

# **Die Kernhülle in Keimzellen:**

Strukturelle Besonderheiten, dynamische Prozesse  
und die Umgestaltung des Zellkerns  
während der Spermatogenese der Maus

## **DISSERTATION**

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Eva Göb**

aus

**Haßfurt**

Würzburg, Februar 2011



Eingereicht am: \_\_\_\_\_

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: \_\_\_\_\_

Gutachter: Prof. Dr. Ricardo Benavente

Gutachter: Prof. Dr. Michael Schmid

Tag des Promotionskolloquiums: \_\_\_\_\_

Doktorurkunde ausgehändigt am: \_\_\_\_\_



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
	<b>Summary</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1	Die somatische Kernhülle und deren Bestandteile	5
2.1.1	Innere und Äußere Kernmembranen	6
2.1.1.1	Proteine der äußeren Kernmembran: Nesprine	6
2.1.1.2	Proteine der inneren Kernmembran	8
2.1.1.3	Proteine der inneren Kernmembran mit einer SUN-Domäne	10
2.1.2	Der LINC-Komplex	12
2.1.3	Kernlamina und Lamine	14
2.2	Besonderheiten der Kernhülle während der Gametogenese	18
2.2.1	Die Gametogenese beim Modellorganismus <i>Mus musculus</i>	18
2.2.1.1	Die Meiose	21
2.2.1.2	Die Spermiogenese	23
2.2.2	Die Kernhülle in der meiotischen Phase (Prophase I)	25
2.2.2.1	Telomeranheftung, Bouquetformierung und die besondere Lokalisation von Sun1 und Sun2	25
2.2.2.2	Die Expression von Lamin C2, eines meiosespezifischen A-Typ Lamins	28
2.2.3	Die Kernhülle in der postmeiotischen Phase	30
2.2.3.1	Reorganisation und Umverteilung von Bestandteilen der Spermatidenkernhülle	30
2.2.3.2	Expression von SUN-Domänen Proteinen während der Spermiogenese	31
2.3	Zielsetzung	32
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
3.1	Lamin C2 ist essentiell für das erfolgreiche Durchlaufen der Spermatogenese	33
3.1.1	Mäuse mit deletiertem Lamin C2-spezifischen Exon 1a exprimieren die somatische A-Typ Lamine A und C, das meiotische Lamin C2 hingegen nicht	34
3.1.2	Der Verlust von Lamin C2 führt zur Infertilität männlicher Mäuse	37
3.1.3	Bei männlichen Lamin C2-defizienten Mäusen arretiert die Meiose in der Prophase I	41
3.1.4	Weibliche <i>Lmna<sup>ΔC2/ΔC2</sup></i> Mäuse sind fertil	44
3.2	Die Umformung des Spermienkopfes der Säuger umfasst die Expression neuer LINC-Komplex-Bestandteile sowie den Aufbau zweier neuer LINC-Komplexe	47
3.2.1	Expression und Lokalisation von Sun3 während der Differenzierung des Spermienkopfes	48
3.2.1.1	Sun3 ist ein neues SUN-Domänen Protein	48
3.2.1.2	Sun3 wird ausschließlich während der Spermiogenese exprimiert	52
3.2.1.3	Sun3 polarisiert auf der posterioren Seite des Spermatidenkerns	55
3.2.2	Expression und Lokalisation von Sun1 während der Differenzierung des Spermienkopfes	57

3.2.2.1	Sun1 zeigt während der Spermiogenese eine ungewöhnliche duale Lokalisation _____	57
3.2.2.2	Die anteriore Lokalisation von Sun1 korreliert mit der Expression von Sun1 $\eta$ , einer neuen, spermiogenesespezifischen Sun1 Isoform _____	59
3.2.3	Während der Spermiogenese der Säuger werden zwei neue LINC-Komplexe gebildet _____	63
3.2.3.1	Nesprin1 polarisiert am posterioren, Nesprin3 am anterioren Pol des Spermatidenkopfes _____	63
3.2.3.2	Nesprin1/Sun3 und Nesprin3/Sun1 bilden zwei neue spermiogenesespezifische LINC-Komplexe _____	65
<b>4</b>	<b>Diskussion _____</b>	<b>68</b>
4.1	Der Verlust von Lamin C2 führt zu einem meiotischen Prophase I Arrest in der Spermatogenese von <i>Mus musculus</i> _____	69
4.2	An der Ausbildung des Spermienkopfes der Säuger sind zwei neue LINC-Komplexe beteiligt _____	74
4.2.1	Der Sun3/Nesprin1 LINC-Komplex am posterioren Spermatidenpol _____	78
4.2.2	Der Sun1 $\eta$ /Nesprin3 LINC-Komplex am anterioren Spermatidenpol _____	78
4.3	Das <i>Sun1</i> Gen der Maus kodiert für sieben verschiedene Isoformen mit gewebespezifischer Expression _____	80
4.4	Ausblick _____	82
<b>5</b>	<b>Tiere und Organismen _____</b>	<b>84</b>
5.1	Mäuse _____	84
5.2	Bakterienstämme _____	84
<b>6</b>	<b>Materialien _____</b>	<b>85</b>
6.1	Biologische Materialien _____	85
6.1.1	Zelllinien _____	85
6.1.2	Antikörper _____	85
6.2	Molekularbiologische Materialien _____	87
6.2.1	Plasmidvektoren _____	87
6.2.2	Oligonukleotide _____	89
6.2.3	Enzyme _____	91
6.2.4	Größenstandards _____	91
6.3	Kits und Einzelkomponenten _____	91
6.4	Chemikalien _____	92
6.5	Geräte _____	92
6.6	Computerprogramme _____	93
<b>7</b>	<b>Methoden _____</b>	<b>94</b>
7.1	Haltung und Zucht von Labormäusen _____	94

<b>7.2</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>95</b>
7.2.1	Kultivierung von Kulturzellen	95
7.2.2	Transfektion von Kulturzellen	95
<b>7.3</b>	<b>Isolierung von Geweben und Organen</b>	<b>96</b>
7.3.1	Gewebepräparation	96
7.3.1.1	Gefriereinbettung von Geweben	96
7.3.1.2	Paraffineinbettung von Geweben	96
7.3.2	Herstellung von Hodensuspensionen	96
7.3.3	Gewinnung von Gesamtgewebeproben	97
7.3.4	Gewinnung von Spermien aus dem Nebenhoden	97
<b>7.4</b>	<b>Mikrobiologische Methoden</b>	<b>99</b>
7.4.1	Flüssigkultur von Bakterien	99
7.4.2	Photometrische Bestimmung der Bakteriendichte in Flüssigkulturen	99
7.4.3	Glycerinkultur	99
7.4.4	Bakterienkultur auf Agarplatten	99
7.4.5	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	100
7.4.6	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien	100
<b>7.5</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>101</b>
7.5.1	Isolierung von Gesamt-RNA	101
7.5.2	Herstellung von cDNA durch Reverse Transkription (RT-PCR)	101
7.5.3	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	102
7.5.3.1	Amplifikation von cDNA-Fragmenten	103
7.5.3.2	Amplifikation genomischer DNA	104
7.5.3.3	Kolonie-PCR	104
7.5.4	Auftrennen von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese	105
7.5.5	Präparative Agarose-Gelelektrophorese	105
7.5.6	Klonierung von DNA-Fragmenten	105
7.5.6.1	Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	106
7.5.6.2	Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pJET1.2/blunt	106
7.5.6.3	Restriktionsverdau	107
7.5.6.4	Herstellung von DNA-Fragmenten mit glatten Enden mittels Klenow-Fragment	108
7.5.6.5	Verwendung von PCR-Produkten als Insert-DNA (Kinasierung des PCR-Produkts)	108
7.5.6.6	Dephosphorylierung des Vektors	108
7.5.6.7	Ligation	109
7.5.7	Isolierung von DNA	109
7.5.7.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Plasmid Mini Präp)	109
7.5.7.2	Isolierung von genomischer DNA aus Zellen und Geweben	110
7.5.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	110
7.5.9	Fällung von Nukleinsäuren	111
7.5.10	Reinigung von Nukleinsäuren mit Phenol/Chloroform	111

7.5.11	DNA-Sequenzierung	111
<b>7.6</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>112</b>
7.6.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli	112
7.6.2	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	113
7.6.3	Trocknen von SDS-Gelen	113
7.6.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen im SDS-Gel	114
7.6.5	Western Blot	114
7.6.6	Strippen eines Western Blots	115
7.6.7	Expression und Affinitätsreinigung von (His) <sub>6</sub> -Fusionsproteinen	115
7.6.8	Fällung von Proteinen	117
7.6.8.1	Methanol/Chloroform-Fällung	117
7.6.8.2	Aceton-Fällung	117
7.6.9	Dialyse von Proteinen	117
7.6.10	Affinitätsreinigung von Antikörpern über das HiTrap™-Säulensystem	118
7.6.11	Co-Immunpräzipitation	120
<b>7.7</b>	<b>Mikroskopische Methoden</b>	<b>122</b>
7.7.1	Herstellung der Präparate	122
7.7.1.1	Herstellung von Gefrierschnitten und Gewebeabklatschen	122
7.7.1.2	Herstellung von Paraffinschnitten	122
7.7.2	Immunfluoreszenz	122
7.7.2.1	Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten, Gewebeabklatschen und Kulturzellen	122
7.7.2.2	Immunfluoreszenz auf Paraffinschnitten	123
7.7.2.3	Immunfluoreszenz auf gespreiteten Zellen	124
7.7.3	Hämatoxylin/Eosin-Färbung	125
7.7.4	TUNEL-Assay	125
7.7.5	Mikroskopische Auswertung	126
<b>8</b>	<b>Referenzen</b>	<b>127</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>137</b>
<b>10</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>140</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>141</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>142</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>143</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Organisation der Kernhülle somatischer Zellen.	5
Abbildung 2.	Die KASH-Domänen Proteine der Säuger.	7
Abbildung 3.	Die SUN-Proteinfamilie der Säuger.	11
Abbildung 4.	Struktureller Aufbau des LINC-Komplexes.	12
Abbildung 5.	Struktureller Aufbau eines Kernlamins.	14
Abbildung 6.	Die Lamine der Säuger.	16
Abbildung 7.	Die Stadien der Prophase I.	22
Abbildung 8.	Morphologische Differenzierungsprozesse während der Spermiogenese bei Säugetieren.	23
Abbildung 9.	Anheftung meiotischer Telomere an die Kernhülle in der Prophase I.	28
Abbildung 10.	Analyse der A-Typ Lamin-Expression in $Lmna^{Ac2^{\Delta}Ac2}$ Mäusen auf Ebene der mRNA.	34
Abbildung 11.	Analyse der A-Typ Lamin-Expression in $Lmna^{Ac2^{\Delta}Ac2}$ Mäusen im Western Blot.	35
Abbildung 12.	Die Deletion von Exon 1a des $Lmna$ Gens hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von Lamin A und C in somatischen Zellen.	35
Abbildung 13.	$Lmna^{Ac2^{\Delta}Ac2}$ Spermatozyten sind negativ für Lamin C2.	36
Abbildung 14.	$Lmna^{Ac2^{\Delta}Ac2}$ Mäuse sind phänotypisch gesund, weisen jedoch deutlich reduzierte Testes auf.	38
Abbildung 15.	Der Verlust von Lamin C2 führt zu einer geschädigten Zytoarchitektur der Samenkanälchen.	39
Abbildung 16.	$Lmna^{Ac2^{\Delta}Ac2}$ Mäuse können keine reifen Spermien bilden.	40
Abbildung 17.	Spermatozyten Lamin C2-defizienter Mäusen gehen in Apoptose.	41
Abbildung 18.	In $Lmna^{Ac2^{\Delta}Ac2}$ Spermatozyten kommt es zu erheblichen Störungen bei der Paarung und Synapsis der homologen Chromosomen.	43
Abbildung 19.	Ovarien Lamin C2-defizienter Mäuse erscheinen phänotypisch unauffällig.	45
Abbildung 20.	Das Protein Sun3 ist innerhalb der Säugetiere hochkonserviert.	49
Abbildung 21.	Der C-Terminus von Sun3 ist homolog zur SUN-Domäne von Sun1 und Sun2.	51
Abbildung 22.	Sun3 ist ein neues Mitglied der SUN-Proteinfamilie.	51
Abbildung 23.	Sun3 wird ausschließlich im Hoden exprimiert.	52
Abbildung 24.	Sun3 zeigt ein spermiogenesespezifisches Expressionsmuster.	53
Abbildung 25.	Sun3 ist nur in der Kernhülle postmeiotischer Zellen nachweisbar.	54
Abbildung 26.	Sun3 polarisiert am posterioren Pol sich entwickelnder Spermatozyten.	55
Abbildung 27.	Sun3 kolokalisiert mit der spermiogenesespezifischen Mikrotubuli-Manschette.	56
Abbildung 28.	Sun1 zeigt eine duale Lokalisation in differenzierenden Spermatozyten.	58
Abbildung 29.	Im Verlauf der Spermiogenese verändert sich die duale Lokalisation von Sun1.	59
Abbildung 30.	Sun1 $\eta$ ist eine neue testisspezifische Isoform des murinen Sun1 Gens.	60
Abbildung 31.	Sun1 Isoform $\eta$ wird selektiv während der Spermiogenese exprimiert und ist die einzige Sun1 Variante in reifen Spermien.	61
Abbildung 32.	Das Sun1 Gen der Säuger kodiert für insgesamt sieben verschiedene Isoformen.	62
Abbildung 33.	Der C-terminale Bereich des Sun1 Gens kodiert für keine weiteren Isoformen.	62
Abbildung 34.	Die Nesprine 1 und 3 polarisieren während der Differenzierung postmeiotischer Zellen und kolokalisieren mit je einem potentiellen LINC-Komplex-Partner.	64

<b>Abbildung 35.</b>	<i>Sun3 ist durch seine Interaktion mit den Nesprinen 1 und 3 in der Lage LINC-Komplexe zu bilden.</i>	66
<b>Abbildung 36.</b>	<i>Expression der SUN-Domänen Proteine während der Spermatogenese von <i>Mus musculus</i>.</i>	75
<b>Abbildung 37.</b>	<i>Modell für die morphologische Umgestaltung des Spermienkopfes der Säuger unter dem Einfluss zweier gegenüberliegender LINC-Komplexe.</i>	77
<b>Abbildung 38.</b>	<i>Karte des pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> Vektors.</i>	87
<b>Abbildung 39.</b>	<i>Karte des pJET1/blunt Vektors.</i>	87
<b>Abbildung 40.</b>	<i>Karte des pET21a(+) Vektors.</i>	88
<b>Abbildung 41.</b>	<i>Karte der pQE30/31/32 Vektoren.</i>	88
<b>Abbildung 42.</b>	<i>Karte der pEGFP-N und -C Vektoren.</i>	89
<b>Abbildung 43.</b>	<i>Karte des pCMV-Myc Vektors.</i>	89
<b>Abbildung 44.</b>	<i>Aufbau eines Western Blots.</i>	114

## Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1.</i>	<i>KASH-Protein der Säuger und ihre Anbindung an das Zytoskelett.</i>	<i>8</i>
<i>Tabelle 2.</i>	<i>Membranproteine der INM bei Säugetieren.</i>	<i>9</i>
<i>Tabelle 3.</i>	<i>A- und B-Typ Lamine der Säuger im Vergleich.</i>	<i>15</i>
<i>Tabelle 4.</i>	<i>Oogenese und Spermatogenese der Säuger im Vergleich.</i>	<i>18</i>
<i>Tabelle 5.</i>	<i>Die Beteiligung von LINC-Komplexen während der Telomeranheftung und der Bouquetformierung in ausgewählten Modellorganismen.</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 6.</i>	<i>Konserviertheit von Sun3 innerhalb der Vertebraten.</i>	<i>50</i>
<i>Tabelle 7.</i>	<i>Konserviertheit von Sun3 innerhalb der SUN-Proteinfamilie der Maus.</i>	<i>50</i>
<i>Tabelle 8.</i>	<i>Primärantikörper.</i>	<i>85</i>
<i>Tabelle 9.</i>	<i>Sekundärantikörper.</i>	<i>86</i>
<i>Tabelle 10.</i>	<i>Oligonukleotide für Sequenzierungen, Kolonie-PCR und reverse Transkriptionen.</i>	<i>89</i>
<i>Tabelle 11.</i>	<i>Oligonukleotide für die spezifische Amplifikation von cDNA-Fragmenten.</i>	<i>90</i>
<i>Tabelle 12.</i>	<i>Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren.</i>	<i>110</i>
<i>Tabelle 13.</i>	<i>Pipettierschema für Trenn- und Sammelgel bei der SDS-PAGE nach Laemmli.</i>	<i>113</i>



# 1 Zusammenfassung

Die Kernhülle umgibt als geschlossenes Membransystem einen jeden Zellkern und ist damit ein gemeinsames Merkmal aller eukaryotischen Zellen. Sie besteht aus einer inneren und einer äußeren Kernmembran sowie der nukleoplasmatischen Kernlamina, die aufgrund zahlreicher assoziierter Proteine in enger Wechselbeziehung mit der inneren Kernmembran steht. Neben der rein räumlichen Trennung nukleärer und zytoplasmatischer Strukturen hat die Kernhülle bedeutenden regulatorischen Einfluss auf die gesamte Zelle. So ist sie unter anderem an der Steuerung der genomischen Aktivität, an der nukleo- und zytoplasmatischen Signalübertragung und in hohem Maße an der Positionierung und Formerhaltung des Zellkerns beteiligt.

Es mehren sich die Hinweise, dass die Kernhülle auch während der Gametogenese, der Differenzierung befruchtungsfähiger Keimzellen, eine zentrale Rolle einnimmt und folglich auch mit bislang ungeklärten Ursachen humaner Infertilität in Kontext stehen könnte. Um die Bedeutung der Kernhülle für die Keimbahn der Säuger generell besser verstehen zu können, wurden in dieser Arbeit ausgewählte Bestandteile der Keimzellkernhülle untersucht. Dadurch sollte der Kenntnisstand erweitert werden, in welcher Weise die Kernhülle dynamische, morphologische und vor allem für die Keimbahn essentielle Prozesse beeinflusst; insbesondere während der meiotischen und der postmeiotischen Differenzierungsphase bei männlichen Mäusen.

Im Mittelpunkt stand dabei einerseits Lamin C2, ein meiosespezifisches A-Typ Lamin, dessen Verlust zu einer schwer geschädigten Meiose und infolgedessen zu vollständiger männlicher Infertilität führt. Es zeigte sich, dass Lamin C2-defiziente männliche Mäuse schwerwiegende Defekte bei der Paarung und Synapsis der homologen Chromosomen in der meiotischen Prophase I aufweisen und aufgrund apoptotischer Spermatozyten keine reifen Spermien bilden können. Es wird angenommen, dass die Assoziation homologer Chromosomen bzw. die Abstoßung nicht-homologer durch gerichtete Telomerbewegungen entlang der Kernhüllenperipherie vorangetrieben bzw. verhindert wird. Da Lamin C2 seinerseits diese Wanderung der Telomere durch eine Flexibilisierung der Spermatozytenkernhülle vereinfachen soll, ist es durchaus vorstellbar, dass sein Verlust verlangsamte Telomerbewegungen, eine gestörte Homologenfindung und folglich Fehlpaarungen zur Folge hat.

Ein weiteres zentrales Thema war die Erforschung potentieller LINC-Komplexe während der Differenzierungs- und morphologischen Umgestaltungsphase postmeiotischer Keimzellen. LINC-Komplexe sind kernhüllendurchspannende Proteingebilde aus SUN-Proteinen in der inneren und Nesprinen in der äußeren Kernmembran, die nukleäre Strukturen an das Zytoskelett binden. Da sie aufgrund dieser strukturellen Eigenschaft die Kernmorphologie beeinflussen können, erscheinen sie als äußerst geeignet, an der Formierung des Spermienkopfes beteiligt zu sein. Die detaillierte Untersuchung spermiogeneserelevanter LINC-Komplex-Bestandteile ergab, dass während der Spermiogenese tatsächlich zwei neue, strukturell einzigartige LINC-Komplexe gebildet werden, die darüber hinaus auf den entgegengesetzten Seiten differenzierender Spermatischen polarisieren. Da sie den Kern dort an jeweils spezielle Zytoskelettelemente binden könnten, wurde in dieser Arbeit das Modell der LINC-Komplex vermittelten Umformung des Spermienkopfes aufgestellt.

Insgesamt trägt diese Arbeit durch die funktionelle Analyse von Lamin C2 und die Identifizierung neuer LINC-Komplexe dazu bei, die Wichtigkeit der Kernhülle für die Spermatogenese zu vertiefen und auszuweiten.

## Summary

The nuclear envelope is a double membranous structure enclosing the most typical eucaryotic feature, the cell nucleus. It is composed of an inner and an outer nuclear membrane as well as a nucleoplasmic lamina which is closely connected to the inner nuclear membrane by a number of associated proteins. Thus, besides just separating nuclear and cytoplasmic structures the nuclear envelope is functionally involved in many regulatory processes; i.e controlling of the genomic activity, nucleo- and cytoplasmic signaltransduction and, importantly, nuclear positioning and maintenance of nuclear architecture.

Evidence emerges that the nuclear envelope also plays a fundamental role in the differentiation process of germ cells, gametogenesis, likely being responsible for yet unexplained human infertility. In order to expand the knowledge concerning impact and functions of the nuclear envelope for the mammalian germ line selected components and special characteristics of the germ cell nuclear envelope have been investigated in this thesis. Thus, this might help to understand germ line specific dynamic, morphological and other essential processes - particularly in course of meiotic and postmeiotic differentiation in male mice.

Of great interest was lamin C2, a meiosis-specific A-type lamin essential for accurate meiosis and fertility of male mice. It has been shown that the targeted depletion of lamin C2 results in a severely defective meiosis and consequently in complete male infertility. Lamin C2-deficient male mice exhibit serious defects concerning pairing and synapsis of the homologous chromosomes. Thus, these mice are characterized by apoptotic spermatocytes and the complete absence of postmeiotic stages. It has been proposed that telomere movements along the nuclear periphery during prophase I might promote homologous but prevent heterologous chromosome association. Lamin C2 in turn is suggested to facilitate those meiotic telomere migrations by providing local flexibility to the telomeres attached to the nuclear envelope. Given that loss of lamin C2 causes decelerated telomere movements and defective homologous pairing afterwards, the situation in lamin C2-deficient spermatocytes could be explained.

Another central focus was the investigation of potential LINC complexes in differentiating and morphologically reorganizing postmeiotic cells. LINC complexes are proteinaceous structures formed by SUN-proteins at the inner and nesprins at the outer nuclear membrane that tether the cell nucleus to the surrounding cytoskeleton. Since this structural property is suggested to influence nuclear morphology and shaping, LINC complexes appear to be good candidates for participating in mammalian sperm head shaping. Detailed analysis of LINC complex components relevant for spermiogenesis revealed that two novel uniquely assembled LINC complexes are established in the male post meiotic germ line. Moreover, those LINC complexes were shown to polarize to opposite cell poles in differentiating spermatids probably linking to specialized cytoskeletal elements. Therefore, a model for the LINC complex mediated shaping and elongation of the mammalian sperm head has been proposed in this thesis.

Together, the functional analysis of lamin C2 as well as the identification of novel LINC complexes described in this thesis substantiates the fundamental role of the nuclear envelope for entire spermatogenesis.

## 2 Einleitung

Trotz erheblicher Fortschritte auf dem Gebiet der Reproduktionsmedizin ist Infertilität für heutige Generationen ein ernst zu nehmendes gesundheitliches und gesellschaftliches Thema. Bedenkt man, dass weltweit etwa 15% aller Paare ungewollt kinderlos bleiben, kann man sich die gesellschaftlichen Folgen, insbesondere für die stetig schrumpfenden, modernen Industrienationen, ausmalen.

Fertilität hängt von vielen Faktoren ab, in erster Linie jedoch davon, dass zwei, eine männliche und eine weibliche, befruchtungsfähige Keimzellen (Gameten) entstehen, die in der Lage sind, miteinander zu verschmelzen. Sind diese Bedingungen erfüllt, wird mit der Befruchtung der „Grundstein“ für die Entstehung eines neuen, vollständigen Lebewesens gelegt. Auch die Befruchtung selbst ist ein wesentliches Kriterium für Fertilität, denn durch sie wird bei den meisten Organismen das Geschlecht des entstehenden Lebewesen und daher die Richtung, in welche sich seine späteren Keimzellen differenzieren werden, festgelegt. Die Entwicklung der Keimzellen (Gametogenese) beginnt bereits während der frühestens Embryonalentwicklung mit der Einwanderung primordialer Keimzellen in die Gonadenanlagen und setzt sich mit der Differenzierung dieser Vorläuferzellen zu Oogonien bzw. Spermatogonien, weiblichen bzw. männlichen Keimbahnzellen, aus denen die reifen Gameten (Ei und Spermium) hervorgehen, fort. All diese Differenzierungsprozesse sind sehr komplex und involvieren eine Reihe von Regulationsmechanismen, deren molekulare Hintergründe bislang nur teilweise entschlüsselt sind. Unverkennbar ist jedoch, dass bereits das geringfügige Eingreifen in einen dieser wohlkoordinierten Prozesse zu erheblichen Störungen im gesamten Fortpflanzungsprozess und somit zu Infertilität führen kann.

Die Ursachen von Infertilität können sehr vielfältig sein. Insgesamt gehen sie dennoch mehrheitlich auf anatomische Defekte, fehlerhafte Gametogenese, endokrinologische und immunologische Probleme sowie auf umweltbedingte Schädigungen zurück. Bis auf letztere, welche auf gesellschaftliche sowie naturliche Probleme zurückzuführen sind, haben diese Störungen meist einen pathologischen Hintergrund. Obwohl bereits einige infertile Erkrankungen mit genetischen Defekten in Verbindung gebracht wurden, sind immer noch gut ein Viertel aller Fälle von Infertilität idiopathischer Natur, und zwar bei beiden Geschlechtern gleichermaßen. Aufgabe der Grundlagenforschung ist es nun, molekulare Mechanismen von Fertilität sowie genetische Ursachen von Infertilität zu entschlüsseln, um ein grundlegendes Verständnis dieser essentiellen Differenzierungsprozesse zu erhalten. Durch die gezielte Generation von über 400 mutanten Mausmodellen mit in- oder zumindest subfertilem Phänotyp konnten auf diesem Gebiet erhebliche Fortschritte erzielt werden. Besonders in den letzten Jahren wurden zahlreiche Gene identifiziert, deren Mutation oder gar deren kompletter Verlust Infertilität bei Mäusen verursacht, und die darüber hinaus auch mit humaner Infertilität in Zusammenhang stehen (Übersichten in Matzuk und Lamb, 2002; 2008).

Bemerkenswerterweise haben nicht all diese Gene bzw. deren Genprodukte, meist Proteine aber auch kleine nichtkodierende RNAs, ein ausschließlich keimbahnspezifisches Expressionsmuster. Vielmehr wurden Proteine aus nahezu allen zellulären Bereichen identifiziert, die an der Ausbildung eines gut funktionierenden

Reproduktionssysteme beteiligt sind; auch wenn sie in keimbahnabhängigen Prozessen teilweise andere Funktionen übernehmen als in ihrem sonstigen somatischen Umfeld.

Es mehren sich die Hinweise, dass auch die Kernhülle, jene Struktur, die den eukaryotischen Zellkern eingrenzt, entscheidenden zur Differenzierung von Keimzellen beiträgt. In mehreren unabhängigen Arbeiten konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass sich die Keimzellkernhülle in ihrer Zusammensetzung beträchtlich von der somatischer Zellen unterscheidet und vor allem auch, dass gewisse Kernhüllenkomponenten essentiell für die Fertilität eines Lebewesens sind.

Um die Rolle der Kernhülle in der Keimbahn generell besser verstehen zu können, wurden in dieser Arbeit ausgewählte Bestandteile der Keimzellkernhülle untersucht. Im Mittelpunkt standen dabei Beschaffenheit, Funktionen sowie Besonderheiten der Kernhülle während der Gametogenese, insbesondere während der meiotischen und der postmeiotischen Differenzierungsphase bei männlichen Mäusen.

Um einen Überblick über die Kernhülle im Allgemeinen zu erhalten und so deren besondere Rolle in Keimzellen deuten zu können, befasst sich der erste Abschnitt der Einleitung zunächst mit dem grundsätzlichen Aufbau der Kernhülle in somatischen Zellen. Im Anschluss daran, im zweiten Abschnitt, werden schließlich strukturelle und organisatorische Besonderheiten der Kernhülle während der Gametogenese erläutert, wobei vorher kurz die wichtigsten Differenzierungsprozesse der Gametogenese am Beispiel des Modellorganismus *Mus musculus* vorgestellt werden.

## 2.1 Die somatische Kernhülle und deren Bestandteile

Rein augenscheinlich betrachtet, liegt die Hauptaufgabe der **Kernhülle** darin, den Zellkern physikalisch vom übrigen, ihn umgebenden zellulären Material, dem Zytoplasma, abzugrenzen. Der Zellkern ist das wohl bedeutendste und zugleich namensgebende Charakteristikum eukaryotischer Zellen. Er beinhaltet mit Ausnahme des mitochondrialen Ringchromosoms das gesamte genetische Material in Form linearer Chromosomen und übernimmt so die Funktion einer übergeordneten Schaltzentrale auf zellulärer Ebene. Denn neben der Speicherung und Aufbewahrung der genetischen Information, laufen im Zellkern zentrale Prozesse wie Replikation, Transkription und RNA-Prozessierung und ein Teil der Ribosomenbiosynthese ab (Mekhail und Moazed, 2010).

Allerdings sind die Kompartimentalisierung des genetischen Materials sowie die räumliche Trennung nukleärer und zytoplasmatischer Prozesse bei weitem nicht die einzigen Funktionen der Kernhülle; sie ist vielmehr ein komplexes Gebilde, das Wechselbeziehungen innerhalb des Zellkerns aber auch zwischen Kern und Zytoplasma reguliert. So ist sie beispielsweise an der Steuerung der genomischen Aktivität, an der Übertragung von Signalkaskaden sowie am Kernim- und -export beteiligt. Zudem spielt die Kernhülle eine zentrale Rolle bei der Positionierung des Zellkerns bzw. nukleärer Bestandteile innerhalb der Zelle bzw. innerhalb des Kerns (Übersichten in Gruenbaum et al., 2005; Burke und Stewart, 2006; Burke und Roux, 2009; Alsheimer, 2009).

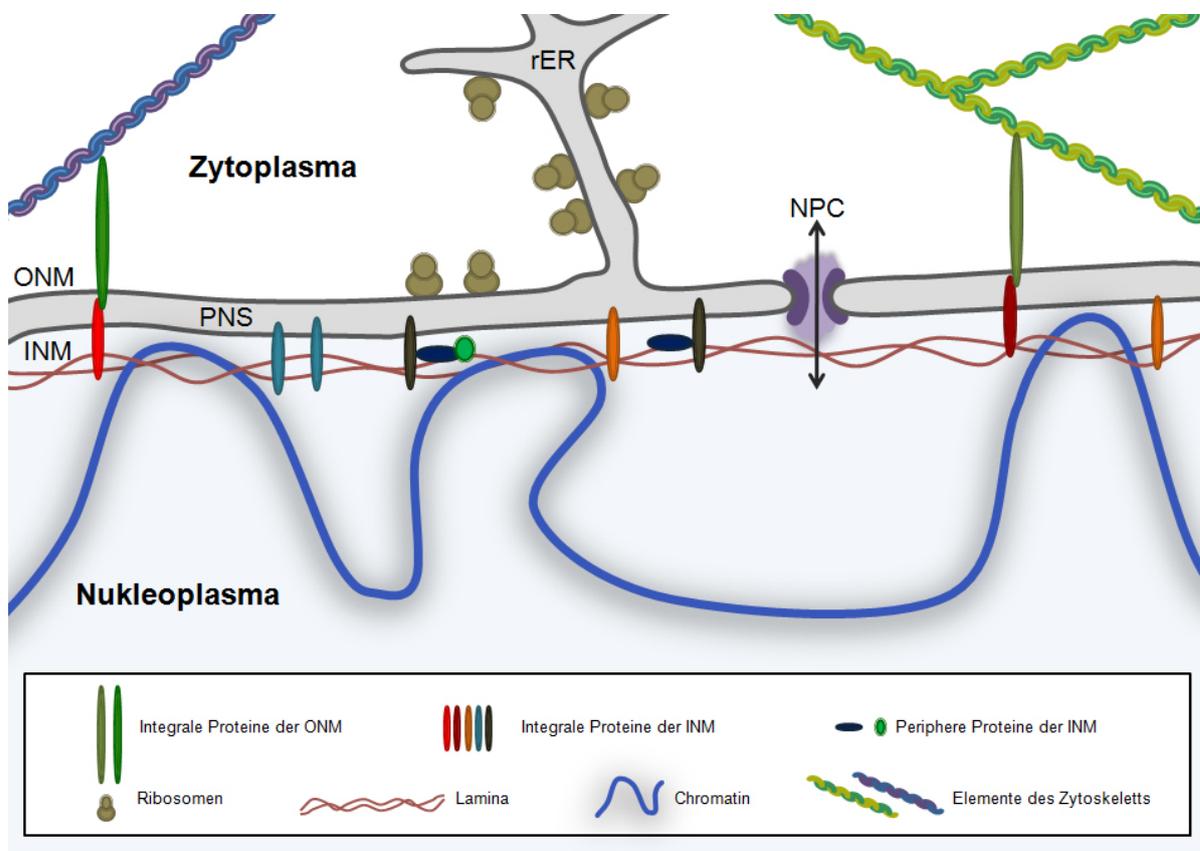


Abbildung 1. Organisation der Kernhülle somatischer Zellen. Die schematische Darstellung zeigt die Kernhülle einer somatischen Zelle im Querschnitt, mit einer äußeren Kernmembran (ONM), die in das raue endoplasmatische Retikulum (rER) übergeht, und einer inneren Kernmembran (INM), die in enger Wechselbeziehung zur Lamina und dem Chromatin steht. Repräsentativ sind weiterhin integrale

und periphere Membranproteine, ein Kernporenkomplex (NPC), an die ONM und die Membranen des rER angelagerte Ribosomen sowie Elemente des Zytoskeletts, die an der Verankerung des Zellkerns beteiligt sind, dargestellt.

Morphologisch gesehen baut sich die Kernhülle aus einem komplexen Membransystem, bestehend aus **innerer** und **äußerer Kernmembran** (INM: inner nuclear membrane; ONM: outer nuclear membrane), sowie einem darunter liegenden filamentösen Netzwerk, der **Kernlamina**, auf (Schirmer und Gerace, 2005; Abbildung 1). Da die INM aufgrund zahlreicher Protein-Protein-Interaktionen mit der darunterliegenden Kernlamina in direkter Verbindung steht, bilden INM und ONM zusammen mit der Lamina das Kontinuum der Kernhülle (Gruenbaum et al., 2003). Der intrazelluläre Austausch von Makromolekülen und anderen löslichen Stoffen zwischen Nukleo- und Zytoplasma wird durch Kernporenkomplexe (NPC: nuclear pore complex) gewährleistet. NPCs sind Multiproteinkomplexe, die die Kernhülle als wässrige Hohlräume in regelmäßigen Abständen durchziehen, wobei INM und ONM an den Kontaktstellen zu den NPCs direkt miteinander fusionieren (Görlich und Kutay, 1999).

Da das Augenmerk in dieser Arbeit besonders auf speziellen Komponenten der INM (**Proteine mit einer SUN-Domäne**), der ONM (**Proteine mit einer KASH-Domäne**) und der Lamina (**Lamin C2**; meiosespezifisches A-Typ Lamin) bei Säugetieren lag, werden diese in den nun folgenden Abschnitten näher vorgestellt.

### 2.1.1 Innere und Äußere Kernmembranen

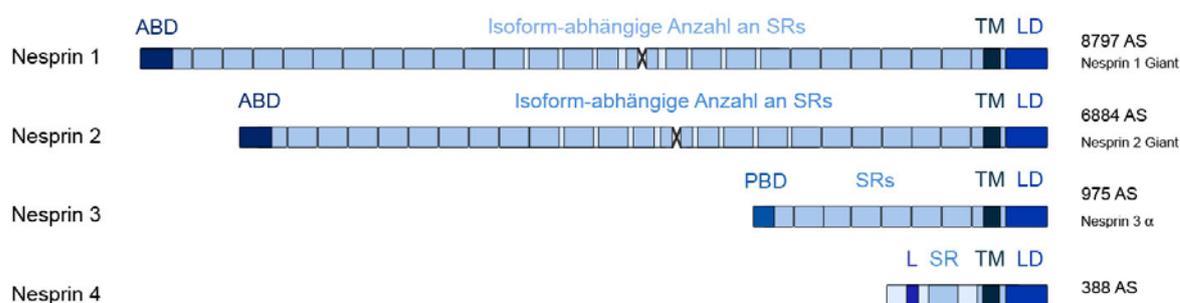
Die INM und die ONM bilden zusammen das membranöse Grundelement der Kernhülle. Sie umhüllen als parallel angeordnetes, konzentrisches Doppelmembransystem das gesamte Nukleoplasma und werden durch einen 30-50 nm breiten Spalt, den perinukleären Raum (PNS: perinuclear space) voneinander getrennt (Hetzer und Wente, 2009). Obwohl beide Phospholipidschichten an den NPCs direkt miteinander in Verbindung und daher in stetem Molekülaustausch stehen, unterscheiden sie sich in ihrem Aufbau doch beträchtlich. So sind beide Membranen mit einer jeweils distinkten Lipidzusammensetzung sowie spezialisierten Membranproteinen ausgestattet, die ihnen ihre unterschiedlichen zellulären Funktionen ermöglichen.

Während die INM unverzweigt dem Nukleoplasma bzw. der Kernlamina zugewandt ist, geht die ONM auf zytoplasmatischer Seite kontinuierlich in das raue endoplasmatische Retikulum (rER) über (Abbildung 1). Infolge dessen ist die ONM an den Verbindungsstellen zum rauen ER auch meist mit Ribosomen besetzt, was die sofortige Translation und Insertion integraler Kernhüllenproteine in die ONM erlaubt. Auch Proteine der INM gelangen auf diese Weise an ihren Bestimmungsort, denn sie können lateral über die Porenmembranen - an den NPCs fusionierte INM und ONM - in den dem Nukleoplasma zugewandten Teil der Kernhülle diffundieren (Ohba et al., 2004; Lusk et al., 2007). Die Retention der so inserierten Proteine erfolgt dann über eine direkte Interaktion mit der Lamina, dem Chromatin oder anderen nukleären Faktoren (Holmer und Worman, 2001).

#### 2.1.1.1 Proteine der äußeren Kernmembran: Nesprine

Wie bereits angesprochen, weisen INM und ONM deutliche Unterschiede bezüglich ihrer Proteinausstattung auf. Die ONM ist im Gegensatz zur INM, in die zahlreiche integrale Proteine eingelagert sind, geradezu proteinarm. Hauptvertreter der integralen Proteine der ONM sind Proteine mit einer evolutionär

konservierten, lumenalen KASH- (Klarsicht/Anc1/Syne Homologie) Domäne; bei Säugern die Proteinfamilie der **Nesprine** (Starr und Fischer, 2005). Bislang konnten der KASH Proteinfamilie der Säuger vier Gene zugeschrieben werden, die für die Proteine Nesprin1 (auch Syne1, Nesp1G oder Enaptin; Apel et al., 2000; Zhang et al., 2001; Padmakumar et al., 2004), Nesprin2 (auch Syne2, Nesp2G oder NUANCE; Zhang et al., 2001; Zhen et al., 2002), Nesprin3 (Wilhelmsen et al., 2005) und Nesprin4 (Roux et al., 2009) kodieren (Abbildung 2). Bei deren Expression entstehen durch alternative Transkriptionsinitiation, -termination und durch alternatives Spleißen der prä-mRNA, vielfältige und zum Teil strukturell stark unterschiedliche Genprodukte; insbesondere für die ubiquitär exprimierten Nesprine 1 und 2, deren längste Isoformen über 500 nm lang sind (Zhang et al., 2001, Warren et al., 2005). An dieser Stelle sei erwähnt, dass nicht alle Spleißformen der Nesprine integrale Membranproteine der ONM sind. Es wurden bereits Varianten von Nesprin1 und 2 in der INM identifiziert und außerdem zytoplasmatische Vertreter, die keine Transmembrandomäne (TM) besitzen (Starr und Fischer, 2005; Morris und Randles, 2010; Haque et al., 2010).



**Abbildung 2. Die KASH-Domänen Proteine der Säuger.** Schematische Darstellung der KASH-Domänen Proteine der Maus (*Mus musculus*): Die Nesprine 1, 2, 3 und 4 werden von verschiedenen Genen kodiert, weisen jedoch als gemeinsames Merkmal eine KASH-Domäne auf. Diese setzt sich aus einem transmembranen (TM) Segment und einer kurzen lumenalen Domäne (LD) zusammen. Die Nesprine 1 sowie 2 und ihre Isoformen, die meist aufgrund variabler Spectrin Repeats (SR) voneinander unterschieden werden können, besitzen zudem N-terminale Aktin-Bindungs-Domänen (ABD). Den N-Terminus von Nesprin3 stellt eine Plektin-Bindungs-Domäne (PBD) dar. In der N-terminalen Region von Nesprin4 konnte ein Leucin-Zipper (L) sowie ein einziges Spectrin-Repeat identifiziert werden.

Gemeinsam ist allen Nesprinen eine N-terminale zytoplasmatische Zytoskelett-Bindungsdomäne sowie eine sich anschließende variable Abfolge sogenannter „Spectrin-Repeats“, aufeinanderfolgende Wiederholungen dreier antiparallel angeordneter ca. 160-Aminosäuren langer  $\alpha$ -Helices, die die Größe einer jeden Isoform festlegen (Djinovic-Carugo et al., 2002; Grady et al., 2005; Abbildung 2). In die ONM integrierte Nesprine zeichnen sich zudem durch eine C-terminale KASH Domäne aus, ein ca. 60 Aminosäuren langes, hochkonserviertes Sequenzmotif mit einer Sequenzverwandtschaft zu den namensgebenden ONM Proteinen Klarsicht (*Drosophila melanogaster*), Anc1 (*Caenorhabditis elegans*) und SYNE1 (*Homo sapiens*). Die KASH-Domäne setzt sich aus einem die ONM durchspannende Teilstück sowie einem kurzen Segment, das in den PNS reicht, zusammen (Mosley-Bishop et al., 1999; Starr und Fischer, 2005; Starr, 2009). Im PNS interagieren Nesprine über ihre KASH-Domänen mit Proteinen der INM, die eine SUN- (Sad1p/Unc84 Homologie) Domäne besitzen (Starr und Han, 2002; Crisp et al., 2006). Diese lumenale Interaktion dient zum einen der primären Lokalisation der Nesprine in der ONM. Von weit größerer Bedeutung ist jedoch, dass durch die Bindung von SUN- und KASH-Domäne im PNS ein die gesamte Kernhülle durchspannender Proteinkomplex entsteht, der das

Kernskelett bzw. die Lamina mit dem Zytoskelett verbindet: der LINC-Komplex (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton; Crisp et al., 2006; Tzur et al., 2006; Stewart-Hutchinson et al., 2008; siehe 2.2.2).

Wie bereits angesprochen, stellt der zytoplasmatische N-Terminus der Nesprine eine funktionelle Verbindung zum Zytoskelett her; und zwar abhängig von der jeweiligen Nesprin-Klasse zu Mikrotubuli, Aktin- oder Intermediärfilamenten. Auf diese Weise wird der Zellkern stabil mit dem Zytoskelett verbunden, wodurch er in einer bestimmten Zellregion positioniert, in einen anderen Bereich translokiert oder in seiner Morphologie umgestaltet werden kann (Übersicht in Mejat und Misteli, 2010). Die Anbindungen der vier Säuger-Nesprine an die verschiedenen Zytoskelettelemente sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1. KASH-Protein der Säuger und ihre Anbindung an das Zytoskelett.

Name (Isoform)	Expression	Zytoskelett-Element	Funktion	Referenz
Nesprin1	ubiquitär	Aktin-Filamente	Kernpositionierung; Kernverankerung	Apel et al., 2000 Zhang et al., 2001
Nesprin1-G		Mikrotubuli (über Kinesin 2, Dynein/Dynaktin-Komplex)	Kernbewegung	Fan und Beck, 2004 Zhang et al., 2009
Nesprin2	ubiquitär	Aktin-Filamente	Kernbewegung; Kernpositionierung; Kernverankerung	Apel et al., 2000 Haque et al., 2006
Nesprin2-G		Mikrotubuli (über Meckelin und MKS1)	Zentrosomenbewegung	Dawe et al., 2007
Nesprin3	ubiquitär	Intermediärfilamente (über Plektin)	Kernpositionierung; Kernverankerung	Wilhelmsen et al., 2005 Ketema et al., 2007
Nesprin4	gewebespezifisch	Mikrotubuli (über Kinesin1)	Zentrosomenassoziation und positionierung	Roux et al., 2009

Funktionen, Bestandteile und die Bedeutung des LINC Komplexes werden, genauso wie Proteine mit einer SUN Domäne, in den folgenden Abschnitten behandelt.

### 2.1.1.2 Proteine der inneren Kernmembran

Mit der INM sind zahlreiche integrale und periphere Membranproteine assoziiert, die weitreichende zelluläre Funktionen besitzen. Proteine der INM gewinnen zudem mehr und mehr an klinischer Bedeutung, da Mutationen in den zugehörigen Genen meist schwerwiegende Erbkrankheiten, sogenannte Envelopathien, zur Folge haben (Nagano und Arahata, 2000; Worman und Bonne, 2007). Bis zum heutigen Zeitpunkt geht man davon aus, dass über 80 verschiedene Proteine integral in die INM von Säugern eingelagert sind, von denen die meisten jedoch nicht näher charakterisiert sind (Schirmer und Gerace, 2005). In vielen Fällen sind integrale INM Proteine über ihre nukleoplasmatischen Regionen direkt in das Netzwerk der Kernlamina, als sogenannte Lamina assoziierte Proteine, eingebunden, was zu einer soliden Verknüpfung der Lamina an die INM führt. Diese stabile Wechselbeziehung zwischen Lamina und Lamina assoziierten Proteinen trägt vor allem zur Stabilisierung der

Kernmorphologie bei, ermöglicht aber auch die Übertragung zytoplasmatischer Signale ins Kerninnere und umgekehrt (Schirmer und Foisner, 2007). In Tabelle 2 werden einige bislang charakterisierte Membranproteine der INM von Säugetieren vorgestellt.

Tabelle 2. Membranproteine der INM bei Säugetieren.

Name	Eigenschaften/Funktionen	Expression	Assoziierte Proteine	Referenz
<b>BAF</b> Barrier-to-autointegration faktor	Linkerprotein; vermittelt die Assoziation von LEM-Domänen Proteinen mit dem Chromatin; Chromatinorganisation	ubiquitär	Chromatin Emerin Lap2 $\alpha$ Lap2 $\beta$ MAN1	Lin und Engelman, 2003 Shimi et al., 2004
<b>Emerin</b>	LEM-Domäne (Chromatin-Interaktion über BAF); mechanische Stabilisierung des Zellkerns; Mutationen im <i>EMD</i> -Gen führen zu X-chromosomaler Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie	ubiquitär	A-Typ Lamine B-Typ Lamine BAF GCL MAN1 Sun1 und 2 Aktin	Bione et al., 1994 Tsuchiya et al., 1999
<b>GCL</b> Germ cell less	Transkriptions Co-Repressor; beteiligt an Regulierung der Genexpression	ubiquitär	Emerin Lap2 $\beta$ MAN1 Chromatin E2F	Jongens et al., 1992
<b>LBR</b> Lamin B Rezeptor	essentiell während der fötalen Entwicklung; Mutationen im <i>LBR</i> -Gen verursachen autosomal dominante HEM/Greenberg Skelettdysplasie oder autosomal rezessive Pelger-Huet Anomalie	ubiquitär	B-Typ Lamine HP1 Histone Chromatin	Worman et al., 1988 Waterham et al., 2003 Hoffmann et al., 2002
<b>Lap1 A,B,C</b> Lamina-assoziertes Polypeptid 1	LEM-Domäne (Chromatin-Interaktion über BAF); Kernhüllenorganisation	ubiquitär	A-Typ Lamine Lamin B1	Foisner und Gerace, 1993 Martin et al., 1995
<b>Lap2 <math>\beta, \gamma, \delta, \epsilon</math></b> Lamina-assoziertes Polypeptid 2	LEM-Domäne (Chromatin-Interaktion über BAF); Kernhüllenorganisation; Aufrechthaltung der Kernmorphologie Kernhüllenorganisation	ubiquitär	A-Typ Lamine B-Typ Lamine BAF Chromatin GCL	Foisner und Gerace, 1993 Harris et al., 1995 Cai et al., 2001
<b>LUMA</b>	wahrscheinlich Kernhüllenorganisation	gewebespezifisch	Emerin	Bengtsson und Otto, 2007
<b>MAN1</b>	LEM-Domäne (Chromatin-Interaktion über BAF); beteiligt an Signaltransduktionen; Mutationen im <i>LEMD3</i> -Gen führen zu autosomal rezessiv vererbter Melorheostose oder Buschke-Ollendorff Syndrom (autosomal rezessiv)	ubiquitär	BAF GCL Emerin A-Typ Lamine R-Smads	Lin et al., 2000 Liu et al., 2003 Hellemans et al., 2004
<b>Nesprin1</b>	Meist in der ONM lokalisiert, aber distinkte Isoformen auch in der INM; Bindung an nukleoplasmatisches Aktin; Aufrechthaltung der Kernmorphologie	gewebespezifisch	Aktin Emerin Lamin A	Mislow et al., 2002

<b>Nesprin2</b>	Meist in der ONM lokalisiert, aber distinkte Isoformen auch in der INM; Bindung an nukleoplasmatisches Aktin; Aufrechthaltung der Kernmorphologie	gewebe-spezifisch	Aktin Emerin Sun1 und 2	Haque et al., 2010
<b>Nurim</b>	sehr hydrophobes TM Protein	?	?	Rolls et al., 1999
<b>Sun1*</b>	SUN-Domäne (Interaktion mit KASH Domänen Proteinen: Aufbau des LINC-Komplexes; Retention von Nesprinen in INM); Verankerung/Positionierung des Zellkerns; Anheftung meiotischer Telomere	ubiquitär	A-Typ Lamine Emerin Nesprin1, 2, 3 und 4	Padmakumar et al., 2005 Crisp et al., 2006 Haque et al., 2006 Ding et al., 2007
<b>Sun2*</b>	SUN-Domäne (Interaktion mit KASH Domänen Proteinen: Aufbau des LINC-Komplexes; Retention von Nesprinen in INM); Verankerung/Positionierung des Zellkerns; Anheftung meiotischer Telomere	ubiquitär	A-Typ Lamine Emerin Nesprin1, 2, 3 und 4	Hodzic et al., 2004 Crisp et al., 2006 Schmitt et al., 2007

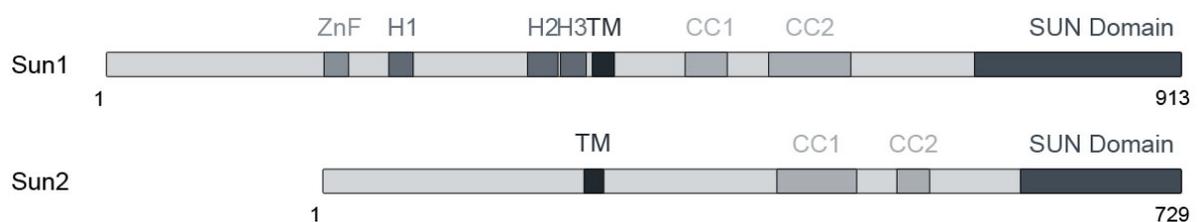
\* Die Proteine Sun1 und Sun2 werden gesondert unter 2.1.1.3 beschrieben.

### 2.1.1.3 Proteine der inneren Kernmembran mit einer SUN-Domäne

Die Säugerproteine Sun1 und Sun2 lokalisieren als integrale Membranproteinen in der INM und gehören der evolutionär konservierten **SUN-Proteinfamilie** an. Gemeinsames Merkmal dieser Proteinfamilie ist ein ca. 200 Aminosäuren langes, hochkonserviertes Sequenzmotif, das sich bei allen bisher identifizierten Familienmitgliedern am C-Terminus befindet. Da diese spezielle Proteindomäne erstmals bei den Proteinen Sad1p und Unc84 entdeckt und charakterisiert wurde, hat man sie als Sad1p/Unc84 Homologie-, oder kurz als SUN-Domäne, bezeichnet (Hagan und Yanagida, 1995; Malone et al., 1999). Unc84 ist ein integrales Membranprotein der INM, das während der Entwicklung des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* eine wichtige Rolle bei der Positionierung und Verankerung des Zellkerns spielt. Es wurde gezeigt, dass die Kernbewegungen in den P-Vorläuferzellen durch gezielte Mutationen im *Unc84* Gen unterbrochen werden, was unkoordinierte Kernbewegungen (UNC = uncoordinated movements) und letztlich das Absterben der P-Zellen zur Folge hat (Malone et al., 1999). Bei *Caenorhabditis elegans* wird noch ein weiteres Protein mit einer SUN-Domäne, SUN-1/Matefin, exprimiert, das genauso wie Unc84 in der INM lokalisiert, jedoch eher eine Funktion bei der Zentrosomenassoziation sowie bei der Differenzierung von Keimzellen hat (Fridkin et al., 2004). Sad1p ist das einzige SUN-Protein der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe*. Es ist wie alle SUN-Proteine in die INM eingelagert, polarisiert jedoch weitgehend, da es mit dem Spindelpolkörper, dem Mikrotubuli organisierenden Zentrum der Hefe, assoziiert (Hagan und Yanagida, 1995). Die Tatsache, dass neben niederen Eukaryoten wie *Saccharomyces cerevisiae* und *Dictyostelium discoideum*, Invertebraten wie *Drosophila melanogaster* und auch Pflanzen (z. B. *Arabidopsis thaliana*) Proteine mit einer SUN-Domäne, nämlich Mps3 (*S.c.*), Sun-1 (*D.d.*), Klaroid, Giacomo und Spag4 (*D.m.*) bzw. AtSun1 und AtSun2 (*A.t.*), exprimieren, unterstreicht die Konserviertheit dieser Proteindomäne (Jaspersen et al., 2006; Kracklauer et al., 2007; Xiong et al., 2008; Kracklauer et al., 2010; Graumann et al., 2010).

Das Genom der Säuger kodiert wenigstens für fünf Proteine mit einer SUN-Domäne: Sun1, Sun2, Sun3, Sun4 (Spag4) und Sun5 (Spag4L), wobei bislang einzig die großen, ubiquitär exprimierten SUN-Proteine Sun1

(101 kDa; 913 Aminosäuren bei *Mus musculus*) und Sun2 (83 kDa; 729 Aminosäuren bei *Mus musculus*) auf Proteinebene charakterisiert sind (Hodzic et al., 2004; Padmakumar et al., 2005). Sun3, Sun4 und Sun5 sind kleinere Vertreter der SUN-Proteinfamilie mit einer vermutlich gewebespezifischen Expression, deren Charakterisierung noch am Anfang steht (Hasan et al., 2006; Tzur et al., 2006; Liu et al., 2007). SUN-Domänen Proteine sind integrale Membranproteine der INM mit einer definierten Topologie (Abbildung 3): N-terminale Proteinregionen variabler Länge und Aminosäurezusammensetzung befinden sich auf der nukleoplasmatischen Seite der INM und werden durch eine die INM durchspannende Typ II TM Domäne vom C-Terminus getrennt, der in den PNS hineinreicht. Im lumenal gelegenen C-terminalen Bereich des Proteins liegen die SUN- und ein bis zwei Coiled-coil-Domänen, welche eine Di- bzw. Multimerisierung der SUN-Proteine sehr wahrscheinlich machen (Hodzic et al., 2004; Padmakumar et al., 2005; Crisp et al., 2006).



**Abbildung 3. Die SUN-Proteinfamilie der Säuger.** Schematische Darstellung der SUN-Domänen Proteine bei der Maus (*Mus musculus*): Sun1 und Sun2 zeigen ein ubiquitäres Expressionsmuster, werden aber von zwei unterschiedlichen Genen kodiert, und zwar von *UNC84A* (Sun1; Chromosom 5 G1; 23 Exons; Gene ID: 77053) und *UNC84B* (Sun2, Chromosom 15 E1, 18 Exons, Gene ID: 223697). Die relativen Positionen von Zink Finger (ZnF), hydrophoben Regionen (H1-H3), transmembranen (TM), Coiled-coil- (CC) und SUN-Domänen sind angegeben.

Aus Göb et al., 2010. doi:10.1371/journal.pone.0012072.g001

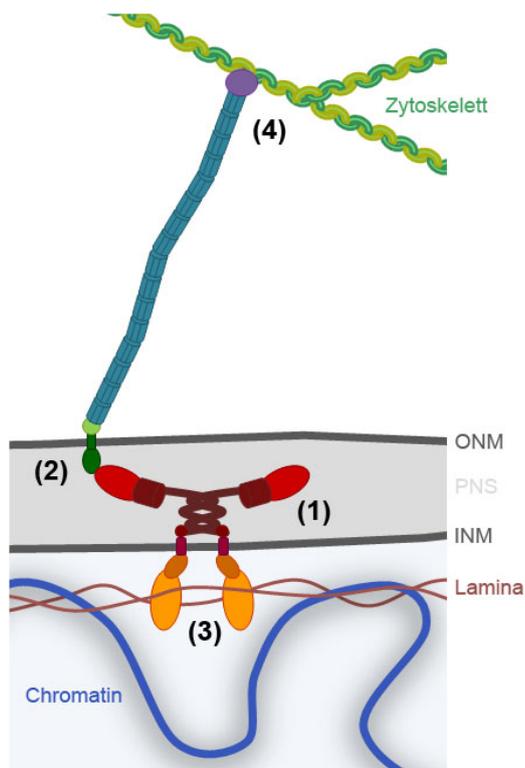
Für Sun1 und Sun2 konnte diesbezüglich bereits die distinkte Bildung von Homo- und Heterodimeren sowie der Aufbau höherer oligomerer Komplexe über Disulfidbrücken nachgewiesen werden (Lu et al., 2008). Im Nukleoplasma stehen die Proteine Sun1 und Sun2 über ihre sonst eher gering konservierten N-Termini in direkter Verbindung mit der Lamina, wobei beide Proteine präferenziell A-Typ Laminen gegenüber eine höhere Bindungsaffinität zeigen als B-Typ Laminen gegenüber (Padmakumar et al., 2005; Crisp et al., 2006). Trotz dieser Interaktion scheinen die Lamine A und C nicht unbedingt für die Lokalisation von SUN-Proteinen in der INM verantwortlich zu sein (Crisp et al., 2006; Haque et al., 2006). Diese Erkenntnisse lassen letztlich den Schluss zu, dass Sun1 und Sun2 für ihre Lokalisation und Zurückhaltung in der INM zusätzliche Interaktionspartner bzw. Signale benötigen. Mögliche Kandidaten wären in diesem Zusammenhang andere INM Proteine wie z. B. Emerin oder kurze Nesprinvarianten, für die bereits eine Interaktion mit den nukleären Domänen von Sun1 und Sun2 nachgewiesen wurden (Haque et al., 2010), aber auch Kernlokalisations- oder Retentionssignale, die zumindest bei der INM-Lokalisation von Sun2 eine Rolle spielen (Turgay et al., 2010). Auch Nesprine, die lumenalen Interaktionspartner der SUN-Proteine könnten eine Funktion bei der Retention von Sun1 und 2 haben, auch wenn sie an deren Primärlokalisation offensichtlich nur bedingt beteiligt sind (Turgay et al., 2010).

Die Tatsache jedoch, dass SUN-Proteine im Kerninneren mit dem Laminnetzwerk, dem im weitesten Sinne nukleären Skelett, und auf der anderen Seite der INM mit Nesprinen, den Linkerproteinen zum zellulären Skelett, wechselwirken, macht SUN-Proteine zu bedeutenden Spielern in der Kern-Zytoplasma-Verbindung.

Diese als LINC-Komplex bezeichnete Nukleo-Zytoskelett Brücke aus SUN- und KASH-Domänen Proteinen hat weitreichende zelluläre Funktionen, die im nun folgenden Abschnitt besprochen werden.

## 2.1.2 Der LINC-Komplex

LINC-Komplexe sind evolutionär hochkonservierte Proteingebilde, die nukleo- und zytoplasmatische Strukturen physikalisch miteinander verbinden. Am grundsätzlichen LINC-Komplex-Zusammenbau sind wenigstens vier Komponenten beteiligt, die jedoch von Organismus zu Organismus bzw. von Zelle zu Zelle stark variieren können:



**Abbildung 4. Struktureller Aufbau des LINC-Komplexes.** (1) SUN-Domänen Proteine bilden zusammen mit (2) KASH-Domänen Proteinen das Grundgerüst eines jeden LINC-Komplexes. Durch die Interaktion von SUN-Proteinen mit (3) Laminen/nukleären Komponenten und durch die Wechselwirkung von KASH-Proteinen mit (4) Elementen des Zytoskeletts entsteht eine Verbindung von Nukleo- und Zytoskelett. (In Anlehnung an Crisp et al., 2006).

(1) **SUN-Domänen Proteine**, integrale Proteine der INM, die durch ihre direkte Bindung im PNS an (2) **Nesprine**, KASH-Domänen Proteine der ONM, das Kernstück eines jeden LINC-Komplexes darstellen. Weiterhin führt die Interaktion von SUN-Proteinen im Kerninneren mit (3) **Laminen** bzw. anderen **nukleären Komponenten** und die Wechselwirkung von Nesprinen mit dem (4) **Zytoskelett** durch die Bindung an Aktin, Tubulin oder Plektin schließlich zur Vervollständigung des LINC-Komplexes (Abbildung 4).

Evolutionär gesehen ist die Struktur des LINC-Komplexes von niederen Eukaryoten bis hin zu hoch entwickelten eukaryotischen Organismen - wie Tieren und Pflanzen - stark konserviert, auch wenn sich dies nicht unbedingt in seinen einzelnen Komponenten widerspiegelt. Die Konserviertheit dieser Kern-Zytoplasma-Brücke deutet bereits auf die zelluläre Wichtigkeit und auch auf die vielfältigen Funktionen des LINC-Komplexes hin. So wurde einerseits die Beteiligung von LINC-Komplexen an statischen Prozessen wie der stabilen **Verankerung des Zellkerns** oder der **Assoziation des Zentrosoms** an die Kernhülle nachgewiesen (Malone et al., 2003; Starr, 2009).

Andererseits gehören auch dynamische Abläufe wie die **aktive und gezielte Positionierung des Zellkerns** in einer bestimmten Zellregion, die **Positionierung nukleärer Bestandteile** (z. B. meiotische Telomere), die **morphologische Umformung des Kerns** sowie gewisse Prozesse in der **Mitose** und der **Meiose** zum Aufgabenfeld von LINC-Komplexen, und zwar Spezies unabhängig (Schmitt et al., 2007; Ding et al., 2007; Chi et al., 2009; Olins et al., 2008; Xiong et al., 2008; Khatau et al., 2009; Übersicht in Burke und Roux, 2009).

Zahlreiche genetische Analysen an LINC-Komplex-Bestandteilen in verschiedenen Modellsystemen belegen darüber hinaus, dass der Aufbau funktionell fehlerfreier LINC-Komplexe Bedingung für ein normales Überleben des Organismus ist. Mutationen in SUN- oder KASH-Proteinen oder gar deren kompletter Verlust führen in vielen Fällen zu fehlerhaft aufgebauten LINC-Komplexen, und somit unweigerlich zu Defekten bei der

Kernverankerung, -bewegung und -organisation (Lee et al., 2002; Starr und Han, 2002; Malone et al., 2003; Penkner et al., 2007; Kracklauer et al., 2007; Grady et al., 2005; Stewart-Hutchinson et al., 2008; Puckelwartz et al., 2009; Ding et al., 2007; Chi et al., 2009; Lei et al., 2009; Übersicht in Mejat und Misteli, 2010). In Säugern hat der Verlust funktioneller LINC-Komplexe besonders gravierende Auswirkungen auf Muskelzellen, genauer gesagt auf die Organisation synaptischer Zellkerne in der neuromuskulären Endplatte, auf das Zentralnervensystem und die Entwicklung der Retina (Lei et al., 2009; Zhang et al., 2009; Yu et al., 2011). Während der Knock-out von *Syne-2* (*Nesprin2*) offensichtlich keine schwerwiegenden myopathischen Folgen hat, verursacht die homozygote Deletion von *Syne-1* (*Nesprin1*) alleine eine Fehllokalisierung synaptischer Kerne einhergehend mit schwerem myopathischem Phänotyp in betroffenen Mäusen. Allerdings scheint *Nesprin2*, nicht jedoch *Nesprin1*, eine essentielle Funktion bei der Bildung laminarer Strukturen im zerebralen Cortex und im Hippocampus während der Gehirnentwicklung zu haben (Zhang et al., 2009). Aufgrund dieser Resultate ist es nicht verwunderlich, dass *Syne-1:Syne-2* Doppel-Knock-out-Mäuse nicht lebensfähig sind und bei der Geburt an schwerer respiratorischer Insuffizienz sterben (Zhang et al., 2007). Ähnliches konnte bei *Sun1:Sun2* Doppel-Knock-out-Mäusen beobachtet werden, die ebenfalls erhebliche Defizite bei der Zellkernlokalisierung in der neuromuskulären Endplatte sowie bei der Ausbildung laminarer Strukturen im Gehirn aufweisen. Auch diese Tiere sind nicht lebensfähig und sterben kurz nach der Geburt (Lei et al., 2009; Zhang et al., 2009).

Die molekularen Ursachen dieser zum Teil gewebespezifischen Defekte sind noch nicht gänzlich entschlüsselt, können jedoch sehr weitreichend sein, wenn man sich die zahlreichenden Prozesse, an denen LINC-Komplexe beteiligt sind, vor Augen führt. Auffällig ist allerdings, dass Defizite beim Aufbau des LINC-Komplexes generell eine Misorganisation der Kernhülle zur Folge haben, was sich besonders an der Vergrößerung des PNS sowie einer morphologisch unregelmäßigen Kernhülle zeigt (Mittelbronn et al., 2008; Crisp et al., 2006; Xiong et al., 2008). Diese Beobachtungen, zusammen mit oben beschriebenen Phänotypen erinnern stark an sogenannte Lamino- und Envelopathien, breitgefächerte humane Krankheiten, die durch Mutationen in Laminen und Kernhüllenproteinen hervorgerufen werden (Worman und Bonne, 2007; Worman und Foisner, 2010). Charakteristisch für diese Erbkrankheiten ist die gewebespezifische Ausprägung, wobei meist die Muskulatur, das subkutane Fettgewebe oder das periphere Nervensystem betroffen sind. Die Entdeckung, dass Mutationen in den humanen *SYNE1* und *SYNE2* Genen, die für die Nesprine 1 und 2 kodieren, ebenfalls zu Laminopathie ähnlichen Phänotypen (Autosomal dominante Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie, Zhang et al., 2007; autosomal rezessive zerebellare Ataxie, Gros-Louis et al., 2007; autosomal rezessive Arthrogryposis/angeborene Gelenksteife, Attali et al., 2009) führen, unterstreicht die zelluläre Relevanz dieser Proteine und somit die des gesamten LINC-Komplexes. Für die SUN-Gene wurden bislang noch keine Laminopathie-auslösenden Mutationen identifiziert (Mejat und Misteli, 2010).

Bemerkenswerterweise haben nicht alle Mutationen bzw. Deletionen von LINC-Komplex-Bestandteilen phänotypische Auswirkungen auf betreffenden Organismus. Der Verlust von *Sun1* alleine resultiert beispielsweise lediglich in der Infertilität *Sun1*-defizienter Mäuse. Alle somatischen Zellen erscheinen phänotypisch völlig unauffällig, was vermutlich an einer Funktionsübernahme und der Kompensation durch *Sun2* liegt (Ding et al., 2007; Chi et al., 2009). Auch *Syne1* bzw. *Syne2* Einzel-Knock-out-Mäuse zeigen weitaus weniger stark ausgeprägte Phänotypen als Doppel-Knock-out-Mäuse (Zhang et al., 2009), eine Tatsache, die

ebenfalls für eine Redundanz der jeweiligen LINC-Komplex-Bestandteile spricht. Die Voraussetzung dafür, dass ein Protein die Aufgabe eines anderen übernehmen und dadurch dessen Verlust kompensieren kann, ist jedoch, dass es in der Lage ist, mit denselben Interaktionspartnern wechsel zu wirken. Im Falle des Säuger-LINC-Komplexes ist diese Voraussetzung erfüllt, denn bisher scheinen SUN- und KASH-Domänen Proteinen promiskuitiv miteinander interagieren zu können (Stewart-Hutchinson et al., 2008).

### 2.1.3 Kernlamina und Lamine

Im Kerninneren erstreckt sich dicht anliegend an die INM das polymere Netzwerk der Kernlamina. In somatischen Zellen kleidet diese relativ dünne (~20 nm), netzwerkartig aufgebaute Struktur die gesamte Kernperipherie aus und steht dabei sowohl mit Komponenten der INM, mit löslichen Proteinen als auch mit dem Chromatin in Verbindung.

Hauptkomponenten der Kernlamina sind Lamine. Lamine gehören zur großen Gruppe der Intermediärfilamentproteine, eine Fibrillen und Netzwerke bildende Proteinfamilie, die in Zellen und Geweben für physikalische Festigkeit sorgt. Anders jedoch als die zytoplasmatischen Intermediärfilamente, deren Vorkommen sich auf wenige Tiergruppen beschränkt, sind Lamine (Typ V Intermediärfilamentproteine) ausschließlich im Kern und zudem in den Zellen aller Metazoen zu finden. Die Lamin-Gene haben sich offensichtlich im Laufe der Metazoen-Evolution vervielfältigt und zu Genen für zytoplasmatische Intermediärfilamente weiter differenziert (Stuurman et al., 1998; Alberts et al., 2002). Dementsprechend sind Lamine und alle anderen Intermediärfilamentproteine strukturell nach einem einheitlichen Grundprinzip aufgebaut (Abbildung 5): Eine zentrale  $\alpha$ -helikale Stäbchendomäne, die die Dimerbildung ermöglicht, wird von einer globulären N-terminalen Kopf- und einer ebenfalls globulären C-terminalen Schwanz-Domäne flankiert (Krohne, 1998; Stuurman et al., 1998). Bei Laminen besteht die zentrale Stäbchendomäne aus den vier  $\alpha$ -helicalen Segmenten 1A, 1B, 2A und 2B, die durch drei konservierte Linkerbereiche voneinander getrennt werden (McKeon et al., 1986). Da es sich bei Laminen außerdem um nukleoplasmatische Proteine handelt, besitzen sie ein NLS im C-terminalen Bereich (Krohne, 1998; Stuurman et al., 1998).

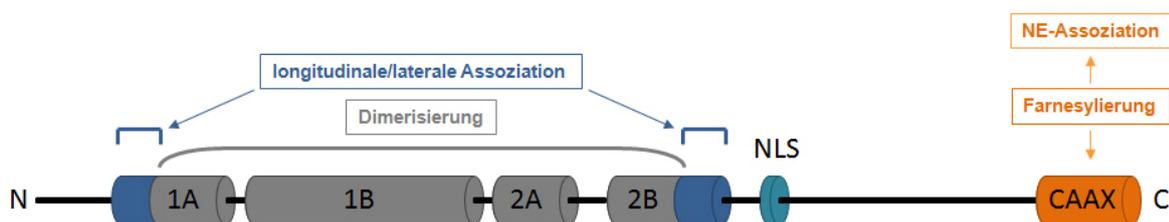


Abbildung 5. Struktureller Aufbau eines Kernlamins.

Auch wenn beide Proteingruppen, Lamine und zytoplasmatische Intermediärfilamente, einen gemeinsamen charakteristischen Grundbauplan haben und sich außerdem erst zu polymeren Strukturen höherer Ordnung zusammenlagern müssen, um ihre zellulären Funktionen zu erfüllen, unterscheiden sie sich doch beträchtlich in ihren Polymerisationseigenschaften sowie in den reifen Polymeren. Während sich Intermediärfilamente in typischen 10 nm Fibrillen organisieren, ist es das Bestreben der Lamine, ein

querverzweigtes Netzwerk auszubilden. Dazu lagern sich zunächst zwei Lamin-Monomere durch Ausbildung von Coiled-coil-Strukturen im  $\alpha$ -helikalen Mittelstück zu Homodimeren zusammen, die dann durch longitudinale und laterale Assoziationen zu Polymeren höherer Ordnung werden. Verantwortlich für diese Assoziationen sind unter anderem zwei hydrophobe Proteinbereiche, die N- und C-terminal der Stäbchendomäne liegen (Stuurman et al., 1998; Übersicht in Burke und Stewart, 2006). Aufgrund unterschiedlicher biochemischer und struktureller Eigenschaften unterscheidet man grundsätzlich zwischen A- und B-Typ Laminen (Tabelle 3).

Tabelle 3. A- und B-Typ Lamine der Säuger im Vergleich.

A-Typ Lamine	B-Typ Lamine
neutraler isoelektrischer Punkt	saurer isoelektrischer Punkt
von einem Gen kodiert ( <i>LMNA</i> )	von zwei Genen kodiert ( <i>LMNB1</i> , <i>LMNB2</i> )
gewebe- und differenzierungsspezifisch exprimiert	ubiquitär exprimiert
Gendefekte führen meist zu gewebespezifischen Krankheiten (Laminopathien)	Gendefekte sind meist letal
CAAX-Box nur im Prä-Lamin A vorhanden; wird während der Prozessierung entfernt	CAAX-Box in allen B-Typ Laminen vorhanden; verbleibt stabil am Protein
während der Mitose löslich im Zytoplasma	während der Mitose membranassoziiert

Bei Säugern kodieren zwei eigenständige Gene für die B-Typ Lamine B1, B2 und B3, wobei Lamin B1 aus dem *LMNB1* und die Lamine B2 und B3 durch alternative Transkriptionsinitiation aus dem *LMNB2* Gen hervorgehen (Höger et al., 1988; Zewe et al., 1991; Furukawa und Hotta, 1993; Abbildung 6). Die Lamine B1 und B2 sind saure Proteine, die ab der frühesten Embryonalentwicklung ubiquitär exprimiert werden und, insbesondere Lamin B1, für das Zellüberleben essentiell sind (Vergnes et al., 2004). Lamin B3 ist eine N-terminal verkürzte, keimzellspezifische Variante von Lamin B2, die ausschließlich während der Spermiogenese auftritt (Schütz et al., 2005a). Alle A-Typ Lamine (Lamin A, A  $\Delta$ 10, C und C2) entstehen durch alternatives Spleißen bzw. alternative Transkriptionsinitiation und -termination eines einzigen Gens, des *LMNA* Gens (Fisher et al., 1986; Abbildung 6). Anders als B-Typ Lamine zeigen A-Typ Lamine ein gewebe- und differenzierungsabhängiges Expressionsmuster: So sind die somatischen A-Typ Lamine A und C während der Embryonalentwicklung erst mit Beginn der Differenzierung von Geweben nachzuweisen. Lamin C2 ist, wie Lamin B3, eine N-terminal verkürzte, keimbahn-spezifische Isoform, tritt aber im Gegensatz zu diesem in der meiotischen Phase der Keimzell-differenzierung auf (Alzheimer und Benavente, 1996; Alzheimer et al., 2000). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die beiden keimbahn-spezifischen Lamine B3 und C2 erheblich dynamischer sind als ihre somatischen Pendanten B1, B2, A und C. Es konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Dynamik von Lamin B3 und C2 aus der Abwesenheit N-terminaler Bereiche resultiert, die eigentlich für die longitudinale und laterale Assoziation der Lamine zu stabilen Netzwerken nötig sind (Schütz et al., 2005b; Jahn et al., 2010).

Um mit der INM assoziieren zu können und so an ihren endgültigen Bestimmungsort zu gelangen, werden Lamine posttranslational modifiziert. So werden die B-Typ Lamine sowie Lamin A in mehreren enzymatischen Schritten C-terminal an der CAAX-Box isoprenyliert, wodurch sie einen hydrophoben Farnesylrest erhalten, der ihnen die Lokalisation an die INM ermöglicht (Kitten und Nigg, 1991; Krohne, 1998). Damit ist die Modifikation bei B-Typ Laminen abgeschlossen, sie bleiben permanent farnesyliert, weshalb sie auch während

der Mitose, wenn sich die Kernhülle auflöst, mit Membranen assoziieren. Lamin A hingegen, das im Zustand mit isoprenylierter CAAX-Box als Prä-Lamin A bezeichnet wird, wird weiter modifiziert: Durch proteolytische Abspaltung der letzten rund 20 Aminosäuren, inklusive modifizierter CAAX-Box, reift Prä-Lamin A zum fertig modifizierten Lamin A (Übersicht in Meshorer and Gruenbaum, 2008; Abbildung 6). Lamin C, das überhaupt keine CAAX-Box und dementsprechend auch keinen Membrananker besitzt, wird über Lamin A an die Kernhülle rekrutiert (Vaughan et al., 2001). Auch Lamin C2, die meiosespezifische A-Typ Laminvariante, hat keine CAAX-Box und kann, da es in meiotischen Zellen das einzige A-Typ Lamin ist, nicht durch Lamin A zur INM rekrutiert werden. Dafür erhält der N-Terminus von Lamin C2, der durch das Hexapeptid GNAEGR eine Myristoylierungsstelle darstellt, durch posttranslationale Modifikation eine Myristoylgruppe, die wie der Farnesylrest von Prä-Lamin A als Membrananker dient (Alzheimer et al., 2000).

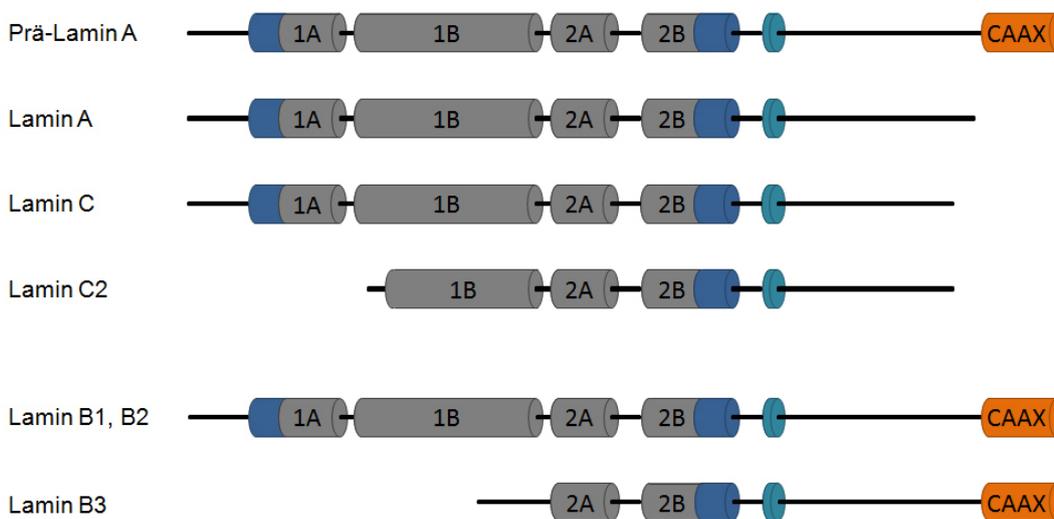


Abbildung 6. Die Lamine der Säuger.

Ähnlich wie es die Aufgabe zytoplasmatischer Intermediärfilamente ist, die Zelle vor mechanischer Beanspruchung zu schützen, liegt die Hauptaufgabe der Kernlamina in der physikalischen Stabilisierung des Zellkerns. Strukturelle Anomalitäten im Aufbau der Kernlamina führen daher unweigerlich zu einem Verlust der mechanischen Belastbarkeit, was in mehreren biophysikalischen Untersuchungen an Lamin A/C-defizienten embryonalen Mausfibroblasten (*Lmna*<sup>-/-</sup> MEFs) belegt werden konnte (Lammerding et al., 2004; Broers et al., 2004; Lee et al., 2007). Auch wenn die Lamina einen entscheidenden Betrag zur Formerhaltung des Zellkerns leistet, sind ihre weiteren Funktionen bei weitem nicht nur strukturgebender Art. So spielen Lamine eine wichtige Rolle bei der Chromatinorganisation und der Genexpression, wobei genarme Chromatinbereiche, Telomere und Zentromere enger mit der Lamina assoziieren als transkriptionell aktives Chromatin. Weiterhin wird die Lamina mit der Replikations-, Transkriptions- und der Apoptose-Regulation sowie mit intrazellulären Signalwegen in Zusammenhang gebracht (Übersicht in Burke und Stewart, 2006).

Während Mutationen in den Genen *LMNB1* und *LMNB2* meist letal sind, führen Defekte im *LMNA* Gen zum allgemeinen Krankheitsbild der Laminopathien. Das sind schwere degenerative Krankheiten, die sich jedoch je nach mutierter Stelle im *LMNA* Gen erheblich im Schweregrad der Erkrankung sowie im betroffenen Gewebe von einander unterscheiden. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden rund 200 verschiedene Mutationen in über 900

Patienten identifiziert, deren phänotypische Ausprägungen stark variieren (Übersichten in Gruenbaum et al., 2005; Stewart und Burke, 2006). Es existieren bislang mehrere Mausmodelle mit denen man den Phänotyp der humanen Laminopathien erfolgreich nachgestellt hat. Dabei zeigen *Lmna*<sup>-/-</sup> Mäuse, Mäuse, die weder Lamin A noch C exprimieren, den gravierendsten Phänotyp, da sie so gut wie alle gewebespezifischen Ausprägungen in sich vereinen. Betroffene Mäuse leiden an schwerer Muskeldystrophie, Lipodystrophie und massiven Schädigungen des peripheren Nervensystems und sterben im Alter von etwa 5 Wochen (Sullivan et al., 1999).

Nachdem die somatische Kernhülle und vor allem ihre für diese Arbeit besonders relevanten Komponenten detailliert vorgestellt wurden, befasst sich der nun folgende Abschnitt mit der Kernhülle von Keimzellen sowie mit der Beschreibung ihrer Besonderheiten während der Differenzierung meiotischer und postmeiotischer Zellen.

## 2.2 Besonderheiten der Kernhülle während der Gametogenese

Die Kernhülle von Keimzellen unterscheidet sich beträchtlich von der somatischer Zellen. So ändern sich sowohl Proteinzusammensetzung als auch deren Verteilung innerhalb der Kernhülle, wenn eine Zelle in die Keimbahn eintritt, und auch die Kernlamina erscheint dünner und aufgelockerter als die in somatischen Zellen (Vester et al., 1993). Im Allgemeinen sind bei der Keimzellkernhülle drei Phänomene zu beobachten: (1) Geringere Expression und (2) Umverteilung/Polarisierung von Kernhüllenkomponenten. (3) Expression keimbahnspezifischer Proteine bzw. Spleißvarianten sonst somatischer Proteine.

Bevor allerdings näher auf die Rolle und besondere Strukturen der Keimzellkernhülle eingegangen wird, soll zunächst der Prozess der Gametogenese am Beispiel des Modellorganismus *Mus musculus* vorgestellt werden.

### 2.2.1 Die Gametogenese beim Modellorganismus *Mus musculus*

Die Gametogenese der Maus ähnelt in vielerlei Hinsicht der des Menschen. Daher eignet sie sich sehr gut, essentielle säugertypische Keimzellendifferenzierungsprozesse und -komponenten zu untersuchen und gewonnene Erkenntnisse schließlich auf den Menschen zu übertragen.

Die Gametogenese beginnt bereits sehr früh während der Embryonalentwicklung mit der Einwanderung primordialer Keimzellen in die Gonadenanlagen. Dort differenzieren sich die Urkeimzellen in mehreren genetisch und hormonell regulierten Prozessen zunächst zu Gonocyten, selbst regenerierbaren Stammzellen, aus denen schließlich die haploiden, reifen Gameten hervorgehen. Dazu müssen die Keimzellen die Meiose, eine besondere Art der Zellteilung, die darauf abzielt das Genom zu haploidisieren, sowie im Falle der männlichen Gametogenese eine morphologische Differenzierungsphase durchlaufen. Auch wenn die Erzeugung haploider befruchtungsfähiger Gameten in der Keimzellendifferenzierung beider Geschlechter oberstes Ziel ist, unterscheiden sich Oogenese, die Differenzierung weiblicher Keimzellen (Eier), und Spermatogenese, die Differenzierung männlicher Keimzellen (Spermien) doch beträchtlich von einander, wie sie dieses Ziel erreichen. Die Hauptunterschiede sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4. Oogenese und Spermatogenese der Säuger im Vergleich.

	Oogenese	Spermatogenese
<b>Keimzellproduzierendes Organ</b>	Ovar	Testis
<b>Zeitraum der Keimzellproduktion</b>	meiotische Phase beginnt embryonal; dann zyklische Oocytenreifung von der Pubertät bis zur Menopause	kontinuierliche Keimzellproduktion von der Pubertät bis zur Seneszenz
<b>Arretierung</b>	Oocytenreifung wird zweimal unterbrochen: Prophase I Arrest (bis zur Pubertät) Metaphase II Arrest (bis zur Befruchtung)	Nein: alle Differenzierungsphasen laufen ohne Unterbrechung ab; Dauer beim Mensch ca. 70 Tage; Dauer bei der Maus ca. 35 Tage

mitotische Vermehrung der Gonien	embryonal abgeschlossen	ab Embryonalentwicklung lebenslang	
Reifeteilung (Meiose) resultiert in	einer großen, haploiden Oocyte und drei kleineren auch haploiden Polkörperchen	vier gleich großen, haploiden Spermatozoen	
Wachstumsphase	Follikulogenese (starke Vergrößerung der Oocyten durch Zytoplasmaleinlagerung)	nein	
postmeiotische Differenzierungsphase	nein	Spermiogenese (morphologische Umgestaltung der haploiden Spermatozoen von rund zu elongiert; inklusive der Ausbildung von Akrosom und Flagellum)	
Keimzellmorphologie	große, sehr zytoplasmareiche und immobile Oocyte	kleine, mobile Spermatozoen, die so gut wie kein Zytoplasma besitzen	
Hormone	<b>LSH</b> (Follikel-stimulierendes Hormon)	Reifung der Follikelkohorte und des dominanten Follikels; Stimulierung der Granulosazellen zur Umwandlung von Androgenen in Östrogene; Estradiolproduktion durch den dominanten Follikel führt zu Senkung des FSH-Spiegels: nur noch Reifung des dominanten Follikels	Aktivierung der Sertolizellen (Regulierung der Spermatogenese, vor allem der Spermiogenese)
	<b>LH</b> (Luteinisierendes Hormon)	Oocytenreifung; Stimulierung der Ovulation (stark erhöhte LH-Konzentration vor dem Eisprung); Umwandlung der restlichen Follikelkohorten in den Corpus luteum und der Granulosazellen in Granulosa-Luteinzellen; Produktion von Gestagenen (v.a. Progesteron)	Stimuliert die Bildung von Androgenen (v.a. Testosteron) in den Leydigzellen; Ausbildung männlicher Geschlechtsorgane und -merkmale

Die **Oogenese** (griechisch: *oón*, das Ei und *génésis*, entstehen) findet in den Eierstöcken (Ovarien) statt, mandelförmige Organe, die man in eine Mark- und eine Rinden- (Cortex-) region unterteilen kann. Die Oogenese beginnt mit der Einwanderung der primordialen Keimzellen in die Gonadenanlage. Dort angelangt, nisten sich die Keimzellen an der Oberfläche des Gonadenepithels ein, vermehren sich durch mitotische Teilung und beginnen mit der Differenzierung zu reifenden Oogonien. Während dieser Phase wird jede Oogonie von einem Zellverband umgeben, aus dem sich später die Granulosazellen entwickeln werden. Die Thecazellen, die zusammen mit den Granulosazellen ein Follikel bilden, gehen auf die mesenchymalen Zellen der Gonadenanlage zurück. Nicht alle Oogonien differenzieren sich zu reifen Keimzellen weiter, die meisten degenerieren, sodass von ursprünglich einigen Millionen Oogonien nur noch ein Bruchteil übrigbleibt (Pinkerton et al., 1961). Die verbleibenden Oogonien treten dann embryonal als primäre Oocyten nach einer letzten Verdopplung ihres genetischen Materials in die Meiose ein (siehe 2.2.1.1). Sie vollenden diese jedoch nicht, sondern arretieren in der Diakinese der Prophase I, im sogenannten Dictyotän. Während dieser Phase haben die nun stetig wachsenden Oocyten allerdings eine wichtige Aufgabe, sie veranlassen nämlich die Differenzierung der somatischen Gonadenzellen in reifes Ovargewebe (McLaren, 1991). Mit Beginn der Pubertät leiten hormonelle Signale die Weiterführung der Meiose in zyklischen Abständen ein. In jedem Zyklus werden eine bis mehrere Oocyten aus ihren Follikeln in den Eileiter entlassen (Ovulation) während die Follikelreste im Ovar zurückbleiben. Mit der Ovulation wird die Meiose I beendet und die Oocyte geht in die zweite meiotische Teilung über. Allerdings wird auch die Meiose II nicht vollendet, sondern in der Metaphase arretiert, bis es schließlich zur

Befruchtung kommt. Bemerkenswert an der Oogenese ist, dass aus den beiden meiotischen Reifeteilungen lediglich eine Oocyte hervorgeht, die einen Großteil des Zytoplasmas enthält. Die drei übrig gebliebenen Zellen, die sogenannten Polkörperchen, bestehen fast nur aus dem Zellkern, werden abgestoßen und degenerieren (aus Gilbert, 2003).

Die **Spermatogenese** findet in den Hoden (Testes) und dort in vielen nebeneinanderliegenden Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti) statt. Auch sie beginnt während der Embryonalentwicklung, wenn die Urkeimzellen in die Gonadenanlage einwandern und sich in der Genitalleiste einnisten. Die männlichen Keimzellen sind zu diesem Zeitpunkt allerdings daran gehindert in die Meiose einzutreten und verbleiben daher in ihrem stammzellähnlichen Zustand. Ähnlich wie die Oocyten beeinflussen diese Keimzellen ihre nähere Umgebung, indem sie die Differenzierung von Genitalleistenzellen zu Sertolizellen induzieren (Adams und McLaren, 2002). Währenddessen entwickeln sich die Testosteron produzierenden Leydigzellen aus dem mesenchymalen Gonadengewebe. Die männlichen Keimzellen bleiben bis zur Pubertät undifferenziert. Ab diesem Zeitpunkt differenzieren sie sich jedoch zu Spermatogonien, die die Keimzellproduktion bis zur Seneszenz aufrecht halten.

Die Differenzierung der Keimzellen innerhalb eines Samenkanälchens schreitet vektorieller von außen nach innen voran und endet mit der Abgabe reifer Keimzellen in das Tubuslumen. Angrenzend an die Tubuswand (Lamina propria) befindet sich neben einigen Sertolizellen die Zellschicht der Spermatogonien, die Zellpopulation, die sich aus den primordialen Keimzellen differenzierte, und die aufgrund ihrer Selbstregenerierbarkeit als Stammzellpool für die sich stetig neu entwickelnde Menge an Keimzellen dient (Typ  $A_S$  Spermatogonien; S=Stammzelle). Allerdings verbleiben nicht alle Spermatogonien in diesem stammzellähnlichen Stadium, sondern werden mehrheitlich in Richtung Keimbahn determiniert. Dazu differenzieren sich  $A_S$  Spermatogonien durch mehrfache mitotische Teilungen zu A ( $A_1$  bis  $A_4$ ) und B Spermatogonien, die nach einer letzten Replikationsrunde als primäre Spermatocyten in die Meiose eintreten (de Rooij, 2001). Damit ist schließlich das Differenzierungsschicksal dieser Zellen festgelegt. Sie durchlaufen ohne Unterbrechung die beiden meiotischen Teilungen, die Reduktions- und die Äquationsteilung, und entwickeln sich, sofern keine Fehler unterlaufen sind, während der Spermiogenese zu beweglichen, stromlinienförmigen Spermatozoen. Während all dieser Differenzierungsphasen stehen die Keimzellen, die aus derselben  $A_1$  Spermatogonie hervorgegangen sind, über Zytoplasmabrücken in Verbindung und werden als Synzytium von Zytoplasmafortsätzen einer Sertolizelle umgeben. Auf diese Weise kann eine einzige Sertolizelle die Prozessierung zahlreicher Keimzellen steuern und der Keimzellpopulation gleichzeitig Schutz bieten (Dym und Fawcett, 1971). Nach Abschluss der Spermiogenese werden die morphologisch ausdifferenzierten Spermatozoen ins Lumen der Tubuli seminiferi entlassen und über die Rete testis sowie die Ductuli efferentes in die Nebenhoden (Epididymides) befördert. Dort reifen die Spermatozoen weiter und werden schließlich in den Samenleiter (Ductus deferens) entlassen (aus Gilbert, 2003; Hermo et al., 2010a).

Auch wenn sich Spermatogenese und Oogenese, wie beschrieben, in zahlreichen Gesichtspunkten voneinander unterscheiden, so haben sie doch ein gemeinsames Ziel: Die Erzeugung haploider, genetisch unterschiedlicher Keimzellen, die durch ihre Verschmelzung ein neues, diploides und zudem genetisch einzigartiges Lebewesen hervorbringen. Dieses Ziel erreichen sie durch die Meiose.

### 2.2.1.1 Die Meiose

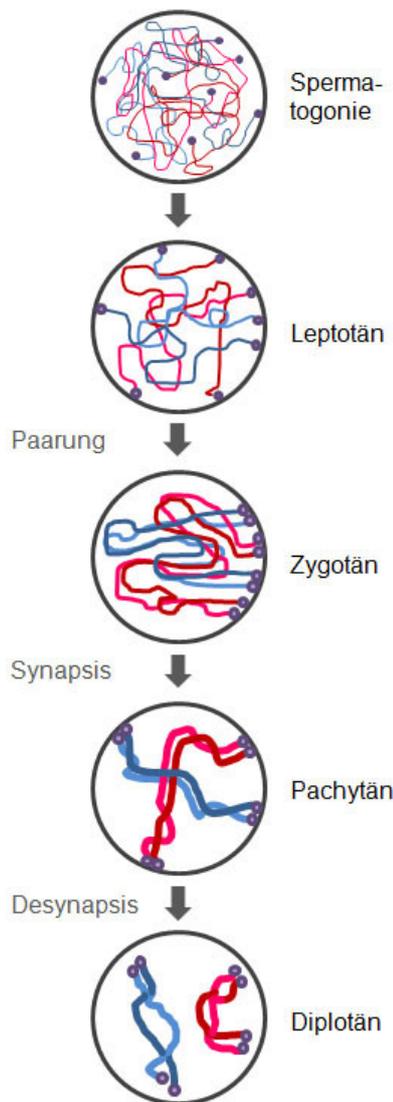
Die **Meiose** (griechisch: *meiosis*, Verminderung), ist eine besondere, nur bei Keimzellen vorkommende Art der Zellteilung, die darauf abzielt **(1) haploide** und **(2) genetisch unterschiedliche Keimzellen** zu erzeugen. Damit unterscheidet sie sich grundsätzlich von der **Mitose**, der Zellteilung somatischer Zellen, bei der **diploide, genetisch identische** Tochterzellen entstehen.

Die **(1)** Erzeugung haploider Gameten ist essentiell, damit der Chromosomensatz bei der Befruchtung, der Fusion zweier Gameten, von Generation zu Generation konstant bleibt. Dies wird in der Meiose durch zwei aufeinanderfolgende Runden der Chromosomensegregation - ohne dazwischen stattfindende DNA-Replikation - erreicht. In der ersten Runde, der sogenannten Reduktionsteilung oder Meiose I, werden die homologen mütterlichen und väterlichen Chromosomen der primären Meiozyten, die aufgrund einer prämeiotischen DNA-Replikation aus zwei Chromatiden bestehen ( $2n, 4C$ ), voneinander getrennt. Die nun sekundären Meiozyten sind bereits haploid, besitzen aber noch den doppelten DNA-Gehalt ( $1n, 2C$ ). Dieser wird in der zweiten Teilungsrunde, die vom Prinzip her einer Mitose gleicht, der Äquationsteilung oder Meiose II, halbiert, sodass die resultierenden haploiden Keimzellen, einen einfachen Chromosomensatz mit einfachem DNA-Gehalt besitzen ( $1n, 1C$ ).

Die Haploidisierung des Genoms ist jedoch nicht der einzige meiotische Prozess von besonderer Bedeutung. Nicht minder wichtig ist **(2)** die homologe Rekombination, der gezielte Austausch zu einander homologer DNA-Abschnitte zwischen mütterlichen und väterlichen Chromosomen durch Crossing over (Villeneuve und Hillers, 2001; Page und Hawley, 2004). Durch diesen sehr komplexen Mechanismus wird das elterliche Genom, zusätzlich zu der zufälligen Segregation der väterlichen und mütterlichen Chromosomen während den meiotischen Teilungen, ferner durchmischt. Bedenkt man, dass sich bereits durch die zufällige Verteilung der homologen Chromosomen  $2^n$  ( $n$  = Anzahl der Chromosomen im haploiden Genom) Kombinationsmöglichkeiten pro Keimzelle ergeben, dass außerdem bei der Befruchtung zwei Keimzellen fusionieren, also  $2^n$  mal zwei, und das pro Homologenpaar etwa ein bis zwei Rekombinationsereignisse auftreten, ist es so gut wie ausgeschlossen, dass, außer bei eineiigen Mehrlingen, zwei genetisch identische Individuen entstehen (Petronczki et al, 2003). Die Bedeutung der homologen Rekombination sowie ihre Notwendigkeit für eine erfolgreiche Reproduktion zeigt sich daran, dass das bloße Ausbleiben von Crossing over zu zufälligem Disjunction und Aneuploidie führen, was letztlich Entwicklungsdefizite oder gar den Tod während der Embryonalentwicklung nach sich ziehen kann (Hassold et al., 2007; Übersicht in Handel und Schimenti, 2010).

Die homologe Rekombination findet in einem einzigartigen, recht lange dauernden Teilabschnitt der Meiose, der Prophase der ersten meiotischen Teilung, statt, der im nun folgenden kurz vorgestellt werden soll. Wie die Mitose, so kann man auch die Meiose allgemein in Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase einteilen, mit dem Unterschiede, dass diese Teilabschnitte in der Meiose zweimal durchlaufen werden. Die meiotische Prophase I, ist also demnach der erste meiotische Abschnitt, den man basierend auf strukturellen und organisatorischen Merkmalen, die homologen Chromosomen betreffend, abermals in fünf Stadien unterteilt hat: Leptotän (griechisch: *leptos*, dünn), Zygotän (griechisch: *zygos*, Paar), Pachytän (griechisch: *pakhus*, dick), Diplotän (griechisch: *diploos*, doppelt) und Diakinese (Siehe Abbildung 7).

Während die homologen Chromosomen im **Leptotän** zu kondensieren beginnen finden im **Zygotän** die ersten Schritte der Paarung der homologen Chromosomen statt. Dies geschieht einerseits durch das gezielte



Einbringen von DNA-Doppelstrangbrüchen (Sun et al., 1989) und andererseits durch dynamische Bewegungen der meiotischen Telomere (Alsheimer, 2009; siehe 2.2.2.1). Die Telomere werden nämlich zunächst physikalisch an der Kernhülle verankert (Alsheimer, 2009), bewegen sich auf einander zu (Bildung des chromosomalen „Bouquets“; siehe 2.2.2.1) und verteilen sich anschließend wieder über die Kernperipherie (Page und Hawley, 2003; Scherthan, 2007; Siderakis und Tarsounas, 2007). Man stellt sich vor, dass dabei die Chromosomen in ihrer gesamten Länge mit bewegt werden, wodurch jedes Chromosom seinen homologen Partner findet, den er dann anhand von Doppelstrangbrüchen definitiv erkennt (Übersicht in Handel und Schimenti, 2010). Haben sich mütterliche und väterliche Homologe gefunden, werden sie über den synaptonemalen Komplex (SC, synaptonemal complex) stabil miteinander verbunden. Der SC ein meiosespezifischer, leiterähnlicher Multiproteinkomplex, dessen Aufbau im Leptotän und Zygotän beginnt und im **Pachytän** vollendet wird (Costa und Cooke, 2007). Ist der SC vollständig zusammen gebaut, das heißt die homologen Chromosomen sind komplett synapsiert, sind die Voraussetzungen für die homologe Rekombination geschaffen. Der Austausch von DNA-Abschnitten zwischen homologen Chromosomen durch die Reparatur von Doppelstrangbrüchen zwischen Nichtschwesterchromatiden findet daher auch im Pachytän statt. Die Stellen an denen Rekombination stattgefunden hat werden als sogenannte Chiasmata im **Diplotän**

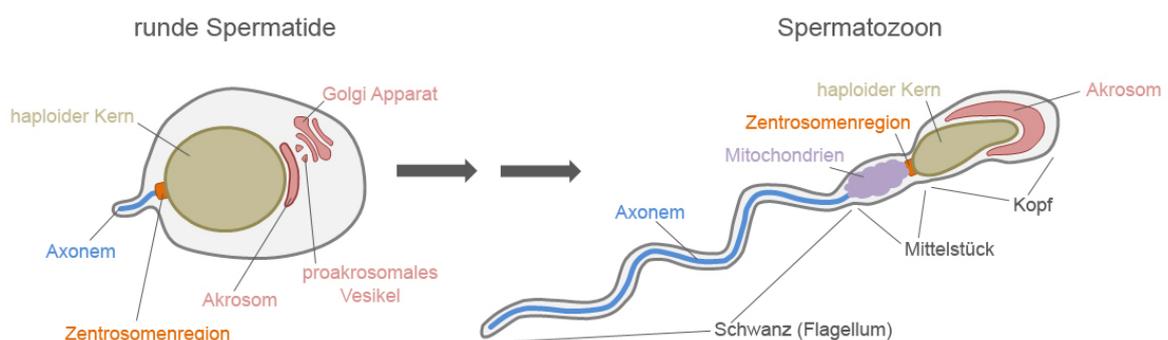
Abbildung 7. Die Stadien der Prophase I.

sichtbar, da der SC in diesem Stadium wieder zerfällt und die Homologen sich voneinander trennen. Nachdem sich zuletzt die Telomere von der INM abgelöst haben, zerfällt die Kernhülle am Ende des letzten Stadiums der Prophase I, der **Diakinese**, und die Meiose schreitet voran (Übersichten in Zickler und Kleckner, 1999; Page und Hawley, 2004; Whitby, 2005).

Die auf diese Weise gepaarten Homologen werden in der Metaphase I in einer bipolaren Spindel befestigt, wobei jedes Homologe nur von einer Spindelfaser erfasst wird. Dadurch werden die Homologen in der Anaphase I auf die beiden Tochterzellen, die sekundären Meiozyten, verteilt. Mit der in der Meiose II schließlich stattfindenden Segregation der Schwesterchromatiden - die vom Prinzip her der mitotischen Teilung ähnelt - ist die meiotische Phase beendet.

### 2.2.1.2 Die Spermiogenese

Als Spermiogenese bezeichnet man die postmeiotische, morphologische Differenzierungsphase männlicher Keimzellen, die dafür verantwortlich ist, dass sich aus den zwar haploiden, aber bewegungsunfähigen (runde Spermatiden) mobile, stromlinienförmige Keimzellen (reife Spermatozoen) entwickeln (Abbildung 8). Rein äußerlich betrachtet zeichnen sich reife Spermatozoen besonders durch die Ausbildung eines Flagellums sowie durch die Schrumpfung, Elongation und Verformung des Spermienkopfes aus (Fawcett, 1975), wobei je nach Spezies morphologisch unterschiedliche Spermien gebildet werden; so sind die der Maus sichelförmig, die des Menschen haben hingegen eine eher rundliche Form. Auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene sind an der Entstehung dieser minimalistischen Zellform zahlreiche Mechanismen und Strukturen beteiligt, die präzise reguliert und auf einander abgestimmt werden müssen. Dazu zählen unter anderem die **Differenzierung von Akrosom und Manschette**, die **Kondensation des Chromatins**, die **Abstoßung des Zytoplasmas** sowie die **Bildung des Flagellums**. Bis auf letzteren, der ausschließlich der Fortbewegung des reifen Spermiums dient, zielen diese Prozesse auch auf die **Elongation und Umformung des Spermienkopfes** ab (Übersicht in Hermo et al., 2010b).



**Abbildung 8. Morphologische Differenzierungsprozesse während der Spermiogenese bei Säugetieren.** In mehreren aufeinander aufbauenden Differenzierungsschritten reifen runde, immobile Spermatiden zu elongierten Spermatozoen, die aufgrund ihres langen Flagellums äußerst beweglich sind.

Die Ausbildung des **Flagellums** beginnt bereits früh in der Spermiogenese mit der Bewegung des Zentriolenpaares in Richtung Zellkern. Dort angekommen wird das Flagellum stabil am Spermatidenkern verankert, was sich an einer kleinen Einstülpung der Kernmembran, der Implanationsfossa, erkennen lässt (Fawcett und Phillips, 1969). Anschließend wächst aus einem der beiden Zentriolen das sogenannte Axonem, das zentrale und bewegliche Element des Spermischwanzes, das hauptsächlich aus Mikrotubuli besteht (Kinozilien-ähnliche  $9 \times 2 + 2$  Struktur), aus (Tilney et al., 1973). Es streckt sich in einem dynamischen Prozess immer weiter und reicht mit Abschluss der Spermiogenese vollständig ins Lumen der Samenkanälchen hinein. Aus diesem Grund werden die reifen Spermatozoen mit dem Flagellum voran ins Tubuslumen entlassen. Die für die Fortbewegung reifer Spermien benötigte Energie liefern Mitochondrien, welche sich während der Spermiogenese kreisförmig um das Mittelstück des Flagellums lagern (Abbildung 8).

Etwa zeitgleich mit der Ausbildung des Flagellums beginnt die Differenzierung des **Akrosoms**. In reifen Spermatozoen befindet sich das Akrosom auf der anterioren, dem Flagellum gegenüberliegenden Seite des Spermienkopfes. Das Akrosom entsteht durch den Zusammenschluss mehrerer proakrosomaler Vesikel, die dem

endoplasmatischen Retikulum bzw. dem Golgi-Apparat entstammen. Diese Vesikel enthalten hauptsächlich hydrolytische Enzyme, die es dem Spermium später ermöglichen Protein- und Zuckerkomponenten der Zona pellucida zu verdauen und so eine Eizelle zu befruchten. Nach Verschmelzen einiger proakrosomaler Vesikel zum Akrosom lagert sich dieses an die anteriore Vorderseite des Zellkerns an und beginnt ihn zu umhüllen. Durch die ständige Einlagerung weiterer Vesikel vergrößert sich das Akrosom zusehends und umgibt letztendlich den gesamten anterioren Kernpol (Yoshinaga und Toshimori, 2003). Bei diesem kontinuierlichen Prozess kommen sowohl Plasma- und äußere akrosomale Membran (OAM, outer acrosomal membrane) als auch innere akrosomale Membran (IAM) und ONM in räumlich Nähe, wodurch ein kompaktes, elektronendichtes Membransystem entsteht. Die Membranen werden lediglich durch dünne Zytoplasmaschichten voneinander getrennt, und zwar durch das **Akroplaxom** zwischen Akrosom und Kern sowie die **ektoplastmatischen Regionen** zwischen Akrosom und den Plasmamembranen von Spermatozoon und Sertolizelle. Die ektoplastmatischen Regionen stellen zugleich Kontaktstellen beider Zellen dar, was die stete Kommunikation zwischen Spermatozoon und Sertolizelle ermöglicht.

Die **Elongation und Verformung des Spermienkopfes** ist äußerst komplex und umfasst zahlreiche wohlkoordinierte, spermiogenesespezifische Mechanismen. Obwohl das Akrosom selbst wohl einen eher geringen Einfluss auf die Streckung des Spermatozoonkerns hat, mehren sich die Hinweise, dass die es umgebenden Zytoplasmaschichten entscheidend zur Spermatozoonelongation beitragen. Sowohl das Akroplaxom zwischen Akrosom und Kern als auch die ektoplastmatischen Regionen zwischen Akrosom und Plasmamembranen sind von besonderer Bedeutung, da sie sowohl Aktin als auch Intermediärfilamentproteine enthalten, also Zytoskelettelemente, die mit der Verformung, Streckung und Orientierung des Spermatozoonkopfes in Verbindung gebracht werden (Übersichten in Kierszenbaum et al., 2003; Toshimori und Ito, 2003; Kierszenbaum und Tres, 2004).

Der posteriore Pol des Spermatozoonkerns wird ebenfalls von Zytoskelett umgeben, nämlich von Bündeln aus Mikrotubuli, die gemeinsam die spermatidenspezifische **Manschette** bilden (Russell et al., 1991; Meistrich et al., 1994). Die Bildung der Manschette beginnt im Vergleich zur Akrosomenbiogenese und der Ausbildung des Flagellums erst relativ spät. Die Manschette erscheint nämlich erstmals in frühen elongierenden Spermatozoonen, umschließt den kompletten posterioren Pol mit Ausnahme der Implanationsfossa und verschwindet wieder, sobald die Elongation und Kompaktierung des Spermienkopfes abgeschlossen ist. Durch die Anwesenheit von Manschette auf der posterioren sowie Akrosom/Akroplaxom und ektoplastmatischen Regionen auf der anterioren Seite wird der Spermatozoonkern vollständig von unterschiedlichen spermiogenesespezifischen Zytoskelettstrukturen umschlossen, von denen man annimmt, dass sie die nötigen Zugkräfte liefern, den Kern in seine endgültige Form zu bringen (Russell et al., 1991; Toshimori und Ito, 2003; Kierszenbaum und Tres, 2004).

Nicht minderwichtig für die gezielte Umformung des Spermienkopfes ist die Kondensation und dichte **Verpackung des Kerninhalts**, des Chromatins. Dies geschieht während der Spermiogenese durch den Austausch von Nukleosomen und somit Histonen durch Transitionsproteine. Doch auch diese werden bald darauf wieder entfernt und Protamine, kleine, sehr basische Proteine, werden in die DNA eingelagert (Ward und Coffey, 1991). Dies hat zur Folge, dass das Chromatin höchst dicht gepackt und jegliche genetische Aktivität eingestellt wird. Bei der morphologischen Umformung und Streckung der Spermatozoonen entstehen große Mengen nicht mehr

benötigten Zytoplasmas. Diese werden zunächst als sogenannte Residualkörperchen abgestoßen, schließlich aber von Sertolizellen phagozytiert und abgebaut bzw. wiederverwertet.

Nach Abschluss der Spermiogenese werden die morphologisch voll ausgereiften Spermatozoen ins Lumen der Samenkanälchen entlassen und aufgrund peristaltischer Bewegungen in die Epididymides befördert.

Nachdem in diesem Abschnitt die Gametogenese der Maus in ihren Grundzügen vorgestellt und die wichtigsten Prozesse erläutert wurden, befassen sich die beiden letzten Abschnitte mit der Kernhülle und den Funktionen, welche sie bei eben diesen Vorgängen innehat.

## 2.2.2 Die Kernhülle in der meiotischen Phase (Prophase I)

Während der meiotischen Prophase I spielen sich einzigartige und zugleich hochkonservierte Prozesse ab: Die Anheftung aller meiotischen Telomere an die Kernhülle **und** deren gezielte Bewegung aufeinander zu und wieder auseinander. Damit diese Prozesse reibungslos und fehlerfrei ablaufen können, muss auch die Kernhülle ihren Beitrag leisten.

### 2.2.2.1 Telomeranheftung, Bouquetformierung und die besondere Lokalisation von Sun1 und Sun2

Sinn und Zweck der Meiose ist die Erzeugung haploider, genetisch unterschiedlicher Keimzellen. Dies wird in der Meiose durch zwei aufeinanderfolgende Zellteilungen ohne dazwischen stattfindende DNA-Replikation erreicht, wobei zunächst die homologen Chromosomen (Meiose I) und anschließend die Schwesterchromatiden (Meiose II) voneinander getrennt werden (Siehe 2.2.1.1). Grundvoraussetzung für die Segregation der homologen Chromosomen in der Meiose I, ist, dass jedes Chromosom seinen homologen Partner findet und nicht mit irgendeinem der 46 (Mensch) bzw. 40 (Maus) anderen Chromosomen assoziiert. Nur wenn ausschließlich homologe Chromosomen paaren, synapsieren und schließlich rekombinieren, kann sichergestellt werden, dass die sekundären Meiozyten nach der Reduktionsteilung genau eines der Autosomenpaare und je ein Geschlechtschromosom erhalten. Ist dies nicht der Fall, können Aneuploidien und andere schwere chromosomale Aberrationen die Folge sein.

Bislang sind die molekularen Mechanismen, die für die Erkennung der homologen Chromosomen verantwortlich sind, bei weitem noch nicht vollständig entschlüsselt; dennoch häufen sich Hinweise, dass die stabile Verankerung der meiotischen Telomere sowie deren dynamische Bewegungen im Leptotän/Zygotän-Stadium der Prophase I entscheidend zur Homologen-Findung beitragen (Alzheimer, 2009; Koszul und Kleckner, 2009; Sato et al., 2009). Es ist bereits seit längerem bekannt, dass Telomere während der Prophase I Kontakt zur Kernhülle aufnehmen und sich zudem entlang der Kernperipherie bewegen, um das sogenannte „Bouquet“ zu bilden (Parvinen und Söderström, 1976). Basierend auf diesen Gegebenheiten, der Erkenntnis, dass jene Mechanismen in ähnlicher Weise bei vielen sexuell reproduzierenden Lebewesen konserviert ablaufen, sowie der Tatsache, dass die Telomeranheftung und -bewegung zeitlich exakt mit der Erkennung, Paarung und Synapsis der Homologen korreliert, mutmaßte man, dass Chromosomenbewegungen und Homologen-Findung direkt miteinander in Verbindung stehen könnten (Zickler und Kleckner, 1998; Niwa et al., 2000). Untersuchungen an Hefen lieferten erste Erkenntnisse bezüglich eines möglichen Zusammenhangs zwischen Telomeranheftung,

Bouquetformierung und Paarung der homologen Chromosomen, denn die gezielte Mutation bzw. der Verlust möglicherweise involvierter Proteine hatte eine insgesamt fehlerhafte Meiose zur Folge (Nimmo et al., 1998; Cooper et al., 1998). Ähnliche Feststellungen konnten neuerdings auch bei höheren Eukaryoten gemacht werden (Penkner et al., 2007; Ding et al., 2007; Chi et al., 2008). Dies unterstreicht einerseits die Konserviertheit andererseits aber auch die Wichtigkeit dieser Prozesse für das erfolgreiche Durchlaufen der Meiose.

Offensichtlich sind nicht nur die Mechanismen, sondern sogar verantwortliche bzw. beteiligte Komponenten konserviert. Es kristallisierte sich heraus, dass die Verankerung der Telomere in der Kernhülle über LINC-Komplexe vermittelt wird (siehe 2.1.2). Bei etlichen bislang untersuchten Modellorganismen wurden nämlich Proteine mit einer SUN-Domäne, die INM-Bestandteile von LINC-Komplexen, identifiziert, die eine Rolle bei der Telomerverankerung spielen. Da bei einigen Spezies zudem ONM-Komponenten von LINC-Komplexen, Proteine mit einer KASH-Domäne, und sogar Zytoskelettelemente, die die Telomerbewegungen aus dem Zytoskelett heraus und über die Kernhülle hinweg steuern könnten, entdeckt wurden, liegt eine Beteiligung von LINC-Komplexen bei der Anheftung der Telomere an die Kernhülle sowie der Bouquetformierung auf der Hand (Übersicht in Hiraoka und Dernburg, 2009). Eine Übersicht bislang identifizierter LINC-Komplex-Bestandteile in verschiedenen Modellorganismen, denen man eine Rolle bei der Verankerung und Bewegung meiotischer Telomere zuschreibt, befindet sich in Tabelle 5.

Tabelle 5. Die Beteiligung von LINC-Komplexen während der Telomeranheftung und der Bouquetformierung in ausgewählten Modellorganismen.

Organismus	SUN-Protein	KASH-Protein	Zyto- skelett	Bouquet/Chromosomen- bewegung	Referenz
<i>S. pombe</i>	<b>Sad1p</b> vermittelt Telomer-Interaktion über die Telomer-Proteine Taz1 und Rap1; Bqt1,2,3,4 stabilisieren SUN-Telomer-Komplex	<b>Kms1p</b>	Mikrotubuli-Motor-Protein-(Dynein) Komplex	MT und Dynein gesteuerte Elongation und Oszillation des Kerns („Horsetail“); Telomer „Clustering“ nahe dem Spindelpolkörper; Mikrotubuli verlaufen tangential zur Kernhülle	Chikashige et al., 1994 Miki et al., 2002 Chikashige et al., 2006 Chikashige et al., 2009
<i>S. cerevisiae</i>	<b>Mps3</b> vermittelt Telomer-Interaktion über Ndj1	<b>Cms4</b> evtl. ONM; hat aber keine KASH-Domäne	Aktin	Telomere bewegen sich tendenziell auf den Spindelpolkörper zu	Jaspersen et al. 2006 Conrad et al., 2007 Conrad et al., 2008
<i>C. elegans</i>	<b>SUN-1/Matefin</b> N-terminal phosphoryliert; Paarungszentren werden von Zink-Finger-Proteinen (HIM-8/ZIM) gebunden; Interaktion mit SUN-Protein unklar	<b>ZYG-12</b>	Mikrotubuli und Dynein	Paarungszentren (Chromatinregionen nahe eines Telomers) orientieren sich zum Zentrosom; Kernorganisation analog zur Bouquetformierung	MacQueen et al., 2005 Phillips und Dernburg, 2006 Penkner et al., 2007 Sato et al., 2009
<i>D. melanogaster</i>	bislang nichts bekannt	nichts bekannt	?	keine wirkliche Bouquetformierung; Schwache Polarisierung von Zentromeren und Telomeren auf den gegenüberliegenden Kernseiten	Bass, 2003 Zickler und Kleckner, 1998

---

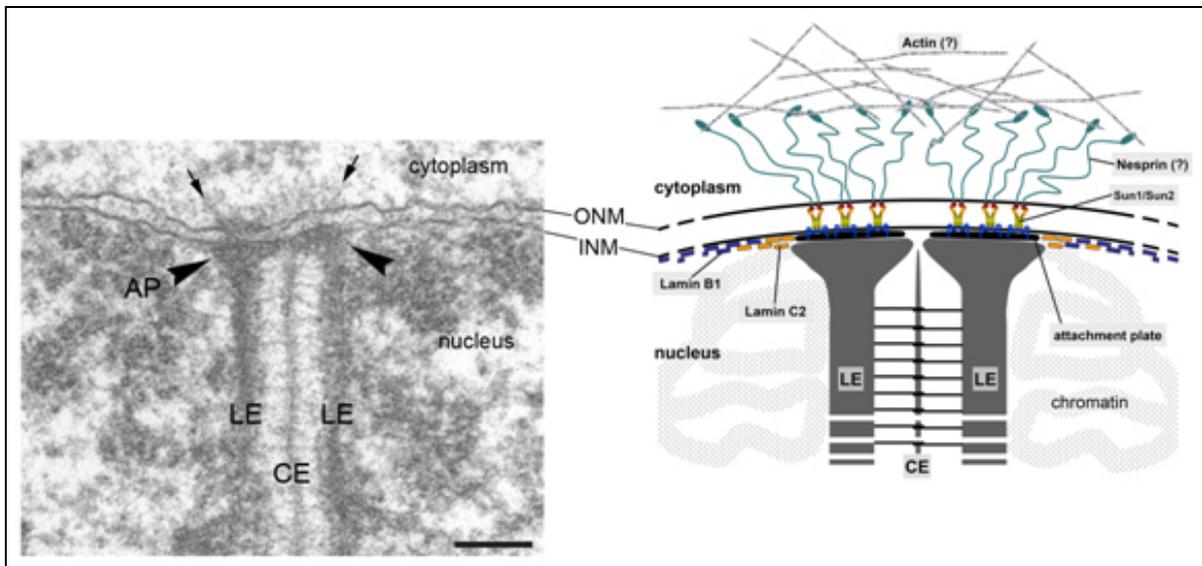
<i>M. musculus</i>	Sun1 und Sun2 kolokalisieren mit meiotischen Telomeren; Telomerassoziation unbekannt	bislang kein KASH-Protein in meiotischen Zellen identifiziert	?	Telomere polarisieren auf der dem Zentrosom zugewandten Seite des Zellkerns	Ding et al., 2007 Schmitt et al., 2007
--------------------	--	---	---	--	---

---

Die Verankerung der meiotischen Telomere in der INM wird in Säugern durch die beiden SUN-Proteine Sun1 und Sun2 vermittelt. Beide Proteine lokalisieren während der Prophase I ausschließlich an den Anheftungsstellen der Chromosomen in der INM und verteilen sich nicht, wie in somatischen Zellen, über die gesamte Kernhülle hinweg (Ding et al., 2007; Schmitt, 2007). Die Anheftungsstellen der meiotischen Telomere (APs, attachment plates) sind einzigartige, elektronendichte Strukturen, die die meiotischen Chromosomenenden dicht an die INM knüpfen. Dabei erscheint es in elektronenmikroskopischen Aufnahmen, als ob die Telomere, bestehend aus Telomerchromatin sowie axialen und lateralen Elementen des SC, direkt in der INM stecken würden. Außerdem konnten auf zytoplasmatischer Seite dünne Fibrillen ausgemacht werden, die sich aus der ONM heraus ins Zytoplasma erstrecken (Esponda und Gimenez-Martin, 1972; Woollam et al., 1967; Schmitt et al., 2007; Abbildung 9). Diese Anordnung Kernhüllen durchspannender Elemente, mit Sun1 und 2 als Teil von diesen, erinnert stark an die Struktur des LINC-Komplexes, von dem man annimmt, dass er die Chromosomenenden über Sun1/2 sowie (ein) noch nicht identifiziere(s) KASH-Protein(e) an Zytoskelettstrukturen knüpft (Abbildung 9). Diese könnten die Chromosomen dann aufgrund zytoplasmatischer Kräfte ins Bouquet dirigieren und auch wieder heraus. Dass dieser meiotische LINC-Komplex von erheblicher Bedeutung ist, zeigt sich an Sun1-defizienten Mäusen, bei denen die Telomere fehlerhaft oder gar nicht angeheftet werden und die Meiose daher aufgrund defizitärer Homologen-Paarung nicht erfolgreich durchlaufen werden kann (Ding et al., 2007; Chi et al., 2009).

Insgesamt gesehen ist man sich darüber einig, dass die Telomere in der meiotischen Prophase I auch bei Säugern über SUN-Proteine in der Kernhülle verankert und über KASH-Proteine an zytoplasmatische Strukturen geknüpft werden; dennoch stellt sich die Frage, wie Telomere und SUN-Proteine miteinander in Verbindung stehen. In *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* und in *Caenorhabditis elegans* wurden bereits chromosomale Adapterproteine identifiziert, die die SUN-Telomer-Interaktion vermitteln; nämlich Bqt1-4, Rap1 und Taz1 bei *S. pombe*, Ndj1 bei *S. cerevisiae* und die ZIM/HIM8 Proteinfamilie bei *C. elegans* (Phillips und Dernburg, 2006; Tomita und Cooper, 2007; Conrad et al., 2008; Chikashige et al., 2009; siehe Tabelle 5). Anders als der LINC-Komplex selbst, sind diese Proteine jedoch nicht konserviert und einzigartig für ihre jeweilige Spezies. Dies ist möglicherweise auf die geringe Konserviertheit der nukleoplasmatischen Regionen in der SUN-Proteinfamilie zurückzuführen, was wiederum eine präzise, speziesspezifische Regulation der Meiose ermöglichen würde. Dass auch bei Säugern die Telomere selbst und ähnliche meiosespezifische Linkerproteine, die direkt an die Telomere binden, von enormer Wichtigkeit sind, ist sehr wahrscheinlich. So führt beispielsweise eine erhebliche Verkürzung der Telomere bei Telomerase-defizienten Mäusen in späten Generationen zu Paarungs- und Rekombinationsfehlern (Liu et al., 2004). Der Verlust der axialen und lateralen Elemente hingegen scheint die Assoziation des Telomerchromatins an die Kernhülle generell nicht zu beeinträchtigen (Liebe et al., 2004). Auch wenn bereits einige in Frage kommenden Telomerproteine untersucht

wurden - z. B. Rap1, das jedoch offensichtlich nicht an der Telomer-SUN-Interaktion beteiligt ist (Scherthan et al., 2010) - wurden bis zum heutigen Zeitpunkt keine in Frage kommenden Kandidaten bei Säugern identifiziert (Übersicht in Alsheimer, 2009; Hairaoka und Dernburg, 2009).



**Abbildung 9. Anheftung meiotischer Telomere an die Kernhülle in der Prophase I.** In der elektronenmikroskopischen Aufnahme (links; aus Schmitt et al., 2007) sind zwei an die Kernhülle angeheftete homologe Chromosomenenden gezeigt, die über den synaptonemalen Komplex (CE, central element; LE, lateral element) miteinander verbunden sind. An den Anheftungsstellen der Telomere (AP, attachment plate, Pfeilspitzen) an die innere Kernmembran (INM, inner nuclear membrane) erscheinen die LEs deutlich verdickt. Auf zytoplasmatischer Seite sind fibrilläre Strukturen erkennbar (Pfeile), die aus der äußeren Kernmembran (ONM) heraus ins Zytoplasma reichen. Aufgrund dieser strukturellen Anordnung wurde ein Modell für den meiotischen LINC-Komplex erstellt (rechts, aus Alsheimer, 2009). Darin stellt man sich vor, dass die meiotischen Telomere über die SUN-Proteine Sun1 und Sun2 in der Kernhülle verankert und über (ein) Nesprin(e) an das Aktin-Zytoskelett geknüpft werden. Dieses könnte dann die benötigten Kräfte für die Telomerbewegungen in der Prophase I bereitstellen.

Auch wenn bei Säugern noch kein Bindeglied zwischen SUN-Protein und Telomer identifiziert wurde, sind beide Proteine, Sun1 und Sun2, bedeutend an der Verankerung der meiotischen Telomere in der Kernhülle beteiligt, und zwar während der gesamten Prophase I: Sowohl Sun1 als auch Sun2 bleiben nämlich ab dem Leptotän, wenn die Telomere an die Kernhülle rekrutiert werden, über das Bouquet-Stadium, bis ins Pachytän hinein Telomer assoziiert (Schmitt et al., 2007; Ding et al., 2007). Ob sie bei der Telomerbewegung allerdings auch eine aktive, dynamische oder nur eine passive Rolle spielen bleibt zu klären.

#### 2.2.2.2 Die Expression von Lamin C2, eines meiosespezifischen A-Typ Lamins

Einhergehend mit der Anheftung der meiotischen Telomere sowie deren Polarisierung und Rückverteilung in der meiotischen Prophase I, kann in Säugerzellen eine einzigartige Spezialisierung der Kernlamina, einem Hauptstrukturelement der Kernhülle (siehe 2.1.3), beobachtet werden. Während in nahezu allen differenzierten Somazellen gewöhnlich vier Lamine, zwei A- (Lamine A und C) und zwei B-Typ Lamine (Lamine B1 und B2), exprimiert werden, ist Lamin B1 der einzige Vertreter in meiotischen Prophase I Zellen (Vester et al., 1993). Dies bedeutet jedoch nicht, dass Lamin B1 das einzige Lamin in der Meiose ist; vielmehr kommt es, sobald Keimzellen in die Meiose eintreten, zur Expression von Lamin C2, einer meiosespezifischen Isoform des *Lmna* Gens (Furukawa et al., 1994; Alsheimer und Benavente, 1996). Lamin C2 ist, wie bereits unter

2.1.3 erwähnt, erheblich kürzer als seine somatischen Gegenspieler und verfügt darüber hinaus über einen speziellen Mechanismus mit der Kernhülle zu assoziieren. Lamin C2 erhält nämlich als N-terminalen Membrananker eine hydrophobe Myristoylgruppe, mit der es, ähnlich wie die farnesylierten somatischen Lamine, an die INM gelangen kann (Übersicht in Alsheimer et al., 2011).

Bemerkenswerterweise unterscheidet sich Lamin C2 nicht nur bezüglich seiner Größe und seiner Membrananbindung von den Laminen A und C. Auch hinsichtlich seiner zellulären Verteilung verhält es sich gänzlich anders als seine die gesamte Kernhülle auskleidenden somatischen Pendanten. Lamin C2 lokalisiert nämlich nicht innerhalb der gesamten Kernhülle sondern nur in speziellen, diskontinuierlichen Regionen; Regionen in denen die angehefteten meiotischen Telomere eingebettet sind (Alsheimer et al., 1999; Abbildung 9). Die Eigenschaft, sogenannte „Patches“ zu bilden, rührt bei Lamin C2 allerdings nicht von seinem meiotischen Umfeld her, denn es aggregiert in diskontinuierlichen Regionen innerhalb der Kernhülle, auch wenn es in transfizierten somatischen (*Lmna*<sup>-/-</sup> MEF) Kulturzellen exprimiert wird (Alsheimer et al., 2000; Jahn et al., 2010). Ursachen dieses besonderen, Lamin C2-spezifischen Verhaltens sind vermutlich die dynamischen Eigenschaften des Proteins, denn Lamin C2 fehlen erstens Domänen, die generell für die laterale und longitudinale Assoziation von Laminen zu polymeren Netzwerken nötig sind (siehe 2.1.3) und, zweitens zeigt Lamin C2 eine signifikant erhöhte Mobilität im Vergleich zu somatischen Laminen (Jahn et al., 2010).

Aufgrund seiner zeitlichen Expression, die mit der Telomeranheftung und der Bouquetformierung korreliert, seiner Lokalisation um die APs der meiotischen Chromosomenenden und der Tatsache, dass Lamin C2 für ein Lamin ausgesprochen dynamisch ist, wurde Lamin C2 die Rolle eines meiotischen „Lamina-Flexibilisators“ zugesprochen. In dieser Hypothese würde Lamin C2 die Lamina um die eingebetteten Telomere herum auflockern, was ihnen erst die gezielte Bewegung in Richtung Zentrosom (Bouquetformierung) und schließlich die Findung der homologen Chromosomen ermöglichen würde. Passend zu dieser Hypothese, zeichnen sich Knock-out-Mäuse, die keine A-Typ Lamine und somit auch kein Lamin C2 exprimieren können, durch Infertilität aus, da die Meiose aufgrund schwerwiegender Defekte bei der Synapsis der homologen Chromosomen im Pachytän arretiert und Spermatozyten Apoptose begehen (Alsheimer et al., 2004).

Lamin C2 ist das einzige A-Typ Lamin, das in die meiotische Kernlamina eingelagert ist. Daher ist anzunehmen, dass der infertile Phänotyp der *Lmna*<sup>-/-</sup> Mäuse vom Verlust des Lamins C2 herrührt. Allerdings leiden Lamin A/C/C2-defiziente Mäuse an Muskeldystrophien, Lipodystrophie und neuronalen Problemen und sterben bereits im Alter von etwa sechs Wochen (Sullivan et al., 1999). Aufgrund dessen kann formell nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Unfruchtbarkeit womöglich ein sekundärer Effekt der insgesamt starken physischen Beeinträchtigung ist. Um diese Begleitprobleme zu umgehen, wurde ein selektiver Knock-out des Lamin C2-spezifischen Startexons 1a hergestellt, welcher die Expression somatischer A-Typ Lamine nicht beeinträchtigen sollte (Schmitt, 2008). In ersten Versuchen wurden bei männlichen Lamin C2-defizienten Mäusen deutlich kleinere Testes sowie apoptotische Spermatozyten festgestellt, was darauf schließen lässt, dass Lamin C2 tatsächlich ein Determinant männlicher Fertilität bei Mäusen sein dürfte (Schmitt, 2008).

### 2.2.3 Die Kernhülle in der postmeiotischen Phase

Die postmeiotische Differenzierungsphase, die Spermiogenese, zeichnet sich durch eine massive morphologische Umstrukturierung der gesamten Zelle, und insbesondere des Zellkerns, aus (siehe 2.2.1.2). Während sich runde Spermatiden durch den Einfluss spermiogenesespezifischer Zytoskelettstrukturen in ihre speziesspezifische Spermienform elongieren und deformieren, wird auch der Zellkern aufgrund transkriptioneller Inaktivierung und Kondensation des Chromatins dramatisch verkleinert, und genauso wie seine ihn umgebende Zelle verformt. Einhergehend mit der Umstrukturierung der Spermatide, kommt es zu einer bemerkenswerten und einmaligen Reorganisation der Spermatidenkernhülle.

#### 2.2.3.1 Reorganisation und Umverteilung von Bestandteilen der Spermatidenkernhülle

Die Kernhülle postmeiotischer Keimzellen unterscheidet sich grundlegend von der somatischer Zellen, was sich einerseits in ihrer Zusammensetzung und andererseits im Verhalten ihrer einzelnen Komponenten widerspiegelt.

Besonders auffällig ist dabei, dass sich während der Elongation des Spermienkopfes alle bislang untersuchten Komponenten der Kernhülle umorganisieren, sich in einem graduellen Prozess zum posterioren Pol bewegen und mit Abschluss der Spermiogenese gänzlich verschwinden (Übersicht in Alsheimer et al., 2011). Zu diesen Komponenten zählen die in der Spermiogenese exprimierte Lamina B1 und B3, die integralen Membranproteine Lap2 und der Lamin B Rezeptor, und auch die Kernporenkomplexe (Alsheimer et al., 1998; Mylonis et al., 2004; Schütz et al., 2005a; Ho, 2010). Man nimmt sogar an, dass diese bezeichnende Umverteilung von Proteinen innerhalb der Kernhülle mit der Elongation um Verformung des Spermatidenkopfes in direktem Zusammenhang steht. Lamina, Lamina assoziierte Proteine und auch der Lamin B Rezeptor können direkt mit dem Chromatin interagieren. Auf diese Weise könnten sie direkt an der Kompaktierung des Chromatins mitwirken, indem sie Chromatinregionen durch ihre Polarisation am posterioren Kernende, mit dorthin lokalisieren bzw. Protamine rekrutieren würden (Alsheimer et al., 1998; Mylonis et al., 2004).

Zudem wurde mit Lamin B3 eine spermiogenesespezifische Lamin B Variante identifiziert, die ähnlich wie das meiosespezifische Lamin C2, einzigartige Polymerisationseigenschaften besitzt (Furukawa und Hotta, 1993; Schütz et al., 2005a, b; siehe auch 2.1.3 und 2.2.2.2). Wie Lamin C2 ist auch Lamin B3 N-terminal verkürzt, was zur Folge hat, dass auch diesem polymerisationsrelevante Proteinbereiche für die Bildung höherer Netzwerke fehlen. Interessanterweise ist Lamin B3 wegen der „fehlenden“ N-terminalen Kopf- sowie der Coil-Domänen A1 und A2 (siehe Abbildung 6) in der Lage Zellkerne in somatischen Kulturzellen zu deformieren. Darüber hinaus ist Lamin B3 aufgrund dessen nachweislich mobiler als somatische B-Typ Lamina (Schütz et al., 2005b). Übertragen auf elongierende Spermatiden würde das bedeuten, dass Lamin B3 die Kernhülle flexibler machen würde, wodurch schließlich der Kern verformt und in die Länge gezogen werden könnte. Auch wenn es einige Hypothesen für die Elongation des Spermatidenkopfes gibt, sind die genauen Mechanismen bzw. in welcher Weise die Kernhülle dazu beisteuert den Kern zu elongieren, weitgehend unbekannt.

### 2.2.3.2 Expression von SUN-Domänen Proteinen während der Spermiogenese

SUN-Domänen Proteine sind als INM Komponenten der LINC-Komplexe in der Lage den gesamten Zellkern bzw. nukleäre Bestandteile (z. B. meiotische Telomere; Ding et al., 2007; Schmitt et al., 2007) zu positionieren, zu bewegen oder auch umzuformen (Xiong et al., 2008; Olins et al., 2009; Khatau, et al., 2009 Übersicht in Starr und Fridolfsson, 2010; siehe 2.1.2, 2.2.2.1). Aufgrund dieser Tatsache mutmaßte man, dass SUN-Proteine oder allgemein LINC-Komplexe ebenfalls an der morphologischen Differenzierung des Spermatidenzellkerns beteiligt sein könnten und begann mit der Untersuchung von SUN-Proteinen in der postmeiotischen Phase der Spermatogenese (Göb, 2007; Schmitt, 2008). Die kürzlich gemachte Beobachtung, dass SUN-Domänen Proteine tatsächlich während der Spermiogenese exprimiert werden, lieferte erste Hinweise und stützt die Hypothese einer LINC-Komplex vermittelten Umformung des Spermienkopfes.

## 2.3 Zielsetzung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Untersuchung ausgewählter Komponenten der Kernhülle während der Spermatogenese der Hausmaus (*Mus musculus*) sowie deren Rolle in der meiotischen bzw. postmeiotischen Differenzierungsphase. Dadurch sollte der Kenntnisstand erweitert werden, in welcher Weise die Kernhülle dynamische, morphologische und vor allem für die Keimbahn essentielle Prozesse beeinflusst.

Der Fokus dieser Arbeit lag dabei zum einen auf dem Protein Lamin C2, das als meiosespezifisch exprimiertes A-Typ Lamin offenbar an der gerichteten Bewegung der Telomere während der meiotischen Prophase I beteiligt ist. Untersuchungen an Knock-out-Mäusen mit mutiertem *Lmna* Gen haben gezeigt, dass der Verlust von A-Typ Laminen nicht nur zu einem schwerwiegenden Lipo- und Muskeldystrophie-Phänotyp (Sullivan et al., 1999), sondern auch zu gravierenden Defekten in der männlichen Keimbahn führt (Alzheimer et al., 2004). Da jedoch aufgrund dieser Daten nicht komplett ausgeschlossen werden kann, dass der infertile Phänotyp Lamin A/C/C2-defizienter Mäuse kein Sekundäreffekt der schweren somatischen Erkrankung ist, sondern allein vom Fehlen des Lamins C2 herrührt, wurde ein selektiver Lamin C2 Knock-out generiert, welcher die Expression der somatischen Lamine A und C nicht beeinträchtigen sollte (Schmitt, 2008). Die Grundcharakterisierung dieser Mauslinie mithilfe RNA- und proteinanalytischer, immunzytochemischer sowie histologischer Techniken ist daher Gegenstand dieser Arbeit.

Das zweite Teilprojekt befasst sich mit der Untersuchung von SUN-Domänen Proteinen sowie der Identifizierung möglicher LINC-Komplexe im Verlauf der Spermiogenese. Da die Proteine Sun1 und Sun3 bereits in Spermatisden nachgewiesen werden konnten (Göb, 2007; Schmitt, 2008), sollte ihre subzelluläre Verteilung und Lokalisation mithilfe spermiogenesespezifischer Marker im Detail analysiert werden. SUN-Domänen Proteine partizipieren zudem am Aufbau sogenannter LINC-Komplexe, beide Kernmembranen durchspannende Proteingebilde, die auf zytoplasmatischer Seite mit dem Zytoskelett in Kontakt stehen und unter anderem an der Kernpositionierung und -bewegung beteiligt sind. Da die gezielte Umformung des Spermatisdenkopfes ebenfalls von Elementen des Zytoskelett beeinflusst wird, ist es denkbar, dass LINC-Komplexe auch bei diesem Prozess eine entscheidende Rolle spielen. Dieser Frage wurde in der vorliegenden Arbeit mit immunzytochemischen und proteinbiochemischen Methoden nachgegangen.

## 3 Ergebnisse

Im diesem Teil der Dissertation werden erzielte Ergebnisse und dadurch neu gewonnene Erkenntnisse vorgestellt. Dies soll insgesamt zu einem besseren Verständnis der besonderen Rolle der Kernhülle in Keimzellen - insbesondere während der Spermatogenese der Säugetiere - beitragen. Da in vorliegender Arbeit mit Lamin C2 einerseits eine meiotische Keimzellkomponente und mit den SUN-Domänen Proteinen Sun1 und Sun3 andererseits Proteine der postmeiotischen Kernhülle analysiert wurden, untergliedert sich der nun folgende Ergebnisteil in zwei Teilabschnitte: 3.1 beschäftigt sich mit der Grundcharakterisierung von Lamin C2 Knock-out-Mäusen und 3.2 beschreibt die Untersuchung von SUN- und KASH-Domänen Proteinen sowie von LINC-Komplexen während der Spermiogenese der Maus.

### 3.1 Lamin C2 ist essentiell für das erfolgreiche Durchlaufen der Spermatogenese

Lamin C2 ist das einzige A-Typ Lamin, das während der Spermatogenese der Maus exprimiert wird (Alzheimer und Benavente, 1996). Die beiden anderen A-Typ Lamine A und C nämlich, die ebenfalls vom *Lmna* Gen kodiert werden, finden sich ausschließlich in differenzierten somatischen Zellen. Dennoch ist Lamin C2 nicht während der gesamten Spermatogenese in die Kernlamina eingelagert, sondern taucht spezifisch nur während der Prophase der ersten meiotischen Teilung auf. Bemerkenswerterweise korreliert die zeitliche Expression dieses meiosespezifischen A-Typ Lamins mit der Anheftung der Telomere an die INM sowie deren Polarisierung zum chromosomalen „Bouquet“, zwei dynamischen Prozessen, welche die Erkennung der homologen Chromosomen erleichtern sowie die Aneinanderlagerung zweier nicht-homologer Chromosomen verhindern sollen (Alzheimer et al., 1999).

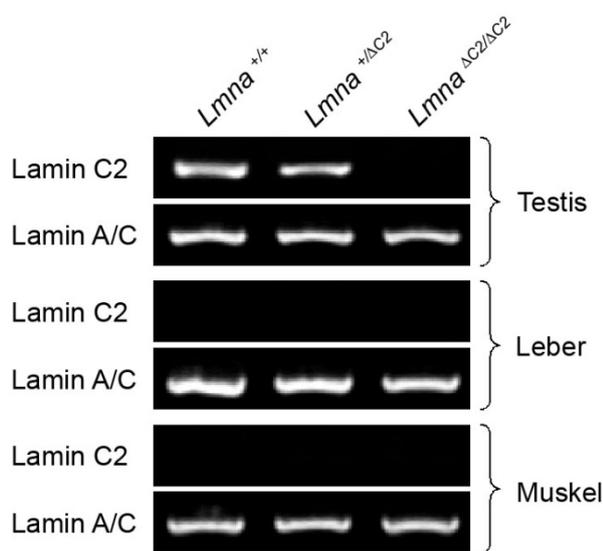
Lamin C2 ist offensichtlich ein wichtiger Fertilitätsdeterminant. Dies stellte sich erstmals bei der Untersuchung von Knock-out-Mäusen mit mutiertem *Lmna* Gen heraus. Betroffene Mäuse exprimieren keine A-Typ Lamine und entwickeln daher kurz nach der Geburt schwere Muskel- und Lipodystrophien und leiden an massiven Schädigungen des Zentralnervensystems (Sullivan et al., 1999). Bei männlichen Mäusen wurde zudem eine stark erhöhte Apoptoserate in Spermatozyten einhergehend mit vollständiger Infertilität festgestellt, was höchstwahrscheinlich auf das Fehlen von Lamin C2 in der Spermatozytenlamina zurückzuführen ist (Alzheimer et al., 2004). Da jedoch formell nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die beobachtete Infertilität eine negative Begeleiterscheinung des Lamin A/C Verlusts ist, wurde eine weitere Knock-out-Mauslinie etabliert, in der lediglich das Lamin C2-spezifische Exon, Exon 2 bzw. Exon 1a, ausgeschaltet wurde (Schmitt, 2008).

Das *Lmna* Gen umfasst insgesamt 13 Exons, wobei die Lamine A und C jeweils Exon 1 als Startexon und als zweites Exon 3 benutzen. Exon 2 (Exon 1a) hingegen dient als alternatives Startexon für Lamin C2 und wird ausschließlich für dessen Expression abgelesen. Die vollständige Deletion des Lamin C2-spezifischen Exon 1a sollte folglich zum Verlust von Lamin C2, nicht jedoch zu dem der somatischen Lamine A und C führen. Gemäß dieser Hypothese wären *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäuse phänotypisch unauffällig aber eingeschränkt fertil, was in ersten Untersuchungen bestätigt werden konnte (Schmitt, 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Charakterisierung der Lamin C2 Knock-out-Mauslinie fortgesetzt, wobei die Analyse der A-Typ Lamin Expression in *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäusen ein zentrales Thema war. Ferner sollte untersucht werden, welche Auswirkung der Verlust von Exon 1a des *Lmna* Gens auf die Keimbahn entsprechender transgener Tiere hat.

### 3.1.1 Mäuse mit deletiertem Lamin C2-spezifischen Exon 1a exprimieren die somatische A-Typ Lamine A und C, das meiotische Lamin C2 hingegen nicht

Die gezielte Deletion des Lamin C2-spezifischen Startexons 1a sollte zum Verlust der Lamin C2 Expression führen, die der somatischen Lamine A und C hingegen sollte nicht betroffen sein, da das übrige *Lmna* Gen intakt bleiben sollte. Um dies zu überprüfen, wurde das Expressionsprofil der A-Typ Lamine A/C und C2 in wildtypischen, heterozygoten und *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Geschwistertieren sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene



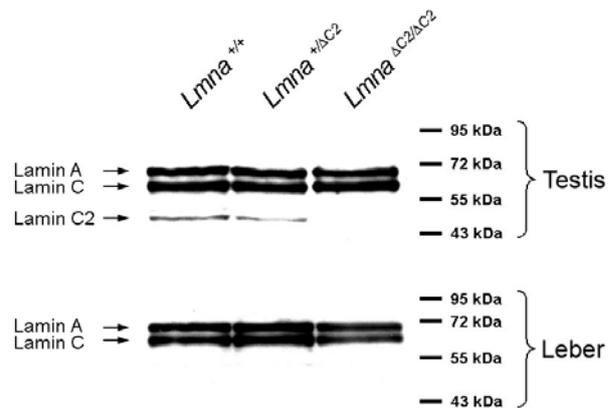
**Abbildung 10.** Analyse der A-Typ Lamin-Expression in *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäusen auf Ebene der mRNA. Gesamt-RNA sechs Wochen alter wildtypischer, heterozygoter und *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Geschwistertiere wurde aus Hoden-, Leber- und Muskelgewebe isoliert und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Die Amplifikation der somatischen Lamine A und C erfolgte mit den Oligonukleotiden LA/C\_maus5'Nde (forward) und r27k1 (reverse) in 25 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 64°C. Lamin C2 wurde mit dem Primerpaar LC2\_maus5'Nde (forward) und r27k1 (reverse) amplifiziert (25 Zyklen; 65°C Annealing-Temperatur). Im Hodengewebe von Mäusen mit deletiertem Exon 1a des *Lmna* Gens ist keine Lamin C2 mRNA nachweisbar. Die Lamin A/C Expression erscheint in allen Geweben unverändert.

bestimmt (Abbildungen 10 und 11). Dazu wurde in einem ersten Versuchsansatz Gesamt-RNA aus Hoden- sowie aus somatischem Leber- und Muskelgewebe isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Durch die Wahl spezifischer Oligonukleotide sollte die cDNA von Lamin C2 bzw. Lamin A/C amplifiziert werden, sofern entsprechende mRNA im zu untersuchenden Gewebe vorhanden gewesen ist. Aus Abbildung 10 geht hervor, dass Lamin C2 Knock-out-Mäuse keine Lamin C2 mRNA mehr exprimieren können, da aus deren Testis Gewebeprobe keine spezifische cDNA amplifiziert werden konnte. Im Gegensatz dazu war in heterozygoten und wildtypischen Testes jeweils Lamin C2-spezifische mRNA nachweisbar. Die Tatsache, dass weder in Leber- noch in Muskelgewebe eine Lamin C2 cDNA-Bande nachgewiesen werden konnte, bestätigt, dass es sich bei Lamin C2 um ein rein keimbahnspezifisches Genprodukt handelt. Darüber hinaus konnte in allen untersuchten Geweben Lamin

A/C cDNA amplifiziert werden, wobei bezüglich der Expression der somatischen Lamine A und C keine Unterschiede zwischen wildtypischen, heterozygoten und Lamin C2 Knock-out-Mäusen festgestellt werden konnten (Abbildung 10).

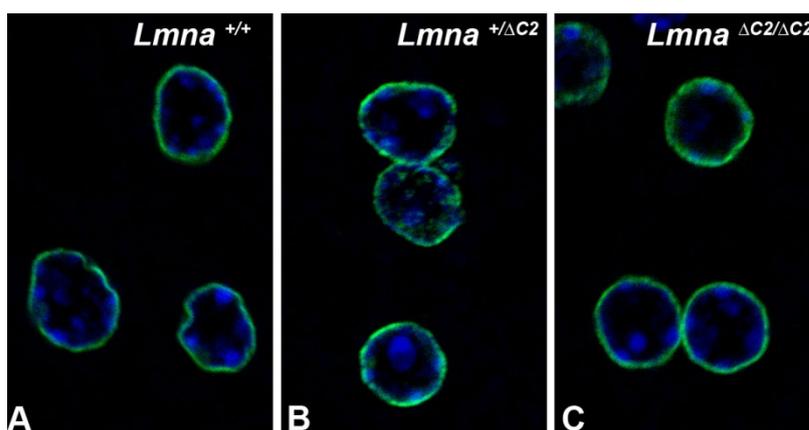
In einem weiteren Experiment wurde die Protein-Expression der Lamine A, C und C2 in *Lmna*<sup>+/+</sup>, *Lmna*<sup>+/-</sup> und *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäusen untersucht. Zu diesem Zweck wurden Hoden- und Lebergewebeproben mittels Immunblot untersucht. Die Proteindetektion erfolgte dabei mit einem spezifischen α-Lamin A/C

Primärantikörper, der die A-Typ Lamine A (70 kDa), C (65 kDa) und C2 (52 kDa) erkennt (Abbildung 11). Wie bereits auf Ebene der mRNA nachgewiesen, exprimieren *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäuse kein Lamin C2. Dies zeigt sich daran, dass in den Spuren, in denen Proteinproben des Hodens wildtypischer und heterozygoter Tiere aufgetragen wurden, jeweils eine spezifische Proteinbande bei etwa 50 kDa erscheint, in der Spur mit Probenmaterial aus dem Hoden einer Lamin C2 Knock-out-Maus hingegen nicht (Abbildung 11). Die Lamine A und C sind sowohl in Hoden- als auch in Lebergewebeproben aller drei Genotypen als Proteinbanden bei 70 und 65 kDa nachweisbar, wodurch auch dieser Versuchsansatz bestätigt, dass *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäuse nicht durch eine mangelnde A-Typ Lamin Expression beeinträchtigt werden können. Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass die Deletion des Lamin C2-spezifisch Startexons 1a zu einer vollständigen Lamin C2-Defizienz führt, und dass die somatischen A-Typ Lamine A und C weiterhin in wildtypischem Ausmaß exprimiert werden.



**Abbildung 11.** Analyse der A-Typ Lamin-Expression in *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäusen im Western Blot. Hoden- und Lebergewebeproben sechs Wochen alter wildtypischer, heterozygoter und *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Geschwistertiere wurden in 2x Proteinprobenpuffer aufgenommen, homogenisiert, denaturiert und im 12%igen SDS-Gel aufgetrennt (5 x 10<sup>5</sup> Zellen/Spur). A-Typ Lamine wurden mit einem polyklonalen α-Lamin A/C Antikörper (Santa Cruz; 1:2000 in 10% Milch) detektiert. Lamin C2 ist nach der Deletion des Exon 1a des *Lmna* Gens im Hodengewebe nicht mehr nachweisbar, die Lamine A und C dagegen in vergleichbaren Mengen.

Aufgrund der Untersuchung der mRNA- und Proteinexpression konnte bereits geklärt, dass das gezielte Ausschalten des Lamin C2-spezifischen Exons 1a keinen Einfluss auf die Expression von Lamin A und C hat. Als nächstes sollte die Lokalisation der somatischen A-Typ Lamine in ihrem zellulären Umfeld in betreffender Mauslinie immunfluoreszenzmikroskopisch überprüft werden, um auch eine etwaige Fehllokalisierung von Lamin A/C auszuschließen.



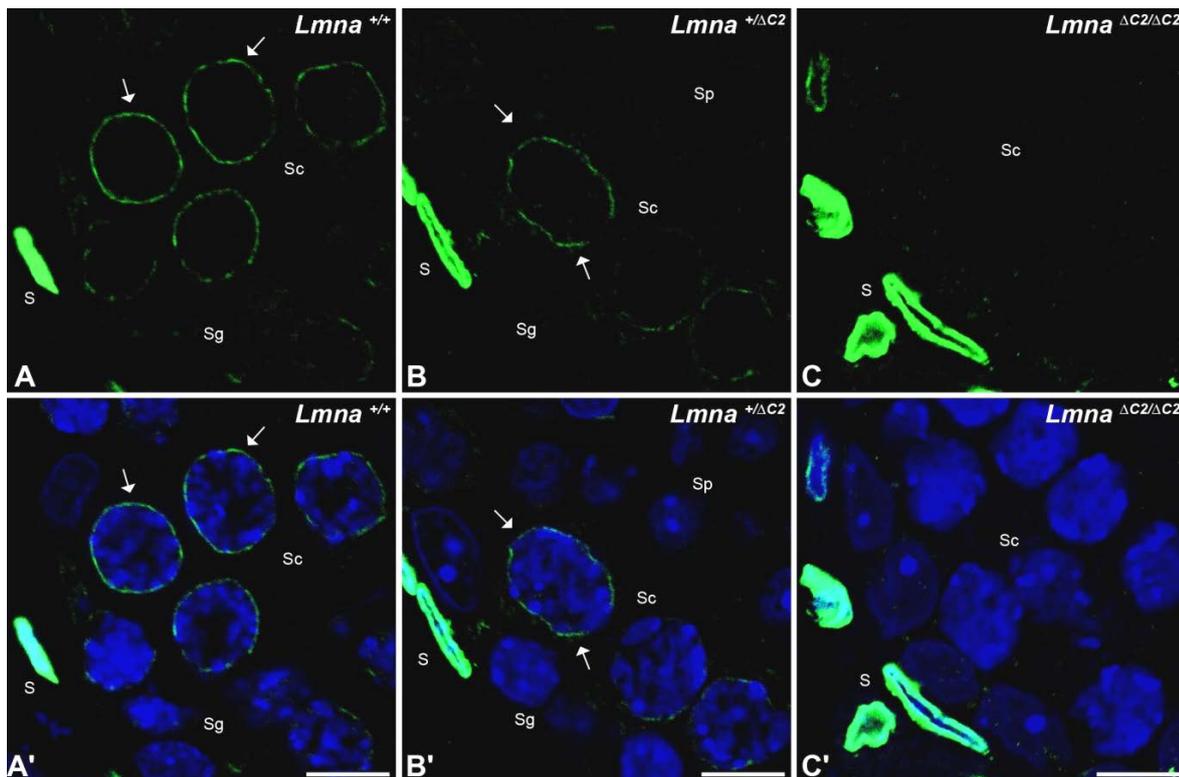
**Abbildung 12.** Die Deletion von Exon 1a des *Lmna* Gens hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von Lamin A und C in somatischen Zellen. Die Verteilung von A-Typ Laminen in somatischen Leberzellen wurde mithilfe der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Lebergewebeproben 8 Wochen alter wildtypischer (A), heterozygoter (B) und *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> (C) Geschwistertiere wurden für 3 h mit 1% PFA fixiert und in Paraffin eingebettet. 5 μm dicke Paraffinschnitte wurden nach Freilegung der Epitope (5 min, 125°C, 1 bar) mit polyklonalen α-Lamin A/C (Santa Cruz; 1:100 in PBS; grün) Antikörpern sowie dem DNA-

Farbstoff 33258-Hoechst (blau) gefärbt. Die Aufnahme zeigt die maximale 2D Projektion dreier Schnittserien, die am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop TCS-SP2 AOBS (Leica) aufgenommen wurden. Die Lokalisation der A-Typ Lamine in Lamin C2-defizienten Mäusen unterscheidet sich nicht von der in wildtypischen oder heterozygoten Tieren.

Lamine lokalisieren in somatischen Zellen kontinuierlich innerhalb der Kernhülle, und zwar A- und B-Typ Lamine gleichermaßen. Um zu überprüfen, ob der Eingriff in das *Lmna* Gen eine veränderte Verteilung der A-Typ Lamine innerhalb der Zelle zur Folge hat, wurde eine Immunlokalisation mit spezifischen α-Lamin A/C

Antikörpern auf Schnitten von Paraffin eingebettetem Lebergewebe durchgeführt. Leber diente in diesem Fall repräsentativ für somatische Gewebe im Allgemeinen. In der mikroskopischen Auswertung der Präparate zeigten sich keinerlei Unterschiede in der Lokalisation von Lamin A/C zwischen den somatischen Leberzellen von *Lmna*<sup>+/+</sup>, *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ C2</sup> und *Lmna* <sup>$\Delta$ C2/ $\Delta$ C2</sup> Mäusen (Abbildung 12), denn die Lamine lokalisierten in adäquater Weise in der Kernhülle aller dreier Genotypen.

Während die somatischen Lamine, wie in Abbildung 12 deutlich zu erkennen, eine kontinuierliche Ringfluoreszenz um den Zellkern zeigen, verteilt sich Lamin C2 in Spermatozyten gänzlich anders. Wie bereits einleitend erwähnt, ist Lamin C2 nur innerhalb spezieller Regionen, in denen die meiotischen Telomere eingebettet sind, in der Spermatozytenkernhülle zu finden (siehe 2.2.2.2). Da Lamin C2 bisher jedoch weder als mRNA noch als Protein im Hodengewebe von *Lmna* <sup>$\Delta$ C2/ $\Delta$ C2</sup> Mäuse nachgewiesen werden konnte, wurde angenommen, dass Spermatozyten dieser Mäuse genauso negativ für Lamin C2 sein sollten. Um dies zu überprüfen, wurde in einem weiteren immunocytochemischen Experiment die Lokalisation von Lamin C2 sowie die der A-Typ Lamine im Hodengewebe untersucht. Dazu wurden zunächst Gewebeproben wildtypischer, heterozygoter und Lamin C2-defizienter Mäuse in Paraffin eingebettet und Schnitte angefertigt. Nachdem bei diesen die durch Formaldehyd-Fixierung maskierten Epitope durch sogenanntes „Unmasking“ freigelegt wurden, wurden die Lamine A/C und C2 mit spezifischen  $\alpha$ -Lamin A/C Antikörpern detektiert.



**Abbildung 13.** *Lmna* <sup>$\Delta$ C2/ $\Delta$ C2</sup> Spermatozyten sind negativ für Lamin C2. Die Verteilung von Lamin C2 in Spermatozyten innerhalb eines Samenkanälchens wurde mithilfe der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Testisgewebeproben 8 Wochen alter wildtypischer (A, A'), heterozygoter (B, B') und *Lmna* <sup>$\Delta$ C2/ $\Delta$ C2</sup> (C, C') Geschwistertiere wurden für 3 h mit 1% PFA fixiert und in Paraffin eingebettet. 5  $\mu$ m dicke Paraffinschnitte wurden nach Freilegung der Epitope im Tischautoklaven (5 min, 125  $^{\circ}$ C, 1 bar) mit polyklonalen  $\alpha$ -Lamin A/C (Santa Cruz; 1:20 in PBS; grün A-C) Antikörpern sowie dem dem DNA-Färbstoff 33258-Hoechst (blau A'-C') gefärbt. Die Aufnahme zeigt die maximale 2D Projektion dreier Schnittserien, die am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop TCS-SP2 AOBS (Leica) aufgenommen wurden. Nach der Deletion von Exon 1a des *Lmna* Gens ist Lamin C2 in der Spermatozytenkernhülle nicht mehr nachweisbar (C, C'). Pfeile in A, A' und B, B' markieren die diskontinuierliche Lokalisation von Lamin C2 in Spermatozyten. S, somatische Zellen; Sg, Spermatozyten; Sc, Spermatozyten; Sp, Spermatozyten. Größenbalken: 15  $\mu$ m.

Dabei zeigte Lamin C2 in Spermatozyten wildtypischer und heterozygoter Mäuse die zu erwartende diskontinuierliche Lokalisation innerhalb der Kernhülle (Abbildung 13). In *Lmna*<sup>AC2/AC2</sup> Spermatozyten konnte Lamin C2 nicht nachgewiesen werden, was wiederum den Resultaten der Expressionsanalyse entspricht. Die Lokalisation der Lamine A und C in somatischen Zellen der Tubuswand unterschied sich auch in diesem Experiment nicht zwischen wildtypischen, heterozygoten und Knock-out-Mäusen, wodurch ein weiteres mal gezeigt werden konnte, dass die Expression der Lamine A und C in *Lmna*<sup>AC2/AC2</sup> Mäusen nicht beeinträchtigt ist.

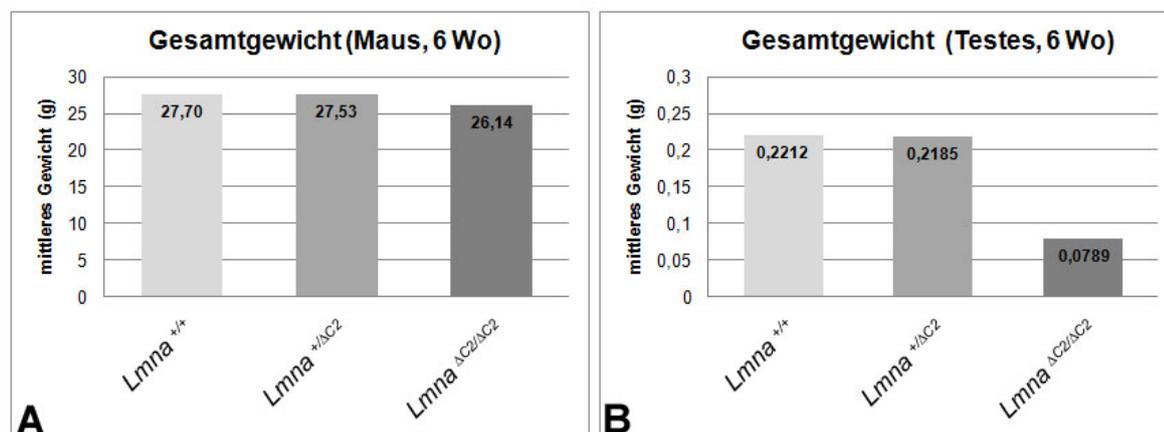
In diesem Teilabschnitt konnte experimentell eindeutig bewiesen werden, dass die gezielte Deletion des Lamin C2-spezifischen Startexon 1a des *Lmna* Gens zum vollständigen Verlust der Lamin C2 Expression führt, und zwar sowohl auf Ebene der mRNA als auch auf Protein-Ebene. Die Expression und Lokalisation der somatischen Lamine A und C, die ebenfalls vom *Lmna* Gen kodiert werden, wird hingegen durch dessen gezielte Mutation in keiner Weise beeinträchtigt. Nachdem die *Lmna*<sup>AC2/AC2</sup> Mauslinie in diesem Abschnitt also als Lamin C2-defizient charakterisiert werden konnte, befassen sich die nun folgenden Teilabschnitte mit den Konsequenzen, die sich aus dieser Defizienz ergeben.

### 3.1.2 Der Verlust von Lamin C2 führt zur Infertilität männlicher Mäuse

Lamin C2 ist ein meiotisches Protein, dessen Expression sich ausschließlich auf das Hodengewebe beschränkt. Aus diesem Grund sowie aufgrund der Tatsache, dass die A-Typ Lamin Expression durch die Deletion von Exon 1a unverändert bleibt, sollte sich der Verlust von Lamin C2 in *Lmna*<sup>AC2/AC2</sup> Mäusen nur auf die Testes auswirken und nicht irgendein anderes Gewebe betreffen. Um die phänotypischen Auswirkungen der Lamin C2-Defizienz zu untersuchen, wurden wildtypische, heterozygote und *Lmna*<sup>AC2/AC2</sup> Geschwistertiere über längere Zeiträume beobachtet. Dabei wurden jedoch weder physische Beeinträchtigungen, abnormale Verhaltensweisen, noch erhöhte Sterberaten bei betreffenden Knock-out-Mäusen festgestellt, wie es beispielsweise bei *Lmna*<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtet werden kann (Sullivan et al., 1999). Die zunächst subjektive phänotypische Unversehrtheit von *Lmna*<sup>AC2/AC2</sup> Mäusen konnte ferner bestätigt werden. So zeigten sich generell keine Unterschiede im Gesamtgewicht wildtypischer, heterozygoter und Lamin C2-defizienter Mäuse zwischen vier Wochen bis sechs Monaten. Repräsentativ für alle untersuchten Tiere der Lamin C2 Knock-out-Mauslinie, sind in Abbildung 14 A die Daten sechs Wochen alter Geschwistertiere graphisch zusammengefasst. Um eine quantitative Aussage darüber treffen zu können, ob sich diese Mäuse bezüglich ihres Gesamtgewichts von einander unterscheiden, wurden die gemittelten Daten einem Student's T-Test unterzogen und so statistisch verglichen. Die dabei erhaltenen *p*-Werte von wildtypisch zu heterozygot ( $p=0,961$ ), wildtypisch zu knockout ( $p=0,5626$ ) und heterozygot zu knockout ( $p=0,5951$ ) liegen allesamt deutlich über  $p=0,05$ , was bedeutet, dass sich die 6 Wochen alten wildtypischen, heterozygoten und Lamin C2-defizienten Geschwister in ihrem Gesamtgewicht nicht signifikant von einander unterscheiden.

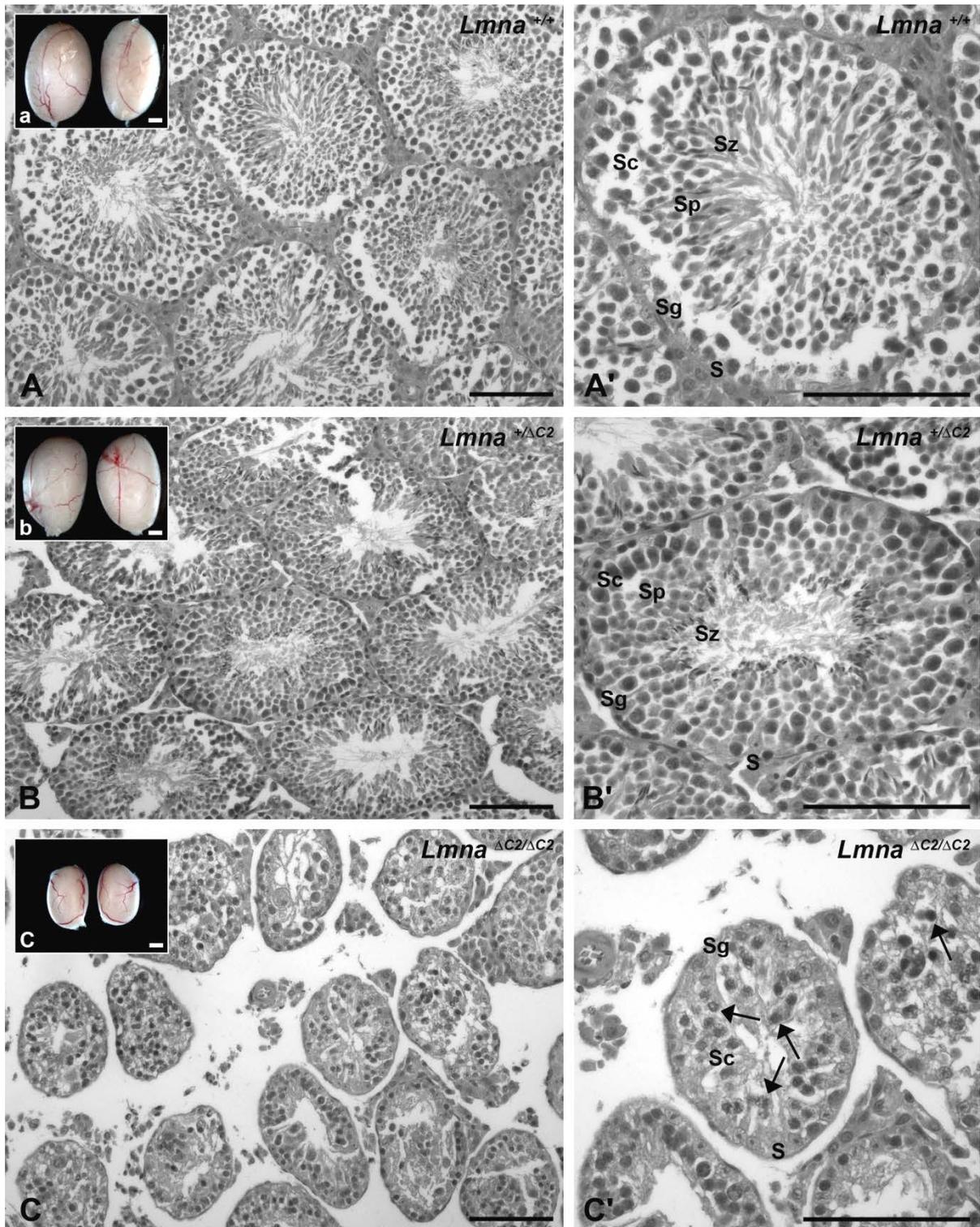
Aufgrund der meiosespezifischen Expression von Lamin C2 sowie der Resultate basierend auf Untersuchungen an *Lmna*<sup>-/-</sup> Mäusen (Alzheimer et al., 2004), wurde davon ausgegangen, dass es durch das Fehlen von Lamin C2 zu Fertilitätsproblemen kommt. Um dies zu überprüfen, wurden Lamin C2-defiziente Mäuse mit wildtypischen Tieren verpaart. Im Falle männlicher, allgemein phänotypisch unauffälliger *Lmna*<sup>AC2/AC2</sup> Mäuse,

kam es in keinem Fall zur Zeugung von Nachkommen, auch nicht wenn die Verpaarung über einen sehr langen Zeitraum aufrecht erhalten blieb. Daher wurden die Testes dieser Mäuse einer genaueren Analyse unterzogen. Dass Lamin C2-defiziente Mäuse deutlich kleinere Testes entwickeln war bereits bei der Präparation erkennbar (Abbildung 15, a-c), denn die Hoden aller untersuchten  $Lmna^{AC2/AC2}$  Mäuse zwischen vier Wochen und sechs Monaten zeigten im Vergleich zu heterozygoten und wildtypischen Geschwistertieren erhebliche Größenreduktionen. Die graphische Darstellung einhergehend mit der statistischen Auswertung, die repräsentativ für alle untersuchten Mäuse verschiedenen Alters aus dem Hodengewicht 6 Wochen alter Geschwistertiere ermittelt wurde, belegt dieses Ergebnis (Abbildung 14 B). Das mittlere Gewicht der Testes Lamin C2-defizienter Mäuse lag mit 0,0789 g deutlich unter dem Gewicht heterozygoter und wildtypischer Mäuse, deren Testes gemittelt 0,2212 g bzw. 0,2185 g wogen. Der mit diesen Daten durchgeführte Student's T-Test zeigt zudem eindeutig, dass sich die Testes von  $Lmna^{AC2/AC2}$  Mäusen signifikant von  $Lmna^{+/+}$  ( $p=0,001026$ ) bzw.  $Lmna^{+/AC2}$  ( $p<0,001$ ) Mäusen unterscheiden. Das Testesgewicht der beiden letztgenannten unterscheidet mit einem p-Wert von 0,9207 hingegen nicht von einander.



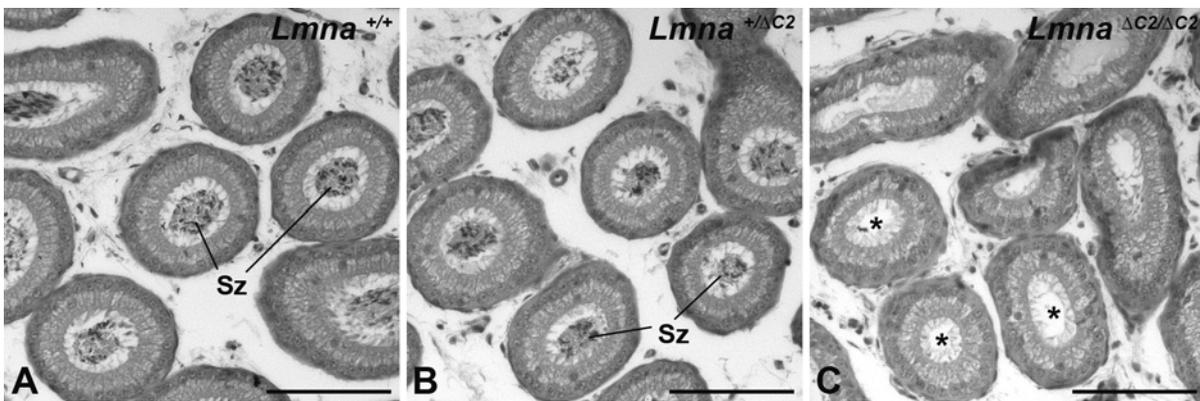
**Abbildung 14.**  $Lmna^{AC2/AC2}$  Mäuse sind phänotypisch gesund, weisen jedoch deutlich reduzierte Testes auf. (A) Die quantitative Auswertung des Gesamtgewichts wildtypischer, heterozygoter und Lamin C2-defizienter Mäuse ( $n=6$ ) zeigt, dass diese Mäuse mit einem mittleren Gewicht von 27,70 g, 27,53 g und 26,14 g ähnlich schwer sind. Ein Student's T-Test bestätigt dies mit  $p$ -Werten von 0,961 (wildtypisch zu heterozygot) 0,5626 (wildtypisch zu knockout) und 0,5951 (heterozygot zu knockout). (B) Lamin C2-defiziente Mäuse haben mit einem mittleren Gewicht von 0,0789 g deutlich leichtere Hoden als wildtypische (0,2212 g) oder heterozygote (0,2185 g) Mäuse. Die quantitative Auswertung des Gesamtgewichts der Testes wildtypischer, heterozygoter und Lamin C2-defizienter Mäuse ( $n=6$ ) bestätigt dies: Die Hoden von  $Lmna^{AC2/AC2}$  Mäusen unterscheiden sich mit  $p$ -Werten von 0,001026 signifikant von  $Lmna^{+/+}$  bzw. mit  $p<0,001$  von  $Lmna^{+/AC2}$  Mäusen. Die Testes wildtypischer und heterozygoter Mäuse unterscheiden sich mit  $p=0,9207$  nicht.

Nachdem bei Lamin C2-defizienten männlichen Mäusen vollständige Infertilität sowie signifikant kleinere Testes festgestellt worden waren, sollten als nächstes Ursachen der beobachteten Unfruchtbarkeit ermittelt werden. Um herauszufinden, wie sich das Fehlen von Lamin C2 auf die Organisation und Struktur des Hodens auswirkt, wurden  $Lmna^{AC2/AC2}$  Testes auf mikroskopischer Ebene histologisch untersucht. Die angewandte Hämatoxylin/Eosin-Färbung ist eine histologische Färbemethode, mit deren Hilfe eventuell auftretende morphologische Mängel erkannt und analysiert werden können. Hämatoxylin färbt nämlich alle sauren, also insbesondere die die DNA beinhaltenden Zellkerne, Eosin hingegen alle basischen Strukturen, d. h. vornehmlich das Zytoplasma. Zu diesem Zweck wurden die Testes 10 Wochen alter  $Lmna^{+/+}$ ,  $Lmna^{+/AC2}$  und  $Lmna^{AC2/AC2}$  Mäuse mit 4% Formaldehyd, was eine gute Gewebestrukturerhaltung gewährleistet, fixiert, in Paraffin eingebettet, 5  $\mu\text{m}$  dick geschnitten und anschließend mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.



**Abbildung 15.** Der Verlust von Lamin C2 führt zu einer geschädigten Zytoarchitektur der Samenkanälchen. Die Organisation im Hodengewebe wildtypischer, heterozygoter und  $Lmna^{\Delta C2/\Delta C2}$  Mäuse wurde histologisch untersucht. Dazu wurden Testes 10 Wochen alter Geschwistertiere UN mit 4% PFA bei RT fixiert und in Paraffin eingebettet. (a-c) zeigt die freipräparierten Testes dieser Mäuse, die mit einem Binokular M2FL III (Leica) aufgenommen wurden. Die Hoden Lamin C2-defizienter Mäuse weisen eine deutliche Größenreduktion auf. Der Eichstrich entspricht 1 mm. (A, A' - C, C') 5  $\mu\text{m}$  dicke Paraffinschnitte wurden mit Haematoxylin und Eosin gefärbt und mit dem Axiophot HB050 Stereomikroskop sowie der Axiocam MRm Digitalkamera (Zeiss) aufgenommen. (A-C) Übersichtsaufnahme von Samenkanälchen im Querschnitt. (A'-C') Ausschnittsvergrößerung aus A, B, C. Die Samenkanälchen wildtypischer und heterozygoter Mäuse sind innerhalb des Hodens homogen organisiert und beinhalten alle Stadien der Spermatogenese. Lamin C2-defiziente Mäuse zeigen morphologisch eine insgesamt unstrukturierte Hodenorganisation sowie deutlich kleinere Samenkanälchen. Die Tubuli seminiferi contorti enthalten keine postmeiotischen Zelltypen, sondern lediglich prämeiotische und meiotische Zellen, die zudem durch eine abnormale Zellmorphologie gekennzeichnet sind (Pfeile in C'). S, somatische Zellen; Sg, Spermatogonien Sc, Spermatozyten; Sp, Spermatozyten; Sz, Spermatozoen. Größenbalken: jeweils 100  $\mu\text{m}$ .

Die Testes aller drei Genotypen enthielten eine Vielzahl parallel angeordneter Samenkanälchen. Dabei liegen in einem jeden Samenkanälchen somatische Zellen sowie Spermatogonien nahe an der Tubuswand. Spermatozyten, Keimzellen die sich in der Meiose befinden, bilden die zweite Zellschicht, während haploide Spermatozoen in der Mitte des Tubus vorzufinden sind (siehe auch 2.2.1). In den Samenkanälchen wildtypischer und heterozygoter Tiere, kann genau dieses Szenario beobachtet werden, da Keimzellen aller Stadien der Spermatogenese nachgewiesen werden können (Abbildung 15 A, A' und B, B'). Samenkanälchen Lamin C2-defizienter Mäuse dagegen sind im Durchschnitt nicht nur deutlich kleiner, sie sind zudem durch ein vollständiges Fehlen postmeiotischer Zellen gekennzeichnet (Abbildung 15 C, C'). So konnten weder runde und elongierte Spermatozoen, noch reife Spermatozoen in den Tubuslumina von *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäusen ausgemacht werden. Weiterhin wurde bei den vorhandenen meiotischen Spermatozyten ein teilweise abnormales und morphologisch verändertes Aussehen festgestellt (Abbildung 15 C', Pfeile), was bereits stark auf eine defizitäre Meiose aufgrund des fehlenden Lamins C2 hindeutet.



**Abbildung 16.** *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäuse können keine reifen Spermien bilden. Epididymides wildtypischer, heterozygoter und *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäuse wurden histologisch untersucht. Dazu wurden Nebenhoden 10 Wochen alter Geschwistertiere UN mit 4% PFA bei RT fixiert und in Paraffin eingebettet. 5 μm dicke Paraffinschnitte wurden mit Haematoxylin und Eosin gefärbt und mit dem Axiophot HB050 Stereomikroskop sowie der Axiacam MRm Digitalkamera (Zeiss) digital aufgenommen. Reife Spermatozoen (Sz) befinden sich in den Kanälchen der Epididymes wildtypischer (A) und heterozygoter (B) Tiere. In den Samenkanälchen von *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäusen (C) hingegen sind keine Spermatozoen vorhanden (Sternchen). Größenskalen: 100 μm.

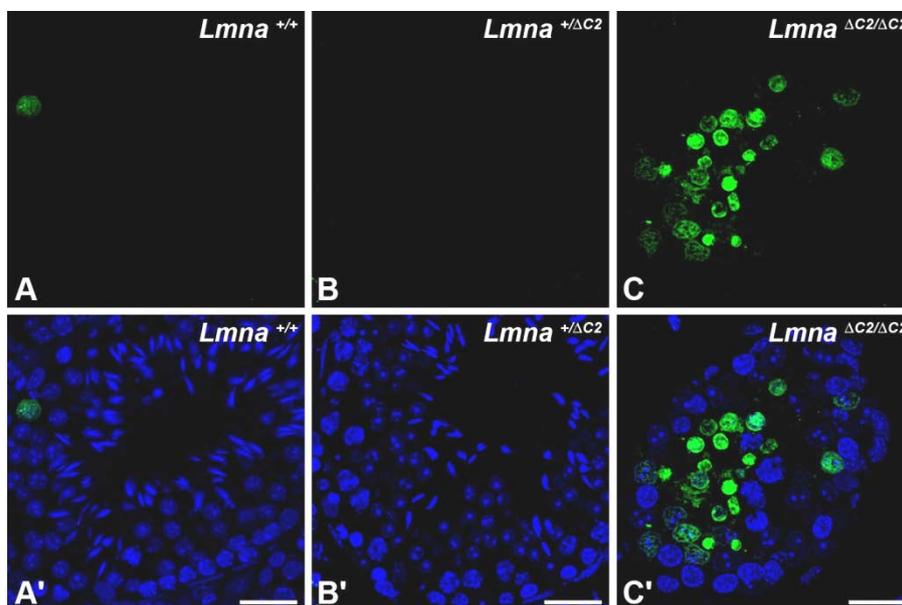
Ein einem weiteren Experiment, wurden auch die Nebenhoden Lamin C2-defizienter Mäuse histologisch untersucht. Die Epididymides können generell in eine Caput-, eine Corpus und eine Caudaregion untergliedert werden, wobei jedoch alle drei Regionen der Ausdifferenzierung und Speicherung reifender Spermatozoen dienen. Um die Epididymides von *Lmna*<sup>+/+</sup>, *Lmna*<sup>+/-</sup> und *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäusen morphologisch vergleichen zu können, wurden die Nebenhoden 10 Wochen alter wildtypischer, heterozygoter und Lamin C2-defizienter Geschwistertiere mit 4% Formaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet, 5 μm dick geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Wie in der Querschnittsaufnahme in Abbildung 16 eindeutig zu erkennen ist, befinden sich keine Spermatozoen in den Lumina der Samenkanälchen im Nebenhoden Lamin C2-defizienter Mäuse (Abbildung 16 C, Sternchen). Die Samenkanälchen in wildtypischen und heterozygoten Epididymides dagegen sind wohlgeordnet und gefüllt mit reifen Spermatozoen (Abbildung 16, A und B).

Die bei *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäusen beobachtete vollständige Infertilität männlicher Tiere, das gänzliche Fehlen postmeiotischer Keimzellen sowie das Vorhandensein offensichtlich geschädigter Spermatozyten, sprechen stark

dafür, dass die Spermatogenese in betroffenen Tieren aufgrund des Fehlens von Lamin C2 abbricht. Da diese Tiere außerdem phänotypisch völlig unauffällig und bis ins hohe Alter gesund sind, ist eindeutig nachgewiesen, dass die festgestellte Unfruchtbarkeit einzig vom Fehlen des Lamins C2 herrührt.

### 3.1.3 Bei männlichen Lamin C2-defizienten Mäusen arretiert die Meiose in der Prophase I

Das Fehlen von Lamin C2 führt zu einer fehlerhaften Spermatogenese einhergehend mit männlicher Infertilität. Die Tatsache, dass in den Samenkanälchen Lamin C2-defizienter Mäuse weder Spermatozoen noch Spermatozoen ausgemacht werden konnten und Spermatozoen zudem augenscheinlich geschädigt sind, lässt vermuten, dass es in *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäusen zu Fehlern in der Meiose kommt; insbesondere da es sich bei Lamin C2 um ein meiosespezifisch exprimiertes Protein handelt. Um zu analysieren, ob es während der Meiose aufgrund des Verlusts von Lamin C2 zu einem Absterben der Spermatozoen kommt, wurde eine TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) Analyse auf Paraffin eingebettetem Hodengewebe wildtypischer, heterozygoter und Lamin C2-defizienter Geschwister Tiere durchgeführt. Das Prinzip des TUNEL-Assays beruht auf der Markierung der 3'-Enden fragmentierter DNA durch das Enzym TdT (Terminale desoxynucleotidyl Transferase). Da apoptotische Zellen stark fragmentierte DNA aufweisen, können diese mit Hilfe eines TUNEL-Assays identifiziert und sichtbar gemacht werden. In diesem Versuch wurden die 3'-Enden fragmentierter DNA-Stämme mit dem Steroid Digoxigenin markiert und über Fluorescein-gekoppelte Fab Fragmente, die gegen Digoxigenin gerichtet waren, nachgewiesen.



**Abbildung 17. Spermatozoen Lamin C2-defizienter Mäuse gehen in Apoptose.** Apoptotische Zellen in den Samenkanälchen wildtypischer, heterozygoter und *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäuse wurden mithilfe eines TUNEL-Assays detektiert. Von Paraffin eingebettetem Hodengewebe (Fixierung: UN mit 4% PFA bei RT) 10 Wochen alter Geschwister Tiere wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, auf denen eine TUNEL-Analyse durchgeführt wurde. Fragmentierte und Digoxigenin markierte DNA wurde mit einem α Digoxigenin Fluorescein-gekoppelten Fab Fragment (Roche; 1:5 in PBS) detektiert. Apoptotische Zellen erscheinen grün (A-C). Zellkerne wurden durch eine

Gegenfärbung mit dem dem DNA-Farbstoff 33258-Hoechst (blau) sichtbar gemacht (A'-C'). Die Aufnahme zeigt die maximale 2D Projektion dreier Schnittserien, die am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop TCS-SP2 AOBS (Leica) aufgenommen wurden. Größenbalken: 25 µm.

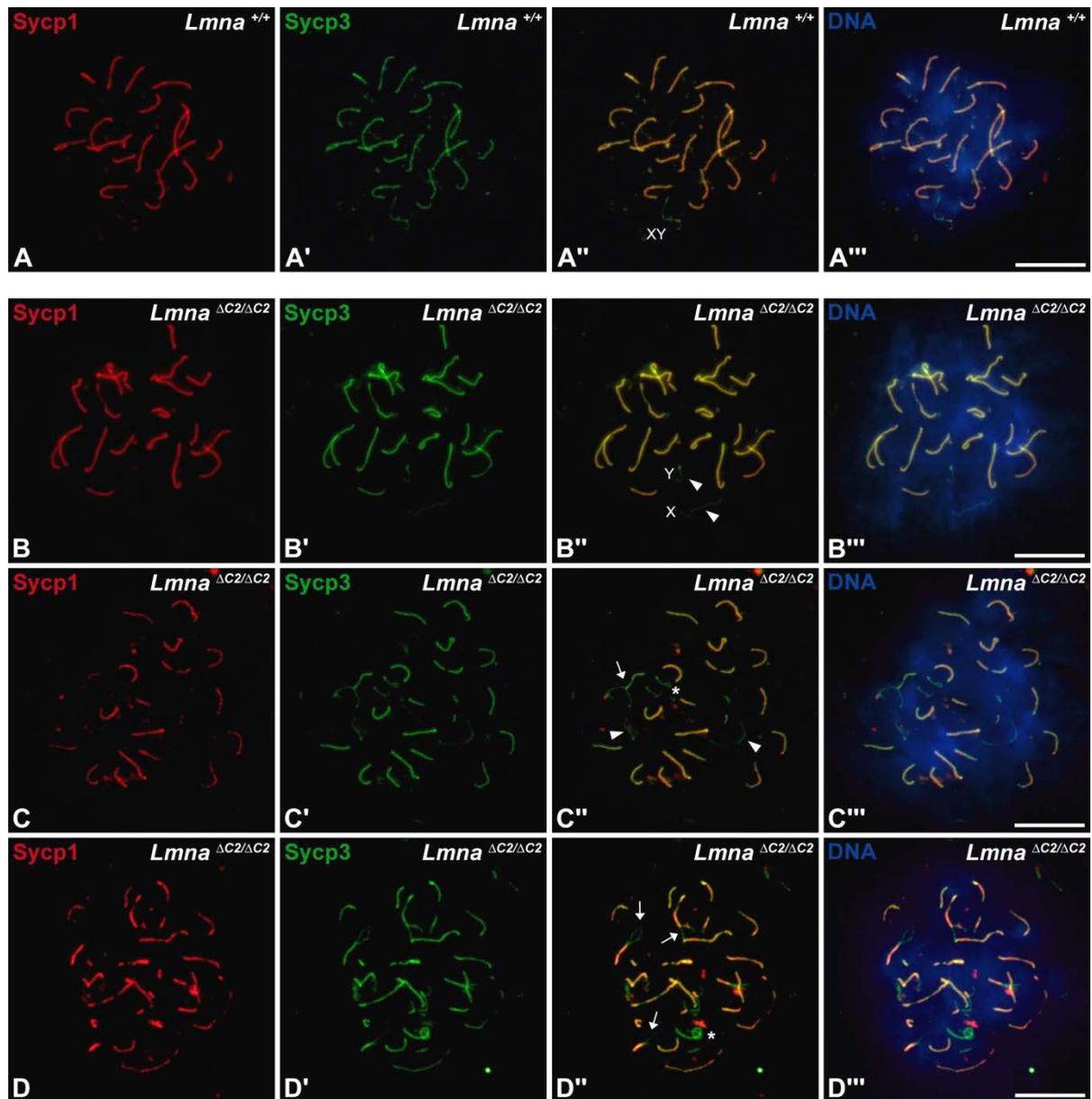
Das Ergebnis der TUNEL-Analyse ist in Abbildung 17 dargestellt. Samenkanälchen Lamin C2-defizienter Mäuse (Abbildung 17 C, C') sind, verglichen mit denen ihrer wildtypischen und heterozygoten Geschwister (Abbildung 17 A, A' und B, B'), durch eine stark erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen gekennzeichnet. Durch die Gegenfärbung mit dem DNA-Farbstoff 33258-Hoechst lassen sich die apoptotischen Zellen zudem eindeutig den

Spermatocyten zuordnen, was bestätigt, dass es in männlichen *Lmna<sup>Ac2/Ac2</sup>* Mäusen zu einem Spermatogenese-Arrest in der Meiose kommt.

Lamin C2 wird, wie erwähnt, während der Meiose, genauer gesagt während der Prophase der ersten meiotischen Teilung exprimiert. In diesem Stadium laufen mit der Findung, Paarung und Synapsis der homologen Chromosomen essentielle und hochkonservierte Prozesse ab, ohne die die sexuelle Reproduktion im Allgemeinen undenkbar wäre. Um schließlich in einem weiteren Experiment zu analysieren, ob und in welcher Weise sich das Fehlen von Lamin C2 auf einen dieser Prozesse auswirkt, wurde das Verhalten der homologen Chromosomen in *Lmna<sup>Ac2/Ac2</sup>* Mäusen immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht und mit dem wildtypischer Tiere verglichen. Die Paarung der homologen Chromosomen in meiotischen Prophase I Zellen lässt sich am besten 2-dimensional auf gespreiteten Zellen untersuchen, da bei dieser Methode ein Großteil löslicher Proteine verloren geht, die relevanten Chromatin gebundenen Proteine aber erhalten bleiben (Abbildung 18). Zur Detektion sowohl der Homologen selbst als auch ihrer Paarungszustandes wurden in diesem Versuch Antikörper gegen Sycp1 und Sycp3 verwendet (Alsheimer und Benavente, 1996; Öllinger et al., 2005). Sycp1 stellt als Transversalfilamentprotein die Hauptkomponente der zentralen Region des SC dar, des Proteingebildes, das sich zwischen zwei aneinander gelagerten Homologen ausbildet und diese reißverschlussartig zusammenhält. Dementsprechend kann Sycp1 nur zum Nachweis synapsierter Chromosomen verwendet werden (Abbildung 18 A-D). Damit zwei homologe Chromosomen jedoch durch das zentrale Element miteinander verbunden werden können, muss jedes Homologe mit einer speziellen Proteinkombination versehen werden, welche die Anlagerung von Sycp1 ermöglicht. Von besonderer Bedeutung sind dabei sogenannte Axial bzw. Lateralelementproteine, die sich zu Beginn der Prophase I schleifenförmig um das Chromatin von Schwesterchromatiden lagern und so zunächst die axialen Elemente des SC ausbilden. Sobald die beiden axialen Elemente zweier homologer Chromosomen in räumliche Nähe gekommen sind, kann mit dem Aufbau der zentralen Region begonnen werden. Ab diesem Zeitpunkt bezeichnet man die axialen als laterale Elemente des SC (Übersicht in Costa und Cooke, 2007, siehe auch 2. 2.1.1). Da Sycp3 ein wichtiger Bestandteil dieser axialen bzw. lateralen Elemente ist, eignet es sich zur Detektion sowohl von gepaarten und aber auch von ungepaarten chromosomalen Abschnitten (Abbildung 18 A'-D' und A''-D''). In wildtypischen Meiozyten liegen die homologen Chromosomen im Pachytän-Stadium in ihrer gesamten Länge synapsiert vor, was bedeutet, dass sie sowohl von Sycp1 als auch von Sycp3 markiert werden. Eine Ausnahme bilden dabei in Spermatocyten die Geschlechtschromosomen X und Y, die lediglich in der pseudoautosomalen Region synapsieren; Die restlichen Chromosomenabschnitte der Gonosomen liegen dagegen ungepaart vor und werden ausschließlich von Sycp3 erkannt (Abbildung 18 A-A'').

Die Beobachtungen an gespreiteten *Lmna<sup>Ac2/Ac2</sup>* Spermatocyten zeigen deutlich, dass es während der Meiose dieser Tiere zu massiven Defekten bei der Synapsis der homologen Chromosomen kommt. So fielen in nahezu allen dieser als pachytän-ähnlich bezeichneten Spermatocyten heterolog assoziierte, unvollständig gepaarte oder univalente Chromosomen auf (Abbildung 18 B''-D''). Bemerkenswert ist auch, dass nicht bei allen Homologen einer Zelle die gleichen bzw. Schädigungen überhaupt auftraten, da einerseits Zellen auszumachen waren, die vergleichsweise normal erschienen (Abbildung 18 B''), andererseits aber auch Spermatocyten mit gravierenden Defekten (Abbildung 18 C'' und D''). In jeder Zelle waren aber auch stets Bivalente ohne

augenscheinliche Defekte zu identifizieren, die normalen, wildtypisch synapsierten Homologen im Pachytän entsprachen. Daher hat man die insgesamt schwer geschädigten Spermatocyten Lamin C2-defizienter Mäuse als pachytän-ähnlich klassifiziert.



**Abbildung 18.** In *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Spermatocyten kommt es zu erheblichen Störungen bei der Paarung und Synapsis der homologen Chromosomen. Um die Aneinanderlagerung der homologen Chromosomen während der meiotischen Prophase I immunocytochemisch zu analysieren, wurden gespreitete Spermatocyten 9 Wochen alter wildtypischer (A - A'') und Lamin C2-defizienter (B,C,D - B''',C''',D''') Geschwistertiere mit Antiseren gegen zwei Hauptkomponenten des SC inkubiert: Zur Detektion der zentralen Region wurden polyklonale Rb  $\alpha$ -Sycp1 (C-term; 1:300 in PBS; rot A - D) Antikörper und zur Detektion von axialen Elementen wurde ein Gp  $\alpha$ -Sycp3 (Serum # 13; 1:150 in PBS; grün A' - D') Antiserum verwendet. Homologe Chromosomen mit einer vollständigen Synapsis (gelb) sowie unsynapsierte chromosomale Regionen (grün) sind in A'' - D'' gezeigt. Die DNA wurde mit dem Farbstoff 33258-Hoechst (blau; A''' - C''') sichtbar gemacht. Die Präparate wurden mit dem Axiophot HB050 Fluoreszenzmikroskop sowie der Axiocam MRm Digitalkamera (Zeiss) analysiert. (A'') Wildtypische Spermatocyten zeichnen sich durch vollständig gepaarte Autosomen sowie ein Bivalent der Geschlechtschromosomen aus. (B'',C'',D'') *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Spermatocyten hingegen weisen eine stark erhöhte Anzahl von Univalenten (Pfeilspitzen), heterologen Assoziationen (Pfeile) sowie Schleifenbildungen (Sternchen) auf. Größenbalken: 20  $\mu$ m.

Dass es während der Spermatogenese Lamin C2-defizienter Mäuse zu gravierenden Schädigungen der Spermatocyten im Verlauf der meiotischen Prophase I kommt, konnte darüber hinaus mithilfe einer anderen Spreitungstechnik bestätigt werden, bei der die selben Defekte bei der Paarung und Synapsis der homologen

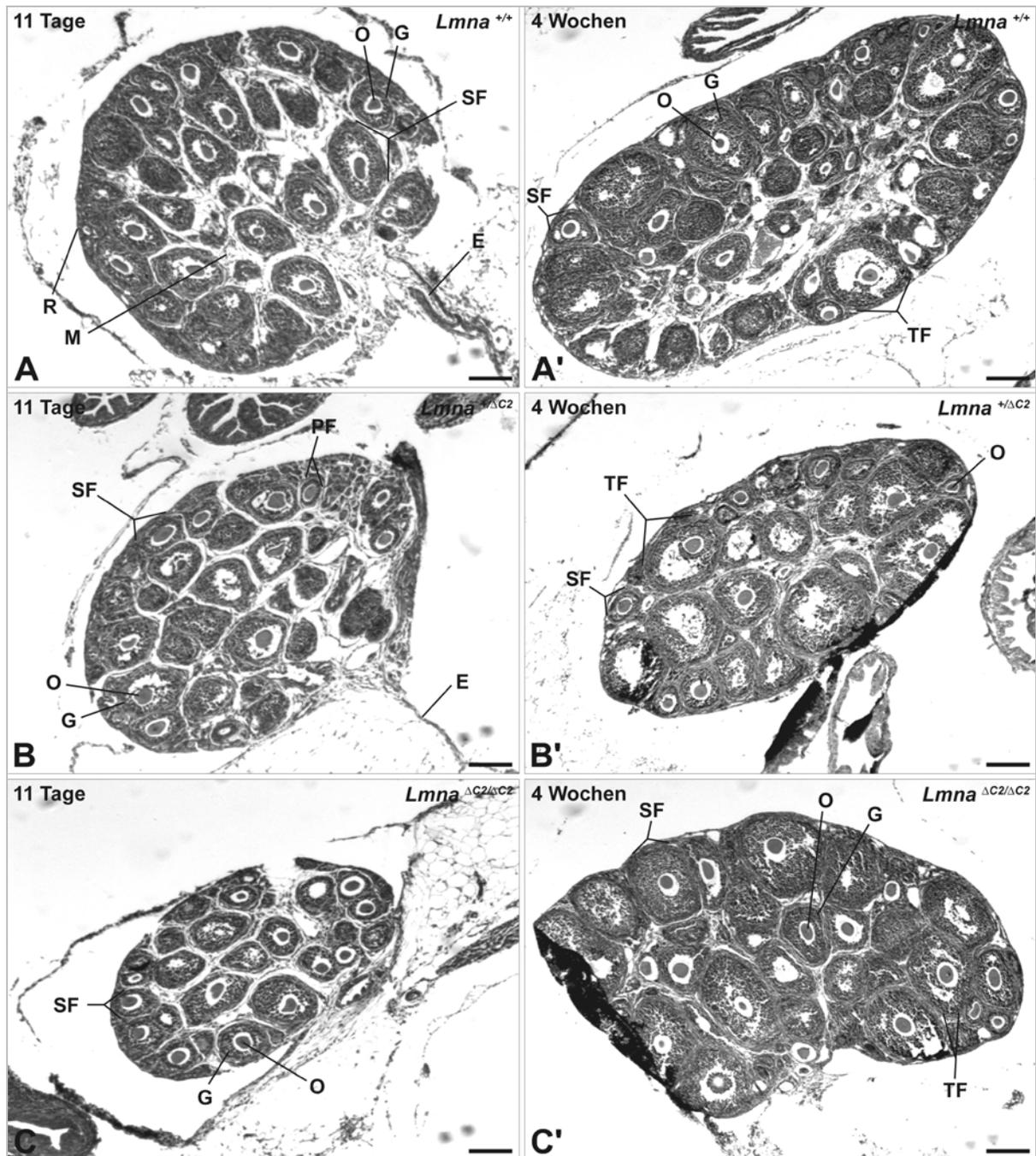
Chromosomen in *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Spermatozyten identifiziert wurden (Link, 2010). Die kategorische Einteilung und Quantifizierung beobachteter Defekte ergab darüber hinaus, dass *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Spermatozyten zu 99% geschädigt und somit in einem Pachytän-ähnlichen Zustand waren, dass das Ausmaß der abnormal synapsierten Homologen innerhalb einer Spermatozyte aber auch von Zelle zu Zelle stark variierte (Link, 2010).

Zusammenfassend konnte in diesem Teilabschnitt experimentell nachgewiesen werden, dass das Vorhandensein von Lamin C2 für ein erfolgreiches Durchlaufen der männlichen Keimbahn unerlässlich ist. Kommt es nämlich, wie in diesem Fall durch die gezielte Deletion des Lamin C2-spezifischen Exons 1a, nicht mehr zur Expression und Lokalisation von Lamin C2 in der Spermatozytenkernhülle, gehen betroffenen Spermatozyten offensichtlich aufgrund defizitärer und unvollständiger Homologenpaarung in Apoptose. Dieses programmierte Zellsterben führt schließlich unweigerlich zu einem Arrest der Spermatogenese im meiotischen Prophase I Stadium, was wiederum die Entwicklung funktioneller Spermien unmöglich macht und in vollständiger Unfruchtbarkeit resultiert.

### 3.1.4 Weibliche *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäuse sind fertil

In vorangegangenen Abschnitten ging es ausschließlich um die Infertilität männlicher Lamin C2-defizienter Mäuse sowie deren Ursachen. Doch wie äußert sich der Verlust von Lamin C2 in der Oogenese, der Differenzierung der weiblichen Keimzellen? Nachdem bei weiblichen *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäusen somatische Defekte ausgeschlossen werden konnten, wurde mit der Untersuchung des möglichen Keimzell-Phänotyps begonnen. Wie unter 2.1.2 erwähnt, wurden zu diesem Zweck Lamin C2-defiziente Mäuse mit wildtypischen Mäusen verpaart. Dabei zeigt sich, dass weibliche *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäuse, im Gegensatz zu Ihren männlichen Pendanten, fertil und zur Zeugung von Nachkommen fähig waren. Um zu überprüfen, ob sich das Ovargewebe Lamin C2-defizienter Mäuse aufgrund des fehlenden Lamins C2s dennoch von dem heterozygoter oder wildtypischer Mäuse unterscheidet, wurden Ovarien 11 Tage und vier Wochen alter Geschwistertiere für 3 h mit 1% Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Die meiotische Prophase I, während der Lamin C2 in Männchen exprimiert wird, ist bei weiblichen Tieren bereits bei der Geburt vollendet. Aus diesem Grund wurden die Ovarien prä- und postpubertierender Mäuse untersucht, da man in diesem Stadium erkennen sollte, ob generell Keimzellen nach der Prophase I vorhanden waren und wenn ja, ob diese durch ein abnormales Erscheinungsbild gekennzeichnet sind.

Aus diesem Grund wurden von den in Paraffin eingebetteten Ovarien Schnitte angefertigt, die mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt wurden. Bei der Auswertung der Präparate zeigten sich keinerlei Unterschiede zwischen den Ovarien wildtypischer, heterozygoter und Lamin C2-defizienter Geschwistertiere (Abbildung 19); und zwar weder bei 11 Tage (Abbildung 19 A-C) noch bei 4 Wochen (Abbildung 19 A'-C') alten Weibchen. In allen untersuchten Ovarien konnte zudem eine vergleichsweise ähnliche Anzahl von sich entwickelnden Follikeln ausgemacht werden, die jeweils phänotypisch unauffällige Oocyten und Granulosazellen enthielten. Aufgrund dieser Resultate kann zunächst davon ausgegangen werden, dass Lamin C2 keine bzw. eine untergeordnete Funktion in der weiblichen Meiose hat, was wiederum eine Erklärung für die Fertilität weiblicher *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäuse ist.



**Abbildung 19.** Ovarien Lamin C2-defizienter Mäuse erscheinen phänotypisch unauffällig. Ovarien wildtypischer, heterozygoter und *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäuse wurden histologisch untersucht. Dazu wurden Ovarien 11 Tage (A - C) bzw. 4 Wochen (A' - C') alter Geschwisteriere für 3 h mit 1% PFA bei RT fixiert und in Paraffin eingebettet. 5 μm dicke Paraffinschnitte wurden mit Haematoxylin und Eosin gefärbt und mit dem MZ 16FA Stereomikroskop (Leica) sowie der uEye Digitalkamera (IDS) analysiert. Gezeigt ist eine Querschnittsaufnahme durch Ovarien wildtypischer, heterozygoter und Lamin C2-defizienter Mäuse. Sowohl Ovarien 11 Tage als auch 4 Wochen alter Weibchen zeigen in *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäusen keine pathologischen Auffälligkeiten und beinhalten alle entwicklungstypischen Zellen. R, Rindenregion; M, Markregion; O, Oocyte; G, Granulosazellen; PF, Primärfollikel; SF, Sekundärfollikel; TF, Tertiärfollikel; E, Eileiter. Größenbalken: 100 μm.

In diesem Abschnitt des Ergebnisteils wurde die Grundcharakterisierung der Lamin C2-Knock-out-Mauslinie behandelt und der aus diesem Knock-out resultierende Phänotyp vorgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass männliche *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäuse aufgrund defizitärer Homologenpaarung in der Meiose vollständig infertil sind, weibliche Mäuse dagegen Nachkommen erzeugen können. Da weiterhin nachgewiesen werden konnte, dass die Deletion von Exon 1a des *Lmna* Gens ausschließlich zum Verlust von Lamin C2 sowie dem

beschriebenen Phänotyp führt, und die Expression der somatischen A-Typ Lamine nicht beeinträchtigt, wäre bewiesen, dass auch die beobachtete Infertilität männlicher *Lmna*<sup>-/-</sup> Mäusen vom Fehlen des Lamins C2 verursacht wird.

### 3.2 Die Umformung des Spermienkopfes der Säuger umfasst die Expression neuer LINC-Komplex-Bestandteile sowie den Aufbau zweier neuer LINC-Komplexe

Die Spermiogenese der Säuger, die Differenzierungsphase haploider männlicher Keimzellen, ist ein hochkomplexer Prozess, an dem die unterschiedlichsten, präzise aufeinander abgestimmten Mechanismen beteiligt sind. Von besonderer Bedeutung ist dabei die morphologische Umgestaltung runder, bewegungsunfähiger Spermatiden in stromlinienförmige, äußerst mobile Spermatozoen, die in der Lage sind eine Oocyte zu befruchten. Während dieses Umformungsprozesses elongiert und schrumpft allerdings nicht nur die Spermatide an sich, sondern außerordentlich auch der Spermatidenzellkern. Obwohl man stark annimmt, dass an der Umgestaltung des Spermatidenkerns spezielle Zytoskelettbestandteile, Kernbewegungen sowie Mechanismen zur Kompaktierung des Chromatins beteiligt sind, sind die molekularen Abläufe dieses wohlkoordinierten Prozesses weitgehend unbekannt (Russell et al., 1991; Kierszenbaum und Tres, 2004; Hecht, 1998; Übersichten in Hermo et al., 2010 a, b). Es mehren sich jedoch die Hinweise, dass auch die Kernhülle einen entscheidenden Beitrag zur Umformung des Spermienkopfes leistet. Denn während sich der Spermatidenkern verformt und in die Länge gezogen wird, ist eine bemerkenswerte Reorganisation der Kernhülle einhergehend mit der Umverteilung ihrer meisten Komponenten zu beobachten (Alsheimer et al., 1998; Mylonis et al., 2004; Schütz et al., 2005 a, b).

Zwei relativ neu entdeckte Proteinfamilien integraler Kernmembranproteine, nämlich SUN-Domänen Proteine der INM und KASH-Domänen Proteine der ONM, erscheinen in diesem Zusammenhang besonders interessant, da sie gemeinsam die Kernhülle durchspannende LINC-Komplexe aufbauen und so den Kern an das Zytoskelett binden. Da LINC-Komplexen zudem Funktionen bei der Positionierung, Bewegung und Deformation des Zellkerns aber auch bei dynamischen Prozessen innerhalb des Kerns zugeschrieben werden (Übersichten in Burke und Roux, 2009; Alsheimer, 2009), kann man sie sehr gut sich als geeignete Kandidaten bei der gezielten Umorganisation des Spermatidenkopfes vorstellen.

Dies zu untersuchen, nämlich ob LINC-Komplexe tatsächlich während der Elongation und Deformation des Spermienkopfes gebildet werden, war Gegenstand dieser Arbeit. Da für Sun2 bereits eine postmeiotische Expression ausgeschlossen (Schmitt et al., 2007), und außerdem aufgrund erster Hinweise ein Vorhandensein von Sun1 und Sun3 in der Spermiogenese angenommen wurde, sollten zunächst die Expressionsprofile der beiden SUN-Proteine 1 und 3 detailliert analysiert werden. In einem weiteren zentralen Teilprojekt wurde schließlich nach LINC-Komponenten der ONM gesucht, die zusammen mit den erwähnten SUN-Proteinen spermiogeneserelevante LINC-Komplexe aufbauen könnten.

### 3.2.1 Expression und Lokalisation von Sun3 während der Differenzierung des Spermienkopfes

Das humane SUN3 wurde erstmals 2006 als putatives SUN-Domänen Protein mit einer starken Expression im Hoden in der Literatur erwähnt (Crisp et al., 2006). Da jedoch weder bekannt war, ob dieses kleine SUN-Protein tatsächlich auf Protein-Ebene exprimiert wird, noch welches gewebespezifische Expressionsmuster bzw. welche zelluläre Lokalisation es aufweist, wurde diesen Fragen in vorliegender Arbeit nachgegangen.

#### 3.2.1.1 Sun3 ist ein neues SUN-Domänen Protein

Die Proteinsequenz des putativen humanen Proteins SUN3 (accession number: gbAAH26189) war zunächst Ausgangspunkt für die datenbankgestützte Suche (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) nach einem murinen Sun3 Homolog. Dabei wurde eine aus adultem Hodengewebe isolierte cDNA (accession number: gbAK132922) identifiziert, die vom murinen *Sunc1* Gen (Sad1 and UNC84 domain containing 1; gene ID: 194974) kodiert wird. Ausgehend von dieser cDNA-Sequenz wurde durch die Wahl spezifischer Oligonukleotide ein cDNA-Fragment von 985 bp amplifiziert, dessen proteinkodierende Sequenz 963 bp betrug (Sun3; accession number: HQ141857). Das dazu korrespondierende Protein von 320 AS hatte ein geschätztes Molekulargewicht von 36.800, einen isoelektrischen Punkt von ca. 7,67, und war zu 71% identisch (82% ähnlich) zu dem zuvor beschriebenen humanen SUN3.

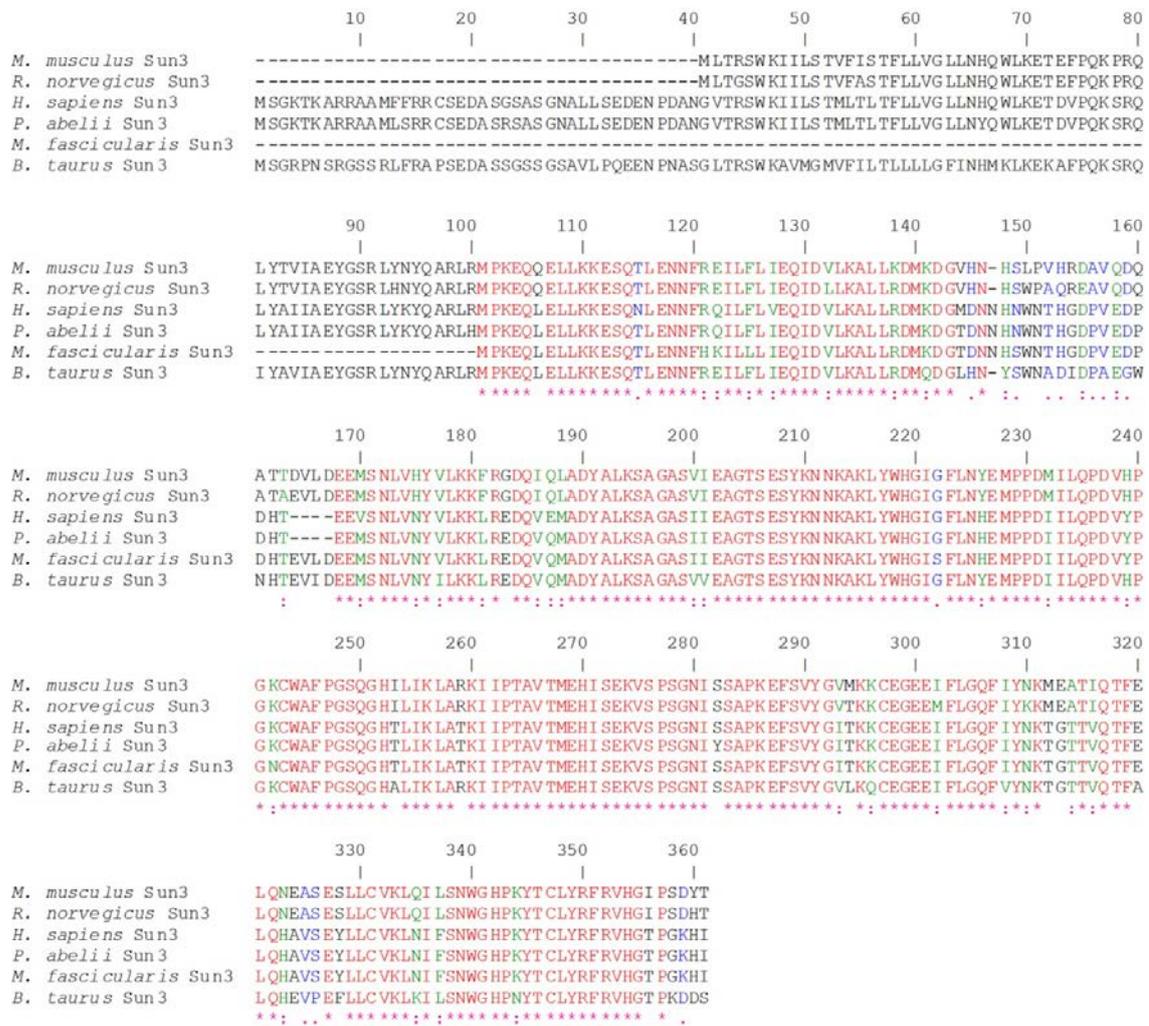


Abbildung 20. Das Protein Sun3 ist innerhalb der Säugetiere hochkonserviert. Die Aminosäuresequenzen mutmaßlicher sowie annotierter Sun3 Proteine verschiedener Spezies der Säuger wurden mithilfe des freizugänglichen Online-Computerprogramm ClustalW2 für multiples Sequenzalignment verglichen. Identische Aminosäuren sind rot markiert und mit einem Sternchen versehen. Biochemisch sehr ähnliche Aminosäuren sind grün sowie durch einen Doppelpunkt und Aminosäuren, die sich biochemisch etwas weniger ähneln, blau sowie durch einen Punkt gekennzeichnet. Bei schwarzen Aminosäuren ist keine oder nur eine geringe Ähnlichkeit vorhanden.

Um ferner die Konserviertheit von Sun3 innerhalb der Säugetiere zu bestimmen, wurden weitere datenbankgestützte Suchen mit murinem Sun3 als Ausgangssequenz durchgeführt. Anschließend wurden ausgewählte Sequenzen mutmaßlicher Sun3 Proteine mit dem Online-Computerprogramm ClustalW2 für multiples Sequenzalignment verglichen (Abbildung 20). Die verglichenen Säuger-Proteine zeigten insgesamt eine sehr hohe Konserviertheit, insbesondere im C-terminalen Bereich des Proteins, was sich an der Vielzahl identischer und biochemisch ähnlicher Aminosäuren zeigte (Abbildung 20). Die Ähnlichkeit der jeweiligen Sun3 Proteine zu einander ist in Tabelle 6 zusammengefasst, wobei die einzelnen Angaben auf den Daten des ClustalW2 Sequenzvergleichs beruhen. Dieser Auflistung ist einerseits eindeutig zu entnehmen, dass Sun3 innerhalb der Säugetiere sehr stark konserviert ist, aus dem Sequenzvergleich mit *X. tropicalis* und *G. gallus* geht andererseits auch hervor, dass offensichtlich eine gewisse Konserviertheit von Sun3 – wiederum besonders im C-terminalen Bereich – innerhalb der Vertebraten besteht.

Tabelle 6. Konserviertheit von Sun3 innerhalb der Vertebraten.

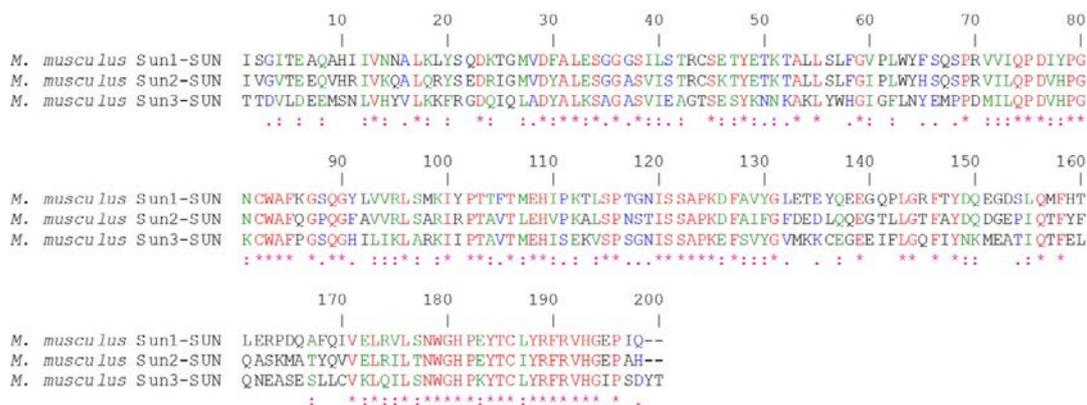
	<i>H. sapiens</i>	<i>R. norvegicus</i>	<i>M. fascicularis</i>	<i>B. taurus</i>	<i>P. abelii</i>	<i>X. tropicalis</i>	<i>G. gallus</i>
<b>Identisch mit <i>M. musculus</i></b>	71,2%	89,4%	66,4%	71,1%	71,5%	27,8%	29,2%
<b>Ähnlich zu <i>M. musculus</i></b>	82,0%	92,5%	75,5%	82,8%	81,8%	52,5%	63,8%

Nachdem festgestellt worden war, dass in den unterschiedlichsten Spezies homologe Proteine zum murinen Sun3 gefunden werden konnten, die innerhalb der Säuger (und auch der Vertebraten) stark konserviert sind, sollte als nächstes ermittelt werden, welche Ähnlichkeiten Sun3 zu den bereits charakterisierten SUN-Domänen Proteinen Sun1 und Sun2 aufweist. Zu diesem Zweck wurden die Proteinsequenzen dieser drei Proteine der Maus mithilfe des Computerprogramms ClustalW2 verglichen und tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 7). Bezogen auf die gesamte Proteinsequenz ist zwischen Sun1 bzw. Sun2 und Sun3 nur eine geringe Ähnlichkeit erkennbar.

Tabelle 7. Konserviertheit von Sun3 innerhalb der SUN-Proteinfamilie der Maus.

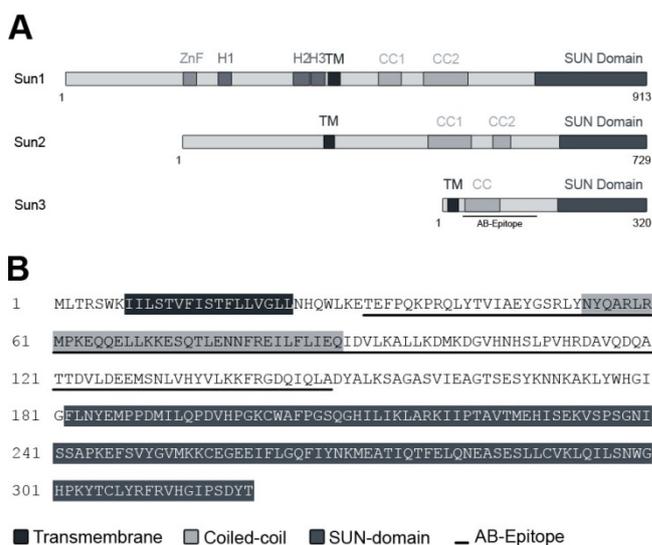
	<b>Sun1</b>	<b>Sun1 (nur SUN-Domänen)</b>	<b>Sun2</b>	<b>Sun2 (nur SUN-Domänen)</b>
<b>Identisch mit Sun3</b>	12,0%	41,0%	16,3%	44,0%
<b>Ähnlich zu Sun3</b>	25,6%	78,0%	32,7%	78,5%

Da sich die Ähnlichkeit der SUN-Domänen Proteine jedoch generell auf die namensgebende C-terminale SUN-Domäne beschränkt, wurden die 200 letzten AS, was der SUN-Domäne entsprechen sollte, von Sun1 bzw. Sun2 und Sun3 verglichen. Diese Proteinbereiche zeigten mit 41 bzw. 44% identischer und 78 bzw. 78,5% ähnlicher AS deutliche Sequenzverwandtschaften (Tabelle 7), was in Abbildung 21 graphisch dargestellt ist. Dabei ist besonders auffällig, dass etwa die 20 letzten AS fast nahezu identisch sind. Dies deutet stark darauf hin, dass die Proteine Sun1, Sun2 und Sun3 zumindest C-terminal einen gemeinsamen Ursprung haben, und dass vermutlich auch Sun3 ein Protein mit einer C-terminalen SUN-Domäne ist. Aufgrund dieser Daten kann also geschlossen werden, dass es sich bei Sun3, basierend auf seiner AS-Sequenz, um ein konserviertes SUN-Protein handeln sollte.



**Abbildung 21.** Der C-Terminus von Sun3 ist homolog zur SUN-Domäne von Sun1 und Sun2. Die Aminosäuresequenzen der SUN-Domänen von Sun1, Sun2 und Sun3 der Maus wurden mithilfe des freizugänglichen Online-Computerprogramm ClustalW2 für multiples Sequenzalignment verglichen. Identische Aminosäuren sind rot markiert und mit einem Sternchen versehen. Biochemisch sehr ähnliche Aminosäuren sind grün sowie durch einen Doppelpunkt und Aminosäuren, die sich biochemisch etwas weniger ähneln, blau sowie durch einen Punkt gekennzeichnet. Bei schwarzen Aminosäuren ist keine oder nur eine sehr geringe Ähnlichkeit vorhanden.

Zur Bestimmung weiterer struktureller Motive im Protein Sun3 wurde dessen AS-Sequenz mit den Online-Computerprogrammen PSORTII und SMART zur Vorhersage von Proteinstrukturmotiven analysiert. Dabei wurden Sun3 distinkte N- und C-Termini zugewiesen, die durch eine einzige N-terminal gelegene TM-



**Abbildung 22.** Sun3 ist ein neues Mitglied der SUN-Proteinfamilie.

(A) Die schematische Darstellung zeigt SUN-Domänen Proteine, die bislang in Mäusen identifiziert wurden. Angegeben sind außerdem die relativen Positionen eines Zinkfinger Motifs (ZnF), der hydrophoben Regionen (H1-H3), der transmembranen (TM), Coiled-coil- sowie der SUN-Domänen. (B) Aminosäuresequenz des murinen Sun3 Proteins mit vorhergesagten Strukturelementen (grau hinterlegt). Die Peptidsequenz, die für die Immunisierung ausgesucht worden war, ist unterstrichen. Aus Göb et al., 2010. doi:10.1371/journal.pone.0012072.g001.

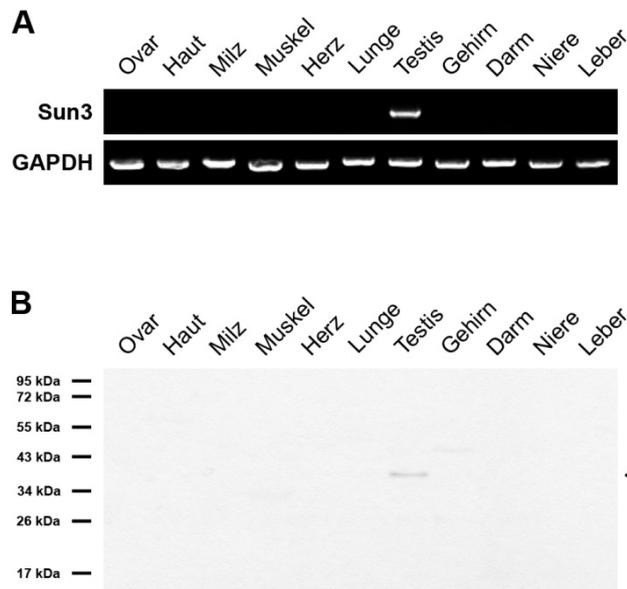
auf die Sequenzverwandtschaft der SUN-Domäne mit den paralogen Säugerproteinen Sun1 und Sun2 bzw. homologen Sun3 Proteinen anderer Spezies keine Homologien mit anderen Proteinen festgestellt werden konnten, wurde zur Generation polyklonaler Antikörper ein über die CC-verlaufendes Epitop gewählt (Abbildung 22). Das daraus resultierenden affinitätsgereinigten Antiserum (Gp  $\alpha$ -Sun3; Göb, 2007) wurde in dieser Arbeit zur Bestimmung des Expressionsmusters und der Lokalisation von Sun3 verwendet.

Domäne voneinander getrennt werden (Abbildung 22). Aufgrund dieser Proteinorganisation sowie der von Liu und Kollegen durchgeführten Protein-spaltungs-Versuche (Liu et al., 2007) konnte Sun3 als neues Typ II Transmembranprotein mit nukleoplasmatischem N-Terminus charakterisiert werden. Der demnach luminal gelegene C-Terminus sollte neben der bereits erwähnten etwa 200 AS langen SUN-Domäne eine CC-Domäne in direkter Nachbarschaft zur TM-Domäne enthalten.

Zusammenfassend kann aus diesen bioinformatischen Analysen geschlossen werden, dass es sich bei Sun3 um ein neues Mitglied der SUN-Proteinfamilie der Säuger handelt, das die im Allgemeinen für alle SUN-Proteine typische Proteinstruktur aufweist (Abbildung 22 A). Da bis

### 3.2.1.2 Sun3 wird ausschließlich während der Spermio-genese exprimiert

Nachdem Sun3 im vorhergegangenen Abschnitt durch den Einsatz bioinformatischer Hilfsmittel als neues putatives SUN-Domänen Protein der Säuger vorgestellt worden war, beschäftigt sich der nun folgende Abschnitt mit der Untersuchung der Expression sowie der zellulären Verteilung von Sun3. Um zu überprüfen, ob das für Sun3 codierende *Sunc1* Gen, wie bereits mehrfach beschrieben (Crisp et al., 2006; Schmitt, 2007; Göb,



**Abbildung 23. Sun3 wird ausschließlich im Hoden exprimiert.** Die gewebespezifische Expression von Sun3 wurde mittels RT-PCR (A) und Western Blot (B) untersucht. (A) Gesamt-RNA wurde aus verschiedenen Geweben adulter Mäuse isoliert und je 1 µg für die RT-PCR verwendet. Die Amplifikation der Sun3-spezifischen cDNA erfolgte mit dem Primerpaar Sun3vATG5' (forward) und Sun3\_AB\_3'Xho (reverse) in 30 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 55°C. Eine GAPDH-PCR mit GAPDH5' (forward) und GAPDH3' (reverse) wurde zur Kontrolle der RNA durchgeführt (25 Zyklen; 58°C Annealing-Temperatur). (B) Proben der selben Gewebe wie in (A) wurden in 2x Proteinprobenpuffer aufgenommen, homogenisiert, denaturiert, im 12%igen SDS-Gel aufgetrennt (5 x 10<sup>5</sup> Zellen; 30 µg Protein/Spur) und geblottet. Das Protein Sun3 wurde mit einem affinitätsgereinigten Gp α-Sun3 Antiserum (1:7500 in 10% Milch) detektiert. Sun3 kann als mRNA und als Protein ausschließlich im Hodengewebe nachgewiesen werden. Aus Göb et al., 2010. doi:10.1371/journal.pone.0012072.g002.

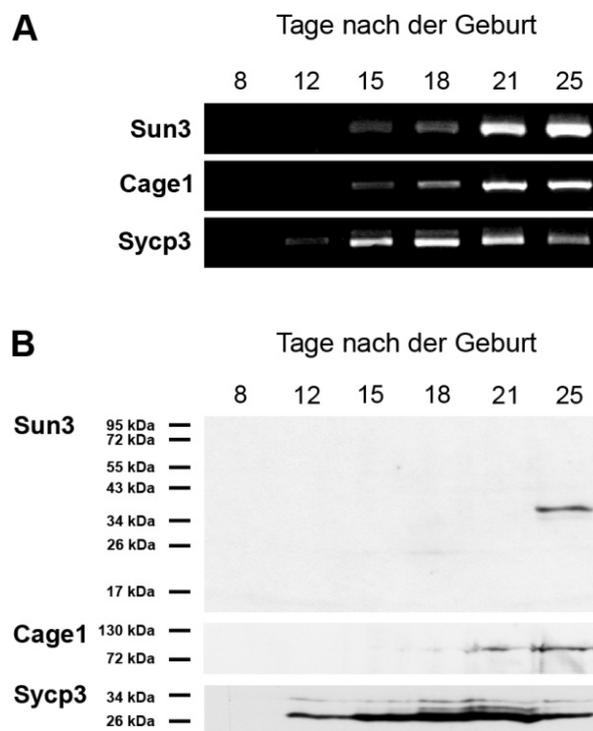
2007), tatsächlich testisspezifisch exprimiert wird, wurde Gesamt-RNA aus diversen somatischen sowie Ovar- und Hodengewebe adulter Mäuse isoliert. Die erhaltene mRNA wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Durch die Wahl spezifischer Oligonukleotide sollte die Sun3 spezifische cDNA amplifiziert werden, sofern entsprechende mRNA im zu untersuchenden Gewebe vorhanden gewesen ist. Aus Abbildung 23 A geht eindeutig hervor, dass die Sun3 mRNA ausschließlich im Hoden und nicht in einem anderen Gewebe exprimiert wurde. Die Amplifikation von GAPDH diente der Kontrolle, um zu zeigen, dass in allen Geweben eine amplifizierbare cDNA gewesen war.

Da die hodenspezifische Expression von Sun3 auch auf Proteinebene bestätigt werden sollte, wurden die selben Gewebe im Immunblot analysiert, wobei die Proteindetektion mit einem affinitätsgereinigten α-Sun3 Antiserum erfolgte (Abbildung 23 B). Die eingesetzten Antikörper erkannten in der Hodengewebeprobe spezifisch

eine einzige Proteinbande bei etwa 37 kDa, was genau der errechneten molekularen Masse von Sun3 entspricht. Da in den anderen Geweben kein derartiges Signal erschien, konnte auch für das Protein Sun3 eine testisspezifische Expression festgestellt und das Ergebnis der RT-PCR bestätigt werden.

Als nächstes wurde das Expressionsprofil von Sun3 im Verlauf der Spermatogenese analysiert. Zu diesem Zweck wurde Gesamt-RNA aus Testessuspensionen pubertierender Mäuse (8, 12, 15, 18, 21 und 25 Tage nach der Geburt) isoliert, durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und diese mithilfe geeigneter Primer amplifiziert. Da Tiere diesen Alters die erste Spermatogenesewelle durchlaufen, sind zu jedem Zeitpunkt andere und jeweils etwas weiter differenzierte Zellpopulationen in den Samenkanälchen des Hodens vorhanden (Bellvé et al., 1997; Malkov et al., 1998). Auf diese Weise kann das Erscheinen eines Proteins, in diesem Fall von Sun3, zeitlich ermittelt werden. Wie in Abbildung 24 A zu erkennen, ist Sun3 in 8 und 12 Tage alten Mäusen, deren Testes hauptsächlich Spermatogonien und frühe bis mittlere Spermatozyten enthalten, nicht nachweisbar. Mit dem Auftauchen früher postmeiotischer Zellen an Tag 15 und 18 konnte Sun3 hingegen erstmals als schwaches Signal amplifiziert und mit fortschreitender Spermiogenese (21 und 25 Tage nach der Geburt) als kräftige Bande nachgewiesen werden. Zur Kontrolle und zur besseren Klassifizierung spermatogenesespezifischer Zelltypen wurde das spermiogenesespezifische Cage1 (Proteinkomponente des Akrosoms; Alsheimer et al., 2005) sowie das meiotische Sycp3 (strukturelle Komponente des SC; Lammers et al., 1994) amplifiziert. Wie erwartet, erschien die mRNA des akrosomalen Cage1 mit Beginn der Spermiogenese an Tag 15 und stieg in ihrer Expression immer weiter an. Die Sycp3 mRNA war dagegen bereits an Tag 12, wenn Spermatozyten mengenmäßig dominieren, nachweisbar, stieg dann an und nahm an Tag 25 wieder ab; genau diese Verteilung ist repräsentativ für ein meiosespezifisches Expressionsprofil. Da sich Sun3 in seiner Expression allerdings genauso wie das spermiogenesespezifische Cage1 verhielt, wurde für Sun3 eine rein postmeiotische Expression ermittelt.

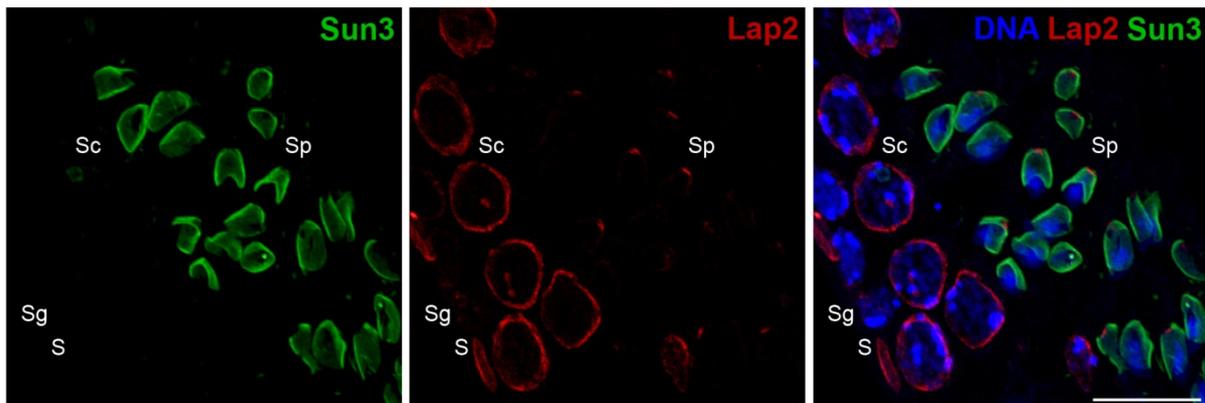
Um das spermiogenesespezifische Expressionsprofil von Sun3 auch im Western Blot überprüfen zu können, wurde Testessuspensionen pubertierender Mäuse aufsteigenden Alters (8 bis 25 Tage nach der Geburt) proteinbiochemisch mit spezifischen Antikörpern analysiert. Die Proteindetektion im Immunblot erfolgte mit einem affinitätsgereinigten  $\alpha$ -Sun3



**Abbildung 24. Sun3 zeigt ein spermiogenesespezifisches Expressionsmuster.** Das Erscheinen von Sun3 während der Spermatogenese der Maus wurde mithilfe von RT-PCR (A) und Western Blot (B) bestimmt. (A) Gesamt-RNA wurde aus Hodenzellsuspensionen pubertierender Mäuse aufsteigenden Alters (8 bis 25 Tage nach der Geburt) isoliert. Je 1  $\mu$ g der gewonnenen mRNA wurde für folgende RT-PCR-Analysen verwendet: die Amplifikation der Sun3 cDNA erfolgte mit den Primern Sun3vATG5' (forward) und Sun3\_AB\_3'Xho (reverse) in 30 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 55°C. Als Kontrolle wurde die cDNA von Cage1 (postmeiotisches Expressionsmuster; CAGE\_exptest\_5' (forward) und CAGE\_RT\_3' (reverse); 30 Zyklen; 60°C Annealing-Temperatur) und Sycp3 (meiotisches Expressionsmuster; SCP3\_5'\_ATG (forward) und SCP3\_TAA+3' (reverse); 25 Zyklen; 52°C Annealing-Temperatur) amplifiziert. (B) Um die stadienspezifische Expression vom Protein Sun3 zu untersuchen wurden die Hodenzellsuspensionen pubertierender Mäuse des gleichen Alters wie in (A) in 2x Proteinprobenpuffer aufgenommen, homogenisiert, denaturiert, im 12%igen SDS-Gel aufgetrennt ( $4 \times 10^5$  Zellen/Spur) und gebロットet. Die Detektion von Protein Sun3 erfolgte mit einem affinitätsgereinigten Gp  $\alpha$ -Sun3 Antiserum (1:5000 in 10% Milch). Zum Nachweis meiotischer bzw. postmeiotischer Zellen wurden polyklonale  $\alpha$ -Sycp3 (Serum # 13; 1:5000 in 10% Milch) bzw.  $\alpha$ -Cage1 (1:1000 in 10% Milch) Antikörper verwendet. Die Expression von Sun3 beschränkt sich auf die postmeiotische Phase der Spermatogenese. Aus Göb et al., 2010. doi:10.1371/journal.pone.0012072.g002.

Antiserum (Abbildung 24 B). Die eingesetzten Antikörper erkannten eine spezifische Sun3-Proteinbande erst an Tag 25 nach der Geburt, wenn Spermatoziden die vorherrschenden Zelltypen in den Samenkanälchen sind. Als Kontrolle wurden wiederum die meiose- bzw. spermiogenesespezifischen Marker Sycp3 bzw. Cage1 verwendet, wobei sich Sun3 auch auf Protein-Ebene wie Cage1, also wie ein postmeiotisches Protein, verhielt. Die Expressionsanalysen von Sun3 deuten sowohl auf RNA- und als auch auf Proteinebene darauf hin, dass es sich bei Sun3 um ein tatsächliches, testisspezifisches Protein handelt, das ausschließlich in Spermatoziden exprimiert wird.

In dem folgenden immunocytochemischen Experiment wurde die Lokalisation von Sun3 in den Zellen der männlichen Keimbahn analysiert. Dies geschah immunfluoreszenzmikroskopisch auf Testes-Paraffinschnitten adulten Gewebes, da in den Samenkanälchen adulter Mäuse alle Zelltypen der Spermatogenese vorhanden sind, in denen Sun3 vorkommen könnte. Die Detektion von Sun3 erfolgte, nach Freilegung der durch Formaldehyd-Fixierung maskierten Epitope durch sogenanntes „Unmasking“, mit einem affinitätsgereinigten  $\alpha$ -Sun3 Antiserum (Abbildung 25). Zur besseren Zuordnung wurden die selben Zellen mit Antikörpern gegen Lap2, Proteine der INM (Dechat et al., 2000), die in den Kernhüllen von somatischen Zellen des Hodens, von Spermatozyten und Spermatoziden lokalisieren (Alzheimer et al., 1998), sowie dem DNA-Farbstoff 33258-Hoechst inkubiert.



**Abbildung 25.** Sun3 ist nur in der Kernhülle postmeiotischer Zellen nachweisbar. Die Lokalisation von Sun3 innerhalb eines Samenkanälchens wurde mithilfe der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu wurde für 3 h mit 1% PFA fixiertes und in Paraffin eingebettetes Hodengewebe in 3  $\mu$ m dicke Schnitte geschnitten. Nach Freilegung der Epitope im Tischautoklaven (5 min, 125  $^{\circ}$ C, 1 bar) wurden die Präparate mit einem affinitätsgereinigten Gp  $\alpha$ -Sun3 Antiserum (1:300 in PBS; grün) sowie monoklonalen 13D4 Antikörpern gegen Lap2 (unverdünnt; rot) inkubiert. Die Antikörper gegen Lap2 dienten der Kennzeichnung der Kernhüllen der somatischen Zellen und aller Spermatogenese-Zelltypen. Die Zellkerne wurden mit dem DNA-Farbstoff 33258-Hoechst sichtbar gemacht. Die Aufnahme zeigt die maximale 2D Projektion dreier Schnittserien, die am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop TCS-SP2 AOBS (Leica) aufgenommen wurden. Sun3 ist ausschließlich in Spermatoziden (Sp) detektierbar; somatische Zellen (S), Spermatozyten (Sg) und Spermatoziden (Sc) dagegen sind negativ für Sun3. Größenbalken: 15  $\mu$ m.

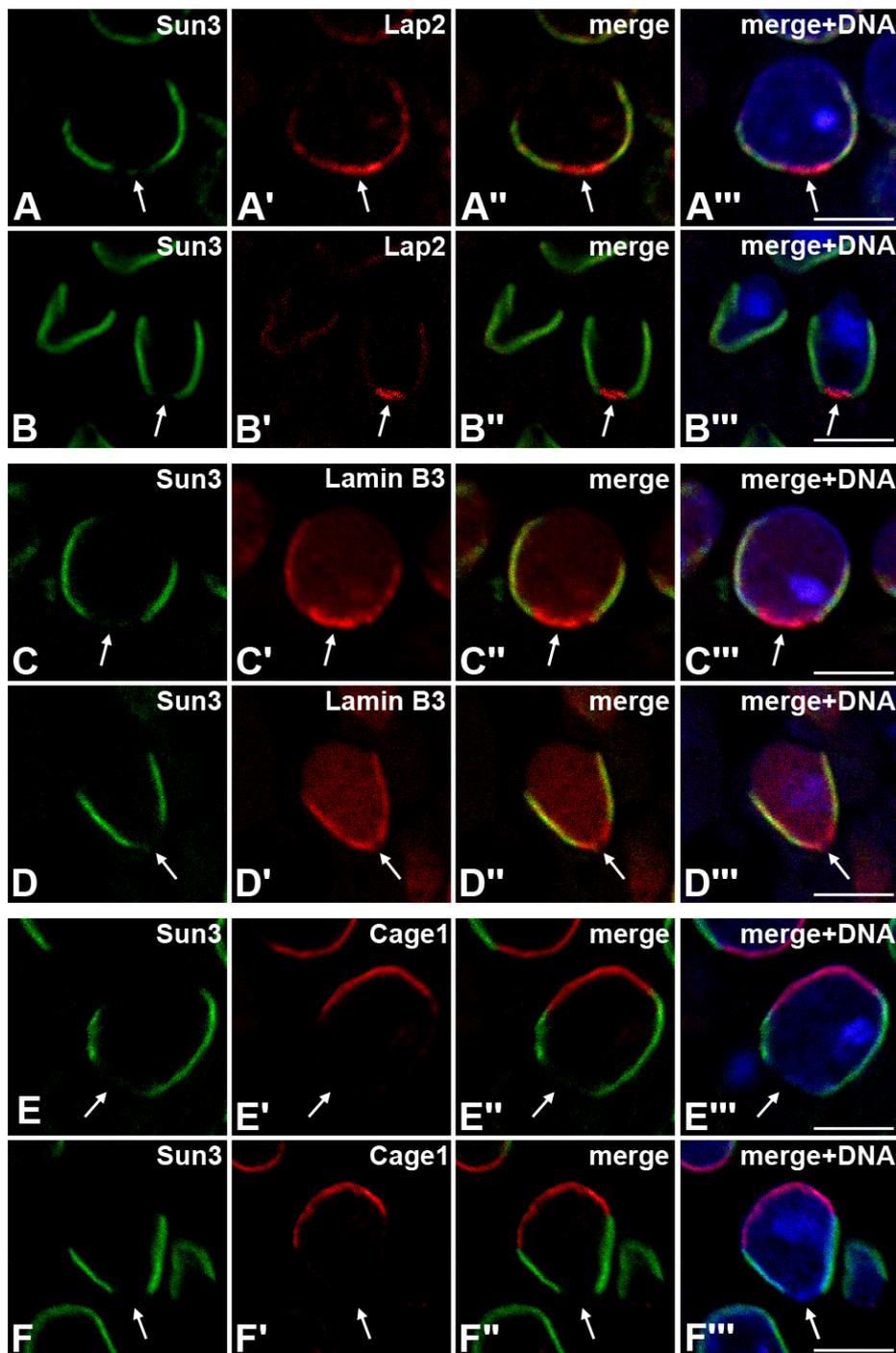
Aus Göb et al., 2010. doi:10.1371/journal.pone.0012072.g002.

Abbildung 25 zeigt eindeutig, dass Sun3 weder in somatischen Zellen noch in Spermatozyten oder Spermatoziden lokalisiert. Die einzigen Zellen im Hodengewebe adulter Mäuse, die in der Immunfluoreszenz positiv für Sun3 waren, waren die sich im Tubuslumen befindlichen Spermatoziden, was mit den Resultaten der RT-PCR und den Western Blot Analysen in Einklang steht. Die immunfluoreszenzmikroskopische Detektion von Sun3 liefert nämlich ein starkes Signal in der Kernhülle eben dieser Spermatoziden. Interessanterweise ist Sun3 jedoch nicht homogen in der Spermatozidenkernhülle verteilt, sondern polarisiert als kappenähnliche Struktur an einem Kernpol, was in der Überlagerung der Einzelaufnahmen deutlich erkennbar ist (Abbildung 25, rechts).

Bevor sich der nächste Abschnitt mit der Polarisierung von Sun3 in der Spermatidenkernhülle befasst, sei zusammenfassend erwähnt, dass Sun3 als ein neues, spermiogenesespezifisch exprimiertes SUN-Protein identifiziert werden konnte, das ausschließlich in der Kernhülle postmeiotischer Zellen lokalisiert.

### 3.2.1.3 Sun3 polarisiert auf der posterioren Seite des Spermatidenkerns

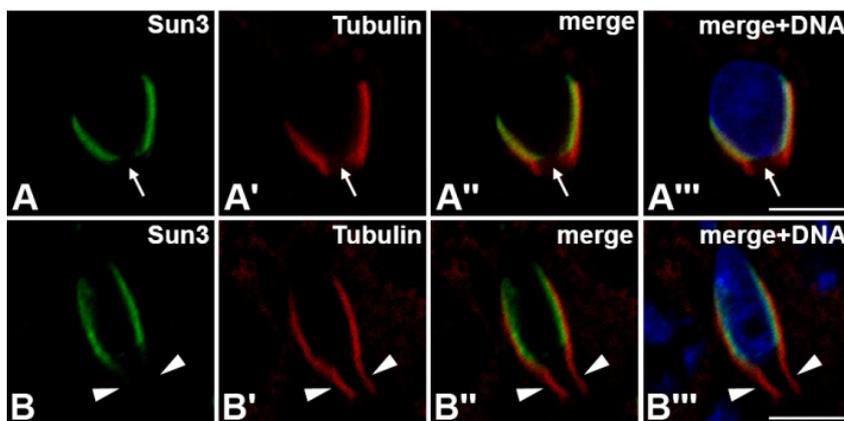
Um die erwähnte Polarisierung von Sun3 in der Kernhülle postmeiotischer Zellen detailliert zu analysieren, wurden weitere immunocytochemische Experimente durchgeführt, da die Verteilung von Sun3 mit der Lokalisation bekannter (Kernhüllen-) Proteine in Spermatiden verglichen werden sollte (Abbildung 26).



**Abbildung 26.** Sun3 polarisiert am posterioren Pol sich entwickelnder Spermatiden. Die Verteilung von Sun3 in runden (A, C, E) und elongierenden (B, D, F) Spermatiden wurde mithilfe der indirekten Immunfluoreszenz mikroskopie untersucht. Dazu wurde für 3 h mit 1% PFA fixiertes und in Paraffin eingebettetes Hodengewebe in 3 (A, B) – 5 (C-F)  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte geschnitten und diese nach Freilegung der Epitope im Tischautoklaven (5-15 min, 125  $^{\circ}\text{C}$ , 1 bar) mit einem affinitätsgereinigten Gp  $\alpha$ -Sun3 Antiserum (1:300 in PBS; grün; A-F) inkubiert. Die selben Zellen wurden mit monoklonalen Antikörpern 13D4 gegen Lap2 (unverdünn; rot; A' und B') und polyklonalen Antikörpern gegen Lamin B3 (1:100 in PBS; rot; C' und D') bzw. das akrosomale Protein Cage1 (1:100 in PBS; rot; E' und F') gegen gefärbt. Überlagerungen sind in A''-F'' gezeigt. Die Zellkerne wurden mit dem DNA-Farbstoff 33258-Hoechst sichtbar gemacht (A'''-F'''). Die Aufnahme zeigt die maximale 2D Projektion dreier Schnittserien, die am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop TCS-SP2 AOBS (Leica) aufgenommen wurden. Sun3 polarisiert in postmeiotischen Zellen am posterioren Pol, jedoch nicht in der Implanations Fossa (Pfeile). Größenbalken: 5  $\mu\text{m}$ .  
Aus Göb et al., 2010. Doi: 10.1371 / journal.pone.0012072.g003.

Lap2 sind integrale Membranproteine der INM, die während der gesamten Spermatogenese kontinuierlich in der INM vorhanden sind, sich im Verlauf der Spermiogenese jedoch drastisch umverteilen (Alsheimer et al., 1998): Während Lap2 in runden Spermatiden noch recht homogen in der Kernhülle verteilt ist, ist es in späten elongierenden Spermatiden nur noch am posterioren Kernpol in einer als Implanations Fossa bezeichneten Region auszumachen. Aus Abbildung 26 A und B geht klar hervor, dass sich Sun3 wie Lap2 zum posterioren Kernpol hin verteilt. Ein vergleichbares Ergebnis lieferte die Doppel-Immunlokalisation von Sun3 mit Antikörpern gegen Lamin B3 (Abbildung 26 C und D). Diese kurze, ausschließlich spermiogenesespezifisch exprimierte Spleißform des *Lmn2* Gens kann nämlich, wie Sun3 und Lap2, nur am posterioren Pol nachgewiesen werden (Schütz et al., 2005a). Das Protein Cage1 befindet sich dagegen, als Komponente des anterioren Akrosoms, auf der gegenüberliegenden Seite von Sun3 (Abbildung 26 E und F).

Neben der allgemein posterior polarisierenden Lokalisation von Sun3 fällt auf, dass Sun3 nicht den gesamten posterioren Pol einnimmt, so wie Lap2 und Lamin B3, sondern am posteriorsten Ende, in der Fossa-Region nicht nachweisbar ist (Abbildung 26 A-F). Bemerkenswerterweise ist dieses Verteilungsmuster während der gesamten Spermiogenese, also in runden, elongierenden und elongierten Spermatiden, zu beobachten. Sun3 polarisiert darüber hinaus in jedem Differenzierungsstadium der Spermatiden am posterioren Kernpol, was einen weiteren Unterschied zu den ebenfalls posterior polarisierenden Proteinen Lap2 und Lamin B3 ausmacht. Diese verteilen sich nämlich zunächst homogen um den Kern (Abbildung 26 A, C) und polarisieren erst in etwas späteren Spermiogenesephasen auf der posterioren Kernseite (Abbildung 26 B, D). Gegen Ende der Spermiogenese beschränken sich diese beiden Proteine fast ausschließlich auf die Implanations Fossa, der Ansatzstelle der Centriolen und somit des Flagellums an den Zellkern, wo Sun3 nie nachweisbar ist.



**Abbildung 27. Sun3 kolokalisiert mit der spermiogenesespezifischen Mikrotubuli-Manschette.** Die Verteilung von Sun3 im Vergleich zur Lokalisation der Manschettens-Mikrotubuli in runden (A) und elongierenden (B) Spermatiden wurde mithilfe der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu wurde eine Doppelimmunlokalisation auf 5 µm dicken Hodenparaffinschnitten, die vor der Paraffineinbettung für 3 h mit 1% PFA fixiert worden waren, durchgeführt. Die Präparate wurden nach der Freilegung der Epitope im Tischautoklaven (10

min, 125 °C, 1 bar) mit einem affinitätsgereinigten Gp  $\alpha$ -Sun3 Antiserum (1:300 in PBS; grün; A und B) sowie monoklonalen Antikörpern gegen  $\alpha$ - (Sigma; 1:200 in PBS; rot; A') oder  $\beta$ -Tubulin (Sigma; 1:100 in PBS; rot; B') inkubiert. Überlagerungen sind in A'' und B'' gezeigt und Zellkerne wurden mit dem DNA-Farbstoff 33258-Hoechst sichtbar gemacht (A''', B'''). Die Aufnahme zeigt die maximale 2D Projektion dreier Schnittserien, die am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop TCS-SP2 AOBS (Leica) aufgenommen wurden. Pfeile in (A) markieren die Implanations Fossa, Pfeilköpfe in (B) Mikrotubuli, die sich in Richtung Flagellum erstrecken. Größenbalken: 5 µm.  
Aus Göb et al., 2010. doi:10.1371/journal.pone.0012072.g003.

Die Abwesenheit von Sun3 in der Implanations Fossa sowie die posteriore Polarisierung dieses neuen SUN-Proteins wurde durch die Immun-Doppellokalisation mit Antikörpern gegen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin auf Testes-Paraffinschnitten von adultem Mausgewebe bestätigt (Abbildung 27).  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin sind die Hauptstrukturelemente der spermatidenspezifischen Mikrotubuli-Manschette, einer aus zytoplasmatischen

Mikrotubuli aufgebauten kelchartigen Zytoskelettstruktur, die den posterioren Teil des Spermatidenkerns umschließt. Abbildung 27 zeigt die vollständige Kolo-kalisation von Sun3 mit dem den Zellkern umschließenden Teil der Manschette, wobei sich Sun3 als Komponente der Kernhülle etwas näher am Zellkern befindet als die zytoplasmatischen Mikrotubuli. Da sich Sun3 in differenzierenden Spermatiden genauso wie die Mikrotubuli der posterioren Manschette verteilt, inklusive vollständiger Abwesenheit in der Fossa-Region, kann für Sun3 die typische Eigenschaft eines SUN-Domänen-Proteins prognostiziert werden, nämlich die Fähigkeit den Kern an Bestandteile des Zytoskeletts zu binden.

Mit genau dieser Thematik, nämlich der Beteiligung von Sun3 am Aufbau funktioneller LINC-Komplexe und somit an der Anbindung an das zelluläre Proteinskelett, beschäftigt sich Abschnitt 3.2.3. Zuvor wird jedoch der Frage nachgegangen, welche Besonderheiten ein weiteres SUN-Protein, nämlich Sun1, im Verlauf der Spermiogenese zeigt.

### 3.2.2 Expression und Lokalisation von Sun1 während der Differenzierung des Spermienkopfes

Sun1 ist das größte SUN-Domänen Protein der Säuger und genauso wie Sun2 recht gut charakterisiert (Hodzic et al., 2004; Padmakumar et al., 2005). Da beide Proteine bereits mehrfach mit der Dynamik und der morphologischen Gestaltung des Kerns und seiner Komponenten in Verbindung gebracht wurden (Übersichten in Starr, 2009; Alsheimer, 2009), wären diese beiden SUN-Proteine geeignete Kandidaten für eine Beteiligung an der morphologischen Umformung der Spermatidenkopfes. Nachdem Sun2 in der Spermiogenese der Maus nicht nachgewiesen werden konnte und somit auch keine Rolle spielen kann (Schmitt, 2008), wurden in dieser Arbeit Lokalisation und Verhalten von Sun1 in postmeiotischen Zellen untersucht, wobei stets mit einem affinitätsgereinigten Antiserum gegen Sun1 (Gp  $\alpha$ -Sun1; Göb, 2007) gearbeitet wurde.

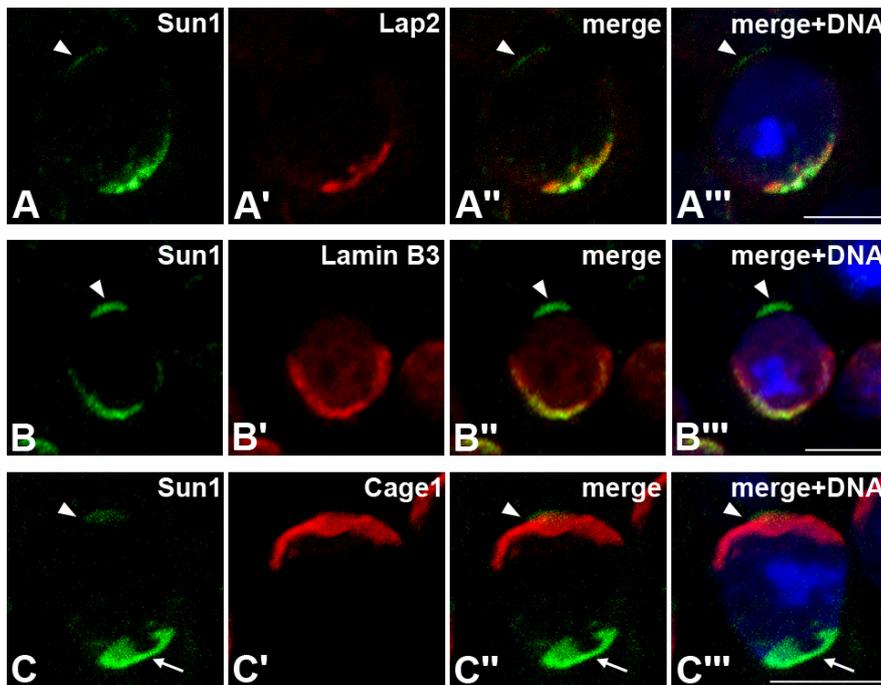
#### 3.2.2.1 Sun1 zeigt während der Spermiogenese eine ungewöhnliche duale Lokalisation

Sun1 ist während der gesamten Spermatogenese der Maus in der Kernhülle nachweisbar, und zwar telomerassoziiert in meiotischen und in der Kernhülle polarisierend in postmeiotischen Zellen (Göb, 2007; Ding et al., 2007; Schmitt, 2008; Chi et al., 2009). Da eine Polarisierung für bereits mehrere Kernhüllenproteine in der Spermiogenese, inklusive Sun3, beschrieben worden war, wurde die Verteilung von Sun1 in Spermatiden immunocytochemisch im Detail analysiert. Dazu wurden Immun-Doppellokalisationen mit Antikörpern gegen Sun1 zusammen mit Antikörpern gegen die bereits vorgestellten Markerprotein der Lap2 Familie, Lamin B3 und Cage1 auf Testes-Paraffinschnitten adulten Mausgewebes durchgeführt. In runden Spermatiden polarisierte Sun1, wie Lap2, Lamin B3 und auch Sun3, am posterioren Pol und befand sich folglich auf der gegenüberliegenden Seite von Cage1 und somit des Akrosoms (Abbildungen 26 und 28, A und C). Zusätzlich zur posterioren Polarisierung in runden Spermatiden zeichneten sich beide SUN-Protein, Sun1 und Sun3, ferner durch die Abwesenheit in der Implantation Fossa aus, was für Sun1 besonders deutlich in Abbildung 28 C zu erkennen ist.

Interessanterweise beschränkte sich die Lokalisation von Sun1 jedoch nicht nur auf den posterioren Teil des Spermatidenkerns, Sun1 war vielmehr erstmals in runden Spermatiden als schwaches Signal am anterioren Pol nachweisbar (Abbildung 28 A, C); eine neue Verteilung, die bislang noch für kein Kernmembranprotein in der

Spermiogenese beobachtet werden konnte. Mit fortschreitender Spermiogenese wurde die anteriore Lokalisation immer stärker und die posteriore schwächer (Abbildung 28 B), weshalb man die Verteilung von Sun1 in postmeiotischen Zellen mittleren Stadiums als duale Lokalisation bezeichnet hat.

Die Tatsache, jedoch, die an der anterioren Lokalisation von Sun1 am überraschendsten war, war, dass Sun1 am anterioren Zellpol nicht in der Kernhülle lokalisiert werden konnte, da sich das Sun1 Signal unmittelbar über dem Akrosom befand (Abbildung 28 C). Eine derartige nicht-nukleäre Lokalisation wurde bislang noch nie bei



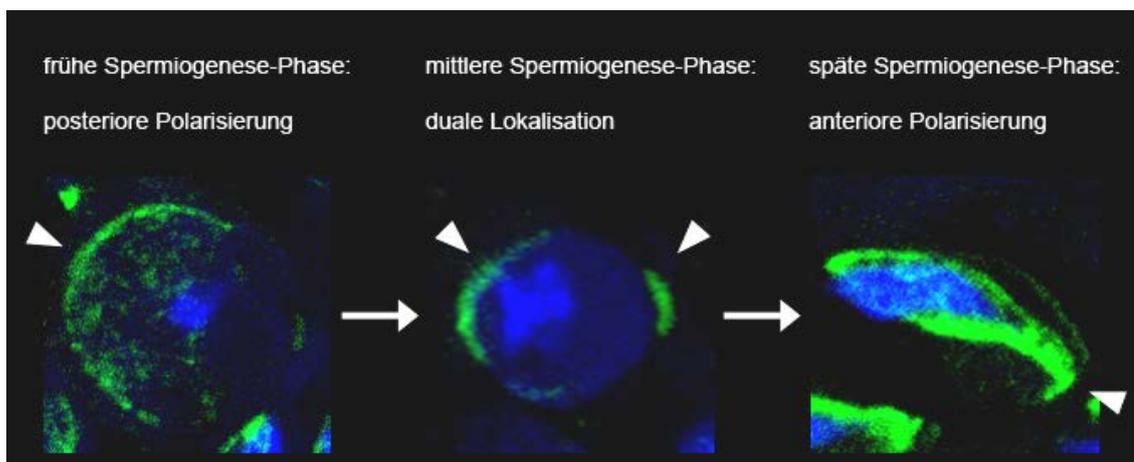
**Abbildung 28.** Sun1 zeigt eine duale Lokalisation in differenzierenden Spermatiden. Die Verteilung von Sun1 in postmeiotischen Zellen wurde mithilfe der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu wurde für 3 h mit 1% PFA fixiertes und in Paraffin eingebettetes Hodengewebe in 5 µm dicke Schnitte geschnitten und diese nach Freilegung der Epitope im Tischautoklaven (15 min, 125 °C, 1 bar) mit einem affinitätsgereinigten Gp  $\alpha$ -Sun1 Antiserum (1:300 in PBS; grün; A-C) inkubiert. Die selben Zellen wurden mit monoklonalen 13D4 Antikörpern gegen Lap2 (unverdünnt; rot; A') und polyklonalen Antikörpern gegen Lamin B3 (1: 100 in PBS; rot; B') bzw. gegen das akrosomale Protein Cage1 (1:100 in PBS; rot; C') gefärbt. Überlagerungen sind in A''-C'' gezeigt. Zellkerne wurden mit dem DNA-Farbstoff 33258-Hoechst sichtbar gemacht (A'''-C'''). Die Aufnahme zeigt die maximale 2D Projektion dreier Schnittserien, die am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop TCS-SP2 AOBs (Leica) aufgenommen wurden. Pfeilköpfe weisen auf die nicht-nukleäre akrosomenassoziierte Lokalisation von Sun1 hin. Die Lage der Implantation Fossa ist angegeben (Pfeil in C). Größenbalken: 5 µm.

Aus Göb et al., 2010. doi:10.1371/journal.pone.0012072.g005.

Antikörpern gegen Sun1 gefärbt worden war, heraus vergrößert. Die vergrößerten Zellen wurden einander schließlich derart gegenübergestellt, sodass der posteriore Pol einer jeden Zelle nach links und der anteriore nach rechts orientiert war (Abbildung 29). In frühen runden Spermatiden lokalisierte Sun1 vornehmlich am posterioren Pol, wobei bereits ein schwaches anteriores Signal erkennbar war (Abbildung 29 links). Die erwähnte duale Lokalisation trat in elongierenden Spermatiden in der mittleren Spermiogenese-Phase auf, wobei Sun1 posterior in der Kernhülle lokalisierte und anterior die nicht-nukleäre Lokalisation zeigte (Abbildung 29 mittig). Damit war die Reorganisation von Sun1 allerdings noch nicht abgeschlossen. In elongierten Spermatiden gegen Ende der Spermiogenese war Sun1 nämlich vom posterioren Pol vollständig verschwunden und nur noch am

einem SUN-Protein beobachtet, und unterscheidet sich darüber hinaus grundlegend von allen bisher untersuchten Proteinen der Kernhülle in der Spermiogenese; diese polarisierten nämlich alle in der Kernhülle am posterioren Spermatidenpol. Wie bereits angedeutet, verteilt sich Sun1 scheinbar während der Spermiogenese in der Spermatidenkernhülle um. Um dieses Verhalten besser analysieren zu können, wurden Zellen, die sich in unterschiedlichen Phasen der Spermiogenese befanden, aus einem 3-dimensional rekonstruierten Paraffinschnitt, der mit

anterioren Pol zu finden, wobei dort Signale sowohl in der Kernhülle als auch akrosomenassoziiert erkennbar waren (Abbildung 29 rechts).



**Abbildung 29.** Im Verlauf der Spermio-genese verändert sich die duale Lokalisation von Sun1. Die Lokalisation von Sun1 in differenzierenden runden, elongierenden und elongierten Spermatiden wurde auf 10  $\mu\text{m}$  dicken Hodenparaffinschnitten mithilfe der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Dazu wurden die Präparate nach Freilegung der Epitope im Tischautoklaven (20 min, 125  $^{\circ}\text{C}$ , 1 bar) mit einem affinitätsgereinigten Gp  $\alpha$ -Sun1 Antiserum (1:300 in PBS; grün) sowie dem DNA-Farbstoff 33258-Hoechst (blau) inkubiert. Die Aufnahme zeigt Ausschnittsvergrößerungen je einer runden (links), elongierenden (mittig) und elongierten (rechts) Spermatide, die als maximale 2D Projektion aller Schnittserien am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop TCS-SP2 AOBS (Leica) aufgenommen wurden. Die Pfeile weisen auf die Verteilung von Sun1 in der jeweiligen Spermio-genese-Phase hin, wobei der posteriore Pole jeder Zelle nach links und der anteriore nach rechts orientiert ist.

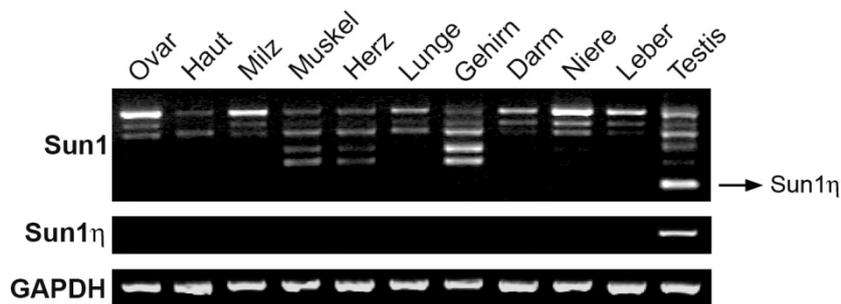
Die detaillierte Untersuchung der Verteilung von Sun1 in postmeiotischen Zellen zeigte zum einen, dass mit Sun1 ein zweites SUN-Domänen Protein während der Spermio-genese der Maus in der Kernhülle polarisiert, erbrachte zum anderen aber auch zwei neue und völlig unerwartete Erkenntnisse: Sun1 zeigte nämlich als erstes Kernhüllenprotein in der Spermio-genese eine Polarisierung am anterioren Zellpol, und lokalisierte dort nicht, wie für ein SUN-Protein typisch, in der Kernhülle, sondern akrosomenassoziiert außerhalb des Kerns.

### 3.2.2.2 Die anteriore Lokalisation von Sun1 korreliert mit der Expression von Sun1 $\eta$ , einer neuen, spermio-genesespezifischen Sun1 Isoform

Die eben beschriebene, ungewöhnliche Verteilung von Sun1 in runden und elongierten Spermatiden war Anlass, das spermatogenesespezifische Expressionsprofil von Sun1 im Detail zu untersuchen. Es war nämlich vor kurzem gezeigt worden, dass bestimmte Sequenzabschnitte des nukleoplasmatischen N-Terminus von Sun1 wichtig für dessen Kernhüllenbindung sind, da gewisse N-terminale Deletionskonstrukte nicht mehr in der Lage waren, mit der Kernhülle zu assoziieren (Liu et al., 2007; Haque et al., 2010). Aufgrund dieser Erkenntnisse entstand die Hypothese, dass Spermatiden möglicherweise eine Sun1-Spleißform exprimieren, die aufgrund fehlender Sequenzen zur Membranassoziation für die nicht-nukleäre Sun1 Lokalisation verantwortlich ist.

Um dies zu überprüfen, sollte in einem ersten Versuchsansatz eine RT-PCR mit Primern zur Amplifikation des Sun1-spezifischen N-Terminus durchgeführt werden, bei der alle möglichen Spleißformen in diesem Sequenzabschnitt identifiziert werden sollten. Zu diesem Zweck wurde zunächst Gesamt-RNA aus diversen somatischen sowie Ovar- und Hodengewebe adulter Mäuse isoliert. Die erhaltene mRNA wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Durch die Wahl zweier Oligonukleotide, die den Bereich zwischen

Exon 6 und Exon 11 amplifizierten, konnten Spleißformen des *Sun1* Gens in diesem Sequenzbereich identifiziert werden: nämlich insgesamt sieben verschiedene Sun1-Transkripte, die sich in ihrer gewebespezifischen Expression zuweilen stark unterschieden (Abbildung 30). Das kürzeste und zugleich am stärksten exprimierte



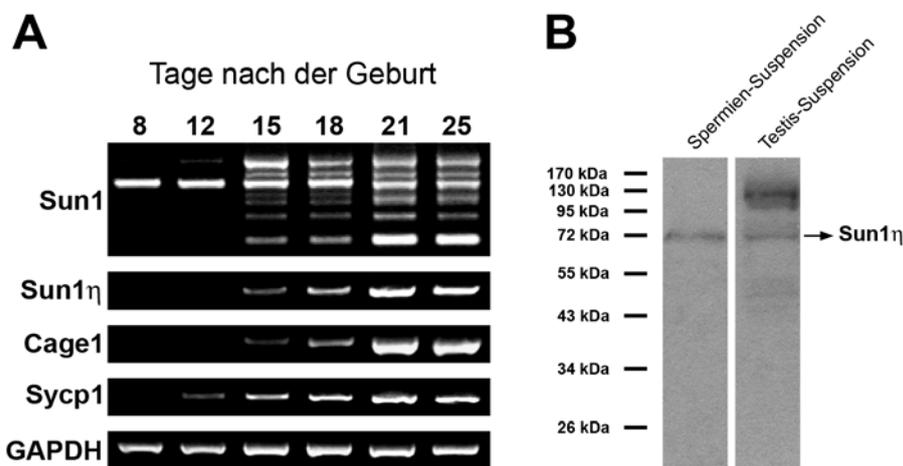
**Abbildung 30.** Sun1 $\eta$  ist eine neue testisspezifische Isoform des murinen *Sun1* Gens. Das Vorhandensein N-terminaler Sun1 Varianten in unterschiedlichen murinen Geweben wurde mithilfe der RT-PCR analysiert. Dazu wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben adulter Mäuse isoliert und je 1  $\mu$ g für die RT-PCR verwendet. Zur Amplifikation potentieller N-terminaler Isoformen wurde ein Primerpaar verwendet, welches spezifisch in Exon 6 bzw. 11 band (*Sun1\_inExon6\_5'* (forward) und *Sun1\_inExon11\_3'* (reverse); 30 Zyklen; 60°C Annealing-Temperatur). Um das testisspezifische Expressionsprofil von Sun1 $\eta$  zu verifizieren wurde eine PCR mit *Sun1\_5'ATG* (forward) und *Sun1\_Übgang\_Ex7\_10\_3'* (reverse) mit 30 Zyklen und einer Annealing-Temperatur von 69°C durchgeführt. Die GAPDH-PCR diente der Kontrolle der mRNA. Sun1 $\eta$  konnte ausschließlich im Hodengewebe amplifiziert werden. Aus Göb et al., 2010. doi:10.1371/journal.pone.0012072.g006.

Transkript war jedoch ausschließlich in Hoden und in keinem anderen somatischen Gewebe noch dem Ovar vorhanden. Dieses Transkript wurde, als das kleinste der insgesamt sieben identifizierten, als Sun1 $\eta$  bezeichnet (accession number: HQ402597). Eine Sequenzierung ergab, dass diesem neuen Sun1 $\eta$  die Exons 7 bis 10 fehlten. Aufgrund

dieser Erkenntnis konnte die vermutlich testisspezifische Expression durch die Wahl eines Primers, der zur Startsequenz von Sun1 korrespondierend war, sowie eines Primers, der zum Exon 7/10 Übergang komplementär war, überprüft werden. Da in dieser PCR eine einzige DNA-Bande, die spezifisch nur im Hodengewebe und keinem anderen somatischen Gewebe oder dem Ovar nachweisbar war, amplifiziert wurde, war die testisspezifische Expression der neuen Sun1 Isoform, Sun1 $\eta$ , bestätigt (Abbildung 30).

Im nächsten Experiment wurde die Expression von Sun1 $\eta$  während der Spermiogenese, in der die beschriebene nicht-nukleäre Lokalisation von Sun1 beobachtet worden war, untersucht. Um das erhaltene Expressionsprofil den verschiedenen Stadien der Spermatogenese zuordnen zu können, wurde das Erscheinen von Sun1 $\eta$  während der ersten Spermatogenesewelle der Maus bestimmt (Bellvé et al., 1997; Malkov et al., 1998; siehe auch 3.2.1.2). Dazu wurde zunächst Gesamt-RNA aus Hodenzellsuspensionen pubertierender Mäuse aufsteigenden Alters (8 bis 25 Tage nach der Geburt) isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Amplifikation von Sun1 Exon 6 bis Exon 11 bzw. vom Start der kodierenden Sequenz bis zum Übergang von Exon 7/10 (spezifische Sun1 $\eta$  Amplifikation) erfolgte wie oben beschrieben. Dabei korrelierte der Nachweis sowohl des kurzen testisspezifischen Transkripts bei der Amplifikation aller Isoformen als auch der spezifische Nachweis von Sun1 $\eta$  mit dem Erscheinen postmeiotischer Stadien (Abbildung 31 A). Testes, die nur Spermatogonien und Spermatozyten enthielten (Tag 8 und 12), waren dagegen negativ für Sun1 $\eta$ ; dieses war nämlich erstmals als schwaches Signal an Tag 15, wenn frühe Spermatoziden im Hoden auftauchen, detektierbar und stieg dann an Tag 21 bis 25, wenn postmeiotische Zellen in den Samenkanälchen vorherrschen, immer mehr an. Da sich das Expressionsmuster von Sun1 $\eta$  zudem deutlich von dem des meiotischen *Sycp1* unterschied und gleichzeitig dem des akrosomalen *Cage1* ähnelte, konnte für Sun1 $\eta$ , wie bereits für Sun3, eine ausschließlich spermiogenesespezifische Expression beobachtet werden (Abbildung 31 A).

Um Informationen über Sun1 $\eta$  auf Proteinebene zu erhalten, wurde dieses im Westernblot untersucht. Da Sun1 $\eta$  in späten Stadien der Spermiogenese eine starke Expression zeigte, wurden zunächst reife Spermatozoen aus den Nebenhoden adulter Mäuse isoliert, Spermienköpfe von den Spermischwänzen getrennt und von den fraktionierten Spermienköpfen eine Zellsuspension hergestellt. Die gewonnene Spermisuspension wurde dann genauso wie eine Zellsuspension aus dem Gesamthoden adulter Mäuse, die zum Vergleich verwendet wurde, im Immunblot analysiert, wobei die Proteindetektion mit einem affinitätsgereinigten  $\alpha$ -Sun1 Antiserum erfolgte (Abbildung 31 B). Die eingesetzten Antikörper erkannten in den fraktionierten Spermienköpfen eine einzige Proteinbande bei 72 kDa, was exakt der errechneten molekularen Masse von Sun1 $\eta$  entsprach. Diese Bande war auch in der Gesamtestis-Suspension vorhanden, wenngleich dort auch Proteinbanden mit höheren Molekulargewichten nachgewiesen wurden; dies war zu erwarten, da im Hoden alle Sun1 Isoformen vorhanden und somit auch detektierbar sein sollten. Dass diese Banden jedoch nicht in Spermatozoen erkannt wurden, bedeutet nicht nur, dass Sun1 $\eta$  in der Spermiogenese exprimiert wird, sondern auch, dass dies die einzige Sun1-Isoform am Ende der Spermiendifferenzierung ist.



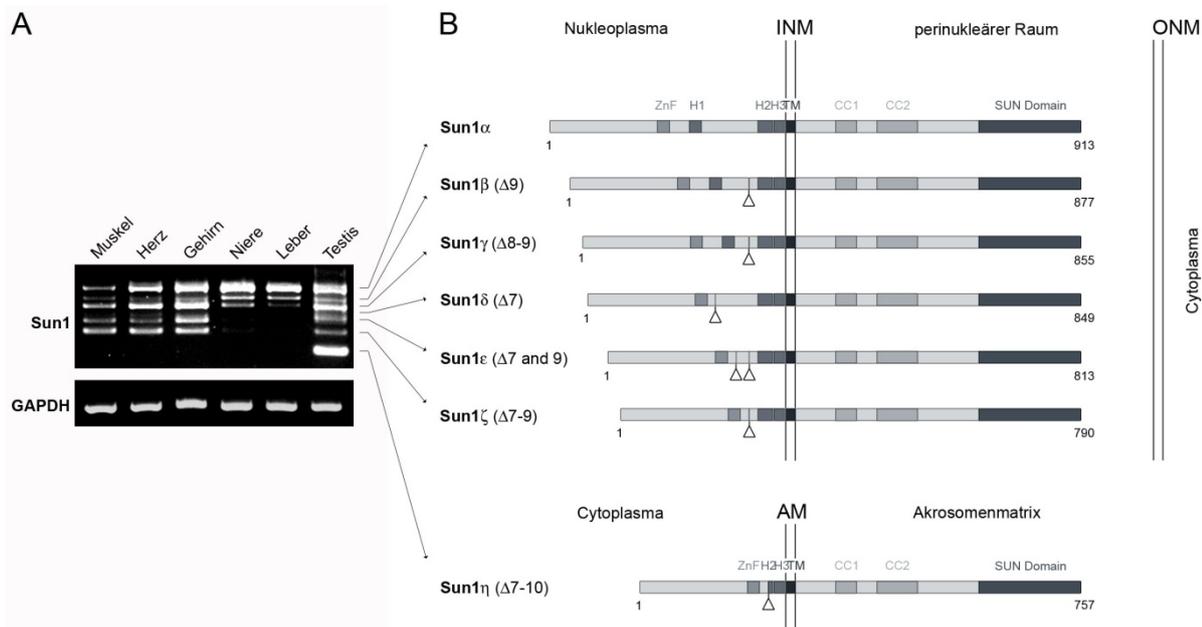
**Abbildung 31.** Sun1 Isoform  $\eta$  wird selektiv während der Spermiogenese exprimiert und ist die einzige Sun1 Variante in reifen Spermien. (A) Das Erscheinen von Sun1 $\eta$  in der Spermiogenese wurde mittels RT-PCR analysiert. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Zellsuspensionen der Hoden pubertierender Mäuse aufsteigenden Alters (8 bis 25 Tage nach der Geburt) isoliert. Je 1  $\mu$ g der gewonnen mRNA wurde für folgende RT-PCR-Analysen verwendet: Die Amplifikation aller N-terminaler Sun1-Isoformen erfolgte mit der

Primerkombination Sun1\_inExon6\_5' (forward) und Sun1\_inExon11\_3' (reverse) in 30 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 60°C. Sun1 $\eta$  wurde spezifisch mit Sun1\_5'ATG (forward) und Sun1\_Übergang\_Ex7\_10\_3' (reverse) amplifiziert (30 Zyklen; 69°C Annealing-Temperatur). Als Kontrolle wurde die cDNA von Cage1 (postmeiotisches Expressionsmuster; CAGE\_exptest\_5' (forward) und CAGE\_RT\_3' (reverse); 25 Zyklen; 60°C Annealing-Temperatur), Sycp1 (meiotisches Expressionsmuster; Sycp1\_Cterm\_maus\_5'Bam (forward) und Sycp1\_Cterm\_3'Sma\_TAA\_maus (reverse); 30 Zyklen; 60°C Annealing-Temperatur) und GAPDH (mRNA-Qualität) amplifiziert. (B) Um die Expression von Sun1 $\eta$  in reifen Spermatozoen zu überprüfen, wurden Suspensionen fraktionierter Spermienköpfe ( $1 \times 10^6$  Zellen) sowie Gesamthodensuspensionen ( $5 \times 10^5$  Zellen) in 2x Proteinprobenpuffer aufgenommen, homogenisiert, denaturiert, im 8%igen SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Zur Detektion möglicher Isoformen wurde ein affinitätsgereinigtes Gp  $\alpha$ -Sun1 Antiserum (1:2000 in 10% Milch) verwendet. Sun1 $\eta$  konnte nur in Spermatozoen und reifen Spermatozoen nachgewiesen werden.

Aus Göb et al., 2010. doi:10.1371/journal.pone.0012072.g006.

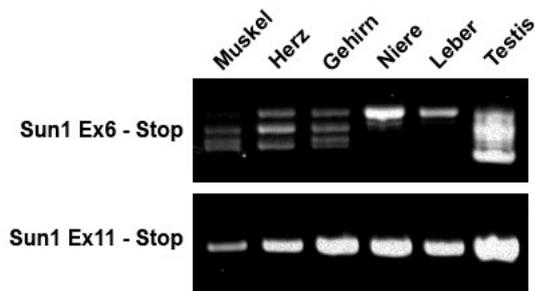
In diesem Kapitel wurde bereits darauf hingewiesen, dass das Sun1 Gen der Maus im N-terminalen Bereich für insgesamt sieben verschiedene Sun1-Isoformen kodiert, die sich bezüglich ihrer gewebespezifischen Expression stark unterscheiden (Abbildung 30). Um das Sequenz- und Expressionsprofil der somatischen Sun1-Isoformen zu analysieren, wurde die PCR zur Amplifikation von Exon 6 bis 11 mit ausgewählten somatischen Geweben wiederholt (Abbildung 32 A). Dabei zeigte sich, dass unter den gegebenen Bedingungen in den untersuchten Geweben entweder drei (Muskel, Herz, Gehirn), sechs (Niere, Leber) oder sieben (Testis) Transkripte amplifiziert wurden, die sich darüber hinaus auch in ihrer Expressionsstärke unterschieden. Kleinere Isoformen erschienen nämlich vornehmlich im Gehirn und in gewissem Maße auch in Herz und Muskel, größere

dominierten dagegen in Niere und Leber. Im Hoden sind alle Isoformen vorhanden, wobei Sun1 $\eta$  nur in diesem Gewebe exprimiert wird.



**Abbildung 32.** Das *Sun1* Gen der Säuger kodiert für insgesamt sieben verschiedene Isoformen. (A) Die Expression unterschiedlicher Sun1 Isoformen in ausgewählten murinen Geweben wurde mittels RT-PCR untersucht. Gesamt-RNA wurde aus den angegebenen Geweben isoliert und je 1  $\mu$ g in der RT-PCR cDNA umgeschrieben. N-terminale Sun1 Isoformen wurden mit den Primern Sun1\_inExon6\_5' (forward) und Sun1\_inExon11\_3' (reverse) in 30 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 60°C amplifiziert. Die Qualität der mRNA wurde mit einer GAPDH-PCR überprüft. Insgesamt konnten sieben unterscheidbare Sun1 Isoformen identifiziert werden, die allesamt ein gewebespezifisches Expressionsmuster zeigten. (B) Die Schemazeichnung zeigt Sun1 $\alpha$  und alle Sun1 Isoformen, die bislang in Mäusen identifiziert werden konnten, wobei Sun1 $\eta$  offensichtlich eine nicht-nukleäre Variante darstellt. Die Sequenzierung aller Varianten ergab, dass alle Isoformen Deletionen zwischen Exon 7 und 10 aufweisen. Die Klassifizierung  $\alpha$  bis  $\eta$  ergab sich aus der absteigenden Nukleotidanzahl. Pfeile markieren DNA-Banden aus (A) und die korrespondierenden Isoformen in (B). Die Position der deletierten Exons ist durch Dreiecke gekennzeichnet. INM, innere Kernmembran; ONM, äußere Kernmembran; AM akrosomale Membran; ZnF, Zinkfinger; H1, H2, H3, hydrophobe Regionen; TM, transmembrane Domäne; CC, Coiled-coil-Domäne.

Um molekulare Unterschiede aber auch Gemeinsamkeiten der Isoformen herauszufinden, wurden alle Sun1 Varianten sequenziert (Abbildung 32 B). Die Sequenzierung ergab, dass in den Isoformen Sun1 $\beta$  bis Sun1 $\eta$  spezifisch ein oder mehrere Exons zwischen Exon 7 und 10 deletiert waren, was wiederum



**Abbildung 33.** Der C-terminale Bereich des *Sun1* Gens kodiert für keine weiteren Isoformen. Die Expression möglicher Sun1 Isoformen im C-terminalen Bereich wurde durch PCR analysiert, die Sun1 entweder von Exon 6 bis Stop (Sun1\_inExon6\_5' (forward) und Sun1\_TAG\_3'Sal (reverse); 30 Zyklen; 64°C Annealing-Temperatur) oder von Exon 11 bis Stop (Sun1\_Start\_Exon11\_5' (forward) und Sun1\_TAG\_3'Sal (reverse); 30 Zyklen; 64°C Annealing-Temperatur) amplifizieren sollte. Der C-Terminus von Sun1 beinhaltet keine Isoformen, da nach Exon 10 nur ein Transkript isoliert wurde.

bedeutet, dass diesen Isoformen nukleoplasmatische Sequenzbereiche vor der TM Domäne fehlten. In den kürzeren Variante, inklusive Sun1 $\eta$ , waren zudem hydrophobe Regionen deletiert, die, wie eingangs erwähnt, wichtig für die Retention von Sun1 an die Kernhülle sind (Liu et al., 2007; Haque et al., 2010).

Um schließlich zu überprüfen, ob das *Sun1* Gen für weitere, möglicherweise C-terminale Isoformen kodiert, wurde der Bereich von Exon 6 bzw. von Exon 11 bis zum Ende der kodierenden Sequenz amplifiziert. Die PCR zur Amplifikation der DNA-Sequenz von Exon 6 bis zum Stopcodon führte dabei zu genau dem Expressionsprofil

(Abbildung 33), das man auch erhielt, wenn man Exon 6 bis Exon 11 amplifizierte (Sun1 $\alpha$  bis  $\eta$ , Abbildung 32). Da in der PCR zur spezifischen Amplifikation der DNA-Sequenz von Exon 11 bis zum Ende nur ein Transkript, nämlich die wildtypische Sun1 $\alpha$  cDNA, identifiziert wurde, kann man davon auszugehen, dass der C-Terminus von Sun1 nur für Gesamt-Sun1 kodiert und die Isoformen  $\alpha$  bis  $\eta$  die einzig exprimierten Spleißformen des *Sun1* Gens der Maus sind.

Aufgrund der ungewöhnlichen Lokalisation von Sun1 in postmeiotischen Zellen, wurde dessen Expressionsprofil im Detail untersucht. Neben sechs unterschiedlichen Sun1 Isoformen, die in somatischen Geweben ebenfalls exprimiert werden, wurde eine spermiogenesespezifische Spleißform, Sun1 $\eta$ , identifiziert, die in reifen Spermatozoen als alleinige Sun1 Variante vorkommt. Bezogen auf die nicht-nukleäre Lokalisation von Sun1 ist Sun1 $\eta$  zudem besonders interessant, da dieser Variante nukleoplasmatische Regionen fehlen, die wichtig für die Kernhüllenbindung von Sun1 sind.

### 3.2.3 Während der Spermiogenese der Säuger werden zwei neue LINC-Komplexe gebildet

Mit Sun3 und Sun1 $\eta$  wurden bereits zwei neue SUN-Domänen Proteine als potentielle INM-Komponenten neuer LINC-Komplexe in der Spermiogenese der Maus vorgestellt. Da funktionelle LINC-Komplexe jedoch stets auch aus einem ONM-Teil, der die Verbindung zum Zytoskelett herstellt, bestehen, wurde schließlich das Verhalten möglicher ONM-Komponenten - im Falle der Säuger die KASH-Proteinfamilie der Nesprine - in der postmeiotischen Phase der Spermatogenese untersucht. Von besonderem Interesse war dabei außerdem, ob auch Sun3 als neu identifiziertes SUN-Protein in der Lage ist, LINC-Komplexe aufzubauen.

#### 3.2.3.1 Nesprin1 polarisiert am posterioren, Nesprin3 am anterioren Pol des Spermatidenkopfes

Um mögliche KASH-Domänen Proteine in der Spermiogenese nachweisen zu können, wurde die Lokalisation der bekannten KASH-Proteine der Säuger, nämlich der Nesprine 1, 2, 3 und 4, in der männlichen Keimbahn immunfluoreszenzmikroskopisch auf Testes-Paraffinschnitten analysiert. Die Detektion der Nesprine 1, 2, 3 und 4 erfolgte, nach Freilegung der durch Formaldehyd-Fixierung maskierten Epitope, mit spezifischen Antikörpern (Rb  $\alpha$ -SYNE1, Atlas Antibodies HPA019113; Rb  $\alpha$ -SYNE2, Atlas Antibodies HPA003435; Rb  $\alpha$ -Nesprin3, Wilhemsen et al., 2005; Rb  $\alpha$ -Nesp4, Roux et al., 2009). Während die Nesprine 2 und 4 in diesem Versuchsansatz nicht nachgewiesen werden konnten, waren die Nesprin1 und 3 als deutliche Signale in Spermatischen anwesend (Abbildung 34).

Da die Verteilung von Nesprin3 in Spermatischen stark an diejenige von Sun1 erinnerte, wurde die Lokalisation beider in einer Doppel-Immunfärbung auf Schnitten von Paraffin eingebettetem Hodengewebe analysiert (Abbildung 34 A). Nesprin3 polarisierte dabei in runden Spermatischen sowohl am posterioren als auch am anterioren Zellpol und zeigte somit die gleiche duale Lokalisation wie Sun1. Wie Sun1 erschien auch Nesprin3 auf der anterioren Seite akrosomenassoziiert außerhalb des Kern (Abbildung 34 A a-c). In späteren Stadien der Spermiogenese schließlich polarisierte Nesprin3 ausschließlich anterior, was wiederum der beobachteten Verteilung von Sun1 entsprach (Abbildung 34 A d-f) und daher stark auf die Bildung eines LINC-Komplexes durch Nesprin3 und Sun1 bzw. dessen spermiogenesespezifischer Isoform  $\eta$  hindeutet.

Auch das zweite in Spermatischen vorkommende KASH-Protein Nesprin1 ähnelte aufgrund seiner posterioren Lokalisation einem möglichen LINC-Komplex-Partner, nämlich Sun3. Die Doppel-Immunlokalisation bestätigte, dass sich Nesprin1 wie Sun3 in der Spermatischen Kernhülle verhielt. Nesprin1 und Sun3 kolokalisierten nämlich lateral und entsprechend der Mikrotubuli-Manschette (siehe 3.2.1.3) um den Kern und waren in der Implantation Fossa nicht nachweisbar (Abbildung 34 B a-c). Im Gegensatz dazu schlossen sich Sun3 und das ebenfalls in Spermatischen nachgewiesene Nesprin3 völlig aus, was ein weiteres immunocytochemisches Experiment zeigte (Abbildung 34 B d-f).

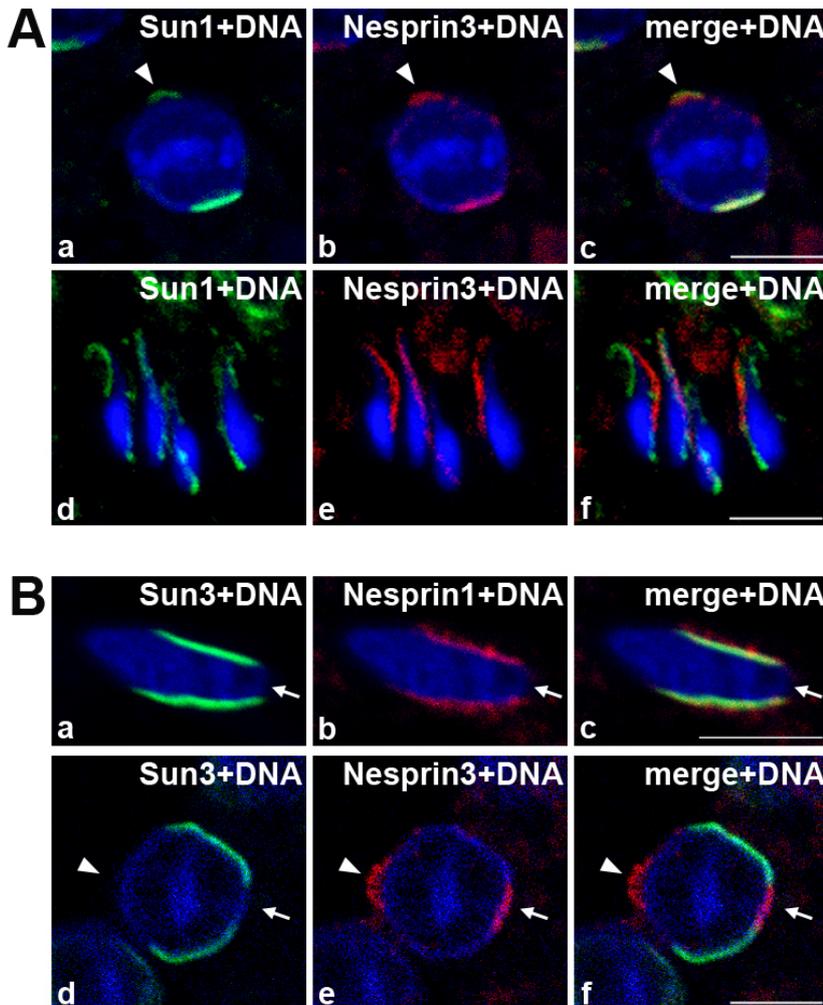


Abbildung 34. Die Nesprine 1 und 3 polarisieren während der Differenzierung postmeiotischer Zellen und kolokollieren mit je einem potentiellen LINC-Komplex-Partner. Die Verteilung der Nesprine 1 und 3 in Spermatischen wurde mithilfe der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu wurde eine Doppel-Immunlokalisation auf 5 µm dicken Hodenparaffinschnitten, die vor der Paraffineinbettung für 3 h mit 1% PFA fixiert worden waren, durchgeführt. Maskierte Epitope wurden vor der Immunlokalisation durch Unmasking im Tischautoklaven (10 min, 125 °C, 1 bar) freigelegt. (A) zeigt die Doppel-Immunlokalisation mit polyklonalen Rb α-Nesprin3 Antikörpern (1:150 in PBS; rot; b, e) zusammen mit einem affinitätsgereinigten Gp α-Sun1 Antiserum (1:300 in PBS; grün; a, d) (B) Doppel-Immunlokalisation eines affinitätsgereinigten Gp α-Sun3 Antiserum (1:300 in PBS; grün; a, d) zusammen mit polyklonalen Antikörpern gegen Nesprin3 (1:150 in PBS; rot; b) oder Nesprin1 (Atlas Antibodies Rb α-SYNE1; 1:20 in PBS; rot; e). Die DNA wurde mit 33258-Hoechst angefärbt. In A c, f und B c, f sind Überlagerungen dargestellt. Die Aufnahme zeigt die maximale 2D Projektion dreier Schnittserien, die am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop TCS-SP2 AOBS (Leica) aufgenommen wurden. Nesprin3 kolokolliert mit Sun1, und zeigt die

gleiche nicht-nukleäre akrosomenassoziierte Lokalisation (Pfeilköpfe in A a-c und B d-f). Sun3 kolokolliert mit Nesprin1, schließt sich jedoch in seiner Lokalisation mit Nesprin3 aus. Die Lage der Implantation Fossa ist angegeben (Pfeile in B a-f). Größenbalken: 5 µm. Aus Göb et al., 2010. doi:10.1371/journal.pone.0012072.g004.

Die Kolokollierung von Sun3 und Nesprin1 deutet, wie auch die gleichartige Verteilung, die für Sun1 und Nesprin3 beobachtet worden war, auf eine direkte Bindung dieser Proteine und somit auf den gezielten Zusammenbau bisher nicht beschriebener LINC-Komplexe hin. Um dies zu überprüfen, sollte die mögliche Interaktion von Sun1 und Nesprin3 bzw. Sun3 und Nesprin1 proteinbiochemisch analysiert werden.

### 3.2.3.2 Nesprin1/Sun3 und Nesprin3/Sun1 bilden zwei neue spermiogenesespezifische LINC-Komplexe

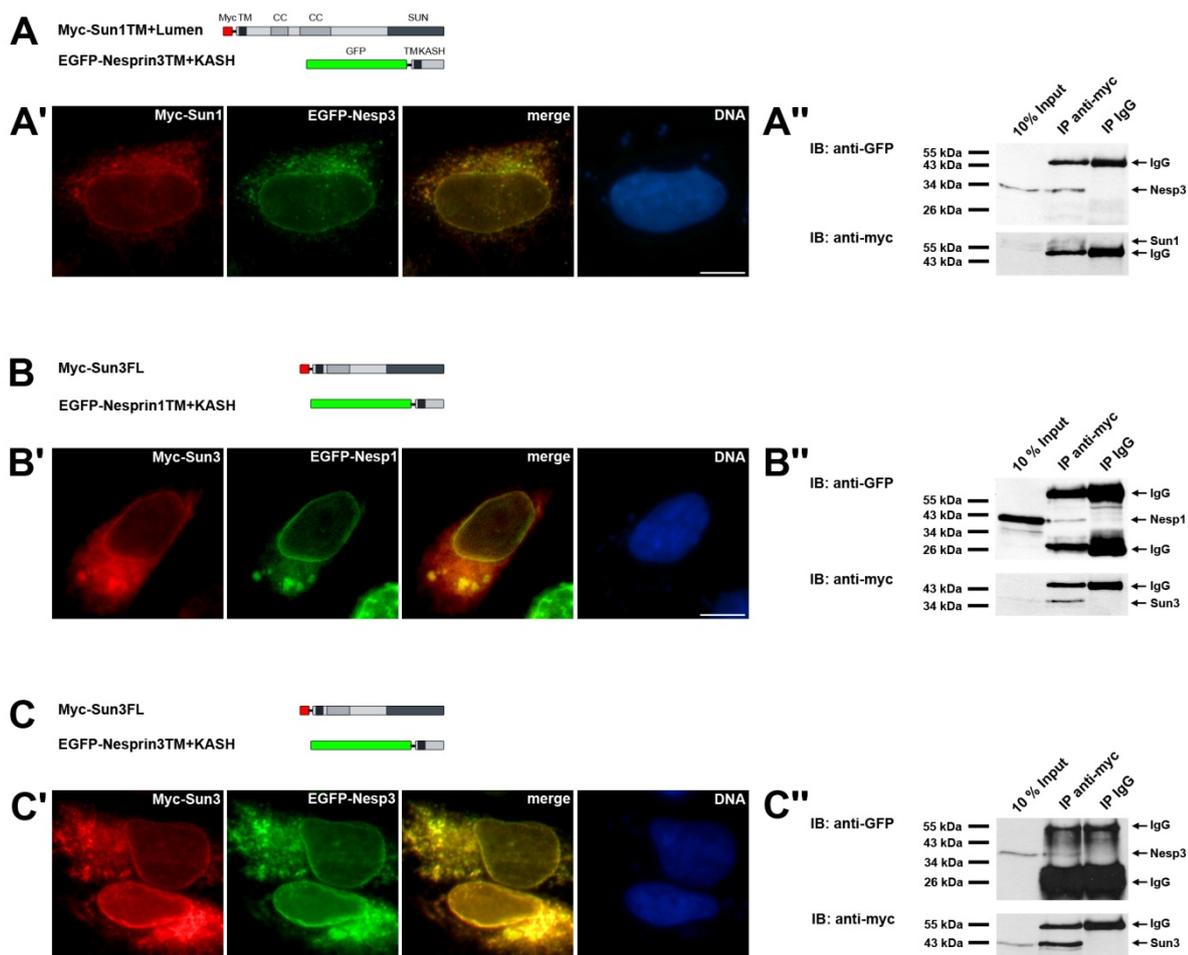
Die mögliche Interaktion der SUN-Proteine Sun1 und Sun3 mit den KASH-Proteinen Nesprin1 und Nesprin3 wurde in einem Co-Transfektions/Co-Immunpräzipitations Experiment untersucht, das weitestgehend dem von Stewart-Hutchinson und Kollegen beschriebenen Protokoll glich (Stewart-Hutchinson et al., 2008). Da dieses auf der Transfektion Myc- bzw. EGFP-markierter Peptide (Myc-Sun1/3 und EGFP-Nesprin1/3, Abbildung 35 A, B, C) im heterologen System, der anschließenden Zellyse, der Präzipitation gebildeter Proteinkomplexe sowie dem immunologischen Nachweis gebunder Proteine beruhte, mussten zunächst die für die Transfektion benötigten Maus-DNA-Konstrukte hergestellt werden.

Für das Konstrukt Myc-Sun1TM+Lumen wurde zunächst ausgehend von der kompletten Sun1 cDNA (bezogen über das Deutsche Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH; accession number: BC047928) ein Fragment amplifiziert, das für die Aminosäuren 501 bis 913 kodierte. Die Amplifikation dieses cDNA-Fragments erfolgte mit den Oligonukleotiden Sun1\_vorTM\_5'\_Eco (forward) und Sun1\_TAG\_3'\_Sal (reverse) in 30 Zyklen und einer Annealing-Temperatur von 60°C. Das Konstrukt Myc-Sun3FL entstand durch eine PCR mit den Primern Sun3\_ATG\_5'\_Eco (forward) und Sun3\_TAG\_3'\_Sal (reverse) in 25 Zyklen und einer Annealing-Temperatur von 60°C mit einer aus Hodengewebe hergestellten cDNA als Template. Erhaltene Sun1 und Sun3 PCR-Produkte wurden in den Vektor pJET1.2/blunt kloniert, sequenziert und positive Klone anschließend mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SalI* verdaut. Daraufhin wurden die DNA-Fragmente in den ebenfalls mit *EcoRI* und *SalI* geschnittenen Expressionsvektor pCMV-Myc ligiert und nach einer abschließenden Sequenzierung zur Transfektion verwendet.

Zur Herstellung der Konstrukte EGFP-Nesprin1TM+KASH und EGFP-Nesprin3TM+KASH wurden Nesprin1 (die 64 letzten AS von Nesprin1) bzw. Nesprin3 cDNA-Fragmente (die 67 letzten AS von Nesprin3) aus einer NIH/3T3-Fibroblasten cDNA amplifiziert. Dies geschah mit den Oligonukleotiden Nesp1\_TM\_KASH5' bzw. Nesp3\_TM\_KASH5' (forward) und Nesp1RT3' bzw. Nesp3RT3' (reverse) in 30 Zyklen bei Annealing-Temperaturen von 62°C bzw. 60°C. Anschließend wurden die PCR-Produkte in die geöffneten *SmaI*-Schnittstellen von pEGFP-C2-Expressionsvektoren ligiert, und positive Plasmide nach der Sequenzierung in HeLa-Zellen transfiziert.

Um heraus zu finden, ob Sun3 in der Lage ist LINC-Komplexe aufzubauen, wurde N-terminal Myc-markierte Gesamt-Sun3 cDNA (Myc-Sun3FL) zusammen mit der N-terminal EGFP-markierten KASH-Domäne von Nesprin1 bzw. Nesprin3 (EGFP-Nesprin1TM+KASH bzw. EGFP-Nesprin3TM+KASH) in HeLa-Zellen co-transfiziert. Als Positivkontrolle diente eine Co-Transfektion mit einem N-terminal Myc-markierten Sun1-Konstrukt, dem die nukleoplasmatische Domäne fehlte (Myc-Sun1TM+Lumen), zusammen mit dem eben beschriebenen EGFP-Nesprin3TM+KASH-Konstrukt, da diese Interaktion bereits beschrieben worden war (Stewart-Hutchinson et al., 2008). Bevor jedoch die eigentliche Interaktion der co-transfizierten Proteine analysiert wurde, wurde der Erfolg der Transfektion immunfluoreszenzmikroskopisch überprüft (Abbildung 35 A', B', C'). Es zeigte sich dabei, dass alle Konstrukte, wie zu erwarten, auch in der Kernhülle lokalisierten und damit bereits beschriebenen Transfektionsexperimenten entsprachen (Stewart-Hutchinson et al., 2008).

Da sich die markierten SUN- und KASH-Peptide in den transfizierten HeLa-Zellen wie erwartet verhielten und sich außerdem aufgrund der Kolo-kalisation in allen drei Kombinationen bereits Interaktionen andeuteten, wurden Co-Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden interagierende SUN-KASH-Komplexe zunächst mit monoklonalen  $\alpha$ -myc Antikörpern aus den lysierten Zellextrakten präzipitiert und gebundenen Proteinen mit monoklonalen  $\alpha$ -EGFP Antikörpern detektiert (Abbildung 35 A'', B'', C''). Eine zusätzlich Co-Immunpräzipitation mit unspezifischen Maus IgG Antikörpern diente als Negativkontrolle. Im Falle der Sun3-Immunpräzipitation konnten sowohl Nesprin1 als auch Nesprin3 als co-präzipitierte Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 35 B'' und C''). Dies spricht eindeutig dafür, dass Sun3 fähig ist, LINC-Komplexe aufzubauen, da es sich in dieser Hinsicht wie Sun1 verhielt, dessen Interaktion mit Nesprin3 in diesem Versuch bestätigt werden konnte (Abbildung 35 A''). Die nachgewiesene Interaktion von Sun3 und Nesprin1 in transfizierten Säugerzellen verstärkt zudem die in der Immunfluoreszenz beobachtete Kolo-kalisation dieser beiden Proteine und ist ein weiteres Indiz für die Bildung funktioneller LINC-Komplexe aus Sun3 und Nesprin1 in differenzierenden Spermatozoen. Da Sun1 und Nesprin3 zudem nachgewiesenermaßen ebenfalls LINC-Komplexe aufbauen ist auch deren gemeinsames Fungieren in der Spermiogenese denkbar.



**Abbildung 35.** Sun3 ist durch seine Interaktion mit den Nesprinen 1 und 3 in der Lage LINC-Komplexe zu bilden. (A, B, C) Um die mögliche Beteiligung von Sun3 am Aufbau funktioneller LINC-Komplexe zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen transient mit Myc-Sun1 bzw. Myc-Sun3 und EGFP-Nesprin1 bzw. EGFP-Nesprin3 Konstrukten co-transfiziert. (A', B', C') Der Erfolg der Transfektion wurde immunfluoreszenzmikroskopisch überprüft, wobei Myc-Sun1 bzw. Myc-Sun3 Peptide mit monoklonalen  $\alpha$ -myc Antikörpern (Invitrogen; 1:200 in PBS; rot) nachgewiesen wurden. Die DNA wurde mit dem Farbstoff 33258-Hoechst sichtbar gemacht. Die Präparate wurden mit dem Axiophot HB050 Fluoreszenzmikroskop sowie der Axiocam MRm Digitalkamera (Zeiss) analysiert. In der Überlagerung wird deutlich,

dass SUN- und Nesprin-Konstrukte ähnliche Lokalisationen um den Zellkern aufweisen. Größenbalken: 10  $\mu\text{m}$ . (A'', B'', C'') Um eine mögliche Interaktion nachzuweisen, wurden Co-Immünpräzipitationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden co-transfizierte HeLa-Zellen in RIPA-Puffer homogenisiert und Protein-Protein-Komplexe mit monoklonalen  $\alpha\text{-myc}$  Antikörpern (Invitrogen; 1,5  $\mu\text{g}$ ) co-immunpräzipitiert. Zur Kontrolle wurden unspezifische Maus IgG Antikörper (Dianova; 1,5  $\mu\text{g}$ ) verwendet. Präzipitierte Antikörper-Protein-Komplexe wurden in 2x Proteinprobenpuffer aufgenommen, homogenisiert, denaturiert, im 12%igen SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Gebundene EGFP-Nesprin1/3 Beute-Peptide wurden mit monoklonalen  $\alpha\text{-GFP}$  Antikörpern (Santa Cruz; 1:2000 in 10 Milch) nachgewiesen. Die Detektion der Köder-Peptide Myc-Sun1/3 erfolgte mit monoklonalen  $\alpha\text{-myc}$  Antikörpern (Invitrogen; 1:2000 in 10% Milch). Die bereits bekannte Interaktion von Sun1 und Nesprin3 (A'') konnte bestätigt werden. Für Sun3 konnten sowohl mit Nesprin1 (B'') als auch mit Nesprin3 (C'') zwei neue LINC-Interaktionspartner gefunden werden. Aus Göb et al., 2010. doi:10.1371/journal.pone.0012072.g004.

Zusammenfassend kann diesem zweiten Teilabschnitt entnommen werden, dass in der Spermiogenese der Säuger unterschiedlichste Komponenten vorhanden sind, die am Aufbau spermiogenesespezifischer LINC-Komplexe beteiligt sein könnten. So wurde mit Sun3 ein neues SUN-Domänen Protein vorgestellt, das ausschließlich im posterioren Bereich der Spermatidenkernhülle lokalisiert und dort vermutlich einen LINC-Komplex mit Nesprin1 bildet. Die Identifikation von Sun1 $\eta$  ist bemerkenswert, da sich dadurch die Möglichkeit des nicht-nukleären LINC-Komplexes und mit diesem vielfältige neue Funktionen ergeben. Sun1 $\eta$  wird nämlich spermiogenesespezifisch und zeitgleich mit der anterioren akrosomassoziierten Lokalisation von Sun1 in postmeiotischen Zellen exprimiert. Da Nesprin3 in Spermatiden zudem das selbe Verteilungsmuster wie Sun1 zeigte, liegt der Aufbau eines anterioren LINC-Komplexes aus Sun1 $\eta$  und Nesprin3 in den Membranen des Akrosoms sehr nahe.

## 4 Diskussion

Die Bildung reifer, funktionell fehlerfreier Keimzellen ist ein entscheidendes Kriterium für die Fertilität eines Individuums. Um dies zu bewerkstelligen, müssen zahlreiche Differenzierungsvorgänge in einem als Gametogenese bezeichneten Prozess präzise reguliert und koordiniert ablaufen und jeweils von speziellen Kontrollmechanismen überprüft werden. Das kontrollierte Zusammenwirken unterschiedlicher Zelltypen, die hormonelle Regulation und auch die zeitlich abgestimmte Expression differenzierungsrelevanter Faktoren sind in diesem Zusammen von maßgeblicher Bedeutung. Dementsprechend kann bereits der Ausfall einer einzigen Komponente innerhalb dieser geordneten Mechanismen zu gravierenden Schädigungen des Fortpflanzungssystems und letztlich zu Infertilität führen.

Auch die Kernhülle, jene membranöse Struktur welche zusammen mit einer Vielzahl assoziierter Proteine den Zellkern einer jeden eukaryotischen Zelle umgibt, scheint erheblichen Einfluss auf das Differenzierungsschicksal einzelner Keimzelltypen auszuüben. Dies konnte bei Säugetieren insbesondere während der Prophase der ersten meiotischen Teilung anhand unterschiedlicher Mausmodelle nachgewiesen werden. In den untersuchten Knock-out-Tieren kam es nämlich aufgrund des Verlusts einer einzigen Kernhüllenkomponente zum Absterben der Meiozyten und folglich zu einem Arrest in der Prophase I (Alzheimer et al., 2004; Ding et al., 2007; Chi et al., 2009). Doch auch während der postmeiotischen männlichen Differenzierungsphase übernimmt die Kernhülle vermutlich wichtige Funktionen, da in deren Verlauf eine bislang einzigartige Reorganisation der Kernhülle und ihrer Bestandteile beobachtet werden konnte (Alzheimer et al., 1998; Mylonis et al., 2004; Schütz et al., 2005a).

Dennoch ist die Bedeutung der Kernhülle während der Gametogenese der Säuger bisweilen nur ansatzweise bekannt und erforscht. Um Funktionen der Kernhülle im differenzierenden Keimzellen im allgemeinen besser verstehen zu können, war die Untersuchung spezieller Komponenten der Keimzellkernhülle, ihre Beteiligung an dynamischen Prozessen sowie an der Reorganisation des Zellkerns zentrales Thema dieser Arbeit. Besonderes Augenmerk lag dabei zum einen auf Lamin C2, einer meiosespezifischen Spleißform des *Lmna* Gens, von der angenommen wurde, dass sie als einziges meiotisches A-Typ Lamin für das erfolgreiche Durchlaufen der Meiose unerlässlich ist. Zum anderen wurden SUN- und KASH-Domänen Proteine als die Kernmembranen durchspannenden Komponenten des LINC-Komplexes bezüglich ihres Erscheinens während der Spermiogenese untersucht. LINC-Komplexe bzw. dessen Bestandteile wurden nämlich als geeignete Kandidaten angesehen, aufgrund ihrer Kern-Cytoskelt verbindenden Eigenschaft an der morphologischen Umgestaltung des Spermatidenkopfes beteiligt zu sein.

Dass die Kernhülle für die Keimbahn insgesamt - für die Spermatogenese der Säuger jedoch im speziellen - von maßgeblicher Tragweite ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit klar aufgezeigt und so ein weiterer bedeutender Schritt zu einem besseren Verständnis der Keimzellkernhülle gemacht werden.

#### 4.1 Der Verlust von Lamin C2 führt zu einem meiotischen Prophase I Arrest in der Spermatogenese von *Mus musculus*

Die Bedeutung der Kernhülle für die Meiose zeigt sich schon sehr früh, wenn im Leptotän/Zygotän-Stadium der Prophase I die Telomere aller Chromosomen, die in diesem Stadium gerade erst zu kondensieren beginnen, stabil in der Kernhülle verankert werden (Schmitt et al., 2007). Damit dieser für das Fortlaufen der Meiose essentielle Mechanismus ablaufen kann, bedarf es einer speziellen Strukturierung der gesamten Kernhülle. So sind beispielsweise die beiden INM-Komponenten somatischer LINC-Komplexe Sun1 und Sun2 in Spermatozyten nicht mehr homogen in der Kernhülle verteilt, sondern nur noch punktuell und kolokalisierend mit je einem Telomer. Man geht sogar davon aus, dass die Assoziation der Telomere an die INM über diese beiden SUN-Proteine vermittelt wird (Ding et al., 2007; Schmitt et al., 2007; siehe 2.2.2.1).

Auch die Kernlamina zeichnet sich in Spermatozyten durch strukturelle und organisatorische Besonderheiten aus (siehe 2.2.2.2): Im Vergleich zu den meisten somatischen Zellen, in denen sich die Lamina aus vier Laminen – zwei A- (Lamine A und C) und zwei B-Typ Laminen (Lamine B1 und B2) – aufbaut, besteht die Lamina dieser Prophase I Zellen aus nur einem A- und einem B-Typ Lamin. Dabei wird das einzige A-Typ Lamin, Lamin C2, zelltypspezifisch nur in der Prophase der ersten meiotischen Teilung exprimiert (Furukawa et al., 1994; Alsheimer und Benavente, 1996). Dieses meiosespezifische Expressionsmusters ist jedoch nicht der einzige Faktor, weshalb Lamin C2 eine ausschlaggebende Rolle in der Meiose zugesprochen wird. Auch seine subzelluläre Lokalisation in distinkten Regionen um die angehefteten Telomere (Alsheimer et al., 1999) sowie der meiotische Phänotyp der *Lmna*<sup>-/-</sup> Mauslinie (Alsheimer et al., 2004) sprechen für eine wichtige meiotische Funktion. Männliche *Lmna*<sup>-/-</sup> Mäuse können nämlich aufgrund der Apoptose später Pachytän-Spermatozyten keine reifen Samenzellen produzieren und sind folglich infertil. Da jedoch bislang formell nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass der Spermatogenese-Arrest bei *Lmna*<sup>-/-</sup> Mäusen kein sekundärer Effekt der allgemein schwer erkrankten Tiere ist (Sullivan et al., 1999), wurde eine selektive Lamin C2 Knock-out-Mauslinie etabliert (Schmitt, 2008). Diese sollte aufgrund der spezifischen Deletion des Lamin C2-spezifischen Startexons 1a alle Lamine außer Lamin C2 exprimieren und darüber hinaus eine detaillierte funktionelle Analyse von Lamin C2 im Verlauf der meiotischen Prophase I ermöglichen.

Dass Lamin C2 tatsächlich ein entscheidender Determinant männlicher Fertilität ist, konnte im Rahmen der Grundcharakterisierung der Lamin C2 Knock-out-Mauslinie nachgewiesen werden. Männliche *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäuse zeichnen sich durch vollständige Infertilität aus und sind in keiner Weise in der Lage Nachkommen zu zeugen. Darüber hinaus belegen RNA- und proteinanalytische sowie immunhistochemische Untersuchungen an wildtypischen, heterozygoten und homozygoten Knock-out-Mäusen eindeutig, dass *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Tiere einzig für Lamin C2 - nicht jedoch für die somatischen A-Typ Lamine A und C - defizient sind. Da *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Mäuse außerdem phänotypisch gesund und nicht, wie Mäuse der *Lmna*<sup>-/-</sup> Linie (Sullivan et al., 1999), durch einen vorzeitigen Tod gekennzeichnet sind, kann die festgestellte Unfruchtbarkeit ausschließlich auf die Deletion des

Lamin C2 spezifischen Startexons und folglich auf den Verlust des Proteins Lamin C2 zurückgeführt werden. Desweiteren lassen diese Erkenntnisse den Schluss zu, dass der bei *Lmna*<sup>-/-</sup> Mäusen beschriebene infertile Phänotyp (Alsheimer et al., 2004) ebenfalls in der Lamin C2-Defizienz und nicht in der physischen Beeinträchtigung dieser Tiere begründet liegt.

Ursache der Infertilität Lamin C2-defizienter männlicher Mäuse ist das Absterben aller Spermatozyten einhergehend mit dem vollständigen Fehlen postmeiotischer Spermatogenesestadien und reifer Spermatozoen. Diesen Phänotyp bezeichnet man allgemein als Azoospermie, dem medizinischen Fachausdruck für humane Infertilität aufgrund des Fehlens ausdifferenzierter Samenzellen. Nicht weiter überraschend ist, dass dieses Phänomen bei vielen Knock-out-Mausmodellen der männlichen Keimbahn zu beobachten ist (Übersichten in Scherthan, 2003; Costa und Cooke, 2007; Matzuk und Lamb, 2002; 2008). Während jedoch bei etlichen dieser infertilen Mausmodelle bereits aufgrund der Lokalisation der deletierten/mutierten Proteine (z. B. Proteine des SC), eines bereits identifizierten Interaktionspartners oder der bekannten Funktion homologer bzw. paraloger Proteine auf eine mutmaßliche Funktion geschlossen werden kann, gestaltete sich die funktionelle Frage bei Lamin C2 schwieriger.

Die Lokalisation von Lamin C2 jedoch, welche als diskontinuierlich aber spezifisch um die kernhüllenassoziierten Telomere beschrieben worden war (Alsheimer et al., 1999), diente als erster Anhaltspunkt für die Suche nach einer potentiellen Funktion. Die meiosespezifische Anheftung der Telomere an die Spermatozytenkernhülle wird über die SUN-Domänen Proteine Sun1 und Sun2 vermittelt (Ding et al., 2007; Schmitt et al., 2007; Chi et al., 2009), welche wiederum zur direkten Interaktion mit - zumindest somatischen - Laminen fähig sind (Padmakumar et al., 2005; Crisp et al., 2006; Haque et al., 2006). Würde nun auch Lamin C2 mit einem SUN-Protein an der Spermatozytenlamina assoziieren, läge seine Beteiligung an der Rekrutierung oder der Befestigung der Telomere an die INM auf der Hand. Da eine fehlerhafte Anheftung der meiotischen Telomere in *Sun1*<sup>-/-</sup> oder auch *Smc1β*<sup>-/-</sup> Mäusen zudem eine substantielle Ursache für das Abbrechen der Meiose darstellt (Ding et al., 2007; Adelfalk et al., 2009), könnte so direkt auf eine Funktion von Lamin C2 geschlossen werden. Die detaillierte qualitative und quantitative Analyse des Anheftungszustandes meiotischer Telomere in Lamin C2-defizienten männlichen Mäusen zeigte allerdings eindeutig, dass sich das Fehlen von Lamin C2 nicht auf die Verankerung der Telomere in der Kernhülle auswirkt. Die Telomere befanden sich in dieser Studie nämlich peripher und kolokalisierten äquivalent zum Wildtyp mit Sun1 (Link, 2010). Eine mögliche Rolle von Lamin C2 an der direkten Telomeranheftung während der meiotischen Prophase I konnte somit ausgeschlossen werden.

Dafür sollte die Untersuchung der meiotischen Prophase I-Prozesse, die in dem Stadium, in dem Lamin C2 selektiv nachgewiesen kann, ablaufen, neue Erkenntnisse bezüglich der Aufgabe von Lamin C2 erbringen. Der Vergleich der homologen Chromosomen wildtypischer und Lamin C2-defizienter Mäuse hinsichtlich Paarung und Synapsis machte deutlich, dass sich der Verlust von Lamin C2 schwerwiegend auf den Paarungszustand der Homologen auswirkt. Im Gegensatz zu wildtypischen Pachytän-Spermatozyten, in denen die Homologen mit Ausnahme der Gonosomen in ihrer gesamten Länge synapsiert vorliegen, wurden in *Lmna*<sup>ΔC2/ΔC2</sup> Spermatozyten zahlreiche Paarungsdefekte festgestellt, die eine außerordentliche Heterogenität an

den Tag legten. Dies äußerte sich einerseits in der enormen Vielfalt der Fehlpaarungen (heterolog assoziierte, unvollständig gepaarte oder univalente Chromosomen, siehe 3.1.3), andererseits in den Unterschieden hinsichtlich Schweregrad und Anzahl fehlgepaarter Chromosomen, die zwischen den einzelnen Spermatocyten ausgemacht werden konnten. Diese Beobachtungen lassen folglich erkennen, dass Lamin C2 in direktem Zusammenhang mit den Paarungsereignissen der homologen Chromosomen stehen muss. Da sich *Lmna*<sup>A<sub>C2</sub>A<sub>C2</sub></sup> Spermatocyten ferner nicht über diesen pachytän-ähnlichen Paarungszustand hinaus differenzieren können, kann geschlossen werden, dass Spermatocyten, die kein Lamin C2 exprimieren, im Pachytän der ersten meiotischen Prophase in Apoptose gehen müssen. Ein weiteres Indiz für den Abbruch der Spermatogenese im Pachytän ist die Beobachtung, dass *Lmna*<sup>A<sub>C2</sub>A<sub>C2</sub></sup> Spermatocyten neben der gestörten Homologenpaarung auch massive Probleme bei der Reparatur induzierter Doppelstrangbrüche und einhergehend mit dieser bei der homologen Rekombination haben (Link, 2010).

Eine fehlerhafte Synapsis, Defekte bei der Doppelstrangbruchreparatur und der homologen Rekombination sowie das programmierte Absterben der Spermatocyten ist ein wiederkehrendes Phänomen, das in zahlreichen meiotischen Knock-out-Mauslinien beobachtet werden kann (Einen Überblick über publizierte meiotische Mausmodelle geben Übersichtsartikel von Matzuk und Lamb, 2002, 2008; Cohen et al., 2006; Costa und Cooke, 2007). Auch der zeitlich relativ einheitlich Abbruch der Spermatogenese in einem Pachytän-ähnlichen Stadium der Prophase I, wie bei den hier beschriebenen *Lmna*<sup>A<sub>C2</sub>A<sub>C2</sub></sup> Mäusen, ist ein gemeinsames Kennzeichen etlicher mutanter Mausmodelle. Erstaunlicherweise hängt dieser Phänotyp dabei offenbar weit weniger von dem mutierten/deletierten Gen an sich ab, als viel mehr von der Tatsache, dass grundsätzlich in die meiotischen Abläufe eingegriffen wurde. Es zeigte sich nämlich, dass der (Funktions-) Verlust unterschiedlichster Genprodukte nahezu die selbe Auswirkung hat: So sind beispielsweise *Sun1*<sup>-/-</sup> (Kernhüllenprotein, Ding et al., 2007), *Sycp1*<sup>-/-</sup> und *Sycp3*<sup>-/-</sup> (Proteine des SC, Yuan et al., 2000, de Vries et al., 2005) oder *Cdk2*<sup>-/-</sup> Mäuse (Protein mit enzymatischer Funktion, Ortega et al., 2003) durch einen Pachytän-Arrest aufgrund apoptotischer Spermatocyten gekennzeichnet. Schlussendlich bedeutet dies nichts weiter, als dass der korrekte Ablauf der Meiose durch zahlreiche übergeordnete Regulationsmechanismen kontrolliert werden muss. Man ist sich inzwischen darüber einig, dass diese Aufgabe von speziellen meiotischen Checkpoint-Systemen erledigt wird, die die Meiose im Falle auftretender Probleme, z. B. heterolog assoziierte und/oder univalente Chromosomen oder gestörte Rekombinationsereignisse, zum Stillstand bringen. Ähnlich wie im somatischen Zellzyklus sind an der Meiose-Regulation offensichtlich Cycline und ihre zugehörigen Cyclin-Kinasen beteiligt, deren Deletion selbst ebenfalls zum Abbruch der Meiose führt (z. B. *Cdk2*<sup>-/-</sup>, Viera et al., 2009; Übersicht in Cohen et al., 2006). Im Hinblick auf die Anheftung und Dynamik der meiotischen Telomere sei in diesem Kontext erwähnt, dass die Cyclin-abhängige Kinase 2 (Cdk2, cyclin dependent kinase 2) eine entscheidende regulatorische Aufgabe bei der Verankerung und Bewegung der meiotischen Telomere innehaben könnte. Cdk2 wurde nicht nur telomerassoziiert während der gesamten Prophase I nachgewiesen (Ashley et al., 2001), sondern darüber hinaus als essentiell für die Gametogenese. Cdk2-defiziente Mäuse haben nämlich erhebliche Defekte bei der Anheftung der Chromosomenenden an die Kernhülle verbunden mit einer aberranten oft nicht-homologen Synapsis, die in gewisser Weise an die heterologen Assoziationen bei *Lmna*<sup>A<sub>C2</sub>A<sub>C2</sub></sup> Mäusen erinnert (Viera et al., 2009).

Interessanterweise wurde in *C. elegans* mit der Checkpoint-Kinase CHK2 ebenfalls ein Kandidat für die Regulation der Telomeranheftung in der Prophase I gefunden (Mac Queen und Villeneuve et al., 2001; Penkner et al., 2009). CHK2 scheint nämlich - ausgelöst durch Doppelstrangbrüche in der frühesten Prophase I - für die N-terminale Phosphorylierung von Matefin/Sun-1 verantwortlich zu sein. Diese Phosphorylierung wiederum wird offenbar dazu benötigt, telomerbindende Proteine an die INM zu rekrutieren und somit die stabile Verankerung der Telomere voranzutreiben. Darüber hinaus ist anzunehmen, dass die Phosphorylierung von Matefin/Sun-1 mit dessen Aggregation, mit den chromosomalen Bewegungen und schließlich mit der Findung der Homologen in Zusammenhang steht, da unphosphorylierte Mutanten verringerte Sun1-Aggregate und heterolog synapsierte Chromosomen aufweisen (Penkner et al., 2009). Übertragen auf die oben genannte, telomerassoziierte Cyclin-Kinase Cdk2 wäre die Regulation der Telomeranheftung in der Säugermeiose in ähnlicher Weise denkbar, wenngleich diesbezüglichen bislang keine konkreten Indizien vorliegen. Insgesamt sind die exakten molekularen Wirkweisen der meiotischen Checkpoint-System allerdings noch nicht hinreichend bekannt und müssen für ein besseres Verständnis der Meiose-Regulation weiter erforscht werden.

Auch die weibliche Meiose wird in ihrem korrekten Ablauf kontrolliert, die Checkpoint-Systeme funktionieren jedoch weitaus weniger stringent. Dies äußert sich besonders deutlich darin, dass männliche meiotische Knock-out-Mäuse fast immer infertil sind, weibliche Knock-out-Tiere hingegen teilweise mildere oder keine phänotypische Auffälligkeiten zeigen (Costa und Cooke, 2007). So ist die den meiotischen Zellzyklus regulierende Kinase Cdk2 beispielsweise die einzige bislang gefundene meiotische Kinase, die auch für die weibliche Fertilität essentiell ist (Ortega et al., 2003). Auch die *Sycp3*<sup>-/-</sup> Knock-out-Mauslinie weist einen merklichen Sexualdimorphismus auf. Während männliche *Sycp3*<sup>-/-</sup> Spermatozyten aufgrund asynapsierter homologer Chromosomen in Apoptose gehen, durchlaufen *Sycp3*<sup>-/-</sup> Oocyten trotz fehlender AEs/LEs die Meiose. Weibliche Tiere sind also fertil, zeigen aber im Vergleich zu wildtypischen Geschwistern deutlich verminderte Wurfgrößen, was auf aneuploide Keimzellen und letztlich auf nicht greifende Checkpoint-Mechanismen zurückzuführen ist (Yuan et al., 2000, 2002; Wang und Höög, 2006). Die Fruchtbarkeit weiblicher *Lmna*<sup>Ac2/Ac2</sup> Tiere könnte in ähnlicher Weise erklärt werden, nähme man an, Lamin C2 spiele in der Oogenese eine wichtige Rolle, sodass für die Fertilität dieser Tiere Checkpoint-Systeme umgangen werden müssten. Lamin C2-defiziente Ovarien erscheinen in der histologischen Untersuchung jedoch phänotypisch vollkommen unauffällig und unterscheiden sich nicht von denen wildtypischer Mäuse. Dies lässt zunächst nicht auf eine bedeutende Funktion von Lamin C2 in der weiblichen Meiose schließen, genauso wenig wie die in preliminären Analysen festgestellte normale Nachkommenzahl. In jedem Fall bedarf es weiterer Experimente (Expressionsstudien der weiblichen Meiose und funktionelle Analysen von *Lmna*<sup>Ac2/Ac2</sup> Weibchen), um den Einfluss von Lamin C2 in der Oogenese zu entschlüsseln.

Aufgrund der funktionellen Analyse männlicher *Lmna*<sup>Ac2/Ac2</sup> Mäuse kann Lamin C2 indes bereits als essentieller meiotischer Faktor – zumindest für die männliche Keimbahn - angesehen werden. Die Frage jedoch, welche Rolle Lamin C2 tatsächlich während der Prophase I in der Spermatozytenlamina spielt, konnte noch nicht hinreichend beantwortet werden. Allerdings legt Lamin C2 eine im Vergleich zu somatischen Laminen signifikant erhöhte Mobilität an den Tag und scheint in der Lage zu sein, die Lokalisation anderer Kernhüllenproteine zu

beeinflussen (Jahn et al., 2010). Zusammen mit seiner zeitlichen Expression, die mit der Telomeranheftung und der Bouquetformierung korreliert (Alsheimer und Benavente, 1996; siehe 2.2.2), sowie seiner patchförmigen Lokalisation um die APs (Alsheimer, 1999) bilden diese Erkenntnisse die Grundlage für eine Hypothese bezüglich einer möglichen Funktion: Man stellt sich Lamin C2 aufgrund seiner dynamischen Eigenschaft als einen meiotischen „Lamina-Flexibilisator“ vor, der durch seine Präsenz in diskontinuierlichen Domänen die Spermatocytenlamina derart modulieren könnte, sodass flexiblere Kernhüllenbereiche entstünden. Da die APs der meiotischen Chromosomenenden genau in diesen Bereichen liegen, würden deren dynamische Bewegungsvorgänge in der Kernperipherie erleichtert werden (Alsheimer et al., 1999; Jahn et al., 2010).

Auch wenn die zugrunde liegenden Mechanismen - vor allem in Säugern - bislang nicht ausreichend entschlüsselt sind, ist man sich einig, dass dynamische chromosomale Prozesse entscheidend zur Erkennung der homologen Chromosomen beitragen (Koszul und Kleckner, 2009; Alsheimer, 2009). Von großer Bedeutung sind dabei sowohl die zentrosomenorientierte Wanderung der Telomere im Leptotän/Zygotän-Stadium der Prophase I (Bildung und Auflösung des chromosomalen Bouquets) als auch die danach stattfindende oszillatorische Chromosomenbewegung (Zickler und Kleckner, 1998). In der Modellvorstellung sollen die Chromosomen auf diese Weise ständig repositioniert werden, wodurch die Findung homologer und zugleich die Abstoßung heterologer Chromosomen vorangetrieben werden soll (Penkner et al., 2007; Sato et al., 2009). Nimmt man nun, dass es bei einem Verlust von Lamin C2 zu einer stabiler und steifer organisierten Kernhülle und dadurch zu verlangsamten oder ausbleibenden Telomerbewegungen käme, sollte sich dies negativ auf die korrekte Paarung und Synapsis der homologen Chromosomen auswirken. Die in *Lmna*<sup>AC2/AC2</sup> Spermatocyten beobachtete schwere Fehlpaarung homologer Chromosomen, das folgende Greifen eines Prophase I-Checkpoints und die damit verbundene Apoptose der Spermatocyten könnte auf diese Weise erklärt, und die Kernhülle so ein mal mehr mit entscheidenden Mechanismen der Keimbahn in Zusammenhang gebracht werden.

## 4.2 An der Ausbildung des Spermienkopfes der Säuger sind zwei neue LINC-Komplexe beteiligt

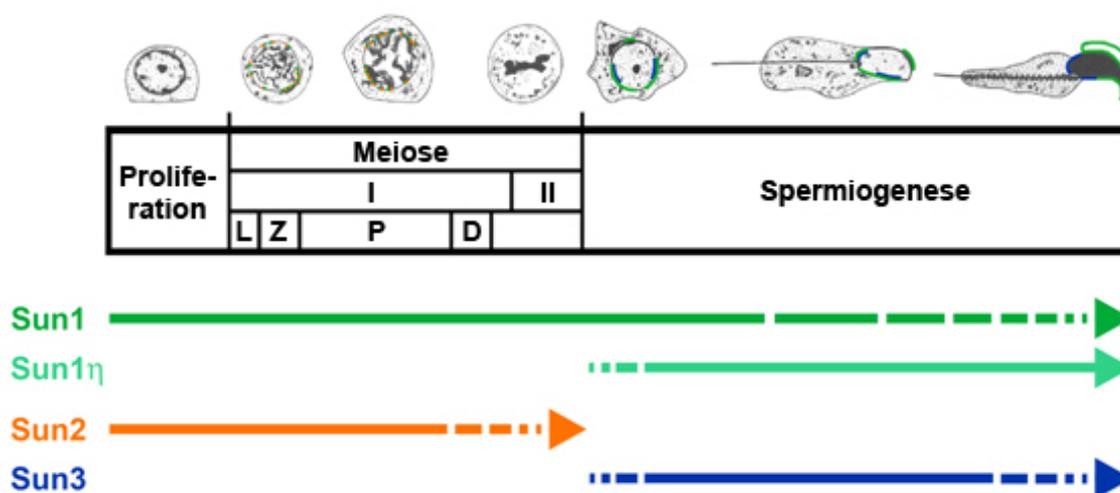
Obwohl bislang noch keine Mausmodelle existieren, die die Bedeutung der Kernhülle für die postmeiotische Phase der Spermatogenese funktionell belegen würden, erscheint die Kernhülle dennoch als wichtige Struktur für die Spermiogenese der Säugetiere. Dies liegt nicht zuletzt daran, dass die haploiden Keimzellen - und insbesondere auch deren Zellkern, welcher wiederum von der Kernhülle umschlossen wird - im Verlauf der Spermiogenese morphologisch in außerordentlicher Weise umgestaltet werden: die zu Beginn der postmeiotischen Differenzierungsphase nämlich noch runden und immoblen Spermatiden werden in mehreren komplexen und eng miteinander in Verbindung stehenden Prozessen zu kompakten und stromlinienförmigen Spermatozoen, die zumindest hinsichtlich ihrer äußeren Form befruchtungsfähig sind.

Der potentielle Einfluss der Kernhülle auf einen oder mehrere dieser Prozesse liegt in der einzigartigen Reorganisation ihrer Bestandteile, die sich mit fortschreitender Differenzierung mehrheitlich auf die posteriore Seite des Spermatidenkerns verteilen. Da es sich dabei mit den integralen INM Proteinen Lap2 und LBR sowie den Laminen B1 und B3, unter anderem um chromatinbindende und strukturgebende Proteine handelt, wurde über eine Beteiligung dieser an der Umformung des Spermatidenkopfes gemutmaßt (Alsheimer et al., 1998; Mylonis et al., 2004; Schütz et al., 2005a). Dennoch sind die molekularen Mechanismen dieses präzise abgestimmten Umformungsprozesses noch weitgehend unverstanden. Es ist allerdings sehr wahrscheinlich, dass spezialisierte spermatidenspezifische Zytoskelettelemente eine entscheidende Rolle spielen; entweder indem sie selbst Kräfte bereitstellen um die Spermatide/den Kern in seine entgültige Form zu bringen oder indem sie sie/ihn in Position halten um von exogenen Faktoren deformiert zu werden (Russell et al., 1991; Dadoune, 2003; Toshimori und Ito, 2003). Die Aktin und Plektin enthaltenden Zytoskelettstrukturen auf der anterioren Seite des Zellkerns, ektoplasmatische Regionen und Akroplaxom, sind dabei genauso von Bedeutung wie die Mikrotubuli-Manschette auf der posterioren Seite (Russell et al., 1991; Kierszenbaum et al., 2003; Kierszenbaum und Tres, 2004; siehe 2.2.1.2). Erstaunlicherweise umgeben diese Strukturen den gesamten Zellkern und scheinen dabei der Kernhülle dicht aufzuliegen. Zwangsläufig stellt sich also die Frage, wie die genannten Zytoskelettelemente und mit diesen motorische Kräfte mit dem Spermatidenkern verknüpft sein könnten.

Da LINC-Komplexe in somatischen und meiotischen Zellen bereits mit Kernpositionierungs- und Kernumformungsprozessen in direkten Zusammenhang gebracht wurden (Olins et al., 2008; Xiong et al., 2008; Khatau et al., 2009; Übersichten in Burke und Roux, 2009; Alsheimer, 2009), wurden sie als äußerst geeignet betrachtet, an der morphologischen Gestaltung des Spermatidenkopfes beteiligt zu sein. Die im Rahmen dieser Arbeit neu gewonnene Erkenntnis, dass in postmeiotischen Zellen sogar zwei unterschiedliche LINC-Komplexe, nämlich Sun1 $\eta$ /Nesprin3 und Sun3/Nesprin1, vorhanden sind, untermauert diese Hypothese (Göb et al., 2010).

Die detaillierte immuncyto- und biochemische Analyse möglicher INM LINC-Komponenten ergab zunächst, dass das putative SUN-Domänen Protein Sun3 **(1)** tatsächlich exprimiert wird, **(2)** es durch seine Interaktion mit Nesprin 1 am LINC-Komplex Aufbau partizipieren kann und **(3)** dass sein Expressionsprofil zeitlich

mit der Differenzierung postmeiotischer Zellen korreliert. Bemerkenswerterweise konnte in dieser Arbeit mit Sun1 $\eta$ , einer verkürzten Spleißform des *Sun1* Gens, ein zweites SUN-Protein mit einer ausschließlich postmeiotischen Expression identifiziert werden. Bezogen auf die allgemeine Expression von SUN-Domänen Proteinen in der Spermatogenese, bedeutet das, dass Zellen der männlichen Keimbahn, die Zellen mit den bislang komplexesten SUN-Protein-Expressionsmuster im gesamten Organismus sind. Neben dem in allen Stadien vorhanden Sun1 (Ding et al., 2007) und dem meiotischen Sun2 (Schmitt et al., 2007) sind nämlich mit den spermiogenesespezifischen Proteinen Sun3 und Sun1 $\eta$  insgesamt vier verschiedene SUN-Proteine in der Spermatogenese nachweisbar; wenn auch nicht zur gleichen Zeit und nicht im selben Zelltyp (Abbildung 36).



**Abbildung 36.** Expression der SUN-Domänen Proteine während der Spermatogenese von *Mus musculus*. Die SUN-Domänen Proteine der Säuger Sun1, Sun2 und Sun3 zeigen während der Spermatogenese unterschiedliche Expressionsmuster. Während Sun1 im gesamten Verlauf der Spermatogenese nachweisbar ist, erscheint Sun2 nur in der Meiose. Das in dieser Arbeit neu vorgestellte SUN-Protein Sun3 wird ausschließlich in postmeiotischen Zellen exprimiert. Für die neu identifizierte Sun1 Isoform Sun1 $\eta$  wurde ebenfalls ein spermiogenesespezifisches Expressionsmuster ermittelt. L, Leptotän; Z, Zygotän; P, Pachytän; D, Diplotän.

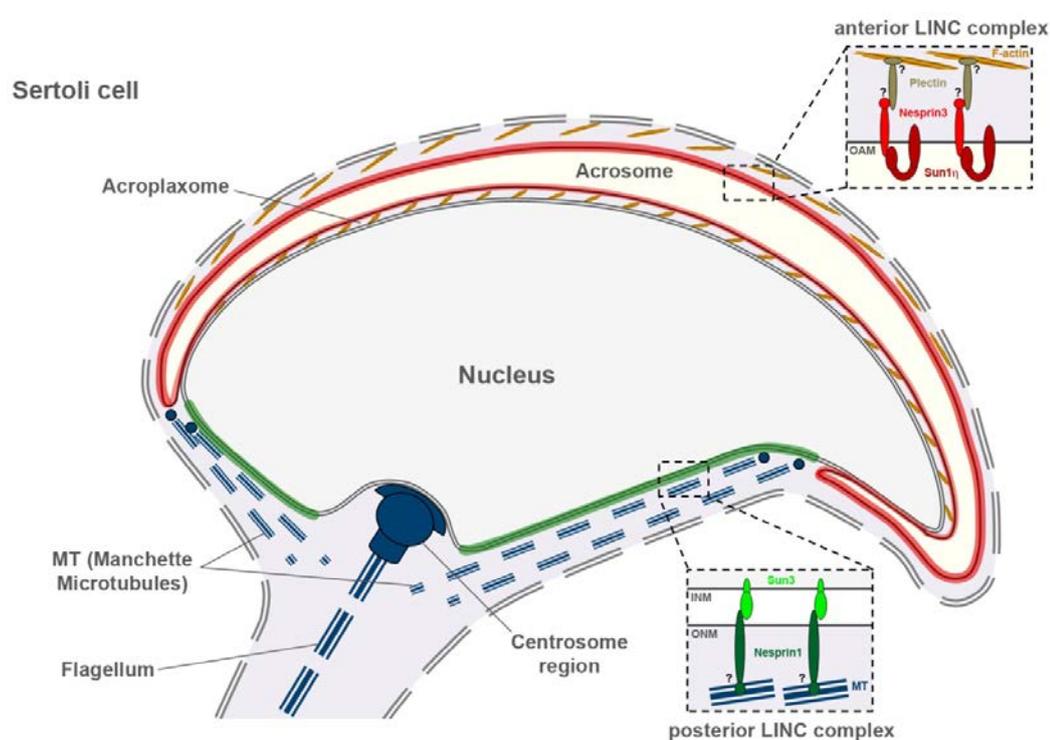
Bereits bei der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der SUN-Proteine Sun1 und Sun3 in Spermatozyten unterschiedlichen Stadiums fiel auf, dass sich diese nicht homogen in der Kernhülle verteilten, sondern spezifisch in speziellen Regionen lokalisierten. Interessanterweise zeigten die Nesprine 1 und 3, die beiden einzigen in postmeiotischen Zellen vorhandenen ONM-Komponenten möglicher LINC-Komplexe, nahezu die selbe Lokalisation wie Sun1 bzw. Sun3. Nesprin1 und Sun3 polarisierten nämlich auf der posterioren, dem Flagellum zugewandten Seite des Zellkerns, Nesprin3 und Sun1/Sun1 $\eta$  hingegen befanden sich - zumindest gegen Ende der Spermio-genese - anterior und entgegen aller Erwartungen außerhalb des Zellkerns. Da SUN- und KASH-Proteine darüber hinaus direkt miteinander interagieren und somit LINC-Komplexe aufbauen können, wird davon ausgegangen, dass während der morphologischen Umgestaltung des Spermienkopfes zwei neue, sich gegenüberliegende LINC-Komplexe formiert werden: anteriore LINC-Komplexe aus Sun1 $\eta$ /Nesprin3 und posteriore LINC-Komplexe aus Sun3/Nesprin1 (Abbildung 37).

Wie bereits mehrfach angesprochen, ist die Modulierung der Kernhülle und die Reorganisation nahezu aller Kernhüllenbestandteile ein allgemeines Merkmal differenzierender Säugerspermatozyten, das zur Elongation und Umformung des Spermienkopfes beitragen soll (Alzheimer et al., 1998; Schütz et al., 2005a, b; 2.2.3.1; 3.2.1.3; 3.2.2.1). So finden sich alle bislang untersuchten Kernhüllenkomponenten, die integralen INM-Proteine

Lap2 und LBR, die Lamine B1 und B3 und auch die NPCs, zu Beginn der Spermiogenese homogen in der gesamten Kernhülle, bewegen sich dann aber mit fortschreitender Differenzierung graduell zum posterioren Pol und sind schließlich mit Ausnahme der Fossa-Region aus der Kernhülle verschwunden (Alzheimer et al., 1998; Mylonis et al., 2004; Schütz et al., 2005a; Ho, 2010). Vollkommen anders jedoch als diese verhalten sich die SUN-Proteine Sun1 und Sun3. Obwohl sich Sun3 ebenfalls posterior polarisierend in der Spermatidenkernhülle befindet, kann bei diesem Protein keine wirkliche Reorganisation beobachtet werden. Sun3 erscheint in frühen Spermatiden schon kelchartig polarisiert in der posterioren Hälfte und verbleibt während der gesamten Spermiogenese in dieser Kernhüllenregion. Da Sun3 zudem vollständig mit der Mikrotubuli-Manschette kolokalisiert, ist es dieser entsprechend in der Implanations Fossa abwesend. Auch Sun1 ist in der Fossa-Region nicht nachweisbar und erscheint zunächst posterior. Im weiteren Verlauf der Spermatidenentwicklung zeigt Sun1 aber eine erstaunliche und noch nie zuvor beobachtete Lokalisation. Denn während Sun3 posterior bleibt und sich alle anderen Kernhüllenproteine auf diese Seite bewegen, ist Sun1 auf beiden Seiten des Spermatidenkopfes - nämlich posterior und anterior - zu finden. Sun1 zeigt demnach eine völlig neue, duale Lokalisation, die sich jedoch im Verlauf der Spermiogenese stark verändert, da Sun1 in frühen runden Spermatiden posterior polarisiert, dort dann verschwindet und in elongierten Spermatiden nur noch auf der anterioren Seite nachweisbar ist. Die anteriore Lokalisation von Sun1 ist besonders erstaunlich, da sich Sun1 in diesem Differenzierungsstadium offensichtlich nicht in der Kernhülle befindet sondern hauptsächlich mit Membranen des Akrosoms assoziiert (Abbildung 37). Diese Beobachtungen liefern einerseits weitere Belege für die in der Spermiogenese stattfindende maßgebliche Modullierung der Kernhülle. Sie weisen aber auch stark darauf hin, dass die einzelnen Komponenten augenscheinlich in bestimmten Regionen der Spermatidenkernhülle lokalisieren müssen, um ihre Funktionen ausführen zu können. Die kürzlich gemachte Feststellungen, dass die Plasmamembran von Spermatiden durch sogenannte Lipid-Flöße ebenfalls in Subregionen untergliedert ist, um so eine funktionelle Abgrenzung einzelner Komponenten zu erreichen, könnte – übertragen auf die Kernhülle – diese Hypothese stützen (Zitranski et al., 2010).

Die Tatsache, dass die Nesprine 1 und 3 genauso polarisieren wie Sun1 bzw. Sun3, spricht eindeutig dafür, dass aus diesen SUN- und KASH-Proteinen neue LINC-Komplexe aufgebaut werden. Da sich die beiden LINC-Komplexe in ihrer Polarisierung jedoch grundlegend von einander unterscheiden, sich sogar völlig voneinander abgrenzen, muss davon ausgegangen werden, dass SUN- und KASH-Proteine nicht zwangsläufig miteinander interagieren müssen; auch wenn sie grundsätzlich dazu in der Lage sind und das in somatischen Zellen auch tun (Abbildung 35; Stewart-Hutchinson et al., 2008). Dies bedeutet folglich, dass LINC-Komplexe - offenbar zelltypabhängig - einerseits unterschiedlich zusammengesetzt und andererseits in verschiedene Bereiche innerhalb der Kernhülle überführt werden können (z. B. in eine bestimmte Kernhälfte, Göb et al., 2010; in APs in Spermatocyten, Ding et al., 2007; Schmitt et al., 2007 oder angereichert um NPCs, Liu et al., 2007). Da die Nesprinen darüber hinaus mit verschiedenen Bestandteilen des Zytoskeletts wechselwirken (siehe 2.1.2), könnte die gegenüberliegende Polarisation dieser LINC-Komplexe in Spermatiden eine Bindung an unterschiedliche Zytoskelettelemente zur Folge haben, was wiederum eine Beteiligung an der Umformung des Spermatidenkopfes nahelegen würde (siehe 4.2.1 und 4.2.2). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass LINC-Komplexe und die jeweiligen LINC-Untereinheiten bereits mehrfach mit der Formerhaltung des Zellkern in

Verbindung gebracht wurden, und somit auch zwangsläufig mit dessen Deformation (Xiong et al., 2008; Olins et al., 2009; Khatau et al., 2009, 2010). So wird beispielsweise die natürliche Armut an LINC-Komplex-Bestandteilen differenzierender Granulozyten für die einfache Deformierbarkeit dieser Zellen verantwortlich gemacht und sogar als evolutionäre Anpassung angesehen (Olins et al., 2009). Auch die „nicht-natürliche Armut“ an LINC-Komplexen, d. h. die gezielte Mutation oder Depletion von SUN- und/oder KASH-Proteine, hat in den unterschiedlichsten Modellorganismen Einfluss auf die allgemeine nukleäre Morphologie, was sich besonders deutlich in einer veränderten Kernarchitektur und in Kernverformungen äußert (z. B. stark vergrößerter PNS, Verlust der Zytoskelettassoziation; Xiong et al., 2008; Lüke et al., 2008; Zhang et al., 2007). Geht man also davon aus, dass sich die Ausstattung einer Zelle mit speziell zusammengesetzten LINC-Komplexen auf die Form des Kerns (und der gesamten Zelle) auswirkt, würde das bedeuten, dass LINC-Komplexe nicht nur bei der Verankerung und Positionierung des Kerns eine Rolle spielen, sondern auch aktiv für dessen Formerhaltung bzw. Verformung mit verantwortlich sind.



**Abbildung 37. Modell für die morphologische Umgestaltung des Spermienkopfes der Säuger unter dem Einfluss zweier gegenüberliegender LINC-Komplexe.** Während der Spermiogenese polarisieren zwei neue spermiogenesespezifische LINC-Komplexe an den beiden gegenüberliegenden Seiten des Spermienkopfes, wo sie den Kern bzw. das Akrosom an Manschetten-Mikrotubuli bzw. F-Aktin zu binden scheinen. Der anteriore LINC-Komplex (rot) wird durch Sun1 $\eta$  und Nesprin3 aufgebaut, wobei beide hauptsächlich in der äußeren akrosomalen Membran (OAM, outer acrosomal membrane) lokalisiert sind. Durch die Interaktion mit Plektin stellen Sun1 $\eta$ /Nesprin3 LINC-Komplexe eine Verbindung zu anterioren Aktinfilamenten, die sich an Verbindungsstellen der Plasmamembranen von Spermatisden und Sertolizellen befinden, her. Der posteriore LINC-Komplex (grün) setzt sich aus Sun3 und Nesprin1 zusammen. Eine Interaktion zwischen Nesprin1 und Mikrotubuli (z. B. über Dynein/Dynaktin und/oder Kinesin II) könnte eine Verbindung des Sun3/Nesprin1 LINC-Komplexes zur posterioren Manschette herstellen. Auf diese Weise wären beide Seiten differenzierender Spermatisdenköpfe durch zwei spezielle LINC-Komplexe an spermatidenspezifische Zytoskelettelemente gebunden.  
Aus Göb et al., 2010. doi:10.1371/journal.pone.0012072.g007.

Zusammengenommen scheinen sowohl die zelluläre Ausstattung mit LINC-Komplexen an sich als auch die tatsächlich im LINC-Komplex integrierten SUN- und KASH-Proteine wichtige Parameter für die Morphologie des Zellkerns und der gesamten Zelle zu sein. Nähme man nun an, dass nicht nur eine geringe Expression von

LINC-Komplex Proteinen oder ihre Mutation zu Formveränderungen des Zellkerns führen könnten, sondern auch die gerichtete Polarisierung bestimmter LINC-Komplexe, wie in der differenzierenden Spermatische, könnte dies als zelluläre Anpassung gesehen werden, die die Elongation des Spermienkopfes erleichtern soll. Um jedoch den Spermaticenkopf tatsächlich zu deformieren und in die Länge zu ziehen, müssen motorische Kräfte und zelluläre Züge wirken, die nur von speziellen Zytoskelettelementen erbracht werden können. Wie diese mit den spermaticenspezifischen LINC-Komplexen in Verbindung stehen könnten, soll im Folgenden erläutert werden.

#### 4.2.1 Der Sun3/Nesprin1 LINC-Komplex am posterioren Spermaticenpol

Die gegensätzliche Lokalisation des posterioren Sun3/Nesprin1 und des anterioren Sun1( $\eta$ )/Nesprin3 LINC-Komplexes spiegelt die klare Polarität elongierender Spermaticiden wider, sie erinnert aber auch stark an die Präsenz gegenüberliegender, spermaticenspezifischer Zytoskelettstrukturen, die, wie bereits mehrfach erwähnt, eine Rolle bei der Umgestaltung des Spermienkopfes zu spielen scheinen (siehe 2.2.1.2). Da zudem durch immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen bereits ein direkter Zusammenhang zwischen Sun3/Nesprin1 und der posterioren Mikrotubuli-Manschette hergestellt werden konnte, liegt eine Beteiligung dieses LINC-Komplexes an der Spermaticenumformung abermals auf der Hand. Interessanterweise entdeckten Russell und Kollegen bereits 1991 in elektronenmikroskopischen Studien, dass stäbchenförmige Strukturen augenscheinlich eine Verbindung zwischen den innersten Mikrotubuli der Manschette und der Oberfläche der Spermaticidenkernhülle, und sogar durch den PNS Kontakt zu ihrer Innenseite, herstellen (Russell et al., 1991). Die darauf basierende Annahme, dass diese stäbchenartigen Verbindungen von der Manschette generierte Kräfte auf den Kern übertragen und diesen so elongieren könnten (Russell et al., 1991; Dadoune, 2003; Toshimori und Ito, 2003), bringt wiederum die aus Sun3 und Nesprin1 aufgebauten LINC-Komplexe ins Spiel: Ein LINC-Komplex aus Sun3 in der INM und einem weit ins Zytoplasma reichenden Nesprin1 wäre nämlich nicht nur charakteristisch für die beschriebene Stäbchen-Struktur, er würde sogar der Kernhülle und Manschette verlinkenden Rolle funktionell gerecht werden (Abbildung 37). In anbetracht dieser Modellvorstellung bliebe schlussendlich zu klären, wie Nesprin1, das eher mit dem Aktin-Zytoskelett in Beziehung gebracht wird (Apel et al., 2000; Zhang et al., 2001) mit der Mikrotubuli-Manschette interagieren könnte. Nachdem kürzlich gezeigt werden konnte, dass Nesprin1 sowohl eine Bindungsaffinität zur Kinesin II Untereinheit KIF3B (Fan und Beck, 2004) als auch zum Dynein/Dynaktin-Komplex (Zhang et al., 2009) hat, wäre einerseits eine Interaktion über diese tubulinbindenden Proteine denkbar. Andererseits wurde F-Aktin in gewissem Maße auch in der Maschette nachgewiesen (Kierszenbaum und Tres, 2004), was ebenfalls eine Integration des Sun3/Nesprin1 LINC-Komplexes in die Manschetten-Struktur ermöglichen würde.

#### 4.2.2 Der Sun1 $\eta$ /Nesprin3 LINC-Komplex am anterioren Spermaticenpol

Auch der anteriore LINC-Komplex aus Sun1 und Nesprin3 kann als potentielles Bindeglied zu spermaticenspezifischen Zytoskelettstrukturen angesehen werden. Da dieser LINC-Komplex jedoch keine offensichtliche zytoskelettassoziierte Lokalisation zeigt, wie der posteriore Sun3/Nesprin1 LINC-Komplex, sondern im Verlauf der Spermaticogenese eine erstaunliche Reorganisation durchmacht, gestaltet sich die

Überlegung, wie Sun1/Nesprin3 eine Verbindung zu anterioren Zytoskelettstrukturen herstellen könnte, schwieriger. In frühen Spermiogenesestadien erscheinen beide, Sun1 und Nesprin3, am posterioren Spermatidenpol, verschwinden dort aber mit fortschreitender Differenzierung und lokalisieren in elongierten Spermatiden nur noch auf der anterioren Seite. Von besonderer Bedeutung ist allerdings nicht nur die beobachtete duale Lokalisation einhergehend mit der einmaligen Reorganisation dieser Kernhüllenkomponenten sondern vielmehr die Lokalisation am anterioren Pol an sich. Sun1/Nesprin3 erscheinen dort nämlich nicht in der Kernhülle sondern hauptsächlich in den Membranen des Akrosoms. Da die nicht-nukleäre Lokalisation insbesondere für ein INM-Protein wie Sun1 äußerst ungewöhnlich und überraschend ist, ist zunächst zu hinterfragen, wie diese Lokalisation zustande kommen könnte, bevor über eine Bindung an Elemente des Zytoskeletts spekuliert werden kann.

Die im Rahmen dieser Arbeit neu entdeckte Sun1 Isoform Sun1 $\eta$  scheint bei der Beantwortung dieser Frage von erheblicher Bedeutung zu sein. Das Erscheinen dieser hodenspezifischen Isoform korreliert nämlich **(1)** zeitlich mit den morphologischen Umformungsprozessen differenzierender Spermatiden und **(2)** fehlen dieser Spleißform mit den Exons 7 bis 10 hydrophobe Proteinbereiche, die wahrscheinlich zur Kernhüllenretention benötigt werden (Liu et al., 2007). Für das Verhalten von Sun1 in der Spermiogenese könnte das bedeuten, dass frühe Spermatiden zunächst das von früheren Arbeiten bekannte (Gesamt-) Sun1 Protein exprimieren, welches sich aufgrund potentieller Retentionssignale oder auch möglicher Bindungspartner zum posterioren Pol bewegt, dort aber später, wie andere Kernhüllenproteine auch, verschwindet (2.2.1.2, 4.2). Sun1 $\eta$ , das diese Retentions- oder Bindungssignale aufgrund der fehlenden Exons 7 bis 10 nicht hat (Liu et al., 2007) bzw. mit anderen bislang unbekanntem Faktoren interagiert, würde dementsprechend von vorne herein am anterioren Pol (außerhalb der Kernhülle) polarisieren. Da Nesprin3 von Sun1 $\eta$  genauso gebunden werden sollte wie von wildtypischem Sun1 (die C-terminalen Bereiche beider Proteine zur Interaktion mit KASH-Proteinen sind gleich), könnte dieses von Sun1 $\eta$  mit an den anterioren Spermatidenpol rekrutiert werden und so gemeinsam mit Sun1 $\eta$  den ersten nicht-nukleären „LINC-Komplex“ aufbauen.

Die Vorstellung des nicht-nukleären LINC-Komplexes erscheint auch hinsichtlich einer Zytoskelett verlinkenden Funktion in anterioren Bereichen des Spermienkopfes sehr interessant, da die ektoplasmatischen Regionen, die anterioren Zytoskelettstrukturen, die neben dem Akroplaxom an der Streckung des Spermatidenkopfes beteiligt zu sein scheinen, zwischen Akrosom und Plasmamembran liegen (Abbildung 37). Die ektoplasmatischen Regionen stellen spezialisierte membranöse Verbindungen zwischen den Plasmamembranen von Sertolizellen und differenzierenden Spermatiden dar, in denen bemerkenswerterweise Plektin nachgewiesen wurde (Guttman et al., 1999; Johnson et al., 2004). Plektin selbst ist ein zytoskelettales Crosslinker Protein mit zytoskelettorganisierenden und stabilisierenden Eigenschaften (Foisner et al., 1988; André et al., 1997; Wiche, 1998); und direkter Interaktionspartner von Nesprin3, über welchen es den somatischen Zellkern in das Intermediärfilament Netzwerk integriert (Wilhelmsen et al., 2005; Ketema et al., 2007). Da Plektin auch mit F-Aktin interagieren kann (Seifert et al., 1992), welches im Gegensatz zu Intermediärfilamenten im Akroplaxom und den Verbindungsstellen von Sertolizellen und Spermatiden angereichert ist (Kierszenbaum und Tres, 2004; Gliki et al., 2004; Fujita et al., 2007), könnte der Sun1 $\eta$ /Nesprin3

LINC-Komplex indirekt an anteriore Zytoskelettelemente binden. Über derartige Bindungen könnte dieser LINC-Komplex in anteriore Bereiche des Spermatidenkopfes transloziert und sich über das eng verknüpfte Membransystem aus Kern- und akrosomalen Membranen zu Verbindungsstellen von Spermatiden und Sertolizellen bewegen. Durch die gezielte Verankerung des Kerns/Akrosoms in anterioren Zytoskelettstrukturen über einen LINC-Komplex aus Sun1( $\eta$ ) und Nesprin3 könnte schließlich die Elongation des Zellkerns und des gesamten Spermienkopfes vorangetrieben werden (Abbildung 37).

Die Entdeckung, dass durch die Expression zweier neuer, spermiogenesespezifischer SUN-Domänen Proteine (Sun3 und Sun1 $\eta$ ) offensichtlich zwei neue, einzigartige LINC-Komplexe entstehen, die sogar auf den entgegengesetzten Seiten sich entwickelnder Spermatiden polarisieren, trägt maßgeblich zu einem besseren Verständnis bei, wie der Spermatidenkopf morphologisch umgestaltet werden könnte. Bedenkt man nämlich, dass diese LINC-Komplexe den Zellkern an spezifische Zytoskelettstrukturen knüpfen könnten, könnte man sich sehr gut vorstellen, wie Spermatidenkern und -kopf durch entgegenwirkenden Kräfte dieser zytoskeletalen Elemente verformt und elongiert werden.

### 4.3 Das *Sun1* Gen der Maus kodiert für sieben verschiedene Isoformen mit gewebespezifischer Expression

Die außergewöhnliche nicht-nukleäre Lokalisation von Sun1 während der Differenzierungsphase postmeiotischer Zellen war Anlass, das Expressionsprofil von Sun1 detailliert zu studieren. Mit Sun1 $\eta$  wurde bei dieser Untersuchung eine neue, spermiogenesespezifische Isoform gefunden, die aufgrund fehlender Proteinbereiche als maßgeblich für diese neuartige Verteilung angesehen wurde (siehe 4.2.2). Es zeigt sich aber auch, dass das murine *Sun1* Gen nicht nur für das wildtypische Sun1 und Sun1 $\eta$  kodiert, sondern für insgesamt sieben verschiedene Transkripte mit zuweilen gewebespezifischer Expression. Dies äußerte sich einerseits in der unterschiedlichen Präsenz und andererseits in der ungleichen Expressionsstärke der einzelnen Isoformen in den verschiedenen Geweben (Abbildung 32). Die Tatsache allerdings, dass zwischen den sieben Sun1 Isoformen überhaupt derart gewebespezifische Unterschiede ausgemacht werden können, spricht dafür, dass diese vermutlich spezielle, zelltypabhängige Funktionen übernehmen - wie sie beispielsweise für Sun1 $\eta$  bereits angenommen werden (siehe 4.2).

Die besondere Bedeutung von Sun1 $\eta$  liegt jedoch nicht nur in seiner ausschließlich testisspezifischen Expression, sondern vor allem auch in seiner mutmaßlichen Proteinstruktur. Die Sequenzierung zeigte nämlich, dass diesem Sun1 Transkript mit den Exons 7 bis 10 Sequenzbereiche fehlen, die aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaft als wichtig für die Membranassoziation und Kernhüllenretention gelten (Liu et al., 2007). Interessanterweise zeigten alle Isoformen Sequenzvariationen nur im N-terminalen Bereich, wobei in jedem Fall der DNA-Abschnitt zwischen Exon 7 und 10 betroffen war (Abbildung 32). In der N-terminalen Domäne vor Exon 6 und dem gesamten C-Terminus wurden dagegen keinerlei Sequenzunterschiede festgestellt, was letztlich

bedeutet, dass das *Sun1* Gen der Maus für sieben Isoformen mit unterschiedlichem nukleoplasmatischen Bereich kodiert. Aus diesen Feststellungen ergeben sich zwei mögliche Schlussfolgerungen: **(1)** der lumenale C-Terminus von Sun1, der sowohl Coiled-coil- als auch SUN-Domäne beinhaltet (siehe 2.1.1.3), zeigt keine Variationen, da er zur Dimerisierung und zur Interaktion mit der KASH-Domäne der Nesprine benötigt wird. **(2)** Obwohl die nukleären Funktionen von Sun1 insgesamt bei weitem noch nicht vollständig bekannt sind, kann man annehmen, dass der nukleoplasmatische N-terminus mit zahlreichen nukleären Faktoren in Verbindung steht und auch an etlichen zum Teil zelltypspezifischen Prozessen (z. B. Anheftung meiotischer Telomere, Ding et al., 2007; Schmitt et al., 2007) beteiligt ist. Eine zelluläre Ausstattung mit mehreren und/oder unterschiedlichen Spleißvarianten könnte daher bei der Bewältigung verschiedenster Aufgaben durchaus hilfreich sein. Dafür spräche auch, dass die C-terminale, im PNS gelegene Proteinregion in der gesamten SUN-Proteinfamilie der Bereich mit der stärksten Sequenzverwandtschaft ist. Der N-Terminus dagegen variiert stark von SUN-Protein zu SUN-Protein; Abhängig von Organismus, Zelltyp und SUN-Protein hat dieser also vermutlich stets unterschiedliche nukleäre Aufgaben zu erfüllen.

Die Expression mehrerer unterschiedlicher Sun1 Isoformen ist auch für den Aufbau des gesamten LINC-Komplexes von Bedeutung. Da Nesprine ebenfalls in zahlreichen Spleißvarianten mit zuweilen noch unbekannt Funktionen und Interaktionspartnern vorkommen, ergäbe sich allein durch die dazukommende Anzahl an Sun1 Isoformen eine enorme Sammlung potentiell unterschiedlich zusammengesetzter LINC-Komplexe. Aufgrund der gewespezifischen Unterschiede der einzelnen Untereinheiten könnten abhängig vom jeweiligen Zelltyp LINC-Komplexe aufgebaut werden, die zwar grundsätzlich die selbe Funktion haben, aber aufgrund geringer Variationen zusätzliche Bindungen eingehen und/oder Prozesse steuern könnten. Die Aufklärung dieser Fragen bedarf jedoch weiterer intensiver Forschungsarbeit.

## 4.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit neu gewonnenen Erkenntnisse tragen maßgeblich dazu bei, die Rolle der Kernhülle in der Gametogenese besser zu verstehen. Doch obwohl mit Lamin C2 ein weiterer Bestandteil der Kernhülle als essentiell für die Spermatogenese der Maus definiert und mit Sun1 und Sun3 sowie den Nesprinen 1 und 3 Komponenten für neue spermiogenesespezifische LINC-Komplexe gefunden und so der Einfluss der Kernhülle auf die Spermatidenreorganisation gestärkt werden konnten, bleiben zahlreiche Fragen offen.

Dass die meiotische Kernhülle eine wichtige Struktur für das erfolgreiche Durchlaufen der Meiose ist, steht nun - nicht zuletzt als Folge dieser Arbeit - außer Frage und zeigt sich allein in der stabilen Verankerung der meiotischen Telomere und deren gerichteter Bewegung entlang der Kernhüllenperipherie. Doch welche Mechanismen setzen die Rekrutierung der Telomere an die Kernhülle in Gang und über welche Faktoren werden die Chromosomenenden schließlich in der Kernhülle verankert? In Säugern stellen die INM-Proteine Sun1 und Sun2 die zentralen Andockstellen für die meiotischen Telomere dar. Es ist jedoch nicht bekannt was Telomer und SUN-Protein verbindet. Eine datenbankgestützte Suche nach homologen Proteinen, die in niederen Eukaryoten bereits bei der SUN-Telomer-Anheftung nachgewiesen wurden, blieb bisher erfolglos. Allerdings könnten proteinbiochemische Verfahren wie beispielsweise Immunpräzipitations- oder Pull-down-Experimente eventuell zur Identifizierung möglicher Crosslinkerproteine beitragen. Ob die infragekommenden Kandidaten dann tatsächlich eine Aufgabe bei der Anheftung der Telomere hätten, könnte schließlich nur durch funktionelle Analysen (z. B. Knock-out-Mäuse) geklärt werden. Nicht minder wichtig als die Frage wie genau die Telomere mit der Kernhülle assoziieren, ist, wie und durch welche Kräfte sie bewegt werden. Die Beantwortung dieser Frage hängt in großem Maße von der Identifizierung der Sun1/2 bindenden LINC-Komplex-Komponenten der ONM und dem damit assoziierten Zytoskelett ab. Da bislang keines der vier in Säugern exprimierten Nesprine als meiotische LINC-Komponente in Frage kommt, sollten mögliche Nesprin-Isoformen oder gar neue Nesprine in Betracht gezogen werden. Die Bewegung der Telomere steht allerdings auch in direktem Zusammenhang mit Lamin C2, dem meiosespezifischen A-Typ Lamin, das im Rahmen dieser Arbeit als essentiell für die männliche Meiose charakterisiert wurde. Lamin C2-defiziente Spermatocyten haben nämlich massive Probleme bei der Bildung synaptonemaler Komplexe zwischen den homologen Chromosomen und gehen folglich in Apoptose. Da die Telomere in diesen Zellen allerdings normal mit der Kernhülle assoziieren, könnte es sein, dass der Verlust von Lamin C2 eine verzögerte Bewegung der Telomere ins Bouquet und/oder aus diesem heraus nach sich zieht. Diese Problematik könnte hervorragend mithilfe in Kultur gehaltener Spermatocyten in Echtzeit analysiert werden. Da ein derartiges Zellkultursystem allerdings bislang noch nicht zur Verfügung steht, muss der Einfluss von Lamin C2 auf die Bouquet-Formierung in fixierten Spermatocyten, die sich in unterschiedlichen Bouquet-Zuständen befinden, bestimmt werden.

Verglichen mit der meiotischen Kernhülle steht die Erforschung der Rolle der postmeiotischen Kernhülle in Säugerzellen gerade erst am Anfang. Die Erkenntnis allerdings, dass Kernhüllenproteine in der Spermatidenkernhülle generell polarisieren und daher vermutlich an der Streckung des Spermienkopfes beteiligt

sind, machte die Kernhülle zu einer interessanten Struktur hinsichtlich der Spermatidenverformung. Von damit verbundener entscheidender Bedeutung ist das in dieser Arbeit aufgestellte Modell der LINC-Komplex vermittelten Umorganisation des Spermienkopfes. Ob die morphologische Differenzierung des Spermatidenkopfes jedoch tatsächlich von diesen neu identifizierten LINC-Komplexen abhängt, muss in weiteren experimentellen Ansätzen überprüft werden. Der gezielte Knock-out der spermiogenesespezifischen SUN-Proteine Sun3 und Sun1 $\eta$  könnte beispielsweise helfen, die Funktion dieser Proteine in der Spermiogenese zu verstehen. Da Sun1 allerdings ubiquitär und somit auch in der Meiose exprimiert wird, müsste mithilfe einer konditionellen Strategie einzig für den Sun1-Verlust in postmeiotischen Spermatogenesestadien gesorgt werden. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass die funktionelle Analyse der in dieser Arbeit identifizierten somatischen Sun1 Isoformen ebenfalls über spezifische Knock-out/down Systeme geschehen müsste, was jedoch in einem noch nicht etablierten somatischen Zellkultursystem erfolgen könnte.

Neben den bislang in Säugern identifizierten SUN-Proteinen Sun1, Sun2 und Sun3 wird in der Literatur mehrfach auf Sun4 (Spag4) und Sun5 (Spag4L) verwiesen. Sun4 und Sun5 sind potentielle SUN-Domänen Proteine mit einer vermutlich zelltypspezifischen Expression (Hasan et al., 2006; Tzur et al., 2006; Liu et al., 2007). Obwohl das *D. melanogaster* Homolog zu Spag4 und das *M. musculus* Protein Spag4L bereits mit der Spermiogenese in Verbindung gebracht wurden (Kracklauer et al., 2010; Frohnert et al., 2010), sollte deren tatsächliches Expressionsmuster, ihre zelluläre Verteilung sowie möglichen Funktionen detailliert untersucht werden. Sollten sich diese nämlich in differenzierenden Spermatiden ähnlich wie Sun1( $\eta$ ) und/oder Sun3 verhalten und darüber hinaus am Aufbau weiterer funktioneller LINC-Komplexe teilnehmen, wäre die Bedeutung der LINC-Komplexe, der SUN-Proteine und schließlich der Kernhülle für differenzierende Keimzellen einmal mehr untermauert.

## 5 Tiere und Organismen

### 5.1 Mäuse

Wildtypische Mäuse der Stämme CD-1 und C57BL/6 sowie genetisch veränderte Mäuse der Linien ESAA1.76/6 und ESAA1/26 (Lamin C2 Knock-out-Mauslinien; Schmitt, 2008) entstammten der Zucht des Biozentrums der Universität Würzburg.

### 5.2 Bakterienstämme

*E. coli* **XL1blue** (Stratagen): Bakterienstamm zur Vermehrung und Klonierung von Plasmiden.

*E. coli* **One Shot® TOP10 Chemically Competent** (Invitrogen): Bakterienstamm zur Klonierung und Vermehrung der pCR®2.1-TOPO® Vektoren.

*E. coli* **Rosetta™** (Novagen): Bakterienstamm zur bakteriellen Expression rekombinanter Proteine. Rosetta™ Bakterienstämme enthalten ein Zusatzplasmid, welches für bestimmte, in Bakterien selten vorkommende tRNAs kodiert. Auf diese Weise wird die Expression des Fusionsproteins erhöht. Das Zusatzplasmid beinhaltet eine Chloramphenicol-Resistenz und ist mit pET Vektoren kompatibel.

*E. coli* **RosettaBlue™** (Novagen): Bakterienstamm zur bakteriellen Expression rekombinanter Proteine. Der RosettaBlue™ Bakterienstamm entspricht grundsätzlich dem beschriebenen Rosetta™ Bakterienstamm. Im Gegensatz zu diesem werden RosettaBlue™ Bakterien allerdings zusammen mit pQE Vektoren verwendet und über Chloramphenicol und Tetracyclin selektiert.

## 6 Materialien

### 6.1 Biologische Materialien

#### 6.1.1 Zelllinien

HeLa: Permanente humane Zelllinie aus Epithelzellen eines Cervixkarzinoms.

#### 6.1.2 Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabellen 8 und 9 zusammengefasst. Antikörper aus eigener Herstellung wurden vor Gebrauch affinitätsgereinigt und auf ihre Spezifität hin getestet (siehe 7.6.10). Soweit nicht anders angegeben wurden Antikörper für die Immunfluoreszenzmikroskopie in PBS und Antikörper für die Detektion im Western Blot in 5-10% Magermilchpulver in TBST verdünnt.

**Tabelle 8. Primärantikörper.** M, Maus; Gp, Guinea pig; Rb, Rabbit; mAb, monoclonal Antibody; pAb, polyclonal Antibody ; e.H., eigene Herstellung; IF, Immunfluoreszenz; WB, Western Blot; Co-IP, Co-Immünpräzipitation, (+) gut geeignet.

Antikörper	Antigen	Herkunft (Tier)	Hersteller (Katalognr.)	Verdünnung			Bemerkung
				IF		WB	
				Normal	Paraffin		
RGS-HIS	Arg-Gly-Ser-6x(HIS)	M mAb	Qiagen (34610)	-	-	1:5000	pQE Vektoren
Penta-HIS	4-6x(HIS)	M mAb	Qiagen (34660)	-	-	1:2000	pET&pQE Vektoren
GFP (B-2)	AS 1-238 von <i>A. victoria</i> GFP	M mAb	Santa cruz (sc-9996)	-	-	1:2000	Co-IP
$\alpha$ -myc	c-myc (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu)	M mAb	Invitrogen (R950-25)	1:200	-	1:2000	Co-IP: 1,5 $\mu$ g
IgG	IgG (unspez. AK)	M mAb	Jackson IR, über Dianova (015-000-003)	-	-	-	Kontrolle in Co-IP: 1,5 $\mu$ g
Anti-Dig-fluorescein, Fab fragment	Digoxigenin	Sheep pAb	Roche (11207741910)	-	1:5	-	Fab Fragments, TUNEL-Assay
$\alpha$ -Sun1	AS 427-722 von <i>M. musculus</i> Sun1	Gp pAb	e.H. / Seqlab	1:600	1:300	1:2000	Göb, 2007; Adelfalk et al., 2009
$\alpha$ -Sun3	AS 31-148 von <i>M. musculus</i> Sun3	Gp pAb	e.H. / Seqlab	1:800	1:300	1:7500	Göb, 2007
$\alpha$ -Lamin C2	C-term von <i>M. musculus</i> Lamin A/C/C2	Rb pAb	e.H. / Seqlab	1:200	1:100	1:2000	
Lamin A/C (H-110)	AS 231-340 von <i>H. sapiens</i> Lamin A/C/C2	Rb pAb	Santa cruz (sc-20681)	1:200	1:50	1:2000	
TRF12-S	19 AS aus N-term von <i>M. musculus</i> TRF1	Rb pAb	Alpha Diagnostic (TRF12-S)	1:150	-	-	Antiserum
TRF12-A	19 AS aus N-term von <i>M. musculus</i> TRF1	Rb pAb	Alpha Diagnostic (TRF12-A)	1:100	-	-	IgG (affinitäts-gereinigt)
13D4	<i>M. musculus</i> LAP2 ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )	M mAb	e.H. (Hybridomzelllinie)	1:10	pur	pur	Alzheimer et al., 1998
$\alpha$ -Lamin B3	AS 1-84 von <i>M. musculus</i> Lamin B3	Rb pAb	e.H. / Seqlab	1:200	1:100		Schütz et al., 2005
$\alpha$ -Cage1	15 AS aus C-term von <i>M. musculus</i> Cage1	Rb pAb	e.H. / Seqlab	1:200	1:100	1:1000	Alzheimer et al., 2005

<b>α -Nesprin 3</b>	7. SR von <i>M. musculus</i> Nesprin3 α/β	Rb pAb	A. Sonnenberg	1.300	1:150	-	Wilhelmsen et al., 2005
<b>α -Nesprin 4</b>	AS 1-90 von <i>M. musculus</i> Nesprin4	Rb pAb	B. Burke	1:50	1:20	-	Roux et al., 2009
<b>α -SYNE1</b>	C-term von <i>H. sapiens</i> Nesprin1	Rb pAb	Atlas Antibodies (HPA019113)	1:100	1:20	-	
<b>α -SYNE2</b>	C-term von <i>H. sapiens</i> Nesprin2	Rb pAb	Atlas Antibodies (HPA003435)	1:50	1:10		
<b>α -Tubulin</b>	C-term von <i>S. purpuratus</i> α-Tubulin	M mAb	Sigma-Aldrich (T5168)	1:2000	1:200	-	Ascites (Klon B5-1-2)
<b>β-Tubulin</b>	<i>R. norvegicus</i> β-Tubulin (β1-β5)	M mAb	Sigma-Aldrich (T4026)	1:200	1:100	-	Ascites (Klon TUB 2.1)
<b>α -SYCP1 C-term (Rb)</b>	AS 922-997 von <i>R. norvegicus</i> <i>Sypc1</i>	Rb pAb	e.H. / Seqlab	1:150	1:50 (+)	1:2000	Öllinger et al., 2005
<b>α -SYCP3 N-term (# 13)</b>	AS 27-38 von <i>R. norvegicus</i> <i>Sypc3</i>	Gp pAb	e.H. / Seqlab	1:150	-	1:5000	Alsheimer und Benavente, 1996
<b>α -SYCP3 (NB300-232)</b>	C-term von <i>H. sapiens</i> SYCP3	Rb pAb	Novus Biologicals (NB300-232)	1:200	1:100 (+)	1:2000	

**Tabelle 9. Sekundärantikörper.** M, Maus; Gp, Guinea pig; Rb, Rabbit; IF, Immunfluoreszenz; WB, Western Blot; HRP, Horseradish Peroxidase.

Antikörper	Antigen	Herkunft (Tier)	Hersteller	Verdünnung			Bemerkung
				IF		WB	
				Normal	Paraffin		
<b>α -M Cy2</b>	IgG Maus	Ziege	Dianova	1:50	1:50	-	
<b>α -Gp Cy2</b>	IgG Meerschweinchen	Ziege	Dianova	1:50	1:50	-	
<b>α -Rb Cy2</b>	IgG Kaninchen	Ziege	Dianova	1:50	1:50	-	
<b>α -M Texas Red</b>	IgG Maus	Ziege	Dianova	1:50	1:50	-	
<b>α -Gp Texas Red</b>	IgG Meerschweinchen	Ziege	Dianova	1:50	1:50	-	
<b>α -Rb Texas Red</b>	IgG Kaninchen	Ziege	Dianova	1:50	1:50	-	
<b>α -M HRP</b>	IgG Maus	Ziege	Dianova	-	-	1:10000	
<b>α -Gp HRP</b>	IgG Meerschweinchen	Ziege	Dianova	-	-	1:10000	
<b>α -Rb HRP</b>	IgG Kaninchen	Ziege	Dianova	-	-	1:10000	

## 6.2 Molekularbiologische Materialien

### 6.2.1 Plasmidvektoren

#### *pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>*

Der Vektor *pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>* ist Bestandteil des TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kits der Firma Invitrogen und wurde in erster Linie zur direkten Klonierung von PCR-Produkten verwendet. Zur Selektion positiver Klone trägt dieser Vektor eine Kanamycin- und eine Ampicillin-Resistenz sowie das  $\beta$ -Galactosidase Gen. Da dieses bei Insertion eines DNA-Fragments unterbrochen wird, ist eine Blau/Weiß-Selektionierung mit X-Gal möglich. Zusätzlich enthält er die Promotorsequenz für die T7-RNA-Polymerase, welche die Herstellung von RNA-Sonden ermöglicht.

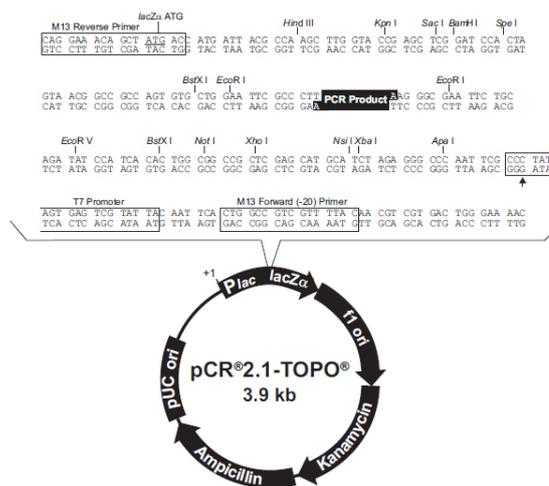


Abbildung 38. Karte des *pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>* Vektors.

#### *pJET1.2/blunt*

Der Vektor *pJET1.2/blunt* ist Bestandteil des CloneJet<sup>™</sup> PCR Cloning Kits der Firma Fermentas und wurde zur direkten Klonierung von PCR-Produkten verwendet. Zur Selektion positiver Klone trägt dieser Vektor eine Ampicillin-Resistenz sowie das Gen für ein Restriktionsenzym, welches für alle gängigen *E. coli* Bakterienstämme lethal ist. Die Ligation eines DNA-Fragments in die multiple cloning site (MCS) führt zur Unterbrechung dieses Gens, was ein Überleben aller Klone mit inseriertem PCR-Produkt zur Folge hat.

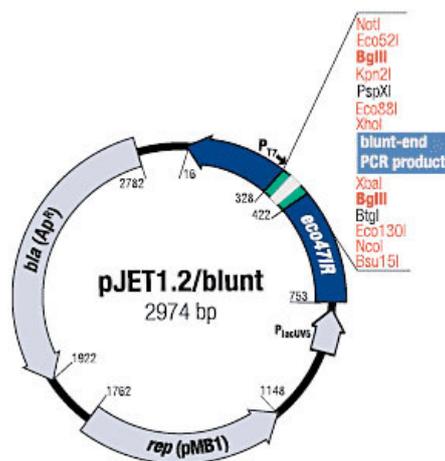


Abbildung 39. Karte des *pJET1.2/blunt* Vektors.

**pET-21a(+)**

Der Expressionsvektor pET21a(+) der Firma Novagen dient der Herstellung bakterieller rekombinanter Fusionsproteine mit C-terminalem (His)<sub>6</sub>-tag. Zur Selektion positiver Klone trägt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz.

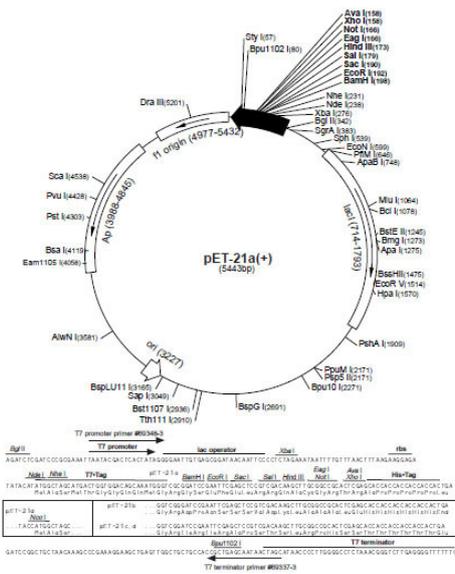


Abbildung 40. Karte des pET21a(+) Vektors.

**pEGFP-N1/2/3 und pEGFP-C1/2/3**

Die Expressionsvektoren pEGFP-N1/2/3 und pEGFP-C1/2/3 der Firma Clontech dienen der Herstellung rekombinanter Proteine mit N- bzw. C-terminaler EGFP- (enhanced green fluorescent protein) Fusion in eukaryotischen Zellen. Die Proteinexpression wird über den humanen CMV (Cytomegalo)-Promotor gesteuert, der in N-Vektoren vor der MCS und in C-Vektoren vor der EGFP-Sequenz liegt. Zur Selektion positiver Klone tragen die Vektoren Kanamycin-Resistenzen.

**pQE-30/31/32**

Die Expressionsvektoren pQE-30/31/32 der Firma Qiagen dienen der Herstellung bakterieller rekombinanter Fusionsproteine mit N-terminalem RGS-(His)<sub>6</sub>-tag. Zur Selektion positiver Klone tragen die Vektoren Ampicillin-Resistenzen.

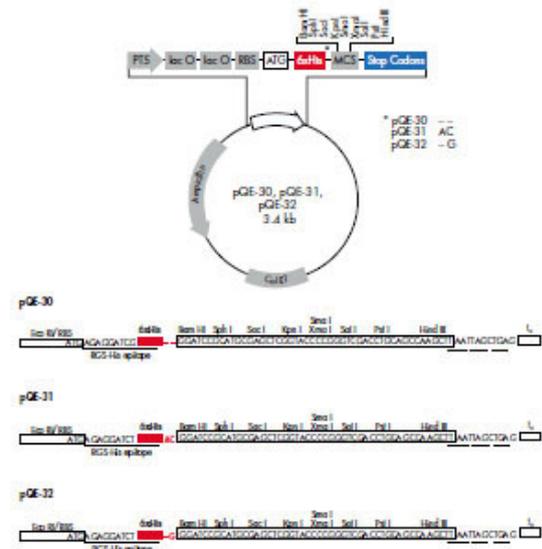


Abbildung 41. Karte der pQE30/31/32 Vektoren.

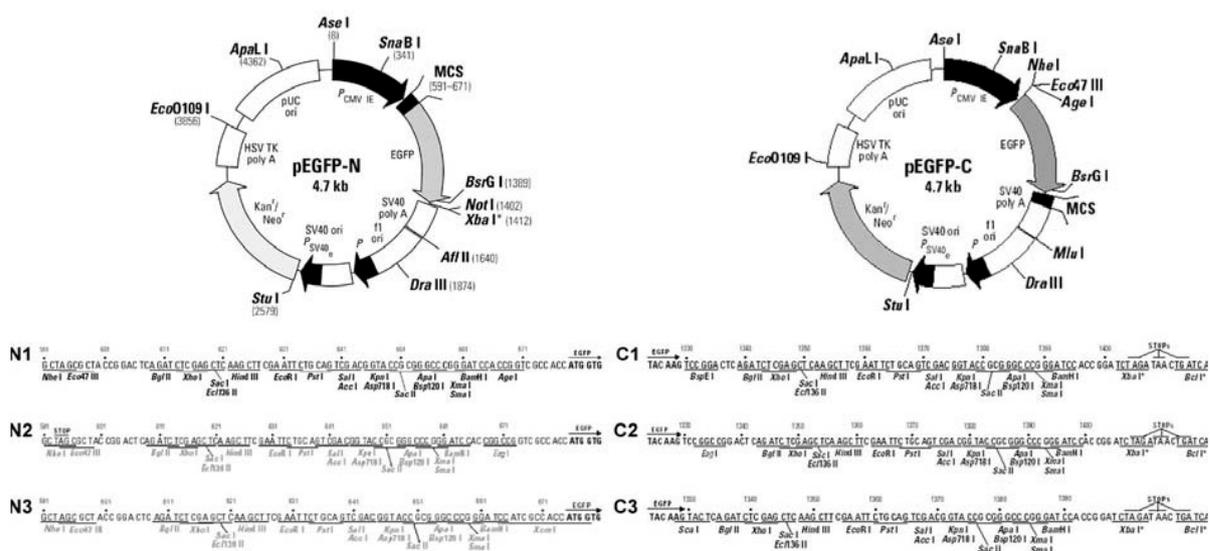


Abbildung 42. Karte der pEGFP-N und -C Vektoren.

**pCMV-Myc**

Der Expressionsvektor pCMV-Myc der Firma Clontech dient der Herstellung rekombinanter Proteine mit N-terminalem Myc-tag in eukaryotischen Zellen, wobei die Expression des Fusionsproteins über den humanen CMV-Promotor gesteuert wird. c-Myc ist ein sehr kleines (13 Aminosäuren) und zudem stark immunreaktives Epitop. Aufgrund dieser Eigenschaften wurden Fusionsproteine mit Myc-tag im Rahmen dieser Arbeit in der Co-Immunpräzipitation eingesetzt. Zur Selektion positiver Klone trägt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz.

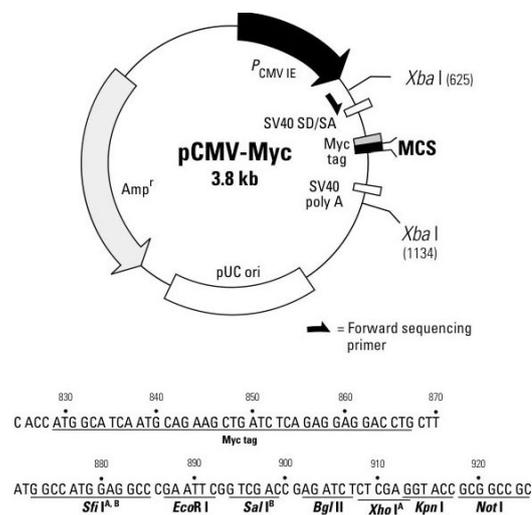


Abbildung 43. Karte des pCMV-Myc Vektors.

**6.2.2 Oligonukleotide**

Alle Oligonukleotide, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabellen 10 und 11 aufgelistet. Soweit nicht anders angegeben wurden alle Oligonukleotide bei den Firmen Thermo Scientific und Biomers bestellt. Wurden DNA-Fragmente bei der Firma GATC sequenziert, wurden dort entsprechende Sequenzierprimer zur Verfügung gestellt.

Tabelle 10. Oligonukleotide für Sequenzierungen, Kolonie-PCR und reverse Transkriptionen. Pol, Polymerase; Phu, Phusion-DNA-Polymerase; Taq, Taq-DNA-Polymerase.

Primername	Sequenz	Annealing (Pol)	Bemerkung
M13 forward (-20) (Invitrogen)	5'-GTAAACGACGGCCAG-3'	48°C (Taq)	3'Vektorprimer TOPO

M13 reverse (Invitrogen)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	48°C (Taq)	5'Vektorprimer TOPO
pEGFP-C Seq_5'	5'-ACATGGTCCTGCTGGAGTTGGT-3'	58°C (Taq)	5' Sequenzierprimer
pEGFP-C Seq_3'	5'-CAGGGGGAGGTGTGGGGAGG-3'	58°C (Taq)	3' Sequenzierprimer
pCMV_Myc_HA_5'	5'-AGCTGCGGAATTGTACCC-3'	50°C (Taq)	5' Sequenzierprimer
pCMV_Myc_HA_3'	5'-TGGTTTGTCCAACTCATCAA-3'	50°C (Taq)	3' Sequenzierprimer
pCMV_Seq_Primer_5'	5'-GATCCGGTACTAGAGGAACTGAAAAAC-3'	56°C (Taq)	5' Sequenzierprimer
pJET5'	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'	50°C (Taq)	5' Sequenzierprimer
pJET3'	5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'	50°C (Taq)	3' Sequenzierprimer
pQE_5'	5'-GAGCGGATAACAATTTACAC-3'	50°C (Taq)	5' Sequenzierprimer
pQE_3'	5'-AATCCAGATGGAGTTCTGAGG-3'	50°C (Taq)	3' Sequenzierprimer
pET21a 5' seq	5'-CGATCCCGCAAATTAATACG-3'	56°C (Taq)	5' Sequenzierprimer
pET 3' seq	5'-GGCAGCAGCCAACTCAGCTTC-3'	56°C (Taq)	3' Sequenzierprimer
Oligo (dT) 18 Primer (Fermentas)	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'		cDNA Synthese

Tabelle 11. Oligonukleotide für die spezifische Amplifikation von cDNA-Fragmenten. Pol, Polymerase; Phu, Phusion-DNA-Polymerase; FL, full length (Gesamtlänge); AK, Antikörper; IP, Immunpräzipitation; L, Lamin.

Primername	Sequenz	Annealing (Pol)	Bemerkung
Sun1_5'ATG	5'-ATGGACTTTTCTCGGCTGCAC-3'	66°C (Phu)	Sun1 FL-Amplifikation
Sun1_3'_TAG	5'-CTACTGGATGGGCTGTCC-3'	66°C (Phu)	Sun1 FL-Amplifikation
Sun1_Übergang_Ex7_10_3'	5'-GCTGCCTTCCGTGGTTGAG-3'	66°C (Phu)	Sun1 $\eta$ spezifisch
Sun1_inExon6_5'	5'-CAGCAATGGATACACTTCCGTG-3'	60°C (Phu)	Sun1 Isoformen-Analyse
Sun1_inExon11_3'	5'-CCAGAAGTTCGCCGAGGCTG-3'	60°C (Phu)	Sun1 Isoformen-Analyse
Sun1_Start_Exon11_5'	5'-AAGGCAGCCTCGGAACCTTC-3'	664°C (Phu)	Sun1 Isoformen-Analyse
Sun1_vorTM_5'_Eco	5'-GAATTCATATTTGCAAGTTTTGTCTTG-3'	60°C (Phu)	myc-Sun1-Klonierung (IP)
Sun1_TAG_3'_Sal	5'-GTCGACCTACTGGATGGGCTGTCC-3'	60°C (Phu)	myc-Sun1-Klonierung (IP)
Sun3vAtg5'	5'-CCCTTTGGTCAACTAAGTGA-3'	55°C (Phu)	Sun3 Start-Codon-Analyse
Sun3_seq_i_5'	5'-GAACAATAGATGTTCTGAAGGCG-3'	54°C (Taq)	Sun3 FL-Amplifikation
Sun3tag_3'	5'-CTAAGTGAATCACTGGGGATGC-3'	55°C (Phu)	Sun3 FL-Amplifikation
Sun3_AB_5'Nde	5'-CATATGACAGAGTTTCTCAAAACCAGG-3'	55°C (Phu)	Sun3 AK-Klonierung, RT
Sun3_AB_3'Xho	5'-CTCGAGAGCCAACTGTATTTGGTCCCCT-3'	55°C (Phu)	Sun3 AK-Klonierung, RT
Sun3_ATG_5'Eco	5'-GAATCCAATGTTAACTCGATCATGGAAG-3'	60°C (Phu)	myc-Sun3-Klonierung (IP)
Sun3_TAG_3'Sal	5'-GTCGACCTAAGTGAATCACTGGGGATG-3'	60°C (Phu)	myc-Sun3-Klonierung (IP)
Nesp1_TM_KASH_5'	5'-TCCGATTCCTCCGTTCTGACC-3'	62°C (Phu)	GFP-Nesp1-Klonierung (IP)
Nesp1RT3'	5'-TCTCCTTACTGCCTGCACTTGTGTG-3'	62°C (Phu)	GFP-Nesp1-Klonierung (IP)
Nesp3_TM_KASH_5'	5'-CGGAGGCCAGAAGCGGTGGAG-3'	60°C (Phu)	GFP-Nesp3-Klonierung (IP)
Nesp3RT3'	5'-CAGAGGCAGCATTGGTCTAAGGCT-3'	60°C (Phu)	GFP-Nesp3-Klonierung (IP)
GAPDH_5'	5'-GGGCCCACTTGAAGGTTGGAGC-3'	58°C (Phu)	GAPDH RT-PCR 5' Primer
GAPDH_3'	5'-GTCAGATCCACGACGGACACATTGG-3'	58°C (Phu)	GAPDH RT-PCR 3' Primer
CAGE_exptest_5'	5'-GCGACTCTAAAGAGTTAATTGCTAGTG-3'	60°C (Phu)	Cage1 RT-PCR 5' Primer
CAGE_RT3'	5'-GGCACCATAAAGAATGTTCTATTTCTTGGATCC-3'	60°C (Phu)	Cage1 RT-PCR 3' Primer
SCP3_5'_ATG	5'-GGCTTCGTCAGATGCTTCGAG-3'	52°C (Phu)	Sycp3 RT-PCR 5' Primer
SCP3_TAA+3'	5'-GACTCATCAGAATAACATGGATTGAAG-3'	52°C (Phu)	Sycp3 RT-PCR 3' Primer

Sycp1_Cterm_maus_5'Bam	5'-GGATCCGCATCTTTACTGGAATCAC-3'	60°C (Phu)	Sycp1 RT-PCR 5' Primer
Sycp1_Cterm_3'Sma_TAA_maus	5'-CCCGGGTTAAGAAAATAACTTTTCTGC-3'	60°C (Phu)	Sycp1 RT-PCR 3' Primer
LC2f1KOP9	5'-CACCAGAGCCCTACCAGACTCTC-3'	60°C (Phu)	5' WT-Genotypisierung
LC2delKOP10	5'-AAAGCTTACACCAGCTCTGGATTC-3'	60°C (Phu)	3' WT-Genotypisierung
LC2intNEOKOP11	5'-GAAGTGTATGTGGAACAGAGGCTG-3'	60°C (Phu)	5' LC2 KO-Genotypisierung
LC2intNEOKOP12	5'-GCTTCCTCGTGCTTTACGGTATC-3'	60°C (Phu)	3' LC2 KO-Genotypisierung
LC2_maus5'/Nde	5'-CATATGGGGAACGCGGAGGGCC-3'	64 °C (Phu)	LC2 RT-PCR 5' Primer
LA/C_maus5'	5'-ATGGAGACCCCGTCACAGCGGC-3'	65 °C (Phu)	LA/C RT-PCR 5' Primer
r27k1	5'-TGG TCC TCA TGC TGG GCC CGC-3'	65°C (Phu)	LA/C/C2 RT-PCR 3' Primer

### 6.2.3 Enzyme

Mit Ausnahme der Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs), der Tag-DNA-Polymerase (Promega, eigene Herstellung) und der M-MLV Reversen Transkriptase (Promega) wurden alle Restriktions- sowie DNA-modifizierenden Enzyme von der Firma Fermentas bezogen.

### 6.2.4 Größenstandards

Lambda DNA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> , Marker 3	Fermentas
GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder	Fermentas
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas

## 6.3 Kits und Einzelkomponenten

ApoTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit	Chemicon
CloneJet™ PCR Cloning Kit	Fermentas
Dynabeads® Protein G	Invitrogen
Effectene™ Transfection Reagent	Qiagen
E.N.Z.A.® Plasmid Mini Prep Kit I	Peqlab Biotechnology
HiTrap™ NHS activated column	Amersham Bioscience
Nitrozellulose	Schleicher & Schuell
Nucleospin® Plasmid	Machery-Nagel
peqGOLD Trifast™	Peqlab Biotechnology
QIAexpress Ni-NTA Protein Purification System	Qiagen
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen
Vector® antigen unmasking solution	Vector Laboratories
Western Lightning® Plus-ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate	Perkin Elmer

Whatman Papier  
 Wizard® SV Gel and PCR Cleanup System

Schleicher & Schuell  
 Promega

## 6.4 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien stammten, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Applichem, Calbiochem, Merck, Roth, Serva und Sigma-Aldrich.

## 6.5 Geräte

Binokular M2FL III	Leica
Biophotometer	Eppendorf
Brutschrank CO <sub>2</sub> -Auto-Zero	Haereus-Holding
Digitalkamera AxioCam MRm	Zeiss
Digitalkamera Pixelfly	PCO
Digitalkamera uEye	IDS
DNA-Gelkammer	Werkstatt, Biozentrum
Drehtisch Reax 2	Heidolph, über Hartenstein
Feinwaage Mettler AC 100	Mettler
Flachbettscanner Epson Perfection V700 Photo	Epson
Fluoreszenzmikroskop Axiophot Stereo HB050 mit Quecksilberlampe	Zeiss
Gefriermikrotom 2800 Frigocut E	Reichert-Jung
Graphit-Blot-Kammer	LMS, über Hartenstein
Heizblock	Liebisch, über Hartenstein
Heizplatte	Medax Nagel GmbH
Heizofen	Memmert
Hybridisierungsöfen MINI 10	MWG Biotech
Kippschüttler WS5	Laborgerätebau E. Bühler
Konfokales Laser Scanning Mikroskop TCS-SP2 AOBS	Leica
Kühlzentrifuge Minifuge T	Heraeus
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments
Laborpumpe Typ Varioprex® II	LKB/Bromma
Laborwaage Mettler PJ 3600 DeltaRange®	Mettler
Magnetrührer M35	GLW
Magnetic Separator für 1,5-2 ml Reaktionsgefäße	Invitrogen
Netzgerät PEQLAB Power Supply EV261	Peqlab
pH-Meter pH 523	WTW, über Hartenstein
Pipetten	Eppendorf, Biotline

Proteingelkammer Mini 8V	Gibco BRL
Rollinkubator RM5	über Hartenstein
Schlittenmikrotom	Leitz
Sonifier B12	Branson Sonic Power
Stabilisiertes Netzgerät 250 V 1 A	Dipl. Ing. L. Fischer
Stereomikroskop MZ 16FA	Leica
Infinite® 200 PRO NanoQuant	Tecan
Thermocycler Cyclone® 25	Peqlab
Thermocycler Cyclone® Gradient	Peqlab
Thermocycler Mastercycler® personal	Eppendorf
Thermocycler Primus 25 advanced®	Peqlab
Tischautoklav	Certoclav
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf
Tischzentrifuge Mikro 200 (mit Kühlfunktion)	Hettich
Umkehrmikroskop Labovert	Leitz
UV-Tisch	Vilbert Lourmat
Vortex L24	GLW
Wasserbad WTH 500	über Hartenstein

## 6.6 Computerprogramme

Adobe® Photoshop CS2  
 Adobe® Reader  
 Avio Vision Release 4.7.1  
 Bioedit 7.0.9  
 ClustalW 2.0.12  
 EasyControl Version 2.15  
 Leica LCS Lite  
 Microsoft® Office Excel 2007  
 Microsoft® Office PowerPoint 2007  
 Microsoft® Office Word 2007  
 PSORTIIb. v2.0  
 R version 2.10.1 Copyright 2009  
 SMART

## 7 Methoden

### 7.1 Haltung und Zucht von Labormäusen

Labormäuse sind Abkömmlinge der Hausmaus (*Mus musculus*) und eignen sich aufgrund folgender Eigenschaften sehr gut als Modellorganismen:

- Säugetiere (Ergebnisse z.T. auf den Menschen übertragbar)
- Verfügbarkeit vieler biologischer Daten
- Sehr schnelle Regenerationszeit (ca. 10 Wochen)
- Geringer Platzbedarf
- Leichte Handhabung

Die Haltung und Zucht der in dieser Arbeit verwendeten wildtypischen (CD-1, C57BL/6) und genetisch veränderten Labormäuse (ESAA1.76/6, ESAA1/26, Lamin C2 Knock-out-Mauslinie) erfolgte im Tierstall des Biozentrums der Universität Würzburg bei ca. 23°C, einer relativen Luftfeuchte von ca. 65% und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12/12 h nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes. Die Mäuse wurden weitestgehend in Gruppen von 2-6 Tieren in Laborkäfigen des Typs II gehalten. Eine Einzelhaltung wurde nach Möglichkeit vermieden. Zur Zucht wurden zuchtreife (7-9 Wochen) männliche und weibliche Mäuse in einem neuen Käfig zusammengesetzt und folgende Wurfereignisse genau protokolliert. Mäuse sind zwar bereits mit ca. 5 Wochen geschlechtsreif, es zeigte sich aber, dass Mäuse, die erst mit 7-9 Wochen (Zuchtreife) in Verpaarungen gesetzt wurden, eine deutlich erhöhte Nachkommenschaft erzeugten. Die Trächtigkeitsdauer der Maus beträgt ca. 21 Tage und die Wurfgrößen belaufen sich auf 5-15 Tiere (abhängig von Mausstamm und Alter der Tiere). Im Alter von ca. 3 Wochen wurden die Jungen von der Mutter abgesetzt, wobei Männchen und Weibchen stets in getrennten Käfigen untergebracht wurden. Alle Käfige wurden mit Identifikationskärtchen versehen, auf denen Mausstamm, Zuchtpaar, Geburtsdatum, Geschlecht, Genotyp, Anzahl an Tieren sowie die laufende Nummer vermerkt waren.

Bei Lamin C2 handelt es sich um ein meiotisches Protein, also ein Protein der Keimbahn. Deshalb wurde die Zucht der Knock-out-Mauslinie durch die Kreuzung heterozygoter, phänotypisch unauffälliger Tiere aufrecht erhalten. Die Verpaarung heterozygoter Tiere erforderte die Genotypisierung jeder einzelnen Maus, da es sich bei den Nachkommen um wildtypische, heterozygote oder Lamin C2-defiziente Mäuse handeln konnte. Um das für die Genotypisierung benötigte Material zu erhalten, wurde jeder Maus während des Absetzens die Spitze des Schwänzchens entfernt, welches dann wie unter 7.5.7.2 beschrieben enzymatisch verdaut wurde. Zur Identifizierung erhielt jede Maus eine Ohrmarke mit aufsteigender dreistelliger Nummer. In manchen Fällen wurden Knock-out-Mäuse außerdem mit einem kleinen Ohrloch gekennzeichnet.

## 7.2 Zellkultur

### 7.2.1 Kultivierung von Kulturzellen

Die Kultivierung von HeLa-Zellen erfolgte in 10% bovinem Wachstumsserum, 1% L-glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin mit DMEM (Dulbeccos modified Eagle Medium, Invitrogen) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt. Die Kultur der Zelllinie wurde am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie (Universität Würzburg) ständig aufrecht erhalten. Zellen für Transfektionen oder andere Analysen wurden der Stammkultur entnommen, in mit Medium gefüllten Petrischälchen (35 mm, Sarstedt) ausgesät und weiter kultiviert. Wurden die Kulturzellen für Immunfluoreszenzen verwendet, wurden sterile Deckgläschen mit in die Petrischale gelegt, auf deren Oberfläche Zellen anwachsen konnten.

### 7.2.2 Transfektion von Kulturzellen

Als Transfektion bezeichnet man die Einführung von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem Effectene™ Transfection Reagent der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers gearbeitet. Prinzip dieser Transfektionsmethode ist die spontane Micellenbildung eines nicht-liposomalen Lipids, wodurch Plasmid-DNA eingehüllt wird und so die Zellmembran passieren kann. Die Inkubation der transfizierten Zellen erfolgte für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt.



→ pH Wert einstellen  
 20% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol  
 (optional: Spatelspitze Bromphenolblau)

Für die Präparation der Hoden wurden Mäuse verschiedenen Alters vorschriftsgemäß mit CO<sub>2</sub> eingeschläfert. Das Hodengewebe wurde wie unter 7.3.1.1 beschrieben präpariert und sofort in eine Glasschale mit eiskaltem PBS überführt. Danach wurden Tunica albuginea, Rete testis und Tubuli contorti und mit diesen möglichst alle Blutgefäße entfernt. Das Gewebe wurde durch das gegeneinander „Wetzen“ von zwei Rasierklingen mechanisch zerkleinert und durch wiederholtes auf- und ab- pipettieren wurden die Zellen aus den Tubuli heraus gespült. Anschließend wurde die Suspension durch ein Nylonnetz (Maschenweite: 30  $\mu$ m), das mit PBS angefeuchtet worden war, filtriert und in einem 50 ml Greinerröhrchen aufgefangen. Das Filtrat wurde nun für 10 min bei 500g und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 1 ml PBS resuspendiert. Im Anschluss daran erfolgte mikroskopisch die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Aus der Anzahl der gezählten Zellen konnte die Zellzahl im Gesamtvolumen der Suspension errechnet werden. Dazu diente folgende Formel:

$$16 \times \text{Zellzahl/Kleinquadrat} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Ausgangsvolumen} = \text{Gesamtzellzahl}$$

Die Zellsuspension konnte nun zu einer Proteinsuspension weiter verarbeitet werden oder der Gewinnung von Gesamt-RNA dienen. Die Isolation von RNA wird unter 7.5.1 beschrieben. Zur Herstellung der Proteinsuspension wurde zunächst für 10 min bei 500g und 4°C in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 10  $\mu$ l 2x PPP pro 1 x 10<sup>6</sup> Zellen resuspendiert. Die Proteinsuspension wurde gevortext, für 15 min auf 95°C erhitzt, abzentrifugiert und längerfristig bei -20°C gelagert.

### 7.3.3 Gewinnung von Gesamtgewebeproben

*Lösungen:*

2x PPP (pH 6,8): siehe 7.3.2

Unter bestimmten Versuchsbedingungen spielte die genaue Zellzahl eine eher untergeordnete Rolle, da lediglich auf das Vorhandensein eines Proteins oder einer RNA in einem Gewebe hin untersucht wird. War dies der Fall, so wurden Gewebe- und Organstücke direkt nach der Präparation auf eine Glasplatte überführt und durch das gegeneinander „Wetzen“ von zwei Rasierklingen mechanisch zerkleinert. Im Anschluss daran wurden die zerkleinerten Gewebestück in adäquaten Mengen 2x PPP aufgenommen, gevortext, für 15 min auf 95°C erhitzt, abzentrifugiert und längerfristig bei -20°C gelagert. Sollten allerdings verschiedene Proben miteinander verglichen werden, musste die Proteinmenge der einzelnen Proben über Coomassie-Färbung (siehe 7.6.2) und einen BSA-Standard (siehe 7.6.4) abgeschätzt werden.

### 7.3.4 Gewinnung von Spermien aus dem Nebenhoden

*Lösungen:*

PBS (pH 7,4): siehe 7.3.1.2

*70%ige Zuckerlösung:*      *70% Saccharose (w/v) in PBS*  
*2x PPP (pH 6,8):*            *siehe 7.3.2*

Für die Gewinnung reifer Spermien wurden die Nebenhoden adulter (2,5 bis 6 Monate), mit CO<sub>2</sub> eingeschläferter Mäuse präpariert und in ein Glasschälchen mit kaltem PBS transferiert. Nachdem die Nebenhoden mechanisch mit zwei Rasierklingen zerkleinert worden waren, wurde die Zellsuspension durch ein Nylonnetz (Maschenweite: 30 µm) gefiltert, für 5 min bei 1000g und 4°C zentrifugiert und das Zellsediment zweimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Zellen erneut in PBS aufgenommen (Volumen entsprechend dem Zuckerkissen) und für 20 sek (Stufe 4) auf Eis sonifiziert. Bei diesem Schritt sollten somatische Zellen, die die Spermiesuspension verunreinigen würden, zerstört werden. Da Spermien jedoch sehr stabil sind, sollten diese bei der Sonifikation mit Ausnahme des Abbrechenden Flagellums intakt bleiben. Durch die nun folgende einstündige Zentrifugation bei 26000g und 4°C auf einer 70%igen Zuckerlösung sollten Spermenschwänzen sowie alle übrigen Zellreste von den Spermienköpfen, die sich nach der Zentrifugation im Pellet befanden, getrennt werden. Nachdem die Zuckerlösung vorsichtig abgenommen worden war, wurden die pelletierten Spermienköpfe insgesamt dreimal mit PBS gewaschen, wobei einmal für 30 min und zweimal für 10 min bei 14000 rpm und RT zentrifugiert wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Anzahl der isolierten Spermien bestimmt (siehe 7.3.2) und diese für weiterführende Versuche verwendet (siehe auch Longo et al., 1987).

Aufgrund der deutlich geringeren Zellgröße der Spermien gegenüber somatischen oder anderen Keimzellen, wurden mit Spermien in 10-facher Konzentration gearbeitet.

## 7.4 Mikrobiologische Methoden

### 7.4.1 Flüssigkultur von Bakterien

Lösungen:

*LB-Medium (pH 7,4):*      10 g/l Bacto-Trypton  
                                   5 g/l Hefe-Extrakt  
                                   10 g/l NaCl  
                                   → Autoklavieren

*Antibiotika-SL:*            Ampicillin                    50 mg/ml in H<sub>2</sub>O (Tropfenweise mit 1M NaOH lösen)  
                                   Chloramphenicol            34 mg/ml in 100% Ethanol  
                                   Kanamycin                    50 mg/ml in H<sub>2</sub>O  
                                   Tetracyclin                    15 mg/ml in 70% Ethanol

Für die Herstellung einer Übernachtskultur (ÜNK), wurde steriles LB-Medium (15 ml) in einem 50 ml Greinerröhrchen mit einem Antibiotikum (Endkonzentration von 50 µg/ml), gegen das die entsprechende Bakterienkultur resistent war, versehen. Anschließend wurde das Medium mit einer Bakterieneinzelkolonie, die aus einer Glycerinkultur (siehe 7.4.3) oder direkt von einer Agarplatte (siehe 7.4.4) stammte, unter sterilen Bedingungen beimpft und über Nacht bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Flüssigkulturen größerer Volumina (100-200 ml), die beispielsweise zur Protein-Expression (siehe 7.6.7) benötigt wurden, wurden mit ca. 10 ml einer frischen ÜNK angeimpft.

### 7.4.2 Photometrische Bestimmung der Bakteriendichte in Flüssigkulturen

Um die Bakteriendichte in einer Flüssigkultur zu ermitteln, bediente man sich der photometrischen Bestimmung der optischen Dichte (OD) der Kultur. Dazu wurde die Extinktion einer Flüssigkultur bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen, wobei eine OD<sub>600</sub> von 1 etwa 8 x 10<sup>8</sup> Bakterienzellen/ml entsprach. Vor jeder Messung wurde das Photometer gegen frisches LB-Medium geeicht.

### 7.4.3 Glycerinkultur

Um Bakterienkolonien über längere Zeiträume stabil aufbewahren zu können, wurden Glycerinkulturen aus 200 µl sterilem Glycerin und 800 µl bakteriellem Medium aus einer ÜNK hergestellt. Die Glycerinkulturen wurden bei -80°C gelagert.

### 7.4.4 Bakterienkultur auf Agarplatten

Zur Herstellung von Agarplatten wurden 1,5% (w/v) Agar zu fertigem LB-Medium (siehe 7.4.1) hinzugegeben und autoklaviert. Nachdem die LB/Agar-Lösung auf etwa 50°C abgekühlt war, wurden gewünschte Antibiotika zugegeben und das noch flüssige Medium in sterile Petrischalen eingegossen. Nach dem Aushärten wurden die fertigen Agarplatten umgedreht und bei 4°C gelagert. Um Bakterien auf Agarplatten zu kultivieren

wurden 100-200 µl Bakterienflüssigkultur auf eine vorgewärmte Platte pipettiert und mit einem sterilen Drygalski-Spatel ausgestrichen. Anschließend wurde die Plattenkultur über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 7.4.5 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

**Lösungen:**

*LB-Medium:*

*siehe 7.4.1*

*TSS (Transforming and Storage Solution) (pH 6,5):*

*LB-Medium*

*+ 10% PEG 3350 oder 8000*

*+ 5% DMSO*

*+ 40 mg MgSO<sub>4</sub> oder MgCl<sub>2</sub>*

*→ steril filtrieren und bei -20°C lagern*

Flüssigkulturen der *E. coli* Stämme XL1blue, Rosetta™ und RosettaBlue™ wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3-0,4 (siehe 7.4.2) bei 37°C unter schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen für 10 min bei 900g und 4°C abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment sofort in 1/40 des Ausgangsvolumens eiskaltem TSS resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde bei 4°C in Aliquots à 100 µl verteilt und in flüssigem Stickstoff Schock gefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80°C. Zur Ermittlung der Transformationseffizienz der neu hergestellten, chemisch kompetenten Bakterien wurden diese mit 1, 10 und 100 pg pUC19-Vektor-DNA transformiert und die Kolonien anschließend ausgezählt. Da sich die Transformationseffizienz als die Anzahl an Transformaten pro µg DNA definiert, sollte diese mindestens bei 1 x 10<sup>7</sup> bis 1 x 10<sup>9</sup> Transformaten pro µg DNA liegen.

#### 7.4.6 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Ein Aliquot chemisch kompetenter Bakterie wurde langsam auf Eis aufgetaut und mit 50-150 ng gereinigter Plasmid-DNA bzw. mit einem kompletten Ligationsansatz (siehe 7.5.6.7) vermischt. Nach einer 45 minütigen Inkubation auf Eis, wurden die Bakterien für 1 min einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt, danach 1 min auf Eis abgekühlt und mit 900 µl sterilem LB-Medium ohne Antibiotikum vermischt. Daraufhin wurde der Transformationsansatz 1 h bei 37°C unter schütteln inkubiert, um es den Bakterien zu ermöglichen ihre Resistenz, die sie durch die Aufnahme des Plasmids erhalten hatten, auszubilden. Danach wurden 100 µl auf einer Selektionsplatte entsprechend der Resistenz des Vektors ausgestrichen. Der restliche Transformationsansatz wurde für 2 min bei 1000g abzentrifugiert, der Überstand wurde bis auf ca. 100 µl abgenommen, das Sediment resuspendiert und ebenfalls auf einer Selektionsplatte ausgestrichen. Die Platten blieben kurz bei Raumtemperatur stehen und wurden anschließend umgedreht über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 7.5 Molekularbiologische Methoden

### 7.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Suspensionen oder aus intakten Geweben und Organen wurde das Phenolreagenz *peqGOLD Trifast™* der Firma Peqlab weitgehend nach Angaben des Herstellers verwendet. Zellsuspensionen wurden wie unter 7.3.2 beschrieben hergestellt und für 10 min bei 500g und 4°C in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 500 µl *PeqGOLD Trifast™* pro  $5 \times 10^6$  Zellen resuspendiert. Gewebe- und Organstücke wurden direkt nach der Präparation auf eine Glasschale überführt und durch das gegeneinander „Wetzen“ von zwei Rasierklingen mechanisch zerkleinert (siehe 7.3.3). Im Anschluss daran wurden die zerkleinerten Gewebestück in je 500 µl *PeqGOLD Trifast™* aufgenommen.

Nach einer 5 minütigen Inkubationszeit in dem Phenolreagenz wurden der Ansatz mit 100 µl Chloroform versetzt, kräftig geschüttelt und für etwa 10 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde für 5 min bei 12000g und RT zentrifugiert, die resultierende wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 350 µl 2-Propanol zugegeben. Nach kurzem Mischen wurde der Ansatz für 5-15 min auf Eis inkubiert, anschließend für 10 min bei 12000g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die präzipitierte RNA fünfmal mit 1 ml 80% Ethanol gewaschen. Wurde die RNA nicht direkt weiter verarbeitet, wurde sie bei -20°C in 80% Ethanol lagert. Andernfalls wurde das RNA-Pellet getrocknet, in 90°C heißem RNase-freien Wasser gelöst und die Konzentration der RNA photometrisch bestimmt (siehe 7.5.8). Schließlich wurde 1 µl RiboLock™ Ribonuklease Inhibitor zugegeben. Die RNA diente in erster Linie der Herstellung von spezifischer cDNA über RT-PCR (7.5.2).

### 7.5.2 Herstellung von cDNA durch Reverse Transkription (RT-PCR)

Die RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) wird allgemein als die Übersetzung einer vorhandenen RNA in komplementäre DNA (cDNA, complementary DNA) definiert und gliedert sich in zwei Abschnitte. Im ersten Teilabschnitt, der eigentlichen reversen Transkription, werden abhängig von der Wahl des verwendeten Primers RNAs mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Der in dieser Arbeit eingesetzte Oligo(dT)18 Primer ist komplementär zum Poly(A) Schwanz prozessierter mRNA, was die Übersetzung aller zellulärer mRNAs in cDNA zur Folge hat. Die resultierende cDNA kann dann im zweiten Teilabschnitt, der einer „herkömmlichen“ PCR gleicht (siehe 7.5.3), mit Hilfe sequenzspezifischer Primer amplifiziert werden.

Die RT-PCR und damit die synthetisierte cDNA war einerseits Ausgangspunkt für fast alle Klonierungen, da durch die Umschreibung der mRNA in cDNA die exakte und zudem Intron freie Nukleotidsequenz ermittelt werden konnte. Andererseits konnten mit Hilfe der RT-PCR Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene durchgeführt werden.

**Pipettierschema für M-MLV Reverse Transkriptase (20 µl RT-PCR-Ansatz):**

1 µg	RNA
1 µl	RiboLock™ Ribonuklease Inhibitor (40 Units/µl, Fermentas)
4 µl	5x RT-Reaktionspuffer
1 µl	dNTPs (Mix, SL je Nukleotid 10mM, Fermentas)
1 µl	Oligo(dT)18 Primer (500µg/ml, Fermentas)
1 µl	M-MLV Reverse Transkriptase (200 Units/µl, Promega)
add 20 µl ddH <sub>2</sub> O	

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C im Thermocycler inkubiert und anschließend 5 min bei 95°C Hitze inaktiviert. Die cDNA konnte bei 4°C oder -20°C gelagert werden.

**7.5.3 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)**

Mit der Methode der PCR (polymerase chain reaction) kann man kleinste Mengen an DNA in vitro millionenfach amplifizieren. Die Vervielfältigung einer Nukleinsäure mittels PCR gleicht dem Reaktionsablauf der natürlichen Replikation. Bei der PCR verwendet man als Startermoleküle zwei synthetische Oligonukleotide (Primer), die zu den 3'-Enden beider DNA-Stränge des gewünschten DNA-Abschnitts komplementär sind. Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte (DNA-Denaturierung und -Neusynthese), wobei die Matrize exponentiell vermehrt wird.

Ein **Zyklus der PCR** besteht aus drei Teilschritten, die sich im Normalfall 25-35-mal wiederholen:

1. Durch Hitze-Denaturierung (90-95°C) wird der zu amplifizierende DNA-Doppelstrang aufgeschmolzen.
2. Während des Annealings hybridisieren Primer, die im Überschuss vorliegen, spezifisch mit den komplementären DNA-Einzelsträngen. Auf diese Weise markieren die Primer das künftige 5'-Ende des neu zu synthetisierenden DNA-Doppelstranges.
3. Die Elongation (ca. 72°C) erfolgt durch den Einsatz einer thermostabilen DNA-Polymerase, die den Doppelstrang ausgehend vom Primer durch spezifisches Anfügen von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) auffüllt.

**Templates**

Als Template wurde für alle PCR-Anwendungen DNA verwendet. Dabei handelte es sich um cDNA, genomische DNA oder um rekombinante DNA in verschiedenen Vektoren. Sollen Transkripte untersucht werden, muss zuerst RNA mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben (siehe 7.5.2), welche dann in weiteren PCR-Amplifikationen eingesetzt werden konnte.

**Primer**

Bei der PCR hängen Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit in hohem Maße vom Design der verwendeten Primer ab. Primer sollten weder mit sich selbst noch mit anderen Primern hybridisieren können, sie sollten keine Loops bilden und nur einmal an den Matrizenstrang binden. Weiterhin sollten bei der Primerwahl

folgende Parameter beachtet sowie die optimalen Annealing-Temperaturen mit Hilfe des Gradientencyclers bestimmt werden:

Länge:	15-25 Nukleotide
Nukleotide:	40-60% GC-Gehalt
Annealing-Temperatur:	5°C unter $T_M$
Schmelztemperatur:	Temperatur, bei der die Hälfte der komplementären Sequenzen als Doppelstrang vorliegen; Berechnung von $T_M$ : $2^\circ\text{C} \times (A+T) + 4^\circ\text{C} \times (G+C)$

### DNA-Polymerasen

Für die PCR gebraucht man verschiedene DNA-Polymerasen. Alle eingesetzten Enzyme sind thermostabil und arbeiten bei einem Temperaturoptimum (meist 72°C). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Taq-DNA-Polymerase (eigene Herstellung des Lehrstuhls), die ursprünglich aus dem Organismus *Thermophilus aquaticus* isoliert wurde, und die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase der Firma New England Biolabs verwendet.

#### 7.5.3.1 Amplifikation von cDNA-Fragmenten

Für die Amplifikation einer cDNA wurde standardmäßig die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase eingesetzt. Sie besitzt eine „proofreading“ Aktivität und ist daher für Klonierungen geeignet. Diese Polymerase erzeugt keine Überhänge und verarbeitet 1000 Nukleotide pro 15 Sekunden.

##### Pipettierschema für Phusion™ DNA Polymerase (50 µl PCR-Ansatz):

4 ng	DNA (1 µl einer cDNA)
1 µl	5'-Primer (SL 10 pmol/µl)
1 µl	3'-Primer (SL 10 pmol/µl)
10 µl	5x Phusion™ HF Buffer (NEB)
1 µl	dNTPs (Mix, SL je Nukleotid 10mM, Fermentas)
1,5 µl	DMSO (100%)
0,5 µl	Phusion™ DNA Polymerase (2 Units/µl, NEB)
add 50 µl ddH <sub>2</sub> O	

Der Ansatz wurde auf Eis zusammen pipettiert und anschließend im Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert:

Initiale Denaturierung:	2 min	98°C	} 25-35 Zyklen
Denaturierung:	15 sek	98°C	
Annealing:	15 sek	Temperatur je nach Primern	
Elongation:	15 sek pro 1000 Basen	72°C	
Finale Elongation:	5 min	72°C	

Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel (siehe 7.5.4) analysiert.

### 7.5.3.2 Amplifikation genomischer DNA

Die Amplifikation genomischer, also Intron haltiger DNA, die beispielsweise bei der Genotypisierung von Knock-out-Mäusen (siehe 7.1) zum Einsatz kommt, gleicht im Prinzip der unter 7.5.3.1 beschriebenen Amplifikation von cDNA-Fragmenten. Dennoch sind beim Umgang mit genomischer DNA als Template einige Gesichtspunkte zu berücksichtigen: Da die zu amplifizierenden genomischen DNA-Fragmente in deutlich geringeren Kopienzahlen je  $\mu\text{g}$  DNA als z. B. Plasmid- oder cDNA vorlagen, wurde mit einer höheren Menge an Template-DNA (500 ng) gearbeitet. Weiterhin wurde die Zeit, die die Phusion-DNA-Polymerase zur Amplifikation benötigt, verdoppelt (30 sek für 1000 bp) und die Annealing-Temperatur der Primer um  $3^\circ\text{C}$  erhöht, wobei die optimalen Annealing-Temperaturen der Primer stets im Gradientencycler bestimmt wurde.

### 7.5.3.3 Kolonie-PCR

Eine Kolonie-PCR ähnelt im Allgemeinen einer herkömmlichen PCR. Durchgeführt wurde die Kolonie-PCR nach der Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren, um zu testen, ob ein Klon das gewünschte Plasmid aufgenommen hatte. Weiterhin konnte durch die Wahl eines internen Primerpaares bestimmt werden, ob überhaupt ein Fragment inseriert hatte. Wurde ein interner Primer und ein Primer, der an die Vektorsequenz band, verwendet, konnte die Orientierung des inserierten DNA-Fragments überprüft werden. Für eine Kolonie-PCR wurde die Taq-DNA-Polymerase (eigene Herstellung des Lehrstuhls für Zell- und Entwicklungsbiologie, Universität Würzburg) verwendet.

Nachdem der Ansatz als Master-Mix pipettiert worden war, verteilte man ihn auf PCR-Reaktionsgefäße. Die zu testende Bakterienkolonie (entspricht der DNA-Probe des PCR-Ansatzes) wurde mit einer Pipettenspitze direkt von der Selektionsplatte gepickt und im PCR-Reaktionsgefäß mit dem vorpipettierten Ansatz vermischt.

#### *Pipettierschema für Kolonie-PCR (25 $\mu\text{l}$ PCR-Ansatz):*

- 0,5  $\mu\text{l}$  5'-Primer (SL 10 pmol/ $\mu\text{l}$ )
- 0,5  $\mu\text{l}$  3'-Primer (SL 10 pmol/ $\mu\text{l}$ )
- 0,5  $\mu\text{l}$  dNTPs (Mix, SL je Nukleotid 10mM, Fermentas)
- 2,5  $\mu\text{l}$  Taq-DNA-Polymerase 10x Reaktionspuffer
- 1,5  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (25 mM)
- 0,5  $\mu\text{l}$  Taq-DNA-Polymerase (5 Units/ $\mu\text{l}$ , eigene Herstellung)
- add 25  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O
- gepickten Klon zugeben und resuspendieren

Der Ansatz wurde auf Eis zusammen pipettiert und anschließend im Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert:

Initiale Denaturierung:	2 min	95°C	} 25 Zyklen
Denaturierung:	30 sek	95°C	
Annealing:	30 sek	Temperatur je nach Primern	
Elongation:	60 sek pro 1000 Basen	72°C	
Finale Elongation:	10 min	72°C	

Die Kolonie-PCR-Produkte wurden im Agarosegel (siehe 7.5.4) analysiert.

#### 7.5.4 Auftrennen von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

##### Lösungen:

20x SB-Laufpuffer (pH 8,0):	als 20x Puffer ansetzen 200 mM NaOH → pH-Wert mit Borsäure einstellen → Laufpuffer: 1x	
6x DNA-Beladungspuffer:	60% (v/v) Glycerin 20% (v/v) 0,2 M EDTA 10% (v/v) ddH <sub>2</sub> O	+ 4% Orange G + 1% Bromphenolblau + 2% Xylencyanol
		oder oder
Ethidiumbromid-SL (10mg/ml)		

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Dabei macht man sich zunutze, dass DNA bei Erzeugung eines elektrischen Feldes aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen in Richtung positiv geladener Anode läuft. Aufgrund der gleichen Ladung bewegen sich kleine DNA-Fragmente schneller als große. Für Fragmente zwischen 100 und 10000 Basenpaaren verwendete man 1%ige Agarose-Gele, denen 0,5 µl der Ethidiumbromid-SL pro 50 ml zugegeben wurde. Da Ethidiumbromid zwischen den DNA-Basen interkaliert und bei Anregung durch UV-Licht eine rosafarbene Fluoreszenz erzeugt, konnten die DNA-Banden sichtbar gemacht werden. Die Agarose-Gele wurden mit DNA-Proben, die mit 6x DNA-Beladungspuffer versetzt worden waren, beladen. In einer Gelspur wurde immer ein Größenstandard (siehe 6.2.4) als Referenz-DNA mit aufgetragen, um die erhaltenen DNA-Fragmente einer bestimmten Größe zuordnen zu können. Die Agarose-Gele wurden zwischen 150 und 300 V gefahren. Die angefärbten DNA-Banden wurden anschließend mittels UV-Transilluminator sichtbar gemacht und dokumentiert.

#### 7.5.5 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Nach Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese konnten gewünschte DNA-Fragmente mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und extrahiert werden. Die Reinigung und Elution der DNA-Fragmente erfolgte mit dem *Wizard® SV Gel and PCR Cleanup System* der Firma Promega nach Angaben des Herstellers. Die isolierte DNA konnte sofort für weitere Versuche verwendet werden oder bei -20°C aufbewahrt werden.

#### 7.5.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

Unter der Klonierung von DNA-Fragmenten versteht man die gezielte DNA-Rekombination, bei der DNA-Sequenzen in Plasmidvektoren eingeschleust werden, welche dann in Bakterien vermehrt und auch wieder aus der Wirtszelle isoliert werden können. Als Wirtszellen wurden verschiedene Stämme von *Escherichia coli* verwendet. Um erfolgreiche Klonierungen durchführen zu können, sollte ein Klonierungsvektor folgende Kennzeichen aufweisen:

1. Replikationsursprung (ORI, origin of replication) für die selbstständige Vermehrung

2. Multiple cloning site (MCS) mit verschiedenen Restriktionsschnittstellen für das Inserieren fremder DNA
3. Primerbindungsregionen für die Sequenzanalyse
4. Antibiotikaresistenzgene, zur Selektion erfolgreich transformierter Vektoren

Mit Hilfe spezifischer Restriktionsenzyme konnten gewünschte DNA-Fragmente aus Vektoren ausgeschnitten werden. Die Fragmente wurden über eine Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 7.5.4) und anschließend aus dem Gel extrahiert (siehe 7.5.5). Die erhaltenen Fragmente konnten nun erneut in Vektoren inseriert werden, die mit demselben Restriktionsenzym geschnitten worden waren.

#### 7.5.6.1 Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>

Der Vektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> liegt in linearisiertem Zustand vor und besitzt an seinen 3'-Enden einen Tymidin-Überhang. Weiterhin ist das Enzym Topoisomerase I kovalent an jedes 3'-Ende gekoppelt. Die Topoisomerase I besitzt die Fähigkeit ohne weitere Enzymzugabe ein DNA-Fragment, das einen Adenin-Überhang besitzt, in den TOPO-Vektor zu ligieren. Anschließend dissoziiert das Enzym selbstständig vom Vektor.

Um von dieser Eigenschaft Gebrauch machen zu können, musste einem PCR-Produkt vor der eigentlichen Klonierung mit dem *TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit* (Invitrogen) ein Adenin-Überhang angehängt werden. Dazu machte man sich zu Nutze, dass die Taq-DNA-Polymerase dazu neigt, Adenine an die freien 3'-Enden von DNA-Fragmenten anzufügen.

##### *Pipettierschema für die Erzeugung eines A-Überhanges (50 µl PCR-Ansatz):*

40 µl	PCR-Produkt (extrahiert und eluiert in 40 µl ddH <sub>2</sub> O)
5 µl	Taq-DNA-Polymerase 10x Reaktionspuffer
3 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
0,5 µl	dNTPs (Mix, SL je Nukleotid 10mM, Fermentas)
0,5 µl	Taq-DNA-Polymerase (5 Units/µl, eigene Herstellung)

Das Hinzufügen der Adenine an ein PCR-Produkt erfolgte bei 10 minütiger Inkubation bei 72°C im Thermocycler. Die weitere TOPO<sup>®</sup>TA-Klonierungsreaktion erfolgte, wie im Herstellerprotokoll beschrieben.

#### 7.5.6.2 Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pJET1.2/blunt

Die Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pJET1.2/blunt geschah mit dem CloneJet<sup>™</sup> PCR Cloning Kit (Fermentas) nach Angaben des Herstellers. Da der Vektor linearisiert und an den 5'-Enden phosphoryliert vorliegt, können DNA-Fragmente mit glatten Enden, wie sie bei der Amplifikation mit der Phusion-DNA-Polymerase entstehen (siehe 7.5.3.1) direkt in die MCS ligiert werden.

##### *Pipettierschema für einen ¼ pJET1.2/blunt Ligationsansatz (5 µl Ansatz):*

0,5-2 µl	PCR-Produkt (ungereinigt)
2,5 µl	5x Reaktionspuffer
0,5 µl	pJET2.1/blunt
0,5 µl	T4 DNA Ligase

*add 5 µl ddH<sub>2</sub>O*

Der Ligationsansatz wurde auf Eis zusammen pipettiert und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde der komplette Ligationsansatz in kompetente *E. coli* Bakterien des Stammes XL1 blue transformiert (siehe 7.4.6). Da der Vektor das Gen für ein Restriktionsenzym, welches für alle gängigen *E. coli* Bakterienstämme lethal ist, trägt, können positiv Klone sehr einfach selektioniert werden. Die Ligation eines DNA-Fragments in die MCS führt nämlich zur Unterbrechung dieses Gens, was ein Überleben aller Klone mit inseriertem PCR-Produkt zur Folge hat. Alle Bakterien mit zirkularisiertem Vektor ohne Insert sterben ab.

### 7.5.6.3 Restriktionsverdau

Um einzelne DNA-Fragmente linear zu erhalten und sie umklonieren zu können, bediente man sich des Restriktionsverdau. Weiterhin konnte mit Hilfe eines Restriktionsverdau als Alternative zur Kolonie-PCR (siehe 7.5.3.3) festgestellt werden, ob ein Insert in einen Vektor ligiert worden war. Dabei wurden spezifische Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Diese Enzyme besitzen meist palindrome Erkennungssequenzen, mit denen sie spezifische Nukleotidsequenzen erkennen und innerhalb des Doppelstranges schneiden. Je nach eingesetztem Enzym entstehen glatte (blunt) oder kohäsive (sticky) Enden. Kohäsive Enden können religiert werden, wenn in beiden Fällen mit demselben Restriktionsenzym geschnitten worden war.

*Pipettierschema für einen Restriktionsansatz (einfach) (10 µl):*

1 µg     DNA  
 1 µl     Restriktionsenzym 1  
 1 µl     10x Puffer (der verwendete Puffer richtet sich nach eingesetztem Enzym)  
*add 10µl ddH<sub>2</sub>O*

*Pipettierschema für einen Restriktionsansatz (doppelt) (20 µl):*

1 µg     DNA  
 1 µl     Restriktionsenzym 1  
 1 µl     Restriktionsenzym 2  
 2 µl     10x Puffer (der verwendete Puffer richtet sich nach den eingesetzten Enzymen)  
*add 20µl dd H<sub>2</sub>O*

Der Restriktionsansatz wurde auf Eis zusammen pipettiert und resuspendiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 1-2 h bei meist 37°C im Brutschrank inkubiert. Es folgte ein Hitzeinaktivierungs-Schritt für 10-15 min bei 60-80°C. (Die Inkubationszeiten und -temperaturen des Restriktionsverdau und der Hitzeinaktivierung richteten sich jedoch stets nach dem eingesetzten Enzym!). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Restriktionsansätze mit 6x DNA-Beladungspuffer versehen und im Agarosegel (siehe 7.5.4) analysiert.

#### 7.5.6.4 Herstellung von DNA-Fragmenten mit glatten Enden mittels Klenow-Fragment

Sollte ein DNA-Fragment, das kohäsive Enden besaß, „geglättet“ werden, bediente man sich des Klenow-Fragments. Dabei handelt es sich um die große Untereinheit der *E. coli* DNA-Polymerase I, die eine 5'-3'-Polymerase-Aktivität besitzt, um ein überhängendes 5'-Ende aufzufüllen.

##### *Pipettierschema für einen Klenow-Ansatz (10 µl):*

Kompletter Restriktionsansatz	oder:	100ng-4µg	DNA
+ 0,5 µl dNTPs (Mix, SL je Nukleotid 10 mM, Fermentas)		0,5 µl	dNTPs
+ 0,75 µl Klenow-Enzym (10 Units/µl, Fermentas)		1 µl	10x Klenow-Puffer (Fermentas)
		0,75 µl	Klenow-Enzym (10 Units/µl)
		add 10µl dd H <sub>2</sub> O	

Der Ansatz wurde auf Eis zusammen pipettiert und für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde für 15 min bei 70°C Hitze inaktiviert.

#### 7.5.6.5 Verwendung von PCR-Produkten als Insert-DNA (Kinasierung des PCR-Produkts)

Gewöhnlich wurde die für eine Klonierung benötigte Insert-DNA durch Verdau mit bestimmten Restriktionsenzymen gewonnen (siehe 7.3.5.3). Alternativ dazu konnte auch ein neu synthetisiertes DNA-Fragment als Insert verwendet werden. Um in diesem Fall erfolgreich klonieren zu können, mussten dem Insert vor der Insertion in einen Vektor Phosphatgruppen angehängt werden. Dabei wurde die T4-Polynukleotid-Kinase verwendet, die die  $\gamma$ -Phosphatgruppe eines ATPs auf ein unphosphoryliertes 5'-Ende überträgt. Dieser Kinasierungsschritt ist nötig, da die DNA-Ligase Phosphate am 5'-Ende eines der zu ligierende Moleküle zur Ausbildung der Phosphodiesterbindung braucht. Der Vektor selbst sollte keine Phosphate tragen, damit er nicht mit sich selbst ligiert.

##### *Pipettierschema für einen Kinasierungsansatz:*

12,5 µl	PCR-Produkt (eluiert in H <sub>2</sub> O)
1 µl	T4 Polynukleotid Kinase (10 Units/µl, Fermentas)
1,5 µl	10x Kinase-Puffer (Fermentas)
1 µl	rATP (Fermentas)

Der Kinasierungsansatz wurde auf Eis zusammen pipettiert und für 1 h bei 37°C inkubiert.

#### 7.5.6.6 Dephosphorylierung des Vektors

Um in einer ungerichteten Klonierung die Religation (Autoligation) des Vektors zu verhindern, wurde dieser dephosphoryliert. Dabei werden Phosphatgruppen an den 5'-Enden der geöffneten Vektor-DNA entfernt, damit die DNA-Ligase die beiden Vektorenden nicht wieder miteinander verknüpfen kann. Wurden zwei verschiedene Restriktionsenzyme in einer gerichteten Klonierung eingesetzt, war eine Dephosphorylierung unnötig, da nur komplementäre Enden ligiert werden können.

##### *Pipettierschema für einen Dephosphorylierungsansatz (5 µl):*

120-150 ng	linearisierte Vektor-DNA
0,5 $\mu$ l	10x SAP-Puffer (Fermentas)
1 $\mu$ l	Shrimp alkalische Phosphatase (1 Unit/ $\mu$ l, Fermentas)
add 5 $\mu$ l ddH <sub>2</sub> O	

Der Dephosphorylierungsansatz wurde auf Eis zusammen pipettiert und 2 h bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Hitzeinaktivierung von 15 min bei 65°C.

### 7.5.6.7 Ligation

Bei der Ligation wurden DNA-Fragmente miteinander verbunden. Dazu mussten sowohl Vektor- als auch Insert-DNA mit demselben Restriktionsenzym geschnitten worden sein. Man bediente sich der Enzymaktivität der T4-DNA-Ligase, die in einer ATP-abhängigen Reaktion die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppe katalysiert.

Für eine Ligation sollte die Insert-DNA im Vergleich zur Vektor-DNA im Überschuss vorliegen. Deshalb wurden Insert und Vektor ungefähr in einem Verhältnis von 3:1 eingesetzt.

#### *Pipettierschema für einen Ligationsansatz (20 $\mu$ l):*

600 ng	Insert-DNA
150 ng	linearisierte Vektor-DNA
2 $\mu$ l	10x T4-DNA-Ligase-Puffer
0,5 $\mu$ l	rATP (Fermentas)
1 $\mu$ l	T4-DNA-Ligase (5 Units/ $\mu$ l)
add 20 $\mu$ l ddH <sub>2</sub> O	

Der Ligationsansatz wurde auf Eis zusammen pipettiert und 1 h bei 16-21°C inkubiert. Handelte es sich bei der Ligation um eine Verknüpfung zweier „glatter“ Enden (blunt-end Ligation) wurde nach 45 min nochmals 1  $\mu$ l T4-DNA-Ligase zugegeben und weitere 45 min bei 16-21°C inkubiert.

Anschließend wurden kompetente Bakterien mit jeweils einem kompletten Ligationsansatz transformiert. Die Durchführung erfolgte, wie unter 7.4.6 beschrieben. Ligationen und Transformationen wurden mit Hilfe der Kolonie-PCR (siehe 7.5.3.3), des Restriktionsverdaus (siehe 7.5.6.3) und der DNA-Sequenzierung (siehe 7.5.11) überprüft.

## 7.5.7 Isolierung von DNA

### 7.5.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Plasmid Mini Präp)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das E.N.Z.A.<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab) sowie Nucleospin<sup>®</sup> Plasmid (Machery-Nagel) nach Herstellerprotokoll verwendet. Beide Verfahren beruhen auf alkalischer Lyse der Bakterien, Trennung der Plasmid-DNA von den übrigen Zellbestandteilen durch Bindung des zirkulären Plasmids an ein Silika-Gel, und der anschließenden Elution mit einer Niedrigsalzlösung (z. B. ddH<sub>2</sub>O; Tris-gepufferte Lösung) bei pH 7,0-8,5. Die so gewonnene Plasmid-DNA besitzt eine sehr hohe Reinheit und ist

daher für Klonierungen (siehe 7.5.6), DNA-Sequenzierungen (siehe 7.5.11) und Transfektionen (siehe 7.2.2) geeignet.

### 7.5.7.2 Isolierung von genomischer DNA aus Zellen und Geweben

#### Lösungen:

<i>SDS-Mix (pH 7,5):</i>	17 mM Tris/HCl 17 mM EDTA 170 mM NaCl 0,85% (w/v) SDS
<i>Proteinase K-SL (Serva):</i>	20 mg/ml; in 10 mM CaCl <sub>2</sub> (pH nicht eingestellt) 100 und 200 µl Aliquots bei -20°C gelagert
<i>Gesättigte NaCl-Lösung:</i>	6 M NaCl

Um wildtypische, heterozygote und Knock-out-Mäuse genotypisieren zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit genomische DNA aus der Schwanzspitze isoliert (siehe 7.1). Dazu wurde das abgeschnittene Gewebestückchen zunächst enzymatisch mit Proteinase K verdaut. 500 µl SDS-Mix und 50 µl der Proteinase K-SL wurden zu dem Schwanzstückchen hinzugegeben und der Ansatz über Nacht bei 56°C unter ständigem Rotieren inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Ansatz mit 250 µl gesättigter NaCl-Lösung versetzt, 10 min bei RT unter ständigem Rotieren sowie weitere 15 min auf Eis inkubiert. Nach 8 minütiger Zentrifugation bei 9000 rpm und 4°C wurde der DNA-haltige Überstand in ein neues 1,5 ml Safe Lock Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von eiskaltem Ethanol (100%, p.A.) gefällt. Die DNA wurde anschließend bei 14000 rpm und RT pelletiert, einmal mit 80% Ethanol gewaschen und für 1-2 h bei RT luftgetrocknet. Das getrocknete DNA-Pellet wurde schließlich in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen (Volumen abhängig von der Größe des DNA-Pellets) und wenigstens 24 h bei 4°C gelöst. Die DNA-Konzentration sowie die Reinheit wurde photometrisch ermittelt (siehe 7.5.8). Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte immer bei 4°C.

### 7.5.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration einer Nukleinsäure bediente man sich der Spektrometrie (Biophotometer, Eppendorf bzw. Infinite® 200 PRO NanoQuant, Tecan). Dabei wurde die Absorption einer DNA oder RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, wobei einer OD<sub>260</sub> von 1 etwa 50 µg/ml doppelsträngige DNA, 40 µg/ml RNA und 30 µg/ml Oligonukleotide entsprechen. Da bei 280 nm die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte, konnte die Probe aus dem Quotienten OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> auf Verunreinigungen durch Proteine hin untersucht werden. Tabelle 12 zeigt den Zusammenhang zwischen OD und Nukleinsäurekonzentration und welchen Wert der Quotient 260/280 bei reinen Proben annehmen sollte. Für die photometrische Messung wurde die Probe 3:60 in ddH<sub>2</sub>O verdünnt und das Photometer geeicht. Die Messung mit Hilfe des Infinite® 200 PRO NanoQuant erfolgte mit 2 µl der unverdünnten DNA.

Tabelle 12. Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren.

	Konzentration bei OD <sub>260</sub> = 1	Reinheit bei OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>
ds DNA	50 µg/ml	1,8

ss DNA	37 µg/ml	1,8
RNA	40 µg/ml	2,0
Oligonukleotide	30 µg/ml	1,8

### 7.5.9 Fällung von Nukleinsäuren

Für die Fällung wurden der wässrigen DNA-Probe 80 µl ddH<sub>2</sub>O, 10 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 250 µl Ethanol (100%, p.a.) in dieser Reihenfolge zugegeben. Die Lösung wurde gut gemischt und für 30 min bei 13000 rpm und RT in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit 70% Ethanol. Im Anschluss daran wurde der Überstand abgesaugt und das DNA-Pellet vollständig bei RT luftgetrocknet. Die getrocknete DNA konnte schließlich in gewünschtem Puffer gelöst werden.

### 7.5.10 Reinigung von Nukleinsäuren mit Phenol/Chloroform

Die Phenol/Chloroform Reinigung diente der Entfernung von DNA-modifizierenden Enzymen (z. B. Restriktionsenzymen) aus Nukleinsäurelösungen. Dazu wurde die DNA-haltige Lösung gegebenenfalls mit sterilem ddH<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt und mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Wasser versetzt. Durch mehrmaliges Invertieren wurde der Ansatz gut gemischt was eine Denaturierung der Proteine durch Phenol und deren Anreicherung in der Interphase zur Folge hatte. Die Phasen wurden anschließend durch eine 5 minütige Zentrifugation bei 14000 rpm und RT getrennt, wobei eine untere organische, eine proteinhaltige Inter- und eine DNA-haltige wässrige Phase entstand. Letztere wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und, um verbliebenes Phenol von der DNA zu entfernen, mit 1 Volumen 100% Chloroform versetzt. Nach gründlichem Mischen und 1 minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm und RT wurde die wässrige Phase wiederum abgenommen und der waschschrift 5-mal wiederholt. Im Anschluss an den letzten Waschschrift wurde die wässrige Phase, wie unter 7.5.9 beschrieben, gefällt.

### 7.5.11 DNA-Sequenzierung

Mit Hilfe der DNA-Sequenzierung kann durch die Zugabe geeigneter Primer die genaue Basenabfolge von DNA-Fragmenten bestimmt werden. Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen wurden bei der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) in Auftrag gegeben. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit dem frei zugänglichen Online-Programm BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) sowie dem vom National Center for Biotechnology Information (NCBI) bereitgestellten Online-Tool Align two (or more) sequences using BLAST (bl2seq) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/bl2seq/wblast2.cgi>).

## 7.6 Proteinbiochemische Methoden

### 7.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli

#### Lösungen:

Lösung A (Applichem):	29,22% Acrylamid 0,8% Bis-Acrylamid
Lösung B (pH 8,7):	1 M Tris/HCl
Lösung C (pH 6,8):	1 M Tris/HCl
20% SDS (in ddH <sub>2</sub> O)	
10% APS (in ddH <sub>2</sub> O)	
2x Proteinprobenpuffer	siehe 7.3.2
Laufpuffer (pH 8,5):	25 mM Tris/HCl 112 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS → als 10x Stammlösung hergestellt

Das Grundprinzip aller elektrophoretischen Trenntechniken für Proteine ist deren Wanderung in einem elektrischen Feld. Polyacrylamid als Trägermaterial für die Gelelektrophorese besitzt das höchste Auflösungsvermögen, denn es können selbst sehr kleine Proteine und Peptide mit einem Molekulargewicht von weniger als 10 kDa im Polyacrylamidgel analysiert werden. Agarosegele hingegen eignen sich aufgrund ihrer Grobmaschigkeit lediglich für die Auftrennung sehr großer Proteine.

Das dreidimensionale Netzwerk des Polyacrylamids wird durch die radikalische Polymerisation des monomeren Acrylamids und des quervernetzenden Bisacrylamids aufgebaut. Die Porengröße des Gels ist abhängig vom Verhältnis zwischen der Acrylamid- und Bisacrylamidkonzentration und somit variabel. Für Proteine gibt es keine allgemeine Wanderungsrichtung, da sie nicht negativ geladen sind, wie zum Beispiel DNA-Moleküle. Durch Zugabe des negativ geladenen Detergenzes Natriumdodecylsulfat (SDS, sodium dodecyl sulphate) bilden sich SDS-Protein-Komplexe mit negativer Ladung. Der Komplex wandert im elektrischen Feld zur Anode. Dabei wandern in einem Proteingemisch die großen Proteine langsam und die kleinen schnell. Dadurch ergibt sich ein bestimmtes Bandenmuster in Abhängigkeit vom Molekulargewicht der Proteine. Weiterhin denaturiert SDS Proteine, weshalb es sowohl dem Gel als auch dem Laufpuffer zugegeben wird. Zur Vollständigen Denaturierung werden Proteine in einem Probenpuffer aufgenommen, der SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol enthält. Letzteres reduziert Disulfidbrücken und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Nachdem zwei Glasplatten für Minigele gereinigt worden waren, wurden sie mit zusammen mit zwei Abstandshaltern (Spacern) mit Hilfe zweier Klammern zusammengebaut. Die Unterseite wurde mit Tesafilm abgeklebt und mit 0,5%iger Agaroselösung abgedichtet. Anschließend goss man das Trenngel mit gewünschter Konzentration zwischen die beiden Glasplatten und überschichtete es mit Wasser. Das Gel war nach ca. 30 min auspolymerisiert, sodass das Wasser abgekippt und das Sammelgel gegossen werden konnte. Schließlich wurde

ein ebenfalls gereinigter Kamm in das Sammelgel eingesteckt. Angaben bezüglich der Prozentigkeit der Gele befinden sich in Tabelle 13.

Tabelle 13. Pipettierschema für Trenn- und Sammelgel bei der SDS-PAGE nach Laemmli. Angaben für jeweils zwei Minigele.

	Trenngel					Sammelgel
	8%	10%	12%	15%		5%
Lösung A	4 ml	5 ml	6 ml	7,5 ml	Lösung A	1,67 ml
Lösung B	5,6 ml	5,6 ml	5,6 ml	5,6 ml	Lösung C	1,25 ml
20% SDS	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	20% SDS	50 µl
ddH <sub>2</sub> O	5,215 ml	4,215 ml	3,215 ml	1,715 ml	ddH <sub>2</sub> O	6,925 ml
Temed	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	Temed	10 µl
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	10% APS	150 µl

Vor der Beladung wurden Tesafilm und Kamm entfernt und das Gel in eine Kammer eingespannt. Die Kammer wurde mit Laufpuffer befüllt und die Geltaschen mit Hilfe einer Pipette gespült. Anschließend wurde das Gel beladen. Die aufzutragenden Proteinproben wurden zuvor in 2x PPP aufgenommen, für 15 min auf 95°C erhitzt und gevortext. In einer Gelspur wurde als Referenz immer ein Größenstandard (siehe 6.2.4) mit aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte konstant bei 60 V (Sammelgel) bzw. 100 V (Trenngel).

## 7.6.2 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

### Lösungen:

*Coomassie-Färbelösung:* 0,25% (w/v) Brillinat Blue R250  
40% (v/v) Methanol  
8% (v/v) Essigsäure

*Entfärbelösung:* 25% (v/v) Methanol  
10% (v/v) Essigsäure

Für die Coomassie-Färbung wurde das Polyacrylamidgel im Anschluss an die Elektrophorese mindestens 3 h oder über Nacht in der Coomassie-Färbelösung inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Gel so lange in der Entfärbelösung geschwenkt bis die Proteinbanden blau und die Gelmatrix wieder transparent war. Das gefärbte Gel konnte nun dokumentiert oder direkt getrocknet werden (siehe 7.6.3).

## 7.6.3 Trocknen von SDS-Gelen

Um Coomassie gefärbte Polyacrylamidgele (siehe 7.6.2) für längere Zeit aufbewahren zu können, wurden sie getrocknet. Dazu wurde ein Gel für ca. 5 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in eine mit ddH<sub>2</sub>O eingeweichte Zellglasfolie gespannt. Das Gel wurde auf die Folie in einen Rahmen gelegt und die übrige Folie wurde luftblasenfrei darüber gelegt. Schließlich wurde ein zweiter Rahmen deckungsgleich auf den ersten gelegt und beide wurden zusammen geklammert. Derart eingespannt wurde das Gel über Nacht getrocknet.

### 7.6.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen im SDS-Gel

Um Proteinkonzentrationen abschätzen zu können, wurden definierte Volumina der zu untersuchenden Proteinlösung in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe 7.6.1), Coomassie gefärbt (7.6.2) und mit einem BSA-Standard (Polyacrylamidgel mit 5 µg, 2 µg, 1 µg, 0,5 µg, 0,2 µg und 0,1 µg BSA in je einer anderen Spur) verglichen.

### 7.6.5 Western Blot

#### Lösungen:

<i>CAPS-Puffer (pH 10):</i>	50 mM CAPS 10% (v/v) Methanol → pH-Wert einstellen 1 mM Mercapto-Propionsäure (87 µl / 1l)
<i>TBST (pH 7,4):</i>	10 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Tween® 20
<i>Absättigungslösung (pH 7,4):</i>	5-10% Milch in TBST
<i>Ponceau S (Serva):</i>	0,2% Ponceau in 3%iger TCA

Der Western Blot (Immun Blot) beschreibt allgemein die Übertragung von Proteinen auf eine Membran mit anschließender Nachweisreaktion. Im Detail beinhaltet der Western Blot folgende Einzelschritte:

#### Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran

Nach Beendigung der SDS-PAGE (7.6.1) wurde das Polyacrylamidgel 10 min in CAPS-Puffer inkubiert. In dieser Zeit wurden Nitrozellulose und 18 Lagen Whatman-Papiere entsprechend der Größe des Gels

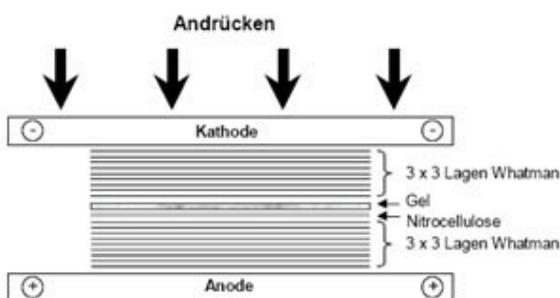


Abbildung 44. Aufbau eines Western Blots.

zugeschnitten. Anschließend wurde der Blot, wie in Abbildung 44 dargestellt, aufgebaut, wobei sowohl die Whatman-Papiere als auch die Nitrocellulose mit CAPS-Puffer angefeuchtet waren. Geblottet wurde für ca. 1 h bei einer Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup>, wobei die Spannung stetig von ca. 8 V auf ca. 20 V anstieg. Danach wurde der Blot abgebaut und die Membran für ca. 5 min in Ponceau S, einem Farbstoff der reversibel

an Proteine bindet, inkubiert. Anschließend entfärbte man die Membran solange in ddH<sub>2</sub>O, bis die rot gefärbten Proteinbanden gut zu erkennen waren. Die Markerbanden und die untersten Banden wurden mit einem weichen Bleistift markiert. Schließlich wurde die Membran in die Absättigungslösung überführt, über Nacht bei 4°C unter leichtem schütteln und tags darauf für 2 h bei RT abgesättigt.

#### Antikörperbindung

Nach der Absättigung folgte als spezifische Nachweisreaktion die Bindung des primären Antikörpers. Die Membran wurde mit dem primären Antikörper, der in Absättigungslösung verdünnt wurde, für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde dreimal für 10 min mit TBST gewaschen. Daran schloss sich die Inkubation mit

dem sekundären Antikörper an. Auch dieser wurde in Absättigungslösung verdünnt. Anschließend wurde wiederum dreimal für 10 min mit TBST gewaschen.

### Detektion

Die Detektion erfolgte stets über eine Peroxidase, die an den sekundären Antikörper gekoppelt war, und die enhanced chemiluminescence (ECL). Dazu wurden die ECL-Lösungen 1 und 2 im Verhältnis von 1:1 vermischt. In dieser Lösung wurde nun die Membran für etwa 1 min inkubiert, wobei man die Lösungen mehrmals über die Membran pipettierte. Die Peroxidase katalysiert eine Redox-Reaktion, bei der Licht in Form von Chemilumineszenz frei wird. Die Membran wurde anschließend falten- und luftblasenfrei in eine Folie gelegt und mit einem Röntgenfilm belichtet. Die Expositionszeit war abhängig von der Intensität des Signals. Der Röntgenfilm wurde 2 min lang entwickelt, gewaschen und fixiert. Zum Schluss wurde der Film unter laufendem Wasser gewaschen, dann getrocknet und dokumentiert.

### 7.6.6 Strippen eines Western Blots

#### Lösungen:

Strip-Puffer 1 (pH 2):	100 mM Glycin
Strip-Puffer 2 (pH 6,7):	100 mM Tris/HCl 2% (w/v) SDS
$\beta$ -Mecrpto-Strip-Puffer (pH 6,7):	100 mM Tris/HCl 2% (w/v) SDS → pH-Wert einstellen 390 $\mu$ l $\beta$ -Mecrptoethanol / 50 ml
TBST (pH 7,4):	siehe 7.6.5
Absättigungslösung (pH 7,4):	siehe 7.6.5

Sollten auf ein und derselben Membran zwei unterschiedliche Proteine nachgewiesen werden, so musste erst der Nachweis des einen Proteins erfolgen, anschließend gebundene Antikörper entfernt (Strippen) und dann das zweite Protein detektiert werden. Dazu wurde die Membran nach der Detektion des ersten Proteins zunächst für 5 min (gegebenenfalls über Nacht bei 4°C) mit TBST gewaschen. Für die darauf folgende Strip-Reaktion gab es zwei Möglichkeiten: Die Membran konnte entweder für 30 min bei RT in Strip-Puffer 1 und weitere 30 min bei RT in Strip-Puffer 2 inkubiert werden oder einmalig für 30 min bei 50°C im  $\beta$ -Mecrpto-Strip-Puffer. In beiden Fällen wurde die Membran schließlich zweimal für 5 min mit TBST gewaschen und für ca. 2 h abgesättigt. Daraufhin konnte mit der Detektion des zweiten Proteins begonnen werden (siehe 7.6.5).

### 7.6.7 Expression und Affinitätsreinigung von (His)<sub>6</sub>-Fusionsproteinen

#### Lösungen:

Puffer A-D:	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Tris/HCl 8 M Urea (Puffer A pH 8; Puffer B pH 6,3; Puffer C pH 5,9; Puffer D pH 4,5)
Neutralisationspuffer (pH 9,5):	1M Tris/HCl

Um Proteine in großen Mengen zu synthetisieren, konnten diese in Bakterien hergestellt und anschließend aus den lysierten Bakterien aufgereinigt werden. Die Affinitätsreinigung wurde mit dem QIAexpress Ni-NTA Protein Purification System (Qiagen) weitgehend nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei binden Proteine mit einem (His)<sub>6</sub>-tag bei pH 8,0 an eine Ni-NTA (nickel nitrilotriacetic acid) Agarosematrix und werden ausgelöst durch einen pH-Wechsel (pH 4,5) wieder von dieser eluiert. Unspezifisch gebundene Proteine sollten in mehreren vorhergegangenen Waschschrinen entfernt worden sein.

### ***Bakterielle Expression***

Ausgangspunkt der bakteriellen Proteinexpression war die Transformation eines Expressionsvektors (siehe 7.4.6) inklusive der kodierenden Sequenz des gewünschten Proteins in einen geeigneten *E. coli* Stamm (Rosetta™ bzw. RosettaBlue™; siehe 5.2). Als Expressionsvektoren dienten pET-21a (Novagen) sowie pQE30-32 (Qiagen), welche beide für sechs aufeinanderfolgende Histidine ((His)<sub>6</sub>-tag) kodieren (siehe 6.2.1).

200-800 ml Flüssigkulturen wurden wie unter 7.4.1 beschrieben beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,9 bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Hatte die Kultur diesen Wert erreicht wurde die Expression des Fusionsproteins durch die Zugabe von IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid, Endkonzentration 1mM) induziert und für 4 h unter konstanten Bedingungen (37°C, ständiges Schütteln) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Bakterien für 10 min bei 3000g und 4°C pelletiert, der Überstand wurde verworfen und die Bakteriensedimente entweder sofort lysiert oder bei -20°C gelagert.

### ***Lyse der Bakterien***

Die induzierten und pelletierten Bakterien wurden zunächst in Puffer A aufgenommen (à 200 ml Ausgangsflüssigkultur 50 ml Puffer A), resuspendiert und für 1 h bei RT gerollt. Es folgten eine 30 sekundige Sonifikation (auf Eis) zur Verbesserung der Lyse, erneute 30 min Rollen bei RT und eine 15 minütige Zentrifugation bei 10.000g und 4°C um etwaige Zellreste zu pelletieren. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein frisches 50 ml Greinerröhrchen überführt und bis zur Beladung der Säule auf Eis gelagert.

### ***Affinitätsreinigung über Ni-NTA-Agarose unter denaturierenden Bedingungen***

5 ml Polypropylen Säulchen (Qiagen) wurden vor der eigentlichen Reinigung gründlich mit ddH<sub>2</sub>O gespült und mit 1-2 ml der Ni-NTA Agarose Suspension gefüllt. Die Säulenmatrix wurde anschließend mit 25 ml Puffer A gewaschen und äquilibriert und mit dem proteinhaltigen Überstand der lysierten Bakterien beladen. Es folgten Waschschrine mit 40 ml Puffer A (à 200 ml Ausgangsflüssigkultur), 15 ml Puffer B (à 200 ml Ausgangsflüssigkultur) sowie 10 ml Puffer C (à 200 ml Ausgangsflüssigkultur). Die (His)<sub>6</sub>-Fusionsproteine wurden schließlich mit 10 ml Puffer D in 1,5 ml Reaktionsgefäße eluiert, wobei den Elutionsfraktionen sofort 1/10 Volumen Neutralisationspuffer zugegeben wurde. Die Elutionsfraktionen wurden bei 4°C gelagert und waren aufgrund des Vorhandenseins von 8 M Urea stabil.

### ***Testen der Elutionsfraktionen***

Um zu bestimmen in welcher Fraktion, in welcher Menge und in welcher Reinheit das gewünschte Fusionsprotein eluiert worden war, wurden die Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE (siehe 7.6.1) und anschließender Coomassie-Färbung (siehe 7.6.2) oder Western Blot (siehe 7.6.5) analysiert.

### 7.6.8 Fällung von Proteinen

Um Proteine in ihrer Reinform getrennt von einer Lösung zu erhalten werden sie gefällt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proteine einer Fällung mit organischen Lösungsmitteln unterzogen.

#### 7.6.8.1 Methanol/Chloroform-Fällung

Für die Fällung von Proteinen mit Methanol und Chloroform wurde folgender Ansatz pipettiert:

<i>1-faches Probenvolumen Proteinlösung:</i>	<i>150 µl</i>
<i>4-faches Probenvolumen Methanol (eiskalt):</i>	<i>600 µl</i>
<i>1-faches Probenvolumen Chloroform:</i>	<i>150 µl</i>
<i>3-faches Probenvolumen ddH<sub>2</sub>O (eiskalt):</i>	<i>450 µl</i>

Die Probe wurde kräftig geschüttelt, für 10 min auf Eis inkubiert und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Dies führte zur Trennung in eine obere methanolhaltige, eine untere organische und eine weißliche Interphase, in der sich die Proteine befanden. Die proteinhaltige Interphase wurde mit einem Spatel in ein neues mit Methanol befülltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Zum Schluss wurde der Überstand verworfen, das Proteinsediment vollständig luftgetrocknet und in beliebigem Puffer gelöst. Da das Lösen gefällter und getrockneter Proteine zuweilen schwierig war, konnte die Proteinlösung erhitzt, sonifiziert oder mit SDS (2-4% Endkonzentration) versetzt werden.

#### 7.6.8.2 Aceton-Fällung

Alternativ dazu konnten Protein auch mit Aceton gefällt werden. Dazu wurde die proteinhaltigen Lösung mit 9-fachen Probenvolumen Aceton (-20°C) versetzt, kräftig geschüttelt, für 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert und für 1 h bei -80°C inkubiert. Die gefällten Proteine wurden schließlich für 10 min bei 8000g und 4°C pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Um die Proteine wieder in Lösung zu bekommen, konnte genauso wie der Methanol/Chloroform-Fällung beschrieben verfahren werden.

### 7.6.9 Dialyse von Proteinen

Die Dialyse dient dazu, Proteinen von einem in einen anderen Puffer zu überführen. Dazu wurden Proteine in ihrem Ursprungspuffer in einen Dialyseschlauch geeigneter Porengröße überführt und in ein Gefäß mit dem neuen Puffer gegeben, wobei Ursprungspuffer und neuer Puffer in einem Verhältnis von wenigstens 1:2000 vorliegen und der Dialysepuffer mehrmals gewechselt werden sollte. Die Dialyse erfolgte bei 4°C.

## 7.6.10 Affinitätsreinigung von Antikörpern über das HiTrap™-Säulensystem

### Lösungen:

Bindepuffer (pH 8,3):	200 mM $\text{NaHCO}_3$ 500 mM $\text{NaCl}$
Waschpuffer 1 (4°C):	1 mM $\text{HCl}$
Puffer A (pH 8,3):	500 mM $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}$ (Ethanolamin) 500 mM $\text{NaCl}$
Puffer B (pH 4,0):	100 mM Essigsäure 500 mM $\text{NaCl}$
Waschpuffer 2:	3,5 M $\text{MgCl}_2$
PBS (pH 7,4):	siehe 7.3.1.2
PBS + 350 mM $\text{NaCl}$ (pH 7,4)	
Elutionspuffer (pH 2,5):	100 mM Glycin
Neutralisierungspuffer (pH 9,5):	1 M $\text{Tris/HCl}$
Lagerungspuffer (pH 7,0):	50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1% (w/v) $\text{NaN}_3$

→ Alle Puffer wurden vor Gebrauch frisch angesetzt und steril filtriert

Antikörper werden in zahlreichen Experimenten eingesetzt, z. B. in Immunfluoreszenz-Analysen, Western Blots oder Immunpräzipitationen. Um jedoch spezifische Antikörper gewinnen zu können, müssen zuerst Tiere mit dem entsprechenden Antigen immunisiert werden. Dies löst eine Immunantwort aus, und infolgedessen erzeugt das Immunsystem, genauer die B-Lymphocyten, Antikörper gegen das Antigen. Da im Organismus zahlreiche B-Zellen vorhanden sind, die unterschiedliche Antikörper gegen verschiedene Epitope des Antigens produzieren, spricht man von polyklonalen Antikörpern. Monoklonale Antikörper erhält man durch die Fusion einzelner B-Lymphocyten mit Krebszellen (Hybridomzellen). Diese können in Kultur genommen werden und produzieren Antikörper gegen exakt das selbe Epitop in den Zellkulturüberstand.

Zwei bis drei Monate nach der Immunisierung wird das Gesamtserum des Tieres gewonnen. Da dies sowohl gegen das immunisierte Antigen Antikörper als auch alle anderen Antikörper des tierischen Immunsystems enthält, werden unspezifische Antikörper in der Regel durch eine Affinitätsreinigung entfernt.

### Kopplung des Antigens an NHS-aktivierte Sepharose

Bei der Affinitätsreinigung über das HiTrap™-Säulensystem wird zunächst das zur Immunisierung verwendete Antigen an die HiTrap™ Säule gekoppelt. Die Kopplung erfolgt über kovalente Bindung der Aminogruppen des Antigens an die NHS-aktivierte Sepharose der HiTrap™-Säule. Dazu musste das Antigen in Bindepuffer vorliegen, was durch Fällung (siehe 7.6.8) oder Dialyse (siehe 7.6.9) erreicht wurde. Zu beachten ist hierbei, dass gefällten Proteinen zum Lösen bis zu 2% SDS (Endkonzentration) zugegeben werden konnte. Wurde das Antigen über eine Dialyse in den Bindepuffer überführt, so musste der Dialysepuffer wenigstens vier- bis fünfmal gewechselt werden, damit die Aminogruppen des Harnstoffs entfernt waren und nicht mit denen des

Antigens um Bindungsstellen konkurrierten. Direkt vor der Beladung wurde die Proteinlösung in jedem Fall für 5 min bei 3000g und 4°C zentrifugiert, um ungelöste Partikel zu sedimentieren.

Die Säule wurde mit Hilfe einer Laborpumpe sowie Schläuchen verschiedener Durchmesser (mit Parafilm abgedichtet) beladen. Der Adapter zur Kopplung von Schlauch und Säule wurde ferner an einem Schlauchende angebracht. Vor Beginn der Reinigung wurden Schlauch und Adapter mit je 10 ml 70% Ethanol und ddH<sub>2</sub>O gespült. Anschließend wurde der Schlauch mit kaltem Waschpuffer 1 gefüllt und die HiTrap™-Säule mit 6 ml von diesem gewaschen. Bei diesem Schritt, bei jedem weiteren Pufferwechsel und während der gesamten Reinigung, musste darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen in die Säule gelangten. Es folgte die Beladung der Säule mit der Proteinlösung: gefällte Proteine wurden in einem Volumen von 1 ml aufgenommen und mit Hilfe einer speziellen Kanüle auf die Säule gebracht. Diese wurde dann verschlossen und 1 h bei RT inkubiert. Dialysierte Proteine wurden für 1 h zirkulierend auf die Säule gebracht (Flußrate 2 ml/min). Im Anschluss daran wurde die Säule mit 6 ml Puffer A, 6 ml Puffer B und weiteren 6 ml Puffer A gewaschen und für 1 h in letzterem bei RT inkubiert. Während dieser Inkubation wurden freie Bindungsstellen mit Ethanolamin abgesättigt. Es folgten erneut 3 Waschschritte: 6 ml Puffer B, 6 ml Puffer A, 6 ml Puffer B (Flußrate bei allen Waschschritten 1 ml/min).

### ***Affinitätsreinigung des Antiserums***

Vor der ersten Benutzung der antigenbeladenen Säule wurde diese mit 10 ml Waschpuffer 2 gewaschen. Mit diesem Waschschritt sollten ungebunden Antigene und Antigenbruchstücke aus der Säule entfernt werden. Es folgten ein Waschschritt mit 30 ml PBS (Flußrate: 1 ml/min) sowie die Beladung der Säule mit dem zu reinigenden Serum. Das Gesamtserum (Meerschweinchen: 3-5 ml; Kaninchen 10 ml) wurde zunächst für 10 min bei 3000g und 4°C zentrifugiert und anschließend 1:10 in PBS verdünnt. Für die Beladung der Säule wurden 40 bzw. 100 ml Serum in PBS verwendet, die mit einer Flußrate von 1-2 ml/min auf die Säule gebracht wurden. Der Durchlauf wurde gesammelt und man ließ ihn weitere dreimal unter den gleichen Bedingungen über die Säule laufen. Anschließend wurde die Säule gewaschen (Flußrate: 1-2 ml/min): 30 ml PBS, 30 ml PBS +350 mM NaCl, 10 ml PBS. Es folgte die Elution der Antikörper mit 15 ml Elutionspuffer bei maximaler Pumpleistung (Flußrate: 3 ml/min). Das Eluat wurde in einem 15 ml Greinerröhrchen aufgefangen und nach jedem ml wurden 50 µl Neutralisierungspuffer zugegeben. Die Säule wurde mit 20 ml PBS gewaschen und schließlich im Lagerungspuffer bei 4°C aufbewahrt.

### ***Dialyse der Antikörper***

Nach der Affinitätsreinigung wurde das Antikörpereluat gegen 4 l vorgekühltes PBS dialysiert (siehe 7.6.9). Der Dialyseschlauch wurde für 30 min in 2 mM EDTA (pH 8) gekocht und anschließend befüllt. Dialysiert wurde über Nacht bei 4°C. Bei der Dialyse gingen ca. 50% der Antikörper verloren, wobei es sich dabei meist um Antikörperbruchstücke handelte.

### ***Aufkonzentrieren des Antikörperdialysats***

Mit Hilfe der Zentrifugalfilteranlage Centriplus YM 50 (Millipore) wurden die gereinigten Antikörper eingeeengt. Da die Ultracel-YM-Membran für Moleküle größer 50 kDa undurchlässig ist, werden nur nicht intakte

Antikörper entfernt. Die Durchführung der invertierten Spin-Methode erfolgte nach Herstellerprotokoll. Das Dialysat wurde bei 3000g und 4°C zentrifugiert und die Antikörper-Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt (gemessen gegen die PBS-Lösung der Dialyse). Es wurde bis zu einer OD<sub>280</sub> von 1,48 zentrifugiert, was einer Antikörperlösung einer Konzentration von 1,0 mg/ml entsprach. Dann wurde das Auffanggefäß mit dem Durchlauf entfernt und der Konzentrat auf ein frisches Auffanggefäß aufgesteckt. Dies wurde für 4 min bei 2000g und 4°C zentrifugiert.

Das Antikörperkonzentrat wurde zunächst so lange bei 4°C gelagert, bis das gereinigte Serum in Immunfluoreszenzen und im Western Blot getestet worden war. Geeignete Verdünnungen mussten empirisch ermittelt werden. Danach wurde das Konzentrat in Aliquots à 5-20 µl verteilt und in flüssigem Stickstoff Schock gefroren. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -70°C.

### 7.6.11 Co-Immunpräzipitation

#### Lösungen:

PBS (pH 7,4):	siehe 7.3.1.2
RIPA-Puffer (pH 7,4):	1% (v/v) Triton-X 100 0,5% (w/v) Natriumdesoxycholat 0,1% (w/v) SDS 1 mM β-Glycerophosphat 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 1 mM EGTA 1 mM EDTA → in PBS (nach Stewart-Hutchinson et al., 2008)
Proteinase-Inhibitor-Mix:	5 mM α-Aminocapronsäure 1 mM Benzamidin 1 mM EDTA 2 µg/ml Aprotinin 2 µg/ml Antipain 2 µg/ml Chymostasin 2 µg/ml Leupeptin 2 µg/ml Pepstasin → als Stammlösung (50x in H <sub>2</sub> O) angesetzt
2x PPP (pH 6,8)	Siehe 7.3.2

Im Allgemeinen bietet die Methode der Co-Immunpräzipitation die Möglichkeit Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Dabei wird ein bekanntes Protein als Köder mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers aus einem Zellextrakt gefischt (immunpräzipitiert) und Proteine oder ganze Proteinkomplexe (Beute), die mit dem Köderprotein interagieren, werden co-immunpräzipitiert. Unspezifische Bindungspartner werden in mehreren Waschschritten entfernt und spezifische eluiert. Ist das Beute-Protein bekannt, kann man mittels Co-Immunpräzipitation eine Protein-Protein-Interaktion be- oder wiederlegen. Dieser Assay kann allerdings auch derart eingesetzt werden, dass man mit einem bekannten Köder-Protein nach einem unbekanntem Interaktionspartner sucht. Bekannte Interaktionspartner können über Western Blot detektiert werden, unbekannte Proteine müssen über andere biochemische Nachweisverfahren, wie z. B. Massenspektrometrie, identifiziert werden. Co-Immunpräzipitationen wurden im Rahmen dieser Arbeit mit Ausnahme kleiner Abweichungen nach Stewart-Hutchinson et al. (2008) durchgeführt.

### **Herstellung der Zellextrakte**

HeLa-Zellen wurden 24 h nach der Co-Transfektion mit Effectene™ (siehe 7.2.2) nach einmaligem Waschen mit PBS mit einem Zellschaber geerntet und in 1,5 ml Maximum Recovery Reaktionsgefäße überführt. Es folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 500g und 4°C, wonach der Überstand verworfen wurde. Waren mehrere Schälchen mit der gleichen Konstrukt-Kombination vorhanden, wurden die Zellen in ein und demselben Reaktionsgefäß gesammelt. Das gesammelte Zellsediment wurde schließlich in 500 µl kaltem RIPA (radioimmunoprecipitation assay) Puffer resuspendiert und mit Proteinase-Inhibitor-Mix (1:50) versetzt. Der Ansatz wurde für 10 min auf Eis lysiert und für 15 min bei 15000g und 4°C zentrifugiert. Damit waren die Zellysate für die Immunpräzipitation vorbereitet.

### **Co-Immunpräzipitation**

Zuerst wurden von den 500 µl Zellysate 1/20 (25 µl) als Input-Kontrolle abgenommen, die sofort in 2x PPP aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert wurde. Das restliche Zellysate wurde zu gleichen Teilen auf zwei neue 1,5 ml Maximum Recovery Reaktionsgefäße verteilt und mit 1-1,5 µg spezifischem bzw. unspezifischem (IgG; Kontrolle) Antikörper versehen. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4°C unter ständigem Rollen inkubiert.

Im Anschluss daran wurden beiden Ansätzen magnetische Dynabeads® Protein-G (Invitrogen) zugegeben. Protein-G ist ein Zellwandprotein des Bakteriums *Streptococcus*, welches unspezifisch und kovalent alle IgG-Antikörper bindet. Aus diesem Grund wird Protein-G bei der Co-Immunpräzipitation dazu verwendet, Antikörper und dessen Antigen sowie sämtliche Interaktionspartner aus dem Extrakt zu fischen. Vor der Verwendung wurden 20 µl Dynabeads® Protein-G in ein neues 1,5 ml Maximum Recovery Reaktionsgefäß pipettiert, für 1 min bei 500g und 4°C zentrifugiert und für 1 min auf dem Magnetic Separator für 1,5-2 ml Reaktionsgefäße platziert. Der Überstand wurde, während sich die Probe auf dem Magneten befand, abgenommen und die Beads einmal mit 250 µl RIPA-Puffer äquilibriert. Daraufhin wurde der Immunpräzipitationsansatz zu den gewaschenen Beads gegeben und für 2 h bei 4°C unter ständigem Rollen inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ansätze dreimal mit je 250 µl RIPA-Puffer gewaschen, wobei zwischen jedem Waschschrift für 1 min bei 500g und 4°C zentrifugiert und 1 min auf dem Magneten inkubiert wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurden die co-immunpräzipitierten Komplexe in 40 µl 2x PPP aufgenommen, resuspendiert, gevortext und 15 min auf 95°C erhitzt. Danach wurden die Ansätze wieder auf dem Magneten platziert, um die Beads von der Probe zu trennen. Die Analyse der Co-Immunpräzipitation erfolgte schließlich mittels SDS-PAGE (siehe 7.6.1) und Western Blot (siehe 7.6.5).

## 7.7 Mikroskopische Methoden

### 7.7.1 Herstellung der Präparate

#### 7.7.1.1 Herstellung von Gefrierschnitten und Gewebeabklatschen

Gefrierschnitte wurden mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (2800 Frigocut E, Reichert-Jung) angefertigt. Als erstes wurde etwas Einbettmedium (Tissue Freezing Medium®, Jung) auf einen kalten (-25°C) Objekteller aufgetropft und darauf ein gefrorenes (siehe 7.3.1.1) Gewebestück platziert. Nach Aushärten des Einbettmediums wurde der Objekteller eingespannt und das Gewebe angeschnitten. Es wurden Schnitte von 6-10 µm angefertigt, die auf einen Objektträger abgeklatscht wurden. Nach jedem Schnitt wurde das Messer mit Aceton gesäubert und die Schnitte mikroskopisch auf ihre Tauglichkeit überprüft. Alternativ konnten Einzelzellen durch direktes Abklatschen auf einen Objektträger überführt werden. Dazu wurde das eingespannte Gewebe angeschnitten, aus dem Mikrotom heraus genommen und ca. 30 sek bei RT angetaut. Anschließend wurden durch leichtes Andrücken eines Objektträgers einzelne Zellen auf diesen übertragen. Bevor die Schnitte und Abklatsche weiter verarbeitet wurden, ließ man sie ca. 30 min bei RT an der Luft trocknen.

#### 7.7.1.2 Herstellung von Paraffinschnitten

Paraffin eingebettetes Gewebe (siehe 7.3.1.2) wurde auf einem Holzklötzchen befestigt und dieses in das Schlittenmikrotom eingespannt. Schnitte gewünschter Dicke (2-15 µm) wurden mit Hilfe eines Pinsels auf einen Wassertropfen (ddH<sub>2</sub>O) auf einem Superfrost Plus Objektträger übertragen und bis sich die Schnitte vollständig ausgestreckt hatten auf einer 58°C warmen Heizplatte inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges Wasser vom Objektträger entfernt, die Schnitte mikroskopisch auf ihre Tauglichkeit überprüft und die Präparate über Nacht bei RT Luft getrocknet.

### 7.7.2 Immunfluoreszenz

#### 7.7.2.1 Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten, Gewebeabklatschen und Kulturzellen

##### *Lösungen:*

*PBS (pH 7,4):* siehe 7.3.1.2

*PFA-Fixierlösung (pH 7,4):* 1% PFA (Paraformaldehyd; w/v) in PBS

*Permeabilisierungslösung:* 0,05 -1% Triton-X100 (v/v) in PBS

*PBT (Absättigungslösung):* PBS + 0,15% (w/v) BSA  
+ 0,1% (v/v) Tween 20

*Hoechst-SL:* 5 µg Hoechst 33258 (Roche) / ml (Verwendung 1:333 in PBS)

*Eindeckelmedium:* Mowiol: 10 g Mowiol 4-88 (Calbiochem) plus 40 ml PBS (ohne KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>);  
pH 8 mit KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> einstellen, 16 h rühren;  
plus 20 ml Glycerin, 16 h rühren; 15 min 17000g, ÜS lagern bei -20°C

oder: 50% (v/v) Glycerin in PBS

### **Fixierung und Absättigung**

Die getrockneten Präparate (Gefrierschnitte und Gewebeabklatsche) oder auf Deckgläschen gezogene Kulturzellen wurden zunächst für 10 min mit 1% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurden zelluläre Membranen für 10 min mit 0,05% Triton-X 100 (da mit Membranproteinen gearbeitet wurde) in PBS permeabilisiert, das Detergens mit PBS ausgewaschen (zweimal 5 min) und die Präparate in einer Feuchtekammer für 1-1,5 h mit PBT abgesättigt.

### **Antikörperlokalisation**

Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper: das PBT wurde abgetropft, sofort 50-200 µl Antikörperlösung (in PBS verdünnt oder pur) auf jedes Präparat pipettiert und für ca. 1h bei RT in einer Feuchtekammer inkubiert. Wurden zwei verschiedene Primärantikörper verwendet, wurde mit diesen nacheinander inkubiert und dazwischen zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Nach der Inkubation mit dem(n) primären Antikörper(n), wurde zweimal für 5 min mit PBS gewaschen und die Präparate für 30 min mit dem sekundären Antikörper unter oben genannten Bedingungen inkubiert. 10 min vor Ablauf der Inkubationszeit wurde jedem Präparat ein Tropfen des Hoechst-Farbstoffes zugegeben, der die DNA im Fluoreszenzmikroskop bläulich erscheinen lässt. Anschließend wurden die Präparate wieder zweimal für 5 min mit PBS gewaschen und eingedeckelt. Die Rückseite eines jeden Deckgläschens wurde an einem fusselfreien Papiertuch abgestreift und das Deckglas mit der Zellseite auf einen Tropfen Mowiol auf einem Objektträger gelegt. Zum Eindeckeln von Objektträgern wurde je ein Tropfen Mowiol direkt auf das Präparat pipettiert und ein Deckglas aufgelegt. Anstelle von Mowiol wurde auch 50% Glycerin in PBS als Eindeckelmedium verwendet. Die Präparate wurden fluoreszenzmikroskopisch analysiert und schließlich bei 4°C gelagert.

#### **7.7.2.2 Immunfluoreszenz auf Paraffinschnitten**

##### **Lösungen:**

PBS (pH 7,4):	siehe 7.3.1.2
Unmasking-Lösung (Vector Labs.):	1:100 in ddH <sub>2</sub> O
Permeabilisierungslösung:	0,01% Triton X-100 (v/v) in PBS
PBT (Absättigungslösung; pH 7,4):	siehe 7.7.2.1
Hoechst-SL:	siehe 7.7.2.1
Eindeckelmedium:	siehe 7.7.2.1

### **Entparafinisierung und Rehydrierung**

Die getrockneten Paraffinschnitte wurden zunächst durch eine zweimalige Inkubation für 10 min in Rotihistol (Roth) entparafinisiert und anschließend in einem absteigenden Ethanol-Gradienten rehydriert: Inkubation der Schnitte für je 2 min in 100%, 90%, 80%, 70% und 60%, 10 in 50% Ethanol und 3 min in ddH<sub>2</sub>O.

### **Unmasking**

Im Anschluss daran erfolgte das sogenannte „Unmasking“, die Freilegung durch Formaldehyd-Fixierung unzugänglich gemachter Epitope. Dazu wurden die entparaffinisierten und rehydrierten Schnitte für 5-20 min (abhängig von Schnittdicke und verwendetem Antikörper) in einer Zitronensäure-basierenden Unmasking-Lösung (Vector Laboratories) inkubiert, die mit Hilfe eines Tischautoklavs auf 125°C und 1,5 bar gebracht wurde. Nach Ablassen des Drucks und Abkühlen des Autoklavs auf unter 100°C wurden die Schnitte in PBS überführt und anschließend für 10 min in 0,1% Triton-X 100 permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen für 5 min mit PBS wurde für 1-1,5 h mit PBT abgesättigt.

Beim Ablassen des Drucks des Autoklavs sollte stets darauf geachtet werden, dass das Wasser nicht kochte, da dies die Qualität des Präparats enorm verschlechtern konnte.

### **Antikörperlokalisierung**

Die Antikörperlokalisierung bei Paraffinschnitten erfolgte wie unter 7.7.2.1 beschrieben, wobei die Antikörper doppelt so konzentriert eingesetzt wurden wie bei herkömmlichen Immunfluoreszenzen.

#### **7.7.2.3 Immunfluoreszenz auf gespreiteten Zellen**

##### **Lösungen:**

<i>PBS (pH 7,4):</i>	<i>siehe 7.3.1.2</i>
<i>PFA-Fixierlösung (pH 7,4):</i>	<i>1% PFA (Paraformaldehyd; w/v) in PBS</i>
<i>Permeabilisierungslösung:</i>	<i>1% Triton X-100 (v/v) in ddH<sub>2</sub>O</i>
<i>PBT (Absättigungslösung; pH 7,4):</i>	<i>siehe 7.7.2.1</i>
<i>Hoechst-SL:</i>	<i>siehe 7.7.2.1</i>
<i>Eindeckelmedium:</i>	<i>siehe 7.7.2.1</i>

##### **Fixierung, Absättigung und mechanische Spreitung**

Die Immunfluoreszenz auf gespreiteten Zellen eignet sich besonders dann, wenn bestimmte zelluläre (Chromatin assoziierte) Strukturen analysiert werden sollen und dabei die Erhaltung der Zellmorphologie vernachlässigt werden kann. Um dies zu erreichen wurde zunächst ein Stückchen gefriereingebetteten Gewebes in PBS aufgenommen und resuspendiert. Von der erhaltenen Zellsuspension wurden 50 µl auf einem Objektträger ausgestrichen und 10 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit sollten die Zellen auf die Oberfläche des Objektträgers absinken. Anschließend wurden 250 µl der Permeabilisationslösung (1% Triton X-100 in ddH<sub>2</sub>O) zugegeben und wiederum 10 min bei RT inkubiert, wobei der Objektträger zwei- bis dreimal „horizontal geschüttelt“ wurde. Nachdem dann überschüssige Flüssigkeit abgetropft worden war, wurden die Zellen mit 200 µl 1% Formaldehyd in PBS für 5 min und RT fixiert. Es folgte die mechanische Spreitung der Zellen, bei der ein Deckglas auf betreffenden Objektträger aufgelegt und mit den Daumen fest aufgedrückt wurde (ca. 2 min). Im Anschluss daran wurde das Deckglas durch die Inkubation in PBS vom Objektträger gelöst und die fixierten und gespreiteten Zellen in einer Feuchtekammer für 1-1,5 h mit PBT abgesättigt.

### **Antikörperlokalisierung**

Die Antikörperlokalisierung auf gespreiteten Zellen erfolgte wie unter 7.7.2.1 beschrieben, wobei die optimalen Antikörperkonzentrationen entsprechend des jeweiligen Experiments bestimmt wurden.

### 7.7.3 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

*Lösungen:*

*Haemalaunlösung nach Mayer (Fluka)*

*Eosinstammlösung (von 1983): 1:100 in ddH<sub>2</sub>O*

Die Hämatoxylin/Eosin-Färbung ist ein histologisches Färbeverfahren, das vor allem in der morphologischen und pathologischen Untersuchung verschiedener Gewebestrukturen Anwendung findet. Durch die Kombination zweier Einzelfärbungen, der Hämatoxylin- sowie der Eosinfärbung können zudem zelluläre und gewebespezifische Details auf lichtmikroskopischer Ebene recht gut aufgelöst werden. Hämatoxylin, das in histologischen Färbungen als aufbereitetes Hämalaun zum Einsatz kommt, färbt alle sauren Strukturen blau, insbesondere Zellkerne, da in ihnen die Desoxyribonukleinsäure (DNA: deoxyribonucleic acid) lokalisiert ist. Eosin hingegen färbt basische Strukturen rot, was eine Rot-Färbung des (überwiegend basischen) Zytoplasmas zur Folge hat.

Die Hämatoxylin/Eosin-Färbung wurde auf 4% PFA fixierten (siehe 7.3.1.2), 5-10 µm dicken Paraffinschnitten (7.7.1.2) durchgeführt. Nach der Entparaffinisierung und Rehydrierung (siehe 7.7.2.1) wurden die Schnitte für 10 min bei RT in einer Feuchtekammer mit 150 µl Hämalaunlösung nach Mayer gefärbt. Nach kurzem Spülen in Leitungswasser, wurden die Schnitte für 3-10 min in diesem gebläut. Die Bläuungs-Reaktion wurde unter dem Mikroskop verfolgt und durch Überführen der Schnitte in ddH<sub>2</sub>O gestoppt. Nach 5 minütigem Waschen mit ddH<sub>2</sub>O wurden die Schnitte erneut in die Feuchtekammer gelegt und mit 150 µl der verdünnten Eosinlösung inkubiert. Daraufhin wurde wiederum für 5 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und die Präparate durch eine je 1 minütige Inkubation in 50%, 70% und 100% Ethanol dehydriert, kurz in Rotihistol eingetaucht und mit Histokit eingedeckelt. Nach einer 1 stündigen Trocknung konnten die Dauerpräparate mikroskopisch analysiert werden.

### 7.7.4 TUNEL-Assay

*Lösungen:*

*PBS (pH 7,4): siehe 7.3.1.2*

*Eindeckelmedium: siehe 7.7.2.1*

Mit einem TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) Assay können apoptotische Zellen durch Anbringung von markierten Nukleotiden (in diesem Fall Digoxigenin) an 3'-Enden fragmentierter DNA durch das Enzym TdT (terminal desoxynucleotidyl transferase) identifiziert und dargestellt werden. In dieser Arbeit wurde der TUNEL-Assay auf 1-4% PFA-fixierten Paraffinschnitten durchgeführt, die zuerst, wie unter 7.7.2.1 beschrieben, entparaffiniert und rehydriert wurden. Im Anschluss daran wurden die Präparate dreimal für 5 min in PBS inkubiert und dann weitgehend wie im Herstellerprotokoll (ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Chemicon) beschrieben, weiterbehandelt: die Präparate wurden für 5 min im Equilibration Buffer äquilibriert, 1 h bei 37°C in einer mit Parafilm abgedichteten Feuchtekammer mit dem Enzym TdT (70 µl

Reaction Buffer + 30 µl TdT Enzym; 25 µl/Präparat) inkubiert, 10 min mit Stop/Wash Buffer (1:34 in ddH<sub>2</sub>O) und dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Die Detektion der Digoxigenin-markierten DNA-Fragmente erfolgte über eine 1 stündige Inkubation der Präparate mit dem Anti-dig-fluorescein Fab fragment der Firma Roche, das 1:5 in PBS verdünnt wurde. Da bei der Verwendung dieses Fluorescein-konjugierten Antikörperfragments ein weiterer Sekundärantikörper unnötig war, wurde Hoechst direkt bei diesem Inkubationsschritt zugegeben. Nach erneutem dreimaligen Waschen für 5 min in PBS, wurden die Präparate mit Mowiol oder 50% Glycerin in PBS eingedeckelt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

### 7.7.5 Mikroskopische Auswertung

Immunfluoreszenzmikroskopische Präparate wurden mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Axiophot HB050, Zeiss) mit Quecksilberlampe analysiert und mit einer AxioCam MRm Digitalkamera sowie dem Computerprogramm Avio Vision Release digital dokumentiert. Eine detailliertere Auswertung immunfluoreszenzmikroskopischer Präparate erfolgte an einem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (TCS-SP2 AOBS, Leica) mit der zugehörigen Software (Leica LCS Lite). Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie ermöglicht die Aufnahme optischer Schnitte durch einzelne Zellen oder Gewebe, wobei nur die Schnittebene und keine Bereiche außerhalb des Fokus mit angeregt werden. Standardmäßig wurde mit folgenden Einstellungen gearbeitet:

Objektiv:	HCX PI APO ibd. Bl. 63x/1.4 Ölimmersion
Pinhole:	1 P AU
Scangeschwindigkeit:	400 oder 800 Hz
Format:	512 x 512 oder 1024 x 1024
Zoom:	ein- und zweifach für Übersichten; vier- und achtfach für Einzelzellen
Anzahl an Scans/Bild:	meist drei bis ca. 80 (ganzer Zellkern) Einzelschnittserien im Abstand von je 0,122 µm, aus denen die Maximum 2D Projektion berechnet wurde.

Histologische Präparate wurden mit dem Axiophot HB050 Stereomikroskop mit Durchlicht analysiert und mit einer AxioCam MRm Digitalkamera (beide von Zeiss) sowie dem Computerprogramm Avio Vision Release digital dokumentiert oder mit MZ 16FA Stereomikroskop (Leica) sowie der uEye Digitalkamera (IDS) analysiert.

Zur Bildbearbeitung aller digitalen Aufnahmen wurde das Computerprogramm Adobe® Photoshop CS verwendet.

## 8 Referenzen

- Adams und McLaren, 2002:** Adams IR, McLaren A. Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development*. 2002; 129: 1155-1164.
- Adelfalk et al., 2009:** Adelfalk C, Janschek J, Revenkova E, Blei C, Liebe B, Göb E, Alsheimer M, Benavente R, de Boer E, Novak I, Höög C, Scherthan H, Jessberger R. Cohesin SMC1beta protects telomeres in meiocytes. *J Cell Biol*. 2009; 187: 185-199.
- Alberts et al., 2002:** Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*, 4<sup>th</sup> edition. New York: Garland Science. 2002.
- Alsheimer, 2009:** Alsheimer M. The dance floor of meiosis: evolutionary conservation of nuclear envelope attachment and dynamics of meiotic telomeres. In *Meiosis, Genome Dynamics, Volume 5*. Editors: Benavente R und Voff JN, Basel: Karger. 2009; 81-93.
- Alsheimer und Benavente, 1996:** Alsheimer M, Benavente R. Change of karyoskeleton during mammalian spermatogenesis: expression pattern of nuclear lamin C2 and its regulation. *Exp Cell Res*. 1996; 228: 181-188.
- Alsheimer et al., 1998:** Alsheimer M, Fecher E, Benavente R. Nuclear envelope remodelling during rat spermiogenesis: distribution and expression pattern of LAP2/thymopoietins. *J Cell Sci*. 1998;111: 2227-2234.
- Alsheimer et al., 1999:** Alsheimer M, von Glasenapp E, Hock R, Benavente R. Architecture of the nuclear periphery of rat pachytene spermatocytes: disruption of nuclear envelope proteins in relation to synaptonemal complex attachment sites. *Mol Biol Cell*. 1999; 10: 1235-1245.
- Alsheimer et al., 2000:** Alsheimer M, von Glasenapp E, Schnölzer M, Heid H, Benavente R. Meiotic lamin C2: the unique amino-terminal hexapeptide GNAEGR is essential for nuclear envelope association. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 13120-13125.
- Alsheimer et al., 2004:** Alsheimer M, Liebe B, Sewell L, Stewart CL, Scherthan H, Benavente R. Disruption of spermatogenesis in mice lacking A-type lamins. *J Cell Sci*. 2004; 117: 1173-1178.
- Alsheimer et al., 2005:** Alsheimer M, Drewes T, Schütz W, Benavente R. The cancer/testis antigen CAGE-1 is a component of the acrosome of spermatids and spermatozoa. *Eur J Cell Biol*. 2005; 84: 445-452.
- Alsheimer et al., 2011:** Alsheimer M, Jahn D, Schramm S, Benavente R. Nuclear lamins in mammalian spermatogenesis. In *Epigenetics and Human Health, Epigenetics and human reproduction*. Editors: Rousseaux S und Khochbin S, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin. 2011; doi: 10.1007/978-3-642-14773-9\_12.
- Andrä et al., 1997:** Andrä K, Lassmann H, Bittner R, Shorny S, Fässler R, Propst F, Wiche G. Targeted inactivation of plectin reveals essential function in maintaining the integrity of skin, muscle, and heart cytoarchitecture. *Genes Dev*. 1997; 11: 3143-3156.
- Apel et al., 2000:** Apel ED, Lewis RM, Grady RM, Sanes JR. Syne-1, a dystrophin- and Klarsicht-related protein associated with synaptic nuclei at the neuromuscular junction. *J Biol Chem*. 2000; 275: 31986-31995.
- Ashley et al., 2001:** Ashley T, Walpita D, de Rooij DG. Localization of two mammalian cyclin dependent kinases during mammalian meiosis. *J Cell Sci*. 2001; 114: 685-693.
- Attali et al., 2007:** Attali R, Warwar N, Israel A, Gurt I, McNally E, Puckelwartz M, Glick B, Nevo Y, Ben-Neriah Z, Melki J. Mutation of SYNE-1, encoding an essential component of the nuclear lamina, is responsible for autosomal recessive arthrogryposis. *Hum Mol Genet*. 2007; 18: 3462-3469.
- Bass, 2003:** Bass HW. Telomere dynamics unique to meiotic prophase: formation and significance of the bouquet. *Cell Mol Life Sci*. 2003; 60: 2319-2324.
- Bellvé et al., 1977:** Bellvé AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol*. 1977; 74: 68-85.
- Bengtsson und Otto, 2008:** Bengtsson L, Otto H. LUMA interacts with emerin and influences its distribution at the inner nuclear membrane. *J Cell Sci*. 2008; 121: 536-548.
- Bione et al., 1994:** Bione S, Maestrini E, Rivella S, Mancini M, Regis S, Romeo G, Toniolo D. Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery–Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet*. 1994; 8: 323–327.
- Broers et al., 2004:** Broers JL, Peeters EA, Kuijpers HJ, Ender J, Bouten CV, Oomens CW, Baaijens FP, Ramaekers FC. Decreased mechanical stiffness in LMNA-/- cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies. *Hum Mol Genet*. 2004;13: 2567-2580.

- Burke und Roux, 2009:** Burke B, Roux KJ. Nuclei take a position: managing nuclear location. *Dev Cell*. 2009; 17: 587-597.
- Burke und Stewart, 2006:** Burke B, Stewart CL. The laminopathies: the functional architecture of the nucleus and its contribution to disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2006; 7: 369-405.
- Cai et al., 2001:** Cai M, Huang Y, Ghirlando R, Wilson KL, Craigie R, Clore GM. Solution structure of the constant region of nuclear envelope protein LAP2 reveals two LEM-domain structures: one binds BAF the other binds DNA. *Embo J*. 2001; 16: 399-4407.
- Chi et al., 2009:** Chi YH, Cheng LI, Myers T, Ward JM, Williams E, Su Q, Faucette L, Wang JY, Jeang KT. Requirement for Sun1 in the expression of meiotic reproductive genes and piRNA. *Development*. 2009; 136: 965-73.
- Chikashige et al., 1994:** Chikashige Y, Ding DQ, Funabiki H, Haraguchi T, Mashiko S, Yanagida M, Hiraoka Y. Telomere-led premeiotic chromosome movement in fission yeast. *Science*. 1994; 264: 270-273.
- Chikashige et al., 2007:** Chikashige Y, Haraguchi T, Hiraoka Y. Another way to move chromosomes. *Chromosoma*. 2007; 116: 497-505.
- Chikashige et al., 2009:** Chikashige Y, Yamane M, Okamasa K, Tsutsumi C, Kojidani T, Sato M, Haraguchi T, Hiraoka Y. Membrane proteins Bqt3 and -4 anchor telomeres to the nuclear envelope to ensure chromosomal bouquet formation. *J Cell Biol*. 2009; 187: 413-427.
- Cohen et al., 2006:** Cohen PE, Pollack SE, Pollard JW. Genetic analysis of chromosome pairing, recombination, and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. *Endocr Rev*. 2006; 27: 398-426.
- Conrad et al., 2007:** Conrad MN, Lee CY, Wilkerson JL, Dresser ME. MPS3 mediates meiotic bouquet formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104: 8863-8868.
- Conrad et al., 2008:** Conrad MN, Lee CY, Chao G, Shinohara M, Kosaka H, Shinohara A, Conchello JA, Dresser ME. Rapid telomere movement in meiotic prophase is promoted by NDJ1, MPS3, and CSM4 and is modulated by recombination. *Cell*. 2008; 133: 1175-1187.
- Cooper et al., 1998:** Cooper JP, Watanabe Y, Nurse P. Fission yeast Taz1 protein is required for meiotic telomere clustering and recombination. *Nature*. 1998; 392: 828-831.
- Costa und Cooke, 2007:** Costa Y, Cooke HJ. Dissecting the mammalian synaptonemal complex using targeted mutations. *Chromosome Res*. 2007; 15: 579-589.
- Crisp et al., 2006:** Crisp M, Liu Q, Roux K, Rattner JB, Shanahan C, Burke B, Stahl PD, Hodzic D. Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol*. 2006; 172: 41-53.
- Dadoune, 2003:** Dadoune JP. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc Res Tech*. 2003; 61: 56-75.
- Dawe et al., 2007:** Dawe HR, Smith UM, Cullinane AR, Gerrelli D, Cox P, Badano JL, Blair-Reid S, Sriram N, Katsanis N, Attie-Bitach T, Afford SC, Copp AJ, Kelly DA, Gull K, Johnson CA. The Meckel-Gruber Syndrome Protein MKS1 and meckelin interact and are required for primary cilium formation. *Hum Mol Genet*. 2007; 16: 173-186.
- De Rooij, 2001:** De Rooij, DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction*. 2001; 221: 347-354.
- De Vries et al., 2005:** De Vries FA, de Boer E, van den Bosch M, Baarends WM, Ooms M, Yuan L, Liu JG, van Zeeland AA, Heyting C, Pastink A. Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev*. 2005; 19: 1376-1389.
- Dechat et al., 2000:** Dechat T, Vlcek S, Foisner R. Review: lamina-associated polypeptide 2 isoforms and related proteins in cell cycle-dependent nuclear structure dynamics. *J Struct Biol*. 2000; 129: 335-345.
- Ding et al., 2007:** Ding X, Xu R, Yu J, Xu T, Zhuang Y, Han M. SUN1 is required for telomere attachment to nuclear envelope and gametogenesis in mice. *Dev Cell*. 2007; 12: 863-872.
- Djinovic-Carugo et al., 2002:** Djinovic-Carugo K, Gautel M, Ylänne J, Young P. The spectrin repeat: a structural platform for cytoskeletal protein assemblies. *FEBS Lett*. 2002; 523: 119-123.
- Dym und Fawcett, 1971:** Dym M, Fawcett DW. Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol Reprod*. 1971; 4: 195-215.
- Esponda und Gimenez-Martin, 1972:** Esponda P, Gimenez-Martin G. The attachment of the synaptonemal complex to the nuclear envelope. An ultrastructural and cytochemical analysis. *Chromosoma*. 1972; 38: 405-417
- Fan und Beck, 2004:** Fan J, Beck KA. A role for spectrin superfamily member Syne-1 and kinesin II in cytokinesis. *J Cell Sci*. 2004; 117: 619-629.

- Fawcett und Phillips, 1969:** Fawcett DW, Phillips DM. The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoon. *Anat Rec.* 1969; 165: 153-164.
- Fawcett, 1975:** Fawcett DW. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol.* 1975; 44: 394-436.
- Fisher et al., 1986:** Fisher DZ, Chaudhary N, Blobel G. cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83: 6450-6454.
- Foisner et al., 1988:** Foisner R, Leichtfried FE, Herrmann H, Small JV, Lawson D, Wiche G. Cytoskeleton-associated plectin: in situ localization, in vitro reconstitution, and binding to immobilized intermediate filament proteins. *J Cell Biol.* 1988; 106: 723-733.
- Fridkin et al., 2004:** Fridkin A, Mills E, Margalit A, Neufeld E, Lee KK, Feinstein N, Cohen M, Wilson KL, Gruenbaum Y. Matefin, a *Caenorhabditis elegans* germ line-specific SUN-domain nuclear membrane protein, is essential for early embryonic and germ cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 6987-6992.
- Frohnert et al., 2010:** Frohnert C, Schweizer S, Hoyer-Fender S. SPAG4L/SPAG4L-2 are testis-specific SUN domain proteins restricted to the apical nuclear envelope of round spermatids facing the acrosome. *Mol Hum Reprod.* 2010. doi: 10.1093/molehr/gaa099.
- Fujita et al., 2007:** Fujita E, Tanabe Y, Hirose T, Aurrand-Lions M, Kasahara T, Imhof BA, Ohno S, Momoi T. Loss of partitioning-defective-3/isotype-specific interacting protein (par-3/ASIP) in the elongating spermatid of RA175 (IGSF4A/SynCAM)-deficient mice. *Am J Pathol.* 2007; 171: 1800-1810.
- Furukawa und Hotta, 1993:** Furukawa K, Hotta Y. cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *EMBO J.* 1993; 12: 97-106.
- Furukawa et al., 1994:** Furukawa K, Inagaki H, Hotta Y. Identification and cloning of an mRNA coding for a germ cell-specific A-type lamin in mice. *Exp Cell Res.* 1994; 212: 426-430.
- Gilbert, 2003:** Gilbert SF. *Developmental Biology*, 7<sup>th</sup> edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers. 2003.
- Gliki et al., 2004:** Gliki G, Ebnet K, Aurrand-Lions M, Imhof BA, Adams RH. Spermatid differentiation requires the assembly of a cell polarity complex downstream of junctional adhesion molecule-C. *Nature.* 2004; 431: 320-324.
- Göb, 2007:** Göb E. Diplomarbeit: Reorganisation der Kernhülle während der Spermatogenese von Nagern: Expressionsmuster der SUN-Proteinfamilie. Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg. 2007.
- Göb et al., 2010:** Göb E, Schmitt J, Benavente R, Alsheimer M. Mammalian sperm head formation involves different polarization of two novel LINC complexes. *PLoS ONE.* 2010; 5: e12072. doi:10.1371/journal.pone.0012072.
- Görlich und Kutay, 1999:** Görlich D, Kutay U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Dev Biol.* 1999; 15: 607-660.
- Grady et al., 2005:** Grady RM, Starr DA, Ackerman GL, Sanes JR, Han M. Syne Proteins anchor muscle nuclei at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 4359-4364.
- Graumann et al., 2010:** Graumann K, Runions J, Evans DE. Characterization of SUN-domain proteins at the higher plant nuclear envelope. *Plant J.* 2010; 61: 134-144.
- Gros-Louis et al., 2007:** Gros-Louis F, Dupré N, Dion P, Fox MA, Laurent S, Verreault S, Sanes JR, Bouchard JP, Rouleau GA. Mutations in SYNE1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia. *Nat Genet.* 2007; 39: 80-85.
- Gruenbaum et al., 2003:** Gruenbaum Y, Goldman RD, Meyuhar R, Mills E, Margalit A, Fridkin A, Dayani Y, Prokocimer M, Enosh A. The nuclear lamina and its functions in the nucleus. *Int Rev Cytol.* 2003; 226: 1-62.
- Gruenbaum et al., 2005:** Gruenbaum Y, Margalit A, Goldman RD, Shumaker DK, Wilson KL. The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6: 21-31.
- Guttman et al., 1999:** Guttman JA, Mulholland DJ, Vogl AW. Plectin is concentrated at intercellular junctions and at the nuclear surface in morphologically differentiated rat Sertoli cells. *Anat Rec.* 1999; 254: 418-428.
- Hagan und Yanagida, 1995:** Hagan I, Yanagida M. The product of the spindle formation gene *sad1+* associates with the fission yeast spindle pole body and is essential for viability. *J Cell Biol.* 1995; 129: 1033-1047.
- Handel und Schimenti, 2010:** Handel MA, Schimenti JC. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet.* 2010; 11: 124-136.

- Haque et al., 2006:** Haque F, Lloyd DJ, Smallwood DT, Dent CL, Shanahan CM, Fry AM, Trembath RC, Shackleton S. SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. *Mol Cell Biol.* 2006; 26: 3738-3751.
- Haque et al., 2010:** Haque F, Mazzeo D, Patel JT, Smallwood DT, Ellis JA, Shanahan CM, Shackleton S. Mammalian SUN protein interaction networks at the inner nuclear membrane and their role in laminopathy disease processes. *J Biol Chem.* 2010; 285: 3487-3498.
- Harris et al., 1995:** Harris CA, Andryuk PJ, Cline SW, Mathew S, Siekierka JJ, Goldstein G. Structure and mapping of the human thymopoietin (TMPO) gene and relationship of human TMPO beta to rat lamin-associated polypeptide 2. *Genomics.* 1995; 28: 198-205.
- Hasan et al., 2006:** Hasan S, Güttinger S, Mühlhäusser P, Anderegg F, Bürgler S, Kutay U. Nuclear envelope localization of human UNC84A does not require nuclear lamins. *FEBS Lett.* 2006; 580: 1263-1268.
- Hassold et al., 2007:** Hassold T, Hall H, Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet.* 2007; 16: 203-208.
- Hecht, 1998:** Hecht NB. Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *Bioessays.* 1998; 20: 555-561.
- Hellemans et al., 2004:** Hellemans J, Preobrazhenska O, Willaert A, Debeer P, Verdonk PC, Costa T, Janssens K, Menten B, Van Roy N, Vermeulen SJ, Savarirayan R, Van Hul W, Vanhoenacker F, Huylebroeck D, De Paepe A, Naeyaert JM, Vandesompele J, Speleman F, Verschueren K, Coucke PJ, Mortier GR. Loss-of-function mutations in LEMD3 result in osteopoikilosis, Buschke-Ollendorff syndrome and melorheostosis. *Nat Genet.* 2004; 36: 1213-1218.
- Hermo et al., 2010a:** Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: Background to spermatogenesis, spermatogonia and spermatocytes. *Microsc Res Tech.* 2010; 73: 241-278.
- Hermo et al., 2010b:** Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 2: Changes in spermatid organelles associated with development of spermatozoa. *Microsc Res Tech.* 2010; 73: 279-319.
- Hetzer und Wente, 2009:** Hetzer MW, Wente SR. Border control at the nucleus: biogenesis and organization of the nuclear membrane and pore complexes. *Dev Cell.* 2009; 17: 606-616.
- Hiraoka und Dernburg, 2009:** Hiraoka Y, Dernburg AF. The SUN rises on meiotic chromosome dynamics. *Dev Cell.* 2009; 17: 598-605.
- Ho, 2010:** Ho HC. Redistribution of nuclear pores during formation of the redundant nuclear envelope in mouse spermatids. *J Anat.* 2010; 216: 525-532.
- Hodzic et al., 2004:** Hodzic DM, Yeater DB, Bengtsson L, Otto H, Stahl PD. Sun2 is a novel mammalian inner nuclear membrane protein. *J Biol Chem.* 2004; 279: 25805-25812.
- Hoffmann et al., 2002:** Hoffmann K, Dreger CK, Olins AL, Olins DE, Shultz LD, Lucke B, Karl H, Kaps R, Muller D, Vaya A, Aznar J, Ware RE, Sotelo-Cruz N, Lindner TH, Herrmann H, Reis A, Sperling K. Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huet anomaly). *Nat Genet.* 2002; 31: 410-414.
- Höger et al., 1988:** Höger TH, Zatloukal K, Waizenegger I, Krohne G. Characterization of a second highly conserved B-type lamin present in cells previously thought to contain only a single B-type lamin. *Chromosoma.* 1988; 99: 379-390.
- Holmer und Worman, 2001:** Holmer L, Worman HJ. Inner nuclear membrane proteins: functions and targeting. *Cell Mol Life Sci.* 2001; 58: 1741-1747.
- Jahn et al., 2010:** Jahn D, Schramm S, Benavente R, Alsheimer M. Dynamic properties of meiosis-specific lamin C2 and its impact on nuclear envelope integrity. *Nucleus.* 2010; 1: 273-283.
- Jaspersen et al., 2006:** Jaspersen SL, Martin AE, Glazko G, Giddings TH Jr, Morgan G, Mushegian A, Winey M. The Sad1-UNC-84 homology domain protein Mps3 interacts with Mps2 to connect the spindle pole body with the nuclear envelope. *J Cell Biol.* 2006; 174: 665-675.
- Johnson et al., 2004:** Johnson KJ, Zecevic A, Kwon EJ. Protocadherin alpha3 acts at sites distinct from classic cadherins in rat testis and sperm. *Biol Reprod.* 2004; 70: 303-312.
- Jongens et al., 1992:** Jongens TA, Hay B, Jan LY, Jan YN. The germ cell-less gene product: a posteriorly localized component necessary for germ cell development in *Drosophila*. *Cell.* 1992; 70: 569-84.

- Ketema et al., 2007: Ketema, M., Wilhelmsen, K., Kuikman, I., Janssen, H., Hodzic, D., Sonnenberg, A. Requirements for the localization of nesprin-3 at the nuclear envelope and its interaction with plectin. *J Cell Sci.* 2007; 120: 3384-3394.
- Khatau et al., 2009: Khatau SB, Hale CM, Stewart-Hutchinson PJ, Patel MS, Stewart CL, Searson PC, Hodzic D, Wirtz D. A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 19017-1922.
- Khatau et al., 2010: Khatau SB, Kim D-H, Hale CM, Bloom RJ, Wirtz D. The perinuclear actin in health and disease. *Nucleus.* 2010; 1: 1-6.
- Kierszenbaum und Tres, 2004: Kierszenbaum AL, Tres LL. The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol.* 2004; 67:271-284.
- Kierszenbaum et al., 2003: Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Mol Biol Cell.* 2003; 14: 4628-4640.
- Kitten und Nigg, 1991: Kitten GT, Nigg EA. The CaaX motif is required for isoprenylation, carboxyl methylation, and nuclear membrane association of lamin B2. *J Cell Biol.* 1991; 113: 13-23.
- Kozsul und Kleckner, 2009: Kozsul R, Kleckner N. Dynamic chromosome movements during meiosis: a way to eliminate unwanted connections? *Trends Cell Biol.* 2009; 19: 716-724.
- Kracklauer et al., 2007: Kracklauer MP, Banks SM, Xie X, Wu Y, Fischer JA. *Drosophila* klaroid encodes a SUN domain protein required for Klarisicht localization to the nuclear envelope and nuclear migration in the eye. *Fly (Austin).* 2007; 1: 75-85.
- Kracklauer et al., 2010: Kracklauer MP, Wiora HM, Deery WJ, Chen X, Bolival B Jr, Romanowicz D, Simonette RA, Fuller MT, Fischer JA, Beckingham KM. The *Drosophila* SUN protein Spag4 cooperates with the coiled-coil protein Yuri Gagarin to maintain association of the basal body and spermatid nucleus. *J Cell Sci.* 2010; 123: 2763-2772.
- Krohne, 1998: Krohne G. Lamin assembly in vivo. *Subcell Biochem.* 1998; 31: 563-568.
- Lammerding et al., 2004: Lammerding J, Schulze PC, Takahashi T, Kozlov S, Sullivan T, Kamm RD, Stewart CL, Lee RT. Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J Clin Invest.* 2004; 113: 370-378.
- Lammers et al., 1994: Lammers JHM, Offenberg HH, van Aalderen M, Vink ACG, Dietrich AJJ, Heyting C. The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol.* 1994; 14: 1137-1146.
- Lee et al., 2002: Lee KK, Starr D, Cohen M, Liu J, Han M, Wilson KL, Gruenbaum Y. Lamin-dependent localization of UNC-84, a protein required for nuclear migration in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell.* 2002; 13: 892-901.
- Lee et al., 2007: Lee JS, Hale CM, Panorchan P, Khatau SB, George JP, Tseng Y, Stewart CL, Hodzic D, Wirtz D. Nuclear lamin A/C deficiency induces defects in cell mechanics, polarization, and migration. *Biophys J.* 2007; 93: 2542-2552.
- Lei et al., 2009: Lei K, Zhang X, Ding X, Guo X, Chen M, Zhu B, Xu T, Zhuang Y, Xu R, Han M. SUN1 and SUN2 play critical but partially redundant roles in anchoring nuclei in skeletal muscle cells in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 10207-10212.
- Liebe et al., 2004: Liebe B, Alsheimer M, Höög C, Benavente R, Scherthan H. Telomere attachment, meiotic chromosome condensation, pairing, and bouquet stage duration are modified in spermatocytes lacking axial elements. *Mol Biol Cell.* 2004; 15: 827-837.
- Lin und Engelmann, 2003: Lin CW, Engelman A. The barrier-to-autointegration factor is a component of functional human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *J Virol.* 2003; 77: 5030-5036.
- Lin et al., 2000: Lin F, Blake DL, Callebaut I, Skerjanc IS, Holmer L, McBurney MW, Paulin-Levasseur M, Worman HJ. MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated polypeptide 2 and emerin. *J Biol Chem.* 2000; 275: 4840-4847.
- Link, 2010: Link J. Diplomarbeit: Funktionelle Organisation des meiotischen Zellkerns: Synapsis, Rekombination und Telomeranheftung meiotischer Chromosomen in Lamin C2-defizienten Mäusen. Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg. 2010.
- Liu et al., 2003: Liu J, Lee KK, Segura-Totten M, Neufeld E, Wilson KL, Gruenbaum Y. MAN1 and emerin have overlapping function(s) essential for chromosome segregation and cell division in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 4598-4603.

- Liu et al., 2004: Liu L, Franco S, Spyropoulos B, Moens PB, Blasco MA, Keefe DL. Irregular telomeres impair meiotic synapsis and recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 6496-6501.
- Liu et al., 2007: Liu Q, Pante N, Misteli T, Elsagga M, Crisp M, Hodzic D, Burke B, Roux KJ. Functional association of Sun1 with nuclear pore complexes. *J Cell Biol*. 2007; 178: 785-798.
- Longo et al., 1987: Longo FJ, Krohne G, Franke WW. Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *J Cell Biol*. 1987; 105: 1105-1120.
- Lu et al., 2008: Lu W, Gotzmann J, Sironi L, Jaeger VM, Schneider M, Lüke Y, Uhlén M, Szigartyo CA, Brachner A, Ellenberg J, Foisner R, Noegel AA, Karakesisoglou I. Sun1 forms immobile macromolecular assemblies at the nuclear envelope. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1783: 2415-2426.
- Lüke et al., 2008: Lüke Y, Zaim H, Karakesisoglou I, Jaeger VM, Sellin L, Lu W, Schneider M, Neumann S, Beijer A, Munck M, Padmakumar VC, Gloy J, Walz G, Noegel AA. Nesprin-2 Giant (NUANCE) maintains nuclear envelope architecture and composition in skin. *J Cell Sci*. 2008; 121: 1887-1898.
- Lusk et al., 2007: Lusk CP, Blobel G, King MC. Highway to the inner nuclear membrane: rules for the road. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8: 414-420.
- MacQueen und Villeneuve, 2001: MacQueen AJ und Villeneuve AM. Nuclear reorganization and homologous chromosome pairing during meiotic prophase require *C. elegans* chk-2. *Genes Dev*. 15 : 1674-1687.
- Malkov et al., 1998: Malkov M, Fisher Y, Don J. Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biol Reprod*. 1998; 59: 84-92.
- Malone et al., 1999: Malone CJ, Fixsen WD, Horvitz HR, Han M. UNC-84 localizes to the nuclear envelope and is required for nuclear migration and anchoring during *C. elegans* development. *Development*. 1999; 126: 3171-3181.
- Malone et al., 2003: Malone CJ, Misner L, Le Bot N, Tsai MC, Campbell JM, Ahringer J, White JG. The *C. elegans* hook protein, ZYG-12, mediates the essential attachment between the centrosome and nucleus. *Cell*. 2003; 115: 825-36.
- Martin et al., 1995: Martin L, Crimando C, Gerace L. cDNA cloning and characterization of lamina-associated polypeptide 1C (LAP1C), an integral protein of the inner nuclear membrane. *J Biol Chem*. 1995; 270: 8822-8828.
- Matzuk und Lamb, 2002: Matzuk MM, Lamb DJ. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat Cell Biol*. 2002; 4: 41-49.
- Matzuk und Lamb, 2008: Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med*. 2008; 14:1197-1213.
- McKeon et al., 1986: McKeon FD, Kirschner MW, Caput D. Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature*. 1986; 319: 463-468.
- McLaren, 1991: McLaren A. Development of the mammalian gonad: the fate of the supporting cell lineage. *Bioessays*. 1991; 13: 151-6.
- Meistrich et al., 1994: Meistrich ML, Kasai K, Olds-Clarke P, MacGregor GR, Berkowitz AD, Tung KS. Deficiency in fertilization by morphologically abnormal sperm produced by *azh* mutant mice. *Mol Reprod Dev*. 1994; 37: 69-77.
- Méjat und Misteli, 2010: Méjat A, Misteli T. LINC complexes in health and disease. *Nucleus*. 2010; 1: 40-52.
- Mekhail und Moazed, 2010: Mekhail K, Moazed D. The nuclear envelope in genome organization, expression and stability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010; 11: 317-328.
- Meshorer und Gruenbaum, 2008: Meshorer E, Gruenbaum Y. Rejuvenating premature aging. *Nat Med*. 2008; 14: 713-715.
- Miki et al., 2002: Miki F, Okazaki K, Shimanuki M, Yamamoto A, Hiraoka Y, Niwa O. The 14-kDa dynein light chain-family protein Dlc1 is required for regular oscillatory nuclear movement and efficient recombination during meiotic prophase in fission yeast. *Mol Biol Cell*. 2002; 13: 930-946.
- Mislow et al., 2002: Mislow JM, Holaska JM, Kim MS, Lee KK, Segura-Totten M, Wilson KL, McNally EM. Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro. *FEBS Lett*. 2002; 525: 135-140.
- Mittelbronn et al., 2008: Mittelbronn M, Sullivan T, Stewart CL, Bornemann A. Myonuclear degeneration in LMNA null mice. *Brain Pathol*. 2008; 18: 338-343.
- Morris und Randles, 2010: Morris GE, Randles KN. Nesprin isoforms: are they inside or outside the nucleus? *Biochem Soc Trans*. 2000; 38: 278-280.
- Mosley-Bishop et al., 1999: Mosley-Bishop KL, Li Q, Patterson L, Fischer JA. Molecular analysis of the *klarsicht* gene and its role in nuclear migration within differentiating cells of the *Drosophila* eye. *Curr Biol*. 1999; 9: 1211-1220.

- Mylonis et al., 2004:** Mylonis I, Drosou V, Brancorsini S, Nikolakaki E, Sassone-Corsi P, Giannakouros T. Temporal association of protamine 1 with the inner nuclear membrane protein lamin B receptor during spermiogenesis. *J Biol Chem.* 2004; 279: 11626-11631.
- Nagano und Arahata, 2000:** Nagano A, Arahata K. Nuclear envelope proteins and associated diseases. *Curr Opin Neurol.* 2000; 13: 533-539.
- Nimmo et al., 1998:** Nimmo ER, Pidoux AL, Perry PE, Allshire RC. Defective meiosis in telomere-silencing mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature.* 1998; 392: 825-828.
- Niwa et al., 2000:** Niwa O, Shimanuki M, Miki F. Telomere-led bouquet formation facilitates homologous chromosome pairing and restricts ectopic interaction in fission yeast meiosis. *EMBO J.* 2000; 19: 3831-3840.
- Ohba et al., 2004:** Ohba T, Schirmer EC, Nishimoto T, Gerace L. Energy- and temperature-dependent transport of integral proteins to the inner nuclear membrane via the nuclear pore. *J Cell Biol.* 2004; 167: 1051-1062.
- Olins et al., 2008:** Olins AL, Hoang TV, Zwerger M, Herrmann H, Zentgraf H, Noegel AA, Karakesisoglou I, Hodzic D, Olins DE. The LINC-less granulocyte nucleus. *Eur J Cell Biol.* 2009; 88: 203-214.
- Öllinger et al., 2005:** Öllinger R, Alsheimer M, Benavente R. Mammalian protein SCP1 forms synaptonemal complex-like structures in the absence of meiotic chromosomes. *Mol Biol Cell.* 2005; 16: 212-217.
- Ortega et al., 2003:** Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martín A, Dubus P, Sotillo R, Barbero JL, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet.* 2003; 35: 25-31.
- Padmakumar et al., 2004:** Padmakumar VC, Abraham S, Braune S, Noegel AA, Tunggal B, Karakesisoglou I, Korenbaum E. Enaptin, a giant actin-binding protein, is an element of the outer nuclear membrane and the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res.* 2004; 295: 330-339.
- Padmakumar et al., 2005:** Padmakumar VC, Libotte T, Lu W, Zaim H, Abraham S, Noegel AA, Gotzmann J, Foisner R, Karakesisoglou I. The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J Cell Sci.* 2005; 118: 3419-3430.
- Page und Hawley, 2003:** Page SL, Hawley RS. Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science.* 2003; 301: 785-789.
- Page und Hawley, 2004:** Page SL, Hawley RS. The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004; 20: 525-558.
- Parvinen und Söderström, 1976:** Parvinen M, Söderström KO. Chromosome rotation and formation of synapsis. *Nature.* 1976; 260: 534-535.
- Penkner et al., 2007:** Penkner A, Tang L, Novatchkova M, Ladurner M, Fridkin A, Gruenbaum Y, Schweizer D, Loidl J, Jantsch V. The nuclear envelope protein Matefin/SUN-1 is required for homologous pairing in *C. elegans* meiosis. *Dev Cell.* 2007; 12: 873-85.
- Penkner et al., 2009:** Penkner AM, Fridkin A, Gloggnitzer J, Baudrimont A, Machacek T, Woglar A, Csaszar E, Pasierbek P, Ammerer G, Gruenbaum Y, Jantsch V. Meiotic chromosome homology search involves modifications of the nuclear envelope protein Matefin/SUN-1. *Cell.* 2009; 139: 920-933.
- Petronczki et al., 2003:** Petronczki M, Siomos MF, Nasmyth K. Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell.* 2003; 112: 423-440.
- Phillips und Dernburg, 2006:** Phillips CM, Dernburg AF. A family of zinc-finger proteins is required for chromosome-specific pairing and synapsis during meiosis in *C. elegans*. *Dev Cell.* 2006; 11: 817-829.
- Pinkerton et al., 1961:** Pinkerton JH, McKay DG, Adams EC, Hertig AT. Development of the human ovary - a study using histochemical technics. *Obstet Gynecol.* 1961; 18: 152-181.
- Puckelwartz et al., 2009:** Puckelwartz MJ, Kessler E, Zhang Y, Hodzic D, Randles KN, Morris G, Earley JU, Hadhazy M, Holaska JM, Mewborn SK, Pytel P, McNally EM. Disruption of nesprin-1 produces an Emery Dreifuss muscular dystrophy-like phenotype in mice. *Hum Mol Genet.* 2009; 18: 607-620.
- Rolls et al., 1999:** Rolls MM, Stein PA, Taylor SS, Ha E, McKeon F, Rapoport TA. A visual screen of a GFP-fusion library identifies a new type of nuclear envelope membrane protein. *J Cell Biol.* 1999; 146: 29-44.
- Roux et al., 2009:** Roux KJ, Crisp ML, Liu Q, Kim D, Kozlov S, Stewart CL, Burke B. Nesprin 4 is an outer nuclear membrane protein that can induce kinesin-mediated cell polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 2194-2199.

- Russell et al., 1991:** Russell LD, Russell JA, MacGregor GR, Meistrich ML. Linkage of manchette microtubules to the nuclear envelope and observations of the role of the manchette in nuclear shaping during spermiogenesis in rodents. *Am J Anat.* 1991; 192: 97-120.
- Salpingidou et al., 2007:** Salpingidou G, Smertenko A, Hausmanowa-Petruciewicz I, Hussey PJ, Hutchinson CJ. A novel role for the nuclear membrane protein emerin in association of the centrosome to the outer nuclear membrane. *J Cell Biol.* 2007; 178: 897-904.
- Sato et al., 2009:** Sato A, Isaac B, Phillips CM, Rillo R, Carlton PM, Wynne DJ, Kasad RA, Dernburg AF. Cytoskeletal forces span the nuclear envelope to coordinate meiotic chromosome pairing and synapsis. *Cell.* 2009; 139: 907-919.
- Scherthan, 2003:** Scherthan H. Knockout mice provide novel insights into meiotic chromosome and telomere dynamics. *Cytogenet Genome Res.* 2003; 103: 235-244.
- Scherthan, 2007:** Scherthan H. Telomere attachment and clustering during meiosis. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64: 117-124.
- Scherthan et al., 2010:** Scherthan H, Sfeir A, de Lange T. Rap1-independent telomere attachment and bouquet formation in mammalian meiosis. *Chromosoma.* 2010; doi: 10.1007/s00412-010-0295-4.
- Schirmer und Foisner, 2007:** Schirmer EC, Foisner R. Proteins that associate with lamins: many faces, many functions. *Exp Cell Res.* 2007; 313: 2167-2179.
- Schirmer und Gerace, 2005:** Schirmer EC, Gerace L. The nuclear membrane proteome: extending the envelope. *Trends Biochem Sci.* 2005; 30: 551-558.
- Schmitt, 2008:** Schmitt J. Dissertation: Proteine der Kernhülle und deren Rolle bei der Umgestaltung des Zellkerns meiotischer und postmeiotischer Zellen von Säugern. Bayerische Julius-Maximilians Universität Würzburg. 2008.
- Schmitt et al., 2007:** Schmitt J, Benavente R, Hodzic D, Höög C, Stewart CL, Alsheimer M. Transmembrane protein Sun2 is involved in tethering mammalian meiotic telomeres to the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 7426-7431.
- Schütz et al., 2005a:** Schütz W, Alsheimer M, Öllinger R, Benavente R. Nuclear envelope remodeling during mouse spermiogenesis: postmeiotic expression and redistribution of germline lamin B3. *Exp Cell Res.* 2005; 307: 285-291.
- Schütz et al., 2005b:** Schütz W, Benavente R, Alsheimer M. Dynamic properties of germ line-specific lamin B3: the role of the shortened rod domain. *Eur J Cell Biol.* 2005; 84: 649-662.
- Seifert et al., 1992:** Seifert GJ, Lawson D, Wiche G. Immunolocalization of the intermediate filament-associated protein plectin at focal contacts and actin stress fibers. *Eur J Cell Biol.* 1992; 59: 138-147.
- Shimi et al., 2004:** Shimi T, Koujin T, Segura-Totten M, Wilson KL, Haraguchi T, Hiraoka Y. Dynamic interaction between BAF and emerin revealed by FRAP, FLIP, and FRET analyses in living HeLa cells. *J Struct Biol.* 2004; 147: 31-41.
- Siderakis und Tarsounas, 2007:** Siderakis M, Tarsounas M. Telomere regulation and function during meiosis. *Chromosome Res.* 2007; 15: 667-679.
- Starr, 2009:** Starr DA. A nuclear-envelope bridge positions nuclei and moves chromosomes. *J Cell Sci.* 2009; 122: 577-586.
- Starr und Han, 2002:** Starr DA, Han M. Role of ANC-1 in tethering nuclei to the actin cytoskeleton. *Science.* 2002; 298: 406-409.
- Starr und Fischer, 2005:** Starr DA, Fischer JA. KASH'n Karry: the KASH domain family of cargo-specific cytoskeletal adaptor proteins. *Bioessays.* 2005; 27, 1136-1146.
- Starr und Fridolfsson, 2010:** Starr DA, Fridolfsson HN. Interactions between nuclei and the cytoskeleton are mediated by SUN-KASH nuclear-envelope bridges. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010; 26: 421-444.
- Stewart-Hutchinson et al., 2008:** Stewart-Hutchinson PJ, Hale CM, Wirtz D, Hodzic D. Structural requirements for the assembly of LINC complexes and their function in cellular mechanical stiffness. *Exp Cell Res.* 2008; 314: 1892-1905.
- Stuurman et al., 1998:** Stuurman N, Heins S, Aebi U. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol.* 1998; 122: 42-66.
- Sullivan et al., 1999:** Sullivan T, Escalante-Alcalde D, Bhatt, H, Anver, M, Bhat N, Nagashima K, Stewart CL, Burke B. Loss of A-type lamin expression comprises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol.* 1999; 147: 913-920.
- Sun et al., 1989:** Sun H, Treco D, Schultes NP, Szostak JW. Double-strand breaks at an initiation site for meiotic gene conversion. *Nature.* 1989; 338: 87-90.

- Tilney et al., 1973:** Tilney LG, Bryan J, Bush DJ, Fujiwara K, Mooseker MS, Murphy DB, Snyder DH. Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *J Cell Biol.* 1973; 59: 267-275.
- Tomita und Cooper, 2007:** Tomita K, Cooper JP. The telomere bouquet controls the meiotic spindle. *Cell.* 2007; 130: 113-126.
- Toshimori und Ito, 2003:** Toshimori K, Ito C. Formation and organization of the mammalian sperm head. *Arch Histol Cytol.* 2003; 66: 383-396.
- Tsuchiya et al., 1999:** Tsuchiya Y, Hase A, Ogawa M, Yorifuji H, Arahata K. Distinct regions specify the nuclear membrane targeting of emerin, the responsible protein for Emery–Dreifuss muscular dystrophy. *Eur J Biochem.* 1999; 259: 859–865.
- Turgay et al., 2010:** Turgay Y, Ungricht R, Rothballer A, Kiss A, Csucs G, Horvath P, Kutay U. A classical NLS and the SUN domain contribute to the targeting of SUN2 to the inner nuclear membrane. *EMBO J.* 2010; 29: 2262-2275.
- Tzur et al., 2006:** Tzur YB, Wilson KL, Gruenbaum Y. SUN-domain proteins: „Velcro“ that links the nucleoskeleton to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7: 782-788.
- Vaughan et al., 2001:** Vaughan A, Alvarez-Reyes M, Bridger JM, Broers JL, Ramaekers FC, Wehnert M, Morris GE, Whitfield WGF, Hutchison CJ. emerin and lamin C depend on lamin A for localization at the nuclear envelope. *J Cell Sci.* 2001; 114: 2577-2590.
- Vergnes et al., 2004:** Vergnes L, Peterfly M, Bergo MO, Young SG, Reue K. Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 10428-10433.
- Vester et al., 1993:** Vester B, Smith A, Krohne G, Benavente R. Presence of a nuclear lamina in pachytene spermatocytes of the rat. *J Cell Sci.* 1993; 104, 557-563.
- Viera et al., 2009:** Viera A, Rufas JS, Martínez I, Barbero JL, Ortega S, Suja JA. CDK2 is required for proper homologous pairing, recombination and sex-body formation during male mouse meiosis. *J Cell Sci.* 2009;122: 2149-2159.
- Villeneuve und Hillers, 2001:** Villeneuve AM, Hillers, KJ. Whence meiosis. *Cell.* 2001; 106: 647-650.
- Wang und Höög, 2006:** Wang H, Höög C. Structural damage to meiotic chromosomes impairs DNA recombination and checkpoint control in mammalian oocytes. *J Cell Biol.* 2006; 173: 485-495.
- Ward und Coffey, 1991:** Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod.* 1991; 44: 569-574.
- Warren et al., 2005:** Warren DT, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM. Nesprins: intracellular scaffolds that maintain cell architecture and coordinate cell function? *Expert Rev Mol Med.* 2005. 7: 1-15.
- Waterham et al., 2003:** Waterham HR, Koster J, Mooyer P, Noort Gv G, Kelley RI, Wilcox WR, Wanders RJ, Hennekam RC, Oosterwijk JC. Autosomal recessive HEM/Greenberg skeletal dysplasia is caused by 3 beta-hydroxysterol delta 14-reductase deficiency due to mutations in the lamin B receptor gene. *Am J Hum Genet.* 2003; 72: 1013–1017.
- Whitby, 2005:** Whitby MC. Making crossover during meiosis. *Biochem Soc Trans.* 2005; 33: 1451-1455.
- Wiche, 1998:** Wiche G. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J Cell Sci.* 1998; 111: 2477-2486.
- Wilhelmsen et al., 2005:** Wilhelmsen K, Litjens SH, Kuikman I, Tshimbalanga N, Janssen H, van den Bout I, Raymond K, Sonnenberg A. Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J Cell Biol.* 2005; 171: 799-810.
- Woollam et al., 1967:** Woollam DH, Millen JW, Ford EH. Points of attachment of pachytene chromosomes to the nuclear membrane in mouse spermatocytes. *Nature.* 1967; 213: 298-299.
- Worman und Bonne, 2007:** Worman HJ, Bonne G. „Laminopathies“: a wide spectrum of human diseases. *Exp Cell Res.* 2007; 313: 2121-2133.
- Worman und Foisner, 2010:** Worman HJ, Foisner, R. The nuclear envelope from basic biology to therapy. *Biochem Soc Trans.* 2010; 38: 253-256.
- Worman et al., 1988:** Worman HJ, Yuan J, Blobel G, Georgatos SD. A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85: 8531-8534.
- Xiong et al., 2008:** Xiong H, Rivero F, Euteneuer U, Mondal S, Mana-Capelli S, Laroche D, Vogel A, Gassen B, Noegel AA. Dictyostelium Sun-1 connects the centrosome to chromatin and ensures genome stability. *Traffic.* 2008; 9: 708-24.
- Yoshinaga und Toshimori, 2003:** Yoshinaga K, Toshimori K. Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation. *Microsc Res Tech.* 2003; 61: 39-45.

- Yu et al., 2011:** Yu J, Lei K, Zhou M, Craft CM, Xu G, Xu T, Zhuang Y, Xu R, Han M. KASH protein Syne-2/Nesprin-2 and SUN proteins SUN1/2 mediate nuclear migration during mammalian retinal development. *Hum Mol Genet.* 2011; doi:10.1093/hmg/ddq549.
- Yuan et a., 2000:** Yuan L, Liu JG, Zhao J, Brundell E, Daneholt B, Höög C. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell.* 2000; 5: 73-83.
- Yuan et al., 2002:** Yuan L, Liu JG, Hoja MR, Wilbertz J, Nordqvist K, Höög C. Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science.* 2002; 296: 1115-1118.
- Zewe et al., 1991:** Zewe M, Höger TH, Fink T, Lichter P, Krohne G, Franke WW. Gene structure and chromosomal localization of the murine lamin B2 gene. *Eur J Cell Biol.* 1991; 56: 342-350.
- Zhang et al., 2001:** Zhang Q, Skepper JN, Yang F, Davies JD, Hegyi L, Roberts RG, Weissberg PL, Ellis JA, Shanahan CM. Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *J Cell Sci.* 2001; 114: 4485-4498.
- Zhang et al., 2007:** Zhang Q, Bethmann C, Worth NF, Davies JD, Wasner C, Feuer A, Ragnauth CD, Yi Q, Mellad JA, Warren DT, Wheeler MA, Ellis JA, Skepper JN, Vorgerd M, Schlotter-Weigel B, Weissberg PL, Roberts RG, Wehnert M, Shanahan CM. Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *Hum Mol Genet.* 2007; 16: 2816-2833.
- Zhang et al., 2009:** Zhang X, Lei K, Yuan X, Wu X, Zhuang Y, Xu T, Xu R, Han M. SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 complexes connect centrosomes to the nucleus during neurogenesis and neuron migration in mice. *Neuron.* 2009; 64: 173-187.
- Zhen et al., 2002:** Zhen YY, Libotte T, Munck M, Noegel AA, Korenbaum E. NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* 2002; 115: 3207-3222.
- Zickler und Kleckner, 1998:** Zickler D, Kleckner N. The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu Rev Genet.* 1998; 32: 619-697.
- Zickler und Kleckner, 1999:** Zickler D, Kleckner N. Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet.* 1999; 33: 603-754.
- Zitanski et al., 2010:** Zitanski N, Borth H, Ackermann F, Mayer D, Vieweg L, Breit A, Gudermann T, Boekhoff I. The „acrosome synapse“. *Commun Integr Biol.* 2010; 3: 1-9.

## 9 Abkürzungen

2D	Zweidimensional
%	Prozent
°C	Grad Celsius
®	registriertes Warenzeichen
™	nicht registriertes Warenzeichen
$\alpha$	alpha
$\beta$	beta
$\gamma$	gamma
$\delta$	delta
$\Delta$	Delta
$\epsilon$	epsilon
$\zeta$	zeta
$\epsilon$	eta
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
ABD	Aktin-Bindungs-Domäne
AP	Anheftungsstelle (attachment plate)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure, Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar, Basenpaare
BAF	Barrier-to-autointegration Faktor
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	zenti ( $10^{-2}$ )
C-(terminal, Terminus)	Carboxy-(terminal, Terminus)
ca.	circa
CC	Coiled-coil
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CE	zentrales Element (central element)
CLSM	konfokales Laser scanning Mikroskop (confocal laser scanning microscope)
cm (cm <sup>2</sup> )	Zentimeter (Quadratzentimeter)
CMV	Cytomegalo
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
dd	doppelt destilliert, didesoxy-
ddNTP	2',3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosidtriphosphaten
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (enhanced chemiluminescence)
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein (enhanced green fluorescent protein)
EGTA	Ethylenglycol-bis( $\beta$ -aminoethyl)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
e. H.	eigene Herstellung

ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere (et altera)
FL	volle Länge (full length)
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCL	Germ cell less
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
Gp	Meerschweinchen (guinea pig)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde (hour)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
IAM	innere akrosomale Membran
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
INM	innere Kernmembran (inner nuclear membrane)
kDa	Kilodalton
KASH	Klarsicht-Anc-1-Syne Homologie
l	Liter
L	Leucin-Zipper
Lap1	Lamina-assoziiertes Polypeptide1
Lap2	Lamina-assoziiertes Polypeptide2
LB	Luria-Bertani
LBR	Lamin B Rezeptor
LE	laterales Element
LINC	Linker von Kernskelett und Zytoskelett (linker of nucleoskeleton and cytoskeleton)
m	milli ( $10^{-3}$ ), Meter
M	molar, Maus
mA	Milliampere
mAb	monoklonaler Antikörper (monoclonal antibody)
MCS	multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
MEF	embryonale Mausfibroblasten (mouse embryonic fibroblasts)
min	Minuten
ml	Milliliter
mg	Milligramm
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
n	nano ( $10^{-9}$ ), Anzahl der Chromosomen im haploiden Genom
ng	Nanogramm
N-(terminal, Terminus)	Amino-(terminal, Terminus)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NE	Kernhülle (nuclear envelope)
NLS	Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal)
nm	Nanometer
NPC	Kernporenkomplex (nuclear pore complex)
OAM	äußere akrosomale Membran (outer acrosomal membrane)

OD	Optische Dichte
ONM	äußere Kernmembran (outer nuclear membrane)
pAb	polyklonaler Antikörper (polyclonal antibody)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBD	Plektin-Bindungs-Domäne
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
PNS	perinukleärer Raum (perinuclear space)
p	piko ( $10^{-12}$ )
pM	pikomolar
PPP	Proteinprobenpuffer
Rb	Kaninchen (rabbit)
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RIPA	Radio-Immünpräzipitations Analyse (radio-immunoprecipitation assay)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic Acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur, reverse Transkription
sek	Sekunden
SC	synaptonemaler Komplex (synaptonemal complex)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulphate)
SL	Stammlösung
SPB	Spindelpolkörper (spindle pole body)
SR	Spectrinwiederholung (spectrin repeat)
SUN	Sad1/UNC-84 Homologie
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris-buffered saline)
TdT	terminale Desoxynucleotidyltransferase
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
TM	transmembran, Transmembrandomäne
$T_M$	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSS	Transformations- und Lagerungslösung (transformation and storage solution)
TTP	Thymidintriphosphat
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
ÜN	Über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (volume/volume), Volumenprozent
w/v	Gewicht pro Volumen (weight/volume), Massenprozent
WB	Western Blot
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel
ZnF	Zinkfinger Motiv

## 10 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich,

dass ich die vorliegende Arbeit unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen selbständig angefertigt habe,

dass ich diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen habe,

und dass ich noch keine akademischen Doktorgrade erworben habe und früher auch noch nicht versucht habe einen akademischen Doktorgrad zu erwerben.

Würzburg, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Eva Göb

# Lebenslauf

## *Persönliches*

---

Eva Göb, geboren am 06. Mai 1982 in Werneck, ledig

## *Promotion*

---

seit 10/2007	Promotion am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie der Universität Würzburg zum Thema: „Die Kernhülle in Keimzellen: Strukturelle Besonderheiten, dynamische Prozesse und die Umgestaltung des Zellkerns während der Spermatogenese der Maus“
seit 11/2007	Mitglied im Graduiertenkolleg „Organogenese“ der Universität Würzburg
seit 10/2009	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie der Universität Würzburg
10/2007 - 09/2009	Promotionsstipendium nach dem Bayerischen Eliteförderungsgesetz

## *Studium und Schulbildung*

---

06/2007	Abschluss des Biologiestudiums „mit Auszeichnung“ als Dipl. Biol. Univ.
08/2006 - 06/2007	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie der Universität Würzburg zum Thema „Reorganisation der Kernhülle während der Spermatogenese von Nagern: Expressionsmuster der SUN-Proteinfamilie“ (Abschlussnote: 1,0)
07/2006	Diplomprüfung in Zell- und Entwicklungsbiologie, Biochemie und Humangenetik (Abschlussnote: 1,0)
03/2004	Vordiplom in Allgemeiner Biologie, Chemie und Physik
10/2001 - 06/2007	Biologiestudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
06/2001	Allgemeine Hochschulreife
09/1992 - 07/2001	Regiomontanus-Gymnasium Haßfurt
09/1988 - 08/1992	Grundschule Haßfurt

## *Studienbegleitende Tätigkeit*

---

03/2006 - 05/2007	Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie der Universität Würzburg (Vorbereitung und Betreuung entwicklungsbiologischer Praktika)
-------------------	---

## *Kenntnisse*

---

Fremdsprachen:	Englisch (sehr gute Kenntnisse), Französisch (Grundkenntnisse), Latein
EDV-Kenntnisse:	MS Office (Word, Powerpoint, Excel), Windows XP und Windows 7, Adobe Photoshop, Bioinformatische Datenbank-Analysen (z.B. Sequenzanalyse mit BLAST-Algorithmen, Ensemble-Datenbank, ClustalW)
Laborpraxis:	Molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden, Histologie, Immunlokalisation, Immunocytochemie, Licht- und Elektronenmikroskopie, Konfokale Laserscanning Mikroskopie, Zellkultur, Arbeit mit genetisch veränderten Organismen (Bakterielle Klonierung, Knock-out-Mäuse), tierexperimentelle Arbeiten

## Publikationen

### *Publikationen*

---

**Göb E**, Meyer-Natus E, Benavente R, Alsheimer M. Tissue-specific expression of mammalian Sun1 isoforms. *Commun Integr Biol* (eingereicht).

**Göb E**, Schmitt J, Benavente R, Alsheimer M. Mammalian sperm head formation involves different polarization of two novel LINC complexes. *PLoS ONE*. 2010; 5: e12072. doi:10.1371/journal.pone.0012072.

Adelfalk C, Janschek J, Revenkova E, Blei C, Liebe B, **Göb E**, Alsheimer M, Benavente R, de Boer E, Novak I, Höög C, Scherthan H, Jessberger R. Cohesin SMC1beta protects telomeres in meiocytes. *J Cell Biol*. 2009; 187: 185-199.

### *Veröffentlichte Abstracts*

---

**Göb E**, Schmitt J, Schramm S, Jahn D, Ortega S, Benavente R, Alsheimer R (2009) Lamin C2, a short meiosis-specific A-type lamin isoform, is required for telomere driven meiotic chromosome pairing. "EMBO Conference Series on Nuclear Structure and Dynamics" in l'Isle sur la Sorgue, Frankreich, 30. September - 04. Oktober 2009.

**Göb E**, Schmitt J, Ortega S, Benavente R, Alsheimer M (2008) Meiosis-specific lamin isoform C2 is required for male fertility in mice. "10th DGZ Young Scientist Meeting" in Heidelberg, 24. - 25. September 2008.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei **ALLEN** bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Im Besonderen danke ich jedoch

Herrn Prof. Dr. Ricardo Benavente für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Die Zeit in Deinem Labor wird mir Dank des spannenden Dissertationsthemas, Deiner großartigen Betreuung und der einfach tollen Arbeitsatmosphäre stets in wunderbarer Erinnerung bleiben. Vielen Dank!

Herrn PD Dr. Manfred Alsheimer für die einfach grandiose Betreuung. Lieber Manfred, es hat mich stets gefreut mit einem „Und, was gibt's Neues?“ begrüßt zu werden, da ich daran Dein immerwährendes Interesse an meiner Arbeit und dem Fortschritt meiner Ergebnisse erkennen konnte. Du hast immer Zeit gefunden, Dich um uns und all unsere Projekte zu kümmern und hattest dabei stets hilfreiche Anregungen und Verbesserungsvorschläge parat. Dafür „Danke“!

Herrn Prof. Dr. Michael Schmid für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Georg Krohne und seinen Mitarbeiterinnen Claudia Gehrig und Daniela Bunsen für die Einführung in die Elektronenmikroskopie.

Frau Christina Kober und dem gesamten Tierstall-Team des Biozentrums für die gewissenhafte Betreuung der Mauslinien sowie ihre freundliche Hilfe bei sämtlichen Anliegen.

allen (aktuellen und ehemaligen) Mitarbeitern des Lehrstuhls für Zell- und Entwicklungsbiologie sowie der Abteilung für Elektronenmikroskopie für das angenehme und heitere Arbeitsklima. Vielen Dank auch für die immer schnelle Hilfe und Unterstützung bei bürokratischen Fragen, Materialbestellungen, der Bereitstellung von Kulturzellen, Spitzen und sauberen Laborutensilien sowie bei mikroskop- und computertechnischen Fragen; daher „Danke“ Uli, Kathrin, Silke, Lidia, Robert, Tim & Norbert.

den „Engstlers“ und Rike für die vielen lustigen Momente und Unternehmungen.

meinen lieben Laborkollegen!!! Von Euch, Hannes & Andrea, konnte ich so manches lernen, vor allem zu Beginn meiner Arbeit. Karoline, Sabine, Daniel, Jana & Hanna, mit Euch zu arbeiten hat unglaublich viel Spass gemacht; man kann sich echt keine besseren Kollegen wünschen! Liebe Elisabeth, vielen Dank für Deine Unterstützung bei der Genotypisierung der Knock-out-Mäuse, den EM-Experimenten und für Dein immer offenes Ohr als „Arbeitsgruppenmama“. Ich danke auch allen Praktikanten, die in der Arbeitsgruppe tätig waren - insbesondere für die leckere Verpflegung.

meiner Familie!!! Liebe Mama, lieber Papa, Ihr seid immer für mich da, unterstützt alle meine Vorhaben und habt mich zu dem gemacht was ich bin - dafür bin ich Euch unendlich dankbar. Lieber Opa, Martina & Ossi, auch zu Euch kann ich immer kommen und mir einen guten Rat und Ermutigung abholen, dafür vielen Dank. Mein lieber Andi, Du bist mein Rückzugsort, gibst mir Kraft und nimmst mich einfach so wie ich bin - Danke für alles!