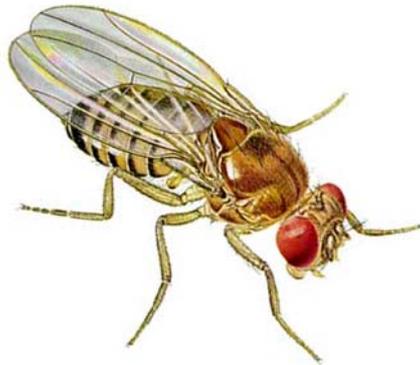


**Charakterisierung der Kernmembranproteine**  
***Lamin B Rezeptor* und *Bocksbeutel***  
**von *Drosophila melanogaster***

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



vorgelegt von

**Nicole Wagner**

aus Hanau

Würzburg 2003

# Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	1
I.1	Zusammenfassung .....	1
I.2	Summary .....	4
<b>II.</b>	<b>Einleitung</b> .....	7
II.1	<b>Aufbau der Kernhülle</b> .....	7
II.2	<b>Kernlamine</b> .....	8
II.2.1	Funktion der Lamine .....	11
II.3	<b>Integrale und assoziierte Membranproteine der inneren Kernmembran</b> .....	14
II.3.1	Der Lamin B Rezeptor (LBR) .....	14
II.3.2	LEM-Domänen Proteine und ihre Interaktionspartner .....	16
	Die Lamina-assoziierten Polypeptide 1 und 2 .....	16
	Emerin und MAN1 .....	17
	Der Barrier-to-Autointegration Factor (BAF) .....	18
II.3.3	Otefin, Nurim, Nesprin-1 und -2 und Ring Finger Binding Protein .....	19
II.3.4	LUMA, Unc-83 und -84, Germ Cell Less (GCL) und Young Arrest (YA) .....	19
II.4	<b>Genetisch bedingte Erkrankungen</b> .....	20
II.4.1	Potentielle Ursachen der mit Mutationen im Lamin A und im Emerin assoziierten humangenetischen Erkrankungen .....	21
II.4.2	Greenberg skeletale Dysplasie und Pelger Huët Anomalie .....	25
II.5	<b>RNA Interference (RNAi)</b> .....	27
II.5.1	Mechanismus der RNAi .....	27
II.5.2	Biologische Bedeutung .....	30
II.5.3	Posttranslationelle Regulation durch Micro RNA .....	31
II.5.4	Anwendung der RNAi .....	34
II.6	<b>Zielsetzung</b> .....	35
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	37
III.1	<b>Charakterisierung des Lamin B Rezeptor (dLBR) von <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	37
III.1.1	<b>Molekulare Charakterisierung des dLBR von <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	37
III.1.1.1	BLAST Suche mit der publizierten Sequenz des Lamin B Rezeptor von <i>Xenopus laevis</i> in der Drosophila Flybase Datenbank .....	37
III.1.1.2	Charakterisierung der EST-Klone LD38760 und SD06601, die die cDNA des Gens CG17952 von <i>Drosophila melanogaster</i> enthalten .....	37
III.1.1.3	Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der dLBR cDNA .....	38
III.1.1.4	Analyse der Zusammensetzung und Eigenschaften des dLBR .....	41
III.1.1.5	Vergleichende Analyse der Drosophila LBR Sequenz mit Datenbanksequenzen .....	43

III.1.1.6	Vergleich einiger potentieller Phosphorylierungsstellen des <i>Drosophila</i> LBR mit publizierten Daten ..	47
<b>III.1.2</b>	<b>Expression des dLBR als GFP-Fusionsprotein</b> .....	48
III.1.2.1	Lokalisation des dLBR(16-334)GFP Fusionsproteins .....	49
III.1.2.2	Extraktionsverhalten des dLBR(16-334)GFP Fusionsproteins .....	51
<b>III.1.3</b>	<b>Herstellung eines Antiserums gegen dLBR</b> .....	52
III.1.3.1	Gewinnung des rekombinanten Polypeptids zur Immunisierung von Meerschweinchen und Mäusen	52
III.1.3.2	Test der polyklonalen dLBR Antikörper .....	53
<b>III.1.4</b>	<b>Untersuchung des Einflusses verschiedener Chemikalien auf das Laufverhalten des dLBR in der SDS-PAGE</b> .....	55
<b>III.1.5</b>	<b>Analyse der Expression des dLBR in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien von <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	56
III.1.5.1	Analyse der Expression des dLBR in verschiedenen Entwicklungsstadien von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	56
III.1.5.2	Analyse der Expression des dLBR in Ovariolen von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	58
<b>III.1.6</b>	<b>Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation des dLBR in der inneren Kernmembran</b> .....	59
<b>III.1.7</b>	<b>Interaktionen und Bindungseigenschaften des dLBR</b> .....	60
III.1.7.1	Löslichkeit des dLBR unter physiologischen Bedingungen .....	60
III.1.7.2	In vitro Chromatin Bindungsstudien des dLBR .....	61
III.1.7.3	Fraktionierung der löslichen Proteine aus <i>Drosophila</i> Schneider S2 Zellen durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation .....	63
III.1.7.4	Interaktion des dLBR mit nukleären Proteinen .....	64
III.1.7.4.1	In vitro Bindungsstudien: Co-Imunpräzipitation des dLBR mit Laminen von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	65
III.1.7.4.2	In vivo Bindungsstudien .....	66
<b>III.1.8</b>	<b>Untersuchung der Sterol C14 Reduktase Aktivität des dLBR</b> .....	68
III.1.8.1	Expression des dLBR in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	71
III.1.8.2	Gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse der von transformierten <i>erg24</i> Hefezellen synthetisierten Sterole .....	73
<b>III.1.9</b>	<b>Molekulare und phänotypische Charakterisierung der PZ-Insertionslinie 11341</b> .....	75
III.1.9.1	Molekulare Charakterisierung der PZ-Insertionslinie 11341 .....	75
III.1.9.2	Phänotypische Charakterisierung der PZ-Insertionslinie 11341 .....	76
<b>III.1.10</b>	<b>Reduktion der Expression von dLBR, Lamin Dm0, Lamin C und Otefin durch RNA Interference (RNAi)</b> .....	81
III.1.10.1	Reduktion der Expression des dLBR in <i>Drosophila</i> Schneider S2, Schneider S2R+ und Kc167 Kulturzellen .....	82
III.1.10.2	Einfluss der Reduktion des dLBR durch RNAi auf die Expression und Lokalisation der Proteine Lamin Dm0, Lamin C, Nukleoporin, Otefin und Fibrillarin .....	85
III.1.10.3	Einfluss der Reduktion des Lamin Dm0 und Lamin C durch RNAi auf die Expression und Lokalisation der Proteine dLBR, Otefin und Nukleoporin .....	90
III.1.10.4	Reduktion des dLBR und der beiden Kernlamine (Lamin Dm0, Lamin C) in der Embryogenese von <i>Drosophila melanogaster</i> durch RNAi .....	98
<b>III.2</b>	<b>Charakterisierung der beiden Isoformen des Bocksbeutel von <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	103
<b>III.2.1</b>	<b>Molekulare Charakterisierung der beiden Isoformen des Bocksbeutel von <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	103
III.2.1.1	Identifizierung und molekulare Charakterisierung beider Bocksbeutel Isoformen .....	104

III.2.1.2	Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der beiden Bocksbeutel Isoformen .....	106
III.2.1.3	Vergleich der beiden Bocksbeutel Isoformen .....	108
III.2.1.4	Analyse der Zusammensetzung und Eigenschaften der beiden Bocksbeutel Isoformen .....	109
III.2.1.5	Vergleichende Analyse des Bocksbeutel von <i>Drosophila melanogaster</i> mit Datenbanksequenzen ..	111
III.2.1.6	Vergleich einiger potentieller Phosphorylierungsstellen des <i>Drosophila</i> Bocksbeutel mit publizierten Daten .....	112
<b>III.2.2</b>	<b>Expression der beiden Isoformen des Bocksbeutel als GFP-Fusionsproteine</b> .....	<b>113</b>
<b>III.2.3</b>	<b>Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen Bocksbeutel</b> .....	<b>116</b>
III.2.3.1	Test der polyklonalen Bocksbeutel Antikörper .....	117
<b>III.2.4</b>	<b>Extraktionsverhalten des Bocksbeutel</b> .....	<b>118</b>
<b>III.2.5</b>	<b>Analyse der Expression von Bocksbeutel in verschiedenen Entwicklungsstadien</b> .....	<b>120</b>
<b>III.2.6</b>	<b>Analyse der Expression von Bocksbeutel in verschiedenen Kulturzelllinien</b> .....	<b>120</b>
<b>III.2.7</b>	<b>Untersuchung der Interaktion des Bocksbeutel mit Lamin Dm0 und Lamin C</b> .....	<b>124</b>
<b>III.3</b>	<b>Molekulare Charakterisierung des Barrier-to-Autointegration Factor (dBAF) von <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	<b>126</b>
III.3.1	BLAST Suche mit der publizierten Sequenz des Barrier-to-Autointegration Factor (BAF) von <i>Rattus norvegicus</i> in der <i>Drosophila</i> Flybase Datenbank .....	126
III.3.2	Charakterisierung des EST-Klones GH06291, der die cDNA des Gens CG7380 von <i>Drosophila melanogaster</i> enthält .....	127
III.3.3	Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der cDNA des Gens CG7380 .....	127
III.3.4	Analyse der Zusammensetzung und Eigenschaften des dBAFs .....	128
III.3.5	Vergleichende Analyse des BAF von <i>Drosophila melanogaster</i> mit Datenbanksequenzen .....	129
III.3.6	Expression des dBAF als GFP-Fusionsprotein .....	129
III.3.7	Herstellung eines Antiserums gegen dBAF .....	131
III.3.7.1	Gewinnung des rekombinanten Proteins und Immunisierung von Meerschweinchen .....	131
III.3.7.2	Test der polyklonalen dBAF Antikörper .....	132
III.3.8	Extraktionsverhalten des dBAF .....	134
III.3.9	Untersuchung der potentiellen Bindung des Bocksbeutels mit dem Barrier-to-Autointegration Factor von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	135
III.3.10	Reduktion der Expression von Bocksbeutel und dBAF durch RNAi Interference (RNAi) .....	139
III.3.10.1	Reduktion der Expression von Bocksbeutel und dBAF in <i>Drosophila</i> Kc167 Kulturzellen und in der Embryogenese durch RNAi .....	140
III.3.10.2	Einfluss der Reduktion des Lamin Dm0 durch RNAi auf die Expression und Lokalisation der Proteine Bocksbeutel, Otefin, dLBR, und Nukleoporin .....	146
<b>IV.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>149</b>
IV.1	Identifizierung und Charakterisierung des Lamin B Rezeptor von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	149
IV.2	Mögliche biologische Funktionen des dLBR .....	153
IV.3	Identifizierung und Charakterisierung der beiden Bocksbeutel Isoformen von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	155
IV.4	Expressionsmuster der beiden Bocksbeutel Isoformen .....	156
IV.5	Vergleich der beiden Bocksbeutel Isoformen mit anderen LEM-Domänen Proteinen .....	157
IV.6	Mögliche biologische Funktionen der beiden Bocksbeutel Isoformen .....	159
IV.7	Identifizierung und Charakterisierung des Barrier-to-Autointegration Factor (dBAF) von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	159

IV.8	Perspektiven .....	160
<b>V.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>163</b>
<b>V.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>163</b>
V.1.1	Geräte .....	163
V.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	164
V.1.3	Häufig verwendete Puffersysteme und Medien .....	164
V.1.4	Kulturzellen und Fliegenstämme .....	170
V.1.5	Enzyme .....	171
V.1.6	Antikörper .....	171
V.1.7	Bakterienstämme, Hefestämme und Vektoren .....	173
<b>V.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>175</b>
<b>V.2.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>175</b>
V.2.1.1	Präzipitation und Reinigung von DNA .....	175
V.2.1.1.1	Präzipitation von DNA durch Natriumacetat / Ethanol fällung .....	175
V.2.1.1.2	Reinigung von DNA durch Chloroform / Phenol Extraktion .....	175
V.2.1.2	Isolation und Nachweis von DNA .....	175
V.2.1.2.1	Prinzip der Plasmid isolation .....	175
V.2.1.2.2	Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese .....	176
V.2.1.2.3	Extraktion von DNA aus Agarosegelen .....	177
V.2.1.3	DNA-Sequenzierung nach Sanger .....	178
V.2.1.3.1	Auswahl der Primer für die Sequenzierung .....	178
V.2.1.3.2	Sequenzierungsreaktion .....	178
V.2.1.3.3	Sequenzauswertung .....	179
V.2.1.4	DNA Amplifikation durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	179
V.2.1.4.1	Auswahl der PCR-Primer .....	179
V.2.1.4.2	Amplifikationsreaktion .....	180
V.2.1.5	DNA Modifizierung durch Enzyme .....	180
V.2.1.5.1	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonucleasen .....	180
V.2.1.5.2	Ligation von DNA-Molekülen .....	181
V.2.1.6	Extraktion von genomischer DNA aus Fliegen .....	182
V.2.1.7	Extraktion von RNA .....	182
V.2.1.8	cDNA Synthese .....	183
V.2.1.8.1	Erststrangsynthese .....	183
V.2.1.8.2	Zweitstrangsynthese .....	184
V.2.1.9	Transkription .....	184
V.2.1.9.1	Gekoppelte in vitro Transkription und Translation .....	184
V.2.1.10	Klonierung .....	185
V.2.1.11	Herstellung kompetenter Zellen .....	186
V.2.1.12	Herstellung von Agarplatten .....	186
V.2.1.13	Transformation .....	186
V.2.1.14	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	188
V.2.1.15	RNA interference (RNAi) .....	188
V.2.1.15.1	MEGAscript™ - Transkription .....	188
V.2.1.15.2	Lithium-Chlorid Fällung und Hybridisierung .....	189
<b>V.2.2</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>189</b>
V.2.2.1	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	189
V.2.2.2	Reinigung des rekombinanten Proteins .....	190

V.2.2.3	Fällung von Proteinen .....	190
V.2.2.3.1	Chloroform-Methanol-Fällung .....	190
V.2.2.3.2	Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) .....	191
V.2.2.4	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	191
V.2.2.4.1	Vorbereitung der Proben .....	191
V.2.2.4.2	Zusammensetzung der Gele .....	191
V.2.2.4.3	Aufbau der Gelapparatur und Gießen des Gels .....	192
V.2.2.4.4	Referenzproteine .....	192
V.2.2.4.5	Coomassiefärbung und Trocknen des Gels .....	192
V.2.2.5	Fluorographie .....	193
V.2.2.6	Übertragung von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose-Membranen (Western Blot) ..	193
V.2.2.7	Immunologisches Proteinnachweisverfahren durch ECL .....	194
V.2.2.8	Entfernen von spezifisch gebundenen Antikörpern von der Nitrozellulose .....	195
V.2.2.9	Herstellung von polyklonalen Antikörpern .....	195
V.2.2.10	Affinitätsreinigung der Antikörper .....	196
V.2.2.11	Herstellung eines Gesamtproteinextraktes aus Kulturzellen .....	197
V.2.2.12	Proteinauftrennung durch Saccharosegradientenzentrifugation .....	197
V.2.2.13	Extraktion von Proteinen .....	198
V.2.2.13.1	Extraktion von Proteinen durch Harnstoff .....	198
V.2.2.13.2	Extraktion von Proteinen durch Triton X-100 .....	199
V.2.2.14	Immunpräzipitation .....	199
V.2.2.15	Kernrekonstitution und Chromatin Bindung in vitro .....	200
V.2.2.16	Herstellung eines Hefe-Proteinextraktes .....	200
<b>V.2.3</b>	<b>Zellkulturmethoden</b> .....	201
V.2.3.1	Kultur von <i>Drosophila melanogaster</i> Zellen .....	201
V.2.3.1.1	Kultivierung von <i>Drosophila melanogaster</i> Schneider S2 Zellen, S2R+ Zellen und Kc167 Zellen .....	201
V.2.3.1.2	Teilen von <i>Drosophila</i> Schneider S2 Zellen, Kc167 Zellen und Anlegen einer neuen Flasche .....	201
V.2.3.1.3	Teilen von <i>Drosophila</i> S2R+ Zellen und Anlegen einer neuen Flasche .....	201
V.2.3.2	Kultur von <i>Xenopus laevis</i> XLKE-A6 Zellen und <i>Ceropithecus aethiops</i> COS-7 Zellen .....	202
V.2.3.2.1	Kultivierung von <i>Xenopus</i> A6 und <i>Ceropithecus</i> COS-7 Zellen .....	202
V.2.3.2.2	Teilen von <i>Xenopus</i> A6-Zellen und <i>Ceropithecus</i> COS-7 Zellen und Anlegen einer neuen Flasche ..	202
V.2.3.3	Transfektion von Kulturzellen .....	202
V.2.3.3.1	Transfektion der <i>Drosophila melanogaster</i> Schneider-S2 Zellen .....	203
V.2.3.3.2	Transfektion der <i>Xenopus</i> A6-Zellen .....	203
V.2.3.3.3	Vorbereitung transfizierter Kulturzellen für die SDS-PAGE .....	204
V.2.3.3.4	RNA-Transfektion von <i>Drosophila melanogaster</i> Kulturzellen .....	204
V.2.3.4	Vorbereitung der <i>Drosophila</i> Kulturzellen für die SDS-PAGE .....	205
V.2.3.5	Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen .....	205
<b>V.2.4</b>	<b>Licht- und elektronenmikroskopische Methoden</b> .....	206
V.2.4.1	Herstellung der Präparate für die Immunfluoreszenz .....	206
V.2.4.1.1	Herstellung von Quetschpräparaten von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	206
V.2.4.1.2	Methoden der Fixierung von Kulturzellen, embryonalen und larvalen Gewebe von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	206
V.2.4.2	Selektive Permeabilisierung mit Digitonin .....	207
V.2.4.3	Antikörperinkubation .....	207
V.2.4.4	Herstellung von whole-mount Präparaten von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	208
V.2.4.5	Analyse am konfokalen Laser Scanning Mikroskop .....	208
V.2.4.6	Analyse am Zeiss Axiophot Stereo Fluoreszenzmikroskop .....	209

V.2.4.7	Vorbereitung 24h alter Embryonen von <i>Drosophila melanogaster</i> für die elektronen-	
	mikroskopische Fixierung .....	209
V.2.4.8	Fixierung mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid .....	209
V.2.4.9	Anfertigen der Ultradünnschnitte .....	210
V.2.4.10	Aufnahmen am Zeiss EM 10 und Entwicklung der Negative .....	210
<b>V.2.5</b>	<b>Spezifische Methoden für die Arbeit mit <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	<b>211</b>
V.2.5.1	Haltung von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	211
V.2.5.2	Kreuzungen .....	211
V.2.5.3	Stabilisierungschromosomen .....	211
V.2.5.4	Inverse PCR zur Lokalisation des Insertionsortes von PZ-Elementen .....	211
V.2.5.5	Mikroinjektion .....	213
<b>V.2.6</b>	<b>Gaschromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen</b> .....	<b>213</b>
V.2.6.1	Vorbereitung von transformierten Hefezellen .....	214
V.2.6.2	GC/MS Analyse von transformierten Hefezellen .....	214
<b>VI.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>215</b>
<b>VII.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>229</b>
VII.1.	Abkürzungen .....	229
VII.2	Verwendete Primer .....	230
<b>VIII.</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>234</b>
<b>IX.</b>	<b>Publikationsliste</b> .....	<b>235</b>
<b>X.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>236</b>
<b>XI.</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b> .....	<b>237</b>

# I. Zusammenfassung

## I.1 Zusammenfassung

Die Kernlamina ist eine essentielle Struktur des eukaryotischen Zellkerns und setzt sich aus den Laminen sowie den mit Laminen assoziierten peripheren und integralen Membranproteinen zusammen.

Bisher ist nur sehr wenig über die Zusammensetzung der Lamina des Invertebraten *Drosophila melanogaster* bekannt.

In der vorliegenden Arbeit habe ich neue Kernmembranproteine von *Drosophila melanogaster* mit molekular- und zellbiologischen Methoden charakterisiert. Dabei handelt es sich um den Lamin B Rezeptor von *Drosophila* (dLBR) sowie die zwei neuen LEM-Domänen Proteine (*Drosophila* Bocksbeutel- $\alpha$  und - $\beta$ ) und den *Drosophila* Barrier-to-Autointegration Factor (dBAF), ein kleines, DNA-bindendes Protein.

Der Lamin B Rezeptor von *Drosophila melanogaster* (dLBR), kodiert durch das Gen CG17952, weist sowohl Gemeinsamkeiten, als auch Unterschiede zum LBR der Vertebraten auf.

Strukturanalysen zeigen, dass sich das 741 Aminosäuren lange Polypeptid aus zwei strukturell verschiedenen Domänen zusammensetzt. Die aminoterminal Domäne von 307 Aminosäuren Länge besitzt viele basische und hydroxylierte Aminosäuren, und der hydrophobe Carboxyterminus ist in acht putative Transmembrandomänen gegliedert.

Der Einsatz von spezifischen Antikörpern gegen die aminoterminal Domäne des dLBR für Immunlokalisations- und Extraktionsstudien belegen, dass der dLBR ein integrales Protein der inneren Kernmembran ist.

Die aminoterminal Domäne des dLBR ist auf der nukleoplasmatischen Seite der inneren Kernmembran lokalisiert. Durch Immunpräzipitationen aus Zellextrakten von *Drosophila* Kulturzellen und in vitro Bindungsstudien konnte ich die Bindung des dLBR an das *Drosophila* B-Typ Lamin, Lamin Dm0 und an Spermiumchromatin nachweisen.

Für den LBR des Menschen konnte die enzymatische Aktivität einer Sterol C14 Reduktase nachgewiesen werden. Um zu analysieren, ob der dLBR ebenfalls diese enzymatische Aktivität aufweist, wurde er in dem mutanten Hefestamm der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert, der sich durch einen Defekt in der Sterol C14 Reduktase Aktivität auszeichnet. Durch kombinierte gaschromatographische und massenspektrometrische Analysen konnte belegt werden, dass der dLBR über keine enzymatische Aktivität einer Sterol C14 Reduktase verfügt.

Die Analyse von P-Element Fliegenstämmen ergab, dass kein Fliegenstamm mit einer P-Element Insertion im dLBR Gen (Gen CG17952) existierte. Der Fliegenstamm 11341; I(2)03605, der sich durch eine P-Element Insertion 990 Basenpaare in 5'  $\rightarrow$  3' Orientierung

vor dem Translationsstart des Genes CG17952 auszeichnet, resultiert im Absterben der homozygoten Tiere während der larvalen und pupalen Entwicklung. Ich konnte jedoch keine veränderte Expression des dLBR nachweisen.

Zur Untersuchung der Interaktionen und der Funktion des dLBR in vivo wurde das Protein in Embryonen von Drosophila und kultivierten S2, S2R<sup>+</sup> und Kc167 Zellen durch RNA interference (RNAi) depletiert. Die Degradation von mehr als 90% des dLBR hatte keinen sichtbaren Effekt auf die Morphologie der Kernhülle, auf die Verteilung nukleärer Proteine einschließlich Lamin Dm0, Lamin C und Otefin sowie auf die Lebensfähigkeit der Embryonen und Kulturzellen, während die Depletion des Drosophila Lamin Dm0 sowohl in Kulturzellen, als auch im Embryo starke morphologische Veränderungen der Zellkerne und den Arrest der embryonalen Entwicklung zur Folge hatte.

Eine weitere Gruppe nicht verwandter Proteine der inneren Kernmembran weist in oder nahe ihres Aminoterminus eine 40 – 50 Aminosäuren lange globuläre Domäne auf, die als LEM Domäne bezeichnet wird. Dieses hoch konservierte Motiv vermittelt durch die Interaktion mit dem kleinen, chromosomalen Protein BAF (**B**arrier-to-**A**uto**i**ntegration **F**actor) die Bindung der LEM-Domänen Proteine an das Chromatin des Zellkerns. In Drosophila war im Unterschied zu Vertebraten bisher nur sehr wenig über diese Proteine bekannt. Mit der Charakterisierung der beiden Proteine Bocksbeutel- $\alpha$  und Bocksbeutel- $\beta$ , Spleiß-Varianten des Gens CG9424, konnte ich zwei neue LEM-Domänen Proteine identifizieren. Den beiden Bocksbeutel Isoformen gemeinsam ist die aminoterminal Domäne einschließlich des konservierten LEM-Motivs. Sie unterscheiden sich jedoch in der carboxyterminalen Region. Die carboxyterminale Transmembrandomäne der 399 Aminosäuren langen  $\alpha$ -Isoform fehlt in der 351 Aminosäuren langen  $\beta$ -Isoform. Die Existenz beider Isoformen konnte durch RT-PCR Analysen nachgewiesen werden.

Um Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen diesen Isoformen feststellen zu können, wurden die beiden Proteine als GFP Fusionsproteine in transfizierten Kulturzellen oder mikroinjizierten Embryonen exprimiert. In den transfizierten Zellen und in der Embryogenese konnte eine deutliche Lokalisation der  $\alpha$ -Isoform in der Kernhülle beobachtet werden, dagegen war der größte Teil der  $\beta$ -Isoform gleichmäßig im Nukleoplasma der transfizierten Zellen verteilt.

Die Immunlokalisations- und Extraktionsstudien mit transfizierten Xenopus A6 Zellen und Drosophila Schneider S2 Zellen belegen, dass die  $\alpha$ -Isoform als integrales Protein in der inneren Kernmembran lokalisiert ist und die in Kulturzellen, Larven und Fliegen dominierende Isoform darstellt.

Der Barrier-to-Autointegration Factor von Drosophila (dBAF), kodiert durch das Gen CG7380, ist dem BAF der Vertebraten sehr ähnlich.

Die Expression des dBAF als GFP Fusionsprotein zeigt eine homogene, nukleoplasmatische Verteilung des Proteins in Interphase-Zellen, während in allen mitotischen Stadien eine

deutlich Kolokalisation mit den Chromosomen zu erkennen ist. Die immunfluoreszenzmikroskopische Analyse mit spezifischen dBAF Antikörpern zeigt in der Interphase der untersuchten Kulturzellen ebenfalls eine homogene Verteilung des dBAF im Zellkern, jedoch scheint das endogene dBAF während der Mitose nur mit bestimmten Bereichen der Chromosomen zu kolokalisieren, zusätzlich ist eine diffuse, cytoplasmatische Verteilung zu beobachten.

Um mehr Informationen über eine potentielle Interaktion von dBAF und Bocksbeutel zu gewinnen, wurde der Einfluss der Reduktion ihrer Expression in *Drosophila* Kc167 Zellen sowie während der frühen Entwicklung in mikroinjizierten Embryonen durch RNA interference analysiert. Die Depletion des dBAF und Bocksbeutel hatte keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen und die intrazelluläre Lokalisation aller untersuchten nukleären Proteine. Somit scheinen beide Proteine in Kulturzellen und während der frühen Entwicklung nicht essentiell zu sein.

Durch die Depletion des Lamin Dm0 in Kulturzellen durch RNA interference konnte ich jedoch zeigen, dass Lamin Dm0 für die Lokalisation der beiden *Drosophila* LEM Domänen Proteine Bocksbeutel- $\alpha$  und Otefin in der inneren Kernmembran erforderlich ist.

## I.2 Summary

The nuclear lamina is an essential structure of the eukaryotic nucleus that is composed of lamins and lamin-associated peripheral and integral membrane proteins. Only limited information is available on the composition of the lamina in the invertebrate *Drosophila melanogaster*.

In this work I have characterized novel membrane proteins of *Drosophila melanogaster* using molecular and cell biological methods, namely the *Drosophila* lamin B receptor (dLBR), two novel LEM domain proteins (*Drosophila* Bocksbeutel- $\alpha$  and - $\beta$ ) and the DNA-binding protein BAF (*Drosophila* BAF).

The *Drosophila melanogaster* lamin B receptor (dLBR), encoded by the annotated gene CG17952, has some but not all properties in common with the vertebrate LBR.

Primary and secondary structure predictions indicated that the 741 amino acids long polypeptide possesses a highly charged aminoterminal domain of 307 amino acids length followed by eight putative transmembrane segments in the carboxyterminal half of the molecule.

Antibodies specific for the aminoterminal domain of the dLBR for immunolocalization and cell fractionation studies reveal that the dLBR is an integral protein of the inner nuclear membrane.

The aminoterminal domain of dLBR is localized on the nucleoplasmic side of the inner nuclear membrane. Binding of dLBR to *Drosophila* B-Type lamins, lamin Dm0, and sperm chromatin could be demonstrated by immunoprecipitations and in vitro binding assays.

For the human LBR a C14 sterol reductase activity has been reported. To verify whether the dLBR also possesses this enzymatic activity, dLBR was expressed in the *Saccharomyces cerevisiae* *erg24* mutant that lacks C14 sterol reductase activity. Combined gas chromatographic and mass spectroscopic analyses revealed that the dLBR does not possess sterol C14 reductase activity.

Analysis of P-element stocks had shown that no P-element insertion in the dLBR gene (gene CG17952) was available. The fly stock 11341; I(2)03605 that contain a single P-element insertion 990 bp 5' of the start codon of gene CG17952 is characterized by homozygous lethality during larval and pupa development, but I could not detect an altered expression level of the dLBR.

To gain insight into interactions and functions of the dLBR in vivo, the protein was depleted in *Drosophila* embryos and cultured S2, S2R+ and Kc167 cells by RNA interference (RNAi). The depletion of more than 90% of the dLBR had no obvious effect on the morphology of nuclei and nuclear envelopes, the distribution of other nuclear envelope components including lamin Dm0, lamin C and otefin and the viability of RNAi-treated cells and embryos whereas the depletion of the *Drosophila* lamin Dm0 in cultured cells and embryos caused morphological alterations of nuclei, nuclear fragility and the arrest of embryonic development.

A group of other, non related inner nuclear membrane proteins possess at or close to its aminoterminal a globular domain of approximately 40 – 50 amino acids known as LEM domain. It has been shown that this evolutionary conserved motif can mediate via the interaction with the small chromosomal protein BAF (**B**arrier-to-**A**utointegration **F**actor) the binding of LEM-domain proteins to chromatin. In contrast to vertebrates, little is known about LEM-domain proteins in *Drosophila*. The two novel LEM-Domain protein I characterized, Bocksbeutel- $\alpha$  and Bocksbeutel- $\beta$ , are splice products of the annotated *Drosophila* gene CG9424.

Both Bocksbeutel isoforms possess the same aminoterminal domain with a LEM-motif, but differ in their carboxyterminal region. The transmembrane domain that is arranged close to the carboxyterminus of the predicted 399 amino acids long  $\alpha$ -isoform is lacking in the 351 amino acids long  $\beta$ -isoform. The existence of both isoforms could be demonstrated by RT-PCR analysis.

To enable the investigation of differences and similarities between these two isoforms, both proteins were expressed as GFP fusion proteins in transfected cells or microinjected embryos. During embryogenesis and in transfected cells, the  $\alpha$ -isoform is targeted to the nuclear envelope, whereas the  $\beta$ -isoform is localized predominantly in the nucleoplasm of transfected cells.

Immunolocalization and cell fractionation of transfected *Xenopus* A6 cells and *Drosophila* Schneider S2 cells reveal that the  $\alpha$ -Isoform is an integral protein of the inner nuclear membrane and the predominant isoform in cells, larvae and flies.

The *Drosophila* BAF (dBAF), encoded by the annotated gene CG7380 has most properties in common with the vertebrate protein.

When expressed as GFP fusion protein, a homogenous distribution in the nucleoplasm is detectable in interphase cells whereas in mitotic cells, GFP-dBAF is predominantly bound to chromosomes. Immunofluorescence staining of *Drosophila* cells with specific dBAF antibodies indicated that dBAF is localized in the nucleus of cells at interphase. In contrast to the localization of the GFP fusion protein in mitotic cells, the distribution of endogenous dBAF is not restricted to distinct regions of mitotic chromosomes. A homogenous distribution in the cytoplasm is also detectable.

To gain more information about the relation of dBAF and Bocksbeutel I analysed by RNA interference the effects of Bocksbeutel and *Drosophila* dBAF knockdown in *Drosophila* Kc167 cells and microinjected embryos. The depletion of dBAF and Bocksbeutel had no influence on the viability of the cells, and the intracellular localization of all other analyzed nuclear proteins. Therefore it can be concluded that *Drosophila* proteins Bocksbeutel and dBAF are not essential for single cells or tissues during early development.

The depletion of lamin Dm0 in cultured cells by RNA interference reveal that lamin Dm0 is required for the nuclear membrane localization of the two Drosophila LEM-domain proteins Bocksbeutel- $\alpha$  and otefin.

## II. Einleitung

### II.1 Aufbau der Kernhülle

Die Kernhülle trennt in eukaryotischen Zellen zwei große Kompartimente, das Cytoplasma der Zelle und das den Zellkern ausfüllende Nukleoplasma. Sie schafft die Möglichkeit einer räumlichen Trennung von Transkription und Translation, die bei den Prokaryoten gleichzeitig ablaufen. Der Zellkern enthält den überwiegenden Teil der genetischen Information der Zelle in Form des dekondensierten Chromatins bzw. der kondensierten Chromosomen sowie zahlreiche Enzyme und den Nukleolus als Bildungsort der ribosomalen Untereinheiten und ist u. a. an der DNA- und RNA-Synthese sowie der RNA-Prozessierung beteiligt.

Die Kernhülle unterteilt sich in drei Kompartimente:

- Die äußere Kernmembran, die dem Cytoplasma zugewandt und mit Ribosomen besetzt ist, steht mit dem rauhen Endoplasmatischen Reticulum (ER) in Verbindung.
- Die Porenmembran, welche die Verbindung zwischen der äußeren und inneren Kernmembran darstellt und den Porenkanal bildet. Der Porenkanal erlaubt den kontrollierten Stoffaustausch von Molekülen zwischen dem Cytoplasma und dem Zellkern, während kleinere Moleküle durch den ca. 9 nm großen Porenkanal frei diffundieren können, wird der Transport größerer Moleküle durch einen aktiven Transportmechanismus gewährleistet.
- Die dem Nukleoplasma zugewandte innere Kernmembran unterscheidet sich strukturell und funktionell sehr stark von der äußeren Kernmembran sowie anderen zellulären Membransystemen. Sie ist mit der nukleären Lamina assoziiert, einem filamentösen Proteinnetzwerk von ca. 10 nm Dicke, bestehend aus Typ V Intermediärfilamentproteinen, den Laminen. In der inneren Kernmembran sind verschiedene Proteine lokalisiert, durch die das Chromatin der Zelle mit der Lamina vernetzt wird (Abb. 1).



der Kernmembran essentielle Tetrapeptid, das CxxM-Motiv (C = Cystein, x = beliebige Aminosäure, M = Methionin) aufweist (Übersicht in Lin und Worman, 1993; Stuurman et al., 1996; Stuurman et al., 1998). Die  $\alpha$ -helikale Stabdomäne ist in vier  $\alpha$ -Helices untergliedert (1A, 1B, 2A und 2B), die durch hoch konservierte Linkerregionen (L1, L12 und L2) voneinander getrennt werden; sie ist flankiert von Phosphorylierungsstellen, den SP/TP-Motiven (S = Serin, P = Prolin, T = Threonin), die während der Mitose durch die p34<sup>cdc2</sup> Kinase phosphoryliert werden, wodurch die Depolymerisation der Lamine und der Zerfall der Lamina sowie der Kernhülle eingeleitet wird (Gerace und Blobel, 1980; Ottaviano und Gerace, 1985). Während oder unmittelbar nach der Translation bilden die Lamine Homodimere und werden nach der Farnesylierung des CxxM Motivs in den Zellkern transportiert, wo die farnesylierten Cysteine die Assoziation mit der inneren Kernmembran vermitteln und die Lamine durch „head-to-tail“- Anlagerung und antiparalleler Anordnung zu einem filamentösen Netzwerk polymerisieren (Holtz et al., 1998; Krohne 1998; Lutz et al., 1992; Hennekes und Nigg, 1994).

Aufgrund ihrer biochemischen und strukturellen Eigenschaften sowie ihres Verhaltens während des Zellzyklus werden zwei Laminisotypen unterschieden: Die ubiquitär exprimierten B-Typ Lamine bleiben während der Mitose über das durch Farnesylierung und Carboxymethylierung modifizierte CxxM Motiv mit Membranen assoziiert und zeichnen sich durch einen sauren isoelektrischen Punkt (IP) aus, während die nur in differenzierten Zellen exprimierten A-Typ Lamine, deren CxxM Motiv meistens während der Prozessierung proteolytisch abgespalten wird (Lamin A) bzw. nicht exprimiert wird (Lamin C), während der Mitose als lösliche Oligomere vorliegen und einen neutralen isoelektrischen Punkt aufweisen (Gerace und Blobel, 1980; Holtz et al., 1989; Sinensky et al., 1994; Übersicht in Moir et al., 2000).

In Pflanzen, einschließlich *Arabidopsis thaliana* sowie, einzelligen Organismen wie die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und die Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe*, konnten keine lamin-kodierenden Gene identifiziert werden. Es wird vermutet, dass sich die evolutive Entwicklung der Lamine während des Überganges von der geschlossenen zur offenen Mitose vollzog (Übersicht in Cohen et al., 2001). Während die Zellteilung in der Hefe sich durch eine geschlossene Mitose auszeichnet, in der die mitotische Kernteilungsspindel innerhalb des Nukleus aufgebaut wird, haben Vertebraten eine offene Mitose, die durch den Zerfall der Kernhülle einschließlich der Kernmembranen, Lamine und der Kernporenkomplexe zwischen der Prophase und der Prometaphase und deren Wiederaufbau in der späten Anaphase / frühen Telophase charakterisiert wird. *Caenorhabditis elegans* und die syncytialen frühen Embryonalstadien von *Drosophila melanogaster* zeigen eine Zwischenstufe zwischen der völlig geschlossenen Mitose der Hefe und der offenen Mitose der Vertebraten. In dem Nematoden, dessen Genom für ein Lamin-Gen, das den B-Typ Laminen angehörende *Imn-1* kodiert, zerfallen die Kernporenkomplexe erst kurz vor der Metaphase, die Lamina sowie die Kernmembran in der späten Anaphase, während die Kernhüllenreueubildung in der Telophase durchgeführt wird, so dass nur eine

sehr kurze Zeitspanne verbleibt, in der die Kernhülle während der Mitose in der Zelle zerfallen vorliegt. In *Drosophila* wurden zwei Gene, die für das ubiquitär exprimierte Lamin Dm0 (B-Typ) sowie das in differenzierten Zellen exprimierte Lamin C (A-Typ) kodieren, charakterisiert (Bossie und Sanders, 1993; Riemer et al., 1995). In den frühen Embryonalstadien zerfallen die Kernporenkomplexe in der Prophase, die Lamina beginnt in der Metaphase zu zerfallen. Es scheint, als ob mit dem Übergang von der offenen zur geschlossenen Phase sowie durch die Verlängerung der Periode in der die Kernhülle während der Mitose zerfallen vorliegt, die Anzahl der Lamin-Gene sowie der alternativ gespleißten Isoformen, ebenso wie die Anzahl von Membranproteinen und somit auch die Komplexität der Kernhülle während der Evolution kontinuierlich anstieg (Abb. 2, Übersicht in Gruenbaum et al., 2003). Während die Invertebraten *C. elegans* und *Drosophila* über ein bzw. zwei Lamin-Gene verfügen, wurden in Säugern drei Lamingene identifiziert: Zwei B-Typ Lamine, als LMNB1 und LMNB2 bezeichnet, und ein A-Typ Lamin, das LMNA. Von diesen Genen werden sieben alternativ gespleißte Isoformen exprimiert: Die Lamine A, A $\Delta$ 10, C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> bilden Spleißvarianten des Gens LMNA, während das LMNB1 Gen für das Lamin B1 und das LMNB2 Gen für die Keimbahn-spezifischen Lamine B2 und B3 kodieren (Alsheimer et al., 1999; Übersicht in Stuurman et al., 1996; Stuurman et al., 1998; Gruenbaum et al., 2003).

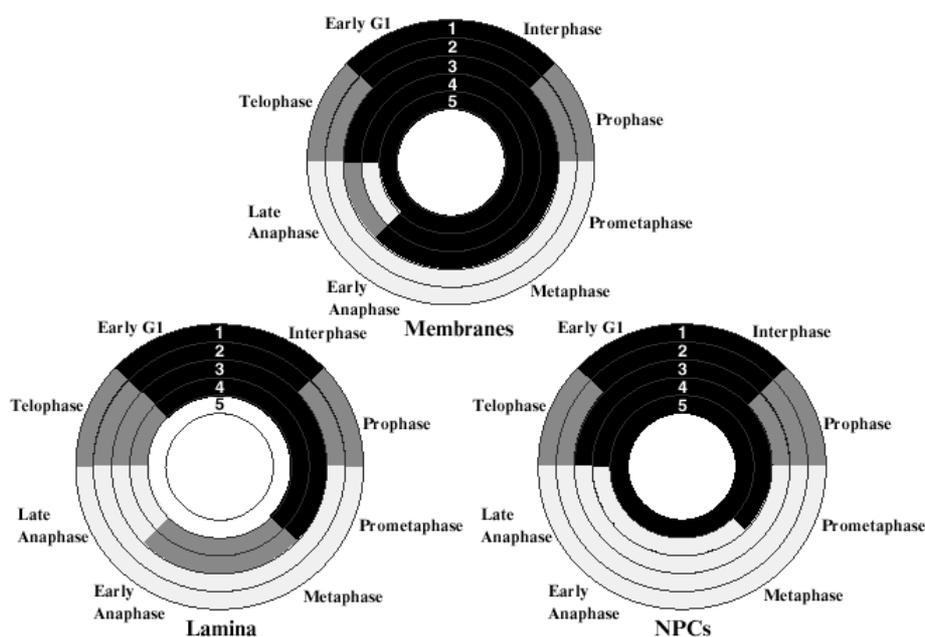


Abb. 2: Schematische Darstellung der Dynamik der Kernporenkomplexe (NPCs), der Lamina und der Kernmembran (Membranes) während der Mitose in 1, Vertebraten; 2, *Drosophila*; 3, frühe Embryonalstadien von *Drosophila*; 4, *C. elegans*; 5, Hefe. Die schwarzen Markierungen kennzeichnen intakte Strukturen, dunkelgraue Markierungen kennzeichnen partial zerfallene Strukturen; vollständig zerfallene Komponenten der Kernhülle sind durch hellgraue Markierung gekennzeichnet. Abgeändert nach Gruenbaum et al., 2003.

## II.2.1 Funktion der Lamine

Die Kernlamina erfüllt in jeder Zelle eine Vielzahl von Aufgaben. Als Bestandteil des Cytoskeletts trägt sie zur mechanischen Stabilisierung der Kernhülle und des Zellkerns bei, wie zahlreiche Untersuchungen belegen: Die Reduktion der Expression des Lamin Dm0 in *Drosophila melanogaster* durch P-Element Insertionen resultieren in einer eingeschränkten Lebensfähigkeit, Sterilität, deutlichen Störungen in der Bewegungsfähigkeit, Fragmentierung der Kernhülle, Akkumulation der Kernporenkomplexe und Bildung von cytoplasmatischen Annulate Lamellae (Lenz-Böhme et al., 1997) oder beeinflussen die Entwicklung der Tracheen und die dorso-ventrale Polarität der Oozyte durch die veränderte Lokalisation des Proteins Gurken (Guillemin et al., 2001). Die Veränderung der Expression von A-Typ-Laminen in HeLa Zellen beeinflusst die Morphologie der gesamten Kernlamina. Die Transfektion von dominant negativem veränderten Lamin A und C in HeLa Zellen resultiert in Defekten der postmitotischen Reorganisation des Zellkerns. Immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen zeigen eine punktförmige, inhomogene Verteilung sowie Aggregation des Lamin C in der Kernperipherie und im Nukleoplasma. Die endogenen Lamine B1 und B2, sowie die Membranproteine LAP2 (Lamina-assoziiertes Polypeptid 2) und Emerin sind ebenfalls in den Einschlüssen nachweisbar (Hendrati Rahajo et al., 2001; Bechert et al., 2002). Die Zellkerne von Hepatozyten und Fibroblasten aus Lmna „Knockout“ Mäusen zeigen eine gestörte Verteilung des peripheren Heterochromatins (Sullivan et al., 1999). Zum Zeitpunkt der Geburt weisen die Mäuse keinerlei phänotypischen Merkmale auf. Nach 2 – 3 Wochen werden die ersten Veränderungen sichtbar, es manifestieren sich eine schwere Muskeldystrophie sowie weitere Abnormalitäten, einschließlich dem Verlust von weißem Fett und Myelin in den Nervenzellen, was zu der Degeneration der Axone führt; nach weiteren 2 - 6 Wochen sterben die Mäuse.

Während der Mitose sind die Lamine essentiell für den Zerfall der Kernhülle sowie der Kernhüllenrenewaldung. Die Mikroinjektion von lamin-spezifischen Antikörpern in Säugerzellen oder das Einschleusen der dominant-negativ agierenden globulären Schwanzdomäne des Lamin LB3 von *Xenopus laevis* in Kernextrakten verhindert die Dekondensation des Chromatins und arretiert die Kernhüllenrenewaldung (Benavente und Krohne, 1986; Lopez-Soler et al., 2001).

Die Phosphorylierung der Lamine sowie deren Interaktionspartner durch die zellzyklus-spezifische p34<sup>cdc2</sup>-Kinase während der Prophase bzw. der Prometaphase leitet durch die Destabilisierung der Kernlamina den Zerfall der Kernhülle ein (Gerace und Blobel, 1980; Ottaviano und Gerace, 1985, Übersicht in Moir et al., 2000). Bei der postmitotischen Reorganisation des Zellkerns sind die Lamine auch an der räumlichen und funktionellen Anordnung des Chromatins durch die Interaktion mit Histonen und dem Heterochromatin Protein 1 (HP1) sowie an der ordnungsgemäßen Organisation der Kernporenkomplexe beteiligt (Jones et al., 2000; Bannister et al., 2001; Kourmouli et al., 2001; Shareef et al., 2001). In *Xenopus* konnte die direkte Interaktion der Kernlamine mit dem Protein NUP153,

einem Bestandteil der Kernporenkomplexe nachgewiesen werden. Die Inhibierung der Neubildung der Lamina resultiert in Kernporenkomplexen, in denen NUP153 fehlt. Die abnormale Aggregation von Kernporen in *C. elegans*, *Drosophila* sowie menschlichen Kulturzellen, in denen die Expression der Kernlaminae inhibiert wurde, bestätigt die Hypothese, dass die Kernlaminae an der Organisation und Verteilung der Kernporenkomplexe beteiligt sind (Lenz-Böhme et al., 1997; Harborth et al., 2001, Übersicht in Gruenbaum et al., 2003).

Eine intakte Kernmembran und Lamina sind auch für die DNA-Replikation essentiell. Die spezifische Rolle in der Replikation ist noch unklar, die Immunodepletion von Laminen in Kernrekonstitutionsversuchen in *Xenopus laevis* resultiert jedoch nicht nur in kleineren, fragilen Zellkernen, sondern auch in einer Störung der DNA-Replikation der neu gebildeten Kerne (Meier et al., 1991). Die Mikroinjektion von Lamin A, dem die aminoterminalen Kopfdomäne fehlt, führt in Säugerzellen ebenfalls zur strukturellen und funktionellen Unterbrechung der Lamina (Spann et al., 1997). Während die Neubildung der Kernmembran sowie der Kernporenkomplexe unbeeinflusst bleibt, wird die DNA-Replikation inhibiert. Die Laminae liegen in nukleoplasmatischen Aggregaten vor, in denen auch die an der Elongation der Replikation beteiligten Faktoren PCNA (**P**roliferating **C**ell **N**uclear **A**ntigen) und RFC (**R**epliation **F**actor **C**omplex) nachgewiesen werden konnten. Diese Faktoren sind auch in normalen Zellen in intranukleären Aggregaten mit Laminen assoziiert. Somit scheinen die Laminae einen signifikanten Einfluss auf die Elongationsphase der DNA-Replikation auszuüben.

Eine wichtige Rolle der Laminae in der Regulierung der Transkription wird durch die Interaktion der Kernlaminae mit einer wachsenden Anzahl von identifizierten Transkriptionsfaktoren, mit Chromatin sowie mit der RNA Polymerase III Transkriptionskomplex bestätigt. Die ordnungsgemäße Organisation der Kernlaminae ist an der RNA-Polymerase III vermittelten Transkription beteiligt, so resultiert die Unterbrechung der intakten Kernlaminae in der Rekrutierung von A- sowie B-Typ Laminen, als auch von Splicing Faktoren, snRNPs (small ribonuclear particles) und Transkriptionsfaktoren in intranukleären Aggregaten (Spann et al., 2002).

Einige der in der Peripherie des Zellkerns lokalisierten Transkriptionsfaktoren scheinen indirekt mit der Lamina zu interagieren, während für andere, wie die Transkriptionsfaktoren Oct-1, dessen POU-Domäne in immortalisierten Zellen die Expression des Kollagenase-Gens reprimiert (Imai et al., 1997) und das transkriptionshemmende Retinoblastoma Protein (pRB, Ozaki et al., 1994) eine direkte Interaktion mit Lamin B (Oct-1) oder A-Typ Laminen (pRB) nachgewiesen werden konnte. Von besonders großem Interesse scheinen diese Interaktionen bezüglich der mit Mutationen im LMNA Gen assoziierten humanen genetischen Erbkrankheiten zu sein, die zur Manifestation von Lipodystrophien führen. Durch Mutationen in der für die carboxyterminale Schwanzdomäne kodierenden Region des LMNA Gens wird die Assoziation mit dem Transkriptionsfaktor SREBP-1 (**S**terol **R**egulatory **E**lement-**B**inding

Protein-1), der in der Regulation der Cholesterol-Biosynthese und der Adipogenese involviert ist, negativ beeinflusst (Favreau et al., 2003).

Die meisten der identifizierten Transkriptionsfaktoren sind in der Kernperipherie lokalisiert und direkt oder indirekt mit Komponenten der Kernlamina, einschließlich Lamine und Membranproteine assoziiert, wodurch vermutlich ihre transkriptionsregulierende Aktivität gehemmt wird.

Die Apoptose, der programmierte Zelltod, ist in unterschiedliche entwicklungspezifische Prozesse involviert und wird durch intrazelluläre wie extrazelluläre Signale, einschließlich Stress oder viralen Infektionen, ausgelöst. Sie ist durch vielfältige morphologische Veränderungen der Zelle, wie die Kondensation des Chromatins, die Fragmentierung der DNA sowie die Degradation cytoplasmatischer und nukleoplasmatischer Proteine durch substrat-spezifische Cystein-Proteasen, den Kaspasen, charakterisiert (Buendia et al., 1999; Übersicht in Cohen et al., 2001). Die Lamine der Vertebraten und des Invertebraten *Drosophila* werden schon sehr früh im apoptotischen Prozess, vor anderen identifizierten Membranproteinen, wie dem Lamin B Rezeptor (LBR) der Lamina-assoziierten Polypeptide 2 $\alpha$  und 2 $\beta$  (LAP2 $\alpha$ , LAP2 $\beta$ ) oder Komponenten der Kernporenkomplexe, einschließlich POM121 und NUP153 durch die Proteinkinase PKC $\alpha$ , phosphoryliert und durch Kaspasen degradiert (Duband-Goulet et al., 1989; Buendia et al., 1999; Übersicht in Gruenbaum et al., 2003). Der Abbau der Lamine resultiert in der anschließenden Dissoziation des Chromatins von der Kernhülle und leitet die Fragmentierung des Chromatins ein. Die Expression von veränderten Laminen in Kulturzellen, die nicht mehr von Kaspasen geschnitten werden können, führt zu einer signifikanten Verzögerung der apoptotischen Prozesse, insbesondere der Fragmentation der DNA durch die Nuklease CAD/DFF40 in BRK-Zellen (baby rat kidney) sowie der Lösung des Chromatins von der Kernhülle, was auf eine direkte Beziehung der Fragmentation der DNA und der Degradation der Lamine hinweist. Lamin-defiziente Zellen sowie Kulturzellen, in denen die Expression der B-Typ Lamine durch RNA interference (RNAi) reduziert wurde, weisen ebenfalls einige Charakteristika von apoptotischen Zellkernen auf, einschließlich der Aggregation der Kernporenkomplexe, der Kondensation des Chromatins und einer abnormalen Morphologie (Sullivan et al., 1999; Harborth et al., 2001). Die frühe Degradation der Lamine durch spezifische Kaspasen scheint jedoch nicht in allen Organismen für die einleitenden Prozesse der Apoptose essentiell zu sein, so wird in dem Nematoden *C. elegans* das Ce-lamin, das nicht als Ziel der in den meisten apoptotischen Prozessen involvierten Kaspase CED-3 erscheint, erst nach der Fragmentierung der DNA degradiert. Eine intakte Lamina scheint für die ordnungsgemäße Lokalisation der in der Apoptose involvierten Kaspase CED-4 nach der Translokation von den Mitochondrien in der Kernperipherie in *C. elegans* essentiell zu sein.

Die vielfältigen Untersuchungen geben Grund zur Annahme, dass die Expression der B-Typ Lamine für die Lebensfähigkeit der Zelle essentiell ist, während die Analysen der Lmna „Knockout“ Maus und der mit Lamin A/C assoziierten genetischen Erbkrankheiten auf eine entwicklungs- und gewebe- spezifische Funktion der A-Typ Lamine hinweisen.

## **II.3 Integrale und assoziierte Membranproteine der inneren Kernmembran**

Integrale sowie assoziierte Membranproteine der inneren Kernmembran sind durch die direkte oder indirekte Interaktion mit Laminen und/oder Chromatin an den vielfältigen, in II.2.1 erwähnten strukturellen und funktionellen Prozessen beteiligt. Die stetig wachsende Anzahl neuer charakterisierter Membranproteine in Invertebraten und Vertebraten verdeutlicht die Komplexität und Vielfältigkeit der inneren Kernmembran und der mit ihr assoziierten Lamina. Bis heute konnten über 20 dieser Proteine, einschließlich deren Splicevarianten in verschiedenen Spezies identifiziert werden, wobei die Anzahl innerhalb einer Spezies in höheren Organismen und so die Komplexität des Aufbaus der inneren Kernmembran zunimmt. Zusammengefasst konnten bisher eine Reihe von integralen Membranproteinen wie der Lamin B Rezeptor (LBR), Emerin, MAN1, Nurim, Nesprin-1 und 2, Ring Finger Binding Protein (RFBP), Unc-83 und -84, LUMA, die Lamina-assoziierten Polypeptide 1 und 2 (LAP1, LAP2) einschließlich ihrer vielfältigen Splicevarianten, von denen einige durch die Abwesenheit einer Transmembrandomäne zu den peripheren Membranproteinen gezählt werden, sowie die peripheren Membranproteine Otefin, GCL und Young Arrest (YA) charakterisiert werden (Übersichten in Dechat et al., 2000; Dreger et al., 2001; Foisner et al., 2001; Georgatos, 2001; Gruenbaum et al., 2003). Mit Ausnahme des Nurims weisen alle diese Proteine eine lange aminoterminal, nukleoplasmatische Domäne auf, die an der Interaktion mit Laminen und/oder Chromatin beteiligt ist. Die Membranproteine der inneren Kernmembran werden an den Ribosomen des rauhen Endoplasmatischen Retikulums synthetisiert und gelangen durch laterale Diffusion in die innere Kernmembran, wo sie durch spezifische Interaktionen mit Laminen und/oder Chromatin im Zellkern immobilisiert werden (Diffusions-Retentions-Modell, Soullam und Worman, 1995; Ellenberg et al., 1997; Östlund et al., 1999).

### **II.3.1 Der Lamin B Rezeptor (LBR)**

Der Lamin B Rezeptor wurde erstmals 1988 als integrales Membranprotein der inneren Kernmembran beschrieben (Worman et al., 1988) und gehört zu den am besten charakterisierten Proteinen der inneren Kernmembran. Der LBR setzt sich aus zwei strukturell und funktionell verschiedenen Domänen zusammen: dem ins Kernplasma ragenden Aminoterminus sowie den hydrophoben Carboxyterminus, der sich in acht Transmembrandomänen gliedert und über die das Protein in der inneren Kernmembran verankert wird (Worman et al., 1990; Ye und Worman, 1994). Strukturelle Analysen der nukleoplasmatischen Domäne des LBR der Vertebraten zeigen, dass sich die aminoterminal Domäne in 3 Subdomänen untergliedert: Die globuläre G1 Domäne

(Aminosäuren 1 - 60) wird durch eine nicht globuläre Linker-Region von der zweiten globuläre Domäne G2 (Aminosäuren 113 - 207) getrennt (Duband-Goulet und Courvalin, 2000). Die drei Subdomänen sind an der Interaktion mit verschiedenen Bindungspartnern beteiligt, so wird die Bindung an B-Typ Lamine und die Bindung des mit Heterochromatin assoziierten Chromodomänen-Proteins HP1 (Heterochromatin Protein 1; Ye und Worman, 1996; Ye et al., 1997) über die globulären Domänen G1 und G2 vermittelt, während die arginin- und serin-reiche Aminosäuresequenz der Linker-Region (Aminosäuren 71 - 100) direkt an Chromatin, bevorzugt an Linker-DNA, bindet (Ye und Worman, 1994; Duband-Goulet und Courvalin, 2000). In vitro interagiert der LBR mit dem Heterochromatin Protein 1, sowie den als Tetramer vorliegenden Histonen H3/H4 sowie mit HA95 und bildet mit diesen Komponenten einen stabilen Komplex (Polioudaki et al., 2001). Ebenso konnte der LBR als Teil eines großen Proteinkomplexes aus kernhaltigen Vogel-Erythrocyten isoliert werden, der neben dem LBR auch A- und B-Typ Lamine, eine spezifische Kinase (LBR Kinase) sowie zwei weitere Polypeptide mit einer molekularen Masse von 18 kD (p18) und 34 kD (p34), aufweist (Simos und Georgatos, 1992, 1994). Ob dieser Proteinkomplex ebenfalls in anderen Zellen und Spezies vorkommt, konnte noch nicht geklärt werden.

Die zellzyklusspezifische Bindung des LBR an B-Typ Lamine und Chromatin wird über die Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen reguliert (Appelbaum et al., 1992; Courvalin et al., 1992; Nikolakaki et al., 1996; Takano et al., 2002). Durch die Phosphorylierung verliert der LBR seine Affinität zu B-Typ Laminen, Chromatin und HP1, bleibt jedoch während der Mitose mit Membranvesikeln assoziiert und akkumuliert zu Beginn der Kernhüllenreuebildung mit den Chromosomen, wodurch er am Transport von Membranen zur Chromatinoberfläche beteiligt ist (Courvalin et al., 2002).

Der Transport dieses Proteins in den Zellkern wird durch zwei nicht-überlappende Signalsequenzen ermöglicht, die in der aminoterminalen Domäne und der ersten Transmembrandomäne lokalisiert sind (Smith und Blobel, 1993; Soullam und Worman, 1993; Ellenberg et al., 1997). Die carboxyterminale Domäne des Lamin B Rezeptor der Vertebraten weist eine starke strukturelle Ähnlichkeit zu den Mitgliedern der Sterol Reduktase Multigen Familie auf (Holmer et al., 1998), eine besonders starke Ähnlichkeit wurde zwischen dem LBR des Menschen und der Sterol C14 Reduktase der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* gefunden (42% identische Aminosäuren); ebenfalls besitzt der menschliche LBR die Fähigkeit, den enzymatischen Defekt der Sterol C14 Reduktase des defizienten Hefestammes *erg24* zu kompensieren (Silve et al., 1998). Mutationen im Gen, das für den menschlichen Lamin B Rezeptor kodiert, verursachen eine schwere genetische Erbkrankheit, die sich in den betroffenen homozygoten und heterozygoten Individuen in einem weiten klinischen Spektrum manifestiert. Die autosomal rezessive Form wurde als Hydrops-ectopic calcification-„moth-eaten“ (HEM) oder Greenberg skeletale Dysplasie beschrieben (Waterham et al., 2003), während die klassische „Pelger Huët Anomalie“ die heterozygote Form repräsentiert (Hoffman et al., 2002; Gastarena et al., 1999).

### II.3.2 LEM-Domänen Proteine und ihre Interaktionspartner

Eine Vielzahl von integralen und peripheren Membranproteinen und deren alternativ gespleißte Isoformen weisen in ihrer aminoterminalen Domäne ein hoch konserviertes Motiv, die LEM-Domäne, auf. Dazu gehören die für die Namensgebung verantwortlichen Lamina-assoziierten Polypeptide 2 (LAP2), Emerin und MAN-1 sowie Otefin von *Drosophila melanogaster* und XMAN1/SANE von *Xenopus laevis*. Das ca. 43 Aminosäuren lange LEM-Motiv besteht aus einer Helixstruktur, die sich aus drei Aminosäuren, gefolgt von zwei durch einen langen Loop miteinander verbundenen  $\alpha$ -Helices zusammensetzt (Cai et al., 2001). Die LEM-Domäne ist für die Interaktion mit einem kleinen, chromatinbindenden Protein, dem Barrier-to-Autointegration Factor (BAF) essentiell. Obwohl bisher nur für zwei dieser Proteine, Emerin und LAP2 $\beta$ , eine direkte Interaktion mit BAF nachgewiesen werden konnte, wird spekuliert, dass BAF durch die Bindung an die LEM-Domäne von Membranproteinen das Chromatin direkt mit der inneren Kernmembran und indirekt mit der Kernlamina vernetzt (Segura-Totten et al., 2002).

#### Die Lamina-assoziierten Polypeptide 1 und 2

Die ausschließlich in Vertebraten vorkommenden Lamina-assoziierten Polypeptide LAP1 und LAP2 werden in vielfältigen Isoformen von zwei Genen im Menschen und der Maus, exprimiert. In Amphibien und Fischen wurden bisher nur Isoformen des LAP2 Gens nachgewiesen. Alle LAPs weisen eine lange, aminoterminal Domäne, einen kurzen carboxyterminalen Schwanz sowie, ausgenommen LAP2 $\alpha$  und LAP2 $\zeta$ , eine Transmembrandomäne auf und sind Typ II Membranproteine (Übersicht in Dechat et al., 2000, Schoft et al., 2003).

Die entwicklungspezifisch exprimierten Lamina-assoziierten Polypeptide 1, von denen drei differentiell gespleißte Varianten (LAP1A, LAP1B und LAP1C) synthetisiert werden, interagieren in unterschiedlicher Affinität mit A- und B- Typ Laminen. Wie auch der LBR, werden diese Proteine während der Mitose phosphoryliert, wodurch die Assoziation mit der Kernlamina unterbrochen wird, und bleiben mit vesikulierten Membranen assoziiert (Foisner und Gerace, 1993).

Von den Lamina-assoziierten Polypeptiden 2 werden ebenfalls verschiedene Isoformen sowohl in Säugern (LAP2 $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , - $\delta$ , - $\epsilon$ , - $\zeta$ ), als auch in *Xenopus laevis* (XLAP2 $\beta$ , - $\gamma$ , - $\omega$ ) und *Danio rerio* (ZLAP2 $\beta$ , - $\gamma$ , - $\omega$ ) synthetisiert (Lang et al., 1999; Schoft et al., 2003; Übersicht in Dechat et al., 2000).

Die Lokalisation der Lamina-assoziierten Polypeptide unterscheidet sich sehr stark in Abhängigkeit der unterschiedlichen carboxyterminalen Regionen der einzelnen Isoformen. Während die Proteine, die über eine Transmembrandomäne verfügen, wie die alternativ gespleißten Isoformen LAP2 $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  des Menschen, in der inneren Kernmembran des

Zellkerns lokalisiert sind, liegen die beiden Isoformen LAP2  $\alpha$  und  $\zeta$  des Menschen im Nukleoplasma unter Aussparung des Nukleolus vor (Dechat et al., 2000).

Die am besten charakterisierte Isoform stellt das LAP2 $\beta$  dar. Für dieses Protein konnte sowohl eine direkte Interaktion mit B-Typ Laminen, als auch mit dem kleinen, chromatinbindenden Protein, dem Barrier-to-Autointegration Factor (BAF) über die allen Isoformen gemeinsame LEM-Domäne nachgewiesen werden (Furukawa, 1999; Cai et al., 2001; Shumaker et al., 2001). Die Lamin Bindungsdomäne des LAP2 von *Xenopus* und Zebrafisch bindet außerdem direkt oder indirekt an Lamin A (Lang und Krohne, 2003).

Zusätzlich zur LEM-Domäne konnte in der aminoterminalen Domäne der Lamina-assoziierten Polypeptide eine strukturell ähnliche, jedoch funktionell unabhängige Domäne, die LEM-shadow Domäne (Aminosäuren 1 – 50 des menschlichen LAP2) identifiziert werden, über deren positiv geladene Aminosäuren die direkte Bindung an Chromatin vermittelt wird (Cai et al., 2001).

## **Emerin und MAN1**

**Emerin** wurde ursprünglich als das in der Muskelerkrankung Emery Dreyfuss Muskeldystrophie (EDMD) mutierte *STA* Gen bezeichnet und weist als integrales Protein der inneren Kernhülle eine nukleoplasmatische, serinreiche aminoternale Domäne, die für die Assoziation mit A-Typ Laminen und BAF essentiell ist sowie eine Transmembrandomäne und eine sehr kurze, in die perinukleäre Zisterne ragende carboxyterminale Domäne auf (Fairley et al., 1999; Lee et al., 2001; Fairley et al., 2002). Die Interaktion mit A-Typ Laminen scheint für die Retention des Emerin in der inneren Kernmembran essentiell zu sein, da in Fibroblasten von Lamin A/C „knock-out“ Mäusen eine Diffusion des Emerin in das Endoplasmatische Retikulum beobachtet werden konnte (Sullivan et al., 1999). Durch verschiedene Untersuchungen konnte die Interaktion des Emerin sowohl mit BAF, als auch mit dem Transkriptionsfaktor Germ-Cell-Less (GCL) nachgewiesen werden (Haraguchi et al., 2001; Holaska et al., 2003). Erst kürzlich publizierte Daten belegen eine direkte Interaktion des Emerin mit dem Splicing-Faktor YT521-B in vitro (Wilkinson et al., 2003).

**MAN1** wurde ursprünglich durch die Charakterisierung von Antikörpern eines Patienten, der an einer Autoimmunerkrankung leidet, entdeckt (Lin et al., 2000). MAN1 weist zwei putative Transmembrandomänen auf, Extraktionsstudien und immunfluoreszenzmikroskopische Analysen zeigen, dass es sich ebenfalls um ein integrales Membranprotein handelt, wobei die LEM-Domäne aufweisende aminoternale Domäne, einschließlich der ersten Transmembrandomäne, für die Lokalisation in der inneren Kernmembran ausreichend ist (Wu et al., 2002). Bislang konnten noch keine Interaktionspartner, die für die Immobilisierung des MAN1 in der inneren Kernmembran essentiell sind, nachgewiesen werden, FRAP-Experimente (**F**luorescence **R**ecovery **A**fter **P**hoto**b**leaching), die eine ausgeprägte Immobilität dieses Proteins in der Kernhülle verglichen mit seiner starken Mobilität im

Endoplasmatischen Retikulum belegen, deuten jedoch auf eine Interaktion mit nukleären Proteinen hin.

Das orthologe Protein von *Xenopus laevis*, XMAN1 (auch als SANE, **S**mad1 **A**ntagonistic **E**ffector, bezeichnet) ist in die Induktion des Neuroektoderms während der frühen Embryogenese involviert. Diese Induktion erfolgt durch die Interaktion von XMAN1 mit Smad1 und die dadurch bedingte Inhibierung von BMPs (**B**one **M**orphogenic **P**roteins) (Osada et al., 2003; Raju et al., 2003).

### **Der Barrier-to-Autointegration Factor (BAF)**

Der Barrier-to-Autointegration Factor (BAF) wurde erstmals 1998 als ein zellulärer Faktor beschrieben, der die Autointegration revers transkribierter retroviraler DNA verhindert. Während der retroviralen Infektion der Zelle wird eine Kopie des viralen Genoms in das Genom der Wirtszelle integriert, vermittelt durch einen großen Nukleo-Protein-Komplex, dem Preintegrations Komplex (PIC), der aus viralen und zellulären Proteinen der Wirtszelle besteht. Die intramolekulare Integration, auch als Autointegration bezeichnet, wird durch die Interaktion der Preintegrations-Komplexe mit dem wirtseigenen, als Dimer vorliegenden Protein BAF verhindert. Der Barrier-to-Autointegration Factor ist im Reich der Metazoa hoch konserviert (Cai et al., 2001), weist jedoch keine Homologien zu anderen bekannten Proteinen auf. Kristall-Struktur-Analysen haben gezeigt, dass BAF ein „helix-hairpin-helix“ Motiv (HhH-Motiv) aufweist, welches in vielen Proteinen die unspezifische Bindung mit DNA vermittelt. Das HhH-Motiv ist durch zwei Helices, die durch eine haarnadelartige Schleife verbunden sind, charakterisiert. Die unspezifische Bindung an DNA wird durch die Interaktion der Amid-Gruppen der Polypeptidkette mit den Phosphatgruppen der DNA vermittelt (Umland et al., 2000). Die zellulären Funktionen von BAF sind noch weitgehend unbekannt. In mitotischen HeLa Zellen konnte eine Kollokalisierung des BAF mit dem integralen Membranprotein Emerin in bestimmten Regionen der Chromosomen nachgewiesen werden (Haraguchi et al., 2001; Segura-Totten et al., 2002). Während der Kernhüllenrebildung vermittelt die Assoziation von BAF mit Emerin dessen Bindung an die Chromosomen (Lee et al., 2001). Die Expression einer dominant negativen Mutante des BAF in Kulturzellen verhindert die Assoziation von Emerin und Lamin A mit der sich neu bildenden Kernhülle (Haraguchi et al., 2001). Die gleichzeitige Bindung von LAP2 und DNA in vitro (Shumaker et al., 2001) weist auf eine wichtige Funktion des BAF in der Regulation nukleärer Funktionen und Organisation hin; durch die Bindung an die LEM-Domäne von Membranproteinen vernetzt das BAF das Chromatin direkt mit der inneren Kernmembran und indirekt mit der Kernlamina (Segura-Totten et al., 2002). Neben der Rekrutierung der Membranen während der Kernhüllenrebildung scheinen diese Interaktionen während der Mitose sowie für die Chromatin Dekondensation während der Kernhüllenrebildung sehr wichtig zu sein, die Depletion des BAF in *Caenorhabditis elegans* durch RNA interference resultiert in schweren Defekten in der Mitose und in einem embryonalen lethalen Phänotyp (Zheng et al., 2000).

Durch die Interaktion des BAF mit Transkriptionsfaktoren wie dem Crx (cone-rod homeobox) und weiteren Transkriptionsfaktoren der Homeodomänen Protein Familie und deren Repression scheint BAF ebenfalls eine wichtige Rolle in der Gewebe- und Zelltyp spezifischen Regulation der Genexpression zu spielen (Wang et al., 2003).

### II.3.3 Otefin, Nurim, Nesprin-1 und -2 und Ring Finger Binding Protein

**Otefin** ist ein ubiquitär exprimiertes, peripheres Membranprotein von *Drosophila melanogaster*, welches in seinem Aminoterminus, der in das Kernlumen ragt, ebenfalls eine LEM-Domäne aufweist und mit Lamin Dm0 interagiert (Padan et al., 1990; Goldberg et al., 1998). Dieses Protein verfügt zwar, wie andere integrale Membranproteine, über ein carboxyterminales, hydrophobes Segment, es wird allerdings spekuliert, dass diese Region zu kurz ist, um die innere Kernmembran zu durchspannen. Im Gegensatz zu den integralen Membranproteinen der inneren Kernmembran, die nach der Synthese an den ER-gebundenen Ribosomen durch laterale Diffusion im ER die innere Kernmembran erreichen, wird der Transport des Otefin in den Zellkern vermutlich durch ein Kernlokalisierungssignal vermittelt und das Protein anschließend über hydrophobe Wechselwirkungen an der inneren Kernmembran lokalisiert (Ashery-Padan et al., 1997a; Ashery-Padan et al., 1997b).

**Nurim (Nuclear rim)** wurde als Protein der inneren Kernmembran beschrieben und weist fünf Transmembrandomänen aus kurzen, aufeinander folgenden Loops auf (Rolls et al., 1999). Bisher konnten noch keine Interaktionspartner identifiziert werden, Extraktionsstudien lassen allerdings auf eine starke Immobilisierung dieses Proteins in der inneren Kernmembran schließen.

#### **Nesprin-1 und Nesprin-2**

Nesprin-1, auch als Myne-1 bezeichnet, und Nesprin-2 kodieren für Typ-2 Membranproteine, die eine Transmembrandomäne sowie multiple Spectrin-Wiederholungen aufweisen. Nesprin-1 wird insbesondere in Muskelzellen exprimiert, liegt als Homodimer vor und zeigt eine Lokalisation mit Heterochromatin als auch eine starke Affinität zu A-Typ Laminen und Emerin (Übersicht in Gruenbaum et al., 2003).

**Ring Finger Binding Protein (RFBP)** ist eine über neun Transmembrandomänen in der inneren Kernmembran lokalisierte Typ IV ATPase, die durch den Verlust der für die Pump-Aktivität essentiellen Domäne charakterisiert ist. Bis auf die Interaktion mit dem Chromatin modifizierenden Faktor Rush ist über dieses Protein noch nichts Näheres bekannt (Übersicht in Gruenbaum et al., 2003).

### II.3.4 LUMA, Unc-83 und -84, Germ Cell Less (GCL) und Young Arrest (YA)

**LUMA**, ein Protein mit vier putativen Transmembrandomänen, scheint in allen Vertebraten und *Drosophila* exprimiert zu werden. Mutationen in den Genen **Unc-83** und **Unc-84**

(**Uncoordinated movement**) von *C. elegans* resultieren in einer fehlerhaften Kernpositionierung der Zellkerne in sich differenzierender Zellen während der Entwicklung des Nematoden. Untersuchungen von Unc-83 und -84 deuten darauf hin, dass beide Proteine über eine Transmembrandomäne in der inneren Kernmembran lokalisiert sind. Während Unc-84 ubiquitär exprimiert wird und die Interaktion mit dem *C. elegans* Lamin für dessen Lokalisation essentiell ist, scheint Unc-83 nur in sich bewegenden Zellen exprimiert zu werden. Proteine, die Homologien zu Unc-84 aufweisen, konnten in den Datenbanken von Säugern und Drosophila gefunden werden, allerdings wurden diese Proteine noch nicht näher charakterisiert (Malone et al., 1999; Übersicht in Gruenbaum et al., 2003)

**Germ Cell Less** (GLC) ist im Reich der Metazoa hoch konserviert und wurde ursprünglich in Drosophila identifiziert. GCL wird während der Embryogenese in Drosophila im posterioren Bereich des Embryos exprimiert und ist für die Keimzellbildung verantwortlich. In Säugerzellen bildet es einen Komplex mit der DP3 Untereinheit des DP3-E2F Transkriptionsfaktors und ist vermutlich in Interaktion mit LAP2 $\beta$  an der transkriptionellen Regulation beteiligt (Kimura et al., 2003).

**Young Arrest** (YA) wurde ebenfalls in Drosophila identifiziert und ist als maternal exprimiertes, peripheres Membranprotein in der Oogenese und der Chromatin Kondensierung beteiligt. Als peripheres Membranprotein der Kernhülle bindet es an B-Typ Lamine, Chromatin und Histon H2B (Lopez et al., 1994; Lopez und Wolfner, 1997; Liu et al., 1998).

## II.4 Genetisch bedingte Erkrankungen

Mutationen in Laminen und mit Laminen assoziierten integralen Membranproteinen sind mit verschiedenen genetisch bedingten Erkrankungen, deren Anzahl ständig wächst, assoziiert. Mutationen in dem für Lamin A und Lamin C kodierenden LMNA Gen verursachen vielfältige humangenetische Erkrankungen, einschließlich der autosomal dominanten (EDMD2) sowie rezessiven Form (EDMD3) der Emery Dreifuss Muskeldystrophie, „Limb girdle“ Muskeldystrophie Typ 1B (LGMD), Dilatierte Cardiomyopathie Typ 1 (DCM), eine noch nicht benannte Erkrankung die Symptome der LGMD und DCM vereint, familiäre partielle Lipodystrophie (FPLD) Typ Dunnigan, Mandibulakrale Dysplasie (MAD), Charcot-Marie-Tooth Erkrankung Typ 2 (CMT) sowie Hutchinson-Gilford Progerie (Übersicht in Burke und Steward, 2002; Worman und Courvalin, 2002; Hegele, 2003; Östlund und Worman, 2003; Vainzof und Zatz, 2003). Bisher wurden zahlreiche Mutationen des LMNA Gens beschrieben, die zur Manifestation von unterschiedlichen Erkrankungen, wie cardio- und neuromuskulären Erkrankungen, Lipodystrophien und Progerie, führen.

Auch die Zahl der genetisch bedingten Erkrankungen, die mit integralen Membranproteinen assoziiert sind, wächst stetig. Während die X-chromosomale rezessive Form der Emery-Dreifuss Muskeldystrophie, die durch Mutationen im für Emerin kodierenden Gen verursacht

wird, bereits sehr intensiv erforscht wird (Fairley et al., 1999; Tsuchiya et al., 1999; Fairley et al., 2002), konnten im letzten Jahr zwei weitere Erkrankungen, die Hydrops-ectopic calcification-“moth-eaten” (HEM) oder Greenberg skeletale Dysplasie (Waterham et al., 2003) sowie die „Pelger Huët Anomalie“ (Hoffman et al., 2002) charakterisiert werden, die durch Mutationen im Gen, das für den menschlichen Lamin B Rezeptor kodiert, verursacht werden.

#### II.4.1 Potentielle Ursachen der mit Mutationen im Lamin A und im Emerin assoziierten humangenetischen Erkrankungen

Die Tatsache, dass das LMNA-Gen in den meisten differenzierten Zellen exprimiert wird, erschwert das Verständnis, wie verschiedene Mutationen in einem einzigen Gen zu einer solchen Vielfalt von, auf spezifische Gewebe (Fett- und Muskelgewebe) beschränkten, klinischen Symptomen und resultierenden Erkrankungen führen.

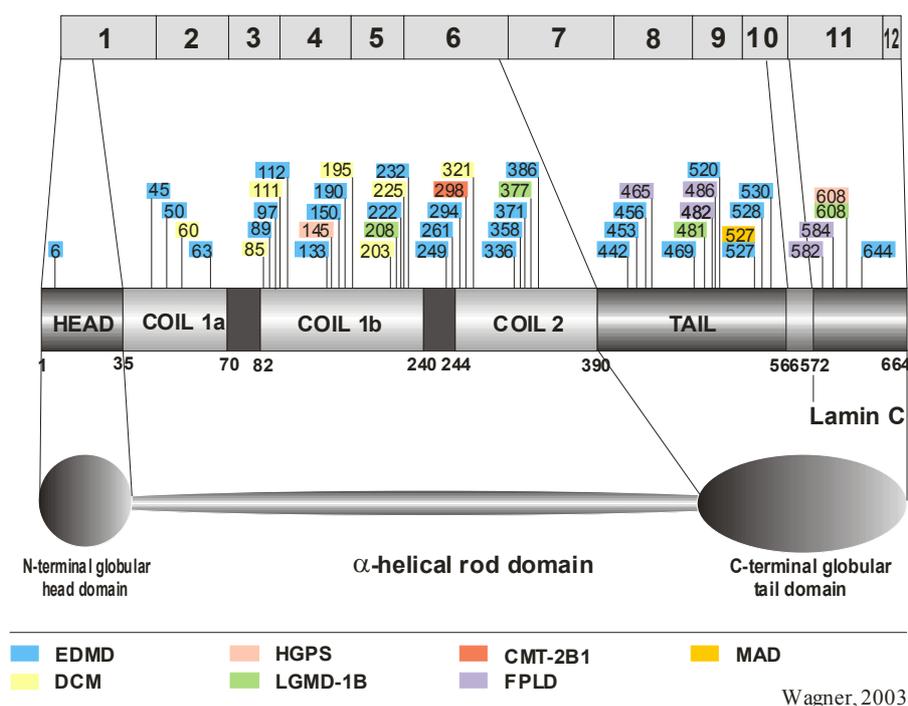


Abb. 3: Schematische Darstellung des menschlichen Lamin A/C Genes (LMNA), des Lamin A/C Proteins und der identifizierten Mutationen, die mit EDMD (Emery Dreifuss Muskeldystrophie, DCM (Dilatierete Cardiomyopathie), HPGS (Hutchinson-Gilford Progerie), LGMD-1B (Limb-girdle Muskeldystrophie), CMT-2B1 (Charcot-Marie-Tooth Erkrankung), FPLD (Familiäre Partiale Lipodystropie) und MAD (Mandibulakrale Dysplasie) assoziiert sind. LMNA kodiert für die beiden Isoformen Lamin A (664 Aminosäuren) und Lamin C (572 Aminosäuren).

Um dieses Paradox zu lösen, wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt, die sich nicht unbedingt ausschließen, sondern vermutlich miteinander in enger Beziehung stehen, und deren Kombination die unterschiedlichen Ausprägungen zur Folge haben:

Die sog. „Mechanische-Stress“ Hypothese geht davon aus, dass durch die gestörte Expression von Lamin A und Emerin die strukturelle Integrität der Lamina geschwächt wird, und die Zellkerne fragil und anfällig gegenüber apoptotischen Prozessen werden. Durch den mechanischen Stress, dem insbesondere die Skelettmuskel- und Herzmuskelzellen ausgesetzt sind, könnte die starke Belastung während jeder Kontraktion in einer Deformierung und Zerstörung der Zellkerne durch induzierte Apoptose resultieren. Auch die variable Beeinflussung der Skelettmuskulatur in EDMD, DCM und LGMD-1B könnte mit diesem Modell plausibel erklärt werden: Da der Skelettmuskel aus einem großen Syncytium besteht, würde die Beeinträchtigung nur weniger Zellkerne kaum zu einem phänotypischen Erscheinungsbild führen, solange noch genügend unbeschädigte Zellkerne vorhanden sind oder durch die Proliferation der Myoblasten die Beschädigten ersetzt werden. Erst wenn die Anzahl der beschädigten Zellkerne steigt, zeigten sich die Symptome der fortschreitenden Muskeldystrophie (Burke et al., 2001). Es gibt allerdings auch einige gravierende Erklärungsschwierigkeiten bezüglich dieses Modells, so ist beispielsweise nicht zu erklären, warum die Zellen der ventrikulären Erregungsleitung anfälliger sein sollten als andere Herzmuskelzellen. Auch die Relation zur Manifestation einer Lipodystrophie lässt sich mit dieser Hypothese nur schwer erklären (Östlund und Worman, 2003).

Eine andere Hypothese geht davon aus, dass durch Mutationen im LMNA-Gen die Interaktion mit nukleären Bindungspartnern und deren Immobilisierung in der inneren Kernmembran gestört wird, was deren Diffusion in das Endoplasmatische Retikulum zur Folge hat und so negative Auswirkungen auf die strukturelle und funktionelle Integrität des ER haben könnte. Es ist bekannt, dass der Verlust von Lamin A/C in einer fehlerhaften Lokalisation des Membranproteins Emerin im ER resultiert (Fairley et al., 1999; Fairley et al., 2002). Die Umverteilung der integralen Membranproteine könnte sich auf die enzymatische Aktivität der Proteine der Cholesterol- und Fettsäuren-Synthese auswirken, die im ER lokalisiert sind und somit vielleicht durch eine Veränderung des Lipidstoffwechsels an der Manifestation von Symptomen der Lipodystrophie beteiligt sein könnten. Bezüglich der Skelett- und Herzmuskulatur könnte die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  während der Kontraktionen ebenfalls durch Veränderungen des Sarkoplasmatischen Retikulums negativ beeinflusst werden (Burke und Steward, 2002).

Eine weitere Hypothese wurde durch die Identifizierung des muskel-spezifischen Membranproteins der inneren Kernmembran Syne1 aufgestellt, das vermutlich mit Lamin A interagiert. Lamin A könnte, ebenso wie für Emerin, für die Immobilisierung von Syne1, dessen Expression in Zellkernen der postsynaptischen Membranen am stärksten ist, in der inneren Kernmembran essentiell sein. Die Zellkerne der postsynaptischen Membran unterscheiden sich von anderen Zellkernen durch die Transkription spezifischer Gene, die für die Struktur und Funktion der Synapse notwendig sind. Die Charakterisierung von Syne1

fürhte zur Spekulation, dass dieses Protein für die ordnungsgemäße Positionierung der postsynaptischen Kerne wichtig sei und die Abwesenheit von funktionellen A-Typ Laminen in einer Umverteilung von Syne1 und damit auch der postsynaptischen Zellkerne resultieren könnte (Burke und Steward, 2002).

Eine andere Möglichkeit könnte sein, dass durch die veränderte Expression der Lamine deren Affinität zu zellspezifischen Bindungspartnern oder Transkriptionsfaktoren moduliert wird und somit die zell-typische Genexpression oder Signaltransduktionswege beeinflusst werden. Verschiedene nukleäre Proteine und Transkriptionsfaktoren, wie das Retinoblastoma Protein, interagieren mit A-Typ Laminen. Eine besondere Bedeutung könnte der Interaktion der A-Typ Lamine mit dem SREBP1 (Sterol Response Element Binding Protein 1) beigemessen werden, der als Adipocyten-Differenzierungsfaktor charakterisiert wurde (Lloyd et al., 2002). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung der Expression von SREBP1 den Verlust von weißem Fettgewebe, die Akkumulation von Lipiden in der Leber und anderen Geweben sowie die Ausprägung einer Diabetes zur Folge hat, ähnlich der klinischen Symptome, die mit den LMNA-assoziierten Lipodystrophien beobachtet werden können (Übersicht in Kirkland et al., 2002). Somit könnten Mutationen im LMNA die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation des Fettstoffwechsels beteiligt sind, beeinflussen. Diese Hypothese wird auch dadurch bekräftigt, dass sowohl Myoblasten, als auch Adipocyten durch die spezifische Differenzierung aus einem gemeinsamen Vorläufer, der mesenchymalen Stammzelle abgeleitet werden. Eine veränderte Regulation der Differenzierung der Preadipocyten in Fettzellen, wie sie auch im normalen Alterungsprozess des Menschen nachzuweisen ist, könnte die Akkumulation von weißem Fettgewebe in verschiedenen Organen und Geweben erklären. Auch ab einem Alter von 75 Jahren ist eine Umverteilung von Lipiden in Muskeln, Knochenmark und anderen Geweben zu beobachten. Während ein deutlicher Verlust des subkutanen Fettes zu erkennen ist, scheinen die visceralen Fettdepots nicht beeinflusst zu sein. Dieses ungleiche Verhältnis von visceralen zu subkutanen Fettgewebe ist mit einem erhöhten Risiko assoziiert, an Atherosklerose und Diabetes zu erkranken, beides Symptome, die auch bei der FPLD, MAD und HGPS zu beobachten sind (Taylor-Jones et al., 2001; Kirkland et al., 2002; Wilson, 2000). Die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Muskel- oder Fettzellen, ebenso wie die Differenzierung von Preadipocyten in Fettzellen, wird durch eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren gesteuert, ein sehr fein abgestimmtes Regulationsgefüge, das durch die veränderte Expression von Laminen und integralen Membranproteinen, wie Emerin, negativ beeinflusst werden könnte.

Mutationen in Laminen könnten auch deren Suszeptibilität gegenüber apoptotischen Prozessen verstärken. Lamine werden in der Apoptose bereits sehr früh von spezifischen Kaspasen degradiert. Der Phänotyp lamin-defizienter Zellen ähnelt denen apoptotischer Zellen; in ihnen ist ebenfalls eine Aggregation der Kernporenkomplexe, die Ablösung des Chromatin von der Kernhülle und die Veränderung der Morphologie des Zellkerns zu beobachten. Es konnte noch nicht geklärt werden, inwieweit diese Prozesse in der

Manifestation der mit LMNA assoziierten Erkrankungen relevant sein könnten, es konnten jedoch in den Zellen untersuchter Patienten keine Anzeichen einer verstärkten Apoptose beobachtet werden. Auch die Tatsache, dass Kaspasen erst nach dem Zerfall der Kernhülle Zugang zu den Laminen haben, scheint diese Hypothese nicht zu bekräftigen.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit stellt sich bezüglich der Tatsache, dass viele, mit Muskeldystrophien assoziierte Proteine Bestandteile eines hypothetischen Karyo-Cytoskeletts darstellen. Ein solches Netzwerk könnte die Verbindung zwischen A-Typ Laminen, Emerin und anderen, in Muskeldystrophien involvierten Proteinen des Dystrophin-Glykoprotein Komplexes (DGC) und des Cytoskeletts mit der Extrazellulären Matrix darstellen. Es wird vermutet, dass durch die Interaktion des Syne/Anc-1 mit UNC-84/SUN Verbindung der Lamina mit dem DGC vermittelt wird. Durch die direkte oder indirekte Interaktion der in die perinukleäre Zisterne ragenden SUN-Domäne des UNC-84 mit dem Aktin-bindenden Protein Syne/Anc-1 könnte die Verbindung der Kernhülle mit dem DGC vermittelt werden (Starr und Han, 2003). Es wird angenommen, dass die Verbindung des Karyo-Cytoskeletts mit der Extrazellulären Matrix die Plasmamembran vor mechanischen Einflüssen, die sich besonders während der muskulären Kontraktion verstärken, schützt (Östlund und Worman, 2003).

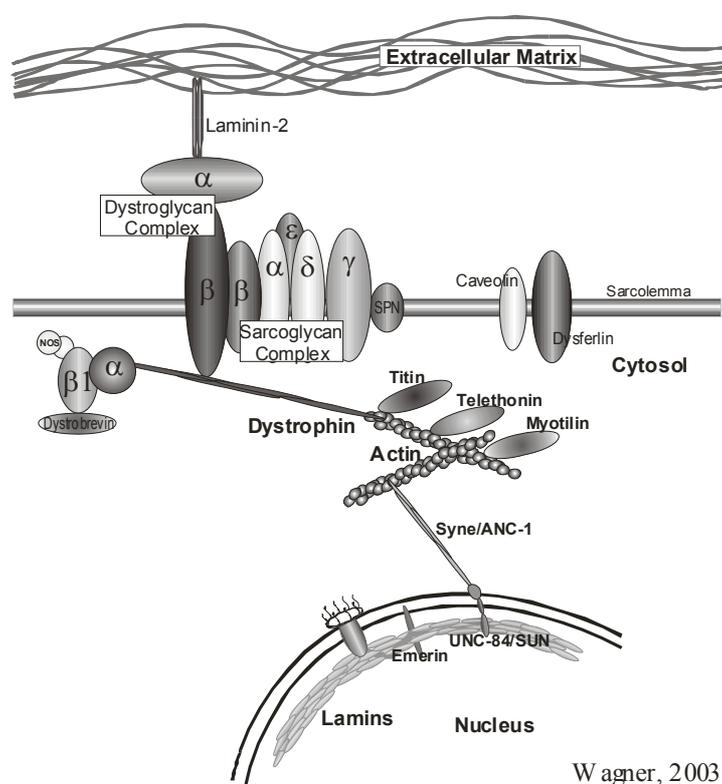


Abb. 4: Schematische Darstellung der Proteine der Plasmamembran, des Cytoplasmas und der Extrazellulären Matrix und ihre putativen Interaktionen mit der inneren Kernhülle.

## II.4.2 Greenberg skeletale Dysplasie und Pelger Huët Anomalie

Mutationen im Gen, das für den menschlichen Lamin B Rezeptor kodiert, verursachen eine schwere genetische Erbkrankheit, die sich in den betroffenen homozygoten und heterozygoten Individuen in einem weiten klinischen Spektrum manifestiert. Die autosomal rezessive Form wurde als Hydrops-ectopic calcification-“moth-eaten” (HEM) oder Greenberg skeletale Dysplasie beschrieben (Waterham et al., 2003), während die klassische „Pelger Huët Anomalie“ die heterozygote Form repräsentiert (Hoffman et al., 2002; Gastearna et al., 1999). Die HEM wird zu den klassischen, humanen Erbkrankheiten gezählt, deren phänotypische Erscheinungsbilder aus Defekten in der Sterolbiosynthese resultieren (Übersicht in Nwokoro et al., 2001; Porter, 2002). Das RHS/Smith-Lemli-Opitz Syndrom (SLOS, Battaile et al., 2001; Nowaczyk et al., 2001) wird als Prototyp dieser Erkrankungen bezeichnet, zu denen neben der HEM noch fünf weitere Krankheiten gehören, einschließlich „Desmosterolosis“ (Waterham et al., 2001), „X-linked dominant chondrodysplasia punctata type 2“ (CDPX2), „CHILD Syndrom“ (congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma/nevus and limb defects; König et al., 2000), Lathosterolosis und „Antley-Bixler Syndrom“ (Übersicht in Porter, 2002; Herman, 2003). Cranofaciale Abnormalitäten, geistige Zurückgebliebenheit sowie schwere Defekte in der Knochenentwicklung, die vermutlich aus dem Defizit an Cholesterin während der frühen embryonalen Entwicklung resultieren, sind mit allen beschriebenen Erkrankungen assoziiert. Mutationen, die in der Manifestation dieser humanen Erbkrankheiten resultieren, konnten, ausgenommen das noch nicht näher charakterisierte Antley-Bixler Syndrom, in den für die in der Sterolbiosynthese involvierten Enzymen kodierenden Gene identifiziert werden. Während die meisten der identifizierten Enzyme im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind, weist der menschliche Lamin B Rezeptor, dessen carboxyterminale Region mit der enzymatischen Aktivität einer 3 $\beta$ -Hydroxysterol  $\Delta$ 14-Reduktase assoziiert ist, eine ausschließliche Lokalisation in der inneren Kernmembran auf.

	<b>SLOS</b>	<b>Desmosterolosis</b>	<b>CDPX2</b>	<b>CHILD</b>
Inheritance	AR	AR	XLD	XLD
Enzyme defect	3 $\beta$ -Hydroxysterol $\Delta$ 7-reductase	3 $\beta$ -Hydroxysterol $\Delta$ 24-reductase	3 $\beta$ -Hydroxysterol $\Delta$ 8 $\Delta$ 7-reductase	3 $\beta$ -Hydroxysterol 4-decarboxylase
Gene symbol	DHCR7	DHCR24	EBP	NSDHL

	<b>Greenberg dysplasia</b>	<b>Antley-Bixler syndrome</b>	<b>Lathosterolosis</b>
Inheritance	AR	AR	AR
Enzyme defect	3 $\beta$ -Hydroxysterol $\Delta$ 14- reductase	Lanosterol 14- $\alpha$ -demethylase	3 $\beta$ -Hydroxysterol $\Delta$ 5- desaturase
Gene symbol	LBR	NR	SC5D

Abb. 5: Humane genetische Erbkrankheiten die mit Defekten in der Cholesterol Biosynthese assoziiert sind (verändert nach Porter, 2002).

AR, autosomal recessive; XLD, X-Linked dominant; NR, not reported.

Die beschriebenen Mutationen im humanen LBR Gen sowie Mutationen im homologen *ichtyosis* Genlocus der Maus weisen ein geno- und phänotypisch ähnliches Erscheinungsbild auf. Die Deletionen, Insertionen und Basenaustausche in der für die carboxyterminale Domäne des LBR kodierenden Region in Mensch [IVS12-5-10del; IVS2-2A→G; 1308G→A; IVS11+1G→A; 1173delC; 1129C→T; IVS13-2A→G; 500G→C; 501-504delCCTT; 1599-1605TCTTCTA→CTAGAAG] und Maus [815ins; 1088insCC; 1884insGGAA] führen vorwiegend zu einer veränderten Prozessierung des Primärtranskriptes, welches für ein verkürztes Protein kodiert (Waterham et al., 2003; Shultz et al., 2003). Westernblot- und immunfluoreszenzmikroskopische Analysen zeigen eine starke Reduktion der Expression des LBR, allerdings sind keine verkürzten Varianten detektierbar, was auf eine „nonsense-vermittelte Degradation der mRNA“ („nonsense mediated RNA decay“) oder eine posttranslationale Degradation des mutierten Proteins zurückzuführen ist.

Die betroffenen homozygoten Individuen weisen eine verstärkte pränatale Mortalitätsrate und schwere Entwicklungsdefekte auf, welche zu Störungen der enchondralen Knochenbildung und des Längenwachstums der Knochen (Chondrodystrophie) und zur Ausbildung eines Wasserkopfes führen. In den heterozygoten Individuen manifestiert sich die Mutation in einem veränderten Erscheinungsbild der lymphoblastoiden Zellen. Die Zellkerne der Neutrophile und Eosinophile weisen eine zweilappige Morphologie und eine verstärkte Kondensation des Chromatin auf (Horn et al., 2000; Trajkovski et al., 2002; Waterham et al., 2003). Der in der Expression stark reduzierte Lamin B Rezeptor scheint eine normale Lokalisation und Verteilung in der inneren Kernhülle aufzuweisen. Das phänotypische Erscheinungsbild ist jedoch nicht auf die Anwesenheit eines dominant negativen verkürzten Proteins zurückzuführen, sondern wird vermutlich durch die Reduktion der Expression des LBR verursacht (Waterham et al., 2003). Es wird spekuliert, dass die gestörte enzymatische Aktivität der carboxyterminalen Domäne des menschlichen LBR die bedeutendste Ursache für die Manifestation der PHA und Greenberg Dysplasie ist. Inwieweit die Funktion der an zahlreichen Interaktionen beteiligten aminoterminalen Domäne des LBR für die Ausprägungen der beiden Erkrankungen eine Rolle spielt, ist nicht bekannt. Es wird jedoch spekuliert, dass das den LBR kodierende Gen in der Evolution aus der Rekombination zweier primordialer Gene entstanden ist, von denen eines für ein nukleäres Protein, das andere für eine Sterolreduktase kodierte (Holmer et al., 1998). Die unterschiedlichen Funktionen der beiden Domänen, deren kodierende Regionen von einem großen Intron separiert werden, unterstützen diese Hypothese.

## II.5 RNA Interference (RNAi)

Das Einschleusen von doppelsträngiger RNA (dsRNA), korrespondierend zu spezifischen Gensequenzen, führt in vielen Organismen zur Inhibierung der Genfunktion durch die spezifische Degradation der endogenen mRNA (Übersicht in Brantl, 2002; Hutvagner et al., 2002; Tijstermann et al., 2002; Voinnet, 2002; Baulcombe 2003; Szweykowska-Kulinska et al., 2003).

Die Möglichkeit, durch die Injektion von dsRNA Genfunktionen zu beeinträchtigen, wurde zum ersten Mal für den Nematoden *Caenorhabditis elegans* beschrieben (Fire et al., 1998). Bis zu diesem Zeitpunkt war man davon ausgegangen, dass durch eingeschleuste antisense RNA die Genexpression inhibiert werden kann (Hamilton und Baulcombe, 1999). Die These, dass dieser Mechanismus durch die Hybridisierung von antisense RNA mit der endogenen mRNA ausgelöst wird, erwies sich teilweise als irrtümlich. Die zu diesem Zeitpunkt beobachteten Effekte können aus heutiger Sicht auf Kontaminationen eines geringen Anteils von dsRNA Molekülen zurückgeführt werden. Das Paradox der Entdeckung, dass Moleküle mit sense-Charakter in *C. elegans* ebenso effektiv zur Inhibierung von Genexpression waren wie antisense RNA (Powell-Coffman et al., 1996), wurde durch das Labor von Fire und Mello (Fire et al., 1998; Montgomery und Fire, 1998) gelöst, die demonstrieren konnten, dass das Einschleusen von dsRNA, korrespondierend zu spezifischen Gensequenzen zu der Inhibierung deren Funktionen führt. Der als RNAi (RNA interference) bezeichnete Prozess wirkt durch einen posttranskriptionellen Mechanismus. Montgomery, Xu und Fire (Montgomery et al., 1998) stellen fest, dass die Injektion von dsRNA, korrespondierend zu Intron- oder regulatorischen Sequenzen, zu keinem sichtbaren Phänotyp führte.

Bis heute konnte das Phänomen der RNAi in allen multizellulären Organismen, einschließlich *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Trypanosoma brucei*, *Neurospora crassa* und Säugern, beobachtet werden (Ngo et al., 1998; Wianny und Zernicka-Goetz, 2000; Elbashir et al., 2001, Paddison et al., 2002; Kamath und Ahringer, 2003; Tschudi et al., 2003).

### II.5.1 Mechanismus der RNAi

Die spezifische Degradation der zur eingeschleusten dsRNA komplementären mRNA wird durch einen komplexen Prozess vermittelt, an dem kleine, interferierende Ribonukleinsäuren (small interfering RNAs, siRNAs) beteiligt sind (Übersicht in Narry, 2003). siRNAs werden durch die Prozessierung langer dsRNAs exogenen oder endogenen Ursprungs durch die Ribonuklease III (RNase III) *Dicer* hergestellt. *Dicer* wurde ursprünglich aus Schneider S2 Zellen von *Drosophila melanogaster* isoliert (Bernstein et al., 2001) und weist neben einer ATP-abhängigen RNA-Helikase Domäne und einer tandemartigen RNase III Domäne eine PAZ Domäne (Piwi/Argonaut/Zwille Domäne) sowie eine dsRNA-Bindungsdomäne (dsRBD),

auf. Homologe Ribonukleasen konnten bisher in *C. elegans* (*DCR-1*), *A. thaliana* (*Carpel Factory*, *Short Integuments-1*), und Säugern (*Dicer*) identifiziert werden (Ketting et al., 2001; Übersicht in Narry, 2003). Die hohe Konservierung dieses Enzyms im gesamten Reich der Metazoa weist auf die hohe Bedeutung der siRNA vermittelten zellulären Regulation hin.

Die lokale Entwindung der dsRNA Duplex wird in einem ATP-abhängigen Schritt durch die Helikase-Domäne von *Dicer* vermittelt, wodurch es möglich wird, lange dsRNAs in doppelsträngige siRNA Fragmente zu prozessieren. Diese weisen eine Länge von 21-25 Nukleotiden (nt) und Überhänge von zwei Nukleotiden an den beiden 3' Enden auf. Jeder Strang besitzt eine 5' Phosphatgruppe sowie eine 3' Hydroxylgruppe und ist durch eine perfekte Komplementarität zu der zu degradierenden mRNA charakterisiert (Zamore et al., 2000; Elbashir et al., 2000).

Ein Strang der siRNA Duplex wird in einen hoch molekularen Proteinkomplex, dem sog. RISC (**R**NA-**I**nduced **S**ilencing **C**omplex) eingebunden, der erstmals aus *Drosophila* Schneider S2 Zellen isoliert werden konnte (Hammond et al., 2002). Die ATP-abhängige Entwindung der siRNA durch eine noch nicht näher charakterisierte Helikase führt zum Verlust eines der beiden RNA-Stränge und kennzeichnet die Aktivierung des RISC (RISC\*). Die Degradation der zum verbleibenden Strang der siRNA komplementären mRNA wird im terminalen Schritt durch eine ebenfalls noch nicht identifizierte Endonuklease eingeleitet, danach wird die geschnittene mRNA entlassen und die katalytischen Untereinheiten des RISC können erneut in einen siRNA vermittelten Degradationszyklus eingeschleust werden.

Biochemische Analysen an *Drosophila* Schneider S2 und menschlichen HeLa Kulturzellen führten zur Charakterisierung weiterer Komponenten des RISC, die als Mitglieder der Argonaute Familie identifiziert werden: *Argonaute-2* (*AGO2*) und *Argonaute-1* (*AGO1*) in *Drosophila melanogaster* sowie zwei Isoformen des Translationsfaktors eIF2C (*eIF2C1* und *eIF2C2*) des Menschen (Hammond et al., 2002; Doi et al., 2003).

Argonaute Proteine sind ~ 100 kDa große, basische Proteine, die durch die Existenz von zwei konservierten Domänen, die als PAZ bzw. PIWI Domäne bezeichnet werden, gekennzeichnet sind. Während die biologische Funktion der aminoterminal oder zentral lokalisierten, ca. 130 AS langen PAZ Domäne, noch unklar ist, konnte nachgewiesen werden, dass die carboxyterminal lokalisierte, ca. 300 AS lange PIWI Domäne des menschlichen eIF2C für die Interaktion mit *Dicer* essentiell ist (Doi et al., 2003).

Die Mitglieder der Argonaute Protein-Familie sind sowohl an spezifischen Prozessen zur Inhibierung der Genfunktion auf transkriptioneller (*Dicer*, *Saccharomyces pombe*; *Piwi*, *Drosophila melanogaster*) und posttranskriptioneller (*rde-1*, **RNAi** deficient *Caenorhabditis elegans*) Ebene, als auch an der Regulationentwicklungsspezifischer Prozesse (*AGO1*, *Drosophila melanogaster*; *alg-1/alg-2*, *Caenorhabditis elegans*) und der Determination von Stammzellen (*Piwi*, *Drosophila melanogaster*; *PINHEAD/ZWILLE*, *Arabidopsis thaliana*) beteiligt. Während die Inhibierung der Proteinfunktion einiger Mitglieder in einer starken Beeinträchtigung in der Entwicklung der betroffenen Organismen resultiert, beeinflussen

andere Argonaute Proteine die Determination von Stammzellen oder sind in Prozessen der RNAi involviert (Carmell et al., 2002).

Die intensive Suche nach in der RNAi involvierten Proteinen führte zu der Charakterisierung einer weiteren Proteinfamilie, die RNA Helikasen. In vielen untersuchten Organismen, einschließlich *A. thaliana*, *D. melanogaster*, *C. elegans* und Mensch, konnten RNA Helikasen identifiziert werden, deren Einteilung in zwei Subfamilien erfolgt: Die RNA Helikase *SDE3* (silencing defective) von *Arabidopsis thaliana* sowie homologe Proteine der Fruchtfliege (*Spinde-E*) und des Menschen (*Gemin3*) werden in die Upf1p-ähnliche Familie eingeteilt, während die RNA-Helikase von *Caenorhabditis elegans* (*SMG-2*) der Upf1p Proteinfamilie angehört. Für weitere Komponenten des RISC, wie dem menschlichen *Gemin4*, konnten die biologischen Funktionen noch nicht näher charakterisiert werden (Carmell et al., 2002).

Da bereits geringe Mengen an eingeschleusten dsRNA Molekülen zur Ausprägung eines deutlichen Phänotyps genügen und das Phänomen der RNAi in Nematoden und Pflanzen nicht auf individuelle Zellen beschränkt ist, sondern ebenfalls eine systemische Ausbreitung (SAS: **S**ystemic **A**cquired **S**ilencing) in andere Gewebe und die Keimbahn beobachtet werden konnte (Tavernakis et al., 2000), wurde schon sehr früh vermutet, dass die eingeschleuste dsRNA in Nematoden und Pflanzen einen Amplifikationsschritt durchläuft.

Erste Hinweise ergaben sich aus der Analyse RNAi- und SAS- resistenter Nematoden. Während die Inhibierung bestimmter Gene eine systemische Ausbreitung der Inhibierung der Genfunktion durch RNAi (transitive RNAi), nicht aber die lokalen, durch RNAi induzierten Effekte verhindern konnte, wurde durch die Inhibierung anderer Gene der Mechanismus der RNAi negativ beeinflusst. Die intensiven Untersuchungen dieser Gene führten zur Identifizierung der RNA-abhängigen RNA Polymerasen (RdRPs) in *C. elegans* (*EGO-1*, *RRF-1*, *RRF-3*), *A. thaliana* (*SGS2/SDE1*, suppressor of gene silencing) und *Neurospora crassa* (*qde-1*, quelling defective; Cogoni und Macino, 1999), die an der Amplifikation der dsRNA (transitive RNA; Sijen et al., 2001) oder an der systemischen Ausbreitung der RNAi (Winston et al., 2002) beteiligt sind. Die Abwesenheit der transitiven und systemischen Komponente der RNAi in *Drosophila melanogaster* und Vertebraten wies bereits auf unterschiedliche Funktionen der in der Inhibierung der Genfunktionen involvierten Komponenten in Pflanzen und Nematoden sowie *Drosophila* und Säugern hin (Roignant et al., 2003).

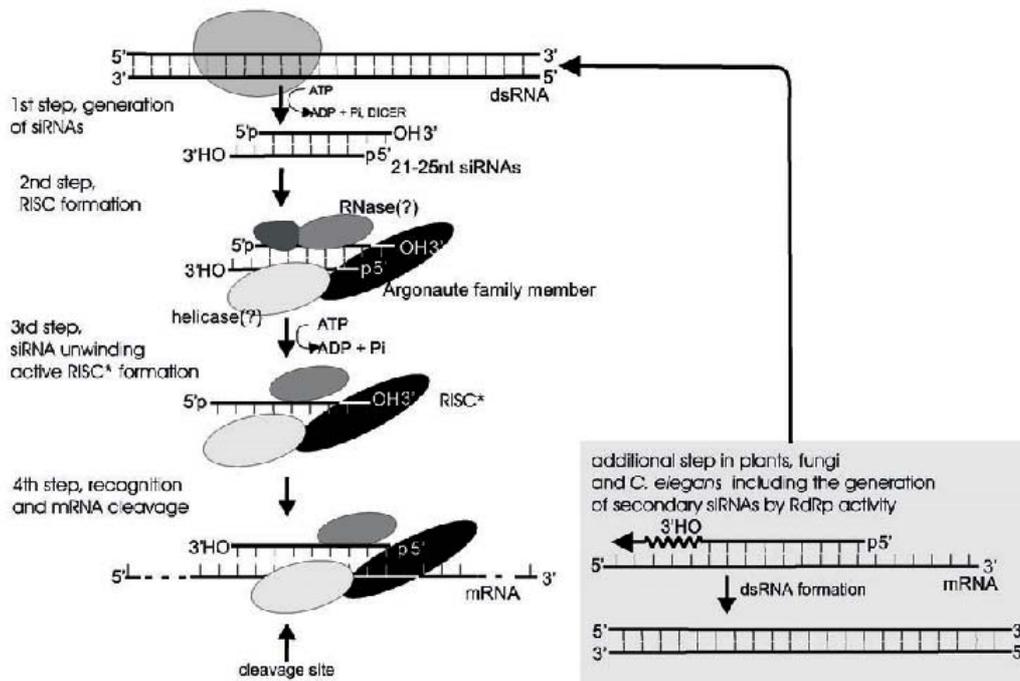


Abb. 6: Schematische Darstellung der RNAi; abgeändert nach Szweykowska-Kulinska et al., 2003

## II.5.2 Biologische Bedeutung

Erste Hinweise auf die biologische Bedeutung der RNAi, die in Pflanzen auch als PTGS (**P**ost-**T**ranskriptional **G**ene **S**ilencing) bezeichnet wird, wurde durch die Entdeckung erzielt, dass PTGS-defiziente Pflanzen eine Hypersensibilität gegenüber Infektionen bestimmter pflanzen-pathogener Viren aufweisen. Die Hypothese, dass das PTGS der Bestandteil eines aus evolutiver Sicht betrachteten sehr alten Abwehrmechanismus gegen virale Infektionen sei, wurde durch die Identifikation viraler Proteine, die in der Suppression der PTGS involviert sind, bekräftigt. Bis heute konnte eine Vielzahl viraler Suppressoren, einschließlich der *Helper-component Proteinase* (Hc-Pro) des Potyvirus, Protein *2b* des Cucumber Mosaik Virus, Protein *p25* des Potato Virus X, Protein *P1* des Sobemovirus und Protein *Av2* des Geminivirus identifiziert werden, welche die PTGS in verschiedenen Schritten inhibieren. Wie auch die RNase III *Dicer*, werden diese viralen Proteine, die die RNAi vermittelte antivirale Abwehr der Pflanzen inhibieren können, in die Familie der dsRNA-bindenden Proteine eingeordnet (Lichner et al., 2003; Ramanathan et al., 2003; Saunders und Barber, 2003). Die Inhibierung der RNAi durch virale Suppressoren ist nicht nur auf Pflanzen beschränkt, mit der Identifizierung des Proteins *B2* des Flock house virus (FHV) wurde ein virales Protein charakterisiert, das auch in Invertebraten und Vertebraten als Suppressor der RNAi fungiert (Übersicht in Vance und Vaucheret, 2003; Voinnet, 2001). Zusätzlich zum Schutz vor viralen Infektionen konnte in Invertebraten, einschließlich *C. elegans* und *Drosophila melanogaster*, die Beteiligung der in der RNAi involvierten Komponenten an der Inhibierung von

Transpositionen beobachtet werden. Hinweise auf weitere regulative Funktionen der RNAi-Maschinerie wurden in *Drosophila melanogaster* gefunden. In männlichen Fliegen wird die Genexpression des X-chromosomal kodierten Proteins *Stellate*, dessen Überexpression zur Sterilität führt, durch einen RNAi-ähnlichen Mechanismus inhibiert. Die Expression der dsRNA *Suppressor of Stellate*, deren hoch repetitive Sequenz auf dem Y-Chromosom lokalisiert ist, resultiert in der Degradation der korrespondierenden *Stellate* mRNA (Übersicht in Zamore, 2001).

Neben der Beeinflussung der Genfunktion auf post-transkriptioneller Ebene wird in Pflanzen durch das Einschleusen von dsRNA auch die Genfunktion auf transkriptioneller Ebene, als TGS bezeichnet, inhibiert. Die Arbeitsgruppe Matzke konnte nachweisen, dass durch das Einschleusen von NOSpro dsRNA des Cauliflower Mosaik-Virus, welche spezifische Sequenzen des Nopalinsynthase Promoters (NOSpro) aufweist, in der de novo Methylierung von Sequenzen des korrespondierenden Promoter resultiert. Mit diesem Nachweis konnte erstmals gezeigt werden, dass siRNAs nicht nur an der spezifischen Degradation von mRNA im Cytoplasma, sondern auch auf Chromatin Ebene an der epigenetischen Modifikation beteiligt sind (Mette et al., 2000).

Die Abwesenheit der transitiven und systemischen RNAi in höheren Organismen (Roignant et al., 2003) legt die Vermutung nahe, dass durch die Entwicklung des zellulären Immunsystems die ursprünglichere Abwehr viraler Infektionen, auch als VIGS (virus induced gene silencing) bezeichnet, durch RNAi bedeutungslos wurde.

Intensive Untersuchungen der an der RNAi beteiligten Komponenten in höheren Organismen führten zur Identifizierung eines zweiten Regulationsmechanismus durch sog. miRNAs (microRNAs), der ebenfalls durch die Involvierung spezifischer Komponenten der RNAi wie die RNase III *Dicer* und Mitgliedern der Argonaute Proteinfamilie charakterisiert ist, die Proteinexpression jedoch nicht auf posttranskriptioneller, sondern auf posttranslationaler Ebene reguliert.

### II.5.3 Posttranslationelle Regulation durch Micro RNA

Verschiedene Studien führten zur Entdeckung der microRNAs (miRNAs), die biochemisch mit einer Länge von ~ 22nt sowie einer 5' Phosphat- und 3' Hydroxylgruppe biochemisch nicht von siRNAs zu unterscheiden sind. Von den oft in Clustern angeordneten kodierenden Genen (Lagos-Quintana et al., 2001) werden polycistronische, lange Primärtranskripte (primary precursor for miRNA, pri-miRNAs) synthetisiert und im Zellkern in die für alle miRNAs charakteristische Haarnadelschleifen Form (pre-miRNAs) prozessiert. Nach dem Export in das Cytoplasma werden sie in einem sekundären Prozessierungsschritt zu ~ 22 nt langen reifen miRNA durch die RNase III *Dicer* getrimmt (Hutvagner et al., 2001; Hutvagner und Zamore, 2002; Lee et al., 2002; Zeng und Cullen, 2003).

Während siRNAs eine perfekte Komplementarität zu der zu degradierenden Ziel-RNA aufweisen, zeichnen sich die miRNAs mit Ausnahme derer der Pflanzen fast alle durch eine imperfekte Komplementarität von 1 -3 nicht gepaarten Nukleotiden aus.

Die aufgrund ihres temporalen, entwicklungspezifischen Expressionsmusters zunächst als small temporal RNAs (stRNAs) bezeichneten miRNAs wurden erstmals in *C. elegans* identifiziert.

Exemplarisch für nahezu alle miRNAs der Vertebraten und Invertebraten sind die an der Regulation der Entwicklung beteiligten stRNAs *lin-4* und *let-7* des Nematoden *C. elegans*. Die Expression von *let-7* während des 4. Larvalstadiums (L4) ist essentiell für den Übergang der larvalen Entwicklung zum adulten Nematoden. Durch die Bindung der 21-nt langen stRNA *let-7* an die 3' nicht translatierte Region (3' UTR) des Zielgens *lin-41* wird dessen Expression inhibiert. In einer ähnlichen Weise werden auch die entwicklungspezifischen Prozesse während des 2. Larvalstadiums durch die Bindung der 22-nt langen stRNA *lin-4* an die nicht translatierten Regionen der Gene *lin-14* und *lin-28* und Inhibierung deren Expression reguliert (Olsen und Ambros, 1999). Da die Menge der Transkripte von *lin-41*, *lin-14* und *lin-28* während der Entwicklung von *C. elegans* nicht verändert wird, vermutet man, dass die spezifische Inhibierung der Expression der Zielgene durch *lin-4* und *let-7* auf der Ebene der Translation stattfindet (Übersicht in Brantl, 2002).

Auch in *Drosophila* sowie allen anderen Bilateriern konnten stRNAs, ähnlich *lin-4* und *let-7*, identifiziert werden. Wie in *C. elegans*, scheinen auch in *Drosophila* die stRNA miR-125 und *let-7* an regulatorischen Funktionen während der Metamorphose beteiligt zu sein (Pasquinelli et al., 2000; Hutvagner et al., 2002).

Die unterschiedliche Regulation der Genexpression durch siRNAs oder miRNAs wird vermutlich durch deren Grad an Komplementarität zur Ziel-RNA bestimmt; die Determinierung der verschiedenen Regulationsmechanismen durch spezifische Interaktionspartner wird ebenfalls diskutiert (Übersicht in Voinnet, 2002; Doench et al., 2003). Durch die Interaktion mit spezifischen Faktoren, eventuell Paaren von verwandten RNA-bindenden Proteinen, wird der Eintritt in einen RNAi oder stRNA spezifischen Regulationsweg festgelegt. Ein solches Paar könnten die Proteine *RDE-1* und *ALG-1/ALG-2* von *C. elegans* darstellen. Beide Proteine sind Mitglieder der **PAZ** und **PIWI Domänen** (PPD) Protein-Familie. Während die Inhibierung von *RDE-1* zu Defekten in der RNAi führt, die Tiere jedoch eine normale Entwicklung zeigen, weisen *ALG-1/ALG-2* defiziente Tiere schwere Entwicklungsdefekte, jedoch keine Beeinflussung der RNAi auf (Abb. 7; Übersicht in Voinnet, 2002).



2003) und über 255 im Menschen (Lim et al., 2003) identifiziert werden, die sich in ihrer Sequenz, Struktur und ihrem Expressionsprofil innerhalb einer Spezies stark unterscheiden, jedoch alle durch die imperfekte Haarnadelstruktur, die durch 1 bis 3 ungepaarte Nukleotide unterbrochen wird, gekennzeichnet sind. Die starke Konservierung der meisten miRNAs im Reich der Metazoa, wie *miR-10*, dessen kodierende Sequenz im Hox-Gencluster aller untersuchten Organismen, einschließlich Drosophila, Anopheles, Zebra- und Kugelfisch, Maus und Mensch lokalisiert ist, weist auf eine bedeutende regulative Funktion dieser Familie der nicht kodierenden Ribonukleinsäuren hin (Lagos-Quintana et al., 2003). Viele der miRNAs des Menschen wurden in Assoziation mit einem ca. 550 kDa großen Proteinkomplex, der als miRNP bezeichnet wird und eine starke Ähnlichkeit mit RISC aufweist, gefunden (Hunter und Poethig, 2003). Die durch Computeranalysen identifizierten ~100 miRNAs von *C. elegans* und ~255 miRNAs des Menschen repräsentieren mit 0,5 - 1% aller kodierenden Gene dieser beiden Spezies einen prozentualen Anteil, der mit vielen großen Genfamilien, einschließlich Hormonrezeptoren, Zinkfinger Proteinen oder Homeodomänen Proteine, die ebenfalls in regulatorische Prozessen involviert sind, vergleichbar ist (Lim et al., 2003; Lim et al., 2003b). Ferner konnte kürzlich eine weitere Familie kleiner Ribonukleinsäuren identifiziert werden, die als tiny noncoding RNAs (tncRNAs) bezeichnet wurden, eine ähnliche Länge wie miRNAs aufweisen, jedoch nicht von Vorläufermolekülen, die eine Haarnadelstruktur aufweisen, von *Dicer* prozessiert werden. Da sie ebenfalls ein temporales Expressionsmuster aufweisen, werden auch für diese neu identifizierten Ribonukleinsäuren regulative Funktionen während der Entwicklung angenommen (Ambros et al., 2003).

#### II.5.4 Anwendung der RNAi

Während die praktische Anwendbarkeit der RNAi bei Nematoden (Mikroinjektion der dsRNA, Kultivierung der Nematoden in Gegenwart von dsRNAs oder Fütterung von dsRNA produzierenden *E.coli*; Kamath und Ahringer, 2003) und Drosophila (Mikroinjektion, Transfektion oder Kultivierung von Kulturzellen in Gegenwart von dsRNAs) sich als relativ einfach erweist, wurden lange Zeit in Säugern die Möglichkeiten der spezifischen Inhibierung der Genexpression durch RNAi, durch unspezifische Prozesse, die durch das Einschleusen von langen dsRNA Molekülen aktiviert wurden, eingeschränkt. Die Konfrontation von Zellen mit dsRNA Molekülen über 50 bp resultiert in der Inaktivierung des Translationsfaktors eIF2 $\alpha$  durch Phosphorylierung durch die dsRNA-abhängige Proteinkinase (PKR) sowie in der Aktivierung der 2'5' Oligoadenylat-Polymerase und Inaktivierung von I $\kappa$ B, was zu einer unspezifischen Degradation der mRNA, Inhibierung der Translation und zur Apoptose der Zelle führt. Die RNAi in somatischen Zellen wurde erst durch die Entdeckung von Thomas Tuschls Arbeitsgruppe, dass synthetische siRNAs der Länge von 21-nt zu kurz zur Aktivierung der PKR und 2'5' Oligoadenylat-Polymerase sind, anwendbar (Elbashir et al., 2001; Elbashir et al., 2002). Bis zu diesem Zeitpunkt war die Anwendbarkeit der RNAi auf

die Mikroinjektion in die Schwanzvene postnataler Mäuse (Lewis et al., 2002) sowie auf frühe Embryonalstadien (Wianny und Zernicka-Goetz, 2000), embryonale Zelllinien, wie embryonale Stammzelllinien und embryonale Karzinomzellen (Caplen et al., 2001; Billy et al., 2001; Yang et al., 2001; Paddison et al., 2002), beschränkt.

Um die Kosten der Synthese von siRNAs zu minimieren und eine stabile Expression von siRNAs in Zellen zu ermöglichen, wurden in den letzten 2 Jahren verschiedene Plasmidvektoren entwickelt, die eine Expression der siRNA innerhalb der transfizierten Zelle durch die Transkription von RNA Polymerase III abhängigen Promotoren wie U6 (Paddison et al., 2002; Sui et al., 2002) und H1 (Brummelkamp et al., 2002; Zhang et al., 2003) sowie tRNA<sup>Val</sup> Promotoren (Kawasaki und Taira, 2003) ermöglichen. Da die Transfektion von Plasmidvektoren in Abhängigkeit der eingesetzten Kulturzelllinie eine unterschiedliche Effizienz aufweist, wurde intensiv an dem Einsatz viraler Vektoren zur Einschleusung von siRNA in Säugerzellen gearbeitet (Barton und Medzhitov, 2002; Xia et al., 2002). Retrovirale Vektoren, die sich durch eine hohe Infektionsrate menschlicher Kulturzellen auszeichnen, wurden für den Einsatz von siRNAs in der in vivo Gentherapie entwickelt. Ebenso wurde auch der Einsatz lentiviraler Vektoren, die auch eine effiziente Infektion von nicht teilenden Zellen und Stammzellen zeigen, erprobt (Rubinson et al., 2003). Adenovirale Vektoren, die nur eine transiente Expression in infizierten Zellen ermöglichen, wurden in der Krebstherapie eingesetzt, in der keine persistierende Expression der siRNA notwendig ist (Shen et al., 2003).

Eines der bedeutendsten Merkmale der RNAi ist die hohe Sequenzspezifität. Der Austausch einer einzigen Base in der zur mRNA komplementären Sequenz resultiert in der Aufhebung des RNAi Effektes. Diese hohe Spezifität ermöglicht die selektive Inhibierung der Expression von Allelen, die Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen aufweisen und stellt somit eine wichtige neue Therapieform in der Medizin dar (Übersicht in Agami, 2002; Shi, 2003).

Die RNAi stellt somit nicht nur eine neue Methode zur Erforschung von Genfunktionen durch deren selektive Inaktivierung dar, sondern bietet auch neue Möglichkeiten im Einsatz in der Gentherapie zur Bekämpfung von viralen- und neurodegenerativen Erkrankungen sowie Krebserkrankungen.

## II.6 Zielsetzung

Die stetig wachsende Anzahl von neuen, humangenetischen Erkrankungen, die auf Mutationen von assoziierten (Lamin A/C) und integralen (Emerin, Lamin B Rezeptor) Membranproteinen der inneren Kernmembran zurückzuführen sind, haben das Interesse an der Erforschung der biologischen Funktionen dieser Komponenten des Zellkerns stark erhöht. Die Identifizierung neuer Proteine der inneren Kernmembran sowie deren Interaktionspartner in den Vertebraten *Mus musculus*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio*, *Gallus gallus* und *Homo sapiens* haben zu einem besseren Verständnis des komplexen Aufbaus

der Kernhülle sowie deren Funktion und Beteiligung an den vielfältigen regulatorischen Prozessen beigetragen.

Während die Zusammensetzung der Kernhülle der Vertebraten, deren Membranproteine und Interaktionspartner, in den letzten Jahren sehr intensiv erforscht wurden, sind in dem Invertebraten *Drosophila melanogaster* bisher nur sehr wenige Kernkomponenten bekannt. Die Anzahl der Membranproteine beschränkt sich auf die recht gut charakterisierten beiden Lamine (Lamin Dm0, Lamin C), auf das LEM-Domänen Protein Otefin sowie einige nukleäre Proteine einschließlich Germ-Cell Less (GCL) und Young Arrest (YA).

In den letzten Jahren gewann die Erforschung des Modellorganismus *Drosophila* an großer Bedeutung. Durch seine intensive Erforschung konnten fundamentale Erkenntnisse auf genetischen, molekular- und entwicklungsbiologischen Gebieten gewonnen werden (Übersicht in Rubin et al., 2000). Die Sequenzierung des kompletten Genoms von *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000) sowie die Entwicklung von Transposon- oder RNAi-basierter Methoden zur selektiven Inhibierung von Genfunktionen stellten die Grundlagen zur Identifizierung hoch konservierter Proteine, einschließlich der Transkriptionsfaktoren, regulatorischer, struktureller, chromosomaler Proteine ebenso wie Ionenkanäle und an Signaltransduktionswegen beteiligter Proteine dar. Ebenso sind viele komplexe Prozesse, wie Entwicklung, Verhalten, Schlaf, physiologische Prozesse ebenso wie die Neurodegeneration, sowie regulatorische Prozesse, zur Kontrolle der Entwicklung der Extremitäten, des Nervensystems, der Augen und des Herzens, zirkadiane Rhythmen sowie die angeborene Immunität von der Fliege bis zum Menschen hoch konserviert (Übersicht in Kornberg und Krasnow, 2000). Die Identifizierung von 177, zu 289 humanen, mit schweren Erkrankungen assoziierten Genen, orthologen Genen der Fliege bietet eine bedeutende Basis zum Verständnis an der Entwicklung humangenetischer Erkrankungen beteiligter, fundamentaler Prozesse (Rubin et al., 2000).

Wie bereits erwähnt, ist über die strukturelle und funktionelle Zusammensetzung der Kernhülle von *Drosophila* noch sehr wenig bekannt. Auch die Bedeutung von LEM-Domänen Proteinen und deren Interaktion mit nukleären Komponenten, die vermutlich bei Vertebraten zur Vernetzung der Kernlamina mit dem Chromatin beitragen, ist bei *Drosophila* noch nicht näher erforscht worden. Bis heute konnte nur ein LEM-Domänen Protein - das Otefin - charakterisiert werden. Zu den in Vertebraten sehr häufig vorkommenden Lamina-assoziierten Polypeptiden konnten in *Drosophila* keine verwandten Proteine oder genomische Sequenzen identifiziert werden.

In dieser Arbeit sollten neue integrale Membranproteine sowie potentielle Interaktionspartner in *Drosophila melanogaster* identifiziert und molekularbiologisch, biochemisch und immunocytoologisch durch die Herstellung von *Drosophila* spezifischen Antikörpern charakterisiert werden. Durch in vitro und in vivo Bindungsstudien sollten Interaktionen mit nukleären Proteinen näher untersucht werden. Die biologische Funktion sollte durch Charakterisierung eventuell vorhandener P-Element Insertionslinien sowie durch die spezifische Inhibierung der Genfunktion durch RNA-Interference (RNAi) analysiert werden.

### III. Ergebnisse

#### **III.1 Charakterisierung des Lamin B Rezeptor (dLBR) von *Drosophila melanogaster***

##### **III.1.1 Molekulare Charakterisierung des dLBR von *Drosophila melanogaster***

###### **III.1.1.1 BLAST Suche mit der publizierten Sequenz des Lamin B Rezeptor von *Xenopus laevis* in der *Drosophila* Flybase Datenbank**

Mit der publizierten Sequenz des Lamin B Rezeptor von *Xenopus laevis* (XLBR, Accession Nummer: Y17842) wurde in der Gendatenbank von *Drosophila melanogaster* (Flybase: <http://flybase.bio.indiana.edu/>) eine Suche nach ähnlichen Proteinen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das putative Protein, kodiert von dem Gen CG17952 (Flybase Accession Nummer: AE003455), eine deutliche Homologie zu der Sequenz des XLBR aufweist.

Das Gen CG17952 ist auf dem rechten Arm des 2. Chromosoms in der Region 57F10 - 57F11 lokalisiert. Der 5' nicht translatierte Bereich setzt sich aus 402 Basenpaaren zusammen. Die beiden kodierenden Exons (Exon 1: 1 - 418 bp; Exon 2: 419 - 2226 bp) werden von einem 530 Basenpaaren langen Intron separiert. Der 3' nicht translatierte Bereich setzt sich aus 145 Basenpaaren zusammen und enthält eine typische Polyadenylierungssequenz (AATAAA)(Abb. 8).

###### **III.1.1.2 Charakterisierung der EST-Klone LD38760 und SD06601, die die cDNA des Gens CG17952 von *Drosophila melanogaster* enthalten**

Die beiden EST-Klone LD38760 und SD06601 (Accession Nummern: AI519242; AI534069), die die vollständige Sequenz des Gens CG17952 enthalten, wurden von Celera Genetics; Invitrogen bezogen. Die vollständige cDNA, die aus isolierter polyA+ RNA von 0 - 24 h alten Embryonen von *Drosophila melanogaster* (LD pOT2 Plasmid Library) oder Kulturzellen der *Drosophila* Kulturzelllinie L2 (SD pOT2 Plasmid Library) synthetisiert wurde, lag in dem Expressionsvektor pOT2 vor.

Da bereits im Rahmen anderer Arbeiten Abweichungen in der Aminosäureabfolge der von der BDGP-Flybase und Celera Genetics publizierten Sequenzen gefunden worden waren,

wurde die komplette Sequenz des Gens CG17952 durch Sequenzierung der beiden EST-Klone ermittelt und mit der in den Gendatenbanken von *Drosophila melanogaster* publizierten Sequenz verglichen. Die Sequenzen beider EST-Klone wiesen einige Abweichungen zu der publizierten Sequenz auf. Durch die Sequenzierung von durch PCR amplifizierten, korrespondierenden Bereichen aus genomischer DNA konnten diese Abweichungen bestätigt werden. Das von dem Gen CG17952 kodierte putative Protein wurde von mir als dLBR (Drosophila Lamin B Rezeptor) bezeichnet.

### III.1.1.3 Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der dLBR cDNA

Durch Sequenzanalysen konnte festgestellt werden, dass beide EST-Klone die komplette cDNA des Gens CG19752 enthalten und die identischen Abweichungen zur publizierten Sequenz aufweisen. Die Sequenz wurde anhand der gefundenen Abweichungen korrigiert (Abb. 8).

Die nachfolgende Tabelle listet die Abweichungen in der Nukleotid- und abgeleiteten Aminosäuresequenz auf:

Position des Nukleotids	Abweichung der Nukleotidsequenz	Abweichung der Aminosäuresequenz
155	<u>AGC</u>	Ser → Thr
177	<u>CGI</u>	-----
198	<u>GCG</u>	-----
200	<u>GIT</u>	Gly → Ala
894	<u>TCC</u>	-----
949	<u>ITC</u>	Phe → Leu
1044	<u>CTA</u>	-----
1222	<u>AGT</u>	Ser → Gly
1578	<u>GAG</u>	-----
1620	<u>AAI</u>	-----
1806	<u>CAG</u>	-----

```

CAGCGACGTCGCCTTTTCCTTTTCGGCGCGCAAACACAAATAAATACAGAA
AATTAGAGAAATAAAGAAAGCAAAGAAACTAGAGAAAACCACAGCGTTACT
TTTACTTAAGTACATTAATAGATTGTGTGTATTTTGTAAACTATAAATAAC
1  ATGCAGCACTCGCCGAGCACAACGACTGATCATATCCATTTTGCAGCACGT
   M  Q  H  S  P  S  T  T  T  D  H  I  H  F  A  A  R
52  TTTTTCGACCGCAATTCATACACCATGGATCGACGCCTGAGACGCCCGCGT
   F  F  D  R  N  S  Y  T  M  D  R  R  L  R  R  P  R

```

103 CGCACGGAAGACGTGTCCAGCGGTCCACTTCTGGCCCAGTCCAAGCAGCCC  
R T E D V S S G P L L A Q S K Q P

154 ACCCTCCTGCCGGTGACCCGACGAACGGGCTCCGTGACAGCTGCCGCTGCC  
T L L P V T R R T G S V T A A A A

205 ACCGCCACCGCCACCGCCACCGCTGGTCCCGCCACCCGGACACGTGCCTCC  
T A T A T A T A G P A T R T R A S

256 CCGTCACGCAACAAGGTCGTTCGCACCGCCCTCGCCCCGATCTTGGCCCGCGC  
P S R N K V V A P P S P D L G P R

307 ACCCGTCGCTCCAGCCGGCCGAGGTCGTTCGGTGGGTCCGCTGACCGGATCG  
T R R S S R P R S S V G P L T G S

358 GGATCTGGTTCCTCGCTGCCCATCAAGGCCCATCAAGGCACGCACACCC  
G S G S S L P I K A A I K A R T P

409 ATCCCAGAGGTTTCCGAGGTATCATCGCCTATTTCGTTTGTCAACCAGCAAT  
I P E V S E V S S P I R L S T S N

460 CTGCCCATGACATTGACCACCAACACATCCAGCGGCGCACCCGAACAAAGCA  
L P M T L T T N T S S G A P N K A

511 TTTAACACAAGCTCCGTGAACAGCGGCAACAGCTTCAGCCGTACCACTACC  
F N T S S V N S G N S F S R T T T

562 AGCAGCACCACCACAACCACGGAGCGCATCGAGATCCGTGCCGAGGGAGAC  
S S T T T T T E R I E I R A E G D

613 GGCGAGGTGGACACGGATTCCATTCGCAAACGCATAACCGAACGACTGCGC  
G E V D T D S I R K R I T E R L R

664 AGATCGGTGTTCGAAGACAATCTCAAATCTAGCTGGAACACCAGTGACAAAC  
R S V S K T I S N L A G T P V T N

715 ACCGAAGAGGGCAGTCGTTATAGTAGGAGTGTGTCCCGATCCGTCTACGAC  
T E E G S R Y S R S V S R S V Y D

766 GATGAGAAGTCCTCCAAGCGTAGTTACTCTACGGGTGAAGAGGATATTGAT  
D E K S S K R S Y S T G E E D I D

817 GAGGAGGATGAATTGGAGGAGGATCAGTTCCGTAGTTTCAATGTAACCCGT  
E E D E L E E D Q F R S F N V T R

868 AAATCGGCCACACCGGCGGAAATATCATGCCGTGAGTTGAAGGCTCCTAGA  
K S A T P A E I S C R Q L K A P R

919 GAATTTGGCGGTTGGCTAGGCGCCTTCCTGCTCCTGCTACTTCTGCCACC  
E F G G W L G A F L L L L L L P T

970           GCCGTCTACTATTTGACATGGAGCTGTACGGCCAGAAACGCCTGTCAGTTT  
          A V Y Y L T W S C T A R N A C Q F

1021          AAGCACCTCAATCTGGGTATACTGCTGGATGTTAACTACCTAACGCGCCAG  
          K H L N L G I L L D V N Y L T R Q

1072          GTGTTCCAGCCACGAGTGGTGGGTGCCTTTGCCGCCTATCAGGTGGTGGTA  
          V F Q P R V V G A F A A Y Q V V V

1123          TTTCTGCTGGTGGCACTGCTACCAGGACGAAGGGTTCATCTCACCCGCGAG  
          F L L V A L L P G R R V H L T R E

1174          ACCTACAAGTTTAATTGTCTAGCAGTTTCGCTTACGCTTTTGATTGCCGGT  
          T Y K F N C L A V S L T L L I A G

1225          GGAGTGGCCGAGTATCTGAAGTATCCAGTGGTCACCTTCGTTCTGCGTCAC  
          G V A E Y L K Y P V V T F V L R H

1276          TATCTGCGTTTCTGCATCTTTGGACTCGTTGGCGCCTTTGTGGCAGCTGCT  
          Y L R F C I F G L V G A F V A A A

1327          TGGAGCTACTGGCTGGTGGACACCGCCAAGTACAATGTGCTGCGCCAAACG  
          W S Y W L V D T A K Y N V L R Q T

1378          CTGACCAATGATTATGGCAGGACTGGCAGCTTTGTGGTGGACTTCGCGCTG  
          L T N D Y G R T G S F V V D F A L

1429          GGCAGACAGCTCAATCCCAAGTGGCTAGGACGCGTGGATTGAAACAGTTT  
          G R Q L N P K W L G R V D W K Q F

1480          CAGTACCGTCTCTCCCTGGTGACCACCTTGATCTATGCCACCTGCTACATC  
          Q Y R L S L V T T L I Y A T C Y I

1531          TACCAGACGCTCGTGTGGCCCCAGAAGCCGCAGCTGGGTGAACAGGAAGGC  
          Y Q T L V W P Q K P Q L G E Q E G

1582          TATCTCTACCAGGCCAAATACTACTGGAACAATGTAACTATGATCCTGCC  
          Y L Y Q A K Y Y W N N V N Y D P A

1633          ACCCTGTTCTCGGCCAGCTGCTTGCTGTTCTACGTATTGGACGCCATTATT  
          T L F S A S C L L F Y V L D A I I

1684          TTCGAGCACCCTTGAGCTCATCCTTTGAGCTGCAACACGAAGGCTACGGC  
          F E H H L S S S F E L Q H E G Y G

1735          TGTTTGCTGCTCCTGCGCTACGCAGCCACTCCATATCTGCTGACGGCGGTC  
          C L L L L R Y A A T P Y L L T A V

1786          ACCAAGTATTTCTACGAGCAACGTGTACCCATCTCCTGCTGGTATGCTCCG  
          T K Y F Y E Q R V P I S C W Y A P

```

1837   CTGGCAGTGGCTGCTCTGCTGTCTCTGGGATTGCTGGTCAAGCGATTCAGT
        L A V A A L L S L G L L V K R F S

1888   TGC GCCTACAAGTACAAATACCGATTGAACTCGCAAAGTCCGATCTTCGCC
        C A Y K Y K Y R L N S Q S P I F A

1939   AACATCGAAACTATTACACGTATCAGGGAAGCCGTCTGCTGCTCAGCGGA
        N I E T I H T Y Q G S R L L L S G

1990   ATGTGGGGATGGGTACGCCAGCCCAACTATCTAGGCGACATCGTGGCCCTG
        M W G W V R Q P N Y L G D I V A L

2041   CTGGCCCTGGCTGCTCCCATGGCCCTGCGTCCGGCCTGGCCACCAGTTCTG
        L A L A A P M A L R P A W P P V L

2092   GGTCTTAGTCTGATCATCCTGCTCCTGCTCCATCGCGCCACCCGAGCGAAC
        G L S L I I L L L L H R A T R A N

2143   GCCCGGAATCAGGCGCGCTATCACTCCTCCTGGCAGCGCTACAGCACCCAG
        A R N Q A R Y H S S W Q R Y S T Q

2194   GTGCGCAGCTACATCCTGCCAGGGTCTACTTAA GCCGGGAGTTGACCCTT
        V R S Y I L P R V Y *

CTATTTTCTGTGGCCATTCTTATTTTTTATTTTCAGTTTGTTTTTATTTTATGT
TTCGAATTTGTATATATAATAACGTATTTCATAATTCATATTGTTCTAGACCAC
CAATACAGCCCCCCCCCCCCCTTCAGCCATTACTTTTAGTAACAAAATTTG
ATTTTACACTCGCCGACACACCTGCACATTAACAAAATGAATTTTCACACA
CATAATTATAGTTAAAAAACCATCTAGCTGTACGAACTTATGCGCTTAAGAT
CTAGACATCTTATATAATCAATACTTGTAATCTATGTGGTATGCATATAGAT
AGTACTTTTTTACATTCAAATATGAAATAAAAAAAACATAGTTTCTATGCT
ATGAAGAAACGCAA

```

Abb. 8: Korrigierte Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des Lamin B Rezeptor von *Drosophila melanogaster* (Accession Nummer: AE003455). Kodierende Nukleotide sind in Großbuchstaben, die 3' und 5' nicht translatierten Regionen sind unterstrichen dargestellt. Das Startcodon, das Stopcodon sowie das Polyadenylierungssignal sind fett gedruckt.

#### III.1.1.4 Analyse der Zusammensetzung und Eigenschaften des dLBR

Das offene Leseraster des Gens CG17952 kodiert für ein Protein von 741 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 82.948 Dalton. Der berechnete Isoelektrische Punkt des Gesamtmoleküls liegt bei 9,83. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Häufigkeit der einzelnen Aminosäuren und ihren prozentualen Anteilen am gesamten Protein.

Aminosäure		Anzahl	Anteil (%)
Ala	(A)	65	Ala
Arg	(R)	63	Arg
Asn	(N)	26	Asn
Asp	(D)	22	Asp
Cys	(C)	10	Cys
Gln	(Q)	26	Gln
Glu	(E)	29	Glu
Gly	(G)	39	Gly
His	(H)	12	His
Ile	(I)	27	Ile
Leu	(L)	87	Leu
Lys	(K)	23	Lys
Met	(M)	5	Met
Phe	(F)	28	Phe
Pro	(P)	40	Pro
Ser	(S)	70	Ser
Thr	(T)	65	Thr
Trp	(W)	13	Trp
Tyr	(Y)	40	Tyr
Val	(V)	50	Val

Das Hydrophobizitätsprofil (Abb. 9) zeigt acht putative Transmembrandomänen im carboxyterminalen Bereich des Proteins.

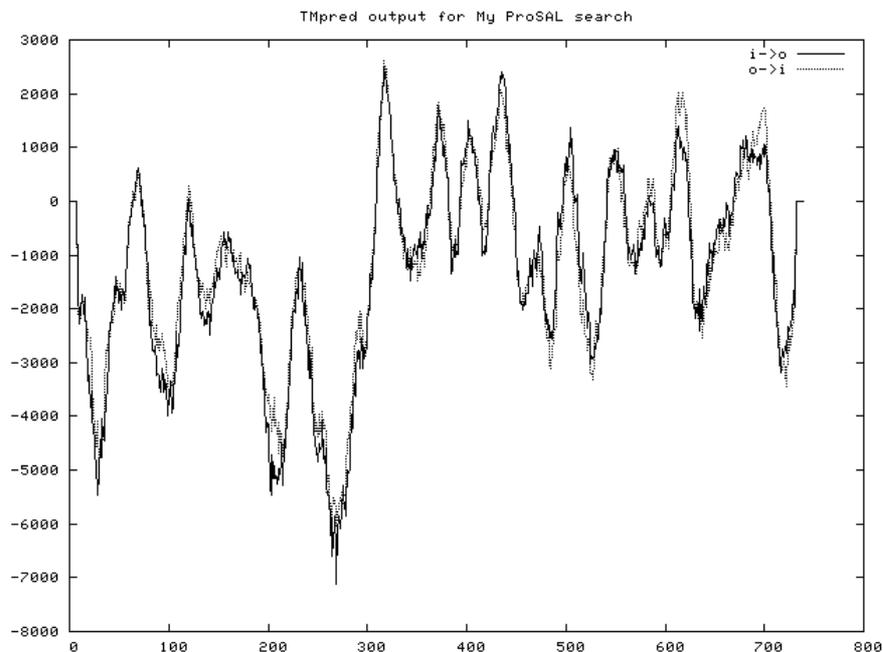


Abb. 9:  
Hydrophobizitätsprofil  
des dLBR von  
*Drosophila melanogaster*  
(nach Kythe-Andersen,  
1984).

Die Lage und Länge der Transmembrandomänen des dLBR sind in der nachfolgenden Tabelle angegeben.

Transmembran- domäne	Lage innerhalb des Proteins (in AS)	Länge (in AS)
1	308 - 328	21
2	363 - 382	20
3	395 - 411	17
4	429 - 448	20
5	497 - 513	17
6	541 - 562	22
7	610 - 632	23
8	673 - 693	21

### III.1.1.5 Vergleichende Analyse der *Drosophila* LBR Sequenz mit Datenbanksequenzen

Der putative Lamin B Rezeptor von *Drosophila melanogaster* zeigt beim Vergleich mit den publizierten Sequenzen des entsprechenden Proteins des Menschen (Accession Nummer: L25931) und *Xenopus laevis* (Accession Nummer: Y17842) eine deutliche Homologie im Bereich der potentiellen Transmembrandomänen (Aminosäuren 308 - 741 des dLBR: 22,8% Identität; Aminosäuren 650 - 676 des dLBR: 66,7% Identität). Die Transmembrandomänen 1 bis 6 weisen eine ähnliche Länge und Position auf, die potentiellen Transmembrandomänen 7 und 8 des dLBR sind jedoch wesentlich kürzer als die der Vertebraten-Proteine. Die Ähnlichkeit im Bereich der nukleoplasmatischen Domäne, die die Interaktion des LBR der Vertebraten mit B-Typ Laminen (Ye und Worman, 1994), Chromatin (Ye und Worman, 1994; Duband-Goulet und Courvalin, 2000), sowie dem Heterochromatin Protein 1 (HP1) (Ye und Worman, 1996; Ye et al., 1997; Polioudako et al., 2001) vermittelt, ist dagegen sehr gering (Aminosäuren 1 - 307 des dLBR: 7,8% Identität), während die Ähnlichkeit zwischen den beiden Vertebraten-LBRs signifikant höher ist (Aminosäuren 1 - 219 des XLBR: 36,5% Identität) (Abb. 10).

hLBR	---- <b>MPSRK</b> FAD <b>GEVVRGRWPGSSLYEVE</b> EILS---- <b>HDST</b> SQ <b>LYTVKYKDGTELE</b> LKEN	52
XLBR	MIKK <b>MPGQ</b> KYEI <b>GETVMGRWPGSSLYE</b> VQVVG---- <b>FNSK</b> SQ <b>EYKVLKDGTD</b> LDLKEG	56
dLBR	-MQHS <b>PSTTTD</b> HIHFAARFFDRN <b>SYTMDRRLRRPR</b> RTEDV <b>SSG</b> PLLAQ <b>SKOPTLL</b> PVTRR	59
	* * * * *	
hLBR	<b>DIKPLT</b> S <b>FRQRKGGSTSSSP</b> SRRRG----- <b>SRSRSRSRSPGR</b> PKSA	94
XLBR	<b>DIKRQNI</b> FNRKR <b>SSSPSRRRSRSR</b> SPG----- <b>RSRSPARRRSP</b> LRPSSPG	103
dLBR	TGSV <b>TAAAATATATATAGPATRTR</b> ASPSRN <b>KVVAPPSPDLGPRT</b> RR <b>SSRPRS</b> SV <b>GP</b> LTGS	119
	* * * * *	

hLBR	<b>RRSASASHQADIKEARR--EVEV<b>KLTP</b>LILKPFNGN----SISRY<b>NGEP</b>-----</b>	136
XLBR	<b>RPAKNGHQSSLI<b>RD</b>IKKGD<b>TLQVHLTPV</b>KLQDY-----STGKH<b>NGEP</b>-----</b>	145
dLBR	<u>GSGSSLPIKAA<b>IKARTPI</b>EVSEVSS<b>PIRL</b>STSNLPM<b>TLT</b>TNTSS<b>GAP</b>NKAFNTSSVNSG</u>	179
	* * * * *	
hLBR	<b>EHIERN<b>DAPHKNT</b>---QEK<b>F</b>LSL<b>SQ</b>-ESSYIATQY<b>SLR</b>PR<b>REEV</b>KLKEID<b>SKEEKY</b>VAKE</b>	191
XLBR	<b>EGFEK<b>IT</b>TRHRAT<b>PV</b>KAI<b>EL</b>MEEEL-ERNEK<b>VL</b>HYS<b>LSP</b>ROESS<b>IP</b>TG<b>IV</b>LADS--<b>VP</b>TE</b>	202
dLBR	<u>NSFSR<b>TTT</b>SS<b>TTT</b>TT<b>TERIE</b>IRAEGD<b>GEVD</b>TDSIRK<b>RITER</b>LRRSV<b>SKTIS</b>NLAG<b>TPVT</b>NT</u>	239
	* * * * *	
hLBR	LAVRT <b>FEV</b> TP <b>IRAKD</b> -----	206
XLBR	TLPEM <b>TEK</b> NAEN <b>PK</b> -----	216
dLBR	<u>EEGSRYSRSVRSVYDDEEKSSKRSYSTGEEDIDEEDELEEDQFRSFNVTRKSATPAEISC</u>	299
hLBR	-----LE <b>FGG</b> V <b>P</b> GV <b>FL</b> IM <b>FGLP</b> V <b>FL</b> FL <b>LL</b> MCK <b>Q</b> KD <b>PS</b> LL <b>NF</b> PPP-L <b>PALY</b> EL <b>W</b> ET <b>R</b> VF	259
XLBR	-----L <b>AF</b> GG <b>AIG</b> C <b>FL</b> FM <b>V</b> CV <b>PALLY</b> LL <b>VV</b> CG <b>Q</b> Q <b>Y</b> TS--G <b>YP</b> -----F <b>V</b> EL <b>LD</b> I <b>Q</b> VF	262
dLBR	<u>RQLKAPRE<b>FGG</b>W<b>LGA</b>FL<b>LL</b>LL<b>LL</b>L<b>P</b>TAV<b>Y</b>Y<b>L</b>T<b>W</b>SC<b>TARN</b>AC<b>Q</b>FKHL<b>N</b>L<b>G</b>IL<b>LD</b>V<b>N</b>Y<b>L</b>T<b>R</b>Q<b>V</b>F</u>	359
	*** * ** * * *	
hLBR	<u>GVYLL<b>W</b>FL<b>I</b>Q<b>V</b>LFY<b>LL</b>P<b>I</b>GKV<b>VE</b>GT<b>PL</b>ID<b>GRR</b>L<b>KYR</b>L<b>NG</b>F<b>YAF</b>IL<b>T</b>SA<b>VIG</b>-TS<b>LF</b>Q<b>G</b>VE</u>	318
XLBR	<u>G<b>FF</b>V<b>L</b>W<b>T</b>LL<b>Q</b>V<b>I</b>LY<b>LL</b>P<b>L</b>GKV<b>V</b>D<b>G</b>A<b>Q</b>L<b>K</b>NG<b>K</b>R<b>L</b>K<b>YR</b>I<b>SG</b>CS<b>AF</b>FL<b>TAA</b>IM<b>AG</b>M<b>KY</b>Y<b>E</b>IN</u>	322
dLBR	<u>QPR<b>V</b>V<b>G</b>A<b>FA</b>AY<b>Q</b>V<b>V</b>V<b>FL</b>L<b>V</b>ALL<b>P</b>GRR<b>V</b>HL<b>TR</b>-E<b>TY</b>KF<b>N</b>CL<b>AV</b>SL<b>T</b>LL<b>I</b>AG<b>G</b>V<b>A</b>E<b>Y</b>L<b>K</b>Y<b>P</b>V</u>	418
	* *	
hLBR	<b>FHYVY<b>SH</b>LF<b>Q</b>F<b>A</b>LA<b>A</b>T<b>V</b>FC<b>V</b>VL<b>S</b>V<b>Y</b>LY<b>M</b>RS<b>L</b>K<b>AP</b>R<b>ND</b>L<b>S</b>PAS-----<b>SG</b>NAV<b>Y</b>D<b>F</b>FI<b>G</b>R</b>	372
XLBR	<b>FLYI<b>F</b>EHY<b>L</b>Q<b>F</b>A<b>S</b>AT<b>L</b>F<b>S</b>FL<b>S</b>I<b>Y</b>LY<b>V</b>RS<b>Y</b>K<b>V</b>P<b>N</b>E<b>E</b>L<b>S</b>W<b>A</b>AN-----<b>SG</b>N<b>F</b>I<b>Y</b>K<b>F</b>V<b>M</b>G<b>R</b></b>	377
dLBR	<u>VT<b>F</b>VL<b>R</b>H<b>Y</b>L<b>R</b>FC<b>I</b>F<b>G</b>L<b>V</b>G<b>A</b>F<b>V</b>AA<b>A</b>W<b>S</b>Y<b>W</b>L<b>V</b>D<b>T</b>A<b>K</b>Y<b>N</b>V<b>L</b>R<b>Q</b>T<b>L</b>T<b>N</b>D<b>Y</b>G<b>R</b>T<b>G</b>S<b>F</b>V<b>V</b>D<b>F</b>AL<b>G</b>R</u>	478
	* * * * * * * * *	
hLBR	<b>ELNPR-IG<b>T</b>FD<b>L</b>K<b>Y</b>FC<b>EL</b>R<b>P</b>GL<b>I</b>G<b>W</b>V<b>V</b>IN<b>L</b>V<b>M</b>L<b>L</b>A<b>E</b>M<b>K</b>I<b>Q</b>D<b>R</b>AV<b>P</b>-----</b>	416
XLBR	<b>EINPR-IG<b>N</b>LD<b>L</b>K<b>V</b>F<b>V</b>IR<b>Q</b>AL<b>M</b>S<b>W</b>V<b>L</b>IN<b>L</b>IM<b>L</b>F<b>A</b>E<b>M</b>K<b>V</b>H<b>K</b>W<b>D</b>E<b>P</b>-----</b>	421
dLBR	<u>QL<b>N</b>PK<b>W</b>L<b>G</b>R<b>V</b>D<b>W</b>K<b>Q</b>F<b>Q</b>Y<b>R</b>L<b>S</b>L<b>V</b>T<b>T</b>LI<b>Y</b>AT<b>C</b>Y<b>I</b>Y<b>Q</b>T<b>L</b>V<b>W</b>P<b>Q</b>K<b>P</b>Q<b>L</b>G<b>E</b>Q<b>E</b>G<b>Y</b>L<b>Y</b>Q<b>A</b>K<b>Y</b>W<b>N</b>N</u>	538
	** * * * *	
hLBR	--- <b>SL</b> AM <b>I</b> L <b>V</b> NS <b>F</b> Q <b>L</b> LY <b>V</b> D <b>AL</b> W <b>NEE</b> ALL <b>T</b> T <b>M</b> D <b>I</b> I <b>H</b> D <b>G</b> F <b>G</b> F <b>M</b> L <b>A</b> F <b>G</b> D <b>L</b> V <b>W</b> V <b>P</b> F <b>I</b> Y <b>S</b> F <b>Q</b> A <b>F</b>	473
XLBR	--- <b>SL</b> SM <b>I</b> L <b>V</b> NS <b>F</b> Q <b>L</b> LY <b>V</b> D <b>G</b> F <b>W</b> NE <b>E</b> Y <b>F</b> LM <b>S</b> P <b>D</b> I <b>V</b> R <b>D</b> G <b>F</b> G <b>F</b> LL <b>A</b> F <b>G</b> SL <b>A</b> V <b>A</b> P <b>F</b> T <b>Y</b> S <b>L</b> Q <b>T</b> Y	478
dLBR	<u>V<b>N</b>Y<b>D</b>P<b>A</b>T<b>L</b>F<b>S</b>A<b>S</b>CL<b>L</b>F<b>Y</b>V<b>L</b>DA<b>I</b>I<b>F</b>EH<b>H</b>L<b>S</b>SS<b>F</b>EL<b>Q</b>HE<b>G</b>Y<b>G</b>CL<b>L</b>LL<b>R</b>Y<b>A</b>AT<b>P</b>Y<b>L</b>L<b>T</b>AV<b>T</b>K<b>Y</b></u>	598
	* * ** * *	
hLBR	<b>YLV</b> SH <b>P</b> NE <b>V</b> SW <b>P</b> MA <b>S</b> L <b>I</b> IV <b>L</b> K <b>L</b> CG <b>Y</b> VI <b>F</b> R <b>G</b> AN <b>S</b> Q <b>K</b> NA <b>F</b> R <b>K</b> NP <b>S</b> DP <b>K</b> LA <b>H</b> L <b>K</b> T <b>I</b> H <b>T</b> S <b>T</b> G <b>K</b> N	533
XLBR	<b>YLV</b> NN <b>P</b> V <b>D</b> LS <b>R</b> Q <b>A</b> SA <b>I</b> V <b>A</b> L <b>K</b> FL <b>G</b> Y <b>I</b> Y <b>R</b> G <b>AN</b> N <b>Q</b> K <b>A</b> F <b>R</b> Q <b>N</b> P <b>D</b> D <b>P</b> RL <b>S</b> HL <b>K</b> T <b>I</b> P <b>T</b> S <b>A</b> G <b>S</b> K	538
dLBR	<u>F<b>Y</b>E<b>Q</b>R<b>V</b>P<b>I</b>SC<b>W</b>Y<b>A</b>PL<b>A</b>V<b>A</b>ALL<b>SL</b>GL<b>L</b>V<b>K</b>RF<b>S</b>C<b>A</b>Y<b>K</b>Y<b>R</b>LN<b>S</b>Q<b>S</b>P<b>I</b>F<b>A</b>NI<b>E</b>T<b>I</b>H<b>T</b>Y<b>Q</b>G<b>S</b>R</u>	658
	* * * * * * * * *	
hLBR	<b>LLV</b> SG <b>W</b> W <b>G</b> F <b>V</b> R <b>H</b> P <b>N</b> Y <b>L</b> G <b>D</b> I <b>M</b> AL <b>A</b> W <b>SL</b> PC <b>G</b> F <b>N</b> H <b>I</b> L <b>P</b> - <b>Y</b> F <b>Y</b> I <b>I</b> Y <b>F</b> T <b>M</b> LL <b>V</b> H <b>R</b> E <b>A</b> R <b>D</b> E <b>Y</b> H <b>C</b> K	592
XLBR	<b>LLI</b> SG <b>W</b> W <b>G</b> F <b>V</b> R <b>H</b> P <b>N</b> Y <b>L</b> G <b>D</b> I <b>M</b> AL <b>A</b> W <b>CL</b> AC <b>G</b> F <b>N</b> H <b>I</b> L <b>P</b> - <b>Y</b> F <b>Y</b> V <b>I</b> F <b>L</b> T <b>L</b> L <b>L</b> I <b>D</b> R <b>A</b> A <b>R</b> D <b>E</b> Q <b>R</b> C <b>R</b>	597
dLBR	<u>LL<b>L</b>SG<b>M</b>W<b>G</b>W<b>V</b>R<b>Q</b>P<b>N</b>Y<b>L</b>G<b>D</b>I<b>V</b>ALL<b>A</b>L<b>A</b>AP<b>M</b>AL<b>R</b>PA<b>W</b>PP<b>V</b>L<b>G</b>LS<b>L</b>I<b>L</b>LL<b>L</b>H<b>R</b>A<b>T</b>R<b>A</b>N<b>A</b>R<b>N</b>Q</u>	718
	** ** * * * * * ** *	
hLBR	<b>KKY</b> G <b>V</b> A <b>W</b> E <b>K</b> Y <b>C</b> Q <b>R</b> V <b>P</b> Y <b>R</b> I <b>F</b> P <b>Y</b> I <b>Y</b>	615
XLBR	<b>EKY</b> GL <b>D</b> W <b>D</b> K <b>Y</b> C <b>Q</b> H <b>V</b> R <b>Y</b> R <b>L</b> L <b>P</b> Y <b>V</b> Y	620
dLBR	<u>AR<b>Y</b>H<b>S</b>SW<b>Q</b>R<b>Y</b>ST<b>Q</b>V<b>R</b>S<b>Y</b>IL<b>P</b>R<b>V</b>Y</u>	741
	* * * * *	

Abb. 10: Sequenzvergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen des Lamin B Rezeptor von Mensch (hLBR), Xenopus (XLBR) und Drosophila (dLBR). Identische Aminosäuren bei Mensch und Xenopus sind fett gedruckt; identische Aminosäuren bei allen drei Organismen sind fett gedruckt und mit einem Stern unterlegt. Die Lage der potentiellen Transmembrandomänen ist unterstrichen. Die mit Punkten unterlegte Region des Drosophila Proteins wurde zur Herstellung eines rekombinanten Polypeptids für die Herstellung von Antikörpern verwendet.

Die carboxyterminale Domäne des Lamin B Rezeptor der Vertebraten weist eine starke strukturelle Ähnlichkeit zu den Mitgliedern der Sterol Reduktase Multigen Familie auf (Holmer et al., 1998), eine besonders starke Ähnlichkeit (42% identische Aminosäuren) wurde zwischen dem LBR des Menschen und der Sterol C14 Reduktase der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* gefunden; ebenfalls besitzt der menschliche LBR die Fähigkeit, den enzymatischen Defekt der Sterol C14 Reduktase des defizienten Hefestammes *erg24* zu kompensieren (Silve et al., 1998). Die Suche mit der Sequenz der endogenen Sterol C14 Reduktase von *Saccharomyces cerevisiae* (ERG24, Accession Nummer: M99419) in der Gendatenbank von *Drosophila melanogaster* (Flybase: <http://flybase.bio.indiana.edu/>) zeigte die höchste Übereinstimmung der Sterol C14 Reduktase mit dem putativen Lamin B Rezeptor von *Drosophila* (score: 177,  $1.5e^{-19}$ ; Abb. 11).

dLBR	MQHSPSTTTDHIHFAARFFDRNSYTMRRRLRRPRRTEDVSSGPLLAQSKQPTLLPVTRRT	60
ERG24	-----	
dLBR	GSVTAAATATATATAGPATRTRASPSRNKVVAPPSPDLGPRTRRRSSRPRSSVGPLTGSG	120
ERG24	-----	
dLBR	SGSSLPIKAAIKARTPIPEVSEVSSPIRLSTSNLPMTLTTNTSSGAPNKAFTSSVNSGN	180
ERG24	-----MVSALNPRTEFEFGGLIGALGISIGLFPVFTIILN-----	35
	*   * *   *   *   *   *	
dLBR	SFSRTTTSSTTTTTERIEIRAEGDGEVDTDSIRKRITERLRRSVSKTISNLAGTPVTNTE	240
ERG24	-----	
dLBR	EGSRYSRSVRSVYDDEKSSKRSYSTGEEDIDEEDDELEEDQFRSFFNVTRKSATPAEISCR	300
ERG24	-----QMIRPDYFIKGFQNFDFIVELWNG-----	59
	*   *   *	
dLBR	QLKAPREFGGWLGAFLLLLLLPTAVYYLTTWSTARNACQFKHLNLGILLDVNYLTRQVFQ	360
ERG24	-IKPLRYLLGNRELWTVYCLWYGILAVLDVILPGR-----VMKGVQLRDGSKLS	107
	*   *   *   *   *   *   *	
dLBR	PRVVGAFAAAYQVVVFLVALLPGRRVHLTRETYKFNCLAVSLTLLIAGGVAEYLYKYPVVT	420
ERG24	YKINGIAMSTTLVVLAIRWK-----LTDGQLPELQYLYEN	143
	*   *   *   *   *   *	
dLBR	FVLRHYLRFCIFGLVGAFVAAAWSYWLVDTAKYNVLRQTLTNDYGRTGSEFVDFALGRQL	480
ERG24	HVSLCIISILFSFFLATYCYVASFIPLIFFKKNNGKREKILALGGNSGNIYDWFIGREL	203
	*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *	
dLBR	NPKWLGRVDWKQF-QYRLSLVTTLIYATCYIYQTLVWPQKPQLGEGYLYQAKYYWNNV	539
ERG24	NPR-LGPLDIKMFSELRPGMLLWLLINLSCLHH-----HYLKTG	241
	**   **   *   *   *   *   *   *	
dLBR	NYDPATLFSASCLLFYVLDAIIFEHHLSSSFELQHEGYGCLLLLRYAATPYLLTAVTKYF	599
ERG24	KINDALVLVNFLQGFFYIFDGVLNEEGVLTMMDITTDGFGFMFAFGDLSLVPFTYSLQARY	301
	*   *   *   *   *   *   *	
dLBR	YEQRVPISCWYAPLAVAALLSLGLLVKFRFCAYKYKYRLNSQSPIFANIETIHTYQGSRL	659
ERG24	LSVSPVELGWVKVVGILAIMFLGFHIFHSANKQKSEFRQGK-----LENLKSITKRGTKL	357
	*   *   *   *   *   *   *   *   *   *	

```

dLBR      LLSGMWGWVRQPNYLGDIVALLLALAAPMALRPAWPPVLGLSLIILLLLLHRATFRANARNQA 719
ERG24     LCDGWWAKSQHINYFGDWLISLSWCLATWFQTPLTYYYSL-YFATLLLHRQQRDEHKCRL 416
          *  *  *      ** **  *                *      *****  *

dLBR      RYHSSWQRYSTQVRSYILPRVY 741
ERG24     KYGENWEEYERKVPKIIPYVY 438
          *  *  *      *  *  *  *  *

```

Abb. 11: Sequenzvergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen des Lamin B Rezeptor von *Drosophila melanogaster* (dLBR) mit der Sterol C14 Reduktase von *Saccharomyces cerevisiae* (ERG24). Identische Aminosäuren sind fett gedruckt und mit einem Stern unterlegt.

Der strukturelle Vergleich der aminoterminalen Domäne des dLBR mit den homologen Proteinen der Vertebraten zeigt neben der geringen Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen weitere Abweichungen. Strukturelle Analysen der nukleoplasmatischen Domäne des LBR der Vertebraten haben gezeigt, dass sich die aminoterminalen Domäne in 3 Subdomänen untergliedert: Die globuläre G1 Domäne (Aminosäuren 1 - 60) wird durch eine nicht globuläre Linker-Region von der zweiten globulären Domäne G2 (Aminosäuren 113 - 207) getrennt (Duband-Goulet und Courvalin, 2000). Die drei Subdomänen sind an der Interaktion mit verschiedenen Bindungspartnern beteiligt; so wird die Bindung der B-Typ Lamine und die Bindung der mit Heterochromatin assoziierten HP1-Proteine über die globulären Domänen G1 und G2 vermittelt, während die arginin- und serinreiche Aminosäuresequenz der Linker-Region (Aminosäuren 71 - 100) vermutlich direkt an Chromatin bindet. Während die Analyse der Sekundärstrukturen des LBR von *Xenopus laevis* und *Mus musculus* ebenfalls eine Gliederung der aminoterminalen Domäne in zwei globuläre Domänen, die durch eine Linker-Region getrennt werden, aufzeigt, scheint die nukleoplasmatische Domäne des dLBR keine globulären Domänen aufzuweisen (Abb. 12).

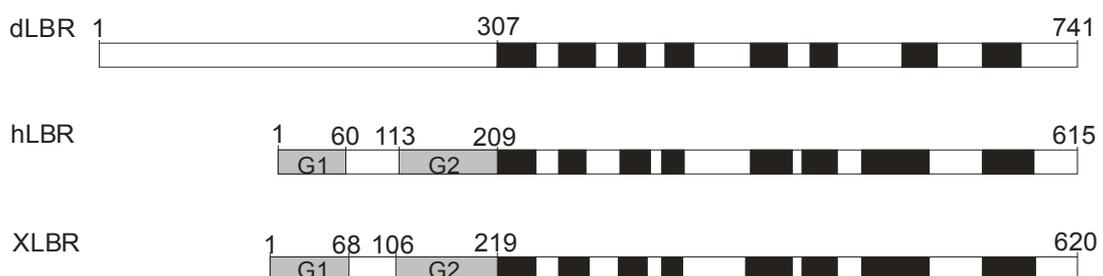


Abb. 12: Schematische Darstellung des Lamin B Rezeptor von *Drosophila* (dLBR), Mensch (hLBR) und *Xenopus* (XLBR); die globulären Domänen (G1 und G2) des aminoterminalen Bereiches der Proteine sind hellgrau unterlegt. Die Transmembrandomänen sind schwarz markiert. Die Zahlen geben die Positionen der Aminosäuren bezüglich der Lage im gesamten Protein an.

### III.1.1.6 Vergleich einiger potentieller Phosphorylierungsstellen des *Drosophila* LBR mit publizierten Daten

Der Abbau der Kernhülle in der Prometaphase der Mitose wird durch die Phosphorylierung der Lamine, der mit ihr assoziierten Proteine sowie der Kernporenkomplexproteine induziert. Die Proteine weisen potentielle Phosphorylierungsstellen für die p34<sup>cdc2</sup> Proteinkinase, die Proteinkinase A, die Proteinkinase C, die MAP Proteinkinase sowie für die Casein Proteinkinase II auf (Übersicht in Gruenbaum et al., 2003). In der nukleoplasmatischen Domäne des LBR verschiedener Organismen befinden sich Konsensussequenzen für die Phosphorylierung durch die Proteinkinase A und die p34<sup>cdc2</sup> Proteinkinase (Appelbaum et al., 1990; Courvalin et al., 1992).

Die Suche nach potentiellen Phosphorylierungsstellen in der Sequenz des dLBR zeigt eine potentielle Phosphorylierungsstelle für die Protein A Kinase (R-R-X-S; R = Arginin, X = beliebige Aminosäure, S = Serin). Die erste Aminosäure dieses Sequenzmotivs befindet sich bei Arg<sup>104</sup>, die entsprechenden Konsensussequenzen von *Xenopus laevis* bei Arg<sup>74</sup> und Arg<sup>91</sup> (Gajewski und Krohne, 1999), die des Hühnchens bei Arg<sup>92</sup> und Arg<sup>93</sup> (Worman et al., 1992) sowie die des Menschen bei Arg<sup>75</sup> (Ye und Worman, 1994). Die für die Phosphorylierung durch die p34<sup>cdc2</sup> Kinase beschriebene Konsensussequenz S/T-P-X-X (S = Serin, T = Threonin, P = Prolin, X = beliebige Aminosäure) tritt bei dem *Drosophila* LBR insgesamt sieben mal auf, beginnend mit Ser<sup>4</sup>, Ser<sup>95</sup>, Thr<sup>135</sup>, Ser<sup>145</sup>, Thr<sup>234</sup>, und Thr<sup>293</sup>. Literaturvergleiche zeigen potentielle Phosphorylierungsstellen durch die p34<sup>cdc2</sup> Kinase bei *Xenopus laevis* bei Ser<sup>71</sup>, Ser<sup>82</sup>, Ser<sup>88</sup>, Ser<sup>94</sup>, Ser<sup>100</sup>, Thr<sup>128</sup>, Thr<sup>158</sup> und Ser<sup>183</sup>, (Gajewski und Krohne, 1999), beim Hühnchen bei und Thr<sup>188</sup> (Courvalin et al., 1992), sowie beim Menschen bei Ser<sup>71</sup>, Thr<sup>118</sup> und Thr<sup>200</sup> (Ye und Worman, 1994). Ebenfalls konnten potentielle Phosphorylierungsstellen für die Casein Kinase II (S/T-X-X-D/E; S = Serin, T = Threonin, X = beliebige Aminosäure, E = Glutaminsäure, D = Asparaginsäure), beginnend mit Thr<sup>7</sup>, Thr<sup>192</sup>, Thr<sup>237</sup>, Ser<sup>252</sup>, Ser<sup>265</sup>, Thr<sup>266</sup> und Thr<sup>293</sup>, sowie für die Proteinkinase C (S/T-X-R/K; S = Serin, T = Threonin, X = beliebige Aminosäure, R = Arginin, K = Lysin), beginnend mit Thr<sup>57</sup>, Thr<sup>103</sup>, Ser<sup>106</sup>, Thr<sup>194</sup>, Ser<sup>211</sup>, Thr<sup>217</sup>, Ser<sup>259</sup>, Ser<sup>260</sup>, Thr<sup>288</sup> und Ser<sup>298</sup>, identifiziert werden. Neben den Phosphorylierungsstellen für die Protein A Kinase, p34<sup>cdc2</sup> Kinase und Casein II Kinase weist die nukleoplasmatische Region des Lamin B Rezeptor beim Menschen und *Xenopus laevis* Arginin-Serin Dipeptid-Motive auf, die durch die LBR-assoziierte Kinase des p58 Komplexes zellzyklusspezifisch phosphoryliert werden, wodurch die Interaktion des LBR mit anderen Proteinen modifiziert wird (Nikolakai et al., 1996; Papoutsopoulou et al., 1999; Takano et al., 2002). Eine arginin- serinreiche Region, die sich beim Menschen zwischen Arg<sup>74</sup> und Ser<sup>84</sup> und bei *Xenopus laevis* zwischen Arg<sup>68</sup> und Ser<sup>94</sup> befindet, konnte beim LBR von *Drosophila melanogaster* nicht nachgewiesen werden; es sind lediglich zwei RS-Dipeptide bei Arg<sup>105</sup> und Arg<sup>110</sup> lokalisiert.

### III.1.2 Expression des dLBR als GFP-Fusionsprotein

Der Lamin B Rezeptor wurde erstmals 1988 als integrales Membranprotein der inneren Kernmembran beschrieben (Worman et al., 1988) und bis heute konnten homologe Proteine in verschiedenen Vertebraten identifiziert werden. Charakteristisch für den Lamin B Rezeptor ist neben der an Protein- und Chromatin Interaktionen beteiligten nukleoplasmatischen Domäne die hydrophobe carboxyterminale Region der acht Transmembrandomänen, über die das Protein in der inneren Kernmembran verankert ist. Das Hydrophobizitätsprofil des LBR von *Drosophila melanogaster* weist ebenfalls acht potentielle Transmembrandomänen auf, daher ist anzunehmen, dass der dLBR ein integrales Membranprotein ist. Für den LBR des Menschen konnte gezeigt werden, dass die Expression der aminoterminalen Domäne einschließlich der 1. Transmembrandomäne in transfizierten Kulturzellen für die Lokalisation des verkürzten Proteins in der Kernhülle ausreichend ist (Smith und Blobel, 1993; Soullam und Worman, 1993; Ellenberg et al., 1997). Das exprimierte, verkürzte Fusionsprotein weist wesentliche Funktionen des endogenen LBR auf, da alle zur Interaktion mit den nukleoplasmatischen Bindungspartnern (Chromatin, B-Typ Lamine, HP-1) notwendigen Domänen in der aminoterminalen Region des Lamin B Rezeptor lokalisiert sind (Ye und Worman, 1994; Ye et al, 1997).

Zur Charakterisierung der zellulären Lokalisation des dLBR wurde die für den Aminoterminus und für die erste bzw. ersten beiden potentiellen Transmembrandomänen kodierenden Regionen der cDNA (Nukleotide 48 - 1004; 1 - 1158) durch PCR amplifiziert und in den eukaryotischen Expressionsvektor pEGFP-N1 kloniert.

Die Klonierung der für die Aminosäuren 16 - 334 kodierenden Region der cDNA (Nukleotide 48 - 1004) des dLBR wurde von Kristina Stöckert unter meiner Anleitung durchgeführt.

Mit Hilfe des eukaryotischen Expressionsvektors pEGFP-N1 können Proteine, deren kodierende Sequenzen in diesen Vektor kloniert wurden, als GFP-Fusionsproteine in eukaryotischen Zellen exprimiert werden. Am 3'-Ende der MCS, d.h. in Leserichtung hinter der multiple cloning site, liegt die kodierende Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins GFP der Qualle *Aequora victoria*. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Mutante des GFP, das „enhanced“-GFP (EGFP) verwendet, das sich im Vergleich zum Wildtyp-GFP durch verstärkte Fluoreszenzintensität, geringe Anfälligkeit gegen Photobleaching und verbesserte Expression in Säugerzellen auszeichnet.

### III.1.2.1 Lokalisation des dLBR(16-334)GFP Fusionsproteins

Um die Expression und Lokalisation der GFP-Fusionsproteine zu analysieren, wurden die Expressionsvektoren für die Transfektion der Kulturzelllinien A6 (*Xenopus laevis*) COS-7 (*Ceropithecus aethiops*) und Schneider S2 (*Drosophila melanogaster*) sowie für die Mikroinjektion in 30 - 60 min alten Embryonen von *Drosophila melanogaster* eingesetzt.

Die Lokalisation der dLBR(16-334)GFP Fusionsproteine wurde durch direkte Fluoreszenz nachgewiesen (Abb. 13).

In allen mit dLBR(16-334)GFP transfizierten Zelllinien (Abb. 13 A6: A, B; COS-7: C; Schneider S2: D) sowie in den Quetschpräparaten der injizierten Embryonen (Abb. 13 E) ist eine deutliche Lokalisation des dLBR-Fusionsproteins im Bereich der Kernhülle sowie eine Koloakalisation (Abb. 13 A', B') mit den endogenen Laminen zu erkennen. In transfizierten A6 und COS-7 Zellen, in denen das Protein überexprimiert wird, ist eine zusätzliche Lokalisation des Fusionsproteins im Endoplasmatischen Retikulum (ER) detektierbar (Abb. 13 B, C). Eine derartige Verteilung konnte bei der Expression des menschlichen Lamin B Rezeptor sowie des integralen Membranproteins MAN1 als GFP-Fusionsproteine in transfizierten COS-7 Zellen beobachtet werden (Ellenberg et al., 1997; Wu et al., 2002). Die Kernhülle und das ER bilden ein kontinuierliches System aus Membranen; an den Ribosomen des ERs neu synthetisierte integrale Proteine, deren cytoplasmatische Domänen eine Größe von ~60 kDa nicht übersteigen, erreichen durch laterale Diffusion innerhalb des ERs und der Kernporenmembran die innere Kernmembran. Dort werden sie durch die Interaktion mit spezifischen Bindungspartnern der inneren Kernmembran und Interaktion mit Chromatin zurückgehalten (Diffusions-Retentions Modell, Soullam und Worman, 1995; Ellenberg et al., 1997; Östlund et al., 1999); eine Diffusion in die äußere Kernmembran wird somit verhindert, wie „Fluorescence loss in photobleaching (FLIP)“ Experimente gezeigt haben (Ellenberg et al., 1997; Östlund et al., 1999). Die Immobilisierung des Lamin B Rezeptor erfolgt über die spezifische Interaktion mit Kernlaminen und Chromatin (Ellenberg et al., 1997). Durch die Überexpression des dLBR in transfizierten A6 und COS-7 Zellen können nicht mehr alle Proteine über ihre spezifischen Interaktionspartner in der inneren Kernmembran zurückgehalten werden und diffundieren in das endoplasmatische Retikulum.

Die Expression des dLBR(16-386)GFP Fusionsproteins in transfizierten *Xenopus* A6 und *Drosophila* Schneider S2 Zellen resultiert ebenfalls in der Lokalisation der Fusionsproteine in der inneren Kernmembran und im endoplasmatischen Retikulum (Daten nicht gezeigt.)

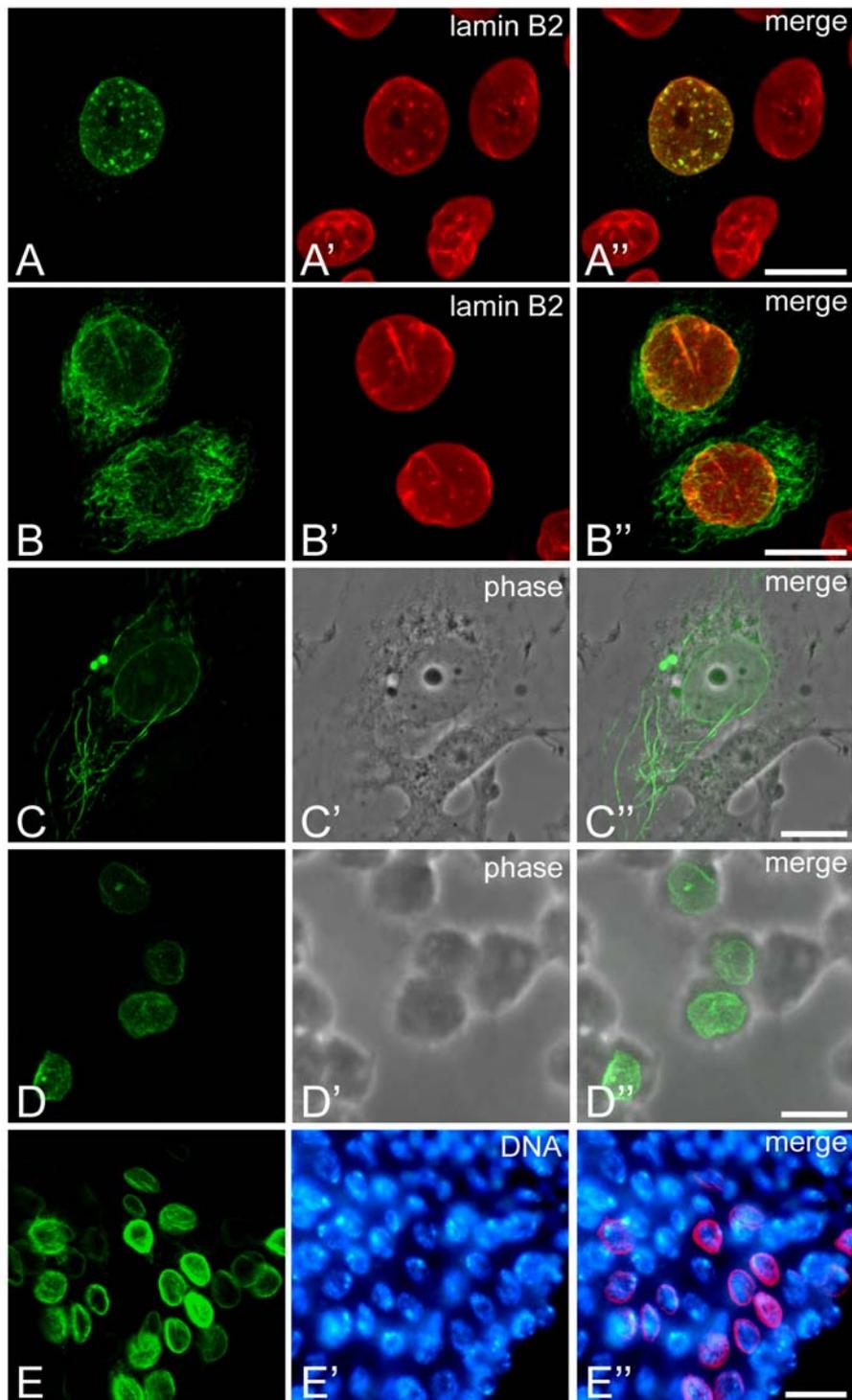


Abb. 13: Expression des dLBR(16-334) GFP-Fusionsproteins in transfizierten *Xenopus* A6 (A, B), *Ceropithecus* COS-7 (C) und *Drosophila* Schneider S2 Kulturzellen (D) und 24 h alten Embryonen von *Drosophila melanogaster* (E). Lokalisation der GFP-Fusionsproteine und des endogenen Lamin B2 (A', B', Antikörper X223) durch direkte Fluoreszenzmikroskopie (A – E) und indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie (A', B').

C', D') Phasenkontrastaufnahmen

A'' - D'') Überlagerung der Abbildungen A+A' – E+E'

E') DNA Färbung mit dem Fluorochrom Hoechst 33258

Eichstriche: 10µm

### III.1.2.2 Extraktionsverhalten des dLBR(16-334)GFP Fusionsproteins

Der Lamin B Rezeptor der Vertebraten wurde als integrales Transmembranprotein, das in somatischen Interphasezellen mit der Kernlamina und Chromatin interagiert, beschrieben (Übersicht in Gruenbaum et al., 2003). Die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der verkürzten dLBR-GFP Fusionsproteine deuten darauf hin, dass diese über die erste Transmembrandomäne bzw. die ersten beiden Transmembrandomänen in der inneren Kernmembran verankert werden. Durch Extraktionsstudien mit Harnstoff, die von Kristina Stöckert übernommen wurden, sollten die biochemischen Eigenschaften des dLBR(16-334)-GFP Fusionsproteins näher charakterisiert werden.

Während biologische Membranen in Anwesenheit von hohen Harnstoffkonzentrationen stabil sind, werden periphere Membranproteine von den Membranen abgelöst. Durch anschließende Ultrazentrifugation der gelösten Proteine können Transmembranproteine oder kovalent an Transmembranproteine gebundene Proteine mit den Membranen sedimentiert werden.

Das Extraktionsverhalten wurde an mit dLBR(16-334)GFP transfizierten COS-7 Kulturzellen getestet. Die transfizierten Zellen wurden mit 8M Harnstoff extrahiert und durch Ultrazentrifugation fraktioniert. Die Proteine aus den Extraktionsüberständen und -sedimenten wurden durch 10% SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und die dLBR(16-334)GFP Fusionsproteine mit Hilfe eines Antikörpers gegen GFP nachgewiesen (Abb. 14, Spuren 1 und 2). Als Kontrolle wurde die Nitrocellulose mit dem Antikörper X223 inkubiert, der gegen das Lamin B2 gerichtet ist (Abb. 14, Spuren 3 und 4).

Das dLBR-GFP Fusionsprotein erwies sich gegenüber der Extraktion mit Harnstoff als stabil und kann stets im Sediment nachgewiesen werden (Abb. 14 Spur 1). Die zur Kontrolle nachgewiesenen B-Typ Lamine befinden sich nach der Harnstoffextraktion fast völlig im Überstand (Abb. 14 Spur 4), da sie als periphere Membranproteine nur mit der Kernmembran assoziiert sind.

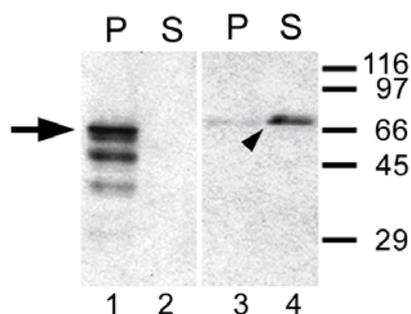


Abb. 14: Extraktionsverhalten des dLBR(16-334)GFP-Fusionsproteins.

Transfizierte Ceropithecus COS-7 Zellen wurden mit 8 M Harnstoff extrahiert und durch Zentrifugation in Überstand (Supernatant S) und Sediment (Pellet P) fraktioniert. Die Proteine wurden gelelektrophoretisch durch 10% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit GFP-Antikörpern (Spuren 1 und 2) oder mit dem Antikörper X223 gegen Lamin B2 (Spuren 3 und 4) inkubiert.

Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts sind in kD angegeben.

Die Lokalisation der dLBR-GFP Fusionsproteine in den transfizierten Kulturzellen und mikroinjizierten Embryonen sowie deren Extraktionsverhalten deuten darauf hin, dass es sich bei dem putativen Lamin B Rezeptor von *Drosophila* um ein Transmembranprotein handelt, und dass die erste Transmembrandomäne des dLBR für die Lokalisation in der Kernhülle ausreichend ist.

### III.1.3 Herstellung eines Antiserums gegen dLBR

Da bisher noch keine spezifischen Antikörper gegen den Lamin B Rezeptor von *Drosophila melanogaster* zur Verfügung standen, sollten spezifische Antikörper in Mäusen und Meerschweinchen hergestellt werden. Da sich die nukleoplasmatische Domäne des dLBR sehr stark von denen der Vertebraten unterscheidet, ist diese Region für die Herstellung eines drosophila-spezifischen Antiserums geeignet. Um in den Tieren eine adäquate Immunreaktion auszulösen, wurde ein Polypeptid der Länge von 245 Aminosäuren (AS 17 - 262) bakteriell exprimiert und zur Immunisierung verwendet.

#### III.1.3.1 Gewinnung des rekombinanten Polypeptids zur Immunisierung von Meerschweinchen und Mäusen

Um das Polypeptid bakteriell zu synthetisieren, wurde durch PCR die für den Teilbereich der nukleoplasmatischen Domäne kodierende Region der cDNA (Nukleotide 49 - 786) amplifiziert und in den pET 21a Expressionsvektor kloniert. Die Expression des rekombinanten Polypeptids in *E. coli* BL21 codon plus wurde durch Zugabe von IPTG induziert (Abb. 15). Die bakteriellen Proteine wurden gelelektrophoretisch durch 10% SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blue angefärbt (Abb. 15 Spur 1) oder auf Nitrocellulose übertragen und über die am Carboxyterminus lokalisierten sechs Histidine mit dem HIS-TAG-Antikörper nachgewiesen (Abb. 15 Spur 2). Eine starke Expression kann 4 h nach der Induktion nachgewiesen werden; es ist eine deutliche Bande im Bereich von 30 kD zu erkennen. Das langsamere Laufverhalten des Proteins bezüglich des berechneten Molekulargewichtes von 27 kD ist auf einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren zurückzuführen.

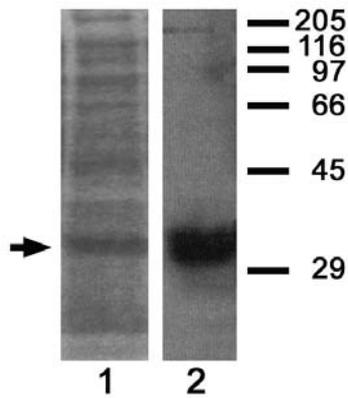


Abb. 15: Expression des rekombinanten Polypeptids (AS 17 – 262 des dLBR).

Die gesamten bakteriellen Proteine wurden durch 10% SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blue angefärbt (Spur 1) oder auf Nitrocellulose transferiert (Spur 2). Der Nachweis des exprimierten Polypeptids erfolgte durch Inkubation mit dem primären HIS-TAG Antikörper sowie dem Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper über ECL.

Der Pfeil markiert das synthetisierte Polypeptid.

Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts sind in kD angegeben.

Das bakteriell exprimierte Polypeptid wurde über die sechs Histidine mit Hilfe einer Nickel-Chelat Säule gereinigt. Für die Immunisierung von Mäusen und Meerschweinchen wurden je 50 µg / 100 µg des gereinigten Polypeptids eingesetzt.

### III.1.3.2 Test der polyklonalen dLBR Antikörper

Die Antiseren wurden sowohl im Westernblot, als auch in der Immunfluoreszenz getestet. Mit den Antiseren der Meerschweinchen (LBR/gI und LBR/gII; g = guinea pig) und einer der drei immunisierten Mäuse (LBR/mI; m = mouse) wurden annähernd identische Ergebnisse erzielt. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden die dLBR spezifischen Antikörper LBR/gI und LBR/gII durch eine Affinitätsreinigung über CNBr-aktivierter Sepharose von den übrigen Bestandteilen des Serums isoliert. Die affinitätsgereinigten Antikörper bestätigten die mit den polyklonalen Antiseren erhaltenen Ergebnisse. Falls nicht anders erwähnt, wird im Folgenden stets eine 1:1 Mischung der Antiseren LBR/gI und LBR/gII (LBR/gI+II) verwendet.

Im Immunblot wurden die Antiseren mit Gesamtproteinen des 3. Larvalstadiums von *Drosophila melanogaster* und *Drosophila Schneider S2* Kulturzellen getestet (Abb. 16). Die Antikörper aller drei Seren reagieren deutlich mit einem Protein der molekularen Masse von Mr 66.000. Die Diskrepanz bezüglich des berechneten Molekulargewichtes von 81.620 D ist vermutlich auf ein verändertes Laufverhalten aufgrund intramolekularer Faltungen im Bereich der Transmembrandomänen zurückzuführen. Dieses außergewöhnliche Verhalten in der SDS-PAGE konnte bei dem LBR von *Xenopus laevis* (Xp58, Gajewski und Krohne, 1999) und von *Gallus gallus* (Worman et al., 1990) beobachtet werden, alle drei Proteine zeigen in der SDS-PAGE eine wesentlich höhere Mobilität. Zusätzlich wird von den Antiseren ein „Schmier“ erkannt, der sich oberhalb der aufgetrennten Referenzproteine, an der Grenze zum Sammelgel befindet, der vermutlich auf Aggregate des dLBR, die sich nicht im SDS-Probenpuffer lösen, zurückzuführen ist. In den Immunblots der larvalen Gesamtproteine sind teilweise weitere, weniger intensive Banden ober- und unterhalb von 66.000 D zu erkennen,

die auf die Hitzebehandlung der Proteinproben vor der Auftrennung durch die SDS-PAGE und auf die Degradation des dLBR zurückzuführen sind.

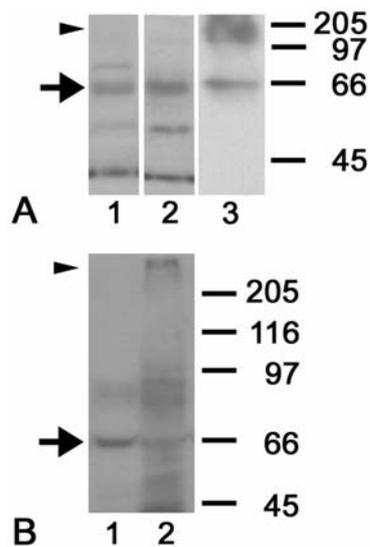


Abb. 16 Test der Antiseren gegen dLBR

A) Test der polyklonalen Antiseren LBR/gI (Spur 1), LBR/gII (Spur 2) und LBR/mI (Spur 3) im Immunblot auf den Gesamtproteinen des 3. Larvalstadiums (Spuren 1 und 2) und Schneider S2 Kulturzellen (Spur 3) von *Drosophila melanogaster*.

B) Test der affinitätsgereinigten Antiseren LBR/gI und LBR/gII im Immunblot auf den gesamten Proteinen des 3. Larvalstadiums (Spur 1) und Schneider S2 Kulturzellen (Spur 2) von *Drosophila melanogaster*.

Die Antiseren zeigen eine starke Reaktion mit einem Antigen bei ca. 66.000 D.

Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts sind in kD angegeben.

In der indirekten Immunfluoreszenz von *Drosophila* Kc167 Zellen färben die Antikörper aller drei Seren deutlich die Kernperipherie (Abb. 17 A - C), was auf eine Lokalisation des dLBR in der Kernmembran hinweist.

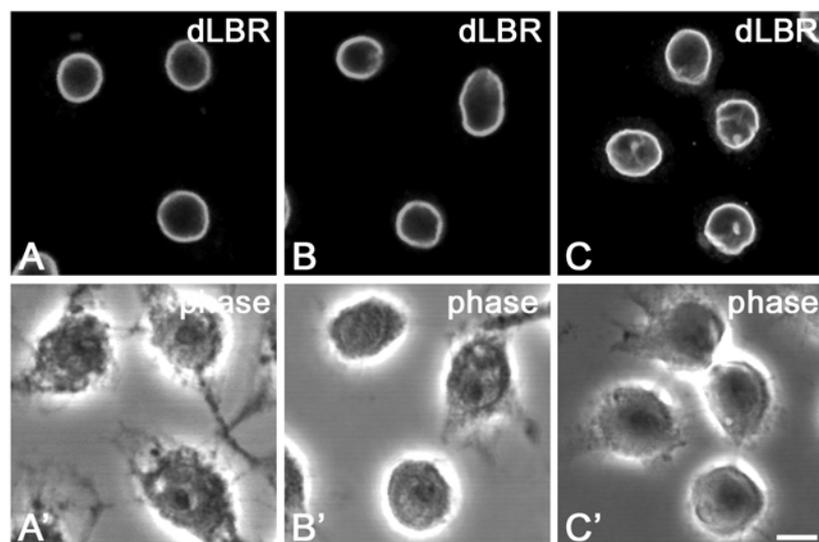


Abb. 17: Test der polyklonalen Antiseren LBR/gI (A), LBR/gII (B), LBR/mI (C) in *Drosophila* Kc167 Zellen nach Fixierung der Zellen mit Methanol/Aceton durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie.

A' - C') Phasenkontrastaufnahmen

Eichstrich: 10µm

### III.1.4 Untersuchung des Einflusses verschiedener Chemikalien auf das Laufverhalten des dLBR in der SDS-PAGE

In allen Immunblots der verschiedenen dLBR Antiseren konnte neben dem erwarteten Signal bei 66.000 D ein zweites Signal („Schmier“) oberhalb der Referenzproteine detektiert werden. Verschiedene reduzierende Chemikalien wie DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol können einen deutlichen Einfluss auf das Verhalten der Proteine im SDS-PAGE haben. Auch die Inkubation mit Harnstoff, der die Proteine entfaltet und die intermolekularen Wechselwirkungen löst, kann einen Einfluss auf das Laufverhalten von Proteinen ausüben. Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Chemikalien auf das Laufverhalten des dLBR wurden homogenisierte Schneider S2 Kulturzellen in sechs Ansätze aufgeteilt und in SDS-Probenpuffern, die in unterschiedlichen Zusammensetzungen DTT und/oder Harnstoff enthielten, resuspendiert. Die Hälfte der Ansätze wurde vor der SDS-PAGE für 2 min auf 97°C erhitzt. Nach dem Transfer auf Nitrocellulose wurde der Immunblot mit den Antiseren LBR/gI+II inkubiert (Abb. 18). Es kann kein Einfluss des DTTs oder des Harnstoffs auf das Laufverhalten nachgewiesen werden, in allen Ansätzen sind sowohl das spezifische Signal bei 66.000 D, als auch die Signale der aggregierten Proteine oberhalb der Referenzproteine detektierbar.

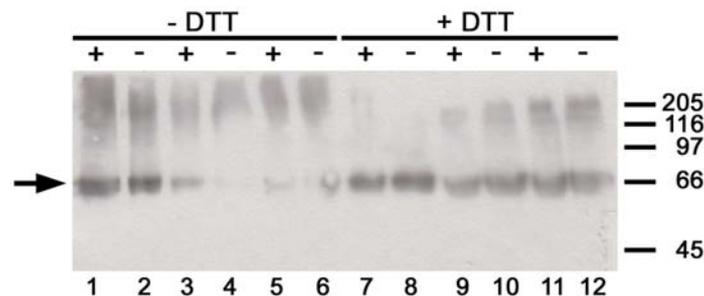


Abb. 18: Einfluss verschiedener Chemikalien auf das Laufverhalten des dLBR im SDS-PAGE

Homogenisierte Drosophila Schneider S2 Zellen wurden in SDS-Probenpuffer verschiedener Zusammensetzungen aufgenommen. Die Hälfte der Proben wurde vor der gelelektrophoretischen Auftrennung durch 10% SDS-PAGE für 2 min auf 97°C erhitzt (+). Die Proteine wurden auf Nitrocellulose transferiert und im Immunblot mit den Antiseren dLBR/gI+II inkubiert.

- 1) Gesamtproteine aus S2 Zellen in SDS-Probenpuffer (+)
- 2) Gesamtproteine aus S2 Zellen in SDS-Probenpuffer (-)
- 3) Gesamtproteine aus S2 Zellen in SDS-Probenpuffer mit 2 M Harnstoff (+)
- 4) Gesamtproteine aus S2 Zellen in SDS-Probenpuffer mit 2 M Harnstoff (-)
- 5) Gesamtproteine aus S2 Zellen in SDS-Probenpuffer mit 4 M Harnstoff (+)
- 6) Gesamtproteine aus S2 Zellen in SDS-Probenpuffer mit 4 M Harnstoff (-)
- 7) Gesamtproteine aus S2 Zellen in SDS-Probenpuffer mit DTT (+)
- 8) Gesamtproteine aus S2 Zellen in SDS-Probenpuffer mit DTT (-)
- 9) Gesamtproteine aus S2 Zellen in SDS-Probenpuffer mit 2 M Harnstoff / DTT (+)
- 10) Gesamtproteine aus S2 Zellen in SDS-Probenpuffer mit 2 M Harnstoff / DTT (-)
- 11) Gesamtproteine aus S2 Zellen in SDS-Probenpuffer mit 4 M Harnstoff / DTT (+)
- 12) Gesamtproteine aus S2 Zellen in SDS-Probenpuffer mit 4 M Harnstoff / DTT (-)

Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts sind in kD angegeben

### III.1.5 Analyse der Expression des dLBR in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien von *Drosophila melanogaster*

Um eine eventuell gewebe- und entwicklungsspezifische Expression des dLBR zu untersuchen, wurden die Antiseren für die Inkubation verschiedener Gewebe, Entwicklungsstadien und Kulturzelllinien von *Drosophila melanogaster* verwendet.

#### III.1.5.1 Analyse der Expression des dLBR in verschiedenen Entwicklungsstadien von *Drosophila melanogaster*

Um die Expression des dLBR während der Entwicklung von *Drosophila melanogaster* zu untersuchen, wurden verschiedene Entwicklungsstadien (3. Larvalstadium, Puppe, adulte Fliege) im Immunblot und durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Tiere verschiedener Entwicklungsstadien (3. Larvenstadium – Fliege) wurden in SDS-Probenpuffer homogenisiert und durch 10% SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 19). Der Immunblot weist in allen Entwicklungsstadien die für den dLBR spezifischen Signale auf. Neben dem erwarteten spezifischen Signal bei 66.000 Dalton (Abb. 19 Pfeil) sind auch die Aggregate des dLBR im oberen Bereich des Proteingeeles zu erkennen (Abb. 19 Pfeilkopf).

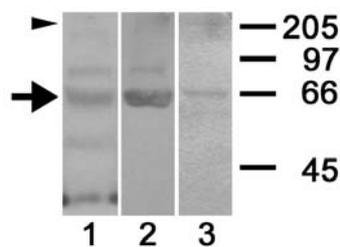


Abb. 19: Expression des dLBR in verschiedenen Entwicklungsstadien von *Drosophila melanogaster*.

Larven des 3. Larvalstadiums (Spur 1), Puppen (Spur 2) und adulte Tiere (Spur 3) wurden in SDS-Probenpuffer homogenisiert und die Gesamtproteine gelelektrophoretisch über 10% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit den Antiseren LBR/gI+II im Immunblot inkubiert.

Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts sind in kD angegeben.

Für die Analyse der Expression des dLBR durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie wurden Quetschpräparate verschiedener Entwicklungsstadien von *Drosophila melanogaster* (Embryonalstadien 12, 17; 3. Larvalstadium, Puppenstadium; Einteilung der embryonalen Entwicklungsstadien nach Volker Hartenstein und José Campos-Ortega) und *Drosophila* Schneider S2 und Schneider S2R+ (S2 Rezeptor plus, Yanagawa et al., 1998) Kulturzellen verwendet (Abb. 20). Die beiden Zelllinien Schneider S2 und S2R+ bestehen aus embryonalen Zellen einer 0 - 22h alten Primärkultur von *Drosophila melanogaster* und können für die Analyse der spezifischen Expression des dLBR während der frühen Embryonalentwicklung eingesetzt werden. Die für die Untersuchung verwendeten Schneider S2 Zellen zeigen eine ubiquitäre Expression des Lamin Dm0, während eine schwache Expression des Lamin C nur in vereinzelt Zellen zu erkennen ist. Im Gegensatz zur

ubiquitären Expression des Lamin Dm0 bereits in der frühen Embryogenese, wird das Lamin C, wie alle A-Typ Lamine, erst in der späten embryonalen Entwicklung exprimiert und ist erst nach 13 - 19 h der embryonalen Entwicklung detektierbar (Riemer et al., 1995). Die Expression des dLBR in dieser Kulturzelllinie ist somit repräsentativ für die frühe Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster*.

In allen untersuchten Entwicklungsstadien (Abb. 20 C – F) und Kulturzelllinien (Abb. 20 A, B) ist eine gleichmäßige Färbung der Peripherie des Zellkerns durch die Antiseren LBR/gI+II zu erkennen.

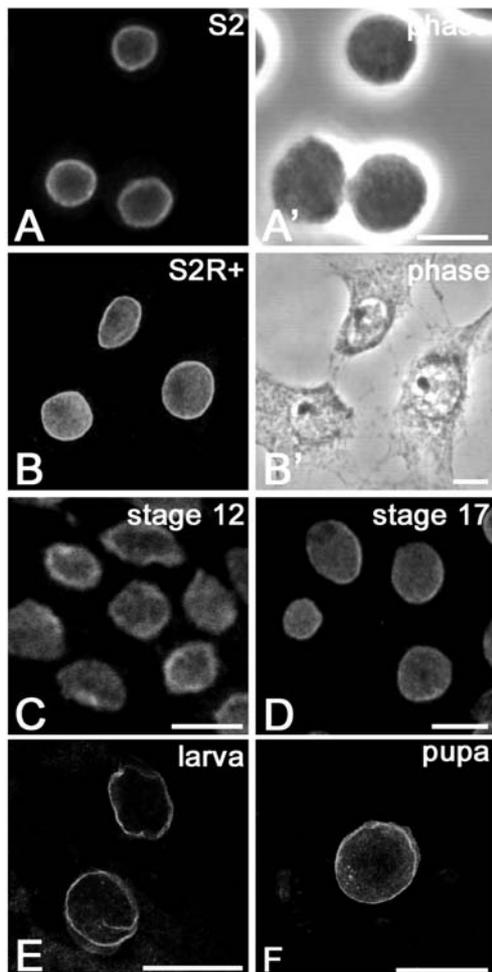


Abb. 20: Lokalisation des dLBR in verschiedenen Kulturzelllinien und Entwicklungsstadien von *Drosophila melanogaster* durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie in Drosophila Schneider S2 Zellen (A), Schneider S2R+ Zellen (B), den Embryonalstadien 12 (stage 12; C), 17 (stage 17; D) sowie im 3. Larvalstadium (larva; E) und in der Puppe (pupa; F).

A', B') Phasenkontrastaufnahmen

Eichstriche: 10  $\mu$ m

Die immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen sowie die Detektion des dLBR in verschiedenen Entwicklungsstadien im Immunblot weisen auf eine ubiquitäre Expression des Drosophila LBR in somatischen Zellen hin.

### III.1.5.2 Analyse der Expression des dLBR in Ovariolen von *Drosophila melanogaster*

Um die Expression des dLBR in differenzierten Geweben zu untersuchen, wurden Whole mount Präparate von Ovariolen aus *Drosophila melanogaster* angefertigt (Abb. 21).

Die Ovarien von *Drosophila* bestehen aus verschiedenen Zelltypen und werden als merostische Ovarien bezeichnet. Ein Ovarium ist in ein Bündel von Ovariolen gegliedert. In jeder Ovariolen befindet sich eine Reihe von Oocyten in unterschiedlichen Entwicklungsstadien, die sich jeweils in getrennten Eikammern befinden. Jede dieser Eikammern enthält 16 Zellen, die sich von einer gemeinsamen primären Oogonie herleiten. Eine dieser Zellen entwickelt sich zur Oocyte, die im proximalen Teil der Eikammer lokalisiert ist, während sich die übrigen 15 Zellen zu polyploiden Nährzellen entwickeln. Die Eikammer wird von insgesamt ca. 1000 Follikelzellen umgeben, die ihren Ursprung in den somatischen mesodermalen Zellen der Gonadenanlagen haben.

In allen Eikammern ist deutlich die Lokalisation des dLBR in der Kernperipherie der verschiedenen Zellen zu erkennen (Abb. 21). Die Abbildungen zeigen einen mikroskopischen Durchschnitt durch mehrere Eikammern (Abb. 21 A, B, D) sowie die Aufsicht auf eine von Follikelzellen umgebene Eikammer (Abb. 21 C).

Sowohl die Kernperipherie der Follikelzellen, welche die Eikammern abgrenzen, als auch die polyploiden Nährzellen im Inneren der Eikammern weisen eine starke Anfärbung durch das Antiserum dLBR/gI auf (Abb. 21 A, B, C). Im Inneren weisen die Kernhüllen der Nährzellen eine intensive Färbung auf, die Oocyte selbst ist von den Nährzellen nicht abgrenzbar.

Die leichte Hintergrundfluoreszenz aller Aufnahmen ist zurückzuführen auf die zahlreichen fluoreszierenden Zellen, die direkt über oder unter der Schnittebene der Aufnahme liegen. Durch den Vergleich des mit einem polyklonalen Antikörpers gegen Lamin Dm0 von *Drosophila melanogaster* inkubierten Präparates kann jedoch ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um eine spezifische Färbung des Cytoplasmas handelt (Abb. 21 D).

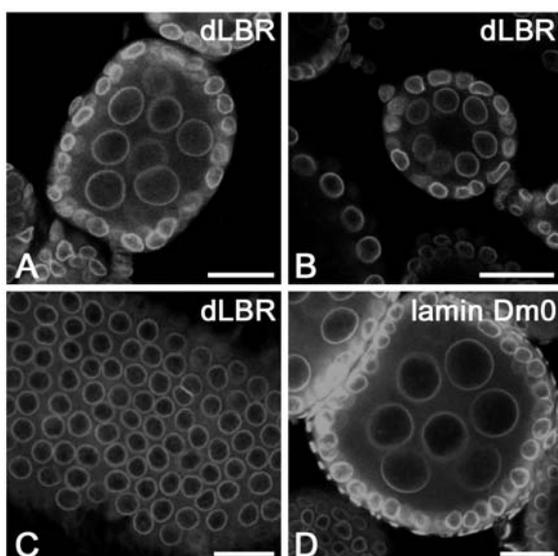


Abb. 21: Lokalisation des dLBR (A, B, C) und Lamin Dm0 (D) in Ovariolen von *Drosophila melanogaster* durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie  
Eichstriche: 20  $\mu$ m

### III.1.6 Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation des dLBR in der inneren Kernmembran

Die Lokalisation des dLBR konnte durch die immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen auf die Kernmembran eingegrenzt werden; es ist jedoch nicht ersichtlich, ob sich das Protein in der inneren, der äußeren oder beiden Membrandomänen befindet. Zur Untersuchung der Lokalisation des dLBR wurden *Drosophila* Schneider S2 Zellen mit den Detergenzien Digitonin und Triton X-100 inkubiert (Abb. 22). Digitonin permeabilisiert Membranen in Abhängigkeit ihres Cholesteringehaltes unterschiedlich stark. Durch die Inkubation mit Digitonin wird die Plasmamembran selektiv permeabilisiert, während die Kernhülle intakt bleibt. Eine Lokalisation des dLBR in der äußeren Kernmembran könnte in digitonin-permeabilisierten Zellen durch die Inkubation mit dem Antiserum LBR/gI detektiert werden. Eine ausschließliche Lokalisation des dLBR in der inneren Kernmembran hätte keine Anfärbung der Kernmembran zur Folge, da die Antikörper keinen Zugang zu ihren Epitopen haben.

Zur Kontrolle der Antikörperinkubation wurden S2 Zellen in einem parallelen Ansatz mit Triton X-100 permeabilisiert, wodurch alle Membranen extrahiert werden und sämtliche Epitope für die Antikörper zugänglich sind (Abb. 22 A - C). Um die selektive Permeabilisierung zu kontrollieren, wurden Antikörper gegen Lamin Dm0 und  $\alpha$ -Tubulin eingesetzt. Durch die Detektion des  $\alpha$ -Tubulin in der Immunfluoreszenz kann die Permeabilisierung der Plasmamembran nachgewiesen werden, da die Antikörper Zugang zu den Epitopen der im Cytoplasma lokalisierten Proteine haben (Abb. 22 C, C'). Die Epitope der Kernlamine, die sich im Nukleus befinden, sollten nur nach der Extraktion mit Triton X-100 für die Antikörper zugänglich sein (Abb. 22 B), in den mit Digitonin permeabilisierten Zellen sollte die Kernhülle noch intakt sein (Abb. 22 B').

Nur in den mit Triton X-100 extrahierten Zellen kann eine Färbung der Kernhülle mit dem Serum LBR/gI nachgewiesen werden (Abb. 22 A), während der dLBR in den digitonin-permeabilisierten Zellen für die spezifischen Antikörper nicht zugänglich ist (Abb. 22 A'). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der dLBR in der inneren Kernmembran lokalisiert ist.

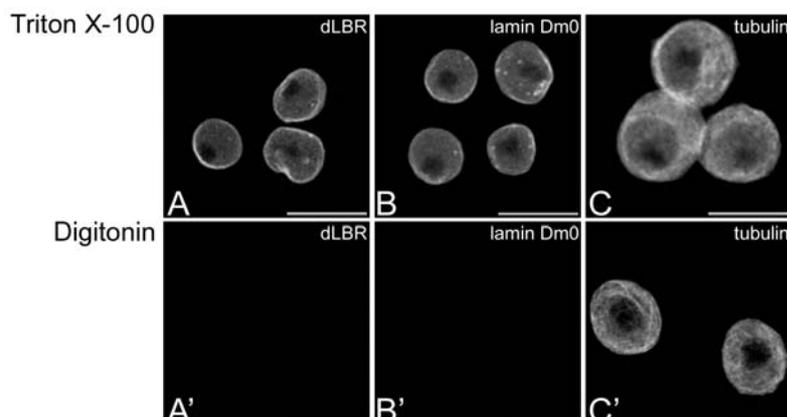


Abb. 22: Lokalisation von dLBR (A, A'), Lamin Dm0 (B, B') und  $\alpha$ -Tubulin (C, C') auf vollständig (Triton X-100, A - C) und selektiv (Digitonin, A' - C') permeabilisierten *Drosophila* Schneider S2 Zellen durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie. Eichstriche: 10  $\mu$ m

### III.1.7 Interaktionen und Bindungseigenschaften des dLBR

Bisherige Bindungsstudien mit dem Lamin B Rezeptor der Vertebraten haben gezeigt, dass die aminoternale Domäne an der Interaktion mit verschiedenen nukleären Komponenten beteiligt ist. Diese bei den Vertebraten hoch konservierte Domäne gliedert sich in zwei globuläre Domänen, die durch eine Linker-Region miteinander verbunden sind (Duband-Goulet und Courvalin, 2000). Die erste globuläre Domäne (G1 Domäne) interagiert mit B-Typ Laminen (Ye und Worman, 1994; Meier und Georgatos, 1994), während die zweite globuläre Domäne (G2 Domäne) an der Interaktion mit den Heterochromatin assoziierten HP-1 Proteinen beteiligt ist (Ye und Worman, 1996; Ye et al., 1997). Neben der indirekten Bindung an Chromatin über die HP-1 Proteine konnte ebenfalls eine direkte Bindung des LBR an Chromatin nachgewiesen werden, die über die arginin- und serinreiche Aminosäuresequenz der Linker-Region vermittelt wird (Takano et al., 2002). In vitro Bindungsstudien haben gezeigt, dass der LBR mit HP1 und den Histonen H3 und H4 einen stabilen Komplex bildet (Polioudaki et al., 2001). Meine molekulare Charakterisierung des dLBR weist darauf hin, dass die nukleoplasmatische Domäne des dLBR im Gegensatz zu dem LBR der Vertebraten keine globulären Regionen besitzt. Außerdem ist die Ähnlichkeit zu den nukleoplasmatischen Domänen der Vertebraten sehr viel geringer. Somit stellte sich die interessante Frage, ob die aminoternale Domäne des dLBR die Fähigkeit besitzt, an B-Typ Lamine und an Chromatin zu binden. Um die Bindungseigenschaften des dLBR zu untersuchen, wurden in vitro Bindungsstudien und Immunpräzipitationen durchgeführt.

#### III.1.7.1 Löslichkeit des dLBR unter physiologischen Bedingungen

Zur Durchführung der in vitro Bindungsstudien mussten zunächst geeignete physiologische Bedingungen geschaffen werden, bei denen möglichst viele Proteine der eingesetzten *Drosophila Schneider S2* und *Kc167* Zellen extrahiert werden konnten. Die Kulturzellen wurden in physiologischem Extraktionspuffer (1% Triton, 150 mM NaCl, 20 mM Tris, 1 mM PMSF, 1 mM Trypsin Inhibitor pH 7,4) inkubiert und die löslichen Proteine durch Zentrifugation bei 13.000 g gewonnen. Die Proteine der Extraktionsüberstände (Supernatant, S) sowie der Sedimente (Pellet, P) wurden in proportionalen Mengen durch SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und im Immunblot mit den Antisera LBR/gI+II inkubiert (Abb. 23 A). Als Kontrolle wurde die Nitrocellulose mit dem monoklonalen Antikörper ADL67, der gegen Epitope des Lamin Dm0 von *Drosophila* gerichtet ist, inkubiert (Abb. 23 B). Es konnte nachgewiesen werden, dass unter diesen Extraktionsbedingungen ca. 50 % des dLBR und mehr als 50% der Lamine gelöst wurden und im Überstand detektiert werden konnten (Abb. 23 A, B; Spur 2).

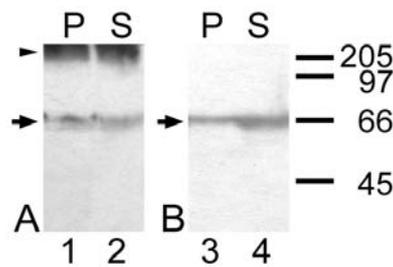


Abb. 23: Biochemische Charakterisierung des Proteinextraktes aus *Drosophila Schneider S2* Zellen. *Drosophila Schneider S2* Zellen wurden gleichzeitig mit 1% Triton X-100 und 150 mM NaCl extrahiert und bei 13.000 g zentrifugiert. Die Proteine des Überstandes (S; Spuren 2 und 4) und des Sedimentes (P; Spuren 1 und 3) wurden in proportionalen Mengen gelelektrophoretisch durch 10% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit Antikörpern gegen dLBR (A) oder Lamin Dm0 (B) inkubiert.

Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts sind in kD angegeben.

### III.1.7.2 In vitro Chromatin Bindungsstudien des dLBR

Für die aminoternale Domäne des LBR der Vertebraten konnte sowohl die indirekte Bindung über HP1, als auch eine direkte Bindung an Chromatin nachgewiesen werden. Um die Bindung der aminoterminalen Region des dLBR an Chromatin zu untersuchen, wurden in vitro Bindungsstudien mit Spermienchromatin und Eiextrakt von *Xenopus laevis* durchgeführt. Der interphasische Eiextrakt von *Xenopus* enthält nach der Inkubation bei 80°C und Sedimentierung aller löslichen Proteine (einschließlich der Kernlamine und der Proteine der Kernporenkomplexe) das für die Dekondensation des Spermienchromatins notwendige Chaperon Nukleoplasmin. Als Kontrolle wurde die in vitro Bindung mit der aminoterminalen Region des LBR von *Xenopus laevis* (XLBR) durchgeführt, da eine Bindung an Spermienchromatin für dieses Protein bereits nachgewiesen werden konnte (Gajewski und Krohne, 1999).

Die bakteriell exprimierte verkürzte Polypeptide (dLBR: Aminosäuren 16 - 262; XLBR: Aminosäuren 4 - 210) wurden mit hitzebehandeltem Eiextrakt (S<sub>200</sub>) inkubiert, und die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation sedimentiert. Die Hälfte des Überstandes wurde mit Spermienchromatin inkubiert (+Sp, Spermienchromatin), die andere Hälfte wurde als Kontrolle verwendet (-Sp). Nach der Inkubation wurden die Ansätze durch Zentrifugation fraktioniert und die Sedimente (P, Pellet) und die Überstände (S, Supernatant) in proportionalen Mengen durch 10% SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und im Immunblot mit spezifischen den polyklonalen Antisera dLBR und XLBR nachgewiesen (Abb. 24) Um eine unspezifische Bindung der polyklonalen Antisera LBR/gI+II und XLBR/gI an Proteine des Spermienchromatins ausschließen zu können, wurde ebenfalls Spermienchromatin durch 10% SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunblot mit den beiden Antisera inkubiert (Sp).

Wie in der Abbildung 24 zu sehen ist, binden die aminoterminalen Domänen des dLBR und des XLBR an Spermienchromatin und sind nur in den Sedimenten nachzuweisen (Abb. 24 dLBR: A, Spur 4; XLBR: B, Spur 4). In Abwesenheit des Spermienchromatins können die löslichen Proteine nicht sedimentiert werden und befinden sich ausschließlich in den Fraktionen der Überstände (Abb. 24 A, B Spur 1). Die drosophila-spezifischen Antikörper erkennen zusätzliche Banden in den Bereichen von Mr 60.000 bis 200.000 D, die auf eine Vernetzung des dLBR mit chromatin-spezifischen Proteinen oder eine Aggregation des dLBR während der Inkubation zurückzuführen sind (Abb. 24 A, Spur 4). Die Antikörper der Serien LBR/gI+II und XLBR/gI reagieren nicht mit Proteinen des Spermienchromatins (Abb. 24 Spur 5).

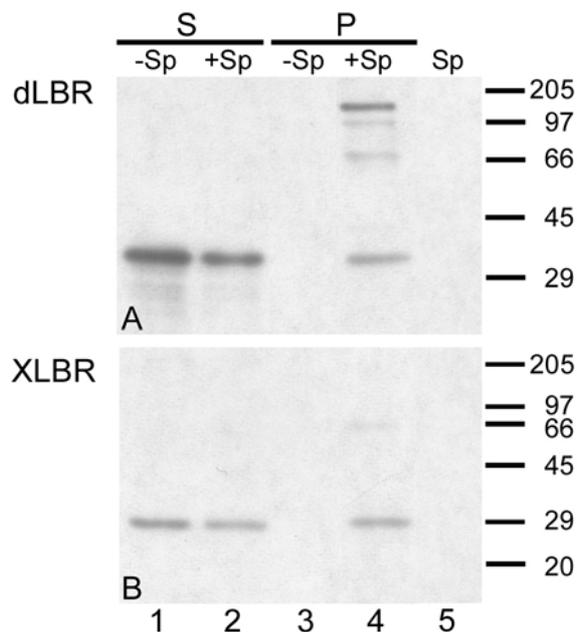


Abb. 24: In vitro Bindung der bakteriell synthetisierten aminoterminalen Domänen des LBR von *Drosophila melanogaster* (dLBR, AS 17-262) und *Xenopus laevis* (XLBR, AS 4-210) an Spermienchromatin.

Zu den löslichen Proteinen des hitzebehandelten Eiextraktes von *Xenopus laevis* ( $S_{200}$ ) wurden die bakteriell exprimierten aminoterminalen Domänen von dLBR (A) und XLBR (B) gefügt und in der Gegenwart (+Sp, Spuren 2 und 4) oder Abwesenheit (-Sp, Spuren 1 und 3) von Spermienchromatin inkubiert und durch Zentrifugation bei 10.000 g in Sediment (Spuren 3 und 4) und Überstand (Spuren 1 und 2) fraktioniert. Die Proteine der Fraktionen und Spermienchromatin als Kontrolle (Sp, Spur 5) wurden in proportionalen Mengen gelelektrophoretisch über 10% SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunblot mit den polyklonalen Antikörpern gegen dLBR (A) oder XLBR (B) inkubiert.

Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts sind in kD angegeben.

Die in vitro Bindungsstudien mit Spermienchromatin zeigen, dass trotz der strukturellen und sequenziellen Unterschiede der aminoterminalen Domänen des dLBR und des Vertebraten LBR eine Interaktion des dLBR mit Chromatin möglich ist.

### III.1.7.3 Fraktionierung der löslichen Proteine aus *Drosophila Schneider S2* Zellen durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation

Die Fraktionierung durch einen kontinuierlichen Zuckergradienten eignet sich zur Auftrennung von löslichen Proteinen und Proteinkomplexen. Die extrahierten Proteine aus *Drosophila Schneider S2* Zellen wurden auf einen kontinuierlichen Zuckergradienten (5 - 30% w/v) geschichtet und durch Ultrazentrifugation gemäß ihres spezifischen Sedimentationskoeffizienten aufgetrennt. Die kleineren sowie die als Monomere vorliegenden Proteine können in den oberen Fraktionen detektiert werden, während sich Oligomere und Proteine, die in größeren Proteinkomplexen eingebunden sind in den mittleren und unteren Fraktionen befinden. Sollte der dLBR mit dem Lamin Dm0 interagieren, dann müssten die beiden Proteine in ähnlichen Fraktionen detektiert werden können. Zur Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten werden Immunglobuline, die einen Sedimentationskoeffizient von IgG: 6,5 S aufweisen, parallel im Zuckergradienten zentrifugiert. Nach der Fraktionierung wurden die Proteine mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt, durch 10% SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Der Immunblot wurde mit den polyklonalen Antiseren gegen dLBR (Abb. 25 A) und Lamin Dm0 (Abb. 25 B) inkubiert, um die Proteine in den einzelnen Fraktionen zu detektieren.

Die Auftrennung im Zuckergradienten zeigt eine Verteilung des dLBR in allen Fraktionen (Abb. 25 A, Spuren 1 - 21), während das Lamin Dm0 nur in den Fraktionen zu finden ist, die einen Sedimentationskoeffizient von 6,5 S und kleiner aufweisen (Abb. 25 B, Spuren 11 - 21). Die Detektion der beiden Proteine in den Fraktionen mit mittleren (Lamin Dm0, dLBR) und hohen (dLBR) Sedimentationskoeffizienten weist darauf hin, dass die Proteine in diesen Fraktionen Bestandteil von oligomeren Komplexen sind.

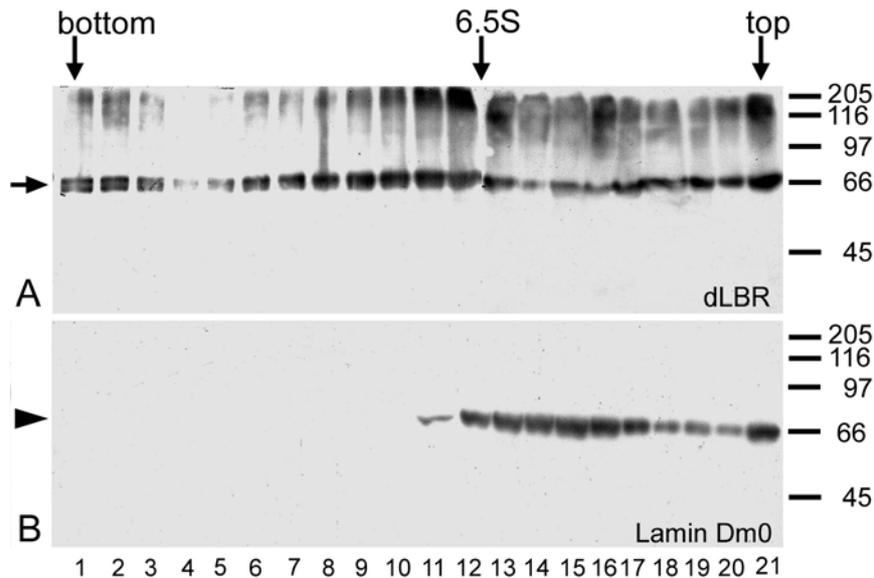


Abb. 25: Saccharose-Gradienten-Zentrifugation (5 - 30%) des Gesamtproteinextraktes des 13.000 g Überstandes von *Drosophila* Schneider S2 Zellen, die mit 1% Triton X-100 und 150 mM NaCl extrahiert wurden. Die Proteine der 21 Fraktionen wurden durch 10% SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und der Immunblot mit polyklonalen Antikörpern gegen dLBR (A) und Lamin Dm0 (B) inkubiert.

Die Position des Sedimentationskoeffizienten des Immunglobulin G ist angegeben.

Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts sind in kD angegeben.

#### III.1.7.4 Interaktion des dLBR mit nukleären Proteinen

Durch die Saccharose-Gradienten-Zentrifugation konnte gezeigt werden, dass sich der dLBR in Fraktionen befindet, die Lamine enthalten. Die Co-Fraktionierung ist aber kein ausreichender Beweis für das Vorliegen von dLBR-Lamin Komplexen.

Um die Bindungseigenschaften des dLBR bezüglich der A- und B- Typ Lamine von *Drosophila melanogaster* in vitro zu untersuchen, wurden die aminotermine Region des dLBR sowie die potentiellen Bindungspartner Lamin Dm0 und Lamin C durch gekoppelte in vitro Transkription/Translation synthetisiert.

Um die potentielle Interaktion des dLBR mit Kernlaminen auch in vivo untersuchen zu können, wurden ebenfalls Co-Immunpräzipitationen mit *Drosophila* Schneider S2 und Kc167 Zellen durchgeführt.

#### III.1.7.4.1 In vitro Bindungsstudien: Co-Immunpräzipitation des dLBR mit den Laminen von *Drosophila melanogaster*

Die in vitro Bindungsstudien mit in vitro translatierten Proteinen wurden unter meiner Anleitung von Sabine Seitz durchgeführt.

Um die Bindung des dLBR an Lamin Dm0 und Lamin C in vitro zu untersuchen, wurde die aminoternale Domäne des dLBR (AS 17 - 262) sowie die jeweiligen beiden potentiellen Bindungspartner (dLBR (AS 17 - 262) - Lamin Dm0; dLBR (AS 17 - 262) - Lamin C) durch gekoppelte in vitro Transkription und Translation synthetisiert und anschließend mit den dLBR- oder Lamin- spezifischen Antikörper, die an Protein-A-Sepharose gekoppelt waren, immunpräzipitiert.

Die an die Antikörper gebundenen Proteine wurden einschließlich ihrer Bindungspartner durch 10% SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Fluorographie detektiert (Abb. 26). Als Kontrolle wurden die beiden Transkriptions-/Translationsansätze aufgetrennt (Abb. 26 A Spur 3). Um eine unspezifische Bindung der Lamine an den dLBR Antikörper ausschließen zu können, wurden Kontroll-Immunpräzipitationen durchgeführt, bei denen der an die Sepharose gekoppelte Antikörper ausschließlich mit dem in vitro synthetisierten Lamin inkubiert wurde. Die Überstände der Kontroll-Immunpräzipitationen (Abb. 26 B, C, Spur 2) sowie die immunpräzipitierten Proteine (Abb. 26 A, Spuren 1 und 2; B, C Spur 1) und die immunpräzipitierten Proteine der Kontroll-Immunpräzipitationen (Abb. 26 B, C Spur 3) wurden durch 10% SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Fluorographie detektiert.

Wie in Abb. 26 A zu sehen ist, kann die aminoternale Domäne des dLBR nicht mit dem gekoppelten Lamin Dm0- (Abb. 26 A, Spur 2) oder Lamin C-Antikörper (Abb. 26 A, Spur 1) co-immunpräzipitiert werden. Im Gegensatz dazu zeigt die Immunpräzipitation des Lamin Dm0 mit dem Antikörper gegen dLBR als an die Protein A Sepharose gekoppelte Komponente ein deutliches Signal bei 66.000 D, welches in der Größe dem Lamin Dm0 entspricht (Abb. 26 B, Spur 1). In der Spur 1 der Abb. 26 C, in welcher ebenfalls Antiserum LBR/gl an die Protein A Sepharose gekoppelt wurde, ist ein sehr schwaches Signal bei 66.000 D zu erkennen, was dem immunpräzipitierten Lamin C entsprechen könnte. Die Kontroll-Immunpräzipitation zeigt, dass das in vitro synthetisierte Lamin C unspezifisch an die Sepharose bindet (Abb. 26 C, Spur 3). Dagegen bindet deutlich weniger in vitro translatiertes Lamin Dm0 unspezifisch an die Sepharose (Abb. 26 B, Spur 3).

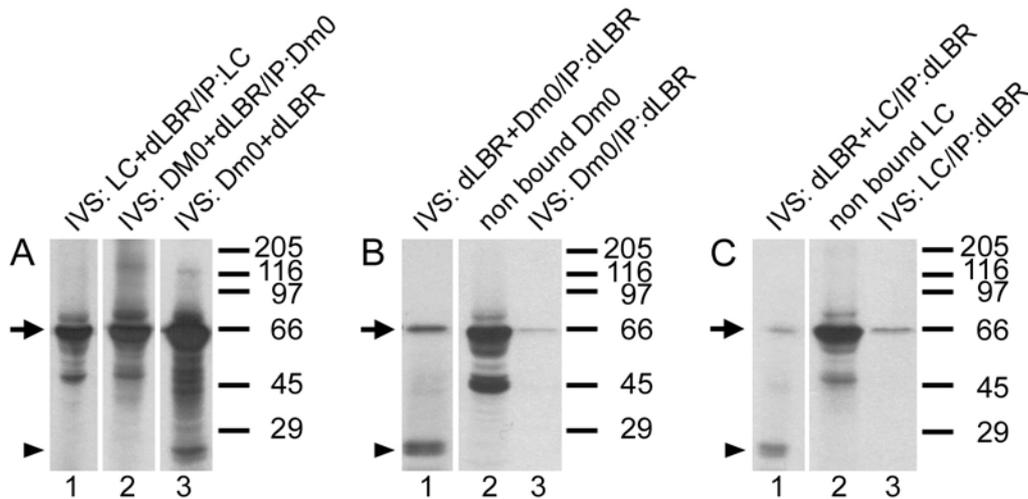


Abb. 26: Immunpräzipitationen der in vitro synthetisierten Proteine dLBR (AS 17-262), Lamin Dm0 und Lamin C mit den an Protein A-Sepharose gekoppelten spezifischen Antikörpern.

Die beiden potentiellen Bindungspartner wurden durch gekoppelte Transkription/Translation synthetisiert (IVS: in vitro synthetisierte Proteine) und an Protein A Sepharose gekoppelten Antikörpern gegen eines der Proteine immunpräzipitiert (IP). Die Überstände der Kontroll-Immunpräzipitationen (B, C Spur 2) sowie die immunpräzipitierten Proteine einschließlich ihrer Bindungspartner (A, Spur 1 und 2; B, C Spur 1 und 3) wurden gelelektrophoretisch durch 10% SDS-PAGE aufgetrennt und durch Fluorographie detektiert. Als Kontrolle wurden die in vitro synthetisierten Proteine Lamin Dm0 und dLBR (A, Spur 3) aufgetragen.

A) Immunpräzipitation der in vitro translatierten Proteine Lamin Dm0/dLBR und Lamin C/dLBR

B) Immunpräzipitation der in vitro translatierten Proteine Lamin Dm0/dLBR

C) Immunpräzipitation der in vitro translatierten Proteine Lamin C/dLBR

Die immunpräzipitierten Lamine sind mit einem Pfeil, der immunpräzipitierte dLBR ist mit einem Pfeilkopf gekennzeichnet.

Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts sind in kD angegeben.

### III.1.7.4.2 In vivo Bindungsstudien

Um die potentiellen Interaktionen des dLBR mit den beiden Laminen von *Drosophila melanogaster* (Lamin Dm0; Lamin C) näher zu charakterisieren und die Ergebnisse der in vitro Translationsexperimente zu überprüfen, wurden Immunpräzipitationen mit zwei unterschiedlichen Zelllinien von *Drosophila melanogaster* durchgeführt. Die beiden untersuchten Zelllinien Schneider S2 und Kc167 unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Expression der Lamine, da sie aus Gewebe unterschiedlichen Entwicklungsstadien stammen. Wie schon erwähnt, handelt es sich bei den Schneider S2 Zellen um embryonale Zellen, die aus 0 - 22 h alten Embryonen gewonnen wurden. Die noch nicht differenzierten Zellen exprimieren nur Lamin Dm0, da die Expression des Lamin C erst ab dem späten 12. Embryonalstadium von *Drosophila melanogaster* detektierbar ist. Die Transkription des entwicklungspezifisch regulierten A-Typ Lamins im späten 12. Embryonalstadium korreliert mit der Differenzierung der sich entwickelnden Gewebe. Zu diesem Zeitpunkt haben die

meisten Zellen die mitotischen Teilungen eingestellt und arretieren in der G1 Phase. Die Organanlagen beginnen sich zu entwickeln und sind histologisch nachweisbar. Die Expression des Lamin C ist zunächst nur im Hinterdarm und den Önozyten nachweisbar und setzt sich in den sich später differenzierenden Geweben wie dem Vorderdarm, den posterioren Stigmata und der Epidermis fort. Im Gegensatz zu den sich differenzierenden Geweben bleiben die Zellen des embryonalen zentralen Nervensystems, der Malphigischen Gefäße sowie der ventralen Neuroblasten Lamin C negativ (Riemer et al., 1995). Die Expression des Lamin C in Schneider S2 Zellen ist auf wenige Zellen (weniger als 1%) beschränkt, daher ist davon auszugehen, dass es sich bei dieser Kulturzelllinie um weitgehend undifferenzierte Zellen eines sehr frühen Entwicklungsstadium handelt. Im Gegensatz zu dieser embryonalen Zelllinie stammen die Kc167 Zellen von differenzierten Haematocyten ab, die eine Co-Expression beider Lamine (Lamin Dm0 und Lamin C) aufweisen.

Die Immunpräzipitationen wurden mit den beiden Antiseren gegen dLBR, LBR/gI und LBR/ml, durchgeführt (Abb. 27). Um eine unspezifische Bindung der Proteine zu vermeiden, wurden die mit Immunpräzipitationspuffer aus Schneider S2 oder Kc167 Zellen extrahierten Proteine vor der Immunpräzipitation in einem Aliquot der Sepharose vorinkubiert und die eventuell unspezifisch gebundenen Proteine durch Zentrifugation sedimentiert. Die an Protein A-Sepharose gekoppelten Antikörper wurden mit diesem Überstand (13.000 g Überstand) inkubiert und dadurch der daran bindende dLBR einschließlich dessen Bindungspartner co-immunpräzipitiert. Die Proteine wurden durch 10% SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit monoklonalen (ADL67; Abb. 27 Spuren 1 und 2) und polyklonalen Antikörpern (Abb. 27 Spuren 3 und 4) gegen Lamin Dm0 sowie monoklonalen (LC28; Abb. 27 Spuren 5 und 6) Antikörpern gegen Lamin C inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Immunpräzipitationen mit Ansätzen ohne Antikörper durchgeführt (Abb. 27 Spuren 7 und 8).

Mit beiden Zellextrakten aus Schneider S2 Zellen (S2) und Kc167 Zellen (Kc) kann Lamin Dm0 immunpräzipitiert werden (Abb. 27 Spuren 1, 2, 3, 4). Eine Immunpräzipitation des Lamin C mit Zellextrakten aus Kc167 Zellen kann jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. 27 Spur 6). Dies bestätigt die Vermutung, dass aus den in vitro Translationsansätzen co-immunpräzipitiertes Lamin C auf unspezifische Bindungen des Lamins zurückzuführen ist.

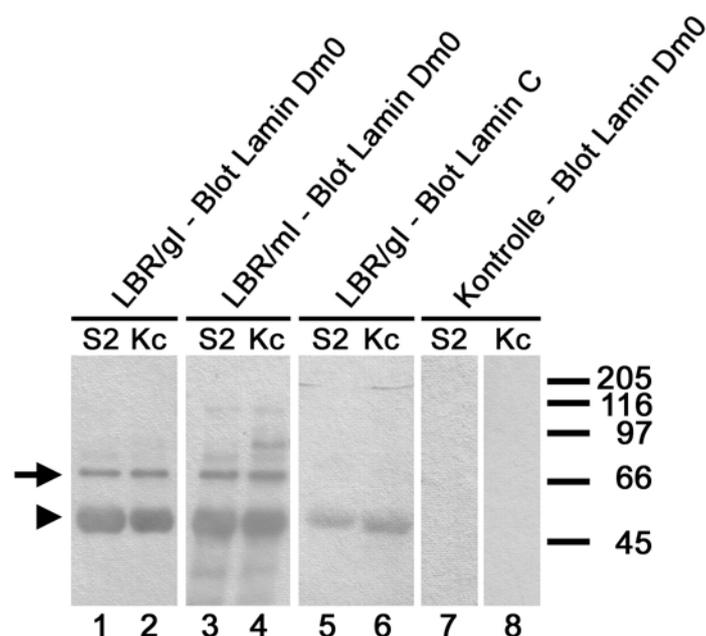


Abb. 27: Co-Immünpräzipitation der Lamine Dm0 und LC mit dLBR.

Die 13.000 g Überstände (Triton/NaCl-Extraktion) der *Drosophila* Zelllinien Schneider S2 (S2) und Kc167 (Kc) wurden mit dem an Protein A Sepharose gekoppelten Antikörpern LBR/gI (Spuren 1, 2, 5, 6) oder LBR/ml (Spuren 3 und 4) inkubiert. Zur Kontrolle wurden Immunpräzipitationen ohne Antikörper durchgeführt (Kontrolle, Spuren 7, 8). Die immunpräzipitierten Proteine wurden durch 10% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und die Immunblots mit monoklonalen (Spuren 1, 2, 7, 8) und polyklonalen Antikörpern gegen Lamin Dm0 (Spuren 3 und 4) und monoklonalen Antikörpern gegen Lamin C durchgeführt (Spuren 5 und 6). Die Position des Lamin Dm0 ist mit einem Pfeil markiert, die Position der schweren Ketten (HC) der Immunglobuline ist mit einem Pfeilkopf markiert. Die Positionen der Referenzproteine sind in kD angegeben.

Durch diese Bindungsstudien konnte nachgewiesen werden, dass Lamin Dm0, nicht aber Lamin C in den eingesetzten Zellextrakten mit dem dLBR in löslichen Proteinkomplexen vorliegt. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass die aminoterminalen Region des dLBR für die Interaktion mit Lamin Dm0 *in vitro* ausreichend ist.

### III.1.8 Untersuchung der Sterol C14 Reduktase Aktivität des dLBR

Die carboxyterminale Domäne des Lamin B Rezeptor der Vertebraten weist eine starke strukturelle Ähnlichkeit zu den Mitgliedern der Sterol Reduktase Multigen-Familie auf (Holmer et al., 1998), eine besonders starke Ähnlichkeit (42% identische Aminosäuren) wurde zwischen dem LBR des Menschen und der der Sterol C14 Reduktase der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* gefunden. Neben dieser strukturellen Ähnlichkeit konnte nachgewiesen werden, dass der LBR die Fähigkeit besitzt, den enzymatischen Defekt der Sterol C14 Reduktase des defizienten Hefestammes *erg24* zu kompensieren (Silve et al., 1998).

Sterole beeinflussen als Mitglieder der Gruppe der Steroide und Hauptkomponenten von eukaryotischen zellulären Membranen deren Fluidität und Permeabilität. In Vertebraten ist das Cholesterol als wichtigstes Sterol ein strukturelles Element der Membranen und dient als Vorstufe vieler an Signaltransduktionen beteiligter Stoffe, einschließlich Steroidhormone, wie Progesteron, Testosteron, Östradiol und Cholesterol. Studien haben gezeigt, dass Cholesterol auch an der kovalenten Modifikation von Hedgehog-Proteinen beteiligt ist und somit regulatorische Funktionen in der räumlichen Musterbildung während der Embryogenese von Vertebraten und Invertebraten aufweist (Farese und Herz, 1998; Roux et al., 2000).

In Invertebraten wird Cholesterol hauptsächlich für die Synthese von Ecdysonen in Insekten und Signalmolekülen während spezifischer Entwicklungsstadien in Nematoden verwendet. Während Vertebraten über die Fähigkeit verfügen, Cholesterol in der Sterolbiosynthese ausgehend von Acetyl Coenzym A de novo zu synthetisieren (Abb. 28), fehlen in Invertebraten viele Enzyme dieses Stoffwechselweges. Sie sind nicht in der Lage, Cholesterol zu synthetisieren und müssen es mit der Nahrung aufnehmen (Übersicht in Rawson, 2003 und Kurzchalia und Ward, 2003).

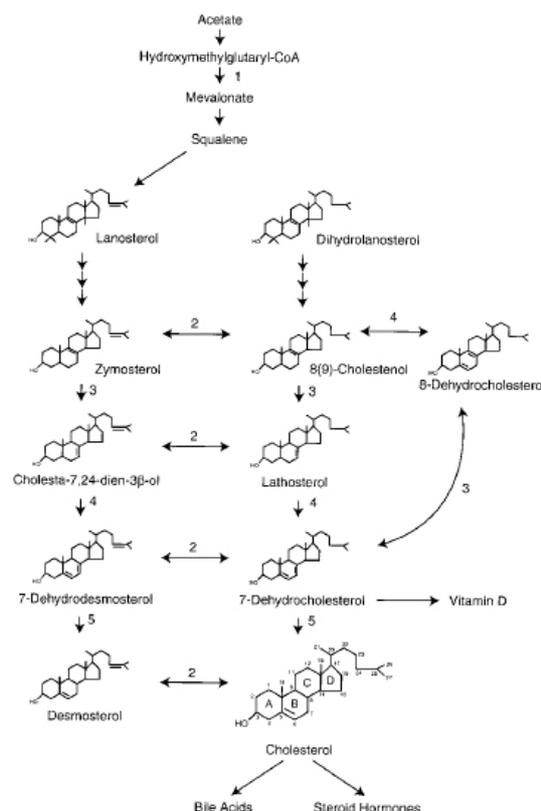


Abb. 28: Schematische Darstellung der Cholesterol Biosynthese (Battaile und Steiner, 2000)

Die dargestellten Reaktionen werden durch folgende Enzyme katalysiert 1= HMG-CoA Reduktase; 2= 3β-hydroxysteroid-D24-Reduktase; 3= 3β-hydroxysteroid-D7, D8-Reduktase; 4= 3β-hydroxysteroid-D5-Desaturase; 5= 3β-hydroxysteroid-D7-Reduktase

Trotz der Unfähigkeit, Cholesterol de novo zu synthetisieren, zeigte die Suche mit der Sequenz der endogenen Sterol C14 Reduktase von *Saccharomyces cerevisiae* (ERG24, Accession Nummer: M99419) in der Genbank von *Drosophila melanogaster* (Flybase: <http://flybase.bio.indiana.edu/>) eine hohe Übereinstimmung der Sterol C14 Reduktase mit dem Lamin B Rezeptor von *Drosophila* (score: 177,  $1.5e^{-19}$ ). Die carboxyterminale Domäne des dLBR (Aminosäuren 301 – 741) weist eine Identität von 17% mit der Sterol C14 Reduktase ERG24 auf. Da in *Drosophila* viele der am Sterolbiosyntheseweg beteiligten Enzyme oberhalb der Squalene Synthase fehlen, stellt sich nun die interessante Frage, ob der Lamin B Rezeptor über eine Sterol C14 Reduktase Aktivität, wie sie für den LBR des Menschen nachgewiesen werden konnte (Slive et al., 1998), verfügt.

Für die Analyse der Sterol C14 Reduktase Aktivität des dLBR wurde der Hefestamm *erg24* verwendet, der sich durch einen Defekt in der Sterolbiosynthese auszeichnet. Die Klonierung der dLBR cDNA in einen Hefe Expressionsvektor und die Transformation der Hefezellen führte Daniela Weber unter meiner Anleitung durch.

#### **Der *Saccharomyces cerevisiae* Hefestamm *erg24***

Der Hefestamm *erg24* der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* zeichnet sich durch einen Defekt in der Sterolbiosynthese aus. In der Sterolbiosynthese der Hefe wird, ausgehend von Acetyl-Coenzym A, in mehreren Schritten, die durch verschiedene Enzyme katalysiert werden, das Intermediat Ergosterol gebildet (Abb. 29). Die Synthese des Ergosterol erfolgt durch Reduktion des Zwischenproduktes 4,4-dimethylcholesta-8,14,24-trienol (Ignosterol), katalysiert durch die Sterol C 14 Reduktase zu 4,4-dimethylcholesta-8,24-dienol (Ergosterol). Der mutante Hefestamm *erg24* ist durch einen Defekt des Gens ERG24 charakterisiert, das für die Sterol C14 Reduktase kodiert (Crowley et al., 1996). Dieser Hefestamm zeichnet sich neben dem enzymatischen Defekt durch eine starke Beeinträchtigung des aeroben Wachstums, einer Uracil-Defizienz und der Hypersensibilität gegenüber Cycloheximid aus. Der Hefestamm *erg24* sowie die zur Kontrolle eingesetzten folgenden Vektoren wurden mir freundlicherweise von Dr. Martin Bard, Universität Indianapolis, USA bzw. Dr. Kathrin Schrick, Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt:

pYX212-ERG24, der die cDNA des Gens ERG24, welches für die Sterol C14 Reduktase von *Saccharomyces cerevisiae* kodiert, enthält.

pYX212-FACKEL, der die cDNA des Gens FACKEL, welches für die Sterol C14 Reduktase der Brassicaceae *Arabidopsis thaliana* kodiert, enthält.

pYX212-control, der die cDNA eines 900 Basenpaar langes Kontrollgens ohne enzymatische Aktivität enthält.

Die Vektoren pYX212-ERG24 und pYX212-FACKEL wurden als positive Kontrollen eingesetzt, da sie die Defizienzen des *erg24* Hefestammes komplementieren können. Als negative Kontrolle wurde der pYX212-control Vektor eingesetzt.

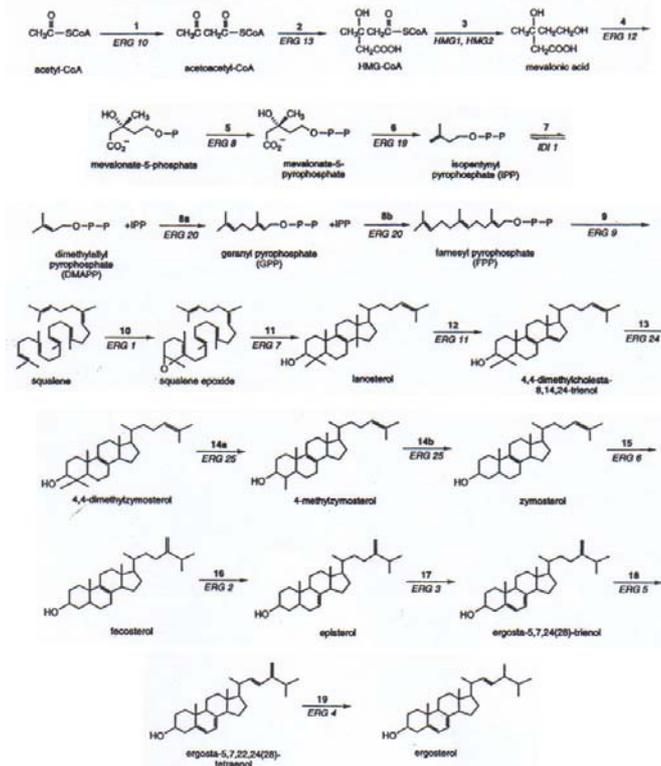


Abb. 29: Ergosterol Biosyntheseweg von *Saccharomyces cerevisiae* (Lees et al., 1999)

### III.1.8.1 Expression des dLBR in *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Analyse der Sterol C14 Reduktase Aktivität des dLBR wurde die komplette kodierende Region der cDNA (Nukleotide 1 – 2222) durch PCR amplifiziert und in den Hefe-Expressionsvektor pYX212 kloniert. Mit Hilfe dieses Expressionsvektors können Proteine in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert werden. Die Expressionsvektoren der Hefe besitzen neben den Charakteristiken zur bakteriellen Expression (f1 ori und ColE1ori, Antibiotika-Resistenzen) zusätzliche Selektionsmarker, wodurch Auxotrophien in defizienten Hefestämmen komplementiert werden können. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Expressionsvektor pYX212 ist durch einen URA3 Selektionsmarker ausgezeichnet. Die Transformation des rekombinanten dLBR in Hefezellen des Stammes *erg24* wurde nach der Standardmethode von Gietz und Woods (Gietz et al., 1992) durchgeführt.

Um die Expression des dLBR in Hefezellen zu überprüfen, wurden Proteinextrakte im Immunblot analysiert.

Der rekombinante pYX212-dLBR Vektor sowie die Kontrollvektoren (pYX212 -ERG24; -control) wurden durch Transformation in Hefezellen des Stammes *erg24* eingeschleust und in YPAD-Medium kultiviert. Proteinextrakte der verschiedenen transformierten Hefestämme wurden durch 10% SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose

transferiert und im Immunblot mit den Antiseren LBR/gI+II inkubiert. Zur Kontrolle der Expression des dLBR wurden Drosophila Schneider S2 Kulturzellen verwendet.

Wie aus der Abbildung 30 deutlich wird, wird der dLBR in den mit pYX212-dLBR transformierten Hefezellen (Abb. 30 Spur 2) und in den als Kontrolle aufgetragenen Schneider S2 (Abb. 30 Spur 1) Zellen exprimiert. Der Antikörper erkennt in beiden Spuren ein Protein der molekularen Masse von ca. 66.000 Da, welches der Expression des dLBR entspricht. Die Expression des dLBR in den Hefezellen ist auch durch das typische Laufverhalten des Proteins charakterisiert, was durch die Proteinaggregate in den als Kontrolle aufgetragenen Schneider S2 Zellen und in den Proteinextrakten der mit pYX212-dLBR transformierten Hefezellen im Bereich oberhalb der Referenzproteine nachzuweisen ist. Bei den Proteinproben der mit pYX212-ERG24 (Abb. 30 Spur 3) und pYX212-control (Abb. 30 Spur 4) transformierten Hefezellen kann keine für den dLBR spezifische Bande detektiert werden. Jedoch zeigt die Abbildung in allen Proteinproben, die aus transformierten Hefezellen isoliert wurden, ein starkes Signal bei 29.000 D (Abb. 30 Spuren 2 – 4). Im Serum der mit dLBR immunisierten Meerschweinchen scheinen noch Antikörper vorhanden zu sein, die unspezifisch mit Hefeproteinen reagieren.

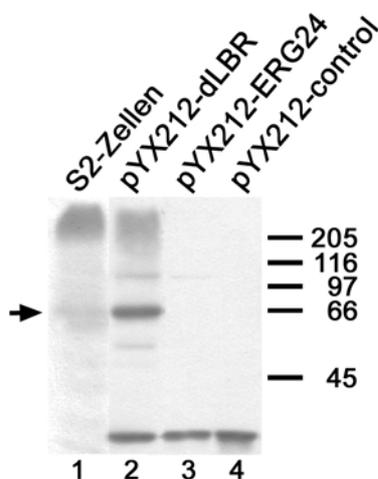


Abb. 30: Expression des dLBR in transformierten *erg24* Hefezellen.

Der Hefestamm *erg24* wurde mit den Vektoren pYX212-dLBR (Spur 2), pYX212-ERG24 (Spur 3) und pYX212-control (Spur 4) transformiert und die Gesamtproteine der transformierten Hefezellen durch 10% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und der Immunblot mit den polyklonalen Antikörpern dLBR/gI-II inkubiert. Als Kontrolle wurden Drosophila Schneider S2 Kulturzellen eingesetzt (Spur 1). Die Position des dLBR ist durch einen Pfeil markiert.

Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts sind in kD angegeben.

Die Lokalisation des dLBR in den transformierten Hefezellen durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie ergab keine verwertbaren Daten, da die dLBR Antikörper mit einem Hefeprotein von 29.000 D reagierten (Daten nicht gezeigt).

### III.1.8.2 Gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse der von transformierten *erg24* Hefezellen synthetisierten Sterole

Die Kultivierung des mit dLBR transformierten Hefestammes unter verschiedenen Wachstumsbedingungen ließ vermuten, dass der dLBR keine Sterol C14 Reduktase Aktivität aufweist (Weber, 2003). Zur eindeutigen Charakterisierung der enzymatischen Aktivität des dLBR auf biochemischem Weg wurden die produzierten Sterole der transformierten *Saccharomyces cerevisiae* Zellen durch gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse identifiziert. Die defizienten *erg24* Hefezellen synthetisieren anstatt von Ergosterol als Hauptendprodukt des Sterolbiosyntheseweges das Intermediat Igosterol, da die Biosynthese durch das Fehlen des Enzyms Sterol C14 Reduktase unterbrochen wird. Hefezellen, die durch Transformation des Arabidopsis Gens FACKEL bzw. des Gens ERG24 den enzymatischen Defekt der Mutante komplementieren können, erlangen wieder die Fähigkeit, Ergosterol zu synthetisieren, während Hefezellen, die nur mit dem leeren Vektor pYX212-control transformiert wurden, Igosterol akkumulieren.

Die mit den Vektoren pYX212 -ERG24; -FACKEL; -dLBR und -control transformierten Hefezellen wurden, wie unter V.2.6.1 beschrieben, mit methanolischer KOH Lösung verseift und die Sterole mit n-Hexan extrahiert. Die konzentrierte Lösung wurde am GC/MS-Gerät in der Arbeitsgruppe von Prof. Schreier am Lehrstuhl für Pharmazie und Lebensmittelchemie (Universität Würzburg) analysiert. Dabei durchlief das Gerät das in V.2.6.2 beschriebene Programm. Für jeden transformierten Hefestamm wurden ein Gaschromatogramm sowie mehrere Massenspektren erstellt. Im Gaschromatogramm werden die getrennten Einzelsubstanzen des analysierten Gemisches aufgeführt, wobei die x-Achse die Zeit (in min) mit der die einzelnen Komponenten das Ende der Säule erreichen, und die y-Achse die relative Konzentration der einzelnen Komponenten beschreibt. Die Massenspektren stellen die Fragmentationen der gaschromatographisch aufgetrennten einzelnen Komponenten dar. Auf der x-Achse wird das Verhältnis von Masse zu Ladung und auf der y-Achse die relative Intensität der Fragmente dargestellt. Als Kontrolle wurden für das synthetisch erzeugte Ergosterol ebenfalls ein Gaschromatogramm sowie ein Massenspektrum erstellt (Abb. 31 A). Da jedes Sterol ein bestimmtes Fragmentierungsmuster bei der Ionisierung im Massenspektrometer erzeugt, wurden durch Vergleich mit einem MS Spektrum einer Spektrenbibliothek die Sterole identifiziert, die von den transformierten *Saccharomyces cerevisiae* Zellen produziert wurden (Abb. 31).

Die GC/MS Analysen zeigen, dass durch die Transformation der mutanten *erg24* Hefezellen mit den Genen ERG24 oder FACKEL, die für die endogenen Sterol C14 Reduktasen von *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana* kodieren, die Defizienz komplementiert werden kann und die Zellen erwartungsgemäß wieder Ergosterol synthetisieren (Abb. 31 C, D), während die mit pYX212-control transformierten Hefezellen Igosterol produzieren (Abb. 31 E). Die Expression des dLBR in den transformierten *erg24* Hefezellen kann den enzymatischen Defekt allerdings nicht komplementieren, die Analyse des Massenspektrums

zeigt das für das Intermediat Ignosterol typische Spektrum (Abb. 31 B, F). Der Lamin B Rezeptor weist somit keine enzymatische Aktivität einer Sterol C14 Reduktase auf.

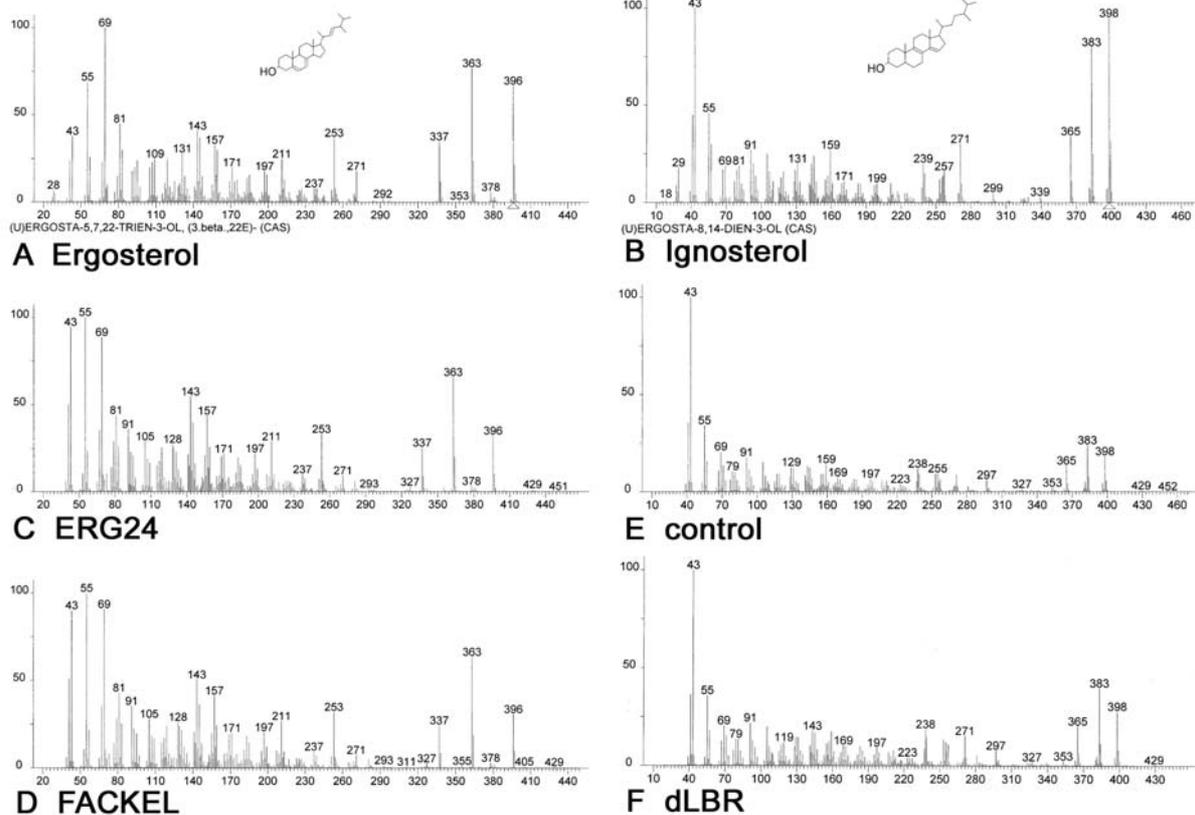


Abb. 31: Massenspektrometrische Analysen der Sterole der mit pYX212 -dLBR (F), -ERG24 (C), -FACKEL (D), -control (E) und -dLBR (F) transformierten *erg24* Hefezellen. Die Sterole der transformierten Hefezellen wurden für 24 h in YPAD Medium kultiviert und die Sterole mit n-Hexan extrahiert. Die Produktion der Sterole Ergosterol oder Ignosterol wurde massenspektrometrisch analysiert und mit den Spektren von Ergosterol (A) und Ignosterol (B) einer MS-Spektrenbibliothek verglichen.

### III.1.9 Molekulare und phänotypische Charakterisierung der PZ-Insertionslinie 11341

Um die biologische Relevanz des Lamin B Rezeptor von *Drosophila melanogaster* analysieren zu können, sollte nach Phänotypen gesucht werden, die auf Mutationen des den dLBR kodierenden Gens CG17952 zurückzuführen sind. Für diese Analysen kann die Insertion von transposablen Elementen genutzt werden. Diese Elemente können durch die Integration in einer bestimmten genomischen Region zu Mutationen führen.

Es wurde deshalb in der *Drosophila melanogaster* BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project) Datenbank nach Transposons gesucht, die in der Nähe der genomischen Region von 2R 57F liegen. Mit der Insertionslinie 11341 wurde ein solches transposables Element gefunden. Die P-Element Insertion P{PZ}(2)03605<sup>03605</sup> ist auf dem rechten Arm des 2. Chromosoms in der Region 57F8 -10 lokalisiert und befindet sich 990 Basenpaare in 5' → 3' Orientierung vor dem Translationsstart des Gens CG17952, welches für den dLBR kodiert. Die PZ-Insertionslinie 11341 wurde durch das Bloomington Drosophila Stamm-Zentrum in Indiana zur Verfügung gestellt.

#### III.1.9.1 Molekulare Charakterisierung der PZ-Insertionslinie 11341

Die Lokalisation des integrierten PZ-Elementes im Genom der PZ-Insertionslinie 11341 wurde mit den für das PZ-Element spezifischen Primerpaaren Pry2/Pry1 und Plac4/Plac1 durch inverse PCR überprüft. Um den genauen Insertionsort zu bestimmen, wurden mit dem für das PZ-Element spezifischen Primern verschiedene PCR-Produkte von 400, 500, 550 und 600 Basenpaaren amplifiziert. Die Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, isoliert und anschließend sequenziert. Durch die Sequenzierung konnte ein Teilbereich der an das PZ-Element angrenzenden Region im Bereich 29748 – 29877 ermittelt werden. Die Lage des PZ-Elementes konnte auf einen Bereich von ca. 1070 Basenpaaren vor dem Translationsstart des dLBR eingegrenzt werden, der genaue Insertionsort konnte nicht ermittelt werden. Da der für die Sequenzierung verwendete Primer bereits in der terminalen Region des PZ-Elementes bindet, ist anzunehmen, dass die direkt angrenzende genomische Region nicht sequenziert werden konnte, so dass die Insertion auf die vorhergesagte Region von ca. 990 Basenpaaren vor dem Translationsstart des dLBR korrigiert werden und die Lokalisation des Insertionsortes des PZ-Elementes bestätigt werden kann. Durch die P-Element Analyse konnte ich außerdem nachweisen, dass die Drosophila Insertionslinie 11341 kein weiteres P-Element enthielt.

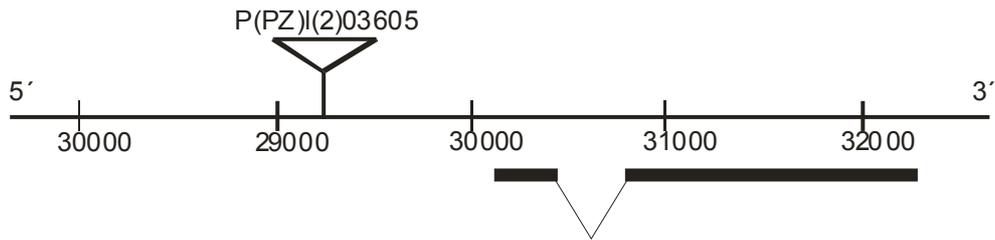


Abb. 32: Genomische Region des den dLBR kodierenden Gens CG17952 mit dem Insertionsort des P{PZ}I(2)03605<sup>03605</sup> Elementes der Linie 11341. Das PZ-Element liegt in 5' → 3' Orientierung zum Gen CG17952 und ist ca. 990 Basenpaare von dessen Translationsstart entfernt.

### III.1.9.2 Phänotypische Charakterisierung der PZ-Insertionslinie 11341

#### Etablierung eines Green Fluorescent Protein (GFP) Balancer Stammes (P{PZ}I(2)03605<sup>03605</sup>/CyO-GFP) und Analyse der homozygoten Embryonen und Larven

Die PZ-Insertionslinie 11341 zeichnet sich durch folgenden Genotyp aus:

`cn[1] P{ry[+t7.2]=PZ}I(2)03605[03605]/CyO; ry[506]`

und ist im Vergleich zum Wildtyp rezessiv lethal. Die homozygoten Tiere sterben während des Puppenstadiums. Zur näheren Charakterisierung der heterozygoten und homozygoten Fliegen wurde durch die Kreuzung der PZ-Insertionslinie 11341 mit dem Stamm BL-5702 ein heterozygoter, über CyO-GFP balancierter Stamm etabliert, der ebenfalls die P-Element Insertion P{PZ}I(2)03605<sup>03605</sup> aufweist (Abb. 33 Kreuzungsschema).

Die Einkreuzung des Balancers CyO-GFP hat den Vorteil, dass die in Bezug auf die P-Element Insertion homozygoten Larven von den heterozygoten Tieren unterschieden werden können. Die Nachkommen des P{PZ}I(2)03605<sup>03605</sup>/CyO-GFP Stammes bestehen aus 2/3 heterozygoter Tiere des Genotyps P{PZ}I(2)03605<sup>03605</sup>/CyO-GFP und zu 1/3 aus Tieren, die homozygot bezüglich des P-Elementes sind (P{PZ}I(2)03605<sup>03605</sup> / P{PZ}I(2)03605<sup>03605</sup>). Die homozygoten Embryonen und Larven sind somit die einzigen Tiere, die keine GFP-Fluoreszenz aufweisen und können bereits im Alter von 10 - 12 Stunden unter dem Fluoreszenzmikroskop unterschieden werden.

In den Embryonalstadien und 1. Larvalstadium wird das Green Fluorescent Protein (GFP) in den heterozygoten Tieren im Bereich der Speicheldrüsen und der glatten Muskulatur des Mitteldarms exprimiert, während in der weiteren larvalen Entwicklung neben der starken Fluoreszenz des Mitteldarms auch eine schwache Fluoreszenz im Bereich der Imaginalscheiben, des Gehirns, des Fettkörpers und des Darms sichtbar ist.

**Kreuzung der PZ-Insertionslinie 11341 mit dem CyO-GFP Balancerstamm BL-5702**

$$\begin{array}{l} \pm \quad \underline{\text{Pz}} \quad \underline{\text{ry}} \\ + \quad \text{CyO} \quad \text{ry} \end{array} \quad \times \quad \begin{array}{l} \pm \quad \underline{\text{Sco}} \quad \pm \\ \rightarrow \text{CyO-GFP} \quad + \end{array} \quad \text{P-Generation}$$

$$\begin{array}{l} \pm \quad \underline{\text{Pz}} \quad \underline{\text{ry}} \\ +/\rightarrow \text{sco} \quad + \end{array} \quad \begin{array}{l} \pm \quad \underline{\text{Pz}} \quad \underline{\text{ry}} \\ +/\rightarrow \text{CyO-GFP} \quad + \end{array} \quad \begin{array}{l} \pm \quad \underline{\text{Pz}} \quad \underline{\text{ry}} \\ +/\rightarrow \text{CyO} \quad + \end{array} \quad \text{F1-Generation}$$

Isolierung und Kreuzung der CyO-balancierten F1-Generation untereinander:

$$\begin{array}{l} \pm \quad \underline{\text{Pz}} \quad \underline{\text{ry}} \\ + \text{CyO-GFP} \quad + \end{array} \quad \times \quad \begin{array}{l} \pm \quad \underline{\text{Pz}} \quad \underline{\text{ry}} \\ \rightarrow \text{CyO-GFP} \quad + \end{array}$$

Abb. 33: Kreuzungsschema der PZ-Insertionslinie 11341 mit einem über CyO-GFP balancierten Stamm BL-5702. Pz: P-Element Insertion P{PZ}I(2)03605<sup>03605</sup>; +: wildtypisch; ry: rosy; CyO: Curly of Oster; CyO-GFP: Curly of Oster-GFP; →: Wildtypisches Y-Chromosom; Sco: Scotoid; (letale Kombinationen nicht angezeigt)

**Analyse der homozygoten Tiere der PZ-Insertionslinie P{PZ}I(2)03605<sup>03605</sup>/CyO-GFP**

Die P-Element Insertion P{PZ}I(2)03605<sup>03605</sup> ist homozygot lethal. Um den Zeitpunkt der Lethalität näher bestimmen zu können, wurden die homozygoten Embryonen und Larven des aus der Kreuzung etablierten Stammes, P{PZ}I(2)03605<sup>03605</sup>/CyO-GFP isoliert. Die Trennung der homo- und heterozygoten Embryonen und Larven erfolgte durch die Detektion der CyO-GFP balancierten heterozygoten Tieren unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die homozygoten, GFP-negativen Tiere wurden isoliert und deren Entwicklung untersucht.

Die homozygoten Embryonen und Larven weisen bis zum 3. Larvalstadium keine phänotypischen Veränderungen im Vergleich zu den heterozygoten Tieren bezüglich der Dauer der Embryogenese und der Larvalentwicklung auf. Ebenso weisen die homozygoten Tiere keine sichtbaren Abnormalitäten bis zum Ende des Puppenstadiums auf. Die Entwicklung der meisten Tiere arretiert innerhalb des 96 h andauernden Puppenstadiums, nur wenige entwickeln sich bis zur adulten Fliege, sterben jedoch noch innerhalb der Puppenhülle. Zur phänotypischen Analyse wurden die homozygoten Fliegen aus der Puppenhülle präpariert und für die rasterelektronenmikroskopische Analyse vorbereitet.

### Phänotypische Charakterisierung der homozygoten Tiere der PZ-Insertionslinie P{PZ}I(2)03605<sup>03605</sup>/CyO-GFP

Für die rasterelektronenmikroskopische Analyse der homozygoten Tiere des P{PZ}I(2)03605<sup>03605</sup>/CyO-GFP Stammes wurden die am Ende des Puppenstadiums arretierten Fliegen aus der Puppenhülle präpariert. Als Kontrolle wurden adulte Tiere des Stammes „WT-Berlin“, verwendet. Die Tiere wurden mit 6,25% Glutaraldehyd fixiert, entwässert und kritisch Punkt getrocknet. Nach der Fixierung wurden sie mit Platin/Palladium bedampft und im Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht (Abb. 34).

Beim Vergleich der homozygoten Tiere des P{PZ}I(2)03605<sup>03605</sup>/CyO-GFP Stammes (Abb. 34 A' - E', A'' - E'') mit wildtypischen Fliegen (Abb. 34 A - E) werden sofort die phänotypischen Abnormalitäten sichtbar. Die homozygoten P-Element Fliegen zeigen einen deutlich verkürzten Thorax. Auch das Abdomen scheint verkürzt zu sein, die Proportionen sind im Vergleich zum Wildtyp verändert (Abb. 34 A', A'', B', B''). Besonders auffällig sind die im Vergleich zum Wildtyp veränderten Augen (Abb. 34 C', C'', D', D'', E', E'').

Die Facettenaugen von *Drosophila melanogaster* bestehen bei wildtypischen Fliegen aus ca. 750 hexagonal angeordneten Ommatidien. Jedes Ommatidium setzt sich der Cornea und der Retina aus acht Photorezeptoren und zwölf akzessorischen Pigmentzellen zusammen. Die Photorezeptoren R1 bis R6 sind ringförmig um zwei zentrale Rezeptoren (R7 und R8) angeordnet. Die lichtempfindlichen Rhabdomere der Photorezeptoren sind miteinander zu einem gemeinsamen Rhabdom verschmolzen. Oberhalb der Photorezeptoren ist der sich aus 4 Semperzellen zusammensetzende Kristallkegel, der von zwei primären und mehreren sekundären Pigmentzellen umgeben ist. Zwischen den Ommatidien sind schmale, mechanosensorische Borsten angeordnet, deren sensorische Axone direkt ins Gehirn der Fliege führen (Chanut et al., 2001; Polaczyk et al., 1998).

Die homozygoten Tiere weisen eine starke Reduktion der Anzahl der Ommatidien und eine rauhe Oberfläche („rough eye“ Phänotyp) auf (Abb. 34 C', C'', D', D'', E', E''). Besonders auffällig ist die unregelmäßige Anordnung der Ommatidien und der mechanosensorischen Borsten, die zwischen vielen Ommatidien fehlen (Abb. 34 E', E''). Dieser Phänotyp, der auch als „rough eye“ Phänotyp bezeichnet wird, wird durch eine Vielzahl von Mutationen von Genen, die an der komplexen Entwicklung des Facettenauges von *Drosophila melanogaster* beteiligt sind, verursacht (Chanut et al., 2001; Polaczyk et al., 1998).

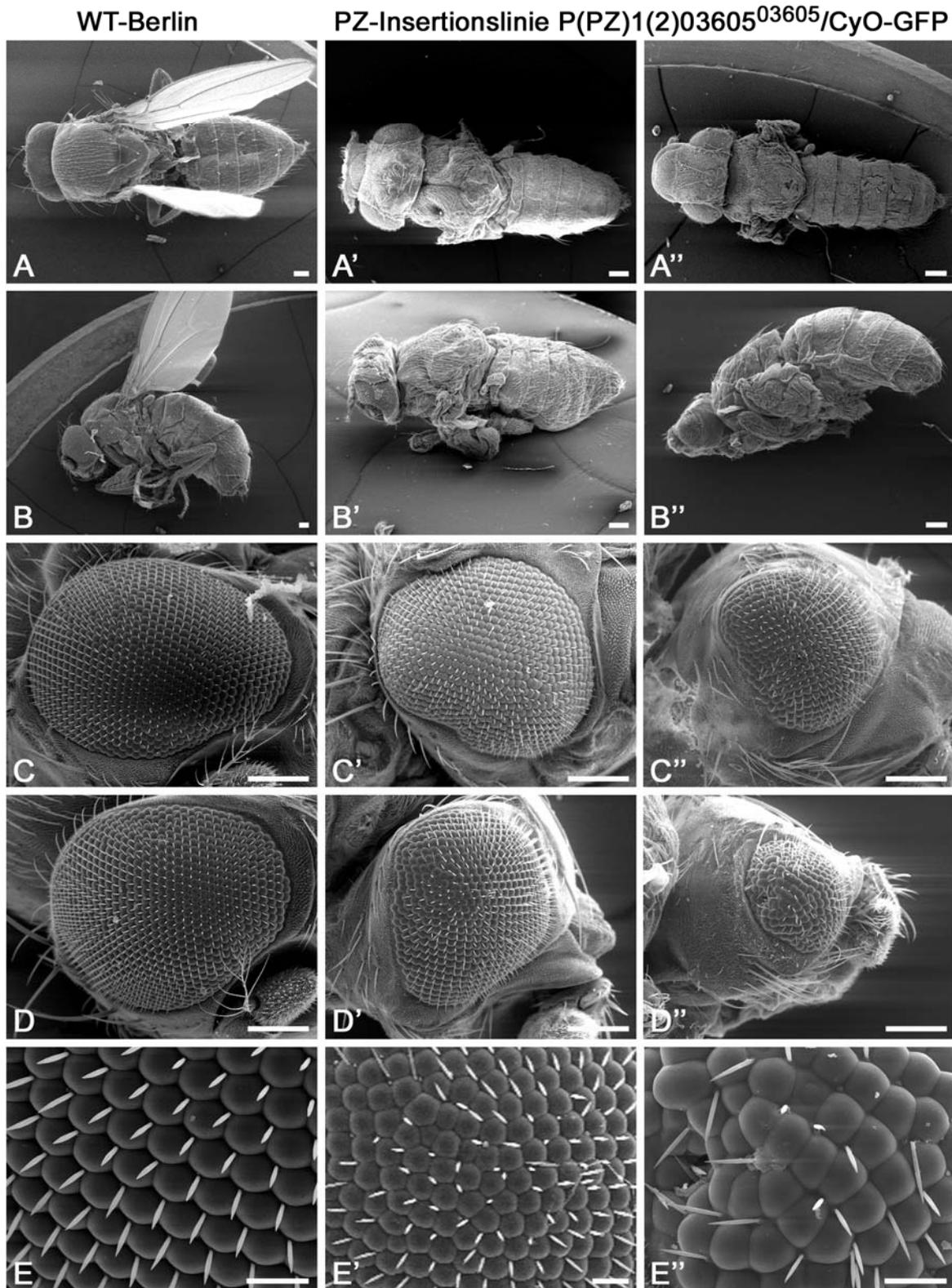


Abb. 34: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen adulter Tiere der Stämme „WT-Berlin“ (A - E) und „P{PZ}1(2)03605<sup>03605</sup>/CyO-GFP“ (A' - E', A'' - E'') von *Drosophila melanogaster*.  
Eichstriche A-D'': 100 µm; E-E': 20 µm

Um zu klären, ob die Insertion des PZ-Elementes 990 Basenpaare vor dem Translationsstart des Gens CG17952 in einer Verringerung dessen Genproduktes in den homozygoten Larven resultiert, wurden Gesamtproteinextrakte des 3. Larvalstadiums heterozygoter und homozygoter Tiere im Immunblot analysiert (Abb. 35). Die homozygoten Tiere wurden zuvor unter dem Fluoreszenzmikroskop von den heterozygoten Larven isoliert. Die Gesamtproteine der homozygoten (+/+) und heterozygoten (+/-) Larven wurden in proportionalen Mengen aufgetragen. Die Detektion des dLBR erfolgte mit den polyklonalen Antikörpern LBR/gI+II (Abb. 35 A). Zur Kontrolle wurde die Nitrozellulose mit den monoklonalen Antikörpern ADL 67 gegen Lamin Dm0 inkubiert (Abb. 35 B).

Die Expression des dLBR scheint durch die Insertion des PZ-Elementes nicht beeinflusst zu werden (Abb. 35). Es ist keine nachweisbare Reduktion der Expression des dLBR in den homozygoten Larven (Abb. 35 A, Spuren 3 und 4) im Vergleich zu den heterozygoten Tieren (Abb. 35 Spuren 1 und 2) feststellbar. Die in den Immunblots erkennbaren Banden ober- und unterhalb von 66.000 D sind auf die Homogenisierung der Larven sowie die Hitzebehandlung der Proteinproben vor der Auftrennung durch die SDS-PAGE und auf die Degradation des dLBR zurückzuführen. Die Lethalität und die phänotypischen Veränderungen der homozygoten Tiere können somit nicht eindeutig auf einen direkten Einfluss der Insertion des PZ-Elements auf die Expression des dLBR zurückgeführt werden.

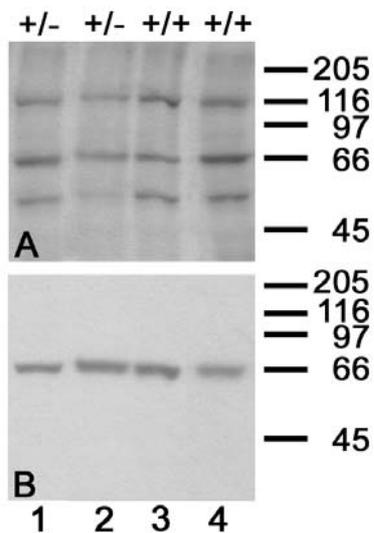


Abb. 35: Expression des dLBR (A) und des Lamin Dm0 (B) während des 3. Larvalstadiums in heterozygoten (+/-) und homozygoten (+/+) Tieren des P-Element Stammes P{PZ}I(2)03605<sup>03605</sup>/CyO-GFP von *Drosophila melanogaster*. Homozygote (+/+) und heterozygote (+/-) Tiere des 3. Larvalstadiums wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop isoliert und in SDS-Probenpuffer homogenisiert. Die larvalen Gesamtproteine wurden gelelektrophoretisch durch 10% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit den polyklonalen Antikörpern LBR/gI+gII (A) und den monoklonalen Antikörpern ADL 67 gegen Lamin Dm0 (B) im Immunblot inkubiert. Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts sind in kD angegeben.

Da die phänotypischen Manifestationen des P-Element Stammes P{PZ}I(2)03605<sup>03605</sup>/CyO-GFP nicht eindeutig auf eine veränderte Expression des dLBR zurückgeführt werden können, sollte die biologische Relevanz des Lamin B Rezeptor von *Drosophila melanogaster* durch Depletion des dLBR in Kulturzellen und während der Embryogenese von *Drosophila* durch RNA Interferenz untersucht werden.

### III.1.10 Reduktion der Expression von dLBR, Lamin Dm0, Lamin C und Otefin durch RNA Interference (RNAi)

Zur Untersuchung der Funktionen und Interaktionen des dLBR in vivo sollte die Genfunktion in *Drosophila* Kulturzellen und Embryonen durch das Einschleusen doppelsträngiger RNA (dsRNA) durch RNA Interference inhibiert werden.

Durch die Immunpräzipitationen konnte ich eine direkte Interaktion des dLBR mit Lamin Dm0 nachweisen. Um die Auswirkung der Veränderung der Expression des Lamin Dm0 auf die Lokalisation des dLBR zu untersuchen, sollte in parallelen Ansätzen ebenfalls die Expression der endogenen Lamine von *Drosophila melanogaster* in Kulturzellen und im Embryo durch RNAi reduziert werden.

Eine direkte Interaktion des dLBR mit Lamin C konnte durch die Immunpräzipitation mit Proteinextrakten aus *Drosophila* Kc167 Zellen nicht belegt werden. Um die Auswirkungen der Reduktion des Lamin C auf die Integrität der Lamina und auf die Lokalisation der integralen Kernmembranproteine zu untersuchen, sollte ebenfalls dessen Expression durch RNAi reduziert werden.

Die Synthese doppelsträngiger Ribonukleinsäuren sowie deren Einsatz in der Zellkultur von *Drosophila melanogaster* basiert auf der Methode von Clemens et al., 2000. Verschiedene cDNA-Fragmente, deren Expression durch RNA Interference inhibiert werden sollte, wurden durch PCR amplifiziert und in den pCR®II-TOPO Vektor kloniert. Die zur Synthese verwendeten Primer setzen sich aus der Bindungsstelle der T7-Polymerase und der spezifischen kodierenden Sequenz zusammen (VII.2 Anhang). Die cDNA-Fragmente wurden durch Restriktion isoliert und für die modifizierte Transkription mit dem MEGAscript™ High Yield Transcription Kit der Firma Ambion eingesetzt. Die präzipitierten und gereinigten einzelsträngigen RNA-Moleküle wurden hybridisiert und die doppelsträngige RNA direkt für die Transfektion von Kulturzellen verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Transfektion folgende *Drosophila* Kulturzelllinien eingesetzt:

Drosophila Schneider S2 Zellen  
Drosophila Schneider S2R+ Zellen  
Drosophila Kc167 Zellen

Die Kulturzelllinien unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Expression der Lamine. Wie bereits erwähnt, exprimieren die embryonalen Schneider S2 und S2 R+ nur Lamin Dm0, während in der differenzierten Zelllinie Kc167 die Expression beider Lamine, Lamin Dm0 und Lamin C, nachweisbar ist.

In allen Experimenten wurden die Kulturzellen entsprechend den Angaben mit dsRNA transfiziert. Als Kontrolle wurden Kulturzellen mit dem identischen Volumen Kulturmedium

versetzt und unter gleichen Bedingungen kultiviert. Die Reduktion der Expression wurde immunfluoreszenzmikroskopisch und biochemisch im Immunblot mit spezifischen Antikörpern analysiert. Zur phänotypischen Analyse wurde die Morphologie der Zellen und die Verteilung der integralen und assoziierten Membranproteine dLBR, Otefin, Lamin Dm0, Lamin C und des Fibrillarin, ein Protein der dichten fibrillären Komponente des Nukleolus, sowie die Verteilung der Kernporen durch die Lokalisation des Nukleoporin, immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Analyse der transfizierten Zellen erfolgte nach 24, 48, 72, 96, und 120 Stunden (Zeitpunkt der Transfektion = 0h)

### **III.1.10.1 Reduktion der Expression des dLBR in Drosophila Schneider S2, Schneider S2R+ und Kc167 Kulturzellen**

Die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigen in allen mit dLBR dsRNA transfizierten Zelllinien (Abb. 36) nach 24 Stunden eine signifikant schwächere Antikörperfärbung (Abb. 36 A). Nach 48, 72 und 96 Stunden kann in 90 - 95% der Kc167 (Abb. 36 Kc167 cells) und Schneider S2 (Abb. 36 Schneider S2 cells) sowie in 70 - 75% der S2R+ Zellen (Abb. 36 Schneider S2R+ cells) keine oder nur eine sehr schwache Färbung des dLBR mit den Antiseren LBR/gI+II nachgewiesen werden (Abb. 36 B - D). Die Anzahl der schwach gefärbten Zellen verringert sich in den Schneider S2 Zellen innerhalb des Zeitraums von 120 und 144 Stunden, so dass nach 120 h die meisten transfizierten Zellen in der Immunfluoreszenz nicht mehr von den Kontrollzellen unterschieden werden können (Abb. 36 Schneider S2 cells, E). Einen Anstieg der Anzahl mäßig bis stark gefärbter Zellen kann bei den beiden Zelllinien Kc167 und Schneider S2R+, die im Vergleich zu den Schneider S2 Zellen eine geringere Teilungsrate aufweisen, erst nach 144 h nachgewiesen werden (Abbildung nicht gezeigt). Während des gesamten Zeitraums können in allen drei untersuchten Zelllinien keine morphologischen Unterschiede zwischen transfizierten Zellen (Abb. 36 A – E) und Kontrollzellen (Abb. 36 F) beobachtet werden.

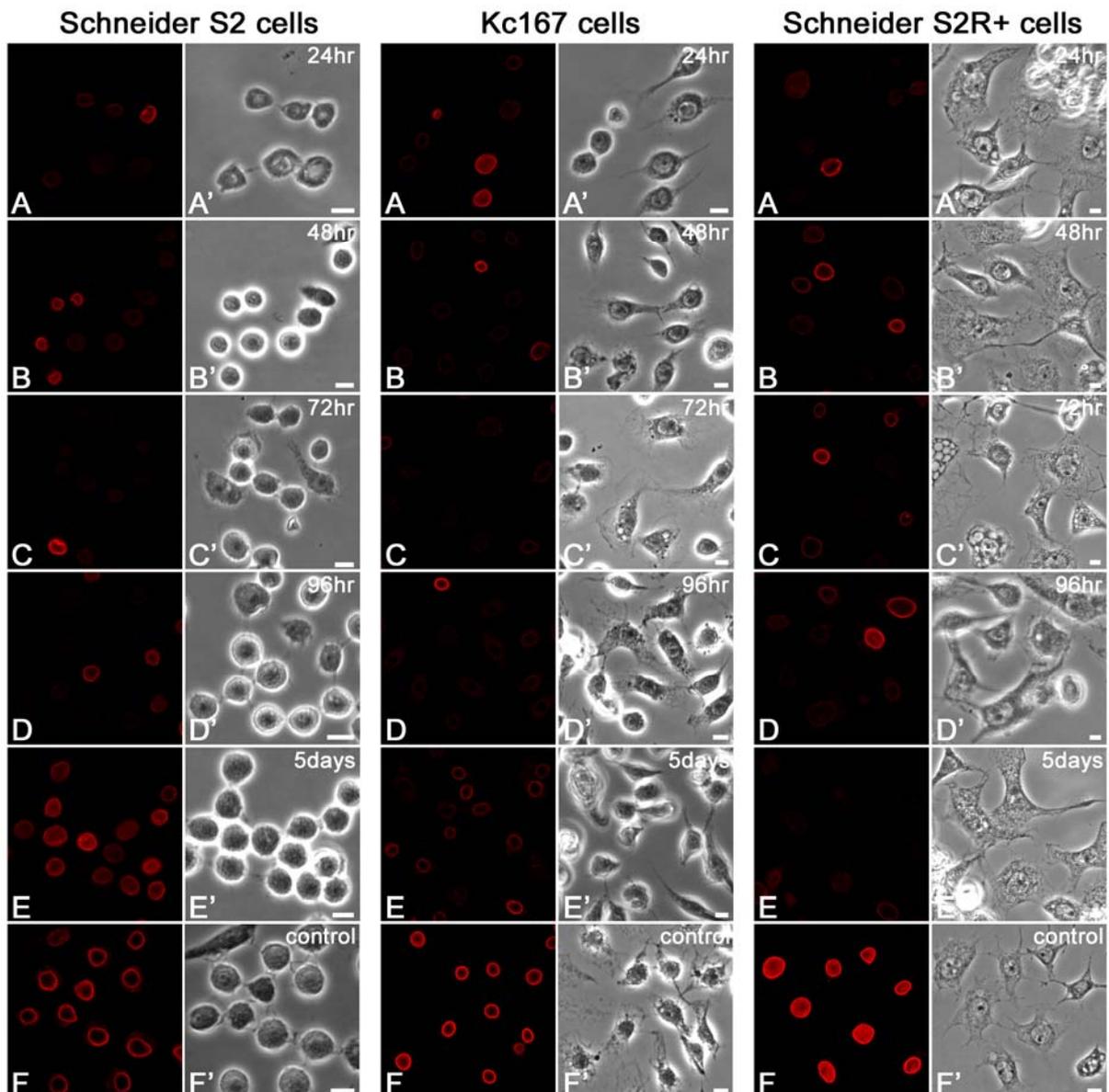


Abb. 36: Reduktion des dLBR in Drosophila Schneider S2, Schneider S2R+ und Kc167 Zellen durch RNA Interferenz (RNAi)

Drosophila Schneider S2, Kc167 und Schneider S2R+ Kulturzellen wurden mit dsRNA, spezifisch für das dLBR kodierende Gen transfiziert (A - E) oder als Kontrolle mit dem identischen Volumen Kulturmedium inkubiert (F) und durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie im Zeitraum von 24h (A), 48h (B), 72h (C), 96h (D) und 5 Tagen (E) nach der Transfektion analysiert.

A'-E') Phasenkontrastaufnahmen der transfizierten Zellen

F') Phasenkontrastaufnahmen der Kontrollzellen

Eichstriche: 10 µm

Zur Quantifizierung der Reduktion der Expression des dLBR in Drosophila Schneider S2, S2R+ und Drosophila Kc167 Zellen wurden proportionale Mengen von transfizierten Zellen und Kontrollzellen nach 72 h im Immunblot analysiert (Abb. 37).

In alle untersuchten Zelllinien kann eine drastische Reduktion des endogenen dLBR nachgewiesen werden (Abb. 37 Schneider S2: A, Spuren 3 und 4; Kc167: B, Spuren 3 und 4; Schneider S2R+: C, Spur 2), während die Expression des zur Kontrolle analysierten Lamin Dm0 (Abb. 37 A', C'), Otefin (Abb. 37 B') und  $\alpha$ -Tubulin (Abb. 37 A'', B'') nicht beeinflusst wird.

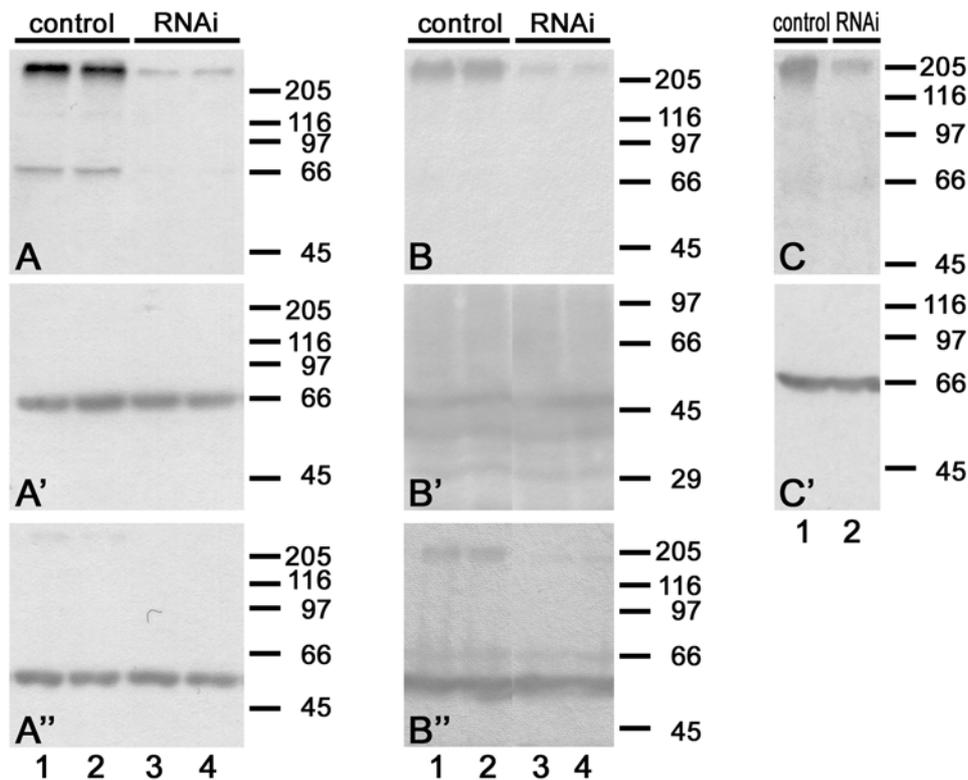


Abb. 37: Reduktion des dLBR in Drosophila Schneider S2, Schneider S2R+ und Kc167 Zellen durch RNA Interference (RNAi)

Drosophila Schneider S2 (A - A''), Kc167 (B - B'') und Schneider S2R+ (C - C') Kulturzellen wurden mit dsRNA, spezifisch für das dLBR kodierende Gen transfiziert (RNAi) oder mit dem identischen Volumen Kulturmedium inkubiert (control). Nach 72 h wurden proportionale Mengen des Gesamtproteins (125.000 Zellen) der transfizierten (A-A', Spuren 3 und 4; B-B', Spuren 3 und 4; C,C' Spur 2) und Kontrollzellen (A-A', Spuren 1 und 2; B-B', Spuren 1 und 2; C-C', Spur 1) durch 10% SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und im Immunblot mit den polyklonalen Antikörpern dLBR/gl+gII (A, B, C) oder zur Kontrolle mit Antikörpern gegen Lamin Dm0 (A', C'), Otefin (B') und  $\alpha$ -Tubulin (A'', B'') inkubiert.

Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts sind in kD angegeben.

### III.1.10.2 Einfluss der Reduktion des dLBR durch RNAi auf die Expression und Lokalisation der Proteine Lamin Dm0, Lamin C, Nukleopodin, Otefin und Fibrillarin

Die biochemischen Analysen haben gezeigt, dass die Reduktion der Expression des dLBR in den untersuchten Zelllinien keinen Einfluss auf die Expression des Lamin Dm0 und des Otefin hat. Um eine eventuell veränderte Lokalisation der kernmembranassoziierten Proteine Lamin Dm0, Lamin C und Otefin sowie der Kernporen zu untersuchen, wurden die mit dsRNA transfizierten Kulturzellen (Abb. 38 - 40, RNAi-dLBR) sowie Kontrollzellen (Abb. 38 - 40, control) 72 h nach der Transfektion durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Für die Untersuchungen wurden die zwei embryonalen Zelllinien Drosophila Schneider S2, Schneider S2R+ sowie die Zelllinie Kc167 eingesetzt, eine von Hämatozyten abgeleitete differenzierte Zelllinie, die sich in der Expression der Kernlamine von den embryonalen Zelllinien unterscheidet, da sie neben dem ubiquitär exprimierten Lamin Dm0 auch das entwicklungspezifische regulierte Lamin C exprimiert.

Die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der transfizierten Zelllinien Schneider S2 (Abb. 38), Schneider S2R+ (Abb. 39) und Kc167 (Abb. 40) zeigen 72 h nach der Transfektion in allen Zelllinien eine drastische Reduktion der Expression des dLBR (Abb. 38 - 39 E, Abb. 40 F). Eine Färbung der Kernhülle durch die Antiseren LBR/gI+gII ist erst bei einer Verstärkung der fluoreszenzmikroskopischen Signale über 760 Volt sichtbar (Abb. 38 - 39, E', Abb. 40 F'), während die Expression des dLBR in den transfizierten Zellen bei der Verstärkung der Signale mit 647 Volt, bei der die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen durchgeführt wurden, kaum sichtbar ist (Abb. 38 - 39, E, Abb. 40 F).

In den mit dLBR dsRNA transfizierten Schneider S2 und S2R+Zellen (Abb. 38 - 39) kann kein Einfluss der Reduktion des endogenen dLBR auf die Expression und Lokalisation des Lamin Dm0 festgestellt werden. Die Lokalisation des Lamin Dm0 ist in den transfizierten Zellen (Abb. 38 - 39 RNAi-dLBR A'), die nur noch eine sehr schwache Expression des dLBR aufweisen (Abb. 38 - 39 RNAi-dLBR A) von den Kontrollzellen (Abb. 38 - 39 control, A') nicht zu unterscheiden. Die Expression und Lokalisation des dLBR in der inneren Kernmembran scheint somit für die Lokalisation und Retention des Lamin Dm0 nicht essentiell zu sein. Die Verteilung der Kernporenkomplexe wird ebenfalls durch die fast vollständige Depletion des integralen Membranproteins nicht beeinflusst (Abb. 38 - 39 RNAi-dLBR B') und ist von der Lokalisation der Kernporen in den Kontrollzellen (Abb. 38 - 39 control, B') nicht unterscheidbar. Auch die Lokalisation des membranassoziierten Otefin (Abb. 38 - 39 RNAi-dLBR C') sowie die Verteilung des Fibrillarin innerhalb der dichten fibrillären Komponente des Nukleolus (Abb. 38 - 39 D') wird durch die Reduktion der Expression des dLBR nicht beeinflusst und ist von der Verteilung der beiden Proteine in den Kontrollzellen (Abb. 38 - 39 control, C', D') nicht zu unterscheiden.

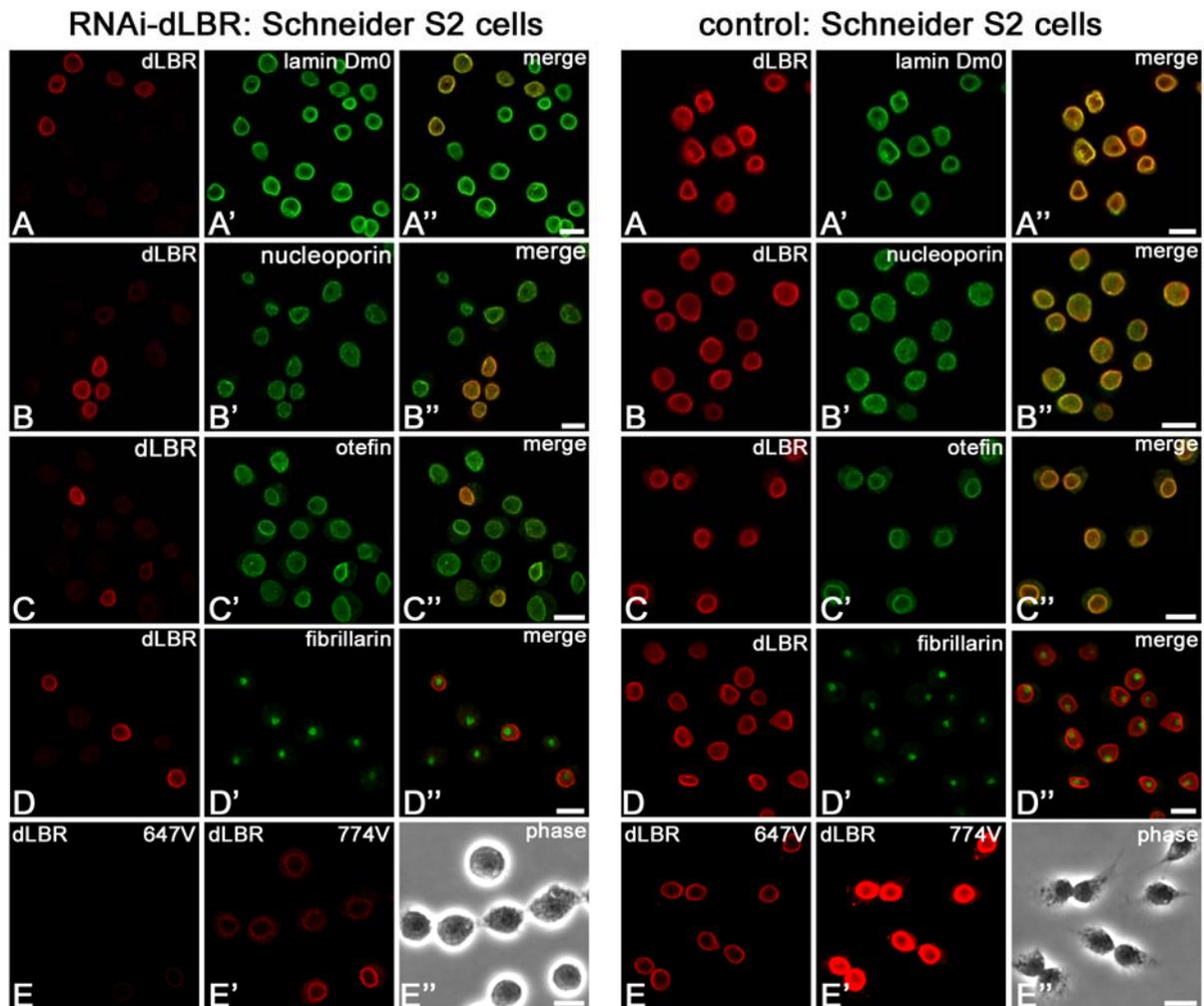


Abb. 38: Reduktion des dLBR in Drosophila Schneider S2 Zellen durch RNA Interferenz (RNAi)  
 Drosophila Schneider S2 Kulturzellen wurden mit dsRNA, spezifisch für das dLBR kodierende Gen transfiziert (RNAi-LBR) oder mit dem identischen Volumen Kulturmedium inkubiert (control) und die Expression und Lokalisation der Proteine dLBR (A - E), Lamin Dm0 (A'), Nukleoporin (B'), Otefin (C') und Fibrillarlin (D') durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie 72 h nach der Transfektion analysiert.

Zur Demonstration der Reduktion der Intensität der Immunfluoreszenz wurden die Zellen mit einer Signalstärke von 647V (E) und 774V (E') aufgenommen.

A''-D'') Überlagerung der Abbildungen A+A' – D+D'

E'') Phasenkontrastaufnahmen der transfizierten Zellen und Kontrollzellen

Eichstriche: 10  $\mu$ m

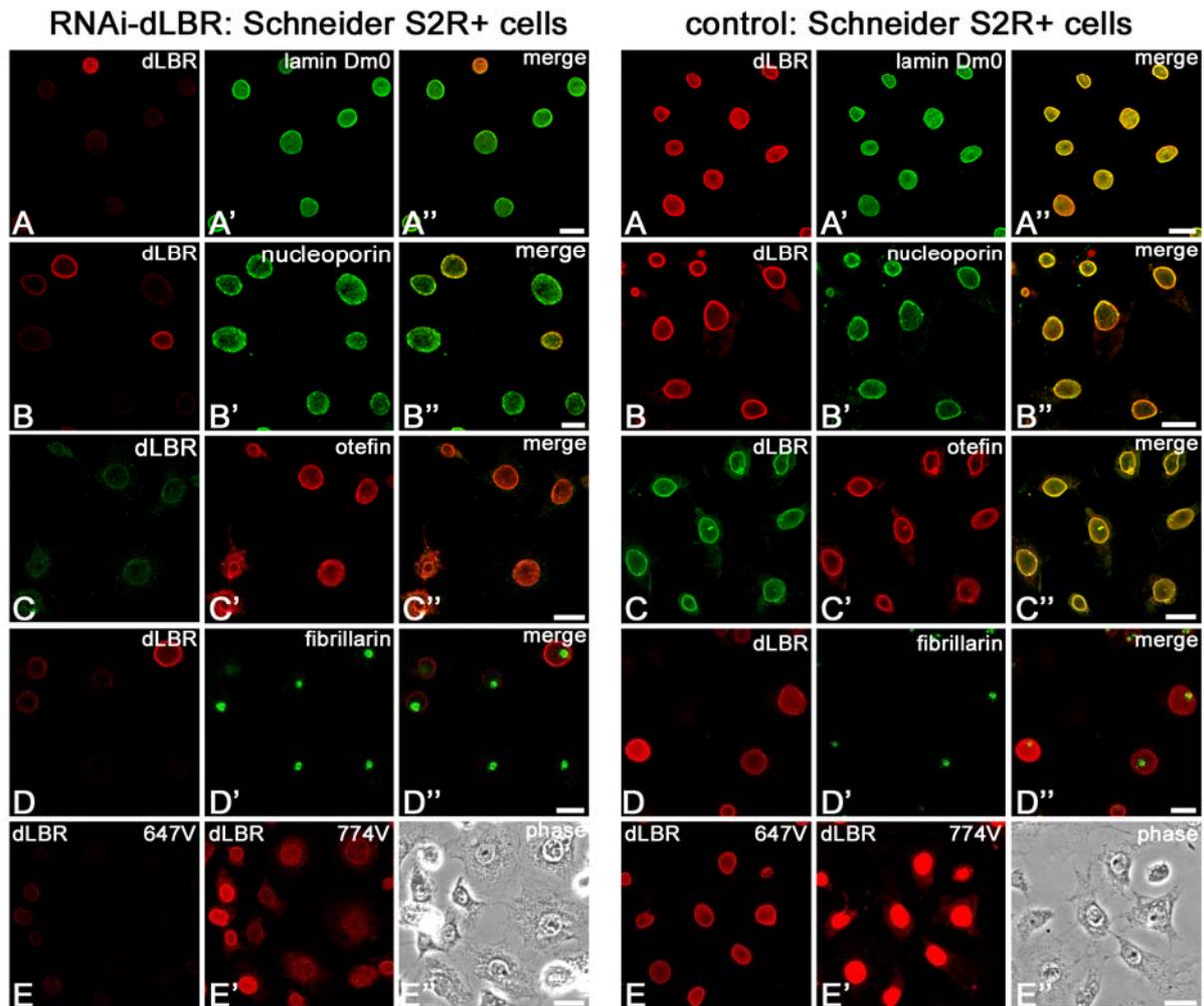


Abb. 39: Reduktion des dLBR in *Drosophila* Schneider S2R+ Zellen durch RNA Interference (RNAi) *Drosophila* Schneider S2R+ Kulturzellen wurden mit dsRNA, spezifisch für das dLBR kodierende Gen transfiziert (RNAi-LBR) oder mit dem identischen Volumen Kulturmedium inkubiert (control) und die Expression und Lokalisation der Proteine dLBR (A - E), Lamin Dm0 (A'), Nukleoporin (B'), Otefin (C') und Fibrillarin (D') durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie 72 h nach der Transfektion analysiert.

Zur Demonstration der Reduktion der Intensität der Immunfluoreszenz wurden die Zellen mit einer Signalstärke von 647V (E) und 774V (E') aufgenommen.

A''-D'') Überlagerung der Abbildungen A+A' – D+D'

E'') Phasenkontrastaufnahmen der transfizierten Zellen und Kontrollzellen

Eichstriche: 20  $\mu$ m

Identische Resultate wurden auch in den mit dLBR dsRNA transfizierten Kc167 Zellen erzielt. In dieser differenzierten Zelllinie wurde neben der Expression und Lokalisation des Lamin Dm0 auch die Verteilung des Lamin C untersucht. Wie auch in den analysierten Schneider Zelllinien hat die Reduktion der Expression des dLBR keinen Einfluss auf die Verteilung des endogenen Lamin Dm0 (Abb. 40 A') sowie des ausschließlich in Kc167 Zellen exprimierten Lamin C (Abb. 40 B'). Auch die Verteilung der Kernporenkomplexe (Abb. 40 C') und die Verteilung des membranassoziierten Otefin (Abb. 40 D') und des Fibrillarin (Abb. 40 E') wird durch die fast vollständige Depletion des dLBR nicht beeinflusst.

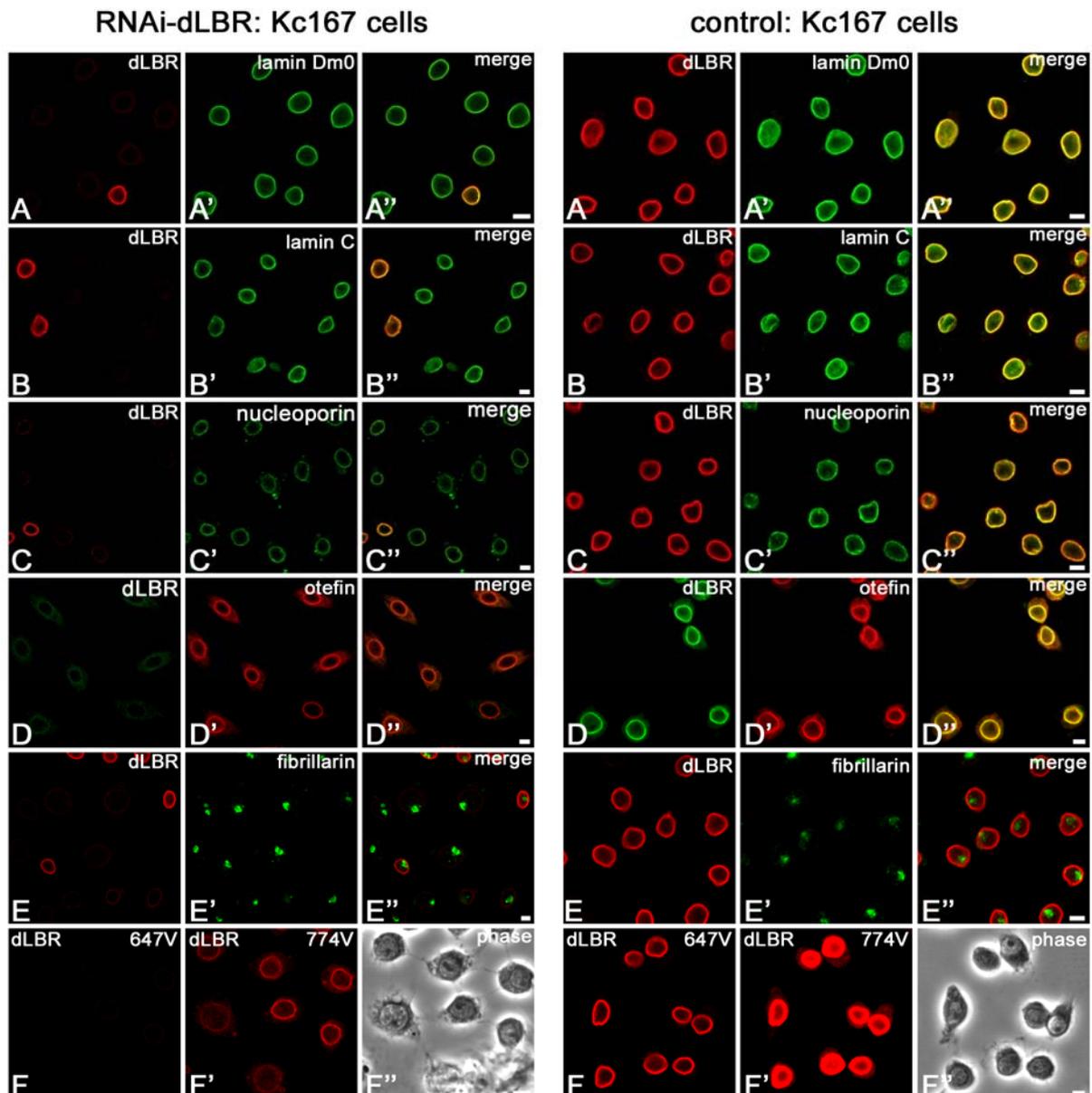


Abb. 40: Reduktion des dLBR in *Drosophila* Kc167 Zellen durch RNA Interference (RNAi)  
*Drosophila* Kc167 Kulturzellen wurden mit dsRNA, spezifisch für das dLBR kodierende Gen transfiziert (RNAi-LBR) oder mit dem identischen Volumen Kulturmedium inkubiert (control) und die Expression und Lokalisation der Proteine dLBR (A - F), Lamin Dm0 (A'), Lamin C (B'), Nukleoporin (C'), Otefin (D') und Fibrillarin (E') durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie 72 h nach der Transfektion analysiert.

Zur Demonstration der Reduktion der Intensität der Immunfluoreszenz wurden die Zellen mit einer Signalstärke von 647V (F) und 774V (F') aufgenommen.

A''-E'') Überlagerung der Abbildungen A+A' – E+E'

F'') Phasenkontrastaufnahmen der transfizierten Zellen und Kontrollzellen

Eichstriche: 10  $\mu$ m

Die Reduktion der Expression des dLBR durch RNAi in den untersuchten Kulturzelllinien scheint keinen Einfluss auf die Verteilung und Retention des Lamin Dm0 in der Kernlamina zu haben. Neben dem ubiquitär exprimierten dLBR konnte auch das membranassoziierte Protein Otefin als direkter Bindungspartner des Lamin Dm0 identifiziert werden (Goldberg et al., 1998). Die Assoziation des Lamin Dm0 mit Otefin in den dLBR depletierten Kulturzellen könnte für die Retention des Lamin Dm0 in der Lamina ausreichend sein.

Um den Einfluss der Depletion beider Proteine auf die Lokalisation des Lamin Dm0 zu analysieren, wurde die Expression des endogenen dLBR und Otefin in Schneider S2 Zellen durch RNAi reduziert (Abb. 41). Die Zellen wurden mit den für beide Proteine spezifischen doppelsträngigen RNAs transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurde die Expression und Lokalisation der beiden durch RNAi depletierten Proteine sowie die Lokalisation des Lamin Dm0 und der Kernporen in den transfizierten Zellen (Abb. 41 RNAi dLBR/otefin) und Kontrollzellen (Abb. 41 control) durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert.

Überraschenderweise können in den Ansätzen der transfizierten Kulturzellen nur Zellen detektiert werden, die eine gleichmäßige Reduktion beider Proteine dLBR und Otefin aufweisen oder Zellen, deren Expression durch die Transfektion nicht beeinflusst wird (Abb. 41 A, A'). Die parallele Reduktion des dLBR und des Otefin hat keinen Einfluss auf die Expression und Lokalisation des Lamin Dm0 (Abb. 41 B'); die Verteilung der Kernporen wird ebenfalls nicht beeinträchtigt (Abb. 41 C'). Die gleichzeitige Reduktion der Proteine dLBR und Otefin scheint somit keinen Einfluss auf die korrekte Lokalisation des Lamin Dm0 in der Kernlamina in den untersuchten Kulturzellen zu haben.

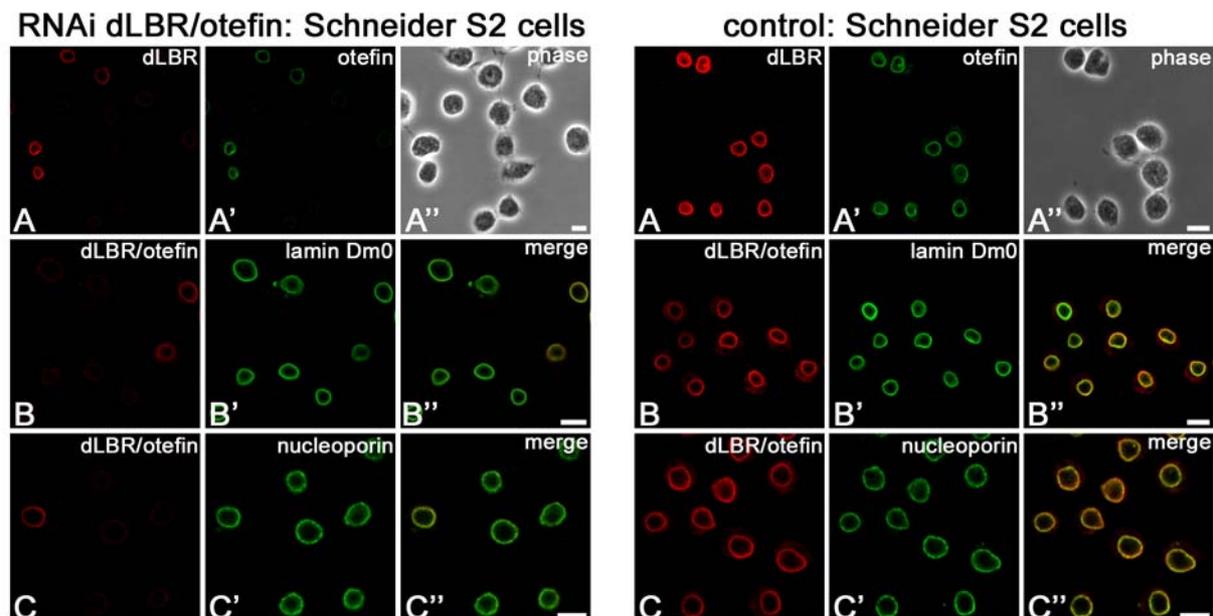


Abb. 41: Reduktion des dLBR und Otefin in Drosophila Schneider S2 Zellen durch RNA Interference (RNAi)

Drosophila Schneider S2 Kulturzellen wurden mit dsRNA, spezifisch für die dLBR und Otefin kodierenden Gene transfiziert (RNAi LBR/otefin) oder mit dem identischen Volumen Kulturmedium inkubiert (control) und die Expression und Lokalisation der Proteine dLBR (A, B, C), Otefin (A', B, C)

Lamin Dm0 (B') und Nukleoporin (C') durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie 72 h nach der Transfektion analysiert.

A'') Phasenkontrastaufnahmen der transfizierten Zellen und Kontrollzellen

B''-C'') Überlagerung der Abbildungen B+B' – C+C'

Eichstriche: 10 µm

### **III.1.10.3 Einfluss der Reduktion des Lamin Dm0 und Lamin C durch RNAi auf die Expression und Lokalisation der Proteine dLBR, Otefin und Nukleoporin**

Wie schon erwähnt, resultiert die Reduktion der Expression von Kernlaminen in Säugerzellen, *C. elegans* und *D. melanogaster* in vielfältigen Veränderungen, einschließlich der Veränderung der Morphologie des Zellkerns, Störungen der postmitotischen Reorganisation des Zellkerns, der Verteilung der Porenkomplexe, der räumlichen Anordnung sowie Funktion des Chromatins, der Interaktion mit Transkriptionsfaktoren, der Transkription, DNA Replikation, sowie der Veränderung der Lokalisation von Kernmembranproteinen (Lenz-Böhme et al., 1997; Spann et al., 1997; Sullivan et al., 1999; Lee et al., 2000; Liu et al., 2000; Lopez-Soler et al., 2001; Spann et al., 2002).

Um zu untersuchen, ob die Expression und korrekte Lokalisation der Kernlamine Lamin Dm0 und Lamin C für die Verteilung und Retention der Membranproteine dLBR und Otefin in der inneren Kernmembran notwendig ist, wurden in Zusammenarbeit mit Johannes Schmitt die *Drosophila* Zelllinien Schneider S2 und Schneider S2R+ mit Lamin Dm0 dsRNA sowie die Zelllinie Kc167 mit Lamin Dm0 dsRNA oder Lamin C dsRNA transfiziert.

Zur Quantifizierung der Reduktion der Expression des Lamin Dm0 und Lamin C wurden, repräsentativ für alle mit Lamin Dm0 dsRNA transfizierten Zelllinien, proportionale Mengen von transfizierten Zellen (Abb. 42 A, B Spur 2) und Kontrollzellen (Abb. 42 A, B Spur 1) der *Drosophila* Kc167 Zellen nach 72 h im Immunblot analysiert.

In den mit Lamin Dm0 dsRNA transfizierten Ansätzen kann eine starke Reduktion des endogenen Lamin Dm0 nachgewiesen werden (Abb. 42 A, Spur 2), während die Expression des zur Kontrolle analysierten Lamin C (Abb. 42 A', Spur 2) und dLBR (Abb. 42 A'', Spur 2) nicht beeinflusst wird. Ebenso kann eine starke Reduktion der Expression des Lamin C in den mit Lamin C dsRNA transfizierten Kc167 Zellen beobachtet werden (Abb. 42 B, Spur 2), die Expression des zur Kontrolle untersuchten Lamin Dm0 (Abb. 42 B', Spur 2) und dLBR (Abb. 42 B'', Spur 2) wird jedoch nicht beeinflusst.

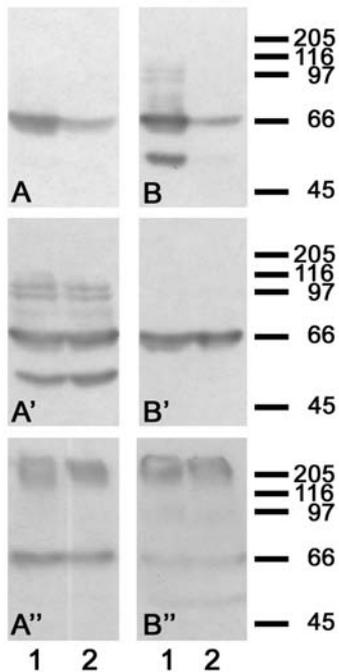


Abb. 42: Reduktion des Lamin Dm0 und Lamin C in Drosophila Kc167 Zellen durch RNA Interference (RNAi)

Drosophila Kc167 Kulturzellen wurden mit dsRNA, spezifisch für die Lamin Dm0 (A - A'') und Lamin C (B - B'') kodierenden Gene transfiziert (Spur 2) oder mit dem identischen Volumen Kulturmedium inkubiert (Spur 1). Nach 72 h wurden proportionale Mengen des Gesamtproteins (125.000 Zellen) der transfizierten Zellen und Kontrollzellen durch 10% SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und im Immunblot mit Antikörpern gegen Lamin Dm0 (A, B'), Lamin C (A', B) und dLBR (A'', B'') inkubiert.

Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts sind in kD angegeben.

Um den Einfluss der Depletion der Lamine auf die Expression und Lokalisation des dLBR und des Otefin sowie auf die Verteilung der Kernporen zu untersuchen, wurden die mit Lamin Dm0 dsRNA und Lamin C dsRNA transfizierten Zellen und Kontrollzellen 72 h nach der Transfektion fixiert und die Expression und Lokalisation der Lamine sowie der Proteine dLBR, Otefin und Nukleoporin durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert.

Die Depletion des Lamin Dm0 in den untersuchten Kulturzelllinien Schneider S2 (Abb. 43), Schneider S2R+ (Abb. 44) und Kc167 (Abb. 45) resultiert in einer veränderten Morphologie der Zelle. Das Lamin Dm0, welches in den Kontrollzellen eine gleichmäßige Lokalisation in der Kernperipherie aufweist (Abb. 43 - 45 E), kann in den transfizierten Zellen aller drei Zelllinien oft in großen Aggregaten oder in kleineren punkt- oder sichelförmigen Strukturen nachgewiesen werden, die sich an einer Seite des Zellkerns ausbilden (Abb. 43 - 45 A - D). Auch die Verteilung der Kernporenkomplexproteine wird durch die Reduktion und Umverteilung des Lamin Dm0 stark beeinflusst. Die Detektion des Nukleoporin mit dem spezifischen Antikörper mAb414 zeigt eine unregelmäßige Färbung der Kernperipherie, was auf die Aggregation der Kernporen zurückzuführen ist (Abb. 43 - 45 F'). Die Aggregation der Kernporen ist in den größeren Kc167 und S2R+ Zellen wesentlich besser sichtbar als in den kleineren S2 Zellen (Abb. 44 - 45 F'). Während in vielen Zellen in bestimmten Regionen der Kernhülle die Kernporen aggregieren, können auch Regionen beobachtet werden, die keine Kernporen mehr aufweisen (Abb. 43 - 45 F'). Dieser Phänotyp konnte ebenfalls in Fliegenstämmen beobachtet werden, die eine P-Element Insertion im für Lamin Dm0 kodierenden Gen aufweisen. In den untersuchten Zellen konnte, wie auch in den von mir depletierten Kulturzellen, eine ungleichmäßige Verteilung des Lamin Dm0 und Aggregation der Kernporen beobachtet werden (Lenz-Böhme et al., 1997). Auch in *C. elegans*,

Säugerzellen und Fribroblasten von Lmna knock out Mäusen resultiert die Reduktion der endogenen Lamine oder Mutationen in den kodierenden Genen in dieser auffälligen Aggregation der Kernporenkomplexe.

Im Unterschied zur unregelmäßigen Verteilung der Kernporen und des Lamin Dm0, weisen die meisten transfizierten Schneider S2 Zellen eine homogene Färbung der Kernperipherie durch die Antiseren LBR/gI+II auf (Abb. 43 A', B', C', D'), wie sie auch in den Kontrollzellen zu erkennen ist (Abb. 43 E'). In einigen Zellen ist eine Kolo-kalisation des dLBR mit punktförmigen, größeren Aggregaten des Lamin Dm0 in der Kernperipherie zu beobachten (Abb. 43 B', C'), in vereinzelt Zellen ist eine schwache cytoplasmatische Färbung zu erkennen (Abb. 43 D').

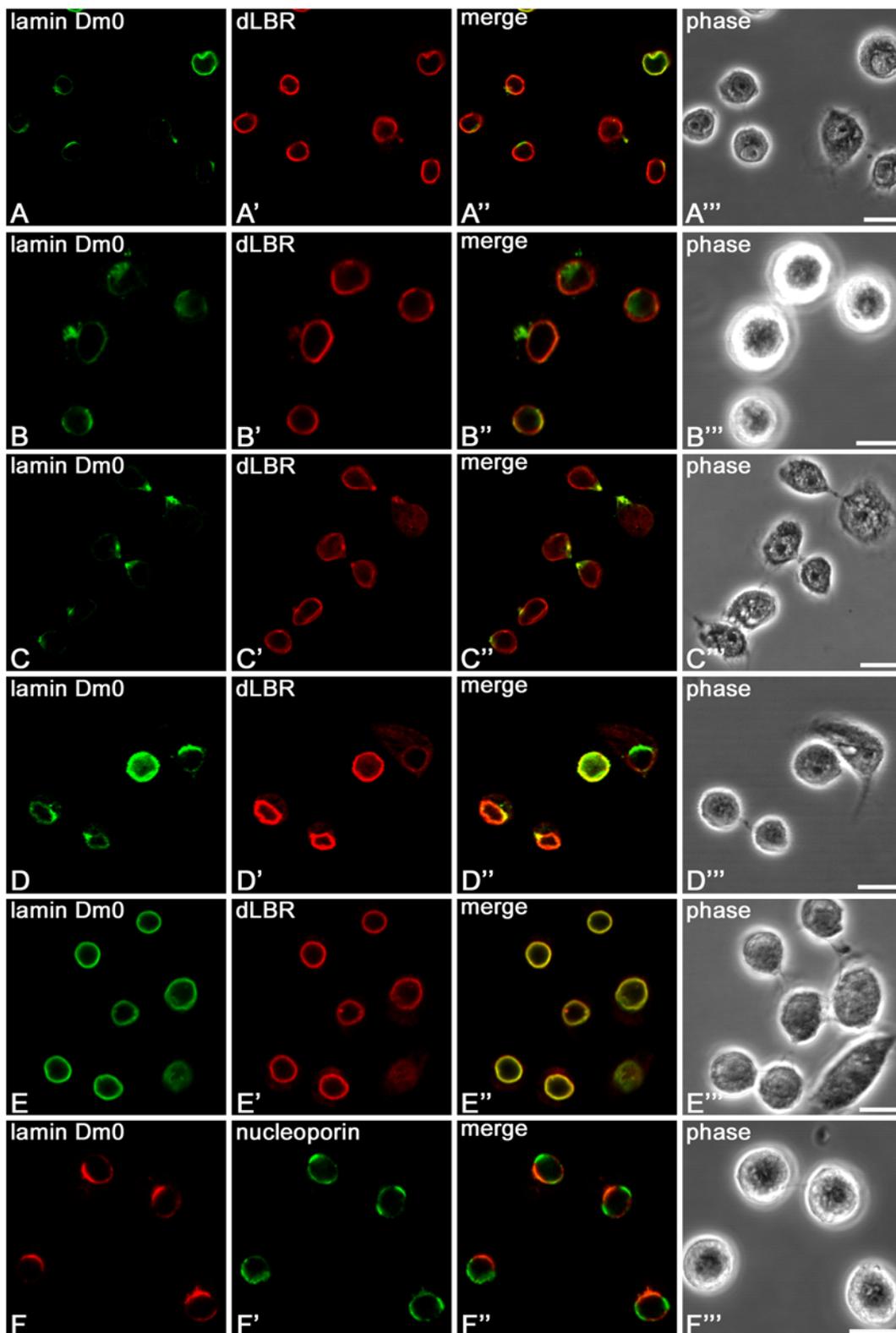


Abb. 43: Reduktion des Lamin Dm0 in Drosophila Schneider S2 Zellen durch RNA Interferenz (RNAi)  
 Drosophila Schneider S2 Kulturzellen wurden mit dsRNA, spezifisch für das Lamin Dm0 kodierende Gen transfiziert (A - D, F) oder mit dem identischen Volumen Kulturmedium inkubiert (E) und die Expression und Lokalisation der Proteine Lamin Dm0 (A - F), dLBR (A' - E') und Nukleoporin (F') durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie 72 h nach der Transfektion analysiert.

A''- F'') Überlagerung der Abbildungen A+A' – F+F'

A'''- F''') Phasenkontrastaufnahmen; Eichstriche: 10 µm

Während ein nur sehr geringer Einfluss der Depletion des Lamin Dm0 auf die Lokalisation des dLBR in der inneren Kernmembran in den Schneider S2 Zellen zu beobachten ist, scheint die Verteilung des dLBR und auch des Otefin in den wesentlich größeren Kc167 und Schneider S2R+ Zellen durch die Reduktion und unregelmäßige Verteilung des Lamin Dm0 nachweislich stärker beeinflusst zu werden (Abb. 44 - 45 dLBR A' - D'; Otefin G'). In den transfizierten Kc167 Zellen ist in vielen Zellen eine deutliche Kollokalisierung des dLBR und des Otefin in den punktförmigen Aggregaten des Lamin Dm0 zu beobachten (Abb. 44 dLBR: A', B', C'; Otefin: G'), die beiden Membranproteine scheinen in einigen Zellen nicht mehr ausreichend in der inneren Kernmembran zurückgehalten zu werden und sind ebenfalls in den Zellkern-angrenzenden Strukturen lokalisiert (Abb. 44 dLBR: D'; Otefin: G'), was auf eine Diffusion des dLBR und Otefin in das Endoplasmatische Retikulum hinweist.

In den Kernhüllen der analysierten transfizierten S2R+ Zellen ist ebenfalls eine deutliche Aggregation des dLBR nachzuweisen (Abb. 45 B', C', D').

Während in Zellen, die eine fast vollständige Depletion des Lamin Dm0 aufweisen, die Verteilung des dLBR jedoch noch sehr homogen erscheint (Abb. 45 A'), scheint die Verteilung des Otefin wesentlich stärker beeinträchtigt zu sein (Abb. 44 - 45 G').

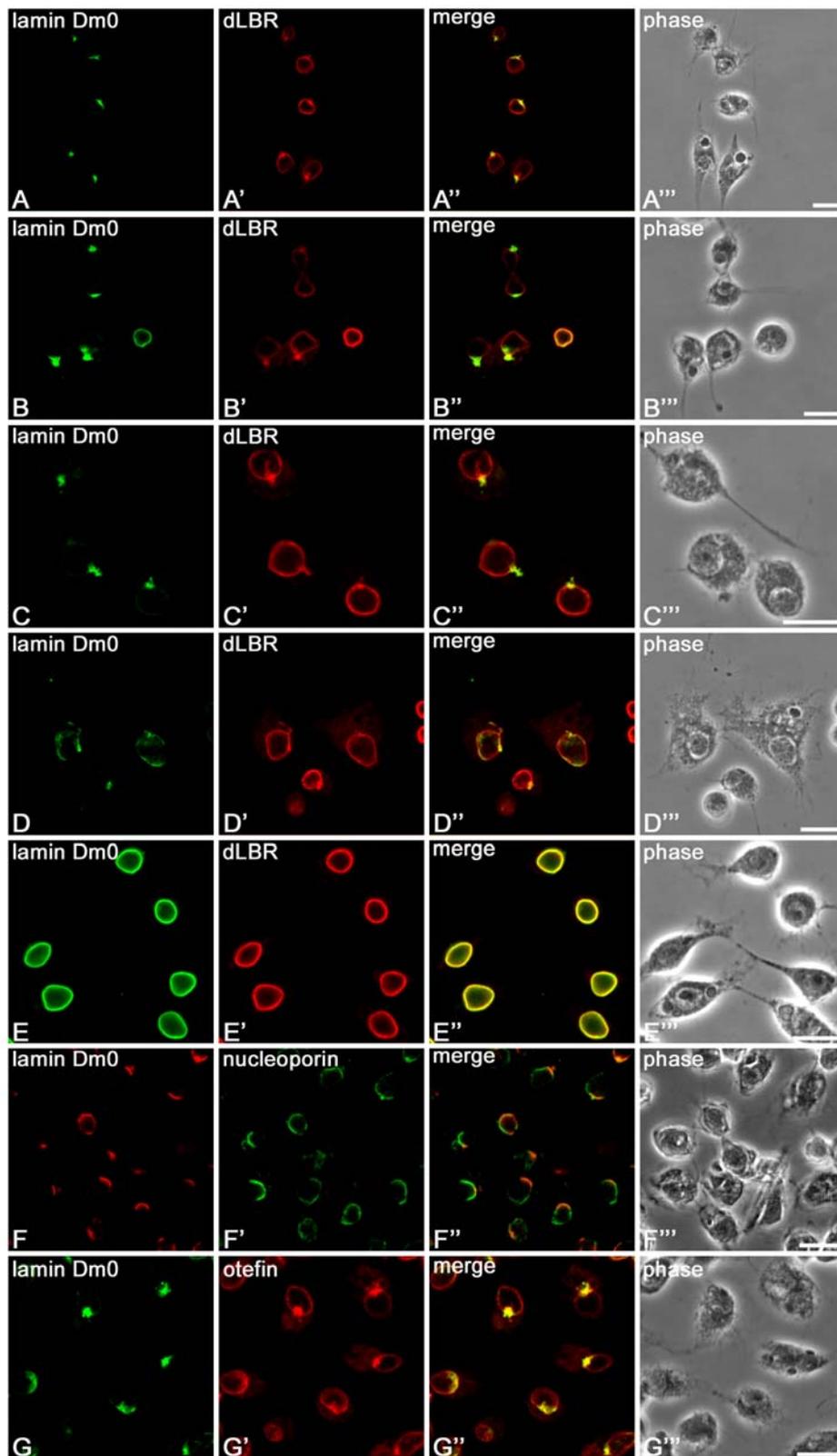


Abb. 44: Reduktion des Lamin Dm0 in *Drosophila* Kc167 Zellen durch RNA Interference (RNAi)  
*Drosophila* Kc167 Kulturzellen wurden mit dsRNA, spezifisch für das Lamin Dm0 kodierende Gen transfiziert (A - D, F, G) oder mit dem identischen Volumen Kulturmedium inkubiert (E) und die Expression und Lokalisation der Proteine Lamin Dm0 (A - F), dLBR (A' - E'), Nucleoporin (F') und Otefin (G') durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie 72 h nach der Transfektion analysiert.

A''- G'') Überlagerung der Abbildungen A+A' – G+G'

A'''- G''') Phasenkontrastaufnahmen; Eichstriche: 10  $\mu$ m

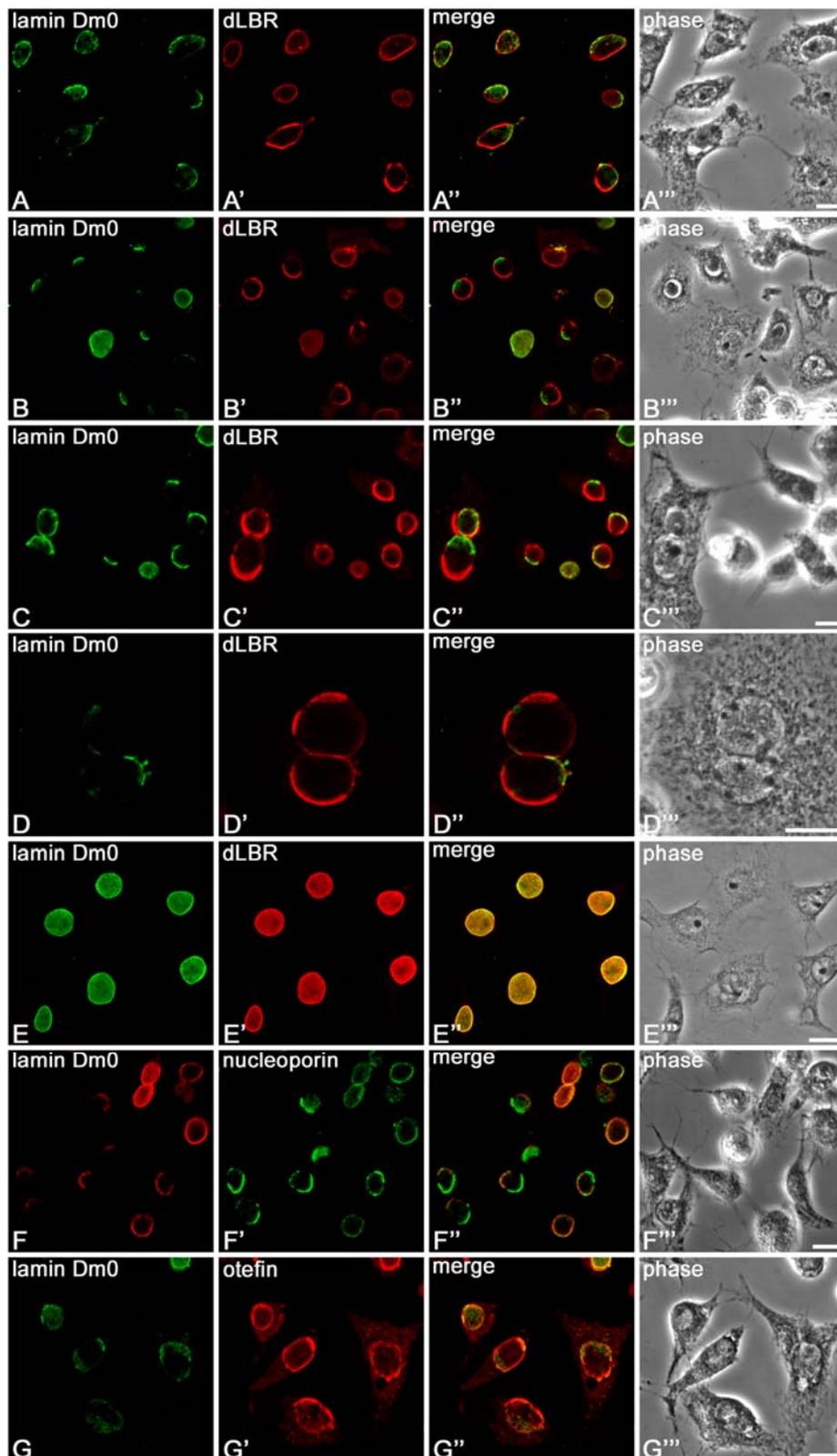


Abb. 45: Reduktion des Lamin Dm0 in Drosophila Schneider S2R+ Zellen durch RNA Interferenz (RNAi)  
 Drosophila Schneider S2R+ Kulturzellen wurden mit dsRNA, spezifisch für das Lamin Dm0 kodierende Gen transfiziert (A - D, F, G) oder mit dem identischen Volumen Kulturmedium inkubiert (E) und die Expression und Lokalisation der Proteine Lamin Dm0 (A - G), dLBR (A' - E'), Nukleoporin (F') und Otefin (G') durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie 72 h nach der Transfektion analysiert.

A''- G'' ) Überlagerung der Abbildungen A+A' – G+G'

A'''- G''') Phasenkontrastaufnahmen; Eichstriche: 20 µm

Die Reduktion der Expression des Lamin C in Kc167 Zellen (Abb. 46, A - D) durch RNAi hat keinen sichtbaren Einfluss auf die Morphologie der Zellen oder die Lokalisation der Kernmembranproteine dLBR (Abb. 46 A', B') und Otefin (Abb. 46 D') sowie auf die Expression und Verteilung des endogenen Lamin Dm0 (Abb. 46 B, C, D). Die Verteilung der Kernporenkomplexe wird ebenfalls nicht beeinflusst (Abb. 46 C').

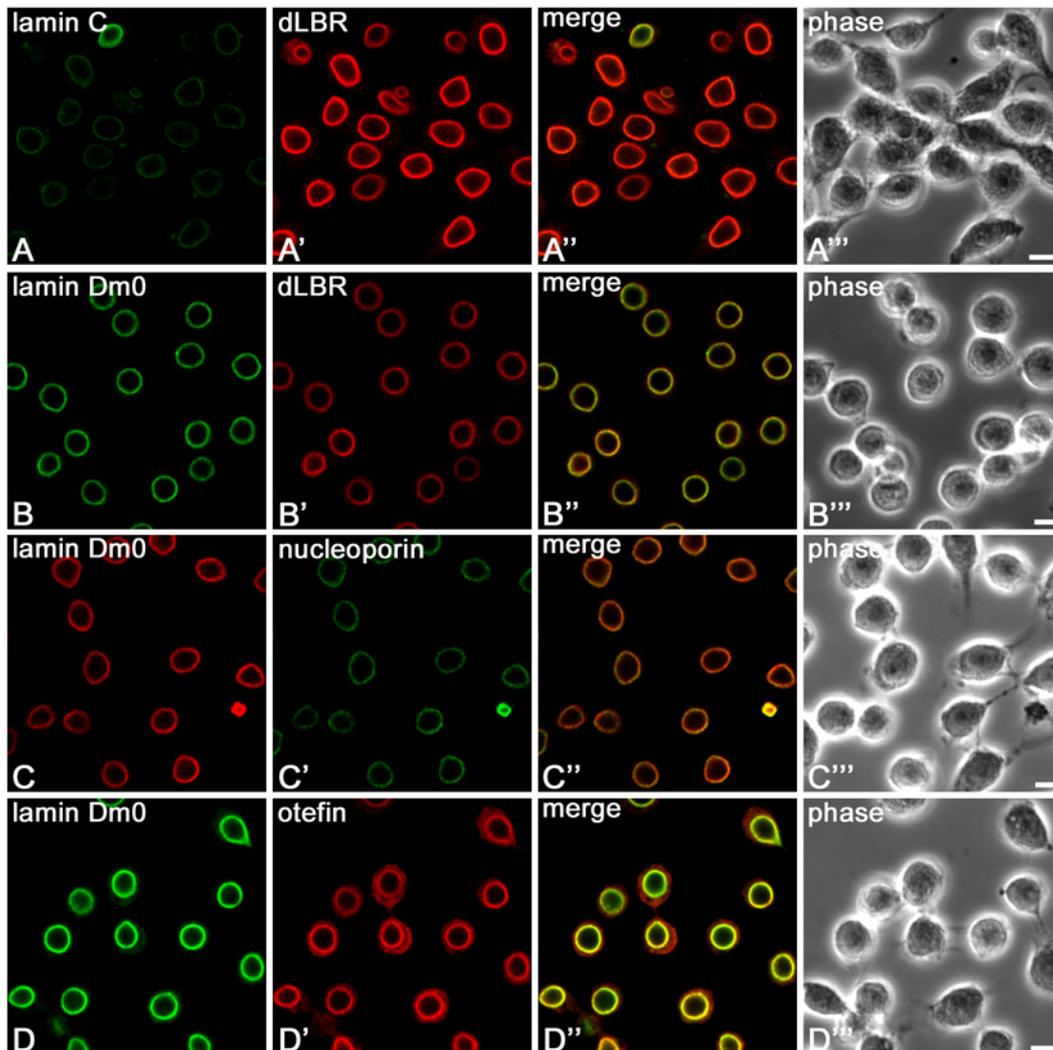


Abb. 46: Reduktion des Lamin C in *Drosophila* Kc167 Zellen durch RNA Interference (RNAi)

*Drosophila* Kc167 Kulturzellen wurden mit dsRNA, spezifisch für das Lamin C kodierende Gen transfiziert (A – D) und die Expression und Lokalisation des Lamin C (A) des Lamin Dm0 (B, C, D) sowie des dLBR (A', B'), Nukleoporin (C') und Otefin (D') durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie 72 h nach der Transfektion analysiert.

A''- D'' ) Überlagerung der Abbildungen A+A' – D+D'

A'''- D''') Phasenkontrastaufnahmen

Eichstriche: 10 µm

Während die Reduktion der Expression des Lamin C keinen Einfluss auf die Verteilung des dLBR in den untersuchten Kulturzellen zu haben scheint, lässt sich eine deutliche Beeinträchtigung der Verteilung der Kernmembranproteine dLBR und Otefin in Lamin Dm0 depletierten Kulturzellen nachweisen. In Kc167 und Schneider S2R+ Zellen konnte trotz fast

vollständiger Depletion in vielen Zellen jedoch immer noch eine homogene Verteilung des dLBR nachgewiesen werden, während die Lokalisation des Otefin stärker beeinträchtigt zu werden scheint. In einigen Zellen konnte eine deutliche Diffusion der beiden Proteine in das Endoplasmatische Retikulum beobachtet werden, was auf eine Retention der beiden Proteine durch das Lamin Dm0 hinweist. Die Interaktion der beiden Kernmembranproteine mit Lamin Dm0 scheint jedoch nicht in allen untersuchten Zellen essentiell für die Lokalisation und Retention der beiden Membranproteine in der inneren Kernmembran zu sein; die noch sehr homogene Verteilung des dLBR in den mit Lamin Dm0 dsRNA transfizierten Zellen weist auf die Interaktion mit weiteren Komponenten des Nukleus hin, die an der Retention des dLBR beteiligt sind. Die direkte und indirekte Interaktion des dLBR mit peripherem Chromatin scheint ebenfalls für die korrekte Lokalisation in der inneren Kernmembran sehr wichtig zu sein.

In keiner der mit Lamin Dm0 oder Lamin C dsRNA transfizierten Zelllinien konnten Anzeichen der Apoptose festgestellt werden. Während die Depletion des endogenen Lamin B1 und B2 durch RNAi in Säugerzellen und *C. elegans* in der Apoptose der Zellen resultiert (Harborth et al., 2001; Cohen et al., 2002), konnten in den von mir und Johannes Schmitt untersuchten Zelllinien von *Drosophila melanogaster* keine Anzeichen dafür entdeckt werden, dass die mit Dm0 oder Lamin C dsRNA transfizierten Kulturzellen den programmierten Zelltod durchführten.

#### **III.1.10.4 Reduktion des dLBR und der beiden Kernlamine (Lamin Dm0, Lamin C) in der Embryogenese von *Drosophila melanogaster* durch RNAi**

Für einige Proteine einschließlich A-Typ Lamine und dem integralen Kernmembranprotein Emerin, welches in Säugerzellen ebenfalls mit B-Typ Laminen assoziiert ist, konnte gezeigt werden, dass deren Expression in Kulturzellen nicht essentiell zu sein scheint (Harborth et al., 2001), deren Expression und korrekte Lokalisation im Organismus jedoch unentbehrlich ist (Worman und Courvalin, 2002; Gruenbaum et al., 2003). Um zu untersuchen, ob die Expression des dLBR in dem sich entwickelnden Embryo von *Drosophila melanogaster* essentiell ist, wurde der dLBR in der Embryogenese durch Mikroinjektion von dLBR dsRNA depletiert. Der Einfluss der Depletion der Kernlamine Lamin Dm0 sowie des ab dem 12. Embryonalstadium exprimierten Lamin C auf die Lokalisation des dLBR im sich entwickelnden Embryo wurde ebenfalls durch Mikroinjektion spezifischer dsRNAs untersucht. Die Mikroinjektion wurde an 30 - 60 min alten Embryonen (2. Entwicklungsstadium; Einteilung der embryonalen Entwicklung in 17 Stadien nach Volker Hartenstein und José Campus-Ortega) durchgeführt.

Die effektive Reduktion der Expression der zu analysierenden Gene durch RNAi im sich entwickelnden Embryo durch RNAi erfordert die Injektion von ~ 0,2 fMol der dsRNA in den sich entwickelnden Embryo innerhalb der ersten 4 - 5 Embryonalstadien. Das Volumen des

Embryos beträgt ~ 7,3 nl, die intrazelluläre Konzentration der dsRNA beträgt somit ca. ~ 25 nM (Tuschl et al., 1999).

Die sich entwickelnden Embryonen wurden 24 h und 48 h nach der Mikroinjektion für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie präpariert und mit polyklonalen und monoklonalen Antikörpern gegen dLBR (LBR/gI+II), Lamin Dm0 (ADL84, ADL195) und Lamin C (LC28) inkubiert oder für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung vorbereitet.

Die Embryonen, in denen die Expression des dLBR durch RNAi reduziert wurde, zeigen keine Veränderungen bezüglich der Morphologie der Embryonen und Dauer der Embryogenese verglichen mit nicht-injizierten Kontroll-Embryonen (Abb. 47 Tabelle).

Die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigen, dass in allen analysierten Embryonen des 12. Embryonalstadiums (Abb. 48 A) und in den meisten der Embryonen des 17. Embryonalstadiums sowie des 1. Larvalstadiums (Abb. 48 B) keine oder nur eine sehr schwache Antikörperfärbung im Vergleich zu Kontroll-Embryonen des 17. Embryonalstadiums (Abb. 48 C) beobachtet werden kann. Eine Färbung der Kernhülle durch die Antiseren LBR/gI+gII wird erst bei einer Verstärkung der fluoreszenzmikroskopischen Signale über 760 Volt sichtbar (Abb. 48 D'), die Expression des dLBR ist bei der Verstärkung der Signale mit 647 Volt, bei der die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Kontroll-Embryonen durchgeführt wurden (Abb. 48 E, Aufnahme mit 760 Volt: E'), nicht sichtbar (Abb. 48 D). Nach 48 Stunden können in 6 von 20 analysierten Embryonen eine kleine Anzahl von Zellen detektiert werden, die eine mit den Zellen der Kontroll-Embryonen vergleichbare Immunfluoreszenz nach der Färbung mit den Antiseren LBR/gI+II aufweisen (Abb. 47 Tabelle), was darauf hindeutet, dass die Expression des dLBR nach diesem Zeitraum nicht mehr durch RNAi inhibiert wird.

Die Expression und Verteilung des Lamin Dm0 werden nicht durch die Depletion des dLBR beeinflusst (Abb. 48 A', B') und sind mit der Expression in den Kontroll-Embryonen vergleichbar (Abb. 48 C'). Sowohl in verschiedenen Kulturzelllinien, als auch im sich entwickelnden Embryo bis zum 1. Larvalstadium scheint die Depletion des dLBR die Expression und Lokalisation des Lamin Dm0 nicht zu beeinflussen.

Während sich die mit dLBR dsRNA injizierten Embryonen im Vergleich zu nicht injizierten Kontroll-Embryonen normal entwickeln, resultiert die Depletion des Lamin Dm0 durch Mikroinjektion von Lamin Dm0 dsRNA in einem Arrest der embryonalen Entwicklung im Embryonalstadium 10 (Abb. 47 Tabelle). Die immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen der Quetschpräparate der arretierten Embryonen zeigen, dass die Zellkerne im Vergleich zu Präparaten von Kontroll-Embryonen sehr fragil sind (Abb. 48 F - F''). Die Antikörperfärbung des Lamin Dm0 (Abb. 48 F) und des dLBR (Abb. 48 F') zeigen, dass die Kernhüllen der injizierten Tiere während der Präparation zerrissen wurden und das Chromatin aus den Zellkernen entweichen konnte (Abb. 48 F''). Die Analyse der mit Lamin Dm0 dsRNA injizierten Embryonen nach 48h und 72 Stunden zeigt identische Resultate. Die Embryonen entwickeln sich nach dem Arrest im 10. Embryonalstadium nicht weiter, auch nach 48 h und

72 h können nur in der Embryogenese arretierte Embryonen des 10. Embryonalstadiums detektiert werden.

Die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung dieser Embryonen zeigt die identischen morphologischen Veränderungen wie die mit Lamin Dm0 dsRNA transfizierten Kulturzellen auf (Abb. 49). Die Kernporenkomplexe zeigen keine gleichmäßige Verteilung, innerhalb der Kernhülle können sowohl Kernmembranbereiche, die frei von Kernporen sind, als auch Regionen, in denen die Kernporen akkumuliert vorliegen (Abb. 49 Pfeil), beobachtet werden. In den porenfreien Bereichen entstehen unregelmäßige Abstände zwischen der inneren und äußeren Kernmembran, die Kernhülle verformt sich in diesen Regionen (Abb. 49 Pfeilkopf).

Während die mit Lamin Dm0 dsRNA injizierten Embryonen im 10. Embryonalstadium arretieren, zeigen die mit Lamin C dsRNA injizierten Embryonen (Abb. 48 H, I) im Vergleich zu nicht injizierten Kontroll-Embryonen (Abb. 48 J) keine Verzögerung der embryonalen Entwicklung (Abb. 47 Tabelle). Die Expression und Verteilung des dLBR werden durch die Depletion des Lamin C nicht beeinflusst (Abb. 48 H'), die Zellkerne weisen eine intakte Kernhülle und eine normale Verteilung des Chromatins auf (Abb. 48 H''). Die Färbung der Kernhülle durch die monoklonalen, Lamin C spezifischen Antikörper wird erst bei einer Verstärkung der fluoreszenzmikroskopischen Signale über 650 Volt sichtbar (Abb. 48 I'), die Expression des Lamin C ist bei der Verstärkung der Signale mit 594 Volt, bei der die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Kontroll-Embryonen durchgeführt wurden (Abb. 48 J, Aufnahme mit 760 Volt: J'), nicht sichtbar (Abb. 48 I).

	Entwicklungsstadium	
	24 h	48 h
<b>Nicht injizierte Kontrollembryonen</b>	12.Embryonalstadium	1.Larvalstadium
<b>RNAi: dLBR</b>	12.Embryonalstadium	17.Embryonalstadium - 1.Larvalstadium
Antikörperfärbung: dLBR	(8) --	(14) -- (6) -/+
<b>RNAi: lamin Dm0</b>	10.Embryonalstadium	10.Embryonalstadium
Antikörperfärbung: lamin Dm0	(16) + fragile Zellkerne	(16) + fragile Zellkerne
<b>RNAi: lamin C</b>	12.Embryonalstadium	17.Embryonalstadium - 1.Larvalstadium
Antikörperfärbung: lamin C	(9) +	(12) +

Abb. 47: Reduktion des dLBR, Lamin Dm0 und Lamin C in Embryonen von *Drosophila melanogaster* durch RNA Interference (RNAi)

Embryonen des 2. Embryonalstadiums wurden mit dsRNA, spezifisch für die dLBR, Lamin Dm0 und Lamin C kodierenden Gene mikroinjiziert und die Entwicklung der nicht injizierten Kontrollembryonen sowie der mit dLBR dsRNA, Lamin Dm0 dsRNA und Lamin C dsRNA injizierten Tiere (RNAi)

statistisch ausgewertet. Anzahl der von den Tieren nach 24h und 48 h erreichten Entwicklungsstadien sowie die Anzahl der für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie präparierten Tiere und die Anzahl der positiv (+) oder negativen (--) Immunfluoreszenz (Färbung des dLBR, Lamin Dm0 und Lamin C mit spezifischen Antikörpern).

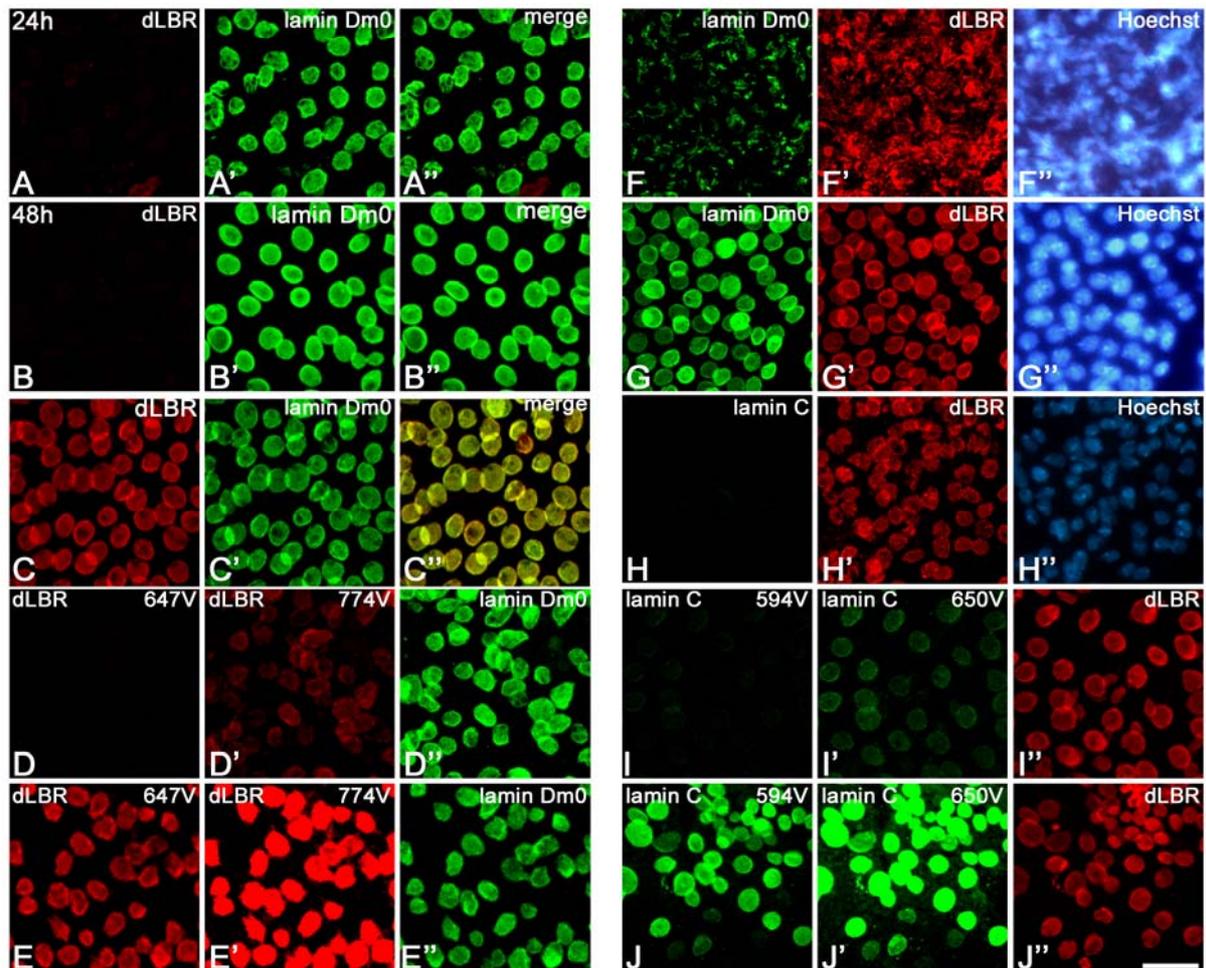


Abb. 48: Reduktion des dLBR, Lamin Dm0 und Lamin C in Embryonen von *Drosophila melanogaster* durch RNA Interferenz (RNAi)

Embryonen des 2. Embryonalstadiums wurden mit dsRNA, spezifisch für die dLBR (A, B, D), Lamin Dm0 (F) und Lamin C (H, I) kodierenden Gene mikroinjiziert und die Expression und Lokalisation des dLBR (A - E, D' - H', I'', J''), Lamin Dm0 (A' - C', D'', E'', F, G) und Lamin C (H - I, I', J') auf Quetschpräparaten von injizierten (A, B, D, F, H, I) und nicht injizierten Kontroll-Embryonen (C, E, G, J) 24h (A) und 48 h (B - J) nach der Mikroinjektion durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert.

Zur Demonstration der Reduktion der Intensität der Immunfluoreszenz wurden die Zellen mit einer Signalstärke von 647 Volt (D, E) und 774 Volt (D', E') sowie 594 Volt (I, J) und 650 Volt (I', J') aufgenommen.

A''- C'') Überlagerung der Abbildungen A+A' - C+C'

F''- H'') DNA-Färbung mit dem Fluorochrom Hoechst 33258

Eichstrich: 10 µm

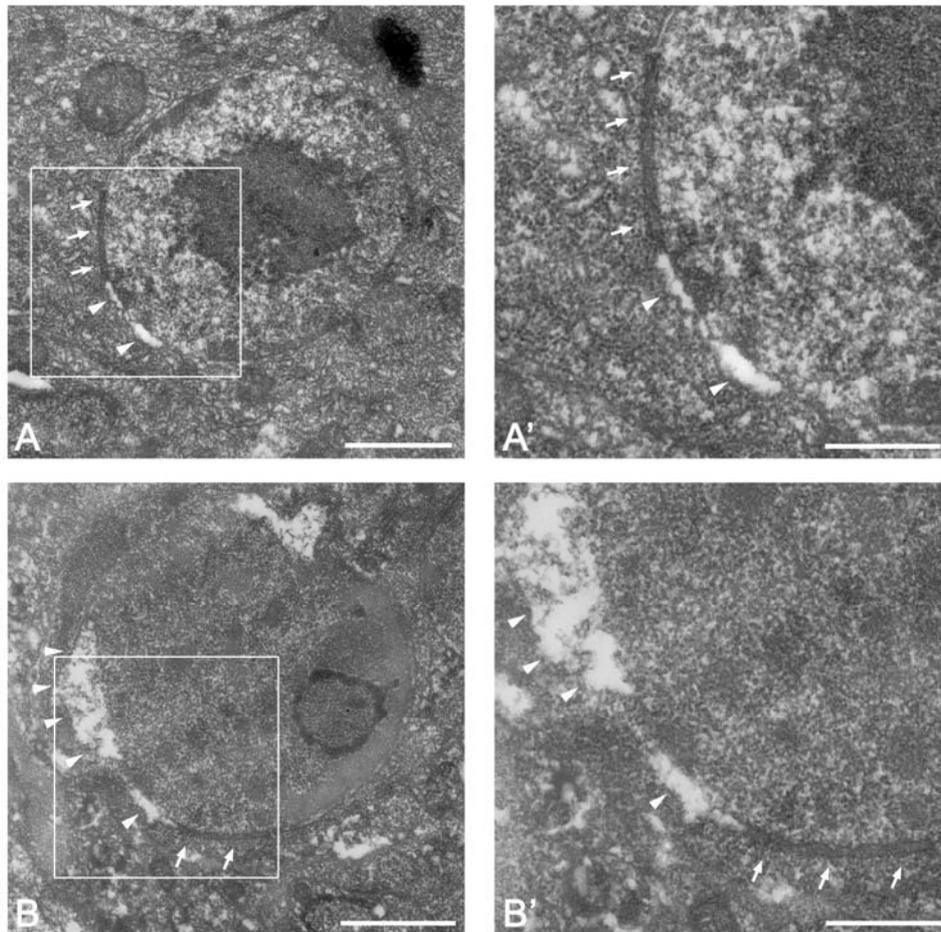


Abb. 49: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der mit Lamin Dm0 dsRNA mikroinjizierten, im 10. Embryonalstadium arretierten Embryonen.

- A, B) embryonale Zelle mit porenfreien Regionen der Kernmembran (Pfeilkopf) und akkumulierten Kernporenkomplexen (Pfeil);  
Eichstrich: 1,0  $\mu\text{m}$
- A', B') Vergrößerung des markierten Ausschnittes; embryonale Zelle mit porenfreien Regionen der Kernmembran (Pfeilkopf) und akkumulierten Kernporenkomplexen (Pfeil);  
Eichstrich: 0,5  $\mu\text{m}$

## III.2 Charakterisierung der beiden Isoformen des Bocksbeutel von *Drosophila melanogaster*

### III.2.1 Molekulare Charakterisierung der beiden Isoformen des Bocksbeutel von *Drosophila melanogaster*

Im Rahmen meiner Diplomarbeit führte ich eine erste Charakterisierung des von dem Gen CG9424 kodierten Proteins, welches ich als Bocksbeutel bezeichnete, durch. Dieses Protein wurde durch die Suche mit der publizierten Sequenz der LEM-Domänen der beiden Proteine MAN1 von *Caenorhabditis elegans* und LAP2 $\beta$  von *Danio rerio* (Accession Nummern: NP496944, CAC86206) nach Proteinen, die eine konservierte LEM-Domäne besitzen, in der Gendatenbank von *Drosophila melanogaster* (Flybase: <http://flybase.bio.indiana.edu/>) gefunden. Neben dem schon charakterisierten Otefin (Goldberg et al., 1998) wies die aminoterminal Region von 47 Aminosäuren von Bocksbeutel die höchste Ähnlichkeit mit der LEM-Domäne des ZLAP2 $\beta$  und des *C. elegans* MAN1 (10,6 % Identität) auf (Abb. 50).

Der Vergleich der LEM-Domänen von Bocksbeutel und Otefin zeigte eine auffallend hohe Ähnlichkeit (Aminosäuren 1-47 des Bocksbeutel: 53,2% Identität), während die sich an die 47 Aminosäuren anschließenden Regionen eine wesentlich geringere Ähnlichkeit aufwiesen (Aminosäuren 48-399 des Bocksbeutel: 17% Identität).

MAN1	1	---MVDVEKMSDAELRAELNVRGANVGPVTGT <b>TRSLYEK</b> KLKLLSG	44
ZLAP2	92	---DVDVTELSNEGLKDLLLKYGLNAGPIVAST <b>TRKVYEK</b> R <b>LQ</b> ----	131
CG9424	1	<b>MSDLSYLDTLGNKEL</b> LAKCLEHGLPGVPVTD <b>STRSVIIRRLKAKITG</b>	47
otefin	1	<b>MADVDDFDSL</b> SNAELRAKMLAQGLPNI <b>PVTDS</b> SRKVLV <b>KRLRASIGG</b>	47
		* * * * *	

Abb. 50: Sequenzvergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen der LEM-Domänen des *Caenorhabditis elegans* MAN1 (MAN1), *Danio rerio* LAP2 $\beta$  (ZLAP2), *Drosophila melanogaster* CG9424 (CG9424) und *Drosophila melanogaster* Otefin (otefin). Identische Aminosäuren zwischen zwei Spezies sind fett gedruckt; identische Aminosäuren zwischen allen vier Organismen sind fett gedruckt und mit einem Stern unterlegt. Die Zahlen geben die Positionen der ersten und letzten Aminosäure jeder Sequenz bezüglich der Position im gesamten Protein an.

Das den Bocksbeutel kodierende Gen CG9424 ist auf dem rechten Arm des 3. Chromosoms in der Region 85D27 lokalisiert. Die vorhergesagte Länge des Transkripts betrug 1251 bp, für das exprimierte Protein wurde eine Länge von 399 AS und eine molekulare Masse von 44.203 Dalton sowie ein Isoelektrischer Punkt von 9.25 vorhergesagt.

Die Analyse der Sekundärstruktur zeigte eine putative Transmembrandomäne am Carboxyterminus des von dem Gen CG9424 kodierten Proteins. Der Vergleich der Sequenzierung des EST-Klones LD45742 (Accession Nummer: AI513462; Celera Genetics; Invitrogen), der die gesamte cDNA des Gens CG9424 enthalten sollte, mit der in den Gendatenbanken publizierten Sequenz zeigte die Existenz eines zusätzlichen Splice-Donor und Splice-Akzeptor im carboxyterminalen Bereich des Gens CG9424 auf; die prozessierte, verkürzte Isoform der Länge von 351 Aminosäuren, die durch die cDNA des EST-Klones LD45742 kodiert wird, ist durch das Fehlen der carboxyterminalen Transmembrandomäne charakterisiert. Die Antikörper, die ich im Rahmen meiner Diplomarbeit herstellte, zeigten in *Drosophila Schneider S2* und in Ovariolen von *Drosophila melanogaster* eine unterschiedlich stark ausgeprägte Färbung der Kernperipherie sowie eine homogene, schwächere Färbung des Nukleoplasmas als auch des Cytoplasmas. Die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen standen jedoch im Gegensatz zu der Lokalisation des als GFP-Fusionsproteins exprimierten Bocksbeutel (Nukleotide 4-1056 der cDNA des EST-Klones LD45742), das in transfizierten *Xenopus A6* Zellen gleichmäßig im Zellkern unter Aussparung des Nukleolus sowie bei einer starken Expression auch im Cytoplasma zu beobachten war. Eine Anreicherung in der Kernperipherie war nicht zu beobachten. Die Amplifikation und Sequenzierung der verkürzten Sequenz aus einer cDNA, die aus embryonaler polyA<sup>+</sup>RNA synthetisiert worden war und die identischen Abweichungen zur publizierten Sequenz wie die cDNA des EST-Klones aufwies, bestätigen deren Existenz (Urban, 2001).

Die auffällige Diskrepanz zwischen der endogenen Lokalisation des Bocksbeutel in der indirekten Immunfluoreszenz und der Lokalisation des verkürzten GFP-Fusionsproteins führte zur Annahme, dass in *Drosophila melanogaster* eventuell zwei Isoformen des Gens CG9424 exprimiert werden.

Durch weitere molekularbiologische, biochemische und immuncytologische Untersuchungen sollte im Rahmen meiner Promotion eine eventuell vorhandene zweite Isoform, deren Sequenz der von Celera Genetics publizierten Sequenz entsprechen sollte, identifiziert und näher charakterisiert werden.

### **III.2.1.1 Identifizierung und molekulare Charakterisierung beider Bocksbeutel Isoformen**

Um die Existenz einer zweiten Isoform zu überprüfen, die sich von der im Rahmen meiner Diplomarbeit identifizierten verkürzten Isoform in der carboxyterminalen Region unterscheiden sollte, wurde eine cDNA Bibliothek aus poly(A)<sup>+</sup> mRNA, die aus Larven des 3. Larvalstadiums von *Drosophila melanogaster* extrahiert wurde, konstruiert. Mit 5' Primern und für die jeweilige potentielle Isoform spezifischen 3' Primern sollten spezifische Fragmente der kodierenden Regionen durch PCR amplifiziert werden. Sowohl mit den für die verkürzte Isoform, die ich als  $\beta$ -Isoform bezeichnen werde, spezifischen Primern, als auch

mit spezifischen Primern für die potentielle, längere Isoform des Bocksbeutel, die ich als  $\alpha$ -Isoform bezeichnen werde, konnten verschiedene, für die carboxyterminale Region kodierende Fragmente durch PCR amplifiziert werden (Abb. 51 A: Spur 2: PCR-Fragment der  $\beta$ -Isoform, Nukleotide 1-1053; Spur 3: PCR-Fragment der  $\alpha$ -Isoform, Nukleotide 261-1094; Spur 4: PCR-Fragment der  $\alpha$ -Isoform, Nukleotide 826-1094). Auch aus der genomischen DNA, die aus adulten Fliegen von *Drosophila melanogaster* isoliert wurde, konnte mit spezifischen Primern die kodierende Region der 1197 Nukleotide langen  $\alpha$ -Isoform isoliert werden (Abb. 51 B, Spur 4). Die 1053 Nukleotide lange  $\beta$ -Isoform wurde aus der konstruierten cDNA Bibliothek durch PCR amplifiziert (Abb. 51 B, Spur 2). Durch Sequenzierung wurden die Nukleotidsequenzen beider Isoformen ermittelt; die Nukleotidsequenz der  $\alpha$ -Isoform stimmte mit der von Celera Genetics publizierten Sequenz überein, die Nukleotidsequenz der  $\beta$ -Isoform entsprach der in meiner Diplomarbeit ermittelten Sequenz.

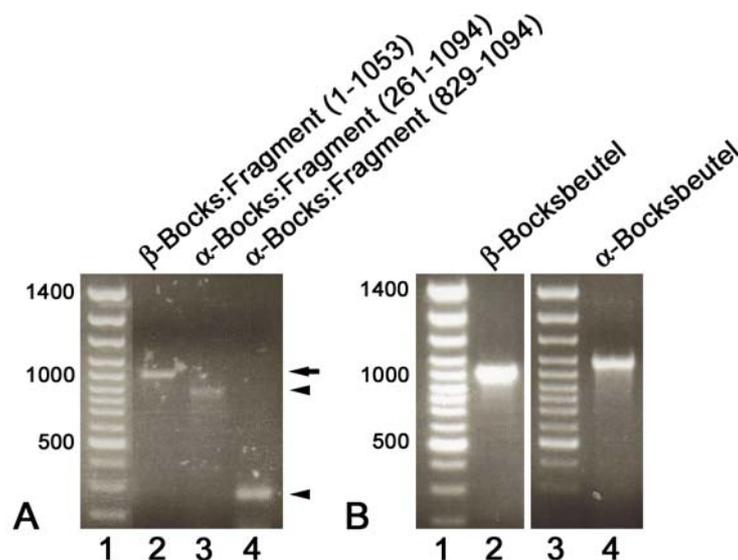


Abb. 51: Amplifizierung der gesamten kodierenden Regionen der Bocksbeutel  $\alpha$ - und  $\beta$ - Isoform (B) sowie verschiedener, für die Isoformen spezifischer DNA-Fragmente (A) durch PCR.

A) RT-PCR-Fragmente aus RNA-Präparationen larvalen Gesamtgewebes von *Drosophila melanogaster*. Die PCR wurde mit für die beiden Isoformen spezifischen Primer-Kombinationen (Bocksbeutel  $\beta$ -Isoform 1-1053, Spur 2; Bocksbeutel  $\alpha$ -Isoform 261-1094, Spur 3, 829-1094, Spur 4) durchgeführt.

B) PCR-Fragmente der gesamten kodierenden Regionen der Bocksbeutel  $\beta$ -Isoform und Bocksbeutel  $\alpha$ -Isoform. Die kodierende Region der  $\beta$ -Isoform (1-1053) wurde durch RT-PCR aus RNA-Präparationen larvalen Gesamtgewebes von *Drosophila melanogaster* amplifiziert (Spur 2). Die kodierende Region der  $\alpha$ -Isoform (1-1197) wurde aus genomischer DNA von *Drosophila melanogaster* durch PCR isoliert. Beide Isoformen wurden mit spezifischen Primer-Kombinationen amplifiziert.

Die Auftrennung erfolgte im 1% Agarosegel, als Längenmarker wurde ein 100 Basenpaar Marker verwendet (A, Spur 1; B, Spur 1, 2).

### III.2.1.2 Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der beiden Bocksbeutel Isoformen

#### Bocksbeutel $\alpha$ -Isoform

1 ATGTCGGACCTTTCTTACCTGGACACGTTGGGCAACAAGGAGCTGCTGGCCAAGTGCCTG  
 M S D L S Y L D T L G N K E L L A K C L  
 61 GAGCACGGCCTGCCCGGTGTTCCCGTGACGGACAGCACCCGCAGCGTCATAATTCGCCGA  
 E H G L P G V P V T D S T R S V I I R R  
 121 CTAAAGGCCAAAATCACCGGGTTCGCTGAACAAAAGCAAATCTGCAAGTAAGAAAGCG  
 L K A K I T G V P L N K S K S A S K K A  
 181 ATTCCGAGGCGTGAGACCGTACACGGCAGCCAGGTAACGACGCCACATCGGAGCCAGTG  
 I P R R E T V H G S Q V T T P T S E P V  
 241 CGTCGTACGCCCGCAAGAGTGCAGGACGCACTAGCAGCAACAACAAGATCAGCGAA  
 R R T P G K S A G R T S S N N N K I S E  
 301 CAAAGTCGTCGCACAATCGCCTATGGACTAGACAACACCTCGATCTCGGGAAGATCTGTG  
 Q S R R T I A Y G L D N T S I S G R S V  
 361 CAGACTACTACCACGGTGTCCGATATGAGCTCCCAGTCGGAGGACGACGACTCCTACATG  
 Q T T T T V S D M S S Q S E D D D S Y M  
 421 GTGGACTCTCCGGTGCCTAATTACTCCAAGGACCAGCAGCCTAGACGTTATGTTTCTCTA  
 V D S P V P N Y S K D Q Q P R R Y V S L  
 481 GCCAAATCCGGAGTTTTGACCACATCTTACACACGCGAAGTTGACCAGCCGCTGTACGAA  
 A K S G V L T T S Y T R E V D Q P L Y E  
 541 CAGGAGGATATAACCACGCAGCTACACCTACGAAAGACCCCATGTGCCAGCCGCCACTCTT  
 Q E D I P R S Y T Y E R P H V P A A T L  
 601 CACGCACTTCCCACATACGAGCCACGCATCGAACCTTCGACATACAGACCCACAGATTTG  
 H A L P T Y E P R I E P S T Y R P T D L  
 661 GGTTTTTTCGCGTCCCCTGCTGACTCAAACCAACTTAAACTCAACCAGCTACGAGGAGTCA  
 G F S R P L L T Q T N L N S T S Y E E S  
 721 TCTACGTACAATCCAAAACCTTTCACCCATTTTCGCCAAGAAACACTTTCAGCGGATCCGCT  
 S T Y N P K L S P I S P R N T F S G S A  
 781 AGGCCTTTTGGTGGCCCAGCACCAGCTCCAGCACCCATTCGCCAGCGACAGAGTGTTCCA  
 R P F G G P A P A P A P I R Q R Q S V P  
 841 GTTAGTGGATCCAATCTGGCCCGTGGTCGCTGCTCCAGCCGACCACCGCAGTAAACACT  
 V S G S N L A R G R L L Q P T T A V N T  
 901 CTATATCCACAACATAAATGAATTCTACGATCAGCCGAATGACGCAGGCGAACCCATGGAG  
 L Y P Q L N E F Y D Q P N D A G E P M E  
 961 ACGGAGAGCGAGTCCGAAGTCGAGGAAGTACCCATCAATAGCCATTTCCAAAAGAATCGC

T E S E S E V E E V P I N S H F Q K N R

1021 TTCTCGCCGCTGGCTAGAAAACCTCTG**GT**AAGACACCAAGATCAGGTTTCGCCTATGGCG  
 F S P L A R K P L V R H H D Q V S P M A

1081 CAGTTCGGTGCCTGGCGGTGTCATTGGATCAAAAATATAATCTCAAATTCTACTTAATA  
 Q F R A L A V S L D Q K Y N L K F Y L I

1141 TTGGT**AG**TGTCAGTGATGCTGGCCACCATGGTGTACGTGGTATTGACACCCAACGCCTGA  
 L V V S V M L A T M V Y V V L T P N A \*

Abb. 52: Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der  $\alpha$ -Isoform des Bocksbeutel von *Drosophila melanogaster*. Die Position der Splice -Donor und - Akzeptor Sequenzen ist eingerahmt.

### Bocksbeutel- $\beta$ Isoform

1 ATGTCGGACCTTTCTTACCTGGACACGTTGGGCAACAAGGAGCTGCTGGCCAAGTGCCTG  
 M S D L S Y L D T L G N K E L L A K C L

61 GAGCACGGCCTGCCCGGTGTTCCCGTGACGGACAGCACCCGCAGCGTCATAATTCGCCGA  
 E H G L P G V P V T D S T R S V I I R R

121 CTAAAGGCCAAAATCACCGGGGTTCGCTGAACAAAAGCAAATCTGCAAGTAAGAAAGCG  
 L K A K I T G V P L N K S K S A S K K A

181 ATTCCGAGGCGTGAGACCGTACACGGCAGCCAGGTAACGACGCCACATCGGAGCCAGTG  
 I P R R E T V H G S Q V T T P T S E P V

241 CGTCGTACGCCCGCAAGAGTGCAGGACGCACTAGCAGCAACAACAAGATCAGCGAA  
 R R T P G K S A G R T S S N N N K I S E

301 CAAAGTCGTGCGACAATCGCCTATGGACTAGACAACACCTCGATCTCGGGAAGATCTGTG  
 Q S R R T I A Y G L D N T S I S G R S V

361 CAGACTACTACCACGGTGTCCGATATGAGCTCCCAGTCGGAGGACGACTCCTACATG  
 Q T T T T V S D M S S Q S E D D D S Y M

421 GTGGACTCTCCGGTGCCTAATTACTCCAAGGACCAGCAGCCTAGACGTTATGTTTCTCTA  
 V D S P V P N Y S K D Q Q P R R Y V S L

481 GCCAAATCCGGAGTTTTGACCACATCTTACACACGCGAAGTTGACCAGCCGCTGTACGAA  
 A K S G V L T T S Y T R E V D Q P L Y E

541 CAGGAGGATATAACCACGCAGCTACACCTACGAAAGACCCCATGTGCCAGCCGCACTCTT  
 Q E D I P R S Y T Y E R P H V P A A T L

601 CACGCACTTCCCACATACGAGCCACGCATCGAACCTTCGACATACAGACCCACAGATTTG  
 H A L P T Y E P R I E P S T Y R P T D L

661 GGTTTTTTCGCGTCCCCTGCTGACTCAAACCAACTTAAACTCAACCAGCTACGAGGAGTCA  
 G F S R P L L T Q T N L N S T S Y E E S

721 TCTACGTACAATCCAAAACCTTTCACCCATTTTCGCCAAGAAACACTTTCAGCGGATCCGCT

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

781 AGGCCTTTTGGTGGCCCAGCACCAGCTCCAGCACCCATTTCGCCAGCGACAGAGTGTTCCA  
R P F G G P A P A P A P I R Q R Q S V P

841 GTTAGTGGATCCAATCTGGCCCGTGGTCGCCTGCTCCAGCCGACCACCGCAGTAAACACT  
V S G S N L A R G R L L Q P T T A V N T

901 CTATATCCACAACCTAAATGAATTCTACGATCAGCCGAATGACGCAGGCGAACCCATGGAG  
L Y P Q L N E F Y D Q P N D A G E P M E

961 ACGGAGAGCGAGTCCGAAGTCGAGGAAGTACCCATCAATAGCCATTTCCAAAAGAATCGC  
T E S E S E V E E V P I N S H F Q K N R

1021 TTCTCGCCGCTGGCTAGAAAACCTCTGTGTCAGTGA  
F S P L A R K P L C Q \*

Abb. 53: Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der  $\beta$ -Isoform des Bocksbeutel von *Drosophila melanogaster*.

### III.2.1.3 Vergleich der beiden Bocksbeutel Isoformen

Die beiden Bocksbeutel Isoformen unterscheiden sich in der carboxyterminalen Region. Die 399 Aminosäuren lange  $\alpha$ -Isoform unterscheidet sich von der 351 Aminosäuren langen  $\beta$ -Isoform durch die Existenz der carboxyterminalen, potentiellen Transmembrandomäne (Abb. 54 – 55). Die Verwendung der Splice-Donor und Splice-Akzeptor Site in der verkürzten  $\beta$ -Isoform resultiert in einer Verschiebung des Leserasters und führt durch ein zusätzliches Stop-Codon zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation.

$\alpha$ -Bocks	<b>MSDLSYLDTLGNKELLAKCLEHGLPGVPVTDSTRSVIIRRLKAKITGVPLNKSKSASKKA</b>	60
$\beta$ -Bocks	<b>MSDLSYLDTLGNKELLAKCLEHGLPGVPVTDSTRSVIIRRLKAKITGVPLNKSKSASKKA</b>	60
$\alpha$ -Bocks	<b><u>I</u>PRRET<b>VHGSQVTTPT</b>SEPVRRT<b>PGKSAGRTSSNNNKISEQSRRTIAYGLDNTSISGRSV</b></b>	120
$\beta$ -Bocks	<b><u>I</u>PRRET<b>VHGSQVTTPT</b>SEPVRRT<b>PGKSAGRTSSNNNKISEQSRRTIAYGLDNTSISGRSV</b></b>	120
$\alpha$ -Bocks	<b><u>Q</u>TTTTVSDMSSQ<b>SEDDDSY</b>MVDS<b>SPVPNYSKDQ</b>QPRRYVSLAKSGVLT<b>TTSY</b>TREVDQPLYE</b>	180
$\beta$ -Bocks	<b><u>Q</u>TTTTVSDMSSQ<b>SEDDDSY</b>MVDS<b>SPVPNYSKDQ</b>QPRRYVSLAKSGVLT<b>TTSY</b>TREVDQPLYE</b>	180
$\alpha$ -Bocks	<b>QEDIPRSYTYERPHVPAATLHALPTYE<b>PRIEP</b>STYRPTDLGF<b>SRPLL</b>TQTNLNSTSYEES</b>	240
$\beta$ -Bocks	<b>QEDIPRSYTYERPHVPAATLHALPTYE<b>PRIEP</b>STYRPTDLGF<b>SRPLL</b>TQTNLNSTSYEES</b>	240
$\alpha$ -Bocks	<b>STYNPKLSPISPRNTFSGSARPFGGPAPAPAP<b>IRQRQ</b>SVPVSGSNLARGRLLQPTTAVNT</b>	300
$\beta$ -Bocks	<b>STYNPKLSPISPRNTFSGSARPFGGPAPAPAP<b>IRQRQ</b>SVPVSGSNLARGRLLQPTTAVNT</b>	300
$\alpha$ -Bocks	<b>LYPQLNEFYDQPN<b>DAGE</b>PMETESESEVEEVPINSHFQKNRFSPLARKPLVRRHHDQVSPMA</b>	360
$\beta$ -Bocks	<b>LYPQLNEFYDQPN<b>DAGE</b>PMETESESEVEEVPINSHFQKNRFSPLARKPLCQ-----</b>	351
$\alpha$ -Bocks	QFRALAVSLDQKYNLK <b>FYLILVVSVM</b> LATMVYVVLTPNA	399
$\beta$ -Bocks	-----	

Abb. 54: Sequenzvergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen der  $\alpha$ -Isoform ( $\alpha$ -Bocks) und  $\beta$ -Isoform ( $\beta$ -Bocks) des Bocksbeutel von *Drosophila melanogaster* CG9424. Identische Aminosäuren zwischen beiden Isoformen sind fett gedruckt. Die Lage der potentiellen Transmembrandomäne ist unterstrichen. Die in der  $\alpha$ -Isoform mit Punkten unterlegte Region wurde zur Synthese eines rekombinanten Polypeptids für die Herstellung von polyklonalen Antikörpern verwendet.

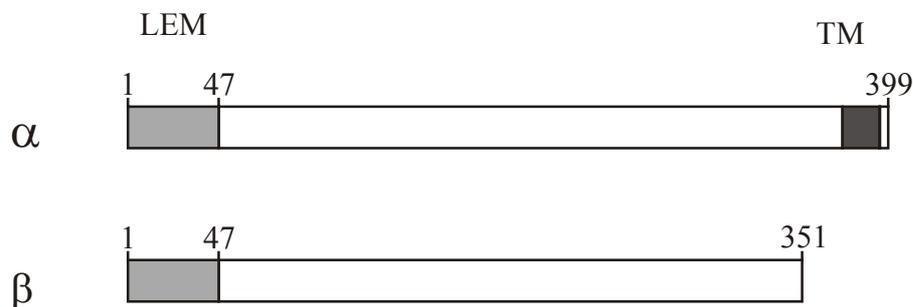


Abb. 55: Schematische Darstellung der  $\alpha$ - und  $\beta$ - Isoform des Bocksbeutel von *Drosophila melanogaster*. Die LEM-Domäne ist grau, die potentielle Transmembrandomäne ist schwarz markiert. Die Zahlen geben die Positionen der Aminosäuren bezüglich der Lage im gesamten Protein an.

### III.2.1.4 Analyse der Zusammensetzung und Eigenschaften der beiden Bocksbeutel Isoformen

Der offene Leseraster des Gens CG9424 kodiert für die beiden Isoformen Bocksbeutel- $\alpha$  und Bocksbeutel- $\beta$ . Die Länge der exprimierten  $\alpha$ -Isoform beträgt 399 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 44.203 Dalton und einem Isoelektrischen Punkt von 9,25. Die Länge der exprimierten  $\beta$ -Isoform beträgt 351 Aminosäuren mit einem berechneten

Molekulargewicht von 38.761 Dalton und einem Isoelektrischen Punkt von 9,04. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Häufigkeit der einzelnen Aminosäuren und ihren prozentualen Anteilen am gesamten Protein der jeweiligen Isoform.

$\alpha$ -Bocksbeutel				$\beta$ -Bocksbeutel			
Aminosäure		Anzahl	Anteil(%)	Aminosäure		Anzahl	Anteil(%)
Ala	(A)	23	5.8	Ala	(A)	18	5.1
Arg	(R)	29	7.3	Arg	(R)	27	7.7
Asn	(N)	19	4.8	Asn	(N)	17	4.8
Asp	(D)	17	4.3	Asp	(D)	15	4.3
Cys	(C)	1	0.3	Cys	(C)	2	0.6
Gln	(Q)	18	4.5	Gln	(Q)	16	4.6
Glu	(E)	22	5.5	Glu	(E)	22	6.3
Gly	(G)	17	4.3	Gly	(G)	17	4.8
His	(H)	7	1.8	His	(H)	5	1.4
Ile	(I)	13	3.3	Ile	(I)	12	3.4
Leu	(L)	34	8.5	Leu	(L)	27	7.7
Lys	(K)	17	4.3	Lys	(K)	15	4.3
Met	(M)	7	1.8	Met	(M)	4	1.1
Phe	(F)	8	2.0	Phe	(F)	6	1.7
Pro	(P)	37	9.3	Pro	(P)	35	10.0
Ser	(S)	48	12.0	Ser	(S)	45	12.8
Thr	(T)	35	8.8	Thr	(T)	33	9.4
Trp	(W)	0	0.0	Trp	(W)	0	0.0
Tyr	(Y)	18	4.5	Tyr	(Y)	15	4.3
Val	(V)	29	7.3	Val	(V)	20	5.7

Das Hydrophobizitätsprofil der  $\alpha$ -Isoform zeigt im carboxyterminalen Bereich des Moleküls eine Transmembrandomäne (Abb. 56).

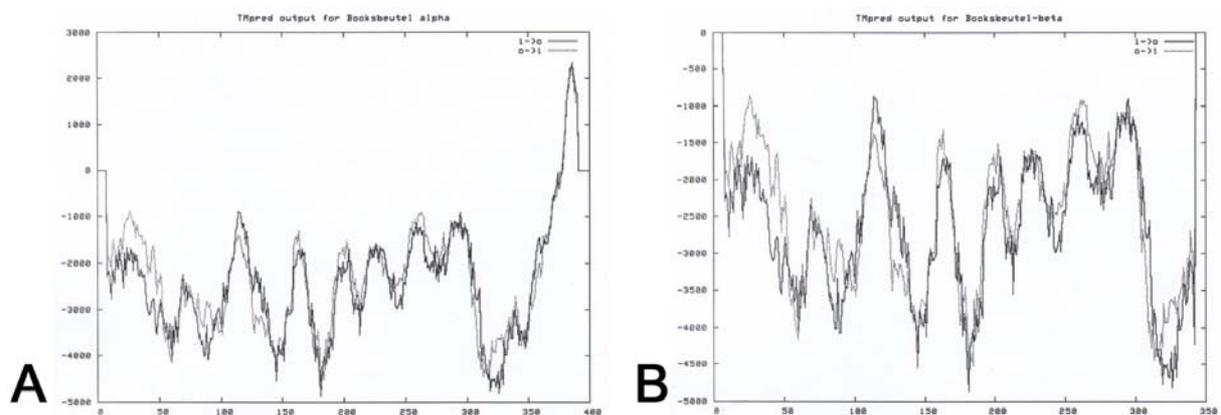


Abb. 56: Hydrophobizitätsprofil der Bocksbeutel  $\alpha$ -Isoform (A) und Bocksbeutel  $\beta$ -Isoform (B) von *Drosophila melanogaster* (nach Kythe-Andersen, 1984).

### III.2.1.5 Vergleichende Analyse des Bocksbeutel von *Drosophila melanogaster* mit Datenbanksequenzen

Die  $\alpha$ -Isoform des Bocksbeutel von *Drosophila melanogaster* zeigt beim Vergleich mit der publizierten Sequenz des Otefin (Accession Nummer: NP476664) von *Drosophila melanogaster* eine starke Ähnlichkeit im Bereich der LEM-Domäne (Aminosäuren 1 - 47 des  $\alpha$ -Bocksbeutel: 53,2 % Identität) und der carboxyterminalen Region (Aminosäuren 368 - 399 des  $\alpha$ -Bocksbeutel: 38,7 % Identität), während die Ähnlichkeit der beiden Proteine in den restlichen Aminosäuren wesentlich geringer ist (Aminosäuren 48 - 367 des  $\alpha$ -Bocksbeutel: 15,7 %) (Abb. 57).

otefin	<u>MADVDDFD</u> <b>SL</b> <u>SNAELRAKMLAQGLPNIPVTDS</u> <b>SRKVLVKRLRASIGG</b> ---QASPAASPKK	57
$\alpha$ -Bocks	<u>MSDLSYLD</u> <b>TLGNKELLAKCLEHGLPGVPVTDS</b> <u>TRSVIIRRLKAKITGVPLNKSKSASKKA</u>	60
otefin	TNRRETL----APAPGAPSAPAAASTPVDKLDG <b>NKVAPATKARRTI</b> TAAEAKEPVRRLPE	113
$\alpha$ -Bocks	IPRRET <b>VHGSQVTTPT</b> SEPVRRTPGKSAGRTSS <b>NNNKISEQSRRTI</b> AYGLDNTSISGRSV	120
otefin	EAIRRRP <b>DEADRLRSEEPVAARKPTT</b> APAAQPVQ <b>TRRTSTSSG</b> SERKVVEPLRKPETIVE	173
$\alpha$ -Bocks	QTTTTVSD <b>MSSQSEDDDSY</b> MVDS <b>PVP</b> NYSKDQ <b>QPRRYVSLAKSGV</b> LTTSYTREVDQPLYE	180
otefin	<b>Q</b> PASSKRAD <b>RE</b> ENYLK <b>VNSLIV</b> LES <b>DEE</b> DEQLVQAADLVEQEHAAR <b>QKTK</b> KLASSGTTT	233
$\alpha$ -Bocks	<b>Q</b> EDIPRSYTY <b>ER</b> PHVPAAT <b>LHAL</b> P <b>TYE</b> PR <b>IE</b> PSTYRPTDLGFSRPL <b>LQT</b> NLN <b>STSY</b> EES	240
otefin	YEYK <b>SKVVEPPRR</b> QVYEATA <b>AAPVLP</b> PSVPSARAQ <b>TTSS</b> TRSYDYAS <b>NPAPGRYS</b> SFVRTA	293
$\alpha$ -Bocks	STY <b>NP</b> KLSPIS <b>PR</b> NTFSGS <b>AR</b> PFGG <b>PAPAPAPI</b> RQ <b>RQ</b> ----- <b>SV</b> PVSG-- <b>SN</b> LARGR	290
otefin	AQGYV <b>TAE</b> APPVASYSS <b>YK</b> RTYANELSDD <b>TDS</b> KEDQ <b>YEST</b> FARNLARLRAERIG <b>DRISP</b>	353
$\alpha$ -Bocks	LLQPT <b>TA</b> VNTLYPQLNEFYDQ <b>PND</b> AGE <b>PMETE</b> SESEVE <b>VE</b> VPINSHFQ----- <b>KNR</b> F <b>SP</b>	343
otefin	YSR <b>RTL</b> ASGNAGSGSLGYEPRARRSLRPND <b>NSV</b> SEAFNRWLN <b>SLEQ</b> KY <b>HIKSKL</b> FIVLLV	413
$\alpha$ -Bocks	LARKPL <b>VR</b> -----HHDQ <b>VSP</b> MA <b>QF</b> RALAV <b>SLDQ</b> KYN <b>LKFYLIL</b> V <b>VS</b> V	385
otefin	LL <b>LIGV</b> YIF <b>Y</b> --- 424	
$\alpha$ -Bocks	<u>MLAT<b>MVY</b>VVLT</u> PN <b>A</b> 399	

Abb. 57: Sequenzvergleich des Otefin (otefin) von *Drosophila melanogaster* mit der  $\alpha$ -Isoform des Bocksbeutel ( $\alpha$ -Bocks) von *Drosophila melanogaster*. Vergleich der Aminosäuresequenzen; Identische Aminosäuren sind fett gedruckt. Die Position der LEM-Domänen ist mit einer punktierten Linie unterlegt, die Transmembrandomäne der  $\alpha$ -Isoform ist unterstrichen.

Von dem Gen Bocksbeutel werden durch Prozessierung zwei Isoformen synthetisiert, die sich durch die Existenz einer Transmembrandomäne unterscheiden. Unter anderen Genen, die für Proteine mit LEM-Domänen kodieren, konnten ähnliche Spleiß-Varianten nur für die Lamina-assoziierten Polypeptide (LAPs) beschrieben werden (Berger et al., 1996, Schoft et al., 2003; Übersicht in Gruenbaum et al., 2003). Der Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen des LAP2 $\beta$  des Zebrafisches mit der  $\alpha$ -Isoform des Bocksbeutel

(Abb. 58) zeigt jedoch eine nur sehr geringe Ähnlichkeit auf (Aminosäuren 1 - 399 des  $\alpha$ -Bocksbeutel: 16,8 % Identität). Die Ähnlichkeiten zu den Lamina-assoziierten Proteinen anderer Spezies sowie zu anderen Membranproteinen, die eine LEM-Domäne aufweisen, ist ebenfalls sehr gering (Aminosäuren 1 - 399 des  $\alpha$ -Bocksbeutel: 16,3 % Identität mit LAP2 $\beta$  von *Rattus norvegicus*, 15,3 % Identität mit LAP2 von *Xenopus laevis*).

ZLAP2	<b>M</b> LEFLEDP <b>S</b> VL <b>T</b> <b>KDKLKS</b> ALLANNVAL <b>P</b> NGD <b>Q</b> RKD <b>V</b> YVQLYL <b>K</b> N <b>L</b> T <b>V</b> Q <b>N</b> KKSSGSPDVFS 60
$\alpha$ -Bocks	<b>M</b> SDLSYLD <b>T</b> LGN <b>K</b> ELL <b>LAKC</b> LEHGLPGV <b>P</b> VD <b>S</b> TR <b>S</b> VI <b>I</b> RR <b>L</b> KAK <b>I</b> T <b>G</b> ----- 47
ZLAP2	SDEELPP <b>A</b> P <b>V</b> VSNR <b>S</b> RS <b>S</b> GRKAT <b>R</b> KTDKVRPDD <b>V</b> DVTELSNEGLKDLL <b>L</b> K <b>Y</b> GL <b>N</b> AGPIVAS 120
$\alpha$ -Bocks	----- <b>V</b> PLN <b>K</b> SK <b>S</b> ASKKA <b>I</b> PRR----- <b>E</b> T <b>V</b> HGSQ <b>V</b> TT <b>P</b> T <b>S</b> EPVRR <b>T</b> P <b>G</b> KS <b>A</b> GRTSSN 94
ZLAP2	<b>T</b> R <b>K</b> V <b>Y</b> E <b>K</b> R <b>L</b> Q <b>K</b> LLDQ <b>G</b> PP <b>V</b> A <b>V</b> AL <b>P</b> SE <b>T</b> S <b>Q</b> T <b>D</b> GN <b>Q</b> NGNND <b>S</b> D <b>Q</b> Y <b>S</b> D <b>R</b> EEEPVAPAP <b>V</b> T <b>V</b> P <b>E</b> 180
$\alpha$ -Bocks	<b>N</b> N <b>K</b> I <b>S</b> E <b>Q</b> ----- <b>S</b> RRT <b>I</b> A <b>Y</b> GLD <b>N</b> T <b>S</b> I <b>S</b> GR <b>S</b> V <b>Q</b> TT <b>T</b> T <b>V</b> <b>S</b> D <b>M</b> S <b>S</b> Q <b>S</b> E <b>D</b> DD <b>S</b> Y <b>M</b> V <b>D</b> S <b>P</b> V <b>P</b> N 147
ZLAP2	PEVEAEL <b>I</b> P <b>V</b> VERP <b>V</b> RSR <b>G</b> KTP <b>V</b> T <b>S</b> R <b>T</b> R <b>S</b> G <b>H</b> TRDFSEPSIVKEVSVSLMRMK <b>V</b> Q <b>P</b> L <b>T</b> V <b>P</b> 240
$\alpha$ -Bocks	Y <b>S</b> KDQ <b>Q</b> PR <b>R</b> Y <b>V</b> S---LAKSGV <b>L</b> T <b>T</b> S <b>Y</b> TR----- <b>E</b> V <b>D</b> Q <b>P</b> L <b>Y</b> E <b>Q</b> 181
ZLAP2	<b>K</b> D <b>P</b> K <b>S</b> K <b>R</b> Y <b>S</b> M <b>S</b> A <b>T</b> E <b>S</b> T <b>K</b> R <b>P</b> V <b>S</b> S <b>L</b> NNKH <b>D</b> E <b>N</b> T <b>A</b> D <b>I</b> P <b>S</b> P <b>P</b> H <b>R</b> Q <b>S</b> S <b>R</b> E <b>P</b> L <b>V</b> S <b>L</b> I <b>N</b> T <b>A</b> C <b>V</b> E <b>V</b> D 300
$\alpha$ -Bocks	<b>E</b> D-- <b>I</b> PR <b>S</b> Y <b>T</b> YER <b>P</b> H <b>V</b> PA <b>A</b> T <b>L</b> H <b>A</b> L <b>P</b> T <b>Y</b> E <b>P</b> R <b>I</b> E <b>P</b> S <b>T</b> Y <b>R</b> P <b>T</b> D <b>L</b> G <b>F</b> <b>S</b> R-- <b>P</b> L <b>L</b> T <b>Q</b> T <b>N</b> L <b>N</b> S <b>T</b> S <b>Y</b> E 238
ZLAP2	DQGMQD <b>V</b> L <b>S</b> CR <b>S</b> ANG <b>L</b> L <b>A</b> Q <b>G</b> V <b>R</b> S <b>A</b> A <b>V</b> S <b>K</b> L <b>S</b> K <b>P</b> V <b>L</b> S <b>Q</b> S <b>K</b> P <b>S</b> K <b>P</b> L <b>V</b> D <b>M</b> M <b>C</b> C <b>L</b> S <b>P</b> S <b>S</b> D <b>R</b> Q <b>K</b> E 360
$\alpha$ -Bocks	<b>E</b> S----- <b>S</b> T <b>Y</b> N <b>P</b> K <b>L</b> <b>S</b> P <b>I</b> S-- <b>P</b> R <b>N</b> T <b>F</b> <b>S</b> G <b>S</b> A <b>R</b> <b>P</b> F <b>G</b> G <b>P</b> A <b>P</b> A <b>P</b> A <b>P</b> <b>I</b> R <b>Q</b> R <b>Q</b> S <b>V</b> 279
ZLAP2	VE <b>K</b> V <b>S</b> A <b>I</b> D <b>Q</b> T <b>P</b> R <b>A</b> VERD <b>V</b> L <b>K</b> E <b>I</b> F <b>P</b> T <b>E</b> N <b>L</b> N <b>T</b> P <b>T</b> G <b>I</b> S <b>A</b> T <b>C</b> R <b>R</b> <b>P</b> I <b>R</b> G <b>A</b> A <b>G</b> R <b>P</b> L <b>I</b> D <b>T</b> W <b>L</b> N <b>E</b> S <b>R</b> Q 420
$\alpha$ -Bocks	P <b>V</b> S <b>G</b> S <b>N</b> L <b>A</b> R <b>G</b> R <b>L</b> L <b>Q</b> P <b>T</b> T <b>A</b> V <b>N</b> T <b>L</b> Y <b>P</b> -- <b>Q</b> L <b>N</b> E <b>F</b> Y <b>D</b> Q <b>P</b> N <b>D</b> A <b>G</b> E <b>P</b> M <b>E</b> T <b>E</b> S <b>E</b> ----- 324
ZLAP2	RL <b>S</b> D <b>L</b> K <b>Q</b> T <b>T</b> S <b>S</b> S <b>F</b> S <b>S</b> T <b>S</b> S <b>Y</b> T <b>E</b> S <b>R</b> S <b>V</b> PR <b>V</b> S <b>S</b> I <b>P</b> L <b>S</b> A <b>S</b> K <b>S</b> T <b>A</b> P <b>P</b> T <b>V</b> K <b>S</b> R <b>S</b> R <b>R</b> S <b>L</b> P <b>V</b> W <b>Q</b> L <b>V</b> 480
$\alpha$ -Bocks	-- <b>S</b> E <b>V</b> E <b>E</b> V <b>P</b> I <b>N</b> S <b>H</b> F <b>Q</b> K <b>N</b> R <b>F</b> S <b>P</b> L <b>A</b> R <b>K</b> P <b>L</b> V <b>R</b> H <b>H</b> D <b>Q</b> V <b>S</b> P <b>M</b> A <b>Q</b> F <b>R</b> A <b>L</b> A <b>V</b> S <b>L</b> D <b>Q</b> K <b>Y</b> N <b>L</b> K <b>F</b> Y <b>L</b> I <b>L</b> V 382
ZLAP2	LLSA <b>V</b> A <b>G</b> FLFFI <b>Y</b> Q <b>A</b> M <b>E</b> T <b>N</b> D <b>V</b> GL <b>F</b> K <b>Q</b> S <b>G</b> T <b>D</b> D <b>S</b> T <b>S</b> K 515
$\alpha$ -Bocks	V <b>S</b> V <b>M</b> L <b>A</b> T <b>M</b> V <b>Y</b> V <b>V</b> L <b>T</b> P <b>N</b> A----- 399

Abb. 58: Sequenzvergleich des LAP2 $\beta$  von *Danio rerio* (ZLAP2) mit der  $\alpha$ -Isoform des Bocksbeutel ( $\alpha$ -Bocks) von *Drosophila melanogaster*. Vergleich der Aminosäuresequenzen; Identische Aminosäuren sind fett gedruckt. Die Position der LEM-Domänen ist mit einer punktierten Linie unterlegt.

### III.2.1.6 Vergleich einiger potentieller Phosphorylierungsstellen des *Drosophila* Bocksbeutel mit publizierten Daten

Der Abbau der Kernhülle in der Prometaphase der Mitose wird, wie in III.1.1.6 bereits erwähnt, durch die Phosphorylierung der Lamine, der mit ihr assoziierten Proteine sowie der Kernporenkomplexproteine induziert. Die Proteine weisen potentielle Phosphorylierungsstellen für die p34<sup>cdc2</sup> Proteinkinase, die Proteinkinase A, die Proteinkinase C, die MAP Proteinkinase sowie für die Casein Proteinkinase II auf (Übersicht in Gruenbaum et al., 2003).

Die Suche nach potentiellen Phosphorylierungsstellen in der beiden Isoformen gemeinsamen aminoterminalen Sequenz des Bocksbeutel zeigt potentielle Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C (S/T-X-R/K; S = Serin, T = Threonin, X = beliebige Aminosäure, R = Arginin, K = Lysin), beginnend mit Ser<sup>32</sup>, Ser<sup>57</sup>, Ser<sup>102</sup>, Ser<sup>116</sup>, Thr<sup>214</sup>, Ser<sup>251</sup> und Ser<sup>259</sup>. Die für die Phosphorylierung durch die Casein Kinase II beschriebene Konsensussequenz S/T-X-X-D/E (S = Serin, T = Threonin, X = beliebige Aminosäure, E = Glutaminsäure, D = Asparaginsäure) tritt bei *Drosophila* Bocksbeutel insgesamt neun mal auf, beginnend mit Ser<sup>5</sup>, Thr<sup>125</sup>, Ser<sup>131</sup>, Ser<sup>133</sup>, Thr<sup>235</sup>, Ser<sup>236</sup>, Ser<sup>321</sup>, Ser<sup>323</sup> und Ser<sup>325</sup>. Ebenfalls konnte eine potentielle Phosphorylierungsstelle für die cAMP abhängige Protein Kinase (RRET, R = Arginin; E = Glutaminsäure; T = Threonin), durch die das strukturell dem Bocksbeutel sehr ähnliche Otefin *in vitro* an Arg<sup>42</sup> phosphoryliert werden kann (Ashery-Padan et al., 1997), bei Arg<sup>63</sup> gefunden werden.

### III.2.2 Expression der beiden Isoformen des Bocksbeutel als GFP-Fusionsproteine

Die Lamina-assoziierten Polypeptide 2 (LAP2) der Vertebraten sind die bisher einzigen charakterisierten polymorphen Proteine, die alle über eine LEM-Domäne verfügen, sich aber im Bereich der carboxyterminalen Regionen stark unterscheiden und durch differentielles Spleißen entstehen (Übersicht in Dechat et al., 2000; Gruenbaum et al., 2003). Die Lokalisation dieser Proteine unterscheidet sich sehr stark in Abhängigkeit der unterschiedlichen carboxyterminalen Regionen der einzelnen Isoformen. Während die Proteine, die über eine Transmembrandomäne verfügen, wie die alternativ gespleißten Isoformen LAP2 $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  des Menschen in der inneren Kernmembran des Zellkerns lokalisiert sind, liegen die beiden Isoformen LAP2  $\alpha$  und  $\xi$  des Menschen im Nukleoplasma unter Aussparung des Nukleolus vor (Dechat et al., 1998; Dechat et al., 2000). Die beiden Spleißvarianten des Bocksbeutel zeigen zwar keine starke sequenzielle Ähnlichkeit zu den Lamina-assoziierten Polypeptiden, unterscheiden sich jedoch auch, ähnlich den LAP's, in ihrer carboxyterminalen Region und durch die Existenz einer potentiellen Transmembrandomäne, die in der  $\alpha$ -Isoform des Bocksbeutel zu finden ist.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit hatte ich bereits die Lokalisation der als GFP-Fusionsprotein exprimierten  $\beta$ -Isoform (Nukleotide 4-1056) in transfizierten *Xenopus* A6 Zellen charakterisiert. Da ein Einfluss des aminoterminal exprimierten GFP auf die Lokalisation des GFP- $\beta$ -Fusionsproteins (GFP- $\beta$ ) nicht auszuschließen ist, wurde die gesamte kodierende Region der cDNA der  $\beta$ -Isoform (Nukleotide 1-1053), ebenso wie die der  $\alpha$ -Isoform (Nukleotide 1-1149) durch PCR amplifiziert und in den eukaryotischen Expressionsvektor pEGFP-N1 kloniert. Die so konstruierten Fusionsproteine weisen die gesamte  $\alpha$ -Isoform oder  $\beta$ -Isoform, gefolgt vom GFP ( $\alpha$ -GFP,  $\beta$ -GFP), auf. Um die Expression und Lokalisation des  $\alpha$ -GFP und des  $\beta$ -GFP zu untersuchen und mit der

Lokalisation des GFP- $\beta$  zu vergleichen, wurden die neu konstruierten Expressionsvektoren für die Transfektion der Kulturzelllinien A6 (*Xenopus laevis*) und Schneider S2 (*Drosophila melanogaster*) sowie für die Mikroinjektion in 30 - 60 min alten Embryonen von *Drosophila melanogaster* (2. Embryonalstadium) eingesetzt (Abb. 59).

In den im Rahmen meiner Diplomarbeit transfizierten *Xenopus* A6 Zellen (Abb. 59 A, B) war eine gleichmäßige Verteilung des GFP- $\beta$ -Fusionsproteins im Nukleoplasma unter Aussparung des Nukleolus sowie bei einer starken Überexpression auch eine schwächere Verteilung im Cytoplasma zu beobachten (Abb. 59 B).

Eine ähnliche Verteilung der  $\beta$ -Isoform wurde auch bei der Expression des GFP am carboxyterminalen Ende des Fusionsproteins ( $\beta$ -GFP) detektiert, daher ist ein Einfluss des GFPs auf die Lokalisation der  $\beta$ -Isoform auszuschließen (Abb. 59 C, D).

Im Gegensatz zu der gleichmäßigen, nukleoplasmatischen Verteilung der  $\beta$ -Isoform ist in transfizierten *Xenopus* A6 (Abb. 59 E) und *Drosophila* Schneider S2 (Abb. 59 F) eine deutliche Lokalisation der  $\alpha$ -GFP-Isoform in der Kernhülle sowie eine Kolokalisation mit den endogenen Laminen zu erkennen (Abb. 59 E', E'', F', F''). In transfizierten A6 und S2 Zellen, in denen das  $\alpha$ -GFP Fusionsprotein überexprimiert wird, ist eine zusätzliche Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum (ER) detektierbar. Eine derartige Verteilung konnte auch bei der Überexpression integraler Membranproteine einschließlich des menschlichen Lamin B Rezeptor sowie des LBR von *Drosophila melanogaster* als GFP-Fusionsproteine in transfizierten COS-7 Zellen beobachtet werden (Ellenberg et al., 1997; III.1.2). Da die Kernhülle und das ER ein kontinuierliches Membransystem bilden, diffundieren die überexprimierten Proteine bei einer ausbleibenden Immobilisierung innerhalb der Kernmembran durch die Interaktion mit spezifischen Bindungspartnern durch laterale Diffusion zurück in das ER (Diffusions-Retentions Modell, Soullam und Worman, 1995; Ellenberg et al., 1997; Östlund et al., 1999).

Um die intrazelluläre Lokalisation der  $\alpha$ -Isoform innerhalb des Organismus und die mögliche Prozessierung des Transkriptes zu untersuchen, wurden die die  $\alpha$ -GFP Isoform kodierenden Plasmide in Embryonen von *Drosophila melanogaster*, die sich im 2. embryonalen Entwicklungsstadium befanden, mikroinjiziert. In den Quetschpräparaten der 24 und 48 h alten Embryonen kann in einigen Zellkernen eine deutliche Lokalisation der  $\alpha$ -GFP Isoform in der inneren Kernmembran beobachtet werden (Abb. 59 G, H), daher ist anzunehmen, dass die Splice –Donor und –Akzeptor Sequenzen der in vivo synthetisierten  $\alpha$ -GFP Primärtranskripte nicht verwendet wurden.

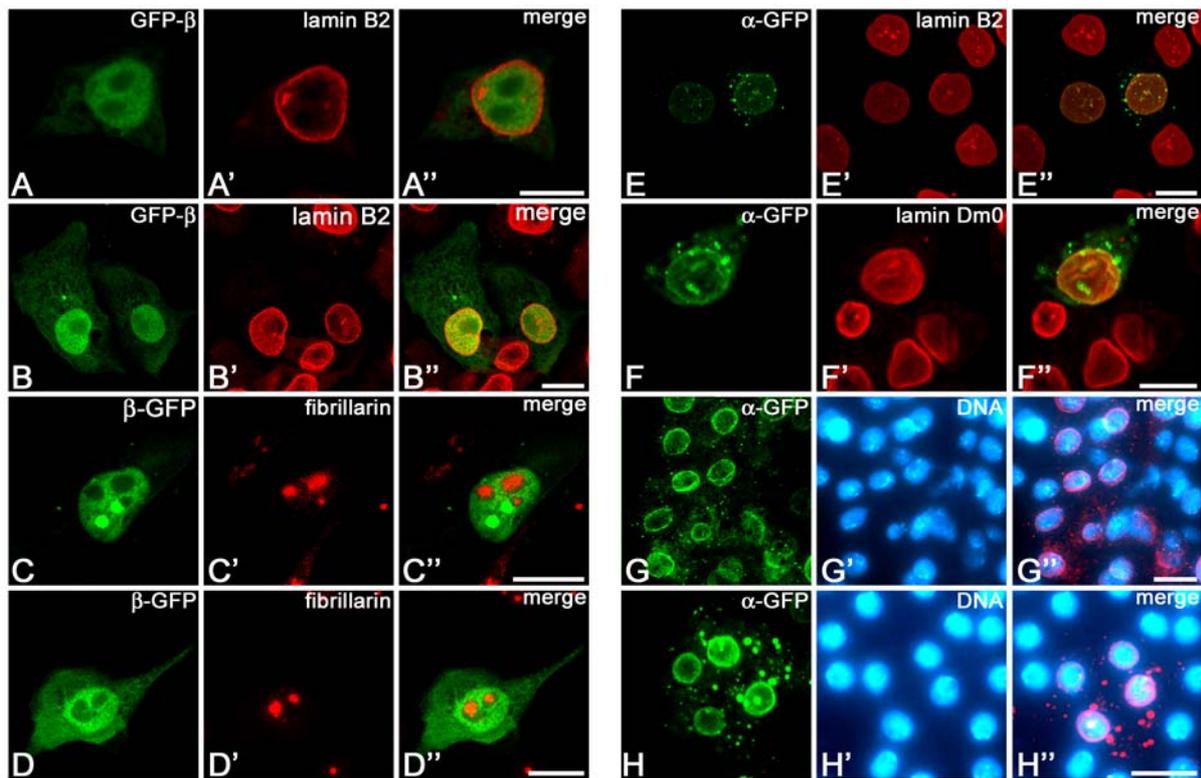


Abb. 59: Expression und Lokalisation der GFP- $\beta$  (A, B),  $\beta$ -GFP (C, D) und  $\alpha$ -GFP Fusionsproteine (E-F) in transfizierten *Xenopus* A6 Kulturzellen (A-E), *Drosophila* Schneider S2 Kulturzellen (F) und Embryonen von *Drosophila melanogaster* (G, H). Lokalisation der GFP-Fusionsproteine und des endogenen Lamin B2 (A', B', E'), Fibrillarin (C', D'), und Lamin Dm0 (F') durch direkte Fluoreszenzmikroskopie (A – H) und indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie (A' – F').

G', H') DNA Färbung mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 (G', H').

A''- H'') Überlagerung der Abbildungen A+A' – H+H'

Eichstriche: 10 $\mu$ m

Die Lokalisation der beiden Isoformen im Zellkern aller transfizierten Zelllinien deutet auf eine Assoziation der beiden Isoformen gemeinsamen aminoterminalen Region mit Chromatin und/oder noch nicht identifizierten nukleoplasmatischen Interaktionspartnern hin.

Für die ausschließlich in Vertebraten vorkommenden Lamina-assoziierten Polypeptide konnte eine direkte Bindung mit Chromatin über positiv geladene Aminosäuren der LEM-Shadow Domäne (Aminosäuren 1 – 50 des menschlichen LAP2) sowie eine indirekte Bindung an Chromatin über die Interaktion mit dem Barrier to Autointegration Factor, die durch die hydrophoben Aminosäuren der LEM Domäne (Aminosäuren 111 – 152 des menschlichen LAP2) vermittelt wird, nachgewiesen werden (Cai et al., 2001; Shumaker et al., 2001). Die Existenz einer LEM-Domäne in beiden Bocksbeutel Isoformen (Aminosäuren 1 – 47), legt die Vermutung nahe, dass eine indirekte Bindung der beiden Bocksbeutel Isoformen an Chromatin ebenfalls über dieses Motiv vermittelt werden könnte.

Für eines der am besten untersuchten Proteine der inneren Kernmembran, dem Lamin B Rezeptor konnte gezeigt werden, dass die erste Transmembrandomäne für eine korrekte

Lokalisation in der inneren Kernmembran in transfizierten Kulturzellen ausreichend ist. Während der menschliche LBR ein zusätzliches Lokalisationssignal in der nukleoplasmatischen Domäne aufweist, welches ebenfalls für die Lokalisation des Proteins in der inneren Kernmembran ausreichend ist (Smith und Blobel, 1993; Soullam und Worman, 1993; Ellenberg et al., 1997), belegt die unterschiedliche Lokalisation der Bocksbeutel  $\alpha$ - und  $\beta$ -GFP Fusionsproteine, dass die nukleoplasmatische Domäne des Bocksbeutel kein zusätzliches Signal für die Lokalisation in der inneren Kernmembran aufweist, so dass die Transmembrandomäne der  $\alpha$ -Isoform das einzige Lokalisationssignal darstellt und für die Lokalisation und Retention des Bocksbeutel- $\alpha$  in der inneren Kernmembran essentiell ist.

Um mehr über die biochemischen Eigenschaften des Bocksbeutel  $\alpha$ -GFP-Fusionsproteins zu erfahren, wurden die mit dem GFP-Fusionsprotein transfizierten A6 Zellen mit 8 M Harnstoff extrahiert. Die  $\alpha$ -GFP Isoform erweist sich gegenüber der Extraktion mit Harnstoff als stabil und kann mit einem spezifischen Antikörper gegen GFP stets im Sediment nachgewiesen werden (Abb. 60 Spur 1). Die ebenfalls vom GFP-Antikörper erkannten Degradationsprodukte des GFP können dagegen in beiden Fraktionen detektiert werden. Die Extraktionseigenschaften der Bocksbeutel  $\alpha$ -GFP Isoform sowie dessen Hydrophobizitätsprofil (III.2.1.4, Abb. 56) bestätigen die Annahme, dass es sich bei Bocksbeutel- $\alpha$  um ein integrales Membranprotein der inneren Kernmembran handelt.

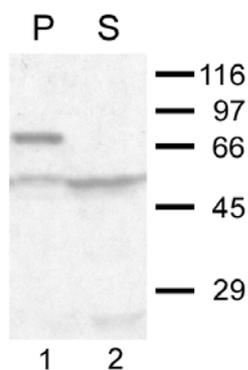


Abb. 60: Extraktionsverhalten des Bocksbeutel  $\alpha$ -GFP-Fusionsproteins. Transfizierte *Xenopus* A6 Zellen wurden mit 8 M Harnstoff extrahiert und durch Zentrifugation in Sediment (Spur 1) und Überstand (Spur 2) fraktioniert. Die Proteine wurden gelelektrophoretisch über 10% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit GFP-Antikörpern (Spuren 1 und 2) inkubiert.

Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts sind in kD angegeben.

### III.2.3 Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen Bocksbeutel

Durch die Expression der beiden Isoformen Bocksbeutel- $\alpha$  und Bocksbeutel- $\beta$  als GFP-Fusionsproteine konnte eine unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation der beiden Isoformen in Abhängigkeit der Existenz der carboxyterminalen Transmembrandomäne festgestellt werden. Eine ähnliche Lokalisation konnte auch für die verschiedenen Isoformen der Lamina-assoziierten Polypeptide der Vertebraten nachgewiesen werden (Übersicht in Gruenbaum et al., 2003). Die LAPs unterscheiden sich nicht nur in ihrer strukturellen

Zusammensetzung und Lokalisation, sondern auch in ihrer Expression. Während die LAP2 Isoformen LAP2 $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  als die im Menschen am häufigsten vorkommende Isoformen in somatischen Zellen beschrieben wurden, ist die Expression der LAP1 Proteine, aber auch einiger Isoformen der LAP2, wie das ZLAP2 $\omega$  von *Danio rerio*,entwicklungsspezifisch (Schoft et al., 2003; Übersicht in Gruenbaum et al., 2003).

Für die Charakterisierung der gewebe- und entwicklungsspezifischen Expression der beiden Isoformen des Bocksbeutel in *Drosophila melanogaster* wurden die in meiner Diplomarbeit hergestellten, spezifischen Antiseren gegen die gemeinsame aminoternale Domäne der beiden Isoformen Bocks/gI, Bocks/gII sowie die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Antiseren Bocks/gIII und Bocks/mI (g = guinea pig, m = Mouse) verwendet. Für die Herstellung der Antiseren Bocks/gIII und Bocks/mI wurde das Polypeptid der Länge von 146 Aminosäuren (AS 30 – 167; Urban, 2002) gegen die gemeinsame aminoternale Domäne der beiden Isoformen bakteriell exprimiert, gereinigt und für die Immunisierung verwendet.

### III.2.3.1 Test der polyklonalen Bocksbeutel Antikörper

Die neuen Antiseren wurden sowohl im Westernblot, als auch in der Immunfluoreszenz getestet. Mit den in meiner Diplomarbeit hergestellten Antiseren Bocks/gI und Bocks/gII und den neuen Antiseren Bocks/gIII und Bocks/mI wurden annähernd identische Ergebnisse erzielt (Abb. 61 A).

Die im Rahmen meiner Diplomarbeit affinitätsgereinigten Antiseren Bocks/gI und Bocks/gII bestätigten die mit den polyklonalen Antiseren erhaltenen Ergebnisse (Abb. 61 B).

Falls nicht anders erwähnt, wird im Folgenden stets das Antiserum Bocks/gIII verwendet.

Im Immunblot wurden die Antiseren auf Gesamtproteinen des 3. Larvalstadiums von *Drosophila melanogaster* und *Drosophila Schneider S2* Zellen getestet. Die Antikörper aller vier Antiseren sowie die affinitätsgereinigten Antiseren reagieren deutlich mit einem Protein der molekularen Masse von Mr 56.000, ebenso wird auch ein Polypeptid mit einer geringfügig höheren Mobilität im SDS-PAGE erkannt (Abb. 61 A, B). Zusätzlich erkennen die Antikörper Polypeptide, die eine wesentlich geringere Mobilität aufweisen (Abb. 61 A), die vermutlich auf die Aggregation der Proteine während der Homogenisierung der Larven und der Hitzebehandlung der Proteinproben zurückzuführen ist. Die häufig zu erkennende Proteinbande bei ca. 40.000 Da stellt wahrscheinlich ein Degradationsprodukt dar, das sehr stabil ist und sowohl in den Proteinproben der larvalen Gesamtproteine, als auch in den Gesamtproteinen der Schneider S2 Zellen zu finden ist und von allen Antiseren sowie den affinitätsgereinigten Antiseren erkannt wird. Da die erkannten Proteine von Mr 56.000 und Mr 52.000 eine geringere Mobilität aufweisen als die berechneten Molekulargewichte der beiden Isoformen ( $\alpha$ -Isoform Mr: 44.203;  $\beta$ -Isoform Mr: 38.761), können die zwei Banden nicht eindeutig den beiden Isoformen zugewiesen werden. Die Diskrepanz zwischen der berechneten molekularen Masse und dem Laufverhalten im SDS-PAGE ist bei vielen Proteinen zu beobachten und resultiert oft aus intramolekularen Faltungen und dem Anteil an

basischen Aminosäuren. Das im Bereich von 52.000 D nachgewiesene Polypeptid könnte sowohl die kleinere, 351 Aminosäure lange  $\beta$ -Isoform des Bocksbeutel, als auch ein Degradationsprodukt des Proteins von Mr 56.000 darstellen. Die Existenz solcher Degradationsprodukte ist u.a. auch bei den Laminen bekannt, bei denen die aminoterminal Domäne abgespalten wird und im SDS-PAGE als zusätzliche Bande zu erkennen ist.

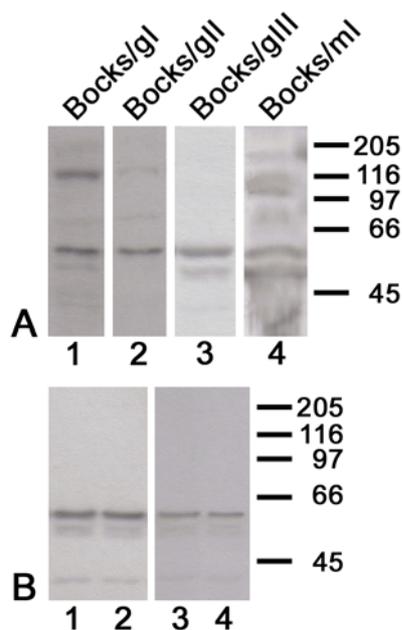


Abb. 61 A) Test der Antiseren Bocks/gI (Spur 1), Bocks/gII (Spur 2), Bocks/gIII (Spur 3) und Bocks/mI (Spur 4) im Immunblot auf den Gesamtproteinen des 3. Larvalstadiums (Spuren 1 und 2) und Schneider S2 Kulturzellen (Spuren 3 und 4) von *Drosophila melanogaster*.

Abb. 61 B) Test der affinitätsgereinigten Antikörper Bocks/gI (Spuren 1 und 2) und Bocks/gII (Spuren 3 und 4) im Immunblot auf den gesamten Proteinen des 3. Larvalstadiums von *Drosophila melanogaster*.

Die Antiseren zeigen eine starke Reaktion mit einem Antigen bei 56.000 D und eine schwächere Reaktion mit einem Antigen bei 52.000 D.

Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts sind in kD angegeben.

### III.2.4 Extraktionsverhalten des Bocksbeutel

Das Extraktionsverhalten und die Lokalisation des Bocksbeutel- $\alpha$  GFP-Fusionsproteins im Bereich der Kernperipherie sowie das Hydrophobizitätsprofil deuten darauf hin, dass es sich bei Bocksbeutel- $\alpha$  um ein integrales Membranprotein handelt. Durch weitere Extraktionsstudien mit Harnstoff oder Triton X-100 von *Drosophila* Schneider S2 Zellen sollten die biochemischen Eigenschaften des Bocksbeutel näher untersucht werden.

*Drosophila* Schneider S2 Zellen wurden mit 8 M Harnstoff (Abb. 62 Spuren 1 und 2) oder 1% Triton X-100/100 mM NaCl (Abb. 62 Spuren 3 und 4) extrahiert und durch Ultrazentrifugation in Sediment und Überstand fraktioniert. Die Proteine der Extraktionsüberstände sowie die Sedimente wurden in proportionalen Mengen durch 10% SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und im Immunblot mit dem Antiserum Bocks/gIII inkubiert (Abb. 62 A). Als Kontrolle wurde die Nitrozellulose mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen Epitope des Lamin Dm0 von *Drosophila* gerichtet ist, inkubiert (Abb. 62 B).

Die Antikörper erkennen nach der Extraktion mit Harnstoff ein Polypeptid von Mr 56.000, das vorwiegend im Sediment zu detektieren ist (Abb. 62 A, Spur 1). Da nur integrale Membranproteine nach der Extraktion mit Harnstoff mit den Membranen sedimentiert werden sollten, repräsentiert das von den Antikörpern erkannte Protein vermutlich die eine Transmembrandomäne aufweisende  $\alpha$ -Isoform. Während ca. 50% der zur Kontrolle nachgewiesenen Lamine sich als assoziiertes Membranprotein nach der Extraktion im Überstand befinden (Abb. 62 B, Spur 2), erkennen die bocksbeutel-spezifischen Antikörper im Überstand nur eine, verglichen mit den Laminen, kleine Menge des Polypeptids von Mr 56.000 sowie kleinere Polypeptide, die vermutlich dessen Degradationsprodukte darstellen (Abb. 62 A, Spur 2).

Durch die Extraktion mit Triton X-100/100mM NaCl können die membranhaltigen Lipidmicellen sowie über 50% des Proteins von Mr 56.000 im Überstand detektiert werden (Abb. 62 A, Spur 4), während über 50% der Lamine im Sediment zu finden sind (Abb. 62 B, Spur 3).

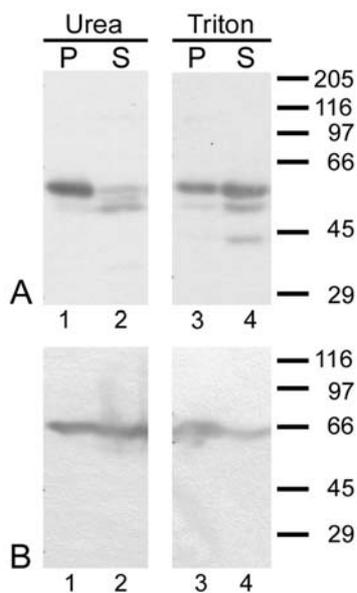


Abb. 62: Extraktionseigenschaften von Bocksbeutel.

*Drosophila* Schneider S2 Zellen wurden mit 8 M Harnstoff (Urea, Spuren 1 und 2) oder Triton X-100/100 mM NaCl (Triton, Spuren 3 und 4) extrahiert und durch Zentrifugation in Überstand (Supernatant S, Spuren 2 und 4) und Sediment (Pellet P, Spuren 1 und 3) fraktioniert. Die Proteine der Fraktionen wurden in proportionalen Mengen gelelektrophoretisch durch 10% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit Antikörpern gegen Bocksbeutel (A) oder Lamin Dm0 (B) inkubiert.

Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts sind in kD angegeben.

Der Vergleich des Extraktionsverhaltens der Bocksbeutel  $\alpha$ -Isoform als GFP-Fusionsprotein aus transfizierten A6 Zellen mit dem Extraktionsverhalten des von den Antikörpern erkannten Polypeptids von Mr 56.000 aus Schneider S2 Zellen deutet darauf hin, dass das in diesen Kulturzellen dominierende, exprimierte Polypeptid von Mr 56.000 die 399 Aminosäuren lange  $\alpha$ -Isoform repräsentiert.

### III.2.5 Analyse der Expression von Bocksbeutel in verschiedenen Entwicklungsstadien

Um die Expression der Bocksbeutel Isoformen während der Entwicklung von *Drosophila melanogaster* zu untersuchen, wurden verschiedene Entwicklungsstadien (3. Larvalstadium, Puppe, adulte Fliege) im Immunblot analysiert. Die verschiedenen Entwicklungsstadien wurden in SDS-Probenpuffer homogenisiert und über 10% SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 63).

Der Immunblot weist in allen Entwicklungsstadien ein spezifisches Signal bei 56.000 D auf, welches vermutlich die, auch in den *Drosophila Schneider S2* Kulturzellen dominierende,  $\alpha$ -Isoform des Bocksbeutel repräsentiert. Zusätzlich sind, wie auch in Abb. 63, Polypeptide, die eine niedrigere Mobilität aufweisen und vermutlich auf die Aggregation durch die Homogenisierung und Hitzebehandlung der Proteinproben zurückzuführen sind, zu erkennen.

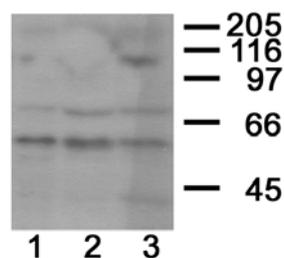


Abb. 63: Expression von Bocksbeutel in verschiedenen Entwicklungsstadien von *Drosophila melanogaster*.

Verschiedene Entwicklungsstadien (3. Larvalstadium, Spur 1; Puppe, Spur 2; adulte Tiere, Spur 3) wurden in SDS-Probenpuffer homogenisiert, und die Gesamtproteine gelelektrophoretisch durch 10% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit dem Antiserum Bocks/gIII im Immunblot inkubiert.

Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts sind in kD angegeben.

### III.2.6 Analyse der Expression von Bocksbeutel in verschiedenen Kulturzelllinien

Um die Expression der beiden Isoformen in verschiedenen embryonalen und differenzierten Zelllinien zu untersuchen, wurden die embryonalen Zelllinien *Drosophila Schneider S2* und *Schneider S2R+* sowie die differenzierte Zelllinie *Kc167* eingesetzt. Die Expression und Lokalisation des Bocksbeutel wurde durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen und mit 3% Paraformaldehyd und 0,3% Triton X-100 untersucht (Abb. 64 - 65).

In der indirekten Immunfluoreszenz von *Drosophila* Schneider S2 Zellen (Abb. 64) färben die Antikörper des Serums Bocks/gI sowie der drei Antiseren Bocks/gII, gIII und mI (nicht gezeigt) die Kernperipherie der Kulturzellen in unterschiedlicher Intensität an (Abb. 64 A - C). Verglichen mit der Expression des Lamin Dm0 (Abb. 64 A' - C'), scheint Bocksbeutel jedoch in den untersuchten Schneider S2 Zellen nicht gleichmäßig exprimiert zu werden. Während in den meisten Zellen nur eine leichte Färbung der Kernhülle zu erkennen ist (Abb. 64 B), zeigen 5 – 10% der untersuchten Zellen eine starke Färbung der Kernperipherie (Abb. 64 A). Diese verstärkte Kernmembranfärbung ist vor allem in Zellen, die sich in der späten Telophase und der Cytokinese befinden, zu beobachten (Abb. 64 C). Ebenso ist in allen Zellen eine schwache Färbung des Nukleoplasmas und des Cytoplasmas sowie die Färbung kleinerer Aggregate zu erkennen (Abb. 64 A - C).

Die Untersuchungen der Lokalisation der  $\alpha$ -GFP und  $\beta$ -GFP Fusionsproteine des Bocksbeutel zeigten eine unterschiedliche Lokalisation der beiden Isoformen. Während die  $\alpha$ -Isoform ausschließlich in der Kernperipherie lokalisiert ist, ist die  $\beta$ -Isoform im Nukleoplasma sowie schwach im Cytoplasma der transfizierten Zellen verteilt. Die Extraktionsversuche sowie die Lokalisation des Bocksbeutel-Antigens in der Kernperipherie der *Drosophila* Schneider S2 Zellen führen zu der Annahme, dass das im Bereich der Kernhülle lokalisierte Antigen die vermutlich in dieser embryonalen Zelllinie am stärksten exprimierte  $\alpha$ -Isoform repräsentiert.

Die schwache Färbung des Nukleoplasmas könnte ebenfalls auf eine schwache Expression der  $\beta$ -Isoform bzw. einer unspezifischen Kreuzreaktion der Bocks/gIII Antikörper mit anderen Proteinen zurückzuführen sein. Die schwache cytoplasmatische Färbung könnte auch durch die im ER lokalisierte  $\alpha$ -Isoform verursacht werden. Interessanterweise konnte die identische schwache nukleo- und cytoplasmatische Färbung der Kulturzellen auch mit den Antiseren Bocks/gI, gII und mI sowie mit den affinitätsgereinigten Antiseren Bocks/gI und Bocks/gII beobachtet werden.

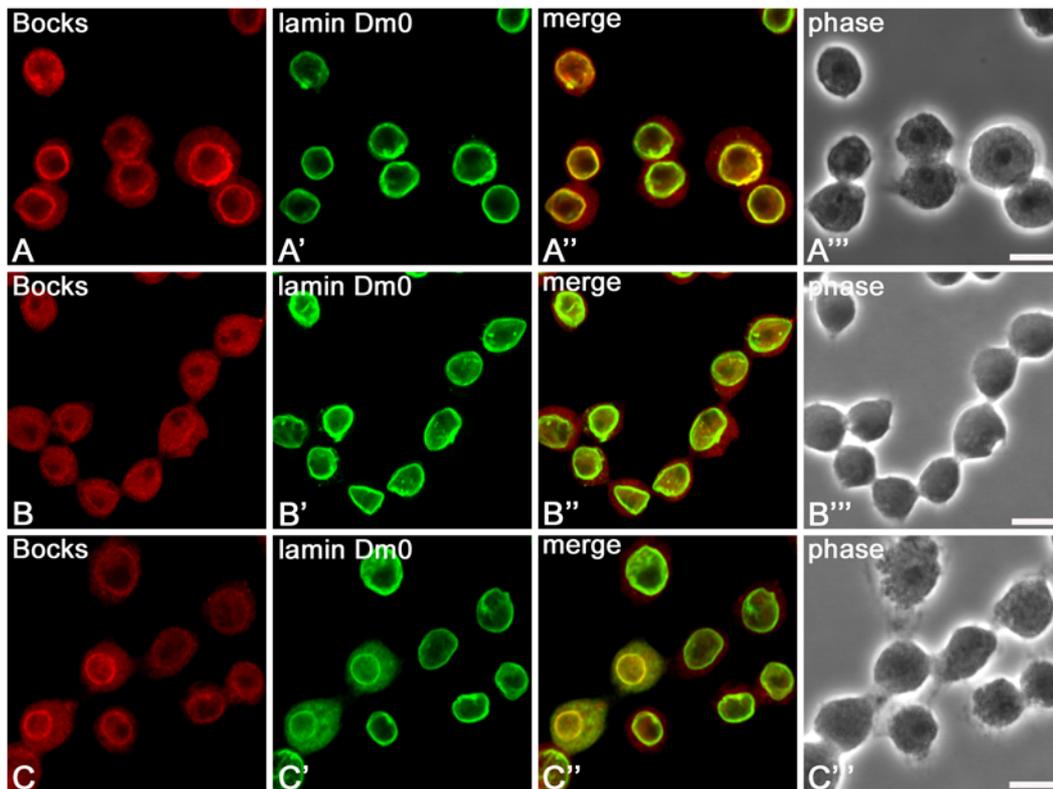


Abb. 64: Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie von *Drosophila* Schneider S2 Zellen nach der Fixierung mit 3% Paraformaldehyd, Permeabilisierung mit 0,3% Triton X-100 und Antikörperfärbung mit dem Antikörpern Bocks/gIII (A - C) und monoklonalen Antikörpern gegen Lamin Dm0 (ADL85 und ADL194) (A' - C').

A''- C'') Überlagerung der Abbildungen A+A' – C+C'

A'''- C''') Phasenkontrastaufnahmen

Eichstriche: 10µm

In den immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der differenzierten Kc167 Zellen ist ebenfalls in allen Zellen eine deutliche Färbung der Kernperipherie durch das Antiserum Bocks/gIII zu erkennen (Abb. 65 A, B). Das in der Kernperipherie lokalisierte Antigen repräsentiert vermutlich, wie in den embryonalen Schneider S2 Zellen, die Bocksbeutel- $\alpha$  Isoform. Die Expression scheint jedoch in den differenzierten Kc167 Zellen wesentlich stärker zu sein als in den untersuchten S2 Zellen (Abb. 64), da die Intensität der Immunfluoreszenz im Bereich der Kernperipherie wesentlich intensiver ist. Bei der Betrachtung der gesamten Zellen fällt wie auch schon in den Schneider S2 Zellen auf, dass die Expression des Bocksbeutel im Vergleich zur der homogenen Expression des Lamin Dm0 (Abb. 65 A') und des dLBR (Abb. 65 B') auch in den Kc167 Zellen zu variieren scheint, es sind sowohl Zellen, die eine intensive Färbung der Kernhülle aufweisen, als auch etwas schwächer gefärbte Zellen zu beobachten (Abb. 65 B). Die Lokalisation des von dem Antiserum Bocks/gIII erkannten Antigens in den Schneider S2R+ (Abb. 65 C, D) ist mit dessen Lokalisation in den Schneider S2 Zellen vergleichbar (Abb. 64). Diese beiden

Zelllinien stammen von embryonalen Zellen, die aus 0-24 h alten Embryonen isoliert wurden, unterscheiden sich jedoch in ihrer Größe und Expression der *wingless*-Rezeptoren Dfrizzled-2 und Dfrizzled-1 in der Schneider S2R+ Kulturzelllinie (Yanagawa et al., 1998).

Wie schon in den Schneider S2 Zellen beobachtet werden konnte, weisen die Schneider S2R+ Zellen, die sich in der Cytokinese befinden, eine starke Färbung der Kernmembran auf, während in anderen Zellen nur eine sehr schwache Färbung der Kernperipherie zu sehen ist (Abb. 65 C, D).

In den beiden Zelllinien Kc167 und Schneider S2R+ ist ebenfalls eine schwache nukleoplasmatische Färbung unter Aussparung des Nukleolus sowie eine schwache cytoplasmatische Färbung durch die Antikörper zu erkennen (Abb. 65 A, B, C, D).

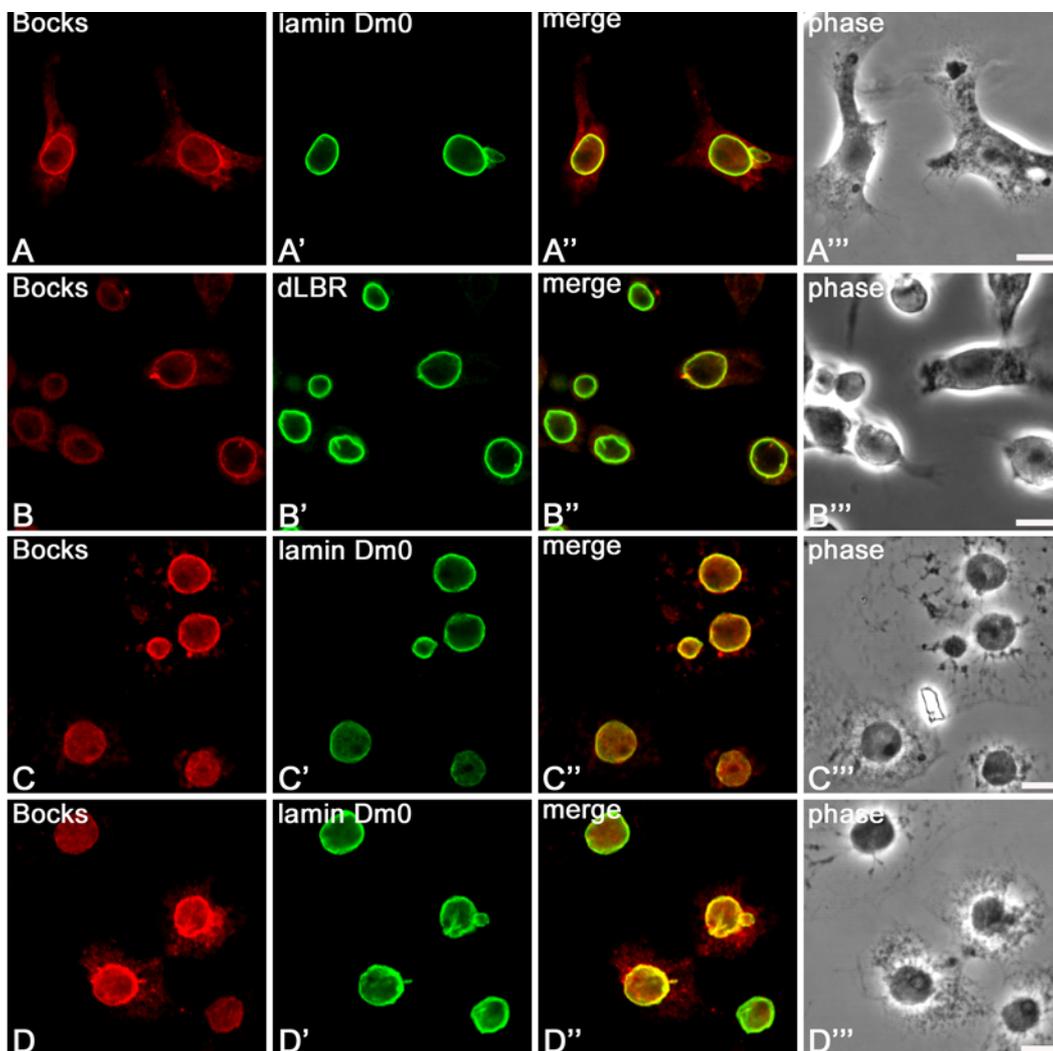


Abb. 65: Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie von *Drosophila* Kc167 (A - B) und Schneider S2R+ Zellen (C - D) nach der Fixierung mit 3% Paraformaldehyd, Permeabilisierung mit 0,3% Triton X-100 und Antikörperfärbung mit dem Antiserum Bocks/gIII (A - D), LBR/dI+II (B') und monoklonalen Antikörpern gegen Lamin Dm0 (ADL 84 und ADL 195) (A', C', D').

A''- D''') Überlagerung der Aufnahmen A+A' - D+D'

A'''- D''') Phasenkontrastaufnahmen; Eichstriche: 10µm

In den immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte eine unterschiedliche starke Färbung der Kernperipherie in Abhängigkeit der untersuchten Kulturzelllinie beobachtet werden. Die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigen, dass die  $\alpha$ -Isoform in Kulturzellen exprimiert wird. Es ist aber nicht gesichert, ob die nukleoplasmatische Färbung mit den Bocksbeutel Antikörpern durch das Bocksbeutel- $\beta$  bedingt wird.

### III.2.7 Untersuchung der Interaktion des Bocksbeutel mit Lamin Dm0 und Lamin C

Bisherige Bindungsstudien haben gezeigt, dass eine Vielzahl von LEM-Domänen Proteinen mit unterschiedlichen Komponenten des Zellkerns interagiert. Während bei den LAP2-Isoformen durch die hoch konservierten LEM- bzw. LEM-Shadow Domänen die indirekte oder direkte Bindung an das periphere Chromatin vermittelt wird (Cai et al., 2001), interagiert die sog. Lamina-Bindungsdomäne der LAPs direkt mit den Komponenten der nukleären Lamina. Die Isoformen, die durch eine Transmembrandomäne in der inneren Kernmembran verankert werden, binden an B-Typ Lamine, während die im Nukleoplasma verteilten LAPs, wie das LAP2 $\alpha$ , mit A- und C-Typ Laminen interagieren (Übersicht in Gruenbaum et al., 2003). Auch für andere LEM-Domänen Proteine, wie Emerin oder Otefin, konnte eine direkte Interaktion mit A-Typ oder B-Typ Laminen nachgewiesen werden (Lee et al., 2001, Goldberg et al., 1998).

In den Invertebraten *Drosophila melanogaster* und *C. elegans* konnten keine zu den Lamina-assoziierten Polypeptiden homologen Proteine identifiziert werden. In *Drosophila* ist bislang nur das Otefin als Interaktionspartner des Lamin Dm0 beschrieben worden. Die Identifikation der beiden Isoformen von Bocksbeutel in *Drosophila melanogaster*, die ebenfalls über eine LEM-Domäne verfügen und wie die LAPs durch differentielles Splicen synthetisiert werden sowie die hohe strukturelle Ähnlichkeit mit dem Otefin, legt die Vermutung nahe, dass auch diese beiden Isoformen direkt oder indirekt mit Komponenten der nukleären Lamina interagieren.

Um die potentiellen Interaktionen der in *Drosophila* Kc167 Kulturzellen dominierenden  $\alpha$ -Isoform mit den Laminen Lamin Dm0 und Lamin C zu untersuchen, wurden Immunpräzipitationen mit *Drosophila* Kc167 Zellen durchgeführt. Wie schon erwähnt, stammen die Kc167 Kulturzellen von differenzierten Haematocyten ab und weisen eine Co-Expression beider Lamine (Lamin Dm0 und Lamin C) auf.

Die Immunpräzipitationen wurden mit dem Antiserum Bocks/gl durchgeführt. Um eine unspezifische Bindung der Proteine zu vermeiden, wurden die mit Immunpräzipitationspuffer aus Kc167 Zellen extrahierten Proteine vor der Immunpräzipitation in einem Aliquot der Sepharose vorinkubiert und die eventuell unspezifisch gebundenen Proteine durch Zentrifugation sedimentiert. Die an Protein A-Sepharose gekoppelten Antikörper wurden mit

diesem Überstand (13.000 g Überstand) inkubiert und dadurch der daran bindende Bocksbeutel einschließlich dessen Bindungspartner immunpräzipitiert. Die Proteine wurden durch 10% SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit monoklonalen Antikörpern gegen Lamin Dm0 (ADL67) und gegen Lamin C (LC28) inkubiert (Abb. 66). Zur Kontrolle wurden die Immunpräzipitationen mit Ansätzen ohne Antikörper durchgeführt (Abb. 66 Spur 3).

Wie in Abb. 66 zu sehen ist, kann weder Lamin Dm0 (Abb. 66 Spur 1) noch Lamin C (Abb. 66 Spur 2) mit den Zellextrakten aus Kc167 Zellen immunpräzipitiert werden. In den beiden Immunblots ist lediglich die schwere Kette der Immunglobuline nachzuweisen (Abb. 66 Spur 1 und 2, Pfeilkopf).

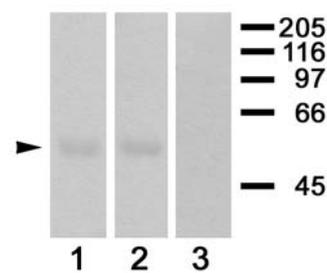


Abb. 66: Immunpräzipitation der Gesamtproteine aus Kc167 Zellen mit dem Antiserum Bocks/gl. Der 13.000 g Überstand (Triton/NaCl-Extraktion) aus *Drosophila* Kc167 Zellen wurde mit dem an Protein A Sepharose gekoppelten Antiserum Bocks/gIII inkubiert. Zur Kontrolle wurden Immunpräzipitationen ohne Antikörper durchgeführt (Spur 3). Die immunpräzipitierten Proteine wurden durch 10% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und im Immunblot mit monoklonalen Antikörpern gegen Lamin Dm0 (ADL67, Spur 1) und Lamin C (LC28, Spur 2) durchgeführt. Die Position der schweren Kette (HC) der Immunglobuline ist mit einem Pfeilkopf markiert. Die Positionen der Referenzproteine sind in kD angegeben.

### **III.3 Molekulare Charakterisierung des Barrier-to-Autointegration Factor (dBAF) von *Drosophila melanogaster***

#### **III.3.1 BLAST Suche mit der publizierten Sequenz des Barrier-to-Autointegration Factor (BAF) von *Rattus norvegicus* in der *Drosophila* Flybase Datenbank**

Wie viele nukleäre Proteine, einschließlich LAP2, Emerin, MAN1, Otefin, Lem-3 und SANE, weist die aminoternale Domäne der beiden Bocksbeutel Isoformen eine konservierte **LEM**-Domäne auf. Dieses ~ 43 Aminosäuren lange Motiv besteht aus einer Helixstruktur, die sich aus drei Aminosäuren, gefolgt von zwei durch einen langen Loop miteinander verbundenen  $\alpha$ -Helices zusammensetzt (Cai et al., 2001). Für zwei der oben aufgeführten Proteine, LAP2 und Emerin, konnte eine direkte Interaktion der LEM-Domäne mit einem kleinen, Chromatinbindenden Protein, dem **Barrier-to-Autointegration Factor (BAF)** nachgewiesen werden (Lee et al., 2001; Haraguchi et al., 2001; Shumaker et al., 2001; Segura-Totten et al., 2002).

Es wird jedoch vermutet, dass BAF auch mit anderen LEM-Domänen Proteinen interagiert und so das Chromatin mit der inneren Kernmembran und indirekt mit der Kernlamina vernetzt (Segura-Totten et al., 2002). Da auch die von mir identifizierten Isoformen des Bocksbeutel von *Drosophila melanogaster* in ihrer gemeinsamen aminoternalen Region eine LEM Domäne aufweisen, könnten auch diese beiden Proteine potentielle Interaktionspartner des BAF darstellen. Da bislang noch kein homologes Protein in *Drosophila melanogaster* identifiziert worden war, führte ich mit der publizierten Sequenz des Barrier-to-Autointegration Factor von *Rattus norvegicus* in den Gendatenbanken von *Drosophila melanogaster* (Flybase: <http://flybase.bio.indiana.edu/>) eine Suche nach ähnlichen Proteinen durch. Dabei zeigte sich, dass das putative Protein, kodiert von dem Gen CG7380 (Accession Nummer: AE003619), eine deutliche Homologie zu der Sequenz des BAF der Ratte aufweist.

Das Gen CG7380 ist auf dem linken Arm des 2. Chromosoms in der Region 28D8 lokalisiert. Der 5' nicht translatierte Bereich setzt sich aus 144 Basenpaaren zusammen. Der 3' nicht translatierte Bereich setzt sich aus 224 Basenpaaren zusammen und enthält eine typische Polyadenylierungssequenz (AATAAA).

### III.3.2 Charakterisierung des EST-Klones GH06291, der die cDNA des Gens CG7380 von *Drosophila melanogaster* enthält

Der EST-Klon GH06291 (Accession Nummer: AI07012), der die vollständige Sequenz des Gens CG7380 enthält, wurde von Celera Genetics; Invitrogen bezogen. Die vollständige cDNA, die aus isolierter polyA+ RNA aus Köpfen von *Drosophila melanogaster* (GH pOT2 Plasmid Library) synthetisiert wurde, lag in dem Expressionsvektor pOT2 vor. Die komplette Sequenz des Gens CG7380 wurde durch Sequenzierung ermittelt und mit der in den Gendatenbanken von *Drosophila melanogaster* publizierten Sequenz verglichen. Die Sequenzierung wies keine Abweichungen zu der von Celera Genetics publizierten Sequenz auf.

Das von dem Gen CG7380 kodierte putative Protein wurde als dBAF (Drosophila Barrier-to-Autointegration Factor) bezeichnet.

### III.3.3 Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der cDNA des Gens CG7380

AGATGTGTTGTTGCATTTTCGAAA

ATATCACTTGCTGCCACACTGGCTGTGCGTCATTTTCAGAAACGCCGCGAATATTTTGCC

ATTGAAATCTAGCTAAGCATTGGAATTTTCGCAACGTGCAGCAGCAAAGCAAACACTACAAAC

1 **ATG**TCGGGCACATCGCAGAAACACAGGAACTTCGTTGCGGAGCCAATGGGCAACAAGTCG  
M S G T S Q K H R N F V A E P M G N K S

61 GTGACGGAACCTGGCCGGAATTGGGGAAACCCTCGGTGGACGCTTGAAGGACGCTGGATTC  
V T E L A G I G E T L G G R L K D A G F

121 GATATGGCCTACACCGTTTTGGGACAGTATCTGGTGCTGAAAAAGGACGAGGAGCTGTTC  
D M A Y T V L G Q Y L V L K K D E E L F

181 AAGGACTGGATGAAGGAGGTGTGCCACGCCAGCTCCAAACAGGCATCCGATTGCTACAAC  
K D W M K E V C H A S S K Q A S D C Y N

241 TGTCTCAACGATTGGTGCGAGGAGTTCTT**TAA** GAGGTGGACACACAAGCCATCCGAGT  
C L N D W C E E F L -

AATTCGATCAAAGGAATCTGCTAAAGGCATCGGCCAATCATTTTTATTTCGCAGTCAACG

AAAGTGGCCCAATGCTAGCTAAGCATTGCGGTGTTCACTGTTAGTATGTATAGCTGTAG

GGTGTAATTTAATGTCTAATCCG**AATAAA**TGTACAGTCATGGAAACGATCCTGCATTTGG

GGATCTCTGTTCTGCGAAAA

Abb. 67: Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des Barrier-to-Autointegration Factor (dBAF) von *Drosophila melanogaster* (Accession Nummer: AE003619). Kodierende Nukleotide sind in Großbuchstaben, die 3' und 5' nicht translatierten Regionen sind unterstrichen dargestellt. Das Startcodon, das Stopcodon sowie das Polyadenylierungssignal sind fett gedruckt.

### III.3.4 Analyse der Zusammensetzung und Eigenschaften des dBAF

Das offene Leseraster des Gens CG7380 kodiert für ein Protein von 90 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 10.117 Dalton. Der berechnete Isoelektrische Punkt des Gesamtmoleküls liegt bei 5.04. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Häufigkeit der einzelnen Aminosäuren und ihre prozentualen Anteile am gesamten Protein.

Aminosäure		Anzahl	Anteil (%)
Ala	(A)	6	6.7
Arg	(R)	2	2.2
Asn	(N)	4	4.4
Asp	(D)	6	6.7
Cys	(C)	4	4.4
Gln	(Q)	3	3.3
Glu	(E)	8	8.9
Gly	(G)	8	8.9
His	(H)	2	2.2
Ile	(I)	1	1.1
Leu	(L)	9	10.0
Lys	(K)	8	8.9
Met	(M)	4	4.4
Phe	(F)	4	4.4
Pro	(P)	1	1.1
Ser	(S)	6	6.7
Thr	(T)	4	4.4
Trp	(W)	2	2.2
Tyr	(Y)	3	3.3
Val	(V)	5	5.6

### III.3.5 Vergleichende Analyse des BAF von *Drosophila melanogaster* mit Datenbanksequenzen

Der putative Barrier-to-Autointegration Factor von *Drosophila melanogaster* zeigt beim Vergleich mit den publizierten Sequenzen des BAF der Ratte (*Rattus norvegicus*; Accession Nummer: AB024333) eine deutliche Homologie (Aminosäuren 1 - 90 des dBAF: 63,3% Identität).

```

BAF:      -MTTSQKHRDFVAEPMGEKPVGSLAGIGDALGKRLEERGFDKAYVVLGQFLVLKK 54
dBAF:     MSGTSQKHRNFVAEPMGNKSVTELAGIGETLGGRLKDAGFDMAYTVLGQYLVLKK 53
          ***** ***** * ***** ** ** *** ** **** *****

BAF:      DEDLFREWLKDTCGANAKQSRDCFGCLREWCDAFL 89
CG7380:   DEELFKDWMKEVCHASSKQASDCYNCLNDWCEEFL 90
          ** ** * * * * ** ** ** ** **

```

Abb. 68: Sequenzvergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen des Barrier-to-Autointegration Factor von *Rattus norvegicus* (BAF) und *Drosophila melanogaster* (dBAF). Identische Aminosäuren sind fett gedruckt und mit einem Stern unterlegt.

### III.3.6 Expression des dBAF als GFP-Fusionsprotein

In *Xenopus* A6 und XLK-WG Kulturzellen ist das endogene BAF (XBAF) im Zellkern lokalisiert und im Bereich der Kernhülle angereichert, ein kleiner Teil des Proteins scheint jedoch auch im Cytoplasma lokalisiert zu sein (Segura-Totten et al., 2002).

Zur Charakterisierung der zellulären Lokalisation des putativen BAF von *Drosophila melanogaster* wurde die komplette kodierende Region der cDNA (Nukleotide 1 - 270; 4 - 273) durch PCR amplifiziert und in die eukaryotischen Expressionsvektoren pEGFP-N1 und pEGFP-C2 kloniert. Mit Hilfe dieser beiden Expressionsvektoren können Proteine als GFP-Fusionsproteine in eukaryotischen Zellen exprimiert werden. Da eine sterische Inhibierung der potentiellen Interaktionspartner durch das sehr große EGFP (Mr ~ 27.000 Da) nicht ausgeschlossen werden kann, wurden für die Expression die beiden Expressionsvektoren pEGFP-C2 und pEGFP-N1 gewählt, da sie sich in der Lokalisation der für das EGFP kodierenden Sequenzen unterscheiden. Während bei der Expression des dBAF mit dem pEGFP-C2 Vektor das EGFP am aminoterminalen Ende des Fusionsproteins exprimiert wird, bildet das EGFP durch die Expression im pEGFP-N1 Vektor die carboxyterminale Region des Fusionsproteins.

Um die Expression und Lokalisation der GFP-Fusionsproteine zu analysieren, wurden die Expressionsvektoren für die Transfektion der Kulturzelllinie A6 (*Xenopus laevis*) eingesetzt.

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden die transfizierten Zellen mit 3% Paraformaldehyd fixiert und mit 0,3% Triton X-100 permeabilisiert.

In allen sowohl mit GFP-dBAF (Abb. 69 A - D), als auch mit dBAF-GFP (Abb. 69 E - H) transfizierten *Xenopus* A6 Zellen ist eine deutliche Lokalisation der GFP-Fusionsproteine im Nukleoplasma (Abb. 69 A, E) zu beobachten, der Bereich des Nukleolus bleibt ausgespart. Es sind keine Unterschiede in der Lokalisation der dBAF-Fusionsproteine zu erkennen, wenn das GFP am aminoterminalen (GFP-dBAF) oder carboxyterminalen (dBAF-GFP) Bereich exprimiert wird. Eine Anreicherung der Fusionsproteine in der Kernperipherie, die für die Expression des endogenen BAF von *Xenopus laevis* in Kulturzellen beschrieben wurde (Segura-Totten et al., 2002), konnte nicht beobachtet werden. In allen untersuchten Stadien der Mitose ist eine Kolokalisation mit den Chromosomen zu erkennen (Abb. 69 B - D, F - H), in der Telophase und Metaphase zeigt sich eine deutliche Kolokalisation beider BAF-Fusionsproteine mit den auseinanderweichenden Chromosomen oder den Chromosomen der Metaphaseplatte (Abb. 69 D, D''; H, H'').

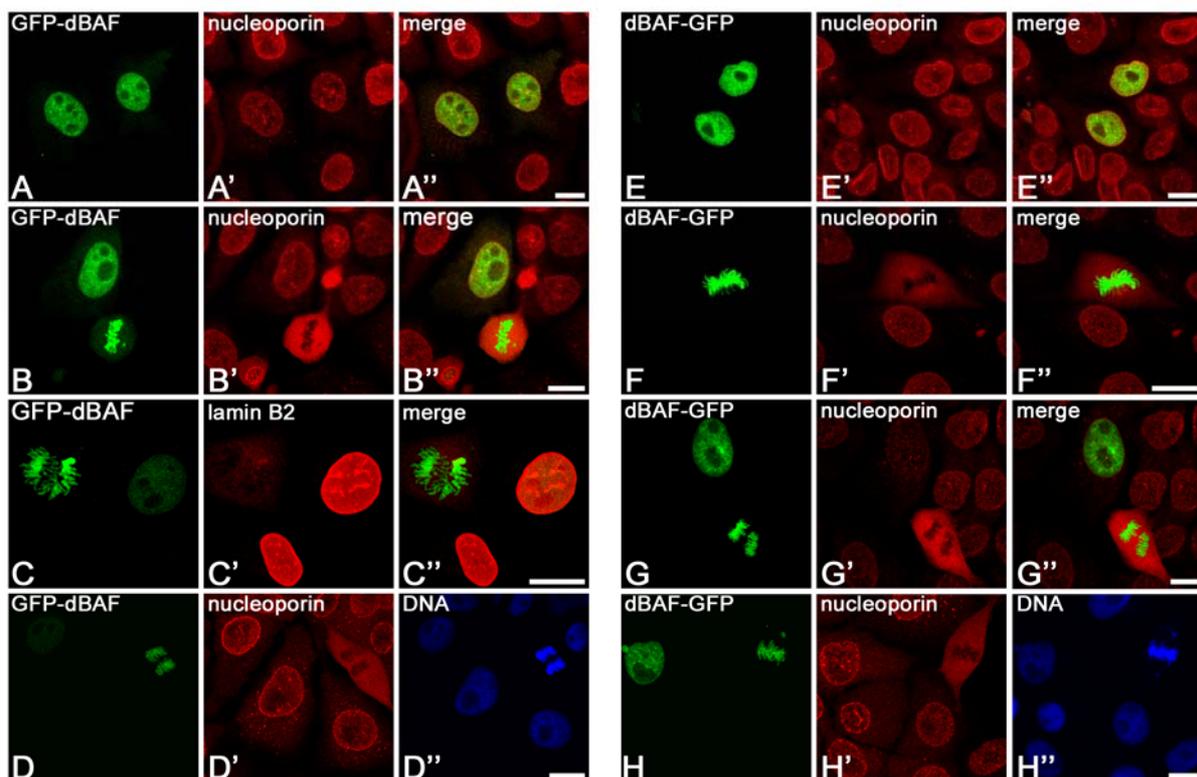


Abb. 69: Expression der GFP-dBAF (AS 2-90, A – D) und dBAF-GFP (AS 1-90, E – H) Fusionsproteine in transfizierten *Xenopus* A6 Zellen. Lokalisation der GFP-Fusionsproteine (A – H) durch direkte Immunfluoreszenzmikroskopie; des endogenen Nucleoporins (A' , B' , D' - H') und des Lamin B2 (C') durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie.

D'', H'') DNA Färbung mit dem Fluorochrom Hoechst 33258

A''- C'', E''- G'') Überlagerung der Abbildungen A+A' – C+C', E+E' – G+G'

Eichstriche: 10µm

### III.3.7 Herstellung eines Antiserums gegen dBAF

Da bisher noch keine spezifischen Antikörper gegen den Barrier-to-Autointegration Factor von *Drosophila melanogaster* zur Verfügung standen, sollten durch die Immunisierung von Meerschweinchen spezifische Antikörper hergestellt werden. Um in den Tieren eine adäquate Immunreaktion auszulösen, wurde das gesamte Protein der Länge von 90 Aminosäuren bakteriell exprimiert und für die Immunisierung verwendet.

#### III.3.7.1 Gewinnung des rekombinanten Proteins und Immunisierung von Meerschweinchen

Um den Barrier-to-Autointegration Factor von *Drosophila melanogaster* bakteriell zu synthetisieren, wurde durch PCR die gesamte kodierende Region der cDNA (Nukleotide 4 - 270) amplifiziert und in den pET 21a Expressionsvektor kloniert. Die Expression des rekombinanten Polypeptids in *E. coli* BL21 codon plus wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Die bakteriellen Proteine wurden gelelektrophoretisch durch 18% SDS-PAGE nach Kornberg aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und über die am Carboxyterminus lokalisierten sechs Histidine mit dem HIS-TAG-Antikörper nachgewiesen (Abb. 70 Spuren 1 und 2). Eine starke Expression kann bereits 4 h nach der Induktion nachgewiesen werden, es ist eine deutliche Bande im Bereich von 10 kD zu erkennen.

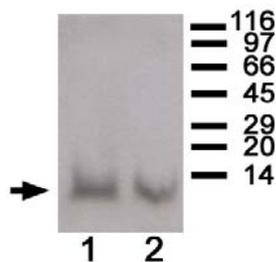


Abb. 70: Expression des rekombinanten Polypeptids (AS 1-90 des dBAF).

Die gesamten bakteriellen Proteine wurden durch 18% SDS-PAGE nach Kornberg aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert (Spur 1 und 2). Der Nachweis des exprimierten Polypeptids erfolgte durch Inkubation mit dem primären HIS-TAG-Antikörper sowie dem Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper über ECL.

Der Pfeil markiert das synthetisierte Polypeptid.

Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts sind in kD angegeben.

Das bakteriell exprimierte Polypeptid wurde über die sechs Histidine mit Hilfe einer Nickel-Chelat Säule gereinigt. Für die Immunisierung der Meerschweinchen wurden je 100 µg des gereinigten Polypeptids eingesetzt. Da die Länge des Polypeptids von 96 Aminosäuren für eine adäquate Immunreaktion in den Meerschweinchen eventuell nicht ausreichen würde, wurde eines der beiden Meerschweinchen mit bakteriell exprimierten Polypeptiden immunisiert, die zuvor mit Glutaraldehyd vernetzt worden waren. Die Proteine wurden zu diesem Zweck für 20 min in 0,3% Glutaraldehyd in ddH<sub>2</sub>O inkubiert, mit Methanol/Chloroform gefällt und in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und für die Immunisierung vorbereitet.

### III.3.7.2 Test der polyklonalen dBAF Antikörper

Die Antiseren der Immunisierung zweier Meerschweinchen mit nativem dBAF (dBAF/gI; g = guinea pig) und Glutaraldehyd vernetztem dBAF (dBAF/gII) wurden sowohl im Westernblot, als auch in der Immunfluoreszenz getestet. Mit den Antiseren dBAF/gI und dBAF/gII wurden im Westernblot annähernd identische Ergebnisse erzielt (Abb. 71 A). In der Immunfluoreszenz erwies sich das Antiserum dBAF/gI als etwas stärker und wird, wenn nicht anders erwähnt, für die weiteren immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen verwendet.

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden die dBAF spezifischen Antiseren dBAF/gI und dBAF/gII durch eine Affinitätsreinigung über CNBr-aktivierter Sepharose von den anderen Bestandteilen des Serums isoliert. Die affinitätsgereinigten Antikörper bestätigten die mit den polyklonalen Antiseren erzielten Ergebnisse (Abb. 71 B).

Im Immunblot wurden die Antiseren mit Gesamtproteinen des 3. Larvalstadiums von *Drosophila melanogaster* und *Drosophila Schneider S2-Zellen* getestet. Die Antikörper beider Seren reagieren deutlich mit einem Protein der molekularen Masse von Mr 10.000 Dalton.

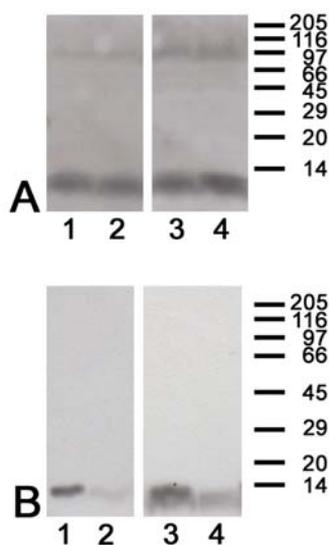


Abb. 71:

- A) Test der Antiseren dBAF/gI (Spuren 1 und 2) und dBAF/gII (Spuren 3 und 4) im Immunblot auf den Gesamtproteinen des 3. Larvalstadiums von *Drosophila melanogaster*.
- B) Test der affinitätsgereinigten Antiseren dBAF/gI (Spuren 1 und 2) und dBAF/gII (Spuren 3 und 4) im Immunblot auf den gesamten Proteinen des 3. Larvalstadiums (Spuren 2 und 4) und Schneider S2 Kulturzellen (Spuren 1 und 3) von *Drosophila melanogaster*.

Die Antiseren zeigen eine starke Reaktion mit einem Antigen bei ca. 10.000 D.

Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts sind in kD angegeben.

In der indirekten Immunfluoreszenz von mit 3% Paraformaldehyd fixierten und mit 0,3% Triton X-100 permeabilisierten *Drosophila Schneider S2* (Abb. 72 A, D, E), *Schneider S2R+* (Abb. 72 C) und *Kc167 Zellen* (Abb. 72 B) färben die Antikörper des Serums dBAF/gI in der Interphase das Nukleoplasma des Zellkerns an, der Bereich des Nukleolus bleibt ausgespart. Ebenso ist eine leichte, diffuse Färbung des Cytoplasmas zu beobachten. Während die GFP-Fusionsproteine in transfizierten *Xenopus A6 Zellen* eine vollständige Kolokalisation mit den kondensierten Chromosomen während der Mitose aufweisen, bleibt ein Teil der Chromosomen in den untersuchten *Schneider S2 Zellen* von der

Immunfluoreszenz ausgespart (Abb. 72 D, E). Das dBAF scheint nur mit bestimmten Bereichen der Chromosomen zu koloalisieren, während die in der Mitose löslichen Lamine in der ganzen Zelle verteilt sind und die Chromosomen in der Immunfluoreszenz des Lamin Dm0 vollständig ausgespart bleiben (Abb. 72 D', D''; E', E''). Während die Lokalisation der GFP-dBAF Fusionsproteine (III.3.6 Abb. 69) während der Mitose auf die Koloalisation mit den Chromosomen beschränkt ist, liegt ein großer Teil des dBAF während der Mitose in den untersuchten *Drosophila* Zelllinien diffus verteilt in der gesamten Zelle vor (Abb. 72 D, E).

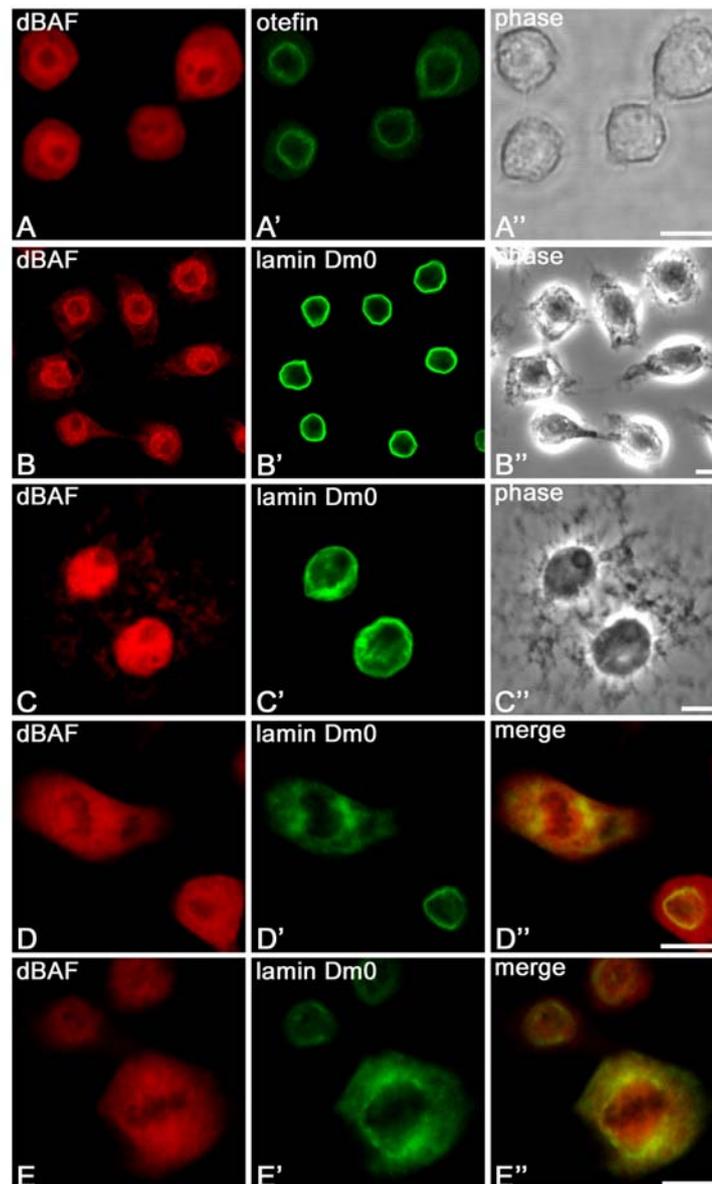


Abb. 72: Lokalisation des dBAF in *Drosophila* Schneider S2 Zellen (A, D, E), Schneider S2R+ Zellen (B) und Kc167 Zellen (C) nach Fixierung der Zellen mit 3% Paraformaldehyd und Permeabilisierung mit 0,3% Triton X-100 sowie des endogenen Otefin (A') und Lamin Dm0 (B' – E') durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie.

A''- C'') Phasenkontrastaufnahmen

D''- E'') Überlagerung der Abbildungen D+D' – E+E'; Eichstriche: 10µm

In der indirekten Fluoreszenzmikroskopie von Quetschpräparaten des 3. Larvalstadiums von *Drosophila melanogaster* ist eine deutliche Färbung des Zellkerns sowie eine Anreicherung des dBAF in der Kernperipherie zu erkennen (Abb. 73 A – C)

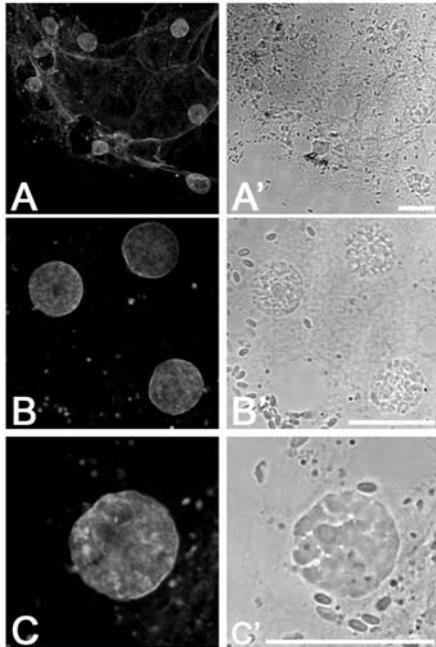


Abb. 73: Expression und Lokalisation des dBAF auf Quetschpräparaten des 3. Larvalstadiums von *Drosophila melanogaster* durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie.

A' - C') Phasenkontrastaufnahmen

Eichstriche: 10  $\mu$ m

### III.3.8 Extraktionsverhalten des dBAF

Um mehr über die biochemischen Eigenschaften des Drosophila Barrier-to-Autointegration Factor zu erfahren, wurden Schneider S2 Kulturzellen mit 8 M Harnstoff oder 1% Triton X-100 in Konzentration mit 250 mM NaCl extrahiert (Abb. 74). Durch die Extraktion mit Harnstoff werden die Wechselwirkungen zwischen den Proteinen gelöst, so dass alle Proteine ausgenommen integrale Membranproteine, die mit biologischen Membranen assoziiert bleiben, in Lösung gehen. Durch die gleichzeitige Extraktion mit Triton X-100 und 250 mM NaCl soll die Bindung des dBAF an Komponenten des Karyoskeletts (nukleäre Proteine, die unter hohen Ionenkonzentrationen und Anwesenheit nichtionischer Detergenzien unlöslich sind) und des Chromatins untersucht werden. Nach der Extraktion und Fraktionierung befinden sich Proteine, die mit Komponenten des Karyoskeletts assoziiert sind, in der unlöslichen Fraktion im Sediment, während sich andere Proteine ablösen und sich im Überstand befinden.

Schneider S2 Kulturzellen wurden mit 8 M Harnstoff (Abb. 74 Urea; Spuren 1 und 2) oder 1% Triton X-100 mit 250 mM NaCl (Abb. 74 Triton; Spuren 3 und 4) extrahiert und durch Ultrazentrifugation in Sediment und Überstand fraktioniert. Die Proteine der Extraktionsüberstände (Supernatant, S, Spuren 2 und 4) sowie die Sedimente (P, Pellet, Spuren 1 und 3) wurden in proportionalen Mengen durch 18% SDS-PAGE nach Kornberg

gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und im Immunblot mit dem Antiserum dBAF/gI inkubiert (Abb. 74 A).

Als lösliches Protein ist dBAF nach der Extraktion mit Harnstoff ausschließlich im Überstand zu detektieren (Abb. 74 Spur 2), während nach der Extraktion mit 1% Triton X-100/250 mM NaCl) sich die größte Menge des dBAF im Sediment befindet (Abb. 74 Spur 3). Die Anwesenheit des dBAF im Sediment deutet auf ionische und hydrophobe Wechselwirkungen des Proteins mit Komponenten des Karyoskeletts und des Chromatins hin.

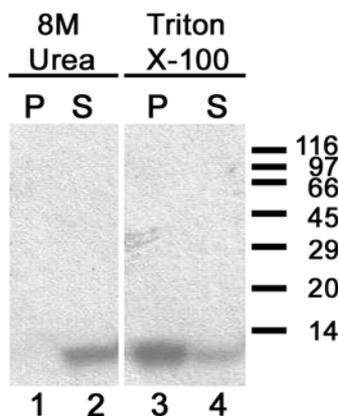


Abb. 74: Extraktionsverhalten des dBAF.

*Drosophila* Schneider S2 Zellen wurden mit 8 M Harnstoff (Urea, Spuren 1 und 2) oder mit Triton X-100 / 250 mM NaCl (Triton, Spuren 3 und 4) extrahiert und durch Zentrifugation in Überstand (S) und Sediment (P) fraktioniert. Die Proteine der Fraktionen wurden in proportionalen Mengen gelelektrophoretisch durch 18% SDS-PAGE nach Kornberg aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit Antikörpern gegen dBAF inkubiert.

Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts sind in kD angegeben.

### III.3.9 Untersuchung der potentiellen Bindung des Bocksbeutel mit dem Barrier-to-Autointegration Factor von *Drosophila melanogaster*

Der Barrier-to-Autointegration Factor bindet an eine Vielzahl von Membranproteinen der inneren Kernmembran, die eine LEM-Domäne aufweisen. Diese Interaktionen sowie die direkte Bindung des BAF an DNA spielen eine wichtige Rolle in der Rekrutierung der Membranen und der Dekondensation des Chromatins während der Kernhüllenrebildung. Durch die Bindung an Membranproteine der inneren Kernmembran, einschließlich dem Emerin und Lamina-assoziierten Polypeptid 2 (LAP2), vernetzt BAF das Chromatin direkt mit der inneren Kernmembran und indirekt mit der Kernlamina (Lee et al., 2001; Haraguchi et al., 2001; Shumaker et al., 2001). Während diese Proteine im zentralen Bereich des dimeren BAF-Komplexes binden, erfolgt die Assoziation der DNA mit den beiden Seiten des Proteinkomplexes (Segura-Totten et al., 2002). Durch die molekulare Charakterisierung der beiden Isoformen des Proteins Bocksbeutel von *Drosophila melanogaster* konnte ich zwei weitere Proteine identifizieren, die eine LEM-Domäne aufweisen und somit potentielle Bindungspartner des dBAF darstellen. Eine mögliche Interaktion des dBAF mit den beiden Spleißvarianten des Proteins Bocksbeutel sollte durch Immunpräzipitationen untersucht werden.

Die Immunpräzipitationen wurden mit den beiden Zelllinien Schneider S2 und Kc167 von *Drosophila melanogaster* durchgeführt. Zur Analyse der potentiellen Bindung wurden die Immunpräzipitationen sowohl mit dem Antiserum dBAF/gI, als auch mit dem Antiserum Bocks/ml durchgeführt. Um eine unspezifische Bindung der Proteine zu vermeiden, wurden die mit Immunpräzipitationspuffer aus Schneider S2 oder Kc167 Zellen extrahierten Proteine vor der Immunpräzipitation in einem Aliquot der Sepharose vorinkubiert, und die eventuell unspezifisch gebundenen Proteine durch Zentrifugation sedimentiert. Die an Protein A-Sepharose gekoppelten Antikörper wurden mit diesem Überstand (13.000 g Überstand) inkubiert und dadurch die daran bindenden Proteine dBAF oder Bocksbeutel, einschließlich deren Bindungspartnern immunpräzipitiert. Die Proteine wurden durch 10% oder 18% SDS-PAGE nach Kornberg gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit polyklonalen Antikörpern gegen Bocksbeutel (Abb. 75 A) oder dBAF (Abb. 75 B) inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Immunpräzipitationen mit Ansätzen ohne Antikörper durchgeführt. Wie in Abbildung 75A zu sehen ist, überdeckt die schwere Kette der Immunglobuline (Abb. 75 A, Spuren 1 und 2) alle weiteren Signale im Bereich von 60 – 50 kD. Da die in den Kulturzellen dominierende  $\alpha$ -Isoform des Bocksbeutel von Mr 56.000 bei einer Immunpräzipitation mit dem dBAF ebenfalls in dem Bereich der schweren Kette zu detektieren wäre (Abb. 75 A: Spur 3, larvale Gesamtproteine), können durch die Immunpräzipitationen mit dem dBAF/gI Antiserum keine Aussagen über eine potentielle Bindung des Bocksbeutel mit dem dBAF getroffen werden. Eine Immunpräzipitation des dBAF mit dem Bocks/gIII Antiserum aus Schneider S2 Zellen (Abb. 75 B, Spur 3) und Kc167 Zellen (Abb. 75 B, Spur 4) konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

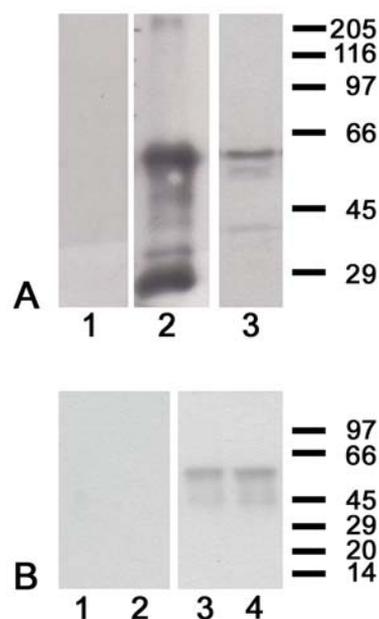


Abb. 75 A: Immunpräzipitation mit dBAF Antikörpern aus Zellextrakten

Die 13.000 g Überstand (Triton/NaCl-Extraktion) von *Drosophila Schneider* S2 wurden mit dem an Protein A Sepharose gekoppelten Antiserum dBAF/gI inkubiert. Zur Kontrolle wurden Immunpräzipitationen ohne Antikörper durchgeführt (Spur 1). Die immunpräzipitierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und im Immunblot mit polyklonalen Antikörpern gegen Bocksbeutel (Spur 2) inkubiert. Als Kontrolle wurden larvale Gesamtproteine (Spur 3) aufgetragen.

Abb. 75 B: Immunpräzipitation mit Bocksbeutel Antikörpern aus Zellextrakten

Die 13.000 g Überstände (Triton/NaCl-Extraktion) von *Drosophila Schneider* S2 (Spuren 1 und 3) und Kc167 Zellen (Spuren 2 und 4) wurden mit dem an Protein A Sepharose gekoppelten Antiserum Bocks/gIII inkubiert. Zur Kontrolle wurden Immunpräzipitationen ohne Antikörper durchgeführt (Spuren 1 und 2). Die immunpräzipitierten Proteine wurden durch 18% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und im Immunblot mit polyklonalen Antikörpern gegen dBAF (Spuren 3 und 4) inkubiert.

Die Positionen der Referenzproteine sind in kD angegeben.

Um zu überprüfen, ob sich die LEM-Domänen Proteine Bocksbeutel und Otefin nach der Saccharose-Gradienten-Zentrifugation in ähnlichen Fraktionen wie dBAF befinden, wurden wie schon in III.1.7.3 beschrieben, extrahierte Proteine von *Drosophila Schneider* S2 Zellen auf einen kontinuierlichen Zuckergradienten (5 – 30% w/v) geschichtet und durch Ultrazentrifugation gemäß ihres spezifischen Sedimentationskoeffizienten aufgetrennt. Zur Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten wurden Immunglobuline (Sedimentationskoeffizient 6,5) parallel im Zuckergradienten zentrifugiert. Nach der Fraktionierung wurden die Proteine mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt, durch 10% bzw. 18% SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Der Immunblot wurde mit polyklonalen Antikörpern gegen Lamin Dm0 (Abb. 76 A), Bocksbeutel (Abb. 76 B), dBAF (Abb. 76 C) und Otefin (Abb. 76 D) inkubiert, um die Proteine in den einzelnen Fraktionen zu detektieren.

Wie in Abb. 76 zu erkennen ist, ist nur ein kleiner Teil der LEM-Domänen Proteine Bocksbeutel und Otefin in Fraktionen zu detektieren, in denen sich auch dBAF befindet. Trotzdem durch die Immunpräzipitationsstudien eine direkte Interaktion des Bocksbeutel mit dBAF nicht nachgewiesen werden konnte, weist die Detektion der beiden LEM-Domänen Proteine und des dBAF in den Fraktionen mit mittleren Sedimentationskoeffizienten darauf hin, dass die Proteine in diesen Fraktionen eventuell Bestandteile von oligomeren Komplexen sind.

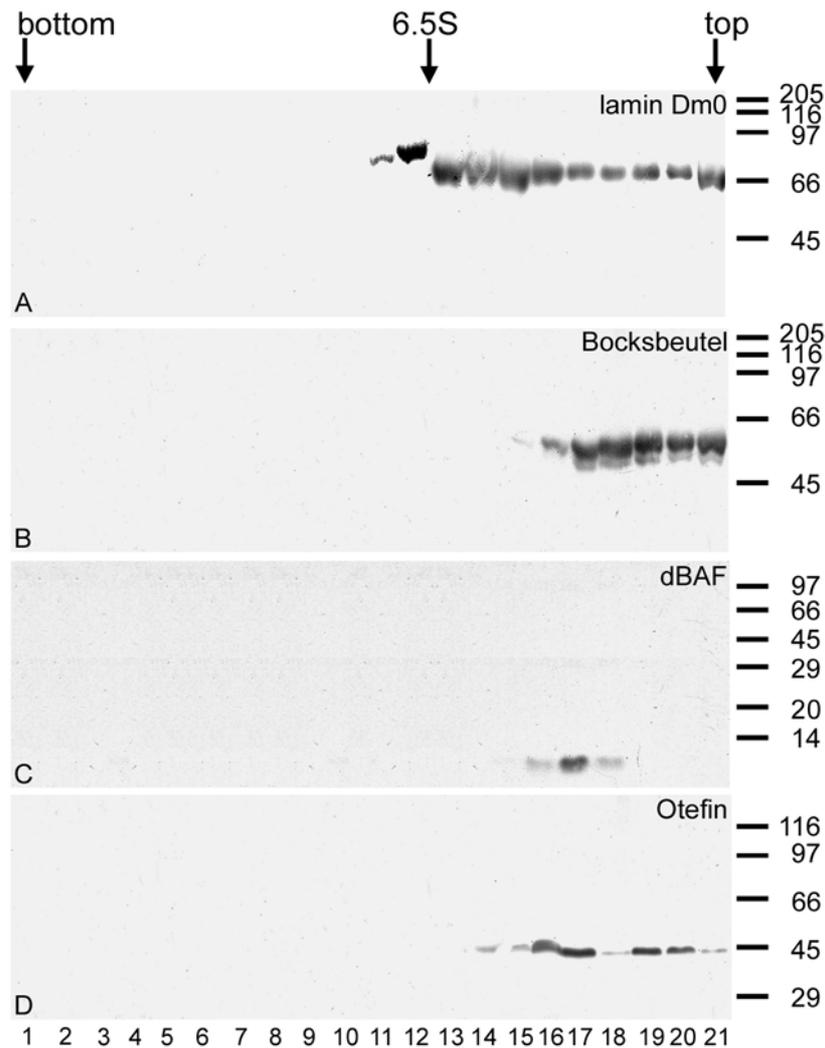


Abb. 76: Saccharose-Gradienten-Zentrifugation (5 - 30%) des Gesamtproteinextraktes des 13.000 g Überstandes von *Drosophila* Schneider S2 Zellen, die mit 1% Triton X-100 und 150 mM NaCl extrahiert wurden. Die Proteine der 21 Fraktionen wurden durch SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und der Immunblot mit polyklonalen Antikörpern gegen Lamin Dm0 (A), Bocksbeutel (B), dBAF (C) und Otefin (D) inkubiert.

Die Position des Immunglobulin G (6.5S; Sedimentationskoeffizient), der Anfang (top) und das Ende (bottom) des Gradienten sind durch Pfeile markiert.

Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts sind in kD angegeben.

### III.3.10 Reduktion der Expression von Bocksbeutel und dBAF durch RNAi Interference (RNAi)

Wie schon erwähnt, weisen beide Isoformen des Bocksbeutel in ihrer gemeinsamen aminoterminalen Domäne eine LEM-Domäne auf, eine stark konservierte Domäne, die in vielen nukleären Proteinen, einschließlich LAP2, Emerin, MAN1, Otefin und SANE, identifiziert werden konnte (Cohen et al., 2001; Dechat et al., 2000; Lin et al., 2000; Raju et al., 2003). Während die LEM-Domänen des LAP2 und Emerin in Säugern die direkte Bindung des Barrier-to-Autointegration Factor vermitteln (Shumaker et al., 2001; Lee et al., 2001), konnte eine direkte Bindung zwischen Bocksbeutel und dBAF durch die Immunpräzipitationen nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Um mehr Informationen über die potentielle Interaktion dieser beiden Proteine in Invertebraten zu gewinnen, sollte der Einfluss der Depletion des Bocksbeutel durch RNAi auf die Expression und Verteilung des dBAF in Kc167 Zellen und vice versa untersucht werden.

Die verschiedenen, für Bocksbeutel und dBAF kodierenden DNA-Fragmente, wurden durch PCR amplifiziert und in den pCR<sup>®</sup>II-TOPO Vektor kloniert. Die zur Synthese verwendeten Primer setzen sich aus der Bindungsstelle der T7-Polymerase und der spezifischen kodierenden Sequenz zusammen (VII.2 Anhang). Die cDNA-Fragmente wurden durch Restriktion isoliert und für die modifizierte Transkription mit dem MEGAscript<sup>™</sup> High Yield Transcription Kit der Firma Ambion eingesetzt. Die präzipitierten und gereinigten einzelsträngigen RNA-Moleküle wurden hybridisiert und die doppelsträngige RNA direkt für die Transfektion von *Drosophila* Kc167 Kulturzellen sowie für die Mikroinjektion von 30 – 60 min alten Embryonen von *Drosophila melanogaster* verwendet.

In allen Experimenten wurden die Kulturzellen entsprechend den Angaben mit dsRNA transfiziert. Als Kontrolle wurden Kulturzellen mit dem identischen Volumen Kulturmedium versetzt und unter gleichen Bedingungen kultiviert.

Die Reduktion der Expression wurde immunfluoreszenzmikroskopisch und biochemisch im Immunblot mit spezifischen Antikörpern analysiert. Zur phänotypischen Analyse wurde die Morphologie der Zellen und die Verteilung der integralen und assoziierten Membranproteine Bocksbeutel, dLBR, Otefin, Lamin Dm0, und Lamin C sowie die Verteilung des Barrier-to-Autointegration Factor (dBAF) von *Drosophila* immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Analyse der transfizierten Zellen erfolgte nach 24, 48, 72, 96, 120 und 144 Stunden (Zeitpunkt der Transfektion = 0h).

### **III.3.10.1 Reduktion der Expression von Bocksbeutel und dBAF in Drosophila Kc167 Kulturzellen und in der Embryogenese durch RNAi**

Die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigen in den mit Bocks dsRNA bzw. mit dBAF dsRNA transfizierten Kc167 Kulturzellen (Abb. 77, RNAi-Bocksbeutel; RNAi-dBAF) nach 24 Stunden eine signifikant schwächere Antikörperfärbung (Abb. 77 A). Nach 48, 72 und 96 Stunden kann in 90 - 95% der KC167 keine oder nur eine sehr schwache Antikörperfärbung nachgewiesen werden (Abb. 77 B - D). Die Anzahl der schwach gefärbten Zellen verringert sich innerhalb des Zeitraums von 120 und 144 Stunden, so dass nach 144 h die meisten transfizierten Zellen in der Immunfluoreszenz nicht mehr von den Kontrollzellen unterschieden werden können (Abb. 77 F). Während des gesamten Zeitraums können sowohl in den mit Bocksbeutel dsRNA, als auch in den mit dBAF dsRNA transfizierten Kc167 Zellen keine morphologischen Unterschiede zwischen transfizierten Zellen und Kontrollzellen (Abb. 77 G) beobachtet werden.

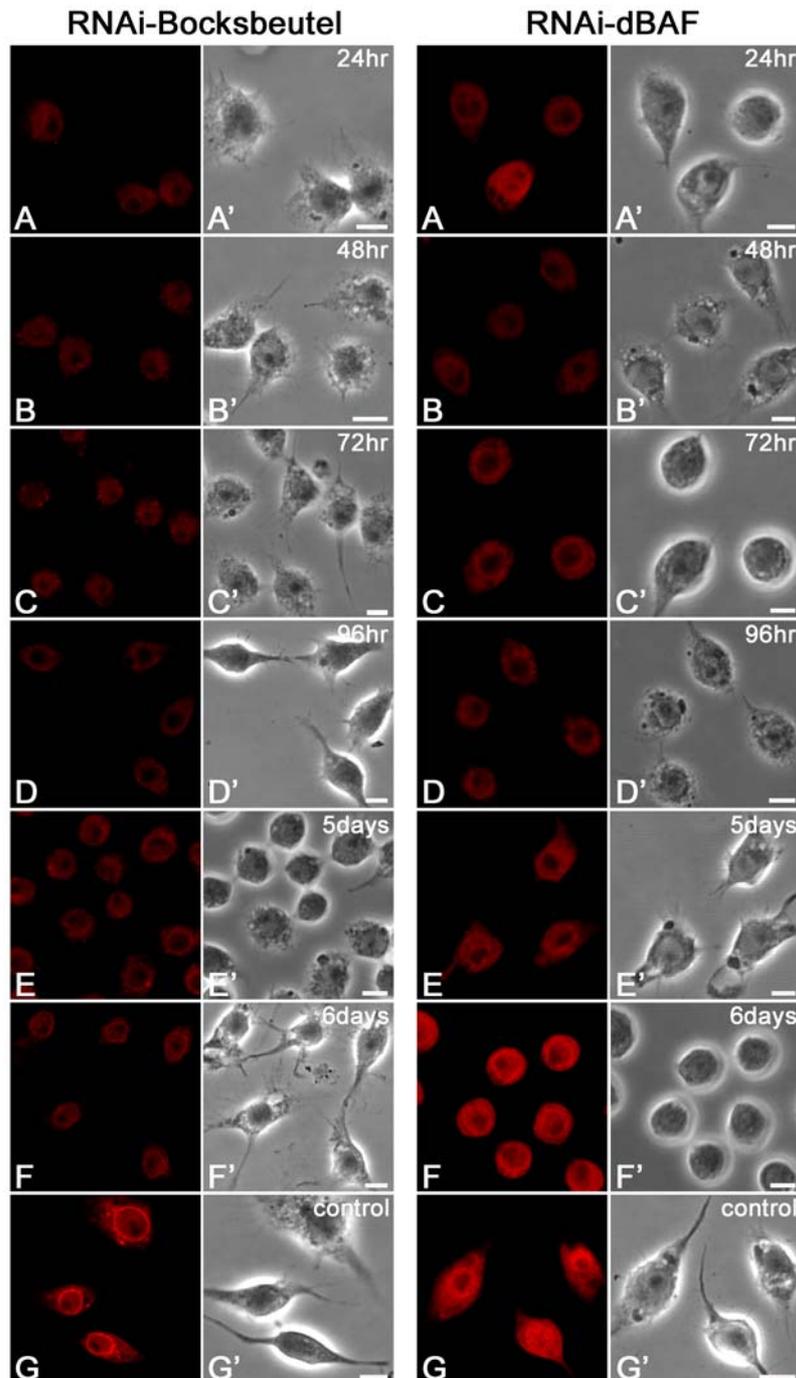


Abb. 77: Reduktion des Bocksbeutel (RNAi-Bocksbeutel) und dBAF (RNAi-dBAF) in *Drosophila* Kc167 Zellen durch RNA Interferenz (RNAi)

*Drosophila* Kc167 Kulturzellen wurden mit dsRNA, spezifisch für das Bocksbeutel oder dBAF kodierende Gen transfiziert (A - H) oder mit dem identischen Volumen Kulturmedium inkubiert (G) und durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie im Zeitraum von 24h (A), 48h (B), 72h (C), 96h (D) 5 Tagen (E) und 6 Tagen (H) nach der Transfektion analysiert.

A'- G') Phasenkontrastaufnahmen

Eichstriche: 10  $\mu$ m

Zur Quantifizierung der Reduktion der Expression der beiden Proteine Bocksbeutel und dBAF in *Drosophila* Kc167 Zellen wurden proportionale Mengen von transfizierten Zellen

(Abb. 78 Spuren 3 und 4) und Kontrollzellen (Abb. 78 Spuren 1 und 2) nach 72 h im Immunblot analysiert.

In den mit Bocksbeutel dsRNA transfizierten Kc167 Zellen kann eine drastische Reduktion des endogenen Bocksbeutel nachgewiesen werden (Abb. 78 A, Spuren 3 und 4), während die Expression des zur Kontrolle analysierten dLBR (Abb. 78 B) und Tubulin (Abb. 78 C) nicht beeinflusst wird. Ebenso wird auch die Expression des dBAF in den mit dBAF dsRNA transfizierten Zellen stark reduziert (Abb. 78 D, Spuren 3 und 4), während die Synthese des zur Kontrolle untersuchten Tubulin (Abb. 78 E) nicht beeinflusst wird.

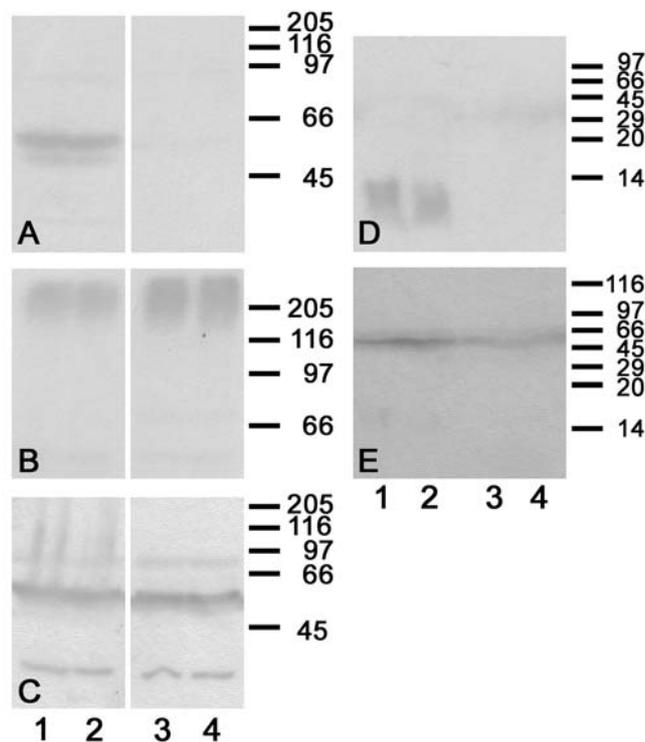


Abb. 78: Reduktion des Bocksbeutel (A - C) und dBAF (D, E) in *Drosophila* Kc167 Zellen durch RNA Interference (RNAi)

*Drosophila* Schneider Kc167 Kulturzellen wurden mit dsRNA, spezifisch für das Bocksbeutel (A – C) oder dBAF (D – E) kodierende Gen transfiziert oder mit dem identischen Volumen Kulturmedium inkubiert. Nach 72 h wurden proportionale Mengen (125.000 Zellen) der transfizierten Zellen (Spuren 3 und 4) und Kontrollzellen (Spuren 1 und 2) durch 10% bzw. 18% SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und im Immunblot mit den polyklonalen Antikörpern Bocks/gII (A) und dBAF/gI (D) oder zur Kontrolle mit Antikörpern gegen dLBR (B) und  $\alpha$ -Tubulin (C, E) inkubiert.

Referenzproteine unterschiedlichen Molekulargewichts sind in kD angegeben.

Der Einfluss der Reduktion des Bocksbeutel durch RNAi auf die Expression und Verteilung des dBAF sowie der nukleären Proteine Lamin Dm0, Lamin C, dLBR und Otefin (Abb. 79) und vice versa (Abb. 80) wurden in mit dsRNA transfizierten *Drosophila* Kc167 Kulturzellen

(Abb. 79 RNAi-Bocksbeutel; Abb. 80 RNAi-dBAF) sowie Kontrollzellen (Abb. 79 - 80, control) 72 h nach der Transfektion durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert.

Zusätzlich zu der Untersuchung der Depletion des dBAF in Kulturzellen sollten auch die Effekte dessen Reduktion in der Embryogenese von *Drosophila melanogaster* durch die Mikroinjektion der dBAF dsRNA in Embryonen des 2. Embryonalstadiums analysiert werden (Abb. 81).

In den Kontrollzellen ist eine starke Färbung der Kernhülle durch das Antiserum Bocks/gl zu erkennen, ebenso ist eine schwächere Färbung des Nukleoplasmas und des Cytoplasmas zu beobachten (Abb. 79, control A - E). Der Barrier-to-Autointegration Factor von *Drosophila melanogaster* (dBAF) weist eine homogene Verteilung im Nukleoplasma unter Aussparung des Nukleolus sowie eine schwache cytoplasmatische Verteilung in den Kc167 Zellen auf (Abb. 80, control A - D).

Die Depletion der mRNAs von Bocksbeutel und dBAF resultiert in einer starken Reduktion der Expression beider Proteine (Abb. 79 RNAi-Bocks, A - E; Abb. 80 RNAi-dBAF, A - D). Während die Kernhülle in den mit Bocks/gl inkubierten transfizierten Kc167 Zellen nicht mehr sichtbar ist (Abb. 79 RNAi-Bocks, A - E), scheint die Reduktion des dBAF in den mit dBAF dsRNA transfizierten Zellen auf das Nukleoplasma beschränkt zu sein; interessanterweise kann in 60 – 70 % der Zellen eine schwache Färbung der Kernhülle mit den dBAF/gl Antikörpern festgestellt werden (Abb. 80 RNAi-dBAF, A - D). Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass die Halbwertszeit des eventuell mit der Lamina assoziierten dBAF wesentlich höher ist als das homogen im Nukleoplasma verteilte Protein.

In den mit Bocksbeutel dsRNA transfizierten Zellen kann, verglichen mit den Kontrollzellen, kein Einfluss auf die Expression und Lokalisation des *Drosophila* BAF festgestellt werden (Abb. 79 A'). Ebenso hat die Depletion des dBAF durch RNAi, verglichen mit den Kontrollzellen, keinen Einfluss auf die intrazelluläre Verteilung des Bocksbeutel in den untersuchten Kc167 Zellen (Abb. 80 A').

Die Reduktion der Expression des dBAF hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Lokalisation der integralen und assoziierten Membranproteine dLBR, Lamin Dm0 und Lamin C (Abb. 80 D', B', C'). Während die Expression einer dominant negativen Mutante des menschlichen BAF in einer fehlerhaften Lokalisation der Membranproteine Emerin, LAP2 $\beta$  und Lamin A in HeLa Kulturzellen resultiert (Haraguchi et al., 2001), kann in dBAF depletierten Kc167 Zellen keine Veränderung der Lokalisation des Lamin C (Abb. 80 C') oder der untersuchten integralen Kernmembranproteine festgestellt werden (Abb. 80 A', D'). Das im Bereich der Kernmembran zu detektierende dBAF scheint in den transfizierten Zellen für die korrekte Verteilung der Kernmembranproteine und für die Vitalität der Kulturzellen ausreichend zu sein, da im Vergleich zu den Kontrollzellen kein Einfluss der Reduktion der Expression des dBAF durch RNAi auf die Morphologie und Vitalität der transfizierten Kc167 Zellen beobachtet werden kann.

Wie in den mit dBAF dsRNA transfizierten Kulturzellen kann auch in der Embryogenese der dBAF depletierten, mikroinjizierten Embryonen kein Effekt der Reduktion des dBAF auf die

Entwicklung und Lebensfähigkeit der Tiere festgestellt werden (Abb. 81). Während in Quetschpräparaten von 48h alten Tieren eine deutliche Reduktion des dBAF durch RNAi (Abb. 81 A, B) im Vergleich zu nicht injizierten Kontrolltieren (Abb. 81 C, D) in der Immunfluoreszenz festgestellt werden kann, ist keine Beeinflussung der Verteilung des endogenen Lamin Dm0 (Abb. 81 A', B') sowie der Entwicklung der Tiere zu beobachten. Alle injizierten Tiere entwickeln sich im Vergleich zu den nicht injizierten Kontrolltieren unauffällig und erreichen nach 48 h Entwicklung bei 18°C das erste Larvalstadium.

Auch durch die Depletion des Bocksbeutel in Kc167 Kulturzellen wird die Expression und Lokalisation der integralen und assoziierten Membranproteine dLBR, Otefin, Lamin Dm0 und Lamin C nicht beeinflusst (Abb. 79 E', D', B', C').

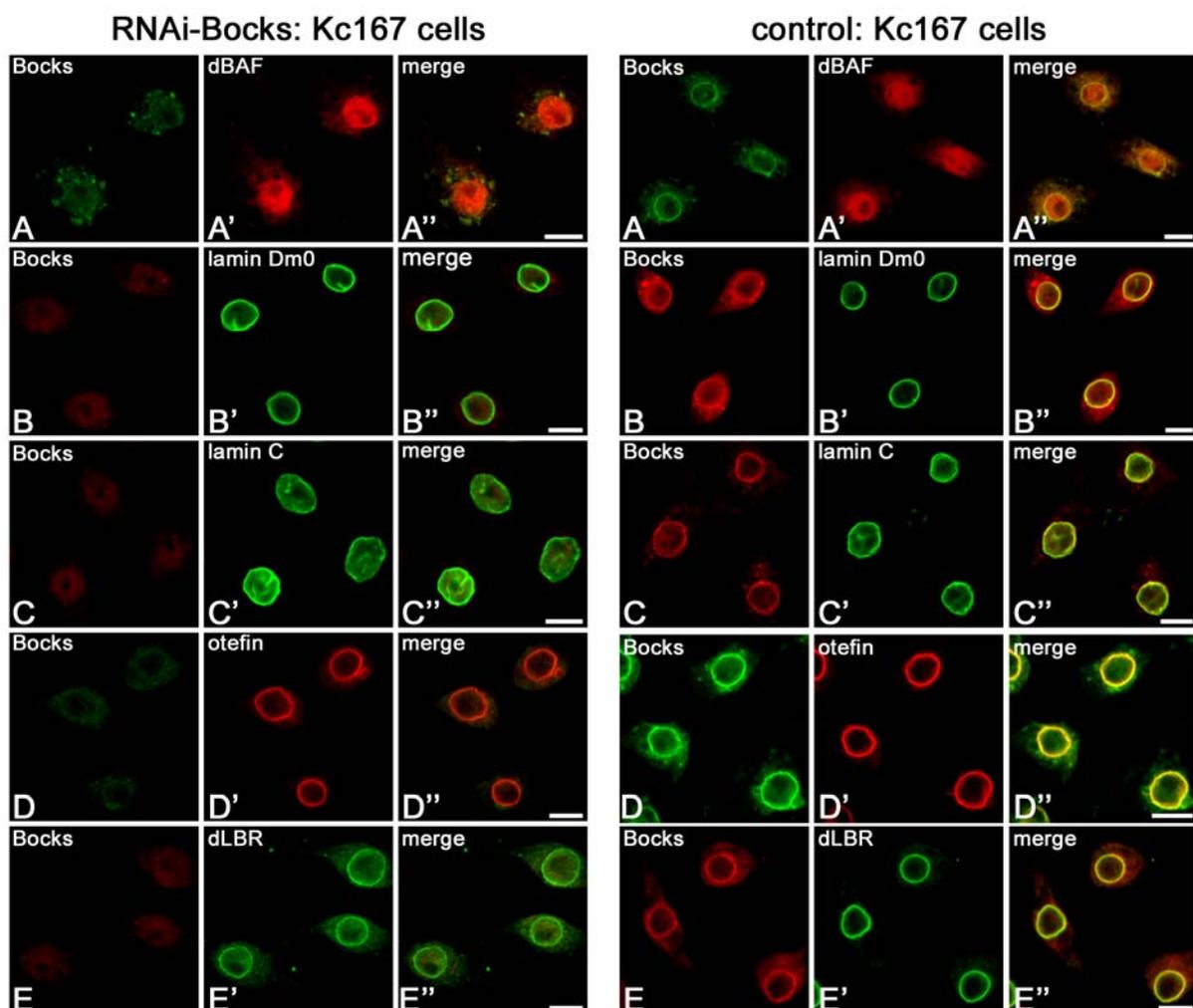


Abb. 79: Reduktion des Bocksbeutel in *Drosophila* Kc167 Zellen durch RNA Interference (RNAi) *Drosophila* Kc167 Kulturzellen wurden mit dsRNA, spezifisch für das Bocksbeutel kodierende Gen CG9424 transfiziert (RNAi-Bocks A – E) oder mit dem identischen Volumen Kulturmedium inkubiert (control A - E) und die Expression und Lokalisation der Proteine dBAF (A') Lamin Dm0 (B'), Lamin C (C'), Otefin (D') und dLBR (E') durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie 72 h nach der Transfektion analysiert.

A'' - E'') Überlagerung der Abbildungen A+A' – E+E'

Eichstriche: 10 µm

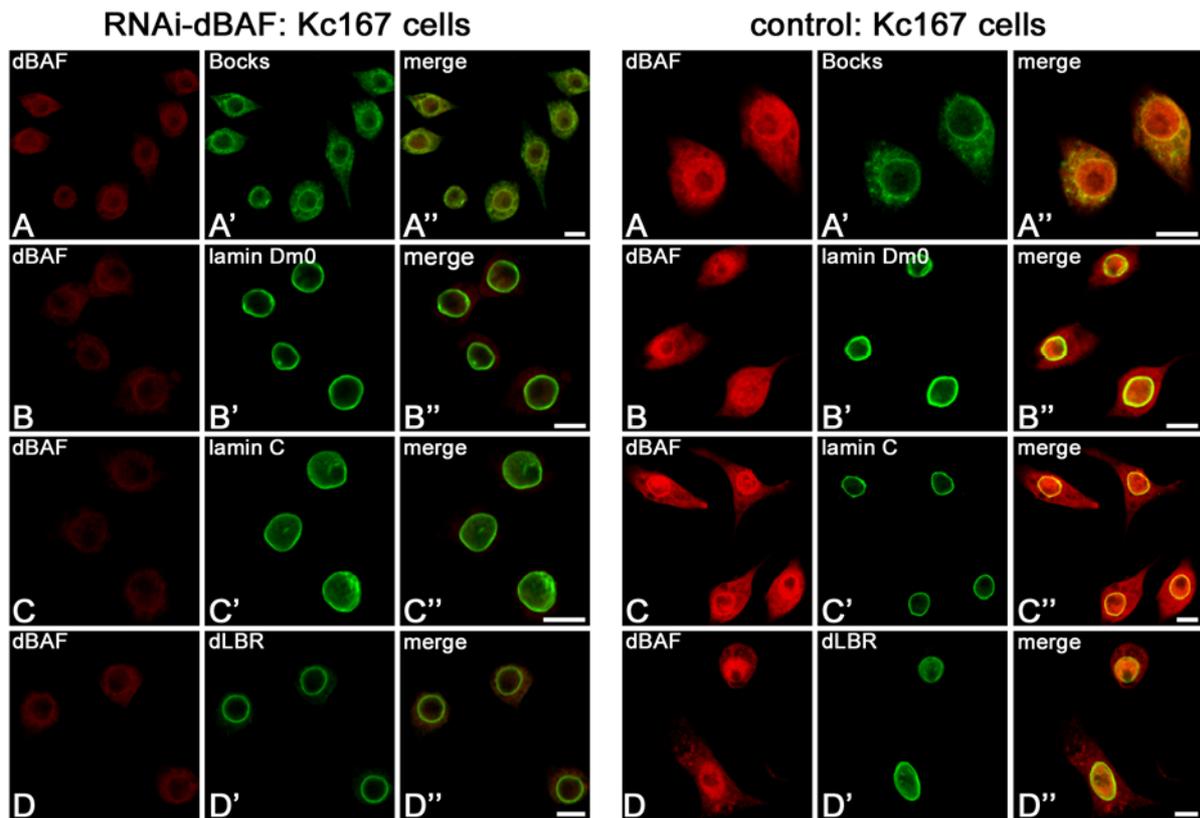


Abb. 80: Reduktion des dBAF in *Drosophila* Kc167 Zellen durch RNA Interferenz (RNAi)  
*Drosophila* Kc167 Kulturzellen wurden mit dsRNA, spezifisch für das dBAF kodierende Gen CG7380 transfiziert (RNAi-dBAF A – D) oder mit dem identischen Volumen Kulturmedium inkubiert (control A - D) und die Expression und Lokalisation der Proteine Bocksbeutel (A') Lamin Dm0 (B'), Lamin C (C'), und dLBR (D') durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie 72 h nach der Transfektion analysiert. A''- D'') Überlagerung der Abbildungen A+A' – D+D' Eichstriche: 10  $\mu$ m

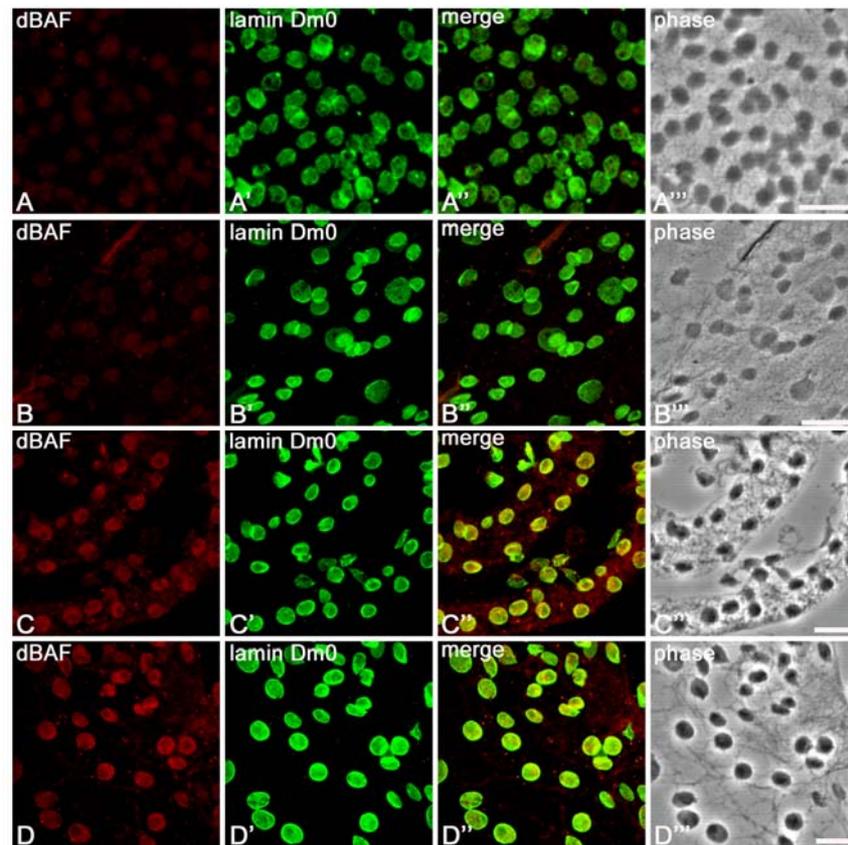


Abb. 81: Reduktion des dBAF in Embryonen von *Drosophila melanogaster* durch RNA Interference (RNAi)

Embryonen des 2. Embryonalstadiums wurden mit dsRNA, spezifisch für das dBAF kodierende Gen CG7380 mikroinjiziert und die Expression und Lokalisation des dBAF (A - D) sowie des Lamin Dm0 (A' - D') auf Quetschpräparaten von injizierten (A, B) und nicht injizierten Kontroll-Embryonen (C, D) 48 h nach der Mikroinjektion durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert.

A''- D'') Überlagerung der Aufnahmen A+A' - D+D'

A'''- D''') Phasenkontrastaufnahmen

Eichstriche: 10  $\mu$ m

### III.3.10.2 Einfluss der Reduktion des Lamin Dm0 durch RNAi auf die Expression und Lokalisation der Proteine Bocksbeutel, Otefin, dLBR, und Nukleoporin

Die Depletion der LEM-Domänen Proteine Otefin und Bocksbeutel scheint in Kulturzellen und in den ersten Embryonalstadien des Invertebraten *Drosophila melanogaster* keinen Einfluss auf die Verteilung der A- und B- Typ Lamine zu haben.

Dagegen beeinflusst die Depletion des Lamin Dm0 in Kc167 Zellen ebenfalls die Verteilung und Retention des mit Lamin Dm0 interagierenden Membranproteins Otefin.

Um zu analysieren, ob die Expression und korrekte Lokalisation des Lamin Dm0 auch für die Verteilung und Retention des LEM-Domänen Proteins Bocksbeutel in der inneren

Kernmembran notwendig ist, wurden *Drosophila* Kc167 Kulturzellen mit Lamin Dm0 dsRNA transfiziert (Abb. 82).

Die Depletion des Lamin Dm0 resultiert, wie schon in den Abb. 43 - 45 gezeigt werden konnte, in einer ungleichmäßigen Verteilung des Lamin Dm0, welches oft in großen Aggregaten oder kleineren punkt- oder sichelförmigen Strukturen nachgewiesen werden kann, sowie in der Umverteilung und Aggregation der Kernporenkomplexe. Die Lokalisation des Lamin B Rezeptor sowie des Otefin scheint ebenfalls beeinträchtigt zu werden. Während die Verteilung des dLBR noch sehr homogen erscheint, wird die Lokalisation des Otefin wesentlich stärker beeinflusst.

Um auch die Lokalisation des Bocksbeutel in den Lamin Dm0 depletierten Kc167 Zellen zu untersuchen, wurden Kc167 Zellen wie in III.1.10.3 beschrieben mit Lamin Dm0 dsRNA transfiziert und die transfizierten Zellen sowie nicht transfizierte Kontrollzellen 72 h nach der Transfektion fixiert und die Expression und Lokalisation des Lamin Dm0 sowie der Proteine Bocksbeutel, Otefin und dLBR durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert (Abb. 82).

In den mit Lamin Dm0 dsRNA transfizierten Zellen ist eine deutliche Kolo­kalisierung des Bocksbeutel mit Lamin Dm0 zu erkennen (Abb. 82 B - B''). Während die Regionen der Kernhülle, in denen Aggregate des Lamin Dm0 nachzuweisen sind, auch mit den für Bocksbeutel spezifischen Antikörpern angefärbt werden, ist die Färbung in anderen Bereichen, die keine Lokalisation des Lamin Dm0 mehr aufweisen, reduziert.

Die Verteilung des Otefin in Lamin Dm0 depletierten Kc167 Zellen ist sehr ähnlich und scheint wie die Lokalisation des Bocksbeutel von der korrekten Lokalisation des Lamin Dm0 in der Kernlamina abhängig zu sein (Abb. 82 C'). Während Lamin Dm0 für die Lokalisation und Retention der beiden LEM-Domänen Proteine Bocksbeutel und Otefin in der inneren Kernmembran notwendig zu sein scheint, zeigte die noch sehr homogene Verteilung des Lamin B Rezeptors von *Drosophila melanogaster* in den Lamin Dm0 depletierten Kc167 Zellen (Abb. 82 D'), dass die Kernlamina nicht für die Retention aller Proteine in der inneren Kernmembran essentiell sind.

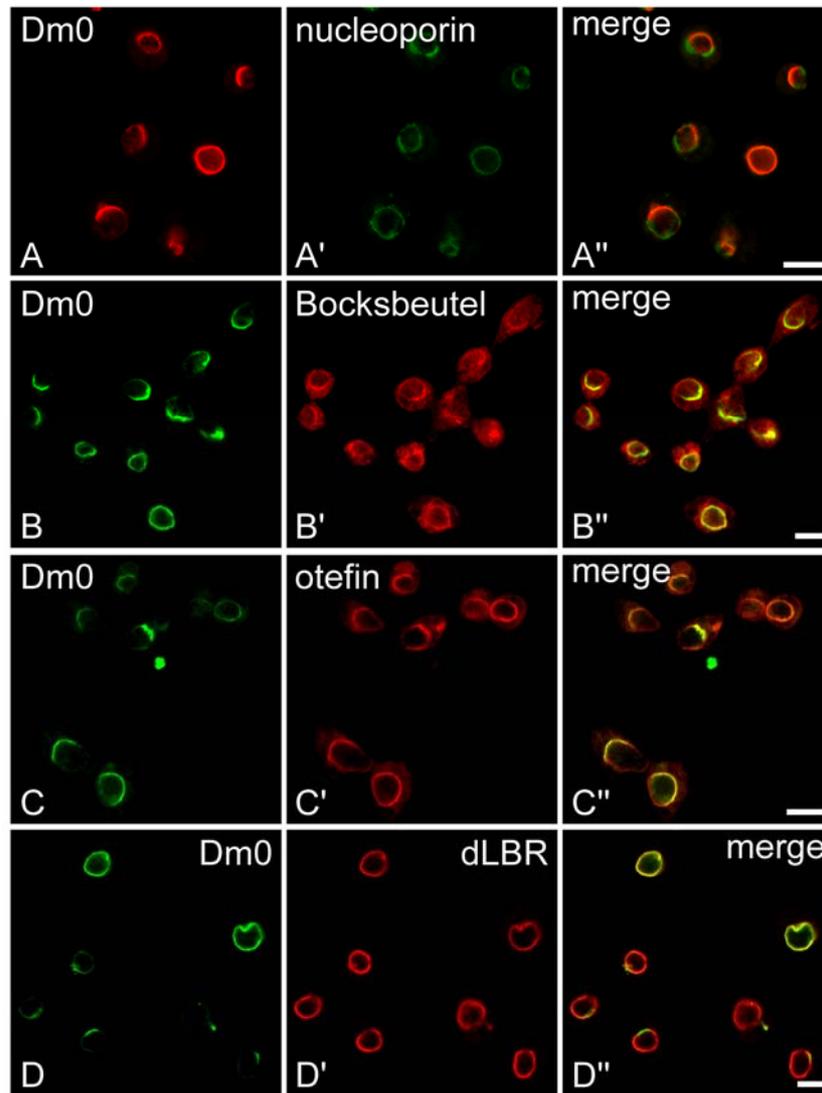


Abb. 82: Reduktion des Lamin Dm0 in *Drosophila* Kc167 Zellen durch RNA Interferenz (RNAi)  
*Drosophila* Kc167 Kulturzellen wurden mit dsRNA, spezifisch für das Lamin Dm0 kodierende Gen transfiziert (A – D) und die Expression und Lokalisation der Proteine Bocksbeutel (B') Otefin (C') und dLBR (D') sowie die Verteilung der Kernporen durch die Lokalisation des Kernporenproteins Nucleoporin (A') durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie 72 h nach der Transfektion analysiert. (A'' – D'') Überlagerung der Abbildungen A+A' – D+D'  
 Eichstriche: 10  $\mu$ m

Obwohl durch die Immunpräzipitations-Studien keine direkte Interaktion des Bocksbeutel mit Lamin Dm0 nachgewiesen werden konnte, scheint die korrekte Lokalisation des Lamin Dm0 sowie eine intakte Lamina dennoch für die Retention der  $\alpha$ -Isoform des Bocksbeutel in der inneren Kernmembran essentiell zu sein.

## IV. Diskussion

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die Identifizierung und Charakterisierung von neuen Proteinen der inneren Kernmembran sowie deren Interaktionspartnern von großer Bedeutung. Sie trägt nicht nur zum besseren Verständnis der Komplexität der Kernhülle, deren Funktion und Beteiligung an einer Vielzahl von regulatorischen Prozessen bei, sondern gewinnt auch im Zusammenhang mit humangenetischen Erkrankungen, die durch Mutationen in Laminen und integralen Membranproteinen verursacht werden, immer mehr an Bedeutung (Übersicht in Gruenbaum et al., 2003).

Während die Zusammensetzung der Kernhülle der Vertebraten bereits sehr intensiv erforscht wurde, waren in dem für die Molekularbiologie und Genetik sehr bedeutenden Modellorganismus *Drosophila melanogaster* nur sehr wenige Proteine der Kernhülle bekannt. Ziel meiner Arbeit war es, neue integrale Kernmembranproteine sowie potentielle Interaktionspartner in *Drosophila melanogaster* zu identifizieren und ihre molekularen und biochemischen Eigenschaften, ihre Bindungseigenschaften und ihre biologischen Funktionen zu charakterisieren.

### IV.1 Identifizierung und Charakterisierung des Lamin B Rezeptor von *Drosophila melanogaster*

Meine molekulare Charakterisierung des von dem Gen C17952 kodierten Proteins bestätigte die Vermutung, dass dieses Protein den Lamin B Rezeptor von *Drosophila* darstellt. Der strukturelle Aufbau des dLBR ähnelt dem der LBR der Vertebraten; so gliedert sich das Protein in zwei strukturell verschiedene Domänen, einer aminoterminalen, im Nukleoplasma lokalisierten Domäne sowie einer sich aus acht Transmembrandomänen zusammensetzenden hydrophoben carboxyterminalen Domäne; weist aber auch bedeutende Unterschiede auf: Während die aminoterminalen Domäne des LBR der Vertebraten in zwei globuläre Domänen gegliedert ist, die durch eine arginin- und serinreiche Linker-Region miteinander verbundenen werden (Duband-Goulet und Courvalin, 2000), weist die aminoterminalen Region des dLBR keine derartige strukturelle Gliederung auf. Ebenso auffällig ist, dass die Transmembrandomänen 1 bis 6 des dLBR, verglichen mit dem LBR der Vertebraten, eine ähnliche Länge und Position aufweisen; die potentiellen Transmembrandomänen 7 und 8 des dLBR jedoch wesentlich kürzer sind (Abb. 83). Es ist bekannt, dass die globulären Domänen sowie die Linker-Region an der Vermittlung verschiedener Interaktionen des Vertebraten LBR mit unterschiedlichen Bindungspartnern, einschließlich B-Typ Laminen und Chromatin, beteiligt sind. Trotz der großen strukturellen Unterschiede, konnte dennoch durch Immunpräzipitationen und in vitro Bindungsstudien,

auch für die aminoternale Domäne des dLBR eine Interaktion sowohl mit B-Typ Laminen, als auch mit Chromatin nachgewiesen werden.

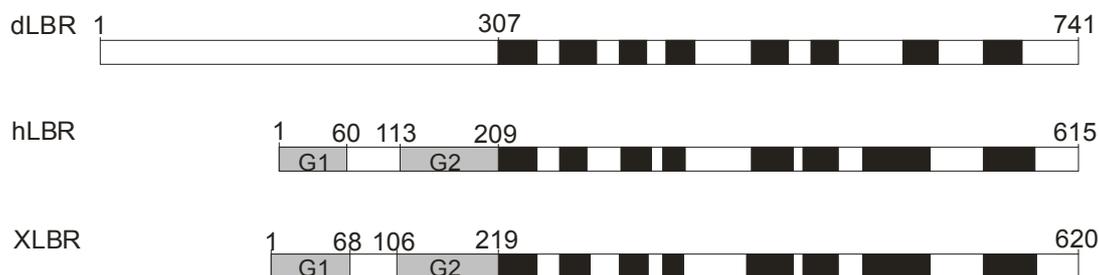


Abb. 83: Schematische Darstellung des Lamin B Rezeptor von Drosophila (dLBR), Mensch (hLBR) und Xenopus (XLBR); die globulären Domänen (G1 und G2) des aminoterminalen Bereiches der Proteine sind grau unterlegt. Die Transmembrandomänen sind schwarz markiert. Die Zahlen geben die Positionen der Aminosäuren bezüglich der Lage im gesamten Protein an.

Besonders auffällig ist die strukturelle Organisation der carboxyterminalen Domäne, auch bezüglich der untersuchten enzymatischen Aktivität einer Sterol C-14 Reduktase, wie sie für den LBR des Menschen nachgewiesen werden konnte (Silve et al., 1998). Dieses Protein wird zu den Mitgliedern der Sterolreduktase Multigenen Familie gezählt, zu denen neben besagtem LBR des Menschen auch die Sterol C14 Reduktasen von *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana* gezählt werden (Holmer et al., 1998) und die als essentielle Enzyme an der Cholesterol-Synthese beteiligt sind. Obwohl Insekten wie auch Nematoden den Tierklassen angehören, die nicht in der Lage sind, Cholesterol de novo zu synthetisieren und dieses essentielle Protein mit der Nahrung aufnehmen müssen (Übersicht in Rawson, 2003 und Kurzchalia und Ward, 2003), zeigte überraschenderweise die Suche mit der Sequenz der endogenen Sterol C14 Reduktase von *Saccharomyces cerevisiae* (ERG24, Accession Nummer: M99419) in der Gendatenbank von *Drosophila melanogaster* (Flybase: <http://flybase.bio.indiana.edu/>) eine hohe Übereinstimmung der Sterol C14 Reduktase mit dem Lamin B Rezeptor von Drosophila (score: 177,  $1.5e^{-19}$ ). Trotz der Ähnlichkeit konnte nachgewiesen werden, dass der dLBR nicht über die Fähigkeit verfügt, die spezifischen Defizienzen des Hefestammes *erg24* zu komplementieren und somit keine Sterol C14 Reduktase Aktivität aufweist. Betrachtet man die carboxyterminale Region des menschlichen LBR (hLBR) und des dLBR mit der Sterol C14 Reduktase von *Saccharomyces cerevisiae* (ERG24), fällt sofort die doch recht große Übereinstimmung zwischen hLBR und ERG24 (Aminosäuren 200-615 des hLBR, 41% Identität), verglichen mit der wesentlich geringeren Ähnlichkeit des dLBR mit der Sterol C14 Reduktase (Aminosäuren 301-741 des dLBR, 17% Identität), auf. Dieser Unterschied ist im Bereich der 7. und 8. Transmembrandomäne des dLBR am größten, die sich deutlich in ihrer Länge und Zusammensetzung von denen der Vertebraten-Proteine unterscheiden. Da die enzymatische Aktivität der Sterol C14 Reduktasen und des hLBR in den hinteren Transmembrandomänen



in *Drosophila* verlorenen Enzymen, gezählt werden kann. Die genauere Betrachtung der verkürzten 6. und 7. Transmembrandomänen des dLBR unterstützt diese Hypothese. Auffällig ist, dass die Region (Aminosäuren 575 – 632 des dLBR), welche in dem hLBR Bereiche der 7. Transmembrandomäne darstellt, einige hydrophile Aminosäuren aufweist. Der Austausch nur eines Nukleotides in den betroffenen Aminosäuren resultiert im Ersatz der hydrophilen durch eine hydrophobe Aminosäure (beispielsweise Aminosäureposition 589: ACT, kodierend für Threonin → ATT, kodierend für Isoleucin). Wird mit dieser veränderten Sequenz des dLBR eine neue Strukturanalyse durchgeführt, wird die 7. Transmembrandomäne des dLBR um die 34 Aminosäuren verlängert. Dies führt zu der Spekulation, dass sich im Laufe der Evolution der Invertebraten in diesem relevanten Aminosäurebereich eine Punktmutation etablieren konnte, die den Austausch einer hydrophoben Aminosäure durch eine hydrophile und damit die Verkürzung der 7. Transmembrandomäne zur Folge hatte. Durch den damit verbundenen Verlust der enzymatischen Aktivität der carboxyterminalen Domäne des dLBR konnten sich im weiteren Verlauf der Evolution weitere Punktmutationen etablieren, wodurch die sehr viel geringere Ähnlichkeit des dLBR mit der Sterol C14 Reduktase der Bäckerhefe, verglichen mit dem LBR der Vertebraten, erklärt werden könnte. Bis jetzt ist noch unbekannt, ob andere Invertebraten, wie *Anopheles gambiae*, ein für einen LBR kodierendes Gen besitzen. Die Suche in der Datenbank von *Anopheles* zeigt jedoch ebenfalls eine signifikante Ähnlichkeit des Peptides ENSANGP00000015268 mit der Sterol C14 Reduktase sowie der carboxyterminalen Domäne des dLBR.

Es ist noch nicht geklärt, ob der dLBR eine andere Funktion im Lipid-Stoffwechsel übernommen hat, die sich von der enzymatischen Aktivität des Vertebraten LBR unterscheidet. Es ist jedoch bekannt, dass hoch konservierte Proteine in *Drosophila* und Säugern, die in der Lipidsynthese involviert sind, während der evolutiven Entwicklung verschiedene Funktionen übernommen haben. SREBPs (**S**terol **R**egulatory **E**lement **B**inding **P**roteins) und deren Interaktionspartner sind an der Regulation der Lipidsynthese beteiligt. Während jedoch in Säugern die Cholesterolsynthese durch eine Cholesterol gesteuerte Rückkopplung durch die proteolytische Spaltung der SREBPs reguliert wird, wird in *Drosophila* derselbe Stoffwechselweg nicht durch Cholesterol, sondern durch Phosphatidylethanolamin reguliert und bedingt die Synthese anderer Lipide aber nicht die von Sterolen (Dobrosotskaya et al., 2002; Übersicht in Kurzchalia und Ward, 2003). Ergänzende Studien zur enzymatischen Aktivität des dLBR könnten somit eine potentielle Funktion der carboxyterminalen Domäne des dLBR in der Lipidbiosynthese aufzeigen.

Neben den strukturellen Gemeinsamkeiten weist der dLBR interessanterweise auch ähnliche biochemische Eigenschaften, verglichen mit denen der LBR der Vertebraten, auf. Das auffällige Laufverhalten dieses Proteins in der SDS-PAGE konnte ebenso bei dem LBR von *Xenopus laevis* (XLBR) sowie dem LBR von *Gallus gallus* beobachtet werden. Alle drei Polypeptide weisen bezüglich ihres errechneten Molekulargewichtes eine wesentlich höhere

Mobilität auf (dLBR: Mr 66.000 anstatt 83.000). Auch die ungewöhnliche Aggregation des dLBR, die im Immunblot als „Schmier“ oberhalb von 205 kDa zu erkennen ist, konnte schon bei der Charakterisierung des XLBR beobachtet werden.

## IV.2 Mögliche biologische Funktionen des dLBR

Die Depletion des dLBR in Kulturzellen sowie während der frühen Embryogenese durch RNA interference hatte keinen sichtbaren Effekt auf die Morphologie der Zelle und der Kernhülle sowie auf die Verteilung anderer nukleärer Proteine. Auch die Entwicklung der mit dLBR-dsRNA mikroinjizierten Embryonen unterschied sich nicht von den nicht injizierten Kontrolltieren. Die gleichzeitige Depletion des dLBR und des bislang einzigen zusätzlichen, mit Laminen assoziierten Membranproteins von *Drosophila* -dem Otefin- durch RNAi scheint die mechanische Stabilität der Kernhülle ebenfalls nicht zu beeinflussen. Die Depletion von Membranproteinen, einschließlich LAP2 und Emerin in Säugerzellen durch RNAi hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Integrität der Kernlamina und der Kernhülle (Harborth et al., 2001). Die Depletion dieser Proteine durch RNA interference sowie weitere Untersuchungen die zeigen konnten, dass in Oozyten von *Xenopus laevis* die Expression des LBR so gering ist, dass sie durch immunfluoreszenzmikroskopische Analysen nicht detektiert werden kann, bekräftigt die Vermutung, dass der LBR, ebenso wie andere integrale Membranproteine, für die mechanische Stabilität der Zelle nicht essentiell ist. Da die endogenen Proteine durch die RNAi nicht vollständig depletiert werden können, ist es jedoch auch nicht auszuschließen, dass die kleine, verbleibende Menge des dLBR ausreicht, um eine normale Organisation und Funktion des Zellkerns zu gewährleisten. Im Gegensatz dazu resultiert eine vergleichbare Reduktion des vermutlich mit dem dLBR interagierenden Lamin Dm0 in Kulturzellen und während der Embryogenese von *Drosophila melanogaster* durch RNAi oder durch P-Element Insertionen im kodierenden Gen in einer erheblichen Veränderung der Morphologie des Zellkerns und dem Arrest der Entwicklung (III.1.10.3, Lenz-Böhme et al., 1997). Auch die Untersuchungen der Depletion des Ce-Lamin von *C. elegans* sowie der Lamine B1 und B2 in Säugerzellen belegen, dass B-Typ Lamine essentiell für die Integrität der Kernhülle sind, da auch deren Depletion die Morphologie der Kernhülle nachteilig beeinflusst und die Apoptose der Zellen oder den Arrest der Entwicklung zur Folge hat (Liu et al., 2000; Harborth et al., 2001; Cohen et al., 2002; Übersicht in Gruenbaum et al., 2003).

Wie bereits erwähnt, scheint die Depletion des dLBR durch RNAi keinen sichtbaren, nachteiligen Einfluss zu haben. Es ist noch nicht bekannt, ob der dLBR ein essentielles Protein darstellt. Die Untersuchungen der P-Element Insertionslinie 11341 zeigen zwar, dass die Insertion dieses P-Elementes 990 Basenpaare vor dem Translationsstart des dLBR in den homozygoten Tieren lethal ist, es konnte jedoch keine veränderte Expression des dLBR festgestellt werden. Auch der „Rough-Eye“-Phänotyp der homozygoten Fliegen ist ein sehr häufig zu beobachtender Phänotyp. Es ist daher nicht eindeutig nachzuweisen, ob die P-

Element Insertion die Expression des dLBR in der Fliege tatsächlich beeinflusst oder ob der Phänotyp auf die Störung der Expression eines benachbarten Genes zurückzuführen ist. Die Vermutung, dass der dLBR in der embryonalen Entwicklung nicht essentiell zu sein scheint, wie die Depletion des Proteins durch RNAi in der frühen Embryogenese zeigen konnte, wird durch die beschriebenen Mutationen im humanen LBR Gen sowie Mutationen im homologen *ichtyosis* Genlocus der Maus bekräftigt. Die autosomal rezessive Form der Mutation im LBR kodierenden Gen des Menschen wurde als Hydrops-ectopic calcification-“moth-eaten” (HEM) oder Greenberg skeletale Dysplasie beschrieben (Waterham et al., 2003), während die klassische „Pelger Huët Anomalie“ die heterozygote Form repräsentiert (Hoffman et al., 2002; Gastearna et al., 1999). Die betroffenen Mäuse und menschlichen Individuen weisen ein geno- und phänotypisch ähnliches Erscheinungsbild auf, einschließlich einer verstärkten pränatalen Mortalitätsrate (in ca. 40 – 50% der Mäuse), sowie schwere Entwicklungsdefekte die zu Störungen der enchondralen Knochenbildung und des Längenwachstums der Knochen (Chondrodystrophie) und zur Ausbildung eines Wasserkopfes führen. Westernblot- und immunfluoreszenzmikroskopische Analysen zeigen eine starke Reduktion der Expression des LBR; ein verkürztes Protein, das eventuell dominant negativ agieren könnte, wurde nicht nachgewiesen. Während in den meisten Zellen eine zwar reduzierte, aber dennoch normale Lokalisation und Verteilung des LBR in der inneren Kernhülle nachgewiesen werden konnte, manifestiert sich die Mutation in den heterozygoten Individuen vor allem in einem veränderten Erscheinungsbild der lymphoblastoiden Zellen: Die Zellen weisen eine mehrlappige Morphologie und eine verstärkte Kondensation des Chromatins auf (Horn et al., 2000; Trajovski et al., 2002; Shultz et al., 2003; Waterham et al., 2003). Eine derartige, veränderte Morphologie der Zellen und Verteilung des Chromatins konnte in den dLBR depletierten Zellen von *Drosophila* nicht beobachtet werden. Wie aber lassen sich diese phänotypischen Unterschiede zwischen der Depletion des dLBR in dem Invertebraten *Drosophila* und der Manifestation der beschriebenen Symptome in Maus und Mensch erklären? Eine Spekulation erwächst aus der Tatsache, dass die carboxyterminale Domäne des dLBR im Gegensatz zum LBR des Menschen keine enzymatische Aktivität einer Sterol C14 Reduktase aufweist. Da vermutet wird, dass das klinische Erscheinungsbild der HEM und PHA vor allem auf die gestörte funktionelle Aktivität der carboxyterminalen Domäne des LBR zurückzuführen ist, ist es eventuell möglich, dass durch die Depletion des dLBR in *Drosophila* die Lipidsynthese, verglichen mit der der Vertebraten, nicht beeinflusst wird. Die Einordnung der HEM und der PHA in die Gruppe der klassischen humanen Erbkrankheiten, deren phänotypische Erscheinungsbilder sich sehr ähneln und alle auf Defekte in der Sterolbiosynthese zurückzuführen sind, bekräftigen die Vermutung, dass die zu beobachtenden Phänotypen, die durch Mutationen im LBR Genlocus verursacht werden, ausschließlich auf die Störung des Sterolstoffwechsels zurückzuführen sind. Inwieweit die aminoternale Domäne des LBR, die ebenfalls mit einer Vielzahl nukleärer Proteine zu interagieren vermag, an der

Manifestation dieser Erkrankungen beteiligt ist, ist noch nicht bekannt. Auch die Frage, ob der dLBR funktionell im Lipidstoffwechsel involviert ist, ist noch zu klären.

### **IV.3. Identifizierung und Charakterisierung der beiden Bocksbeutel Isoformen von *Drosophila melanogaster***

Im Rahmen meiner Diplomarbeit ist es mir gelungen, durch die Suche mit der konservierten LEM-Domäne der beiden Proteine MAN1 von *Caenorhabditis elegans* und LAP2 $\beta$  von *Danio rerio* (Accession Nummern: NP496944, CAC86206) das Gen CG9424 zu identifizieren, dass nach publizierten Daten der Gendatenbank von *Drosophila melanogaster* (Flybase: <http://flybase.bio.indiana.edu/>) für ein LEM-Domänen Protein, welches als Bocksbeutel bezeichnet wird, kodieren sollte, dass in seiner aminoterminalen Region über ein konserviertes LEM-Motiv sowie eine putative Transmembrandomäne nahe des Carboxyterminus verfügen sollte. Der Vergleich der Sequenzierung des EST-Klones LD45742 (Accession Nummer: AI513462; Celera Genetics; Invitrogen), der die gesamte cDNA des Gens CG9424 enthalten sollte, mit der in den Gendatenbanken publizierten Sequenz zeigte die Existenz eines zusätzlichen Splice-Donor und Splice-Akzeptor im carboxyterminalen Bereich des Gens CG9424 auf. Das von dieser cDNA synthetisierte Protein zeichnete sich durch das Fehlen der carboxyterminalen Transmembrandomäne aus. Die auffällige Diskrepanz zwischen der Lokalisation des endogenen Bocksbeutel in der indirekten Immunfluoreszenz und der Expression des verkürzten Polypeptids als GFP-Fusionsprotein führte zur Annahme, dass in *Drosophila melanogaster* eventuell zwei Isoformen des Gens CG9424 exprimiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit habe ich die eventuell vorhandene zweite Isoform, deren Sequenz der von Celera Genetics publizierten Sequenz entsprechen sollte und die über eine potentielle Transmembrandomäne verfügt, näher charakterisiert und mit der verkürzten Isoform verglichen werden.

Durch RT-PCR Analysen konnte bestätigt werden, dass von dem Gen Bocksbeutel durch Prozessierung zwei Isoformen synthetisiert werden, die sich durch die Existenz einer Transmembrandomäne unterscheiden. Unter anderen Genen, die für Proteine mit LEM-Domänen kodieren, konnten ähnliche Spleiß-Varianten nur für die Lamina-assoziierten Polypeptide (LAPs) beschrieben werden (Berger et al., 1996, Schoft et al., 2003; Übersicht in Gruenbaum et al., 2003).

Die Expression der beiden Bocksbeutel Isoformen als GFP-Fusionsproteine in transfizierten Kulturzellen konnte zeigen, dass sich die Lokalisation der beiden Proteine in Abhängigkeit ihrer carboxyterminalen Region unterscheidet: Während die verkürzte 351 Aminosäuren lange  $\beta$ -Isoform im Nukleoplasma der transfizierten Zellen verteilt vorlag, konnte bei der die potentielle Transmembrandomäne aufweisende, 399 Aminosäuren langen  $\alpha$ -Isoform eine Lokalisation in der Kernperipherie beobachtet werden.

Die unterschiedliche Lokalisation der beiden als GFP Fusionsproteine exprimierten Isoformen deutet darauf hin, dass die nukleoplasmatische Domäne des Bocksbeutel kein zusätzliches Lokalisationssignal, welches für die Lokalisation des Proteins in der inneren Kernmembran ausreichend ist, aufweist. Im Gegensatz zu anderen integralen Membranproteinen, wie dem Lamin B Rezeptor des Menschen, der ein zusätzliches Lokalisationssignal in der nukleoplasmatischen Domäne aufweist, welches ebenfalls für die Lokalisation des Proteins in der inneren Kernmembran ausreichend ist (Smith und Blobel, 1993; Soullam und Worman, 1993; Ellenberg et al., 1997), scheint die Transmembrandomäne für die Lokalisation und Retention der  $\alpha$ - Isoform in der inneren Kernmembran essentiell zu sein.

#### **IV.4 Expressionsmuster der beiden Bocksbeutel Isoformen**

Die Immunlokalisationen und Extraktionsstudien führten zu der Annahme, dass die  $\alpha$ -Isoform die dominierende exprimierte Isoform in den untersuchten Kulturzelllinien zu sein scheint. Die Expression der  $\alpha$ -Isoform scheint jedoch nicht in allen Zellen gleichmäßig zu sein. In den embryonalen Zelllinien *Drosophila* Schneider S2 und Schneider S2R+ konnte eine unterschiedlich starke Färbung der Kernhülle durch die Bocksbeutel Antikörper beobachtet werden. Während viele Zellen nur eine sehr schwache Färbung der Kernperipherie aufwiesen, war in Zellen, die sich in der späten Telophase oder Cytokinese befanden, eine verstärkte Kernmembranfärbung zu beobachten. Im Gegensatz zu den embryonalen Zelllinien konnte in der differenzierten Zelllinie Kc167 sowie in Whole mount Präparaten von Ovariengewebe aus *Drosophila* (Urban, 2001) eine wesentlich stärkere Färbung der Kernperipherie in allen Zellen beobachtet werden. Während somit die  $\alpha$ -Isoform in allen untersuchten Kulturzelllinien und Geweben exprimiert zu werden scheint, konnte eine eindeutige Expression der  $\beta$ -Isoform nicht nachgewiesen werden. Obwohl die RT-PCR Analysen sowie die Sequenzierung des EST-Klones belegen, dass die verkürzte Isoform in *Drosophila* exprimiert wird, ist eine Lokalisation des Bockbeutel- $\beta$  in der Immunfluoreszenz nicht eindeutig zu bestimmen. Die Expression der  $\beta$ -Isoform als GFP-Fusionsprotein deutet darauf hin, dass dieses Protein im Nukleoplasma lokalisiert ist. Mit den Antikörpern aller vier Antiseren, ebenso wie mit den affinitätsgereinigten Antikörpern, war eine schwache cytoplasmatische und nukleoplasmatische Färbung zu beobachten, es ist allerdings schwierig zu bestimmen, ob diese Färbung auf die Expression der  $\beta$ -Isoform, der  $\alpha$ -Isoform oder auf eine unspezifische Kreuzreaktion der Antikörper zurückzuführen ist. Es ist nicht auszuschließen, dass die Expression des Bocksbeutel- $\beta$  auf spezifische Zellen, Gewebe oder Entwicklungsstadien beschränkt ist. Da sich auch das Expressionsmuster der  $\alpha$ -Isoform in den untersuchten Kulturzelllinien zu unterscheiden scheint, könnte man vermuten, dass beide Bocksbeutel Isoformen gewebe- oder entwicklungspezifisch exprimiert werden. Die gewebe-spezifische Expression konnte bereits für andere Kernmembranproteine,

einschließlich einiger Isoformen der Lamina-assoziierten Polypeptide 2 (LAP2, Lang et al., 1999; Schoft et al., 2003) und keimbahn- oder entwicklungspezifisch exprimierten Laminen (Alzheimer et al., 1999; Hofemeister et al., 2002; Übersicht in Gruenbaum et al., 2003; Krohne, 1998) nachgewiesen werden.

#### **IV.5 Vergleich der beiden Bocksbeutel Isoformen mit anderen LEM-Domänen Proteinen**

Homologe der LEM-Domänen Proteinfamilie finden sich in den Invertebraten *Drosophila* wie auch *C. elegans*, allerdings konnten die LAP2 Proteine bisher nur in Vertebraten identifiziert werden. Interessanterweise zeigen die beiden Bocksbeutel Isoformen einige Gemeinsamkeiten zu den LAP2 Proteinen der Vertebraten. Sowohl die Isoformen des Bocksbeutel, als auch die Isoformen der LAP2 Proteine weisen in ihrer aminoterminalen Domäne ein hoch konserviertes LEM-Motiv auf und entstehen durch differenziertes Spleißen. Auch die Lokalisation der Lamina-assoziierten Polypeptide 2 unterscheidet sich, wie die der beiden Bocksbeutel Isoformen, sehr stark in Abhängigkeit der unterschiedlichen carboxyterminalen Region. Während die Proteine, die über eine Transmembrandomäne verfügen, wie die alternativ gespleißten Isoformen LAP2 $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  des Menschen, in der inneren Kernmembran des Zellkerns lokalisiert sind, liegen die beiden Isoformen LAP2  $\alpha$  und  $\xi$  des Menschen im Nukleoplasma unter Aussparung des Nukleolus vor (Dechat et al., 2000). Eine weitere auffällige Gemeinsamkeit könnte das Expressionsmuster darstellen. Einige Isoformen der LAP2 Proteine werden gewebe- und entwicklungspezifisch synthetisiert, beispielsweise wird das LAP2 $\omega$  in *Xenopus laevis* und *Danio rerio* nur in den frühen Entwicklungsstadien exprimiert (Lang et al., 1999; Schoft et al., 2003). Da, wie schon erwähnt, sich das Expressionsmuster der Bocksbeutel Isoformen von anderen, ubiquitär exprimierten Membranproteinen, wie dem Lamin Dm0 oder dem LBR stark unterscheidet, ist anzunehmen, dass sich auch diese LEM-Domänen Proteine in ihrer Expression unterscheiden. Obwohl die Bocksbeutel Isoformen hinsichtlich ihrer Struktur und ihrem Expressionsmuster denen der LAP2 Proteine scheinbar sehr ähnlich sind, zeigen Sequenzvergleiche der  $\alpha$ -Isoform des Bocksbeutel mit verschiedenen LAP2 Proteinen, wie dem LAP2 $\beta$  von *Danio rerio* (ZLAP2 $\beta$ ) oder LAP2 $\beta$  von *Rattus norvegicus* (LAP2 $\beta$ ), eine nur sehr geringe Ähnlichkeit (Aminosäuren 1 - 399 des  $\alpha$ -Bocksbeutel: 16,8 % Identität mit ZLAP2 $\beta$ ; 16,3 % Identität mit LAP2 $\beta$ ).

Es wird angenommen, dass die LAP2 Proteine vermutlich erst später in der Entwicklung auftraten, wo durch die zunehmende Komplexität des Zellkerns zusätzliche Proteine erforderlich wurden. Während die LEM-Domänen Proteine Emerin und MAN1 auch in Invertebraten wie *C. elegans* identifiziert wurden, konnten sowohl in *Drosophila*, als auch in *C. elegans* bisher keine Homologen der LAP2 Proteine gefunden werden.

Betrachtet man die Bedeutung der in der frühen Embryonalentwicklung exprimierten LAP2-Isoformen, beispielsweise das LAP2 $\omega$  von *Xenopus laevis* und *Danio rerio*, so fällt auf, dass diese beiden Isoformen vermutlich an dem raschen Aufbau der Kernhülle beteiligt sind. In den späteren Entwicklungsstadien werden diese früh exprimierten Isoformen durch die somatischen Isoformen der LAP2 Proteine ersetzt. Die Kernteilungen in den syncytialen frühen Embryonalstadien von *Drosophila melanogaster* scheinen dagegen weniger komplex zu sein als die der Vertebraten, was die Hypothese bekräftigen würde, dass die LAP2 Proteine erst mit der wachsenden Komplexität des Zellkerns auftreten.

Es stellt sich natürlich die Frage, mit welchen bereits identifizierten LEM-Domänen Proteinen anderer Spezies die Bocksbeutel Isoformen verglichen werden können. Zwei weitere, relativ gut charakterisierte Proteine dieser Familie stellen MAN1 und Emerin dar. Sequenzvergleiche zeigen jedoch, dass die Ähnlichkeit der Bocksbeutel Proteine auch mit MAN1 und Emerin sehr gering ist. Auch die vergleichende Genom-Analyse schließt diese beiden Proteine als Homologe vermutlich aus, da in *Drosophila* die beiden potentiellen LEM-Domänen Proteine, kodiert durch die Gene CG3167 und CG3748, eine deutlich höhere Ähnlichkeit mit MAN1 und Emerin aufweisen. Die Suche nach LEM-Domänen Proteinen in *Drosophila* zeigt noch ein weiteres potentielles LEM-Domänen Protein; das durch das Gen CG8679 kodierte Protein weist eine große Ähnlichkeit zum lem-3 von *C. elegans* auf. Ob diese drei Proteine tatsächlich mit den schon charakterisierten MAN1 und lem-3 verwandt sind, muss noch geklärt werden. Eine genaue Einordnung der neuen LEM-Domänen Proteine Bocksbeutel- $\alpha$  und - $\beta$  ist somit noch nicht möglich, die molekulare Charakterisierung der drei neuen potentiellen LEM-Domänen Proteine, kodiert durch die Gene CG3167, CG8679 und CG3748, könnte zum besseren Verständnis dieser Proteinfamilie beitragen.

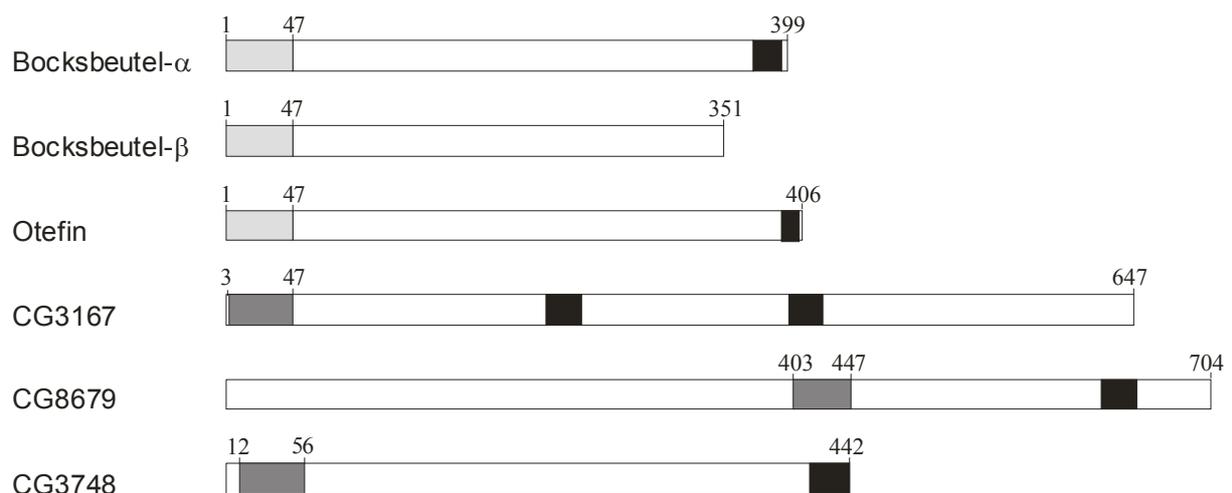


Abb. 85: Schematische Darstellung der LEM-Domänen Proteine (Bocksbeutel- $\alpha$ , Bocksbeutel- $\beta$ , Otefin) und der potentiellen LEM-Domänen Proteine (CG3167, CG8679, CG3748) von *Drosophila melanogaster*. Die LEM-Domänen sind hellgrau, die potentiellen LEM-Domänen sind dunkelgrau, und die (potentiellen) Transmembrandomänen bzw. hydrophoben Segmente (Otefin) sind schwarz markiert. Die Zahlen geben die Positionen der Aminosäuren bezüglich der Lage im gesamten Protein an.

## IV.6 Mögliche biologische Funktionen der Bocksbeutel Isoformen

Die Bocksbeutel  $\alpha$ -Isoform zeigt einige Gemeinsamkeiten mit anderen LEM Domänen Proteinen. Obwohl durch die Immunpräzipitations-Studien keine direkte Interaktion des Bocksbeutel mit Lamin Dm0 nachgewiesen werden konnte, scheint die korrekte Lokalisation des Lamin Dm0 sowie eine intakte Lamina dennoch für die Retention der  $\alpha$ -Isoform des Bocksbeutel in der inneren Kernmembran essentiell zu sein. Auch für die Retention der LEM-Domänen Proteine Otefin, Emerin (Harborth et al., 2001; Gruenbaum et al., 2002) und MAN1 (Liu et al., 2003) sind Kernlamine essentiell. Ebenso gemeinsam ist allen diesen Proteinen, dass deren Depletion durch RNAi scheinbar nicht essentiell für die strukturelle Integrität der Kernhülle in Kulturzellen zu sein scheint. Es ist noch nicht geklärt, ob die beiden bisher identifizierten LEM-Domänen Proteine Otefin und Bocksbeutel bzw. die noch nicht näher charakterisierten potentiellen LEM-Domänen Proteine überlappende Funktionen in *Drosophila* übernehmen. Untersuchungen der LEM-Domänen Proteine MAN1 und Emerin in *C. elegans* konnten zeigen, dass die Reduktion eines der beiden LEM-Domänen Proteine durch RNAi kaum sichtbare Effekte zur Folge hatte, während die gleichzeitige Depletion von Emerin und MAN1 in dem Arrest der Embryogenese resultierte (Gruenbaum et al., 2002; Liu et al., 2003). Es wird vermutet, dass auch LEM-Domänen Proteine anderer Organismen überlappende Funktionen haben.

## IV.7 Identifizierung und Charakterisierung des Barrier-to-Autointegration Factor (dBAF) von *Drosophila melanogaster*

Für zwei Mitglieder der LEM-Domänen Proteinfamilie, LAP2 und Emerin, konnte eine direkte Interaktion mit einem kleinen, DNA-bindenden Protein, dem Barrier-to-Autointegration Factor (BAF) nachgewiesen werden (Lee et al., 2001; Haraguchi et al., 2001; Shumaker et al., 2001; Segura-Totten et al., 2002). Es wird jedoch vermutet, dass BAF auch mit anderen LEM-Domänen Proteinen interagiert und so das Chromatin mit der inneren Kernmembran und indirekt mit der Kernlamina vernetzt (Segura-Totten et al., 2002). Da auch die von mir identifizierten Isoformen des Bocksbeutel von *Drosophila melanogaster* in ihrer gemeinsamen aminoterminalen Region eine LEM Domäne aufweisen, könnten auch diese beiden Proteine potentielle Interaktionspartner des ebenfalls in dieser Arbeit charakterisierten *Drosophila* BAF darstellen. Eine direkte Interaktion dieser beiden Proteine konnte jedoch mit den durchgeführten Immunpräzipitationen nicht nachgewiesen werden. Auch die Depletion des Bocksbeutel hatte keinen Effekt auf die intrazelluläre Lokalisation des dBAF und vice versa.

Die Depletion des dBAF durch RNAi in Kulturzellen und während der frühen Embryogenese scheint ebenfalls die Morphologie des Zellkerns, die Lokalisation anderer nukleärer Proteine

sowie die Lebensfähigkeit der Kulturzellen und der mikroinjizierten Embryonen nicht zu beeinflussen. Interessanterweise konnte bei den dBAF dsRNA transfizierten Zellen keine gleichmäßige Reduktion beobachtet werden. Die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigen, dass stets eine kleine Menge des Proteins mit der Kernhülle assoziiert blieb. Dieser Anteil des endogenen dBAF könnte ausreichend sein, um eine normale Organisation und Funktion des Zellkerns zu gewährleisten. Die Vermutung, dass dBAF in der frühen Embryogenese vermutlich dennoch nicht essentiell ist, zeigen erst kürzlich publizierte Daten der Arbeitsgruppe von Kazuhiro Furukawa, die nachweisen konnten, dass *Drosophila* dBAF Null Mutanten fähig sind, sich bis zum Übergang des larvalen zum pupalen Entwicklungsstadium zu entwickeln (Furukawa et al., 2003).

## IV.8 Perspektiven

Wie bereits erwähnt, konnte in den letzten Jahren eine Vielzahl neuer Proteine der inneren Kernmembran und deren Interaktionspartner in Vertebraten identifiziert werden. Die intensive Erforschung der Zusammensetzung der Kernhülle konnte entscheidend zum Verständnis des komplexen Aufbaus, sowie deren Funktion und Assoziierung mit humangenetischen Erbkrankheiten beitragen. Bis auf die bereits recht gut charakterisierten beiden Kernlaminae (Lamin Dm0, Lamin C) und dem LEM-Domänen Protein sowie die beiden Proteine Germ-Cell Less (GCL) und Young Arrest (YA) waren dagegen keine weiteren Membranproteine des Invertebraten *Drosophila melanogaster* bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit sowie meiner Diplomarbeit war es mir möglich, weitere neue Membranproteine, einschließlich des dLBR, der beiden Isoformen Bocksbeutel- $\alpha$  und Bocksbeutel- $\beta$ , sowie deren potentielle Interaktionspartner, der Barrier-to-Autointegration Factor (dBAF) in *Drosophila melanogaster* zu identifizieren. Durch die molekulare Charakterisierung dieser Proteine konnten neue Erkenntnisse über das Expressionsmuster, die Bindungseigenschaften und die potentiellen biologischen Funktionen von Kernmembranproteinen sowie die Komplexität der Kernlamina in *Drosophila* gewonnen werden. Die so erworbenen Informationen wurden in einer schematischen Darstellung der Kernhülle von *Drosophila* zusammengetragen. Die noch nicht näher charakterisierten potentiellen Interaktionen, die sich auf die schon intensiv erforschten Bindungen homologer oder ähnlicher Proteine in Vertebraten beziehen, sind mit einem Fragezeichen gekennzeichnet.

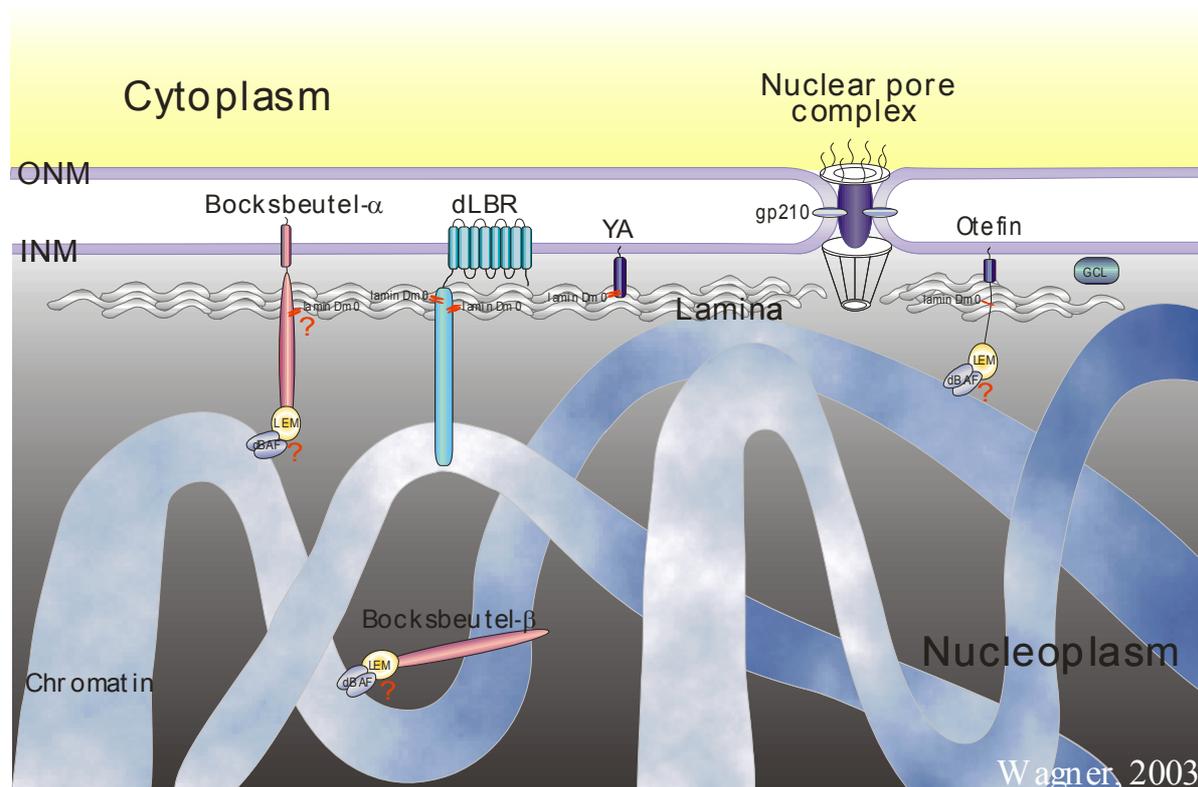


Abb. 86: Schematische Darstellung der Kernhülle und des angrenzenden Chromatins von *Drosophila melanogaster*.

Der Nachweis, dass der dLBR über keine Sterol C14 Reduktase verfügt, führt zu der Frage, ob der dLBR noch in der Lipidsynthese von *Drosophila* involviert ist. Wie schon erwähnt, ist bekannt, dass hoch konservierte Proteine in Invertebraten und Vertebraten im Lauf der Evolution verschiedene Funktionen im Lipidstoffwechsel übernommen haben. Ergänzende Studien zur enzymatischen Aktivität des dLBR könnten eine potentielle Funktion der carboxyterminalen Domäne des dLBR in der Lipidbiosynthese aufzeigen.

Falls der dLBR über keine enzymatische Aktivität mehr verfügen sollte, könnte die biologische Funktion der aminoterminalen Domäne, unabhängig von der enzymatischen Aktivität untersucht werden, wodurch wichtige Erkenntnisse bezüglich der vielfältigen Funktionen des LBR und dessen Assoziation mit den humangenetischen Erkrankungen erlangt werden könnten. Bisher wird angenommen, dass die gestörte enzymatische Aktivität der carboxyterminalen Domäne des menschlichen LBR die bedeutendste Ursache für die Manifestation der Erbkrankheiten PHA und HEM ist. Inwieweit die Funktion der an zahlreichen Interaktionen beteiligten aminoterminalen Domäne des LBR für die Ausprägungen der beiden Erkrankungen eine Rolle spielt, ist nicht bekannt.

Die Charakterisierung der erwähnten Gene CG3167 (putatives MAN1 Homolog), CG8679 (putatives lem-3 Homolog) und CG3748 (putatives Emerin Homolog) könnte zum besseren Verständnis der Komplexität der Kernhülle von *Drosophila* beitragen. Durch kombinierte Depletierung dieser potentiellen LEM-Domänen Proteine, sowie der LEM-Domänen Proteine

Bocksbeutel und Otefin durch RNA interference könnten potentielle, überlappende Funktionen der Mitglieder der LEM-Familie untersucht werden und so weitere Erkenntnisse über die Funktion dieser Membranproteine und ihrer Interaktion mit der Kernlamina gewonnen werden. Auch durch die spezifische Depletierung von Bocksbeutel- $\alpha$  und Bocksbeutel- $\beta$  könnten wichtige Erkenntnisse über die Expression der beiden Isoformen und ihre biologische Bedeutung gewonnen werden. Durch die Herstellung eines  $\alpha$ -spezifischen Antikörpers könnte die Expression dieser Isoform gesondert untersucht werden.

Für beide Bocksbeutel Isoformen konnten noch keine Bindungspartner eindeutig identifiziert werden, da aber anzunehmen ist, dass diese beiden Proteine, wie auch die LEM-Domänen Proteine der Vertebraten, sowohl mit Laminen, als auch mit BAF interagieren, würde die Analyse dieser potentiellen Interaktionen erheblich zum Verständnis des Aufbaus sowie der Funktion der Kernlamina und ihrer Beteiligung an vielfältigen zellulären Prozessen beitragen.

## V. Material und Methoden

### V.1 Material

#### V.1.1 Geräte

Brutschrank	CO <sub>2</sub> -Auto-Zero	Heraeus-Holding, Hanau
Brutschrank	UNI INCU	Uni-Equip Kraupa, Martinsried
Feinwaage Satorius Typ: H110		Satorius GmbH, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Axiophot Stereo	Zeiss, Oberkochen
Umkehrmikroskop	IM35	Zeiss, Oberkochen
Gaschromatographisches, massenspektrometrisches Analysegerät		GC 860, Fisons Instruments MD800 Thermo Finnigen, Frankreich
Gewebekulturschalen		Greiner Labortechnik
Graphitblotkammer		LMS; bezogen über A. Hartenstein, Würzburg
Heizblock für 1,5ml Eppendorfgefäße		bezogen über A. Hartenstein, Würzburg
Heizplatte mit Magnetrührer IKA-Combimac RCT		Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Kipp-Schüttler: Heidolph Typ REAX3		bezogen über A. Hartenstein, Würzburg
Konfokales Laser Scanning Mikroskop TCS, SP		Leica, München
Laborwaagen	PJ 3600 Delta Range	Mettler, Gießen
Lichtmikroskop (Zellkultur)		Leitz, Wetzlar
Netzgeräte	CONSORT E 455 CONSORT E 734	Bezogen über Hartenstein, Würzburg
PCR-Gerät: Progen, FM13585		bezogen über Progene, Wertheim
PH-Meter, Typ pH 523		WTW
Photometer		Eppendorf, Hamburg
Sequenzierer: ABI PRISM <sup>TR</sup> 310 Genetic Analyser		Perkin Elmer, Applied Biotems GmbH, Weiterstadt
Sterile Bank: Steril GARD Hood Class III		Müller Labortechnik, Windhagen
Temperierter Schüttler: SM 25		Bühler, Tübingen
Thermocycler: Thermodux		Progene, Wertheim
Tiefkühlschrank -20°C		Privileg, Quelle
Tiefkühltruhe -86°C Freezer		Forma Scientific, Labotect, Göttingen
Vortex Genie 2		Bender und Hohbein AG, Zürich
Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q UF Plus		Millipore, Witten
Wasserbad: Typ W 270, 100°C		bezogen über A. Hartenstein

Zentrifugen	Kühlbare Laborzentrifuge	Heraeus-Holding, Hanau
	Minifuge RF	Heraeus-Holding, Hanau
	Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf
	Ultrazentrifuge LB-70	Beckman Instr. Inc., Fullerton USA
	Universal K2S	Hettich, Tuttlingen

### V.1.2 Verbrauchsmaterialien

E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit II	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
MEGAscript™ High Yield Transcription Kit	Ambion, Huntingdon, UK
Nitrocellulose	Schleicher und Schuell, Dassel
Protein A-Sepharose CL-4B	Pharmacia, Biotech
Röntgenfilme, Kodak X-Omat AR	Sigma, Deisenhofen
Seakem Agarose	Biozym, BIOzym Diagnostik Oldendorf
QIAquick Gel Extraktion Kit	QIAGEN, Düsseldorf
QIAGEN Plasmid Miniprep/Midiprep-Kit	QIAGEN, Düsseldorf
SMARTTMcDNA Synthese construction kit	CLONTECH laboratories, Inc
Taq DyeDeoxy Terminator cycle sequencing kit / DNA labelling kit	MBI, Fermentas, St Leon-Roth
TNT-system; coupled in vitro translation and transcription kit	Promega, Madison, WI, USA
TOPO TA cloning®Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Whatman-Papier	Schleicher und Schuell, Dassel

Sofern nicht anders vermerkt, wurden sämtliche Chemikalien und Lösungsmittel von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Difo Laboratoireis (Detroit), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Sie wurden, wenn nötig, in Analysenqualität verwendet. Die Lösungen zum Waschen oder Spülen in Alkohol sowie Methanol für Färbe-, Entfärbelösungen und Blotpuffer wurden in technischer Qualität bezogen und verwendet.

### V.1.3 Häufig verwendete Puffersysteme und Medien

Färbelösung für Polyacrylamidgele:	0,2	%	Coomassie R
	40	%	Methanol
	8	%	Essigsäure

Entfärbelösung:	20	%	Methanol
	7	%	Essigsäure

**Elutionspuffer (Proteinaufreinigung)**

Puffer A:	6	M	Guanidin Hydrochlorid
	0,1	M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,01	M	Tris/NaOH pH 8,0
Puffer B:	8	M	Harnstoff
	0,1	M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8,0
Puffer C:	8	M	Harnstoff
	0,1	M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6,3
Puffer D:	8	M	Harnstoff
	0,1	M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 5,9
Puffer E:	8	M	Harnstoff
	0,1	M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
LB-Medium (1l)	10	g	NaCl
	5	g	Hefeextrakt
	10	g	Bacto-Trypton ph 7,0
LB-Agar (1l)	10	g	NaCl
	5	g	Hefeextrakt
	10	g	Bacto-Trypton
	15	g	Bacto Agar ph 7,0

Antibiotika werden dem gegebenenfalls in folgenden Enkonzentrationen zugefügt:

100 µg/ml	Ampicillin
25 µg/ml	Kanamycin
12,5 µg/ml	Chloramphenicol

Mowiol	10	g	Mowiol
	40	ml	PBS, pH 8,0 16h rühren
	20	ml	Glycerin
	16 h rühren, nicht lösliche Bestandteile sedimentieren		
1 x PBS	137	mM	NaCl
	3	mM	KCl
	1,5	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	7	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH: 7,2 – 7,4
0,5 x PBS	68,5	mM	NaCl
	1,5	mM	KCl
	0,75	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	3,5	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH: 7,2 – 7,4
Probenpuffer (nach Laemmli 1970)	60	mM	Tris; pH 6,8
	2	%	SDS
	10	%	Glycerin
	10	%	DTT (0,1M)
	0,1	%	Bromphenolblau
<b>Semitrockenblot-Puffer</b>			
Puffer 1:	25	mM	Tris, pH 10,4 in 20% Methanol
Puffer 2:	300	mM	Tris, pH 10,4 in 20% Methanol
Puffer 3:	25	mM	Tris, pH 9,4
	40	mM	Norleucin
SDS-PAGE Elektrodenpuffer (1l)	2,8	g	Tris
	2,0	g	SDS
	14,3	g	Glycin
SDS-PAGE Lösung A	60,0	g	Acrylamid
	1,6	g	N,N'-Bisacrylamid ad 200 ml H <sub>2</sub> O
SDS-PAGE Lösung B	18,17	g	Tris/HCl, pH 8,8
	0,4	g	SDS ad 100 ml H <sub>2</sub> O

SDS-PAGE Lösung C	6,06	g	Tris/HCl, pH 8,8
	0,4	g	SDS ad 100 ml H <sub>2</sub> O
<b>SDS-PAGE nach Thomas und Kornberg, 1975</b>			
SDS-PAGE Elektrodenpuffer (1l)	6	g	Tris
	1,0	g	SDS
	28,7	g	Glycin
SDS-PAGE Lösung A	30,0	g	Acrylamid
	0,15	g	N,N'-Bisacrylamid ad 100 ml H <sub>2</sub> O
SDS-PAGE Lösung B	36,14	g	Tris/HCl, pH 6,8
	0,4	g	SDS ad 100 ml H <sub>2</sub> O
SDS-PAGE Lösung C	9,09	g	Tris/HCl, pH 8,8
	0,4	g	SDS ad 100 ml H <sub>2</sub> O
TBST:	140	mM	KCl
	0,3	%	Tween 20
	10	mM	Tris/HCl pH 8,0
TBST++:	540	mM	NaCl
	0,3	%	Tween 20
	10	mM	Tris/HCl
	0,1	%	Triton-X-100 pH 8,0
2 x TSS	20	%	PEG 4000 (Roth)
	10	%	DMSO (Dimethylsulfoxid)
	70	mM	MgSO <sub>4</sub> oder MgCl <sub>2</sub>
Harnstoffpuffer (V.1.3.1)	8	M	Harnstoff
	1,5	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	7	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1	mM	Trypsin-Inhibitor
	1	mM	PMSF pH : 7,2

Tritonpuffer (V.1.3.2)	1,0	%	Triton X-100
	100	mM	NaCl
	10	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1	mM	EDTA
	1	mM	EGTA
	1	mM	Trypsin-Inhibitor
	1	mM	PMSF
			pH: 7,0
Immunpräzipitationspuffer (V.1.3.3)	1	%	Triton X-100
	150	mM	NaCl
	20	mM	Tris
	1	mM	Trypsin-Inhibitor
	1	mM	PMSF
			pH: 7,4
Extraktionspuffer von Kulturzellen (V.1.3.4)	0,5	%	Triton X-100
	150	mM	NaCl
	50	mM	Tris
	1	mM	Trypsin-Inhibitor
	0,2	mM	PMSF
			pH: 7,4

#### Drosophilapuffer für die Präparation von Gewebestücken

Drosophilapuffer (V.1.3.5)	70	mM	NaCl
	5	mM	KCl
	1,5	mM	CaCl <sub>2</sub>
	20	mM	MgCl <sub>2</sub>
	10	mM	NaHCO <sub>3</sub>
	5	mM	Trehalose
	115	mM	Saccharose
	5	mM	HEPES
			pH: 7,2

#### MEGAscript™-Transkription

ATP-Lösung	75	mM	
CTP-Lösung	75	mM	
GTP-Lösung	75	mM	
UTP-Lösung	75	mM	
Lithiumchloridlösung	7,5	M	LiCl
	50	mM	EDTA

RNA-Probenpuffer	18	mM	EDTA
	95	%	Formamid
	0,025	%	Xylencyanol
	0,025	%	Bromphenolblau
	0,025	%	SDS

**Zellkultur:**

## Komplettmedium für Xenopus-A6 Kulturzellen (150 ml)

18,5	ml	H <sub>2</sub> O
1,5	ml	Penicillin/Streptomycin: Stammlösung: 10.000 U/ml; Endkonzentration: 100 U/ml
1,5	ml	L-Glutamin Stammlösung: 200 mM; Endkonzentration: 2 mM
15	ml	FCS
113,5	ml	DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium; Eurobio, Biotechnology)

## Komplettmedium für Ceropithecus COS-7 Kulturzellen (150 ml)

1,5	ml	Penicillin/Streptomycin: Stammlösung: 10.000 U/ml; Endkonzentration: 100 U/ml
1,5	ml	L-Glutamin Stammlösung: 200 mM; Endkonzentration: 2 mM
15	ml	FCS
132	ml	DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium; Eurobio, Biotechnology)

## Komplettmedium für Drosophila Kulturzellen (100 ml)

1,0	ml	Penicillin/Streptomycin: Stammlösung: 10.000 U/ml; Endkonzentration: 100 U/ml
1,0	ml	L-Glutamin Stammlösung: 200 mM; Endkonzentration: 2 mM
10	ml	FCS
88	ml	Schneider's Drosophilamedium; Life Technologies, Karlsruhe

Transfektionsreagens (A6-Zellen): Roti<sup>®</sup>-Fect (Roth, Karlsruhe)

Transfektionsreagens (Schneider-Zellen): Effectene<sup>™</sup> Reagent (QIAGEN, Düsseldorf)

**Hefemedien und Lösungen**

## CM-Hefe-Selektionsmedium (complete minimal medium)

2,0	g	Dropout Pulver ohne Uracil
2,0	g	Hefe Stickstoff Basis
8,0	g	Ammoniumsulfat
0,6	g	CaCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O
20,0	g	Glukose ad 1l H <sub>2</sub> O

## YPD-Vollmedium

10,0	g	Hefeextrakt
20,0	g	Bakto-Trypton
0,6	g	CaCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O
20,0	g	Glukose
		ad 1l H <sub>2</sub> O

## YAPD-Medium

10,0	g	Hefeextrakt
20,0	g	Bakto-Trypton
0,6	g	CaCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O
20,0	g	Glukose
0,1	g	Adeninhemisulfat
		ad 1l H <sub>2</sub> O

**V.1.4 Kulturzellen und Fliegenstämme**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

XLKE-A6	Nierenepithelzelllinie von <i>Xenopus laevis</i> kultiviert bei 27°C, 5% CO <sub>2</sub>
COS-7	Nierenzelllinie von <i>Ceropithecus aethiops</i> kultiviert bei 37°C, 5% CO <sub>2</sub>
S2	Primärkultur 20 – 24h alter Embryonen von <i>Drosophila melanogaster</i> kultiviert bei 27°C, 0% CO <sub>2</sub>
S2R <sup>+</sup>	Primärkultur 20 – 24h alter Embryonen von <i>Drosophila melanogaster</i> kultiviert bei 27°C, 0% CO <sub>2</sub>
KC167	Von Haematocyten abgeleitete Zelllinie von <i>Drosophila melanogaster</i> kultiviert bei 27°C, 0% CO <sub>2</sub>

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit folgenden Fliegenstämmen von *Drosophila melanogaster* gearbeitet:

Wildtyp Berlin	Bloomington Drosophila Stock Center, Indiana, USA
P-Element 11341	Bloomington Drosophila Stock Center, Indiana, USA
BL-5702	Bloomington Drosophila Stock Center, Indiana, USA

### V.1.5 Enzyme

Enzym	Konzentration	Puffer	Erkennungssequenz und Schnittstelle
<b>Eco RI</b>	10 units/ $\mu$ l	Puffer O <sup>+</sup> (10x)	5'-G <sup>↓</sup> AATT C-3' 3'-CTTAA <sup>↑</sup> G-5'
<b>Kpn I</b>	10 units/ $\mu$ l	Puffer Kpn I (10x)	5'-GGTAC <sup>↓</sup> C-3' 3'-C <sup>↑</sup> CATGG-5'
<b>Nde I</b>	10 units/ $\mu$ l	Puffer Nde I (10x)	5'-CA <sup>↓</sup> TATG-3' 3'-GTA <sup>↑</sup> TAC-5'
<b>Xho I</b>	10 units/ $\mu$ l	Puffer R <sup>+</sup> (10x)	5'-C <sup>↓</sup> TCCGAG-3' 3'-GAGCT <sup>↑</sup> C-5'
<b>Not I</b>	10 units/ $\mu$ l	Puffer O <sup>+</sup> (10x)	5'-GC <sup>↓</sup> GGCCGC-3' 3'-CGCCGG <sup>↑</sup> CG-5'
<b>Sac I</b>	10 units/ $\mu$ l	Puffer Sac I (10x)	5'-GAGCT <sup>↓</sup> C-3' 3'-C <sup>↑</sup> TCCGAG-5'
<b>Sau 3AI</b>	10 units/ $\mu$ l	Puffer B (10x)	5'-GATC <sup>↓</sup> -3' 3'-CTAG <sup>↑</sup> -5'
<b>CfoI</b>	10 units/ $\mu$ l	Puffer B (10x)	5'-GCG <sup>↓</sup> C-3' 3'-C <sup>↑</sup> GCG-5'

#### Sonstige Enzyme

Expand High Fidelity System	Boehringer, Mannheim
Taq DNA Polymerase	MBI-Fermentas
T4 DNA Ligase	MBI-Fermentas
Calf Intestine Alkaline Phosphatase	MBI-Fermentas

### V.1.6 Antikörper

ADL 67	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen über:	Drosophila melanogaster Lamin Dm <sub>0</sub> Maus, monoklonal Blot: 1:5000 Dr. Nico Stuurmann
ADL 84	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen über:	Drosophila melanogaster Lamin Dm <sub>0</sub> Maus, monoklonal IF: 1:10 Dr. Nico Stuurmann
ADL 195	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen über:	<i>Drosophila melanogaster</i> Lamin Dm <sub>0</sub> Maus, monoklonal IF: 1:10 Dr. Nico Stuurmann

Anti-GFP	Antigen: Herkunft: Verdünnung:	Green Fluorescence Protein Maus, monoklonal IF: 1:200 Blot: 1: 2000
	Bezogen:	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
dBAF	Antigen: Herkunft: Verdünnung:	<i>D. melanogaster</i> Barrier to Autointegration Factor Meerschweinchen, polyklonal IF: 1:1000 Blot: 1:1000
Bocksbeutel	Antigen: Herkunft: Verdünnung:	<i>Drosophila melanogaster</i> Bocksbeutel Meerschweinchen, polyklonal IF: 1:1000 Blot: 1:1000
Bocksbeutel	Antigen: Herkunft: Verdünnung:	<i>Drosophila melanogaster</i> Bocksbeutel Maus, polyklonal IF: 1:1000 Blot: 1:1000
Fibrillarin (72B9)	Antigen: Herkunft: Verdünnung:	Fibrillarin Maus, monoklonal IF: 1:50
Lamin Dm0	Antigen: Herkunft: Verdünnung:	<i>Drosophila melanogaster</i> Lamin Dm <sub>0</sub> Meerschweinchen, polyclonal IF: 1:500 Blot: 1:500
Lamin C	Antigen: Herkunft: Verdünnung:	<i>Drosophila melanogaster</i> Lamin C Meerschweinchen, polyclonal IF: 1:500 Blot: 1:500
dLBR	Antigen: Herkunft: Verdünnung:	<i>Drosophila melanogaster</i> Lamin B Rezeptor Meerschweinchen, polyclonal IF: 1:1000 IF: 1:1000
dLBR	Antigen: Herkunft: Verdünnung:	<i>Drosophila melanogaster</i> Lamin B Rezeptor Maus, polyclonal IF: 1:1000 IF: 1:1000
mAb 414	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen:	Nukleoporin Maus, monoklonal IF: 1:1000 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Otefin	Antigen: Herkunft: Verdünnung:	<i>Drosophila melanogaster</i> Otefin Meerschweinchen, polyklonal IF: 1:500
RGS	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen:	His-Tag (6 Histidine) Maus, monoklonal Blot: 1:1000 Quiagen
$\alpha$ -Tubulin	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen:	$\alpha$ -Tubulin Maus, monoklonal Blot: 1:20.000 Sigma, T-5168
X223	Antigen: Herkunft: Verdünnung:	<i>Xenopus laevis</i> Lamin B <sub>2</sub> Maus, monoklonal IF: 1:300

Ziege IgG; anti Maus; gekoppelt mit Meerettich-Peroxidase	1:10000	Dianova, Hamburg
Ziege IgG; anti Meerschwein; gekoppelt mit Meerettich-Peroxidase	1:10000	Dianova, Hamburg
Ziege IgG; anti Maus; gekoppelt mit TexasRed	1:100	Dianova, Hamburg
Ziege IgG; anti Meerschwein; gekoppelt mit TexasRed	1:100	Dianova, Hamburg
Ziege IgG; anti Maus; gekoppelt mit Cy2	1:100	Dianova, Hamburg

### V.1.7 Bakterienstämme, Hefestämme und Vektoren

#### Bakterienstämme:

XL 1-Blue	Stratagene, Heidelberg
Top 10 One Shot	Invitrogen, Karlsruhe
BL21 codon plus	Stratagene, Heidelberg

#### Hefestämme:

<i>erg24:: LEU2 his3<math>\Delta</math>200 leu2<math>\Delta</math>1 trp1<math>\Delta</math>63 ade2-101 lys2-801 ura3-52</i>	Zur Verfügung gestellt von Dr. Martin Bard, Indiana University Purdue University Indianapolis, USA
---	--

#### Vektoren:

Bluescript (SK)  
pCR 2.1-TOPO  
pET 21a(+)  
pEGFP-C2  
pEGFP-N1  
pYX212

Stratagene, Heidelberg  
Invitrogen, Karlsruhe  
Novagen, Merck KGaA, Darmstadt  
CLONTECH Laboratories GmbH, Heidelberg  
CLONTECH Laboratories GmbH, Heidelberg  
Zur Verfügung gestellt von Dr. Kathrin Schrick, Tübingen

## V.2 Methoden

### V.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### V.2.1.1 Präzipitation und Reinigung von DNA

##### V.2.1.1.1 Präzipitation von DNA durch Natriumacetat / Ethanolfällung

Zur Präzipitation von DNA, die sich in wässriger Lösung befindet, werden dieser 1/10 Volumen 3M Natrium-Acetat (pH 4,6) und 2,5 Volumen Ethanol (100%) zugefügt und 30 min bei -70°C inkubiert. Der Ansatz wird 20 - 30 min bei 11.000 g zentrifugiert, der Überstand entfernt und die präzipitierte DNA durch Zugabe von 250 µl EtOH (70%) und anschließendem Zentrifugieren (10 min; 11.000 g, gereinigt. Der Überstand wird entfernt und das Sediment an der Luft getrocknet.

##### V.2.1.1.2 Reinigung von DNA durch Chloroform / Phenol Extraktion

Zur Reinigung genomischer DNA wird diese mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die sich in wässriger Lösung befindende DNA wird mit 40 µl 3M Natriumacetatlösung und 500 µl Phenol versetzt, durch Invertieren vermischt und für 2 min bei 11.000 g zentrifugiert. Die untere, organische Phase wird vorsichtig entfernt und die verbleibende wässrige Phase mit 500 µl CHCl<sub>3</sub>/Isopentanol (CIA) versetzt. Die Lösung wird durch Invertieren gemischt und für 10 sec bei 11.000 g zentrifugiert, wodurch sich zwei klare Phasen bilden, die durch eine weiße Interphase getrennt ist. Die untere, organische Phase wird erneut entfernt und die verbleibende wässrige Phase mit 500 µl CIA versetzt und für 2 min bei 11.000 g zentrifugiert. Der wässrige Überstand wird vorsichtig entfernt und in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt, anschließend wird die DNA mit Ethanol (100%) gefällt und das Sediment mit Ethanol (70%) gewaschen. Das Sediment wird in 50 µl TE-Puffer gelöst.

#### V.2.1.2 Isolation und Nachweis von DNA

##### V.2.1.2.1 Prinzip der Plasmidisolierung

Das Prinzip der Plasmidisolierung basiert auf der Lyse der Bakterien in alkalischem Medium und der nachfolgenden Trennung der DNA von den übrigen Zellbestandteilen durch Adsorption der DNA an einer Kieselgelmembran unter hoher Salzkonzentration.

Die Isolation erfolgt in 3 Schritten:

- Abzentrifugieren der Bakterien und Resuspension; Lyse der Bakterien; Abtrennung der gelösten DNA von den anderen Zellbestandteilen durch Zentrifugation
- Adsorption der DNA an die Kieselgelmembran
- Waschen und Eluieren der Plasmid-DNA

Für die Präparation der Plasmid-DNA wurden im Rahmen dieser Arbeit die säulenchromatographischen Methode von QIAGEN und Peqlab angewendet. Die Plasmidisolierung erfolgte nach den mitgelieferten Protokollen der Handbücher und wird an dieser Stelle nicht weiter erläutert.

### V.2.1.2.2 Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

#### Agarose-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese macht von der Eigenschaft geladener Substanzen Gebrauch, in einem elektrischen Feld zum ihrer Ladung entgegengesetzten Pol zu wandern. Größenunterschiede zwischen DNA-Molekülen sind leicht feststellbar, da ihre Restriktionsfragmente durch Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht werden können.

Je nach Länge der DNA-Fragmente empfehlen sich folgende Agarosekonzentrationen:

Agarosekonzentration in %	effiziente Auftrennung
0,6	1-20 Kb
0,9	0,5-7 Kb
1,2	0,4-6 Kb
1,5	0,2-3 Kb
2,0	0,1-2 Kb

Im Rahmen dieser Arbeit wurden im Wesentlichen 1% Agarosegele verwendet.

Wird ein elektrischer Strom durch das Gel geschickt, wandert jedes negativ geladene DNA-Fragment in Richtung der Anode, mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus seines Molargewichts ist. (Einheit: 1 Kb → Längeneinheit, die 1000 Basen(paare) eines einzel(doppel)strängigen Nucleinsäuremoleküls entspricht; 1 Kb ≈ 0,34 µm Länge und einer Masse von ca. 660 Kd.) Um die DNA sichtbar zu machen, wird dem Gel Ethidiumbromid zugesetzt, das nach seiner Bindung an die DNA intensiv unter UV-Licht fluoresziert.

Agarosegel 1%:           0,4 g Agarose  
                               40 ml 1xTAE Puffer  
                               1 µl Ethidiumbromid (c = 10 ng/ml)

Das Agarose-Puffergemisch wird aufgekocht, wenn sich die Agarose vollständig gelöst hat, abgekühlt und nach dem Zufügen des Ethidiumbromids in den vorbereiteten Gelschlitten gegossen. Nach 30 min ist das Gel erstarrt und kann in der Gelkammer mit den vorbereiteten Proben beladen werden. Die Gelelektrophorese erfolgt 1-2 h bei 50-70 Volt.

#### Referenz DNA

Die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente wird anhand eines separat aufgetragenen Größenstandards ermittelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Lambda DNA/EcoRI+HindIII bzw. GeneRuler™100bp DNA Ladder Plus als Größenstandard verwendet.

Lambda DNA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i>		GeneRuler™100bp DNA Ladder Plus	
21226	bp	3000	bp
		2000	bp
5148 / 4973	bp	1500	bp
4277	bp	1200	bp
3530	bp	1031	bp
		900	bp
2027 / 1904	bp	800	bp
1584	bp	700	bp
1330	bp	600	bp
		500	bp
983	bp	400	bp
831	bp	300	bp
564	bp	200	bp
125	bp	100	bp

### **Gelelektrophoretische Konzentrationsbestimmung**

Mit dieser Methode kann die DNA-Konzentration lediglich geschätzt werden. Neben dem DNA-Fragment, dessen Größe zu schätzen ist, wird ein DNA-Fragment bekannter Konzentration (im Rahmen dieser Arbeit: 100 ng linearisierter Bluescript-Vektor) im Agarosegel aufgetrennt. Die Intensität der jeweiligen Banden kann dann unter UV-Licht verglichen werden.

#### **V.2.1.2.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

Die Extraktion erfolgt mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraktions Kit“ von QIAGEN. Das zu isolierende DNA-Fragment wird mit einem sauberen Skalpell nach der gelelektrophoretischen Auftrennung aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die DNA wird in diesem Verfahren zunächst aus dem Gel gelöst und an eine Kieselgel-Membran gebunden. Da die Adsorption stark pH abhängig ist, enthält der Puffer QG eine hohe Salzkonzentration und einen pH-Wert  $\leq 7,5$ , um eine effiziente Adsorption (95%) der DNA an die Membran zu erreichen.

Nachdem die DNA an die Membran gebunden hat, werden in einem Waschschriff mit dem ethanolhaltigen Puffer PE unerwünschte Primer und Verunreinigungen wie Salze, Enzyme, ungebundene Nukleotide, Agarose, Ethidiumbromid und andere Detergenzien ausgewaschen, da diese nicht an die Kieselgelmembran binden und nach der Zentrifugation durch die Säule laufen und verworfen werden können.

Nach dieser Reinigung kann die DNA aus der Säule eluiert werden. Da die Effizienz wie die Adsorption stark salzkonzentrations- und pH-abhängig ist, enthält der Elutionspuffer EB, im Gegensatz zur Adsorption, eine niedrige Salzkonzentration und einen basischen pH-Wert (pH 8,5). Die Elution erfolgt mit EB-Puffer oder Wasser.

Die detaillierte Durchführung entspricht dem zum Kit gehörigen Protokoll und wird hier nicht näher erläutert. Sämtliche benötigten Lösungen und Materialien sind im Lieferumfang enthalten.

### V.2.1.3 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete DNA-Sequenzierung beruht auf der Didesoxymethode von Sanger (Sanger et al, 1977). Die Methode macht von der Möglichkeit Gebrauch, mit Hilfe der DNA-Polymerase von einem Primer aus einen neuen, komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Die Synthese erfolgt in Gegenwart von Nukleotidtriphosphaten, denen in niedriger Konzentration 2',3'-Didesoxynukleotide (ddNTP's), d.h. Nukleotide, deren 3'-Hydroxylgruppe an der Desoxyribose fehlt, beigefügt sind. Im Rahmen dieser Arbeit verwendeten System (Taq Dye deoxy™ Terminator Sequenzing-Kit; Applied Biosystems, Weiterstadt) sind die ddNTPs (A, C, G, T) mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so dass sie sich durch ihre spezifische Fluoreszenz nachweisen lassen. Die veränderten Nukleotide bewirken bei ihrem Einbau einen Abbruch der DNA-Synthese, da wegen der fehlenden 3'OH-Gruppe der Desoxyribose keine neue Phosphodiesterbindung zu einem weiteren Nukleotid geknüpft werden kann. Der Einbau der Desoxynukleotide erfolgt zufallsgemäß, so dass eine Mischung von neu synthetisierten DNA-Strängen unterschiedlicher Länge entsteht. Die Fragmente werden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels eines Lasers nachgewiesen. Die Fluoreszenz-Signale werden mit Hilfe eines Computers ausgewertet.

#### V.2.1.3.1 Auswahl der Primer für die Sequenzierung

Die meisten zu sequenzierenden DNA-Fragmente befanden sich im Rahmen dieser Arbeit im pBluescript bzw. pCR®2.1-Topo -Vektor. Der Vektor besitzt beidseits der „multiple cloning site“ spezifische Primer-Bindungsstellen für die im TOPO TA Cloning® kit mitgelieferten Primer.

Primer für pBluescript

T3 Primer : 5'- AATTAACCCTCACTAAAAGGGG - 3'

T7 Primer: 5'- GTAATACGACTCACTATAGGGC - 3'

Primer für pCR®2.1-Topo:

M13 Forward(-20): 5'- GTAAAACGACGGCCAG - 3'

M13 Reverse: 5'- CAGGAAACAGCTATGAC - 3'

Alle anderen Primer, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet werden, wurden von Roth (Karlsruhe) speziell angefertigt.

#### V.2.1.3.2 Sequenzierungsreaktion

Das verwendete Sequenzierungskit enthält bereits alle wesentlichen Komponenten (Taq-Polymerase, Mg<sup>2+</sup>-haltiger 10x PCR-Puffer, dNTPs, markierte ddNTPs). Die spezifischen Komponenten (DNA, spezifische Primer) werden entsprechend der jeweiligen Reaktion noch hinzugefügt.

Reaktionsansatz: 300 ng DNA  
 3 µl Reaktionslösung  
 100 nM spezifische Primer  
 mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 µl auffüllen

Die Komponenten werden zusammengefügt und durchlaufen in einem Thermocycler folgende 25 Zyklen:

1. Schritt	Denaturierung der DNA	96°C	30 sec
2. Schritt	Annealing der Primer	50°C	15 sec
3. Schritt	Elongation	60°C	4 min

Die entstandenen DNA-Fragmente werden durch Zufügen von 10 µl Natriumacetat (3M, pH 4,9), 90 µl ddH<sub>2</sub>O und 250 µl absoluten Ethanol präzipitiert und zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, um noch vorhandene dNTPs und ddNTPs zu entfernen. Das getrocknete DNA-Sediment wird in 25 µl TSR (Template Supression Reagent; Perkin Elmer, Rodgau) aufgenommen, für 2 min bei 90°C denaturiert und anschließend bei 4°C bis zur Sequenzierung aufbewahrt.

### V.2.1.3.3 Sequenzauswertung

Die Sequenzauswertung erfolgt durch ein von der Genetic Computer Group (GCG, Madison, USA) entwickeltes Softwarepaket. Die ermittelten Sequenzen werden auf Sequenzierfehler überprüft und analysiert.

### V.2.1.4 DNA Amplifikation durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht die selektive Amplifikation eines bestimmten, durch zwei Oligonukleotide (Primer) definierten Nukleinsäurebereiches. Die PCR beruht auf der Synthese von DNA-Sequenzen an einer Einzelstrangnukleinsäure, die zwischen zwei vorgegebenen Oligonukleotidprimern liegen. Temperaturstabile DNA-Polymerasen (z.B. die Taq-Polymerase, isoliert aus dem Bakterium „*Thermus aquaticus*“) gestatten auf einfache Weise die Durchführung wiederholter DNA-Synthese- und Denaturierungszyklen der neusynthetisierten DNA-Doppelstränge.

Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten:

- (1) In jedem Reaktionszyklus wird durch kurze Hitzebehandlung die DNA-Doppelhelix denaturiert.
- (2) Während des Abkühlens hybridisieren die im Überschuss vorliegenden beiden Primer spezifisch mit ihren komplementären Sequenzen der zu amplifizierenden DNA. Diese Primer bilden das 5'-Ende der neu zu synthetisierenden Komplementärstränge.
- (3) Während der anschließenden Elongationsphase synthetisiert die DNA-Polymerase vom Primer aus den komplementären Strang durch spezifisches Anfügen der zugefügten vier Desoxyribonucleosid-Triphosphate.

Nach einem wiederholten Denaturierungsschritt (1) dienen nun die beiden neu synthetisierten Fragmente ihrerseits als Matrize. Durch die Verdoppelung der DNA nach jedem Reaktionsdurchlauf kommt es so zu einer exponentiellen Anreicherung des gewünschten DNA-Fragmentes (2<sup>n</sup>). Es werden in der Regel 20-30 Zyklen durchlaufen.

#### V.2.1.4.1 Auswahl der PCR-Primer

Es ist darauf zu achten, dass beide Primer eine ähnliche Schmelztemperatur aufweisen, die über 50°C liegen sollte, um eine unspezifische Bindung der Primer und somit eine Amplifikation von unspezifischen DNA-Fragmenten zu verhindern. Zur Ermittlung der Schmelztemperatur wurde folgende empirische Formel gewählt:

$$T_M = 4 \times \Sigma (G,C) + 2 \times \Sigma (A,T) - 5$$

Ebenso ist darauf zu achten, dass die Primer nicht mit sich selbst hybridisieren können, um so eine Amplifikation der Primer während der PCR Reaktion zu verhindern.

Um das Einklonieren in einen spezifischen Vektor zu ermöglichen, werden die Primer so gewählt, dass das entstehende PCR-Produkt an beiden Seiten geeignete Schnittstellen für spezifische Restriktionsenzyme aufweist.

#### V.2.1.4.2 Amplifikationsreaktion

Ansatz: 1 µl DNA (0,1 µg/µl)  
 1 µl Primer I (100 pmol/µl)  
 1 µl Primer II (100 pmol/µl)  
 1 µl dNTP-Mix (10mM)  
 5 µl 10 x Puffer ohne MgCl<sub>2</sub>  
 5 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM)  
 1 µl Taq-Polymerase (5U/µl) bzw. High Fidelity Polymerase (3,5U/µl)

---

add 50 µl ddH<sub>2</sub>O

Da die Reaktion für jede verwendete Template-DNA sowie für die spezifischen Primer unterschiedlich ist, werden die Reaktionsbedingungen für jeden Versuchsansatz optimiert (Annealing-Temperatur, Konzentration der Template-DNA, Konzentration der Primer, Zeiten der einzelnen Reaktionsschritte). Die Komponenten werden in ein PCR-Gefäß gegeben und durchlaufen im Thermocycler folgende 20-30 Reaktionszyklen:

96°C - 2 min	(Denaturierung)	} 20 - 30 Zyklen
96°C - 2 min	(Denaturierung)	
≥50°C - 1 min	(Annealing)	
72°C - 1 min	(Elongation)	
72°C - 10 min	(verlängerte Elongation)	

Nach Beendigung der PCR wird die DNA in Probenpuffer aufgenommen und über ein präparatives Gel gereinigt.

#### V.2.1.5 DNA Modifizierung durch Enzyme

##### V.2.1.5.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Restriktionsendonucleasen erkennen spezifische Basensequenzen in einer DNA-Doppelhelix und schneiden beide Stränge der Helix an spezifischen Stellen. Die biologische Aufgabe der aus Prokaryoten isolierten Restriktionsenzyme besteht im Abbau fremder DNA-Moleküle. Die zelleigene

DNA wird nicht abgebaut, da die jeweiligen Erkennungsstellen durch Methylierung vor den Restriktionsenzymen geschützt sind. Viele Restriktionsenzyme erkennen spezifische Sequenzen von 4-8 Basenpaaren und spalten in dieser Region in jedem Strang eine Phosphodiesterbindung. Eine Eigenschaft der meisten dieser Schnittstellen ist die zweifache Rotationssymmetrie (erkannte Sequenzen: Palindrome). Beim Schneiden der DNA entstehen abhängig vom jeweiligen Enzym kurze, überstehende Einzelstrangabschnitte („sticky ends“), welche die glatte Verbindung von 2 doppelsträngigen DNA-Fragmenten ermöglichen, sofern beide Fragmente mit der gleichen Restriktionsendonuclease erzeugt wurden oder stumpfe Enden („blunt ends“), bei denen die Schnittstellen in beiden Strängen der DNA an der gleichen Stelle liegen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Enzyme sowie ihre jeweiligen Puffersysteme von MBI-Fermentas (St. Leon Roth) bezogen. Die jeweils einzusetzenden Puffer sowie die entsprechende Restriktions- sowie Denaturierungstemperatur werden in diesem System angegeben. Da sich die zu wählenden Puffer- und Temperaturbedingungen voneinander unterscheiden können, ist bei einer Doppelrestriktion der DNA zu beachten, dass zuerst die Restriktion mit einem der beiden Enzyme durchgeführt wird. Ein kleines Aliquot der DNA wird daraufhin gelelektrophoretisch aufgetrennt, um die Vollständigkeit der Restriktion zu kontrollieren. Das Enzym wird durch Erhitzen inaktiviert und die DNA gefällt (V.2.1.1), um die Salze zu entfernen. Anschließend erfolgt die Restriktion mit dem zweiten Enzym. Die Inkubationsdauer beträgt in der Regel 1 - 2 h, bei niedrig konzentrierten Enzymen kann die Restriktion auch über Nacht durchgeführt werden. Die Enzyme werden in Konzentrationen von 1 - 4 Einheiten (units) pro  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt, unter optimalen Salz- und Temperaturbedingungen schneidet eine Einheit des Enzyms in einer Stunde 1  $\mu\text{g}$  DNA. Für analytische Untersuchungen werden 0,1-0,5  $\mu\text{g}$  DNA, für präparative Ansätze werden 0,5 - 5  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt.

#### V.2.1.5.2 Ligation von DNA-Molekülen

Durch die Methode der Ligation können DNA-Fragmente kovalent verbunden werden, wenn die Fragmente überlappende Enden mit jeweils komplementären Sequenzen, wie sie in der Restriktion erzeugt wurden, besitzen. So lässt sich ein gewünschtes DNA-Fragment mit einem linearisierten Vektor verbinden, sofern beide mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten wurden.

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor sollte das Verhältnis zwischen der Zahl der eingesetzten Fragmentmoleküle und des linearisierten Vektors mindestens 3:1 betragen.

Ligationsansatz:	x $\mu\text{l}$ DNA-Fragment
	y $\mu\text{l}$ Vektor-DNA
	1 $\mu\text{l}$ DNA-T4-Ligase (1 unit/ $\mu\text{l}$ )
	2 $\mu\text{l}$ 10x Ligationspuffer
	-----
	add 20 $\mu\text{l}$ dd H <sub>2</sub> O

Die Ligation erfolgt für 1-2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C.

### V.2.1.6 Extraktion von genomischer DNA aus Fliegen

Die Extraktion von DNA aus Fliegen erfolgt in folgenden Schritten:

1. Homogenisierung: 50 Fliegen werden in 0,5 ml Homogenisierungspuffer versetzt und bei 4°C in einem Glaspotter homogenisiert.
2. Entfernung der Proteine: Das Homogenat wird für 30 min bei 68°C inkubiert und die Proteine durch Zugabe von 75 µl Kaliumacetatlösung (8M) bei 4°C präzipitiert.
3. DNA-Präzipitation: Die wässrige Phase wird mit 1ml Ethanol (100%) versetzt.
4. Waschen der DNA: Das DNA Präzipitat wird mit 1ml Ethanol (70%) gewaschen.
5. Lösen der DNA: Das DNA-Präzipitat wird in 360 µl TE-Puffer gelöst.
6. Entfernung der RNA: Die RNA wird durch Zugabe von 1µl RNase A (10mg/ml) und Inkubation bei 37°C für 10 min degradiert.
7. Reinigung der DNA: Die DNA wird durch Extraktion mit Phenol-Chloroform gereinigt.

Homogenisierungspuffer:

100	mM	Tris
100	mM	EDTA
100	mM	NaCl
0,5	%	SDS
		pH: 7,5

### V.2.1.7 Extraktion von RNA

Die Extraktion von RNA aus Kulturzellen oder Geweben wurde mit dem gebrauchsfertigen Reagenz peqGOLD TriFast™ der Firma peqlab nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt. Die Extraktion erfolgt über die optimierte Guanidinisothiocyanat / Phenol-Methode, die auf der Einschnitt-Flüssigphasen-Separation basiert. Mit dieser Methode ist es möglich, nicht-degradierte RNAs sowohl aus kleinen, als auch aus großen Probenmengen zu gewinnen. Die enthaltene Lösung (Gesamt-RNA einschließlich mRNA und rRNA) ist frei von DNA und Proteinen.

Die RNA-Extraktion erfolgt in folgenden Schritten, die detaillierte Durchführung ist dem mitgelieferten Protokoll zu entnehmen und wird hier nicht näher erläutert:

1. Homogenisierung: 2 Drosophila Larven (3. Larvenstadium ~ 50 mg) werden mit 1,0 ml peqGOLD TriFast™ homogenisiert.
2. Phasentrennung: Zugabe von 200 µl Chloroform.
3. RNA-Präzipitation: Die wässrige Phase wird mit 500 µl Isopropanol versetzt.
4. Waschen der RNA: Das RNA Präzipitat wird mit 1ml Ethanol (75%) gewaschen.
5. Lösen der RNA: Das RNA-Präzipitat wird in 20µl DEPC-H<sub>2</sub>O (+ 40U RNase-Inhibitor) gelöst.

Die so gewonnene RNA kann für Verfahren wie cDNA-Synthesen, RT-PCR-Reaktionen und in vitro Translationen weiterverwendet werden.

### V.2.1.8 cDNA Synthese

Die cDNA-Synthese macht Gebrauch von der Fähigkeit der *Reversen Transkriptase* (isoliert aus dem mouse-mamma-leukämie-Virus), mRNA in eine single-strand (ss) DNA umzuschreiben.

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellte cDNA wurde mit Hilfe des SMART<sup>TM</sup>cDNA Synthese construction kit (CLONTECH laboratories, Inc.) nach der Methode der LD-PCR (long-distance PCR), (LD-PCR; Barnes et al., 1994), synthetisiert. Von großem Vorteil ist die geringe Mindestmenge an RNA, die eingesetzt werden muss (50 ng RNA oder 25 ng polyA<sup>+</sup>RNA). Sämtliche benötigten Materialien und Lösungen sind im Lieferumfang enthalten.

Prinzip der cDNA Synthese:

Der modifizierte oligo (dt) Primer (CDS III / 3'PCR-Primer) bindet am 3' Ende der mRNA, die *Reverse Transkriptase* synthetisiert den Erststrang. Das SMART III<sup>TM</sup>Oligo-nukleotid (Switching Mechanism At 5' End of RNA Transcript) fungiert als kurzes Template am 5' Ende der mRNA. Wenn die *Reverse Transkriptase* das 5' Ende der mRNA erreicht hat, wechselt das Enzym vom mRNA-Template-Strang und synthetisiert die komplementäre Basenfolge zum SMART III<sup>TM</sup>-Oligonukleotid. Das Resultat ist eine einzelsträngige cDNA, die das komplementäre 5' Ende der mRNA enthält sowie die komplementäre Sequenz zum SMART III<sup>TM</sup>-Oligonukleotid am 5' Strang, welches im nächsten Schritt der Reaktion (Zweit-Strang-cDNA-Synthese) als universelle „priming site“ (SMART-anchor) während der Amplifikation in der LD-PCR dient.

#### V.2.1.8.1 Erststrangsynthese

Die Komponenten der Erststrang-cDNA-Synthese werden bei 4°C in einem sterilen Eppendorfgefäß zusammengefügt.

Reaktionsansatz:	0,025 – 0,5 µg poly A <sup>+</sup> RNA
	1 µl SMART III <sup>TM</sup> -Oligonukleotid
	1 µl CDS III / 3' PCR-Primer
	-----
	add 5 µl dd H <sub>2</sub> O

Die Komponenten werden vorsichtig gemischt und für 2 min bei 72°C erhitzt. Nachdem der Reaktionsansatz auf Eis abgekühlt wurde, wird er kurz bei 10.000 g zentrifugiert, um eventuell kondensierte Reaktionslösung am Boden des Eppendorfgefäßes zu sammeln. Es werden folgende Komponenten hinzugefügt:

2,0 µl 5x First-Strand-Puffer
1,0 µl DTT (20mM)
1,0 µl dNTP-Mix (10mM)
1,0 µl MMLV-Reverse Transkriptase (200 u/µl)

Die Komponenten werden gemischt und 1h für 42°C im Thermocycler inkubiert. Danach wird der Ansatz erneut auf Eis abgekühlt und ein Aliquot von 2 µl für die Zweitstrang-Synthese (cDNA Amplifikation durch LD-PCR) entnommen.

### V.2.1.8.2 Zweitstrangsynthese

Es werden folgende Komponenten in einem sterilen Eppendorfgefäß zusammengefügt:

Reaktionsansatz:	2 µl First-Strand cDNA
	80 µl dd H <sub>2</sub> O
	10 µl 10x cDNA PCR-Puffer
	2 µl dNTP-Mix
	2 µl 5' Primer
	2 µl CDS III / 3' PCR-Primer
	2 µl 50x Advantage cDNA Polymerase Mix
	<hr/>
	100 µl

Die Komponenten werden gemischt und durchlaufen im Thermocycler folgende 18 – 20 Reaktionszyklen:

Amplifikationsprotokoll:	95°C - 1 min	
	95°C - 15 sec	] 18-20 Zyklen
	68°C - 6 min	

Um die Vollständigkeit der cDNA Synthese zu überprüfen, wird ein Aliquot von 5 µl gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die cDNA sollte als „Schmier“ von 0,1-4 Kb sichtbar sein.

### V.2.1.9 Transkription

#### V.2.1.9.1 Gekoppelte in vitro Transkription und Translation

Für die zellfreie Transkription und Translation wurde im Rahmen dieser Arbeit das TNT<sup>®</sup> Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega, Madison, WI, USA) verwendet. Die Kopplung der Transkription und Translation ermöglicht die Synthese von Proteinen in vitro und den gleichzeitigen Einbau einer radioaktiv markierten Aminosäure (z.B. <sup>35</sup>S Methionin) zur späteren Detektion des Proteins.

Ansatz

12,5	µl	TNT <sup>®</sup> Reticulocyten Lysat
1,0	µl	TNT <sup>®</sup> Reaktionspuffer
0,5	µl	TNT <sup>®</sup> RNA Polymerase (SP 6, T3 oder T7)
0,5	µl	Aminosäuremix ohne Methionin (1 mM)
2,0	µl	<sup>35</sup> S-Methionin (1000 Ci/mmol und 10 mCi/ml)
0,5	µl	RNasin <sup>®</sup> Ribonuklease Inhibitor (40 units/µl)
0,5	µg	Template DNA
		add 25 µl ddH <sub>2</sub> O

Der Ansatz wird 2h im Wasserbad bei 30°C inkubiert.

## V.2.1.10 Klonierung

### Allgemeine Klonierung in Vektoren

Bei der Klonierung wird ein DNA-Fragment, das ein interessantes Gen enthält, in das gereinigte DNA-Genom eines sich selbst replizierenden genetischen Elements, meist ein Plasmid oder Virus-integriert. Ein Virus oder Plasmid, das in dieser Weise eingesetzt wird, bezeichnet man als Klonierungsvektor.

Jeder Vektor zeichnet sich durch eine Reihe spezifischer Eigenschaften aus, so dass die Wahl des Vektors von der Anwendung der Klonierung abhängt. Klonierungsvektoren besitzen eine Reihe von spezifischen DNA-Sequenzelementen, die die Klonierung ermöglichen:

- Polylinkerregion (MCS = multiple cloning site) mit verschiedenen Restriktionsschnittstellen, die das Einfügen fremder DNA-Inserts ermöglichen.
- Primerbindungsstellen zur direkten Sequenzanalyse der klonierten DNA-Sequenzen.
- Promoterregionen, die eine Initiation einer RNA-Synthese an definierten Promoterregionen mit spezifischen RNA-Polymerasen gestatten.
- Antibiotikaresistenzgene zur Identifizierung einer erfolgreichen Transformation, bzw. andere Möglichkeiten zur Identifizierung.

Die Klonierungsvektoren werden zunächst mit einem Restriktionsenzym geschnitten, so dass linearisierte DNA-Moleküle entstehen. Die zelluläre DNA wird mit dem gleichen Enzym geschnitten und die dabei entstehenden Restriktionsfragmente werden mit den linearisierten Plasmiden gemischt, mit denen sie über ihre komplementären Enden zu rekombinierten DNA-Ringen verschmelzen. Diese rekombinanten Moleküle, in denen die Abschnitte der Fremd-DNA eingebaut sind, werden dann mit dem Enzym DNA-Ligase kovalent ringförmig geschlossen. Die Plasmide werden in kompetente Bakterienzellen durch Transformation eingeschleust. Wenn diese Zellen wachsen und sich teilen (Verdopplung der Zellzahl = logarithmisches Wachstum), replizieren sie auch die rekombinanten Plasmide, und es entstehen in riesiger Zahl Kopien der Plasmide.

Um transformierte Bakterien von nicht transformierten zu unterscheiden, tragen die Vektoren Gene für Antibiotikaresistenzen (z.B. Ampicillin oder Tetracyclin). Lässt man die Bakterien in antibiotikahaltigem Medium wachsen, überleben nur die Bakterien, die ein Plasmid aufgenommen haben, da nur die resistent gegen das Antibiotikum sind. Die Kolonien werden mit sterilen Zahnstochern aufgenommen und zu großen Kulturen herangezüchtet.

### TOPO<sup>®</sup>TA-Klonierung

Das TOPO TA cloning<sup>®</sup>Kit (Invitrogen, Groningen, Niederlande) bietet die Möglichkeit der direkten Insertion eines Taq-Polymerase amplifizierten PCR-Produktes in einen Klonierungsvektor.

Der Klonierungsvektor (pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> bzw. pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>) liegt linearisiert vor, mit einem einzelnen 3'-Thymidin (T)-Überhang und kovalent gebundener Topoisomerase I. Die Taq-Polymerase addiert ein einzelnes Deoxy-Adenosin (A) an die 3'-Enden des PCR-Produktes, wodurch eine effiziente Ligation in den Vektor möglich ist. Die kovalent am Vektor gebundene Topoisomerase I (isoliert aus dem Vaccinia-Virus) bindet im Reaktionsablauf an die Duplex-DNA an spezifischen Regionen und schneidet die Phosphodiesterbindung nach der Basenabfolge: 5'-CCCTT an einem Strang. Die dabei frei werdende Bindungsenergie wird für die kovalente Verknüpfung des 3'-Phosphat des geschnittenen Strangs mit dem Tyrosyl-Überhang (Tyr-274) der Topoisomerase I genutzt. Die Phospho-Tyrosyl-Verknüpfung zwischen DNA und dem Enzym wird darauf durch die 5'-Hydroxy-

Gruppe des originalgeschnittenen Strangs angegriffen; dies hat die Umkehrung der Reaktion und die Freisetzung der Topoisomerase I zur Folge.

Die TOPO TA cloning® Reaktion wurde nach dem Protokoll durchgeführt, welches ebenso wie alle benötigten Komponenten sowie Bakterien im Lieferumfang des TOPO TA cloning®Kits enthalten sind und wird hier nicht weiter erläutert.

### V.2.1.11 Herstellung kompetenter Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden kompetente XL-1Blue Bakterien (nach der Methode von Chung, Niemela und Muller, 1989) hergestellt. Die Bakterienzellwände werden durch dieses Verfahren so verändert, dass die Bakterien unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind, Fremd-DNA aus dem umgebenden Medium aufzunehmen.

LB-Medium und 2 x TSS werden im Verhältnis 1:1 gemischt und der pH wird auf 6,5 eingestellt. Diese Lösung wird steril filtriert und in Fraktionen von 5 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert. 100 ml LB-Medium werden mit 2 ml einer Übernachtskultur der XL-1Blue Bakterien angeimpft. Wenn die Bakterien die logarithmische Wachstumsphase erreicht haben (zu messende OD bei 600 nm: 0,3 - 0,4), wird die Kultur in einem sterilen Zentrifugengefäß bei 1000 g für 10 min sedimentiert. Das Sediment wird in 1/40 Volumen (≈ 2,5 ml) eiskaltem LB/TSS resuspendiert. Die Bakterien können nun in 100 - 200 µl Fraktionen aliquotiert werden. Nachdem sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden, können sie bei -70°C aufbewahrt werden.

### V.2.1.12 Herstellung von Agarplatten

#### Agarplatten für *Escherichia coli*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden LB-Agarplatten verwendet. Zur Herstellung wird frisch autoklavierter LB-Agar auf ca. 50°C abgekühlt und in sterile Plastikpetrischalen (Ø10 cm) gegossen, so dass der Agar ca. 1/3 des Volumens der Petrischale ausfüllt. Nach dem Trocknen (2 Tage bei RT) werden die Agarplatten bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Zur Herstellung von antibiotikahaltigen Agarplatten wird dem auf 50 °C abgekühlten Agar das Antibiotikum in der entsprechenden Konzentration hinzugefügt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ampicillin (100 µg/ml Endkonzentration) Kanamycin (25 µg/ml Endkonzentration) und Chloramphenicol (12,5 µg/ml Endkonzentration) verwendet.

#### Agarplatten für *Saccharomyces cerevisiae*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Agarplatten aus Minimalmedium sowie aus Vollmedium verwendet. Der Agar wird durch Erhitzen gelöst und die sterilfiltrierten Nährstoffe sowie die Glucose nach kurzem Abkühlen hinzugefügt, um dem Karamellisieren der Glucose und der Zerstörung der Aminosäuren vorzubeugen. Nach dem Trocknen (2 Tage bei RT) werden die Agarplatten bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

### V.2.1.13 Transformation

Die Aufnahme von Fremd-DNA in ein Bakterium oder eine Hefezelle wird als Transformation bezeichnet. Damit die Fremd-DNA bei der Transformation nicht abgebaut wird, muss sie ringförmig vorliegen (Plasmid-DNA) und benötigt einen Replikationsstartpunkt, der von der Bakterien- oder

Hefezelle erkannt wird. Zusätzlich trägt die Plasmid-DNA meistens eine Antibiotikaresistenz, um eine Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien zu ermöglichen. Neben Antibiotikaresistenzen tragen die Plasmide zur Transformation von Hefezellen zusätzliche Selektionsmarker, mit denen Auxothrophien in Hefen komplementiert werden können.

### **Transformation von *Saccharomyces cerevisiae***

Zur Transformation der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Hefen wurden die Standard-Transformation nach Gietz und Woods (1994) angewendet. Diese Methode basiert auf der Tatsache, dass Alkali-Kationen Hefezellen zur Aufnahme von DNA kompetent machen können. Nach Inkubation der Hefezellen in gepuffertem Lithiumacetat, wird die zu transformierende DNA zusammen mit einer Lachsspermien-DNA, die als „Carrier-DNA“ fungiert, in die Zelle transportiert. Die Aufnahme der DNA wird durch das Reagenz Polyethylenglykol (PEG) und durch einen Hitzeschock verstärkt. Im Anschluss an die Transformation werden die Hefezellen auf Selektionsmedium ausplattiert.

#### **Standardtransformation nach Gietz und Woods (1994):**

Verwendete Lösungen:

50 % (w/v)	Polyethylenglykol,	MW 3350 in H <sub>2</sub> O, sterilfiltriert
1 M	Lithiumacetat,	in H <sub>2</sub> O, sterilfiltriert
100 mM	Lithiumacetat,	in H <sub>2</sub> O, sterilfiltriert
20 mg/ml	ssSS - DNA	(Lachsspermien DNA)

Der gewünschte Hefestamm wird in YPAD-Vollmedium bei 30°C unter leichtem Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 – 1,0 herangezogen. Ein Aliquot von 10 ml wird für 5 min bei 4°C und 1000 g sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und das Sediment in 1 ml Lithiumacetat (100 mM) resuspendiert, 5 min bei 30°C inkubiert und in Aliquots von 100 µl bei 1000 g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Sediment mit den Reagenzien in folgender Reihenfolge überschichtet:

240 µl	PEG	(50% w/v)
36 µl	Lithiumacetat	1 M
25 µl	ssSS-DNA	(2 mg/ml)
~ 5 µl	Plasmid-DNA	(100 ng – 5 µg)
45 µl	ddH <sub>2</sub> O	

Der Ansatz wird für 1 min gevortext, 20 min bei 42°C inkubiert und anschließend für 2 min bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Sediment in 100 – 200 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Die Platten werden zum Schutz vor Austrocknung mit Parafilm umwickelt und bei 30°C im Brutschrank für 2-5 Tage inkubiert.

### **Transformation von *Escherichia coli***

Die zu transformierenden kompetenten Bakterien werden auf Eis aufgetaut und die Plasmid-DNA (10 - 100 ng Endkonzentration) oder die halbe Menge eines Ligationsansatzes hinzugefügt. Der Ansatz wird nach vorsichtigem Mischen 30 min auf Eis inkubiert. Danach werden die Bakterien für 30 - 40 sec einem Hitzeschock von 37°C ausgesetzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zufügen von 1 ml LB-Medium werden die Bakterien für 60-90 min bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Bakteriensuspension wird sedimentiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 100 µl antibiotikahaltigem LB-Medium resuspendiert. Jeweils 50 µl der Suspension werden auf einer antibiotikahaltigen Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag sollten

sich deutliche Bakterienkolonien gebildet haben. Einzelkolonien können mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und zum Animpfen von Übernachtskulturen z.B. für Plasmidpräparationen verwendet werden.

#### V.2.1.14 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* sowohl in Flüssigmedium (bei 30°C, unter leichtem Schütteln) als auch auf Agarplatten kultiviert. Zur Kultivierung wurden die beiden Vollmedien YAPD- und YPD verwendet. Der eingesetzte Hefestamm *erg24* zeichnet sich durch eine Defizienz für die Synthese von Uracil aus, d.h. er ist nicht fähig, in Minimalmedium, welches aus Glucose, verschiedenen Salzen und Spurenelementen besteht, zu wachsen. Durch Transformation mit dem Hefeexpressionsvektor pYX212, welcher die Uracil-Auxotrophie komplementiert, können sich nur die Transformanten in diesem Medium vermehren und so selektiert werden. Zur Lagerung der Hefestämme bei -70°C wird 1 ml einer späten logarithmischen oder frühen stationären Hefe-Flüssigkultur mit 210 µl Glycerin (86%, steril filtriert) versetzt, gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Hefestämme können so bei -70°C in 15% Glycerin mehr als fünf Jahre lang gelagert werden.

#### V.2.1.15 RNA interference (RNAi)

Die Synthese doppelsträngiger Ribonukleinsäuren sowie deren Einsatz in der Zellkultur von *Drosophila melanogaster* basiert auf der Methode von Clemens et al., 2000. Verschiedene kodierende DNA-Fragmente, deren endogene mRNAs durch RNA interference degradiert werden sollen, werden durch die Polymerase-Ketten-Reaktion amplifiziert. Die zur Synthese verwendeten Primer setzen sich aus der Bindungsstelle der T7-Polymerase und der spezifischen kodierenden Sequenz zusammen. Das amplifizierte PCR-Produkt wird für die Transkription in den pCR<sup>®</sup>II-TOPO Vektor ligiert und mit dem Restriktionsenzym EcoRI, dessen Erkennungssequenzen sich beidseitig der multiplen Klonierungstelle befinden, isoliert. Die linearisierten DNA-Fragmente können für die modifizierte Transkription mit dem MEGAscript<sup>™</sup> High Yield Transcription Kit der Firma Ambion eingesetzt werden. Sämtliche benötigten Enzyme und Lösungen sind im Lieferumfang enthalten.

##### V.2.1.15.1 MEGAscript<sup>™</sup> - Transkription

Die Komponenten der MEGAscript<sup>™</sup> – Transkription werden bei 4°C in einem steriles Eppendorfgefäß zusammengefügt.

Reaktionsansatz:

2 µl	ATP-Lösung
2 µl	CTP-Lösung
2 µl	GTP-Lösung
2 µl	UTP-Lösung
2 µl	10 x Reaktionspuffer
8 µl	linearisierte cDNA (500-1000 ng)
2 µl	Enzym - Mix

Der Transkriptionsansatz wird für 4 - 24 h bei 37°C inkubiert. Um die Reinheit der einzelsträngigen RNA zu erhöhen, wird die cDNA durch Inkubation mit DNase (15 min; 37°C) degradiert.

### V.2.1.15.2 Lithium-Chlorid Fällung und Hybridisierung

Die Lithium-Chlorid Fällung ist eine effektive Methode zur Reinigung der einzelsträngigen RNA von ungebundenen Nukleotiden, Proteinen sowie Transfer-RNAs.

Dem Transkriptionsansatz werden 30 µl ddH<sub>2</sub>O und 25 µl Lithium-Chlorid-Lösung zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 45 min bei -20°C wird die RNA durch Zentrifugation bei 4°C sedimentiert. Das Sediment wird mit Ethanol (70%) gewaschen, für 10 min getrocknet und in 20 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die einzelsträngigen RNA-Moleküle werden für 5 min bei 95°C im Wasserbad inkubiert und durch konstante Abkühlung bei Raumtemperatur hybridisiert.

Die erhaltene doppelsträngige RNA kann zur Transfektion von Kulturzellen oder zur Mikroinjektion in Embryonen von *Drosophila melanogaster* eingesetzt werden.

## V.2.2 Proteinbiochemische Methoden

### V.2.2.1 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Mit Hilfe des pET-Expressionssystems (Novagen) können Proteine im bakteriellen System synthetisiert und anschließend aufgereinigt werden. Vor der Klonierungsstelle des Zielgens befindet sich ein starker T7-Promoter. Im nicht induzierten Zustand ist die Zelle nicht in der Lage, vom Zielgen das gewünschte Protein zu exprimieren, da der codierende Genabschnitt unter der Kontrolle des lacUV5-Promoters steht, welcher durch den vorhandenen lac-Repressor reprimiert wird. Durch den Transfer des Plasmides in eine Wirtszelle (z.B. BL21), die eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerase Gens enthält, welches ebenfalls unter der Kontrolle des lacUV5-Promoters steht, kann die Expression des gewünschten Proteins durch Zugabe von IPTG (Isopropylthio-β-Galaktosid) induziert werden. Das IPTG inaktiviert den Repressor und der Promoter wird freigegeben. Am 3'Ende der Klonierungsstelle befinden sich das Startcodon und eine kurze, für sechs Histidine codierende Sequenz (sog. HIS-Tag), mit deren Hilfe das exprimierte Protein isoliert und gereinigt werden kann.

#### Durchführung:

Mit einem sterilen Zahnstocher werden Klone der transformierten Bakterien in eine 50 ml LB-Kultur (+Antibiotikum) übertragen. Die Kultur wird bei 37°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wird eine frische 200 ml Kultur (LB-Medium +Antibiotikum) mit 10 – 20 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert, bis die Bakterien die logarithmische Wachstumsphase erreicht haben (Zu messende OD bei 600 nm: 0,5 - 0,7). Als nicht induzierte Kontrolle wird 1 ml der Kultur abgenommen, abzentrifugiert und in 40 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Der Bakterienkultur wird nun IPTG (Endkonzentration: 1mM; IPTG-Stammlösung: 1000mM) hinzugefügt. Dieses inaktiviert den Repressor und gibt so den Promoter frei, wodurch die Proteinexpression induziert wird. Die Bakterien werden erneut für 4 - 5h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert, danach wird 1 ml der Kultur abgenommen, abzentrifugiert und in 40 µl Probenpuffer für die SDS-PAGE aufgenommen; Diese Probe stellt die induzierte Kontrolle dar. Um die Proteinexpression zu überprüfen, werden jeweils 10 µl der Kontroll-Probe und der IPTG-induzierten Probe gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Bakterienkultur wird für 15 min in der LB-70 Ultrazentrifuge bei

5000 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment bis zur weiteren Verwendung bei –20°C eingefroren.

### V.2.2.2 Reinigung des rekombinanten Proteins

Die Reinigung des rekombinanten Fusionsproteins erfolgt mit Hilfe des histidinreichen carboxyterminalen Endes (HIS-Tag) durch Nickel-Chelat Affinitätschromatographie. Durch die carboxyterminale Gruppe von sechs Histidinen wird dem Protein die Bindung an immobilisierte Ni<sup>2+</sup> Kationen ermöglicht. Diese sind über NTA (Nitrilotriessigsäure), einem Chelatbildner, an das Säulenmaterial, das aus Agarose besteht, gekoppelt. Durch dieses Verfahren lässt sich das Fusionsprotein selektiv von den übrigen bakteriellen Proteinen isolieren und durch die nachfolgenden Waschschriffe reinigen. Nach der Reinigung wird das Protein durch Zugabe von Puffern verschiedener pH-Werte eluiert.

#### Durchführung:

Auf eine Säule wird ca. 2 ml Säulenmaterial (Ni-NTA-Resin; Qiagen) gegeben und mit reichlich Puffer A gewaschen. Es ist darauf zu achten, dass die Säule nicht austrocknet. Das Fusionsprotein befindet sich nach der Expression mit allen übrigen bakteriellen Proteinen im Bakteriensediment. Das Bakteriensediment wird in 20 ml Puffer A resuspendiert und die Suspension bei Raumtemperatur für 1h gerührt. Die Proteine lösen sich während dieser Zeit von den übrigen bakteriellen Bestandteilen, die beim anschließenden Zentrifugieren (15 min; 10.000rpm; 4°C) sedimentiert werden. Der proteinhaltige Überstand wird auf die vorbereitete Nickelsäule aufgetragen. Die bakteriell exprimierten Fusionsproteine binden über ihre Histidine an das Nickelchelate und können so von den übrigen bakteriellen Proteinen isoliert werden. Da der pH-Wert, bei dem das Fusionsprotein eluiert wird, unbekannt ist, werden auf die Säule nacheinander Puffer, deren Zusammensetzung identisch ist, die sich jedoch in ihrem pH-Wert unterscheiden, aufgetragen und die eluierten Fraktionen in Eppendorfgefäßen aufgefangen. Die gebundenen Proteine werden folgendermaßen eluiert:

10 ml Puffer B  
12 ml Puffer C  
20 ml Puffer D  
10 ml Puffer E

Die eluierten Fraktionen können bei –20°C aufbewahrt werden. Die Konzentration und Reinheit der Aliquots wird mit Hilfe der SDS-PAGE ermittelt.

### V.2.2.3 Fällung von Proteinen

#### V.2.2.3.1 Chloroform-Methanol-Fällung

Zu den Aliquots der zu fällenden Proteine wird das dreifache Volumen H<sub>2</sub>O, das vierfache Volumen Methanol sowie das einfache Volumen Chloroform gegeben, kräftig geschüttelt und der Ansatz für 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Es bilden sich zwei Phasen, an deren Grenze (Interphase) sich das denaturierte Protein befindet. Die obere Phase wird vorsichtig abgenommen und verworfen. Dem verbliebenen Ansatz, der sich aus der chloroformhaltigen unteren Phase und der proteinhaltigen Interphase zusammensetzt, wird das dreifache Volumen Methanol (bezogen auf die Ausgangslösung)

hinzugefügt, wodurch sich Methanol und Chloroform vermischen und keine Phasengrenzen mehr entstehen. Die Lösung wird für 1 – 2 min bei 11.000 g zentrifugiert, wodurch die Proteine sedimentiert werden. Der Überstand wird verworfen, das Sediment luftgetrocknet und je nach weiterer Verfahrensweise (SDS-PAGE; Immunisierung) weiterbearbeitet.

#### V.2.2.3.2 Fällung mit Trichloressigsäure (TCA)

Zu einem Aliquot von 500 µl wird 125 µl TCA (100%) gegeben, gemischt, für ca. 3 h bei 4°C inkubiert und danach bei 10.000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Sediment 1 x mit 300 µl TCA (5%), 1 x mit 1 ml Aceton (90%) und 1 x mit Aceton (100 %) gewaschen und danach luftgetrocknet. Die so gefällten Proteine können entweder bei -70°C gelagert oder direkt weiterbearbeitet werden.

#### V.2.2.4 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit dieser Methode werden Proteine in denaturierter Form in einem diskontinuierlichen Gelsystem aufgetrennt. Das SDS-Polyacrylamidgel setzt sich aus dem Sammelgel und dem Trenngel zusammen. Sie unterscheiden sich in ihrer Acrylamidkonzentration und in ihrem pH-Wert. Während im Sammelgel im angelegten elektrischen Feld eine lokale, starke Konzentration der Proteine bewirkt wird, werden die Proteine im sich anschließenden Trenngel gemäß ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgt mit Hilfe des Detergenz SDS, das durch seine eingebrachte sehr stark negative Ladung die Eigenladung der Proteine überdeckt, so dass alle Proteine zum positiven Pol des elektrischen Feldes wandern. Zusätzlich dient das SDS dazu, die Proteine in ihrer gestreckten Form zu bewahren.

##### V.2.2.4.1 Vorbereitung der Proben

Die Proben werden in Eppendorfgefäßen in SDS-Probenpuffer (nach Laemmli, 1970) resuspendiert und für 5 min bei 97°C erhitzt, wodurch die Proteine denaturiert werden. Anschließend werden die Proben kurz zentrifugiert, um eventuell noch vorhandene unlösliche Bestandteile zu sedimentieren.

##### V.2.2.4.2 Zusammensetzung der Gele

Die Angaben sind jeweils in ml und ausreichend für acht Minigele:

Zusammensetzung des Trenngels:

Acrylamidkonzentration	6 %	8 %	10 %	12 %	18 %
Lösung A	6,0	8,0	10,0	12,0	18,0
Lösung B	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
H <sub>2</sub> O	16,4	14,4	12,4	10,4	4,4
TEMED	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
10 % APS	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

Zusammensetzung des Sammelgels:

Lösung A:	1,3	ml
Lösung B:	2,5	ml
H <sub>2</sub> O:	6,2	ml
TEMED:	0,01	ml
10 % APS:	0,4	ml

#### V.2.2.4.3 Aufbau der Gelappatur und Gießen des Gels

Die 2 gründlich gereinigten Glasplatten werden aufeinander gelegt, wobei sie an den beiden seitlichen Rändern durch 2 Abstandhalter getrennt sind. Die Unterseite wird mit Klebeband und 0,5% Agaroselösung abgedichtet. Nach dem Erstarren werden die Komponenten des Trenngels zusammengefügt und bis zu einer Höhe von ca. 5 cm gegossen. Das Trenngel wird sofort mit H<sub>2</sub>O überschichtet, um einer ungleichmäßigen Polymerisation am oberen Rand vorzubeugen. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert ist, wird das H<sub>2</sub>O entfernt und ein Kamm mit 12 Taschen in den oberen, leeren Bereich der Glasplatten eingefügt. Mit einer Pipette wird das frisch hergestellte Sammelgel eingefüllt. Nach dessen Polymerisation werden das Klebeband sowie der Kamm vorsichtig entfernt und das Gelsystem in die Gelkammer eingespannt. Die vorbereiteten Proben werden in die Taschen geladen. Durch Anschließen der oberen Kammer an die Kathode, der unteren an die Anode und Anlegen einer konstanten Stromstärke von 20 mA wird die Elektrophorese gestartet. Nach ca. 1,5 h, wenn die Bromphenolblaubande fast die Agaroseschicht erreicht hat, wird die Elektrophorese gestoppt und das Gel aus den Glasplatten genommen. Das Sammelgel wird verworfen und das Trenngel mit Coomassie-Blau gefärbt oder für einen Westernblot oder eine Autoradiographie weiterverwendet.

#### V.2.2.4.4 Referenzproteine

Zur Bestimmung der Molekulargewichte der aufgetragenen Proteine werden in einer Spur Proteine bekannter Masse als Referenzproteine aufgetragen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Referenzproteine verwendet:

Referenzproteine:	Myosine	205 kD
	β-Galactosidase	116 kD
	Phosphorylase b	97 kD
	Albumin, (Rinderserum)	66 kD
	Albumin, (Hühnerei)	45 kD
	Carboanhydrase	29 kD
	Trypsin-Inhibitor	20 kD
	α-Lactalbumin	14 kD

#### V.2.2.4.5 Coomassiefärbung und Trocknen des Gels

Die Färbung der Proteine erfolgt für 20 min unter ständigem Schütteln in der Coomassie-Färbelösung. Danach wird das Gel in der Entfärbelösung, die mehrere Male gewechselt wird, entfärbt. Zur Aufbewahrung wird das Gel zwischen Einmachfolie und Whatman-Papier auf dem Geltrockner getrocknet.

### V.2.2.5 Fluorographie

Bei der *in vitro* Transkription / Translation werden die neu synthetisierten Proteine durch den Einbau einer radioaktiv markierten Aminosäure markiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde  $^{35}\text{S}$  Methionin verwendet. Die Empfindlichkeit der Autoradiographie kann durch im Polyacrylamidgel gelöste Fluorophore erheblich gesteigert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Fluorophor PPO verwendet.

Das Polyacrylamidgel wird über Nacht entfärbt und zweimal für 30 min unter leichtem Schütteln in Dimethylsulfoxid (DMSO) und anschließend für 3 h in PPO/DMSO (Rotifluoreszint D) inkubiert, wodurch das Gel vollständig entfärbt wird. Das Gel wird zweimal für 30 min im doppelten Volumen  $\text{ddH}_2\text{O}$  inkubiert, wodurch die Fluorophore ausfallen. Zum Trocknen wird das Gel auf ein feuchtes Filterpapier gelegt, mit Frischhaltefolie bedeckt und für 1 h auf dem Geltrockner getrocknet. Nach dem Abkühlen des Gels wird ein Röntgenfilm aufgelegt und die Kassette bei  $-70^\circ\text{C}$  über Nacht inkubiert.

### V.2.2.6 Übertragung von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose-Membranen (Western Blot)

Bei diesem Verfahren werden die Proteine, die in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Proteine, die durch die SDS-Anlagerung eine stark negative Ladung erhalten haben, wandern durch das Anlegen einer entsprechend gepolten Spannung aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran. Durch dieses Verfahren ist es möglich, mit Hilfe von entsprechenden Antikörpern einzelne, an die Nitrozellulose gebundene Proteine zu identifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Semitrockenblot verwendet.

#### Aufbau:

Es werden achtzehn gleich große Blatt Whatmanpapier zurechtgeschnitten, die an den Rändern ca. 1 cm größer sind als das zu blottende Gel selbst. Die Nitrozellulosemembran sollte eine dem Gel entsprechende Größe haben. Auf die Graphitplatte werden neun Blätter Whatmanpapier, die in Puffer drei getränkt wurden, gelegt. Darauf werden das in Puffer drei getränkte Gel und die in Puffer eins getränkte Nitrozellulose gelegt. Damit sich zwischen den einzelnen Lagen keine Luftblasen bilden, wird zwischendurch vorsichtig mit einem Glasstab über den Blotaufbau gerollt. Über die Nitrozellulose werden drei in Puffer eins getränkte sowie sechs in Puffer zwei getränkte Blätter Whatmanpapier gelegt. Zum Schluss wird die obere Graphitplatte aufgelegt und die Apparatur eventuell mit einem Gewicht beschwert, um einen gleichmäßigen Transfer der Proteine zu gewährleisten.

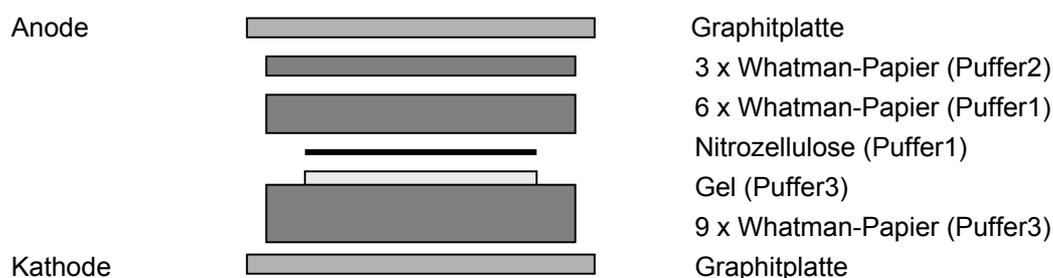


Abb. 87: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Semitrockenblots

### **Färben der transferierten Proteine mit Ponceau S**

Nach dem Transfer werden die Proteine mit Ponceau S angefärbt. So lassen sich eventuell vorhandene Störungen (z.B. durch Luftblasen) und Unregelmäßigkeiten im Laufverhalten der Proteine erkennen. Die Referenzbanden werden mit einem Stift nachgezogen, um beim späteren Entwickeln des Blots die ungefähre apparente molekulare Masse des Proteins abschätzen zu können. Die Nitrozellulosemembran wird für ca. 5 Sekunden in der Färbelösung geschwenkt und danach mit Wasser entfärbt. Die Nitrozellulose kann nun für das immunologische Nachweisverfahren weiterverwendet werden.

### **V.2.2.7 Immunologisches Proteinnachweisverfahren durch ECL**

Spezifische Antikörper können als biochemische Sonden verwendet werden, um bestimmte Proteine nach ihrer Fraktionierung durch Gelelektrophorese in Polyacrylamidgelen zu identifizieren. Diese Methode der „indirekten Immunocytochemie“ ist sehr empfindlich, da der primäre Antikörper in der Regel auch auf der Nitrozellulose immobilisierte Proteine erkennt. Der spezifische primäre Antikörper erkennt bestimmte Epitope des gesuchten Proteins. Der sekundäre Antikörper, der gegen konstante Regionen des primären Antikörpers gerichtet ist, die nicht für die Antigenerkennung verantwortlich sind, ist kovalent mit einem Markermolekül verbunden, das leicht nachweisbar ist; im Rahmen dieser Arbeit wurden sekundäre Antikörper verwendet, die an das Enzym Peroxidase (isoliert aus Meerrettich) gekoppelt wurden.

Um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern, werden die unspezifischen Bindungsstellen vor der Antikörperinkubation abgesättigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierfür eine Lösung aus 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST verwendet. Die Absättigung erfolgt bei 4°C über Nacht. Am darauf folgenden Tag erfolgen die Antikörperinkubationen. Zunächst erfolgt die Inkubation (1h) mit dem spezifischen Primärantikörper (Spezifische Verdünnung in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST)) unter leichtem Schwenken. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wird die Nitrozellulose dreimal mit TBST gewaschen. Der an Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper wird ebenfalls 1h lang inkubiert (Verdünnung: 1:10000 in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST). Danach erfolgen wieder drei Waschschrte mit TBST. Die weiteren Arbeiten erfolgen in der Dunkelkammer bei Rotlicht. Zur Detektion des gebundenen Antikörpers wird das „enhanced chemiluminescence-System“ (ECL) von Amersham verwendet. Die beiden Komponenten des Systems werden in einer frischen 1:1-Lösung zusammengefügt, dies hat eine chemische Reaktion der Substanz „Luminol“ mit der Substanz „Perhydrol“ zur Folge, die durch das anwesende Enzym Peroxidase katalysiert wird. Die Reaktion führt zur Emission von Licht, dessen Intensität zur Schwärzung eines aufgelegten Röntgenfilms ausreicht. Die Chemilumineszenz erreicht ihr Maximum nach zehn Minuten und dauert ca. eine Stunde an.

Durchführung:

Herstellung einer frischen 1:1 Mischung der beiden Komponenten, in der die Nitrozellulose 1 min lang inkubiert wird. Anschließend wird die Nitrozellulose faltenfrei in Haushaltsfolie eingewickelt und auf die proteintragende Seite ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Exposition beträgt in der Regel 1 - 10 min, abhängig von der Signalstärke. Der Röntgenfilm wird sofort entwickelt, fixiert und nach 30 min Wässerung im Trockenschrank getrocknet.

### V.2.2.8 Entfernen von spezifisch gebundenen Antikörpern von der Nitrozellulose

Damit eine bereits mit ECL entwickelte Nitrozellulosemembran erneut für eine Antikörperinkubation verwendet werden kann, müssen bereits gebundene Antikörper entfernt werden. Die Bindung des Antikörpers an sein Epitop kann durch Waschschriffe im sauren Milieu aufgehoben werden, da unter diesen pH-Bedingungen die Affinität des Antikörpers zu seinem spezifischen Epitop sehr schwach ist.

Durchführung:

Die Nitrozellulose wird 10 min in TBST inkubiert. Anschließend erfolgen zwei Inkubationsschritte in Glycinpuffer für die Dauer von jeweils 30 min, wodurch die gebundenen Antikörper abgewaschen werden. Anschließend wird die Nitrozellulose für 10 min in TBST inkubiert. Die weitere Behandlung entspricht der einer frisch geblotteten Nitrozellulose.

Glycinpuffer:                200 mM Glycin  
                                       200 mM NaCl                pH: 2,3

### V.2.2.9 Herstellung von polyklonalen Antikörpern

Zur Antikörperproduktion wird einem Meerschweinchen, einer Maus (oder einem anderen Tier) das entsprechende Antigen mehrere Male in bestimmten Zeitabschnitten injiziert und später das antikörperreiche Serum gesammelt. Dieses Antiserum enthält eine heterogene Mischung von Antikörpern, jeder von einem anderen B-Lymphozyten (antikörper-produzierende Zelle) hergestellt. Dieses Serum wird als polyklonales Antikörperserum bezeichnet. Die unterschiedlichen Antikörper erkennen verschiedene Epitope des spezifischen Antigens und können zur Identifizierung des Antigens nach seiner Auftrennung durch Gelelektrophorese in Polyacrylamidgelen verwendet werden.

#### Immunisierung von Mäusen und Meerschweinchen

Es werden drei Immunisierungen durchgeführt, deren Abstand jeweils drei Wochen beträgt. Die Gewinnung des Serums erfolgt acht Tage nach der dritten Immunisierung.

Für die Immunisierungen von einem Meerschweinchen (oder drei Mäusen) werden jeweils 100 µg (50 µg) des Proteins in 50 µl (25 µl) ddH<sub>2</sub>O rehydriert und in 50 µl (25 µl) Harnstofflösung (8M, PBS gepuffert) gelöst. Nach der Zugabe von weiteren 600 µl (50 µl) H<sub>2</sub>O werden die Proben für 10 min auf Eis inkubiert. Der Lösung wird 700 µl (100 µl) Freund'sches Adjuvants hinzugefügt und gründlich gemischt, bis eine stabile Emulsion entstanden ist. Für die erste Immunisierung wird komplettes Adjuvants, für alle weiteren Immunisierungen inkomplettes Adjuvants verwendet. Die Injektion der Tiere erfolgt unter Betäubung mit Ether subcutan in den Nackenbereich (Meerschweinchen) oder im Bereich der hinteren Extremitäten (Mäuse).

#### Gewinnung des Serums

Für die Gewinnung des Serums werden die Tiere mit Ether betäubt. Mit einer scharfen Schere wird die Halsschlagader durchtrennt und das herausrinnende Blut wird über einen Trichter in einem Falconröhrchen aufgefangen. Nach einer Inkubationszeit von 2h bei Raumtemperatur wird es zur Inkubation über Nacht in den Kühlraum bei 4°C gestellt. Am nächsten Tag wird der Blutkuchen durch Zentrifugation für 20 min bei 5000 rpm in der Minifuge RF (Heraeus) sedimentiert. Das Überstand wird abgenommen, in ein neues Falconröhrchen überführt und erneut für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das gewonnene Serum wird aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt.

### V.2.2.10 Affinitätsreinigung der Antikörper

Das gewonnene Serum der Meerschweinchen und Mäuse enthält neben den gewünschten Antikörpern viele andere Bestandteile des Blutes, sowie eine Vielzahl von Antikörpern, die nicht spezifisch für das immunisierte Protein sind. Um die Antikörper, die spezifisch gegen das Protein gerichtet sind, welches für die Immunisierung eingesetzt wurde, von den vielfältigen anderen Bestandteilen des Serums zu isolieren, wird eine Affinitätsreinigung der Antikörper durchgeführt. Das für die Immunisierung eingesetzte Protein (=Ligand) wird bei diesem Verfahren an ein bestimmtes Trägermaterial gekoppelt, im Rahmen dieser Arbeit wurde hierfür CNBr-aktivierte Sepharose (Pharmacia, Biotech) verwendet. Der Ligand wird unter bestimmten pH- und Salzbedingungen an die CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. Nach der Kopplung wird das Serum der CNBr-aktivierte Sepharose+Ligand hinzugefügt. Die Antikörper, die gegen den gekoppelten Liganden gerichtet sind, binden am Ligand. Alle nicht gebundenen Antikörper und anderen Bestandteile des Serums werden in den folgenden Waschschrritten entfernt. Durch eine Veränderung des pH-Wertes in den folgenden Elutionsschritten wird die Bindung der Antikörper an den Liganden wieder aufgehoben, und die affinitätsgereinigten Antikörper können isoliert werden.

Lösungen:

Kopplungs-Puffer	0,2 M 0,5 M	NaHCO <sub>3</sub> NaCl pH 8,3
Wasch-Puffer	0,1 M 0,5 M	Na-Acetat NaCl
Wasch-Puffer (Sepharose)		2 x PBS 0,1 % Triton in 2 x PBS 0,3 M NaCl in 2 x PBS 1 x PBS
Elutionspuffer	0,5 M 10 mM	NaCl Glycin pH 2,3
Neutralisations-Puffer	100 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 9,2
HCl-Lösung	1 mM	
Glycerin-Lösung	0,2 M	
NaN <sub>3</sub> -Lösung in PBS	0,01 %	

#### **Vorbereitung der CNBr-aktivierten Sepharose:**

Die Menge der vorzubereitenden Sepharose richtet sich nach der Menge des Proteins (=Ligand), das für die Affinitätsreinigung eingesetzt werden soll (Die Kopplungskapazität der gequollenen Sepharose beträgt 25 - 60 mg/ml Sepharose). Die getrocknete Sepharose wird in einer 1 mM HCl-Lösung

aufgenommen und im gequollenen Zustand auf eine Säule überführt. Die Sepharose wird vorsichtig mit 40 ml der 1 mM HCl-Lösung gewaschen und in ein 2 ml Gefäß überführt.

Kopplung des Liganden:

Das zu koppelnde Protein wird in Kopplungspuffer aufgenommen und gelöst. Die Proteinlösung wird zu der CNBr-aktivierten Sepharose gegeben und bei 4°C über Nacht unter Rotation inkubiert. Am nächsten Tag werden die verbliebenen freien reaktiven Gruppen durch Zugabe von 0,2 M Glycin (4h, RT) abgesättigt. Nach der Inkubationszeit wird die Sepharose 1 x mit Waschpuffer (0,1 M Na-acetat; 0,5 M NaCl) und 5 x mit Kopplungspuffer gewaschen.

#### **Bindung der Antikörper:**

Zur Bindung der Antikörper wird das Serum zur Sepharose gegeben und unter Rotation für 3h inkubiert. Nach der Bindung der Antikörper werden alle nicht gebundenen Bestandteile des Serums durch die folgenden Waschschrte entfernt: Die Sepharose wird nacheinander mit zweimal PBS; 0,1% Triton in 2 x PBS; 0,3 M NaCl in 2 x PBS; und 1 x PBS gewaschen.

#### **Eluierung der Antikörper:**

Die Eluierung erfolgt in 1,5 ml Eppendorfgefäßen. Zur Eluierung der Antikörper wird ca. 300 µl des glycinhaltigen Elutionspuffers hinzugefügt und die Sepharose vorsichtig für 30 sec invertiert. Da die Affinität eines Antikörpers zu seinem Epitop im sauren Milieu sehr schwach ist, kann er durch Erniedrigung des pH-Wertes entfernt werden. Danach wird die Sepharose für 30 sec bei 200 - 500 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in 150 µl Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (100 mM)-Puffer überführt. Dieser Schritt wird 4 x wiederholt. Die Sepharose kann in 0,01% NaN<sub>3</sub>-Lösung in PBS bei 4°C aufbewahrt werden. Um die Stabilität der Antikörper zu gewährleisten, wird den eluierten Antikörpern BSA (1mg/ml Endkonzentration) hinzugefügt.

### **V.2.2.11 Herstellung eines Gesamtproteinextraktes aus Kulturzellen**

Zur Herstellung eines Gesamtproteinextraktes aus Kulturzellen werden die dafür gezüchteten Kulturzellen durch Pipettieren vorsichtig von der Oberfläche der Zellkulturflasche gelöst, in ein steriles Falconröhrchen überführt und bei 500 g für 10 min sedimentiert. Das Sediment wird zweimal mit 1 x PBS gewaschen, in Extraktionspuffer (V.1.3.4) resuspendiert und für 20 min bei 4°C unter Rotation inkubiert. Zur Trennung der gelösten Proteine von den restlichen Bestandteilen der Kulturzellen wird der Ansatz für 20 min bei 11.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der die gelösten Proteine enthält, wird abgenommen und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Der Gesamtproteinextrakt kann nun bei -70°C für längere Zeit aufbewahrt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Herstellung eines Gesamtproteinextraktes *Drosophila melanogaster* Schneider S2 und Kc167 Kulturzellen verwendet.

### **V.2.2.12 Proteinauftrennung durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation**

Bei der Saccharose-Gradienten-Zentrifugation können Gesamtproteine von Kulturzellen nach ihrer Form und Größe bzw. ihrem Radius aufgetrennt werden.

Zur Herstellung eines kontinuierlichen Saccharose-Gradienten werden zwei verschiedenen konzentrierte Saccharose-Lösungen (5 bzw. 30% in Extraktionspuffer mit 0,5% Triton X-100) in ein System zweier verbundener Kammern gefüllt. Der ableitende Schlauch wird an ein Beckmann-Zentrifugenröhrchen

angeschlossen und die Lösungen unter ständigem Rühren in das Röhrchen gefüllt. Die zwei verschiedenen Saccharose-Lösungen werden durch die Verbindung der beiden Kammern gemischt und bilden im Zentrifugenröhrchen einen kontinuierlichen Saccharose-Gradienten von 30 bis ca. 10%. Auf die oberste Schicht des Zentrifugenröhrchens wird vorsichtig 1 – 1,5 ml des Gesamtproteinextraktes aus Kulturzellen bzw. 100 µg Immunglobulin G (in 1 ml Extraktionspuffer) zur Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten geschichtet und für 18 h bei 10.000 g (Beckmann Zentrifuge, Rotor SW41) zentrifugiert. Der Saccharose-Gradient wird mittels einer Pumpe in 500 µl Aliquots fraktioniert. Die Proteine werden mit TCA gefällt und die luftgetrockneten Sedimente in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Der Nachweis der fraktionierten Proteine erfolgt durch indirekte Immunocytochemie nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE und Transfer auf Nitrocellulose.

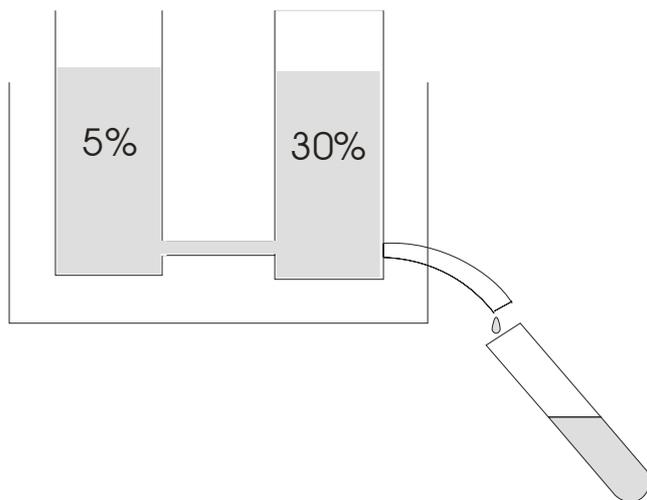


Abb. 88: Versuchsanordnung zur Herstellung eines kontinuierlichen Saccharose-Gradienten

### V.2.2.13 Extraktion von Proteinen

Durch Extraktionen können die biochemischen Eigenschaften von Proteinen untersucht werden. Dadurch kann unterschieden werden, ob das Protein als integrales Membranprotein vorliegt, an Membranen des Karyo-/Cytoskeletts assoziiert ist, oder ob es frei im Karyo-/Cytoplasma verteilt ist.

#### V.2.2.13.1 Extraktion von Proteinen durch Harnstoff

Durch die Extraktion mit Harnstoff werden Proteine so entfaltet, dass keine hydrophoben Wechselwirkungen mehr möglich sind. Da alle Proteine bis auf integrale Membranproteine in Lösung gehen, führt der Verlust des stützenden Proteinanteils zur Vesikulierung der Membranen. Die integralen Membranproteine werden mit den Membranen sedimentiert, während sich durch die Aufhebung der hydrophoben Wechselwirkungen die meisten Proteine nach der Zentrifugation im Überstand befinden.

Die zur Extraktion gezüchteten Kulturzellen werden in ein steriles Falconröhrchen überführt, sedimentiert und zweimal mit inkomplettem Kulturmedium und einmal mit 1x PBS gewaschen. Das Sediment wird in 750 µl 8 M Harnstoff-Puffer (V.1.3.1) resuspendiert und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Zur Fraktionierung werden die Zellen nach der Inkubation 45 min bei 100.000 g und 4°C der Beckmann Ultrazentrifuge zentrifugiert. Dabei sollten sich Membranen und gelöste Proteine

voneinander trennen. Der Überstand wird mit Methanol/Chloroform gefällt und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Das Sediment der Zentrifugation wird einmal mit Harnstoff-Puffer gewaschen und ebenfalls in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Beide Fraktionen werden in proportionalen Mengen durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und durch indirekte Immunocytochemie nachgewiesen.

#### **V.2.2.13.2 Extraktion von Proteinen durch Triton X-100**

Durch die Extraktion mit Triton X-100 werden die Lipidanteile der Membranen gelöst, wodurch die Membranen zerstört werden und als Lipidmicellen vorliegen. Integrale Membranproteine bleiben in den Membranpartikeln gebunden und befinden sich nach der Zentrifugation mit den sehr leichten Lipidmicellen im Überstand, während Proteine, die ein polymeres Netzwerk bilden, sedimentiert werden.

Die zur Extraktion gezüchteten Kulturzellen werden in ein steriles Falconröhrchen überführt, sedimentiert und zweimal mit inkomplettem Kulturmedium und einmal mit 1x PBS gewaschen. Das Sediment wird in 750 µl Triton-Puffer (V.1.3.2) resuspendiert und 10 min bei 4°C inkubiert. Zur Fraktionierung werden die Zellen nach der Inkubation 45 min bei 100.000 g und 4°C der Beckman Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird mit Methanol/Chloroform gefällt und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Das Sediment der Zentrifugation wird einmal mit Triton-Puffer gewaschen und ebenfalls in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Beide Fraktionen werden in proportionalen Mengen durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und durch indirekte Immunocytochemie nachgewiesen.

#### **V.2.2.14 Immunpräzipitation**

Bei der Immunpräzipitation handelt es sich um eine Affinitätschromatographie. Ein spezifischer Ligand, z.B. ein Antikörper, der kovalent an eine Gelmatrix gebunden wird, bindet an das für ihn spezifische Protein. Hierfür können Proteine eines Gesamtproteinextraktes aus Kulturzellen oder in vitro synthetisierte Proteine eines Transkriptions/Translationsansatzes eingesetzt werden. Die gebundenen Proteine können durch bestimmte Wasch- und Elutionsbedingungen gereinigt werden. Um die Interaktion von Proteinen in vitro zu untersuchen, wird eine Sonderform der Immunpräzipitation, die Co-Immunpräzipitation durchgeführt, bei der nicht nur das an den spezifischen Liganden gebundene Protein, sondern auch dessen Bindungspartner nachgewiesen werden können. Als Gelmatrix wurde Protein-A-Sepharose<sup>R</sup> CL-4B (Pharmacia Biotech) verwendet. Die Bindung an die F<sub>C</sub>-Region der Immunglobuline wird über durch CNBr gebundenes Protein A vermittelt. Es werden insbesondere IgG, aber auch IgM und IgA gebunden, deren variablen F<sub>ab</sub>-Regionen die Bindung mit den spezifischen Antigenen vermitteln.

##### **Vorbereitung der Protein-A-Sepharose und Kopplung der Antikörper**

Für jede Immunpräzipitation werden 5 - 10 mg Sepharose und 2 - 3 µl Serum (IgG) eingesetzt. Die Sepharose wird in 1 x PBS vorgequollen, 5 min bei 500 g zentrifugiert und insgesamt 3 x mit 1 x PBS gewaschen. Der Überstand wird verworfen und die Sepharose in 60 µl 1 x PBS resuspendiert.

Um eine unspezifische Bindung der Proteine eines Gesamtproteinextraktes aus Kulturzellen zu vermeiden, werden die mit Immunpräzipitationspuffer (V.1.3.3) extrahierten Proteine zu einem Aliquot der Sepharose gegeben und 30 min bei 4°C inkubiert. Zur Sedimentation unspezifisch gebundener

Proteine wird der Ansatz für 5 min bei 500 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und bis zur Bindung an den Primärantikörper Bei 4°C aufbewahrt.

Zur Kopplung des Antikörpers werden 2 – 3 µl Serum zur Protein-A-Sepharose gegeben und für 2 h auf Eis inkubiert, dabei wird die sich absetzende Sepharose immer wieder durch vorsichtiges Pipettieren resuspendiert. Nach der Bindung des Antikörpers wird die Sepharose 3 x mit 1 x PBS und 2 x mit Immunpräzipitationspuffer gewaschen. Zur Bindung der spezifischen Proteine werden 1 ml des vorinkubierten Proteinextraktes (Proteinkonzentration 30 – 35 mg/ml) bzw. vitro synthetisierte Proteine eines Transkriptions/Translationsansatzes zur Sepharose gegeben und 2 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Um unspezifische Proteine von der Sepharose zu entfernen, wird der Ansatz nach der Inkubationszeit für 5 min bei 500 g zentrifugiert und 4 x mit Immunpräzipitationspuffer und 1 x mit PBS gewaschen. Der Überstand wird vollständig abgenommen und das Sediment der Sepharose in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Zur Kontrolle wird die Immunpräzipitation mit einem Ansatz ohne Antikörper durchgeführt.

### V.2.2.15 Kernrekonstitution und Chromatin Bindung in vitro

Interphasischer Eiextrakt ist in der Lage, um Chromatin herum eine Kernhülle sowie Annulate lamellae (cytoplasmatische Membranstapel, die Elemente der Kernporen enthalten) auszubilden. Zur Untersuchung der Fähigkeit von Proteinen, an Chromatin zu binden, wird der interphasische Eiextrakt durch Zentrifugationen und Inkubation bei 80°C fraktioniert. Annähernd alle löslichen Proteine, einschließlich der Kernlamine und Proteine der Kernporenkomplexe werden sedimentiert. Der Überstand enthält das für die Dekondensation des Spermienchromatins notwendige Chaperon Nukleoplasmin. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Eiextrakt und Spermien von *Xenopus laevis* verwendet. Die Präparation von Spermien sowie die Herstellung des interphasischen Eiextraktes, dessen Anreicherung (S<sub>200</sub> Überstand) und Fraktionierung durch Hitzebehandlung, wurden nach der Methode, beschrieben in Gajewski and Krohne, 1999 durchgeführt. Die Spermien und der S<sub>200</sub> Überstand wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dabauvalle zur Verfügung gestellt.

Um die Bindung von Proteinen an Chromatin zu untersuchen, werden die bakteriell exprimierten und gereinigten Proteine mit Methanol/Chloroform gefällt und in ddH<sub>2</sub>O (Endkonzentration: 1 - 2µg/µl) resuspendiert. Den gelösten Proteinen wird der hitzebehandelte Eiextrakt (S<sub>200</sub>) hinzugefügt und die Ansätze werden für 5 min bei 4°C inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile werden durch Zentrifugation bei 10.000 g und 4°C für 10 min sedimentiert. Der Hälfte des Überstandes werden Spermien (20.000 Spermien/µl S<sub>200</sub>) zugefügt, die andere Hälfte wird als Kontrolle verwendet. Beide Ansätze werden für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die Ansätze 1:3 mit Salzpuffer (50mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, pH 7,2) vermischt und bei 10.000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Die Überstände können direkt weiter verwendet oder bei -70°C gelagert werden. Die Sedimente werden mit Puffer gewaschen und ebenfalls bei -70°C gelagert. Beide Fraktionen werden in proportionalen Mengen durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und durch indirekte Immunocytochemie nachgewiesen.

### V.2.2.16 Herstellung eines Hefe-Proteinextraktes

#### Vermehrung und Vorbereitung der Hefezellen

Der zu analysierende Hefestamm wird über Nacht in YPAD-Medium bei 30°C im Rundschüttler angezogen. Von dieser Kultur wird eine frische 25 ml-Flüssigkultur (YPAD-Medium) angelegt und mit

1 ml angeimpft. Die Hefe wird bis zum Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,7 – 1 kultiviert, in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 1000 g für 5 min zentrifugiert. Das Sediment wird 1 ml  $H_2O$  gewaschen und die Hefezellen aufgeschlossen.

#### **Aufschluss der Hefezellen mit Glasperlen**

Zur Herstellung eines Hefe-Proteinextraktes müssen zunächst die Zellwände der Hefezellen aufgeschlossen werden. Das Hefe-Sediment wird in 1 ml  $H_2O$  resuspendiert und bei 1500 g für 1 min zentrifugiert. Das Sediment wird in 0,5 ml eiskaltem SDS-Probenpuffer (Laemmli, Zusatz von 0,5 mM PMSF und 0,5 mM Benzamidin) resuspendiert und zu 0,5 ml Glasperlen gegeben. Zum Aufschluss der Zellwände wird der Ansatz 4 x für 45 sec gevortext, zwischen diesen Schritten werden die Hefeextrakte für 30 sec auf Eis abgekühlt. Zur Sedimentation der Glasperlen sowie großer Zellbestandteile wird der Ansatz für 5 min bei 11.000 und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und für die SDS-PAGE eingesetzt.

### **V.2.3 Zellkulturmethoden**

#### **V.2.3.1 Kultur von *Drosophila melanogaster* Zellen**

##### **V.2.3.1.1 Kultivierung von *Drosophila melanogaster* Schneider S2 Zellen, S2R+ Zellen und Kc167 Zellen**

Die Zellen werden in 50 ml Kulturflaschen, 35mm-Schälchen zur Transfektion oder in einer 24-Loch-Platte im Brutschrank unter konstanter Temperatur (27°C) unter Ausschluss von  $CO_2$  gehalten. Um eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten, wird das verbrauchte Kulturmedium alle 2 Tage durch frisches Medium ersetzt. Das alte Medium wird abgesaugt und durch 6 ml frisches Medium ersetzt.

##### **V.2.3.1.2 Teilen von *Drosophila* Schneider S2 Zellen, Kc167 Zellen und Anlegen einer neuen Flasche**

Die Zellen werden, wenn sie eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht haben, geteilt. Das Medium der zu teilenden Flasche wird abgesaugt. Um die Zellen zu vereinzeln werden 6 ml Kompletmedium zu den Zellen gegeben und die Zellen durch vorsichtiges Pipettieren resuspendiert. Zum Anlegen einer neuen Kulturflasche wird 1ml dieser Zellsuspension in eine neue Flasche überführt und mit 5 ml Kompletmedium aufgefüllt. Das Medium wird am nächsten Tag durch 6 ml frisches Kompletmedium ersetzt, um eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten.

##### **V.2.3.1.3 Teilen von *Drosophila* S2R+ Zellen und Anlegen einer neuen Flasche**

Die Zellen werden, wenn sie eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht haben, geteilt. Das Medium der zu teilenden Flasche wird abgesaugt. Zum Waschen der Zellen werden vorsichtig 4 ml PBS hinzugefügt und wieder abgesaugt. Zum Ablösen der Zellen wird 1 ml der Trypsinlösung auf die Zellen gegeben und die Kulturflasche etwas geschwenkt, um das Ablösen der Zellen zu verfolgen. Nach ca. 15 - 20 min haben sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst. Um die Zellen zu vereinzeln werden 5 ml Kompletmedium zu den Zellen gegeben und die Zellen durch vorsichtiges Pipettieren

resuspendiert. Zum Anlegen einer neuen Kulturflasche werden 2 – 2,5 ml dieser Zellsuspension in eine neue Flasche überführt und mit 4 ml Komplettmedium aufgefüllt. Das Medium wird am nächsten Tag durch 6 ml frisches Komplettmedium ersetzt, um eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten.

### **V.2.3.2 Kultur von *Xenopus laevis* XLKE-A6 Zellen und *Ceropithecus aethiops* COS-7 Zellen**

#### **V.2.3.2.1 Kultivierung von *Xenopus* A6 und *Ceropithecus* COS-7 Zellen**

Die Zellen werden in 50 ml Kulturflaschen oder in 35mm-Schälchen zur Transfektion im Brutschrank unter konstanter Temperatur (27°C) und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5 % gehalten. Um eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten, wird das verbrauchte Kulturmedium alle 2 Tage durch frisches Medium ersetzt. Das alte Medium wird abgesaugt und durch 6 ml frisches Medium ersetzt. Die Kultivierung der COS-7 Zellen erfolgt wie bei den A6 Zellen, allerdings werden die Säugerzellen bei einer konstanten Temperatur von 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten.

#### **V.2.3.2.2 Teilen von *Xenopus* A6-Zellen und *Ceropithecus* COS-7 Zellen und Anlegen einer neuen Flasche**

Die Zellen werden, wenn sie eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht haben, geteilt. Das Medium der zu teilenden Flasche wird abgesaugt. Zum Waschen der Zellen werden vorsichtig 2 ml PBS hinzugefügt und wieder abgesaugt. Zum Ablösen der Zellen wird 1 ml der Trypsinlösung auf die Zellen gegeben und die Kulturflasche etwas geschwenkt, um das Ablösen der Zellen zu verfolgen. Nach ca. 1-1,5 min haben sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst. Um die Zellen zu vereinzeln werden 5 ml Komplettmedium zu den Zellen gegeben und die Zellen durch vorsichtiges Pipettieren resuspendiert. Zum Anlegen einer neuen Kulturflasche werden 1,5 ml dieser Zellsuspension in eine neue Flasche überführt und mit 4,5 ml Komplettmedium aufgefüllt. Das Medium wird am nächsten Tag durch 6 ml frisches Komplettmedium ersetzt, um eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten.

### **V.2.3.3 Transfektion von Kulturzellen**

Unter der Transfektion versteht man das Einschleusen von Fremd-DNA in Eukaryotenzellen. Für das Einschleusen von doppelsträngiger RNA in Kulturzellen wird im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls der Begriff der Transfektion verwendet. Die eingeschleusten Plasmide besitzen neben einem prokaryotischen Replikationsstart zur Vermehrung in Bakterien auch einen eukaryotischen, um ebenfalls eine Expression in eukaryotischen Zellen zu gewährleisten. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Vektoren codieren für das grün-fluoreszierende Protein GFP (**green fluorescent protein**), welches aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde. Die codierende Sequenz für das GFP befindet sich vor (pEGFP-C2) oder hinter (pEGFP-N1) der multiplen Klonierungsstelle des Vektors, so dass es am carboxyterminalen oder aminoterminalen Ende des Fusionsprotein exprimiert wird. Das GFP absorbiert Licht der Wellenlänge 488 nm und emittiert es bei 507 nm, wodurch es im Fluoreszenzmikroskop auf seine Intensität und seinen Einfluss auf die Zelle untersucht werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, abhängig von der Kulturzelllinie, die Transfektionen mit den Reagenzien Effectene (Qiagen, Düsseldorf) oder Roti<sup>®</sup>-Fect (Roth, Karlsruhe) durchgeführt. Beide Reagenzien kondensieren die DNA der Zelle in kompakte Komplexe und bewirken mittels Endocytose deren Aufnahme in Kulturzellen. Die Transfektionsrate ist im Allgemeinen bei den Xenopus A6 Zellen wesentlich höher als bei den Drosophila Schneider S2-Zellen.

#### **V.2.3.3.1 Transfektion der *Drosophila melanogaster* Schneider-S2 Zellen Vorbereiten der Deckgläschen**

Zur Transfektion werden frisch autoklavierte Deckgläschen, deren Durchmesser 12 mm beträgt, verwendet. Mit einer sterilen Pinzette werden 4 Deckgläschen auf den Boden einer Petrischale (35 mm Durchmesser) gedrückt und 1,5 ml Komplettmedium hinzugefügt. Zur Transfektion werden 0,5 ml – 1 ml der Zellen hinzugefügt (ca.  $1-3 \times 10^5$  Zellen; Diese Angabe bezieht sich auf eine Konfluenz der Ausgangsflasche von ca. 80 %). Die Petrischalen werden mit Parafilm umwickelt und so luftdicht verschlossen. Die Zellen werden 12-24 h im Brutschrank kultiviert und das alte Medium am nächsten Tag vorsichtig durch neues Medium ersetzt. Haben die Zellen eine Konfluenz von 30-50 % erreicht, kann die Transfektion durchgeführt werden.

#### **Transfektion der *Drosophila melanogaster* Schneider S2 Zellen mit Effectene<sup>™</sup>**

Zur Transfektion wird eine Konzentration der zu transfizierenden DNA von 2 µg eingesetzt. Die DNA sollte in 10-15 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 gelöst sein. Die DNA wird vor der Verwendung für 15 min auf 72°C erhitzt, um eventuell vorhandene Mikroorganismen in der DNA-Lösung abzutöten. In einem Eppendorfgefäß wird EC-Puffer (QIAGEN) zu der DNA gegeben, so dass das Endvolumen 150 µl beträgt. Es werden 16 µl des Enhancers hinzugefügt und vorsichtig gemischt (das Verhältnis von DNA zu dem Enhancer sollte 1 µg DNA zu 8 µl Enhancer betragen). Die Mischung wird 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden 20 µl Effectene<sup>™</sup> Reagenz hinzugefügt. Die Mischung wird für 10 sec geschüttelt und danach für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Kulturmedium der für die Transfektion vorbereiteten Zellen wird abgesaugt und die Zellen werden vorsichtig mit Medium (ohne Serum) gewaschen. Danach werden 2 ml Komplettmedium hinzugefügt. 1 ml des Komplettmediums wird zu dem Transfektionsansatz gegeben. Dieser wird tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Petrischalen werden mit Parafilm luftdicht umwickelt und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Morgen wird das alte Kulturmedium durch 2,5 - 3 ml frisches Kulturmedium ersetzt, um eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten.

#### **V.2.3.3.2 Transfektion der Xenopus A6-Zellen**

##### **Vorbereiten der Deckgläschen**

Zur Transfektion werden frisch autoklavierte Deckgläschen, deren Durchmesser 12 mm beträgt, verwendet. Mit einer sterilen Pinzette werden 4 Deckgläschen auf den Boden einer Petrischale (35 mm Durchmesser) gedrückt und 1,5 ml Komplettmedium hinzugefügt. Es werden 0,5 ml – 1 ml trypsinbehandelter Zellen hinzugefügt (ca.  $1-3 \times 10^5$  Zellen; diese Angabe bezieht sich auf eine Konfluenz der Ausgangsflasche von ca. 80 %). Die Zellen werden 12-24 h im Brutschrank kultiviert und das alte Medium am nächsten Tag vorsichtig durch neues Medium ersetzt. Haben die Zellen eine Konfluenz von 50-80 % erreicht, kann die Transfektion durchgeführt werden.

**Transfektion der Xenopus A6 Zellen mit Rotifect**

Zur Transfektion wird eine Konzentration der zu transfizierenden DNA von 5 µg eingesetzt. Die DNA sollte in 10-15 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 gelöst sein. Die für die Transfektion benötigte DNA wird 10-15 min bei 70°C erhitzt, um eventuell vorhandene Bakterien abzutöten, vorsichtig wieder abgekühlt und in 60 µl Medium (ohne Serum und Antibiotika) aufgenommen. Eine Mischung von 10 µl Rotifect und 60 µl Medium (ohne Serum und Antibiotika) wird vorbereitet, und die beiden Ansätze werden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 0,8 ml Medium (ohne Serum und Antibiotika) der DNA/Rotifect-Mischung hinzugefügt, so dass das Gesamtvolumen ca. 940 µl beträgt. Das Kulturmedium der für die Transfektion vorbereiteten Zellen wird abgesaugt, und die Zellen werden 2 x vorsichtig mit je 1 ml PBS gewaschen. Zur Transfektion wird die DNA/Rotifect/Medium-Mischung vorsichtig hinzugefügt, und die Zellen werden für 6h bei 27°C im Brutschrank inkubiert. Danach werden 2 ml Komplett-Medium hinzugefügt, und die Zellen werden über Nacht im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Morgen wird das alte Kulturmedium durch 2,5 - 3 ml frisches Kulturmedium ersetzt, um eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten.

**V.2.3.3.3 Vorbereitung transfizierter Kulturzellen für die SDS-PAGE**

Das Zellkulturmedium der transfizierten Zellen wird vorsichtig abgesaugt, und die Zellen werden 2 x mit PBS gewaschen. Danach werden sie 1 x mit ½ konzentriertem PBS gewaschen. Zu den Zellen wird 1 ml Ethanol (100%) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min werden die Zellen mit einem Gummischaber abgelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen werden 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand wird verworfen, und das Sediment 1 x mit 1 ml Ethanol (100%) gewaschen. Zur Dehydrierung wird dem Sediment 1 ml Aceton (100%) hinzugefügt und 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, und das getrocknete Sediment bei -70°C eingefroren oder in 30 µl Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 97°C erhitzt.

**V.2.3.3.4 RNA-Transfektion von *Drosophila melanogaster* Kulturzellen**

Die angewandte RNA-Transfektionsmethode wurde in Anlehnung an das Protokoll (Clemens et al, 2000) durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Transfektion folgende Kulturzelllinien von *Drosophila melanogaster* verwendet:

Schneider S2 Zellen  
Kc167 Zellen  
Schneider S2R+ Zellen

**Durchführung:**

Die für die RNA-Transfektion kultivierten Zellen werden vorsichtig vom Boden der Kulturflasche gelöst, in ein steriles 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1000 rpm (Hettich Universal/K2S) sedimentiert. Das Sediment wird in 10 ml Kulturmedium (ohne Serum und Antibiotika) resuspendiert, und die Zellzahl durch Zählung mit der Neubauer Zählkammer bestimmt. Hierfür werden von der Zellsuspension 100 µl in der Zählkammer ausgewertet. Es werden 3 Zählungen durchgeführt, deren Mittelwert als Richtwert für Zellzahl pro Milliliter angibt (Zellzahl pro ml =  $n \times 10^4$ ;  $n$  = Anzahl der ausgezählten Zellen pro Quadrat). Die Zellsuspension wird mit Medium (ohne Serum und Antibiotika) entsprechend verdünnt, so dass die Endkonzentration der Zellen in Lösung  $0,75 - 1,00 \times 10^6$  für immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen oder  $0,5 \times 10^6$  für proteinbiochemische Untersuchungen beträgt.

Für jeden RNA-Transfektionsansatz werden 2 x 1 ml der Zellsuspension verwendet und in 2 Bereiche einer 6-Lochplatte gegeben. Der Zellsuspension des 1. Bereiches wird die zu transfizierende

doppelsträngige RNA zugefügt, so dass eine Endkonzentration von 37 nM vorliegt. Dies entspricht bei einer dsRNA von 700 Basenpaaren Länge 15 µg RNA. Der 2. Bereich stellt die Kontrolle dar. Die 6-Lochplatte wird 1 min durch kreisende Bewegungen kräftig geschüttelt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden den Ansätzen je 3 ml Komplettmedium zugefügt, die Platte mit Parafilm luftdicht verschlossen und für 24 h bei 27°C im Brutschrank inkubiert. Für die proteinbiochemische Analyse werden die Zellen für 72 – 96 h im Brutschrank inkubiert. Das Kulturmedium wird 24 h nach der Transfektion durch frisches Komplettmedium ausgetauscht, um die Nährstoffversorgung der Kulturzellen zu gewährleisten. Für die Analyse der transfizierten Zellen am Immunfluoreszenzmikroskop wird nach 24 h eine 24 Lochplatte mit frisch autoklavierten Deckgläschen (12 mm Durchmesser) vorbereitet. Mit einer sterilen Pinzette wird 1 Deckgläschen auf den Boden jedes Loches gedrückt und 1,5 – 2 ml Komplettmedium hinzugefügt. Die Zellen der beiden Ansätze der RNAi-Transfektion werden vorsichtig vom Boden der 6-Lochschaale gelöst und entsprechend der Anzahl der zu analysierenden Tage auf die Deckgläschen der 24-Lochschaale aufgeteilt. Die Schaale wird mit Parafilm luftdicht verschlossen und für 1 – 5 weitere Tage im Brutschrank inkubiert. Nach 2 h haben sich die Kulturzellen auf den Deckgläschen angesiedelt und können bereits zur Analyse der Transfektionsrate verwendet werden. Die Analyse der Transfektionsrate erfolgt im Allgemeinen 24, 48, 72, 96, 120 und 144 h nach der Transfektion. Die Deckgläschen werden hierfür aus der 24-Lochplatte entnommen, fixiert und für die Analyse am CLSM vorbereitet. Die proteinbiochemische Analyse der Transfektionsansätze erfolgt 72 bzw. 96 h nach der Transfektion. Die Kulturzellen werden vorsichtig vom Boden der 6-Lochplatte gelöst, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellzahl durch Zählung mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen werden sedimentiert und mit SDS-Probenpuffer versetzt, so dass die Zellzahl 125.000 / 10 µl beträgt. Für die SDS-PAGE werden je 125.000 Zellen des Transfektionsansatzes sowie des Kontrollansatzes verwendet.

#### **V.2.3.4 Vorbereitung der Drosophila Kulturzellen für die SDS-PAGE**

Die Kulturzellen (Konfluenz von 90 – 100 %) werden vorsichtig vom Boden der Kulturflasche gelöst und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen werden 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment 2 x mit Kulturmedium (ohne Serum und Antibiotika) gewaschen. Das Sediment wird in 100 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert. Für die SDS-PAGE werden Aliquots von 5 – 10 µl eingesetzt.

#### **V.2.3.5 Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen**

Zur Lagerung bei -70°C oder in flüssigem Stickstoff werden die entsprechenden Kulturzellen durch Trypsinbehandlung oder Pipettieren abgelöst, in Komplettmedium aufgenommen und in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen werden schonend für 5 min bei 1000 rpm (Hettich Universal/K2S) sedimentiert und in Einfriermedium (7ml Komplettmedium, 2 ml FCS, 1 ml DMSO) aufgenommen und in 1,5 ml Kryoröhrchen überführt. DMSO verhindert bei langsamer Abkühlung die Auskristallisierung des in den Zellen vorhandenen Wassers. Da es auch als starkes Zellgift wirkt, werden die Kryoröhrchen sofort in eine Einfrierbox (Nalgene™ Cryol C Freezing Container) überführt und die Box bei -70°C eingefroren. Das in der Einfrierbox befindliche Isopropanol verhindert ein zu schnelles Abkühlen der Zellen und beugt somit der Kristallisierung vor.

Zum Auftauen der Zellen werden die Kryoröhrchen im Wasserbad inkubiert. Die Zellsuspension wird sofort nach dem Auftauen in ein steriles 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Komplettmedium

überführt. Die Lösung wird bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand mit dem Zellgift DMSO sofort entfernt. Das Sediment wird in 6 ml Komplettmedium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt. Die Zellen werden entsprechend den Bedingungen der spezifischen Zelllinie über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wird das Nährmedium abgesaugt und durch frisches ersetzt, um eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten und letzte Rückstände des DMSO zu entfernen.

## **V.2.4 Licht- und elektronenmikroskopische Methoden**

### **V.2.4.1 Herstellung der Präparate für die Immunfluoreszenz**

#### **V.2.4.1.1 Herstellung von Quetschpräparaten von *Drosophila melanogaster***

Zur Herstellung von Quetschpräparaten von Embryonen und werden zunächst mehrere Objektträger zum Entfetten für 2 min in Aceton gelegt und anschließend trocken gerieben. Mit einer sauberen Pinzette wird das embryonale oder larvale Gewebe auf einen Objektträger gelegt, überschüssiges Medium entfernt und mit einem runden Deckglas bedeckt. Durch leichtes Andrücken des Deckglases werden die Zellen auf dem Objektträger verteilt. Das Präparat wird auf einen auf -70°C gekühlten Metallblock gelegt und auf diese Weise schockgefroren. Nach ca. 10 sec wird mit einer Rasierklinge das Deckglas abgesprengt und das Präparat an der Luft getrocknet.

#### **V.2.4.1.2 Methoden der Fixierung von Kulturzellen, embryonalen und larvalen Gewebe von *Drosophila melanogaster***

Um die Expression und Lokalisation spezifischer Proteine von Kulturzellen und embryonalen und larvalen Geweben analysieren zu können, müssen die Zellen fixiert werden, um die Zellstrukturen zu stabilisieren und zu permeabilisieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden der Fixierung angewendet, abhängig von der Löslichkeit der zu untersuchenden Proteine und davon, ob eine Antikörperinkubation mit anschließender Dauerfixierung des Präparates durchgeführt werden sollte, oder die Zellen nur einmalig für Aufnahmen am CLSM verwendet werden sollten.

##### **Fixierung mit Methanol/Aceton**

Diese Fixierungsmethode wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Analyse aller nicht löslichen Proteine (z.B. integrale Membranproteine, membranassoziierte Proteine) angewendet. Die mit Kulturzellen bewachsenen Deckgläschen werden kurz in 1 x PBS gewaschen, um restliches Kulturmedium zu entfernen, 5 min bei -20°C in Methanol fixiert und zur Dehydrierung 1 min bei -20°C in Aceton inkubiert. Die Deckgläschen werden sofort in 1 x PBS überführt.

##### **Fixierung mit Formaldehyd/Triton X-100**

Diese Fixierungsmethode wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Analyse aller löslichen Proteine verwendet. Die mit Kulturzellen bewachsenen Deckgläschen bzw. das embryonale oder larvale Gewebe von Quetschpräparaten wird 20 min in 3% Formaldehyd/PBS fixiert. Zur Entfernung des Formaldehyds werden die Präparate 2 x 5 min in 1 x PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen werden die Präparate 5 min in 0,3% Triton X-100/PBS inkubiert. Abschließend werden die Präparate 2 x 5 min in 1 x PBS gewaschen.

### **Fixierung mit Glutaraldehyd**

Bei dieser Methode der Fixierung wird die Zelle in ihrem ursprünglichen, nicht entwässerten Zustand erhalten. Da sie keine Antikörperinkubation zulässt, kann sie nur zur einmaligen Analyse von exprimierten GFP-Fusionsproteinen am CLSM herangezogen werden. Die Glutaraldehydfixierung stellt somit eine geeignete Methode dar, um die Auswirkungen des GFP-Fusionsproteins auf die Morphologie der Zelle zu untersuchen. Artefakte, die durch die oben genannten Fixierungsmethoden und durch eine Antikörperinkubation möglicherweise auftreten können, können bei der Glutaraldehydfixierung ausgeschlossen werden.

Die transfizierten Kulturzellen werden kurz in 1 x PBS gewaschen und 15 min mit einer Glutaraldehydmischung inkubiert. Dazu wird einer Lösung im Verhältnis 1:1 aus 1 x PBS und 2,5% Glutaraldehyd mit Ionen (2,5% Glutaraldehyd; 50 mM Cacodylat pH 7,2; 50 mM KCl; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>) hergestellt. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und können bis zur Verwendung bei 4°C in 1 x PBS gelagert werden. Zur Analyse am CLSM werden die Deckgläschen aus dem 1 x PBS entnommen und mit 50% Glycerin in 1 x PBS eingebettet.

### **V.2.4.2 Selektive Permeabilisierung mit Digitonin**

Die Permeabilisierung mit Digitonin ist abhängig vom Cholesteringehalt der Membranen. Während unter den gewählten Bedingungen die Plasmamembran der Zelle bereits permeabilisierbar ist, bleibt die Kernmembran intakt, und das Nukleoplasma sowie die innerer Kernmembran sind bei einer anschließenden Antikörperinkubation für die Antikörper nicht zugänglich.

#### **Durchführung:**

Die auf Deckgläschen kultivierten Zellen werden mit 3% Formaldehyd/PBS fixiert. Die Hälfte der Deckgläschen wird als Kontrolle für 10 min mit 0,1% Triton X-100 in PBS bei Raumtemperatur permeabilisiert, die andere Hälfte wird für 5 min bei 4°C mit 40 mg/ml Digitonin in PBS inkubiert. Die Deckgläschen werden zweimal für je 4 min PBS gewaschen und für die Antikörperinkubation verwendet.

### **V.2.4.3 Antikörperinkubation**

Die fixierten, mit Zellen beschichteten Deckgläschen, Objektträger oder Gewebe von Quetschpräparaten werden kurz in 1 x PBS gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen werden die Präparate vor Beginn der Antikörperinkubation mit 0,5% BSA/PBS für 5 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem primären Antikörper. Die Antikörper werden entsprechend den Angaben in 0,5% BSA/PBS verdünnt. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 30 min werden die Präparate 2 x 5 min in 1 x PBS gewaschen. Es folgt die Inkubation mit dem sekundären, an einen Fluoreszenzfarbstoff (Texas Red, DTAF oder Cy2) gekoppelten Antikörper, der entsprechend den Angaben in 0,5% BSA/PBS verdünnt wurde. Die Inkubationszeit beträgt ebenfalls 30 min, wobei 10 min vor deren Ende der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst in einer Verdünnung von 1:1000 in 0,5% BSA/PBS zugefügt wird. Dieser interkaliert mit der DNA, wodurch die Zellkerne lokalisiert werden können. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Präparate 2 x 5 min in PBS gewaschen, für 2 min in technischem Ethanol dehydriert und anschließend in noch feuchtem Zustand in Moviol (Hoechst, Frankfurt) eingebettet. Die Präparate können bei 4°C aufbewahrt werden und sind bis zu 6 Monate lang haltbar.

#### **V.2.4.4 Herstellung von whole-mount Präparaten von *Drosophila melanogaster***

##### **Präparation und Fixierung von Ovariolen**

Adulte, weibliche Fliegen von *Drosophila melanogaster* werden mit CO<sub>2</sub> betäubt und der Kopf sowie die Flügel werden mit einer feinen Schere abgetrennt. Die Fliegen werden in Drosophilapuffer (V.1.3.5) überführt und die Ovariolen vorsichtig mit einer Uhrmacherpinzette entnommen. Die präparierten Ovariolen werden in eine Schale mit PBS überführt. Zur Fixierung werden die Ovariolen zunächst für 15 min in 3% Formaldehyd / PBS fixiert und dann für weitere 15 min in 3% Formaldehyd / 1% Triton / PBS inkubiert. Anschließend folgen zwei Waschschrte zu je 5 min in 1% Triton/ 0,5% BSA / PBS. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen werden die Ovariolen in 1% Triton / PBS überführt und für 30 min inkubiert.

##### **Antikörperinkubation**

Im Anschluss an die Fixierung erfolgt die Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4°C über Nacht. Der Antikörper wird entsprechend den Angaben in V.1.6 in 1% BSA / PBS verdünnt. Am folgenden Tag werden die Ovariolen für 3 h in 1% BSA / PBS gewaschen. Zur Fixierung der primären Antikörper werden die Ovariolen für 15 min in 3% Formaldehyd / PBS inkubiert. Anschließend folgen zwei Waschschrte zu je 20 min in 1% BSA / PBS, danach werden die Präparate für 3 h mit dem sekundären Antikörper in vorgegebener Verdünnung inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wird der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst (Verdünnung: 1:500 in 1% BSA / PBS) hinzugefügt und für 1 h inkubiert. Zum Waschen werden die Ovariolen über Nacht in BSA / PBS überführt. Am nächsten Tag werden die Ovariolen in eine Mischung aus einem Volumenanteil PBS und einem Volumenanteil Glycerin (100%) überführt. Auf einen gesäuberten Objektträger wird ein Tropfen PBS/Glycerin gegeben und die Ovariolen darin eingebettet. Das Präparat wird vorsichtig mit einem Deckglas zugedeckt und bis zum Mikroskopieren bei 4°C aufbewahrt.

#### **V.2.4.5 Analyse am konfokalen Laser Scanning Mikroskop**

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse von Zellpräparaten am CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope, Typ TCS SP; Leica, München) bietet die Möglichkeit zur Untersuchung von Präparaten verschiedener Dicken. Moleküle unterschiedlicher Ebenen des Präparates erzeugen häufig mehrere übereinander liegende Bilder. Die elektronische Bildverarbeitung des CLSM macht es möglich, in einem dicken Präparat eine ausgewählte Ebene zu fokussieren, während Fluoreszenzsignale, die unter- und oberhalb der Fokusebene liegen, ausgeblendet werden. Damit wird ein klarer, optischer Ausschnitt abgebildet. Anstatt wie in der gewöhnlichen Fluoreszenzmikroskopie die gesamte Probe zu beleuchten, fokussiert der Laser des CLSM immer nur einen einzelnen Punkt in einer bestimmten Ebene. Die vom Präparat emittierte Fluoreszenz wird gesammelt und zu einem Bild zusammengesetzt. Die über das Mikroskop-System direkt in das verwendete Computersystem eingescannten Aufnahmen wurden im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des Software-Programmes Leica TCS NT Version 1.6.587 (Leica microsystems Heidelberg GmbH) bearbeitet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden GFP-Fusionsproteine sowie Texas-Red-, DTAF- und Cy2- markierte Strukturen untersucht. Die Bearbeitung der aufgenommenen Bilder erfolgt über das Computergraphikprogramm Adobe Photoshop.

### V.2.4.6 Analyse am Zeiss Axiophot Stereo Fluoreszenzmikroskop

Zur Analyse der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst markierten DNA transfizierter Zellen oder embryonaler und larvaler Gewebe wurde das Zeiss Axiophot Stereo Fluoreszenzmikroskop verwendet. In der Tabelle sind die Anregungswellenlängen für die Detektion der entsprechend markierten Strukturen, sowie der Wellenlängenbereich des emittierten Lichts aufgeführt. Die Bearbeitung der aufgenommenen Bilder erfolgt über das Computergraphikprogramm Adobe Photoshop.

	GFP	DTAF	Cy2	Texas Red
Anregungswellenlänge	488 nm	492 nm	490 nm	568 nm
Maximum des emittierten Lichts	520 nm	568 nm	508 nm	570-580 nm

### V.2.4.7. Vorbereitung 24h alter Embryonen von *Drosophila melanogaster* für die elektronenmikroskopische Fixierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mikroinjizierte, 24 h alte Embryonen verwendet. Da die Embryonen nach der Mikroinjektion fest am Objektträger haften und mit Voltaf-Öl überschichtet sind, müssen sie mit großer Sorgfalt präpariert werden. Die Embryonen werden mit einer Uhrmacherpinzette abgehoben und 2 x in H<sub>2</sub>O gewaschen, um alle Reste des Öls zu entfernen. Zur Präparation wird ein Objektträger mit einem Tropfen 1% Agaroselösung versehen. Nachdem der Tropfen erstarrt ist, werden die Embryonen in der Mitte des Agarosetropfens platziert und mit einem weiteren Tropfen der Agaroselösung beschichtet.

Um ein Eindringen der Fixierungslösungen in das embryonale Gewebe zu ermöglichen, werden die Embryonen mit einer ausgezogenen Pasteurpipette angestochen. Der vollständig erstarrte Agaroseblock wird mit einem sauberen Skalpell zu einem kleinen Würfel getrimmt; die Embryonen sollten sich in seiner Mitte befinden.

### V.2.4.8 Fixierung mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid

Durch die Fixierung mit Glutaraldehyd werden die Aminosäuren der Proteine miteinander vernetzt und so die Abstände der Moleküle im Präparat fixiert. Die Erhöhung des Kontrastes eines Präparates erfolgt durch die Inkubation mit Osmiumtetroxid und alkalischen Schwermetallsalzlösungen. Das Osmiumtetroxid erniedrigt durch Anlagerung an Doppelbindungen die Valenzstufe der Atome von acht auf sechs, wodurch es zu einer Schwärzung des Präparates kommt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Fixierungsverfahren bei Embryonen von *Drosophila melanogaster* angewendet.

#### Durchführung:

Die im Agaroseblock fixierten Embryonen werden für 5 min bei 4°C in einer 2,5% gepufferten Glutaraldehydlösung inkubiert und anschließend 1 x mit 50 mM Cacodylatpuffer gewaschen. Das Präparat wird für 2 h bei 4°C in 1% OsO<sub>4</sub>, 0,1% Glutaraldehyd, 0,2 M Cacodylat fixiert. Nach 5 Waschschritten zu je 5 min in H<sub>2</sub>O erfolgt die Kontrastierung mit 0,5% Uraaylacetat bei 4°C über Nacht. Im Anschluss an die Kontrastierung erfolgt die Entwässerung des Präparates.

**Entwässerung:**

Die sich an die Fixierung mit Glutaraldehyd anschließende Entwässerungsreihe wird auf Eis durchgeführt. Nach jedem Entwässerungsschritt wird der Überstand vorsichtig abgenommen.

Aufsteigende Ethanolreihe:

30 min	50 %	Ethanol
30 min	70 %	Ethanol
30 min	90 %	Ethanol
30 min	96 %	Ethanol
30 min	100 %	Ethanol
30 min	100 %	Ethanol
30 min	100 %	Ethanol

Für die Epon-Einbettung von mit Glutaraldehyd-fixierten Embryonen werden im Anschluss an die Ethanolreihe drei Inkubationsschritte in Propylenoxid zu je 30 min auf Eis durchgeführt.

**Epon Einbettung:**

Nach der Entwässerung werden die Präparate in einer 1:1 Mischung aus Propylenoxid und Epon bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgen 3 Inkubationsschritte in Epon mit 1/50 Volumen DMP-30 (Beschleuniger) zu je 2 h. Danach wird die Suspension im geöffneten Gefäß durch Inkubation bei 60°C für 3-4 Tage ausgehärtet.

**V.2.4.9 Anfertigen der Ultradünnschnitte**

Zur Vorbereitung der Schnittfläche wird der Präparateblock in einen Halter gespannt, der in einem Untersatz unter der Stereolupe befestigt wird. Während des sog. Trimmens wird das Epon um das Präparat mit einer Rasierklinge entfernt, so dass eine pyramidenförmige Schnittfläche mit einer Kantenlänge von ca. 0,5 mm entsteht. Der Eponblock wird in ein Ultramikrotom eingespannt. Mit einem Glasmesser werden einige Semidünnschnitte angefertigt, die nach dem Übertragen auf einen Objektträger unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden können. Wenn die Schnittebene für einen Ultradünnschnitt geeignet ist, wird der Harzblock wieder eingespannt und das Glasmesser gegen ein Diamantmesser ausgetauscht, mit dem die Ultradünnschnitte angefertigt werden. Die Dicke der Schnitte beträgt 60 – 80 nm. Die Schnitte werden auf ein mit Pioloform beschichtetes Nickelnetz übertragen und getrocknet. Zur Aufbewahrung werden die Kupfernetze in eine „Grid-Box“ gelegt.

**V.2.4.10 Aufnahmen am Zeiss EM 10 und Entwicklung der Negative**

Die Analyse am Transmissions-Elektronenmikroskop diente im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung der Morphologie der Zellen mikroinjizierter Embryonen. Zur Erhöhung des Kontrastes werden die Schnitte erst mit Uranylacetat (in EtOH) und anschließend mit Bleicitrat gefärbt.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einer eingebauten Kamera mit automatischer Belichtungssteuerung hergestellt. Die Planfilme (Kodak) werden mit dem EM-Negativentwickler Kodak-D19 (Kodak) entwickelt. Danach werden die Filme im Tetenal Schnellfixierbad fixiert. Von den Negativen werden mit einem Vergrößerungsapparat (Focomat; Durst, Brixen) Positivabzüge auf Fotopapier (Brovira Speed, Härten 1-5; Agfa, Leverkusen) hergestellt. Die Abzüge werden in Neutol Positiventwickler (Agfa) entwickelt und im Fixierbad für Positive (Tetenal Fixiersalz; Agfa) fixiert.

## V.2.5 Spezifische Methoden für die Arbeit mit *Drosophila melanogaster*

### V.2.5.1 Haltung von *Drosophila melanogaster*

Die Haltung von *Drosophila melanogaster* erfolgt auf einem Standardmedium folgender Zusammensetzung:

1	l	Wasser
180	g	Maisgrieß
10	g	Sojamehl
18,5	g	Cenovis (Bierhefe)
7,5	g	Agar-Agar
40	g	Diamalt
40	g	Zuckerrübensirup
1	TL	Nipagin

Die Haltung der Stammlinien erfolgte bei 25°C, auch die Kreuzungen wurden bei 25°C durchgeführt. Zur Gewinnung von Eiablagen wurde ein spezielles Medium aus Agar und Apfelsaft verwendet. Zur Stimulation der Eiablage wurden die Platten kurz vor der Verwendung mit Hefe bestrichen.

### V.2.5.2 Kreuzungen

Durch Kreuzung von Fliegen unterschiedlichem Genotyp ist die gezielte Selektion eines gewünschten Genotyps möglich. Für die gezielten Einzelkreuzungen werden frisch geschlüpfte, stets jungfräuliche Fliegen gleichen Alters verwendet, um einen einheitlichen Genotyp in der nachfolgenden Generation zu erhalten.

### V.2.5.3 Stabilisierungschromosomen

Mutationen wurden in stabilisierten, heterozygoten Stammlinien gehalten. Mit Hilfe von Stabilisierungschromosomen wird ein Crossing over zwischen den beiden homologen Chromosomen wirksam ausgeschlossen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für das 2. Chromosomenpaar der Balancer CyO-In(2LR)0 sowie der CyO/GFP-Balancer (Rudolph et al., 2000) verwendet. Eine ausführliche Beschreibung der verwendeten Mutationen ist in Lindsley und Zimm (1992) zu finden.

### V.2.5.4 Inverse PCR zur Lokalisation des Insertionsortes von PZ-Elementen

Die Lokalisation des Insertionsortes von P-Elementen kann mit spezifischen Primern für das 5'- oder 3'-Ende des integrierten P-Elementes bestimmt werden. Die genomische DNA wird mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen, deren Schnittstellen sich in 5'- oder 3'-Orientierung bezüglich des P-Elementes befinden, geschnitten, wodurch Fragmente entstehen, die genomische DNA und /oder Sequenzen des P-Elementes enthalten. Die Fragmente werden durch Ligation zirkularisiert und die genomischen Bereiche, die sowohl einen Teil der Region des P-Elementes, als auch die angrenzende Region der genomischen DNA aufweisen, mit den spezifischen Primern amplifiziert. Die

Basenabfolge der spezifischen PCR-Produkte kann nach der Sequenzierung mit den Datenbanken verglichen werden, und der Lokalisationsort des integrierten P-Elements durch den Vergleich der Analyse der angrenzenden genomischen Region bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die spezifischen Primer für das PZ-Element verwendet (Pry2/Pry1; Plac4/Plac1). Als Restriktionsendonukleasen wurden Sau 3AI und CfoI verwendet.

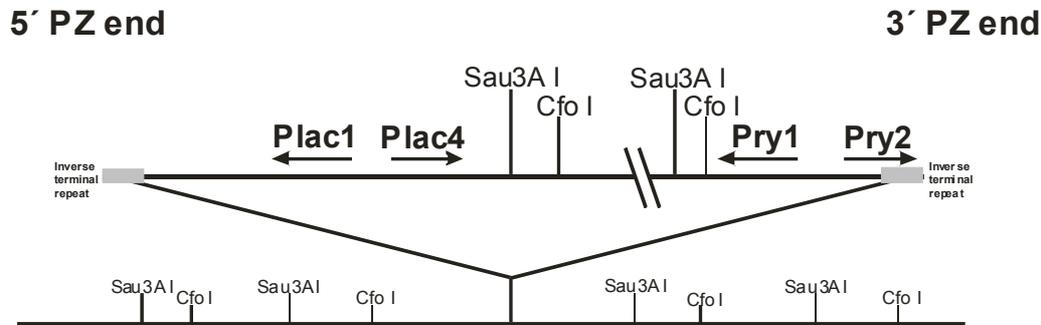


Abb. 89: PZ – Element: Lage von Schnittstellen und spezifischen Primern

#### **Durchführung:**

Die isolierte und gereinigte genomische DNA der zu untersuchenden P-Elementlinie wird in zwei separaten Restriktionen mit den Endonukleasen Sau 3AI oder CfoI für 3 h bei 37°C inkubiert.

Ansatz: 17 µl genomische DNA  
 2 µl Puffer (NEB Sau 3AI oder BRL1 10x Puffer)  
 2 µl Sau 3AI oder CfoI  
 1 µl RNase A (20µg/ml)  
 0,5 µl BSA (100x) bei der Restriktion mit Sau 3AI

Die Inaktivierung der Restriktionsenzyme erfolgt durch Inkubation für 20 min bei 65°C

Die durch die Restriktion entstandenen Fragmente werden bei 4°C über Nacht ligiert. Dabei bilden sich unterschiedliche zirkularisierte DNA-Fragmente, die sowohl genomische DNA, als auch den genomischen Bereich der P-Element Insertion enthalten können.

Ansatz: 20 µl der Restriktion der genomischen DNA  
 10 µl T4-DNA Ligase Puffer (10x)  
 2 µl T4-DNA Ligase  
 58 µl dd H<sub>2</sub>O

Der Ligationsansatz wird mit Ethanol gefällt (V.2.1.1.1) und aufgereinigt. Die aufgereinigten DNA-Fragmente werden in der folgenden PCR mit den für das P-Element spezifischen Primern amplifiziert, wodurch die zirkularen Fragmente amplifiziert werden, die den 5'- bzw. 3'-Bereich des P-Elementes sowie einen Teil der genomischen DNA beinhalten. Für jeden der folgenden Ansätze wurde die PCR nach folgenden Ansatz und Temperaturprofil durchgeführt.

Ansätze: Sau 3AI, Pry-Primer  
 CfoI, Pry-Primer  
 Sau 3AI, Plac-Primer  
 CfoI, Plac-Primer

PCR-Ansatz		Temperaturprofil (30 Zyklen)	
10,0 µl	DNA (aus Ligation)	94 °C	3 min
5,0 µl	10 x Puffer ohne MgCl <sub>2</sub>	94 °C	30 sec
5,0 µl	MgCl <sub>2</sub> (25mM)	60 °C	30 sec
1,0 µl	dNTP's (10mM)	72 °C	2 min
2,5 µl	Primer Pry2 oder Plac4 (20µM)	72 °C	10 min
2,5 µl	Primer Pry1 oder Plac1 (20µM)		
0,5 µl	Taq-Polymerase (5U/µl)		
24,5 µl	dd H <sub>2</sub> O		

Die amplifizierten PCR-Produkte werden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Gelextraktion isoliert. Durch Sequenzierung der DNA-Fragmente mit den für die PCR eingesetzten Primern wird die Basenabfolge ermittelt und mit den entsprechenden Datenbanken verglichen.

### V.2.5.5 Mikroinjektion

Zur Eiablage werden Fliegen der Stammlinie Wildtyp Berlin für einen Zeitraum von 2 h auf die mit Hefe bestrichenen Eiablageplatten gesetzt. Das Vorgelege wird verworfen und die Fliegen alle 30 min auf neue Platten umgesetzt. Die so gewonnenen Eier werden sofort für die Mikroinjektion vorbereitet, da sie zum Zeitpunkt der Mikroinjektion nicht älter als 1 h sein sollten. Die Vorbereitungen sowie die Mikroinjektion werden bei 18°C durchgeführt, wodurch die Embryogenese verzögert wird. Die Eier werden von den Platten entfernt und in einer Kollektorrückführung durch Inkubation für 45-60 sec mit einer wässrigen Natriumhypochloritlösung (7%) dechorionisiert. Die mit H<sub>2</sub>O gewaschenen und dechorionisierten Eier werden auf einen Gitternetzfilter übertragen und in posteriorer Ausrichtung aufgereiht. Nach dem Aufreihen werden die Eier auf einen mit n-Heptan Kleber bestrichenen Objektträger übertragen und zur Fixierung in einer Schale mit trockenem Silicagel für 30 min inkubiert. Das Trocknen ermöglicht die Injektion zusätzlicher Flüssigkeit in den Embryo. Die Injektionsnadel wird in dieser Zeit unter dem Mikroskop auf die gewünschte Länge gekürzt, so dass der Durchmesser ungefähr ¼ des posterioren Pols des Embryos beträgt. Die Injektionsnadel wird unter dem Binokular mit dem zu injizierenden Plasmid oder der dsRNA gefüllt. Die fixierten Embryonen werden mit Voltalef 10S-Öl beschichtet und mit dem posterioren Pol zur Injektionsnadel weisend auf dem Objektisch ausgerichtet. Die Mikroinjektion wird unter dem Mikroskop durchgeführt, indem die Injektionsnadel fokussiert, die Vitellinmembran des Embryos durchstoßen und die Injektionslösung mit leichtem Druck in den Embryo gespritzt wird. Alle Embryonen, die nicht erfolgreich injiziert werden konnten, werden mit der Nadel zerstört, um ihre weitere Entwicklung zu verhindern. Die Objektträger werden in einer feuchten Kammer bei 18°C inkubiert und die Embryonen nach 24 h bzw. die sich entwickelnden Larven nach 48 h analysiert.

### V.2.6 Gaschromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Intermediate des Sterolstoffwechsels von transformierten Hefezellen mit Hilfe eines Gaschromatographen-Massenspektrometers (GC/MS) untersucht. Dieses Gerät ist die Kopplung eines Massenspektrometers mit einem Gaschromatographen.

In einem Gaschromatographen werden gasförmige Substanzen in ihre Komponenten aufgetrennt. Das zu analysierende verdampfbare Flüssigkeitsgemisch wird in einer heizbaren Trennsäule verdampft. Mit Hilfe eines Trägergases als mobile Phase werden die Substanzen in der Säule chromatographisch aufgetrennt. Die getrennten Substanzen erreichen so nacheinander das Ende der Säule und können durch einen Detektor gemessen und als Peaks am Computer angezeigt werden. Nach der gaschromatographischen Auftrennung werden die Substanzen am Ende der Säule direkt in einen Massenspektrometer geleitet, wo sie der Reihe nach ionisiert und ihre relativen Molekülmassen bestimmt werden können. Das Massenspektrometer erzeugt aus der Substanz gasförmige Ionen und trennt diese nach ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung auf. Das so entstandene Massenspektrum gibt Auskunft darüber, welche Ionen bei der Ionisierung der Substanz in welcher relativen Menge entstanden sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Sterole von transformierten Hefezellen untersucht. Da jedes Sterol bei der massenspektrometrischen Auftrennung ein bestimmtes Fragmentierungsmuster erzeugt, wurden die Sterole durch den Vergleich mit einer Spektrenbibliothek identifiziert.

### **V.2.6.1 Vorbereitung von transformierten Hefezellen**

Zur gaschromatographischen / massenspektrometrischen Analyse müssen die Sterole aus den transformierten Hefezellen isoliert werden.

#### **Durchführung:**

100 ml YPAD-Medium werden mit den transformierten Hefezellen angeimpft und bei 30°C auf dem Rundschtüttler inkubiert, bis eine OD600 von 0,6 erreicht ist. Die Hefezellen werden bei 2000 g und 4°C für 5 min sedimentiert. Anschließend folgen zwei Waschschriffe mit je 45 ml 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4), der mit Ethanol (1% vol/vol) versetzt wurde und ein Waschschriff mit 45 ml 0,1 M Kaliumphosphatpuffer. Das Hefesediment wird in methanolischer 40% KOH Lösung, welche mit Pyrogallol versetzt wurde, resuspendiert. Die Lösung wird in einem Rundkolben, der mit einem Rückflusskühler verbunden ist bei 90°C 1h lang erhitzt, wodurch die Hefezellen verseift (hydrolytische Spaltung) werden. Die Zellkomponenten, die eine Estergruppe (z.B. Fette) tragen, werden durch die Inkubation mit KOH hydrolytisch gespalten; aus Fetten entstehen Glycerin und die Kaliumsalze der entsprechenden Fettsäuren. Nach dem Abkühlen des Gemisches erfolgt die Extraktion der Sterole mit n-Hexan, wodurch sich 2 Phasen bilden. Die untere, wässrige Phase wird abgelassen und die farblose obere, sterolhaltige Phase in ein kleines Gefäß für die GC/MS Analyse überführt. Durch die Begasung mit Stickstoff verflüchtigt sich ein Teil des Lösungsmittels und die Sterole werden in der Lösung konzentriert, die am GC/MS analysiert werden kann.

### **V.2.6.2 GC/MS Analyse von transformierten Hefezellen**

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten GC/MS Analysen wurden mit dem GC 8060, Fisons Instruments MD800 (Thermo Finnigen, Frankreich) durchgeführt. Der Injektor hatte eine Temperatur von 250°C. Es wurde folgendes Temperaturprogramm durchlaufen: Die Säule (DB5 MS mit 250µm Durchmesser und 0,25µm Schichtdicke) wurde von 60°C auf 300°C in einem Intervall von 5°C/min aufgeheizt, wobei 300°C 10min lang konstant gehalten wurden. Als Trägergas wurde Helium verwendet, das mit einem konstanten Druck von 90kPa die Säule durchfloss. Zum Ionisieren wurden 70eV benutzt. Die GC/MS Analyse wurde am Lehrstuhl für Pharmazie und Lebensmittelchemie (Universität Würzburg) von Prof. Schreier durchgeführt.

## VI. Literaturverzeichnis

- Agami, R.** (2002): RNAi and related mechanisms and their potential use for therapy. *Curr. Opinion in Chem. Biol.* **6**, 829-834.
- Alsheimer, M., von Glasenapp, E., Hock, R., Benavente, R.** (1999): Architecture of the nuclear periphery of rat pachytene spermatocytes: distribution of nuclear envelope proteins in relation to synaptonemal complex attachment sites. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1235-1245.
- Ambros, V., Lee, C. R., Lavanway, A., Williams, P. T.** (2003): MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **13**, 807-818.
- Appelbaum, J., Blobel, G., Georgatos, S. D.** (1990): Binding of Lamin B Receptor to its nuclear membrane is affected by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **266**, 4181-4184.
- Ashery-Padan, R., Ulitzur, N., Arbel, A., Goldberg, M., Weiss, A. M., Maus, N., Fisher, P. A., Gruenbaum, Y.** (1997): Localization and posttranslational modifications of otefin, a protein required for vesicle attachment to chromatin, during *Drosophila melanogaster* development. *Mol Cell Biol.* **17**, 4114-4123.
- Ashery-Padan R., Weiss, A. M., Feinstein, N., Gruenbaum, Y.** (1997b): Distinct regions specify the targeting of otefin to the nucleoplasmic side of the nuclear envelope. *J. Biol. Chem.* **272**, 2493-2499.
- Bannister, A., Zegerman, P., Partridge, J., Miska, E., Thomas, J., Allshire, R., Kouzarides, T.** (2001): Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromodomain. *Nature* **410**, 120-124.
- Barton, G. und Medzhitov, R.** (2002): Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 14943-14945.
- Bashirullah, A., Pasquinelli, A. E., Kiger, A. A., Perrimon, N., Ruvkun, G., Thummel, C. S.** (2003): Coordinate regulation of small temporal RNAs at the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Dev. Biol.* **259**, 1-8.
- Battaile, K. und Steiner, R.** (2000): Smith-Lemli Opitz Syndrome: The First Malformation Syndrome Associated with Defective Cholesterol Synthesis; *Molecular Genetics and Metabolism* **71**, 154-162.
- Bossie, C. A. und Sanders, M. M.** (1993): A cDNA from *Drosophila melanogaster* encodes a lamin C-like intermediate filament protein. *J. Cell Sci.* **104**, 1263-1272.
- Bechert, K., Lagos-Quintana, M., Harborth, J., Weber, J., Osborn, M.** (2003): Effects of expressing lamin A mutant protein causing Emery-Dreifuss muscular dystrophy and familial partial lipodystrophy in HeLa cells. *Experimental Cell Research* **286**, 75-86.
- Benavente, R. und Krohne, G.** (1986). Involvement of nuclear lamins in postmitotic reorganization of chromatin as demonstrated by microinjection of lamin antibodies. *J. Cell Biol.* **103**, 1847-1854.
- Berger, R., Theodor, L., Shoham, J., Gokkel, E., Brok-Simoni, F., Avraham, K. B., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Rechavi, G., Simon, A. J.** (1996): The characterization and localization of the mouse thymopoietin/lamina-associated polypeptide 2 gene and its alternatively spliced products. *Genome Research* **6**, 361-370.

- Bernstein, E., Caudy, A., Hammond, S., Hannon, G.** (2001): Role for a bidentat ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366.
- Billy, E., Brondani, V., Zhang, H., Müller, U., Filipowicz, W.** (2001): Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *PNAS* **98**, 14428-14433.
- Brantl, S.** (2002): Antisense-RNA regulation and RNA interference; *Biochem. et Biophys. Acta* **1575**, 15-25.
- Brennecke, J., Hipfner, D., Stark, A., Russel, R., Cohen., M.** (2003): bantem encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell* **113**, 25-36.
- Brummelkamp, T., Bernards, R., Agami, R.** (2002): A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550-553.
- Buendia, B., Santa-Maria, A., Courvalin, J.-C.** (1999): Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complexes during apoptosis. *J. Cell Sci.* **112**, 1743-1753.
- Burke, B., Mounkes, L., Stewart, C.** (2001): The nuclear envelope in muscular dystrophy and cardiovascular diseases. *Traffic* **2**, 675-683.
- Burke, B. and Stewart, C. L.** (2002): Life at the edge: The nuclear envelope and human disease. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* **2**, 575-585.
- Cai, M., Huang, Y., Ghirlando, R., Wilson, K. L., Craigie, R., Clore, G. M.** (2001): Solution structure of the constant region of nuclear envelope protein LAP2 reveals two LEM-domain structures: one binds BAF and the other binds DNA. *EMBO J.*, **20**, 4399-4407.
- Caplen, N., Parrish, S., Imani, F., Fire, A., Morgen, R.** (2001): Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 9742-9747.
- Carmell, M., Xuan, Z., Zhang, M., Hannon, G.** (2002): The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes* **16**, 2733-2742.
- Carrington, J. C. und Ambros, V.** (2003): Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* **301**, 336-338.
- Chanut, F., Woo, K., Pereira, S., Donohoe, T. J., Chang, S.-Y., Laverly, T. R., Jarman, A. P., Heberlein, U.** (2002): Rough eye is a gain-of-function allele of amos that disrupts regulation of the proneural gene atonal during *Drosophila* retinal differentiation. *Genetics* **160**, 623-635.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., Miller, R. H.** (1989): One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2172-2175.
- Clemens, J. C., Worby, C. A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maehama, T., Hemmings, B. A., Dixon, J. E.** (2000). Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **97**, 6499-6503.
- Cogoni, C., Macino, G.** (1999): Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* **399**, 166-169.

- Cohen, M., Lee, K. K., Wilson, K. L., Gruenbaum, Y.** (2001). Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional evolution of the nuclear lamina. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 41-47.
- Cohen, M., Tzur, Y. B., Neufeld, E., Feinstein, N., Delannoy, M. R., Wilson, K. L., Gruenbaum, Y.** (2002). Transmission electron microscope studies of the nuclear envelope in *Caenorhabditis elegans* embryos. *J. Struct. Biol.* **140**, 232-240.
- Courvalin, J. C., Segil, N., Blobel, G., Worman, H. J.** (1992): The lamin B receptor of the inner nuclear membrane undergoes mitosis-specific phosphorylation and is a substrate for p34cdc2-type protein kinase. *J. Biol. Chem.* **267**, 19035-19038.
- Crowley, J. H., Smith, S. J., Leak, F. W., Parks, L. W.** (1996): Aerobic isolation of an ERG24 null mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriology* **178**, 2991-1993.
- Dechat, T., Gotzmann, J., Stockinger, A., Harris, C. A., Talle, M. A., Siekierka, J. J, Foisner R.** (1998): Detergent-salt resistance of LAP2a in interphase nuclei and phosphorylation-dependent association with chromosomes early in nuclear assembly implies functions in nuclear structure dynamics. *EMBO J.* **17**, 4887-4902.
- Dechat, T., Vlcek, S., Foisner, R.** (2000): Lamina-associated polypeptide 2 isoforms and related proteins in cell cycle-dependent nuclear structure dynamics. *J. Struct. Biol.* **129**, 335-345.
- Dobrosotskaya, I. Y., Seegmiller, A. C., Brown, M. S., Goldstein, J. L. and Rawson, R. B.** (2002): Regulation of SREBP processing and membrane lipid production by phospholipids in *Drosophila*. *Science* **296**, 879-883.
- Doench, J., Peterson, C., Sharp, P.** (2003): siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.* **17**, 438-442.
- Doi, N., Zenno, S., Ueda, R., Ohki-Hamazaki, H., Ui-Tei, K., Saigo, K.** (2003): Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors. *Curr. Biol.* **13**, 41-46.
- Dreger, C. K., König, A. R., Spring, H., Lichter, P. and Herrmann, H.** (2002): Investigation of nuclear architecture with a domain-presenting expression system. *J. Struct. Biol.* **140**, 100-115.
- Duband-Goulet, I., Courvalin, J.-C. und Buendia, B.** (1998): LBR, a chromatin and lamin binding protein from the inner nuclear membrane, is proteolyzed at late stages of apoptosis; *J. Cell Sci.* **111**, 1441-1451.
- Duband-Goulet, I. und Courvalin, J.-C.** (2000): Inner nuclear membrane protein LBR preferentially interacts with DNA secondary structures and nucleosomal linker. *Biochem.* **39**, 6483-6488.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T.** (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in mammalian cell culture. *Nature* **411**, 494-498.
- Elbashir, S., Harborth, J., Weber, K., Tuschl, T.** (2002): Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* **26**, 199-213.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., Tuschl, T.** (2000): RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15**, 188-200.
- Ellenberg, J., Siggia, E. D., Moreira, J. E., Smith, C. L., Presley, J. F., Worman, H. J., Lippincott-Schwartz, J.** (1997): Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J. Cell Biol.* **138**, 1193-206 .

- Fairley, E. A. L., Kendrick-Jones, J., Ellis, J. A.** (1999): The Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype arises from aberrant targeting and binding of emerin at the inner nuclear membrane. *J. Cell Sci.* **112**, 2571-2582.
- Fairley, E. A., Ridell, A., Ellis, J. A., Kendrick-Jones, J.** (2002): The cell cycle dependent mislocalisation of emerin may contribute to the Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype. *J. Cell Sci.* **115**, 341-354.
- Farese, R. V. und Herz, J.** (1998): Cholesterol metabolism and embryogenesis, *TIG* **14-3**, 115-120.
- Favreau, C., Dubosclard, E., Östlund, C., Vigouroux, C., Capeau, J., Wehnert, M., Higuët, D., Worman, H. J., Courvalin, J.-C., Buendia, B.** (2003): Expression of Lamin A mutated in the carboxyl-terminal tail generates an aberrant nuclear phenotype similar to that observed in cells from patients with Dunnigan-Type partial lipodystrophy and Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Experim. Cell Res.* **282**, 14-23.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M., Kostas, S., Driver, S., Mello, C.** (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- Foisner, R. und Gerace, L.** (1993): Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell* **73**, 1267-1279.
- Foisner, R.** (2001): Inner nuclear membrane proteins and the nuclear lamina. *J. Cell Sci.* **114**, 3791-3792.
- Furukawa, K.** (1999): LAP2 binding protein 1 (L2BP1/BAF) is a candidate mediator of LAP2-chromatin interaction. *J. Cell Sci.* **112**, 2485-2492.
- Gajewski, A. und Krohne G.** (1999): Subcellular distribution of the *Xenopus* p58/lamin B receptor in oocytes and eggs. *J. Cell Sci.* **112**, 2583-2596.
- Gastarena Erice, J., Arguinano Perez, J. M., Pericas, F. S.** (1999): Homozygous of the Pelger-Huët anomaly. *Haematologica* **84**, 748.
- Georgatus, S. D.** (2001): The inner nuclear membrane: simple, or very complex? *EMBO J.* **20**, 2989-2994.
- Gerace, L. und Blobel, G.** (1980): The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* **19**, 277-287.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A., Schiestl, R. H.** (1992): Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic. Acids Res.* **20**, 1425.
- Goldberg, M., Lu, H., Stuurman, N., Ashery-Padan, R., Weiss, A. M., Yu, J., Bhattacharyya, D., Fisher, P. A., Gruenbaum, Y., Wolfner, M. F.** (1998): Interactions among *Drosophila* nuclear envelope proteins lamin, otefin and YA. *Mol. Cell Biol.* **18**, 4315-4223.
- Goldman, R. D., Chou, Y. H., Prahlad, V., Yoon, M.** (2002): Intermediate filaments: dynamic processes regulating their assembly, motility, and interactions with other cytoskeletal systems. *FASEB J. Suppl.* **2**, 261-265.
- Gruenbaum, Y., Wilson, K. L., Harel, A., Goldberg, M., Cohen, M.** (2000): Review: Nuclear lamins - structural proteins with fundamental functions. *J. Struc. Biol.* **129**, 313-323.

- Gruenbaum, Y., Lee, K. K., Liu, J., Cohen, M., Wilson, K. L.** (2002): The expression, lamin-dependant localization and RNAi depletion phenotype for emerin in *C. elegans*. *J. Cell Sci.* **115**, 923-929.
- Gruenbaum, Y., Goldman, R. D., Meyuhas, R., Mills, E., Margalit, A., Fridkin, A., Dayani, Y., Prokocimer, M. and Enosh, A.** (2003). The nuclear lamina and its functions in the nucleus. *Int. Rev. Cyt.* **226**, 1-62.
- Guillemin, K., Williams, T., Krasnow, M.** (2001): A nuclear lamin is required for cytoplasmic organization and egg polarity in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* **3**, 848-851.
- Hamilton, A. J., Baulcombe, D. C.** (1999): A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants; *Science* **286**, 950-952.
- Hammond, S., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.** (2000): An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293-296.
- Haraguchi, T., Koujin, T., Segura-Totten, M., Lee, K. K., Matsuoka, Y., Yoneda, Y., Wilson, K. L., Hiraoka, Y.** (2001): BAF is required for emerin assembly into the reforming nuclear envelope. *J. Cell Sci.* **114**, 4575-4585.
- Harborth, J., Elbashir S. M., Bechert K., Tuschl, T., Weber, K.** (2001): Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J. Cell Sci.* **114**, 4557-4565.
- Hegele, R.** (2003): Lamin mutations come of age. *Nature Medicine* **9**, 644-645.
- Hendrati Raharjo, W., Enarson, P., Sullivan, T., Steward, C., Burke, B.** (2001): Nuclear envelope defects associated with LMNA mutations cause dilated cardiomyopathy and Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J. Cell. Sci.* **114**, 4447-4457.
- Hennekes, H. und Nigg, E.** (1994): The role of isoprenylation in membrane attachment of nuclear lamins. *J. Cell Sci.* **107**, 1019-1029.
- Herman, G. E.** (2003): Disorders of cholesterol biosynthesis: prototypic metabolic malformation syndromes. *Hum. Mol. Gen.* **12**, R75-R88.
- Hoffmann, K., Dreger, C. K., Olins, A. L., Olins, D. E., Shultz, L. D., Lucke, B., Karl, H., Kaps, R., Müller, D., Vaya, A., Aznar, J., Ware, R. E., Sotelo Cruz, N., Lindner, T. H., Herrmann, H., Reis, A., Sperling, K.** (2002): Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huët anomaly). *Nature Genetics* **31**, 410-414.
- Holaska, J. M., Lee, K. K., Kowalski, A. K., Wilson, K. L.** (2003): Transcriptional repressor Germ Cell-less (GCL) and Barrier to Autointegration Factor (BAF) compete for binding to emerin in Vitro. *J. Biol. Chem.* **278**, 6969-6975.
- Holmer, L., Pezhman, A., Worman, H. J.** (1998): The human lamin B receptor/sterol reductase multigene family. *Genomics* **54**, 469-476.
- Horn, L.-C., Faber, R., Meiner, A., Piskazeck, U., Spranger, J.** (2000): Greenberg dysplasia: first reported case with additional non-skeletal malformations and without consanguinity. *Prenat. Diagn.* **20**, 1008-1011.
- Holtz, D., Tanaka, R. A., Hartwig, J., McKeon, F.** (1989): The CaaX motif of lamin A functions in conjunction with the nuclear localisation signal to target assembly to the nuclear envelope. *Cell* **59**, 969-977.

- Hunter, C. und Poethig, S. R.** (2003): miSSING LINKS: miRNA and plant development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 373-378.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A., Balint, E., Tuschl, T., Zamore, O.** (2001): A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* **293**, 834-838.
- Hutvagner, G. und Zamore, P.** (2002): A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**, 2056-2060.
- Imai, S., Nishibayashi, S., Takao, K., Tomifuji, M., Fujino, T., Hasegawa, M., Takano, T.** (1997): Dissociation of Oct-1 from the nuclear periphery structure induces the cellular aging-associated collagenase gene expression. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2407-2419.
- Jones, D., Cowell, I., Singh, P.** (2000): Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *BioEssays* **22**, 124-137.
- Kamath, R. S. und Ahringer, J.** (2003): Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* **30**, 313-321.
- Kawasaki, H. und Taira, K.** (2003): Short hairpin type of dsRNA that are controlled by tRNA (Val) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells. *Nucleic Acids Res.* **31**, 700-707.
- Ketting, R., Fischer, S., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G., Plasterk, R.** (2001): Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* **15**, 2654-2659.
- Kimura, T., Ito, C., Watanabe, S., Takashi, T., Ikawa, M., Yomogida, K., Fujita, Y., Ikeuchi, M., Asada, N., Matsumiya, K., Okuyama, A., Okabe, M., Toshimori, K., Nakano, T.** (2003): Mouse Germ Cell-Less as an essential component of nuclear integrity. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1304-1315.
- Kirkland, J. L., Tchkonja, T., Pirtskhalava, T., Han, J., Karagiannides, I.** (2002): Adipogenesis and aging: does aging make fat go MAD? *Experimental Gerontology* **37**, 757-767.
- König, A., Happle, R., Bornholdt, D., Engel, H., Grzeschik, K.-H.** (2000): Mutations in the NSDHL gene, encoding a  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, cause CHILD syndrome. *Am. J. Med. Gen.* **90**, 339-346.
- Kourmouli, N., Theodoropoulos, P. A., Dialynas, G., Bakou, A., Politou, A. S., Cowell, I. G., Georgatos, S. D.** (2000): Dynamic associations of heterochromatin protein 1 with the nuclear envelope. *EMBO J.* **19**, 6558-6568.
- Krohne, G.** (1998): Lamin assembly in vivo. In *Subcellular Biochemistry: Intermediate filaments.* (ed. H. Herrmann and J. Robin Harris), pp. 563-586. Plenum Publishing/London, UK.
- Kurzchalia, T. V. und Ward, S.** (2003). Why do worms need cholesterol. *Nat. Cell Biol.* **5**, 684-688.
- Kyhse-Andersen, J.** (1984): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-210.
- Laemmli, U.** (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T.** (2001): Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **294**, 853-858.

- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A., Tuschl, T.** (2003): New microRNAs from mouse and human. *RNA* **9**, 175-179.
- Lang, C., Paulin-Levasseur, M., Gajewski, A., Alsheimer, M., Benavente, R., Krohne, G.** (1999): Molecular characterization and developmentally regulated expression of *Xenopus* lamina-associated polypeptide 2 (XLAP2). *J. Cell Sci.* **112**, 749-759.
- Lang, C. und Krohne, G.** (2003): Lamina-associated polypeptide 2 $\beta$  (LAP2  $\beta$ ) is contained in a protein complex together with A- and B-type lamins. *Eur. J. Cell Biol.* **82**, 143-153.
- Lees, N., Bard, M., Kirsch, D. R.** (1999): Biochemistry and Molecular Biology of Sterol Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **34**, 33-47.
- Lee, K. L., Gruenbaum, Y., Spann, P., Liu, J., Wilson K. L.** (2000): *C. elegans* nuclear envelope proteins emerlin, MAN1, lamin, and nucleoporins reveal unique timing of nuclear envelope breakdown during mitosis. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3089-3099.
- Lee, K. K., Haraguchi, T., Lee, R. S., Koujin, T., Hiraoka, Y., Wilson, K. L.** (2001): Distinct functional domains in emerlin bind lamin A and DNA-bridging protein BAF. *J. Cell Sci.* **114**, 4567-4573.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J., Kim, S., Kim, V.** (2002): MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* **21**, 4663-4670.
- Lenz-Böhme, B., Wismar, J., Fuchs, S., Reifegerste, R., Buchner, E., Betz, H. and Schmitt, B.** (1997): Insertional mutation of the *Drosophila* nuclear lamin Dm0 gene results in defective NEs, clustering of nuclear pore complexes, and accumulation of annulate lamellae. *J. Cell Biol.* **137**, 1001-1016.
- Lewis, D., Hagstrom, J., Loomis, A., Wolff, J., Herweijer, H.** (2002): Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat. Genet.* **32**, 107-108.
- Lichner, Z., Silhavy, D., Burgyán, J.** (2003): Double-stranded RNA-binding proteins could suppress RNA interference-mediated antiviral defences. *J. General Virology* **84**, 975-980.
- Lim, L. P., Lau, N. C., Weinstein, E. G., Abdelhakim, A., Yekta, S., Rhoades, M. W., Burge, C. B., Bartel, D. P.** (2003a): The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* **17**, 991-1008.
- Lim, L. P., Glasner, M. E., Yekta, S., Burge, C. B., Bartel, D. P.** (2003b): Vertebrate microRNAs genes. *Science*, **299**, 1540.
- Lin, F. und Worman, H. J.** (1993): Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J. Biol. Chem.* **268**, 16321-16326.
- Lin, F., Blake, D. L., Callebaut, I., Skejanc, I. S., Holmer, L., McBurney, M. W., Paulin-Levasseur, M., Worman, H. J.** (2000): MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated peptide 2 and emerlin. *J. Biol. Chem.* **275**, 4840-4847.
- Lindsey, D. L. und Zinn, G. G.** (1992): The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, Inc.
- Liu, J. und Wolfner, M. F.** (1998): Functional dissection of YA, an essential, developmentally regulated nuclear lamina protein in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 188-197.
- Liu, J., Ben-Shaharm, T. R., Riemer, D., Treinin, M., Spann, P., Weber, K., Fire, A., Gruenbaum, A.** (2000): Essential role for *Caenorhabditis elegans* lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3937-3947.

- Liu, J., Lee, K. K., Segura-Totten, M., Neufeld, E., Wilson, K. L., Gruenbaum, Y.** (2003): MAN1 and emerin have overlapping function(s) essential for chromosome segregation and cell division in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**, 4598-4603.
- Lopez, J. M., Song, K., Hirshfeld, A. B., Lin, H., Wolfner, M. F.** (1994): The *Drosophila* fs(1)Ya protein, which is needed for the first mitotic division, is in the nuclear lamina and in the envelopes of cleavage nuclei, pronuclei and nonmitotic nuclei. *Dev. Biol.* **163**, 2002-211.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K. D., Carrington, J. C.** (2002): Cleavage of scarecrow-like mRNA targets by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science* **297**, 2053-2056.
- Lopez, J. M. und Wolfner, M. F.** (1997): The developmentally regulated *Drosophila* embryonic lamina protein 'Young Arrest' (fs(1)Ya) is capable of associating with chromatin. *J. Cell Sci.* **110**, 643-651.
- Lopez-Soler R. I., Moir, R. D., Spann, T. P., Stick, R., Goldman, R. D.** (2001): A role for nuclear lamins in nuclear envelope assembly. *J. Cell Biol.* **154**, 61-70.
- Lutz, R., Trujillo, M., Denham, K., Wenger, L., Sinensky, M.** (1992): Nucleoplasmic localisation of prelamin A: implications for prenylation-dependent lamin A assembly into the nuclear lamina. *Proc. Natl Acad. Sci.* **89**, 3000-3004.
- Lloyd, D. J., Trembath, R. C., Shackleton, S.** (2002): A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum. Mol. Gen.* **11**, 769-777.
- Malone, C. J.; Fixsen, W. D., Horvitz, H. R., Han, M.** (1999): UNC-84 localizes to the nuclear envelope and is essential for nuclear migration and anchoring during *C. elegans* development. *Development* **126**, 3171-3181.
- Meier, J., Campbel, K. H., Ford, C. C., Stick, R., Hutchison, C. J.** (1991): The role of lamin L<sub>III</sub> in nuclear assembly and DNA replication, in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *J. Cell Sci.* **98**, 271-279.
- Meier, J. und Georgatos, S.** (1994): Type B lamins remain associated with the integral nuclear envelope protein p58 during mitosis: implications for nuclear reassembly. *EMBO J.* **13**, 1888-1898.
- Mette, M. F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M. A., Matzke, A. J. M.** (2002): Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* **19**, 5194-5201.
- Moir, R. D., Spann, T. P., Lopez-Soler, R. I., Yoon, M., Goldman, A. E., Khuon, S., Goldman, R. D.** (2000): The dynamics of the nuclear lamins during the cell cycle – relationship between structure and function. *J. Struct. Biol.* **129**, 324-334.
- Montgomery, M. und Fire, A.** (1998): Double-stranded RNA as a mediator in sequence-specific genetic silencing and cosuppression. *TIG* **14**, 255-258.
- Montgomery, M., Xu, S., Fire, A.** (1998): RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 15502-15507.
- Narry, K.** (2003): RNA interference in functional genomics and medicine. *J. Korean Med. Sci.* **18**, 309-318.
- Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K., Ullu, E.** (1998): Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 14687-14692.

- Nikolakai, E., Simos, G., Georgatos, S., Giannakouros, T.** (1996): A nuclear envelope-associated kinase phosphorylates arginine-serine motifs and modulates interactions between the Lamin B Receptor and other nuclear proteins. *J. Biol. Chem.* **271**, 8365-8372.
- Nowaczyk, M. und Wayne, J.** (2001): The Smith-Lemli-Opitz syndrome: a novel metabolic way of understanding developmental biology, embryogenesis, and dysmorphology. *Clinic. Genet.* **59**, 375-386.
- Nwokoro, N., Wassif, A., Porter, F.** (2001): Genetic disorders of cholesterol biosynthesis in mice and human. *Mol. Genet. Metab.* **74**, 105-119.
- Olsen, P. H. und Ambros, V.** (1999): The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev. Biol.* **216**, 671-676.
- Osada, S., Ohmori, S. Y., Taira, M.** (2003): XMAN1, an inner nuclear membrane protein, antagonizes BMP signaling by interacting with Smad1 in *Xenopus* embryos. *Development* **130**, 1783-1794.
- Östlund, C., Ellenberg, J., Hallberg, E., Lippincott-Schwartz, J., Worman, H. J.** (1999): Intracellular trafficking of emerin, the Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein. *J. Cell Sci.* **112**, 1709-1719.
- Östlund, C., Worman, H.** (2003): Nuclear envelope proteins and neuromuscular diseases. *Muscle and Nerve* **27**, 393-406.
- Ottaviano, Y. and Gerace, L.** (1985): Phosphorylation of the nuclear lamins during interphase and mitosis. *J. Biol. Chem.* **260**, 624-632
- Ozaki, T., Saijo, M., Murakami, K., Enomoto, H., Taya, Y., Sakiyama, S.** (1994): Complex formation between lamin A and the retinoblastoma gene product: identification of the domain on lamin A required for its interaction. *Oncogene* **9**, 2649-2653.
- Padan, R., Nainudel-Espzsteyn, S., Goitein, R., Fainsod, A., Gruenbaum, Y.** (1990): Isolation and characterization of the *Drosophila* nuclear envelope otefin cDNA. *J. Biol. Chem.* **265**, 7808-7813.
- Paddison, P., Caudy, A., Bernstein, E., Hannon, G., Conklin, D.** (2002): Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* **16**, 948-58.
- Papoutsopoulou, S., Nikolakaki, E., Giannakouros, T.** (1999): SRPK1 and LBR protein kinase show identical substrate specificities. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **255**, 602-607.
- Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., Hayward, D. C., Ball, E. E., Degnan, B., Muller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E., Ruvkun, G.** (2000): Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408**, 86-89.
- Pe'ery, T., Mathews, M. B., Baulcombe, D.** (2003): RNA interference. *Editorial/Methods* **30**, 287-288.
- Polaczyk, P. J., Gasperini, R., Gibson, G.** (1998): Naturally occurring genetic variation affects *Drosophila* photoreceptor determination. *Dev. Genes Evol.* **207**, 462-470.
- Polioudaki, H., Kourmouli, N., Drosou, V., Bakou, A., Theodoropoulos, P. A., Singh, P. B., Giannakouros, T., Georgatos, S. D.** (2001): Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO reports* **21**, 920-925.

- Porter, F. D.** (2002): Malformation syndrome due to inborn errors of cholesterol synthesis. *J. Clin. Invest.* **110**, 715-724.
- Powell-Coffman, J. A., Knight, J., Wood, W. B.** (1996): Onset of *C. elegans* gastrulation is blocked by inhibition of embryonic transcription with an RNA polymerase antisense RNA. *Dev. Biol.* **178**, 472-483.
- Raju, G. P., Dimova, N., Klein, P. S., Huang, H.-C.** (2002): SANE, a novel LEM domain protein, regulates bone morphogenic protein signalling through interaction with Smad1. *J. Biol. Chem.* **278**, 428-437.
- Ramanathan, Y., Song, L., Mathews, M. B., Tolia, P. P.** (2003): Functional cloning of genes encoding dsRNA binding proteins. *Methods* **39**, 348-252.
- Rawson, R. B.** (2003): The SREBP pathway – insights from Insigs and insects. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 631-640.
- Riemer, D., Stuurman, N., Berrios, M., Hunter, C., Fisher, P., Weber, K.** (1995): Expression of *Drosophila* lamin C is developmentally regulated: analogies with vertebrate A-type lamins. *J. Cell Sci.* **108**, 3189-3198.
- Roignant, J., Carre, C., Mugat, B., Szymczak, D., Lepesant, J., Antoniewski, C.** (2003): Absence of transitive and systemic pathway allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*. *RNA* **9**, 299-308.
- Rolls, M. M., Stein, P. A., Taylor, S. S., Ha, E., McKeon, F., Rapaport, T. A.** (1999): A visual screen of a GFP-fusion library identifies a new type of nuclear envelope protein. *J. Cell Biol.* **146**, 29-44.
- Roux, C., Wolf, C., Mulliez, N., Gaoua, W., Cormier, V., Chevy, F., Citadelle D.** (2000): Role of cholesterol in embryonic development; *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, 1270-1279.
- Rubinson, D., Dillon, C., Kwiatkowski, A., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., Zhang, M., McManus, M., Gertler, F., Scott, M., Van Parijs, L.** (2003): A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat. Genet.* **33**, 401-406.
- Rudolph, T., Lu, B., Westphal, T., Szidonya, J., Eissenberg, J., Reuter, G.** (1999): New type of CyO and TM3 green balancers. *Dros. Inf. Serv.* **82**, 99-100.
- Saunders, L. und Barber, G.** (2003): The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions. *FASEB* **17**, 961-983.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.** (1977): DNA-sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schoft, V. K., Beauvais, A. J., Lang, C., Gajewski, A., Prüfert, K., Winkler, C., Akimenko, M.-A., Paulin-Levasseur, M., Krohne, G.** (2003): The lamina-associated polypeptide 2 (LAP2) isoforms  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\omega$  of zebrafish: developmental expression and behavior during the cell cycle. *J. Cell Sci.* **116**, 2505-2517.
- Schrack, K., Mayer, U., Horrichs, A., Kuhnt, C., Bellini, C., Dangl, J., Schmidt, J. and Jürgens, G.** (2000): FACKEL is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev.* **14**, 1471-1484.
- Segura-Totten, M., Kowalski, A. K., Craigie, R., Wilson, K. L.** (2002): Barrier-to-autointegration factor: major roles in chromatin decondensation and nuclear assembly. *J. Cell Biol.* **158**, 475-485.

- Sempere, L. F., Sokol, N. S., Dubrovsky, E. B., Berger, E. M., Ambros, V.** (2003): Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by hormonal signals and Broad-Complex gene activity. *Dev. Biol.* **259**, 9-18.
- Shareef, M., King, C., Damaj, M., Badagu, R., Huang, D. W., Kellum, R.** (2001): *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1)/origin recognition complex (ORC) protein is associated with HP1 and ORC and functions in heterochromatin induced silencing. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1671-1685.
- Shen, C., Buck, A., Liu, X., Winkler, M., Reske, S.** (2003): Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Lett* **539**, 111-114.
- Shi, Y.** (2003): Mammalian RNAi for the masses. *TRENDS in Genetics* **19**, 9-12.
- Schultz, L. D., Lyons, B. L., Burzenski, L. M., Gott, B., Samuels, R., Schweitzer, P. A., Dreger, C., Herrmann, H., Kalscheuer, V., Olins, A. L., Olins, D. E., Sperling, K., Hoffmann, K.** (2003): Mutations at the mouse ichthyosis locus are within the lamin B receptor gene: a single gene model for human Pelger-Huët anomaly. *Human Mol. Genetics* **12**, 61-69.
- Shumaker, D. K., Lee, K. K., Tanhehco, Y. C., Craigie, R., Wilson, K. L.** (2001): LAP2 binds to BAF-DNA complexes: requirement for the LEM domain and modulation by variable regions. *EMBO J.* **20**, 1754-1764.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H. A., Fire, A.** (2001): On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing; *Cell* **107**, 465-476.
- Silve, S., Dupuy, P. H., Ferrara, P., Loison, G.** (1998): Human lamin B receptor exhibits sterol C14-reductase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1392(2-3)**, 233-244.
- Simos, G. und Georgatos S.D.** (1992): The inner nuclear membrane protein p58 associates in vivo with a p58 kinase and the nuclear lamins. *EMBO J.* **11**, 4027-4036.
- Simos, G. und Georgatos, S.D.** (1994): The lamin B receptor-associated protein p34 shares sequence homology and antigenic determinants with the splicing factor 2-associated protein p32. *FEBS Lett* **346(2-3)**, 225-228.
- Sinensky, M., Fantle, K., Trujillo, M., McLain, T., Kupfer, A., Dalton, M.** (1994): The processing pathway of prelamin A. *J. Cell Sci.* **107**, 61-67.
- Smith, S. und Blobel G.** (1993): The first membrane spanning region of the lamin B receptor is sufficient for sorting to the inner nuclear membrane. *J. Cell Biol.* **120**, 631-637.
- Soullam, B. und Worman, H. J.** (1993): The amino-terminal domain of the lamin B receptor is a nuclear envelope targeting signal. *J. Cell Biol.* **120**, 1093-1100.
- Soullam, B. und Worman, H. J.** (1995): Signals and structural features involved in integral membrane protein targeting to the inner nuclear membrane. *J. Cell Biol.* **130**, 15-27.
- Spann, T. P., Moir, R. D., Goldman, A. E., Stick, R. und Goldman, R. D.** (1997): Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *J. Cell Biol.* **136**, 1201-1212.
- Spann, T., Goldman, A., Wang, C., Huang, S., Goldman, R.** (2002): Alteration of nuclear lamin organisation inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *J. Cell Biol.* **156**, 603-608.
- Starr, D. A. und Han, M.** (2003): ANChors away: an actin based mechanism of nuclear positioning. *J. Cell. Sci.* **116**, 211-216.

- Stuurman, N., Sasse, B., Fisher, P. A.** (1996): Intermediate filament protein polymerization: Molecular analysis of *Drosophila* nuclear lamin head-to-tail binding. *J. Struct. Biol.* **117**, 1-15.
- Stuurman, N., Heins, S., Aebi, U.** (1998): Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J. Struct. Biol.* **122**, 42-66.
- Sui, G., Soohoo, C., Affar el, B., Gay, F., Shi, Y., Forrester, W.** (2002): A DNA vector based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 5515-5520.
- Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Bhatt, H., Anver, M., Naryan, B., Nagashimi, K., Stewart, C. L., Burke, B.** (1999): Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* **147**, 913-920.
- Szweykowska-Kulińska, Z., Jarmolowski, A., Figlerowicz, M.** (2003): RNA interference and its role in the regulation of eucaryotic gene expression. *Acta Biochimica Polonica* **50**, 217-229.
- Takano, M., Takeuchi, M., Ito, H., Furukawa, K., Sugimoto, K., Omata, S. and Horigome, T.** (2002): The binding of lamin B receptor to chromatin is regulated by phosphorylation in the RS region. *Eur. J. Biochem.* **269**, 943-953.
- Tavernarakis, N., Wang, S. L., Doroukov, M., Ryazanov, A., Driscoll, M.** (2000): Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nature genetics* **24**, 180-183.
- Taylor-Jones, J. M., McGehee, R. E., Rando, T. A., Lecka-Czernik, B., Lipschitz, D. A., Peterson, C. A.** (2002): Activation of an adipogenic program in adult myoblasts with age. *Mech. Ageing Dev.* **123**, 649-661.
- Thomas, J. O. und Kornberg, R. D.** (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 2626-2630.
- Tijsterman, M., Ketting, R., Plasterk, R.** (2002): The genetics of RNA silencing. *Annu. Rev. Genet.* **36**, 489-519.
- Trajkovski, Z., Vrcankovski, M., Saveski, J., Gucev, Z. S.** (2002): Greenberg dysplasia (hypodysplastic calcification-moth-eaten skeletal dysplasia): Prenatal ultrasound diagnosis and review of literature. *Am. J. Med. Gen.* **111**, 415-419.
- Tschudi, C., Djikeng, A., Shi, H., Ullu, E.** (2003): In vivo analysis of the RNA interference mechanism in *Trypanosoma brucei*. *Methods* **30**, 304-312.
- Tsuchiya, Y., Hase, A., Ogawa, M., Yorifuji, H., Arahata, K.** (1999): Distinct regions specify the nuclear membrane targeting of emerin, the responsible protein for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Eur. J. Biochem.* **259**, 859-865.
- Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P., Sharp, P. A.** (1999): Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.* **13**, 3191-3197.
- Umland, T. C., Shui-Qing, W., Craigie, R., Davies, D. R.** (2000): Structural basis of DNA bridging by Barrier-to-Integrase Factor. *Biochem.* **39**, 9130-9138.
- Urban, N.** (2001): Analyse von Kernmembranproteinen von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit
- Vainzof, M., Zatz, M.** (2003): Protein defects in neuromuscular diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **36**, 543-555.

- Vance, V. und Vaucheret, H.** (2003): RNA Silencing in plants: defense and counterdefense. *Science* **292**, 2277-2280.
- Voinnet, O.** (2001): RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics* **17**, 449-259.
- Voinnet, O.** (2002): RNA silencing: small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 444-451.
- Wang, X., Xu, A., Rivolta, C., Li, L., Peng, G.-H., Swain, P., Swung, C.-H. Swaroop, A., Berson, E., Dryja, T., Chen, S.** (2003): Barrier to autointegration factor interacts with the cone-rod homeobox and represses its transactivation function. *J. Biol. Chem.* **277**, 43288-43300.
- Waterham, H. R., Koster, J., Romeijn, G. J., Hennekam, R. C. M., Vreken, P., Andersson, H. C., FitzPatrick, D. R., Kelley, R. I., Wanders, R. J. A.** (2001): Mutations in the  $3\beta$ -hydroxysterol  $\Delta^{14}$ -reductase gene cause Desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis. *Am J. Hum. Genet.* **69**, 685-694.
- Waterham, H. R., Koster, J., Mooyer, P., van Noort, G., Kelley, R. I., Wilcox, W. R., Wanders, R. J. A., Hennekam, R. C. M. and Oosterwijk, J. C.** (2003): 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.* **72**, 1013-1017.
- Weber, D.** (2003): Biochemische Untersuchung des Lamin B Rezeptors von *Drosophila melanogaster*. Schriftliche Hausarbeit
- Wianny, F. und Zernicka-Goetz, M.** (2000): Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat. Cell Biol.* **2**, 70-75.
- Wilkinson, F. L., Holaska, J. M., Zhang, Z., Sharma, A., Manilal, S., Holt, I., Stamm, S., Wilson, K. L., Morris, G. E.** (2003): Emerin interacts in vitro with the splicing-associated factor, YT521-B. *Eur. J. Biochem.* **270**, 2459-2466.
- Wilson, K. L.** (2000): The nuclear envelope, muscular dystrophy and gene expression. *Trends Cell Biol.* **10**, 125-129.
- Winston, W. M., Molodowitch, C., Hunter, C. P.** (2002): Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* **295**, 2456-2459.
- Worman, H. J., Yuan, J., Blobel, G., Georgatos, S. D.** (1988): A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8531-8534.
- Worman, H. J., Evans, C. D., Blobel, G.** (1990): The lamin B receptor of the nuclear envelope inner membrane: a polytopic protein with eight potential transmembrane domains. *J. Cell Biol.* **117**, 245-258.
- Worman, H. J. und Courvalin, J.-C.** (2002): The nuclear lamina and inherited disease. *Trends Cell Biol.* **12**, 591-598.
- Wu, W., Lin, F., Worman, H. J.** (2002): Intracellular trafficking of MAN1, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *J. Cell Sci.* **115**, 1361-1372.
- Xia, H., Mao, Q., Paulson, H., Davidson, B.** (2002): siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat. Biotechnol.* **20**, 1006-1010.
- Xu, P., Vernooy, S. Y., Guo, M., Hay, B. A.** (2003): The *Drosophila* microRNAs Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr. Biol.* **13**, 790-795.

- Yanagawa, S., Lee, J.-S., Ishimoto, A.** (1998): Identification and characterization of a novel line of *Drosophila* Schneider S2 cells that respond to Wingless signalling. *J. Biol. Chem.* **273**, 32353-32359.
- Yang, S., Tutton, S., Pierce, E., Yoon, K.** (2001): Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7807-7816.
- Ye, Q., Callebaut, I., Pezhman, A., Courvalin, J. C., Worman, H. J.** (1997): Domain-specific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR. *J. Biol. Chem.* **272**, 14983-14989.
- Ye, Q. und Worman, H. J.** (1994): Primary structure analysis and lamin B and DNA binding of human LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *J. Biol. Chem.* **269**, 11306-11311.
- Ye, Q. und Worman, H. J.** (1996): Interaction between an integral protein of the nuclear envelope inner membrane and human chromodomain proteins homologous to *Drosophila* HP1. *J. Biol. Chem.* **271**, 14653-14656.
- Zamore, P., Tuschl, P., Bartel, P.** (2000): RNAi: Double-stranded RNA directs ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25-33.
- Zamore, P. D.** (2001): RNA interference: listening to the sound of silence; *Nat. Struct. Biol.* **8**, 746-750.
- Zeng, Y. und Cullen, B. R.** (2003): Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA* **9**, 112-123.
- Zhang, L., Yang, N., Mohamed-Hadley, A., Rubin, S. C., Coukos, G.** (2003): Vector-based RNAi, a novel tool for isoform-specific knockdown of VEGF and anti-angiogenesis gene therapy of cancer. *Biochem. Biophysical. Res. Com.* **303**, 1169-1178.
- Zheng, R., Ghirlando, R., Lee, M.S., Mizuuchi, K., Krause, M., Craigie, R.** (2000): Barrier-to-autointegration factor (BAF) bridges DNA in a discrete, higher-order nucleoprotein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8997-9002.
- Zdobnov, E. M., von Mering, C., et al.** (2002). Comparative genome and proteome analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*. *Science*, **298**, 149-159.

## VII. Anhang

### VII.1. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BAF	Barrier-to-Autointegration Factor
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
dd	bidestiliert
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleotid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm bzw. Standardwert der Erdbeschleunigung
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Stunde
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
l	Liter
LAP	Lamin assoziiertes Polypeptid
LBR	Lamin B Rezeptor
kD	Kilodalton
m	Meter
M	Molar
mA	Milli-Ampere
MCS	multiple cloning site
mg	Milligramm
min	Minute
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA

---

μ	Mikro
NPC	Nuclear pore complex (Kernporenkomplex=
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
RdRp	RNA-dependend RNA-Polymerase
RISC	RNA-induced Silencing Complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
stRNA	Small Temporal RNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-(hydrothymethyl)-aminoethan
U	Unit
V	Volt
Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

## VII.2 Verwendete Primer

### Drosophila Lamin B Rezeptor

#### dLBR (1-741) pBluescript SK

Upstream-Primer: 5' - TTT TCT AGA ATG CAG CAC TCG CCG AGC A - 3'

Downstream-Primer: 5' - TTT GGA TCC TTA GTA GAC CCT GGG CAG G - 3'

#### dLBR (17-334) pEGFP N1

Upstream-Primer: 5' - AAC TCG AGA TGC AGG CAC GTT TTT TCG ACC GCA ATT - 3'

Downstream-Primer: 5' - TTG GTA CCC TGG CCG TAC AGC TCC ATG TC - 3'

#### dLBR (17-262) pET21a

Upstream-Primer: 5' - AAC ATA TGC GTT TTT TCG ACC GCA ATT CAT ACA C - 3'

Downstream-Primer: 5' - AAC TCG AGA CGC TTG GAG GAC TTC TCA TCG TCG - 3'

#### dLBR (1-741) pYX212

Upstream-Primer: 5' - TTT GAA TTC ATG CAG CAC TCG CCG AGC A - 3'

Downstream-Primer: 5' - TTT CTC GAG TTA GTA GAC CCT GGG CAG G - 3'

### Drosophila Bocksbeutel- $\alpha$

#### Bocksbeutel- $\alpha$ (1-399) pBluescript SK

Upstream-Primer: 5' - AAC TCG AGA ATG TCG GAC CTT TCT TAC CT - 3'

Downstream-Primer: 5' - AAT CTA GAT CAG GCG TTG GGT GTC AAT ACC ACG TAC - 3'

#### Bocksbeutel- $\alpha$ (1-399) pEGFP-N1

Upstream-Primer: 5' - AAC TCG AGA ATG TCG GAC CTT TCT TAC CT - 3'

Downstream-Primer: 5' - AAG GTA CCG CGT TGG GTG TCA ATA CCA CGT ACA CCA TGG  
TGG CCA GCA TCA C - 3'

#### Bocksbeutel (30-176) pET21a

Upstream-Primer: 5' - AAA CAT ATG ACG GAC AGC ACC CGC AGC GTC - 3'

Downstream-Primer: 5' - AAA CTC GAG CTG GTC AAC TTC GCG TGT GTA - 3'

#### Bocksbeutel- $\alpha$ (Fragment: Nukleotide 261-1094) pET21a

Upstream-Primer: 5' - GCA GGA CGC ACT AGC AGC AA - 3'

Downstream-Primer: 5' - CAC CAT GGT GGC CAG CAT CAC TGA CAC TAC CAA TAT TAA  
GTA GAA TTT GAG ATT - 3'

**Bocksbeutel- $\alpha$  (Fragment: Nukleotide 826-1094) pET21a**

Upstream-Primer: 5' - CCG ACC ACC GCA GTA AAC AC - 3'

Downstream-Primer: 5' - CAC CAT GGT GGC CAG CAT CAC TGA CAC TAC CAA TAT TAA  
GTA GAA TTT GAG ATT - 3'**Drosophila Bocksbeutel- $\beta$** **Bocksbeutel- $\beta$  (1-351) pBluescript KS**

Upstream-Primer: 5' - AAT CTA GAA TGT CGG ACC TTT CTT ACC TGG ACA CGT - 3'

Downstream-Primer: 5' - TTG GAT CCT CAC TGA CAC AGA GGT TTT CTA GCC AG - 3'

**Bocksbeutel- $\beta$  (1-351) pEGFP-C2**

Upstream-Primer: 5' - AAT CTA GAA TGT CGG ACC TTT CTT ACC TGG ACA CGT - 3'

Downstream-Primer: 5' - TTG GAT CCT CAC TGA CAC AGA GGT TTT CTA GCC AG - 3'

**Bocksbeutel- $\beta$  (1-351) pEGFP-N1**

Upstream-Primer: 5' - AAC TCG AGA ATG TCG GAC CTT TCT TAC CTG G - 3'

Downstream-Primer: 5' - TTG GTA CCT GAC ACA GAG GTT TTC TAG CCA GC - 3'

**Drosophila Barrier-to-Autointegration Factor****dBAF (1-80) pET21a**

Upstream-Primer: 5' - AAC ATA TGT CGG GCA CAT CGC AGA AAC ACA GGA - 3'

Downstream-Primer: 5' - AAC TCG AGA AGA ACT CCT CGC ACC AAT CGT TGA GAC AG - 3'

**dBAF (2-80) pEGFP-C2**

Upstream-Primer: 5' - AAC TCG AGG TCG GGC ACA TCG CAG AAA CAC A - 3'

Downstream-Primer: 5' - AAG GTA CCT TAC AAG AAC TCC TCG CAC CAA TCG TTG A - 3'

**dBAF (1-80) pEGFP-N1**

Upstream-Primer: 5' - AAC TCG AGA ATG TCG GGC ACA TCG CAG AAA CA - 3'

Downstream-Primer: 5' - TTG GTA CCA AGA ACT CCT CGC ACC AAT CGT TGA G - 3'

**RNAi-Primer**

Jeder der eingesetzten Primer setzt sich aus der T7 Polymerase Bindungsstelle

5' - GAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA - 3'

gefolgt von der spezifischen Sequenz zusammen:

**dLBR (RNAi)**

Upstream-Primer: 5' - CCC AGT CCA AGC AGC CCA GCC - 3'

Downstream-Primer: 5' - GCA AAG GCA CCC ACC ACT CGT - 3'

**Bocksbeutel (RNAi)**

Upstream-Primer: 5' - TCG GAC CTT TCT TAC CTG GAC - 3'

Downstream-Primer: 5' - TTG GCG AAA TGG GTG AAG AAA GTT - 3'

**dBAF (RNAi)**

Upstream-Primer: 5' - ATG TCG GGC ACA TCG CAG AAA - 3'

Downstream-Primer: 5' - CAA GAA CTC CTC GCA CCA ATC - 3'

**Otefin (RNAi)**

Upstream-Primer: 5' - ATG GCC GAT GTG GAC GAT TTT GAT - 3'

Downstream-Primer: 5' - ACC GGT GCT GGG TTG CTC GCA TA - 3'

**Lamin Dm0 (RNAi)**

Upstream-Primer: 5' - ATG TCG AGC AAA TCC CGA CGT - 3'

Downstream-Primer: 5' - GCG ACT GCT TCA ACT TGG CAT C - 3'

**Lamin C (RNAi)**

Upstream-Primer: 5' - ATG TCA GCA CGC CGC GTC - 3'

Downstream-Primer: 5' - TCA CCA GTT CCT GGA GCG A - 3'

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Nicole Wagner, geb. Urban  
Adresse: Moritzgasse 1  
97070 Würzburg  
Geburtsdatum: 4.5.1977  
Geburtsort: Hanau  
Familienstand: verheiratet

### Schulbildung:

1983 - 1987 Grundschule Großauheim, Hanau  
1987 - 1988 St. Josef Schule, Hanau  
1988 - 1994 Karl-Rehbein-Gymnasium, Hanau  
1994 - 1996 Hohe Landesschule, Hanau  
Juni 1996 Allgemeine Hochschulreife

### Studium:

1996 - 2000 Biologiestudium an der Bayerischen Julius Maximilians  
Universität Würzburg  
Studienschwerpunkte:  
Zell- und Entwicklungsbiologie  
Genetik  
Virologie und Immunologie

2000 - 2001 Diplomarbeit in der Abteilung für Elektronenmikroskopie am  
Biozentrum der Bayerischen Julius Maximilians Universität  
Würzburg bei Prof. Dr. G. Krohne.  
Thema: Analyse von Kernmembranproteinen von *Drosophila  
melanogaster*

2001 - 2003 Promotionsstudium in der Abteilung für Elektronenmikroskopie  
am Biozentrum der Bayerischen Julius Maximilians  
Universität Würzburg bei Prof. Dr. G. Krohne.  
Thema: Charakterisierung der Kernmembranproteine *Lamin B  
Rezeptor* und *Bocksbeutel* von *Drosophila melanogaster*

## IX. Publikationsliste

**Wagner, N.**, Weber, D., Seitz, S., Krohne, G. (2003): The lamin B receptor of *Drosophila melanogaster*. Zur Publikation eingereicht in „Journal of Cell Science“.

**Wagner, N.**, Schmitt, J., Krohne, G. (2003): Two novel LEM domain proteins are splice products of the annotated *Drosophila melanogaster* gene CG9424 (Bocksbeutel). Zur Publikation eingereicht in „European Journal of Cell Biology“.

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die an der Entstehung dieser vorliegenden Arbeit direkt oder indirekt beteiligt waren:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Georg Krohne für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, für die Möglichkeit, an diesem interessanten Thema zu arbeiten, vor allem aber für seine Menschlichkeit, seine engagierte Betreuung, Motivation und Unterstützung und natürlich für seine unzähligen rettenden Nusszöpfe.

Herrn Prof. Dr. C. R. Müller-Reible danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Kristina Stöckert, Daniela Weber, Sabine Seitz und Johannes Schmitt, deren Betreuung ich übernehmen durfte, bedanke ich mich für die Übernahme einiger kleiner Teilprojekte, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Ellen Fecher danke ich für die vielen Sequenzierungen, die sie für mich durchgeführt hat.

Ein großer Dank gilt den Engeln der EM-Abteilung und der Genetik, besonders Claudia Gehrig, Daniela Bunsen und Susanne Clemens-Richter.

Bei Kathrin Schrick, Uni Tübingen, bedanke ich mich für die Bereitstellung des Hefestammes sowie verschiedener Vektoren.

Bei Kristina Prüfert, die mich Tag für Tag mit ihrer guten Laune angesteckt hat, für die vielen lustigen Gespräche und Stunden im Labor.

Bei der Studienstiftung des Deutschen Volkes für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

Ein großer Dank geht an alle Mitarbeiter der Zoologie I, der Genetik sowie allen Doktoranden, Diplomanden, Zulassungskandidaten und Praktikanten der EM-Abteilung, die zur tollen Arbeitsatmosphäre mit beigetragen haben.

**Mein besonderer Dank gilt den drei wichtigsten Menschen in meinem Leben,**

meinen Eltern, die mich mein gesamtes Leben selbstlos unterstützen, die ich über alles liebe und verehere und deren Hilfe und Vertrauen mir mein ganzes Leben lang Kraft gab.

meinem geliebten Ehemann Thomas, dem ich die glücklichsten Jahre meines Lebens verdanke, der mit mir durch Höhen und Tiefen ging, für seine unendliche Geduld und Unterstützung während der Verfassung dieser Arbeit und für die endlosen Stunden der Fehlersuche.

**Danke !!!**

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Weiterhin habe ich noch keinen Promotionsversuch unternommen oder diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

**Würzburg, den**

**Nicole Wagner, geb. Urban**