1994). Sperm chemotaxis: egg peptides control cytosolic calcium to regulate flagellar responses. *Dev. Biol.* 165: 10-19.
- COOK, S.P., BABCOCK, D.F., (1993a). Selective modulation by cGMP of the K⁺ channel activated by speract. *J. Biol. Chem.* 268: 22402-22407.

- COOK, S.P., BABCOCK, D.F., (1993b). Activation of Ca^{2+} permeability by cAMP is coordinated through the pH_i increase induced by speract. *J. Biol. Chem.* 268: 22408-22413.
- CORBY, N., (2000). Unpublished. Direct submission.
- CORPET, F., (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. acids res.* 16, 10881-10890.
- COSSON, M.P., (1990). Sperm chemotaxis. Controls of sperm motility: biological and clinical aspects. CRC Press, Boca Raton, FL: 103-135.
- COSTANZO, R.M., (1991). Regeneration of olfactory receptor cells. *Ciba Found Symp.* 160:233-42; discussion 243-8.
- CRIVICI, A., IKURA, M., (1995). Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24, 85-116.
- DANGOTT, L.J., GARBERS, D.L., (1984). Identification and partial characterization of the receptor for speract. *J. Biol. Chem.* 259: 13712-13716.
- DARSZON A., LABARCA P., NISHIGAKI T., ESPINOSA F., (1999). Ion Channels in Sperm Physiology. *Phys. Rev.* 79 (2), 481-510.
- DEFER, N., BEST-BELPOMME, M., HANOUNE, J., (2000). Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F400-F416.
- DEFER, N., MARINX, O., POYARD, M., LIENARD, M.O., JEGOU, B., HANOUNE, J., (1998). The olfactory adenylyl cyclase type 3 is expressed in male germ cells. *FEBS Lett.* 424: 216-230.
- DREYER, W.J., (1998). The area code hypothesis revisited: Olfactory receptors and other related transmembrane receptors may function as the last digits in a cell surface code for assembling embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 9072-9077.
- DRINNAN, S.L., HOPE, B.T., SNUTCH, T.P., VINCENT, S., (1991). G_{olf} in the basal ganglia. *Mol. Cell. Neurosci.* 2, 66- 70.
- DRUTEL, G., ARRANG, J.-M., DIAZ, J., WISNEWSKY, C., SCHWARTZ, K., SCHWARTZ, J.-C., (1995). Cloning OL1, a Putative Olfactory Receptor and its Expression in the Developing Rat Heart. *Receptors channels* 3, 33-40.
- EISENBACH, M., (1999). Mammalian Sperm Chemotaxis and Its Association With Capacitation. *Dev. Gen.* 25:87-94.
- EISENBACH, M., TUR-KASPA, I., (1999). Do human eggs attract spermatozoa? *Bio essays* 21: 203-210.
- FALKE J.J., HAZELBAUER G.L., (2001). Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors. *TRENDS in Biochemical Sciences* 26 (4), 257-265.
- FALKE J.J., BASS R.B., BUTLER S.L., CHERVITZ S.A., DANIELSON M.A., (1997). THE TWO-COMPONENT SIGNALING PATHWAY OF BACTERIAL CHEMOTAXIS: A Molecular View of Signal Transduction by Receptors, Kinases, and Adaption Enzymes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:457-512.
- FAUSSNER, A., PROUD, D., TOWNS, M., BATHON, J.M., (1998). Influence of the Cytosolic Carboxyl Termini of Human B1 and B2 Kinin Receptors on Receptor Sequestration, Ligand Internalization, and Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* 273 (5):2617-2623.
- FEINBERG, A.P. & VOGELSTEIN, B., (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analyt. Biochem.* 132, 6-13.
- FERRAND, N., PESSAH, M., FRAYON, S., MARAIS, J., GAREL, J.-M., (1999). Olfactory Receptors, G_{olf} and Adenylyl Cyclase mRNA Expressions in the Rat Heart During Ontogenic Development. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31, 1137-1142.

- FRASER, L.R., ADEOYA-OSIGUWA, S., (1999). Modulation of Adenylyl Cyclase by FPP and Adenosine Involves Stimulatory and Inhibitory Adenosine Receptors and G Proteins. *Mol. Repr. Dev.* 53:459-471.
- FRINGS, S., (2001). Chemolectrical signal transduction in olfactory sensory neurons of air-breathing vertebrates. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 58, 510-519.
- FUCHS, T., GLUSMAN, G., HORN-SABAN, S., LANCET, D., PILPEL, Y., (2001). The human olfactory subgenome: from sequence to structure and evolution. *Hum. Genet.* 108: 1-13.
- FUENTES-MASCORRO, G., SERRANO, H., ROSADO, A., (2000). Sperm Chromatin. *Arch. Androl.* 45:215-225.
- FÜLLE, H.J., GARBERS, D.L., (1994). Guanylyl Cyclases: a Family of Receptor-linked Enzymes. *Cell Biochem. Funct.* 12: 157-165.
- FÜLLE, H.J., VASSAR, R., FOSTER, D.C., YANG, R.-B., AXEL, R. & GARBERS, D.L., (1995). A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3571-3575.
- GALINDO, B.E., BELTRÁN, C., CRAGOE, JR. E.J., DARSZON, A., (2000). Participation of a K⁺ Channel Modulated Directly by cGMP in the Speract-Induced Signaling Cascade of *Strongylocentrotus purpuratus* Sea Urchin Sperm. *Dev. Biol.* 285-294.
- GARBERS, D.L., (1999). The Guanylyl Cyclase Receptors. *Methods* 19, 477-484.
- GIBSON, A.D., GARBERS, D.L., (2000). Guanylyl Cyclases As a Family Of Putative Odorant Receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 23:417-439.
- GAT, U., NEKRASOVA, E., LANCET, D., NATOCHIN, M., (1994). Olfactory receptor proteins. Expression, characterization and partial purification. *Eur. J. Biochem.* 225, 1157-1168.
- GAUSS, R., SEIFERT, R., KAUPP, U.B., (1998). Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 393: 583-587.
- GAUTIER-COURTEILLE, C., SALANOVA, M., CONTI, M., (1998). The Olfactory Adenylyl Cyclase III is Expressed in Rat Germ Cells during Spermiogenesis. *Endocrinology* 139: 2588-2599.
- GERSTNER, A., ZONG, X., HOFMANN, F., BIEL, M., (2000). Molecular Cloning and Functional Characterization of a New Modulatory Cyclic Nucleotide-Gated Channel Subunit from Mouse Retina. *J. Neurosci.*, 20 (4):1324-1332.
- GETHING, M.J., SAMBROOK, J., (1981). Cell-surface expression of influenza haemagglutinin from a cloned DNA copy of the RNA gene. *Nature*. 293(5834):620-5.
- GIOJALAS, L.C., ROVASIO, R.A., (1998). Mouse spermatozoa modify their dynamic parameters and chemotactic response to factors from the oocyte microenvironment. *Int. J. Androl.* 21: 201-206.
- GLASSNER, M., JONES, J., KLIGMAN, I., WOOLKALIS, M.J., GERTON, G.L., KOPF, G.S., (1991). Immunocytochemical and Biochemical Characterization of Guanine Nucleotide-Binding Regulatory Proteins in Mammalian Spermatozoa. *Dev. Biol.* 146, 438-450.
- GLATT, C.E., SNYDER, S.H., (1993). Cloning and expression of an adenylyl cyclase localized to the corpus striatum. *Nature* 361, 536-538.
- GLUSMAN, G., CLIFTON, S., ROE, B., LANCET, D., (1996). Sequence analysis in the olfactory gene cluster on human chromosome 17: recombinational events affecting receptor diversity. *Genomics* 37, 147-160.
- GLUSMAN, G., SOSINSKY, A., BEN-ASHER, E., AVIDAN, N., SONKIN, D., BAHAR, A., ROSENTHAL, A., CLIFTON, S., ROE, B., FERRAZ, C., DEMAILLE, J., LANCET, D., (2000). Sequence, Structure, and Evolution of a Complete Human Olfactory Receptor Gene Cluster. *Genomics* 63, 227-245.

- GODDE, M., Dissertation, Universität Regensburg, 1996. Elektrophysiologische Charakterisierung von zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen sowie biophysikalische Untersuchungen zur Signaltransduktion in Spermien. Issn 0944-2952.
- GOLD, G.H., (1999). CONTROVERSIAL ISSUES IN VERTEBRATE OLFACTORY TRANSDUCTION. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 857-871.
- GOLDBERG, E., (1996). Transcriptional Regulatory Strategies in Male Germ Cells. *J. Androl.*, 17 (6), 628-632.
- GOSS, S.J, HARRIS, H., (1975). New method for mapping genes in human chromosomes. *Nature* 255, 680-684.
- GRAHAM, F.L., SMILEY, J., RUSSEL, W.C., NAIRN, R., (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-72.
- GRAY, J., (1928). The effect of egg-secretions on the activity of spermatozoa. *J. Exp. Biol.* 5, 362-365.
- GREER, C.A., STEWART, W.B., TEICHER, M.H., SHEPHERD, G.M., (1982). Functional development of the olfactory bulb and a unique glomerular complex in the neonatal rat. *J. Neurosci.* 2 (12):1744-59.
- GURAYA, SS., (2000). Cellular and Molecular Biology of Capacitation and Acrosome Reaction in Spermatozoa. *Int. Rev. Cytol.* 199:1-64.
- HALL, R.A., PREMONT, R.T., LEFKOWITZ, R.J., (1999). Heptahelical Receptor Signaling: Beyond the G-Protein Paradigm. *J. Cell Biol.*, 145, 927-932.
- HANSBROUGH, J.R., GARBERS, D.L., (1981). Speract: purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 256: 1447-1452.
- HANSBROUGH, J.R., KOPF, G.S., GARBERS, D.L., (1980). The stimulation of sperm metabolism by a factor associated with eggs and by 8-bromo-guanosine 3',5'-monophosphate. *Biochim. Biophys. Acta* 630, 82-91.
- HEERY, D.M., GANNON, F. & POWELL, R., (1990). A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. *Trends Gen.* 6, 173.
- HERVÉ, D., ROGARD, M., LÉVI-STRAUSS, M., (1995). Molecular analysis of the multiple Golf α subunit mRNAs in the rat brain. *Mol. Brain Res.* 32, 125-134.
- HERVÉ, D., LÉVI-STRAUSS, M., MAREY-SEMPER, I., VERNEY, C., TASSIN, J.-P., GLOWINSKI, J., GIRAULT, J.-A., (1993). G_{olf} and G_s in Rat Basal Ganglia: Possible Involvement of G_{olf} in the Coupling of Dopamine D₁ Receptor with Adenylyl Cyclase. *J. Neurosci.* 13 (5): 2237-2248.
- HEUSS, C., GERBER, U., (2000). G-Protein-independent signaling by G-Protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.* 23, 469-475.
- HILDEBRANDT, J.D., CODINA, J., TASH, J.S., KIRCHICK, H.J., LIPSCHULTZ, L., SEKURA, R.D., BIRNBAUMER, L., (1985). The membrane-bound spermatozoal adenylyl cyclase system does not share coupling characteristics with somatic cell adenylyl cyclases. *Endocrinology* 116, 1357-1366.
- HINSCH, K.D., HABERMANN, B., JUST, I., HINSCH, E., PFISTERER, S., SCHILL, W.-B., AKTORIES, K., (1993). ADP-ribosylation of Rho proteins inhibits sperm motility. *FEBS Lett.* 334 (1), 32-36.
- HINSCH, K.D., HINSCH, E., AUMÜLLER, G., TYCHOWIECKA, I., SCHULTZ, G., SCHILL, W.-B., (1992). Immunological Identification of G-Protein α - and β -Subunits in Tail Membranes of Bovine Spermatozoa. *Biol. Repr.* 47, 337-346.
- HIRANO, A.A., HACK, I., WÄSSLE, H., DUVOISIN, R.M., (2000). Cloning and Immunocytochemical Localization of a Cyclic Nucleotide-Gated Channel α -Subunit to All Cone Photoreceptors in the Mouse Retina. *J. Comp. Neurol.* 421:80-94.

- HOROWITZ, J.A., TOEG, H., ORR, G.A., (1984). Characterization and Localization of cAMP-dependent Protein Kinases in Rat Caudal Epididymal Sperm. *J. Biol. Chem.*, 259 (2): 832-838.
- IIDA, H., YOSHINAGA, Y., TANAKA, S., TOSHIMORI, K., TAKAYUKI, M., (1999). Identification of Rab3A GTPase as an Acrosome-Associated Small GTP-Binding Protein in Rat Sperm. *Dev. Biol.* 211, 144-155.
- ISHIKAWA, Y., GRANT, B.S., OKUMURA, S., SCHWENCKE, C., YAMAMOTO, M., (2000). Immunodetection of adenylyl cyclase protein in tissues. *Mol. Cell. Endocrin.* 162, 107-112.
- JAISWAL, B.S., CONTI, M., (2001). Identification and Functional Analysis of Splice Variants of the Germ Cell Soluble Adenylyl Cyclase. *J. Biol. Chem.* 276 (34), 31698-31708.
- JONES, D.T. & REED, R.R., (1989). G_{olf} : An Olfactory Neuron Specific G-Protein Involved in Odorant Signal Transduction. *Science* 244, 790- 795.
- JUILFS, D.M., FÜLLE, H.-J., ZHAO, A.Z., HOUSLAY, M.D., GARBERS, D.L. & BEAVO, J.A., (1997). A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94,3388-3395.
- KAJIYA, K., INAKI, K., TANAKA, M., HAGA, T., KATAOKA, H., TOUHARA, K., (2001). Molecular Bases of Odor Discrimination: Reconstitution of Olfactory receptors that Recognize Overlapping Sets of Odorants. *J. Neurosci.* 21(16):6018-6025.
- KALUZA, J.F., BREER, H., (2000). Responsiveness of Olfactory Neurons To Distinct Aliphatic Aldehydes. *J. Exp. Biol.* 203, 927-933.
- KAUPP, U.B., SEIFERT, R.. Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels. Zur Veröffentlichung eingereicht.
- KAWASAKI, H., SPRINGETT, G.M., MOCHIZUKI, N., TOKI, S., NAKAYA, M., MATSUDA, M., HOUSMAN, D.E., GRAYBIEL, A.M., (1998). A Family of cAMP-Binding Proteins That Directly Activate Rap1. *Science* 282, 2275-2279.
- KEBEKUS, U., Dissertation, Universität Hannover, 1998. Molekularbiologische Charakterisierung, Lokalisation und heterologe Expression von Duftstoffrezeptoren aus männlichen Keimzellen. ISSN 0944-2952
- KOBORI, H., MIYAZAKI, S., KUWABARA, Y., (2000). Characterization of Intracellular Ca^{2+} Increase in Response to Progesterone and Cyclic Nucleotides in Mouse Spermatozoa. *Biol. Repr.* 63, 113-120.
- KOHL, S., BAUMANN, B., BROGHAMMER, M., JAGLE, H., SIEVING, P., KELLNER, U., SPEGAL, R., ANASTASI, M., ZRENNER, E., SHARPE, L.T., WISSINGER, B., (2000). Mutations in the CNGB3 gene encoding the beta-subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated channel are responsible for achromatopsia (ACHM3) linked to chromosome 8q21. *Hum. Mol. Genet.* 9 (14), 2107-2116.
- KONNO, H., AIZAWA, K., AKAHIRA, S., AKIYAMA, J., CARNINCI, P., ENDO, T., FUKUDA, S., FUKUNISHI, Y., HARA, A., HAYATSU, N., HIROZANE, T., HORI, F., ISHII, Y., ISHIKAWA, T., ITOH, M., IZAWA, M., KADOTA, K., KAGAWA, I., KAI, C., KAWAI, J., KIKUCHI, N., KOJIMA, Y., KOYA, S., KUSAKABE, M., MATSUYAMA, T., MIKI, R., MIZUNO, Y., NAKAMURA, M., ODA, H., OKAZAKI, Y., OWA, C., OZAWA, Y., SAITO, H., SANO, M., SATO, K., SHIBATA, K., SHIBATA, Y., SHIGEMOTO, Y., SHIRAKI, T., SOGABE, Y., SUGAHARA, Y., SUZUKI, H., SUZUKI, H., TAKAHASHI, F., TATENNO, M., TOMINAGA, N., TSUNODA, Y., WATAHIKI, A., WATANABE, S., YAMAMURA, T., YASUNISHI, A., YOKOTA, T., YOSHIKI, A., YOSHINO, M., MURAMATSU, M., HAYASHIZAKI, Y., (1999). RIKEN Mouse ESTs (Konno, H., *et al.* 1999). Unpublished.

- KONNO, H., AIZAWA, K., AKAHIRA, S., AKIYAMA, J., ARAKAWA, T., CARNINCI, P., ENDO, T., FUKUDA, S., FUKUNISHI, Y., HARA, A., HAYATSU, N., HIROZANE, T., HORI, F., ISHII, Y., ISHIKAWA, J., ISHIKAWA, T., ITOH, M., IZAWA, M., KADOTA, K., KAGAWA, I., KAI, C., KAWAI, J., KIKUCHI, N., KIYOSAWA, H., KOJIMA, Y., KONDO, S., KOYA, S., KURIHARA, C., KUSAKABE, M., MATSUYAMA, T., MIKI, R., MIZUNO, Y., NAKAMURA, M., ODA, H., OKAZAKI, Y., ONO, T., OWA, C., SAITO, H., SAKAI, C., SATO, K., SHIBATA, K., SHIBATA, Y., SHIGEMOTO, Y., SHINAGAWA, A., SHIRAKI, T., SOGABE, Y., SUGAHARA, Y., SUZUKI, H., SUZUKI, H., TAGAWA, A., TAKAHASHI, F., TOMINAGA, N., TOYA, T., TSUNODA, Y., WATAHIKI, A., WATANABE, S., YAMAMURA, T., YAMANAKA, I., YANO, R., YASUNISHI, A., YOKOTA, T., YOSHIDA, K., YOSHIKI, A., YOSHINO, M., MURAMATSU, M., HAYASHIZAKI, Y., (2000). RIKEN Mouse ESTs (Konno, H., *et al.*). Unpublished.
- KOPF, G.S., WOOLKALIS, M.J., GERTON, G.L., (1986). Evidence for a guanine nucleotide-binding regulatory protein in invertebrate and mammalian sperm. Identification by islet-activating protein-catalyzed ADP-ribosylation and immunochemical methods. *J. Biol. Chem.* 261, 7327-7331.
- KOZAK, M., (1981). Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucl. acids res.* 9, 5233-5252.
- KRAUTWURST, D., YAU, K.-W., REED, R.R., (1998). Identification of Ligands for Olfactory Receptors by Functional Expression of a Receptor Library. *Cell*, 95, 917-926.
- KRIEGER, J., SCHLEICHER, S., STROTHMANN, J., W ANNER, I., BOEKHOFF, I., RAMING, K., DE GEUS, P., BREER, H., (1994). Probing olfactory receptors with sequence-specific antibodies. *Eur. J. Biochem.* 219, 829-835.
- KRONER, C., BOEKHOFF, I., LOHMANN, S.M., GENIESER, H.G., BREER, H., (1996). Regulation of olfactory signaling via cGMP-dependent protein kinase. *Eur. J. Biochem.* 236 (2):632-7.
- KUBICK, S., STROTHMANN, J., ANDREINI, I., BREER, H., (1997). Subfamily of Olfactory Receptors Characterized by Unique Structural Features and Expression Patterns. *J. Neurochem.* 69, 465-475.
- LABARCA, P., SANTI, C., ZAPATA, O., MORALES, E., BELTRÁN, C., LIÉVANO, A., DARSZON, A., (1996). A cAMP Regulated K⁺-Selective Channel from the Sea Urchin Sperm Plasma Membrane. *Dev. Biol.* 174: 271-80.
- LAEMMLI, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LANCET, D., BEN-ARIE, N., COHEN, S., GAT, U., GROSS-ISSEROFF, R., HORN-SABAN, S., KHEN, M., LEHRACH, H., NATOCHIN, M., NORTH, M., (1993). Olfactory receptors: transduction, diversity, human psychophysics and genome analysis. *Ciba Found Symp.* 179:131-41; discussion 141-6.
- LANE, R.P., CUTFORTH, T., YOUNG, J., ATHANASIOU, M., FRIEDMAN, C., ROWEN, L., EVANS, G., AXEL, R., HOOD, L. AND TRASK, B.J., (2001). Genomic analysis of orthologous mouse and human olfactory receptor loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (13), 7390-7395.
- LAPIDOT, M., PILPEL, Y., GILAD, Y., FALKOVITZ, A., SHARON, D., HAAF, T., LANCET, D., (2001). Mouse-Human Orthology Relationships in an Olfactory Receptor Gene Cluster. *Genomics* 71, 296-306.
- LEE, H.C., GARBERS, D.L., (1986). Modulation of the voltage-sensitive Na⁺/H⁺ exchange in sea urchin spermatozoa through membrane potential changes induced by the egg peptide speract. *J. Biol. Chem.* 261(34):16026-32.
- LEE, K.-W., HAN, P.-L., (2000). Direct Submission. Submitted (07-APR-2000).

- LILLIE, FR., (1913). Studies of fertilisation. V. The behavior of the spermatozoa of *Nereis* and *Arbacia* with special reference to egg extractives. J. Exp. Zool. 14: 515-574.
- LI, Q., WRANGE, Ö., ERIKSSON, P., (1997). The Role of Chromatin in Transcriptional Regulation. Int. J. Biochem. Cell Biol. 29 (5), 731-742.
- MALNIC, B., HIRONO, J., SATO, T., BUCK, L.B., (1999). Combinatorial Receptor codes for Odors. Cell, 96, 713-723.
- MANDEL, M. & HIGA, A., (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53, 159-162.
- MANOR, M., (1994). Identification and Purification of Female-Originated Chemotactic Factors. PhD Thesis, Weizmann Institute of Science, Rehovot.
- MARONPOT, R.R., BOORMAN, G.A., GAUL, B.W., (1999). Pathology of the Mouse. Cache River Press, ISBN 1-889899-03-8.
- MARRA, M., HILLIER, L., ALLEN, M., BOWLES, M., DIETRICH, N., DUBUQUE, T., GEISEL, S., KUCABA, T., LACY, M., LE, M., MARTIN, J., MORRIS, M., SCHELLENBERG, K., STEPTOE, M., TAN, F., UNDERWOOD, K., MOORE, B., THEISING, B., WYLIE, T., LENNON, G., SOARES, B., WILSON, R., WATERSTON, R., (1996). The WashU-HHMI Mouse EST Project. Unpublished.
- MARRA, M., HILLIER, L., KUCABA, T., MARTIN, J., BECK, C., WYLIE, T., UNDERWOOD, K., STEPTOE, M., THEISING, B., ALLEN, M., BOWERS, Y., PERSON, B., SWALLER, T., GIBBONS, M., PAPE, D., HARVEY, N., SCHURK, R., RITTER, E., KOHN, S., SHIN, T., JACKSON, Y., CARDENAS, M., MCCANN, R., WATERSTON, R., WILSON, R., (1999). The WashU-NCI Mouse EST Project 1999. Unpublished.
- MCCARTHY, L.C., TERRETT, J., DAVIS, M.E., KNIGHTS, C.J., SMITH, A., CRITCHER, R., SCHMITT, K., HUDSON, J., SPURR, N.K., GOODFELLOW, P.N., (1997). A First-Generation Whole Genome-Radiation Hybrid Map Spanning the Mouse Genome. Gen. Res. 7:1153-1161.
- MEINKOTH, J. & WAHL, G., (1984). Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. Analyt. Biochem. 138, 267-284.
- MENCO, B.P.M., CUNNINGHAM, A.N., QASBA, P., LEVY, N., REED, R.R., (1997). Putative odour receptors localize in cilia of olfactory receptor cells in rat and mouse: a freeze substitution ultrastructural study. J. Neurocytol. 26, 297-312.
- MERLET, F., WEINSTEIN, L.S., GOLDSMITH, P.K., RARICK, T., HALL, J.L., BISSON, J-P., DE MAZANCOURT, P., (1999). Identification and Localization of G protein subunits in human spermatozoa. Mol. Hum. Repr. 5 (1), 38-45.
- MEYER, M.R., Dissertation, Universität zu Köln, 1999. Klonierung, Lokalisierung und funktionelle Charakterisierung eines zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals aus dem Riechepithel der Ratte. ISSN 0944-2952
- MEYER, M.R., ANGELE, A., KREMMER, E., KAUPP, U.B., MÜLLER, F., (2000). A cGMP-signaling pathway in a subset of olfactory sensory neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. 97 (19), 10595-10600.
- MEYER, T.S. & LAMBERTS, B.L., (1965). Use of coomassie brilliant blue r250 for the electrophoresis of microgram quantities of *parotid saliva* proteins on acrylamide-gel strips. Biochim. Biophys. Acta 107, 144-145.
- MICHAUT, M., TOMES, C.N., DE BLAS, G., YUNES, R., MAYORGA, L.S., (2000). Calcium-triggered acrosomal exocytosis in human spermatozoa requires the coordinated activation of Rab3A and N-ethylmaleimide-sensitive factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (18), 9996-1001.

- MILLAR, M.R., SHARPE, R.M., MAGUIRE, S.M., GAUGHAN, J., WEST, A.P., SAUNDERS, P.T.K., (1994). Localization of mRNAs by *in-situ* hybridization to the residual body at stages IX-X of the cycle of the rat seminiferous epithelium: fact or artefact? *Int. J. Adrol.*, 17, 149-160.
- MITCHELL, R., MCCULLOCH, D., LUTZ, E., JOHNSON, M., MACKENZIE, C., FENNELL, M., FINK, G., ZHOU, W., SEALFON, S., (1998). Rhodopsin-family receptors associate with small G proteins to activate phospholipase D. *Nature* 392, 411-414.
- MOMBAERTS, P., WANG, F., DULAC, D., CHAO, SK., NEMES, A., MENDELSON, M., EDMONDSON, J., AXEL, R., (1996). Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87, 675-686.
- MONASTYRSKAIA, K., GOEPFERT, F., HOCHSTRASSER, R., ACUNA, G., LEIGHTON, J., PINK, J.R., LUNDSTROM, K., (1999). Expression and Intracellular Localization of Odorant Receptors in Mammalian Cell Lines using Semliki Forest Virus Vectors. *J. Rec. & Sign. Transd. Res.*, 19 (1-4), 687-701.
- MOON, CH., JABERI, P., OTTO-BRUC, A., BAEHR, W., PALCZEWSKI, K., RONNETT, G.V., (1998). Calcium-Sensitive Particulate Guanylyl Cyclase as a Modulator of cAMP in Olfactory Receptor Neurons. *J. Neurosci.* 18 (9):3195-3205.
- MORISAWA, M., (1994). Cell signaling mechanisms for sperm motility. *Zool. Sci.* 11, 647-662.
- MULLIS, K.B., FALOONA, F.A., SCHAR, S., SAIKI, R., HORN, G. & EHRlich, H., (1986). Specific amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold spring harbor symp. Quant. Biol. 51, 263-273.
- NAKAMURA, T., (2000). Cellular and molecular constituents of olfactory sensation in vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 126, 17-32.
- NEF, P., HERMANS-BORGMEYER, I., ARTIERES-PIN, H., BEASLEY, L., DIONNE, V.E., HEINEMANN, S.F., (1992). Spatial pattern of receptor expression in the olfactory epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8948-8952.
- NEF, S., ALLAMAN, I., FIUMELLI, H., DE CASTRO, E., NEF, P., (1996). Olfaction in birds: differential embryonic expression of nine putative odorant receptor genes in the avian olfactory system. *Mech. Dev.* 55, 65-77.
- NEF, S., NEF, P., (1997). Olfaction: transient expression of a putative odorant receptor in the avian notocord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4766-4771.
- NEI, M., XU, P., GLAZKO, G., (2001). Estimation of divergence times from multiprotein sequences for a few mammalian species and several distantly related organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (5), 2497-2502.
- NEKRASOVA, E., SOSINSKAYA, A., NATOCHIN, M., LANCET, D., GAT, U., (1996). Overexpression, solubilization and purification of rat and human olfactory receptors. *Eur. J. Biochem.* 238, 28-37.
- OKSCHE, A., DEHE, M., SCHÜLEIN, R., WIESNER, B., ROSENTHAL, W., (1998). Folding and cell surface expression of the vasopressin V2 receptor: requirement of the intracellular C-terminus. *FEBS Lett.* 424, 57-62.
- OLIVEIRA, R.G., TOMASI, L., ROVASIO, R.A., GIOJALAS, L.C., (1999). Increased velocity and induction of chemotactic response in mouse spermatozoa by follicular and oviductal fluids. *J. Reprod. Fertil.* 115: 23-27.
- O'NEIL, K.T., DEGRADO, W.F., (1990). How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic α -helices. *Trends biochem. Sci.* 15, 59-64.
- PARMENTIER, M., LIBERT, F., SCHURMANS, S., SCHIFFMANN, S., LEFORT, A., EGGERICKX, D., LEDENT, C., MOLLEREAU, C., GERARD, C., PERRET, J., GROOTEGOD, A., VASSART, G., (1992). Expression of members of the putative olfactory receptor gene family in mammalian germ cells. *Nature* 355, 453-455.

- PILPEL, Y., LANCET, D., (1999). The variable and conserved interfaces of modeled olfactory receptor proteins. *Prot. Sci.* 8, 969-977.
- PRADO, G.N., MIERKE, D.F., PELLEGRINI, M., TAYLOR, L., POLGAR, P., (1998). Motif Mutation of Bradykinin B2 Receptor Second Intracellular Loop and Proximal C-Terminus Is Critical for Signal Transduction, Internalization, and Resensitization. *J. Biol. Chem.* 273, 50:33548-33555.
- QUILL, T.A., REN, D., CLAPHAM, D.E., GARBERS, D.L., (2001). A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (22), 12527-12531.
- RALT, D., MANOR, M., COHEN-DAYAG, A., TUR-KASP A, I., BEN-SHLOMO, I., MAKLER, A., YULI, I., DOR, J., BLUMBERG, S., MASHIACH, S., EISENBACH, M., (1994). Chemotaxis and Chemokinesis of Human Spermatozoa to Follicular Factors. *Biol. Reprod.* 50: 774-785.
- RAMING, K., KONZELMANN, S., BREER, H., (1998). Identification of a G-Protein Coupled Receptor Expressed in Distinct Brain Regions and a Defined Olfactory Zone. *Receptors and Channels*, 6, 141-151.
- REN, D., NAVARRO, B., PEREZ, G., JACKSON, A.C., HSU, S., SHI, Q., TILLY, J.L., CLAPHAM, D.E., (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 413, 603-609.
- REPASKE, D.R., GARBERS, D.L., (1983). A hydrogen ion flux mediates stimulation of respiratory activity by speract in sea urchin spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 258: 6025-6029.
- RESSLER, K.J., SULLIVAN, S.L., BUCK, L.B., (1994). Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* 79, 1245-1255.
- RIDGWAY, P., ALMOUZNI, G., (2001). Chromatin assembly and organization. *J. Cell Sci.* 114(15), 2711-2712.
- RIUS, R.A., MOLLNER, S., PFEUFFER, T., LOH, Y.P., (1994). Developmental changes in G_s and G_{olf} proteins and adenylyl cyclases in mouse brain membranes. *Brain Res.* 643, 50-58.
- ROMEIS, B., (1968). *Mikroskopische Technik*. R. Oldenbourg Verlag, 16. Auflage.
- DE ROOIJ, J., ZWARTKRUIS, F.J.T., VERHEIJEN, M.H.G., COOL, R.H., NIJMAN, S.M.B., WITTINGHOFER, A., BOS, J.L., (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396, 474-477.
- ROUQUIER, S., TAVIAUX, S., TRASK, B.J., BRAND-ARPON, V., VAN DEN ENGH, G., DEMAILLE, J., GIORGI, D., (1998). Distribution of olfactory receptor genes in the human genome. *Nature Gen.*, 18, 243-250.
- RUSSEL, L.D., ETTLIN, R.A., HIKIM, A.P.S., CLEGG, E.D., (1990). *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Cache River Press, ISBN 0-9627422-0-1.
- SAMBROOK, I., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T., (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A.R.; (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- SANTOS, M.A., (1991). An improved method for the small scale preparation of bacteriophage DNA based on phage precipitation by zinc chloride. *Nucl. Acids Res.* 19(19):5442.
- SANTOS-SACCHI, J., GORDON, M., (1980). Induction Of The Acrosome Reaction In Guinea Pig Spermatozoa By cGMP Analogues. *J. Cell Biol.* 85, 798-803.
- SASSONE-CORSI, P., (1997). Transcriptional Checkpoints Determining the Fate of Male Germ Cells. *Cell*, 88, 163-166.
- SCHACKMANN, R.W., CHOCK, P.B., (1986). Alteration of intracellular $[Ca^{2+}]$ in sea urchin sperm by the egg peptide speract. *J. Biol. Chem.* 261, 8719-8728.

- SCHANDAR, M., LAUGWITZ, K.-L., BOEKHOFF, I., KRONER, C., GUDERMANN, T., SCHULTZ, G., BREER, H., (1998). Odorants Selectively Activate Distinct G Protein Subtypes in Olfactory Cilia. *J. Biol. Chem.*, 273 (27), 16669-16677.
- SCHMIDT, E.E., (1996). Transcriptional promiscuity in testes. *Curr. Biol.* 6 (7), 768-769.
- SCHMIDT, E.E., SCHIBLER, U., (1995). High accumulation of components of the RNA polymerase II transcription machinery in rodent spermatids. *Dev.* 121, 2373-2383.
- SCHULTZ, J.E., KLUMPP, S., BENZ, R., SCHURHOFF-GOETERS, W.J., SCHMID, A., (1992). Regulation of adenylyl cyclase from *Paramecium* by an intrinsic potassium conductance. *Science*. 255 (5044):600-3.
- SEIFERT, R., SCHOLTEN, A., GAUSS, R., MINCHEVA, A., LICHTER, P., KAUPP, U.B., (1999). Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9391-9396.
- SHARON, D., GLUSMAN, G., PILPEL, Y., KHEN, M., GRUETZNER, F., HAAF, T., LANCET, D., (1999). Primate Evolution of an Olfactory Receptor Cluster: Diversification by Gene Conversion and Recent Emergence of Pseudogenes. *Genomics* 61, 24-36.
- SHIMOMURA, H.L., GARBERS, D.L., (1986). Differential effects of resact analogues on sperm respiration rates and cyclic nucleotide concentration. *Biochemistry* 25: 3405-3410.
- SHIMOMURA, H.L., DANGOTT, L.J., GARBERS, D.L., (1986). Covalent coupling of a resact analogue to guanylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 261: 15778-15782.
- SHORT, J.M., FERNANDEZ, J.M., SORGE, J.A. & HUSE, W.D., (1988). λ ZAP: a bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucl. Acids Res.* 16, 7583-7600.
- SILVESTRONI, L., PALLESCHI, S., GUGLIELMI, R., CROCE, CT., (1992). Identification and localization of atrial natriuretic factor receptors in human spermatozoa. *Arch. Androl.* 28, 75- 82.
- SINCLAIR, M.L., WANG, X.Y., MATTIA, M., CONTI, M., BUCK, J., WOLGEMUTH, D.J., LEVIN, L.R., (2000). Specific expression of soluble adenylyl cyclase in male germ cells. *Mol. Reprod. Dev.* 56 (1):6-11.
- SINGER, M.S., HUGHES, T.E., SHEPHERD, G.M., GREER, C.A., (1998). Isolation of olfactory receptor mRNA sequences from olfactory bulb glomerular layer. Unpublished.
- SKOUFOS, E., (1999). Conserved Sequence Motifs of Olfactory Receptor-like Proteins may Participate in Upstream and Downstream Signal Transduction. *Receptors and Channels* 6, 401-413.
- SPIRIN, A.S., (1994). Storage of Messenger RNA in Eukaryotes: Envelopment With Protein, Translational Barrier at 5' Side, or Conformational Masking by 3' Side? *Mol. Repr. Dev.* 38:107-117.
- STEGE, K., PAULS, K., KLONISCH, T., FRANKE, F.E., BERGMANN, M., (2000). Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol. Hum. Repr.*, 6 (3), 219-225.
- STENGEL, D., HANOUNE, J., (1984). The sperm adenylyl cyclase. *Ann. Ny Acad. Sci* 438, 18- 28.
- STEEGERS, E.A., HOLLANDERS, J.M., JONGSMA, H.W., HEIN, P.R., (1990). Atrial natriuretic peptide and progesterone in ovarian follicular fluid. *Gynecol. Obstet. Invest.* 29 (3):185-7.
- STRADER, C.D., FONG, T.M., TOTA, M.R., UNDERWOOD, D., (1994). Structure And Function of G Protein-Coupled Receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 63:101-132.

- STROTMANN, J., HOPPE, R., CONZELMANN, S., FEINSTEIN, P., MOMBAERTS, P., BREER, H., (1999). Small subfamily of olfactory receptor genes: structural features, expression pattern and genomic organization. *Gene* 236, 281-291.
- SULLIVAN, S.L., ADAMSON, M.C., RESSLER, K.J., KOZAK, C.A., BUCK, L.B., (1996). The chromosomal distribution of mouse odorant receptor genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 884- 888.
- SUNDSFJORD, J.A., FORSDAHL, F., THIBAUT, G., (1989). Physiological levels of immunoreactive ANH-like peptides in human follicular fluid. *Acta Endocrinol. (Copenh)*. 121 (4):578-80.
- SUZUKI, N. (1995). Structure, function and biosynthesis of sperm-activating peptides and fucose sulfate glycoconjugate in the extracellular coat of sea urchin eggs. *Zool. Sci.* 12, 13-27.
- SUZUKI, N., NOMURA, K., OHTAKE, H., ISAKA, S., (1981). Purification and the primary structure of sperm-activating peptides from the jelly coat of sea urchin eggs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99: 1238-1244.
- SUZUKI, N., SHIMOMURA, H., RADANY, E.W., RAMARAO, C.S., WARD, G.E., BENTLEY, J.K., GARBERS, D.L., (1984). A peptide associated with eggs causes a mobility shift in a major plasma membrane protein of spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 259 (23): 14874-14879.
- SVAREN, J., HÖRZ, W., (1993). Histones, nucleosomes and transcription. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 3:219-225.
- TASH, J.S., (1989). Protein Phosphorylation: The Second Messenger Signal Transducer of Flagellar Motility. *Cell Mot. Cytosk.* 14:332-339.
- TEICHER, M.H., STEWART, W.B., KAUER, J.S., SHEPHERD, G.M., (1980). Suckling pheromone stimulation of a modified glomerular region in the developing rat olfactory bulb revealed by the 2-deoxyglucose method. *Brain Res.* 194 (2):530-5.
- TEMPLETON, D., ECKHART, W., (1984). N-terminal amino acid sequences of the polyoma middle-size t antigen are important for protein kinase activity and cell transformation. *Mol. Cell. Biol.* 4,817-821.
- THOMAS, M.B., HAINES, S.L., AKESON, R.A., (1996). Chemoreceptors expressed in taste, olfactory and male reproductive tissues. *Gene* 178, 1-5.
- THREADGILL, D.W., YEE, D., MATIN, A., NADEAU, J.H., MAGNUSON, T., (1997). Genealogy of the 129 inbred strains: 129/SvJ is a contaminated inbred strain. *Mam. Gen.* 8, 390-393.
- TOUHARA, K., SENGOKU, S., INAKI, K., TSUBOI, A., HIRONO, J., SATO, T., SAKANO, H., HAGA, T., (1999). Functional identification and reconstitution of an odorant receptor in single olfactory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4040-4045.
- TOSCANO, W.A., GROSS, M.K., (1991). Calmodulin-mediated adenylyl cyclase from equine sperm. *Methods in Enzymology* 195, 91-110
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T. & GORDON, J., (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- VAN DEN AKKER, F., (2001). Structural insights into the ligand binding domains of membrane bound guanylyl cyclases and natriuretic peptide receptors. *J. Mol. Biol.* 311(5):923-37.
- VANDERHAEGHEN, P., SCHURMANS, S., VASSART, G., PARMENTIER, M., (1993). Olfactory receptors are displayed on dog mature sperm cells. *J. Cell. Biol.* 123: 1441-1452.

- VANDERHAEGHEN, P., SCHURMANS, S., VASSART, G., PARMENTIER, M., (1997a). Molecular cloning and chromosomal mapping of olfactory receptors expressed in the male germ line: Evidence for their wide distribution in the human genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 283-287.
- VANDERHAEGHEN, P., SCHURMANS, S., VASSART, G., PARMENTIER, M., (1997b). Specific Repertoire of Olfactory Receptor Genes in the Male Germ Cells of Several Mammalian Species. *Genomics* 39, 239-246.
- VASSAR, R., CHAO, S.K., SITCHERN, R., NUNEZ, J.M., VOSSHALL, L.B., AXEL, R., (1994). Topographic organisation of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* 79, 981-991.
- VOWELS, J.J., THOMAS, J.H., (1994). Multiple chemosensory defects in *daf-11* and *daf-21* mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 138: 303-316.
- WALENSKY, L.D., SNYDER, S.H., (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J. Cell. Biol.* 130, 857-869.
- WALENSKY, L.D., ROSKAMS, I., LEFKOWITZ, R.I., SNYDER, S.H., RONNET, G.V., (1995). Odorant receptors and desensitization proteins colocalize in mammalian sperm. *Mol. med.* 1: 130-141.
- WALENSKY, L.D., RUAT, M., BAKIN, R.E. BLACKSHAW, S., RONNETT, G.V., SNYDER, S.H., (1998). Two Novel Odorant Receptor Families Expressed in Spermatids Undergo 5'-Splicing. *J. Biol. Chem.* 273 (16): 9378-9387.
- WALKER, W.H., DELFINO, F.J., HABENER, J.F., (1999). RNA Processing and the Control of Spermatogenesis. *Front. Horm. Res. Basel. Karger.* 25, 34-58.
- WANG, F., NEMES, A., MENDELSON, M., AXEL, R., (1998). Odorant Receptors Govern the Formation of a Precise Topographic Map. *Cell*, 93, 47-60.
- WARD, C.R., BROKAW, C.J., GARBERS, D.L., VAQUIER, V.D., (1985). Chemotaxis of *arabacia punctulata* spermatozoa to resact, a peptid from the egg jelly layer. *J. Biol. Chem.* 101: 2324-2329.
- WENNEMUTH, G., WESTENBROEK, R.E., XU, T., HILLE, B., BABCOCK, D.F., (2000). $Ca_v2.2$ and $Ca_v2.3$ (N- and R-type) Ca^{2+} Channels in Depolarization-evoked Entry of Ca^{2+} into Mouse Sperm. *J. Biol. Chem.* 275, 21210-21217.
- WESTENBROEK, R.E., BABCOCK, D.F., (1999). Discrete regional distributions suggest diverse functional roles of calcium channel $\alpha 1$ subunits in sperm. *Dev. Biol.* 207 (2):457-69.
- WETZEL, C.H., BEHRENDT, H.-J., GISSELMANN, G., STÖRTKUHL, K.F., HOVEMANN, B., HATT, H., (2001). Functional expression and characterization of a *Drosophila* odorant receptor in a heterologous cell system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (6), 9377-9380.
- WEYAND, I., GODDE, M., FRINGS, S., WEINER, J., MÜLLER, F., ALTENHOFEN, W., HATT, H. & KAUPP, U.B., (1994). Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature* 368, 859-863.
- WIESNER, B., WEINER, J., MIDDENDORFF, R., HAGEN, V., KAUPP, U.B., WEYAND, I., (1998). Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca^{2+} entry into sperm. *J. Cell. Biol.* 142: 473-484.
- WILLIAMS, C.J., SCHULTZ, R.M., KOPF, G.S., (1996). G protein gene expression during mouse oocyte growth and maturation, and preimplantation embryo development. *Mol. Reprod. Dev.* 44 (3), 315-323.
- WISSINGER, B., MÜLLER, F., WEYAND, I., SCHUFFENHAUER, S., THANOS, S., KAUPP, U.B. & ZRENNER, E., (1997). Cloning, chromosomal localization and functional expression of the gene encoding the α -subunit of the cGMP-gated channel in human cone photoreceptors. *Eur. J. Neurosci.* 9, 2512-2521.

- WOLFFE, A.P., GUSCHIN, D., (2000). Review: Chromatin Structural Features and Targets That Regulate Transcription. *J. Struct. Biol.* 129, 102-122.
- WONG, S.T., TRINH, K., HACKER, B., CHAN, G.C.K., LOWE, G., GAGGAR, A., XIA, Z., GOLD, G.H., STORM, D.R., (2000). Disruption of the Type III Adenylyl Cyclase Gene Leads to Peripheral and Behavioral Anosmia in Transgenic Mice. *Neuron*, 27, 487-497.
- XIA, Z., CHOI, E.-J., WANG, F., STORM, D.R., (1992). The type III calcium/calmodulin-sensitive adenylyl cyclase is not specific to olfactory sensory neurons. *Neurosci. Lett.*, 144, 169-173.
- XIE, S.Y., FEINSTEIN, P., MOMBAERTS, P., (2000). Characterization of a cluster comprising ~ 100 odorant receptor genes in mouse. *Mamm. Gen.* 11, 1070-1078.
- YANG, R.B., FÜLLE, H.J. AND GARBERS, D.L., (1996). Chromosomal localization and genomic organization of genes encoding guanylyl cyclase receptors expressed in olfactory sensory neurons and retina. *Genomics* 31 (3), 367-372.
- YU, S., AVERY, L., BAUDE, E., GARBERS, D.L., (1997). Guanylyl cyclase expression in specific sensory neurons: A new family of chemosensory receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3384-3387.
- YUNES, R., MICHAUT, M., TOMES, C., MAYORGA, L.S., (2000). Rab3A Triggers the Acrosome Reaction in Permeabilized Human Spermatozoa. *Biol. Repr.* 62, 1084-1089.
- ZAMIR, N., BARKAN, D., KEYNAN, N., NAOR, Z., BREITBART, K., (1995). Atrial natriuretic peptide induces acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa. *Am. J. Physiol.*, 216-221.
- ZAMIR, N., RIVEN-KREITMAN, R., MANOR, M., MAKLER, A., BLUMBERG, S., RALT, D., EISENBACH, M., (1993). Atrial natriuretic peptide attracts human spermatozoa in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 116-122.
- ZHAO, H., IVIC, L., OTAKI, J.M., HASHIMOTO, M., MIKOSHIBA.K., FIRESTEIN, S., (1998). Functional Expression of a Mammalian Odorant Receptor. *Science* 279, 237-240.
- ZIGMAN, J.M., WESTERMARK, G.T., LAMENDOLA, J., BOEL, E., STEINER, D.F., (1993). Human $G_{olf}\alpha$: Complementary Deoxyribonucleic Acid Structure and Expression in Pancreatic Islets and other Tissues Outside the Olfactory Neuroepithelium and Central Nervous System. *Endocrinology* 133, 2508-2514.

7 Anhang

Sequenzinformationen und Primer der in dieser Arbeit untersuchten Signaltransduktionskomponenten.

7.1 Duftstoffrezeptoren

Die in Kapitel 3.1.1 verwendeten Bezeichnungen sind in der nachfolgenden Tabelle gegenübergestellt.

Vanderhaeghen <i>et al.</i> , 1997a	Strotmann <i>et al.</i> , 1999	Vorliegende Arbeit
TPCR05		TOR1
TPCR07		TOR3
TPCR09		TOR4
TPCR11		TOR5
TPCR15		TOR6
TPCR18		TOR7
TPCR33		TOR8
TPCR34		TOR9
TPCR35		TOR10
TPCR50		TOR11
TPCR51		TOR12
TPCR52	<i>mOR37d</i>	TOR13
TPCR53		TOR14
TPCR55		TOR15
TPCR56		TOR16

Tabelle 4: Bezeichnung der in dieser Arbeit untersuchten OR-Fragmente.

Von Vanderhaeghen *et al.* (1997b) wurde die Nomenklatur Testis PCR und eine arabische Ziffer verwendet. Mouse olfactory receptor wurde von Strotmann *et al.* (1999) verwendet. Die arabische Ziffer bezeichnet die Subfamilie und der Buchstabe den Rezeptor der Subfamilie. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bezeichnung Testis olfaktorischer Rezeptor mit entsprechender arabischer Ziffer verwendet.

In der nachfolgenden Tabelle 5 sind die Primer zur Klonierung der cDNA-Fragmente sowie die maximale Hybridisierungstemperatur aufgeführt.

Rezeptor	Primerkombination	Fragmentlänge (Bp)	max. Hybr. Temp.
1	# 2312/# 2313	315	48 °C
3	# 2314/# 2315	341	50 °C
4	# 2316/# 2317	325	50 °C
5	# 2318/# 2319	358	50 °C
6	# 2320/# 2321	355	48 °C
7	# 2322/# 2323	307	50 °C
8	# 2324/# 2325	331	48 °C
9	# 2326/# 2327	318	48 °C
10	# 2292/# 2293	365	48 °C
11	# 2300/# 2301	365	48 °C
12	# 2328/# 2329	359	48 °C
13	# 2330/# 2331	353	50 °C
	# 2688/# 2682	987	54 °C
14	# 2332/# 2333	374	48 °C
15	# 2294/# 2295	365	48 °C

<i>I6</i>	# 2298/# 2299	331	48 °C
<i>S1</i>	# 2339/# 2340	290	52 °C
<i>S3</i>	# 2341/# 2342	285	50 °C

In Tabelle 6 ist die Primerkombination aufgeführt, die gegen konservierte Aminosäure-Sequenzmotive in der *OR*-Familie gerichtet ist.

Primer	AS-Sequenzmotiv	max. Hybr. Temp.	verwendete Hybr. Temp.
# 2270	(Abb. 11; 3.1.1) I2	58 °C	50 °C (TORS1)
# 2271	(Abb. 11; 3.1.1) TM6	54 °C	

In der folgenden Tabelle ist die Zusammensetzung der Ribosonden aufgeführt, die in der Northernblot-Analyse und der *in situ* Hybridisierung verwendet wurden.

OR	Adenosin	Guanosin	Cytidin	Thymidin	G/C Anteil in %
3	94	115	76	56	56
6	86	64	94	127	42,6
7	109	69	58	71	41,4
8	134	89	60	76	41,5
9	128	73	51	66	39
10	120	99	69	69	47,1
11	134	89	60	76	41,5
12	72	65	116	104	50,7
13	72	82	94	105	49,9
15	65	74	101	117	49
<i>S1</i>	77	98	71	44	58,3
<i>S3</i>	95	82	60	45	50,4

Tabelle 7: Zusammensetzung der Ribosonden der *OR*. Angegeben ist die Anzahl der Nukleotide Adenosin, Guanosin, Cytidin und Thymidin in den Sondenfragmenten der Rezeptoren (*OR*) und der G/C Anteil.

Primer, die für die chromosomale Lokalisation der *OR* verwendet wurden.

OR	Primer	Fragmentlänge Bp	max. Hybr. Temp.	verwendete Hybr. Temp.
TORS1	# 2512/# 2513	326	62 °C/60 °C	60 °C

Tabelle 8: Primer, die zur chromosomalen Lokalisation von *TORS1* verwendet wurden.

Angegeben ist die errechnete Fragmentlänge des Amplifikates sowie die in den PCR-Experimenten maximal mögliche und die verwendete Hybridisierungstemperatur der Primer. Die vollständigen PCR-Bedingungen sind 2.13 zu entnehmen.

Tabelle 9 gibt die Primer wider, die zur heterologen Expression eingesetzt wurden.

OR	Primer	Hybridisierungsbereich	Hybr. Temp.	eingefügte Schnittstellen bzw. Konsensus Sequenzen
TORS1	# 2490	1	48 °C	XbaI
	# 2469	913		EcoRI
Rhodopsin	# 2547	-10	52 °C	XhoI/Kozak
	# 2548	106		XbaI

Tabelle 9: Primerkombinationen zur heterologen Expression des Duftstoffrezeptors TORS1.

Die Position 1 des Hybridisierungsbereichs bezeichnet das Adenosin des Startkodons ATG (5'-Primer). Der 3'-Primer (# 2469) überdeckt das Stoppkodon. Angegeben sind die in den PCR-Versuchen verwendete Hybridisierungstemperatur (Hybr. Temp.) sowie die Schnittstellen bzw. eine ideale Ribosomenbindestelle (Kozaksequenz, Kozak, 1981), die mit den Primern eingefügt wurden.

Abb. 38: DNA-Sequenz des *TORS1*-Gens.

-491 TCTAGAGCGCGGCCGCGAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGCGTCGACTCGATCCATAACTTCAACCTTAAAGTGGTAGAAAAAAATTA

-400 ATTATCCCCTAACTGAAATATTGAGATATTCCATCAATTTGGTGTCAAGTCACCTTTTTTAATCTCTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTGT

-300 TTGTTTGTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTTCGAGGCGAGGGTTTCTCTGTGTGGCCCTGGCTGGCCTGGAACTCGCAAGTCACCTTAAAAA

-200 AAAATCATCCTCAGACCAGGTATGGTGGCATATGGGAGGCAGAGGCAGGTGGATCGCTGTGAGTTCAAGGCCAGCCTGGTCTACAGAAGTAGTTCCAGGA

-100 TACCTTATCTTAAAAAAGCAAAACAAACAAACAAACAAACAGGCAAGCATCCTCCTGTCTTTCAGGTTTGGTCAGAGCT

1 ATGAAGACCCCGAGTAACAGCACAGAGGCGGACTTCATTCTCTCGGCCCTCTTCAGCCACACACAGCCAACTCGCTCCTGCTTCTCTGTTGTGTAGTAA

M K T P S N S T E A D F I L L G L F S H T H A N S L L L S V V L V

101 TCTTCAACCGCTCTCTGATGGGGAATACCTCATGATCCTTCTCATCTGCAGGGACCCAGGCTGCACGCGCCCATGTATTCTTCTCAGCCAGCTCTC

I F T A S L M G N T L M I L L I C R D P R L H A P M Y F L L S Q L S

201 CCTCATGGACATGATGTCTCCACCATTGTGCCAAGATGGCAGCCAACTACTGACGAGCAGAGATCCATCTCCCTGCGAGGCTGTGGCTCCAG

L M D M M L V S T I V P K M A A N Y L T S T S R S I S P A G G C G S Q

300 ATCTTCTCTTCTCTCACTTTGCGAGGGGCGAGTGCTTCTCTCTGGCAGCCATGTCTATGATCGTACGTAGCCATATGCTTTCCCTGCGCTACCATG

I F L F L T L L A G G E C F L L A A M S Y D R Y V A I C F P L R Y H

401 TCCTCATGAACCCCAAGTTGTGTGCATACCTGACAGTGGGTCTTGCTCTGGGAGCTGCCGATGGACTGATGAGGCGGGCACCATCCTGAGTTTCC

V L M N P K L C A Y L T V G S W L L G A A D G L M Q A G T I L S F P

501 TTTCTGCCACTCTCGAACATCAACCCTTCTTCTGTGAGGCACCTTCTCTGGTGCGCCTCGCTGCGCAGACACCAAAGCTTTGAGTTCTTATGTAC

F C H S R T I N H F F C E A P S L V R L A C A D T K V F E F F M Y

601 ATCTGCTGCATCTCTGATGCTCTGATCCCGCTGTCCCTCGTCTGGCTTCTTACTCGCTCATCTGCGCCAGGTGCTCCGCATGCGATCTCCGCAGGCC

I C C I L M L L I P L S L V L A S Y S L I L A T V L R M R S S A A

701 GGAAGAAAGCCTTCCACACCTGCTCTTACACCTGGCTGTGGTGGGGTTGTTCTACGGGGCCATCATCTTATCATACATGAGACCCCAAGTCCCACAGCC

R K K A F T T C S S H L A V V G L F Y G A I I F I Y M R P K S H Q P

801 AGGCAAGAGTGACAAAGTGGTGTCTGCCTTCTACACCATCTTCAAGCCGGTGTGAACCTCTCATATACAGTGTGAGAAACAAGGAGGTCAAGGGAGCC

G K S D K V V S A F Y T I F T P V L N P L I Y S V R N K E V K G A

901 TTGAGGAAGTGGCTGCAGAAGACAGTGTGATAAAAACTCCACAAACGAGCTCCACTCAAGTCAGGCGCGCTCACTACAGACTCAGCTTCTCTGATCCA

L R K W L Q K T V

1001 TTGAACATTCTTTTGTGTGATTAACTTCTTTGACGCTCCTTTGACATTTTCTATTCTAATTTTAAACAAAGCGTTTGGAAAAATCAATTTGCCCTCTGG

1101 TGCCCGCTGTGTTAGCCACTATGTTACTTCTTAAATAGGGTCGTAGAGATGGGCACAGTGACACAGGCCTGGCTATCTAGA

Abb. 38: Sequenz des genomischen Klons pBgenTORS1. Die Nukleotide sind in 5' → 3' Richtung nummeriert. +1 entspricht dem ersten Nukleotid des Startkodons. Unter der kodierenden Region ist die abgeleitete Aminosäuresequenz im Einbuchstabenkode dargestellt (siehe 3.1.6.1.4, Abb. 22). Das Startkodon und das Stoppkodon sind fett gedruckt und rot markiert. Die Schnittstellen, mit denen das genomische Fragment kloniert wurde, sind grau unterlegt. Die transmembranalen Segmente (TM) sind überstrichen. Die putative N-Glykosylierungsposition ist kursiv und fett gedruckt (N⁶).

7.2 G_{αolf}

Tabelle 10: Veröffentlichte Sequenzen der kodierenden Region von G_{αolf} aus Maus und Ratte.

Accession-Nr.	Sequenzbereich	Ursprungsgewebe	Identische Nukleinsäuren mit M26718	Referenz
M26718	vollständige kodierende Region der Ratte	Olfaktorisches Epithel	-	Jones & Reed, 1989
AI842004	NT 185-384	Cerebellum	94 %	Bonaldo <i>et al.</i> , 1996
Mmu 38503	NT 683-1179	Gehirn	95 %	Williams <i>et al.</i> , 1996

Unter der angegebenen Accession-Nr. ist die jeweilige Sequenz in der Datenbank des NCBI abgelegt. Der Sequenzbereich gibt den Bereich der kodierenden Region der Rattensequenz wider, der den Mauspartialsequenzen entspricht.

Tabelle 11: Primer zur Klonierung der vollständigen kodierenden Region von G_{αolf} aus der Maus.

Primer	Sequenzbereich	max. Hybr. Temp.	verwendete Hybr. Temp.
# 2825/# 2826	NT 12-1153	70 °C/72 °C	68 °C

Der unter Sequenzbereich angegebene cDNA-Abschnitt des Maus G_{αolf} wird von dem Primerpaar eingerahmt. Aufgeführt ist die maximale Hybridisierungstemperatur, bei der die Primer verwendet werden können, sowie die in den PCR-Experimenten verwendete Temperatur.

Abb. 39: cDNA-Sequenz der kodierenden Region des Maus $G_{\alpha\text{olf}}$ sowie die abgeleitete Proteinsequenz.

```

-12                                     GAGCCAGCAGGC

1  ATGGGGTGTGTTGGGCAACAGCAGCAAGACCGCGGAAGATCAGGGCGTAGATGAAAAAGAACCGCGGAGGCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGTTGCAGA
  M G C L G N S S K T A E D Q G V D E K E R R E A N K K I E K Q L Q

101 AAGAGCGCCTGGCTTACAAAGCAACTCACCCTGCTGCTTCTGGGGGCTGGTGAGTCCGGGAAAAGCACTATCGTCAAACAGATGAGGATCCTGCACGT
  K E R L A Y K A T H R L L L L G A G E S G K S T I V K Q M R I L H V

201 CAATGGCTTCAACCCGAGGAAAAGAGCAGAAAATTCTGGACATCAGGAAAATGTCAAAGATGCGATCGTGACAATCGTTTCAGCAATGAGTACTATC
  N G F N P E E K K Q K I L D I R K N V K D A I V T I V S A M S T I

301 ATACCTCCAGTTCCTGCTGGCCAAACCTGAGAACCAGTTCGGGTGAGATTATATCAAGAGCATAGCCCCTATCACTGACTTTGAATATTTCCAGGAGTTCT
  I P P V P L A N P E N Q F R S D Y I K S I A P I T D F E Y S Q E F

401 TTGACCATGTGAAGAAGCTGTGGGACGATGAAGGAGTGAAGGCTGCTTTGAGAGATCCACGAGTACCAGCTGATCGACTGTGCACAATACTTCTGGA
  F D H V K K L W D D E G V K A C F E R S N E Y Q L I D C A Q Y F L E

501 AAGGATTGACAGTGTGAGTCTGGTTGACTACACCCACAGACCAGGACCTGCTCAGATGCAGAGTGTGACATCAGGAATCTTTGAGACACGATTCCAA
  R I D S V S L V D Y T P T D Q D L L R C R V L T S G I F E T R F Q

600 GTGGACAAAGTGAAGTTTACATGTTTGTGTTGGAGGCGAGAGATGAGAGAAGAAAATGGATCCAGTGTTTAATGATGCTACTGCGATCATTTACG
  V D K V N F H M F D V G G Q R D E R R K W I Q C F N D V T A I I Y

701 TGGCGGCTGTAGTAGCTACAACATGGTGATCCGGGAAGATAACAATACCAACAGACTTCGGGAATCACTGGACCTGTTTGAAGCATCTGGAATAACAG
  V A A C S S Y N M V I R E D N N T N R L R E S L D L F E S I W N N R

801 GTGGTTGCGAACCATTCTATCATCTATTCTTGAACAAACAAGACATGCTGGCAGAAAAGTCTTGGCAGGGAAGTCAAAAATCGAAGACTATTTCCCG
  W L R T I S I I L F L N K Q D M L A E K V L A G K S K I E D Y F P

901 GAGTATGCCAATTATATGTCCTGAAGATGCAACACCAGATGCGGGAGAAGATCCCAAGTTACAAGAGCAAAGTTCTTTATCCGGGATCTGTTCTTGA
  E Y A N Y T V P E D A T P D A G E D P K V T R A K F F I R D L F L

1001 GGATCAGCACAGCCACGGGTGATGGCAACATTACTGCTACCCCTCACTTACCTGCGCCGTGGACACAGAGAATCCGACAGAGTGTTCACAGATTGCCG
  R I S T A T G D G K H Y C Y P H F T C A V D T E N I R R V F N D C R

1101 TGACATCATCCAGAGAATGCATCTCAAGCAGTACGAACCTCTTGTGAAGGCCAATCAAGCTT
      C18
      D I I Q R M H L K Q Y E L L
  
```

Abb. 39: Dargestellt ist die kodierende Region der $G_{\alpha\text{olf}}$ cDNA. Die Nukleotide sind in 5' → 3' Richtung nummeriert. Das Start- und das Stoppkodon sind fett gedruckt und rot dargestellt. Unter der kodierenden Sequenz ist die Aminosäuresequenz im Einbuchstabenkode abgebildet. Das Peptid, gegen das der Antikörper C18 gerichtet ist, ist grau unterlegt.

7.3 Adenylylzyklase III

Tabelle 12: Publiizierte Partialsequenzen der Adenylylzyklase III aus der Maus.

Accession-Nr.	Sequenzbereich	Ursprungsgewebe	Identische Nukleotide mit M55075	Referenz
Ratten ACIII cDNA-Klon M55075	vollständige kodierende Region der Ratte	Olfaktorisches Epithel	-	Bakalyar & Reed, 1989
BB575150	504-722	Adult male pituitary gland		Aizawa <i>et al.</i> , 2000
AW740974	679-1024	Thymus	95 %	Marra <i>et al.</i> , 1999
AF253540	965-1295	unbekannt	96 %	Lee & Han, 2000
AK013198	1363-1539	11 Tage Embryo	96 %	Carninci & Hayashizaki, 1999
BB209261	1515-1813	Adult male Aorta	95 %	Konno <i>et al.</i> , 2000
BF019956	1972-2258	Thymus	92 %	NCI-CGAP ⁺

BF165179	2110-2869	Lung	94 %	NIH-MGC *
AA880100	3014-3469	Mammary gland	93 %	Marra <i>et al.</i> , 1996

Partialsequenzen, die in den Datenbanken EST-mouse und nr des NCBI unter der angegebenen Accession Nr. abgelegt sind. Der Sequenzbereich bezieht sich auf die Nukleotidpositionen der Ratten ACIII-cDNA.

[†]National Cancer Institute, Cancer Genome Anatomy Project (CGAP)

*National Institutes of Health, Mammalian Gene Collection (MGC)

Tabelle 13: Primer zur Klonierung der kodierenden Region der ACIII aus der Maus

Primerkombination	Sequenzbereich	max. Hybr. Temp.	verwendete Hybr. Temp.
# 2908/# 2909	NT 8-1000	68 °C/70 °C	68 °C
# 2842/# 2843	NT 957-1805	78 °C/66°C	66 °C
# 2803/# 2814	NT 1776-3453	62 °C/64 °C	60 °C

Die Positionen unter Sequenzbereich geben den cDNA-Abschnitt der Maus ACIII wider, der von den Primern flankiert wird. Aufgeführt ist die maximale Hybridisierungstemperatur, bei der die Primer verwendet werden können, sowie die in den PCR-Experimenten verwendete Temperatur.

Abb. 40: Die kodierende Region der ACIII-cDNA.

2901 CAAATTCCGGGTCATCACCAAGATCAAACTATTGGCAGCACCTATATGGCAGCTTCAGGAGTCACACCAGATGTCAACACCAATGGCTTTACAAGCTCC
K F R V I T K I K T I G S T Y M A A S G V T P D V N T N G F T S S

3001 AGCAAGGAGGAAAAGTCAGACAAGGAGCGCTGGCAGCACCTGGTTGACCTGGCTGACCTTGCATTAGCCATGAAGGACACGCTCACAAACATCAACAACC
S K E E K S D K E R W Q H L V D L A D F A L A M K D T L T N I N N

3101 AGTCATTCAACAACCTTTCATGTTGCGCATAGGCATGAACAAAGGAGGAGTTCTGGCTGGCGTCATTGGAGCCCGGAACCACTATGACATCTGGGGCAA
Q S F N N F M L R I G M N K G G V L A G V I G A P E P H Y D I W G N

3201 TACCTTGGATGTGGCCAGCAGGATGGAATCCACAGGAGTCATGGGCAACATCCAGGTGGTAGAAGAGACGCAGGTCATCCTTCGAGAGTACGGCTTCCGC
T L D V A S R M E S T G V M G N I Q V V E E T Q V I L R E Y G F R

3301 TTTGTGAGGCGAGGTCCCATCTTTGTGAAAGGCAAAGGGGAGCTTCTGACCTTTTCTTGAAGGGCGGGACAGGCCAGCTGCCTTCCCAATGGCTCCT
F V R R G P I F V K G K G E L L T F F L K G R D R P A A F P N G S

3401 CTGTTACACTGCCCAAGTGGTGGACAACCCCTGAAGCGACCTCTGGCTCC
S V T L P H Q V V D N P

Abb. 40: Die kodierende Region der ACIII-cDNA. Die Nukleotide sind in 5' → 3' Richtung numeriert. Das Start- und das Stoppkodon sind fett gedruckt und rot dargestellt. Unter der kodierenden cDNA-Sequenz ist die Aminosäuresequenz im Einbuchstabenkode abgebildet. Die potentielle N-abhängige Glykosylierungsstelle ist blau dargestellt. Das Peptid, gegen das der Antikörper C20 gerichtet ist, ist grau unterlegt.

7.4 Guanylylzyklase-D

Tabelle 14a, b, c: Veröffentlichte Sequenzen der GC-D aus unterschiedlichen Spezies:

a) Maus EST's:

Accession Nr.	Ursprungsgewebe	Sequenzbereich (Ratte)	Funktionelle Domäne	Referenz
AI645380	Thymus	NT 2081–2343	KHD	Marra <i>et al.</i> , 1996
AA153585	Thymus	NT 2081–2263	KHD	Marra <i>et al.</i> , 1996
AI448708	Thymus	NT 2768-2904	CCD	Marra <i>et al.</i> , 1996
AV208501	Testis	NT 3355-3618	3' kodierend und nicht kodierend	Konno <i>et al.</i> , 1999

Tabelle 14a: Veröffentlichte cDNA Sequenzen der Maus GC-D.

Angegeben sind die jeweiligen Sequenzbereiche der Ratten GC-D, die den Maus EST's entsprechen. Die Maus EST's kodieren für Teile der cyclase catalytic domain (CCD) und der Kinase-Homologie-Domäne (KHD). Das EST aus dem Testis umfaßt einen Bereich aus der 3' kodierenden und dem 3' nicht-kodierenden Bereich direkt im Anschluß an das Stoppkodon.

b) Maus genomische Fragmente:

Accession Nr.	Ursprungsgewebe	Sequenzbereich (Ratte)	Funktionelle Domäne	Referenz
L47643 (Exon 2)	genomische DNA	NT 99–860	SP/ECD	Yang <i>et al.</i> , 1996
L47644 (Exon 3)	genomische DNA	NT 863–1159	ECD	Yang <i>et al.</i> , 1996
L47645 (Exon 4)	genomische DNA	NT 1154–1506	ECD	Yang <i>et al.</i> , 1996
L47646 (Exon 5)	genomische DNA	NT 1510–1603	TMD	Yang <i>et al.</i> , 1996

Tabelle 14b: Veröffentlichte genomische Sequenzen der Maus GC-D.

Angegeben sind die jeweiligen Sequenzbereiche der Ratten GC-D, die den Maus EST's entsprechen. Die Maus genomischen Fragmente kodieren für das Signalpeptid (SP), die extrazelluläre-Domäne (ECD) und die transmembranale-Domäne (TMD).

b) Veröffentlichte Sequenzen von Mensch und Ratte

Accession Nr.	Ursprungsgewebe	Sequenzbereich (Ratte)	Funktionelle Domäne	Referenz
L37203 (Ratte)	olfaktorisches Epithel	vollständige cDNA	vollständiges Protein	Fülle <i>et al.</i> , 1995
BF513152 (Mensch)	Lunge	NT 2544 - 2955	CCD	NCI-CGAP 1997

Tabelle 14c: Bisher veröffentlichte cDNA Sequenzen der GC-D aus Ratte und Mensch. Unter der Accession Nr. ist die entsprechende Sequenz in der Datenbank des NCBI abgelegt. Das Ursprungsgewebe gibt das Organ an, aus dem die cDNA kloniert wurde. Die menschliche cDNA kodiert für einen Bereich aus der katalytischen-Domäne (CCD).

Tabelle 15 a/b: Primer zur Klonierung von cDNA-Fragmenten der GC-D

a) Intrazelluläre-Domäne der Maus GC-D

Primerkombination	Sequenzbereich	max. Hybr. Temp.	verwendete Hybr. Temp.
# 2650/# 2651	NT 1779–2788	60 °C/60 °C	60 °C
# 2612/# 2823	NT 2684–3393	56 °C/62 °C	54 °C

b) Bereich aus der katalytischen-Domäne der menschlichen GC-D

Primerkombination	Sequenzbereich	max. Hybr. Temp.	verwendete Hybr. Temp.
# 3023/# 3024	NT 2544-2875	66 °C/70 °C	64 °C

Die Positionen geben die von den Primer flankierten Sequenzbereiche der Ratten GC-D cDNA-Sequenz wider. Aufgeführt ist die maximale Hybridisierungstemperatur sowie die in den PCR-Experimenten verwendete Temperatur.

Abb. 41: Vergleich der Ratten und Maus (partial) GC-D cDNA-Sequenz

RATGCD	- GCGTACACGCTTCTGGAGCACACCAACGTGGCCCTGTACACAGGAGAGTGGGTGTGGCTGAAGAAGTTTGAAGCAGGCAAGGCTCCTGATCTGCGGCC -	1878
SV129GCDFA	- GCGTACACGCTTCTGGAGCACACCAACGTGGCCCTGTACACAGGAGAGTGGGTGTGGCTGAAGAAGTTTGAAGCAGGCAAGGCTCCTGATCTTGGGCC -	100
RATGCD	- CAGCAGCCTCAGCCTCTGAGAAAGATGCGGAGATGCGGCATGAGAATGTCAACGCTTCTCTGGGTCTCTTGTGGGCCCTGAGGTTAGTGCGATGGTG -	1978
SV129GCDFA	- AAGTAGCCTTAGCTTCTGAGAAAGTGGGAGATGCGGCATGAGAATGTACTGCTTCTCTGGGTCTCTTGTGGGCCCTGAGGTTAGTGCGATGGTG -	200
RATGCD	- CTGGAGCACTGTGCCGTGGCAGCCTGGAGGAOCTGCTAAGGAATGAGGAOCTGAGGCTAGACTGGACCTTCAAGGCCCTCTACTGTTGATCTGATCC -	2078
SV129GCDFA	- CTGGAGCACTGTGCCGTGGCAGCCTGGAGGAOCTGCTGAGAATGAGGAOCTGAGGCTAGACTGGACCTTCAAGGCCCTCTACTGTTAGATCTGATCC -	300
RATGCD	- GAGGTTTGGGTATCTGCACCATCGACATTTCCGCCATGGGCGCTCAAGTCCAGGAACCTGTGTGGTGGACACTGCTTTGTGCTCAAGATCACTGACCA -	2178
SV129GCDFA	- GAGGTTTGGGTATCTGCACCATCGGCGCTTCCGCCATGGGCGCTCAAGTCCAGGAACCTGTGTGGTGGACACTGCTTTGTGCTCAAGATCACTGATCA -	400
RATGCD	- TGGTTATGCAGAGTTCTGGAGTCTCACTGCTCTTTCAGGCCCCAGCGCGCCAGGAAGAGCTTCTGTGGACGGCTCCTGAGCTGTTGCGGGGGCCTCGG -	2278
SV129GCDFA	- TGGCTATGCAGAGTTCTGGAGTCTCACTGCTCTTTCAGGCCCCAGCGCGCCAGGAAGAGCTTCTGTGGACGGCTCCTGAGCTGTTGCGGGGGCCTGGG -	500
RATGCD	- GGGCCTTGGGGGCTGGGAAGGCCACCTTCAAGGTGATGTTTTAGCCTGGGCATCATCTGCGAGGAGTACTGACCGAGACCCACCTACTGCTCCT -	2378
SV129GCDFA	- GGTCTGAG-----AAGGCCACCTTCAAGGTGATGTTTTAGCCTGGGCATCATCTGCGAGGAGTACTGACCGAGACCCACCTACTGCTCCT -	591
RATGCD	- GGGGACTCTCAGCAGAAGAGATCATCGGAAGTGGCATCTCCCCCTCCTCTGTGCGCGCCCTCTGGTGTCCCTGACCAAGGTCCTCGAGTGCATCCA -	2478
SV129GCDFA	- GGGGACTCTCAGCAGAAGAGATCATCGGAAGTGGCATCTCCCCCTCCTCTGTGCGCGCCACTGGTGTCCCTGACCAAGGTCCTCGAGTGCATCCA -	691
RATGCD	- GTTGATGCAGCTGTGCTGGGAGGAAGCTCCAGATGACAGGCCAAGCTTGGACAGATCTACACAGTTCAAAAGCATCAACCAAGGCAAGAAGACAAGT -	2578
SV129GCDFA	- GTTGATGCAGCTGTGCTGGGAGGAAGCTCCAGATGACAGGCCAAGCTTGGACAGATCTACACAGTTCAAAAGCATCAACCAAGGCAAGAAGACAAGT -	791
RATGCD	- GTTGCTGACTCCATGCTGGGATGCTGGAGAAGTATCCCAAAGCCTGGAAGGCTGTGTCAGGAGCGGACTGAGGAGCTGGAAGTGGAGAGGCGGAAGA -	2678
SV129GCDFA	- GTTGATGACTCCATGCTGGGATGCTGGAGAAGTATCCCAAAGCCTGGAAGGCTGTGTCAGGAGCGGACTGAGGAGCTGGAAGTGGAGAGGCGGAAGA -	891
RATGCD	- CAGAGAGGCTGCTCTCACAGATGCTCCCGCTGTGTGCGCATGCTCTAAGATGGAACAACCTGTGGAGCCGAGTACTTTGACCAAGTCAACCATCTA -	2778
SV129GCDFA	- CAGAGAGGCTGCTCTCACAGATGCTCCCGCTGTGTGCGCATGCTCTAAGATGGAACAACCTGTGGAGCCGAGTACTTTGACCAAGTCAACCATCTA -	991
RATGCD	- TTTCACTGACATCGTGGGCTTTACCACTCTCAGCCTTGAAGTGAAGCCATTGAGGTGGTGGGCTTCTCAATGATCTCTACAGATGTTTGTATGCTGTT -	2878
SV129GCDFA	- TTTCACTGACATCGTGGGCTTTACCACTCTCAGCCTTGAAGTGAAGCCATTGAGGTGGTGGGCTTCTCAATGATCTCTACAGATGTTTGTATGCTGTT -	1091
RATGCD	- CTAGACAGCCATGATGTGTATAAGGTAGAAACATAGGGGATGCTACATGGTGGCTCTGGGCTCCTCGGCGCAACGGAATCGGCATGCTGCTGAGA -	2978
SV129GCDFA	- CTGACAGCCATGATGTGTATAAGGTAGGAGCATTAGGGGATGCTACATGGTGGCTCTGGGCTCCTCGGCGCAACGGAATCGGCATGCTGCTGAGA -	1191
RATGCD	- TTGCCAATCGCTCTGGAGATCCTTAGCTAAGCAGGCACTTCGGATGAGGCGATGACCTGATGTGCCCATCGGTGTGAGGCGGCTGCTGATTGAGG -	3078
SV129GCDFA	- TTGCCAATCGCTCTGGAGATCCTTAGCTAAGCAGGCACTTCGGATGAGGCGATGACCTGATGTGCCCATCGGTGTGAGGCGGCTGCTGATTGAGG -	1291
RATGCD	- GCGCTGTGTGGCAGGTGTTGTGGTCTCAACATGCTCGGTACTGCTCTTTGGGACACCGTGAACACTGCTTCCAGGATGGAATCCACTGGAGTGGCA -	3178
SV129GCDFA	- ACCCTGTGTGGCAGGTGTTGTGGTCTCAACATGCTCGGTACTGCTCTTTGGGACACCGTGAACACTGCTTCCAGGATGGAATCCACTGGAGTGGCA -	1391
RATGCD	- TACAGAATCCAGCTCAGCGAAGCACTGTCCAGGCCCTGCTTAGCCTTGAAGAAGGCTACAAAATTGATGTGAGAGGTGAGACCGAAGTGAAGGGGAAGG -	3278
SV129GCDFA	- TACAGGATCCAGCTCAGTCAAAGCACTGTCCAGGCCCTGCTCAGCCTGTATGAAGGCTACAAAATTGATGTGAGAGGTGAGACTGAAGGGGAAGG -	1491
RATGCD	- GCTTGGAGGAGACTTACTGGCTGACAGGGAAGACAGGATTTGCAGATCCCTCCTACACCTCTGTCCATCCAGCCTGGAGCCCATGGCAGGACCATAT -	3378
SV129GCDFA	- GCTTGGAGGAGACTTACTGGCTGACAGGGAAGTATGATTTGAGAGCCCTGCTACACCTCTGTCTATCAAGCCTGGAGCCCATGGCAGGACCGCAT -	1591
RATGCD	- AAACCAAGAAATCGG	3393
SV129GCDFA	- AAACCAAGAAATCGG	1606

Abb. 41: Vergleich der cDNA-Sequenzen der GC-D aus Ratte (RATGCD) und Maus (SV129GCDPA; Partialsequenz). Die Abweichungen der Maussequenz von der Rattensequenz sind in rot dargestellt. Die Nukleotide sind in 5' → 3' Richtung numeriert. Rechts angegeben sind die Nukleotidpositionen der entsprechenden Sequenz. Die cDNA-Bereiche, die für die Kinase-Homologie-Domäne (KHD) und die C-terminale katalytische-Domäne (CCD) kodieren, sind überstrichen. Die Begrenzung dieser Bereiche wurde Fülle *et al.* (1995) entnommen.

7.5 Zapfensehzellen α -Untereinheit (CNGA3)

Tabelle 16: Veröffentlichte CNGA3 cDNA-Sequenzen:

Accession Nr.	Ursprungsgewebe	Sequenzbereich	Referenz
X89598	Huhn Retina	vollständige cDNA	Bönigk <i>et al.</i> , 1993
X89600	Rinder Hoden/ Rinder Retina	vollständige cDNA	Weyand <i>et al.</i> , 1994
AF065314	Mensch Retina	vollständige cDNA	Wissinger <i>et al.</i> , 1997
AJ243933	Maus Retina	vollständige cDNA	Hirano <i>et al.</i> , 2000
AJ272429/AJ272428	Ratte olfaktorisches Epithel	vollständige cDNA	Meyer <i>et al.</i> , 2000

Tabelle 16: Veröffentlichte cDNA-Sequenzen von CNGA3-Untereinheiten. Angegeben ist die Accession-Nr. unter der die Sequenz in der NCBI Datenbank abgelegt ist.

Tabelle 17: Primerkombinationen zur Klonierung der mCNGA3-Untereinheit

Primerkombination	Sequenzbereich (Nukleotid)	max. Hybr. Temp.	verwendete Hybr. Temp.
# 2876/# 2877	1–1004	68 °C/68 °C	66 °C
# 2840/# 2841	947–2039	68 °C/68 °C	66 °C

Tabelle 17: Primerkombinationen mit denen die cDNA der CNGA3-Untereinheit amplifiziert wurde. Angegeben sind die Sequenzbereiche, die von den Primern umschlossen werden, und die maximale Hybridisierungstemperatur, sowie die in den Experimenten verwendete Hybridisierungstemperatur.

Abb. 42: Kodierende Region der mCNGA3l-cDNA.

-20 TGAATGTGACCTGTGCAGAG

1 ATGGCAAAGGTGAACACCCAGTGTTCACAGCCCTCCCGACCCAACTTCAATAAAGAATGCGGACAGAGATCTCGACCACGTAGAGAACGGCCTGGGCA
M A K V N T Q C S Q P S P T Q L S I K N A D R D L D H V E N G L G

101 GGTTCTCACTCAACATGTGAGGAGACATCTTCCACACTGCAGCAAGGGATCGCCATGGAGACCCGAGGACTGGCTGGATCCGCACGGAGCGTAGTCACAAG
R S H S P C E E T S S T L Q Q G I A M E T R G L A G S A R S V V T S

201 CCAGGGACCCAGCCAGGTTGTACGCCTCATCATCTCGATTTCGTGCGTGGGCTCCAGGCACCTACACGATGAAGACCAGACACCTGACTCCTTTTGGAT
Q G P A R V S R L I I S I R A W A S R H L H D E D Q T P D S F L D

301 CGATTTTCATGGATCTGAGCTTAAGGAAGTCTCCACCCGGGAAAGCAATGCCAGGCCAACCCAGGAGAACAGAACCCAGACGGAGGGGAAGGAAGG
R F H G S E L K E V S T R E S N A Q P N P G E Q K P P D G G E G K

401 AGGAGCCCATTTGGTGGAGCCCTCCAGCAACATCTACTACCGCTGGCTGACTGCCATCGCGCTCCAGTCTTCTATAACTGGTGTCTACTTGTATGCAG
E E P I V V D P S S N I Y Y R W L T A I A L P V F Y N W C L L V C R

501 GGCCTGTTTTGATGAGCTACAATCAGAGCACCTGACGCTGTGGCTGGTCTTGGACTACTCTGCAGATGTCCTTTATGTTTGAACATGCTGGTTCGAGCC
A C F D E L Q S E H L T L W L V L D Y S A D V L Y V L D M L V R A

601 CGGACAGGTTTCCTTGAGCAAGGCCTAATGGTCAGAGATACCAAGAGGCTGTGGAAACATTACACAAAGACCTTGCACTTCAAGCTGGACATCCTGTCTC
R T G F L E Q G L M V R D T K R L W K H Y T K T L H F K L D I L S

701 TCATCCCCACAGACCTGGCTTATTTAAAGTTGGGCGTGAACACCCAGAACTGAGGTTCAACCGCTCCTGAAGTTCTCTCGGCTCTTTGAATCTTTGA
L I P T D L A Y L K L G Y Y R W L T A I A L P V F Y N W C L L V C R

801 CCGCACAGACAAAGGACCACTACCCCAACGTGTTCAGGATAGGGAACCTTGGTCTTTACACTCATCATCCAGTGAATGCCTGCATCTACTTT
R T E T R T N Y P N Y F R I G N L V L Y T L I I I H W N A C I Y F

901 GCCATTTCCAAGTTCATTGGTTTTGGGACAGACTCCTGGGTCTATCCAAACACCTCCAAGCCGGAGTATGCACGACTCTCCCGGAAGTACATTACAGTC
A I S K F I G F G T D S W Y P N T S K P E Y A R L S R K Y I Y S

1001 TCTACTGGTCCACCTGACCTGACCACTTGGTGAGACCCACCCCGGTGAAGATGAAGAGTATCTCTTTGGTTCATCGACTTCTGGTGGGTAT
L Y W S T L T L T T I G E T P P P V K D E E Y L F V V L D F L V G I

1101 CCTGATCTTTGCCACCATAGTGGCAACGTAGGCTCCATGATTTCCAACATGAACGCTCCCGGGTAGAGTCCAGGCTAAGATCGACTCCGCTCAAGCAG
L I F A T I V G N V G S M I S N M N A P R V E F Q A K I D S V K Q

1201 TACATGCAGTTCGGGAAGGTAACCAAGGACTTGAGACTCGGTTATCCGGTGGTTGACTATCTGTGGGCAACAGGAAGCGGTGGATGAAAAGGAAG
Y M Q F R K V T K D L E T R V I R W F D Y L W A N R K T V D E K E

1301 TGCTCAAAAACCTCCCGACAAGCTGAAGGCTGAGATCGCCATCAACGTGCACCTGGACAGCTGAAGAAGTCCGAATCTTCCAGGACTGCGAGGCGGG
V L K N L P D K L K A E I A I N V H L D T L K K V R I F Q D C E A G

1401 GCTGCTGGTGGAGCTGGTGTGAAGCTCCGCCCCACTGTGTTCAGCCCCGGGACTACATATGCAAAAAGGGGGACATTGGAAGAGAGATGTACATCATC
L L V E L V L K L R P T V F S P G D Y I C K K G D I G R E M Y I I

1501 AAGGAGGCAAGCTGGCTGTGGTGGCTGATGACGGGTCACCCAGTTTGTGGTCTCAGTGACGGCAGTTACTTTGGGGAGATTAGCATCTTAAACATTA
K E G K L A V V A D D G V T Q F V V L S D G S Y F G E I S I L N I

1601 AGGGGAGCAAGTCTGGGAACCGCAGGACGGCCAACATCAGGAGTATCGGCTACTCAGACCTGTTCTGCCTCTCCAAGGATGACCTAATGGAAGCCCTCAC
K G S K S G N R R T A N I R S I G Y S D L F C L S K D D L M E A L T

1701 CGAGTACCCAGACGCTAAGAGGGCTCTGGAGGAAAAGGGCCGTGAGATCTTGATGAAGGACAACCTAATTGATGAGGACCTAGTCGCGGCCAGGGTAGAT
E Y P D A K R A L E E K G R Q I L M K D N L I D E D L V A A R V D

1801 ACCAGGGACGTTGAGGAGAAGGTGGAGTACCTGGAGTCCCTGGACATCCTGCAGACGAGGTTTGCCCGACTCCTGGCTGAGTACAGTGCCTCCAGAG
T R D V E E K V E Y L E S S L D I L Q T R F A R L L A E Y S A S Q

1901 TGAAGCTGAACAGCGGCTCACTCGGCTGGAGAGCCAGATGAACAGGAGGTGTTGTGGCTTCTCACCTGACAGGGAGAATTCCGAGGATGCTTCAAGAC
M K L K Q R L T R L E S Q M N R R C C G F S P D R E N S E D A S K T

2001 TGACTGAAAATGCAGGTGG
D

Abb. 42: Kodierende Region der mCNGA3-cDNA.

Dargestellt ist die mCNGA3l Spleißvariante. Die Nukleotide sind in 5' → 3' Richtung numeriert. Das Start- und das Stoppkodon sind in rot und fett gedruckt. Der DNA-Sequenzbereich, der in der Spleißvariante mCNGA3s fehlt ist fett und kursiv gedruckt. Unter der DNA-Sequenz ist die Aminosäuresequenz im Einbuchstabenkode widergegeben. Der Proteinbereich, der in mCNGA3s fehlt, ist kursiv und blau abgebildet. Die Lage der transmembranalen Segmente S1 – S6, der Porenregion und der Bindestelle für zyklische Nukleotide (cNMP-Bindestelle) ist durch einen Balken über der Sequenz angegeben. Die Grenzen dieser Bereiche wurden durch Sequenzvergleich mit anderen CNGA3-Kanälen (Bönigk *et al.*, 1993; Weyand *et al.*, 1994; Bönigk *et al.*, 1996) festgelegt.

Abb. 43: Calmodulin-Bindestellen von CNGA3-Untereinheiten

	1	5	8	14	CaM-Effekt:
mCNCalpha2a	VENGLGR	VSRLIISIRAWASRHLHDEDQ			?
mCNCalpha2b	VENGLGRSHSPCEETSSSTLQQGIAMETRGLAGSARSVVTSQGP	VSRLIISIRAWASRHLHDEDQ			?
rCNCalpha2a	VENGLGR	VSRLIISIRAWASRHLHDEDQ			(+)
rCNCalpha2b	VENGLGRSHSPCEETSSSTVHQGIVMETGELAGAAQSLFTSQGP	VSRLIISIRAWASRHLHDEDQ			(+)
hCNCalpha2	AENGLSRHSSSEETSSVLQPGIAMETRGLADSRQSSFTSQGP	LSRLIISIRAWASRHLHDEDQ			-
bCNCalpha2	IENGLSRTHLPCEETSSSELQEGIAMETRGLAESGQGSFTGQGI	LSRLIISIRAWASRHLHDEDQ			-
cCNCalpha2	IENGFIIRTHSLCEDTSSSELQRVISMEGRHLGSGQTSPTTGRGAMARLSRFVVSLSRWATRHLHDEDQ				(+)

Abb. 43: Vergleich der putativen Calmodulin-Bindestellen der mCNGA3-Spleißvarianten mit den entsprechenden Bereichen anderer CNGA3-Untereinheiten. Dargestellt sind Bereiche aus den Spleißvarianten mCNGA3s/l, aus den CNGA3-Untereinheiten der Ratte (rCNGA3s/l), des Menschen (hCNGA3), des Rindes (bCNGA3) und des Huhns (cCNGA3). Aminosäuren, die das „1-5-8-14“-Motiv (blau unterlegt) unterbrechen, sind rot markiert.

7.6 Zapfensehzellen β -Untereinheit (CNGB3)

Tabelle 18: Veröffentlichte CNGB3 cDNA-Sequenzen

Accession Nr.	Ursprungsgewebe	Sequenzbereich	Referenz
AJ243572	Maus Retina	vollständige cDNA	Gerstner <i>et al.</i> , 2000
AF272900	Mensch Retina	vollständige cDNA	Kohl <i>et al.</i> , 2000

Tabelle 18: Veröffentlichte cDNA-Sequenzen der CNGB3-Untereinheit. Angegeben ist die Nummer unter der die Sequenz in der NCBI Datenbank abgelegt ist.

Tabelle 19: Primerpaare zur Klonierung der Maus CNGB3-Untereinheit.

Primerkombination	Sequenzbereich	max. Hybr. Temp.	verwendete Hybr. Temp.
1. PCR # 2767/# 2768; 2. PCR # 2769/# 2770	1-1075	62 °C/760 °C; 62 °C/62 °C	58 °C/60 °C
# 2646/# 2647	1009–2125	62 °C/60 °C	60 °C

Abb. 44: Kodierende Region der CNGB3-cDNA.

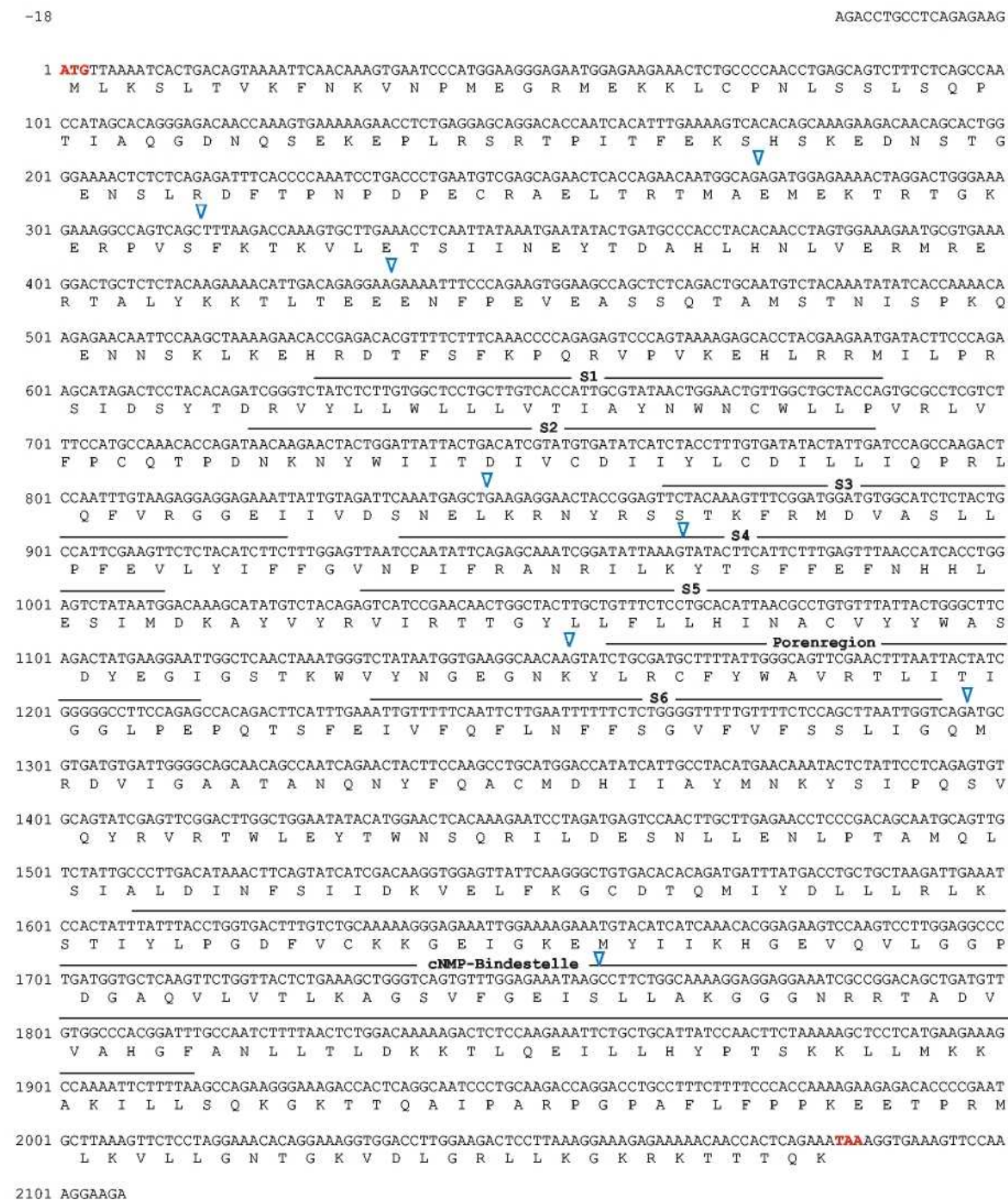


Abb. 44: Kodierende Region der CNGB3-cDNA. Die Nukleotide sind in 5' → 3' Richtung numeriert. Das Start- und das Stoppkodon sind in rot und fett gedruckt. Unter der DNA-Sequenz ist die Aminosäuresequenz im Einbuchstabenkode wiedergegeben. Die Lage der transmembranalen Segmente S1 – S6, der Porenregion und der Bindestelle für zyklische Nukleotide (cNMP-Bindestelle) ist durch einen Balken über der Sequenz angegeben. Die Grenzen dieser Bereiche wurden Gerstner *et al.* (2000) entnommen. Putative, in dieser Arbeit identifizierte Spleißpositionen sind mit blauen Pfeilspitzen markiert.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologische Informationsverarbeitung (IBI-1) des Forschungszentrums Jülich angefertigt. Ich bedanke mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere gilt mein Dank:

Prof. Dr. U.B. Kaupp für die Überlassung des Themas und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Dr. I. Weyand, in dessen Forschungsvorhaben ich eingebunden war, für die gute Betreuung. Sein persönliches Engagement und die ständige Diskussionsbereitschaft haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Dr. W. Bönigk, Dr. A. Baumann für die fachkundige Unterstützung dieser Arbeit in allen Fragen der Molekularbiologie.

Dr. S. Frings für die Hilfe und Anleitung beim Ca^{2+} -Imaging.

Dr. F. Müller für seine Einweisung in die Mikroskopie sowie seine fachkundige Unterstützung in allen Fragen der Immunzytochemie.

Dr. R. Middendorff (UKE Hamburg), Dr. S. Gotzes (RWTH Aachen) und Dr. K. Imai (GSF München) für ihre fachkundige Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft im Rahmen verschiedener Kooperationen.

Frau M. Bruns für die Unterstützung in der Zellkultur.

Frau A. Eckert, Herr R. Esser, Herr D. Portz und Herr D. Grammig für die umfangreiche technische Unterstützung, Geduld und freundliche Hilfe bei allen organisatorischen Problemen.

Frau Prof. Dr. Sigrun Korsching möchte ich für die Übernahme der Beurteilung dieser Arbeit als Gutachter der Universität zu Köln danken.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4002
August 2002
ISSN 0944-2952