

# **Lamina assoziierte Polypeptide 2, Lamin B Rezeptor und Lamine: Untersuchungen an Vertebratenmodellen**

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

vorgelegt von

**Kristina Prüfert**

aus  
Bremen

Würzburg 2004

Eingereicht am:

2. November 2004

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Prof. Dr. U. Scheer

Gutachter:

Prof. Dr. G. Krohne

Gutachter:

Prof. Dr. R. C. Müller-Reible

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Zusammenfassung</b>	1
<b>I. 1. Zusammenfassung</b>	1
<b>I. 2. Summary</b>	4
<b>II. Einleitung</b>	7
<b>II. 1. Aufbau der Kernhülle</b>	7
<b>II. 2. Die Lamine</b>	8
<b>II. 3. Integrale Membranproteine der inneren Kernmembran</b>	13
II. 3. 1. Lamina assoziierte Polypeptide 1 und 2 (LAP1 bzw. LAP2)	14
II. 3. 2. Emerin	17
II. 3. 3. MAN 1	18
II. 3. 4. Der Lamin B Rezeptor LBR	19
II. 3. 5. Weitere integrale und periphere Membranproteine der inneren Kernmembran	21
<b>II. 4. Genetisch bedingte Krankheiten</b>	22
<b>II. 5. Zebrafisch</b>	26
<b>II. 6. Morpholinos</b>	28
<b>II. 7. Zielsetzung</b>	29
<b>III. Material und Methoden</b>	31
<b>III. 1. Material</b>	31
III. 1. 1. Bakterienstämme und Vektoren	31
III. 1. 2. Kulturzellen	31
III. 1. 3. Fische	32
III. 1. 4. Chemikalien	32
III. 1. 5. Häufig verwendete Lösungen und Medien	32
III. 1. 6. Antikörper	35
III. 1. 7. Enzyme	35
III. 1. 8. Primer	38
III. 1. 9. Verbrauchsmaterial	39
III. 1. 10. Verwendete Kits	40
III. 1. 11. Vorhandene Laminkonstrukte	40
III. 1. 12. Verwendete Morpholinos	41
III. 1. 13. Geräte	41
III. 1. 14. Computerprogramme und Internet-Seiten	44
<b>III. 2. Methoden</b>	45
III. 2. 1. Molekularbiologische Methoden	45
III. 2. 1. 1. Bakterienkulturen	45
III. 2. 1. 2. Agarose-Gelelektrophorese	46
III. 2. 1. 3. Isolation von DNA	46
III. 2. 1. 4. Reinigung von Nukleinsäuren	47
III. 2. 1. 5. Konzentrationsbestimmung gelöster Nukleinsäuren	48
III. 2. 1. 6. Transformation von DNA	49
III. 2. 1. 7. Klonierung	49
III. 2. 1. 8. DNA-Modifikation durch Enzyme	50
III. 2. 1. 9. Polymerasekettenreaktion, PCR	52

III. 2. 1. 10. Sequenzierung	53
III. 2. 1. 11 In vitro Transkription und Translation	54
III. 2. 1. 12. Identifikation von Klonen über radioaktive Hybridisierung von Filtern ("radioactive hybrid Mapping")	55
III. 2. 1. 13. Herstellung von gecappter GFP-mRNA	57
<b>III. 2. 2. Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>58</b>
III. 2. 2. 1. Proteinfällung (Chloroform oder Trichloressigsäure)	58
III. 2. 2. 2. SDS- Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	59
III. 2. 2. 3. Coomassiefärbung und Trocknen des Gels	60
III. 2. 2. 4. Fluorographie	60
III. 2. 2. 5. Western Blot	61
III. 2. 2. 6. Färben der transferierten Proteine mit Ponceau S	62
III. 2. 2. 7. Immunologischer Proteinnachweis durch Enhanced Chemiluminescence (ECL)	62
III. 2. 2. 8. Entfernen von spezifisch gebundenen Antikörpern von der Nitrozellulose	63
III. 2. 2. 9. Expression rekombinanter Proteine in E.coli	63
III. 2. 2. 10. Reinigung des rekombinanten Proteins	64
III. 2. 2. 11. Herstellung eines polyklonalen Antikörpers	65
III. 2. 2.12. Extraktion von Proteinen durch Harnstoff	66
III. 2. 2. 13. Gewebespezifische Proteinanalyse	66
<b>III. 2. 3. Zellkulturmethoden</b>	<b>67</b>
III. 2. 3. 1. Kultivierung	67
III. 2. 3. 2. Teilen von Kulturzellen und Anlegen einer neuen Flasche	67
III. 2. 3. 3. Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen	67
III. 2. 3. 4. Herstellung einer Primärezelllinie aus Hühner-Fibroblasten	68
III. 2. 3. 5. Transfektion von Kulturzellen	68
III. 2. 3. 6. Vorbereitung von Zellen für eine SDS-PAGE	69
III. 2. 3. 7. Mikroinjektion von A6 Zellen	69
<b>III. 2. 4. Fische</b>	<b>70</b>
III. 2. 4. 1. Haltung und Kreuzung	70
III. 2. 4. 2. Injektion	71
III. 2. 4. 3. Auswertung	71
III. 2. 4. 4. Fotografie	71
III. 2. 4. 5. Homogenisation	72
<b>III. 2. 5. Mikroskopische Methoden</b>	<b>72</b>
III. 2. 5. 1. Herstellung der Präparate für die Immunfluoreszenz	72
III. 2. 5. 2. Antikörperinkubation	73
III. 2. 5. 3. Immunfluoreszenzmikroskope	73
III. 2. 5. 4. Analyse von Zellen am konfokalen Laser Scanning Mikroskop	74
III. 2. 5. 5. Herstellung von Präparation für das Transmissions-Elektronenmikroskop	74
III. 2. 5. 6. Herstellen von Ultradünnschnitten	75
III. 2. 5. 7. Kontrastierung	76
III. 2. 5. 8. Analyse am Transmissions-Elektronenmikroskop	76

<b>IV. Das Lamina assoziierte Polypeptid 2 des Zebrafisch (zLAP2)</b>	77
<b>IV.1. Ergebnis</b>	77
IV.1. 1. Charakterisierung und Strukturanalyse des genomischen zLAP2	77
IV. 1. 2. Auf der Suche nach den LAP2 $\alpha$ -Isoformen im Zebrafisch und Huhn	90
IV. 1. 3. Auf der Suche nach der $\omega$ -spezifischen Isoform	99
<b>IV. 2. Diskussion</b>	100
IV. 2. 1. Charakterisierung des Zebrafisch LAP2	100
IV. 2. 2. Identifikation eines LAP2 in Hühnchen	100
IV. 2. 3. Vergleichende Analysen von LAP2 in verschiedenen Spezies	101
IV. 2. 4. LAP2 $\omega$ und LAP2 $\alpha$ - zwei Isoformen die nicht in allen Spezies vertreten sind	102
IV. 2. 5. Das LAP2 $\omega$ von <i>Xenopus</i> und Zebrafisch	102
IV. 2. 6 Die säugerspezifische $\alpha$ Isoform des LAP2	103
<b>V. Der Lamin B Rezeptor des Zebrafisch</b>	106
<b>V. 1. Ergebnisse</b>	106
V. 1. 1. Identifikation eines cDNA-Klons des Zebrafisch Lamin B Rezeptors (zLBR)	106
V. 1. 2. In vitro Transkription/Translation der gefundenen zLBR cDNA	111
V. 1. 3. Identifikation der genomischen LBR Sequenz des Zebrafisch	112
V. 1. 4. Sequenzierung des unbekanntes Bereiches	113
V. 1. 5. Struktureller Aufbau des genomischen Zebrafisch LBR	114
V. 1. 6. Herstellung polyklonaler Antikörper gegen die aminoterninale Domäne des Zebrafisch LBRs	116
V. 1. 7. Testen der Antikörper in der Immunfluoreszenz	118
V. 1. 8. Testen der Antikörper im Immunblot	129
<b>V. 2 Diskussion</b>	121
V. 2. 1. Identifikation und strukturelle Charakterisierung des Zebrafisch LBR	121
<b>VI. Funktionsanalyse des CxxM-Motivs der Lamine</b>	123
<b>VI.1. Ergebnisse</b>	123
VI. 1. 1. Allgemeine Anmerkung für die folgenden Ergebnisse	123
VI. 1. 2. Untersuchung des CxxM-Motivs	124
VI. 1. 2. 1. Überprüfung der Lamin Konstrukte	124
VI. 1. 2. 2. Untersuchung von wildtypischen Laminen	125
VI. 1. 2. 3. Auswirkungen der Cxx-Box	131
VI. 1. 2. 4. Der Einfluss anderer Domänen der Lamine	134
VI. 1. 2. 5. Vergleichende Expression der Lamin Mutanten in anderen Organismen	136
VI. 1. 2. 6. Unterschiedliche Auswirkungen von Lamin A	137
VI. 1. 2. 7. Einfluss des GFPs auf die morphologische Veränderung	139

VI. 1. 3. GNAERG-Sequenz des Lamin C2	141
VI. 1. 3. 1. Verwendete Konstrukte	141
VI. 1. 3. 2. Lichtmikroskopische Untersuchungen	142
VI. 1. 3. 3. Elektronenmikroskopische Analyse	143
<b>VI. Diskussion</b>	147
<b>VII. Morpholino Injektionen</b>	151
<b>VII. 1 Ergebnisse</b>	151
VII. 1. 1. Grundlegende Informationen bezüglich der Morpholino Injektionen und der anschließenden Interpretation	151
VII. 1. 2. Reduktion des zLAP2 mit Hilfe des Morpholinos Mo-LAP2	154
VII. 1. 3. Reduktion des LBR	159
VII. 1. 4. Reduktion der Lamine B1 und B2	163
<b>VII. 2 Diskussion</b>	169
<b>VIII. Literaturverzeichnis</b>	174
<b>IX. Anhang</b>	184
<b>IX. 1. Exon-/Introngrößen der genomischen LAP2 Sequenzen</b>	184
<b>IX. 2. Translation der cDNA Sequenz des Hühner LAP2</b>	185
<b>IX. 3. Genomische Sequenzen</b>	187
<b>IX. 4. Sequenz des Zebrafisch LBRs</b>	188
<b>IX. 5. pCS2P+Polylinker II</b>	189
<b>IX. 6. Abkürzungen</b>	189
<b>Lebenslauf</b>	192
<b>Publikationsliste</b>	193
<b>Danksagung</b>	194
<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	195

## I. Zusammenfassung

### I. 1 Zusammenfassung

Der Zellkern ist ein wichtiges Organell von eukaryotischen Zellen, der durch eine Doppelmembran vom Cytoplasma abgetrennt wird. Mit Hilfe des Zebrafischs als Modellorganismus und kultivierten Zellen verschiedener Vertebraten wurde in mehreren Teilprojekten Untersuchungen an integralen (Lamina assoziiertes Polypeptid 2, Lamin B Rezeptor) und peripheren Membranproteinen (Lamine) der in inneren Kernmembran durchgeführt.

Eines der am besten untersuchten integralen Membranproteine der inneren Kernmembran ist das Lamina assoziierte Polypeptid 2 (LAP2). Durch alternatives Splicen entstehen aus einem einzigen Gen eine Reihe verschiedener Isoformen die entwicklungs- und gewebespezifisch exprimiert werden. In Säuger sind 6 verschiedene Isoformen (LAP2 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\zeta$ ) bekannt, von denen alle mit Ausnahmen von LAP2 $\alpha$  und  $\zeta$ , in die innere Kernmembran integriert sind. Das LAP2 $\alpha$  ist ausschließlich im Nukleoplasma lokalisiert und wurde bis jetzt nur bei Säugern beschrieben.

Durch die Identifikation eines genomischen Klons ICRFc 7101293Q5 (RZPD) sowie vergleichende Datenbankanalysen konnte der strukturelle Aufbau des Zebrafisch LAP2-Gens ermittelt werden. Das Gen kodiert innerhalb von 19 kb (ohne regulatorische Sequenzen) 15 Exons aus denen durch alternatives Splicen 3 verschieden Isoformen hervorgehen (zLAP2  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\omega$ ). Mit Hilfe des "Radiation Hybrid mappings" wurde das LAP2 Gen auf der "Linkage group" 4 des Zebrafischs, zwischen den EST-Markern fc01g04 (213,97) und fb49f01 (215,69cR) lokalisiert. Aufgrund der zusätzlichen Identifikation der genomischen Sequenz des Hühner LAP2-Gens konnten die genomischen Sequenzen der LAP2 Gene von niederen Vertebraten (Zebrafisch), über die Vögel (Huhn), bis zum Säuger (Mensch) miteinander verglichen werden. Dabei zeigte sich einerseits, dass die  $\omega$  Isoform des Zebrafischs nicht im Genom von Huhn und Säugern vorhanden ist: Andererseits ist die  $\alpha$  Isoform der Säuger ebenfalls in keinem der anderen Spezies (Huhn, Zebrafisch) zu finden ist. Weiterhin konnte bei zusätzliche Proteinanalysen mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern, gegen die konservierte aminoternale Domäne der LAP2 Proteine, in 10 Tage alten Hühner Embryonen nur ein Protein mit einem vergleichbaren Molekulargewicht zum LAP2 $\beta$  anderer Spezies eindeutig detektiert werden. Aufgrund dieser Befunde und der Tatsache, dass die

kodierenden Exonsequenzen zwischen Mensch und Huhn eine größere Ähnlichkeit zeigen als zwischen Mensch und Zebrafisch, liegt die Vermutung nahe, dass die  $\alpha$ -Isoform eine Neuheit der Säugern darstellt.

Ein weiteres integrales Membranprotein, das erstmals beim Zebrafisch untersucht wurde, ist der Lamin B Rezeptor (zLBR). Mit Hilfe von radioaktiv markierten Sonden, konnte zwei Klone identifiziert werden die sowohl die gesamte cDNA-Sequenz (MPMGp567K10194Q3 (RZPD)) als auch die gesamte genomische Sequenz (ICRFc71M10137Q5 (RZPD)) beinhalten. Anhand von vergleichenden Datenbankanalysen, konnte der strukturelle Aufbau des Zebrafisch LBR-Gens ermittelt werden. Dieses kodiert innerhalb von 12 kb (ohne regulatorische Sequenzen) mit 13 Exons für ein 616 Aminosäure großes Protein. Vergleichbar mit dem LBR anderer Spezies besitzt der Zebrafisch LBR ebenfalls 8 Transmembrandomänen in seiner carboxyterminalen Domäne mit denen er in der inneren Kernmembran verankert ist. Der Aminosäurenvergleich mit anderen Spezies zeigte, dass die Aminosäuresequenz sowohl des aminoterminalen Bereichs als auch im Bereich der Transmembrandomänen hoch konserviert ist. Weiterhin wurden polyklonalen Antikörpern gegen die ersten 210 Aminosäuren des zLBRs hergestellt, die für zukünftige immunologische Analysen verwendet werden können.

Ebenso wie die integralen Membranproteine spielen auch die Lamine eine wichtige Rolle bei nukleären Prozessen. Die B-Typ Lamine zeichnen sich alle durch ein konserviertes CxxM-Motiv am Carboxyterminus aus. Das CxxM-Motiv wird nach posttranslational modifiziert, wodurch es lipophile Eigenschaften erlangt und somit für die anfängliche Verankerung der Lamine in der inneren Kernmembran verantwortlich ist. Bei A-Typ Laminen ist dieses Motiv nicht in der Primärsequenz enthalten oder es wird nach dem Einbau in die Kernlamina proteolytisch abgespalten. Eine Besonderheit stellt das meiotische Lamin C2 dar, welches ein Spliceprodukt des Lamin A Gens der Säuger ist. Das Lamin C2 besitzt zwar kein CxxM-Motiv an seinem Aminoterninus, dafür aber ein Hexapeptid (GNAEGR) nach dem Startmethionin. Die posttranslationale Modifikation dieser Sequenz verleiht dem Protein lipophile Eigenschaften. Anhand von funktionellen Analysen konnte durch die Überexpression GFP-Fusionsproteinen verschiedener wildtypischer Lamine und Lamin Mutanten gezeigt werden, dass die Interaktion der Lamine über das CxxM-Motiv oder das GNAEGR-Motiv mit der inneren Kernmembran, das Wachstum der Kernhülle induziert.



In einem letzten Projekt konnte mit Hilfe spezifischer "antisense-" Oligonukleotide, die als "Morpholinos" bezeichnet werden, die Expression von LAP2, LBR und den B-Typ Laminen B1 und B2 in Zebrafisch Embryonen reprimiert werden. Die Blockade der mRNA-Translation der entsprechenden Gene erfolgte in allen Fällen innerhalb der ersten 24 Stunden vollständig. Obwohl die Anzahl der beobachteten Embryonen relativ gering war, so zeigte sich bei allen Embryonen eine deutliche Entwicklungsverzögerung und unterschiedlich starke Entwicklungsstörungen. Die morphologischen Auswirkungen waren bei der Reduktion des LAP2 oder der Lamine geringer als bei der Reduktion des LBR, da in beiden Fällen maternale Proteine, wie das LA2 $\omega$  oder das B-Typ Lamin LIII, nicht reduziert werden konnten.

## I. 2. Summary

The nucleus is an essential organelle of eucaryotic cells and separated by a double membrane, the nuclear envelope, from the cytoplasm. Using the zebrafish as one model organism and also cultured cells of various vertebrates, analysis of integral (lamina associated polypeptide 2, lamin B receptor) and peripheral membrane proteins (lamins) of the inner nuclear membrane were performed.

One of the best investigated protein of the inner nuclear membrane is the lamina associated polypeptide 2. By alternative splicing the LAP2 gene encodes a number of isoforms that are expressed in a developmental and tissue specific manner. In mammals 6 different isoforms (LAP2 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\zeta$ ) are known, and all of them except for LAP2 $\alpha$  and LAP2 $\zeta$  get integrated into the inner nuclear membrane. LAP2 $\alpha$  is predominantly found in the nucleoplasm and has so far only been described in mammals. Due to the identification of the genomic clone ICRFc 7101293Q5 (RZPD) and an additional contig-sequence published by a database of the Sanger Institute, I was able to analyse the genomic structure of the zebrafish lamina associated polypeptide 2 (zLAP2) gene. It spans approximately 19 kb (with no regulatory sequences) and contains 15 exons. By alternative splicing the 15 exons encode 3 isoforms (zLAP2  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\omega$ ). Using the method of "radiation hybrid mapping" the zLAP2 gene could be localised onto the linkage group 4 between the EST-markers fc01g04 (213,97) and fb49f01 (215,69cR). The additional identification of the genomic LAP2 sequence of chicken, made it possible to compare the genomic sequences of lower vertebrate LAP2 (zebrafish), avian LAP2 (chicken) and mammal LAP2 (human). This comparison revealed that the zebrafish LAP2 $\omega$  was not found in the chicken and the mammalian genome. On the other hand sequences encoding a LAP2 $\alpha$  isoform were not detected in the chicken and zebrafish genome. The analysis of total proteins of 10 day old chicken embryos and fibroblasts using monoclonal and polyclonal antibodies raised against the evolutionary conserved aminoterminal domain confirmed the abundance of a LAP2 $\alpha$  isoform. The predominant isoform detected was comparable to LAP2 $\beta$  of other species. These results suggest, in addition to the fact that the exons of human LAP2 show a higher identity to the exons of the chicken LAP2 than to the exons of the zebrafish LAP2, that the  $\alpha$  Isoform is a novelty of mammals.

A second integral membrane protein, which I focused on, is the lamin B receptor of zebrafish (zLBR). By using radioactive labelled probes of a previously identified LBR fragment, I was able to identify clones that were coding for the cDNA- (MPMGp567K10194Q3 (RZPD)) and the genomic sequence (ICRFc71M10137Q5 (RZPD)). By further computer analysis a genomic sequence was determined and revealed that the LBR gene spans over 12 kb nucleotides (no regulatory sequences included). The gene contains 13 exons and encodes a protein of 616 amino acids. Comparable to other species the zLBR contains 8 transmembrane domains in its carboxyterminal domain. Comparison of LBRs of different species on the amino acid level demonstrated that the aminoterminal region and the carboxyterminal domain are highly conserved. Especially the carboxyterminal domain coding for the membrane spanning domains exhibited a high conservation. Furthermore polyclonal antibodies, specific for the amino acids 1-210 were raised and can be used for immunological analysis in the future.

Comparable to integral membrane proteins of the inner nuclear membrane lamins are also essential for nuclear processes. A main feature of B type lamins is the carboxyterminal CxxM-motif. This motif undergoes a posttranslational isoprenylation and is responsible for the correct targeting and initial association of the lamins to the inner nuclear membrane. A type lamins on the other hand do not possess a CxxM-motif in the primary sequence (mammalian lamin C, C2). In the lamin A isoform the CxxM-motif is encoded in the primary structure but gets proteolytically removed after the protein was targeted to the lamina. The lamin C2, a meiotic splice variant of lamin A, demonstrates a peculiarity. It does not encode a CxxM-motif but possesses the hexapeptide GNAEGR at its aminoterminal end. The GNAEGR-sequence also undergoes a posttranslational modification and becomes myristoylated. Functional studies using overexpressed GFP-fusion proteins of different wildtype lamins and lamin mutants demonstrated that both the CxxM motif and the GNAEGR motif promote nuclear membrane proliferation.

With the help of specific antisense oligonucleotides, known as "Morpholinos", I was able to block the expression of LAP2, LBR and B-type lamins B1 and B2 in zebrafish embryos. The mRNA translation of each gene was blocked completely for at least 24 hours after fertilisation. Although only few embryos were investigated I realised an obvious delay in development and developmental defects in different degrees in all analysed embryos. The degree of morphological deformations was more obvious in knock downs of LBR, than after the

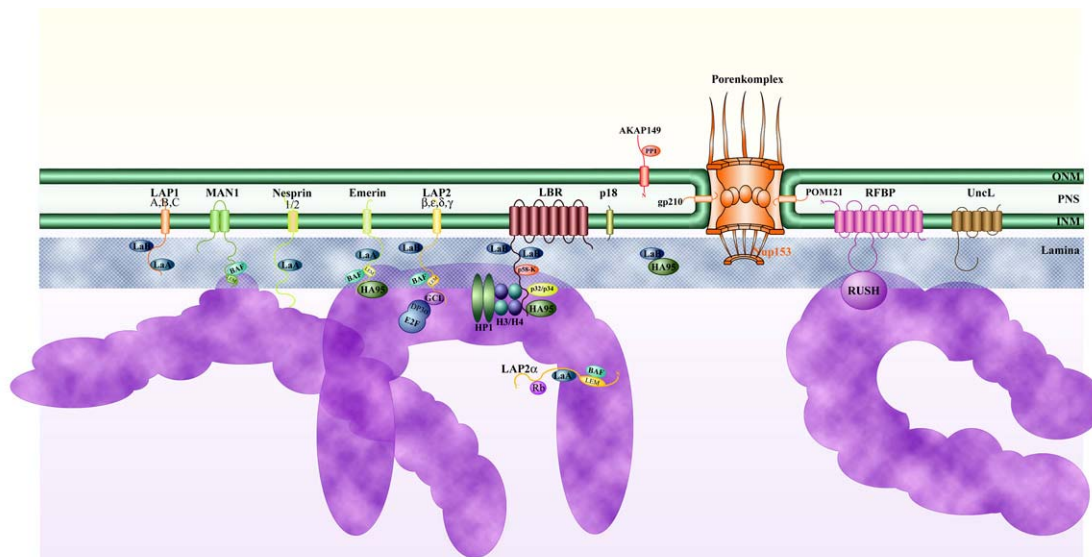
reduction of LAP2 or the B type lamins, where maternal proteins, like LAP2 $\omega$  and the B Type lamin LIII could not get reduced.

## II. Einleitung

### II. 1. Aufbau der Kernhülle

Eines der wohl wichtigsten Merkmale, die Eukaryonten von Prokaryonten unterscheidet ist der Zellkern (= Nukleus). Der Zellkern, welcher ungefähr 10% des Gesamtvolumens in Anspruch nimmt, unterteilt die Zelle in zwei Kompartimente, die als Cytoplasma und Nukleoplasma bezeichnet werden.

Während das Cytoplasma eine Reihe von Organellen, wie Golgi Apparat, endoplasmatisches Retikulum (ER), Mitochondrien oder Ribosomen beinhaltet, findet man im Nukleus neben nukleären Proteinen hauptsächlich DNA. Der Nukleus ist Ort der DNA- und RNA-Synthese sowie der RNA-Prozessierung. Er ist weiterhin Ort für die Synthese der ribosomalen Untereinheiten und schützt durch seine Hülle die DNA. Die durch die Kompartimente herbeigeführte räumliche und zeitliche Trennung von Transkription und Translation, welche bei Prokaryonten zeitgleich abläuft, ermöglicht eine feine Abstimmung der Proteinexpression. Die Kernhülle selbst ist ein äußerst komplexes Gebilde, welches trotz genauester Untersuchung noch viele Fragen offen lässt. Sie setzt sich aus drei strukturellen Komponenten zusammen: der äußeren Kernmembran, den Porenkomplexen und der inneren Kernmembran (Abb. II.1).



**Abb. II.1: Schematischer Aufbau der Kernhülle und Interaktion einiger Kernmembranproteine**

äußere (ONM) und innere (INM) Kernmembran sowie perinukleärer Raum (PNS); Porenkomplex mit einigen Porenkomplexproteinen (gp210, POM121, Nup153); Lamina mit Lamin A (LaA) und Lamin B (LaB); Integrale Membranproteine (LAP1, Man1, Nesprin, Emerin, LAP2, LBR, p18, RFBP, UncL, Unc84); weitere interagierende nukleäre Proteine (HA95, BAF, p58-K, p32/p34, GCL, HP1, H3, H4, RUSH); Darstellung von Christiane Glöckner

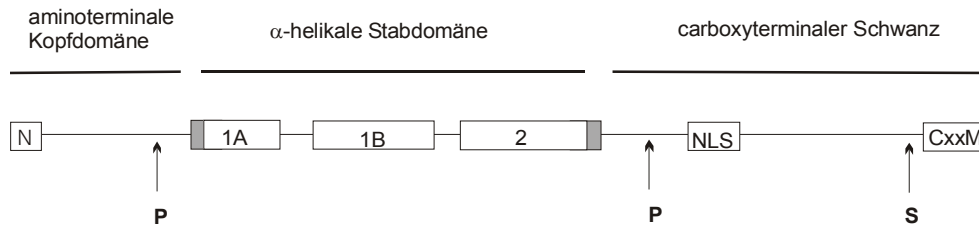
Obwohl die äußere und innere Kernmembran eine recht ähnliche Lipidzusammensetzung zeigen, so unterscheiden sie sich doch deutlich in Bezug auf ihre integralen Membranproteine und ihre Funktion. Die äußere Membran steht in Kontinuität mit dem ER, wodurch eine freie Diffusion von größeren Proteinen im Lumen des ERs und in der ER-Membran zur Kernmembran ermöglicht wird. Die innere Kernmembran enthält eine Reihe von integralen Membranproteinen, die in der Lage sind sowohl mit der unterliegenden Lamina als auch mit dem im Zellkern vorhandenen Chromatin zu interagieren. An den Stellen, an denen die äußere und innere Kernmembran fusionieren, befinden sich die Porenkomplexe, welche ebenfalls aus spezifischen Proteinen zusammengesetzt ist. Der Kernporenkomplex (Durchmesser~ 9 nm) dient dem gezielten Informationsaustausch zwischen Cytoplasma und Nukleoplasma und ermöglicht eine freie Diffusion von kleineren Molekülen. Größere Moleküle müssen über einen aktiven und gerichteten Transport zu ihrem Bestimmungsort gelangen. In Säugern findet man in somatischen Zellen zwischen 3000 und 4000 Porenkomplexe pro Zellkern. Die Lamina bildet eine fibrilläre Schicht unterhalb der inneren Kernmembran und ist über die Interaktion mit integralen Membranproteinen mit dieser verbunden.

### **II. 2. Die Lamine**

Die Hauptstrukturelemente der Lamina sind die Lamine. Diese besitzen eine molekulare Masse von 60-80 kDa und gehören zur Familie der Typ V Intermediärfilamente (McKeon et al., 1986; Krohne et al., 1987). Sie bilden ein fibrilläres Netzwerk, welches sich unterhalb der inneren Kernmembran zwischen den einzelnen Kernporenkomplexen erstreckt. Durch hydrophobe Wechselwirkungen an den Porenkomplexen erfolgt eine feste Assoziation die weiterhin durch die Interaktion mit integralen Membranproteinen verstärkt wird. Ein kleiner Teil der Lamine ist nicht mit der Kernhülle verbunden sondern befindet sich innerhalb des Nukleus (Liu et al., 2000). Durch ihre Fähigkeit mit Chromatin zu assoziieren kommt den Laminen nicht nur die Aufgabe der strukturellen Stabilisierung der Kernhülle zu, sondern sie scheinen auch an einer Reihe von nukleären Prozessen beteiligt zu sein. Unter anderem wird ihnen eine Rolle bei der postmitotischen Reorganisation des Nukleus, der Chromatindekondensation und -organisation, sowie der DNA-Replikation zugesprochen. Weiterhin gibt es Hinweise, dass Lamine auch an apoptotischen Abläufen beteiligt sind (Goldman et al., 2002).

## II. 2. 1. Molekulare Struktur der Lamine

Der Aufbau der Lamine lässt sich strukturell und funktionell in eine kurze nicht helikale aminoternale Kopfdomäne, eine  $\alpha$ -helikale Stabdomäne und einen langen carboxy-terminalen Schwanz einteilen (Abb. II.2).



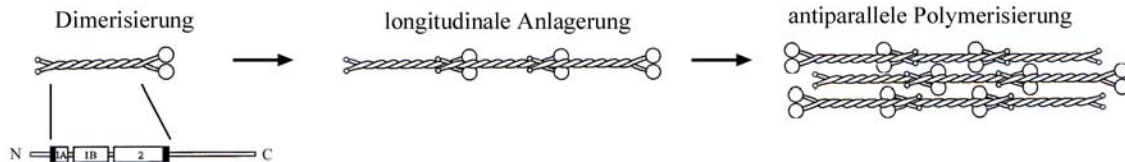
**Abb. II.2: Schematischer Aufbau eines Lamins**

Kästen:  $\alpha$ -Helices; NLS: Kernlokalisations-Signal; CxxM: Membranbindungsstelle; P: Stelle für mitotische Phosphorylierung; N: Aminoterminus; C: Carboxyterminus (nach Krohne, 1998; Stuurman et al., 1998); Helix 2A und 2B zusammengefasst

Die Stabdomäne besitzt eine Reihe von Heptadwiederholungen, welche an der Bildung von coiled-coil Strukturen beteiligt, und daher charakteristisch für  $\alpha$ -Helix-Proteine sind (McKeon 1987; Stuurman et al., 1998). Insgesamt 4  $\alpha$ -Helices (1A, 1B, 2A, 2B) werden durch drei hoch konservierte, nicht helikale Linkerregionen (L1, L2, L3) getrennt. Aufgrund dieser Helices wird die Dimerisierung der Lamine gewährleistet. Die Stabdomäne wird auf beiden Seiten von Phosphorylierungsstellen flankiert, die während der Mitose von den p34/cdc2 Kinasen phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung resultiert in der Depolymerisation der Lamine und scheint damit den Zusammenbruch der Kernhülle einzuleiten (Gerace und Bloble, 1980; Newport und Spann, 1987). Der carboxyterminale Schwanz besitzt ebenfalls zwei wichtige Regionen. Zum einen das Kern-Lokalisations-Signal (NLS) und zum anderen das CxxM (C: Cystein; x: variable Aminosäure (AS), M: Methionin)-Motiv am C terminalen Ende des Proteins. Das CxxM Motiv ist für die Interaktion der Lamine mit der inneren Kernmembran essentiell, reicht aber nicht aus um die Lamine dort dauerhaft zu halten (Nigg 1992; Hofemeister et al., 2000 Maske et al 2003).

Direkt nach der Translation beginnen sich die Lamine im Cytoplasma an ihren Helices parallel aneinanderzulagern und bilden dabei eine Dimer-Doppelwendel aus. Der lange carboxyterminale Schwanz besitzt dabei jeweils eine globuläre Form (Aebi et al., 1986; Krohne, 1998) (Abb. II.3). Nach dem Transport in den Nukleus erfolgt in einem zweiten Schritt eine longitudinale Anlagerung der Kopf- und Schwanzdomänen („head-to tail“) der Dimere. Hierbei scheinen die ersten Aminosäuren der Helix 1A und die letzten Aminosäuren der Helix 2B einschließlich der folgenden 10 Aminosäuren eine wichtige Rollen zu spielen,

denn zum einen sind sie hoch konserviert und zum anderen verhindern Mutationen in diesem Bereich die Laminpolymerisation, aber nicht die Dimerisierung (Stuurman et al., 1998; Heald and McKeon 1990; Übersicht Gruenbaum et al., 2003). Unterhalb der inneren Kernmembran kommt es anschließend zu einer, wahrscheinlich antiparallelen Aneinanderlagerung der Protofilamente und es bildet sich eine fibrilläre Schicht die schließlich als Lamina bezeichnet wird.



**Abb. II.3: Schematische Darstellung der Laminpolymerisation**  
(modifiziert nach Stuurman et al., 1998)

Aufgrund ihrer strukturellen und biochemischen Eigenschaften, sowie ihres Verhaltens während der Mitose können die Lamine in A-Typ und B-Typ Lamine unterteilt werden.

Die B-Typ Lamine sind während der Entwicklung in allen Stadien und allen Zelltypen zu finden. Sie besitzen einen sauren isoelektrischen Punkt und interagieren über das CxxM-Motiv mit der inneren Kernmembran. Diese Interaktion bleibt auch während der Mitose bestehen. Das CxxM Motiv ist in allen B-Typ Laminen zu finden. Das Cystein wird kurz nach der Translation im Cytoplasma farnesyliert, worauf die letzten drei Aminosäuren abgespalten werden. Anschließend folgt eine Methylierung des Cysteins (Moir et al., 1995). Der durch diese Modifikation sehr hydrophobe Carboxyterminus interagiert schließlich mit der Kernmembran. Im Gegensatz dazu folgt bei A-Typ Laminen, die ein CxxM-Motiv besitzen, noch eine weitere Modifikation. Die letzten 18 Aminosäuren werden proteolytisch abgespalten, was zu einem Verlust des letzten Cysteins und damit zu einem Verlust der Membraninteraktion führt. Dies mag ein Grund sein warum die A-Typ Lamine während der Mitose nicht an den Membranen sondern als lösliche Oligomere in den Zellen zu finden sind. Natürlich gilt dies auch für die A-Typ Lamine, die von vornherein kein CxxM Motiv besitzen wie zum Beispiel das Lamin C oder das Lamin C2. Ein weiterer Unterschied zu den B-Typ Laminen ist der neutrale isoelektrische Punkt und die Tatsache, dass A-Typ Lamine erst in differenzierten Zellen exprimiert werden.

Im Laufe der Evolution hat die Anzahl der Lamine zugenommen. Während in Pflanzen und Hefen noch keine Lamine vorkommen, findet man bei *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) schon ein Gen (*lmn-1*) für ein B-Typ Lamin (Liu et al., 2000). In *Drosophila melanogaster* existieren immerhin schon 2 Gene, die sowohl für ein A-Typ Lamin (Lamin C) als auch für



ein B-Typ Lamin (Dm0) kodieren. Und bei Vertebraten sind letztlich drei Lamin Gene (LMNA, LMNB1, LMNB2) bekannt, die jedoch durch alternatives Splicen mehrere Isoformen hervorbringen. Bei Säugern kodiert das LMNA für 4 verschiedene Lamine (A, C, AΔ10, C2), das LMNB2 für 2 Isoformen (B2 und B3) und das LMNB1 nur für das Lamin B1. Während die meisten Isoformen in somatischen Zellen zu finden sind, treten das Lamin B3 und das Lamin C2 nur in der Keimbahn auf (Furukawa und Hotta, 1993; Furukawa et al., 1994). Der *Xenopus* und der Zebrafisch besitzen sogar ein eigenes Gen (LB3) welches für das oocytenspezifische Lamin LIII kodiert. Das Lamin C2 weist neben der Keimbahn-spezifischen Expression noch eine weitere Besonderheit auf. Ähnlich wie das Lamin C besitzt es kein CxxM-Motiv am Carboxyterminus dafür aber ein spezifisches Myristylierungssignal am Aminoterminus, welches ebenfalls eine Interaktion des Lamins mit der inneren Kernmembran bewirkt. Das Myristylierungssignal besteht aus 6 Aminosäuren (GNAEGR) welche die gesamte aminoternale Domäne sowie einen Teil der Stabdomäne substituieren (Alsheimer et al., 2000).

### II. 2. 2. Funktion der Lamine

Wie Anfangs schon kurz erwähnt, ist die Lamina in eine Reihe verschiedenster Aufgaben involviert. Durch ihren netzartigen Aufbau verleiht sie dem Zellkern seine Struktur und trägt entscheidend zu seiner Stabilität bei. Wird der Lamingehalt einer Zelle reduziert, äußert sich das nicht nur in einer erhöhten Brüchigkeit der Kernmembran sondern auch in einer unnormalen Aggregation von Kernporenkomplexen und einem vorzeitigen Zelltod (Lenz Böhme et al., 1997; Liu et al., 2000, Sullivan et al., 1999; Wagner et al., 2004).

Aber auch während der Mitose kommt den Laminen eine wichtige Rolle zu. Sowohl beim Zusammenbruch als auch beim Wiederaufbau der Kernhülle scheinen Lamine essentiell zu sein. Der Zusammenbruch der Kernhülle wird durch die Phosphorylierung einer Reihe von Proteinen herbeigeführt. Dazu gehören neben Kernporenkomplexproteinen und Lamin-bindenden Proteinen (LAP1; LBR) auch die Lamine selbst (Favreau et al., 1996; Qian et al., 1998; Übersicht: Gruenbaum et al., 2003). Durch die Phosphorylierung der Lamine kommt es zur Depolymerisation des Lamin-Netzwerkes, was in einer Auflösung der Lamina und schließlich der Kernhülle resultiert (Gerace und Bloble, 1980; Newport und Spann, 1987). Mutationen in den serinreichen Phosphorylierungsregionen, welche die Stabdomäne der Lamine flankieren, verhindern die Depolymerisation der Lamina und führen somit zum Anhalten des Zellzyklus (Heald und McKeon, 1990). Obwohl bei der Neubildung der

Kernhülle nur ein kleiner Teil der Lamina beteiligt ist, und alle anderen Laminae erst später in den Kern transportiert werden, scheint dieser kleine Teil äußerst wichtig zu sein. Dies wird deutlich wenn man Versuche betrachtet, bei denen durch Immunodepletion der Lamina sowohl die Bildung der Kernhülle als auch die Bildung der Porenkomplexe verhindert wurden (Burke and Gerace, 1986; Dabauvalle et al., 1991). Zusätzlich spielen die Laminae eine Rolle bei der postmitotischen Reorganisation des Kerns.

Die korrekte Anordnung der Lamina scheint auch die Replikation von DNA zu beeinflussen, dabei ist die Frage nach dem „Wie genau“ aber noch nicht beantwortet (Gruenbaum 2000; Goldman et al., 2002). Experimente, bei denen das *Xenopus* Lamin LIII durch Immunodepletion weitgehend entfernt wurden, zeigten, dass zwar kleine brüchige Kerne gebildet wurden aber die DNA nicht repliziert werden konnte (Newport et al., 1990). Im Gegenzug konnte durch Zugabe von aufgereinigtem Lamin LIII zu depletiertem Eiextrakt von *Xenopus* die Fähigkeit zur Replikation wiederhergestellt werden (Goldberg et al., 1995). Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei der Mikroinjektion von Lamin A bzw. LIII Mutanten ohne Kopfdomäne gefunden (Spann et al., 1997). Ein weiterer Hinweis für eine Rolle bei der Replikation ist die Tatsache, dass in Lamin-Aggregaten zwei Faktoren (PCNA und RFC) identifiziert wurden, die bei der Elongation der DNA-Replikation benötigt werden.

Ein weiterer nukleärer Prozess, an dem Laminae beteiligt sind, ist die Transkription. Strukturelle Analyse bei *Drosophila* haben gezeigt, dass inaktive DNA wie Centromere, Telomere, Heterochromatin aber auch inaktive X Chromosomen bei Säugern vorwiegend mit der Lamina assoziiert vorliegen (Marshall und Sedat, 1999; Belmont et al., 1986; Übersicht: Gruenbaum et al., 2003). Ebenso konnten eine Reihe von Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die sich hauptsächlich in der Kernperipherie befinden. So konnten zum Beispiel die Transkriptionsfaktoren Oct-1 bzw. Retinoblastoma Protein, welche die Transkription spezifischer Proteine reprimieren, mit Lamin B bzw. Lamin A/C colokalisiert werden (Übersicht: Gruenbaum et al., 2003). Die Transkriptionsfaktoren scheinen an der Kernperipherie gehemmt und erst durch den Transport in das Kerninnere aktiviert zu werden. Wiederum andere Untersuchungen haben gezeigt, dass bei der Expression einer dominant negativen Lamin A Mutante mit der fehlerhaften Laminaorganisation auch die Aktivität der RNA Polymerase II abhängigen Transkription gehemmt wird. Andere Aktivitäten, wie die von der Polymerase I oder III werden jedoch nicht beeinflusst (Spann et al., 2002).

Die Anzeichen für eine bevorstehende Apoptose sind stark kondensiertes Chromatin, blasenförmig Membranen, Auftreten von apoptotischen Körpern und Fragmentierung der DNA. Die Fragmentierung von DNA, integralen Membranproteinen (LAP2 $\beta$ , LAP2 $\alpha$ )

Kernmembranproteinen (NUP153, POM121) sowie von Laminen erfolgt durch spezifische Kaspasen (Buendia et al 1999; Gotzman 2000; Kihlmark et al., 2001; Übersicht: Gruenbaum et al., 2003). Dabei sind die Lamine bei den ersten Proteinen, die von den Kaspasen angegriffen werden. Der Zerfall der Lamina scheint dabei die Ablösung des Chromatins von der Kernhülle zu bewirken. Anhand von Laminmutanten, die nicht mehr von Kaspasen geschnitten werden konnten, konnte gezeigt werden, dass sich die Apoptose für mehrere Stunden verzögert (Rao et al., 1996). Obwohl sich die Apoptose durch solche Mutanten nicht verhindern lässt, zeigen diese recht deutlich, dass die Degradation der Lamine ein wichtiger Schritt beim programmierten Zelltod zu sein scheint.

Wie wichtig die Funktion der Lamine ist, wird besonders deutlich wenn man sich Fälle betrachtet bei denen diese Funktionen beeinträchtigt sind. Eine Reihe von Erbkrankheiten resultieren aus Mutationen in Lamingenen. (siehe Kapitel II.4.1)

### II. 3. Integrale Membranproteine der inneren Kernmembran

Alle integralen Membranproteine der inneren Kernmembran zeichnen sich durch mindestens eine Transmembrandomäne aus, über welche das Protein in der inneren Kernmembran verankert wird. Fast alle dieser Proteine besitzen eine lange aminoterminal Domäne die ins Nukleoplasma reicht und dort mit einer Vielzahl von nukleären Proteinen sowie Chromatin und der Lamina interagieren können. Die Interaktion mit diesen Strukturen beeinflussen die Funktion und Organisation der Kernhülle und des Chromatins. Mittlerweile sind bei Invertebraten und Vertebraten eine ganze Reihe von integralen Membranproteinen identifiziert worden (Übersicht: Dechat et al., 2000a; Georgatos et al., 2001; Cohen et al., 2001; Gruenbaum et al., 2003). Mit zunehmender evolutiver Entwicklung der Organismen nimmt auch die Komplexität der Kernhülle zu. Wie schon für die Lamine beschrieben, nimmt nicht nur die Anzahl der Gene sondern auch die Anzahl der daraus resultierenden Isoformen zu. Ähnliches gilt auch für die integralen Membranproteine. Auch hier wird die Komplexität durch die Expression entwicklungs- oder gewebespezifischer Splicevarianten erhöht.

Einige der integralen Membranproteine weisen in ihrer aminoterminalen Region eine hoch konservierte LEM-Domäne auf. Die LEM Domäne ist ungefähr 40 Aminosäuren (AS) lang und zeichnet sich durch eine kurze N-terminale  $\alpha$ -Helix gefolgt von 2 parallelen  $\alpha$ -Helices, welche durch einen langen Loop getrennt werden, aus (Lin et al., 2000; Cai et al., 2001). Diese Domäne erhielt ihren Namen von den drei Proteinen, LAP2, Emerin und MAN1, in denen sie zuerst entdeckt wurde (Lin et al., 2000), aber auch andere Proteine wie das Lem-3

(Lee et al 2000) oder das Otefin in *Drosophila melanogaster* (Goldberg et al., 1998) besitzen dieses Motiv.

Die LEM-Domäne ist wichtig für die Interaktion des Proteins mit Chromatin. Dabei erfolgt die Interaktion nicht direkt sondern wird über ein kleines ebenfalls hoch konserviertes Protein BAF (**barrier to autointegration factor**) vermittelt. Die Interaktion mit BAF konnte zwar bis jetzt nur für LAP2 $\beta$ , Emerin und Man1 (Liu et al., 2003) direkt nachgewiesen werden, aber man geht davon aus, dass dieses Protein für die Interaktion der LEM Domäne mit der DNA essentiell ist. Das BAF wurde ursprünglich in Viren identifiziert, in denen es eine Rekombination der reverse transkribierten viralen DNA verhindert, bevor diese ins Wirtsgenom integriert wird (Lee and Craigie, 1998; Zheng et al., 2000). Das BAF besitzt eine Helix-Hairpin-Helix Struktur (Umland et al., 2000) ist ungefähr 89 AS groß und ist innerhalb der verschiedenen Spezies hoch konserviert. Aufgrund seiner Fähigkeit unspezifisch doppelsträngige DNA zu verbinden, scheint es nicht nur eine wichtige Rolle bei der Chromatinorganisation zu spielen, sondern auch wichtige Funktionen während der Mitose und der Interphase innezuhaben (Furukawa et al., 2003).

### **II. 3. 1. Lamina assoziierte Polypeptide 1 und 2 (LAP1 bzw. LAP2)**

#### **II. 3. 1. 1. LAP1**

Eines der integralen Membranproteine ist das Lamina assoziierte Polypeptid 1 (LAP1). Es gehört zum Typ II der integralen Membranproteine und besitzen neben dem nukleoplasmatischen Aminoterminus eine Transmembrandomäne und einen kurzen, Carboxyterminus, der im perinukleären Raum lokalisiert ist.

Die drei bekannten Formen LAP1A (~75 kDa) , LAP1B (~68 kDa) und LAP1C (~55 kDa) scheinen durch alternatives Splicen aus einem LAP1 Gen hervorzugehen (Senior und Gerace 1988; Foisner und Gerace 1993; Martin et al., 1995). Im Gegensatz zur LAP1C Isoform scheinen die Isoformen LAP1A und LAP1B jeweils ein 27 Aminosäure langes coiled-coil  $\alpha$ -Helix Motiv zu beinhalten mit dem eine LAP1-Dimerisierung möglich wäre (Martin et al., 1995).

Die nukleoplasmatische Domäne aller drei Isoformen scheint sowohl mit der calcium-abhängigen Kinase cdc2 als auch mit dem Lamin A und dem Lamin B zu interagieren. Dabei zeigen die einzelnen Isoformen jedoch eine unterschiedliche Affinität zu den Laminen. LAP1 A und B besitzen im Gegensatz zu LAP1C eine wesentlich höhere Affinität zu Lamin A/C.

Es gibt Hinweise, dass die Expression der drei LAP1 Isoformen entwicklungspezifisch reguliert wird. Während die kleinste LAP1C Isoform in allen Entwicklungsstadien vorzukommen scheint, findet man eine starke Expression von LAP1A und LAP1B nur in differenzierten Zellen. Da die Expression von LAP1A und LAP1B vergleichbar mit der Expression von Lamin A/C ist, zu denen sie ohnehin eine hohe Affinität aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass die Interaktion dieser Proteine eine wichtige Rolle für die Stabilität von nukleären Strukturen spielt.

Die LAP1 Proteine, die in einer geordneten Struktur an der inneren Kernmembran zu finden sind, bleiben auch während der Mitose mit den Membranvesikeln assoziiert (Foisner und Gerace, 1993). Der in der Mitose auftretende Phosphorylierung der LAP1 Proteine konnte noch keine genaue Funktion zugeordnet werden, beeinflusst aber offensichtlich die Assoziation mit den Laminen.

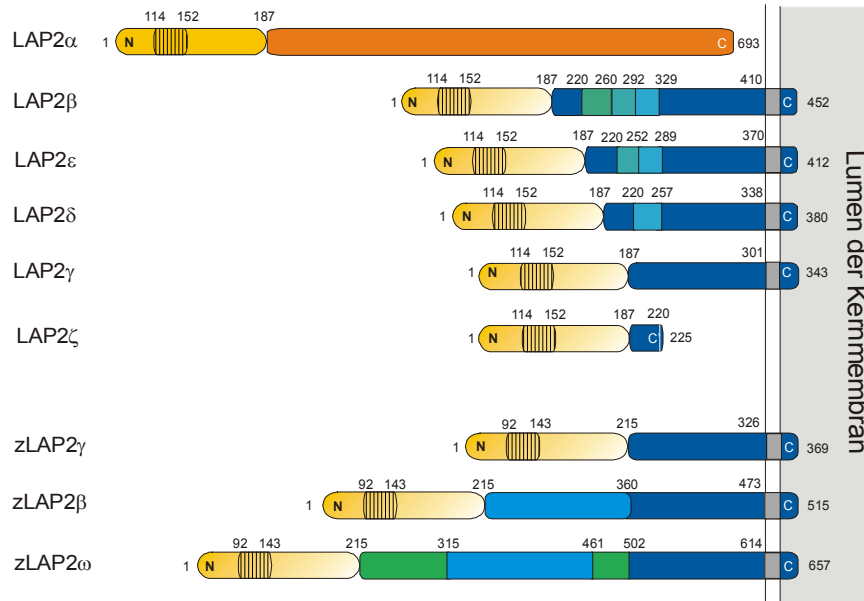
Das LAP1 konnte bis jetzt nur in Vertebraten gefunden werden, scheint aber, im Gegensatz zu den Lamina assoziierten Polypeptiden 2 (LAP2), weder in Amphibien noch in Fischen vorzukommen.

### II. 3. 1. 2. LAP2

Das Lamina assoziierte Polypeptid 2 (LAP2) ist wesentlich besser charakterisiert worden als das LAP1 und gehört wohl mit zu den am besten untersuchten Proteinen der inneren Kernmembran. Das Protein wurde erstmals anhand von monoklonalen Antikörpern, die gegen Kernmatrixprotein der Rattenleber gerichtet waren, identifiziert (Foisner und Gerace 1993). Da sich das Protein als äußerst TritonX100- und salzresistent erwies und nach der Extraktion in derselben Fraktion wie die Lamine zu finden war, erhielt es seinen Namen als Lamina assoziiertes Protein.

Die Charakterisierung der LAP2 Gene von Maus und Mensch zeigten, dass nicht nur ein LAP2 Protein durch das Gen kodiert wird, sondern dass durch alternatives Splicen eine ganze Reihe von Isoformen exprimiert werden. Bei der Maus wurden bis zu sieben Isoformen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\zeta$ ) (Berger et al., 1996) identifiziert, und obwohl beim Menschen erst drei Isoformen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) näher charakterisiert wurden (Harris et al., 1994, 1995), ist es wohl nicht auszuschließen, dass auch hier noch weitere Isoformen existieren. Die LAP2 Proteine sind in allen Vertebraten zu finden. Auch bei *Xenopus* und Zebrafisch konnten jeweils drei Isoformen gefunden werden ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\omega$ ) (Gant et al., 1999; Lang et al., 1999; Schoft et al., 2003).

Der strukturelle Aufbau der LAP2 Proteine ist in allen Spezies und fast allen Isoformen ähnlich (Abb. II.4).



**Abb. II.4: Struktureller Aufbau der LAP2 Isoformen der Säuger und des Zebrafisch.**  
 In Anlehnung an Dechat et al., 2000a und Schoft et al., 2003; gelb: aminoternale Domäne; dunkelblau: carboxyterminale Domäne; grün-blau: Einschübe der Isoformen; gestreift: LEM Domäne; grau: Transmembrandomäne; rot:  $\alpha$  spezifische Region; grün:  $\omega$ -spezifische Region

Das Protein gliedert sich in eine hoch konservierte aminoternale Domäne und eine carboxyterminale Domäne. Am Ende der carboxyterminalen Domäne befindet sich, mit Ausnahmen der  $\alpha$ - und  $\zeta$ -Isoform der Säuger, eine Transmembrandomäne, die das Protein in der Kernlamina verankert. Nur ein kleiner Rest ragt in den perinukleären Raum, während der Großteil des Proteins im Nukleoplasma zu finden ist. Hier interagiert das LAP2 Protein mit einer Reihe von Kernproteinen.

Die aminoternalen Domänen aller Isoformen sind innerhalb einer Spezies identisch und weiterhin zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert. In ihr befinden sich zwei globuläre Domänen, die mit Chromatin interagieren können. Eine dieser Domänen ist das LEM-Motiv, welches zuvor schon kurz erklärt wurde, und die zweite die „LEM-like“ Domäne. Die „LEM-like“ Domäne zeigt strukturell eine gewisse Homologie zur LEM-Domäne, kann aber im Unterschied dazu direkt mit Chromatin assoziieren (Furukawa et al., 1998; Cai et al., 2001). Die Assoziation der LEM Domäne mit Chromatin erfolgt dagegen über BAF. Auch die carboxyterminale Domäne weist eine hoch konservierte Region auf, die in allen Isoformen, außer  $\alpha$  und  $\zeta$ , zu finden ist. Neben der Transmembrandomäne befindet sich hier eine Lamin-Bindungsdomäne, mit der nicht nur eine Interaktion zur Lamina hergestellt wird, sondern auch der Transport des Proteins zur inneren Kernmembran gewährleistet ist (Furukawa et al., 1995; Lang und Krohne 2002). Untersuchungen haben gezeigt, dass die einzelnen Isoformen entweder in unterschiedlichen Entwicklungsstadien oder in

verschiedenen Geweben exprimiert werden (Alzheimer et al., 1998; Del Pino et al., 2002; Schoft et al., 2003). Das LAP2 $\omega$  in *Xenopus* und Zebrafisch ist nur in der frühen Embryonalentwicklung zu finden und wird in den späteren Stadien zunehmend von der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Isoform verdrängt. Diese beiden Isoformen werden in allen differenzierten Zellen in gleichen Maßen exprimiert. Das LAP2 $\alpha$  ist dagegen nur in ausdifferenzierten Säuger-Zellen zu finden.

Das LAP2 $\beta$  gehört mit zu den am besten untersuchten Isoformen. Die Interaktion mit der Lamina, die sowohl über die Bindung mit A und B-Typ Laminen erfolgt, scheint Einfluss auf das Kernwachstum am Ende der Mitose zu haben (Yang et al., 1997). Weiterhin gibt es Hinweise, dass es eventuell auch am Zusammenbruch der Mitose beteiligt ist, da eine Assoziation mit dem HA95 Protein in der Interphase nachgewiesen wurde. Das HA95 ist ein Protein, das sowohl eine regulierende Rolle beim Zerfall der Kernmembran als auch bei der Chromatinkondensation spielt (Martins et al., 2000).

Aufgrund einer zusätzlichen Chromatinbindungsdomäne in der  $\beta$  spezifischen Region (Furukawa et al., 1995) und der Fähigkeit allein oder mit seinem Bindungspartner GLC (Germ-Cell-Less) die Transkription reprimieren zu können (Nihil et al., 2001), scheint das LAP2 $\beta$  nicht nur ein Verbindungsglied zwischen Chromatin und Kernmembran zu sein sondern auch regulatorische Funktionen bei der Chromatinorganisation zu besitzen.

Ein weitere sehr gut charakterisierte Isoform der LAP2 Proteine ist die  $\alpha$ -Isoform die bis jetzt nur in Säugern identifiziert wurde. Sie unterscheidet sich von den übrigen Isoformen durch seine spezifische carboxyterminale Domäne. Das Fehlen der Transmembrandomäne in dieser Region führt zu einer gleichmäßigen Verteilung des Proteins im Kern, wobei der Nukleolus ausgespart wird (Dechat et al., 1998). Das LAP2 $\alpha$  besitzt weiterhin eine Lamin-Bindungsdomäne, die spezifisch mit A-Typ Laminen interagiert (Dechat et al., 2000b) und eine Kern/Chromatin-Domäne, welche für die frühe Bindung an Chromatin nach der Mitose notwendig ist (Vlcek et al., 1999).

Die genaue Funktion des LAP2 $\alpha$  ist noch nicht geklärt, jedoch scheint es sowohl beim Kernassembly, speziellen Abläufen im Zellzyklus sowie in der Apoptose (bei Überexpression) eine Rolle zu spielen (Vlcek et al., 2002).

### II. 3. 2. Emerin

Das 35 kDa große Emerin kann in drei unterschiedliche Domänen eingeteilt werden. Durch die carboxyterminale Transmembrandomäne ist das Protein in der inneren Kernmembran

verankert. Es besitzt eine serinreiche aminoternale Domäne, die in den nukleoplasmatischen Raum ragt und eine sehr kurze carboxyterminale Domäne die im perinukleären Raum zu finden ist (Fairley et al., 1999; Lee et al., 2001). In der aminoternalen Domäne befindet sich das LEM Motiv über welches Emerin, vermittelt durch BAF, mit Chromatin interagieren kann. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass Emerin eine direkte Bindung mit Laminen (Lamin B1; Lamin A/C) eingeht (Fairley et al., 1999; Wilson et al., 2001). Die Bindung an A-Typ Lamine scheint dabei Einfluss auf die Verankerung von Emerin im Kern zu besitzen, denn „knock-out“ Mäuse für Lamin A/C zeigten eine Fehllokalisation des Emerins im endoplasmatischen Retikulum (Sullivan et al., 1999). In den letzten Jahren sind weitere Bindungspartner des Emerins identifiziert worden. Darunter sind Transkriptionsrepressoren wie Germ-Cell-Less (GCL) (Haraguchi et al., 2001; Holaska et al., 2003) und Btf (Bengtsson and Wilson, 2004), mRNA Splicing Faktoren wie YT521-B (Wilkinson et al., 2003) sowie nukleäres Myosin I und F Actin (Bengtsson and Wilson 2004). Auch eine Interaktion mit dem Nesprin 1 $\alpha$ , einem weiteren integralen Membranprotein, konnte nachgewiesen werden (Mislow et al., 2002a). Seine medizinische Relevanz erlangte das Protein durch die Entdeckung der Emrin Dryfuss-Muskeldystrophie, die durch Mutation im Emerin-Gen ausgelöst wird (siehe Kapitel II.4.1).

### II. 3. 3. MAN 1

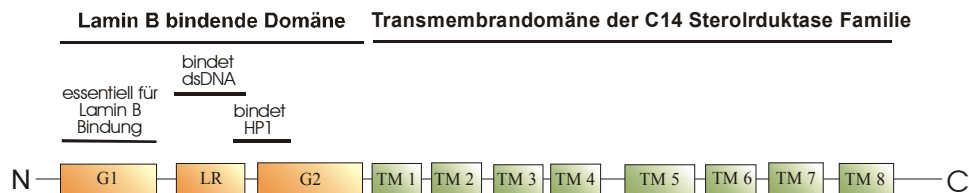
Die Untersuchung von menschlichen Antikörpern eines an einer Autoimmunkrankheit erkrankten Patienten ermöglichte erstmals die Charakterisierung des MAN 1 (Lin et al., 2000). Das sehr große Protein (82 kDa) besteht aus einer aminoternalen Domäne, in der vergleichbar mit dem Emerin und LAP2, die LEM Domäne lokalisiert ist, zwei putativen Transmembrandomänen und einem carboxyterminalen Schwanz. Anhand von Extraktionsstudien und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass das MAN1 zur Gruppe der integralen Membranproteine gehört und ausschließlich in der inneren Kernmembran zu finden ist. Hierbei scheint die erste Transmembrandomäne für die Lokalisation im Kern auszureichen (Wu et al., 2002). Da die Mobilität des MAN1 in der inneren Kernmembran im Vergleich zur Mobilität im ER stark reduziert ist, wird vermutet, dass das MAN 1 dort mit weiteren Bindungspartnern interagiert.



### II. 3. 4. Der Lamin B Rezeptor LBR

Ein weiteres sehr gut charakterisiertes Protein der inneren Kernmembran ist der 1988 erstmals beschriebene Lamin B Rezeptor (Worman et al., 1988). Dieses Protein wurde bis jetzt in allen untersuchten Vertebraten sowie in *Drosophila melanogaster* gefunden, scheint aber sowohl in *Caenorhabditis elegans* als auch in *Saccharomyces cerevisiae* nicht vorzukommen (Cohen et al., 2001).

Der LBR ist mit seinen 70,4 kDa ein recht großes Protein, das sowohl strukturell als auch funktionell in zwei Domänen eingeteilt werden kann. Der aminoternale Bereich des Proteins wird durch die ersten 4 Exons des LBR-Gens kodiert (Schuler et al., 1994) und besitzt einen recht hydrophilen, basischen Charakter (Silve et al., 1998).



**Abb. II.5: Struktureller Aufbau des LBRs**

G1, G2: globuläre Domänen, LR: nicht globuläre Linkerregion, TM: Transmembrandomänen, N: Aminoterminus, C: Carboxyterminus

Anhand von strukturellen Analysen konnte gezeigt werden, dass sich die aminoternale Region in drei Subdomänen unterteilen lässt. Hierbei handelt es sich um zwei globuläre Domänen (Abb. II.5; G1, G2), die durch eine nicht globuläre Linkerregion (Abb. II.5; LR) voneinander getrennt werden. Der aminoternale Bereich befindet sich im Nukleoplasma und interagiert dort mit einer Vielzahl von Bindungspartnern.

Der carboxyterminale Teil des Proteins erweist sich dagegen als äußerst hydrophob und zeichnet sich durch 8 Transmembrandomänen aus, mit denen das Protein in der inneren Kernmembran verankert wird (Worman et al., 1990; Silve et al., 1998, Georgatos et al., 2001). Der recht kurze carboxyterminale Schwanz ragt wie die aminoternalen Domänen ins Nukleoplasma.

Im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, gelangt der LBR über freie Diffusion zur inneren Kernmembran. Dabei scheinen zwei voneinander unabhängige Sequenzmotive, die einerseits im aminoternalen Bereich und andererseits in der ersten Transmembrandomäne lokalisiert sind, eine signalgebende Rolle zu spielen (Soullam and Worman, 1993; Gajewski und Krohne, 1999). Ist der LBR in der inneren Kernmembran angekommen verliert er seine

Mobilität (Stuurman et al., 1998), indem er über seine nukleoplasmatische Domäne mit anderen Proteinen des Zellkerns interagiert.

Die zuerst entdeckte Interaktion mit dem Lamin B der Lamina ist wohl verantwortlich für die Namensgebung des Proteins. Untersuchungen zeigten, dass die gesamte aminoterminal Domäne an der Laminbindung beteiligt ist, aber nur die erste globuläre Domäne (1-60 AS) für diese Bindung essentiell ist (Ye et al., 1997). Für die nicht globuläre Linkerregion konnte in vitro eine Assoziation mit Chromatin nachgewiesen werden, während der vordere Teil der zweiten globulären Domäne mit dem Heterochromatin Protein HP1 interagiert (Ye und Worman 1994, 1996; Ye et al., 1997). Dabei findet die Bindung des LBRs mit dem HP1 wahrscheinlich indirekt über ein Tetramer aus Histonen H3 und H4 statt (Polioudaki et al., 2001). Weiterhin wurde eine Interaktion mit dem Protein HA95 nachgewiesen, welches ebenfalls mit Lamin B, LAP2, A-Typ Laminen (Georgatos et al., 2001) dem integralen Membranprotein p18, dem Polypeptidkomplex p32/34, sowie spezifischen LBR Kinasen (Simons und Georgatos 1992, 1994) assoziiert.

Durch Dephosphorylierung einiger arginin-, serinreicher Motive der aminoterminalen Region während der Mitose verliert der LBR seine Affinität zu den B-Typ Laminen, dem Chromatin sowie dem Heterochromatinprotein HP1 (Courvalin et al., 1992, Stuurman et al., 1998), was Auswirkungen auf die Kernstabilität zu haben scheint. Gleichzeitig bleibt der LBR jedoch mit den Membranvesikeln assoziiert und ist, da er zu Beginn der Kernhüllenrebildung mit den Chromosomen akkumuliert, am Transport der Membranen zur Chromatinoberfläche beteiligt. Der LBR scheint eines der ersten Proteine zu sein, welches durch die Bindung an Chromatin zur Neubildung des Kerns beiträgt. Neben der Rolle, die der LBR in der Kerndissoziation bzw. Kernassoziation zukommt, deuten die Interaktionen mit Chromatin oder dem Protein HP1 auch auf Funktionen bei der Chromatinorganisation hin.

Während dem aminoterminalen Teil des Proteins eine Reihe von Interaktionspartnern, und damit verbunden auch Funktionen, zugesprochen werden können, fand man bei der carboxyterminalen Domäne des menschlichen LBR eine große strukturelle Ähnlichkeit mit der C14-Sterolreduktase (Erg24) von *Saccharomyces crevisiae* (40%) (Smith and Blobel 1994). Tatsächlich konnte in Erg 24 Defizit-Stämmen die Expression des menschlichen LBR diesen Defekt kompensieren (Silve et al., 1998). Inwieweit der carboxyterminale Teil jedoch die Aufgabe einer Sterolreduktase in der Zelle übernimmt ist noch nicht geklärt, da in Versuchen mit dem LBR von *Drosophila melanogaster* (Wagner et al., 2004), *Xenopus laevis* oder dem Zebrafisch (*Danio rerio*) (Glöckner, 2004) und dem Hühnchen LBR (Smith and Blobel, 1994) keine Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte. Vielleicht fungiert der

carboxyterminale Teil auch nur als Rezeptor für Sterolmoleküle, welche für den Zellzyklus spezifische Prozesse notwendig sind (Silve et al., 1998).

Strukturelle Analysen des LBR Gens ergaben ein außergewöhnlich großes Intron zwischen Exon 4 und Exon 5. Da die Exons 1-4 den aminoternale Teil des LBRs beinhalten und die restlichen Exons (5- 13) für den carboxyterminale Teil kodiert (Schuler et al., 1994), und beide Domänen Ähnlichkeiten mit funktionell unterschiedlichen Proteinen aufweisen, besteht die Annahme, dass der LBR wohl aus einer Rekombination zweier Gene entstanden ist.

Zwei bekannte Erbkrankheiten können auf Mutationen im LBR Gen zurückgeführt werden. Zum einen die autosomal rezessive Stoffwechselkrankheit Greenberg Skelett Dysplasie (Hydrops-ectopic calcification-„moth-eaten“ (HEM)) und zum anderen die Pelger-Huët-Anomalie (siehe Kapitel II.4.2).

### **II. 3. 5. Weitere integrale und periphere Membranproteine der inneren Kernmembran**

**Nesprin1 und 2**, auch bezeichnet als Myne-1, sind Typ 2 integrale Membranproteine die neben einer Reihe von Spektrinwiederholungen eine putative Transmembrandomäne aufweisen (Mislow et al., 2002a; Zhang et al., 2001). Im Gegensatz zu den bis jetzt bekannten Membranproteinen befindet sich die Transmembrandomäne bei den Nesprinen in der aminoterminalen Region. Nesprin 1 wird besonders in Muskelzellen exprimiert und zeigt dort eine hohe Affinität zu Lamin A/C und zu Emerin (Mislow et al., 2002b).

**Numrin** (nuclear rim) ist ein 29 kDa großes Protein, welches 5 putative Transmembrandomänen besitzt und als integrales Membranprotein identifiziert wurde (Rolls et al., 1999). Es weist eine geringe Mobilität in der inneren Kernmembran auf, aber Interaktionspartner konnten nicht gefunden werden.

**Unc84** (uncoordinated movement) wurde als häufig vorkommendes integrales Membranprotein in *C. elegans* identifiziert (Malone et al., 1999). Anhand von Antikörpern konnte eine Lokalisation des Proteins an der äußeren Kernperipherie nachgewiesen werden. Es scheint in der Nematodenentwicklung eine wichtige Rolle bei der Kernbewegung zu spielen. Das Fehlen von unc84 führt dabei nicht nur zu einem Verlust der Beweglichkeit der Kerne sondern auch zum Verlust der Verankerung im Cytoplasma (Malone et al., 1999; Stearns, 1997). Der carboxyterminale Teil des Proteins weist eine gewisse Homologie zu den Proteinen Sad1 (spindel architecture defective protein) von *S. pombe* und den noch nicht näher charakterisierten Proteinen SUN1 und SUN2 von Säugern auf (Raff, 1999).

**Otefin** gehört wie LAP2, Emerin und MAN1 zu den LEM Domänenproteinen (Padan et al., 1990). Es wird in *Drosophila* ubiquitär exprimiert und interagiert mit dem *Drosophila* Lamin B, Dm0, und Chromatin (Goldberg et al., 1998). Es besitzt in seiner carboxyterminalen Region ein Segment, welches eine hohe Hydrophobizität aufweist, jedoch zu kurz ist, um die innere Kernmembran zu durchdringen. Daher wird vermutet, dass das Protein eher als peripheres statt als integrales Membranprotein interagiert (Ashary-Padan et al., 1997). Das Otefin wird aufgrund seines Kernlokalisierungssignals aktiv in den Kern transportiert.

**Young Arrest (YA)** ist ein maternal kodiertes peripheres Membranprotein. Es wurde ebenfalls in *Drosophila* identifiziert und scheint dort an der Oogenese sowie der korrekten Chromosomenkondensation beteiligt zu sein. Es interagiert mit Lamin Dm0, Chromatin und dem Histon H2B. (Liu et al., 1995; Goldberg et al., 1998; Übersicht Gruenbaum et al., 2003).

**Germ-Cell-Less (GCL)** wurde ursprünglich bei *Drosophila* identifiziert und scheint unter den Metazoa sowohl strukturell als auch funktionell hoch konserviert zu sein. In *Drosophila* wird GCL am posterioren Pol der Embryonen exprimiert und scheint dort bei der Bildung von Keimzellen eine Rolle zu spielen (Jongens et al., 1992, 1994; Übersicht: Gruenbaum et al., 2003). Das GCL besitzt eine spezielle Protein-Protein-Interaktionsdomäne (BTB/POZ) die ebenfalls bei vielen anderen Aktin- und DNA-bindenden Proteinen zu finden sind. Bei Säugern sind fast alle Proteine, die eine solche Domäne besitzen, an transkriptionellen Vorgängen beteiligt. Dem GCL wurde weiterhin eine Interaktion mit dem DP-Protein nachgewiesen, welches als Bindungspartner des Transkriptionsfaktors E2F bekannt ist. Diese Interaktion scheint die Transkriptionsaktivität des E2F zu reduzieren. Wie schon zuvor erwähnt interagiert das GCL auch mit LAP2 $\beta$  (Nihil et al., 2001) oder dem Emerin (Holaska et al., 2003), was vermuten lässt, dass auch dieses Protein Einfluss auf die Transkription ausübt.

### II. 4. Genetisch bedingte Krankheiten

Wie in den vorangegangenen Kapiteln schon angedeutet, sind einige der Proteine die sowohl am strukturellen als auch am funktionellen Aufbau der Kernhülle beteiligt sind bei fehlerhafter Expression auch für einige Krankheiten verantwortlich. Da diese Erkrankungen auf genetischen Defekten beruhen werden sie vererbt. Im folgenden Kapitel sollen einige dieser Erbkrankheiten erläutert werden, deren Ursprung in Mutationen des Emerins, der Lamine und des Lamin B Rezeptors liegen.

## II. 4. 1. Genetische Erkrankungen aufgrund von Mutationen im Emerin und Lamin A Gen

Eine ganze Reihe von verschiedenen Erbkrankheiten werden durch Mutationen im LMNA Gen ausgelöst. Dabei scheint die Position, an der die Mutationen auftreten, unterschiedliche Krankheiten hervorzurufen. Mutationen, die sich im Inneren der Immunglobulin-ähnlichen Domäne, des Carboxyterminus des Lamins befinden, scheinen dessen räumliche Struktur zu verändern. Die dabei auftretenden Erkrankungen resultieren dabei alle in Muskel-erkrankungen wie Emery-Dryfuss Muskeldystrophie, "limb girdle" Muskeldystrophie oder Cardiomyopathie 1A. Befinden sich die Mutationen jedoch nur oberflächlich an der Immunglobulin-ähnlichen Domäne so treten eher Störungen des Fettstoffwechsels auf. Eine solche Form wäre die Dunnigan familiäre partielle Lipodystrophie, oder das "Charcot-Marie-Tooth-2" Syndrom (Dhe-Phaganon et al., 2002; Übersicht: Gruenbaum et al., 2003). Aber nicht nur Veränderungen im LMNA führen zu Muskeldystrophien sondern auch Mutationen im Emerin Gen.

Die **Emery Dryfuss-Muskeldystrophie (EMDM)** ist eine relativ seltene Erbkrankheit die durch eine frühe Kontraktur von Ellenbogen, Knöcheln und Nacken sowie einer fortschreitenden Muskelschwäche mit Degradation von Herz- und Skelettmuskulatur charakterisiert wird. Es existieren drei Formen dieser Erbkrankheit. Zum einen die X-chromosomale rezessive Form, die durch Mutation im Emerin Gen ausgelöst wird und zum anderen die autosomal dominante und autosomal rezessive Form, die durch Mutationen im LMNA Gen verursacht werden. Die am häufigsten auftretende Form der EMDM ist die rezessiv X-chromosomal vererbte Variante. Dabei treten Mutationen im Emerin Gen (STA Gen) auf, die durch eine Leserasterverschiebung, Deletion oder "nonsense" Mutationen zu einem verfrühten Abbruch der Translation führen. Bei Patienten, die von dieser EMDM betroffen sind, wird kein oder nur sehr wenig Emerin exprimiert. Bemerkenswert dabei ist, dass die auslösenden Mutationen, von denen über 90 bekannt sind, nicht auf eine Region im Gen beschränkt sind, sondern über das ganze Emerin Gen verteilt auftreten. Die autosomalen Formen der EMDM ist bei wesentlich weniger Patienten zu finden. Hier treten Leserasterverschiebungen, Deletionen, "missense" oder "nonsense" Mutationen in Regionen des LMNA Gens auf, die sowohl im Lamin A als auch im Lamin C zu finden sind (Bonne et al., 1999). Die betroffenen Regionen liegen meistens in der carboxyterminalen Domäne, die eine immunglobulin-ähnliche Faltung annimmt (Dhe-Paganon et al., 2002).

Die **“Limb girdle“ Muskeldystrophy (LGMD)** ist eine Erkrankung die zwar vergleichbare Symptome wie die EMDM zeigt, diese aber weniger stark ausgeprägt sind. Dabei steht eher die Schwächung der Gliedmaßen im Vordergrund, die vor dem Erreichen des 20 Lebensjahres eintritt und mit dem Alter zunimmt. Häufig findet man auch Veränderungen der Herzmuskulatur, aber die bei EMDM vorkommenden Kontrakturen von Ellenbogen, Knöcheln und Hals fehlen hier völlig.

Die **Dilatierete Cardiomyopathie (CMD-1A)** ist eine weitere autosomal dominante Erbkrankheit, die durch Mutationen im LMNA Gen ausgelöst wird (Brodsky et al., 2000; Arbustini et al., 2002). Die Mutationen treten meist innerhalb der ersten beiden  $\alpha$ -Helices der Stabdomäne auf. Zwei der Mutationen erwecken dabei besonderes Interesse, da sie entweder nur im Lamin C oder nur im Lamin A zu finden sind (Bonne et al., 2000; Genschel et al., 2001).

Die **Dunnigan familiäre partielle Lipodystrophie (FPLD)** ist eine sehr seltene (1:15 Mio) autosomal dominante Erbkrankheit. Die Patienten machen nach der Geburt einen gesunden Eindruck und erst in der Pubertät treten die ersten Symptome auf. Die Krankheit beginnt mit einem selektiven Verlust des subcutanen Fettgewebes an Armen und Beinen sowie Rumpf und Becken. Im weiteren Verlauf sammelt sich dann weißes Fettgewebe im Gesicht, dem Halsbereich, dem Rücken und der Leistengegend an (Garg, 2000). Bis zum Alter von 20 Jahren entwickeln die meisten Patienten eine Resistenz gegen Insulin sowie eine Glukoseintolleranz und Diabetis mellitus (Übersicht: Gruenbaum et al., 2003). Die Mutationen im LMNA Gen, die für diese seltene Krankheit verantwortlich sind, konzentrieren sich auf einen kleinen Bereich im carboxyterminalen Teil des Lamin A, welcher, wie oben schon erwähnt, an der Oberfläche der globulären Domäne zu finden ist. Untersuchungen haben gezeigt, dass dieser Bereich ebenfalls für Interaktionen mit LAP2 und SREBP-1 (Sterol Response Element Binding Protein 1) benötigt wird und dass Mutationen in dieser Region diese Bindungen beeinträchtigen können (Lloyd et al., 2002).

Die Frage warum Mutationen in einem Gen wie das LMNA, dessen Protein in fast allen Geweben zu finden ist, eine solche Bandbreite von verschiedenen Krankheiten hervorruft, ist bis heute noch nicht geklärt. Die bestehenden Theorien treffen meist auf ein oder zwei Krankheiten zu, können aber auf andere Phänomene nicht angewendet werden. So ist zum Beispiel die Theorie, dass durch den Verlust oder die Reduktion des Lamin A/C die Stabilität der Kerne beeinflusst wird, plausibel. Kerne in Muskelzellen die unter starkem mechanischen Stress stehen, könnten diesem nicht standhalten und zerbrechen, was in dem Tod der Zelle

und somit in Muskelschwund resultieren würde. Zwar ist diese Theorie für die Muskeldystrophien anwendbar, erklärt aber nicht die Symptome der Lipodystrophien, die sich eher auf Fettzellen und Neuronen auswirken. Bedenkt man die vielfältigen Interaktionspartner des Lamin A/C wäre es ebenso denkbar, dass diese Assoziationen regulatorisch auf die Expression verschiedener Gene Einfluss nimmt und dass durch den Verlust diese Expression unterbunden wird. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass eher eine Kombination dieser beiden Möglichkeiten für diese vielfältigen Krankheiten verantwortlich sind.

### **II. 4. 2. Genetische Erkrankungen aufgrund von Mutationen im Lamin B Rezeptor (LBR)**

Die **Pelger Huët Anomalie (PHA)** ist eine autosomal dominante Erbkrankheit, die bei Menschen mit einer Häufigkeit von 0,01-0,1% auftritt. Sie wird durch Veränderungen im LBR Gen ausgelöst, die entweder einen Leserasterschub, "nonsense" Mutationen oder Veränderungen von Spliceregionen bewirken (Hoffman et al., 2002). Häufig treten diese Mutationen in Exons auf, aber auch eine Deletion von 6 bp in Intron 12 wird oft beobachtet. Mutationen, die zu einem Verlust des letzten Exons führen, bewirken, dass kein LBR mehr gebildet wird (nach Gruenbaum et al., 2003)

Heterozygote Patienten zeigen äußerlich keine Auffälligkeiten. Betrachtet man aber die Zellkerne der Granulozyten aus dem Blut, so besitzen diese weniger stark gelappte Kerne als die Granulozyten von gesunden Personen. Während bei heterozygoten Patienten nur die Menge an funktionsfähigem LBR reduziert ist, haben Untersuchungen an homozygoten Patienten gezeigt, dass hier nur noch eine ganz kleine Menge an LBR nachweisbar ist. Die Kerne der Granulozyten sind kugelig und die Patienten zeigen eine starke Entwicklungsverzögerung, Skelettanomalien und Epilepsie. Da nur sehr wenige homozygote Patienten existieren liegt die Vermutung nahe, dass der Verlust des Lamin B Rezeptors eine erhöhte prä- und postnatale Mortalität mit sich bringt. Ähnliches zeigen auch Versuche an Kaninchen, die eine homozygote PHA besitzen (Hoffman et al., 2002). Eine genaue Erklärung wie die Veränderungen des LBRs zu solchen Symptomen führt, bleibt noch offen. Es zeigen sich aber Parallelen zu anderen Erkrankungen, besonders in Bezug auf die Skelettanomalien, die auf eine Störung des Cholesterolfstoffwechsels beruhen. Zu diesen Erkrankungen gehören das Smith-Lemli-Opitz-Syndrom, das "CHILD-Syndrom", das CDPX2 (X linked dominant chondrodysplasia punctata A-Typ 2), die "Desmosterolosis", die "Latherosterolosis" und das

Antley-Bixler Syndrom, sowie die “Greenberg skelettale Dysplasie“ (HEM) (Battaile et al., 2000 König et al., 2000; Waterham et al., 2001, 2003; Übersicht: Porter, 2002).

Die **Greenberg skelettale Dysplasie** (= Hydrops-ectopic calcification-“moth-eaten“ = HEM) beruht im Gegensatz zu den eben aufgezählten Erkrankungen auf einer Mutation im LBR. Sie ist eine sehr seltene autosomal, rezessive Erbkrankheit, die bei betroffenen Föten kurze ödemhaltige Extremitäten, eine Knochenverkalkung sowie allgemeine und Skelettfehlbildungen bewirkt. Die Embryonen sterben entweder schon im Mutterleib oder kurz nach der Geburt. Untersuchungen zeigten, dass im Exon 13 des LBR eine Substitution von sieben Nukleotiden stattgefunden hat, die für ein vorzeitiges Stopcodon kodieren. Der dadurch verkürzte LBR scheint damit seine Funktion, die er im Sterolstoffwechsel einnimmt, nicht mehr erfüllen zu können. Anhand von Versuchen mit Fibroblasten der erkrankten Föten konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von funktionellem LBR der Sterolstoffwechsel wieder hergestellt werden kann (Waterham et al., 2003).

### II. 5. Zebrafisch

Der Zebrafisch (*Danio rerio*) ist ein 5-6 cm großer Fisch, der zur Familie der Karpfenfische (*Cyprinidae*) gehört. Ursprünglich ist er in langsam fließenden Nebenflüssen des Ganges in Bengalen, Pakistan und Bangladesch beheimatet.



**Abb. II.6: Zebrafisch**  
( [www.zfin.org](http://www.zfin.org) )

Aufgrund seiner geringen Größe und seines gestreiften Aussehens wurde er weltweit zu einem beliebten Zierfisch der sich ohne größere Schwierigkeiten in Aquarien halten lässt. Aber nicht nur unter Aquarianern ist der Zebrafisch beliebt sondern mittlerweile auch unter Entwicklungs- und Neurobiologen. In den letzten 10-20 Jahren wurde der Zebrafisch zu einem bedeutenden Modellorganismus, an dem, vergleichbar mit *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis* oder der Maus, entwicklungs- und neurobiologische Prozesse studiert werden können.

Der Zebrafisch gewinnt an Beliebtheit, da er die Vorteile vieler anderer Modellorganismen vereint. Vergleichbar mit *Xenopus* oder *Drosophila* ist die Generationszeit relativ gering. Innerhalb von 12 bis 16 Wochen erlangen die Zebrafische ihre Geschlechtsreife und produzieren dann eine große Nachkommenschaft. Bis zu 300 Eier kann ein Weibchen wöchentlich ablaichen. Ein weiterer Vorteil, besonders für die Entwicklungsbiologen, ist die vollständige Entwicklung des Eis außerhalb der Mutter. Da die Eier und Embryonen bis zu den frühen Larvenstadien komplett durchsichtig sind, lassen sich morphologische Veränder-



ungen sehr leicht untersuchen. Auch das Verwenden von spezifischen Antikörpern wird hierdurch erleichtert. Weiterhin sind die Embryonen groß genug, um auch klassische Transplantationsexperimente durchzuführen.

Da viele biochemische Stoffwechselwege oder biologische Abläufe in Invertebraten, wie *C. elegans* oder *Drosophila* nicht konserviert sind, muss auf komplexere Organismen zurückgegriffen werden. Anhand von genomischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der im Zebrafisch identifizierten Gene auch in Säugern zu finden sind. Daher lassen sich die beim Zebrafisch gewonnenen Erkenntnisse leicht auf den Menschen übertragen. Mittlerweile wurden effiziente Methoden etabliert, um das Zebrafisch Genom nach Mutationen zu durchsuchen, gezielte Mutagenesen durchzuführen oder die Expression von Proteine ganz zu unterdrücken.

Die Entwicklung des Zebrafischembryos läuft folgendermaßen ab (aus [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/stages/index.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/index.html); modifiziert nach Kimmel et al., 1995):

Die Teilung der Zellen erfolgt in einem Zeitrahmen von 15-20 Minuten. Sie sind am Anfang meroblastisch und zeigen eine reguläre Orientierung. Durch die unvollständige Abschnürung der Zellen bleiben diese über cytoplasmatische Brücken mit dem Dotter verbunden. Kleine Moleküle sind somit in der Lage, sich zwischen den einzelnen Blastomeren zu bewegen.

Zwischen dem 8. und 14. Teilungszyklus befindet sich der Embryo im Blastulastadium. Die Teilung erfolgt hier zwar in einem synchronen Rhythmus, jedoch befinden sich die Zellen nicht gleichzeitig in der Mitose. Der Rhythmus gleicht eher einer Welle, bei denen die Zellen am animalen Pol als Erste und die marginalen Zellen als Letzte in die Mitose übergehen. In der folgenden Gastrulation läuft die Epibolie ab. Die Zellen am Rand der Keimscheibe wandern ins Innere und konvergieren auf der dorsalen Seite und bilden dort die embryonale Achse sowie die primäre Keimschicht.

Innerhalb von 10-24 Stunden nach der Befruchtung sind Kopf-, Schwanz- und einige primäre Organanlagen des Embryos zu erkennen. Es entwickelt sich das erste Segment und der Embryo beginnt zu wachsen. Nach 48 Stunden sind die Embryonen in der Lage zu schlüpfen. Es folgt das Larvenstadium (bis zum 29. Tag) und das Juvenilstadium (bis zum 89. Tag), in denen die Zebrafische bis zu 1,4 cm heranwachsen. Um den 90. Tag werden die Tiere geschlechtsreif und zählen somit zu den Adulten. Die Lebensdauer eines Zebrafisches kann bis zu 2 Jahre betragen.

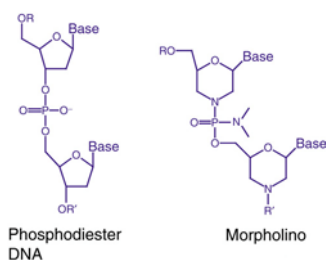
## II. 6. Morpholinos

Funktionelle Analysen stützen sich häufig auf in vitro erworbene Ergebnisse. Diese sind zwar hilfreich, zeigen jedoch meist nur einen kleinen Ausschnitt der möglichen Auswirkungen und können somit eventuelle Folgen für den Organismus nicht mit einbeziehen. Mittlerweile wurden eine ganze Reihe von Methoden entwickelt, die in der Lage sind in vivo Gene zu reprimieren und somit Einblick in die Funktion des Gens zu erhalten. An diese Methoden werden einige Anforderungen gestellt. Zum einen sollen sie effektiv, spezifisch, und reproduzierbar sein und zum anderen sollten sie für die meisten Gene in den meisten Zelltypen funktionieren. Wenn sie dann auch noch leicht durchführbar, ohne weitere Nebenwirkungen und im Vergleich zu anderen Methoden günstig sind, kann man sie fast als perfekt bezeichnen.

Eine Methode, die diesen Kriterien entspricht und bei *Drosophila* und *C. elegans* hervorragende Ergebnisse erzielt, ist das RNAi (RNA interference). Hierbei wird doppelsträngige RNA in Zellen injiziert (oder von Kulturzellen aufgenommen), die dort über einen RNase-ähnlichen Proteinkomplex (DICER) in kleine 21-23 bp große RNA-Stücke geschnitten wird. Diese RNAs sind schließlich für die spezifische Degradation der komplementären mRNA verantwortlich.

Leider haben Versuche mit RNAi bei Zebrafischen zu widersprüchlichen und doch recht variablen Ergebnissen geführt (Summerton and Weller, 1997; Summerton, 1999), so dass diese Methode bei der funktionellen Analyse von Zebrafisch Genen keine Anwendung findet.

Dafür hat sich bei Zebrafischen eher die Methode von "Antisense"-Oligonukleotiden



**Abb. II.7: Morpholino Struktur**  
(Genome biology.com)

etabliert. Anfangs noch recht unspezifisch und anfällig für Degradationen sind mittlerweile "Antisense"-Oligonukleotide entwickelt worden, die eine hohe Erfolgsrate zeigen und als "Morpholinos" bezeichnet werden. "Morpholinos" sind Oligonukleotide, die sich in ihren Bindungsfähigkeiten kaum von normalen Oligonukleotiden unterscheiden. Durch chemische Modifikation besitzen sie jedoch anstatt einer

Ribose, ein Morpholino als Rückgrat (Abb. II.7) Summerton and Welle, 1997; Summerton, 1999). Da die einzelnen "Morpholinos" über eine Phosphorodiamid-Verbindung aneinandergereiht werden, entsteht ein ungeladenes "Rückgrat". Weiterhin ist es im Gegensatz zu natürlichen Oligomeren nicht anfällig für Degradation durch RNasen. Das "Morpholino" ist in der Lage mit einer hohen Affinität an einzelsträngige Nukleinsäuren zu binden und zeigt weder toxische Effekte noch irgendwelche unspezifischen Nebeneffekte.

Werden die “Morpholinos“ so gewählt, dass sie durch ihre Bindung an der mRNA das Start-codon blockieren, verhindert diese Bindung die nachfolgende Translation und ist somit eine elegante Art die Expression spezifischer Proteine zu unterbinden.

Mittlerweile konnten eine Reihe von Genen mit Hilfe von Morpholino-oligonukleotiden ausgeschaltet werden. Bei Zebrafischen (Nasevicius und Ekker, 2000), Seegurken (Howard et al., 2001), *Xenopus* Embryonen (Heasman et al., 2000) und sogar Hühnchen (Kos et al., 2001) wurden die Morpholinos erfolgreich angewendet.

### II. 7. Zielsetzung

In den letzten Jahren ist die Anzahl von genetischen Erkrankungen, die auf Veränderungen von nukleären Proteinen beruht, immer weiter angestiegen. Somit rückt das Bedürfnis dort ablaufende Prozesse besser zu verstehen immer mehr in den Mittelpunkt der Forschung. Die Möglichkeit das Verhalten bestimmter Proteine in unterschiedlichen Modellorganismen zu studieren, erhöht die Bandbreite an Ergebnissen. Durch das Vergleichen und Verbinden der erhaltenen Ergebnisse wächst somit auch das Verständnis über die Zusammenhänge von komplexen Abläufe in einer Zelle.

Im Rahmen meiner Arbeit habe ich zwei Themengebiete bearbeitet. Zu Beginn dieser Arbeit war wenig über Kernmembranproteine im Zebrafisch bekannt. Vera Schoft identifizierte in ihrer Diplomarbeit drei Proteine, die eine hohe Homologie zu den drei bei *Xenopus* bekannten LAP2-Isoformen aufwies. Im ersten Teil meiner Arbeit sollten die Isoformen sowie das kodierende Gen näher charakterisiert werden. Anhand eines Vergleiches mit LAP2-Genen anderer Spezies erhoffte ich mir Aussagen treffen zu können, welche die Existenz verschiedener Isoformen erklärt. Dabei sollte ein besonderes Augenmerk auf die  $\omega$ -Isoform, von *Xenopus* und Zebrafisch, sowie die  $\alpha$ -Isoform der Säuger gelegt werden. Des weiteren sollte ein zweites integrales Membranprotein, der Lamin B Rezeptor, im Zebrafisch identifiziert und charakterisiert werden. Durch eine anschließende Herstellung von spezifischen Antikörpern gegen den LBR sollte eine Grundlage für spätere immunologische Untersuchungen gelegt werden.

Durch die Möglichkeit mit Hilfe von “Morpholinos“ die Expression von Proteinen zu reprimieren, sollte in einem Teilprojekt getestet werden, ob sich das LAP2, der LBR sowie die Lamine B1 und B2 unterdrücken lassen.

Ein weiteres recht umfassendes Projekt beschäftigte sich mit der Funktion der Lamine. Hier interessierte besonders die Frage, welche Rolle ein intaktes CxxM-Motiv bzw. GNAEGR-Signal bei der Assoziation der Lamine mit der Kernmembran spielt. Mit Hilfe von elektronen-

mikroskopischen Methoden sollten Auswirkungen einer Überexpression verschiedener Lamine und Lamin-Mutanten untersucht werden.

## III. Material und Methoden

### III. 1. Material

#### III. 1. 1. Bakterienstämme und Vektoren

Bakterien: *Escherichia coli* XL 1-Blue (Stratagene)  
*Escherichia coli* Top 10 One Shot® (Invitrogen)  
*Escherichia coli* BL21(DE3) Codon-Plus® RIL

Vektoren: Bluescript (SK+) (Stratagene)  
pCR 2.1-TOPO (Invitrogen)  
pEGFP-N1 (Clontech)  
pEGFP-C2 (Clontech)  
pEGFP-C3 (Clontech)  
pET21a (Novagen)  
lawrist (RZPD)  
psport (RZPD)

#### III. 1. 2. Kulturzellen

Die Zellen wurden in Gewebekulturschalen im Brutschrank unter konstanten Temperatur- und CO<sub>2</sub>-Bedingungen kultiviert.

COS-7 Zellen	Nierenzellen von <i>Ceropithecus aethiops</i> kultiviert bei 37°C, 5% CO <sub>2</sub>
XLKE-A6-Zellen	Nierenepithelzelllinie von <i>Xenopus laevis</i> kultiviert bei 27°C, 5% CO <sub>2</sub>
AB9 Zellen	Schwanzflossenzellen von <i>Danio rerio</i> kultiviert bei 27°C, 5% CO <sub>2</sub>
Hühnchen Fibroblasten	Fibroblasten von 10 Tage alten Hühnerembryonen kultiviert bei 37°C, 5% CO <sub>2</sub>
HeLa-Zellen	humane epitheloide Cervixkarzinomzellen (von Patient <u>Henrietta Lack</u> ) kultiviert bei 37°C, 5% CO <sub>2</sub>

#### III. 1. 3. Fische

Die für diese Arbeit verwendeten Tiere TÜAB stammen aus der Fischzucht der Physiologischen Chemie Würzburg.

Die Fischlinie ist eine Kreuzung aus 2 bzw 3 Fischlinien. TÜ-Fische stammen aus dem Labor von Prof. C. Nüsslein-Vollhard in Tübingen und die AB-Fische stammen von Prof. G. Streisinger aus Oregon, der die Linien A und B miteinander kreuzte.

Zebrafische leben in den Flüssen Indiens oder Pakistans. Adulte Fische werden ungefähr 4-6 cm groß.

### III. 1. 4. Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle verwendeten Chemikalien von AppliChem (bezogen von der Firma Hartenstein), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) in Analysequalität bezogen. Für das Ansetzen von Waschlösungen, Färbe- oder Entfärbelösungen wurden Alkohole in technischer Qualität verwendet. Die in der Zellkultur eingesetzten Medien und Chemikalien stammen von GIBCO/BRL (Eggenstein).

### III. 1. 5. Häufig verwendete Lösungen und Medien

20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0
1x TBST	140 mM KCl 0,3% Tween 20 10 mM Tris/HCl; pH 8,0
50x TAE Puffer	2,0 M Tris Base 1,0 M Essigsäure 50 mM EDTA → pH 8,3 (konzentrierte Essigsäure)
LB-Medium (1 l)	10 g NaCl 5 g Hefeextrakt 10 g Bactotrypton; pH 7,4
LB-Agar	Wie LB-Medium, zusätzlich 1,5% Bacto-Agar; Antibiotika werden dem LB-Medium oder dem LB-Agar gegebenenfalls in folgenden Endkonzentrationen zugegeben: Ampicillin (100 µg/ml) Kanamycin (25 µg/ml)
1x 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
Hoechst	1mg/ml (bis-Benzimide)
RNA-Probenpuffer	80% Formamid 1 mM EDTA, pH 8 0,1% Bromphenolblau 0,1% Xylenecyanol

### III. Material und Methoden

---

10x DNA- Probenpuffer	30% (w/v) Ficoll 1% (w/v) SDS 50 mM EDTA 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,05% (w/v) Bromphenolblau 0,05% (w/v) Xylencyanol
-----------------------	---

50x Denhardts	1% Ficoll 1% Polyvinylpyrrolidon 1% BSA
---------------	---

#### **Lösungen für Western Blot**

Westernblot-Transferpuffer 1	25 mM Tris/HCl, pH 10,4 in 20% Methanol (technisch)
------------------------------	--

Westernblot-Transferpuffer 2	300 mM Tris/HCl, pH 10,4 in 20% Methanol (technisch)
------------------------------	---

Westernblot-Transferpuffer 3	40 mM Norleucin 25 mM Tris/HCl, pH 9,6 7,0 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
------------------------------	--

Färbelösung für Polyacrylamidgele	0,2% Coomasie R 40% Methanol (technisch) 8% Essigsäure
-----------------------------------	--

Schwacher Entfärber (für Coomasie-Gele)	2 l Methanol (technisch) 7,3 l H <sub>2</sub> O 0,7 l Essigsäure
---	--

#### **Lösungen für Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Protein-Auftrennung)**

SDS-Probenpuffer (Lämmli 1970)	60 mM Tris/HCl, pH 6,8 2 % SDS 10% Glycerin 10% DDT 0,1% Bromphenolblau
--------------------------------	---

SDS-Laufpuffer	2,8 g Tris 14,3 g Glycin 2,8 g SDS; ad 1 l H <sub>2</sub> O
----------------	---

SDS-PAGE Lösung A	60 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 6,8 0,4 g SDS; ad 100 ml H <sub>2</sub> O
-------------------	---

SDS-PAGE Lösung C                          6,06 g Tris/HCL, pH 6,8  
0,4 g SDS; ad 100 ml H<sub>2</sub>O

#### Lösungen für alkalische Lyse

GTE –Puffer                                  50 mM Glucose  
25 mM Tris/HCl pH 8,0  
10 mM EDTA  
100 mg/ml RNase A

Alkali-SDS-Lösung                          0,2 N NaOH  
1,0% SDS

Acetatlösung                                 0,3 M Kaliumacetat  
12,01% Eisessig  
pH 4,8 mit Eisessig einstellen

#### Lösungen für Zell- bzw. Gewebereinbettungen

Eponkomponente A                         97,1 g Glycidether  
130,8 g DDSA (2 Dodecenylsuccinic acid)

Eponkomponente B                         90 g Glycidether  
81,37 g MNA (Methylnodic anhydride)

Eponmischung                                Komponente A und B in gleichen Teilen  
1,5 – 2 Vol% DMP-30 (Dimethylaminomethylphenol  
Beschleuniger)

Sörensenpuffer pH 7,4                      81,8 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (66 mM)  
18,2 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (66 mM)

2,5%Glutaraldehyd + Ionen                50 mM Glutaraldehyd  
50 mM KCl  
2,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 M Cacodylat (pH 7,2)

50 mM Cacodylat pH 7.2; 50 mM KCl; 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>

#### Lösungen für Zebrafische

Danieau- Lösung                             17,4 mM NaCl  
0,21 mM KCl  
0,12 mM MgSO<sub>4</sub>·7•H<sub>2</sub>O  
0,18 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

0,2% MS-222                                 0,2% Tricain in Danieau-Lösung



### Zellkulturmedien

#### Komplettmedium für *Xenopus*-XLKE A6-Zellen:

27,75%	ddH <sub>2</sub> O
1% (v/v)	Penicillin/Streptomycin: Stammlösung: 10000 U/ml; Endkonzentration: 100 U/ml
1% (v/v)	L-Glutamin: Stammlösung: 200 mM; Endkonzentration: 2 mM
10 %	FCS (Fötale Kälberserum)
in	DMEM ( <u>D</u> ulbecco's <u>m</u> odified <u>e</u> agle's <u>m</u> edium; Eurobio, Biotechnology)

#### Komplettmedium für *Ceropithecus aethiops* COS-7-Zellen, HeLa-Zellen und Hühnerfibroblasten

1% (v/v)	Penicillin/Streptomycin; Endkonzentration 100 U/ml
1% (v/v)	L-Glutamin; Endkonzentration: 2 mM
1% (v/v)	Penicillin/Streptomycin: Stammlösung: 10000 U/ml; Endkonzentration: 100 U/ml
10%	FCS
in	DMEM( <u>D</u> ulbecco's <u>m</u> odified <u>e</u> agle's <u>m</u> edium; Eurobio, Biotechnology)

#### Komplettmedien für *Danio rerio* AB9 Zellen

1% (v/v)	Penicillin/Streptomycin; Endkonzentration 100 U/ml
1% (v/v)	L-Glutamin; Endkonzentration: 2 mM
1% (v/v)	Penicillin/Streptomycin: Stammlösung: 10000 U/ml; Endkonzentration: 100 U/ml
15%	FCS
in	DMEM( <u>D</u> ulbecco's <u>m</u> odified <u>e</u> agle's <u>m</u> edium; Eurobio, Biotechnology)

Trypsin-Lösung:	0,06% Trypsin (w/v)
	0,02% EDTA (w/v)
	in PBS, steril filtriert

### III. 1. 6. Antikörper

#### Primäre Antikörper

Anti-GFP	Antigen:	Green Fluorescence Protein
	Herkunft:	Maus, monoklonal (Mischung zweier mAK)
	Verdünnung:	IF: 1:200
	Literatur:	Blot: 1:2000
	Bezogen über:	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Anti- $\alpha$ Tubulin	Antigen:	$\alpha$ -Tubulin
	Herkunft:	Maus, monoklonal
	Verdünnung:	Blot: 1: 20000
	Bezogen von:	Sigma, T-5168

### III. Material und Methoden

---

Anti- His-tag (QIAexpress Penta-His Antibody)	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen von:	5 Histidine Maus, monoklonal Blot: 1: 1000 QIAgen, Hilden
ADL 84	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Literatur: Bezogen über:	<i>Drosophila melanogaster</i> Lamin DMO Maus monoklonal IF: 1:10 Klapper et al., 1991 Dr. N. Sturmann
X94	Antigen: Herkunft: Verdünnung:  Literatur:	<i>Xenopus laevis</i> Lamin A Maus, monoklonal IF: 1:300 Blot: 1:1000  Höger et al., 1991
X223	Antigen: Herkunft: Verdünnung:  Literatur:	<i>Xenopus laevis</i> Lamin B2 Maus, monoklonal IF: 1:300 Blot: 1:1000  Höger et al., 1990
ZLAP2-1	Antigen: Herkunft: Verdünnung:  Literatur:	<i>Danio rerio</i> LAP2 Meerschweinchen IF: 1:300 Blot: 1:5000  Schoft et al., 2003
X155-8	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Literatur:	<i>Xenopus</i> Lamin B2 Maus, monoklonal WB: 1:1000 Lourim and Krohne, 1993
L <sub>1</sub> B/H	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Literatur:	<i>Xenopus</i> Lamin B1 Meerschwein, polyklonal WB: 1:1000 Lourim et al., 1996
13d4	Antigen: Herkunft: Verdünnung:  Literatur:	Ratte LAP2 $\beta$ Maus, monoklonal IF: unverdünnt Blot: 1:10  Alsheimer et al., 1998

**Sekundäre Antikörper**

anti-Maus IgG gekoppelt mit Meerettich Peroxidase	1: 10000	Dianova, Hamburg
anti-Meerschwein IgG gekoppelt mit Meerettich Peroxidase	1: 10000	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG gekoppelt mit Texas Red	1: 100	Dianova, Hamburg
anti-Meerschwein IgG gekoppelt mit Texas Red	1: 100	Dianova, Hamburg

**III. 1. 7. Enzyme**

**Restriktionsenzyme**

Restriktionsenzyme wurden bei MBI Fermentas bestellt und mit entsprechenden Puffern verwendet.

**Tab. III. 1 Restriktionsenzyme mit spezifischen Erkennungssequenzen**

<b>Restriktions- enzym</b>	<b>Erkennungssequenz und Schnittstelle</b>
<b><i>BamHI</i></b>	5' ...G↓G A T C C...3' 3' ...C C T A G↑G...5'
<b><i>EcoRI</i></b>	5' ...G↓A A T T C...3' 3' ...C T T A A↑G...5'
<b><i>HindIII</i></b>	5' ...A↓A G C T T...3' 3' ...T T C G A↑A...5'
<b><i>KpnI</i></b>	5' ...G G T A C↓C...3' 3' ...C↑C A T G G...5'
<b><i>NotI</i></b>	5' ...G C↓G G C C G C...3' 3' ...C G C C G G↑C G...3'
<b><i>PstI</i></b>	5' ...C T G C A↓G...3' 3' ...G↑A C G T C...5'
<b><i>SalI</i></b>	5' ...G↓T C G A C...3' 3' ...C A G C T↑G...5'
<b><i>XhoI</i></b>	5' ...C↓T C G A G...3' 3' ...G A G C T↑C...5'
<b><i>BglII</i></b>	5' ...A↓G A T C T...3' 3' ...T C T A G↑A...5'
<b><i>SacI</i></b>	5' ...G.A.G.C.T↓C...3' 3' ...C↑T.C.G.A.G...5'

**Sonstige Enzyme**

Expand High Fidelity PCR System	Boehringer
Ribonuclease Inhibitor	MBI-Fermentas
Taq DNA Polymerase	MBI-Fermentas
T4 DNA Ligase	MBI-Fermentas
Pfu Polymerase	MBI-Fermentas
Klenow	MBI-Fermentas
Dnase	Sigma
Rnase	Sigma
CIAP	MBI-Fermentas

III. 1. 8. Primer

Tab. III.2: Primer für die genomische Identifikation von LAP2

Primer	Orien- tierung	Sequenz	T <sub>m</sub> in °C
1	5'-3'	5'-ACATCTTTTCAAATGTCTTGTTTTAAA-3'	53,5
2	3'-5'	5'-CGTTCGGGAGAGCAACATTAT-3'	53,4
3	5'-3'	5'-CCCGTGGTCTCCAACAGGAG-3'	56,6
4	5'-3'	5'-TCGTGAATGAGATAGTGTGCCT	55,5
5	3'-5'	5'-AATGGGAGTAAAATGCTGTGCG-3'	55,7
6	5'-3'	5'-CAAATAGCAAACGCACCA-3'TGG-3'	55
7	3'-5'	5'-CATGGTGCCTTTGCTATTTGC-3'	55,7
8	5'-3'	5'-ACATTTAAGGCCCTTAAACGTTT-3'	52,6
9	5'-3'	5'-ATGCTCAGATTTATGTTTTTTTTTTTG-3'	52,6
10	3'-5'	5'-AACGGGACCATGTGACTAGAAA-3'	52,8
11	5'-3'	5'-GCCTGTCAGGCGTGTTTAAA-3'	52,9
12	5'-3'	5'-CCACCAGGAAAACCGACAAA-3'	56,5
13	3'-5'	5'-TTTGTCGGTTTTCTGCTGG-3'	56,5
14	3'-5'	5'-TTTTCTGTCTTTTGTCTCATAGGTCT-3'	53,4
15	3'-5'	5'-CCACAGCTACAGGAGGACCC-3'	53,4
16	5'-3'	5'-AGTCGAGGGAAAACACCAGTGA-3'	55,1
17	5'-3'	5'-CAGAACTGCGAGGAAAAAAACTT-3'	55,2
18	3'-5'	5'-AAGTTTTTTTTCTCAGTTCTG-3'	55,2
19	3'-5'	5'-TTAACATTC AAGACGGGCCAGTC-3'	56,9
21	3'-5'	5'-GCTCAGTTCTGAATGAGGCC-3'	51,3°
22	5'-3'	5'-CAATAGTGAAGGAGGTGTCTGTTT-3'	51,2
22	5'-3'	5'-CAATAGTGAAGGAGGTGTCTGTTT-3'	51,2
23	3'-5'	5'-GATCACTGGAAGGCGAGAGAC-3'	52,8
24	3'-5'	5'-TTCATATTCATCAGCTTGTTA-3'	51,6

Tab. III. 3: Primer für die Sequenzierung der zLBR-cDNA-Klone (RZPD)

Primer	Orien- tierung	Sequenz	T <sub>m</sub> in °C
P	3'-5'	5'-CGTTTACGGATTGTGGACAC-3'	50,3
P2	3'-5'	5'-AAAACCCAGAGACCAGACACAA-3'	56,4
P3	3'-5'	5'-GCGCATTTACAGAAGAACTT-3'	51,4
P4	3'-5'	5'-AAAGCTCTGGAGACTGGCAT-3'	50,5
P5	3'-5'	5'-AATAAAGGTTACTGCCGGGCC-3'	56,1
P(+A)	5'-3'	5'-GGCTATTTACCATTGACTTTTTTTTAT-3'	52,6

Tab. III. 4: Primer für die Kontrolle der genomischen DNA von zLBR (ICRFc71M10137Q5; RZPD) sowie für die Sequenzierung von Intron7

Primer	Orientierung	Sequenz	T <sub>m</sub> in °C
P-Ex1	5'-3'	5'-CAAAGATGGTACTGAGCTGGAGC-3'	55,6
P-Ex2	3'-5'	5'-TCGACCGTCCAGCAGTTTGAA-3'	57,9
P-Ex4	5'-3'	5'-AGGTGTAGAGCTGGAGAAAGCCGTAG-3'	55,6
P-Ex5	3'-5'	5'-TGGCAGCAGAAACATCAGGAA-3'	55,6
P-Ex7	5'-3'	5'-AGCAGGTGTCGCTGTGTACCAG-3'	56,6
P-Ex8	3'-5'	5'-ACCCAACCCATCAGTCCAGG-3'	55,8
P-In7	3'-5'	5'-TTGTCATCATTTACCCATCGGTTT-3'	54,0

Tab. III.5: Primer für das zLBR Fragment (1-210AS) zur Herstellung von Antikörpern

Primer	Orientierung	Sequenz	T <sub>m</sub> in °C
5'Zp58-5bp (NdeI)	5'-3'	5'-AACATATGCCGCCTGCAAGG-3'	57,3
3'Zp58-627bp (XhoI)	3'-5'	5'-TTCTCGAGCTCCAGATCGGC-3'	56,7

Tab. III. 6: Primer für Sequenzierungen aus dem Vektor

Primer:	Sequenz	T <sub>m</sub> in °C
M13-Reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	50
M13-Forward (-20)	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	50
T7-Primer	5'-AATACGACTCACTATAGG-3'	50
T3-Primer	5'-AATTAACCTCAATAAAGGG-3'	50
Sp6-Primer	5'-ATTTAGGTGACACATTAG-3'	50

Tab. III. 7: Primer für die Herstellung des Lamin SxxM-Konstrukts

Primer	Orientierung	Sequenz	T <sub>m</sub> in °C
5'LB2 (10-35)	5'-3'	5'-ACTACACCAAGCCGGTCGACCCGGT-3'	67,8
3'LB2 (SsvM-BamHI)	3'-5'	5'-TTGGATCCTTACATGACAGAGGAGCCTCTGGA-3'	68,4

### III. 1. 9. Verbrauchsmaterial

CELLocate® Coverslips 175µm <sup>2</sup>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Femtotips®-Injektionsnadeln	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroloader	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nickel NTA Agarose	QIAGEN, Düsseldorf
Nitrocellulose	Schleicher und Schuell, Dassel
Röntgenfilme, Kodak X-Omat AR	Sigma, Deisenhofen
Seakem LE Agarose	Biozym, BIOzym Diagnostik Oldendorf
Whatman-Papier	Firma Schleicher & Schuell, Dassel
Glas-Kapillaren 1.0mmOD x0,58mmID	Harvard apparatus LTD, Edenbridge, UK

### III. 1. 10. Verwendete Kits

E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit II	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
QIAquick Gel Extraktion Kit	QIAGEN, Düsseldorf
QIAGEN Plasmid Miniprep-Kit	QIAGEN, Düsseldorf
Random Priming DNA-labelling kit ver. 1.1	MBI Fermentas, St Leon-Roth
Taq-Dye desoxy <sup>TM</sup> Terminator Sequenzierungs-Kit	Applied Biosystems (Weiterstadt)
TNT-system; coupled in vitro translation and transcription kit	Promega, Madison, WI, USA
TOPO TA cloning®Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
MEGAscript <sup>TM</sup> High Yield Transcription Kit	Ambion, Austin, USA
Sp6	
RNAeasy Kit	QIAGEN, Düsseldorf

### III. 1. 11. Vorhandene Laminkonstrukte

Tab. III. 8: Vorhandene Laminkonstrukte

Konstrukt	Lamin	Merkmal	Vektor	Referenz
xB2	<i>Xenopus</i> Lamin B2	wildtypisch	pEGFP-C3 (Invitrogen)	Vogel, 2002
xB2-ΔN1	<i>Xenopus</i> Lamin B2	Lamin B2 ab der 2. Hälfte der helikalen Domäne 2	pEGFP-C3 (Invitrogen)	Vogel, 2002
xB2-ΔN2	<i>Xenopus</i> Lamin B2	nur carboxyterminaler Schwanz	pEGFP-C3 (Invitrogen)	Vogel, 2002
xB2-ΔN3	<i>Xenopus</i> Lamin B2	Lamin B2 ab der helikalen Domäne 2	pEGFP-C3 (Invitrogen)	Vogel, 2002
zB2-ΔN3	Zebrafisch Lamin B2	Lamin B2 ab der helikalen Domäne 2	pEGFP-C3 (Invitrogen)	Klüver, 2003
dC	<i>Drosophila</i> Lamin C	wildtypisch	pEGFP- (Invitrogen)	Krohne et al., 1998
dC-CxxM	<i>Drosophila</i> Lamin C	mit zusätzlichem CxxM Motiv (CAIM)	pEGFP- (Invitrogen)	Krohne et al., 1998
dDm0	<i>Drosophila</i> Dm0	wildtypisch	pEGFP- (Invitrogen)	Krohne et al., 1998
hA	humanes Lamin A	wildtypisch	pEGFP-C1 (Invitrogen)	Broers et al., 1999
hC	humanes Lamin C	wildtypisch	pEGFP-C1 (Invitrogen)	Broers et al., 1999
rC2	Ratten Lamin C2	wildtypisch	pEGFP-N2 (Invitrogen)	Alsheimer et al., 2000
rC2-myc	Ratten Lamin C2	mit zusätzlicher carboxyterminaler LAAEKLISEEDLNGAA Sequenz (myc-Tag)	pEGFP-N2 (Invitrogen)	Alsheimer et al., 2000
6hC	humanes Lamin C	mit zusätzlichem GNAERG- Motiv am Aminoterminus	pEGFP-N2 (Invitrogen)	Alsheimer et al., 2000

### III. 1. 12. Verwendete Morpholinos

Tab. III. 9: Für die Mikroinjektion verwendete Morpholinos

Morpholino	Sequenz
Mo-zLAP2	CGGGTCTTCCAGAAATTC AACATG
Mo-zLBR	TGCAGGCGGGCATCTTTGTTTACTTC
Mo-zLB1	ATTATGATCGCTTCAGACCCTCTTC
Mo-zLB2	CAGGAGTACACGCCGCGCTCGCCAT
Kontrollmorpholino	CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA

### III. 1. 13. Geräte

Autoklav: Vapoklav	Sterico AG, Dietikon, Schweiz
Binokulare:	
Druchlicht-Stemi Wild M5	Leitz-Wild Heerbrugg
Stemi 2000C	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Brutschränke:	
Temperierbarer Brutschrank Typ P10 (30-220°C und 30-100°C)	Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland
Temperierbarer Brutschrank (36°C) CO2-Auto-Zero	Heraeus-Holding, Hanau
Temperierbarer Brutschrank (27°C) UNI INCU	Uni-Equip Kraupa, Martinsried
Temperierbarer Brutschrank (26°C) Fische	Zu alt zum Bestimmen
Temperierbarer Schüttelinkubator SM25	Bühler, Tübingen, Deutschland
Digitalkamera: Nikon CoolPix 990 (3,35Mpix)	Dutenhofer, Würzburg, Deutschland
Geigerzähler: MikroCont	bezogen über Hartenstein
Gelelektrophoresekammern:	
DNA-Gelkammer (50-60 ml)	cti GmbH, Idstein, Deutschland
DNA-Gelkammer (300 ml)	cti GmbH, Idstein, Deutschland
Proteingelkammer für 2 Minigele (8 x 6 cm)	cti GmbH, Idstein, Deutschland
Glasgefäße und -flaschen, verschiedene Größen	Schott Glas, Mainz, Deutschland
Grafitblotkammer LMS (18 x 18 cm)	cti GmbH, Idstein, Deutschland
Heizblock Liebisch® Epptherm EPT-120-36-1,5	Ismatec Labortechnik, Glattbrugg, Schweiz
Heizplatte mit Magnetrührer	IKA-Combimac RCT Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Hitzesterilisator Typ U15 (30-220°C)	Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland
Kipp-Schüttler, Typ REAX 3	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Kühlgeräte:	
Gefriertruhe Kryotec KLT 4785 CO2 (-70°C)	Hans-S. Schröder GmbH, Hamburg, Deutschland
Tiefkühltruhe -86°C Freezer	Forma Scientific, Labotect, Göttingen
Gefrierschrank PrivilegÖko TF990 (-20°C)	Quelle AG, Fürth, Deutschland
Kühlschrank FKS 5000 Typ 2 (4°C)	Liebherr Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, Deutschland

### III. Material und Methoden

---

Magnetrührer:	
Magnetrührer M21	GLW GmbH, Würzburg, Deutschland
Heizbarer Magnetrührer TMA Assistent 2071	Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland
Mikroinjektoren für Zellinjektion:	
Mikomanipulator 5171	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transjektor 5246	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroinjektoren für Embryoneninjektion:	
Nadelzieher Typ 720	Bachofer, Reutlingen, Deutschland
Mikromanipulator	Leitz, Wetzlar
Mikroinjektor 5242	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikropipetten:	
Pipetman (2-20µl, 20-200µl, 100-1000µl)	Gilson, Middleton, USA
Research (0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskope:	
Labormikroskop Leitz Laborlux S	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axiphot Stereo	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Aristoplan	Leitz, Wetzlar
Konfokales Laser Scanning Mikroskop TCS, SP	Leica, München, Deutschland
Leica DM IRB/E	Leica, München, Deutschland
Umkehrmikroskop IM35	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Lichtmikroskop (Zellkultur)	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Transmissions-Elektronenmikroskope EM10	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Netzgeräte:	
CONSORT E 452	Consort nv, Turnhout, Belgien
CONSORT E 455	Consort nv, Turnhout, Belgien
CONSORT E 734	Consort nv, Turnhout, Belgien
pH-Meter, Typ pH 523	WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer: Biophotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäßmixer Typ L24	GLW mbH, Würzburg, Deutschland
Säulen zur Proteinaufreinigung	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Scanner	X finity pro42
Sequenzierer ABI Prism™310 Genetic Analyser	Genetic Analyser Perkin Elmer, Applied Biotems GmbH, Weiterstadt, Deutschland
Spülmaschine Desinfektor Automatik G7735	Miele & Cie. KG, Bürmoos, Österreich
Sterile Bank: Steril GARD Hood Class III	Müller Labortechnik, Windhagen
Thermocycler:	



### III. Material und Methoden

---

Cyclone 25	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Progene FM12585	Techne AG, Burkhardtsdorf, Deutschland
PeqLab- Primus 25	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
PeqLab- cyclon 25	Progene, Wertheim
Biometra	Biometra, Göttingen
Trockenschrank TYP SI 60	Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland
Ultramikrotom Microm HM500 OM	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Vakuumtrockner für Polyacrylamidgele: Trockner Typ PH-t 40	Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen, Deutschland
Vakuumpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender und Hohbein AG, Zürich
Waagen: Feinwaage Satorius Typ H110	Satorius GmbH, Melsungen, Deutschland
Laborwaage PJ 3600 Delta Range	Mettler, Gießen, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q UF Plus	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
Wasserbad, temperierbar: Typ Braun MM	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland
Zentrifugen	
Kühlzentrifuge Minifuge RF	Heraeus-Holding, Hanau, Deutschland
Kühlzentrifuge J2-21	Beckman Instr. Inc., Fullerton, USA
Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Mikroliter Typ 2043	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Universal K2S Hettich,	Hettich, Tuttlingen
Ultrazentrifuge LB-70	Beckman Instr. Inc., Fullerton USA
Expositions-kammer: Dr Goos suprema	bezogen über Hartenstein
Schüttler Isotop memmet (20-80°C)	bezogen über Hartenstein
Inkubationsofen	Bachofer, Reutlingen, Deutschland

### III. 1. 14. Computerprogramme und Internet-Seiten

Adobe Photoshop 6.0

Microsoft Word 2000

CorelDraw 10

Chromas version 1.45

Oligo.exe structure version 3.4

Clone version 3.02

Leica TCS NT 1.6.587

Leica Microsystems, Heidelberg GmbH

BSSC-ChickEST Database

<http://www.chick.umist.ac.uk>

Medaka Genome Database (M base)

[http://www.mbase.bioweb.ne/~dclust/medaka\\_  
p.html](http://www.mbase.bioweb.ne/~dclust/medaka_to<br/>p.html)

HGMP-RC-Fugu Genomics Project

<http://fugu.hgmp.mrc.ac.uk>

Trust Sanger Institute

<http://www.sanger.ac.uk>

Ensembl Zebrafish Genome Browser

[http://www.ensembl.org/Danio\\_  
rerio/blastview](http://www.ensembl.org/Danio_rerio/blastview)

GENES.MIT.EDU

<http://genes.mit.edu/>

Zfin-Home

<http://www.zfin.org>

Resource Center/Primary Database

<http://www.rzpd.de/>

ClustalW

<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>

ExPASy

<http://www.expasy.org>

Spidey-mRNA to genomic alignment

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell  
/Spidey/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell<br/>/Spidey/)

LN-Panel-Code

<http://zfin.uoregon.edu/ZFIN/>

Entrez-PubMed

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>

NCBI-Blast

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/mmtrace.html>

Blast2Sequences

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2>

## **III. 2. Methoden**

### **III. 2.1. Molekularbiologische Methoden**

#### **III. 2. 1. 1. Bakterienkulturen**

##### **III. 2. 1. 1. 1. Herstellung von Agarplatten**

Für die Herstellung von Agarplatten wird autoklavierter LB-Agar in sterile Petrischalen (Durchmesser 10 cm) gegossen. Die Platten werden einige Stunden oder über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bei 4°C gelagert. Bei Bedarf kann den Platten auch Antibiotika zugegeben werden, um einen Selektionsdruck auf Bakterien mit entsprechenden Resistenzen zu erhöhen. In dieser Arbeit wurden Selektionsplatten mit Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (25 µg/ml) verwendet.

##### **III. 2. 1. 1. 2. Platten- und Flüssigkulturen**

Durch Anlegen von Plattenkulturen ist es möglich Bakterienkolonien so aufzuziehen, dass sie gezielt vereinzelt werden können (bis zu einem Klon). Durch Ausstreichen einer kleinen Menge Flüssigkultur mit einem Drigalskyspatel auf einer Platte und anschließender Inkubation bei 37°C wachsen vereinzelt Kolonien auf der Platte.

Flüssigkulturen werden verwendet, um einen Bakterienklon zu vermehren. Medien mit verschiedenen Volumina werden mit einer Einzelkolonie oder einigen Tropfen einer Bakterien-suspension angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

Bakterien können bei 4°C in Flüssigkultur und auf Nährböden bis zu drei Wochen gelagert werden.

##### **III. 2. 1. 1. 3. Amplifikation von Plasmid DNA**

Je nach Art der Plasmide (low-copy/high-copy Plasmide) liegen sie in unterschiedlicher Kopienzahl im Bakterium vor. Durch das Hochziehen von Bakterien mit dem gewünschten Plasmid in einer entsprechenden Flüssigkultur (III. 2. 1. 1. 2.) kann das Plasmid ebenfalls vermehrt werden. Das bakterielle Wachstum lässt sich in 4 Phasen unterteilen. Die lag-Phase, die log-Phase, die stationäre Phase und die Absterbe-Phase. In der log-Phase sind die Bakterien optimal an die Umgebung angepasst und teilen sich exponentiell bis zur stationären Phase. Die Bakterien sollten zwischen Ende der lag-Phase und Mitte der stationären Phase für eine DNA Isolation verwendet werden.

##### **III. 2. 1. 1. 4. Anlegen von Glycerinkulturen**

Da Bakterien bei 4°C nur begrenzt haltbar sind, bedient man sich für eine längere Lagerung der Glycerinkultur. Dabei werden Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase mit dem selben Volumen an Glycerin ( $\geq 86\%$ ) gut vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. In der -70 bis -80°C Gefriertruhe sind die Bakterien so für mehrere Jahre lagerbar. Nachteil dieser Methode ist, dass die Bakterien eventuell absterben oder das Plasmid verlieren können.

#### III. 2. 1. 2. Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe von Gelelektrophoresen können linearisierte DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden.

Durch Ligation, Deletion oder Integration von DNA-Fragmenten verändert sich die Fragmentgrößen zwischen bestimmten Restriktionsschnittstellen. Diese Veränderung kann nach einem Restriktionsverdau (III.2.1.8.1) auf einem Gel sichtbar gemacht werden.

Die Gelelektrophorese beruht auf der Eigenschaft von geladenen Substanzen sich in einem Spannungsfeld entgegen ihrer Eigenladung zu bewegen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente mit einer Geschwindigkeit umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts in Richtung der Anode. Durch das Variieren der Agarosekonzentration von 0,4-2% kann man Einfluss auf den Auftrennungsgrad nehmen. Man verwendet folgende Konzentrationen für die Auftrennung von Fragmenten folgender Größe.

0,6 % Agarose zur Auftrennung von	20 kb bis 2 kb
0,8 %	10 kb bis 1 kb
1,0 %	8 kb bis 0,5 kb
1,5 %	3 kb bis 0,2 kb
2,0 %	2 kb bis 0,1 kb

Die erforderliche Menge Agarose wird in 1x TAE aufgeköcht. Nachdem das Gel auf ungefähr 50°C abgekühlt ist, wird es mit Ethidiumbromid (1/40 des Gesamtvolumens) versetzt und in einen vorbereiteten horizontalen Gelschlitten mit Taschenkamm gegossen. Nachdem das Gel gehärtet ist, kann es für die Gelelektrophorese verwendet werden.

Die aufzutrennenden Proben werden mit einem 10x DNA-Probenpuffer versetzt, welcher Bromphenol- und Xylencyanolblau enthält, die als Laufmarker dienen. Anhand eines separat aufgetragenen Größenstandards kann die Fragmentgröße der DNA bestimmt werden. In dieser Arbeit wurden der  $\lambda$  DNA/EcoRI+HindIII oder der 100 bp GeneRuler™ von MBI verwendet.

#### III. 2. 1. 3. Isolation von DNA

Die Isolation von Plasmid DNA aus Bakterien beruht auf der Methode der alkalischen Lyse und erfolgt grundsätzlich in 4 Schritten. Bakterien, die in einer Flüssigkultur angezogen wurden, werden sedimentiert und in einem alkalischen Puffer resuspendiert. Die Zugabe eines Lysispuffers schließt die Bakterien auf, so dass nach Zugabe eines dritten Puffers alle hochmolekularen Bestandteile ausfallen. Durch Zentrifugation werden diese Bestandteile von der Plasmid-DNA getrennt, welche anschließend über eine Kieselgelmembran oder durch eine einfache Ethanol-fällung (III.2.1.4.1) isoliert wird.

In dieser Arbeit werden drei Varianten der alkalischen Lyse angewendet. Zum eine die säulenchromatographische Aufreinigung von PeqLab (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) und QIAgen (QIAgen, Düsseldorf), welche benutzt wird, um DNA für Sequenzierungen (III.2.1.10) oder in größeren Mengen zu isolieren. Zum anderen die Isolation ohne Verwendung von Membranen (Alkaline Lysis DNA Isolation), die mit selbst angesetzten Puffer eine schnelle und günstige Möglichkeit bietet, nach einer Ligation (III.2.1.8.3), aus einer großen Anzahl von Klonen, DNA zu isolieren. Die Aufreinigung nach PeqLab und QIAgen erfolgte nach Instruktionen im jeweiligen Handbuch und wird daher nicht weiter erläutert.

#### Durchführung der Alkalischen Lyse ohne Membran: (Protokoll modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979)

1,5 ml einer Übernachtskultur (3 ml) werden für 20 Sekunden abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Sediment in 100 µl GTE-Puffer resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 200 µl frischer Alkali-SDS-Lösung zugegeben, mehrmals invertiert und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 150 µl Acetatlösung und anschließendem Invertieren fallen alle hochmolekulare Zellbestandteile aus. Nach weiteren 5 Minuten auf Eis wird der Ansatz für 5 Minuten zentrifugiert, um die ausgefallenen Bestandteile zu sedimentieren. Der Überstand, in dem sich die Plasmid-DNA befinden, wird anschließend in ein neues Gefäß überführt. Die Plasmide können nun entweder sofort durch Ethanol-fällung (III.2.1.4.1), oder erst nach einer Reinigung durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (III.2.1.4.2) sedimentiert werden. Das Sediment wird, nach 5 Minuten Trocknen an der Luft, in 30 dH<sub>2</sub>O gelöst.

#### **III. 2. 1. 4. Reinigung von Nukleinsäuren**

##### **III. 2. 1. 4. 1. Präzipitation von DNA mit Ethanol oder Isopropanol**

Zu der zu fällenden DNA-Probe wird das 2,5fache Volumen 100% Ethanol und Natriumacetat (Endvolumen 0,3 M; pH 5,2) gegeben. Die Fällung erfolgt bei 30 Minuten auf Eis oder über Nacht bei -20°C. Nach der Fällung wird die Probe für 15-20 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Die sedimentierte DNA wird 70% Ethanol versetzt und erneut zentrifugiert (5 Minuten). Der Alkohol wird vollständig abgezogen und das Sediment für einige Minuten an der Luft getrocknet. Anschließend wird die DNA in dH<sub>2</sub>O gelöst.

Häufig verlangt eine Restriktion mit verschiedenen Enzymen ein Umpuffern des Ansatzes da die Pufferbedingungen für das zweite Enzym nicht optimal sind. Hierfür wird meist die Fällung mit Isopropanol bevorzugt da keine langen Inkubationszeiten auf Eis nötig sind und die Fällung ohne weitere Zugabe von Salzen erfolgt. Zum DNA-Ansatz wird ein 0,7faches Volumen an 100% Isopropanol gegeben, gemischt und anschließend für 20 Minuten zentrifugiert. Nach dem Waschen des DNA Sediments mit 70% Ethanol wird die DNA in dH<sub>2</sub>O gelöst.

##### **III. 2. 1. 4. 2. Phenol-Chloroform Extraktion (“Phenolextraktion“)**

Die “Phenolextraktion“ dient der Reinigung einer Probe von Proteinen. Mit ihr kann kein Einfluss auf den Salzgehalt oder die Konzentration der Probe genommen werden.

Die aufzureinigende Probe sollte in einem Mindestvolumen von 200 µl vorliegen. Ist dieses nicht der Fall, wird die Probe mit dH<sub>2</sub>O und NaAc-Lösung (Endkonzentration 0,3 M) auf dieses Volumen aufgefüllt.

Zur Probe wird das halbe Volumen Phenol und das halbe Volumen Chloroform gegeben. Die Suspension wird gemischt und für 2 Minuten zentrifugiert. Es bilden sich zwei Phasen: die obere, wässrige Phase enthält die gelöste DNA, die untere, organische Phase die Proteine und in manchen Fällen ist eine weiße Interphase zu sehen. Durch vorsichtiges Abziehen der wässrigen Phase und anschließender Ethanol-fällung (III. 2. 1. 4. 1) kann die DNA isoliert werden. Als optionaler Schritt kann die abgezogene wässrige Phase vor der Ethanol-fällung nochmals mit einem Volumen Chloroform versetzt und erneut zentrifugiert werden.

### III. 2. 1. 4. 3. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Diese Methode wird angewendet, wenn nach einer erfolgreichen Restriktion ein bestimmtes Teilfragment aufgereinigt werden soll. Das DNA Fragment ist nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung unter UV-Licht sichtbar und kann mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel entfernt werden. Um anschließend die pH abhängige Adsorption der DNA an einer Kieselgelmembran-Säule zu gewährleisten, wird das Gelstück in einem Lösungspuffer mit hoher Salzkonzentration und einem pH-Wert  $\leq 7,5$  aufgelöst. Verunreinigungen wie überschüssige Primer, Nukleotide, Enzyme, Agarose oder Ethidiumbromid binden nicht an die Membran und können durch Zugabe eines ethanolhaltigen Waschpuffers und anschließender Zentrifugation entfernt werden. Durch Herabsetzen der Salzkonzentration und einem neutralen bis basischen pH-Wertes kann die DNA von der Membran eluiert werden. In dieser Arbeit wurde mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit“ von QIAGEN (QIAGEN, Düsseldorf) gearbeitet. Das Kit liefert alle nötigen Materialien und die Durchführung der Extraktion erfolgte nach Anweisung im Handbuch. Die Elution erfolgte in dH<sub>2</sub>O.

### III. 2. 1. 5. Konzentrationsbestimmung gelöster Nukleinsäuren

#### III. 2. 1. 5. 1. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen wird das Absorptionsspektrum zwischen den Wellenlängen  $\lambda = 220$  nm und  $\lambda = 360$  nm gemessen. Bei 260 nm besitzt die DNA ihr Absorptionsmaximum. Aus diesem Grund wird dieser gemessene Wert zur Berechnung der Probenkonzentration verwendet. Die Konzentration hängt weiterhin vom jeweiligen Verdünnungsfaktor und den Eigenschaften der Oligonukleotide ab.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mit dem Biophotometer von Eppendorf voll automatisch. Es werden Verdünnung und Art der Oligonukleotide als Variablen festgesetzt. Das Photometer misst die Absorption und berechnet die Konzentration der Probe nach folgender Formel [F1]:

$$C = OD_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{nmol/A260} \quad [F1]$$

Die Angaben (nmol/A260) zu den Oligonukleotiden kann dem Programm “Oligo“ des Gerätes entnommen werden.

Allgemein gilt:

$$\begin{aligned} 1 \text{ OD}_{260} \text{ entspricht: } & 50 \mu\text{g/ml dsDNA} \\ & 40 \mu\text{g/ml ssDNA} \\ & 20 \mu\text{g/ml Oligonukleotide} \end{aligned}$$

Nachteil dieser Methode ist die Ungenauigkeit des Photometers bei geringen DNA-Konzentrationen.

#### III. 2. 1. 5. 2. Gele zur Konzentrationsbestimmung

Ein bestimmtes Volumen der zu messenden DNA-Probe wird mit Probenpuffer und dH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 12 bis 20  $\mu\text{l}$  versetzt und neben einem DNA Standard (100 ng) auf einem 0,8 bis 1% Agarosegel aufgetragen. Unter UV-Licht lassen sich die Intensitäten der Banden vergleichen und die Konzentration der Probe kann geschätzt werden. Diese Methode ist subjektiv, jedoch auch für geringe DNA Konzentrationen geeignet.

#### III. 2. 1. 6. Transformation von DNA

Unter Transformation versteht man in der Molekularbiologie die Fähigkeit von Bakterien Fremd-DNA aus der Umgebung aufzunehmen. Diese Fähigkeit macht man sich zu Nutze, um genetisch veränderte Plasmide in Bakterien zu übertragen. Voraussetzung für diese Art der DNA Aufnahme ist jedoch die Kompetenz der Bakterien. In dieser Arbeit wurde die Transformation mittels Hitzeschock durchgeführt.

##### III. 2. 1. 6. 1. Herstellung Hitzeschock- kompetenter Zellen

(nach Chung, Niemela und Mullen, 1989)

Als kompetente Zellen wurden in dieser Arbeit *E.coli*-Bakterien (BL21 und XLIBLue) verwendet, die keine Eigenresistenz besitzen. Durch Veränderungen in der Zellwand, ausgelöst durch bestimmte Bedingungen, erlangen die Bakterien ihre Kompetenz.

##### Durchführung

Von einer 30 ml Übernachtskultur wird eine 200 ml Kultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Erreichen der log-Phase ( $OD_{600} = 0,3-0,5$ ) werden die Bakterien mit einer geringen Umdrehung (2000 rpm; Hettich Zentrifuge) abzentrifugiert. Das Sediment wird in 1/40 Volumen (5 ml) einer LB/2x TSS Mischung (Verhältnis 1:1) resuspendiert und in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Bakterien werden bei -70°C gelagert und sind in diesem Zustand mindestens 6 Monate kompetent.

##### III. 2. 1. 6. 2. Hitzeschocktransformation

Zu einem, auf Eis aufgetauten, Aliquot hitzekompetenter Zellen (100 µl) werden 50-200 ng Plasmid-DNA pipettiert, durch Invertieren gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Transformation geschieht durch eine schnelle und kurze Temperaturerhöhung, indem der Ansatz für 90 Sekunden auf 42°C gestellt wird. Anschließend wird der Ansatz für 5 Minuten auf Eis abgekühlt und mit 900 µl antibiotikafreiem Medium versetzt. Unter leichtem Schütteln bei 37°C werden die Bakterien für 45 Minuten inkubiert und letztendlich auf LB-Selektionsplatten ausgestrichen. Je nach Kompetenz der Zellen und Menge der transformierten DNA sollte nur ein Teil der Bakterien ausplattiert werden. Wird eine hohe DNA-Konzentration eingesetzt reichen 200-300 µl der Zellsuspension aus. Handelt es sich jedoch um eine Transformation mit geringer DNA-Konzentration, zum Beispiel eines Ligationsansatzes, so sollten alle Bakterien auf der Platte ausgestrichen. Es empfiehlt sich die Bakterien bei geringer Umdrehung kurz zu zentrifugieren und das Sediment in einem geringen Volumen (200 µl) auf der Platte zu verstreichen. Bei einer erfolgreichen Transformation erwerben die Bakterien meist eine, auf dem Plasmid kodierte, Resistenz und erhalten somit einen Selektionsvorteil auf entsprechenden Selektionsplatten (III. 2.1.1.2).

#### III. 2. 1. 7. Klonierung

##### III. 2. 1. 7. 1. Allgemeine Klonierung in Vektoren

Allgemein versteht man unter einer Klonierung das Einbringen eines bestimmten DNA-Fragments in ein Genom eines sich selbst replizierenden genetischen Elements. Diese Elemente, auch als Vektoren bezeichnet, sind entweder Plasmide oder Phagen-DNA, die in Bakterien eingeschleust werden können. Man unterscheidet zwei Arten von Vektoren. Zum einen den Klonierungsvektor der rein zur Amplifikation eines gewissen DNA-Stücks dient.

Zum anderen Expressionsvektoren die so konstruiert sind, dass eine ins Leseraster klonierte kodieren Sequenz transkribiert und translatiert werden kann. Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind alles Plasmide, die sich durch eine Reihe von unterschiedlichen Eigenschaften auszeichnen. Einige Eigenschaften besitzen sie jedoch alle:

- a) eine Polylinker-Region (MCS= multiple cloning site). Diese Region beinhaltet eine Reihe von Restriktionsschnittstellen, die im Vektor nur einmal vorkommen und das Einbringen des DNA-Fragments ohne Verlust anderer Eigenschaften gewährleisten.
- b) Primerbindungsstellen am Rande der Polylinker-Region, um eingebrachte DNA-Fragmente sequenzieren zu können,
- c) eine Promotorregion um eine RNA-Synthese zu ermöglichen,
- d) Antibiotikaresistenz(en) um den Bakterien einen Selektionsvorteil zu verschaffen und somit die Identifizierung von Bakterien mit Klonierungsvektor zu erleichtern,
- e) ein "Origin of Replication" damit Plasmidvektoren sich selbst replizieren können und nicht im Laufe der Zeit verloren gehen.

Die Klonierung selbst erfolgt allgemein in drei Schritten. Zuerst werden Vektor und gewünschte DNA mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten (III.2.1.8.1). Anschließend folgt die Aufreinigung der beiden linearisierten DNA Komponenten über ein Agarosegel (III.2.1.2). Zuletzt werden die aufgereinigten Komponenten ligiert (III.2.1.8.3) und das ringförmige Plasmid enthält die gewünschte DNA. Nach einer Transformation (III.2.1.6.2) in Bakterien können diese Klonierungsvektoren amplifiziert werden.

#### **III. 2. 1. 7. 2. TOPO®TA-Klonierung**

Das "TOPO®TA-Cloning-Kit" von Invitrogen (Groningen, Niederlande) ermöglicht die Ligation eines amplifizierten PCR-Fragments in einen Vektor.

Der Ligationsansatz besteht aus 2 Komponenten. Zum einen besteht er aus einem linearisierten Plasmidvektor (pCR 2.1TOPO®) mit 3' überhängendem Tymidin, an das kovalent eine Topoisomerase I (isoliert aus Vaccinia-Virus) gebunden ist. Zum anderen besteht er aus einem PCR Produkt (III.2.1.9.1), bei dem durch eine entsprechende Polymerase (High Fidelity; Promega) in einem optionalen Schritt (10 Minuten bei 72°C) am 3'-Ende ein zusätzliches Adenin angehängt wurde.

Durch Aktivierung und daraus folgendem Freisetzen der Topoisomerase I bei Raumtemperatur, kann die entstehende Bindungsenergie genutzt werden um eine Phosphodiesterbindung zwischen den beiden Komponenten zu erzeugen (Shuman, 1994).

Aufgrund des hohen Preises des "TOPO®TA-Cloning-Kits" wurde nur der halbe Ansatz der in dem beiliegendem Protokoll angegebenen Mengen verwendet. Die grundsätzliche Durchführung erfolgte jedoch wie angegeben und wird daher nicht weiter erläutert.

#### **III. 2. 1. 8. DNA-Modifikation durch Enzyme**

##### **III. 2. 1. 8. 1. Schneiden von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen**

Durch die Fähigkeit Restriktionsendonukleasen zu produzieren, können sich Bakterien vor Fremd-DNA schützen. Diese Restriktionsendonukleasen erkennen Bereiche mit spezifischer Basenabfolge und spezifischer Methylierung. Ist die Methylierung dieser spezifischen Basenabfolge unterschiedlich zu der Eigenmethylierung des Organismus, wird die DNA als



fremd erkannt und geschnitten. Die geschnittene DNA kann entweder glatt („blunt ends“) sein oder aus überhängenden einzelsträngigen DNA-Enden („sticky ends“) bestehen.

Die Molekularbiologie macht sich diese Fähigkeit zu Nutze und verwendet Restriktionsenzyme, um DNA an definierten Stellen zu schneiden. Hierdurch können, mithilfe von Gelelektrophoresen (III.2.1.2) Fragmentgrößen überprüft werden, oder DNA-Fragmente mit Plasmiden ligiert werden (III.2.1.8.3).

Da die Restriktionsenzyme aus unterschiedlichen Bakterien stammen, ist auch ihr Wirkungsmaximum in Bezug auf Salzgehalt und Temperatur recht unterschiedlich. Aus diesem Grund sollten nur die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet und die optimalen Temperaturbedingungen eingehalten werden.

Allgemein gilt folgender Restriktionsansatz:

- x µg DNA
- Reaktionspuffer (1/10 des Restriktionsansatzes)
- 1-10 U Restriktionsenzym pro µg DNA ( $\leq$  1/10 des Restriktionsansatzes)
- dH<sub>2</sub>O (auffüllen)

Das Mindestvolumen für einen solchen Ansatz liegt bei 15 µl. Die Restriktion wird bei den entsprechenden Temperaturen für 2 Stunden oder über Nacht inkubiert. Man unterscheidet zwischen einer analytischen und einer präparativen Restriktion. Die analytische Restriktion dient nur zum Prüfen, ob die erwarteten Fragmente auftreten und kann daher schon nach einer Stunde Inkubation unterbrochen werden. Bei einer präparativen Restriktion sollen die entstandenen Fragmente anschließend für Klonierungsexperimente verwendet werden. Daher wird der Ansatz für mindestens 2 Stunden inkubiert.

#### III. 2. 1. 8. 2. Dephosphorylierung von DNA-Enden

Plasmide, die zur Klonierung von DNA-Fragmenten verwendet werden, müssen häufig nur mit einer Restriktionsnuklease linearisiert werden. Da bei einer solchen Restriktion am 5' Ende der DNA die Phosphatgruppe und am 3' Ende die OH-Gruppe zurückbleiben, besteht die Möglichkeit einer Religation. Um diese zu verhindern, wird das 5'-Ende mit alkalischen Phosphatasen dephosphoryliert. Die in dieser Arbeit verwendete Phosphatase CIAP stammt aus dem Kälberdarm (calf intestine alkaline phosphatase, CIAP).

Die Dephosphorylierung wird im direkten Anschluss an die Restriktion des Plasmids durchgeführt. Hierfür werden 0,1 U der CIAP zu dem Restriktionsansatz gegeben und für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wird der Ansatz anschließend für 15 Minuten bei 68°C hitzeinaktiviert.

#### III. 2. 1. 8. 3. Ligation

Unter Ligation versteht man das Verknüpfen von mindestens zwei DNA-Fragmenten, von denen meist eines der Vektor ist. Die DNA Fragmente sollten komplementäre DNA-Überhänge besitzen oder glatte Enden aufweisen. Weiterhin sollten die 5'-Enden eine Phosphatgruppe und 3' Ende eine OH-Gruppe tragen, damit die Ligase in der Lage ist die DNA-Moleküle über Phosphodiesterbindungen zu verknüpfen.

Der Ligationsansatz setzt sich aus folgenden Faktoren zusammen:

- Vektor (linearisiert, dephosphoryliert)
- DNA Fragment
- 1x Ligationspuffer
- 1 U Ligase (hier T4-Ligase)

Das Verhältnis von Insert zu Vektor sollte bei 3:1 liegen, der gesamte Ligationsansatz sollte 20 µl nicht überschreiten. Mit der folgenden Formel lassen sich die einzusetzenden Mengen im richtigen Verhältnis berechnen:

$$\text{Masse Insert [ng]} = \frac{\text{Masse Vektor [ng]} \cdot \text{Länge Insert [bp]} \cdot 3}{\text{Länge Vektor [bp]}} \quad [\text{F2}]$$

Die Dauer der Ligation ist abhängig von der Temperatur. Diese hat nicht nur Einfluss auf die Aktivität der Ligase, sondern auch auf die „Beweglichkeit“ der einzelnen DNA-Moleküle. Die Ligationen wurden bei 18°C über Nacht durchgeführt.

#### III. 2. 1. 9. Polymerasekettenreaktion, PCR

##### III. 2. 1. 9. 1. Amplifikations-PCR

Die “Polymerase Chain Reaction“ (PCR) ist eine *in vitro* Methode zur gezielten Amplifikation von DNA-Fragmenten zwischen zwei Bereichen mit bekannter Sequenz. Zwei zur DNA komplementäre Oligonukleotide (Primer) mit nahezu gleicher Schmelztemperatur ( $T_m$ ) und gegenläufiger Orientierung, werden als Startpunkt der DNA-Synthese verwendet. Die PCR lässt sich in 3 Schritte unterteilen: die Denaturierung, die Annealingphase und die Elongationsphase. Während der Denaturierung trennen sich die beiden komplementären DNA-Stränge, so dass sich die Primer in der Annealing-Phase an die entsprechenden, komplementären Stellen der Einzelstränge anlagern können. Eine thermostabile DNA-Polymerase kann das 3'-OH Ende der Primer, durch die ebenfalls in der Lösung vorhandenen Desoxyribonukleosidtriphosphate, verlängern. Dies geschieht in der Elongationsphase. Die so neu synthetisierten DNA Fragmente können wiederum als Matrize für eine weitere Reaktion dienen. Durch mehrmaliges Wiederholen (12-30 Zyklen) dieser Reaktionsschritte kommt es zu einer exponentiellen Anreicherung der amplifizierten DNA-Fragmente. Das Temperaturprofil der Reaktion muss den jeweiligen Primern angepasst werden, wobei die Höhe der Temperatur und deren Dauer variiert werden kann. Die Annealing-Phase ist der entscheidende Schritt für die PCR und wird von der Temperatur und der Magnesiumkonzentration beeinflusst. Durch diese Parameter wird die Spezifität und Effizienz der Primerbindung bestimmt und die PCR optimiert. Als Standardansatz für eine PCR verwendet man folgende Komponenten und das folgende Temperaturprofil:

##### Standard-Ansatz:

x µl	DNA (100 ng-200 ng)
1 µl	dNTP-Mix (10 mM)
5 µl	10x Puffer
5 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
1 µl	Primer I(100 pmol/µl)
1 µl	Primer II(100 pmol/µl)
1 µl	Polymerase
	auffüllen auf 50 µl mit dH <sub>2</sub> O

Temperaturprofil für Standardansatz:

<u>Schritt</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temp.</u>	
Denaturierung	2 min	96°C	
Denaturierung	30 sec	96°C	
Annealing	30 sec	variiert	} 25 x
Elongation	1 min	72°C	
Final Extention	10 min	72°C	(optional)
Hold		4°C	

Der "Final Extention" Schritt ist optional und nur notwendig um ein PCR Fragment am 3'-Enden zu verlängern (anhängen von einem Adenosin).

Je nach Verwendungszweck des amplifizierten DNA Fragments werden unterschiedliche Polymerasen verwendet. Für Testamplifikationen zur Überprüfung von Fragmentgrößen wurde in dieser Arbeit die Taq-Polymerase (MBI) verwendet. Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten die für Umklonierungsversuche verwendet werden sollten, wurden Polymerasen mit einer „Proofreading“-Aktivität verwendet, wie die Pfu-Polymerase (MBI) oder die High-Fidelity-Polymerase von (Promega).

**III. 2. 1. 9. 2. "Klon"-PCR**

Um größere Veränderungen im Plasmid zu detektieren, wie zum Beispiel eine erfolgreiche Ligation, kann neben dem Restriktionsverdau (III.2.1.8.1) mit anschließender Gelelektrophorese (III.2.1.2) auch die Methode der "Klon"-PCR angewendet werden. Im Gegensatz zu oben genannter Methode muss man mit Hilfe dieser PCR die Plasmide nicht erst aus den Bakterienklonen isolieren, aufreinigen und verdauen, sondern kann gleich die Bakterien von der Platte nehmen. Dies ist, bei Untersuchungen von einer großen Anzahl von Klonen, eine große Erleichterung. Eine Voraussetzung ist jedoch, dass ein Teil der umliegenden Sequenz des zu untersuchenden Bereiches bekannt ist, denn für die PCR werden zwei gegenläufige Primer benötigt. Ebenso sollten die optimalen Bedingungen (Temperaturprofil, Zeitprofil, MgCl<sub>2</sub>-Konz.) für solch eine PCR bekannt sein.

Ein Teil der Bakterienkolonie wird in 20 µl dH<sub>2</sub>O gelöst. 3 µl dieser Suspension werden als DNA-Vorlage für eine PCR (III.2.1.9.1) verwendet. Der Ablauf der PCR unterscheidet sich nur im ersten Denaturierungsschritt der auf 3 Minuten erhöht wird um die Denaturierung von Proteinen und DNA zu gewährleisten.

**III. 2. 1. 10. Sequenzierung**

**III. 2. 1. 10. 1. Cycle sequencing Methode**

Die heute gängige Methode zur Bestimmung der Basensequenz wird als „Cycle sequencing“ bezeichnet. In einem Ansatz befinden sich neben der zur sequenzierenden DNA der geeignete Primer, die Polymerase, unmarkierte Desoxyribonukleotidtriphosphate und unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (Terminatoren). Die Polymerase fügt in 5'-3'-Richtung die komplementären Basen an das 3'-Ende des Primers. Wird an Stelle eines unmarkierten Nukleotids ein fluoreszenzmarkiertes Didesoxynukleotid eingebaut, kommt es zum Abbruch der Elongation, da keine OH-Gruppe mehr vorhanden ist. So entstehen viele, unterschiedlich lange, an den Enden farbig markierte Stränge, die mittels einer

Kapillarelektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden können. Mittels eines Lasers werden die Fluoreszenzsignale ermittelt und mit Hilfe eines Computers ausgewertet.

### III. 2. 1. 10. 2. Sequenzierungs-PCR

Die Amplifikation der unterschiedlichen Fragmente wird in einer PCR (III.2.1.9) durchgeführt.

Das "Taq-Dye desoxy<sup>TM</sup> Terminator Sequenzing-Kit von Applied Biosystems (Weiterstadt) beinhaltet Farbterminatoren, Desoxyribonukleotidtriphosphate, Enzym (modifizierte Taq-Polymerase) und Magnesium-Chlorid, so dass nur noch die DNA und ein entsprechender Primer zugefügt werden müssen.

Ansatz:

2 µl	Big Dye	(Taq-Dye desoxy <sup>TM</sup> Terminator Sequencing-Mix)
200-400 ng	DNA	
0,1 mM	Primer	
auf 10 µl mit dH <sub>2</sub> O auffüllen		

Die Reaktion wird in einem Thermocycler mit dem folgenden Programmdurchgeführt:

<u>Schritt:</u>	<u>Zeit:</u>	<u>Temp.:</u>	
Denaturierung	2 min	96°C	} 25 x
Denaturierung	30 sec	96°C	
Anneling	15 sec	variabel	
Elongation	4 min	60°C	
Hold		5°C	

Wie auch bei der Amplifikations-PCR ist die Annealingtemperatur von dem verwendeten Primer abhängig.

### III. 2. 1. 10. 3. Aufreinigung der Sequenzierungsreaktion

Nach der PCR wird die DNA mit Ethanol gefällt (III.2.1.4.1). Das gefällte und gewaschene Sediment wird anschließend für 3 Minuten getrocknet und in 16 µl TSR-Puffer (Template-Suppressor-Puffer; Bestandteil des Kits, Perkin Elmer) resuspendiert. Anschließend wird die Sequenzierungsreaktion für 2 Minuten bei 94°C aufgeköcht, kurz gevortext, für 5 Minuten auf Eis abgekühlt und in speziellen Sequenzierungsgefäße überführt. Die Analyse wird mit einem ABI PRISM Sequencer der Firma Perkin Elmer durchgeführt.

### III. 2. 1. 11 In vitro Transkription und Translation

Um zu überprüfen, ob eine DNA vollständig und funktionsfähig ist, kann sie mit einem kombinierten in *vitro* System transkribiert und translatiert werden. Für die zellfreie Transkription und Translation steht das TNT<sup>®</sup> Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega, Madison, WI, USA) zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um cytoplasmatische Zellextrakte, aus denen die endogene RNA sowie die endogenen Aminosäuren entfernt wurden, die aber ansonsten sämtliche, für die Proteinsynthese notwendigen Komponenten enthalten. Für die Transkription und Translation kann nun die zu transkribierende DNA und ein Aminosäuremix zugegeben werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dabei Methionin als <sup>35</sup>S-Methionin zugegeben. Je nach Vektor sollte die entsprechende Polymerase verwendet werden, deren Promotor 5' der zu transkribierenden/translatierenden DNA liegt.

Sämtliche Arbeiten mit radioaktiven Isotopen wurden in einem geeigneten Isotopenlabor durchgeführt.

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
- mit H<sub>2</sub>O auf 25 µl auffüllen.

Der Ansatz wird 1,5 h bei 30°C inkubiert.

Zur Überprüfung des markierten Proteins werden 5 µl des Ansatzes in 15 µl Probenpuffer aufgenommen und in einer SDS-PAGE (III.2.2.2) aufgetrennt. Nach einer Fluorographie (III.2.2.5) und anschließender Exposition auf einem Röntgenfilm kann die Größe des Proteins anhand des Signals bestimmt werden.

#### **III. 2. 1. 12. Identifikation von Klonen über radioaktive Hybridisierung von Filtern (“radioactive hybrid Mapping“)**

Zur Identifikation von noch nicht vollständig bekannten Genen gibt es Datenbanken bei denen alle cDNAs, oder Fragmente genomischer DNA, einzelsträngig auf Filtern fixiert wurden. Durch die Zugabe radioaktiv markierter DNA-Sonden, die den bekannten Teil des Gens enthalten, können die Sonden mit der komplementären DNA auf dem Filter hybridisieren. Diese Hybride hinterlassen ein radioaktives Signal, welches durch eine Exposition auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann. Durch eine Mehrfachbelegung des Filters mit den gleichen DNA Fragmenten und einem genauen Identifikationsmodus können Klone identifiziert werden, die DNA komplementären zur Sonde enthalten.

In dieser Arbeit wurden Filter bei RZPD (Resource Center/Primary Database) bestellt die entweder die entweder mit cDNA Fragmenten oder mit genomischen DNA Fragmenten des Zebrafischs versehen waren. Die Filter können mehrmals verwendet werden, so dass nach mehrere Gene gesucht werden kann. Die Herstellung der Sonde und die Hybridisierung erfolgte, im Gegensatz zur Identifizierung des Klons, nicht nach Anweisung von RZPD. Da die Identifikation für jeden Filter variiert wird hier nicht näher auf den Modus eingegangen. Alle Arbeiten wurden im Isotopenlabor durchgeführt.

#### **III. 2. 1. 12. 1. Radioaktive Markierung einer DNA Sonde (“Random Priming“)**

In dieser Arbeit dienten die cDNAs des Zebrafisch LAP2-Gens und des Zebrafisch LBR-Gens als Sonde. Die Sonden wurden mit <sup>32</sup>P markiertem Cytosin unter Verwendung des DNA-Labeling Kits von Fermentas markiert. Die notwendigen Reagenzien sind bis auf die Radioaktivität im Kit enthalten. Die Durchführung erfolgte in diesem Fall nur bedingt nach Anleitung.

Durchführung

50ng DNA werden mit 10 µl Hexanukleotid-Mix und dH<sub>2</sub>O (Endvolumen 40 µl) gemischt, kurz abzentrifugiert und für 10 Minuten bei 93°C denaturiert. Anschließend werden 3 µl einer Nukleotid-Mischung, die kein Cytosin enthält, sowie 6 µl radioaktiv markiertes Cytosin (mindestens 50 µCi) und 1 µl exo<sup>-</sup> Klenow Fragment (5 U/µl) zu dem Ansatz pipettiert. Während der Inkubation von 10 Minuten bei 37°C werden radioaktiv markierte, komplementäre Teilstränge synthetisiert. Durch Zugabe von 4 µl nicht markierte dNTPs und erneuter Inkubation bei 37°C für 15 Minuten werden die DNA Stränge vervollständigt. Die Proben sollten anschließend sofort bei -20°C weggefroren werden.

**III. 2. 1. 12. 2. Radioaktive Hybridisierung**

Vor der eigentlichen Hybridisierung der Filter mit der DNA-Sonde müssen diese mit einer Prehybridisierungslösung inkubiert werden. Die Prehybridisierungslösung (Hybridisierungslösung ohne Sonde) enthält in diesem Fall DNA aus dem Rinder-Thymus die unspezifisch an alle freien Stellen der Membran binden und diese damit absättigt.

Die Pre-/Hybridisierung erfolgt in speziellen Hybridisierungsröhrchen. Diese können in einem Hybridisierungsofen eingespannt und dort rotiert werden, womit eine gleichmäßige Verteilung der Sonde gewährleistet wird.

Zum Einführen der Filter in die Röhrchen werden diese zuerst mit 5xSSC angefeuchtet. Die Filter werden vorsichtig und ohne Luftblasen an die feuchten Wände des Röhrchen gedrückt. Nach Abkippen der SSC Lösung werden 15 ml der Prehybridisierungslösung in die Röhrchen gefüllt und die Filter über Nacht bei 42°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Am nächsten Tag werden 100 µl dH<sub>2</sub>O zur radioaktiven Sonde (III.2.1.12.1) gegeben und diese für 10 Minuten bei 93°C aufgekocht. Nach keiner kurzen Phase auf Eis wird die Sonde in 5 ml der Hybridisierungslösung überführt, welche, nach Entfernen der Prehybridisierungslösung, auf die Filter gegeben wird. Die Filter werden anschließend über Nacht im Hybridisierungsofen bei 42°C inkubiert. Nach der Hybridisierung folgen mehrere Waschschrte unter niedrigen Stringenzbedingungen. Zuerst wird die radioaktive Lösung entfernt und die Filter kurz in 15 ml 2x SSC geschwenkt. Der erste Waschschrte erfolgt für 30 Minuten bei 42°C im Hybridisierungsofen mit 15 ml 2x SSC/1% SDS. Anschließend werden die Filter vorsichtig aus den Röhrchen gezogen und in einer Wannen mit 1x SSC/1% SDS für 30 Minuten bei 55°C -65°C geschwenkt.

Für die Exposition werden die Filter aus der Waschlösung genommen und vorsichtig mit Haushaltsfolie überspannt. Die so verpackten Filter werden auf einer Pappe fixiert und nach eindeutiger Markierung in einer Expositionskammer auf einen Röntgenfilm gelegt. Die Exposition erfolgt über Nacht (oder länger) bei -70°C.

50% Formamid-Prehybridisierungslösung bzw. Hybridisierungslösung:

	<u>10 ml</u>	<u>20 ml</u>	<u>50 ml</u>	<u>60 ml</u>
Formamid	5,0	10,0	25,0	30,0
20x SSC	2,5	5,0	12,5	15,0
dH <sub>2</sub> O	0,2	0,4	1,0	1,2
5% Na-Pyrophosphat Na P <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	0,2	0,4	1,0	1,2
1M Tris (pH 7,5 steril)	0,5	1,0	2,5	3,0
20% SDS	0,5	1,0	2,5	3,0
50x Denhardt's	1,0	2,0	5,0	6,0
cT-DNA (calf Thymus)**	0,1	0,2	0,5	0,6

\*\* cT-DNA vor Zugabe zum Puffer für 10 Minuten bei 95°C aufkochen und dann für 5 Minuten auf Eis stellen

### III. 2. 1. 12. 3. Radiation hybrid mapping

Für die Kartierung des Zebrafisch LAP2 Gens wurde das Radiation Hybrid Panel: Loeb/NIH/5000/4000 (LN54) aus dem Labor von Marc Ekker verwendet.

Die Herstellung des Panels ist in Hukriede et al., 1999 genau beschrieben. Es handelt sich um Heterokaryons bei denen durch Bestrahlung fragmentierte genomische DNA aus AB9 Fibroblasten mit B78 Maus-Melanom-Zellen fusioniert wurden. Das LN54-Panel-Kit enthält 93 unterschiedliche Hybride, sowie beide einzelnen parentale Genome (AB9 und B78) und ein Mischung aus beiden parental Genomen.

#### Durchführung

Anhand von Primern, die spezifisch für einen Abschnitt im zu lokalisierendem Zebrafisch Gens sind, werden in einer 96 Well-Platte PCR-Reaktionen mit den DNA Proben des LN-Panel-Kits durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Fragmente werden in Agarosegelen aufgetrennt und alle positiven und negativen Ergebnisse der Reihe nach (siehe unten) mit 1 für positiv und 0 für negativ notiert. Der damit erhaltene Code, bestehend aus einer Abfolge von insgesamt 93 Einsen und Nullen, wird über die Zfin Datenbank (<http://www.zfin.org>) ausgewertet. Das Programm ermittelt eine mögliche Lokalisation im Genom und verifiziert diese mittels einem „Lod-Scores“. Je höher der Score desto verlässlicher ist die Lokalisation. Liegt der „Score“ oberhalb von 14 Punkten so ist die Lokalisation signifikant.

Um die Erstellung des Codes zu erleichtern sollte die Wellplatte für die PCR wie folgt mit den nummerierten DNA-Proben des LN54-Panel-Kits beladen werden:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	4	5	6	8	9	11	13	16	18	19
B	23	25	27	29	30	33	36	39	40	41	47	48
C	49	50	52	54	57	59	63	65	66	70	73	74
D	79	80	83	84	85	86	87	88	89	91	92	96
E	97	98	101	104	105	106	108	109	114	117	119	121
F	123	125	132	135	136	137	138	150	151	152	153	167
G	169	174	175	176	178	182	183	184	190	300	301	302
H	303	304	305	306	308	309	310	311	312	Mix	AB9	B78

Der Code ergibt sich aus der Reihenfolge von A1-H9.

### III. 2. 1. 13. Herstellung von gecappter GFP-mRNA

Um gezielt RNA in einen Organismus injizieren zu können, muss von dem entsprechenden Gen über eine *in vitro* Transkription „gecappte“- RNA hergestellt werden. Das „Cap“ besteht aus einer 5'5'-Triphosphatbindung der RNA und verleiht ihrem 5'-Ende somit eine höhere Stabilität gegenüber Phosphatasen und Nukleasen.

Die Herstellung der gecappten -RNA erfolgt in mehreren Schritten nach Anleitung des MEGAscript™ High Yield Transcription Kit und benötigt etwa 2-3 Tage.

#### Durchführung

In dieser Arbeit wurde für eine Kontrollinjektion der „Morpholinos“ „gecappte“ mRNA vom green fluorescence protein (GFP) hergestellt. Die codierende Sequenz des GFP befindet sich auf dem pCSPplus Polylinker II zwischen einem SP6 Promotor und einer *NotI* Restriktionsschnittstelle (Abb.IX.3; Anhang).

Im ersten Schritt werden über Nacht 10 µg des pCSP+Polylinker II in einem Volumen von 200 µl mit *NotI* geschnitten (III.2.1.8.1). Das Enzym wird am nächsten Tag für 20 Minuten bei 65°C inaktiviert. Anschließend wird die DNA mit Hilfe einer Phenol/Chloroformfällung (III.2.1.4.2) von Enzymen und Salzen gereinigt. Die DNA in der oberen, wässrigen Phase wird vorsichtig abgezogen, in ein neues Gefäß überführt und durch Zugabe von 100% Ethanol und Natriumacetat (III.2.1.4.1) gefällt. Nach einem Waschschrift mit 80% Ethanol wird das getrocknete DNA-Sediment in 20 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

Die *in vitro* Transkription erfolgt nach der Anleitung von Ambion. Alle benötigten Reagenzien sind in dem Kit enthalten. 2 µg DNA werden in einem Endvolumen von 20 µl mit 2x dNTPs, 10x Reaktionspuffer, Wasser und 2 µl SP6 Polymerase versetzt, kurz gemischt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die enthaltene DNA durch Zugabe von 1 µl DNase verdaut (15 Minuten, 37°C). Die verbleibende RNA wird nun entweder über eine Phenol/Chloroformfällung oder durch Zugabe von Lithiumchlorid gefällt (beschrieben im Handbuch) Für eine gründliche Abtrennung von DNA, Enzymen und Nukleotiden wird die gelöste RNA nochmals über eine Säule gereinigt (RNeasy Kit, QIAGEN; nach Anleitung im Handbuch) und in 50 µl eluiert. Eine weitere Fällung der RNA mit 3 M Ammoniumacetat und 100% Ethanol ist optional. Die RNA sollte nach einer Konzentrationsbestimmung aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt werden

## III. 2. 2. Proteinbiochemische Methoden

### III. 2. 2. 1. Proteinfällung (Chloroform oder Trichloressigsäure)

Häufig liegen Proteinproben in zu geringer Konzentration vor um sie für eine SDS-PAGE (III.1.2.2) oder eine Immunisierung einsetzen zu können. Durch Fällung können sie konzentriert werden.

#### III. 2. 2. 1. 1. Chloroform-Methanol-Fällung

Zu den zu fällenden Proteine wird das vierfache Volumen Methanol, ein einfaches Volumen Chloroform sowie das dreifache Volumen H<sub>2</sub>O gegeben und kräftig geschüttelt. Nach 1 Minute Zentrifugation bei 11.000 g 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 das Methanol mit dem Chloroform vermischt und keine Phasengrenzen mehr entstehen. Die Lösung wird für ca. 10 Minuten 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) weiterverarbeitet.

#### III. 2. 2. 1. 2. Fällung mit Trichloressigsäure

Zu einem Aliquot von 500 µl wird 125 µl 100 % TCA (Trichloressigsäure) gegeben, gemischt, für ca. 3 Stunden bei 4°C gelagert und danach bei 10.000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Sediment 1x mit 300 µl 5% TCA, 1x mit 1 ml 90% Aceton und 1x mit 100% Aceton gewaschen und danach luftgetrocknet. Die so gefällten Proteine können entweder bei -70°C gelagert oder gleich weiter verwendet werden.



### III. 2. 2. 2. SDS- Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Technik der SDS-PAGE wird dazu genutzt Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen.

Die Proteine werden in einem SDS-Probenpuffer (nach Laemmli, 1970) gelöst und aufgeköcht. Der Probenpuffer enthält neben dem reduzierenden DTT auch das denaturierende SDS (Natriumdodecylsulfat). Das SDS lagert sich an die Disulfidbrücken der Aminosäuren (2 pro AS) und verleiht dem Protein somit eine, der Größe proportionalen, negativen Ladung. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Proteine in Richtung Anode.

SDS ist weiterhin auch ein Bestandteil des Polyacrylamidgels. Das verwendete Gel besteht aus zwei Phasen mit unterschiedlicher Acrylamidkonzentration, pH-Wert und Ionenstärke. Aus diesem Grund wird das Gelsystem auch als diskontinuierlich bezeichnet. Die untere, höher konzentrierte Phase dient der Proteinauftrennung (Trenngel). Durch die Konzentration des Acrylamids wird der Vernetzungsgrad der Acrylamidmoleküle bestimmt und damit Einfluss auf die optimale Auftrennung der Proteine genommen. Je konzentrierter das Trenngel vorliegt, desto höher ist der Vernetzungsgrad und desto besser lassen sich kleinere Proteine auftrennen. Das obere, niedriger konzentrierte Gel dient der gleichmäßigen Konzentration der Proteine in den jeweiligen Taschen (Sammelgel).

#### Zusammensetzung der Gele:

	<u>Trenngel</u>				<u>Sammelgel</u>	
	8%	10%	12%	15%		
Lösung A	8,0	10,0	12,0	15,0	Lösung A	1,3
Lösung B	7,5	7,5	7,5	7,5	Lösung C	2,5
H <sub>2</sub> O	14,4	12,4	10,4	7,4	H <sub>2</sub> O	6,2
TEMED	0,01	0,01	0,01	0,01	TEMED	0,01
10% APS	0,4	0,4	0,4	0,4	10% APS	0,4

Die Angaben sind in ml und gelten für 5 Minigele. Die Zusammensetzungen von Lösung A, B, C sind in Kapitel III.1.5. beschrieben. Die Polymerisation ist eine radikalische Reaktion in der TEMED und APS zusammen als Starter fungieren. Daher sollte eines der beiden Substanzen als letztes zugegeben werden und das Gel nach kurzem Mischen sofort gegossen werden.

#### Vorbereitung der Proteinproben:

Die aufzutragenden Proben werden mit SDS-Probenpuffer (III. 1. 5) versetzt und für 2-5 Minuten bei 98°C aufgeköcht, um die Proteine zu denaturieren und eine Anlagerung des SDS zu erleichtern. Die Proben werden anschließend kurz zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu sedimentieren.

#### Aufbau der Gelapparatur und Gießen des Gels

Zwei mit Ethanol gesäuberte Glasplatten werden durch einen Abstandhalter (Spacer) getrennt, aufeinander gelegt. Die Unterseite und die Ränder werden mit Klebeband versehen und an den Seiten mit Klammern fixiert. Durch vorsichtige Zugabe aufgeköchter 0,5% Agarlösung wird der Spalt zwischen den Platten abgedichtet. Nach dem Erkalten des Agars wird die frisch

angesetzte Trenngel-Lösung zwischen die Platten gegossen, bis etwa 2/3 des Volumens aufgefüllt sind. Anschließend wird das noch flüssige Gel mit Wasser überschichtet, um einen geraden Übergang zum Sammelgel zu gewährleisten. Nach 20 Minuten sollte das Gel auspolymerisiert sein und das Wasser kann entfernt werden. Mit ebenfalls frisch angesetzter Sammelgel-Lösung wird nun das verbleibende Volumen zwischen den Platten gefüllt und der Taschenkamm vorsichtig eingeführt. Ist die Polymerisation des Sammelgels abgeschlossen kann das SDS-Gel für die Elektrophorese verwendet werden.

Die Klebebänder werden von den Platten entfernt und die Gele werden in die, mit ein wenig SDS-Laufpuffer gefüllte Gelkammer gestellt. Durch Auffüllen der oberen Kammer mit SDS-Laufpuffer entsteht ein geschlossenes System durch das ein elektrischer Strom fließen kann. Nachdem der Taschenkamm entfernt wurde, können die im SDS-Probenpuffer frisch aufgekochten Proteinproben aufgetragen werden. Durch Anlegen einer Spannung von 200 Volt und 20 mA pro angeschlossenen Gel werden die Proteine für 1,5–2 Stunden aufgetrennt. Der im Probenpuffer enthaltene blaue Farbstoff (Bromphenolblau) färbt sich gelb wenn er auf die unterste Agarschicht trifft.

Nach der SDS-PAGE können die Proteine entweder in Coomassie angefärbt werden oder auf eine Nitrozellulose übertragen werden.

#### Referenzproteine:

Zur Größenbestimmung wird eine Tasche mit Referenzproteinen beladen, die eine bekannte Größe besitzen. Die in dieser Arbeit verwendeten Referenzproteine sind Der SDS-High molecular Marker und SDS Low molecular Marker der Firma Sigma.

#### SDS High molecular marker

Myosine (Hasenmuskel)	205 kDa
$\beta$ -Galactosidase ( <i>E. coli</i> )	116 kDa
Phosphorylase b (Hasenmuskel)	97 kDa
Albumin (Rinderserum)	66 kDa
Albumin (Hühnerei)	45 kDa
Carboanhydrase (Rindererythrozyten)	29 kDa

#### SDS Low molecular marker

Albumin, (Rinderserum)	66 kDa
Albumin, (Hühnerei)	45 kDa
Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (Hasenmuskel)	36 kDa
Carboanhydrase (Rindererythrozyten)	29 kDa
Trypsinogen (Rinderpankreas)	24 kDa
Trypsin inhibitor (Sojabohne)	20 kDa
$\alpha$ -Lactalbumin (Rindermilch)	14 kDa

### **III. 2. 2. 3. Coomassiefärbung und Trocknen des Gels**

Die Färbung des Gels in einer Coomassie-Färbelösung erfolgt für ca. 20 min unter ständigem Schütteln. Anschließend wird das Gel in einer schwachen Entfärbelösung entfärbt. Der Entfärber sollte mehrmals gewechselt werden, bis auf dem Gel nur noch die angefärbten Proteinbanden zu sehen sind.

Zum Trocknen des Gel wird es auf ein Whatmanpapier gelegt und mit einer in Wasser getränkten Gelatinefolie bedeckt. Abgedeckt mit einer Haushaltsfolie wird das Gel dann unter Vakuum auf einem Heiztisch getrocknet.

### III. 2. 2. 4. Fluorographie

Radioaktiv markierte Proteine, die in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden, lassen sich nach dem Trocknen des Gels leicht durch Auflegen eines Röntgenfilms lokalisieren. Werden schwache  $\beta$ -Strahler, wie zum Beispiel  $^{35}\text{S}$ -Methionin, zur Markierung verwendet, so kann durch Lösen von Fluorophoren im Gel die Empfindlichkeit der Autoradiographie gesteigert werden. In dieser Arbeit wurde das Fluorophor PPO verwendet.

Das über Nacht entfärbte Polyacrylamidgel wird zweimal für 30 Minuten in Dimethylsulfoxid (DMSO) leicht geschüttelt und anschließend für 3 Stunden in einer 1:1 Mischung aus DMSO und PPO (Mischung =Rotifluoreszid D) inkubiert. Nach der Inkubation folgen zwei Waschstschritte mit  $\text{dH}_2\text{O}$  für jeweils 30 Minuten. Durch die Zugabe des Wassers fallen die Fluorophore aus und das durchsichtige Gel färbt sich weiß. Das Gel wird anschließend auf ein Whatmanpapier gelegt, mit Haushaltsfolie abgedeckt und unter Vakuum auf dem Heiztisch getrocknet. Nach dem Trocknen wird das Gel in eine Expositions-kammer mit "Verstärker-schicht" auf einen Röntgenfilm gelegt und bei  $-70^\circ\text{C}$  exponiert. Je nach Stärke des Signals dauert die Exposition zwischen einem Tag und einer Woche.

### III. 2. 2. 5. Western Blot

Beim Western Blot werden die im Gel befindlichen, negativ geladenen Proteine auf eine Nylonmembran transferiert und dabei fixiert. Anschließend können einzelne Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Der Transfer erfolgt in dieser Arbeit nach dem Semi-Dry-Verfahren.

Ein Stapel aus zurecht geschnittenen Whatman-Filterpapieren, Nitrozellulose und Gel wird zwischen die Kathode (Deckel) und Anode (Basis) in die Apparatur gelegt und einem elektrischen Feld ausgesetzt. Die Whatman-Filterpapiere sollten an allen Seiten mindesten 0,5 cm größer sein als das Gel, die Nitrozellulose sollte das gesamte Gel bedecken können. Um für den Transfer einen pH-Gradienten zu erzeugen, werden die Whatman-Filterpapiere, das Gel und die Nitrozellulose in drei verschiedenen Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten getaucht. Daher muss der Stapel nach einer bestimmten Reihenfolge aufgebaut sein (Abb. III.1). Um zu verhindern, dass Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten den Transfer unterbinden, wird mit einem Glasstab vorsichtig über die Filterpapiere gerollt.

Der Stapel wird folgender Maßen auf der Kathode (Graphitplatte) aufgebaut:

1. 9 Lagen in Westernblottransferpuffer-3 getränktes Whatman-Filterpapiere
2. das in Westernblottransferpuffer-3 getränkte Gel
3. die in Westerblottransferpuffer-1 getränkte Nitozellulose
4. 3 Lagen in Westernblottransferpuffer-1 getränkte Whatman-Filterpapiere
5. 6 Lagen in Westernblottransferpuffer-2 getränkte Whatman-Filterpapiere

Durch Auflegen des Deckels mit Graphitplatte entsteht ein geschlossenes Blot-System

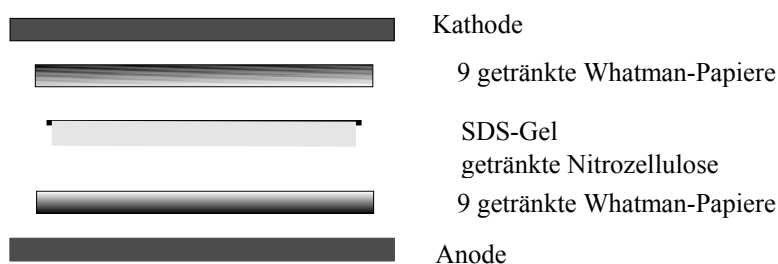


Abb. III. 1: Aufbau der Wester Blot-Apparatur nach dem Semi-Dry-Verfahren

Die angelegte Stromstärke ist abhängig von der Größe der verwendeten Whatman-Filterpapiere. Bei einer Spannung von 200 V werden 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> angelegt. Die Dauer des Transfers wiederum ist abhängig von der Proteingröße. Je größer das Protein, desto länger dauert der Transfer. In der Regel erfolgte der Transfer innerhalb von 1,5 bis 2 Stunden.

### III. 2. 2. 6. Färben der transferierten Proteine mit Ponceau S

Um die Transfereffizienz beurteilen und eventuell vorhandene Störungen (z.B. durch Luftblasen) und Unregelmäßigkeiten im Laufverhalten der Proteine erkennen zu können, werden die Proteine nach dem Transfer mit Ponceau S angefärbt. Die zu erkennenden Referenzbanden werden mit einem Stift nachgezogen, um beim späteren Entwickeln des Blots die ungefähre molekulare Masse der zu untersuchenden Proteine abschätzen zu können. Die Nitrozellulosemembran wird für ca. 30 Sekunden in der Färbelösung geschwenkt und danach mit 1x TBST entfärbt. Die Nitrozellulose kann nun für das immunologische Nachweisverfahren weiterverwendet werden.

### III. 2. 2. 7. Immunologischer Proteinnachweis durch Enhanced Chemiluminescence (ECL)

Um der Größe nach aufgetrennte Proteine auf einer Nitrozellulose zu identifizieren, können Antikörper genutzt werden, die primär ein spezifisches Epitop des Proteins erkennen. Ein sekundärer Antikörper dagegen ist gegen eine konstante Region des primären Antikörpers gerichtet, die nicht für die Antigenerkennung verantwortlich ist. Der sekundäre Antikörper ist seinerseits wieder kovalent an ein Markermolekül gebunden, welches leicht nachweisbar ist. Der ECL-Nachweis (Enhanced Chemiluminescence) basiert auf dem Prinzip, dass durch eine chemische Reaktion von 2 Substanzen (Luminol und Perhydrol) Energie in Form von Lumineszenz frei wird die 428 nm gemessen werden kann. Dies reicht aus um einen Röntgenfilm zu belichten. In diesem System ist der sekundäre Antikörper kovalent an eine Meerrettich-Peroxidase gebunden. Diese entfaltet, nach Zugabe der ECL-Komponenten eine katalytische Aktivität und das in der Lösung enthaltene zyklische Luminol wird oxidiert. Unter alkalischen Bedingungen, und verstärkt durch Enhancer (z.B. Phenol), wird bei dieser Oxidation sofort Energie, in Form von Licht, frei (Abb. III.2). Diese Lichtemission hält eine längere Zeit (HD<sub>50</sub> = 60 Minuten) an, besitzt aber ihr Maximum nach 5-20 Minuten

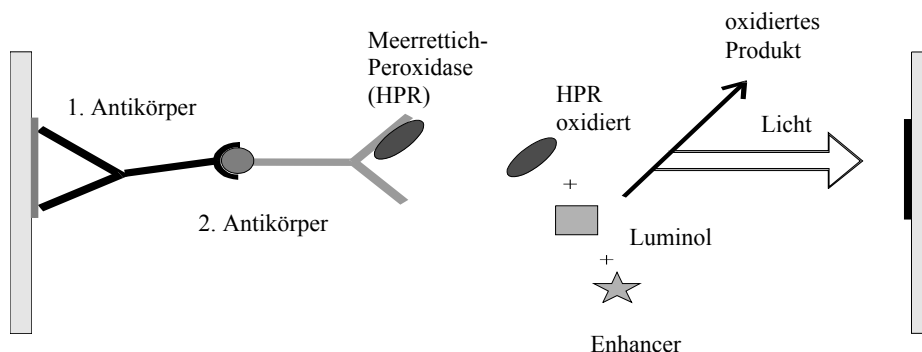


Abb. III. 2: Schematische Darstellung des ECL-Nachweises

#### Durchführung

Die Nitrozellulose besitzt die Eigenschaft alle möglichen Proteine, auch Antikörper, zu binden. Um eine unspezifische Bindung der verwendeten Antikörper an der Membran zu verhindern, wird sie nach dem Blot-Verfahren für mindestens 3 Stunden (besser über Nacht) bei 4°C in einer 5% Magermilchpulver/1x TBST Lösung (w/v) abgesättigt. Anschließend folgt die Antikörperinkubation. Die Nitrozellulose wird für 1 Stunde mit dem primären Antikörper (verdünnt in 5% Magermilch/1x TBST (w/v)) inkubiert. Durch dreimaliges waschen mit 1x TBST für jeweils 15 Minuten werden die nichtgebundenen Antikörper entfernt und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (verdünnt in 5% Magermilch/1x TBST (w/v)) folgt. Nach einem erneuten Waschschrift in 1x TBST für 1 Stunde kann die ECL Inkubation durchgeführt werden. Die Nitrozellulose wird auf eine Haushaltsfolie gelegt und mit einem 1:1 Gemisch der beiden ECL-Komponenten für 1 Minute inkubiert. Die Lösung wird mit einem Tuch vorsichtig entfernt und die Nitrozellulosemembran in die Haushaltsfolie eingeschlagen. In einer Dunkelkammer kann die Membran anschließend auf Röntgenfilmen exponiert und der Film dann entwickelt werden. Die Expositions-, Entwicklungs- und Fixierzeit sind sehr variabel. Bei der Exposition spielt die Menge an Protein und Qualität der primären Antikörper eine enorme Rollen. Die Entwicklungs- und Fixierzeit hängt dagegen vom Alter der Lösungen ab.

#### **III. 2. 2. 8. Entfernen von spezifisch gebundenen Antikörpern von der Nitrozellulose**

Soll eine bereits mit ECL entwickelte Nitrozellulosemembran mit einem weiteren Antikörper getestet werden, so müssen die bereits gebundenen Antikörper wieder entfernt werden. Da die Affinität eines Antikörpers zu seinen Epitop im sauren Milieu sehr schwach wird, kann er durch niedrigen pH abgewaschen werden.

Die Nitrozellulose wird für 10 Minuten in 1x TBST gelegt bevor sie zwei Mal für 30 Minuten in einen Glycinpuffer (200 mM Glycin, 200 mM NaCl, pH 2,3) geschüttelt wird. Anschließend wird die Nitrozellulose erneut in 1x TBST gewaschen und kann dann wie eine frisch geblottete Nitrozellulose behandelt werden.

Durch den Glycinpuffer und dem Waschen in TBST löst sich auch ein kleiner Prozentsatz von Proteinen. Daher sollte diese nicht zu häufig wiederholt werden.

#### **III. 2. 2. 9. Expression rekombinanter Proteine in *E.coli***

Mit Hilfe eines bakteriellen Expressionssystems können gezielt Proteine in Bakterien synthetisiert und anschließend aufgereinigt werden. Es gibt eine Vielzahl von Expressionssystemen, die jedoch alle nach einem ähnlichen Prinzip funktionieren. Die cDNA des zu translatierenden Gens wird im Leseraster in die Multiple Cloning Site (MCS) des Expressionsvektors kloniert. Vor dieser MCS liegt ein starker Promotor der jedoch im nicht induzierten Zustand reprimiert wird. Durch Transformation in entsprechend induzierbarer Bakterien (z.B. BL21λDE3) kann die Repression aufgehoben werden und das Protein wird exprimiert.

#### PET System von Novagen

Das pET System von Novagen (Darmstadt) ist im Katalog ausführlich beschrieben. In dieser Arbeit wurde der pET21a-Vektor (Novagen) verwendet, um Fusionsproteine mit einem C-terminalen "His-tag" (zusätzliche 6 Histidine) zu erhalten. Die zusätzlichen Histidine dienen zur späteren Aufreinigung des Proteins über eine Nickel-Chelat Säule (III.2.2.10)

Der auf dem pET21aVektor vor der MCS kodierte T7-Promotor wird durch den reprimierten lacUV5 Operator blockiert. Durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)

wird der Repressor inaktiviert, der Operator freigesetzt und die T7-Polymerase kann mit der Transkription beginnen.

#### Durchführung

Die cDNA des zu exprimierenden Proteins wird im Leseraster in die MCS des pET21a-Vektors kloniert. Da die zusätzlichen Histidine am carboxyterminalen Ende des Proteins lokalisiert sind, sollte darauf geachtet werden, dass sich kein Stopcodon vor den Histidinen befindet. Nach erfolgreicher Klonierung werden BL21λDE3 mit dem Expressionsvektor transformiert und von einer positiven Kolonie eine 30 ml Übernachtskultur angelegt.

Von dieser Übernachtskultur werden am nächsten Tag 10 ml -15 ml abgenommen um eine frische 200 ml Kultur anzupflanzen. Die Bakterien werden bis zu einer  $OD_{600} = 0,5-0,7$  (logarithmische Phase) wachsen gelassen und anschließend mit IPTG (Endkonzentration: 1 mM; IPTG-Stammlösung: 1000 mM) induziert. Nach 4-5 Stunden werden die induzierten Bakterien durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 5000 rpm sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Protein kann anschließend aufgereinigt werden.

Zur Kontrolle der Expression sollte vor und nach der fünfstündigen Induktion je 1 ml abgenommen, die Bakterien sedimentiert und in SDS-Probenpuffer aufgenommen werden. Durch eine SDS-PAGE (III.2.2.2) und anschließender Coomassiefärbung (III.2.2.3) bzw. Western Blot mit Immun-Nachweis (III.2.2.6, III.2.2.8) kann überprüft werden, ob und in welchem Maße das Fusionsprotein exprimiert wurde.

#### **III. 2. 2. 10. Reinigung des rekombinanten Proteins**

Die Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins (III.2.2.9) erfolgt über eine Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie. Hierbei sind  $Ni^{+2}$ -Kationen über einen Chelatbildner (NTA; Nitrilotriessigsäure) an ein, aus Agarose bestehendes, Säulenmaterial gekoppelt. Wird ein Proteingemisch auf dieses Säulenmaterial gegeben so binden negativ geladene Proteine mit einer höheren Affinität an die Kationen der Säule. Durch das Herabsetzen des pH-Wertes der Umgebung verändern die Proteine ihren Ladungszustand und können somit, durch den Verlust ihrer Affinität, selektiv von der Säule eluiert werden.

#### Durchführung

Das aufzureinigende Fusionsprotein befindet mit allen übrigen bakteriellen Proteinen im Bakteriensediment (III.2.2.9). Das Sediment wird in 20 ml Puffer A resuspendiert und für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Alle Proteine werden während dieser Inkubation gelöst und befinden sich nach einer Zentrifugation bei 10000 rpm für 15 Minuten (4°C) im Überstand.

Während der Zentrifugation wird die Säule mit 2 ml Säulenmaterial (Ni-NTA-Resin; QIAgen) beladen und mit reichlich Puffer A gewaschen. Das Säulenmaterial sollte während der Aufreinigung nie austrocknen, daher sollte die Nickel-Agarose vor der Beladung der Säule mit Puffer A bedeckt sein. Durch die Zugabe des proteinhaltigen Überstandes auf das Säulenmaterial können alle negativ geladenen Proteine, und somit auch das Fusionsprotein, an die Nickel-Agarose binden. Durch Elution der Proteine mit mehreren Puffern identischer Zusammensetzung aber unterschiedlicher pH-Werte (10 ml Puffer B, pH 8; 12 ml Puffer C, pH 6,3; 20 ml Puffer D, pH 5,9; 10 ml Puffer E, pH 4,5) werden alle gebundenen Proteine nacheinander von der Säule gelöst. Da der pH-Wert unbekannt ist bei dem sich das Fusionsprotein löst, wird der Durchfluss in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen und kann bei -20°C aufbewahrt werden.

Zur Überprüfung der Proteinelution werden aus jeder 2. Fraktion 10 µl entnommen und über eine SDS-PAGE (III.2.2.2) aufgetrennt. Anhand von Coomassiefärbungen (III.2.2.3) können die Fraktionen bestimmt werden, die das Fusionsprotein beinhalten. Außerdem sollten die

Fractionen mithilfe eines Western Blots (III.2.2.5) und einer Antikörperinkubation (III.2.2.7) mit anti-His-tag-Antikörpern überprüft werden.

#### Verwendete Puffer für die 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>  
0,01 M Tris/NaOH; pH 8,0

Puffer C: wie Puffer B, jedoch pH 6,3

Puffer D: wie Puffer B, jedoch pH 5,9

Puffer E: wie Puffer B, jedoch pH 4,5

#### **III. 2. 2. 11. Herstellung eines polyklonalen Antikörpers**

Durch Injektion eines Antigens (z.B. aufgereinigtes Protein) in ein Tier wird dessen Immunsystem angeregt gegen dieses Antigen Antikörper zu produzieren. Da mehrere B-Lymphozyten Antikörper gegen verschiedenen Epitope des Antigens produzieren nennt man die aus dem Serum aufgereinigten Antikörper polykonal. Das polyklonale Serum kann für einen spezifischen Proteinnachweis auf einer Nitrozellulose oder für Immunfluoreszenz verwendet werden.

##### **III. 2. 2. 11. 1. Immunisierung**

Die Immunisierung erfolgt durch drei Injektionen unter Verwendung von Freund'schen Adjuvant (Sigma). Für die erste Injektion wird das gefällte Protein in dH<sub>2</sub>O gelöst und mit gleicher Menge komplettem Freund'schen Adjuvant gemischt, bis eine einheitliche Emulsion entsteht. Das komplette Freund'sche Adjuvant enthält zusätzlich abgestorbene Bakterien, die eine stärkere Immunantwort hervorrufen. Die zweite und dritte Immunisierung erfolgen 3 bzw. 5 Wochen nach der ersten Immunisierung. Im Gegensatz zur ersten Injektion wird das Protein mit inkomplettem Freund'schen Adjuvant gemischt in dem keine bakteriellen Komponenten enthalten sind. Acht Tage nach der letzten Immunisierung kann dann das Serum gewonnen werden.

Für eine Immunisierung von Meerschweinchen sollten 100 µg Protein in einem Volumen von 1200 µl subkutan in den Nackenbereich injiziert werden. Um eine unvorhergesehene Bewegung des Tieres zu vermeiden, können die Tiere mit Ether betäubt werden.

Durch ihre kleine Körpergröße reichen bei Mäusen 50 µg pro Immunisierung aus. Das Protein wird in einem Volumen von 130 µl die Leistengegend injiziert.

#### III. 2. 2. 11. 2. Gewinnung des Serums

Für die Gewinnung des Serums werden die Tiere mit Ether betäubt. Anschließend wird mit einer scharfen Schere die Halsschlagader durchtrennt und das herausrinnende Blut über einen Trichter in einem Falconröhrchen aufgefangen. Nach einer Inkubationszeit von 1-2 h bei Raumtemperatur wird das geronnene Blut mit einer Glaspipette vorsichtig vom Rand abgelöst und das Serum über Nacht in den Kühlraum bei 4°C gestellt. Am nächsten Tag wird der Blutkuchen durch 15-minütige Zentrifugation bei 5000 rpm in der Heraeus-Zentrifuge sedimentiert. Der abgenommene Serumüberstand wird in ein neues Falconröhrchen überführt und nochmals für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das so gewonnene Serum wird aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt.

#### III. 2. 2.12. Extraktion von Proteinen durch Harnstoff

##### Durchführung

Hat die Zellkolonie in den Kulturschalen (III. 2. 3. 1) eine Konfluenz über 80% erreicht, werden die Zellen kurz mit 1x PBS gewaschen. Durch Zugabe von 2 ml 1x PBS, versetzt mit PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) und Trypsin-Inhibitor, und leichtem Scharben mit einem Zellkulturspartel, können die Zellen vorsichtig von der Schale gelöst werden. Die gelösten Zellen werden in ein Reaktionsgefäß überführt und für 1 Minute bei geringer Umdrehungszahl (1000 rpm) sedimentiert. Anschließend wird das Zellsediment in 8 M Harnstofflösung (8 M Harnstoff, 14 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM DTT (Dithiothreitol) resuspendiert, mit einem Homogenisator homogenisiert und für 15 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wird das Homogenat in Zentrifugenröhrchen überführt und für 50 Minuten bei 100000 g in der Ultrazentrifuge bei 4°C aufgetrennt. Der Überstand wird abgenommen und die darin enthaltenen Proteine entweder mit Methanol/Chloroform, oder mit Trichloressigsäure gefällt (III.2.2.1). Das Sediment wird durch Zugabe von 8 M Harnstoff und erneuter Zentrifugation (10 Minuten 100000g, 4°C) gewaschen. Sowohl das Sediment als auch die gefällten Proteine aus dem Überstand werden anschließend in SDS-Probenpuffer aufgenommen und in proportionalen Mengen durch eine SDS-PAGE aufgetrennt.

#### III. 2. 2. 13. Gewebespezifische Proteinanalyse

Für eine gewebespezifische Proteinanalyse werden dem Tier Organe wie, Herz, Darm, Leber Ovarien, Haut, Gehirn oder Leber entnommen. In dieser Arbeit wurde Gewebe aus 10 Tage alten Hühnerembryonen entfernt. Das Ei wurde vorsichtig an einer Seite geöffnet und der Embryo in eine saubere Petrischale entlassen. Aufgrund des relativ weiten Entwicklungszustandes des Embryos wird der Kopf so schnell wie möglich mit einer Schere abgetrennt. Anschließend werden die Organe unter einem Binokular präpariert und in Gefäße mit 1x PBS überführt. Um die Proteaseaktivität zu verhindern sollte das Gefäß auf Eis stehen. Nach der Präparation der Organe werden kleine Gewebestücke in mit 100% Aceton gefüllte Reaktionsgefäße überführt. Die Organe können im Aceton bei -70°C gelagert werden. Für eine Proteinanalyse mittels einer SDS-PAGE, werden kleine Stücke des Gewebes entnommen, an der Luft getrocknet und anschließend in SDS-Probenpuffer homogenisiert.

#### III. 2. 3. Zellkulturmethoden



#### III. 2. 3. 1. Kultivierung

Die Zellen werden in 50 ml Kulturflaschen mit Filterdeckel (CO<sub>2</sub> durchlässig) oder in Kulturschälchen (Durchmesser: 6 cm) bei konstanter Temperatur und konstantem CO<sub>2</sub>-Konzentration gehalten. Um eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten, wird das verbrauchte Kulturmedium alle 2 Tage durch frisches Medium ersetzt. Hierfür wird das alte Medium abgesaugt und mit 2-5 ml frischem Medium aufgefüllt (je nach Gefäß).

Die optimalen Wachstumsbedingungen für die A6- (*Xenopus leavis*) und AB9-Zelllinie (*Danio rerio*) liegt bei 27°C; 5% CO<sub>2</sub> und für Hela-Zellen (Mensch), COS-7 -Zellen (*Ceropithecus aethiops*) und Hühnchen Fibroblasten bei 37°C; 5% CO<sub>2</sub>. All diese Zellen wachsen adhärent.

#### III. 2. 3. 2. Teilen von Kulturzellen und Anlegen einer neuen Flasche

Bei einer Konfluenz von ungefähr 80%-90% werden die Zellen geteilt. Das in der Flasche/Schale enthaltene Medium wird abgesaugt und die Zellen werden mit autoklaviertem PBS gewaschen. Durch Inkubation von 1 ml Trypsin und leichtem Schwenken lösen sich die adhären Zellen vom Untergrund. Je nach Zelllinie dauert das Ablösen 1-10 Minuten.

Anschließend werden 6 ml Kompletmedium auf die Zellsuspension gegeben und 1 ml in eine Flasche/Schale überführt. Diese wird dann mit 4 ml Kompletmedium ebenfalls auf 5 ml. Nachdem sich die Zellen abgesetzt haben (4-6 Stunden) oder am folgenden Tag, sollte das Medium gewechselt werden, um das verbliebene Trypsin oder abgestorbene Zellen zu entfernen.

#### III. 2. 3. 3. Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen

Werden Zellen für eine bestimmte Zeit nicht verwendet, kann man sie bei -70°C bzw. in flüssigem Stickstoff für längere Zeit lagern und bei Bedarf wieder auftauen.

##### Einfrieren:

Wie beim Teilen einer Kultur werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin vom Untergrund gelöst. Anschließend werden sie mit 4 ml Kompletmedium versetzt und in eine steriles 15 ml Falconröhrchen überführt. Durch Zentrifugation bei geringer Umdrehung (5 min bei 1000 rpm; Hettich Universal/K2S) werden die Zellen schonend sedimentiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wird das Sediment in einer 1,5 –2 ml Einfrierlösung (7 ml Kompletmedium, 2 ml FCS, 1 ml DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Das DMSO im Einfriermedium verhindert bei langsamer Abkühlung eine Auskristallisierung des in den Zellen vorhandenen Wassers. Es beugt somit der Zerstörung der Zellen vor, wirkt aber auch als starkes Zellgift. Deshalb müssen die gefüllten Röhrchen sofort in einer Einfrierbox (Nalgene™ Cryo1C Freezing Container) bei -70°C eingefroren werden. Die Einfrierbox ist mit Isopropanol gefüllt. Der Alkohol bewirkt ein langsames und gleichmäßiges Abkühlen der Zellen, so dass die Bildung von Kristallen reduziert wird. Nach 1-2 Tagen in der Einfrierbox können die Röhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

#### Auftauen:

Zum Auftauen der Zellen nimmt man die Röhrchen am Vortag aus dem flüssigen Stickstoff und lagert sie bei  $-70^{\circ}\text{C}$ . Die Zellen sollten dann schnellstmöglichst (z.B. Wasserbad) aufgetaut und in ein steriles Falconröhrchen überführt werden. Um eine DMSO Vergiftung zu verhindern wird zusätzlich noch 4 ml Kompletmedium zugegeben. Die Zellen werden durch Zentrifugation bei geringer Umdrehung (5 Minuten bei 1000 rpm; Hettich Universal/K2S) schonend sedimentiert, in neuen 5 ml Kompletmedium resuspendiert und in Kulturflaschen überführt. Am nächsten Tag sollte das Medium nochmals gewechselt werden, um abgestorbenen Zellen zu entfernen.

#### **III. 2. 3. 4. Herstellung einer Primärezelllinie aus Hühner-Fibroblasten**

Die Fibroblasten werden aus 10 Tage alten Hühnerembryonen isoliert. Die Embryonen liegen im Ei an der oberen Seite (je nach Inkubation). Das Ei wird an der unteren Seite Aufgeschlagen und der Embryo in eine sterile Schale entlassen ohne den Dotter zu verletzen. Da der Embryo schon recht weit entwickelt ist, sollte der Kopf zügig mit einer sterilen Schere abgetrennt werden. Anschließend wird die Nabelschnur durchtrennt und der Körper in eine mit sterilem 1x PBS gefüllte Petrischale überführt. Durch einen Schnitt entlang des Rückgrats und weitem Schnitten entlang der Beine und des Halses kann die Haut vorsichtig mit einer sterilen Pinzette abgezogen werden. Die Haut wird in ein auf Eis stehendes Falconröhrchen mit 1x PBS gegeben, um die Proteinase Aktivität zu verhindern. Nachdem die Haut von 3-4 Embryonen präpariert wurde, wird das Medium abgesaugt und die Haut in 3-5 ml Trypsin für 10-15 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation werden die Hautstückchen kräftig pipettiert, um die Zellen zu lösen. Nach einer kurzen Ruhephase setzten sich die Hautteile am Boden des Röhrchens ab und der Überstand mit den Zellen kann vorsichtig entnommen werden. Der Überstand wird für 1-2 Sekunden kurz zentrifugiert, um überführte Hautteile zu sedimentieren. Der Überstand wird erneut in neue Gefäße überführt und die darin enthaltenen Zellen durch eine Zentrifugation bei 1000 rpm sedimentiert. Nach Abnahmen des Überstandes wird das Sediment in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und in Petrischalen (Durchmesser: 6 cm) bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

#### **III. 2. 3. 5. Transfektion von Kulturzellen**

Unter Transfektion versteht man das Einschleusen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Die eingeschleusten Plasmid-Vektoren besitzen neben dem prokaryotischen auch einen eukaryotischen Replikationsstart. Dies ermöglicht die Transkription von DNA-Fragmenten in eukaryotischen Zellen. Einige Expressionsvektoren, zum Beispiel pEGFP-Vektoren, kodieren außerdem für ein aus der Qualle *Aequorea victoria* stammendes, grün-fluoreszierende Protein GFP (green fluorescens protein). Das zu den Chromoproteinen gehörende GFP absorbiert Licht der Wellenlänge 488nm und emittiert es bei 507nm.

Wird ein cDNA-Fragment im Leseraster vor oder hinter (je nach Expressionsvektor) das GFP-Gens kloniert, so wird es in den Zellen als grün-fluoreszierendes Fusionsprotein exprimiert. Die Fluoreszenz kann unter entsprechender UV Anregung am Mikroskop untersucht werden und gibt Aufschluss über Lokalisation, Expressionsintensität und Verhalten des Proteins in der Zelle.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Transfektionen, unabhängig von der Zelllinie, mit dem Reagenz Roti<sup>®</sup>-Fect (Roth, Karlsruhe) durchgeführt. Roti<sup>®</sup>-Fect ist eine Liposomenformulierung eines polykationischen Lipids in Kombination mit einem neutralen Co-Lipid. Es kondensiert DNA in kompakte Strukturen (Rotifect/DNA-Komplexe) und bewirkt mittels Endocytose deren hocheffiziente Aufnahme in Kulturzellen.

Die Effektivität einer Transfektion ist stark abhängig vom Zustand der zu transfizierenden Zellen, der Zelldichte und der verwendeten DNA. Die Transfektionsrate ist im Allgemeinen bei den COS-7 -Zellen wesentlich höher als bei den *Xenopus* A6 Zellen.

#### Durchführung

Zu transfizierende Zellen werden am Vortag in 35 mM Schälchen, mit oder ohne Deckgläschen angesetzt und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Besitzen die Zellen eine Konfluenz von 50%- 80% kann eine Transfektion mit 2-5 µg DNA erfolgen.

Das Volumen der zu transfizierenden DNA sollte nicht größer als 20 µl sein. Die DNA wird für 10 Minuten bei 75°C erhitzt, um eventuell vorhandene Bakterien abzutöten, kurz abzentrifugiert und dann mit 60 µl DMEM vermischt. Auch das Rotifect (10 µl) wird mit 60 µl DMEM versetzt und anschließend zum DNA-DMEM Gemisch gegeben. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur werden weitere 800 µl DMEM zu Gemisch gegeben welches vorsichtig auf frisch mit PBS gewaschen Kulturzellen pipettiert wird. Nach einer Inkubation im Brutschrank für 4-5 Stunden werden zusätzlich 2 ml Kompletmedium zugegeben und die Zellen über Nacht im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag sollte das Medium gewechselt werden, um eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten.

#### Analyse der Expression

Der Erfolg der Transfektion kann unter dem Umkehrfluoreszenzmikroskop überprüft werden. Bei COS-7 -Zellen ist schon nach einem Tag eine deutliche Expression zu erkennen. A6-Zellen zeigen meistens erst nach zwei Tagen eine deutliche Expression. Die Zellen können nun für weitere Analysen verwendet werden.

### **III. 2. 3. 6. Vorbereitung von Zellen für eine SDS-PAGE**

Zellen die in Kulturschälchen wachsen, können auch für Proteinanalysen isoliert werden. Die Zellen werden mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit 100% Ethanol überschichtet. Nach einer Inkubation von 1 Minute können die Zellen mit einem sauberen Gummispatel vom Untergrund abgekratzt werden. Die Zellsuspension wird in Eppendorfgefäße überführt und bei geringer Umdrehung (1000-2000 rpm in der Heareus Zentrifuge) sedimentiert. Nach einem Waschschrift mit 100% Ethanol und erneuter Zentrifugation, wird das Sediment in 100% Aceton resuspendiert. Die Zellen sind in diesem Zustand bei -70°C lagerbar.

Die in einer SDS-PAGE (III.2.2.2.) zu analysierende Menge Protein kann aus dem Aceton-gemisch entnommen, sedimentiert und an der Luft getrocknet werden. Anschließend wird das Sediment in SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 2 Minuten aufgeköcht.

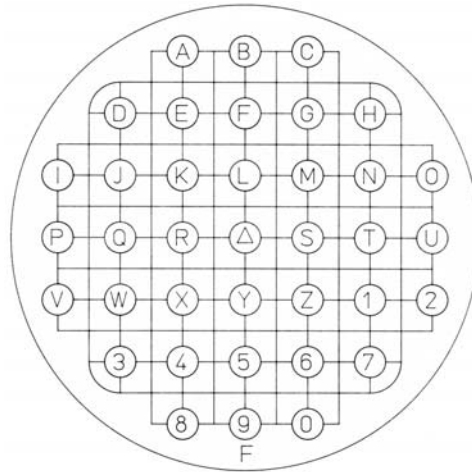
### **III. 2. 3. 7. Mikroinjektion von A6 Zellen**

Die Mikroinjektion von A6 Zellen wurde in dieser Arbeit verwendet, um Zellen an bestimmten Positionen (z. B. CELLoacte-Plättchen) mit Expressionsplasmiden zu versehen oder zwei Expressionsplasmide gleichzeitig in die Zelle zu bringen (Co-Expression).

#### Durchführung

Ähnlich wie bei der Vorbereitung der Transfektion (III.2.3.5) werden am Vortag Zellen in Schälchen mit Deckgläschen kultiviert. Da für die spätere Injektion und Analyse nur eine geringe Anzahl von Zellen verwendet werden ist es hilfreich die Zellen in einer geringeren Dichte in den Schälchen zu kultivieren. Die verwendeten Deckgläschen sollten für eine spätere Lokalisation ebenfalls markiert sein. Soll eine spezifische Zelle für spätere elektronen-

mikroskopische Analysen identifiziert werden, bietet es sich an CELLocate Plättchen (Eppendorf) zu verwenden. Diese besitzen ein eingraviertes Muster, welches eine eindeutige Identifikation ermöglicht.



**Abb. III.3: Markierung von CELLocate Plättchen (Eppendorf)**

Die bewachsenen Deckgläschen werden in eine mit Kulturmedium gefülltes 6 cm Schälchen gelegt. Unter dem Umkehrmikroskop lassen sich die einzelnen Zellen gezielt mit Injektionsnadeln (Femtotips, Eppendorf) ansteuern und können mit Hilfe des Transjektors (Transjektors 5246, Eppendorf) und des Mikromanipulators (Mikromanipulator 5171) injiziert werden. Die Injektionszeit und der Injektionsdruck haben Einfluss auf die injizierte Menge an DNA. In dieser Arbeit wurden 30 ng- 40 ng pro  $\mu\text{l}$  DNA für 0,2 Sekunden bei einem Injektionsdruck von  $P_i = 130 \text{ hPa}$  injiziert.

## III. 2. 4. Fische

### III. 2. 4. 1. Haltung und Kreuzung

Die in dieser Arbeit verwendete Zebrafische stammen aus der Zucht der Physiologischen Chemie I, Würzburg. Die Haltung, Pflege und Kreuzungen wurden von Mitarbeitern des Instituts durchgeführt und erfolgten nach standardisierten Zuchtprotokollen.

#### Haltung

Die Fische werden in einem 14 Stunden Licht – 10 Stunden Dunkel Rhythmus in Aquarien gehalten. Die Wassertemperatur beträgt zwischen  $26^\circ\text{C}$  und  $28^\circ\text{C}$  und besitzt einen Salzgehalt von 0,03%-0,04% (pH zwischen 6,8 und 7,2). Der Ammonium- und Nitritgehalt liegen unter 2 ppm und der Nitratgehalt unterhalb von 60 ppm. Die Becken werden in regelmäßigen Abständen gesäubert.

#### Befruchtung der Zebrafischeier

Für die Versuche wurden Zebrafische der Linie TÜAB verwendet, diese gelten als wildtypisch. Die Fische sollten älter als drei Monate sein und nur einmal alle 1-2 Wochen für die Eiablage herangezogen werden. Während der Dunkelphase werden 1-3 Pärchen von gleicher Größe in einen engmaschigen Käfig in ein kleines Plastikbecken gesetzt. Das verwendete Wasser sollte frisch und ohne Nahrungsreste sein. Die Tiere legen nach Einschalten des Lichtes Eier, die durch die Maschen auf den Grund absinken und somit nicht von den Eltern gefressen werden können. In einem 30 Minuten Rhythmus werden die Eier aus den Becken entnommen und für die Injektion verwendet.

#### III. 2. 4. 2. Injektion

Vor der Injektion werden sowohl die Injektionsnadel als auch die Injektionsschale vorbereitet. Die Nadeln werden aus dünnen Glaskapillaren mithilfe eines Nadelziehers gezogen. Vor der Injektion wird die Nadel mithilfe von speziellen Pipettenspitzen (Microloader, Eppendorf) mit 3 µl Injektionslösung gefüllt und in den Injektor eingespannt. Unter dem Binokular kann man durch vorsichtiges Andrücken einer flachen Oberfläche die noch geschlossene Spitze abbrechen und somit öffnen.

Die Injektionsplatte ist eine mit 0,5%-1% Agarose gefüllte Petrischale, die durch das Einlegen einer Plastikform Rillen in der ausgehärteten Agarose enthält. Die Plastikform wird vor der Injektion entfernt und die Agarose (mit Rillen) mit Danieau-Lösung bedeckt.

Die Injektion erfolgt unter einem Binokular zwischen dem 1-2 Zellstadium, also innerhalb der ersten halben Stunden nach dem Abläichen. Die Eier werden in den Rillen der Agaroseplatte so orientiert, dass die Zellen an der gegenüberliegenden Seite des Injektors liegen. Die gefüllte Nadel wird vorsichtig an das Ei herangeführt und durch eine leichte Bewegung in das Ei eingeführt. Im Ei kann die Spitze vorsichtig orientiert werden, entweder direkt in die Zelle oder im Dotter direkt unterhalb der Zelle. Durch Öffnen des Ventils kann nun die gewünschte Menge an RNA/Morpholino injiziert werden. Der verwendete Druck bei der Injektion ist abhängig von der Größe der Öffnung der Spitze und variiert daher bei jeder neuen Spitze. Die Menge an injizierter Lösung ist im Ei gut sichtbar und kann durch Veränderung des Injektionsdrucks so angepasst werden, dass sie ungefähr 1 nl beträgt.

Nach der Injektion werden die Eier bei 26°C inkubiert und nach 2 Stunden die abgestorbenen Embryonen abgesammelt. Parallel dazu wird immer eine kleine Kontrollgruppe von nichtinjizierten Embryonen aus dem selben Gelege untersucht.

#### III. 2. 4. 3. Auswertung

Nach 24-48 Stunden erfolgt die Auswertung der Injektion. Durch die Co-Injektion von GFP-RNA leuchten die injizierten Fische unter UV-Anregung grünlich. Die Fische werden nach subjektiven Kriterien aussortiert. Stark leuchtenden Fische, leuchtende Fische und nicht leuchtende Fische werden getrennt und für die weiten Analysen verwendet.

#### III. 2. 4. 4. Fotografie

Für eine komplette Aufnahme der Fische unter dem Binokular ist es notwendig die Embryonen vom Chorion zu befreien. Anschließend werden die Embryonen in Petrischalen überführt, welche mit Fischmedium gefüllt sind und mit der Digitalkamera (Nikon) fotografiert. Befinden sich die Embryonen in einem fortgeschrittenen Alter und sind beweglich, kann dem Medium ein Tropfen Betäubungsmittel MS222 zugegeben werden. Sobald die Fische in frisches Medium zurückgesetzt werden, lässt die Betäubung nach.

Für Aufnahmen unter dem Mikroskop musste das Chorion nicht entfernt werden.

Nach der Fotografie werden die Embryonen in Reaktionsgefäße überführt und homogenisiert (III.2.4.5).

#### **III. 2. 4. 5. Homogenisation**

Die Embryonen werden nach der Fotografie in Reaktionsgefäße überführt und das Medium abgesaugt. Anschließend wird 70°C warmer SDS-Probenpuffer dazugegeben, die Fische mit einer abgerundeten Glaspipette homogenisiert und anschließend für 2 Minuten bei 96°C aufgeköcht.

Um eine Degradation der Proteine zu verhindern, können die Embryonen nach dem Absaugen des Mediums in 100% Ethanol und anschließend in 100% Aceton gelegt werden. Nach dem Entfernen des Actetons werden sie dann ebenfalls in SDS-Probenpuffer homogenisiert und aufgeköcht. Diese Variante zeigte jedoch nur mäßigen Erfolg.

#### **III. 2. 5. Mikroskopische Methoden**

##### **III. 2. 5. 1. Herstellung der Präparate für die Immunfluoreszenz**

###### **III. 2. 5. 1. 1. Fixierung von Zellen**

Zum Nachweis von Proteinexpressionen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern werden auf Glasplättchen gewachsene Zellen fixiert. Je nach Analyse können verschiedene Fixierungsmethoden angewendet werden.

###### **III. 2. 5. 1. 1. 1. Fixierung mit Methanol/Aceton**

Dies Art der Fixierung wird verwendet, um membrangebundene Proteine zu detektieren. Die Zellplättchen werden aus der Petrischale genommen und in 1 x PBS gewaschen, um Medienreste zu entfernen. Die Fixierung erfolgt für 5 Minuten bei -20°C in Methanol und anschließender Dehydrierung in Aceton (-20°C). Damit die Zellen nicht austrocknen, werden sie letztlich in 1x PBS gestellt und sofort für die Antikörperinkubation verwendet (III.2.5.4).

###### **III. 2. 5. 1. 1. 2. Fixierung mit 3% Paraformaldehyd**

Zur Analyse von diffus verteilten Proteinen im Zellkern fixiert man die Zellen mit Paraformaldehyd. Da die Membranen bei dieser Fixierung undurchlässig bleiben, müssen sie für eine Antikörperinkubation zuvor mit Triton permeabilisiert werden.

Nach dem Waschen der Zellen in 1x PBS werden sie für 20 Minuten mit 3% Formaldehyd (in 1x PBS) fixiert. Nach einem erneuten Waschschritt erfolgt eine fünfminütige Inkubation der Zellen für mit 0,3% Triton (in 3% Formaldehyd /PBS). Vor der Antikörperinkubation müssen die Zellen noch einmal mit 1x PBS gewaschen werden.

###### **III. 2. 5. 1. 1. 3. Fixierung mit Glutaraldehyd**

Diese Fixierungsmethode ist zwar für eine anschließende Antikörperinkubation ungeeignet, kann aber verwendet werden, um die Einflüsse von fluoreszierende Fusionsproteine auf die Zellmorphologie zu untersuchen. Mögliche Artefakte die durch Antikörperinkubationen auftreten können, sind bei dieser Fixierung ausgeschlossen.

Die verwendete Glutaraldehydkonzentration und die Inkubationszeiten sind sehr variabel und basieren auf Erfahrungswerte. Prinzipiell werden die, mit Zellen bewachsenen, Plättchen kurz in 1x PBS eingetaucht, um das Medium zu entfernen. In einer feuchten Kammer werden die Plättchen anschließend mit einem Tropfen Glutaraldehyd bedeckt. Nach der Fixierung werden die Plättchen kurz in 1x PBS gewaschen und dann auf einen Tropfen Mowiol auf einen

Objektträgern gelegt. Sollen nur die Expression eines Fusionsproteins analysiert werden so reicht eine Fixierung für 15 Minuten mit 1,25% Glutaraldehyd aus.

Diese Fixierung wird auch für Proben verwendet die am Transmissions-Elektronenmikroskop analysiert werden sollen. Zu erst werden die Proben für 30 Minuten in 2,5% Glutaraldehyd mit Ionen (2,5% Glutaraldehyd; 50 mM Cacodylat pH 7,2; 50 mM KCl; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>) fixiert. Anschließend werden sie kurz in 1x PBS gewaschen und können bis zur weiteren Fixierung und Kontrastierung (III. 2. 5. 5.) in 1x PBS bei 4°C gelagert werden.

#### **III. 2. 5. 1. 2. Herstellung von Gefrierschnitten**

Für die Immunlokalisation bestimmter Proteine in Geweben können Gefrierschitte angefertigt werden, die mit entsprechenden Antikörpern inkubiert werden können.

##### Durchführung

Zu erst werden dem Tier Teile der gewünschten Organe entnommen. Diese werden sofort auf eine Tropfen "Tissue Tek" gelegt und so schnell wie möglich in -70°C kaltes 2-Methylbutan getaucht. Die Gewebe sind in diesem Zustand (2 Methylbutan, -70°C) über lange Zeit haltbar. Für die Gefrierschnitte wird das Gefriermikrotom auf -20°C abgekühlt. Die Proben werden aus der Tiefkühltruhe genommen und mit dem "Tissue-Tek" auf speziellen Platten fixiert. Die Platte kann anschließend so in das Gerät gespannt werden, dass dünne Schnitte von dem Gewebe hergestellt werden können. Die Schnitte werden anschließend auf Objektträger überführt, die zuvor mit 100% Aceton entfettet wurden. Durch kurzes Eintauchen in frisches 100% Aceton und anschließendem Trocknen an der Luft werden die Schitte auf dem Objektträger fixiert und können für Immunlokalisationen (III.2.5.2) verwendet werden. Außerdem sind die Schnitte in diesem Zustand auch bei -70°C haltbar.

#### **III. 2. 5. 2. Antikörperinkubation**

Die Antikörperinkubation erfolgt nach einer Fixierung der Zellen mit Methanol/Aceton (III.2.5.1.1.1) oder Paraformaldehyd (III.2.5.1.1.2). Alle Schritte finden in einer feuchten Kammer statt, um eine Austrocknung der Zellen zu verhindern. Pro Deckgläschen benötigt man ca. 100 µl verdünnten Antikörper.

##### Durchführung

Die gewaschenen Zellen werden zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen mit 0,5% BSA (in PBS) überschichtet. Die Inkubation mit dem primären und sekundärem Antikörper erfolgt jeweils für 30 Minuten. Dazwischen sollten die Plättchen 3x 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen werden. Soll gleichzeitig noch eine DNA-Färbung durchgeführt werden, so wird in den letzten 10 Minuten der sekundären Antikörperinkubation verdünnter Hoechst-Farbstoff (1:1000 in PBS; Hoechst 33258, Hoechst, Frankfurt) dazugegeben.

Die Antikörper werden individuell in PBS/5% BSA verdünnt. Nachdem die restliche Antikörper mit 1x PBS von den Zellen gewaschen wurden, werden die Plättchen für 1 Minute in Rotisol (technisches Ethanol) fixiert und noch im feuchten Zustand mit Mowiol auf Deckgläschen eingebettet.

#### **III. 2. 5. 3. Immunfluoreszenzmikroskope**

Präparate die eine Eigenfluoreszenz (z. B. GFP-Fusionsproteine) oder mit Antikörpern inkubiert wurden, können mit Hilfe von Immunfluoreszenzmikroskopen analysiert werden. Durch UV Anregung mit spezifischer Wellenlänge können Farbmarkierungen detektiert

werden. In der folgenden Tabelle sind die Anregungswellenlängen und die Maxima des emittierten Lichts für die verwendeten Fluoreszenzmarkierungen aufgeführt.

**Tab. III. 10: Detektion von Fluoreszenzmarkierungen**

	Anregungswellenlänge	Maximum des emittierten Lichts
GFP	488 nm	520 nm
Texas Red	568 nm	570- 580 nm
Höchst	365 nm	>397 nm

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit drei verschiedenen Fluoreszenzmikroskopen gearbeitet. Das Umkehrfluoreszenzmikroskop IM35 und das Fluoreszenzmikroskop Axiphot Stereo dienten nur zur Überprüfung ob Transfektionen (III.2.3.5) oder Injektionen (III.2.3.7) erfolgreich waren. Für die exakte Analyse eines Zellpräparats wurde das konfokale Laser Scanning Mikroskop verwendet.

#### **III. 2. 5. 4. Analyse von Zellen am konfokalen Laser Scanning Mikroskop**

Bei der Anregung eines Präparats mit UV-Licht emittieren alle Ebenen einer Zellen Licht, dies führt oft zu einer Unschärfe im zu analysierenden Bild, besonders bei höherer Vergrößerung. Das CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope, Typ TCS SP; Leica, München) bietet die Möglichkeit fluoreszierende Zellpräparate exakt zu analysieren. Aufgrund einer elektronischen Bildverarbeitung mit Hilfe eines Lasers ist es möglich nur eine Ebene eines Präparats zu untersuchen. Der Laser fokussiert beim Scannen des Präparates, immer nur einen ganz bestimmten Punkt in einer definierten Ebene. Alle Fluoreszenzsignale umliegender Ebenen werden hierbei unterdrückt. Die gesammelte Bildinformation wird über ein angeschlossenes Computersystem (Software Programm Leica TCS NT 1.6.587; Leica Microsystems Heidelberg GmbH) wiedergegeben.

Die anschließende Bearbeitung der Bilder wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Adobe Photoshop durchgeführt.

#### **III. 2. 5. 5. Herstellung von Präparation für das Transmissions-Elektronenmikroskop**

Die für das Elektronenmikroskop verwendeten Proben müssen für die Analyse in einer sehr dünnen Schicht vorliegen damit die Elektronen sie auch durchdringen können. Die Proben werden zuerst fixiert und kontrastiert. Anschließend folgt eine Einbettung in einen Kunststoffharz (Epon 821) von dem schließlich mit einem Spezialmikrotom ultradünne Schichten abgeschnitten werden können. Die Ultradünnschnitte werden vor der Untersuchung im Elektronenmikroskop noch kontrastiert.

##### **III. 2. 5. 5. 1. Präparation von Zellen für das Transmissionselektronenmikroskop**

###### Lokalisation von injizierten Zellen

Die auf CELLocate Plättchen (CELLocate<sup>®</sup> Coverslips) kultivierten Zellen (III.2.3.1) werden 1-2 Tage nach einer Mikroinjektion (III.2.3.7) mit Glutaraldehyd (III.2.5.1.1.3) fixiert. Anhand des auf die Plättchen gedruckten Rasters kann die exakte Lage von GFP-Fusionsprotein exprimierenden Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ermittelt und festgehalten werden. Diese Information ist für die spätere Herstellung von Ultradünnschnitten (III.2.5.6) und für die Analyse unter dem Elektronenmikroskop von Bedeutung. Die Identifikation der einzelnen Zelle unter dem Elektronenmikroskop wird dadurch erleichtert, dass auch die Position der umliegenden Zellen vermerkt werden.



#### Fixierung, Kontrastierung und Entwässerung der Zellen

Nachdem die Lage der zu untersuchenden Zellen festgehalten wurde, folgt ein zweiter Fixierungsschritt. Die Zellen werden kurz in Cacodylatpuffer (50 mM) getaucht und anschließend mit 2% Osmium-Tetroxid ( $\text{OsO}_4$  in 25 mM Cacodylatpuffer) fixiert. Im Gegensatz zum Glutaraldehyd, reagiert Osmium mit Doppelbindungen in aromatischen Aminosäuren und in Fettsäuren. Zusätzlich verringert das Osmium-Tetroxid durch Anlagerung an Doppelbindungen die Valenzstufen der Atome und bewirkt somit eine Schwärzung des Präparates. Nach 1 Stunde Inkubation wird das Osmium durch Eintauchen in  $\text{dH}_2\text{O}$  abgewaschen und die Zellen über Nacht in 0,5% wässrigem Uranylacetat kontrastiert.

#### Entwässerung

Da die Proben für die Einbettung in Epon völlig flüssigkeitsfrei sein müssen, werden sie durch eine Alkoholreihe entwässert. Hierbei sei anzumerken, dass flüssigkeitsfrei nicht gleichbedeutend ist mit trocken! Zellen die an der Luft trocknen verlieren ihre Struktur und sehen unter dem Elektronenmikroskop völlig zerstört aus. Aus diesem Grund sollte die Entwässerung zügig durchgeführt werden.

Die Plättchen werden für jeweils 5 Minuten in 50%, 70%, 90% und 96% kalten Ethanol getaucht. Anschließend folgten jeweils zwei fünfminütige Inkubationen in 100% Ethanol und Propylenoxid (Vorsicht, Propylenoxid verdunstet sehr schnell!) bei Raumtemperatur. Die Plättchen werden nun in ein 1:1 Gemisch aus Propylenoxid und Epon überführt. Nach 1-2 Stunden werden die Plättchen in reines, frisch angesetztes Epon gelegt und über Nacht inkubiert.

#### Einbettung

Für die Einbettung werden die Plättchen aus dem Epon genommen und auf einen mit Alufolie bezogenem Objektträger gelegt. Das zähe Epon kann vorher leicht abgestreift werden. In eine mit Epon gefüllte Gelatinekapsel wird ein kleiner Zettel mit Identifikationsnummer gegeben und vorsichtig auf die Mitte des Objektträgers gesetzt. Zum Aushärten kommt die Kapsel über Nacht in einen  $60^\circ\text{C}$  Brutschrank.

#### Absprengen des Plättchens

Die getrockneten Eponkapseln werden aus dem Brutschrank genommen und vorsichtig von der Aluminiumfolie gelöst. Die Unterseite der Plättchens wird mit Hilfe einer Rasierklinge von trockenem Epon befreit und anschließend an den Rändern auf die Größe der Kapsel zugeschnitten. Das Absprengen des Plättchens beruht auf den verschiedenen Ausdehnungseigenschaften des Plättchens und des Kunststoffes. Durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff kühlen beide Fraktionen gleichmäßig ab, das Auftauen dagegen erfolgt unterschiedlich schnell. Dadurch entstehen zwischen beiden Komponenten Spannungen die bei Verwendung von etwas Luftdruck ein Ablösen des Plättchens vom Epon bewirken.

Die Zellen befinden sich nun auf der flachen Seite der Eponkapseln und können mit Ultramikrotom angeschnitten werden (III.2.5.6).

### **III. 2. 5. 6. Herstellen von Ultradünnschnitten**

Für das Herstellen von Ultradünnschnitten kann nur ein kleiner Teil des Epons verwendet werden, da sich die Schnitte ansonsten wellen oder reißen. Aus diesem Grund werden unter einem Binokular die Eponkapseln so angeschnitten, dass an den entsprechenden Stellen eine abgeflachte Pyramide entsteht. An der Oberseite der Pyramide sollten die injizierten Zellen bzw. das Gewebe liegen. Die exakte Position kann bei den Zelleinbettungen auf CELLocate

Plättchen aufgrund des Rasters (Abb. III.3) ermittelt werden. Die Buchstaben bzw. Zahlen haben sich ebenfalls im Epon abgedrückt und erleichtern damit die Suche.

Nachdem die Pyramide zugeschnitten wurde, werden mit einem Diamantmesser am Ultramikrotom Schnitte mit einer Dicke von 50-60 nm angefertigt. Mehrere dieser Schnitte werden auf ein mit Pioloform beschichtetes Netzchen gelegt und anschließend kontrastiert.

#### **III. 2. 5. 7. Kontrastierung**

Zur Kontrastierung werden die Netzchen mit der beschichteten Seite nach unten auf eine Tropfen 2% Uranylacetat (in Ethanol) gelegt und für 15-20 Minuten inkubiert. Durch kurzes Eintauchen des Netzchens in 100% Ethanol, 50% Ethanol, reines dH<sub>2</sub>O und anschließend abspülen mit einer Spritzflasche werden die Proben gewaschen. Das feuchte Netzchen wird an einem Filterpapier abgestreift und mit der beschichteten Seite nach unten für 10 Minuten auf einen Tropfen Bleiacetat gelegt. Nach dreimaligem waschen mit dH<sub>2</sub>O und gründlichem Abspülen der Netzchen mit dH<sub>2</sub>O werden sie an einem Filterpapier abgestriffen und können nach dem Trocknen am Transmissionselektronenmikroskop untersucht werden.

#### **III. 2. 5. 8. Analyse am Transmissions-Elektronenmikroskop**

Elektronenmikroskope besitzen im Vergleich zu Lichtmikroskopen ein recht hohes Auflösungsvermögen. Mit ihnen kann man Unebenheiten von bis zu 0,2nm sichtbar machen. In dieser Arbeit wurde das Transmissions-Elektronenmikroskop dazu verwendet den Zellkern und seine morphologischen Veränderungen nach Überexpression eines Proteins zu beobachten. Der Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops ist vergleichbar mit dem eines Lichtmikroskops. Im Gegensatz zu Lichtmikroskop wird jedoch eine Elektronenstrahl als Strahlenquelle verwendet. Eine V-förmige Kathode wird im Vakuum auf ca. 2000°C erhitzt. Die dabei emittierten Elektronen beschleunigen im Hochvakuum fast auf Lichtgeschwindigkeit bevor sie auf eine lochblendenähnliche Anode treffen. Die Elektronen durchdringen das in den Strahlengang eingeschleuste Präparat und erzeugen auf einem fluoreszierenden Bildschirm ein entsprechendes Abbild.

#### Aufnahmen am Zeiss EM10, Entwicklung der Negative und Bildbearbeitung

Durch eine eingebaute Kamera mit automatischer Belichtungssteuerung können elektronenmikroskopische Aufnahmen hergestellt werden. Die Plattenfilme (EM- Plattenfilm; Kodak) werden mit einem Kodak-D19 Negativentwickler entwickelt und anschließend mit einem Tetenal Schnellfixierer fixiert. Die Negative werden mit einer Auflösung von 1000 dpi eingescannt und mit dem Adobe Photoshop bearbeitet.

## IV. Das Lamina assoziierte Polypeptid 2 des Zebrafisch (zLAP2)

### IV.1. Ergebnisse

#### IV. 1. 1. Charakterisierung und Strukturanalyse des genomischen zLAP2

##### IV. 1. 1. 1. Identifikation der genomischen Sequenz des Zebrafisch LAP2 Gens

Zur Identifikation der genomischen Sequenz des Zebrafisch LAP2 Gens wurden zwei unabhängige Strategien verfolgt. Zum einen wurde mit den bekannten Sequenzen der drei zLAP2-Isoformen (AJ320190; AJ320191, AJ320192, Schoft et al., 2003) ein Blast Search in verschiedenen Datenbanken (NCBI, Sanger) durchgeführt. Zum anderen wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde eine „Cosmid-Bibliothek“ von RZPD (Resource Center/Primary Database) untersucht.

##### IV. 1. 1. 1. 1. Identifikation einer genomischen Sequenz über die Datenbank

Unter Verwendung der cDNA Sequenzen der drei bekannten zLAP2-Isoformen (zLAP2 $\omega$ : AJ320190; zLAP2 $\beta$ : AJ320191, zLAP2 $\gamma$ : AJ320192, Schoft et al., 2003) konnte in der Datenbank des Sanger Institutes (www.sanger.ac.uk) über Blast Search eine contig-Sequenz identifiziert werden. Das contig10273.2 ist 200000 bp groß und beinhaltet im Abschnitt 98083 bp bis 117077 bp alle Sequenzabschnitte der drei Isoformen. Die Identität der contig-Sequenz zu den einzelnen Teilabschnitten der cDNA-Sequenzen liegt zwischen 95% und 100%. Diese identischen Teilabschnitte stellen die Exons des zLAP2 Gens dar. Durch einen Vergleich der zLAP2 $\omega$  cDNA und der contig-Sequenz über das Spidey Programm wurden sinnvolle Exon/Intron Grenzen für alle Exons nach der GT/AG Regel ermittelt. Hierdurch konnten 15 Exons identifiziert werden, die für 60 bis 364 Aminosäuren kodieren (Abb. IV.1).

MSEFLEDPSVLTKDKLKSALLANNVALPNGDQRKDVYVQLYLKLNLTQVQNKSSGSPDVFSSDEELP  
 Exon1  
PAPVVSNRSRSGR KATRKTDKVRPDDVDVTELSNEGLKDLLLKYGLNAGPIV ASTRKVYEKRLQ  
 Exon 2  
KLLDQGPPVAVALPSETSQTGDNQNGNNDSDQYSDREE EPVAPAPVTVPEPEVEAEELIPVVERPV  
 Exon 3 Exon 4  
RSRGKTPVTSRTRSGQHTR EDVEEEDWPVLNVKRLKLRSSHRPDQMPASDDT ENSELSSAECF  
 Exon 5 Exon 6  
FAVSEDRRRTGPG AGRRETRPLLSDRSTSKLSSKSESLRRRSAPVRSVLNEASSDK DFSEPSIV  
 Exon 7 Exon 8  
KEVSVSLMRMKVQPL TVPKDPKPSKRYSMSATESTKRPVSSMNNK HDENTADIPSPPHRQSSRE  
 Exon 9 Exon 10  
PLVSLINTACVE VDDQGMQDVLSCRSANGGLL AQGVRSAAVSKLSKPVLSQSKPSKPLVDMCC  
 Exon 11 Exon 12  
LSPSSDRQKE ESCGSPQTHPKSRHSKITPFLSQITPVRGLDNKLMKMETMM VEKVS AidQTPR  
 Exon 13 Exon 14  
AVERDVLKEIFPTENLNTPTGI ATCRRPIRGAAGRPLIDTWNESRQRLSDLKQTTSSSSFSSTS  
 Exon 15

SYTESRSVPRVSSIPLSASKSTAPPTVKRSRRSLPVWVQLVLLSAVAGFLFFIYQAMETNDVGLF  
KQSGTDDSTSK

### **Abb. IV.1: Exons aus dem genomischen LAP2 des Zebrafisch**

Aminosäuresequenz der LAP2 $\omega$ -cDNA (AJ320190); Exon Grenzen ermittelt mit Hilfe der genomischen Sequenz (contig10273.2); unterstrichen: Exons; Lücken: Exongerenzen

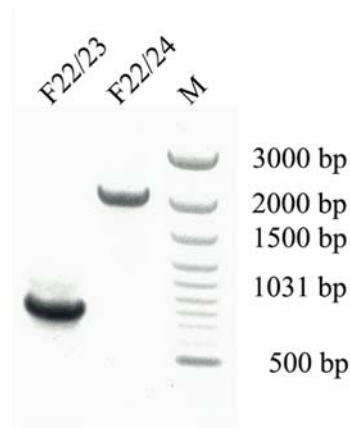
### **IV. 1. 1. 1. 2. Identifikation eines genomischen Klons für zLAP2 über radioaktive Hybridisierung**

Mit Hilfe des im Blueskript Vektor vorliegenden zLAP2 $\omega$ -cDNA Klons wurden eine radioaktiv markierte DNA-Sonde hergestellt, welche für eine Hybridisierung mit einer Cosmid-Bibliothek verwendet wurde. Die 1,9 kb große cDNA wurde über eine PCR mit Primern T7 und T3 amplifiziert und nach der Aufreinigung über "Random Priming" (III.2.1.12.1) mit <sup>32</sup>P-markiertem Cytosin versehen. Die unter hohen Stringenzbedingungen stattfindende Hybridisierung von 3 Cosmid-Filtern (bestellt von RZPD) mit der Sonde ergab mehrere Signale, von denen zwei als sehr deutlich und 6 eher schwach einzustufen waren. Der genomische Klon mit dem stärksten Signal (ICRFc 7101293Q5) wurde bei RZPD bestellt und im lawrist7-Cosmid geliefert.

### **IV. 1. 1. 1. 3. Überprüfung der Datenbank Sequenz mit der Sequenz des genomischen Klons**

Die vom Sanger Institut erhaltene Sequenz wurde über ein "shotgun" Verfahren ermittelt. In diesem Verfahren werden genomische Fragmente von verschiedenen Stellen aus sequenziert und anschließend an identischen Stellen zusammengefügt. Falls einige Segmente nicht eindeutig zusammenpassen, werden die Übergänge mit NN's markiert um auf eventuelle Unstimmigkeiten hinzuweisen. Obwohl es unwahrscheinlich ist, dass großflächige Sequenzierfehler vorhanden sind, können beim Zusammenfügen der einzelnen Segmente dennoch Fehler auftreten. Im contig10273.2 befinden sich mehrere mit NN's markierte, unbekannte Regionen. Zwei dieser unbekanntenen Regionen liegen in der putativen genomischen Sequenz vom zLAP2.

Die Frage inwieweit die Nukleotidabfolge der bei Sanger zugänglichen Sequenz mit dem des genomischen Klons ICRFc 7101293Q5 übereinstimmt und somit Verlass auf den Klon und die contig 10273.2 Sequenzen ist, wurde durch Amplifikation zweier Fragmente mit den Primern 22 und 23 sowie mit Primern 22 und 24 aus dem Klon ICRFc 7101293Q5 in Angriff genommen. Beide über PCR amplifizierten Fragmente besaßen die erwarteten Größe von 800 bp (F22/23) bzw. 2000 bp (F22/24) (Abb. IV.2).



**Abb. IV.2:Größenvergleich von PCR-Produkten aus dem genomischen Klon ICRFc 7101293Q5**

Fragmente wurden mit unterschiedlichen Primern aus dem RZPD Klon ICRFc 7101293Q5 amplifiziert und in einem 1% Agarosegel aufgetrennt; Zahlen geben die verwendeten Primer an (Kapitel: III.1.8); Marker: 100 bp Gen Ruler (Fermentas)

Fragment F22/23 beinhaltet den genomischen Bereich von Exon 8 bis Exon 12. Dieses Fragment wurde nach der Amplifikation in den TOPO<sup>®</sup>-Vektor umkloniert und anschließend mit den M13 Primern (Forward und Reverse) in beide Richtungen ansequenziert. Der Vergleich der Sequenzierung und der bei Sanger zugänglichen Sequenz zeigt eine hohe Übereinstimmung sowohl in den Exons als auch in den Introns (Abb. IV.3).

A)

Contig: **CAATAGTGAAGGAGGTGTCTGTTTCTCTGATGAGGATGAAAGTACAGCCTTTG**gtaggctc  
 F22/23: **CAATAGTGAAGGAGGTGTCTGTTTCTCTGATGAGGATGAAAGTACAGCCTTTG**gtaggctc

Contig: cagtagaaagcattcatgaacatcatgtcatattctagtgccaccgtgttacttacattg  
 F22/23: cagtagaaagcattcatgaacatcatgtcatattctagtgccaccgtgttacttacattg

Contig: ctcttacattaataaag**ACAGTGCCGAAGGATCCCAAACCTCTAAGCGCTACTCCATGT**  
 F22/23: ctcttacattaataaag**ACAGTGCCGAAGGATCCCAAACCTCTAAGCGCTACTCCATGT**

Contig: **CTGCAACAGAATCAACAAAACGCCAGTATCCAGT**TGAACAACAAGgtgtcagagctat  
 F22/23: **CTGCAACAGAATCAACAAAACGCCAGTATCCAGT**TGAACAACAAGgtgtcagagctat

Contig: gtttcttaagcatccataaatataaaagcctcgcatttaacagttgagctgattggttt  
 F22/23: gtttcttaagcatccataaatataaaagcctcgcatttaacagttgagctgattggttt

B)

Contig: ttacatctctagttgatgcttttcagctttttaagcaatatattagatctatccagctctca  
 F22/23: ttacatctctagttgatgcttttcagctttttaagcaatatattagatctatccagctctca

Contig: ttttgaattaattgcatgttcattatgctacattaataaatcag**GTGGATGACCAGGTA**  
 F22/23: ttttgaattaattgcatgttcattatgctacattaataaatcag**GTGGATGACCAGGTA**

Contig: **TGCAGGACGTCCTGAGCTGTAGATCTGCAAATGGTGGTCTTCTG**gtatggtttcgcagtta  
 F22/23: **TGCAGGACGTCCTGAGCTGTAGATCTGCAAATGGTGGTCTTCTG**gtatggtttcgcagtta

## IV. Das Lamina assoziierte Polypeptid 2 des Zebrafisch (zLAP2)

Contig: tgcactgcttataactctatttaaataacattttggcagcttatgaggctctgtttattc  
F22/23: tgcactgcttataactctatttaaataacattttggcagcttatgaggctctgtttattc

Contig: tctaaagGCCCAGGGTGTCTAGATCTGCTGCCGTATCGAAGCTTCAAAGCCTGTTTTGAG  
F22/23: tctaaagGCCCAGGGTGTCTAGATCTGCTGCCGTATCGAAGCTTCAAAGCCTGTTTTGAG

Contig: **TCAGAGCAAACCTTCCAAACCCTTGGTAGACATGATGTGCTGTCTCTCGCCTTCCAGTGA**  
F22/23: **TCAGAGCAAACCTTCCAAACCCTTGGTAGACATGATGTGCTGTCTCTCGCCTTCCAGTGA**

### Abb. IV.3: Sequenzierung von F22/23 zwischen Primer 22 und Primer 23

A) Region von Exon 8 bis Mitte Intron 9; B) Region von Mitte Intron 10 bis Exon 12  
Fragment wurde mit Primern 22 und 23 mittels PCR amplifiziert und nach der Klonierung in den TOPO®-Vektor mit Primern M13 Forward und M13 Reverse ansequenziert; Unterstrichen: Primer 22 (in A) und Primer 23 (in B); Großbuchstaben: Exons; Kleinbuchstaben: Introns; grau unterlegt: Keine Übereinstimmung von contig-Sequenz und Sequenzierung; erhaltenen Sequenz wurde für B) invertiert

Da sowohl der Größenvergleich, als auch der Sequenzvergleich zwischen Datenbank Sequenz und Klon ICRFc 7101293Q5 übereinstimmen, wurde angenommen, dass Beide die genomische Sequenz des zLAP2 Gens enthalten.

### IV. 1. 1. 1. 4. Vervollständigung der zLAP2 Sequenz

Wie schon im vorherigen Abschnitt erwähnt, befinden sich in der contig 10273.2- Sequenz zwei Bereiche, die über eine unbekannte Länge keine eindeutige Nukleotidabfolge besitzen (102332-103498 bp und 104411-104418 bp). Diese unbekannt Bereiche befinden sich in den nicht kodierenden Regionen von Intron 1 und Intron 2. Durch die Wahl spezifischer Primer upstream und downstream dieser Regionen konnte die fehlende Sequenz durch eine Sequenzierung vervollständigt werden. Zur Identifikation der Region in Intron 1 wurde Primer 8 105 bp upstream und Primer 10 79 bp downstream der unbekannt Region gewählt. Mit den Primern wurde ein Fragment (F8/10) aus dem genomischen Klon amplifiziert, welches in den TOPO®-Vektor kloniert und anschließend mit den M13 Primer (Forward und Reverse) sequenziert wurde (Abb. IV.4).

A)

ACATTTAAGGCCCTTAAACGTTTTAAATGCTATTTTACAAAGTAGTAATTTTTTGTATCATTTTTGTTTTATG  
CATTGTATGTTTGTATGCTAAAGTTTGCCTAAATTATTTCTGCAATATGCTGATTTATGAAATCAATAAAATC  
**CTACTAGATTTATTCAATATATGAATAACATTTTAGTTTTGGATTAATTTCTTACATTAATATTCAGTAAATA**  
**TTCTGCGAGTTAAATCTGGCCAGTGTTCAGTTGAAAAGTGGTTGTAAGGCTTAAAATGCATGGAAAGAG**  
**TCATAAATAGGTCTTAAAGCCATTGAATTTGACTCTCTGATTCCTGTATATATATACTCTGTCCAGAACT**  
**TGATAAATGGAGGGTGTGTCTGTAGACTGAGTGACGTTTTTTCTCCTCTGTCTGCTGGAATGCTCAGATTT**  
**ATGTTTTTTTTTTGTTGTTTTTTTTTTTGGAGTAGGCAGTGTCCAGATCAGCCCTGATCAAGGCCCTCA**  
**CTGCAGCTCATACGCCTTCATGATCTACTCCTGCCCTTCCAAACACATTCTCTCCTCCACTTCACTGTTTTTC**  
ACCTCTACTTTTCTAGTCACATGGTCCCCTT

#### IV. Das Lamina assoziierte Polypeptid 2 des Zebrafisch (zLAP2)

B)

```

contig      ACATTTAAGGCCCTTAAACGTTTTAAATGCTATTTTACAAAGTAGTAATTTTTTTGTATC
F8/10      ACATTTAAGGCCCTTAAACGTTTTAAATGCTATTTTACAAAGTAGTAATTTTTTTGTATC
            *****

contig      ATTTTTGTTTATGCATTGTATGTTTGTATGCTAAAGTTTGCCTAANN-----
F8/10      ATTTTTGTTTATGCATTGTATGTTTGTATGCTAAAGTTTGCCTAAATTATTTCTGCAATA

contig      -----
F8/10      TGCTGATTTATGAAATCAATAAAATCCTACTAGATTTATTCAATATATGAATAACATTTT

contig      -----
F8/10      AGTTTTGGATTAATTTCTTACATTAATATTCAGTAAATATTCGCGAGTTAAAAATCTGGC

contig      -----
F8/10      CAGTGTTTCCAGTTGAAAAGTGGTTGTAAGGCTTAAAATGCATGGAAAGAGTCATAAAT

contig      -----
F8/10      AGGTCTTAAAAGCCATTGAATTTGACTCTCTGATTCCTGTATATATATACTCTGTCACAG

contig      -----
F8/10      AAAC TTGATAAAATGGAGGGTGTGTCTGTAGACTGAGTGACGTTTTTTCTCCTCTGTCTCT

contig      -----
F8/10      GCTGGAATGCTCAGATTTATGTTTTTTTTTTTGTGTTTTTTTTTTTTGAGAGTAGGCAGT

contig      -----NNNNATTC
F8/10      GTTCCAGATCAGCCCTGATCAAGGCCCTCACTGCAGCTCATA CGCCTTCATGATC----

contig      TTGCATTGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCTACTCCTGCCCTTCCAAACACATT
F8/10      -----TACTCCTGCCCTTCCAAACACATT
            *****

contig      CTCTCCTCCACTTCACTGTTTTTACCTCTACTTTTCTAGTCACATGGTCCCCGTT
F8/10      CTCTCCTCCACTTCACTGTTTTTACCTCTACTTTTCTAGTCACATGGTCCC
            *****
    
```

**Abb. IV.4: Sequenzierung des fehlenden Fragments in Intron 1**

Fragment F8/10 wurde mit Primern 8 und 10 aus dem genomischen Klon 10273.2 ICRFc 7101293Q5 amplifiziert und nach der Umklonierung in den TOPO®-Vektor mit M13 Primern sequenziert; A) zusammengesetzte Sequenz erhalten durch M13-Forward und M13 Reverse Sequenzierung; B) Sequenzvergleich von contig10273.2 und Fragment F8/10 aus Klon ICRFc 7101293Q5; Unterstrichen: bekannte Intron Sequenz aus contig10273.2 upstream und downstream der unbekanntenen Region; grau unterlegt: Primer 8 und 10; \*: identische Nukleotide

Das Fragment F8/10 aus Klon ICRFc 7101293Q5 ist in den Bereichen vor und hinter der unbekanntenen Sequenz identisch zum contig10273.2. Die neu erhaltene Nukleotidabfolge ist 430 bp lang. Im Vergleich zum contig10273.2 fehlen im genomischen Klon 41 bp. Die Sequenz ist, ohne die 41 bp, unter der Accession Nummer AJ616304 bei NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/)) zugänglich.

Die Grenze von Exon 2 zu Intron 2 ist in der contig 10273.3 Sequenz ebenfalls nicht eindeutig erfasst. 8 NN's deuten auf eine kurze unbekanntene Sequenz hin. Hier wurde ebenfalls ein Fragment (F11/14) mit zwei spezifische Primern (Primer 11 und 14) amplifiziert, in den TOPO®-Vektor kloniert und anschließend sequenziert.

#### IV. Das Lamina assoziierte Polypeptid 2 des Zebrafisch (zLAP2)

A)

gcctgtcagcgtgtttaaacactcgttgctttaacaagttcaatactttaccatgatgtcatctgtacat  
 agtgcagcgtgcagtcatttataaaatgtgcacatcaaactattaaatgagctgcatcatggctgatggta  
 ttaatgtgagcgtttttctttacag**AAAGCCACCAGGAAAACCGACAAAGTTCGTCTCGACGATGTTGATG**  
**TGACGGAGTTGAGCAATGAGGGTTTGAAGGACCTGTTGCTAAAGTATGGCCTGAATGCTGGACCCATTGTT**  
**Ggtgagccgattttaaggattcaacttcaaaaagtaaatatttgcacatggttgatagttccttcagatca**  
**tgggtctcaaacactcaattcctggaggcccgacactctgcacagttgtgccctaataactattctaagacagc**  
**tgatcaaacactaatcgggatgttccagagt**gtccttgaacaccttgaatagttggatcaggtgtgtctgatt  
 agggctggtgcaaagctgtgtagagctgtggccctccaggaattaagtttgagacctatgagacaaaagac  
 aagaaaa

B)

contig gcctgtcagcgtgtttaaacactcgttgctttaacaagttcaatactttaccatgatgt  
 F11/14 gcctgtcagcgtgtttaaacactcgttgctttaacaagttcaatactttaccatgatgt  
 \*\*\*\*\*

contig catctgtacatagtgagcgtgcagtcatttataaaatgtgcacatcaaactattaaatga  
 F11/14 catctgtacatagtgagcgtgcagtcatttataaaatgtgcacatcaaactattaaatga  
 \*\*\*\*\*

contig gctgcatcatggctgatggctattaatgtgagcgtttttctttacag**AAAGCCACCAGGA**  
 F11/14 gctgcatcatggctgatggctattaatgtgagcgtttttctttacag**AAAGCCACCAGGA**  
 \*\*\*\*\*

contig **AACCCGACAA-GTTCGTCTCGACGATGTTGATGTGACGGAGTTGAACCATGAGGTTTTGA**  
 F11/14 **AAACCGACAAAGTTCGTCTCGACGATGTTGATGTGACGGAGTTGAGCAATGAGGGTTTGA**  
 \*\* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*

contig **AGGACCTGTTGCTAAAGTATGGCCTGAATGCTGGACCCATTG**atggnnnnnnnnnn----  
 F11/14 **AGGACCTGTTGCTAAAGTATGGCCTGAATGCTGGACCCATTG**ttgggtgagccgattttaa  
 \*\*\*\*\* \*\*

contig -----  
 F11/14 ggattcaacttcaaaaagtaaatatttgcacatggttgatagttccttcagatcatgggt

contig -----  
 F11/14 ctcaaacactcaattcctggaggcccgacactctgcacagttgtgccctaataactattctaa

contig -----gtccttgaacaccttgaatagttgg  
 F11/14 gacagctgatcaaacactaatcgggatgttccagagtgtccttgaacaccttgaatagttgg  
 \*\*\*\*\*

contig atcaggtgtgtctgattagggctggtgcaaagctgtgtagagctgtggccctccaggaat  
 F11/14 atcaggtgtgtctgattagggctggtgcaaagctgtgtagagctgtggccctccaggaat  
 \*\*\*\*\*

contig taagtttgagacctatgagacaaaagacaagaaaa 414  
 F11/14 taagtttgagacctatgagacaaaagacaagaaaa 575  
 \*\*\*\*\*

#### Abb. IV.5: Sequenzierung des fehlenden Fragments in Intron 2

Fragment F11/14 wurde mit Primern 11 und 14 aus dem genomischen Klon ICRFc 7101293Q5 amplifiziert und nach der Umklonierung in den TOPO®-Vektor mit M13 Primern sequenziert; A) zusammengesetzte Sequenz erhalten durch M13 Forward und M13 Reverse Sequenzierung; B) Sequenzvergleich von contig 10273.2 und Fragment F8/10 aus Klon ICRFc 7101293Q5; Kleinbuchstaben: Intron; Großbuchstaben und fett: Exon 2; Unterstrichen: Primer 11 und 14; Exon 2; grau unterlegt: neue Sequenz (A);\*: identische Nukleotide (B)

Die Sequenz (Abb. IV.5B) zeigt im letzten Teil von Intron 1 und im mittleren Bereich von Intron 2 eine 100% Identität. Im Exon 2 treten einigen Nukleotidabweichungen auf, auf die im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird. Überraschend ist jedoch, dass zu Beginn des



Intron 2 nicht nur wenige Nukleotide fehlen, sondern ein Bereich von 170 bp. Die Sequenz aus Abbildung IV.5A zeigt die zusammengesetzte Nukleotidabfolge aus den Sequenzierungen mit den Forward und Reverse Primern. Sie ist bei NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/)) unter der Accession Nummer AJ616305 zugänglich.

#### **IV. 1. 1. 1. 5. Exon Vergleich auf Nukleotid- und Aminosäurenebene**

Die in Abbildung IV. 5B auftretenden Unterschiede zwischen der Sequenzierung von Fragment F11/14 und dem contig10273.2 im Bereich des Exons scheinen auf Fehler im contig zu beruhen, da ein Vergleich zwischen Sequenzierung und zLAP2-cDNA (AJ320190) eine 100% Identität aufzeigten.

Durch Vergleiche aller im contig10273.2 vorkommenden Exons mit der  $\omega$ -spezifischen cDNA-Sequenz konnte festgestellt werden, dass auch in Exon 1, 2, 7, 9, 13 und 15 Abweichungen auftreten (Tab. IV.1). Inwieweit diese Abweichungen Einfluss auf die Proteinsequenz nehmen, wurde durch Translation (ExPASy) der einzelnen Exons und anschließendem Aminosäurenvergleich ermittelt.

Die Abweichungen in Exon 1 und 7 können als stille Abweichungen bezeichnet werden, da sie die Aminosäuresequenz nicht beeinflussen. Die Unterschiede in Exon 9 und Exon 15 würden dagegen ein Austausch eines Lysins durch ein Methionin bzw. eines Valins durch ein Alanin hervorrufen. Im Vergleich dazu wären die Abweichungen in Exon 2 und 13 gravierender. Im Fall von Exon 2 sind 5 Nukleotidveränderungen zu vermerken, von denen 4 auch Einfluss auf die kodierten Aminosäuren hätten. Der fünfte Unterschied beruht auf den Verlust einer Base, was für die Translation einen Leserasterschub bedeuten würde, der die nachfolgenden 7 Aminosäuren verändert und dabei zu einem Stopcodon führt. Ebenso würde in Exon 13, neben dem reinen Austausch von Aminosäuren auch zwei gravierende Veränderungen der Proteinsequenz erfolgen. Zum einen würde ein Triplet zu einem neuen und damit vorzeitigem Stopcodon werden, zum anderen würde eine zusätzliche Base alle nachfolgenden Aminosäuren verändern. Die folgende Tabelle (Tab. IV.1) zeigt die Position, Art der Abweichungen und die Konsequenz für die Aminosäuresequenz an.

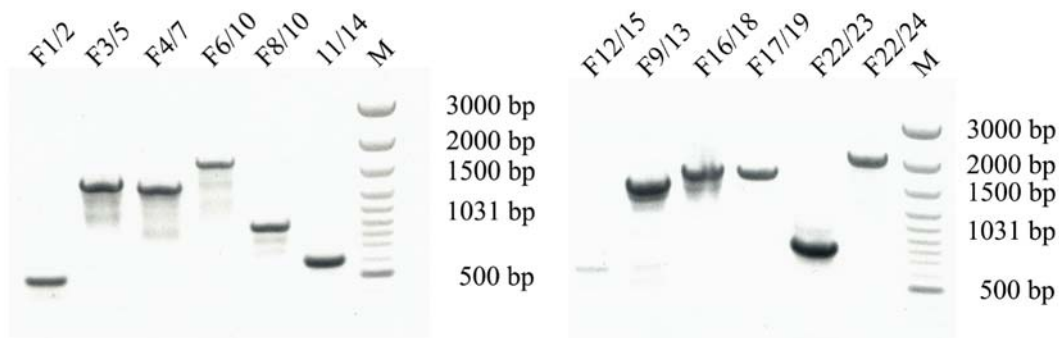
**Tab. IV. 1: Abweichungen von Exons der contig1273.2 Sequenz zur cDNA des zLAP2 $\omega$**   
Sequenzvergleich von contig 10273.2 und Fragment F8/10 aus Klon ICRFc 7101293Q5

Exon	Position (bp) ab ATG	Nukleotid in contig 1273.2	Nukleotid in cDNA	Konsequenz im Protein
1	5	C	T	/
2	253	C	A	Prolin anstatt Tyrosin
	261	-	A	Phenylalanin anstatt Valin, Leserasterschub, nach 7 Triplets Stopcodon
		A	G	Asparagin anstatt Serin
		C	A	Histidin anstatt Asparagin
		T	G	Valin anstatt Glycin
7	934	T	C	/
9	1090	A	C	Methionin anstatt Lysin
13	1444	T	C	Phenylalanin anstatt Serin
	1465	T	G	Stopcodon anstatt Glycin
	1472	C	A	Alanin anstatt Asparagin
	1480	C	-	Leserasterschub verändert die folgenden AS im Exon 13
	1490	C	A	Leucin anstatt Methionin
15	1928	T	C	Valin anstatt Alanin

Da die Sequenzierung von Fragment F11/14 bestätigt, dass alle im Exon 2 auftretenden Nukleotidunterschiede auf Fehler im contig 10273.2 beruhen und die cDNAs der drei Isoformen untereinander in den betroffenen Bereichen identisch sind, wurden die Nukleotide aus der contig Sequenz durch die entsprechenden Nukleotide aus den cDNAs ersetzt. Mit Ausnahme von Position 5 in Exon 1 (folgendes Kapitel).

#### IV. 1. 1. 1. 6. Genomische Strukturanalyse des zLAP2-Gens

Die Sequenzierung der unbekanntenen Bereiche von contig10273.2 (Abb. IV.4 und IV.5) haben gezeigt, dass größere Fragmente im contig fehlen können oder vielleicht auch zusätzlich eingefügt sein könnten. Um eine Vorstellung zu bekommen inwieweit die angegebenen Größen der Introns aus der Datenbank-Sequenz mit den Introns im genomischen Klon übereinstimmen, wurden verschiedene Primer (Kapitel 3.8.1) gewählt, mit denen bestimmte Regionen des zLAP2 Gens amplifiziert wurden. Abbildung IV.6 zeigt alle im Agarosegel aufgetrennten Fragmente.



**Abb. IV.6: Größenanalyse des genomischen zLAP2 Klon (ICRFc 7101293Q5)**

Fragmente wurden mit unterschiedlichen Primern aus dem RZPD Klon ICRFc 7101293Q5 amplifiziert und in einem 1% Agarosegel aufgetrennt; Zahlen geben die verwendeten Primer an (III.8.1); Marker: 100 bp Gen Ruler (Fermentas)

Fragment F1/2 beinhaltet Teile der nicht translatierten Region 5' des Startcodons. Fragment F3/5, F4/7, F6/10, F8/10 und F9/12 sind in Exon 1 bis Exon 2 zu finden und decken das gesamte Intron 1 ab. Mit Primern 11 und 14 sowie 13 und 15 wurden 2 Fragmente (F11/14 und F13/15) im Intron 2 amplifiziert. Fragment F16/18 sowie F17/19 umfassen das gesamte Intron 4. Weiterhin wurde der gesamte zLAP2 $\beta$ -Bereich (F22/23) sowie der Bereich zwischen Exon 8 bis Exon 13 (F22/24) mit den Primern 22, 23 und 24 abgedeckt.

In Tabelle IV.2 wurde zur Veranschaulichung alle erwarteten und erhaltenen Fragmentgrößen zusammengefasst.

**Tab.IV. 2: Vergleich der erwarteten mit den amplifizierte Fragmentgrößen**

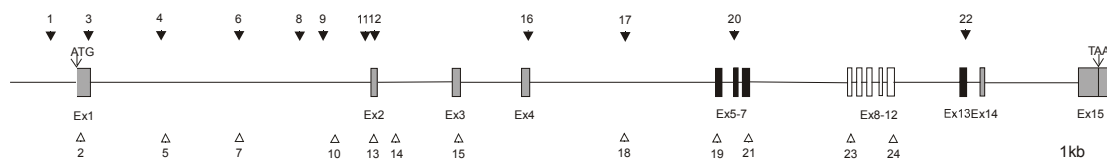
Nummern der Fragmente geben die verwendeten Primer an; erwartete Größen stützen sich aus Angaben aus contig10273.2 die amplifizierten Größen wurden durch PCR mit den angegebenen Primern aus Klon ICRFc 7101293Q5 erhalten

Fragment	erwartete Größe (bp)	amplifizierte Größe (bp)
F1/2	520	500
F3/5	1393	~1300
F 4/7	1341	1300
F6/10	1719	1600
F8/10	?	900
F9/13	1513	1450-1500
F11/14	653	600
F12/15	574	600
F16/18	1710	1700
F17/19	1709	1700
F22/23	793	800
F22/24	2080	2000
F20/21	261	250-300

Diese Art der Analyse gibt zwar keine Auskunft über die Richtigkeit der Nukleotidabfolge, sie zeigt jedoch eindrucksvoll, dass alle amplifizierten Fragmente die erwarteten Größen besitzen. Somit scheint die contig10273.2-Sequenz, bis auf einige Nukleotidabweichungen mit der genomischen Sequenz im Klon übereinzustimmen und beide scheinen die komplette Sequenz des zLAP2-Gens wiederzugeben.

Als offene Fragen bleibt der Beginn von Exon 1, welcher bis zum Ende dieser Arbeit noch nicht eindeutig geklärt werden konnte. Aus dem EST-Klon AW343323 ist bekannt, dass vor dem ATG noch mindestens 58 untranslatierte Nukleotide kodiert sind. Durch Sequenzierung von Fragment F1/2 konnte bestätigt werden, dass diese 58 Nukleotide direkt vor dem ATG zu finden sind. Weiterhin zeigt die Sequenzierung, dass an Position 5 nach dem ATG ein Cytosin anstelle eines Thymidins kodiert ist. Es ergab sich schon früher der Verdacht, dass in dem Klon, dem die cDNA Sequenzen der drei Isoformen (AJ320190, AJ320191, AJ320192) zu Grunde liegen, ein Nukleotidaustausch stattgefunden haben könnte. Da sowohl die Sequenzierung von Fragment F1/2 als auch der EST-Klon AW343323 ein Cytosin anstelle eines Thymidins verzeichnen, wurde dieses in der genomischen Sequenz berücksichtigt.

Der strukturelle Aufbau des zLAP2-Gens sowie die Lage der verwendeten Primer ist in der folgenden Abbildung IV. 7 veranschaulicht. Die Tabelle XI.3 (Anhang) die genauen Größen der Introns und Exons an.



**Abb. IV.7: Struktureller Aufbau des zLAP2 Gens**

Linie: Introns, gestreifte Kästchen: Exons die in allen drei Isoformen vorkommen; leere Kästchen: Exons die nur in der  $\beta$  und der  $\omega$ -Isoform auftreten; schwarze Kästchen:  $\omega$ -spezifische Exons; ▼: 5'- Primer; △: 3'- Primer

Leider war zum Einreichen der Dissertation der Klon ICRFc 7101293Q5 noch nicht vollständig sequenziert, so dass im Anhang (IX.3) nur die vorläufige Sequenz mit allen Korrekturen aus Sequenzierungen und Vergleichen mit der zLAP2 $\omega$  cDNA (AJ320190) zu finden ist.

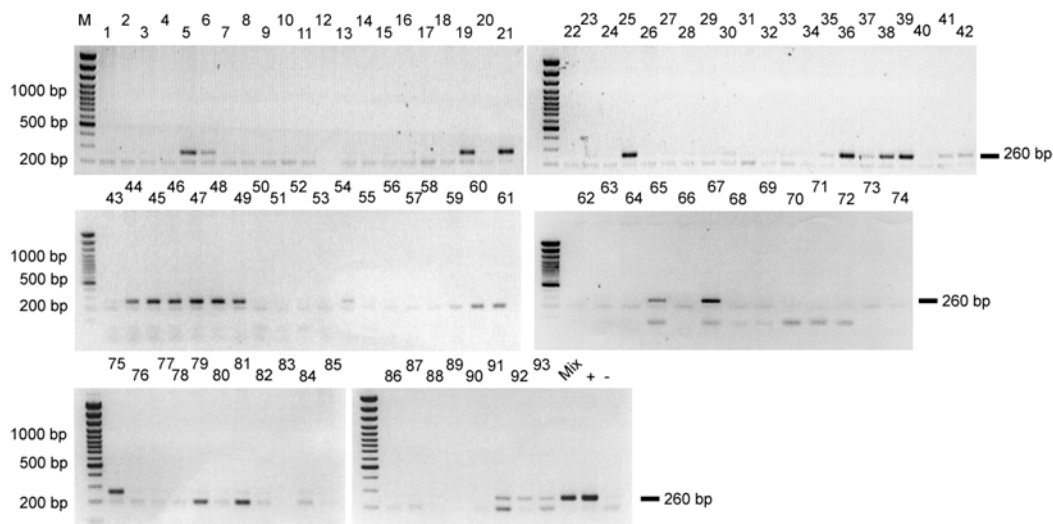
#### IV. 1. 1. 1. 7. Lokalisation des LAP2 im Genom des Zebrafisches

Nach der Strukturanalyse des LAP2 Gens wurde das Augenmerk auf die Lokalisation des Gens im Genom gelegt. Hierfür wurde die Methode des "Radiation Hybrid Mappings" verwendet, in dem ein Gen einer "Linkage Group" des Zebrafisches zugeordnet werden kann. Das von Hukriede beschriebenen LN-54-Panel (Hukriede et al., 1999) besteht aus 93 verschiedenen Maus/Zebrafisch DNA Hybriden aus denen mit spezifischen Primern Teile des gesuchten Gens amplifiziert werden können.

Durch Zuordnen einer 1 für eine erfolgreiche Amplifikation und einer 0 für eine erfolglose PCR kann ein Zahlen-Code ermittelt werden, der unter <http://zfin.org> mit Hilfe der "Mapping Panels" das Gen einer Linkage Group zuweist. Liegt der hierbei ermittelte LOD-Score oberhalb von 14 Punkten, so ist die Zuordnung signifikant. Sollte ein nicht eindeutiges Ergebnis bei der PCR auftreten, so wird an dieser Stelle eine 2 in den Code eingefügt.

Das Experiment wurde zwei mal unabhängig voneinander durchgeführt. Für die PCR (Annelingtemperatur 62°C, 5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)) wurden die Primer 20 und 21 verwendet, welche in der ω-spezifischen Region (Exon 6 und Exon 7) lokalisiert sind.

Abbildung IV.8 zeigt die aufgetrennten PCR-Fragmente. Mit den verwendeten Primern sollten ein 260 bp Fragment amplifiziert werden. In einigen Spuren ist ein solches Fragment zu erkennen.



**Abb. IV.8: Gelelektrophoretische Analyse zur Auswertung des LN-Panels**

Auftrennung von 93 identischen PCR-Reaktionen denen jeweils eine unterschiedliche DNA zu Grunde liegt. Zur Auswertung wird jeder Spur eine 0 (keine Bande bei 260 bp), eine 1 (Bande bei 260 bp) oder 2 (nicht eindeutig) zugewiesen. Der Code ergibt sich aus diesen Nummern von 1-93; 2% Agarosegele; Marker: 100 bp Gen Ruler (Fermentas)

Die letzten drei Spuren sind Kontrollen. Eine Negativkontrolle, welche die genomische DNA der Maus enthält (-) und zwei Positivkontrollen die entweder nur die genomische DNA des Zebrafisches (+) oder eine Mischung aus Zebrafisch und Maus DNA (Mix) enthalten.

Es fällt auf, dass außer der 260 bp Bande in allen Fraktionen eine Bande unterhalb der 200 bp Marke auftritt. Diese scheint ein unspezifisches Produkt aus der Maus DNA zu sein, da sie nicht in der Positivkontrolle, jedoch in der Mischung und in der Negativkontrolle zu finden ist. Diese Bande ist für Erhebung des Codes vernachlässigbar.

Der Code wird der Reihe nach von 1-93 ermittelt, die drei Kontrollen fließen nicht mit in die Zahlenreihe ein.

Code 1:

000011000000000000101000100001000011111011011111100001000000000010100000001  
000101012000000111

LOD: 17,2

Code 2:

000011000000000000101010100001000011111011011111100001000000000010100001001  
000000010000000010

LOD: 19,8

Beide Codes ergaben einen LOD-Score von über 17 Punkten und somit eine signifikante Zuordnung auf der Linkage Group 4.

Um sicher zu stellen, dass es sich nicht um ein zufälliges PCR-Produkt handelte, wurden die 260 bp Produkte von Spur 25 und 36 in den TOPO®-Vektor kloniert und über die M13 Primer sequenziert. Der Vergleich mit der genomischen Sequenz zeigt, dass die amplifizierten Stücke tatsächlich mit der genomischen Sequenz übereinstimmen.

**IV. 1. 1. 2. Vergleich des strukturellen Aufbaus des Zebrafisch LAP2 mit dem des Menschen**

Das in Säugern zu findende LAP2, auch als Thymopoietin (TMPO) bezeichnet, bringt ebenfalls durch alternatives Splicen mehrere Isoformen hervor. In der Maus kodiert das LAP2, zu finden auf Chromosom 10, mit 10 Exons 7 verschiedene Splicevarianten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ) (Berger et al., 1996). Auch im Menschen sind drei von wahrscheinlich mehreren Isoformen näher charakterisiert ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), die aus einem einzelnen, auf Chromosom 12 liegenden, LAP2 Gen hervorgehen (Harris et al., 1994, 1995).

## IV. Das Lamina assoziierte Polypeptid 2 des Zebrafisch (zLAP2)

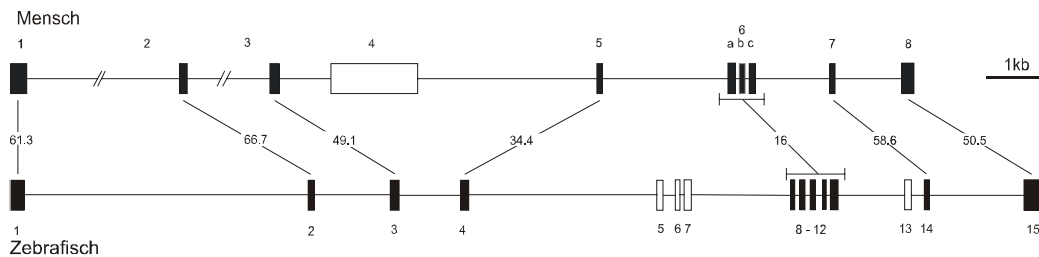
Die aminoterminal Domäne ist nicht nur in allen Splicevarianten innerhalb einer Spezies identisch, sondern auch zwischen den Spezies hoch konserviert (Abb. IV.9).

hLAP2	MPEFLEDPSVLTKDKLKSELVANNVTLPAGEQRKDVYVQLYLQHLTARNRPPLPAGTNSK	60
mLAP2	MPEFLEDPSVLTKDKLKSELVANNVTLPAGEQRKDVYVQLYLQHLTARNRPPLAAGANSK	60
zLAP2	MLEFLEDPSVLTKDKLKSAALLANNVALPNGDQRKDVYVQLYLKNLTVQNK-----KSSG	54
	* *	
hLAP2	GPPDFSSDEEREPTVLGSGAAAAGRSRAAVGRKATKKTDPKPRQEDKDDLDVTELTNEDL	120
mLAP2	GPPDFSSDEERDATPVLGSG-ASVGRGRGAVGRKATKKTDPKPRLEDKDDLDVTELSNEEL	119
zLAP2	SPDVFSSDEELPPAPVVSNR----SRS----GRKATRKTDKVR---PDDVDVTELSNEGL	103
	* *	
hLAP2	LDQLVKYGVNPGPIVGKLIKFIQIGTTRKLYEKLLKLLKREQGTESSRSSTPLPTISSAENT	180
mLAP2	LDQLVRYGVNPGPIVG-----TTRKLYEKLLKLLKREQGTESSRSSTPLPTVSSAENT	171
zLAP2	KDLLLKYGLNAGPIVA-----STRKVYKRLQKLLDQGPP--VAVALPSETSQT DGN	153
	* *	
hLAP2	RQNGSNDSDRYSDNEEGKIL-----NSDSKIELKLEKREPLKGRAKTPVTLKQRRVEH	234
mLAP2	RQNGSNDSDRYSDNDE-----DSKIELKLEKREPLKGRAKTPVTLKQRRTEH	218
zLAP2	-QNGNNDSDQYSDREEEPVAPAPVTVPEPEVEAEELIPVVERPVRSRGKTPVTSRTRSGQH	212
	* *	

**Abb. IV.9: Aminosäuresequenz der aminoterminalen Domäne des LAP2 von verschiedenen Spezies**  
hLAP2 (Mensch); mLAP2 (Maus); zLAP2 (Zebrafisch); \*: identische Aminosäure

Dieser hoch konservierte Bereich ist bei der Maus und dem Menschen in den ersten drei und beim Zebrafisch in den ersten 4 Exons kodiert.

Die genomische Struktur des menschlichen LAP2 konnte aufgrund der von Harris (Harris et al., 1995) und Berger (Berger et al. 1996) veröffentlichten Daten erstellt werden. Der Vergleich auf Aminosäureebene vom humanen mit dem Zebrafisch LAP2 zeigt deutlich, dass die Exons der aminoterminalen und die der carboxyterminalen Domänen eine Identität von 40-61% aufweisen, der mittlere Bereich des Proteins jedoch nur geringfügige Ähnlichkeit zeigt (Abb. IV.10 und Tab. IV.3).



**Abb. IV.10: Strukturvergleich von genomischer Sequenz des menschlichen LAP2 mit dem des Zebrafischs**

schwarze Kästen: homologe Exons von Mensch und Zebrafisch; weiße Kästen: nicht homologe Exons von Mensch und Zebrafisch; Linien: Introns; Zahlen geben den Grad der Identität der Exons wieder (in %); Graphik ist maßstabsgetreu

**Tab. IV. 3: Vergleich der Exons des menschlichen LAP2 mit dem des Zebrafisches**  
 Die Größen der Exons sind in der Anzahl der Aminosäuren (AS) angegeben, der Grad der Identität (in %) bezieht sich auf die Sequenz des menschlichen LAP2

<u>Mensch</u>		<u>Zebrafisch</u>		
Exon	AS	Exon	AS	ID% Mensch / Zebrafisch
Ex1	93	Ex1	79	61.3
Ex2	42	Ex2	39	66.7
Ex3	53	Ex3	50	49.1
Ex4	506	/	/	/
Ex5	32	Ex4	46	34.4
Ex6a	40	} Ex8-12	146	16
Ex6b	31			
Ex6c	35			
Ex7	29	Ex14	35	58.6
Ex8	95	Ex15	120	50.5

Obwohl der generelle Aufbau des LAP2 Gene ähnlich ist, so zeigt der direkte, strukturelle Vergleich zwei große Unterschiede. Beide Gene kodieren für Bereiche die nicht im anderen Gen zu finden sind. Zum einen ist im Zebrafisch LAP2 die  $\omega$ -spezifische Region zu finden, welche von Exon 5-7 und Exon 13 kodiert ist. Zum anderen kodiert das menschliche LAP2 für eine  $\alpha$ -spezifische Region mit Exon 4.

## IV. 1. 2. Auf der Suche nach den LAP2 $\alpha$ -Isoformen im Zebrafisch und Huhn

Die  $\alpha$ -Isoform des LAP2 Gens wurde zwar bei Säugern mehrmals beschrieben (Berger et al., 1996; Harris et al., 1995), jedoch weder bei Fischen noch bei Amphibien gefunden (Schoft et al 2003, Lang et al 2002, Del Pino et al., 2002). Die  $\alpha$ -Isoform ist eine Splicevariante des LAP2 Gens, die zwar den aminoterminalen Teil des Proteins besitzt, aber für einen eigenen Carboxyterminus kodiert, welcher weder eine Transmembrandomäne noch eine Lamin-bindungsstelle besitzt. Aus diesem Grund ist das LAP2 $\alpha$  diffus im Kern verteilt.

### IV. 1. 2. 1. Keine $\alpha$ -spezifische Region im Zebrafisch LAP2

Auf der Suche nach einer Region im Zebrafisch, die homolog zum  $\alpha$ -spezifischen Exon der Säuger sein soll, waren alle "Blast-Suchen" in den verschiedenen Datenbanken (NCBI, Sanger) erfolglos. In Anbetracht, dass die Ähnlichkeiten zwischen menschlichem und Zebrafisch LAP2 bei 50% liegen und die gesuchten,  $\alpha$ -Isoform ähnlichen Sequenzen wahrscheinlich in einem Intron lokalisiert sind, ist dieses aber auch nicht verwunderlich.



Die genomische Identifikation des Zebrafisch LAP2 ermöglicht es jedoch gezielt in Intronbereichen des LAP2-Gens zu suchen. Der ähnliche strukturelle Aufbau (Abb. IV.10) lässt vermuten, dass putative LAP2 $\alpha$  Sequenzen am wahrscheinlichsten in Intron 4 zu finden sind. Dieses bezieht sich zum einen auf die Lage hinter dem aminoterminal kodierenden Exon, zum anderen auf die Größe. Denn neben Intron 1 ist Intron 4 mit 3,3 kb das einzige Intron das groß genug wäre für eine Sequenz zu kodieren, die in der Maus und dem Menschen ~1,5 kb groß ist.

Ein Vergleich (ClustalW, Blast2Sequences) von Intron 4 mit der  $\alpha$ -spezifischen Region der Maus (U39078; Berger et al. 1996) und des Menschen (U18270 Exon 4; Harris et al. 1995) auf Nukleotidebene ergab keine signifikante Ähnlichkeit. Durch Translation von Intron 4 in alle drei Leseraster konnte eine Vielzahl von kurzen und langen Aminosäuresequenzen ermittelt werden. Aber auch der Vergleich dieser Sequenzen mit der Aminosäuresequenz der  $\alpha$ -spezifischen Region des Menschen blieb erfolglos. Um auszuschließen, dass sich die homologen Regionen, oder homologen Fragmente, eventuell nicht doch in den drei vorangegangenen Introns befinden, wurden auch diese auf Aminosäureebene untersucht, mit ähnlich geringem Erfolg. Diese Analyse zeigt deutlich, dass die genomische Sequenz des Zebrafisch LAP2 keinen Bereich enthält, der für Peptide kodiert, die eine signifikante Homologie zum LAP2 $\alpha$  der Säuger aufweisen.

#### **IV. 1. 2. 2. Auf der Suche nach einer $\alpha$ -spezifischen LAP2-Isoform in Vögeln**

Wie eingangs schon erwähnt, ist die LAP2 $\alpha$ -Isoform bei keinem der niederen Vertebraten (*Xenopus* oder Zebrafisch) zu finden, sondern bis jetzt nur in Säugern beschrieben. Es stellt sich die Frage ob diese Splicevariante des LAP2 in allen warmblütigen Vertebraten auftritt oder eine neue LAP2-Isoform ist, die man ausschließlich bei Säugern findet. Um diese Frage zu klären, wurde das LAP2 von Vögeln untersucht.

#### **IV. 1. 2. 2. 1. Identifikation und Charakterisierung des LAP2 im Huhn (cLAP2)**

Da bis zu diesem Zeitpunkt keine Anhaltspunkte über ein LAP2 in Vögeln zugänglich waren, wurden mit der  $\alpha$ -spezifischen Region des menschlichen LAP2, mit dem menschlichen LAP2 $\beta$  und dem LAP2 $\beta$  des Zebrafisch ein "Blast Search" in verschiedenen Datenbanken durchgeführt. Der "Blast Search" mit der  $\alpha$ -spezifischen Region blieb sowohl auf Nukleotidebenen, als auch auf Aminosäureebenen erfolglos. Mit den LAP2 $\beta$  Sequenzen konnte jedoch in der BBSRC Chick EST Datenbank ([www.chick.umist.ac.uk](http://www.chick.umist.ac.uk)) ein EST-Klon (335862.3)

#### IV. Das Lamina assoziierte Polypeptid 2 des Zebrafisch (zLAP2)

identifiziert werden, der auf Nukleotidebene eine hohe Ähnlichkeit zu den bekannten LAP2 $\beta$  Proteinen zeigt. Die Translation (Abb. IX.1; Anhang) zeigt, dass in Position 1085 des EST-Klons ein Nukleotid zu viel vorhanden ist und der damit einhergehende Leserasterschub die nachfolgende Sequenz völlig verändert. Durch Entfernen des Nukleotids erhält man eine Proteinsequenz, welche eine sehr hohe Ähnlichkeit mit dem menschlichen LAP2 $\beta$  aufweist (Abb. IV.11).

```

cLAP2-EST  MPEFLADPSVLTKEKLLKSELIANNVSLPGGEQRKDVYVQLYLQHLTARNPP-----AV
hLAP2 $\beta$       MPEFLEDPSVLTkDKLkSELVANNVTLPAGEQRKDVYVQLYLQHLTARNRPLPAGTNSK
          *****
cLAP2-EST  AQPdFSSDEEREPTPIG-----ARGRGAAVGRKATKkTDKLRaEeKDDLDVTELSNEDL
hLAP2 $\beta$       GPPdFSSDEEREPTVVLGSGAAAAGRRAAVGRKATKkTDKPRQEDKDDLDVTELTNEDL
          *****
cLAP2-EST  QEQLMKYGINPGPIV-----ATTRKLYEKLLKLMEQGPeLkTPMPLPVISSSTENT
hLAP2 $\beta$       LDQLVKYGVNPGPIVGKLIkFQIGTTRKLYEKLLKLREQGTESRSSTPLPTISSAENT
          **
cLAP2-EST  RQNGNNDSDQYSDNEE-----EPKTELRLekREPLKGRMkTPVTLKQRRVVEHNQYTS
hLAP2 $\beta$       RQNGSNDSDRYSDNEEGKIILNDSDSKIELKekREPLKGRAkTPVTLKQR-RVEHNQSYS
          ****
cLAP2-EST  QDGVtETVWtSGSSKSGPLQAFsRESTRVSRRTPRkRVEATLQlPVDDAVISESTPIAET
hLAP2 $\beta$       QAGITETEWtSGSSKGGPLQALtRESTRGSRRTPRkRVETSEHFRIIDGPVISESTPIAET
          *
cLAP2-EST  ILTASNETLVGNRVPGNFkHAAPTLPISePSDMPRRTPKKPLMTAEVPGENSYRRTKSRK
hLAP2 $\beta$       IMASSNESLVVNRVTGNfKHASPIlPIVGEkTEERRVER-----
          *
cLAP2-EST  GYSKEMFPYEVSTPTGISASCRrPIKGAASrPIEHTDFkMDESFF-KYAPKYSTSSDIKS
hLAP2 $\beta$       DILKEMFPYEAStPTGISASCRrPIKGAAGRPLELSDFRMEESfSSKYVPKYVPLADVKS
          *****
cLAP2-EST  EKpSTKkERSVPLWIKILLFVLVSVFLFSVYQSMETNQGnPFsKYISVFTQDSSN
hLAP2 $\beta$       EK--TKKGRSIPVWIKILLFVVAVFLFLVYQAMETNqVnPFsNFLHVDPRKSN-
          **

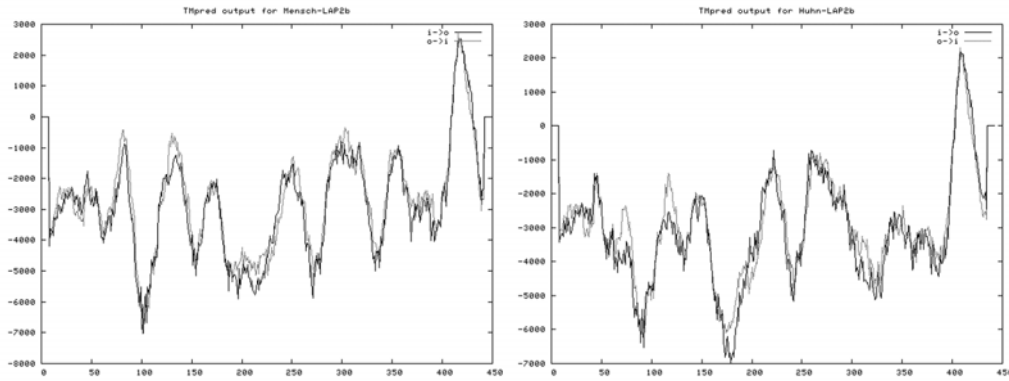
```

**Abb. IV.11: Aminosäurenvergleich der verbesserten cLAP2-EST Sequenz mit dem menschlichen LAP2 $\beta$**

cLAP2-EST (korrigierte Hühnchen EST Sequenz 335862.3 aus BBSRC Chick EST Datenbank);  
hLAP2 $\beta$  (Mensch); \*: identische Aminosäuren

Die Hühner LAP2 $\beta$  cDNA kodiert für ein Protein mit 445 AS. Es zeigt neben den hoch konservierten Bereichen im Aminoterminus auch eine gute Übereinstimmung in der carboxterminalen Domäne. Sowohl die LEM Domäne (97-140 AS) als auch eine putative Transmembrandomäne sind in dem EST-Klon zu finden. Der Vergleich des Hydrophobizitäts-Profiles (TemPred, ExPasy) vom menschlichen LAP2 mit dem vom Huhn zeigt ebenfalls einen ähnlichen Aufbau des Proteins (Abb. IV.12).

#### IV. Das Lamina assoziierte Polypeptid 2 des Zebrafisch (zLAP2)



**Abb. IV.12: Hydrophobizitätsprofil vom menschlichen und vom Hühner LAP2β**  
 Profil ermittelt über TempPred von ExPasy; Peaks > 0 zeigen eine putative Transmembrandomäne

Der EST-Klon besitzt weiterhin noch 80 Nukleotide vor dem Startcodon und mindestens 1564 Nukleotide nach dem Stopcodon. Dieses scheint, zumindest teilweise, die 5' bzw. 3' nicht translatierten Regionen zu sein, da sie ebenfalls in der genomischen Sequenz direkt vor bzw. hinter dem Start/Stopcodon zu finden sind.

#### IV. 1. 2. 2. 2. Struktureller Aufbau des LAP2 im Huhn

Vergleichbar mit der genomischen Analyse des Zebrafisch LAP2 wurde auch die Analyse des Hühnchen LAP2 (cLAP2) in Angriff genommen. Durch einen Blast Search mit der EST-Sequenz des cLAP2 in der Hühnchen Datenbank (ensemble.org/ Gallus\_gallus) konnte ein contig (36.871.141571) identifiziert werden, welches das gesamte cLAP2β beinhaltet.

Mit Hilfe des Spidey Programms und dem Vergleich mit dem EST-Klon wurden sinnvolle Exons definiert (Abb. IV.13).

```

MPEFLADPSVLTKEKLLKSELIANNVSLPGGEQRKDVYVQLYLQHLTARNPPAVAQPDFSSDEEREPTPIGARG
                                     Exon 1
RGAAVGR  KATKKTDKLRAEEKDDLVDTELSNEDLQEQLMKYGINPGPIV  ATTRKLYEKLLKLMEQGPELK
                                     Exon 2
TPMPLPVISSTTENTRQNGNNDSDQYSDNEE  EPKTELRLKREPLKGRMKTPVTLKQRRVVEHNQ  TYSQDG
                                     Exon 3                                     Exon 4
VTETVWTSSGSSKSGPLQAFSRESTRVSRRTPRKR  VEATLQLPVDDAISESTPIAETILTASNETL  VGNRV
                                     Exon 5                                     Exon 6
PGNFKHAAPTLPISEPDMPRRTPKKPLMTAE  VPERTHTEERKVERDILKEMFPYEVSTPTGIASCRRP
                                     Exon 7                                     Exon 8
IKGAASRPIEHTDFKMDESFFKYAPKYSTSSDIKSEKSTKKERSVPLWIKILLFVLVSVFLFSVYQSMETN
                                     Exon 9
QGNPFSKYISVFTQDSSN
    
```

**Abb. IV.13: Exons des Hühnchen LAP2**

Sequenz aus EST-Klon 335862.3 und contig 36.871.141571; unterstrichen: Exons; Lücke: Exon-grenze

Alle 9 Exons, von Start bis Stopcodon, sind innerhalb einer Sequenz von 20,5 kb des contigs 36.871.141571 zu finden. Inwieweit nicht translatierte Regionen in Exon 1 bzw. Exon 9 mit eingebunden werden müssen, ist noch nicht bekannt. Die 20,5 kb können jedoch als putative genomische Sequenz des cLAP2 angesehen werden. Da keine mit NN' markierten Bereiche in der contig 36.871.141571 Sequenz auftreten, scheinen Segmente bei der Sequenzierung eindeutig gewesen zu sein, was wiederum auf eine korrekte Wiedergabe der Introngrößen schließen lässt. Da keine Klonierungsversuche mit den cLAP2 unternommen werden sollten, wurde auch kein genomischer Klon untersucht, um die genomische Struktur zu verifizieren. Für die Suche einer putativen  $\alpha$ -Isoform im Hühnchen ist die gefundene genomische Sequenz aus der Datenbank völlig ausreichend.

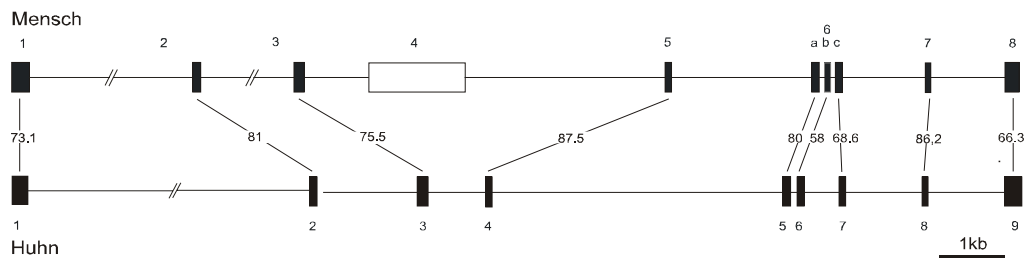
Ein Vergleich der einzelnen Exons aus dem cLAP2 mit dem menschlichen LAP2 zeigt neben einer recht ähnlichen Größe, auch eine sehr hohe Übereinstimmung in ihrer Proteinsequenz. Die für den aminoterminalen Bereich kodierenden Exons sowie das carboxyterminale Exon zeigen eine Identität von >60%. Im Gegensatz zum Zebrafisch (Tab. IV.3) sind auch die Exons im mittleren Bereich des Proteins zu 59 –87% identisch (Tab. IV.4).

**Tab. IV. 4: Vergleich der Exons des menschlichen LAP2 mit dem des Huhns**

Die Größe der Exons sind in der Anzahl der Aminosäuren (AS) angegeben, der Grad der Identität (in %) bezieht sich auf die Sequenz des menschlichen LAP2

<u>Mensch</u>		<u>Hühnchen</u>		
Exon	AS	Exon	AS	ID % Mensch/Hühnchen
Ex1	93	Ex1	80	73.1
Ex2	42	Ex2	42	81
Ex3	53	Ex3	52	75.5
Ex4	506	/	/	/
Ex5	32	Ex4	33	87.5
Ex6a	40	Ex5	40	80
Ex6b	31	Ex6	32	58.1
Ex6c	35	Ex7	37	68.6
Ex7	29	Ex8	32	86.2
Ex8	95	Ex9	98	66.3

Der strukturelle Aufbau des genomische cLAP2 wurde aus den Sequenzen des contigs und des EST-Klons entwickelt. Er ähnelt sehr stark dem des menschlichen LAP2 (Abb. IV.14).



**Abb. IV.14: Strukturvergleich von genomischer Sequenz des menschlichen mit dem Hühner LAP2**

schwarze Kästen: Exons mit homologen in beiden Spezies, weiße Kästen: Exons ohne homologe in der anderen Spezies; Linien: Introns, Zahlen geben die jeweilige Identität der Exons wieder; Graphik ist maßstabsgetreu

Im Gegensatz zum Zebrafisch sind alle im Hühnchen enthaltenen Exons auch im menschlichen LAP2 zu finden. Intron 3 scheint aber nicht genügend Platz für eine Region zu bieten die zu  $\alpha$ -spezifischen Region homolog ist (Abb. IV.14).

Vergleichbar mit der Analyse im Zebrafisch wurden die Introns 1 bis 4 auf Nukleotidebene mit dem Exon 4 des menschlichen LAP2 verglichen. Hierbei ergaben sich jedoch keine signifikanten Ähnlichkeiten. Auch die putativen Proteinsequenzen der Introns ergaben in keinem der drei Leseraster eine ausreichende Ähnlichkeit mit der  $\alpha$ -spezifischen Region.

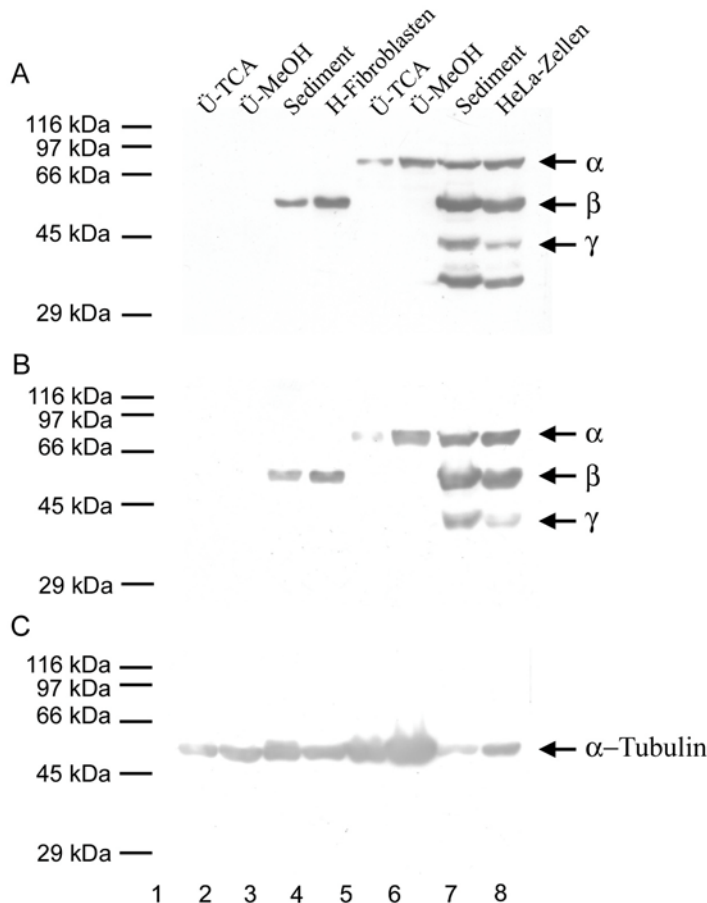
#### IV. 1. 2. 2. 3. Proteinchemische Untersuchung von Hühner Geweben und Zellen

Obwohl der "Blast Search" mit dem  $\alpha$ -spezifischen Exon in den Datenbanken erfolglos war und die Sequenzanalysen des cLAP2 eindeutig belegen, dass in der gefundenen Sequenz keine zur  $\alpha$ -spezifischen Region homologen Sequenz existiert, ist es dennoch möglich, dass eventuell ein zweites Gen des cLAP2 im Huhn existiert. Um dieses zu ergründen, wurden Untersuchungen an Hühner-Fibroblasten und verschiedenen Geweben durchgeführt.

#### IV. 1. 2. 2. 3. 1. Proteinextraktion von kultivierten Hühner-Fibroblasten

Das LAP2 $\alpha$  ist aufgrund des Fehlens einer Transmembrandomäne nicht in der Kernmembran verankert und wird nur durch die Interaktion mit anderen Proteinen im Kern gehalten. Durch eine Extraktion mit 8 M Harnstoff können alle an die Membran assoziierten oder auch nicht assoziierten Proteine von integralen Membranproteine getrennt werden, da letztere bei einer Ultrazentrifugation sedimentiert werden. Eine solche Extraktion wurde mit in Kultur genommenen Fibroblasten von 10 Tage alten Hühnerembryonen und mit HeLa-Zellen durchgeführt. Die Auftrennung der einzelnen Fraktionen (Sediment, Überstand) erfolgte über

eine SDS-PAGE (10% Acrylamid) der sich ein spezifischer Proteinnachweis mit Hilfe spezifischer Antikörper anschloss (Abb. IV.15). Die verwendeten Antikörper 13D4 und zLAP2-1 erkennen spezifisch Epitope aus der, in allen Isoformen vorkommende, aminoterminalen Domäne und haben gezeigt, dass sie auch Spezies übergreifend reagieren.



**Abb. IV.15: Harnstoffextraktion von Hühner-Fibroblasten und HeLa-Zellen**

Spur 1-4: Hühnchen-Fibroblasten; Spur 5-8: HeLa-Zellen

Spur 1 und 5: Überstand nach der Ultrazentrifugation gefällt mit Trichloressigsäure

Spur 2 und 6: Überstand nach der Ultrazentrifugation gefällt mit Methanol/Chloroform

Spur 3 und 7: Sediment der Ultrazentrifugation

Spur 4 und 8: unbehandelte Kontrollzellen

Die Gesamtproteine aus in kulturgenommenen Zellen wurden in 8 M Harnstoff extrahiert. Nach einer Ultrazentrifugation (50000g) wurde der Überstand abgenommen und zu gleichen Teilen entweder mit Methanol/Chloroform oder Tri-Chlor-Essigsäure (TCA) gefällt. Sowohl die gefällten Proteine als auch das Sediment wurden in proportionalen Mengen in einer SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und mit (A) einem monoklonalen Antikörper (13D4) gegen LAP2, (B) einem polyklonalen Antikörper (zLAP2-1) gegen LAP2 und (C) einem monoklonalen Antikörper ( $\alpha$ -Tubulin) gegen  $\alpha$ -Tubulin inkubiert. Molekulare Massen der Referenzproteine sind in kDa angegeben und die in HeLa-Zellen detektieren Isoformen markiert. LAP2 $\alpha$  (75 kDa), LAP2 $\beta$  (56 kDa), LAP2 $\gamma$  (42 kDa),  $\alpha$ -Tubulin (50 kDa)

Beide LAP2 spezifischen Antikörper erkennen in der Kontrollfraktion (Abb.IV.14 Spur 8) der HeLa Zellen die drei am häufigsten vorkommenden Isoformen LAP2 $\alpha$  (75 kDa), LAP2 $\beta$  (56 kDa) und LAP2 $\gamma$  (42 kDa). Der Antikörper zLAP2-1 detektiert noch eine weitere Bande mit einem Molekulargewicht < 45 kDa, dieses scheint ein Abbauprodukt einer oder mehrerer LAP2-Isoformen zu sein in dem für das zLAP2-1 spezifische Epitop vorhanden ist.

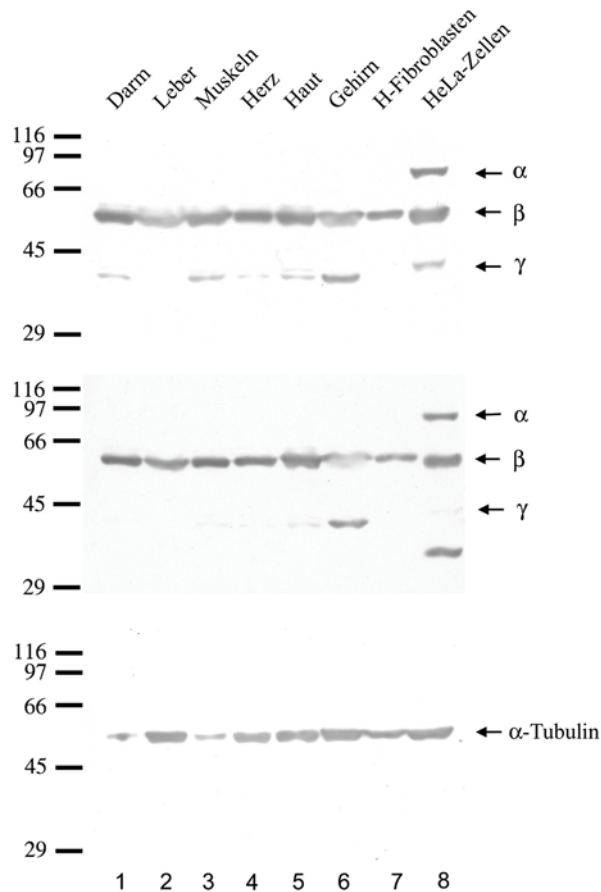
Die Extraktion mit 8 M Harnstoff zeigt eine deutliche Fraktionierung der drei LAP2-Isoformen in HeLa-Zellen. Der Überstand (Abb. IV.14 Spur 5 und 6), in dem sich alle lösliche Proteine befinden, enthält nur die größte der drei Isoformen. Die beiden anderen Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$  wurden vollständig sedimentiert (Abb. IV.14 Spur 7). Im Sediment befindet sich auch noch ein kleiner Teil des LAP2 $\alpha$ , welches wohl noch mit nicht löslichen Bindungspartnern assoziiert vorlag.

Bei der Harnstoffextraktion von Hühner-Fibroblasten konnte dagegen nur eine LAP2-Isoform detektiert werden, die mit ihrer Mobilität im Polyacrylamidgel und ihrer Löslichkeit der LAP2 $\beta$ -Isoform entspricht (Abb. IV.14 Spur 3 und 4). Weder im Überstand noch im Sediment wurde ein Hinweis auf eine weitere Isoform gefunden.

#### **IV. 1. 2. 2. 3. 2. Gewebespezifischen Analyse**

Da das LAP2 bekanntermaßen entwicklungs- und gewebespezifisch exprimiert wird, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Fibroblasten nur einen Teil aller Isoformen exprimieren.

Um eine eindeutige Aussagen über die Existenz verschiedener Isoformen treffen zu können, wurde daher einem 10 Tage alten Hühner-Embryo verschiedene Organe wie Darm, Leber, Muskeln, Herz, Haut und Gehirn entnommen und analysiert. In einer SDS-PAGE wurden die gesamten Proteine dieser Organe sowie in Kultur genommene Hühner-Fibroblasten und HeLa-Zellen aufgetrennt und über einen Immunblot mit den zuvor verwendeten LAP2 spezifischen Antikörpern auf die Expression von verschiedenen Isoformen untersucht (Abb. IV.16).



**Abb. IV.16: LAP2 Expression in verschiedenen Geweben vom Huhn im Vergleich zu HeLa-Zellen**

Spur 1-6: Gesamtproteine aus verschiedenen Organen eines 10 Tage alten Hühnerembryos

Spur 7: in Kultur genommene Hühner Fibroblasten aus 10 Tage alten Embryonen

Spur 8: in Kultur genommene HeLa-Zellen

Die Gesamtproteine aus den Geweben und Kulturzellen wurden in einer SDS-PAGE (10% Acylamid) aufgetrennt und mit (A) einem monoklonalen Antikörper (13D4) gegen LAP2, (B) einem polyklonalen Antikörper (zLAP2-1) gegen LAP2 und (C) einem monoklonalen Antikörper (anti  $\alpha$ -Tubulin) gegen  $\alpha$ -Tubulin inkubiert. Molekularen Massen der Referenzproteine sind in kDa angegeben und die in HeLa-Zellen detektieren Isoformen markiert. LAP2 $\alpha$  (75 kDa), LAP2 $\beta$  (56 kDa), LAP2 $\gamma$  (42 kDa),  $\alpha$ -Tubulin (50 kDa)

Beide Antikörper detektierten in allen Geweben des Huhns das 56 kDa große LAP2 Protein (Abb. IV.15 Spur 1-8). Außerdem wurde in fast allen Geweben ein zweites Protein mit einer molekularen Größe um die 42 kDa gefunden. Dieses Protein weist eine etwas höhere Mobilität als die LAP2 $\gamma$ -Isoform der HeLa-Zellen (Abb. IV.15 Spur 8) auf. Die Expression dieser kleineren Isoform ist in Darm, Muskeln, Haut und Herz ist wesentlich geringer als im Gehirn und fehlt sogar völlig in der Leber und den Fibroblasten. Ein Verlust des Proteins durch die Extraktion ist in diesem Fall auszuschließen, da der zur Beladungskontrolle durchgeführte Immunblot mit  $\alpha$ -Tubulin zeigt eine gleichmäßige Beladung der Spuren und



bestätigt damit das Ergebnis. In keinem der analysierten Gewebe konnte jedoch ein Protein detektiert werden, welches eine dem HeLa LAP2 $\alpha$  entsprechende Größe besitzt.

Aufgrund dieser beiden Analysen können wichtige Aussagen über die im Huhn vorkommenden LAP2-Isoformen getroffen werden. Die Gewebeanalyse zeigt, dass neben der LAP2 $\beta$ -Isoform eventuell eine zweite Isoform exprimiert wird, die aufgrund ihrer molekularen Größe der LAP2 $\gamma$ -Isoform entsprechen könnte. Dieses Protein ist im Gegensatz zur LAP2 $\beta$ -Isoform, nicht in allen Geweben zu finden und wird in anderen Geweben unterschiedlich stark exprimiert. Ein LAP2 Protein, dass der  $\alpha$ -Isoform entsprechen könnte, wurde weder bei der Harnstoffextraktion noch bei der Gewebeanalyse gefunden. Daher bestätigten diese Untersuchungen die Ergebnisse der Sequenzanalyse. Im Huhn wird keine LAP2 $\alpha$ -Isoform exprimiert.

#### **IV. 1. 3. Auf der Suche nach der $\omega$ -spezifischen Isoform**

Vergleichbar mit der  $\alpha$ -Isoform in Säugern, findet man im Zebrafisch eine Isoform, die weder in Säugern, noch im Huhn vorzukommen scheint. Das LAP2 $\omega$  ist eine Isoform, die in der frühen Embryonalentwicklung eine Rolle spielt, da sie sowohl beim Zebrafisch als auch bei *Xenopus* bis zur Gastrula exprimiert wird (Schoft et al., 2003).

Ein Sequenzvergleich der  $\omega$ -spezifischen Exons mit der genomischen Sequenz des Menschen und des Huhn ergaben weder auf Nukleotid- noch auf Aminosäureebene signifikante Ähnlichkeiten. Auch ein "Blast Search" in den entsprechenden Datenbanken blieb ohne Erfolg.

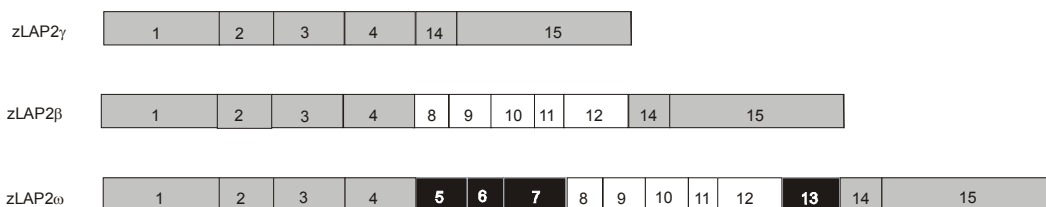
Eine Suche nach der  $\omega$ -spezifischen Region in Medaka und *Fugu* waren dagegen etwas erfolgreicher. Es wurden einige Sequenzen gefunden die gewisse Ähnlichkeiten mit der aminoterminalen Region und der  $\omega$ -spezifische Region aufweisen. Leider sind die Datenbanken (<http://www.mbase.bioweb.ne> oder <http://fugu.hgmp.mrc.ac.uk> ) noch nicht so weit etabliert, dass eindeutige Aussagen über die Existenz von Genen, geschweige denn über Isoformen, getroffen werden können. Eine proteinbiochemische Analyse von LAP2-Isoformen in *Fugu* und Medaka ist bis jetzt leider noch nicht durchführbar, da die existierenden Antikörper gegen LAP2 in beiden Spezies keine Proteine detektieren.

## IV. 2. Diskussion

### IV. 2. 1. Charakterisierung des Zebrafisch LAP2

Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse des Zebrafisch LAP2 Gens ermöglicht eine strukturelle Charakterisierung des LAP2 und gibt Aufschluss über Größe und Lage des Gens, sowie über die Zusammensetzung der einzelnen Splicevarianten. Weiterhin ermöglicht sie die Suche nach unerkannten Splicevarianten innerhalb der gefundenen Introns.

Obwohl die Grenzen der regulatorischen Bereiche noch nicht vollständig bekannt sind, konnte anhand der gefundenen Daten gezeigt werden, dass das LAP2 Gen eine ungefähr Größe von 19 kb aufweist. In diesen 19 kb werden 15 Exons und 14 Introns kodiert, aus denen durch alternatives Splicen drei verschiedene Isoformen (LAP2 $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\omega$ ) hervorgehen. Die entwicklungspezifisch exprimierten Isoformen (Schoft et al., 2003) besitzen alle einen identischen Aminoterminus und einen identischen Carboxyterminus, die von Exon 1-4 bzw. Exon 14 und 15 kodiert sind. Während LAP2 $\omega$  alle 15 Exons besitzt, fehlen im LAP2 $\beta$  die  $\omega$ -spezifischen Bereiche Exon 5-7 und Exon 13. LAP2 $\gamma$  wird dagegen nur von den allgemeinen Exons 1-4 und Exon 14 und 15 gebildet (Abb. IV.17). Die für LAP2 charakteristische LEM-Domäne (93-143 AS) beginnt in Exon 2 und nimmt fast das ganze Exon 3 in Anspruch. Die carboxyterminale Transmembrandomäne befindet sich in Exon 15.



**Abb. IV.17: Splicevarianten des zLAP2Gens**

Kästen markieren die im zLAP2 auftretenden Exons; grau: Exons, die in allen drei Splicevarianten vorkommen, weiß: Exons, die in der  $\omega$  und  $\beta$ -Isoform auftreten, schwarz:  $\omega$ -spezifische Exons

Das Gen konnte im Zebrafisch Genom auf der Linkage Group 4 zwischen den Markern fc01g04 (213.97cR) und fb49f01 (215,69cR) eingeordnet werden.

### IV. 2. 2. Identifikation eines LAP2 in Hühnchen

Im Gegensatz zum Zebrafisch konnte bei der Suche nach einem LAP2 im Huhn nicht auf bekannte cDNA-Sequenzen zurückgegriffen werden. Anhand von vergleichenden Analysen

mit der konservierten aminoterminalen Domäne der  $\beta$ -Isoformen des Zebrafisch und des Menschen, konnte jedoch in einer Datenbank ein EST-Klon identifiziert werden. Dieser EST-Klon beinhaltet eine Sequenz von 1335 bp, die eine hohe Ähnlichkeit mit dem LAP2 $\beta$  des Menschen und des Zebrafisch aufweist. Obwohl die Datenbankanalyse keinen EST-Klon mit einer homologen Sequenz für eine  $\gamma$ -Isoform ergab, so scheinen die proteinbiochemischen Untersuchungen doch Hinweise für solch eine Splicevariante zu liefern. Diese putative  $\gamma$ -Isoform scheint ein etwas kleineres Molekulargewicht als die bekannte  $\gamma$ -Isoform des Menschen zu besitzen und auch in verschiedenen Geweben von 10 Tage alten Embryonen unterschiedlich stark exprimiert zu werden. Das durch SDS-PAGE nachgewiesene cLAP2 $\beta$  besitzt dagegen eine ähnliche molekulare Mobilität wie das menschliche LAP2 $\beta$ . Die Suche nach einer genomischen Sequenz war ebenfalls erfolgreich. Das LAP2-Gen ist auf dem Hühnerchromosom 1 lokalisiert und kodiert innerhalb von 20,5 kb (ohne regulatorische Bereiche) 9 Exons.

#### **IV. 2. 3. Vergleichende Analysen von LAP2 in verschiedenen Spezies**

Während die Größen der homologen Proteine in den verschiedenen Spezies keine großen Unterschiede aufweisen, zeigen die genomischen Sequenzen der Spezies mit zunehmendem Entwicklungsstand auch eine zunehmende Größe. Im Zebrafisch sind die kodierenden Sequenzen innerhalb von 19 kb zu finden. Im Huhn sind es ungefähr 20,5 kb und bei der Maus schon ~22 kb (Berger et al., 1996). Das größte LAP2 Gen findet man mit ~35 kb im Menschen (Harris et al., 1995). Die Größenunterschiede kommen zum Teil durch die zunehmenden Größen der Introns zustande aber auch dadurch, dass die Säuger für eine zusätzliche Isoform kodieren die 1518 bp umfasst. Die Ähnlichkeiten innerhalb der einzelnen vergleichbaren Exons von Zebrafisch, Huhn und Mensch scheinen ebenfalls mit der evolutiven Entwicklung zuzunehmen. Während das LAP2 $\beta$  des Zebrafisch mit dem des Menschen eine Identität von 36% zeigt, liegt die Identität von Huhn und Mensch bei 67% und die von Maus und Mensch bei 85%. Es ist anzumerken, dass die Ähnlichkeiten zwischen Zebrafisch und Huhn geringer sind als die von Huhn und Mensch. Obwohl das LAP2 Gen Ähnlichkeiten in der Sequenz, der Größe oder des strukturellen Aufbaus besitzt, treten auch gravierende Unterschiede in den durch alternatives Splicen entstehenden Isoformen auf.

#### **IV. 2. 4. LAP2 $\omega$ und LAP2 $\alpha$ - zwei Isoformen die nicht in allen Spezies vertreten sind**

Die genomischen Analysen von verschiedenen Organismen zeigen, dass es im Laufe der Evolution zu einer Vielzahl von genetischen Veränderungen gekommen ist. Einige Gene verschwinden völlig, andere bleiben zwar im Genom enthalten, werden aber nicht translatiert. Wiederum andere Gene entstehen durch Kombination zweier einzelner Gene, werden durch Viren oder Bakterieninfektionen integriert oder entstehen einfach von selbst. Der Grund für solche Ereignisse liegt häufig in der Funktion des Proteins, deren Aufgaben entweder überflüssig werden, oder besondere Anpassungen eines Organismus darstellen.

Das LAP2, ein Gen, welches in allen Vertebraten zu finden ist, kodiert in den verschiedenen Organismen eine unterschiedliche Anzahl von Splicevarianten. In *Xenopus*, Zebrafisch und Mensch sind jeweils drei Splicevarianten näher charakterisiert und in der Maus wurden sogar 8 Varianten gefunden (Berger et al., 1996). Der erste Blick lässt vermuten, dass die einzelnen Varianten homolog zueinander sind. Dies scheint auch auf die  $\beta$  und  $\gamma$  Isoform zu zutreffen, da diese nicht nur eine ähnliche Sequenz aufweisen sondern auch ein ähnliches Molekulargewicht, Extraktionsverhalten und eine ähnliche entwicklungspezifische Expression besitzen. Andere Isoformen wie LAP2 $\omega$  oder LAP2 $\alpha$  kommen dagegen nicht in allen Spezies vor. Die Frage nach dem Grund ist in beiden Fällen noch nicht eindeutig zu beantworten und mag mit der speziellen Funktion der Isoform zusammenhängen.

#### **IV. 2. 5. Das LAP2 $\omega$ von *Xenopus* und Zebrafisch**

Das LAP2 $\omega$  ist eine der drei LAP2 Isoformen die sowohl in *Xenopus* als auch im Zebrafisch beschrieben wurden (Lang et al. 1999; Schoft et al, 2003), aber weder in der Maus noch im Menschen ein Homolog zu besitzen scheinen. Die genomischen Analysen in dieser Arbeit zeigen, dass weder im menschlichen noch im Hühner LAP2 Bereiche existieren, die eine signifikante Ähnlichkeit zu den  $\omega$ -spezifischen Exons des Zebrafisch aufweisen. Die Frage nach dem Warum kann wohl mit der speziellen Funktion dieser Isoform begründet werden. Obwohl die genaue Funktion bis heute nicht geklärt wurde, so gibt es Hinweise, dass die  $\omega$ -Isoform eine wichtige Rolle in der frühen Embryonalentwicklung spielt. Sowohl in *Xenopus* als auch im Zebrafisch wird das LAP2 $\omega$  nur in der Oocyte und in der frühen Embryonalentwicklung exprimiert. Untersuchungen aus unserem Labor zeigten, dass das LAP2 $\omega$  des Zebrafisch an der Karyomerbildung in den frühen Mitosen beteiligt zu sein

scheint (Schoft et al., 2003). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von frühen Embryonalstadien des Zebrafisch belegten eine Karyomerbildung bis zum 5-8 Somitenstadium (11-13h nach Befruchtung). Ebenso konnte durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden, dass das zLAP2 $\omega$  in den ersten 12 Stunden nach der Befruchtung mit Chromosomen colokalisiert und diese Colokalisation mit Verlauf der Entwicklung abnimmt. Da die Expression der  $\omega$ -Isoform in Stadien exprimiert wird in denen auch Karyomere gebildet werden, aber durch die somatischen Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$  ersetzt wird, sobald in der Zellteilung keine Karyomere mehr zu finden ist, kann man eine Rolle des LAP2 $\omega$  diesbezüglich vermuten.

Diese Theorie der LAP2 $\omega$  Funktion wird weiterhin dadurch untermauert, dass die  $\omega$ -Isoform auch bei *Xenopus* vorhanden ist, in dessen frühen Entwicklungsstadien ebenfalls Karyomere gebildet werden, aber in höheren Vertebraten wie Vögeln und Säugern nicht vorliegt. Die Karyomere sind wahrscheinlich eine Anpassung an die verkürzte Mitose, die in den ersten Embryonalstadien bei *Xenopus* und Zebrafisch auftreten. Da bei höheren Vertebraten noch keine verkürzten Mitosen oder Karyomere gefunden wurden, kann man vermuten, dass die Funktion des LAP2 $\omega$  wahrscheinlich überflüssig geworden ist. Ebenso wie das LAP2 $\omega$  existiert bei Zebrafisch und *Xenopus* ein weiteres Protein, das eine entwicklungspezifische Rolle zu spielen scheint. Das Lamin LIII wird in beiden Organismen hauptsächlich in der Oocyte exprimiert und ist im adulten *Xenopus* nur noch in spezifischen Geweben wie Ovar, Herz und Gehirn zu finden (Benavente und Krohne 1985, Stick, 1988; Hofemeister et al., 2002). Untersuchung an Säugern, bezogen auf Maus, Ratte und Mensch, zeigten auch hier, dass dieses, für die Entwicklung des *Xenopus* wichtige Protein in Säugern nicht existiert (Hesse 2004).

In beiden Fällen wurden wohl im Laufe der evolutiven Entwicklung andere Mechanismen etabliert, die die Existenz dieser Splicevarianten überflüssig machten und sie deswegen wahrscheinlich verloren gingen.

#### **IV. 2. 6. Die säugerspezifische $\alpha$ Isoform des LAP2**

Eine weitere LAP2 Isoform, die eine so angepasste Funktion zu besitzen scheint, dass sie nicht in allen Vertebraten benötigt wird, ist die  $\alpha$ -Isoform. Eine Besonderheit dieser Isoform und damit ein herausstechender Unterschied zu allen anderen Isoformen ist das Fehlen einer Transmembrandomäne im  $\alpha$ -spezifischen Carboxyterminus. Durch diesen Verlust kann das

LAP2 $\alpha$  nicht mehr in die Membran integriert werden und wird daher nur in Assoziation mit Chromatin gefunden, an das es über seine speziellen DNA Bindungsdomänen bindet.

Aufgrund unserer sehr spezifischen Antikörper, die in der Lage sind kleinste Mengen von LAP2-Protein in einer SDS-PAGE zu detektieren, konnten Untersuchungen an somatischen Zellen und Geweben von *Xenopus*, Zebrafisch und Hühnchen durchgeführt werden (Lang et al., 1999; diese Arbeit). In keinem der untersuchten Organismen konnten wir einen Hinweis für die Existenz einer Isoform finden, die mit dem Molekulargewicht oder dem Extraktionsverhalten des Säuger LAP2 $\alpha$  vergleichbar wäre. Auch Untersuchungen an anderen Amphibien blieben den Nachweis einer  $\alpha$ -Isoform schuldig (Del Pino et al., 2002). Die Möglichkeit, die genomischen Sequenzen auf Spuren einer vielleicht nicht mehr prozessierten Isoform hin zu untersuchen, ergab sich durch die beiden identifizierten Klone aus den Zebrafisch und Hühnchen Datenbanken. Obwohl im Vergleich zum LAP2 Gen des Huhns im Zebrafisch nach den allgemeinen Exons 1-4 ausreichend Platz für eine  $\alpha$  spezifische Region wäre, blieben alle Sequenzvergleiche negativ. Weder im Zebrafisch noch im Huhn konnte eine Region gefunden werden, die eine signifikante Ähnlichkeit mit dem humanen Exon 4 zeigt. Ebenso blieben die Vergleiche in Medaka und *Fugu* Datenbanken ohne Erfolg.

Eine Erklärung für das Fehlen dieser Isoform zu finden ist schwierig, besonders da die genaue Funktion des LAP2 $\alpha$  noch nicht geklärt ist. Basierend auf der Annahme, dass diese Isoform ähnlich wie die  $\omega$ -Isoform eine ganz spezifische Aufgabe besitzt, stellt sich die Frage ob das LAP2 $\alpha$  im Laufe der Evolution von Fischen, Amphibien und Vögeln verloren gegangen ist, oder eine neue Entwicklung in Säugern darstellt. Im ersten Fall würde dies bedeuten, dass die Funktion des LAP2 $\alpha$  soweit an Bedeutung verloren hat, dass die Expression des Proteins überflüssig geworden ist, oder eventuell andere Proteine die Funktion des LAP2 $\alpha$  übernommen haben. Die zweite Theorie würde dem LAP2 $\alpha$  eine wesentlich wichtigere Funktion zusprechen als die erste, denn hier wäre die Funktion so speziell, dass eigens dafür ein neues Protein benötigt wird. Da der Aufbau von Strukturen in Säugern meist komplexeren Mechanismen folgt als in niederen Vertebraten oder gar Invertebraten, scheint diese Vorstellung plausibel. Als Beispiel kann hier auch die Bildung der Lamina angesprochen werden. In Säugern findet man vier verschiedenen Splicevarianten des Lamin A Gens (Lamin A, A $\Delta$ 10, C, C2) und 2 Varianten des Lamin B2 Gens (Gruenbaum et al., 2003). All diese Splicevarianten sind am Aufbau der Lamina, entweder in allen (Lamin A/C) oder in spezialisierten Zellen (Lamin C2) beteiligt. In Amphibien, Fischen und Vögeln ist der Aufbau der Lamina weniger komplex, denn hier ist nur ein Lamin A bekannt.

In diesem Zusammenhang mag es auch interessant erscheinen, dass das LAP2 $\alpha$  als einzige LAP2 Isoform in seinem Carboxyterminus eine Domäne besitzt, mit der es an Lamin A/C binden kann (Dechat et al., 2002b). Da das LAP2 $\alpha$  zusätzlich zwei DNA Bindungsdomänen (Vlcek et al., 1999) aufweist, könnte es Einfluss auf die Organisation von Chromatin nehmen. Dies ist besonders interessant wenn man bedenkt, dass in Spermatogenesestadien von Säugern, in denen die Umorganisation und Verpackung des Chromatins eine wichtige Rolle spielt, ausschließlich die LAP2 $\alpha$ -Isoform gefunden wird (Alsheimer et al 1998). Vielleicht ist das der ausschlaggebende Punkt, der die LAP2 $\alpha$  Isoform in Säugern unentbehrlich macht.

Die Frage woher die  $\alpha$ -Isoform stammt, oder besser das für die  $\alpha$ -spezifische Region kodierende Exon konnte bis jetzt noch nicht beantwortet werden. Versuche das Exon einem viralen Ursprung zuzuordnen, blieben erfolglos, da keine signifikanten Ähnlichkeiten zu finden waren. Die Entstehung des LAP2 $\alpha$  Exon kann wohl erst geklärt werden, wenn die einzelnen Funktionen der verschiedenen Isoformen in höheren und niederen Vertebraten bekannt sind. knock-down oder gar knock-out Versuche der einzelnen Splicevariante an lebenden Organismen können vielleicht dazu beitragen diese Funktionen zu ergründen.

## V. Der Lamin B Rezeptor des Zebrafisch

### V. 1. Ergebnisse

#### V. 1. 1. Identifikation eines cDNA-Klons des Zebrafisch Lamin B Rezeptors (zLBR)

Anhand von vergleichenden Suchen mit der *Xenopus* LBR cDNA-Sequenz in verschiedenen Datenbanken konnten, bezogen auf den Zebrafisch, einige Sequenzen ermittelt werden, die im carboxyterminalen Bereich eine gewisse Ähnlichkeit aufweisen. Aufgrund dieser gefundenen Sequenzen war Vera Schoft während ihrer Diplomarbeit in der Lage drei Fragmente zu amplifizieren, die den carboxyterminalen Teil des Zebrafisch LBRs beinhalten. Diese Fragmente wurden in den TOPO-Vektor ligiert und lagen für diese Arbeit unverändert vor. Die Sequenzierung dieser Fragmente zeigte, dass zwei dieser Sequenzen überlappten, die dritte jedoch eine völlig andere Sequenz besaß, die zusätzlich auch keine Ähnlichkeit zum *Xenopus* LBR aufwies. Das größere der beiden DNA-Fragmente (1035 bp) wurde genutzt, um eine radioaktive, mit  $^{32}\text{P}$  markierte, Sonde für die Hybridisierung einer Zebrafisch cDNA-Genbank herzustellen.

Die 4 unter hohen Stringenzbedingungen hybridisierten cDNA-Filter (RZPD) zeigten nach der Exposition eine Vielzahl von Signalen. Die Signale konnten als schwach, deutlich und sehr stark eingestuft werden. Von 6 sehr stark leuchtenden Signalen wurden dazugehörige cDNA-Klon bei RZPD bestellt, die im pSPORT1-Vektor geliefert wurden.

Zur Kontrolle der gelieferten Klone und um auszuschließen, dass keine falsch-positiven Klone bestellt wurden, wurde das beinhaltete DNA Fragment mit den Primern Sp6 und T7 (Kapitel III.8.1) ansequenziert und mit der bekannten Sequenz von Vera Schoft verglichen. Dabei wurde bestätigt, dass alle cDNA-Klone für die 3' Region des Zebrafisch LBRs kodieren. Für die weitere Identifikation der cDNA-Sequenz des zLBR wurden alle 6 Klone, ausgehend vom 3'-Ende, sequenziert. Je nach erhaltener Sequenz wurden für die folgende Sequenzierung neue Primer (P2, P3, P4, P5; Kapitel III.8.1) bestellt. Als Ergebnis zeigte sich, dass nur der Klon MPMGp567K10194Q3 die vollständige cDNA des zLBR enthält. Mit dem Primer P5 wurde neben der kodierenden Region bis zum ATG auch die gesamte, im cDNA-Klon enthaltene untranslatierte 5' Region sequenziert. Die untranslatierte 3' Region wurde mit Hilfe der Primer (P, P+(A)) ermittelt (Kapitel III.8.1).



Die erhaltenen Sequenzen wurden untereinander, und mit der Sequenz des schon länger bekannten Fragments, verglichen und entsprechend zusammengesetzt. Sie kann als komplette cDNA-Sequenz des zLBR angesehen werden (Abb. V.1).

tttcacagagggaaccagttcagagcggggccagcgttttaaaacaatattctttatattatga  
acttccacggataagcttttagtgattttttaggaaaataaggtcgactgaagtaaacaag

1 ATGCCGCTGCAAGGTTTCAGATTGGAGATACTGTAATGGCCGCTGGCCCGCAGTAAC  
1 **M P P A R F Q I G D T V M G R W P G S N**

61 CTTTATTATGAGGTCAAGGTGATGAGTTTGTATAACAAGACTCGCCTCTACACCGTCATC  
21 **L Y Y E V K V M S F D N K T R L Y T V I**

121 TACAAAGATGGTACTGAGCTGGAGCTGAAGGAGTCAGACATCACGAGTGTGGTCATTTTTT  
41 **Y K D G T E L E L K E S D I T S V V I F**

181 CAAACTGCTGGACGGTCGAGGTCAAGATCTCGATCACCGGGACGCTCGCCAGGACGTTCA  
61 **Q T A G R S R S R S R S P G R S P G R S**

241 TCGGCACGTTCCCGGGACGCCACGTCGCAGTCGCTCCCGTTCACCAGCTAGGACCCGCG  
81 **S A R S R D A H V A V A P V H Q L G P A**

301 CAGAGCTTATCTCGCACACAAAAGTGCCCAAGGAAAACCTCAAGAAGTGTGGAGGTTTCA  
101 **Q S L S R T Q K C P R K T Q E V L E V R**

361 CTCACTCCTGTGGCGATGAAACACGAGAACAACAGCAGCAACAGCAAATCTGAGAAGAAA  
121 **L T P V A M K H E N N S S N S K S E K K**

421 GAGGAAAATAATACAGCTAAAGCAGCTCCTGTAGTCACAGAGGAGAAGACAGAGACTGAA  
141 **E E N N T A K A A P V V T E E K T E T E**

481 TCAGAGAACCAGACAGGTGGACGATATAATCTACGGCGCAGGAAGGACCAGGGTGTATGGC  
161 **S E N Q T G G R Y N L R R R K D Q G D G**

541 AAGGCTGTAGAGCTGGAGAAAGCCGTAGAGTCTGAGCCGTTATTGCAAACCTAAAGCACCA  
181 **K A V E L E K A V E S E P L L Q T K A P**

601 GCAGCCGTC AAGACCGCGATCTGGAGTTTGGAGGAAGAGTCGGTGTGCTTTTCCTGATG  
201 **A A V K T A D L E F G G R V G V L F L M**

661 TTTCTGCTGCCAGGGCTGTGTTGGTATGCTCATTCTCTGTGGGCAGAAGATGCCAGTCTC  
221 **F L L P G L C W Y A H S L W A E D A S L**

721 CAGAGCTTTCCTCTTGAGCTTCCCGCTTTCAGTCTGTCTGGGATTGCCAGGTCTTTGGC  
241 **Q S F P L E L P A L Q S V W D C Q V F G**

781 ATCGTCTGCTCTGGCTTCTCTTCCAGGCCGCTCCTCTCCTTGCTCCCTGTCGGAAAGCTT  
261 **I V L L W L L F Q A V L S L L P V G K L**

841 GTTGAAGGAATGCCACTTAAGAATGGGAAAACCTTGAATACAGGATTAATGGTTTCTAT  
281 **V E G M P L K N G K T L K Y R I N G F Y**

901 GCATTACTCTCACGGCTGTGGCAGCAGGTGTCGCTGTGTACCAGGAGGTGGATCTCAGC  
301 **A L L L T A V A A G V A V Y Q E V D L S**

961 TACATCCATGCACACTTCTTGAGTTCTACACCTCTGCCCTGCTCATCGCAACTCTCCTC  
321 **Y I H A H F L Q F Y T S A L L I A T L L**

1021 AGCATCTACCTGTTTCATCCGCTCCCGCTGGGCATCTAAAGATGAGCTAGCTCCCGGAGGA  
341 **S I Y L F I R S R W A S K D E L A P G G**

1081 ATTTTGGCTACATCATTTATGACTTCTTCATGGGCAGAGAGTTAAATCCCGTATCAAA  
361 **I F G Y I I Y D F F M G R E L N P R I K**

1141 AGCTTCGATATTAAGTTCTTCTGTGAAATGCGCCCTGGACTGATGGGTTGGGTGTTGATC  
381 **S F D I K F F C E M R P G L M G W V L I**

## V. Der Lamin B Rezeptor des Zebrafisch

---

```

1201  AACTTTGCGATGTTGCTTGCTGAAATGAAGCAGCAGAATCTGGAGAATCCGTCTCCAGCG
401  N F A M L L A E M K Q Q N L E N P S P A

1261  ATGCTCCTGGTCAACATCTTCCAGCTCCTGTGGGTCATCGATGGCTTGTGGCATGAGGAG
421  M L L V N I F Q L L W V I D G L W H E E

1321  AAGCTGCTGACTATGATGGACATAATGTATGATGGCTTTGGATTTATGTTGACATTTGGA
441  K L L T M M D I M Y D G F G F M L T F G

1381  GATTTGGCTTTTTGTCCCTTTACATTCACATGTCAAGCATACTATCTAGTCACCCATCCC
461  D L A F V P F T F T C Q A Y Y L V T H P

1441  AATGAGCTCTCAGTGTCTGGATCATTACTCTCATTGCTATGAACGGAGTGGGATACTAT
481  N E L S V F W I I T L I A M N G V G Y Y

1501  ATTTTCAGGAAAGCCAACCTCTCAGAAGTTTGCCTTCAGGAAAAACCCTTCTGACCCGCA
501  I F R K A N S Q K F A F R K N P S D P A

1561  GTGTATCATCTGAAAACCTATTCCCTACTGCAACCGGAAAGAGTCTCATTGTGTCTGGTCTC
521  V Y H L K T I P T A T G K S L I V S G L

1621  TGGGGTTTTGTCCGTCATCCCAATTACCTGGGGGACATCATCATGGCTTTGGCCTGGTCT
541  W G F V R H P N Y L G D I I M A L A W S

1681  CTACCATGCGGGTTCAACACTCTGGTCCCTTATTTTTACCTGATCTATTTGGTCACTCTG
561  L P C G F N T L V P Y F Y L I Y L V T L

1741  CTGGCGCACGGAACCGCACGACACGAGCGTAAGTGCAGGAAAAAGTACGGCTCTGCATGG
581  L A H G T A R H E R K C R K K Y G S A W

1801  GAAGAGTACTGCCAAGCTGTCCCGTACCGCATTTCCTCAAGAGTATACTGAgacttagtc
601  E E Y C Q A V P Y R I F P R V Y *

```

```

tgttatggacactcggggcctaaacaccaggatgacaccgaacatcaaacagggaaatgagtcattagc
agcttagcctcctttttaaagtctttttaaacaacaaacaattacaattgagcaccaaaatcaaacca
atthttcagtcacaaagcgtttacggattgtggacactgcccagtttgagagtttgatctcttaga
tgtatattatgacttagtctgttatggacactcggggcctaaacaccaggatgacaccgaacatcaaa
cagggaaatgagtcattagcagcttagcctcctttttaaagtctttttaaacaacaaacaattacaatt
gagcaccaaaatcaaaccaatthttcagtcacaaagcgtttacggattgtggacactgcccagtttg
cagagtttgatctcttagatgtatattatngtacatattgttttttttttttttaactcttaaat
tgtgttgacataatcctcaacttgccatctcatctgatgtacacacatatacacatttaacgtatttgc
ttggctatttaccattgactttttttatgacacattgtgtaaatgctttttgtatattgtgtatgatgg
gatttttttatatgtgtatagnaaggaac

```

### Abb. V.1: cDNA-Sequenz des Zebrafisch LBRs

ermittelt über Sequenzierung des RZPD Klons MPMGp567K10194Q3 sowie dem zuvor bekannten Fragment; verwendete Primer: (P, P2, P3, P4, P5, P(+A); Kapitel III.8.1); Großbuchstaben: kodierende Nukleotidsequenz; Kleinbuchstaben nicht translatierte Regionen; Unterstrichen Start- und Stopcodon; fett gedruckt: Aminosäuresequenz; normal gedruckt: Nukleotidsequenz

Die so erhaltene Sequenz umfasst 2645 bp und kodiert für ein 616 AS großes Protein. Im angrenzenden Bereich an das 5' und 3' Ende der kodierenden Sequenz sind 128 bp bzw. 642 bp der nicht translatierten Region zu finden. In einem Vergleich mit dem Hühner und dem menschlichen LBR (Abb. V.2) konnte auf Aminosäureebene eine hohe Ähnlichkeit festgestellt werden.

## V. Der Lamin B Rezeptor des Zebrafisch

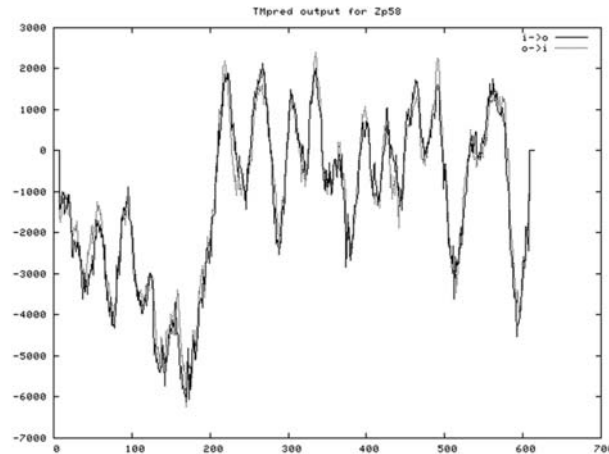
<b>H</b>	MPSRKFDAGEVVRGRWPGSSLYEVEILSHDSTSQLYTVKYKDGTELELKENDIKPLTSF	60
<b>C</b>	MPNRYADAGEVVMGRWPGSVLYYEVQVTSYDDASHLYTVKYKDGTELALKESDIRLQSSF	60
<b>Z</b>	MPPARFQIGDTVMGRWPGSNLYYEVKVMSEFNKTRLYTVIYKDGTELELKESDITSVVIF	60
	* * *	
<b>H</b>	RQR KGGSTSSSPSRRRGRSRSRSPGRPPKSARRSASASHQADIKEARREVEVKLT	118
<b>C</b>	KQR KSQSSSSPSRR SRSRSRSPGRPAKGRSS SHSREHKEDKKKIQETS	114
<b>Z</b>	QTAGRSRSPGRSP GRSSARSRAHVAVPVHQLGPAQSLSRTQKCPKRTQEVLEV	119
<b>H</b>	PLILKPFNGSISRYNGEPEHIERNNDAPHKNT QEKFSLSQESS YIATQYSLRPRREEVK	176
<b>C</b>	LAPPKPSENNTRYNGEPDSTERNDTSSKLEQQKLPDVEME RVLDDQYSLRSRREEKK	173
<b>Z</b>	RLTPVAMKHENSSNSKSEKKEENNTAKAAPVVTEEKTETESENQTGGRYNLRRRKQGD	179
<b>H</b>	LKEIDSKEEKYVAKELAVRTFEVTPIRAKDLEFGGVPGVFLIMFGLPVFLFLLLMCKQK	236
<b>C</b>	KEEIYAEKKIFEAIKTPEKPSKTKLEFGGRFGTFMLMFFLPATVLYLVLMCKQD	229
<b>Z</b>	GKAVELEKAVESEP LLQTKAPAAVKTADLEFGGRVGVFLMFLPLGLCWYAHSLWA E	236
<b>H</b>	DPSSLNFPPPLPALYELWETRVFGVYLLWFLIQVLFYLLPIGKVVEGTPLIDGRRLKYRL	296
<b>C</b>	DPSLMNFPP LPALESWETKVFVGLLWFFFQALFYLLPIGKVVEGLPLSNPRKLYRI	288
<b>Z</b>	DASLQSFPLELPALQSVWDCQVFGIVLLWLLFQAVLSLLPVGKLVGEMPLKNGKTLKYRI	296
<b>H</b>	NGFYAFILTSAVIGTSLFQGVFHYVYSHFLQFALAATVFCVLSVYLYMRSLKAPRNDL	356
<b>C</b>	NGFYAFLLTAAAGTLLYFQFELHYLYDHFVQFAVSAAAFMSALSIYLYIRSLKAPPEEDL	348
<b>Z</b>	NGFYALLTAVAAGVAVYQEVDSLSTHAHFLQFYTSALLIATLLSIYLFIRSRWASKDEL	356
<b>H</b>	SP ASSGNAVYDFFIGRELNPRICTFDLKYFCELRPGLIGWVINLVMLLAEMKIQDRAV	415
<b>C</b>	APGGNSGYLVYDFFTGHELNPRIGSFDLKYFCELRPGLIGWVINLAMLLAEMKIHNQSM	408
<b>Z</b>	APGGIFGYIYDFFMGRELNPRIKSFDIKFFCEMRPGLMGWVLINFAMLLAEMKQNLNEN	416
<b>H</b>	PSLAMILVNSFQLLYVVDALWNEEALLTTMDIHDGFGFMALAFGDLVWVVFYYSFQAFYL	475
<b>C</b>	PSLSMILVNSFQLLYVVDALWNEEAVLTTMDITHDGFGFMALAFGDLVWVVFVYSLQAFYL	468
<b>Z</b>	PSPAMLLVNI FQLLWVIDGLWHEEKLLTMDIMYDGFGLMFTFGDLAFVVFYTCQAYYL	476
<b>H</b>	VSHPNEVSWPMASLIIVLKLKCGYVIFRGANSQKNAFRKNPSDPKLAHLKTIHTSTGKNLL	535
<b>C</b>	VGHPIAISWPVAAAITILNCIGYIIFRSANSQKNFRNPADPKLSYLKVIPTATGKGLL	528
<b>Z</b>	VTHPNELSVFWIITLIAMNGVGYIIFRKANSQKFAFRKNPSDPAVYHLKTIPTATGKSLI	536
<b>H</b>	VSGWGWGFVRHPNYLGDILMALAWSLPCGFNHILPYFYIYFTMLLVHREARDEYHCKKKY	595
<b>C</b>	VTGWGWGFVRHPNYLGDII MALAWSLPCGFNHILPYFYVIYFICLLVHREARDEHCKKKY	588
<b>Z</b>	VSGLWGWGFVRHPNYLGDII MALAWSLPCGFNTLVYFYLIYLVTLAHTARHERKCRKKY	596
<b>H</b>	GVAWEKYCQRPYRIFPYIY	615
<b>C</b>	GLAWERYCQRPYRIFPYIY	608
<b>Z</b>	GSAAWEYCQAVPYRIFPRVY	616

**Abb. V.2: Vergleich der Aminosäuresequenz von Zebrafisch, Huhn und menschlichem LBR**

grau unterlegt: identische Aminosäuren; unterstrichen: Transmembrandomänen; H: Mensch (Acc.number: BC20079); C: Huhn (Acc.number:Y00822) verbesserte Sequenz (Gajewski and Krohne 1999); Z: Zebrafisch

Der Vergleich dieser drei Spezies (Zebrafisch, Huhn und Mensch) beweist nicht nur die hohe Ähnlichkeit des Zebrafisch LBRs zu den anderen LBRs sondern zeigt auch, dass sowohl die ersten 75 AS der aminoterminalen Domäne, sowie die letzten 319 AS der carboxyterminalen Domäne eine hohe Konservierung erfahren haben.

Der Vergleich zeigt ebenfalls, dass die Aminosäuresequenz des zLBR in den Bereichen der Transmembrandomänen des Menschen eine hohe Übereinstimmung aufweist. Um jedoch die genaue Lage der Transmembrandomänen im Zebrafisch festzulegen, wurden diese mit Hilfe eines Hydrophobizitätsprofils (Abb. V.3) ermittelt.



**Abb. V.3: Hydrophobizitätsprofil des Zebrafisch LBRs**  
 Ermittelt über das TMpred von ExPasy; Peaks >0: Transmembrandomänen

Das Hydrophobizitätsprofil (ExPasy TMpred) des zLBR ergab zwei Möglichkeiten an welchen Positionen Transmembrandomänen im zLBR zu finden sein könnten. In Tabelle V.1 sind die Lage, Größe und Orientierung beider Versionen aufgeführt.

**Tab. V.1: Putative Transmembrandomänen im zLBR**

Ermittelt über das TMpred von ExPasy; Das Programm stellte zwei Möglichkeiten für die Anzahl und Lage der putativen Transmembrandomänen (TM) zur Verfügung; Angaben in Aminosäuren (AS); a: außen; i:innen

**A)**

TM	Position (AS)	Länge (AS)	Orientierung
1	210- 229	20	a-i
2	258- 277	20	i-a
3	296- 313	18	a-i
4	326- 246	21	i-a
5	390- 407	18	a-i
6	419- 436	18	i-a
7	452- 477	26	a-i
8	483- 502	20	i-a
9	526- 544	19	a-i
10	550- 571	22	i-a

**B)**

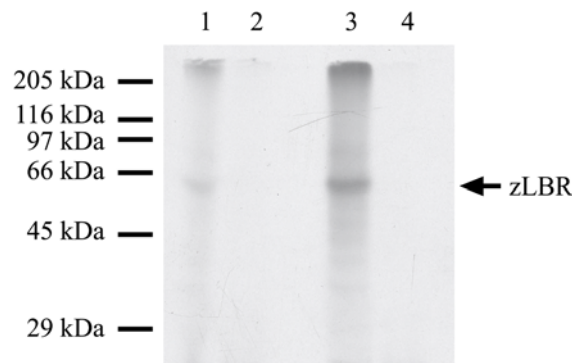
TM	Position (AS)	Länge (AS)	Orientierung
1	215- 234	20	i-a
2	253- 274	22	a-i
3	296- 314	19	i-a
4	326- 346	21	a-i
5	392- 409	18	i-a
6	417- 436	20	a-i
7	452- 477	26	i-a
8	483- 502	20	a-i
9	550- 571	22	i-a

Die vom Programm favorisierte Variante (Tab. V.1A) spricht dem zLBR 10 Transmembrandomänen zu, zeigt aber eine Orientierung des Proteins, welche die amino- und carboxyterminalen Enden in den perinukleären Raum setzt. Die zweite Variante (Tab. V.1B) mit nur 9 putativen Transmembranen zeigt zwar eine Orientierung des aminoterminalen Teils in das Nukleoplasma, aber der carboxyterminale Schwanz würde in das Lumen der Kernmembran ragen. Die Größen der Transmembrandomänen sind in beiden Varianten identisch und variieren nur leicht in der Position ( $\pm 5$  Aminosäuren).

### V. 1. 2. In vitro Transkription/Translation der gefundenen zLBR cDNA

Um zu überprüfen ob die gefundene cDNA-Sequenz aus dem Klon MPMGp567K10194Q3 ein vollständiges Protein kodiert und ob dieses Protein eine vergleichbare Mobilität wie das *Xenopus* LBR besitzt, wurde mit Hilfe des in vitro Transkription/Translation (TNT) Kits von Promega die cDNA transkribiert und anschließend die erhaltene mRNA translatiert.

Hierfür musste die cDNA aus dem pSPORT1 Vektor in den Blueskript pKS-Vektor umkloniert werden da ersterer keine Polymerasebindungsstellen aufwies. Die Umklonierung erfolgte über die von RZPD angegebenen Restriktionsstellen EcoRI und BamHI. Da aus den vorangegangenen Sequenzierungen nicht hervorging in welcher Orientierung die cDNA in dem Insert vorliegt, wurde die Transkription sowohl mit der T3 als auch mit der T7 Polymerase durchgeführt (Abb. V.4).



**Abb. V.4: Gekoppelte in vitro Transkription und Translation der zLBR cDNA aus Klon MPMGp567K10194Q3**

Nach Umklonierung in den Blueskript pKS-Vektor wurde von zwei Klonen (Klon1, Klon 2) mit dem TNT Kit von Promega, unter Verwendung der T3- (Spur 1, 3) bzw. T7-Polymerase (Spur 2, 4), die enthaltene DNA transkribiert und anschließend translatiert. Die erhaltenen Proteine wurden in einem 12% Polyacrylamidgel aufgetrennt und über Fluorographie ermittelt; zLBR (~60 kDa)

Spur 1: Klon 1, Transkription mit T3 Polymerase

Spur 2: Klon 1, Transkription mit T7 Polymerase

Spur 3: Klon 2, Transkription mit T3 Polymerase

Spur 4: Klon 2, Transkription mit T7 Polymerase

M: Marker zeigt 207, 116, 97, 66, 45, 29 kDa

In beiden transkribierten/translatierten Klonen konnte mit der T3 Polymerase ein Protein auf der Höhe von ~ 60 kDa detektiert werden. Dies ist vergleichbar mit der Mobilität des *Xenopus* (~58 kDa) und des menschlichen LBR (~60 kDa) in einer SDS-PAGE. Gleichzeitig kann man aus der positiven Translation mit T3 (Abb. V.4, Spur 1 und 3) und der negativen Translation mit T7 (Abb. V.4, Spur 2 und 4) die Orientierung der cDNA in beiden Vektoren bestimmen. Sowohl im pSPORT 1 als auch im Blueskript pKS liegt die cDNA zwischen BamHI und EcoRI der "Multiple Cloning Site" in 3'-5' Orientierung vor.

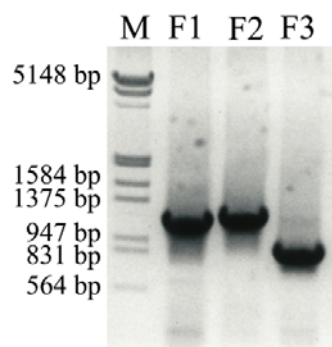
### V. 1. 3. Identifikation der genomischen LBR Sequenz des Zebrafisch

Da die genomische Cosmid-Bibliothek des Zebrafisch Genoms für die vorangegangene Untersuchung des Zebrafisch LAP2 vorlag, wurde mit der radioaktiv markierten Sonde des zLBR die Bibliothek erneut hybridisiert. Hierbei entstand nur ein Signal, dessen zugehöriger Klon bei RZPD bestellt wurde. Der Klon ICRFc71M10137Q5 wurde im lawrist 7 Vektor geliefert.

Gleichzeitig wurde in der Datenbank von Sanger mit der cDNA Sequenz des Zebrafisch LBRs ein Blast Search durchgeführt. Dabei konnte eine contig-Sequenz (contig.9684) identifiziert werden, die fast die gesamte cDNA Sequenz innerhalb von 12 kb beinhaltet. Ein kleiner Bereich der cDNA-Sequenz ~53 bp (1033-1086 bp) ist im contig.9684 nicht eindeutig zuzuordnen, da in dieser Region zu viele Nukleotidunterschiede bestehen. Weiterhin gibt es im Anschluss einen Bereich der mit 8 NN's markiert ist. Die NN's kennzeichnen eine nicht eindeutig identifizierte Region. In den für das zLBR interessanten Bereich kommt nur eine solche unbekannt Region vor.

Vergleichbar mit der Analyse, die für das Zebrafisch LAP2 (Kapitel IV.1.1.1.2.) durchgeführt wurde, wurde auch für das zLBR die Übereinstimmung der gefundenen genomischen Sequenz (RZPD; ICRFc71M10137Q5) mit der contig.9684 Sequenz (Sanger) überprüft.

Mit spezifischen Primern (P-Ex1, P-Ex2, P-Ex4, P-Ex5, P-Ex7, P-Ex8; Kapitel III.8.1), deren Nukleotidabfolge aus der Datenbank-Sequenz abgeleitet wurde, konnten in einer PCR verschiedene Fragmente amplifiziert werden (Abb. V.5).



**Abb. V.5: Größenanalyse von drei putativen Introns in Klon ICRFc71M10137Q5**

Spur1: Fragment F1 amplifiziert mit Primern P-Ex1, P-Ex2

Spur1: Fragment F2 amplifiziert mit Primern P-Ex4, P-Ex5

Spur1: Fragment F3 amplifiziert mit Primern P-Ex7, P-Ex8

Primer siehe Kapitel III.8.1; M:  $\lambda$ -EcoRI/HindIII marker von Fermentas

Die Tabelle V.2 veranschaulicht die aus der contig-Sequenz vorhergesagten Größen und die durch die PCR amplifizierten Fragmente (Abb. V.5). Fragment 1 und Fragment 2 stimmen

mit der erwarteten Größe aus der contig-Sequenz überein, wohingegen Fragment 3 im Agarosegel etwas schneller läuft als erwartet.

**Tab.V.2: Größenvergleich der durch PCR erhaltenen DNA Fragmente mit der erwarteten Sequenz der contig-Sequenz von Sanger (contig.9684)**

amplifizierte Größe: stammt aus Größenanalyse einiger Fragmente aus Klon ICRFc71M10137Q5 (Abb.V.5); erwartete Größe stammt von der contig.9684 Sequenz (Sanger)  
Verwendte Primer für die PCR-Amplifikation siehe Kapitel III.8.1

Fragment	amplifizierter Bereich	erwartete Größe	amplifizierte Größe
F1	Exon 1 - Exon2	1191 bp	~ 1200 bp
F2	Exon 4 - Exon 5	1221 bp	1200-1250 bp
F3	Exon 7 - Exon 8	873 bp	~ 830bp

#### V. 1. 4. Sequenzierung des unbekanntes Bereiches

Wie schon erwähnt ist ein kleiner Bereich (beginnend 6675bp nach ATG) im contig.9684 von Sanger nicht eindeutig identifiziert worden. Mit den Primern P-Ex7, P-In7 und P-Ex8 (Kapitel III.8.1) wurde dieser Bereich aus dem genomischen Klon ICRFc71M10137Q5 sequenziert (Abb. V.6).

```
GGTTTCTATGCATTACTCCTCACGGCTGTGGCAGCAGGTGTCGCTGTGTACCAGGAGGTGGATCTCAGCTACA
TCCATGCACACTTCTTGCACTTCTACACCTCTGCCCTGCTCATCGCAACTCTCCTCAGCATCTACCTGTTTCAT
CCGCTCCCGCTGGGCATCTAAAGATGAGCTAGTCCCGGAGGAAACTCTGgtaaggccatataaaaatcagcca
gcactaaactgacttcttctctttgggttagcatTTTTTcacttggtggtttttcacaatggtttattatcct
cattattcacgctcaaaggatagttcacccaaaatgtaagtttactcatcctcgaagagttccaggccttta
gggattcctttattctggtgcaacttaagaagaattttgaagaagctgaggaccagaccatttctctttattct
ttaatatagaatataatagtaaccattttccctTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTtagtgttcaactaaaagtca
gtcaaactggtttggaccaagtaaaccgatgggtaaatgatgacaattttcagttttaaagttttggatgaac
tatccctttaaataatcgccaagctgtctcataactcttctcgttttcatctgtgctgctgattaggataaaa
ccagctacaattggttatgattatgaaataagcctttcagtaaaaatattgccatttaaagtttaggcttaggt
atTTTTTaaaaagattatacataatTTTTTattattcctctagGCTACATCATTTATGACTTCTTCATGGGCAG
AGAGTTAAATCCCCGTATCAAAGCTTCGATATTAAGTCTTCTGTGAAATGCGCCCTGGACTGATGGGTTG
```

**Abb. V.6: Sequenz des unbekanntes Bereiches aus der contig.9684**

Sequenziert wurde mit Primern P-Ex7, P-In7 und P-Ex8 (Kapitel III.8.1) aus dem genomischen Klon ICRFc71M10137Q5 Sequenz; unterstrichen: Primer P-Ex7, P-In7 und P-Ex8 (von oben nach unten); Großbuchstaben: Exon; Kleinbuchstaben: Intron; grau unterlegt: Nukleotide stimmen nicht mit cDNA-Klon (MPMGp567K10194Q3 von RZPD) überein (dort: TTTT)

Aus der Sequenzierung können zwei Ergebnisse abgeleitet werden. Zum einen die Identifikation der fehlenden Nukleotidsequenz, die auch das Ende eines Exons betrifft. Zum anderen belegt diese Sequenz, dass die Nukleotidabfolge von contig.9684 und genomischem Klon, zum größten Teil, in den Exons 7 und 8 sowie in dem Intron 7 übereinstimmt. Die auftretende Abweichung (Abb. V.6, grau unterlegt) betrifft die letzten zwei Aminosäuren des Exon 7. Hier kodiert der EST-Klon MPMGp567K10194Q3 (RZPD) für ein Isoleucin und ein Phenylalanin (AS 361 und 362) und der genomische Klon ICRFc71M10137Q5 (RZPD) für ein Tyrosin und ein Leucin. Da, wie schon erwähnt, das contig.9684 in diesem Bereich nicht

klar definiert ist und auch die Aminosäuresequenzen von Huhn und *Xenopus* LBR in diesem Bereich Unterschiede aufweisen, scheinen sich die beiden ursprünglichen Sequenzen an dieser Stelle zu unterscheiden, was in zwei verschiedenen Aminosäuren resultiert. Weiterhin zeigt diese Sequenzierung, dass das Intron 7 nur 576 Nukleotide groß ist. Dies erklärt den Größenunterschied von Fragment F3 im Vergleich zur contig-Sequenz (Abb. V4; Tab. V.2), denn Primer P-Ex7 und P-Ex8 amplifizieren ein Fragment mit der Größe von 841 bp und nicht 873 bp, wie von contig.9684 vorgegeben (Tab. V.2). Da nun alle Fragmentgrößen übereinstimmen und schon bei der zLAP2 Analyse positive Erfahrungen mit den bei Sanger veröffentlichten Daten gemacht wurden, scheint die contig.9684 Sequenz tatsächlich die genomische Sequenz des Zebrafisch LBRs wiederzugeben.

### V. 1. 5. Struktureller Aufbau des genomischen Zebrafisch LBR

Durch die Identifikation der unbekanntenen Region kann eine vollständige strukturelle Analyse des kodierenden Bereichs des zLBR Gens durchgeführt werden.

Mit Hilfe des Spidey Programms von NCBI wurden durch den Vergleich der kodierenden Region (von ATG –Stop) mit der contig.9684 Sequenz, sinnvolle Exon/Intron Grenzen im Gen ermittelt (Anhang). Dies zeigte, dass das zLBR durch 13 Exons kodiert ist (Abb. V.7).

```

MPPARFQIGDVTMGRWPGSNLYYEVKVMFSFDNKTRLYTVIYKDGTELELKESDIT  SVVIFQTAGRSRSRSRS
                        Exon 1                                Exon 2
PGRSPGRSSARSRDAHVAVAPVHQLGPAQSLSRQKCPKKTQEVLEVRVRLTPV  AMKHENSSNSKSEKKEENN
                                                Exon 3
TAKAAPVVTE  EKTETESENQTTGGRYNLRRRKDKQDGKAVELEKAVESEPLLQTKAPAAVKTTADLEFGGRVG
                                                Exon 4
VLFLMFLLPGLCWYAHSLWAEDASLQSFPLELPALQSVWDCQVFGIVLLWLLFQAVLSLLPVGK  LVEGMPLK
                        Exon 5                                Exon 6
NGKTLKYRING  FYALLLTAVAAGVAVYQEVDSLVIHAHFLQFYTSALLIATLLSIYLFIRSRWASKDELAPG
                                                Exon 7
GIF  GYIIYDFFMGRELNPRIKSFDIKFFCEMRPGLMGW  VLINFAMLLAEMKQQNLENPSPAMLLVNIQQLL
                        Exon 8                                Exon 9
WVIDGLWHE  EKLLTMMDIMYDGFGEFMLTFGDLAFPVFTFTCQAYYLVTHPNELSVFWIITLIAMN  GVGYYI
                        Exon 10
FRKANSQKFAFRKNPSDPAV  HLKTIPTATGKSLIVSGLWGFVRHPNYLGDIIIMALAWSLPC  GFNTLVPHYFY
                        Exon 11                                Exon 12
LIYLVTLTLLAHGTARHERKCRKKGSAWEEYCAVPYRIFPRVY
                        Exon 13
    
```

**Abb. V.7: Kodierende Exons des Zebrafisch LBRs**

Ermittelt über den Vergleich der cDNA-Sequenz aus dem Klon MPMGp567K10194Q3 (RZPD) und der contig.9684 Sequenz (Sanger)

Des weiteren wurden auch die 128 bp 5' des ATG und die 642 bp 3' des Stopcodons aus der cDNA-Sequenz mit der contig.9684 Sequenz verglichen. Es zeigte sich, dass das Exon 13 nach dem Stopcodon noch weitere nicht translatierte 642 Nukleotide enthält. Die Suche nach dem untranslatierten 5' Bereich lieferte ein etwas überraschenderes Ergebnis. Im kodierenden



Exon 1 befindet sich das Startcodon erst an Position 9. Die weiteren 119 Nukleotide sind ebenfalls im contig.9684 zu finden und liegen 5820 bp upstream des ATG's. Sie befinden sich in einem Bereich, der ebenfalls durch passende Exon/Intron Grenzen gekennzeichnet ist und können daher als untranslatiertes Exon 1' bezeichnet werden.

Da der humane LBR ebenfalls in 13 Exons kodiert ist (Schuler et al., 1994), wurde ein direkter Vergleich des menschlichen und des Zebrafisch LBRs auf Aminosäureebene durchgeführt (Abb. V.8).

```

MPSRKFDGEVVRGRWPGSSLYEVEILSHDSTSQLYTVKYKDGTLELELKENDIK PLTSF
MPPARFQIGDVTMGRWPGSNLYEVKVMSTFNKTRLYTVIYKDGTELELKESDIT SVVIF
** . :* * : : * ***** . ***** : : * . * : : * * * * * * * * * * * . . . : *
Exon 1
RQR-KGGSTSSSPRRRG-SRSRSRSPGRPPKSARRSAS--ASHQADIKEARREVEVKL
QTAGRSRSPGRSSARSDAHVAVPVHQLGPAQSLSRQKCPKRTQEVLEVRL
: . : * * * * . * * : * * . . * . . : * : * * * : * * : * : * : * : *
Exon 2
TPLIL KPGFNSISRYNGEPEHIERNDAPHKNTQ EKFSLSQESSYIATQYSLRPREE
TPV AMKHENSSNSKSEKKEENNTAKAAPVTE EKTETESEN-QTGGRYNLRRRKDQ
** : * . * * . . : * . : . * : * * . . * . . : * . * * * : :
Exon 3 Exon 4
VKLKEIDSKEEKYVAKELAVRTFEVTPIRAKDLEFGGVP GVFLIMFGLPVFLFLLLMC
GDGKAVEL--EKAVESEPLLQTKAPAAVKTADLEFGGRVG VLFMLFLLPGLCWYAHSLW
* : : * * * * . * : * : : : * * * * * * * * * * * * * * * : :
Exon 5
KQKDPDLLNFPPPLPALYELWETRIVFGVYLLWFLIQVLFYLLPIGK VVEGTPLIDGRRLK
A-EDASLQSFPLELPALQSVWDCQVFGIVLLWLLFQAVLSLLPVGK LVEGMPLKNGKTLK
* . * * . * * * * * . : * : * * * : * * * : * * : * * * * * * * * * * * : *
Exon 6
YRLN GFYAFILTSAVIGTSLFQGVFEFHYVYSHFLQFALAATVFCVVLSVYLYMRSKAP
YRING FYALLLTAVAAGVAVYQEVVLSYIHAHFLQFYTSALLIATLLSIYLFIRSRWAS
** : * * * * : * * : * . * : : : * * : * : : * * * * * * * * * * * * * * * * *
Exon 7
RNDLSP-ASS GNAVYDFFIGRELNPRIGTFDLKYFCELRPGLIGW VVINLVMLLAEMKI
KDELAPGGIF GYIIYDFFMGRELNPRIKSFDIKFCEMRPGLMGW VLINFAMLLAEMKQ
: : : * * . * : * * * * * * * * * * : * * : * * * * * * * * * * * * * * * *
Exon 8 Exon 9
PSLAMILVNSFQLLYVVDALWNE EALLTMDIIHDGFGFMLAFGDLVWVPFIYSFQAFYL
PSPAMLLVNIFQLLWVIDGLWHE EKLLTMDIMYDGFGLTFGDLAFVPTFTTCQAYYL
* * * * * * * * * * : * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Exon 10
QDRAVVSHPNEVSWPMASLIIVLK LCGYVIFRGANSQKNAFRKNPSDPKLA HLKTIHTS
QNLNVTHPNELSVFWIITLIAMN GVGYYIFRKANSQKFAFRKNPSDPVAVY HLKTIPTA
* : * * * * : * * : * : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Exon 11
TGKNLLVSGWGFVRHPNYLGDILMALAWSLPC GFNHILPYFYIIYFTMLLVHREARDEY
TGKSLIVSGLWGFVRHPNYLGDIIIMALAWSLPC GFNTLVPIFYLIYLVTLTLLAHGTARHER
* * * . * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Exon 12 Exon 13
HCKKKYGVAWEKYQRPYRIFPYIY
KCRKKYGSAAWEEYQAVPYRIFPRVY
: * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

**Abb. V.8: Exonvergleich des menschlichen LBR mit dem Zebrafisch LBR**  
 Exons des Zebrafisch LBRs ermittelt über den Vergleich der cDNA-Sequenz aus dem Klon MPMGp567K10194Q3 (RZPD) und der contig.9684 Sequenz (Sanger); Exons des humanen LBRs aus Schuler et al., 1994; fett: humaner LBR; normal: Zebrafisch LBR unterstrichen: Exons; Lücken: Exongrenzen; \*: identische Aminosäuren; grau unterlegt: Aminosäure gehört eventuell doch zum vorherigen Exon

Dabei ist sehr schön zu erkennen, dass die Exons der beiden LBRs in vielen Fällen in ihrer Größe identisch sind oder nur um 1-2 Aminosäuren variieren. Bei den Übergängen von Exon 4 und 5 bzw. Exon 6 und 7 wird deutlich, dass das kodierende Triplette geteilt vorliegt und daher nicht eindeutig bestimmt werden kann zu welchem Exon die entsprechende Aminosäure gehört.

**Tab. V.3: Exonvergleich des menschlichen LBR mit dem Zebrafisch LBR**

Exons des Zebrafisch LBRs ermittelt über den Vergleich der cDNA-Sequenz aus dem Klon MPMGp567K10194Q3 (RZPD) und der contig.9684 Sequenz (Sanger); Exons des humanen LBRs aus Schuler et al., 1994; unterstrichen: Exons; Lücken: Exongrenzen; \*: identische Aminosäuren; Die Größe der Exons sind in der Anzahl der Aminosäuren (AS) angegeben, der Grad der Identität (in %) bezieht sich auf die Sequenz des menschlichen LBR

Exon	humaner LBR	Zebrafisch LBR	identische Aminosäuren	Identität (%)
1	55	55	35	63,6
2	67	69	19	28,4
3	28	30	5	17,9
4	63	61	20	31,7
5	66	64	28	42,4
6	18	19	11	61,1
7	64	64	24	37,5
8	35	35	25	71,4
9	42	42	27	64,3
10	56	56	32	57,1
11	27	26	19	70,4
12	41	41	35	85,4
13	53	53	34	64,2

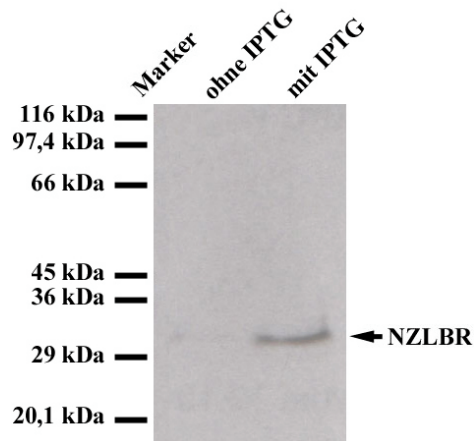
Die Tabelle V.3 fasst die gefundenen Exongrößen und die identischen Aminosäuren in den einzelnen Exons zusammen. Daran kann man gut erkennen, dass die Exons des humanen und des Zebrafisch LBRs innerhalb der aminoterminalen (17,9%-63,6%) Domäne eine geringere Identität zeigen als die Exons in der carboxyterminalen Domäne (37,5%-85,4%). Im aminoterminalen Bereich sind, wie schon beim vorherigen Vergleich (Abb. V.2) gezeigt, besonders die ersten 60 Aminosäuren hoch konserviert.

### V. 1. 6. Herstellung polyklonaler Antikörper gegen die aminoterminalen Domäne des Zebrafisch LBRs

Um Aussagen über das Expressionsverhalten, putative Bindungspartner oder Lokalisation des zLBR treffen zu können, wurden polyklonale Antikörper gegen die ersten 209 Aminosäuren des Zebrafisch LBRs hergestellt.

Als DNA-Vorlage diente der in den pKS-Vektor umklonierte zLBR-cDNA-Klon. Aus ihm wurden mit spezifischen Primern (5'Zp58(NdeI), 3'Zp58(627XhoI); Kapitel III.8.1) ein 627 bp großes DNA Fragment mittels PCR amplifiziert und in den TOPO®-Vektor kloniert.

Da die zur Amplifikation verwendeten Primern zusätzlich die Sequenz für eine NdeI bzw. XhoI Schnittstelle beinhalteten, konnte das DNA-Fragment über diese Restriktionsschnittstellen aus dem TOPO®-Vektor entfernt und in den ebenfalls mit NdeI und XhoI verdauten pET21a Expressionsvektor ligiert werden. Das rekombinante Protein besitzt am Carboxyterminus 6 Histidine über die es zum einen identifiziert (Abb. V.9) und zum anderen über eine Nickel-Chelat Säule aufgereinigt werden kann. Seine Expression erfolgte durch eine IPTG Induktion von *E.coli* BL21 Zellen, die dieses Expressionsplasmid enthielten.



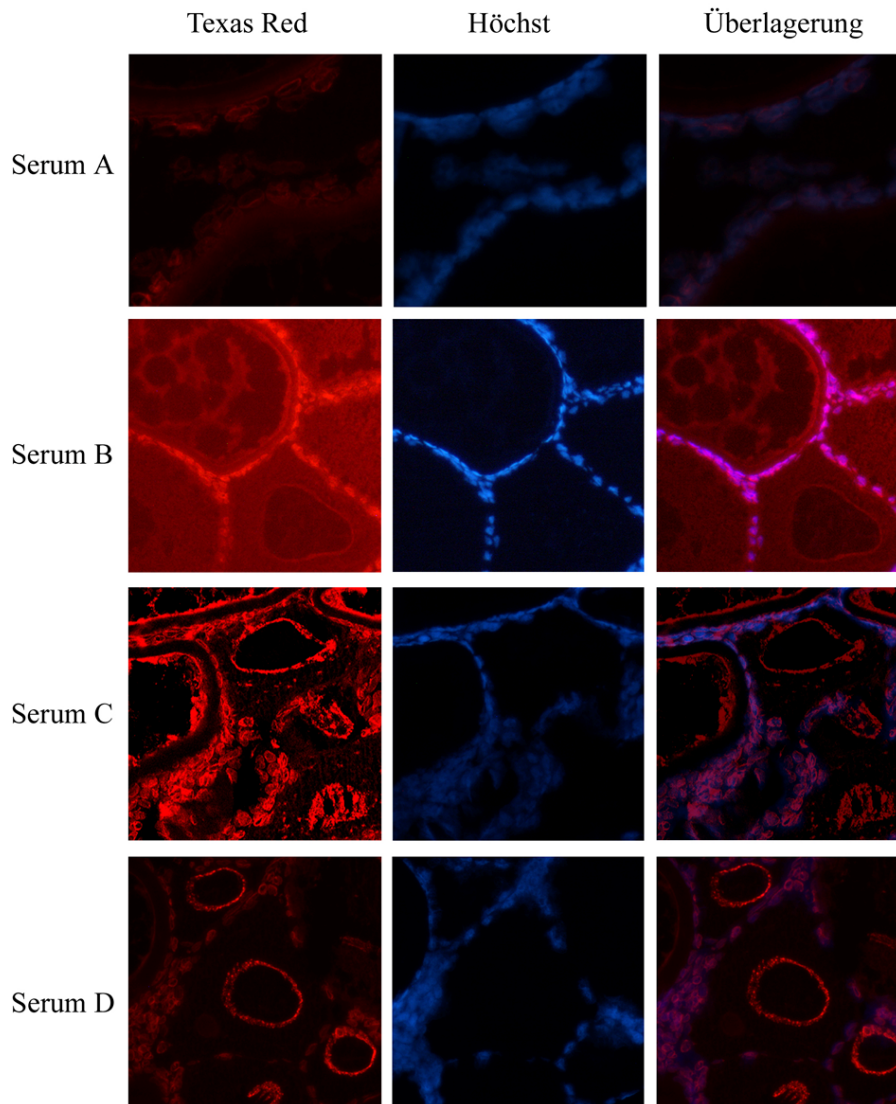
**Abb. V.9: Induktion von BL21 Zellen zur Expression eines zLBR-His Tag Fusionsproteins**  
 Spur 1: nicht induzierte Probe, Spur 2: induzierte Probe; NZLBR: aminoterminaler Bereich des zLBRs (210AS); Marker: zeigt 97, 66, 45 36, 29 und 20,1 kDa

Auf einem Western Blot eines mit IPTG induzierten Zelllysates kann sowohl mit einem Antikörper gegen 6 Histidine als auch mit einem Antikörper gegen das *Xenopus* LBR, welcher schwach mit dem Zebrafisch LBR Protein reagiert, detektiert werden. Das rekombinante Polypeptid besitzt eine Mobilität von Mr 30.000. Sie liegt etwas höher als das erwartete Molekulargewicht (209 AS = 20,9 kDa) und wird wahrscheinlich durch die basischen Aminosäuren im Protein, sowie dem His-Tag hervorgerufen.

Die weitere Aufreinigung des Proteins über die Nickel-Chelat-Säule, die folgende Immunisierung von zwei Meerschweinchen und zwei Mäusen sowie das Testen der erhaltenen Antiseren wurden als Teilprojekte einer Diplomarbeit an Christiane Glöckner abgegeben und unter meiner Anleitung durchgeführt.

### V. 1. 7. Testen der Antikörper in der Immunfluoreszenz

Zum Testen der Antiseren in der Immunfluoreszenz wurden Gefrierschnitte von Zebrafisch Ovarien angefertigt und mit den Seren in einer Verdünnung von 1:150 inkubiert (Abb. V.10).



**Abb. V.10: Immunfluoreszenz mit den hergestellten Antiseren**

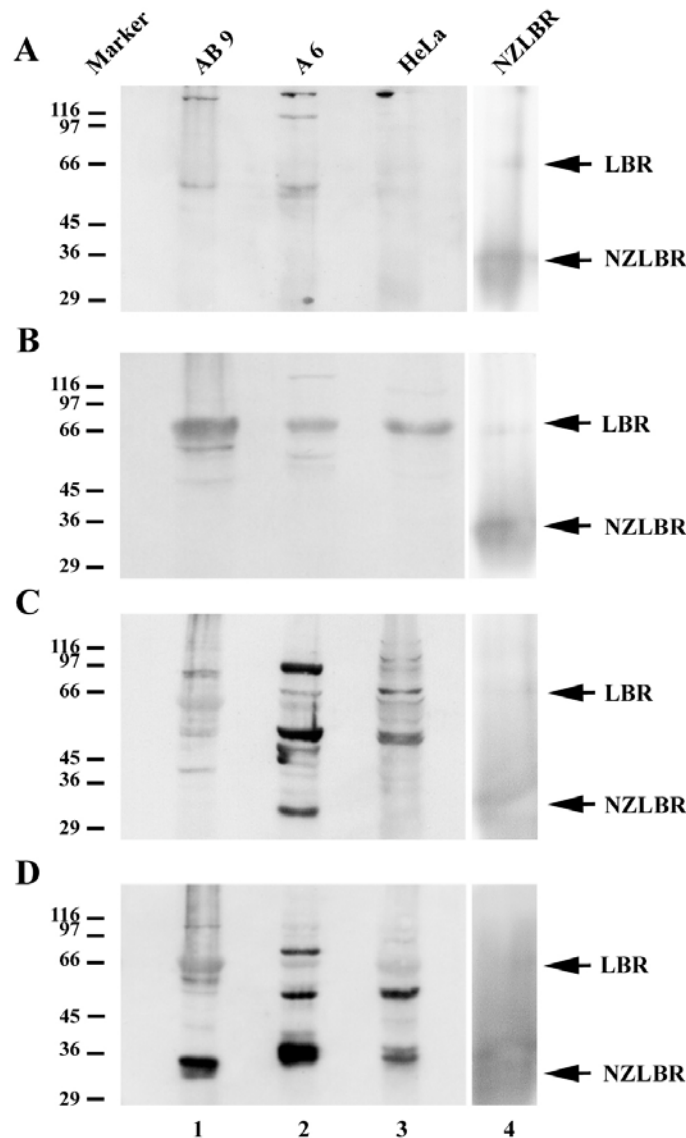
Gefrierschnitte von Zebrafisch Ovarien wurden mit den Antiseren (A, B, C, D) in einer Verdünnung von 1:150 inkubiert. Als 2. Antikörper wurde Texas Red anti Maus (A, B) bzw. Texas Red anti Meerschwein (C, D) verwendet. Hoechst wurde in einer Verdünnung von 1:1000 zur Lokalisation des Chromatins verwendet. Antiseren: A und B aus der Maus; C und D aus dem Meerschweinchen (Bilder von Christiane Glöckner)

Zur Kontrolle wurde die DNA in den Zellkernen mit Hoechst angefärbt. Man erkennt bei allen 4 Antiseren eine eindeutige Färbung der Kernhülle der Follikelzellen in denen das LBR integriert ist. Durch das Serum D wird zusätzlich sehr deutlich die Oozytenkernhülle.

### V. 1. 8. Testen der Antikörper im Immunblot

Die Antiseren wurden ebenfalls auf ihre Spezifität im Immunblot getestet. Gleichzeitig wurde überprüft, ob die Antikörper eine Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen oder LBRs anderer Spezies zeigt.

Hierfür wurde eine äquivalente Menge der gesamten zellulären Proteine von Zebrafisch AB9, *Xenopus* A6 und humanen HeLa-Zellen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Blotten auf Nitrozellulose mit den Antiseren (1:1000) inkubiert (Abb. V.11).



**Abb. V.11: Immunblot von verschiedenen Kulturzellen mit den neu hergestellten Antikörpern gegen zLBR**

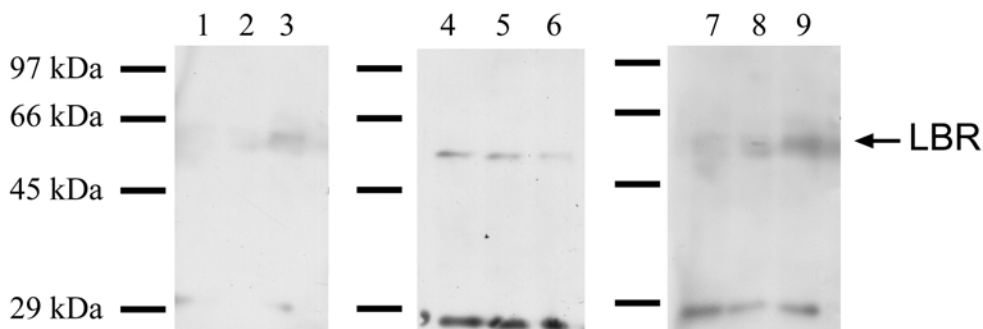
Äquivalente Mengen an Kulturzellen (AB9, A6, HeLa) wurden ebenso wie 60ng aufgereinigtes rekombinantes Protein in einer SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Blotten mit den Antiseren (A, B, C, D) in der Verdünnung 1:1000 inkubiert. Unter Verwendung der entsprechenden 2. Antikörper Peroxidase anti Maus (A, B) bzw. Peroxidase anti Meerschweinchen (C, D) konnte durch ECL Nachweis die Spezifität der Antiseren ermittelt werden;

Spur 1: AB9-Zellen, Spur 2: A6-Zellen, Spur 3: HeLa-Zellen, Spur 4: rekombinantes Protein

Antiseren: A und B aus der Maus, C und D aus dem Meerschweinchen; Marker: zeigt 97, 66, 45, 36, 29 und 20 kDa (Blots von Christiane Glöckner)

Die verwendeten Antikörper waren alle in der Lage das rekombinante Protein (Spur 5) zu detektieren. Antikörper B (Abb. V.11) aus der Maus erzielte das beste Resultat, da es fast ausschließlich den LBR erkennt und zusätzlich mit den LBRs anderer Spezies (Abb. V.11 Spur 2 und 3) kreuzreagiert. Die Antikörper C und D aus den Meerschweinchen (Abb. V.11 C, D) erkennen zwar auch das Zebrafisch LBR, detektieren aber noch zusätzliche Banden, deren Ursprung nicht genau geklärt werden konnte. Wahrscheinlich sind dieses Degradationsprodukte des LBRs. Weiterhin zeigen Antikörper der Seren C und D eine Kreuzreaktivität mit Proteinen aus dem *Xenopus* und dem Menschen. Das Serum A aus der Maus erkennt den LBR in allen drei Zelllinien nur recht schlecht. Der als Schmier zu erkennende Bereich oberhalb der 66 kDa Markerbande wurde auch schon von anderen Antikörpern gegen LBR detektiert.

Für spätere "Knock-down" Experimente mit Morpholinos wurden drei der Antikörper auch an 24h alten Zebrafisch Embryonen getestet. Hierfür wurden pro Spur die Proteine eines Embryos in einem SDS-Gel aufgetrennt und nach einem Western Blot mit den Antiseren (B, C, D) in einer Verdünnung von 1:300 inkubiert.



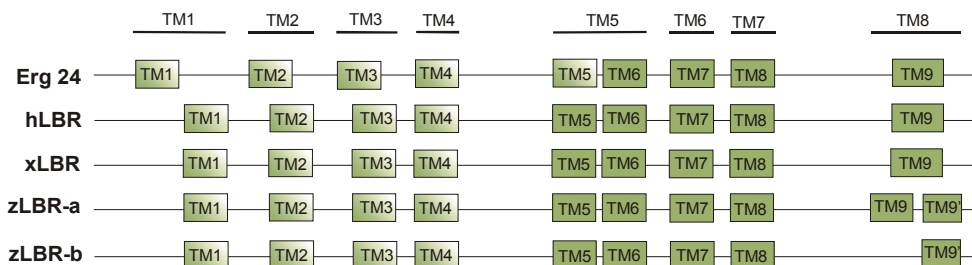
**Abb. V.12: Antikörper Test auf Gesamtproteinen 24 Stunden alter Zebrafisch Embryonen**  
 Serum B (A), Serum C (B) und Serum D (C); Spur 1-9: in Probenpuffer homogenisierte, 24 h alte Zebrafischembryonen; LBR: zerafish LBR(~ 60 kDa); Marker: zeigt 97, 66, 45 und 29 kDa

Die Antikörper detektierten das LBR aus den Zebrafischen relativ schlecht. Antikörper des Serums B (Abb. V.12A) konnten nur in einer Spur ein Protein mit einer ungefähren Mobilität von Mr 60.000 detektieren. Antikörper des Serums C (Abb. V.12B) reagieren zwar in allen drei Spuren mit einem Polypeptid, das jedoch eine höhere Mobilität als der LBR besitzt und auch in Abb. V.11C wesentlich deutlicher zu erkennen ist als der LBR. Antikörper des Serums D (Abb. V.12C) reagieren in allen drei Spuren mit einem Polypeptid, das in der Mobilität vergleichbar ist mit dem von Abbildung V.11A. Somit sind Antikörper B und D wohl am besten für Western Blot Analysen von Gesamtproteinmengen des Zebrafisches geeignet.

## V. 2 Diskussion

### V. 2. 1. Identifikation und strukturelle Charakterisierung des Zebrafisch LBR

In vorangegangenen Experimenten wurde in unserem Labor der carboxyterminale Teil des Zebrafisch LBR isoliert. Mit Hilfe des DNA Fragments, konnte im Laufe dieser Arbeit durch radioaktive Hybridisierung einer cDNA- bzw. Cosmid-Bibliothek der LBR des Zebrafisch identifiziert werden. Das LBR Gen kodiert für ein 616 AS großes Protein. Damit entspricht die Größe des Zebrafisch LBRs in etwa der Größe des LBRs von *Xenopus*, Mensch und Huhn. Aber nicht nur in der Größe sind Ähnlichkeiten zu entdecken, sondern auch in der allgemeinen Sequenz und dem strukturellen Aufbau. Der aminoternale Teil des Proteins, welcher für die Interaktion mit B-Typ Laminen verantwortlich ist, zeigt nur in den ersten 75 Aminosäuren eine hohe Übereinstimmung. Diese Übereinstimmung ist besonders hoch in den ersten 60 Aminosäuren, die für die Bindung an Lamin B essentiell sind (Ye et al., 1997). Die aminoternale Region, die an der Interaktion des LBRs mit DNA oder dem HP1 beteiligt ist, weist zwischen menschlichem LBR und Hühner LBR eine wesentlich größere Identität auf als zwischen menschlichem LBR und Zebrafisch LBR. Der Carboxyterminus zeigt dagegen wieder eine große Übereinstimmung, nicht nur die Aminosäuresequenz betreffend, sondern auch die dort lokalisierten putativen Transmembrandomänen. Das Hydrophobizitätsprofil des Zebrafisch LBRs ergab die Identifikation von 9 bzw. 10 Transmembrandomänen. Dies ist von der Anzahl vergleichbar mit dem LBR des *Xenopus*, Huhn oder Menschen. Auch die Lage und Größe sowie Abstände zwischen den einzelnen Transmembrandomänen sind vergleichbar (Abb. V.13).



**Abb. V.13: Vergleich der carboxyterminalen Regionen des hLBRs, cLBRs, xLBRs und zLBRs mit der C14- Sterolreduktase der Hefe**

TM: Transmembrandomäne; Erg 24: C14 Sterolreduktase der *S. cerevisiae*, hLBR: humaner LBR, xLBR: LBR des *Xenopus*, zLBR-a: LBR des Zebrafisch Variante a, zLBR: LBR des Zebrafisch Variante b

Aufgrund des vom Computerprogramm ermittelten geringen Abstands zwischen der 5. und 6. Transmembrandomäne ist anzunehmen, dass diese beiden Domänen zu einer zusammengefasst werden können. Damit wäre die von Georgatos beschriebene Struktur des LBR, zumindest für den Menschen und den *Xenopus*, mit 8 Transmembrandomänen wieder erreicht (Georgatos et al., 2001). Im Bezug auf den LBR des Huhns und des Zebrafisch scheint für die letzte Transmembrandomäne Ähnliches zu gelten (Abb. V.13 Variante a; vgl. Tab. V.1A). Hier ist jedoch auffällig, dass diese Transmembrandomäne nicht nur größer zu sein scheint, sondern auch in ihrer Lage etwas versetzt zu den Transmembrandomänen der anderen Spezies auftritt. Eine solche Veränderung kann, ebenso wie die Reduktion einer Domäne (Abb. V.13 Variante b; vgl. Tab. V.1B) die Funktionalität eines Proteins beeinflussen.

Wie schon in der Einleitung erwähnt gibt es Hinweise, dass der LBR eine Verbindung von 2 unterschiedlichen Proteinen darstellt. Der carboxyterminale Teil des Proteins weist eine hohe Homologie zu der C14 Sterolreduktase von *Saccharomyces cerevisiae* auf und tatsächlich konnte dem menschlichen LBR eine solche Aktivität nachgewiesen werden (Silve et al., 1998). Untersuchungen von Smith und Blobel (unveröffentlicht, 1994) am Hühner LBR sowie Untersuchungen von Christiane Glöckner (Glöckner, 2004) am Zebrafisch LBR konnten diese Aktivität jedoch nicht bestätigen. Die Schlussfolgerung, dass die Veränderung der Transmembrandomäne allein in dem Verlust der Sterolreduktaseaktivität resultiert, wäre aber etwas verfrüht, denn eine solche Aktivität konnte auch für den *Xenopus* LBR nicht nachgewiesen werden (Glöckner, 2004), dessen Transmembrandomänen vergleichbar mit denen des Menschen sind. Um eindeutige Aussagen treffen zu können, sollten ein direkter Vergleich zwischen *Xenopus*, Zebrafisch und menschlichem LBR angestellt werden, in dem alle drei LBRs im gleichen Expressionsvektor und unter den selben Bedingungen getestet werden. Dieser Fragestellung soll in zukünftigen Projekten nachgegangen werden.



## **VI. Funktionsanalyse des CxxM-Motivs der Lamine**

### **VI. 1. Ergebnisse**

In vorangegangenen Diplomarbeiten von Annette Vogel und Nils Klüver wurden anhand von verschiedenen Lamin Mutanten der Einfluss der helikalen Domänen auf die Struktur des Zellkerns untersucht. Die mutierten Lamine und die Wildtypproteine wurden als GFP-Fusionsprotein exprimiert. Anhand von lichtmikroskopischen Analysen konnte gezeigt werden, dass Lamin Mutanten denen die ersten beiden  $\alpha$ -Helices fehlen, zu einer blasenförmigen Verformung der Kerne führt, Kernporenkomplexe nicht mehr korrekt verteilt werden und es zu einer Aggregation der Lamine kommt. Bei der Expression von wildtypischen Laminen konnte dagegen eher eine einheitliche Färbung der Kernperipherie wahrgenommen werden, die bei Überexpression jedoch punktförmigen Lamin Aggregaten und zu "faltigen" Zellkernen führte. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung dieser Proteinansammlungen sollte eigentlich einer strukturellen Analyse der Lamin Polymere dienen, weitete sich jedoch eher zu einer Funktionsanalyse des CxxM-Motivs aus.

#### **VI.1. 1. Allgemeine Anmerkung für die folgenden Ergebnisse**

Das Einbringen der Expressionsplasmide in die A6 bzw. COS-7 Zellen erfolgte entweder über Transfektion mit RotiFect (Roth) oder über Mikroinjektion. Da diese Methoden keinen Einfluss auf die Expression des Fusionsproteins haben, wird im folgenden darauf verzichtet die verwendete Methode jedes Mal zu erwähnen. Dies gilt auch für die untersuchten Lamin Konstrukte, die, solange nicht anders erwähnt, als GFP-Fusionsproteine exprimiert werden.

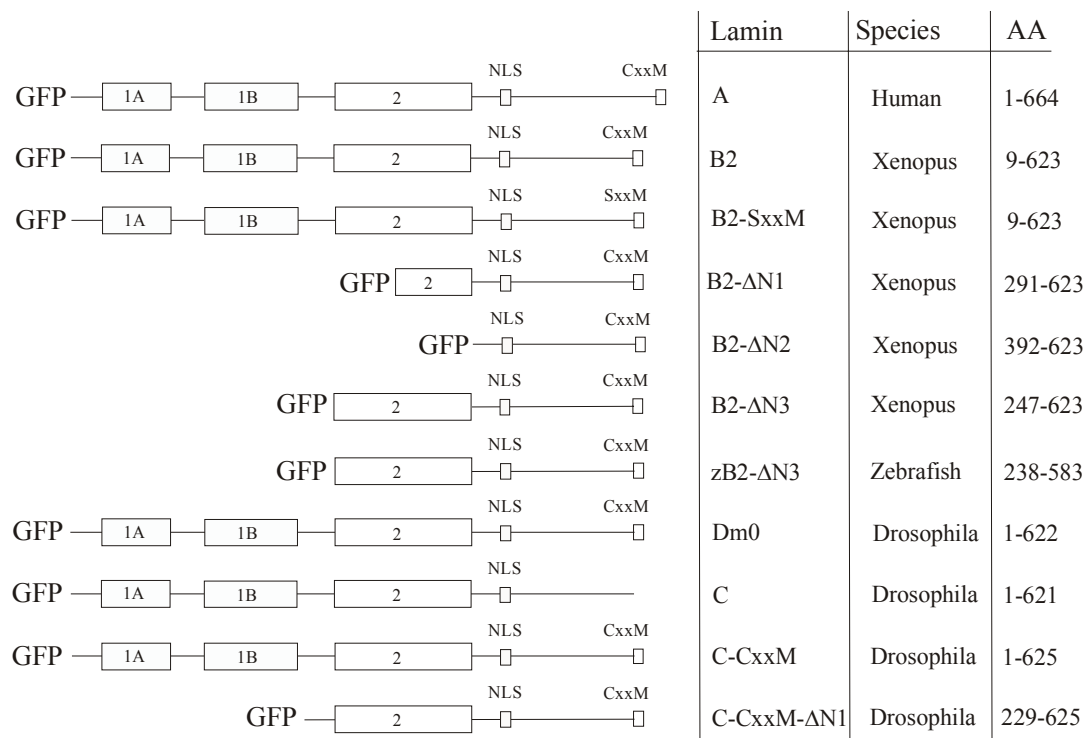
Die Expression variiert jedoch mit der Menge an aufgenommener DNA. Diese ist bei der Transfektion nicht und bei der Injektion nur bedingt zu kontrollieren. Es gilt, dass die Menge an exprimiertem Protein mit der Stärke des GFP-Signals korreliert.

Die transfizierten oder mikroinjizierten Zellen wurden, soweit nicht anders erwähnt, nach 24 Stunden fixiert und für elektronenmikroskopische oder lichtmikroskopische Analysen vorbereitet. Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen zusätzlich mit einem 2. Antikörper markiert, der zuverlässig die Kernlamina detektiert und gegen ein anderes, als das verwendete Lamin gerichtet ist.

## VI. 1. 2. Untersuchung des CxxM-Motivs

### VI. 1. 2. 1. Überprüfung der Lamin Konstrukte

Für diesen Teil der Arbeit wurden eine Reihe von Lamin Konstrukten verwendet, die entweder selbst konstruiert wurden oder von vorrangigen Diplomarbeiten oder von anderen Arbeitsgruppen stammen.



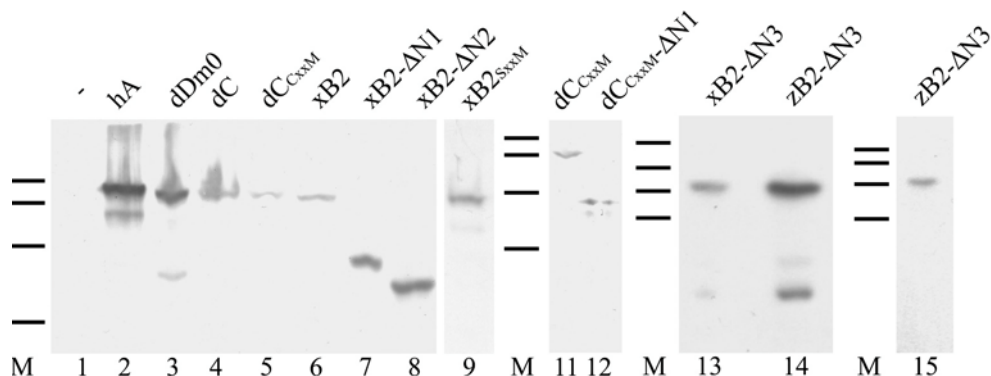
**Abb. VI.1: Schematische Zeichnung der wildtypischen Lamin Konstrukte**

humanes Lamin A, *Xenopus* Lamin B2, *Drosophila* Dm0 und Lamin C; die Lage der des GFPs, der  $\alpha$ -Helices (1A, 1B, 2), des Kernlokalisationssignals (NLS) sowie des CxxM-Motivs sind angegeben

Alle Konstrukte wurden im Leseraster in eine entsprechenden pEGFP-C-Vektor (Invitrogen) ligiert, somit befindet sich bei dem translatierten Fusionsprotein am Aminoterminus ein GFP. Dem *Xenopus* Lamin B2 sowie der Lamin B2-SxxM Mutante, fehlen aufgrund der erfolgten Klonierung die ersten 9 Aminosäuren. Das Fehlen dieser Aminosäuren hat keinen Einfluss auf die Expression, das Polymerisationsverhalten und die Lokalisation dieser Lamins. Daher kann es ohne weiteres mit den anderen Laminen verglichen werden.

Obwohl die Größe der DNA-Konstrukte alle mittels PCR überprüft wurden, wurde zusätzlich die daraus resultierende Proteingröße untersucht. Dafür wurden COS-7- bzw. A6-Zellen mit den einzelnen Konstrukten transfiziert, die Zellen nach 24 Stunden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und die gesamten Proteine mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt. Zusätzlich wurden die mRNA eines Fusionskonstrukts (zLamin B2ΔN3) in Zebrafische injiziert und die

gesamten Proteine der Embryonen ebenfalls nach der Homogenisierung in einer SDS-PAGE untersucht. Die folgende Abbildung (Abb.VI.2) zeigt, dass alle Fusionsproteine exprimiert werden und die erwartete Größe besitzen.



**Abb. VI.2: Charakterisierung der Lamin Fusionskonstrukte**

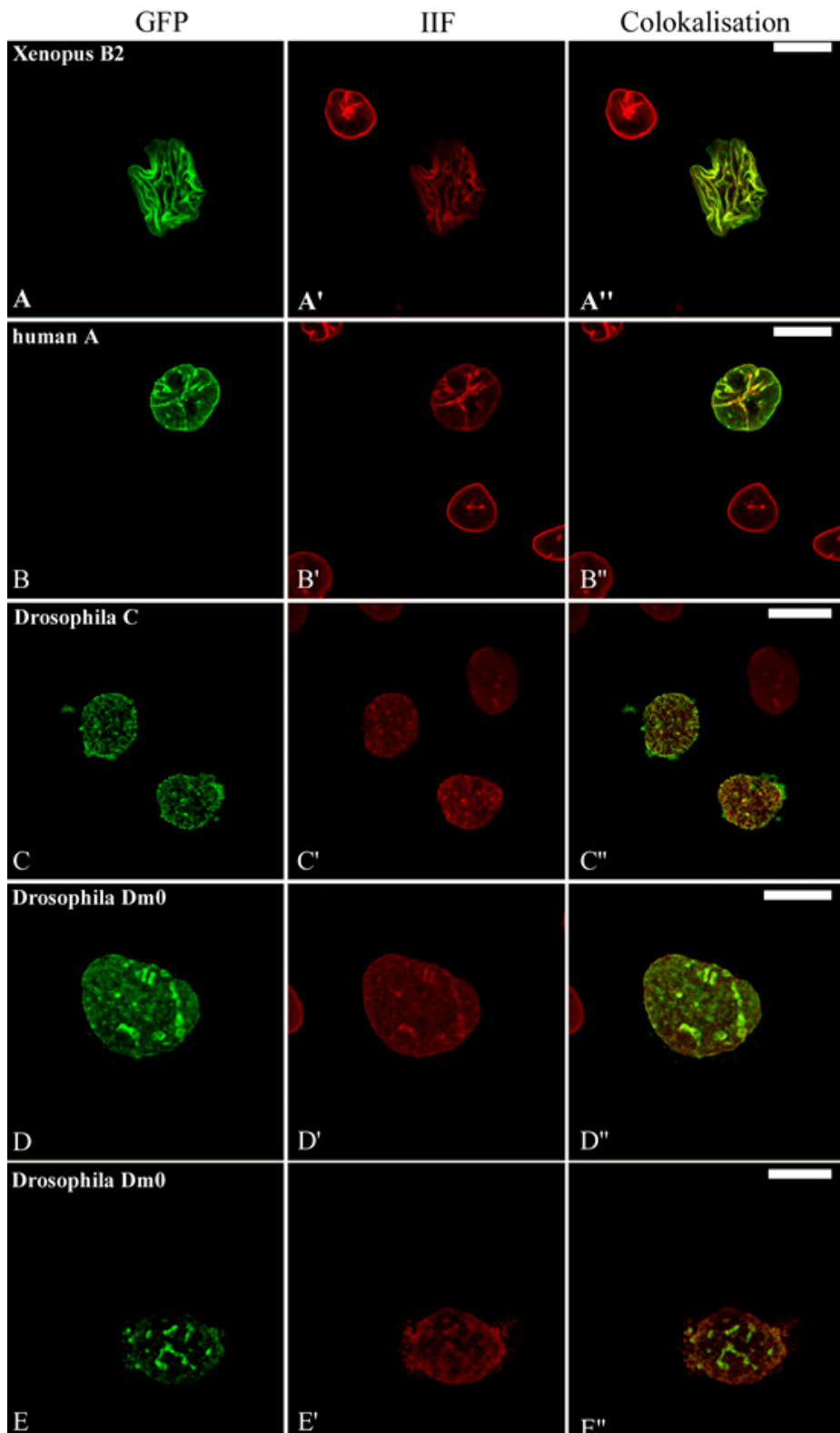
Die gesamte Proteinmenge aus transfizierten COS-7 Zellen (Spur 1-12), *Xenopus* A6 Zellen (Spur 13 und 14) sowie mikroinjizierten Zebrafisch Embryonen (Spur 15), welche verschiedene Lamin Konstrukten (siehe Abb. xxx 1) überexprimierten, wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Durch einen Immunblot mit spezifischen Antikörpern gegen GFP kann die Größe der Fusionsproteine bestimmt werden. Spur 1: nicht transfizierte Zellen; Spur 2: humanes Lamin A; Spur 3: *Drosophila* Lamin Dm0; Spur 4: *Drosophila* Lamin C; Spur 5 und 11: *Drosophila* Lamin C-CxxM; Spur 6: *Xenopus* Lamin B2; Spur 7: *Xenopus* Lamin B2-B2ΔN1; Spur 8: *Xenopus* Lamin B2-B2ΔN2 ; Spur 9: *Xenopus* Lamin B2-SxxM; Spur 12: *Drosophila* Lamin C-CxxM-ΔdN1; Spur 13: *Xenopus* Lamin B2ΔN3; Spur 14 und 15: Zebrafisch Lamin B2ΔN3; Marker (M) zeigt von oben nach unten 116, 97, 66 und 45 kDa. Spur 13, 14 und 15 stammen von Klüver 2003

## VI. 1. 2. 2. Untersuchung von wildtypischen Laminen

Für die Untersuchung von wildtypischen Laminen wurden vier verschiedene Lamine von unterschiedlichen Spezies verwendet. Zum einen die A Typ Lamine, Lamin A (human), Lamin C (*Drosophila*) und zum anderen die B Typ Lamine, Lamin B2 (*Xenopus*) und Lamin Dm0 (*Drosophila*) (siehe Abb.VI.1).

### VI. 1. 2. 2. 1. Lichtmikroskopische Untersuchung von wildtypischen Laminen

Die lichtmikroskopische Analyse aller Konstrukte zeigt nach 24 Stunden Zellen, die sowohl wenig als auch viel des Fusionsproteins exprimieren. In den Zellen, die nur ein schwaches GFP-Signal zeigen, kann bei keinem der Konstrukte Auffälligkeiten in der Kernmorphologie festgestellt werden. Bei hoher Expression werden jedoch zwei gravierende Veränderungen beobachtet (Abb. VI.3).



**Abb. VI.3: Lichtmikroskopische Aufnahmen von GFP-Fusionsprotein exprimierenden *Xenopus* A6 Zellen**

Die Zellen überexprimieren wildtypisches *Xenopus* Lamin B2 (A, A', A''), menschliches Lamin A (B, B', B''), *Drosophila* Lamin C (C, C', C'') und *Drosophila* Lamin Dm0 (D, D', D'', E, E', E''); linke Spalte: GFP-Fluoreszenz, mittlere Spalte: indirekte Immunfluoreszenz (IIF) von Laminen; rechte Spalte: Colokalisation beider Signale; Antikörper: X223 (B', C', D'); X94 (A'), ADL84 (E'); Aufnahme mit dem CLSM; Eichstrich: 10µm

Einerseits kann festgestellt werden, dass die Überexpression von *Xenopus* Lamin B2 (Abb.VI.3A), humanen Lamin A (Abb.VI.3B) und *Drosophila* Lamin Dm0 (Abb.VI.3D,E) sowohl zu einer Vergrößerung und Faltung der Kernmembran führt als auch zur Bildung von punkt- oder linienförmigen Aggregaten. Andererseits scheint das *Drosophila* Lamin C (Abb.VI.3C) die Größe und Form der Nuklei nicht zu beeinflussen, aber dennoch die Bildung von wellenartigen Aggregaten zu bewirken, welche sich über den Kern verteilen.

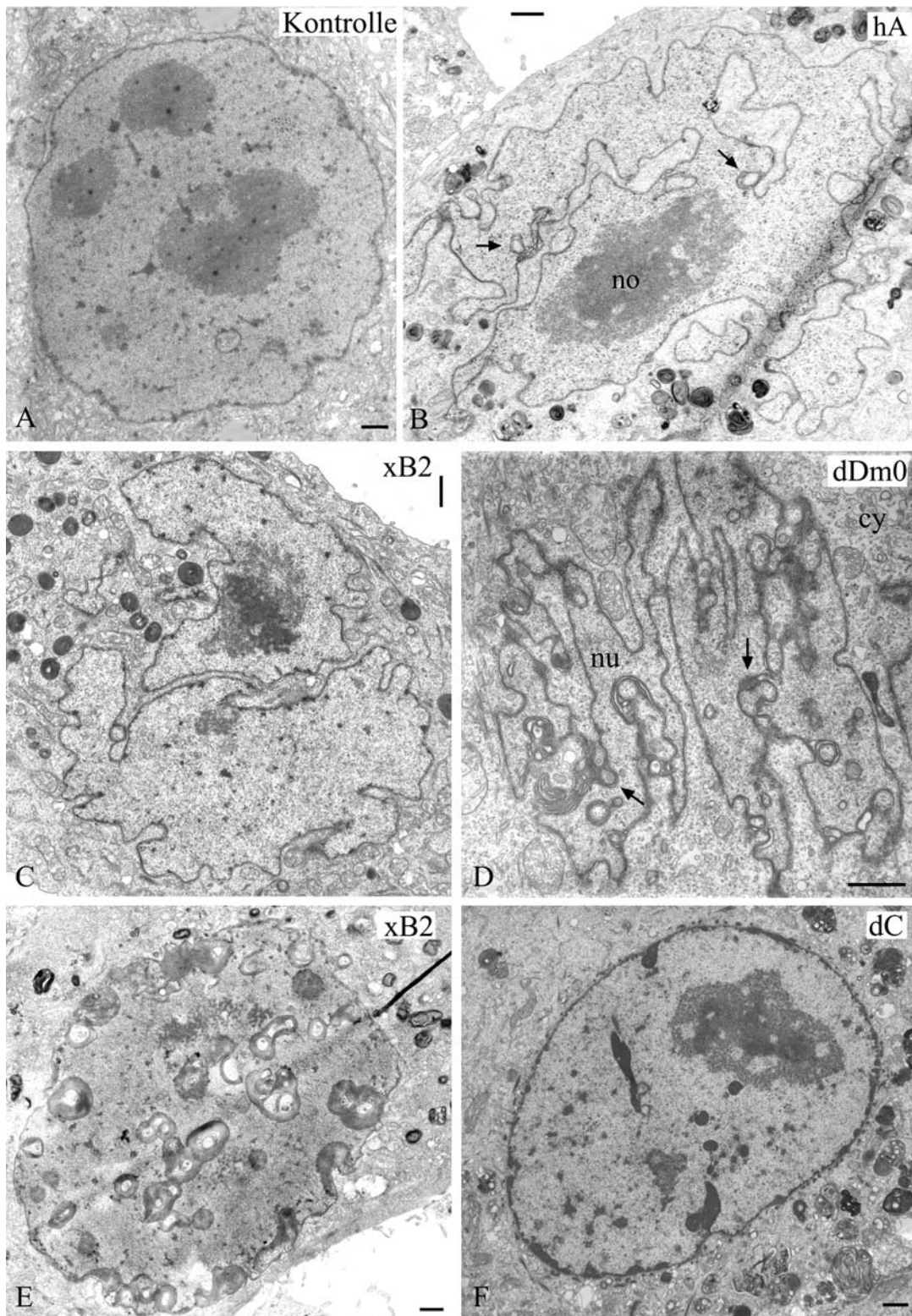
Um zu überprüfen ob sich in den GFP-markierten Bereichen auch wirklich das injizierte Protein befindet, wurden fixierten Zellen, die das Dm0-Fusionsprotein exprimieren mit einem Antikörper gegen Dm0 gefärbt (Abb.VI.3E'). Die eindeutige Colokalisation (Abb.VI.3E'') beider Signale spricht dafür, dass in den durch GFP-markierten Bereichen auch wirklich das transfizierte/injizierte Lamin enthalten ist.

Die Darstellung der Lamina mit einem Antikörper gegen ein endogenes Lamin (Abb. VI.3A'-E') zeigt, dass die Aggregate auch mit endogenen Laminen colokalisieren (Abb. VI.3A''-E''). Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den Punkten und Strichen eher um Falten oder Ein- bzw. Ausstülpungen der Lamina handelt. Beim *Drosophila* Lamin C ist nur eine begrenzte Colokalisation mit endogenen Laminen vorhanden (Abb.VI.3C''). Der größte Teil der Lamine ist in Bereichen lokalisiert in denen keine endogenen Lamine nachweisbar sind (Abb.VI.3C''').

### VI. 1. 2. Elektronenmikroskopische Untersuchung von wildtypischen Laminen

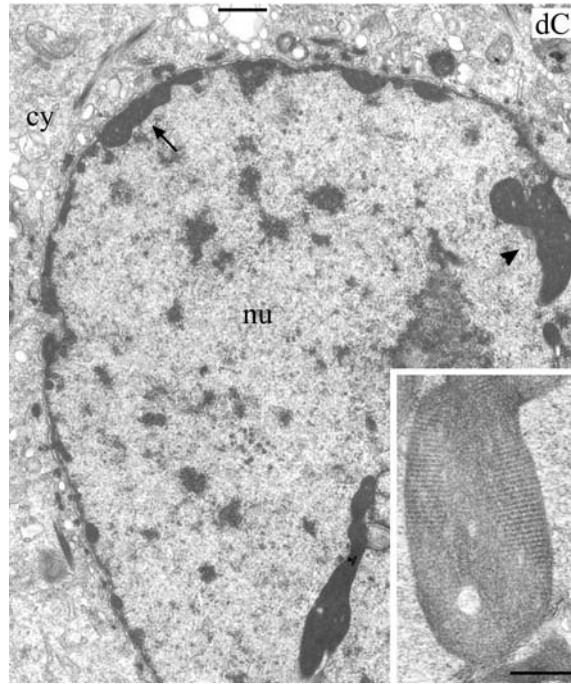
Die elektronenmikroskopische Analyse von Zellen, welche die wildtypischen Lamine überexprimieren, bestätigen zum Teil die lichtmikroskopischen Befunde machen aber gleichzeitig deutlich, dass die punktförmigen Signale in den meisten Fällen nicht auf Aggregate zurückzuführen sind.

Die Überexpression von menschlichem Lamin A (Abb. VI.4B), *Xenopus* Lamin B2 (Abb.VI.4C) und *Drosophila* Dm0 (Abb.VI.4D) zeigt schon bei kleiner Vergrößerung eine enorme Größenzunahme der Kernoberfläche und eine deutliche Faltung der Zellkerne (vgl. Kontrollzelle Abb.VI.4A). Weiterhin sind Regionen an den Kernmembranen zu erkennen an denen zusätzliche Membranen auftreten (Pfeile Abb. VI.4 B, D). Diese zusätzlichen Membranen treten in einigen Zellen kaum sichtbar (Abb.VI.4C) und in anderen Zellen sehr deutlich (Abb.VI.4E) auf. In allen Fällen bilden sie jedoch parallele Membranreihen, die mit der inneren Kernmembran in Kontakt stehen.



**Abb.VI.4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von wildtypischen Laminen, die in *Xenopus* A6 Zellen überexprimiert werden**  
 Zellen exprimieren: kein Fusionsprotein (A), humanes Lamin A (hA; B), *Xenopus* Lamin B2 (xB2; C, E), *Drosophila* Dm0 (dDm0; D) und *Drosophila* Lamin C (dC; F); Pfeile: mehrschichtige Membranen; nu: Nukleoplasma; no: Nukleolus; Eichstriche: 1  $\mu$ m

Die Überexpression des *Drosophila* Lamin C (Abb.VI.4F) scheint dagegen keinen Einfluss auf die Größe, Form und Struktur des Zellkerns zu besitzen. Im Vergleich zu den anderen wildtypischen Laminen findet man hier Aggregate des Fusionsproteins, die als dichte Schicht unterhalb der Kernmembran zu finden sind und auch in das Kerninnere hineinragen (Abb. VI. 5A).

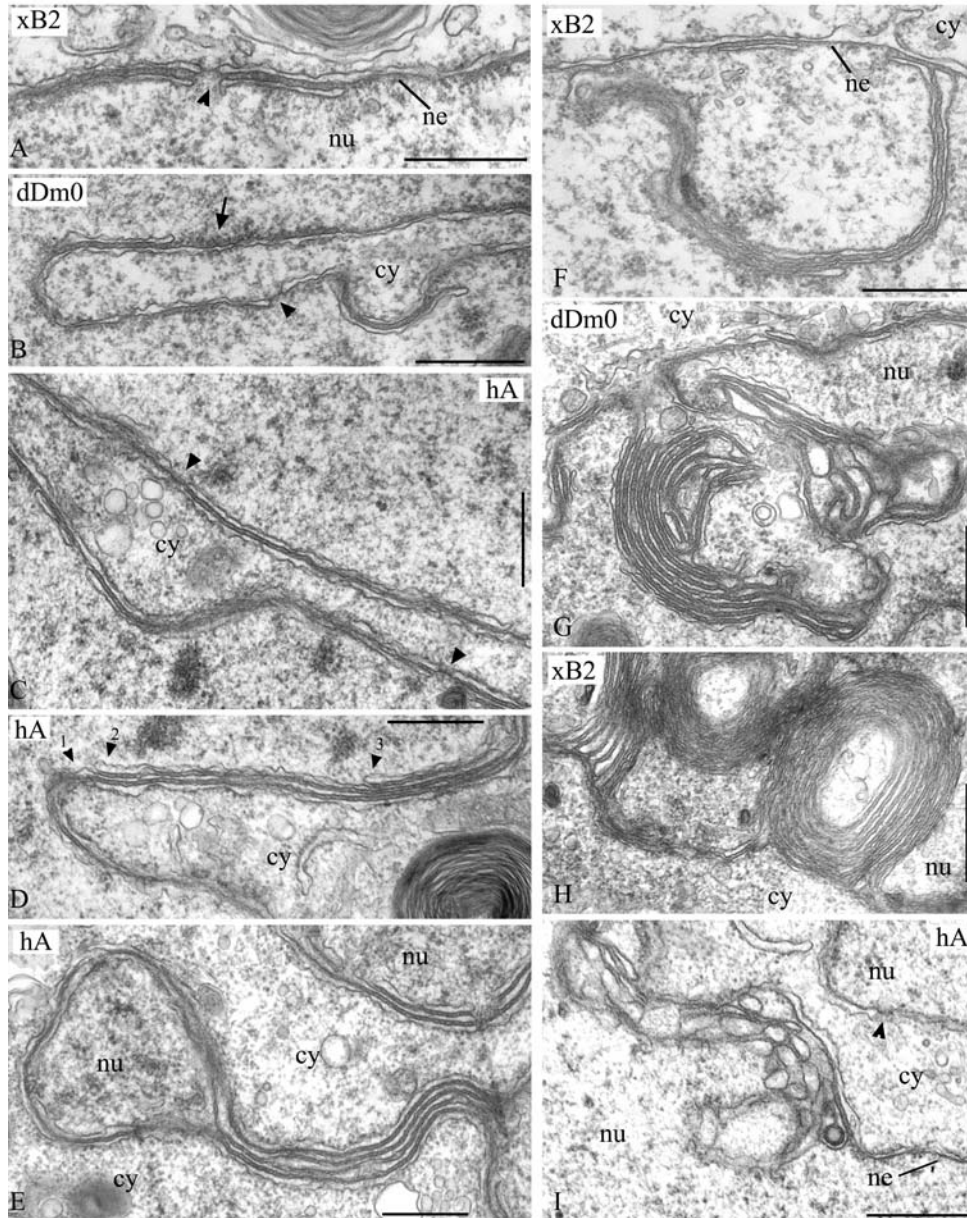


**Abb. VI.5: Überexpression von wildtypischem Lamin C in *Xenopus* A6 Zellen**  
nu: Nukleoplasma; cy: Cytoplasma; Eichstriche: 1  $\mu$ m (A); 500nm (A Einlage; B)

Bei höherer Vergrößerung wird deutlich, dass die Aggregate keine Membranen beinhalten (Abb. VI.5B) und eine regelmäßig gebänderte Struktur aufweisen (Einschub, Abb.VI.5A). Diese parakristalline Struktur konnte jedoch nur beobachtet werden, wenn die Schnittebene parallel zur Längsachse des Polymers lag, in anderen Schnittrichtungen wurden dagegen keine periodischen Strukturen festgestellt.

Auch die Auswirkungen der anderen Lamine (Lamin A, B2 und Dm0) wurde anhand von mehreren Zellen untersucht. Dabei zeigt sich bei allen drei Fusionsproteinen eine vergleichbare Veränderung der Kernmembran (Abb.VI.6). In allen Kernen gibt es Regionen in denen sich zusätzliche flache Membranzisternen unterhalb der inneren Kernmembran befinden. Diese extra Membranen sind nicht mit der Kernmembran verbunden sondern scheinen durch eine elektronendichte Schicht von ihr getrennt zu sein.





**Abb. VI.6: Ausschnitt der Kernperipherie von *Xenopus* A6 Zellen, die wildtypische Lamine exprimieren**

Zellen überexprimieren: *Xenopus* Lamin B2 (xB2; A, F, H), humanes Lamin A (hA; C-E, I) und *Drosophila* Dm0 (dDm0; B, G); Intranukleare Membranzisternen sind durch eine 15-25nm dicke Schicht von der inneren Kernmembran getrennt, die vergleichbar mit normalen Lamina ist (Pfeil, B); Pfeilkopf 1,2,3 in D: zeigen drei unabhängige, aufeinanderliegende Membranzisternen. nu: Nukleoplasma; cy: Cytoplasma; Porenkomplexe (Pfeilköpfe in A, B, C, I); Eichstriche: 500nm

Nähere Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Membranen unabhängig voneinander und an mehreren Stellen der Kernhülle entstehen können (Abb. VI.6A-C). Durch stetiges Wachsen dieser Membranencisternen erscheinen manche Bereiche der Kernmembran vierschichtig (Abb. VI.6C) und können durch Bildung von weiteren Membranzisternen sogar zu kleinen Membranstapeln heranwachsen (Pfeilköpfe Abb. VI.6D). Zwischen den benachbarten Membranzisternen befinden sich wiederum elektronendichte Schichten, die



einen direkten Kontakt verhindern. Durch die starke Faltung der Membranen kommt es in einigen Fällen dazu, dass sich mehrschichtige Membranen von gegenüberliegenden Seiten zusammenlagern (Abb.VI.6E). Da beide Seiten von Cytoplasma umgeben sind, entsteht der Eindruck, dass Membranstapel ins Cytoplasma ragen. Andererseits findet man auch Regionen, bei denen die zusätzlichen Membranen Stapel bilden, die sich ins Nukleoplasma erstrecken (Abb. VI.6F-I). Dabei entwickeln sich in machen Fällen mehrschichtige, gleichförmige Strukturen, die verschiedene Größen und Formen annehmen können (Abb. VI.6G, H), in anderen Fällen dagegen unregelmäßig erscheinende Strukturen (Abb.VI.6I). Bei keinem der untersuchten Kerne wurde in den Regionen, in denen zusätzliche Membranen auftraten Kernporenkomplexe gefunden.

Diese Aufnahmen zeigen, dass der Eindruck der Aggregatbildung, der durch die lichtmikroskopischen Untersuchungen entstanden ist, wohl auf diese mehrschichtigen Membranen zurückzuführen ist. Dabei scheinen nicht die Kernmembranen, sondern die elektronendichte Schichten zwischen den Membranen die entscheidende Rolle zu spielen. Diese Schichten entsprechen von ihrer Dicke (15-25nm) und ihrer Elektronendichte einer normalen Lamina (Abb. VI.6B). Sie sind bei allen Formen und Größen der Membranstapel zwischen den einzelnen Zisternen zu finden und somit vielleicht Auslöser für die Bildung dieser Stapel.

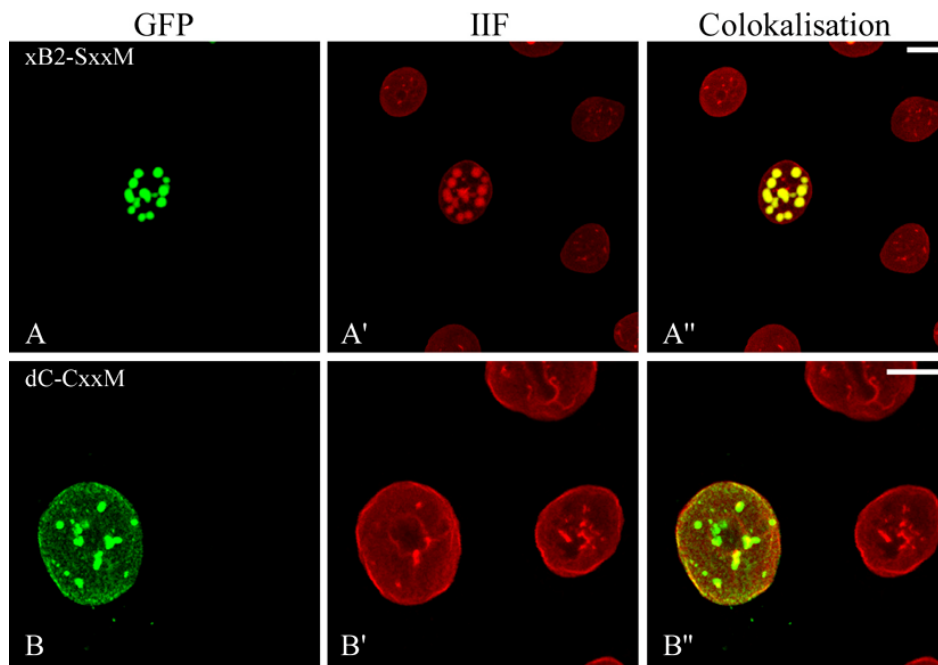
### **VI. 1. 2. 3. Auswirkungen der Caxx-Box**

Die Frage, die sich unweigerlich nach diesen Ergebnissen stellt ist: "Warum treten diese Strukturen nicht beim Lamin C von *Drosophila* auf?" oder anders formuliert: "Was haben all diese wildtypischen Lamine, was das Lamin C nicht hat?" Die Antwort findet sich in der Struktur des Lamin C. Es besitzt im Gegensatz zu allen anderen Laminen von Anfang an, kein CxxM-Motiv. Man geht davon aus, dass dieses Motiv für die anfängliche Verankerung der Lamine an der inneren Kernmembran verantwortlich ist (Krohne et al., 1989; Holtz et al., 1989; Übersicht: Krohne et al., 1998). Um zu überprüfen ob dieses Motiv wirklich der Auslöser für die gefundenen Veränderungen ist, wurden zwei unterschiedliche Lamin Mutanten kloniert und deren Auswirkungen untersucht. Zum einen wurde auf ein Lamin C Konstrukt zurückgegriffen, bei dem das *Drosophila* Lamin C am Carboxyterminus mit einem CxxM-Motiv (CAIM; Krohne et al., 1998)) versehen wurde (Abb.VI.1, LC-CxxM). Zum anderen wurde das CxxM-Motiv des *Xenopus* Lamin B2 so mutiert, dass anstelle des Cysteins ein Serin in dem Motiv auftritt (Abb.VI.1, B2-SxxM). Hierfür wurde, ausgehend vom wildtypischen Lamin B2, mit den Primern (5'LB2 und 3'LB3; siehe III.8.1) ein Fragment amplifiziert, welches am Carboxyterminus neben dem Stopcodon auch die

entsprechende Punktmutation trägt. Das Fragment wurde in den Topo Vektor® kloniert und ansequenziert. Da die untersuchten Fragmente aufgrund eines Leserasterschubs kein funktionsfähiges Lamin B2 kodierten, wurde der intakte aber mutierte carboxyterminale Teil des Fragments über *SpeI/EcoRI* ausgeschnitten und in das schon bestehende, ebenfalls mit *SpeI/EcoRI* verdaute, GFP-Lamin B2 Plasmid umklontiert.

### VI. 1. 2. 3. 1. Lichtmikroskopische Untersuchung

Die Expression dieser Fusionsproteine zeigt schon bei lichtmikroskopischen Untersuchungen einen deutlichen Unterschied zu den entsprechenden wildtypischen Laminen (Vergleiche Abb. VI.3A, C mit Abb. VI.7A, B).



**Abb. VI.7: CLSM-Aufnahmen von *Xenopus* A6 Zellen die Lamine mit veränderten Carboxytermini exprimieren**

Die Zellen überexprimieren zum einen eine *Xenopus* Lamin B2 Mutante bei der Cystein des CxxM-Motivs durch ein Serin ersetzt wurde (xB2-SxxM; A, A', A'') und zum anderen eine *Drosophila* Lamin C-Mutante bei der ein zusätzliches CxxM-Motiv angehängt wurde (dLC-CxxM, B, B', B''); linke Spalte: GFP-Fluoreszenz; mittlere Spalte: indirekte Immunfluoreszenz (IIF) von Laminen; rechte Spalte: Colokalisation beider Signale; Antikörper: X223 (A', B'), Aufnahme mit dem CLSM; Eichstrich: 10µm

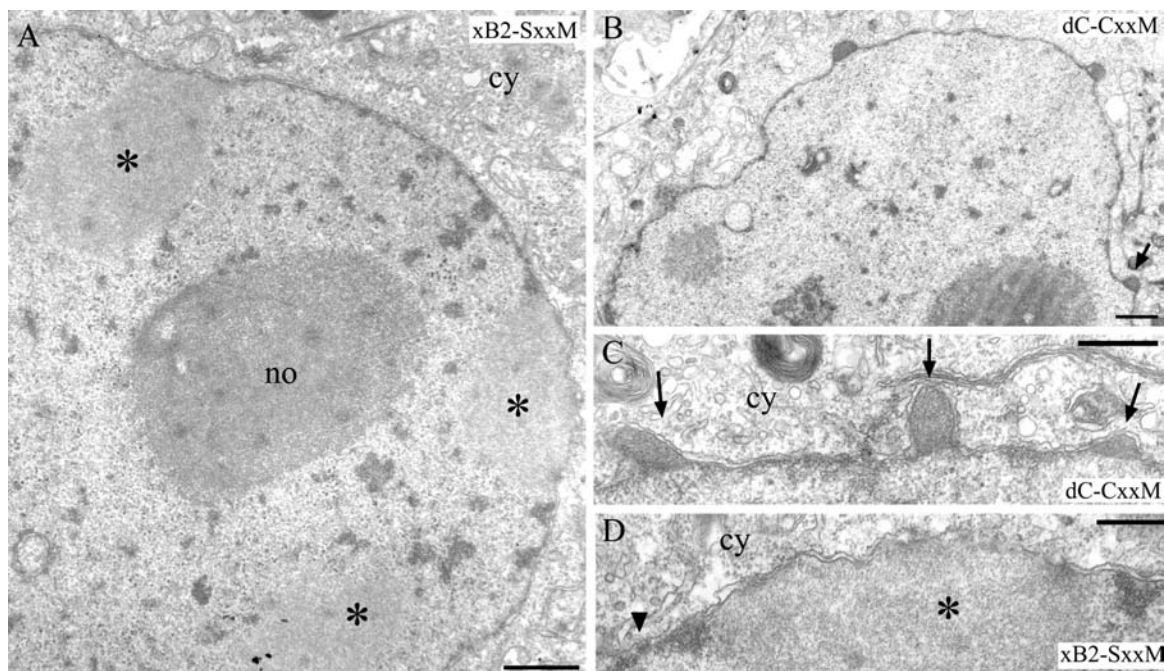
Zellen die das mutierte Lamin B2 (Abb. VI.7A) exprimieren und somit kein funktionelles CxxM-Motiv besitzen, zeigen eine deutliche Ansammlung des Fusionsproteins in globulären Aggregaten. Die beim wildtypischen Lamin B2 aufgetretene Faltung der Kernhülle ist hier nicht mehr zu erkennen. Die Markierung der Lamina mit einem Antikörper gegen Lamin B2

(Abb.VI.7A') bestätigt die Lokalisation des mutierten Lamin B2 in diesen Aggregaten und verdeutlichen, dass die Oberfläche des Kerns nicht gefaltet oder gelappt ist.

Das zusätzliche CxxM-Motiv des *Drosophila* Lamin C scheint ebenfalls die Auswirkungen des Fusionsproteins zu verändern. Anstatt wellenförmiger Linien (Abb.xxx 7C) können nun verschieden große Punkte wahrgenommen werden, die sich über den Kern verteilen (Abb. VI.8B). Die Markierung des Kerns mit einem Antikörper gegen Lamin B2 zeigt, dass der Kern an Größe gewonnen hat und auch kleinere Falten auftreten (Abb. VI.8B'). Die Colokalisation der beiden Signale bestätigt, dass sich die Aggregate an der Oberfläche des Kerns befinden (Abb. VI.8B'').

### VI. 1. 2. 3. 2. Elektronenmikroskopische Untersuchung

Der unterschiedliche Einfluss der beiden Fusionsproteine auf die Morphologie der Kernmembran und der Kernperipherie wird bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung deutlich.



**Abb. VI.8: Auswirkungen des CxxM-Motivs auf die Membranbildung im Kern**

*Xenopus* A6 Zellen überexprimieren: ein *Xenopus* Lamin B2 mit mutiertem CxxM-Motiv (xB2-SxxM; A, D) und ein *Drosophila* Lamin C mit zusätzlichem CxxM-Motiv (dLC-CxxM; B, C); Sternchen: Proteinaggregate die mit der Kernmembran assoziiert sind (A, D), Pfeile: Ausstülpungen der Kernhülle (B, C); Pfeilkopf: Porenkomplex; no: Nukleolus; cy: Cytoplasma; Eichstriche: 1µm (A, B), 500nm (C, D)

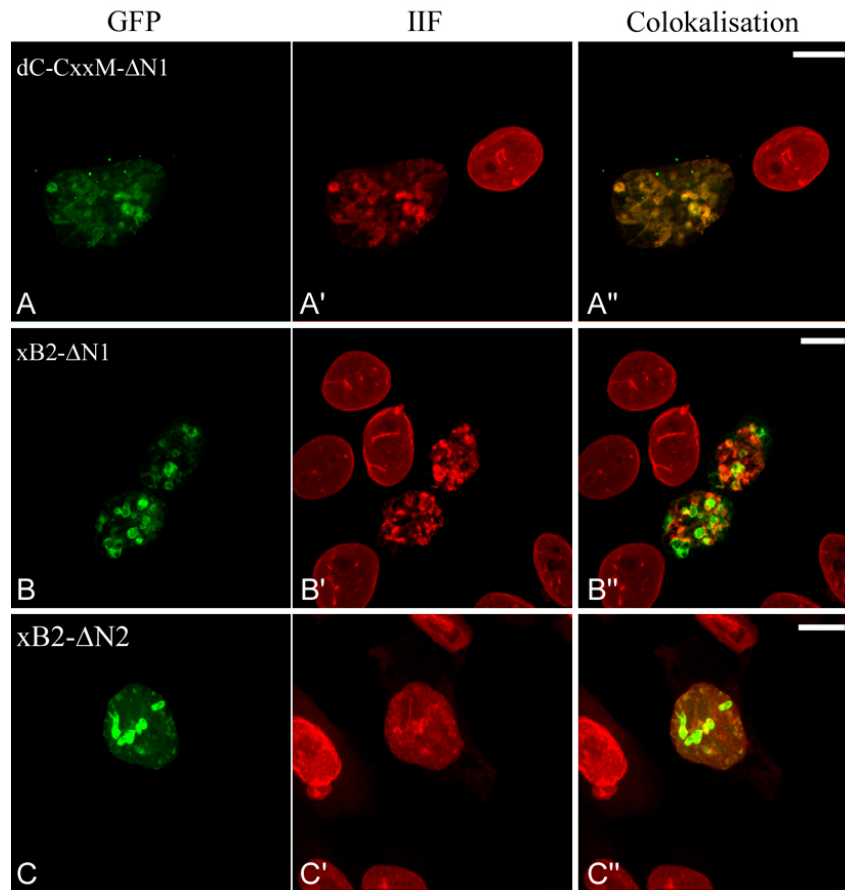
Während der Verlust des CxxM-Motivs beim *Xenopus* Lamin B2 zu einer Ansammlung des Proteins in großen Aggregaten unterhalb der Kernmembran führt (Sterne Abb. VI.8A, D) und keinen Einfluss auf die Form der Kernmembran zu haben scheint, induziert das zusätzliche CxxM-Motiv des *Drosophila* Lamin C die Ausstülpung der Kernmembran (Pfeile, Abb.VI.8B, C). Unterhalb der Ausstülpungen befinden sich kleinere Proteinaggregaten, die eine vergleichbare Elektronendichte wie die wildtypischen Lamin C Polymere aufzeigen (vgl. Abb. VI.5 mit Abb. VI.8C).

### VI. 1. 2. 4. Der Einfluss anderer Domänen der Lamine

Die Ergebnisse der wildtypischen Lamine sowie der beiden CxxM-Motiv Mutanten machen deutlich, dass das CxxM-Motiv Einfluss auf Kernmembranwachstum zeigt, welches sich entweder in der Größenzunahme des Kerns, dessen Faltung oder in der Bildung von extra Membranen äußert. Inwieweit nun die helikalen Domänen an diesem Phänotyp beteiligt sind, soll durch weitere Lamin Mutanten geklärt werden (Abb. VI.1).

Zum einen wurden drei *Xenopus* Lamin B2 Mutanten verwendet, die zwar alle den vollständigen carboxyterminalen Schwanz aber unterschiedliche Regionen der  $\alpha$ -Helices kodierten. Eine Mutante beinhaltet zusätzlich die gesamte helikale Domäne 2 (xB2 $\Delta$ N3), eine zweite nur die 2. Hälfte der helikalen Domäne 2 (B2- $\Delta$ N1) und eine dritte nur den carboxyterminalen Schwanz (B2-N2). Zusätzlich wurde eine Laminmutante des *Drosophila* Lamin C kloniert, die vergleichbar mit der B2- $\Delta$ N3 Mutante die helikale Domäne 2, den carboxyterminalen Schwanz, sowie das zusätzliche CxxM-Motiv beinhaltet (dC-CxxM- $\Delta$ N1). Hierfür wurde das GFP-Lamin C-CxxM -Konstrukt mit *SacI/EcoRI* verdaut und im Leseraster in einen pEGFP-C3-Vektor (Invitrogen) kloniert.

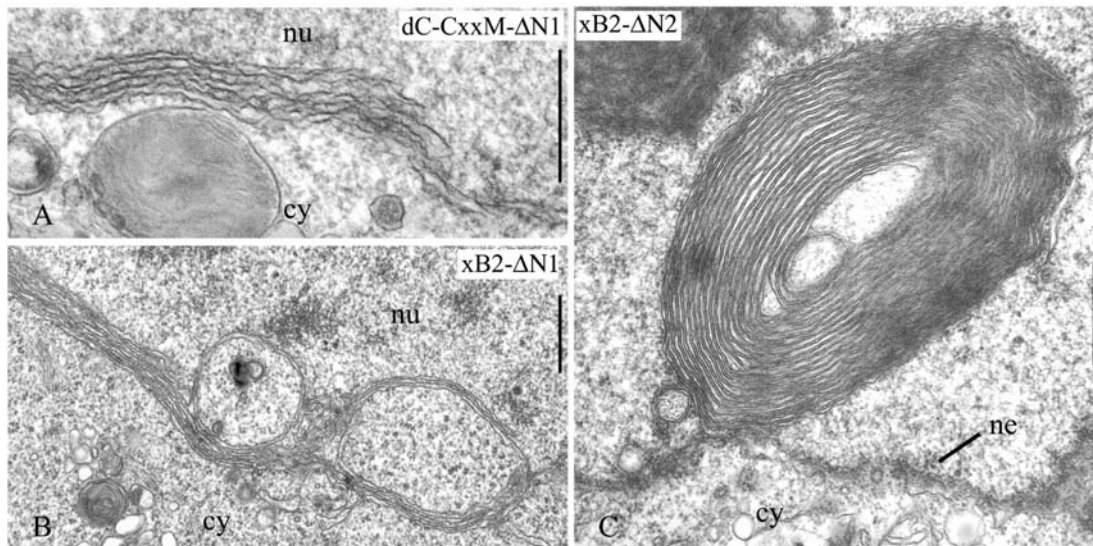
Die Überexpression der *Drosophila* Lamin C Mutante (Abb. VI.9A) zeigt ähnlich wie die beiden *Xenopus* Lamin B2 Mutanten (Abb. VI.9B, C, Aufnahmen: Annette Vogel) eine großflächige Aggregation des Fusionsproteins. Die Kernlamina und damit der Kern erfahren blasenartige Ausstülpungen (Abb. VI.9A', B') in denen die Fusionsproteine zu finden sind und ein großer Teil der endogenen Lamine lokalisiert sind (Abb. VI.9A'', B''). Die Lamin Mutante, die nur die Schwanzdomäne enthält (xB2- $\Delta$ N2) verursacht dagegen keine signifikante Kernverformung (Abb. VI.9 C-C'').



**Abb. VI.9: Beeinflussung der Kernmembran durch die Laminexpression N-terminaler Deletiotinsmutanten**

*Xenopus* A6 Zellen überexprimieren: eine *Drosophila* Lamin C-Mutante, bei der sowohl ein zusätzliches CxxM- Motiv angehängt wurde, als auch die ersten beiden  $\alpha$ -helikalen Domänen entfernt wurden (dC-CxxM- $\Delta$ N1; A, A', A''), eine *Xenopus* Lamin B2- Mutante der die ersten beiden sowie die Hälfte der zweiten  $\alpha$ -helikalen Domäne fehlt (xB2- $\Delta$ N1; B, B', B''), eine *Xenopus* Lamin B2 Mutante, die nur den carboxyterminalen Schwanz kodiert (xB2- $\Delta$ N2; C, C', C''), linke Spalte: GFP-Fluoreszenz, mittlere Spalte: indirekte Immunfluoreszenz von Laminen; rechte Spalte: Colokalisation beider Signale; Antikörper: X223 (A'), X94 (B', C'); Aufnahme über CLSM; Eichstrich: 10 $\mu$ m

Die Expression dieser Lamin Mutanten in A6 Zellen zeigt in allen drei Fällen die Bildung von mehreren Membranschichten im Zellkern (Abb. VI.10). Dabei waren die Membranstapel bei den Mutanten, welche die gesamte helikale Domäne 2 (Abb. VI.10A) oder nur einen Teil dieser Domäne beinhalten (Abb. VI.10B), immer mit der inneren Kernmembran verbunden. Der Phänotyp ist daher mit der Überexpression des wildtypischen *Xenopus* Lamin B2 vergleichbar. Bei der Überexpression der Lamin Mutanten, die nur für den carboxyterminalen Teil des Proteins kodiert, bilden sich zwar mehrschichtige Membranen aus, diese ragen jedoch in den Kern hinein und stehen nur geringfügig mit der Kernhülle in Kontakt. Die Morphologie der Kernmembran scheint durch die Expression der xB2- $\Delta$ N2 Mutante nicht beeinflusst zu werden (Abb.VI.10C).



**Abb. VI.10: Auswirkungen N-terminaler Deletionsmutaten auf die Membransynthese**  
 A6 Zellen überexprimieren eine *Drosophila* Lamin C Mutante der die ersten beiden  $\alpha$ -helikalen Domänen fehlt und ein zusätzliches CxxM-Motiv trägt (dC-CxxM- $\Delta$ N1; A) und zwei *Xenopus* Lamin B2 Mutanten, die entweder ab der Hälfte der Helix 2 (xB2- $\Delta$ N1; B) oder nur den carboxy-terminalen Schwanz (xB2- $\Delta$ N2, C) kodieren; nu: Nukleoplasma; cy: Cytoplasma; ne: Kernhülle; Eichstriche: 500nm

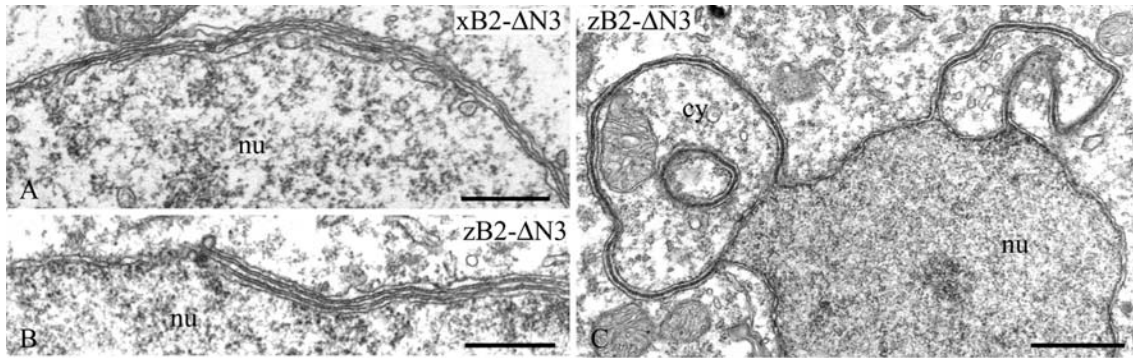
#### VI. 1. 2. 5. Vergleichende Expression der Lamin Mutanten in anderen Organismen

Um auszuschließen, dass der gefundene Phänotyp nur in *Xenopus* Zellen zu finden ist, wurden verschiedene Mutanten auch in COS-7 Zellen oder Zebrafischembryonen überexprimiert. Aufgrund zweier Diplomarbeiten von Annette Vogel und Nils Klüver, die zwei Lamin Mutanten (xB2- $\Delta$ N3 bzw. zB2- $\Delta$ N3) in COS-7 Zellen überexprimierten und lichtmikroskopisch untersuchten, war schon bekannt, dass diese ebenfalls zu massiven Verformungen der Kerne führen, die ähnlich aussehen wie die Zellen, die die Mutanten dC-CxxM- $\Delta$ N1 oder xB2 $\Delta$ N1 exprimieren (siehe Abb. VI.9A, B; Vogel, 2002, Klüver, 2003).

Die elektronenmikroskopischen Untersuchung ergab ähnliche Veränderungen der Kernmembran wie durch die Mutanten dC-CxxM- $\Delta$ N1 und xB2- $\Delta$ N1 (Abb. VI. 10A,B).

Die Expression der *Xenopus* Lamin B2- $\Delta$ N3 Mutante in COS-7 Zellen (Abb. VI.11A) führt genauso wie die Expression der direkt vergleichbaren Mutante des Zebrafisch Lamin B2 (Abb. VI.11B,C) zur Bildung von Kernmembranen, die aus mehreren Membranen besteht. Die Expression in Zebrafisch Embryonen erfolgte über die Mikroinjektion von in vitro synthetisierter mRNA der Lamin Mutante zB2- $\Delta$ N3.

Anhand dieser Daten kann mit Gewissheit behauptet werden, dass die in dieser Arbeit für *Xenopus* A6 beschriebene Veränderungen auch auf andere Organismen übertragbar sind.



**Abb. VI.11: Expression zweier Lamin Mutanten in COS-7 Zellen bzw. Zebrafischembryonen**

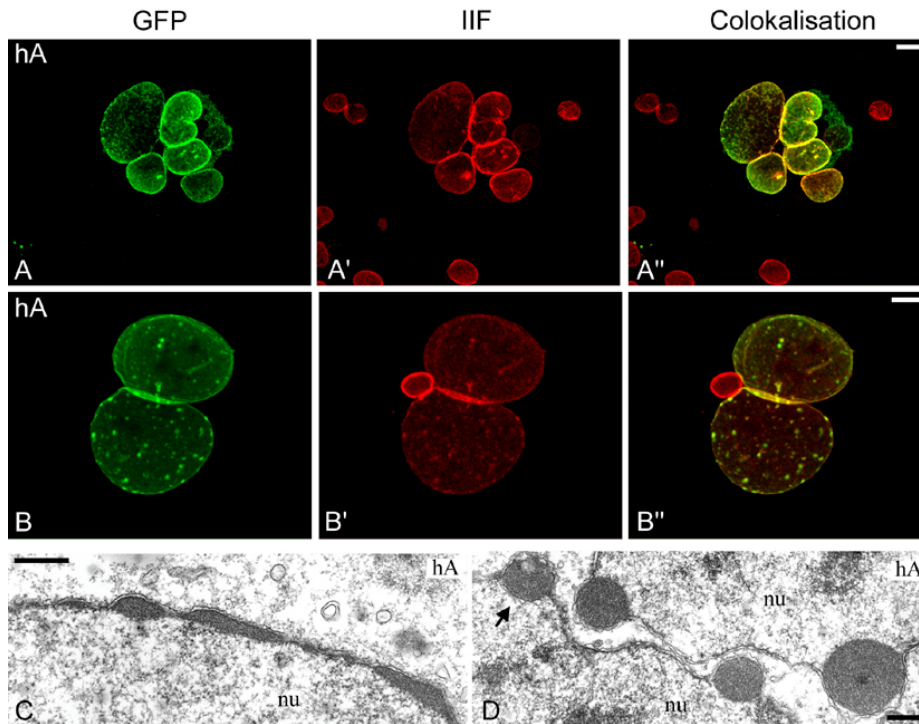
Elektronenmikroskopische Aufnahmen von der Expression der *Xenopus* Lamin B2-Mutante in Cos 7 Zellen (xB2-ΔN3; A) und der Expression der Zebrafisch Lamin B2 Mutante (zB2-ΔN3; B, C) in Zebrafisch Embryonen; beiden Mutanten fehlt der aminoternale Teil bis zur  $\alpha$ -Helix 2; COS-7 Zellen wurde 24h nach der Injektion Zebrafischembryonen 9 h bzw. 36 h nach der Befruchtung fixiert; nu: Nukleoplasma; cy: Cytoplasma; Eichstriche: 500nm

### VI. 1. 2. 6. Unterschiedliche Auswirkungen von Lamin A

Die Verallgemeinerung scheint jedoch nicht auf das wildtypische Lamin A zuzutreffen. Die Expression von humanem Lamin A in HeLa Zellen zeigt sowohl bei lichtmikroskopischen als auch elektronenmikroskopischen Untersuchungen eine Aggregation der Proteine die sich an den Kernmembranen zu großen "Kugeln" anlagern (Bechert et al., 2003). Dennoch gleicht unsere Expression des humanen wildtypischen Lamin A in A6 Zellen eher den Expressionen von *Xenopus* Lamin B2 oder dem *Drosophila* Dm0 (Abb. VI.4, 5). Dies ist verwunderlich da eigentlich bekannt ist, dass sich humanes Lamin A nach dem posttranslationalen Verlust des CxxM-Motivs nicht wie ein B Typ Lamin verhält (Izumi et al., 2000).

Durch die Expression von humanem wildtypischem Lamin A in COS-7 Zellen konnte die von Bechert und Kollegen gefundenen Ergebnisse bestätigt werden (Abb. VI.12). Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der injizierten COS-7 Zellen zeigen eine deutliche Lokalisation des Lamin A im Zellkern. Neben der Ansammlung von Aggregaten findet man auch eine deutliche Färbung der Kernperipherie (Abb. VI.12A, B). Durch die Lokalisation der endogenen Lamine (Abb. VI.12A', B') wird ebenfalls deutlich, dass sich die Aggregate am Rand der Kerne befinden, da beide Signale colokalisieren (Abb. VI.12A'', B''). Dies bestätigt auch die elektronenmikroskopische Analyse, bei der eine elektronendichte Schicht (Abb. VI.12C) unterhalb der Kernmembran oder eine Reihe von runden elektronendichten Aggregaten (Abb. VI.12D) an der Kernmembran gefunden wurden.

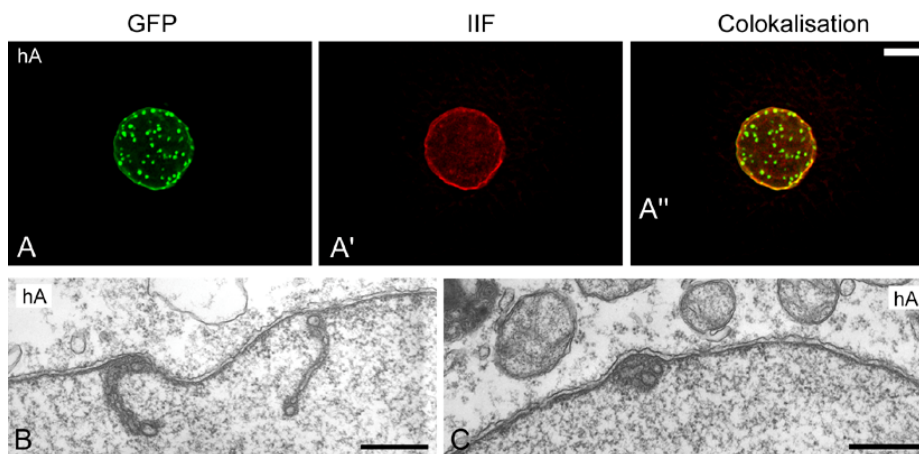




**Abb. VI.12: Überexpression von humanen Lamin A in COS-7 Zellen (37°C)**

Lichtmikroskopische Aufnahmen (A, A', A'', B, B', B''), linke Spalte: GFP-Fluoreszenz, mittlere Spalte: indirekte Immunfluoreszenz von Laminen; rechte Spalte: Colokalisation beider Signale; Antikörper: X223 (A', B') Aufnahme über CLSM; Eichstrich: 10µm; Elektronenmikroskopische Aufnahmen (C, D); nu: Nukleoplasma, Pfeil: kugelförmige Proteinaggregate; Eichstriche: 500nm (B, C)

Überraschenderweise zeigen mit humanen Lamin A injizierte COS-7 Zellen die für 24 Stunden bei 27°C gehalten wurden wiederum einen anderen Phänotyp (Abb. VI.13).



**Abb. VI.13: Überexpression von humanen Lamin A in COS-7 Zellen (27°C)**

Lichtmikroskopische Aufnahmen : GFP-Fluoreszenz (A), indirekte Immunfluoreszenz von Lamin B2 (A'), Colokalisation beider Signale (A''); Antikörper: X223 (A') Aufnahme über CLSM; Eichstrich: 10µm; Elektronenmikroskopische Aufnahmen (B, C); nu: Nukleoplasma, Pfeil: kugelförmige Proteinaggregate; Eichstriche: 500nm (C, D)



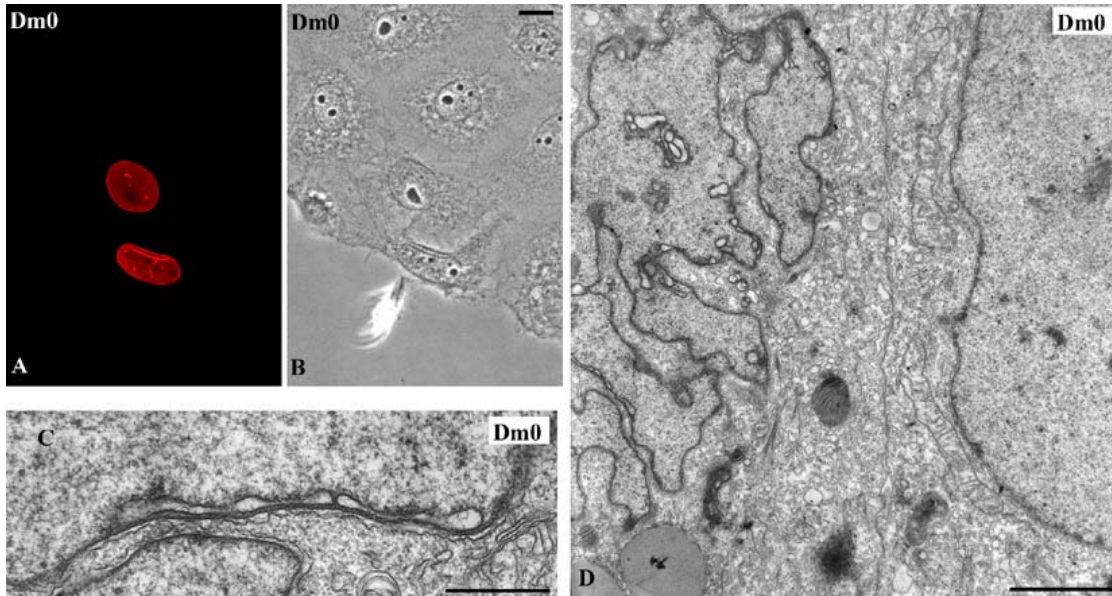
Zwar ist bei der lichtmikroskopischen Untersuchung kein großer Unterschied zu COS-7 Zellen zu erkennen, die bei 37°C kultiviert wurden (vgl. Abb VI.13A-A'' mit Abb. VI.12A-A''), dafür gibt es jedoch auf elektronenmikroskopischer Ebene kaum Ähnlichkeiten. Es kommt bei der geringeren Temperatur (26°C) zu keiner zusätzlichen Schicht unterhalb der Kernhülle oder zu Anlagerung von großen runden Proteinaggregaten sondern eher zur Ausbildung von kleinen Aggregaten, die bei höherer Vergrößerung extra Membranen beinhalten (Abb. VI.13B, C). Da dieses wiederum bei der Expression in A6 Zellen auftritt und vergleichbar ist mit den von B Typ Laminen verursachten Veränderungen der Kernhülle, scheint diese Expression eine Zwischenstufe darzustellen. Die Vermutung liegt nahe, dass der carboxy-terminale Teil des humanen Lamin A nicht vollständig prozessiert wird und somit das CxxM-Motiv erhalten bleibt. Ob dies jedoch auf fehlende, oder aufgrund der Temperatur zu geringer Enzymaktivität oder eine unzugängliche Faltung des Lamin A bei 27°C zurückzuführen ist, müsste durch weitere Experimente geklärt werden.

#### **VI. 1. 2. 7. Einfluss des GFPs auf die morphologische Veränderung**

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der wildtypischen Lamine B2, Dm0 und Lamin A, sowie der verschiedenen Mutanten zeigten in allen Fällen, in denen zusätzliche Membranen gebildet wurden, eine einheitliche Struktur. Durch die Überexpression von Lamin Dm0 ohne GFP, soll geklärt werden in wieweit das GFP die Bildung der Membranstrukturen beeinflusst.

Hierfür wurde die für das *Drosophila* Dm0 kodierende Region über *BglII* und *EcoRI* aus dem GFP- Expressionsplasmid entfernt und über die gleichen Schnittstellen so in den pEGFP-N1 Vektor ligiert, dass es nicht im Leseraster mit dem GFP vorliegt. Die Kontrolle inwieweit das neue Expressionsplasmid auch wirklich Dm0 exprimiert, erfolgte über die Injektion des Konstrukts in A6 Zellen und einer anschließenden Antikörperinkubation mit Antikörpern gegen das Lamin Dm0 (ADL84) (Abb. VI.14A). Die Lokalisation für die elektronenmikroskopische Präparation erfolgte durch eine Coinjektion des neuen Expressionsvektors (60ng/μl) zusammen mit dem pEGFP-C3 Vektor (40ng/μl).

Die lichtmikroskopische Aufnahme zeigt, dass *Xenopus* A6 Zellen, die mit diesem Dm0- Expressionsplasmid injiziert wurden, wirklich Dm0 im Kern exprimieren (Abb. VI.14 A).



**Abb. VI.14: Expression von *Drosophila* Dm0 ohne GFP in *Xenopus* A6 Zellen**

Lichtmikroskopische Aufnahmen einer injizierten Zelle (A, B), Antikörperinkubation gegen Lamin Dm0 (A) und Phasenkontrastaufnahme (B); Eichstrich 10 $\mu$ m;  
Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer injizierten Zelle (C, linke Zelle in D); nicht injizierte Zelle: rechte Zelle in D; Eichstrich: 500nm

Die elektronenmikroskopische Analyse zeigt weiterhin, dass die Zellkerne von Zellen, die das Lamin Dm0 überexprimieren eine stark gefaltete Kernmembran ausbilden und zusätzlich intranukleäre Membranen bilden. Die morphologische Veränderungen sind sehr ähnlich zu denen, die in Zellen gesehen wurden die GFP-Lamin Fusionsproteine exprimieren (vgl. Abb. VI.4, 6). Dieser Versuch beweist weiterhin, dass das GFP keinen Einfluss auf die Bildung von Membranzisternen oder der Kernmembranfaltung besitzt (Abb. VI.14C, D). Abbildung VI.14D zeigt sehr deutlich den Unterschied einer Dm0 exprimierenden Zelle (links) und einer wildtypischen Zelle (rechts).

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich eindeutig festhalten, dass B-Typ Lamine allein durch die Interaktion ihrer carboxyterminalen Domäne mit der inneren Kernmembran eine Induktion der Membransynthese hervorrufen. Dies wird bei Überexpression des Proteins in einer stärkeren Faltung der Membran und einer Ansammlung von Membranstapeln deutlich.

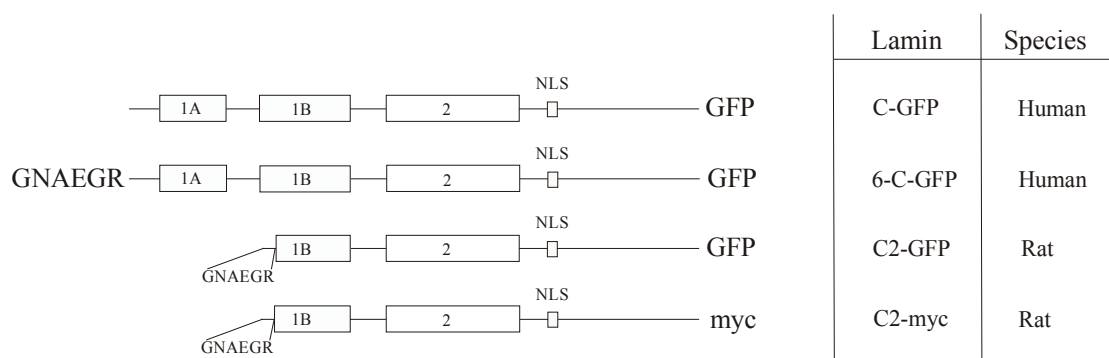
### VI. 1. 3. GNAERG-Sequenz des Lamin C2

Eine Frage, die sich zwangsläufig aus dieser Feststellung ergibt, beschäftigt sich mit dem meiotischen Lamin C2. Dieses A-Typ Lamin besitzt zwar von Anfang an kein CxxM-Motiv mit der es mit der inneren Kernmembran in Kontakt treten könnte, dafür aber eine aminoterminaler Sequenz aus 6 Aminosäuren (GNAEGR), die ebenfalls für die Verankerung des Proteins in der Kernhülle verantwortlich ist (Alsheimer et al., 2000). Hierbei spielt die posttranslationale Modifizierung dieser GNAEGR-Sequenz eine wichtige Rolle. Nach dem Abspalten des aminoterminalen Methionins wird das folgende Glycin myristyliert (Alsheimer et al., 2000) wodurch das Protein mit einer lipophilen Gruppe versehen wird. Denselben Effekt hat auch die posttranslationale Modifikation des CxxM-Motivs der B-Typ Lamine.

Diese lipophilen Gruppen dienen letztlich sowohl bei den B-Typ Lamine als auch beim Lamin C2 der Assoziation mit der Kernmembran. Anhand dieses Proteins soll untersucht werden, ob die Neubildung von Kernmembranen allein auf die Interaktion mit dem CxxM-Motiv beruht, oder ob auch die Interaktion eines A-Typ Lamins, welches diese zweite spezifische Interaktionssequenz besitzt, eine ähnliche Reaktion der Zelle auslöst.

#### VI. 1. 3. 1. Verwendete Konstrukte

Für diese Untersuchungen konnte ich auf einige Konstrukte von Manfred Alsheimer zurückgreifen, die er für die Charakterisierung des GNAEGR-Motivs kloniert hatte (Alsheimer et al., 2000). Abbildung VI.15 zeigt die Konstrukte, die für die folgenden Analysen verwendet wurden.



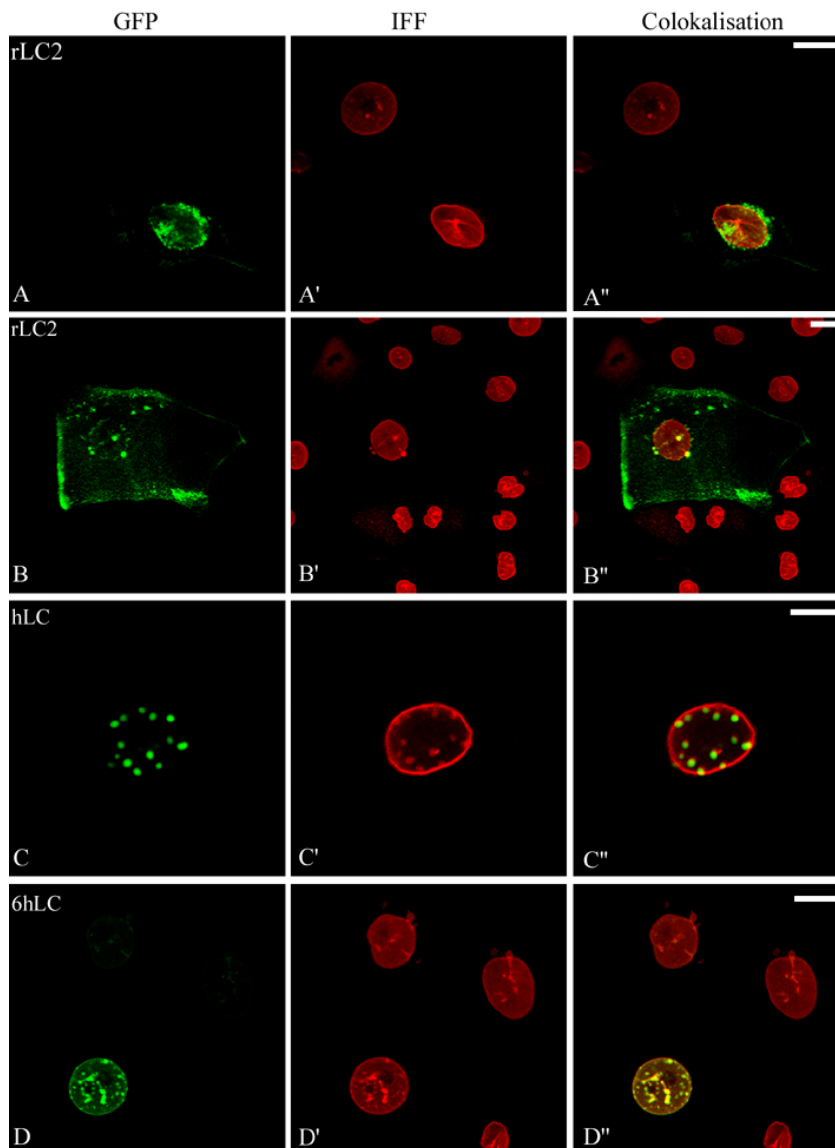
**Abb. VI.15: Schematische Zeichnung Lamin Konstrukte**

GFP-Fusionsproteine: humanes Lamin C (C-GFP), humanes Lamin C mit zusätzlichen 6 Aminosäuren (GNAEGR) (6-C-GFP) wildtypisches Ratten Lamin C2 (C2-GFP); ohne GFP: wildtypisches Ratten Lamin C2 mit zusätzlichen myc-Motiv (LAAEKLISEEDLNGAA) (C2-myc); NLS: Kernlokalisierungssignal

Um die Auswirkungen der GNAERG-Sequenz genauer zu untersuchen, wurden neben dem wildtypischen Lamin C2 der Ratte (rLC2) auch eine Mutante des humanen Lamin C2 getestet, welches am Aminoterminus diese spezifische Sequenz trägt. Zur Kontrolle wurde auch das wildtypische humane Lamin C getestet. Die kodierenden Regionen wurden in pEGFP-N-Vektoren kloniert, wodurch die exprimierten Fusionsproteine am Carboxyterminus das GFP besitzen. Um auszuschließen, dass die gefundenen Ergebnisse durch die Expression des GFPs beeinflusst werden, wurde gleichzeitig ein Lamin C2 exprimiert, welches anstelle des GFPs einen "myc-tag" trägt.

### VI. 1. 3. 2. Lichtmikroskopische Untersuchungen

Die lichtmikroskopische Analyse der in Abbildung VI.15 gezeigten Lamine wurden an *Xenopus* A6 Zellen durchgeführt (Abb. VI.16).



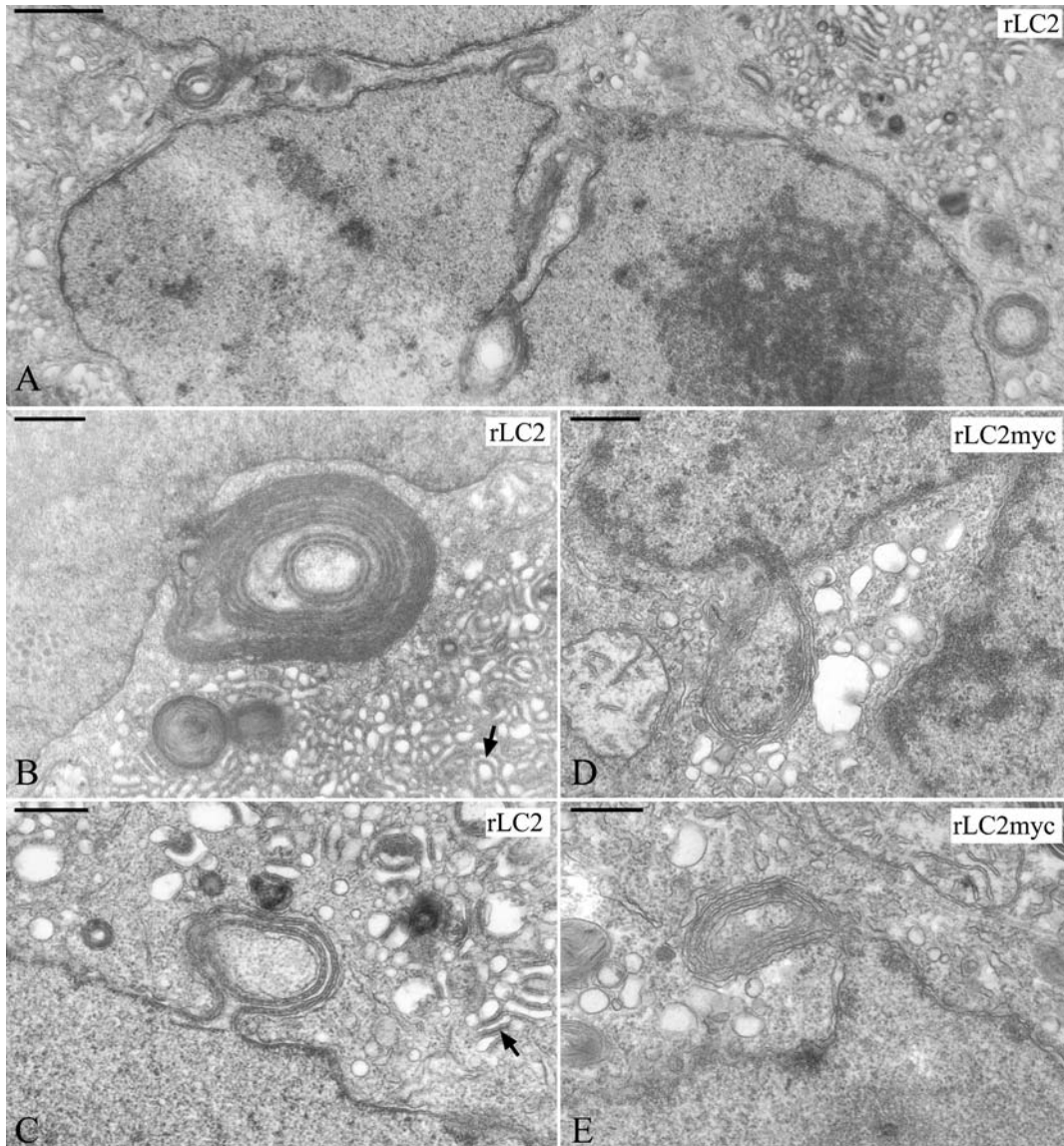
**Abb. VI.16: CLSM-Aufnahmen von überexprimierten Lamin-Fusionsproteinen in *Xenopus* A6 Zellen**

Zellen überexprimieren wildtypisches Ratten Lamin C2 (rLC2; A, A', A'', B, B', B''), wildtypisches humanes Lamin C (hLC; C, C', C'') und humanes Lamin C2 mit einer zusätzlichen GNAERG-Sequenz am Aminoterminus (6hLC; D, D', D''); linke Spalte: GFP-Fluoreszenz, mittlere Spalte: indirekte Immunfluoreszenz (IIF) von Laminen; rechte Spalte: Kokalisation beider Signale; Antikörper: X223, Aufnahme über CLSM; Eichstrich: 10µm

Die Überexpression der GFP-Fusionsproteine führt in allen drei Fällen zur Bildung von punktförmigen Strukturen in der Kernperipherie und/oder im Kerninneren. Neben diesen Strukturen ist das Ratten Lamin C2 auch im Cytoplasma nachweisbar, was wohl zum einen auf eine starke Überexpression zurückzuführen ist, zum anderen aber auch auf die Fähigkeit des Lamin C2 schnell zu polymerisieren und mit cytoplasmatischen Membranen zu interagieren (Abb. VI.16A, B). Die Kerne der Lamin C2 (rLC2) exprimierenden Zellen sind leicht gefaltet (Abb. VI.16 A') oder etwas vergrößert (Abb. VI.16B'). Im Unterschied zum wildtypischen Lamin C2 zeigt das humane Lamin C eine deutliche Bildung von kugeligen Aggregaten (Abb. VI.16C), welche im ganzen Kern verteilt sind (Abb. VI.16C', C''). Durch die zusätzlichen 6 Aminosäuren am Aminoterminal (Mutante 6hLC), ändert sich jedoch die Verteilung des humanen Lamin C. Es sind nicht nur kleinere Punkte und linienförmige Aggregate im Kern zu erkennen, sondern auch eine Lokalisation des Proteins an der Kernperipherie (Abb. VI.16D). Gleichzeitig ist hier eine deutliche Colokalisation zu dem endogenen Lamin B2 der Zelle zu erkennen (Abb. VI.16D', D''), die bei keinem der anderen Lamin Mutanten beobachtet wurden (Abb. VI.16A'', B'', C'').

### VI. 1. 3. 3. Elektronenmikroskopische Analyse

Die elektronenmikroskopische Untersuchung zeigt, dass das Ratten Lamin C2 die Bildung von Ausstülpungen der Kernhülle verursacht. Im Bereich der Ausstülpungen ist die Membran mehrschichtig, wobei benachbarte Membranzisternen durch eine elektronendichte Schicht voneinander getrennt sind (Abb. VI.17). Diese Schicht ist wesentlich weniger elektronendicht als in Zellen, die das Lamin C2-myc exprimierten. Außerdem erscheinen die parallel verlaufenden Membranen weniger regelmäßig als in den Zellen mit dem direkt vergleichbaren GFP-Fusionsprotein (vgl. Abb. VI.17B, C mit D, E). Bei keiner der Ausstülpungen konnten Porenkomplexe gefunden werden.

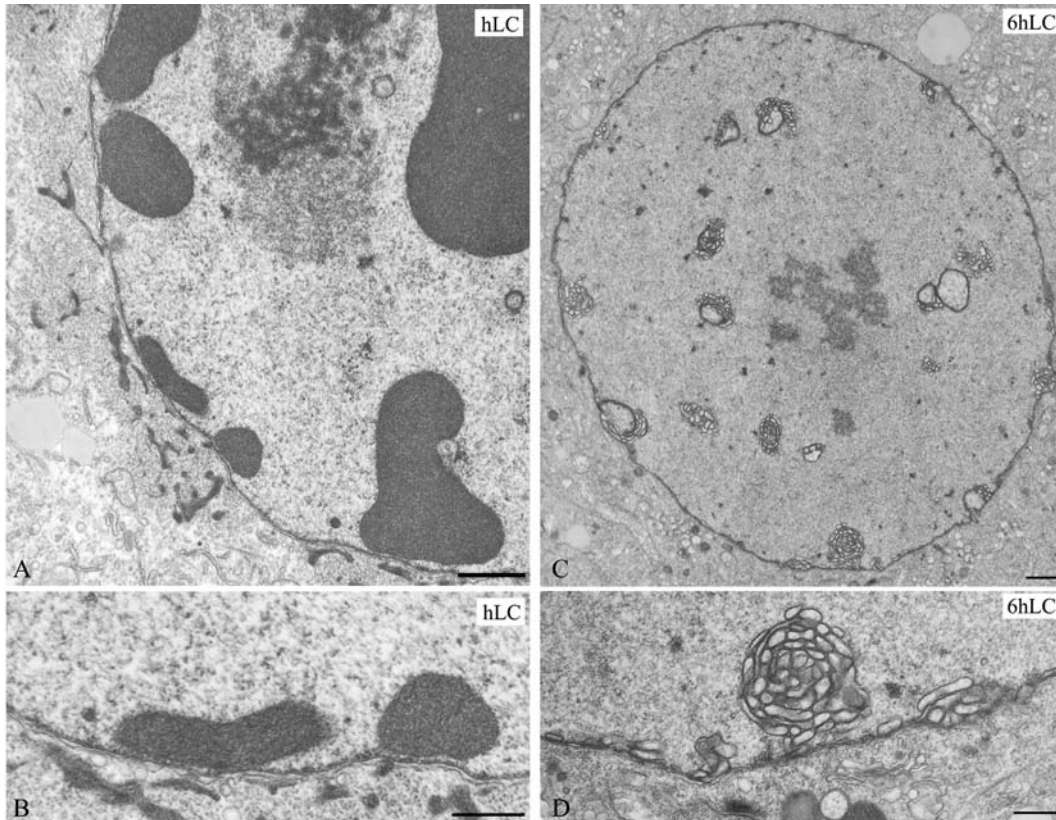


**Abb. VI.17: EM Aufnahmen von Ratten Lamin C2**

A6 Zellen überexprimieren Ratten Lamin C2 Fusionsproteine gekoppelt and GFP (A, B, C) und an ein Myc-tag (D, E)

Die unter dem Lichtmikroskop erkennbaren Strukturen im Cytoplasma sind ebenfalls unter dem Elektronenmikroskop als parallel angeordnete Membranzisternen zu erkennen, die von einer elektronendichten Schicht voneinander getrennt sind (Pfeile; Abb. VI.17 A, B, C).

Dieses Ergebnis spricht dafür, dass auch die GNAERG-Sequenz für die Membranneubildung verantwortlich ist. Besonders deutlich wird dieses im direkten Vergleich des wildtypischen humane Lamin C und des humanen Lamin C mit zusätzlicher GNAERG-Sequenz (Abb. VI.18).



**Abb. VI.18: Auswirkungen der Überexpression von wildtypischem humanen Lamin C (hLC) und mit GNAERG-Sequenz versehenes Lamin C (6hLC) auf *Xenopus* A6 Zellkerne**

Die Expression von wildtypischem Lamin C zeigt unter dem Elektronenmikroskop die Bildung von großen elektronendichten Aggregaten, die sich unterhalb der Kernmembran bilden und in den Kern hineinragen (Abb. VI.18A). Bei höherer Vergrößerung ist nur an einzelnen Punkten ein Kontakt zur inneren Kernmembran erkennbar (Abb. VI.18B). Inwieweit diese Proteinpolymere eine parakristalline Struktur besitzen (vgl. Abb. VI.5A), konnte nicht festgestellt werden, da in keinem der Präparate periodische Strukturen in den Proteinaggregaten gesehen wurden. Zellen, die das mutierte Lamin C mit den zusätzlichen, vom Lamin C2 stammenden, 6 Aminosäuren exprimieren, zeigen dagegen keine Aggregatbildung mehr (Abb. VI.C). Hier können zusätzliche Membranen unterhalb der inneren Kernmembran gefunden werden, die entweder als einzelne kleine Membranzisternen vorhanden sind, oder als unstrukturierte Ansammlung von kleinen runden Membranzisternen ins Innere des Kernes wachsen (Abb. VI.18C, D).

Diese Analysen machen deutlich, dass vergleichbar mit dem CxxM-Motiv der B Typ Lamine auch die GNAEGR-Sequenz des Lamin C2 eine Membransynthese induzieren kann. Der Vergleich der Kernmorphologie zeigt aber, dass durch den myristylierten Aminoterminus des

Lamin C2 oder des Lamin C die gesamte Morphologie des Zellkerns weniger stark verändert wird als nach der Überexpression eines B-Typ Lamins (vgl. Abb.VI.17, 18C, D mit Abb. 4, 5). Andererseits unterscheidet sich die Morphologie der Kernhülle deutlich in Zellen, die Lamin C2 oder GNAEGR-Lamin C exprimieren. Die lokalen Ausstülpungen der Kernhülle nach der Expression von Lamin C2 resultieren wahrscheinlich aus der Anlagerung des Lamin C2. Blasenförmige Ausstülpungen der Kernhülle wurden auch beobachtet, wenn B-Typ Lamine mit einer aminoterminal verkürzten helikalen Domäne, vergleichbar mit dem Lamin C2, exprimiert wurden.



## VI. Diskussion

Die Überexpression von wildtypischen und veränderten Lamin-Konstrukten haben sowohl in Amphibien-, Fisch-, und Säugerzellen gezeigt, dass die Interaktion der Lamine mit der Kernmembran zu einer Induktion der Membransynthese führt. Dabei scheint eine direkte Interaktion ausschlaggebend zu sein, denn nur bei Anwesenheit des bei B-Typ Laminen obligatorische CxxM-Motivs, oder des für Lamin C2 spezifische GNAEGR-Signals, wird eine solche Induktion ausgelöst. Die Induktion resultiert in einem erhöhten Membranwachstum, der sowohl Einfluss auf die Kerngröße und -faltung hat, als auch zur Bildung von zusätzlichen Membranzisternen führt, die sich entweder einzeln unterhalb der Kernmembran befinden oder sich zu verschiedenen Membranstapeln zusammenlagern können (Abb. VI.4, Abb. VI.6). A-Typ Lamine, die keine direkte Interaktion mit der Kernmembran eingehen können, wie das Lamin C von *Drosophila* oder des Menschen, haben dagegen keinen Einfluss auf die Kernmembran, sondern aggregieren nach dem Transport in den Kern (Abb. VI.5; Abb. VI.18A, B).

Durch die Expression zweier Lamin-Konstrukte (Dm0 ohne GFP und rLC2myc) konnten anfängliche Befürchtungen, dass die Membranstapel eventuell auf die Wechselwirkungen der zusätzlichen GFPs zurückzuführen sind, widerlegt werden. Zwar erscheinen die zusätzlichen Membranen nicht mehr in einem so einheitlichen Abstand zueinander (rLC2-myc, Abb. VI.17D, E), dennoch sind keine Unterschiede in der Art der neuen Membranen (vgl. Abb. VI.14C mit Abb. VI.6B) oder in der Faltung der Kerne zu erkennen (vgl. Abb. xxx 14 mit Abb. VI.4D).

Im Gegensatz zu den untersuchten Laminen *Xenopus* Lamin B2, *Drosophila* Lamin C und Dm0 sowie Ratten Lamin C2 zeigt das humane Lamin A in verschiedenen Spezies ein unterschiedliches Verhalten. Die Expression in *Xenopus*-Zellen (A6 Zellen, 27°C; Abb. VI.5C, D, E) resultiert, ähnlich wie bei den B-Typ Laminen, in der Bildung von Membranstapeln, in Säugerzellen (COS-7 Zellen; 27°C; Abb. VI.12) dagegen, aggregiert das Lamin A unterhalb der Kernmembran. Da jedoch die Expression von Lamin A in COS-7 Zellen, die bei 27°C gehalten wurden, zu einer erneuten Bildung von zusätzlichen Membranen in einer abgeschwächten Form führt (Abb. VI.13), liegt die Vermutung nahe, dass das unterschiedliche Verhalten auf eine fehlerhafte Prozessierung des Lamin A zurückzuführen ist. In diesem Fall bleibt jedoch noch zu klären, ob das Herabsetzen der Temperatur die Aktivität der notwendigen Enzyme beeinflusst oder vielleicht das

carboxyterminale Ende des Lamin A, aufgrund einer veränderten Faltung des Proteins, nicht mehr frei zugänglich für die Protease ist.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von überexprimierten, wildtypischen Laminen zeigen unabhängig von der Spezies immer eine elektronendichte Schicht zwischen den einzelnen Membranzisternen oder einer Membranzisterne zur inneren Kernmembran (Abb. VI.5). Diese Schicht entspricht mit einer Dicke von 15-25 nm in etwa der Dicke einer normalen Lamina. Untersuchungen bei Lamin Mutanten, denen die gesamte Kopfdomäne und Teile der  $\alpha$ -helikalen Domänen fehlen oder die nur den carboxyterminalen Teil des Proteins kodieren, ergeben eine Reduktion des Abstandes (8-10 nm, XB2- $\Delta$ N3, Abb. VI.10C). Somit haben diese Domänen Einfluss auf die Dicke der Schicht und auf den Abstand zwischen den Membranen. Dies ist verständlich wenn man bedenkt, dass der Stabdomäne eine wichtige Rolle in der Dimerisierung und antiparallele Anlagerung der Lamine zukommt. Ebenso wahrscheinlich ist es, dass die Interaktionen der Lamine während der Polymerisation auch Einfluss auf die Anordnung von intranukleären Membranen haben (Übersicht: Stuurman et al., 1998; Herrmann and Aebi, 2004). Des weiteren entsteht der Eindruck, dass die Länge der überexprimierten Lamin Mutanten auch Einfluss auf die Lokalisation der zusätzlichen Membranzisternen hat. Während die Überexpression von wildtypische Lamine häufig zur Bildung von Membranzisternen entlang der inneren Kernmembran führt (Abb. VI.6A-E), scheinen Lamine mit gekürzter oder fehlender Stabdomäne eher Membranstapel zu bilden, die nur in kleineren Bereichen direkt unterhalb der inneren Kernmembran liegen und sich hauptsächlich in das Kerninnere erstrecken (Abb. VI.10).

Das Auftreten von intranukleären Membranen ist an sich nichts außergewöhnliches. In Zellen des menschlichen Endometrium (Isaac et al., 2001) werden sie genauso gefunden, wie bei der Überexpression von Kernporenkomplexproteinen Nup53p und Nup153 (Marelli et al., 2001; Bastos et al., 1996). Auch bei der Infektion von Insektenzellen mit dem Bakolovirus treten charakteristische intranukleären Membranen auf (Braunagel et al., 1998). Im Gegensatz zu den Laminen, die bei der Überexpression neben den intranukleären Membranen auch das gesamte Kernwachstum beeinflussen, scheinen die Überexpression von diesen Proteinen jedoch keinen weiteren Effekt auf das Wachstum des Zellkerns zu haben.

Das Wachstum des Kernes wird nicht nur durch die Ansammlung von zusätzlichen Membranen deutlich, sondern äußert sich auch in der Faltung und Ausstülpung der Kernmembran. In Kernen bei denen die Expression der Lamine schwächer ausfiel, konnten zum Beispiel nur Falten und wenig bis keine intranukleären Membranen gefunden werden

(Abb. VI.4C). Untersuchungen mit Antikörpern gegen endogene Lamine oder integrale Membranproteine (z.B. LAP2; Vogel, 2002; Klüver, 2003) zeigten weiterhin eine normale Verteilung der Proteine in der Kernmembran. Die Verteilung der endogenen Proteine der inneren Kernmembran verändert sich jedoch, wenn Lamine exprimiert werden denen die  $\alpha$ -helikale Domäne fehlt (Schirmer et al., 2001) oder die nur Teile der Stabdomäne kodieren (B2- $\Delta$ N1, B2- $\Delta$ N3; Vogel, 2002; Klüver, 2003). Ebenso ändert sich die Anordnung der neu synthetisierten Membran. Sie sind entweder in großen blasenförmigen Ausstülpungen (Abb. VI.11C) bzw. Einstülpungen, sowie in Membranstapeln verschiedener Dicke und Form zu finden (Abb. VI.10). Auch die Lage von Kernporenkomplexen scheint beeinflusst zu werden, denn bei keiner elektronenmikroskopischen Aufnahme konnte in den Bereichen, in denen Membranzisternen unterhalb der Kernmembran lokalisiert waren, Porenkomplexe identifiziert werden (Abb. VI.6, 10, 14, 17).

Ein weiterer auffälliger Punkt, der bei der Überexpression beobachtet werden kann, ist, dass das Wachstum der äußeren Kernmembran nicht in gleichen Maßen stattfindet, wie das Wachstum der intranukleären Membranen. Dies lässt vermuten, dass die Existenz der Lamine zwar das Wachstum induzieren kann, aber, dass auch weitere Faktoren eine Rolle spielen, um ein koordiniertes Kernwachstum zu bewirken.

Das die Überexpression von Laminen das Kernwachstum anregt, steht in Einklang mit Befunden aus Lamin-Depletionen-Versuchen. Hierbei bewirkt eine Depletion einen entgegengesetzten Effekt und verhindert das Kernwachstum sowohl in vitro als auch in vivo (Benavente und Krohne 1986; Newport et al., 1990). Doch wo liegt der Zusammenhang zwischen Laminexpression und Kernwachstum? Welcher Faktor ist für die Induktion verantwortlich? Ist es der direkte Kontakt oder eher ein Prozess der durch die Anwesenheit der Lamine ausgelöst wird? Untersuchungen an Proteinen, die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert sind, zeigen bei Überexpression ein ähnliches Verhalten wie die Lamine. Die Überexpression dieser Proteine induziert das Wachstum von ER-Membranen und führt zu einer Akkumulation der überexprimierten Proteine. Gleichzeitig steigt mit dem Membranwachstum auch die Lipidsynthese, was für ein Kopplung beider Prozesse spricht (Ohkuma et al., 1995; Chin et al., 1982; Ravid et al., 1999; Snapp et al., 2003). Die Lipidsynthese wird wiederum durch eine inhibitorische Rückkopplung reguliert. Dabei induziert der Rückgang von cytosolischem Sterol die proteolytische Aktivierung von bestimmten Transkriptionsfaktoren (SREBP = sterol regulatory element binding proteins). Diese Proteine sind als inaktive Transkriptionsfaktoren in der Membran des ER lokalisiert. Durch die Aktivierung lösen sich die SREBPs aus dem ER, wandern in den Kern und

veranlassen dort die Transkription von Sterolen und Fettsäuren (Horton et al., 2003; Übersicht: Rawson, 2003). In Anbetracht dessen, dass der Zellkern mit dem endoplasmatischen Retikulum in unmittelbarem Kontakt steht, könnte das Wachstum des Zellkerns auf ähnliche Weise kontrolliert werden. Unsere Daten haben gezeigt, dass sowohl die Interaktion des farnesylierten Cysteins von B-Typ Laminen als auch die Myristylierung des aminoterminalen Endes des Lamin C2 die Membransynthese anregen. Inwieweit die Interaktion der Lamine mit der inneren Kernmembran oder die vorrangige Modifikation des CxxM-Motivs oder des GNAEGR-Signals den Lipidmetabolismus beeinflussen, müsste durch weitere Versuche geklärt werden.

## **VII. Morpholino Injektionen**

### **VII. 1. Ergebnisse**

Wie in der Einleitung erwähnt ist die Injektion von Morpholinos eine neue Methode, um gezielt die Expression bestimmter Gene zu reprimieren. Dabei wird nicht das Gen ausgeschaltet, sondern die Translation der mRNA durch die Anlagerung der komplementären Morpholinos verhindert. Die Expression wird jedoch nicht auf Dauer reprimiert, denn mit zunehmender Zellzahl des Organismus verdünnt sich die Konzentration des Morpholinos.

Die folgenden Untersuchungen an Zebrafischembryonen sollen zeigen, ob mit der Injektion von Morpholinos gegen LAP2, LBR, Lamin B1 oder Lamin B2 die Expression dieser Proteine beeinflusst werden kann und ob die Reduktion sichtbare Auswirkungen auf den gesamten Organismus zeigt.

#### **VII. 1. 1. Grundlegende Informationen bezüglich der Morpholino Injektionen und der anschließenden Interpretation**

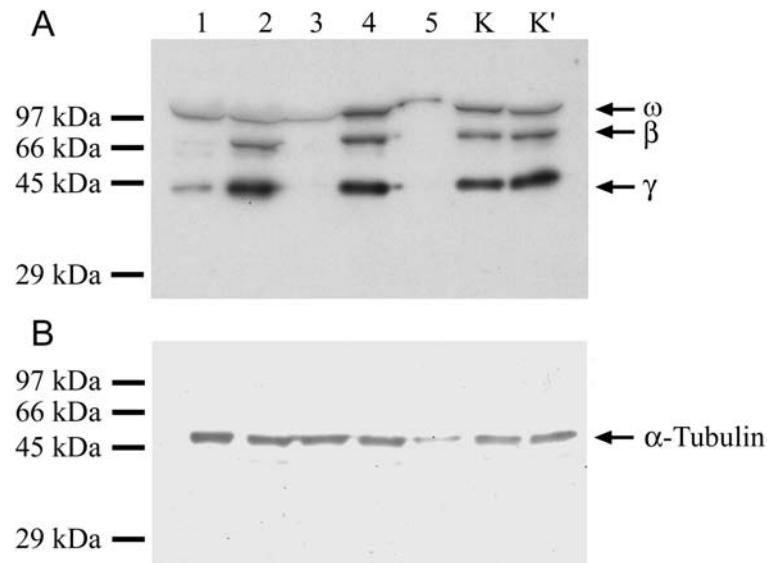
##### **VII. 1. 1. 1. Allgemeine Anmerkung für die Western Blot Analyse**

Die Auftrennung der Embryonen erfolgt in 12% Polyacrylamidgelen. Jede Spur enthält die gesamten Proteine eines einzelnen Embryos.

Um eine Aussage über die zu erwartende Repression treffen zu können, wurden zwei Kontrollen durchgeführt. Zum Einen wurden auf jedem Gel 1-2 nicht injizierte, 24 Stunden alte Embryonen mit aufgetrennt. Diese Spuren, mit "K" gekennzeichnet, geben einen Hinweis auf die natürliche Proteinmenge und auf die Mobilität des Proteins. Zum Anderen wurden die Blots nicht nur mit Antikörpern gegen das reduzierte Protein inkubiert, sondern auch mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin. Dies dient als Beladungskontrolle und soll vermeintlichen Fehlinterpretationen, in Bezug auf eine reduzierte Expression, vorbeugen.

##### **VII. 1. 1. 2. Anfängliche Schwierigkeiten**

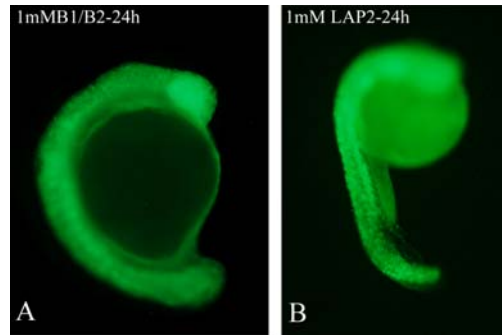
Trotz der Versuche die Embryonen möglichst genau in die Zellen oder im Dotter direkt unterhalb der Zellen zu injizieren, waren die ersten Analysen im Western Blot ernüchternd (Abb. VII.1).



**Abb. VII. 1: Immunblot von Embryonen, 24 h nach der Injektion mit 1 mM Mo-LAP2**

Morpholino Injektion erfolgte im 1-2 Zellstadium in die Zellen oder den Dotter; A) Immunblot mit LAP2 spezifischen Antikörpern (zLAP2-Serum 1); B) Immunblot mit  $\alpha$ -Tubulin spezifischen Antikörpern (anti  $\alpha$ -Tubulin); Spuren enthalten jeweils die gesamte Proteinmenge eines 24 h alten Embryos, Spur 1-5: injizierte Embryonen; Spur 6+7: nicht injizierte Embryonen; 12% SDS-PAGE; Marker: zeigt Größen von 97, 66, 45, 29 kDa;  $\omega$  Isoform (~84 kDa),  $\beta$  Isoform (~63 kDa),  $\gamma$  Isoform (~45 kDa),  $\alpha$ -Tubulin (~50kDa)

Nur vereinzelt zeigte sich eine Reduktion der Proteinexpression (Abb. VII.1A Spur 1, 3, 5) und in den meisten Fällen war kein Unterschied zu den nicht injizierten Embryonen zu erkennen (Abb. VII.1A Spur 2, 4). Die Beladungskontrolle gegen  $\alpha$ -Tubulin bestätigt jedoch eine ähnliche Proteinmenge in fast allen Spuren (Abb. VII.1B). Aus diesem Grund wurde mit Hilfe des pCS2plus-PolylinkerII (Abb. IX.3; Anhang), der die kodierende Sequenz für das "green fluorescence"-Protein (GFP) enthält, und mit Hilfe des Ambion Transkriptions-Kits, gecappte mRNA des GFPs hergestellt. Durch eine Co-Injektion von Morpholino und GFP-mRNA (100ng/ $\mu$ l) wurde somit nicht nur die Translation des gewünschten Proteins reprimiert, sondern gleichzeitig auch das GFP exprimiert. Der Embryo beginnt unter UV-Anregung zu fluoreszieren (Abb. VII. 2) und kann so für die weiteren Analysen/Aufnahmen identifiziert werden.

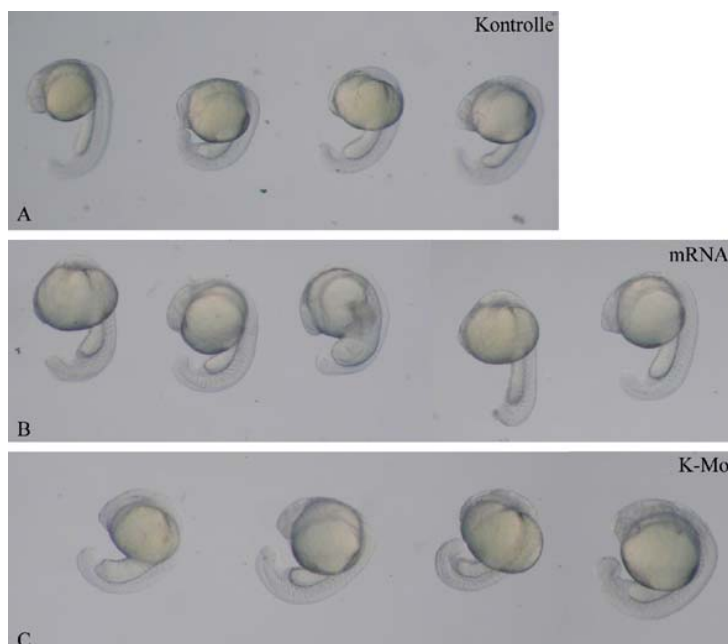


**Abb. VII. 2: 24 h alter Embryo ,der zuvor mit gecappter GFP-mRNA coinjiziert wurde**  
 A) Embryo wurde mit 1mM Mo-Lamin B1, Mo-LaminB2 und 100 ng/μl GFP mRNA injiziert  
 B) Embryo wurde mit 1mM Mo-LAP2 und 100 ng/μl GFP-mRNA injiziert

Trotz der Injektion von gleichen Mengen zeigten die Embryonen im Bezug auf die Fluoreszenz eine unterschiedlich starke Intensität. Es stellte sich heraus, dass bei Embryonen die nur schwach leuchteten kaum eine oder nur eine sehr geringe Repression stattgefunden hat. Daher wurde für die folgenden Analysen die Methode der Co-Injektion beibehalten und die Embryonen nach 24 Stunden in eine stark und eine schwach leuchtende Gruppe aufgeteilt und dementsprechend in Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

### VII. 1. 1. 3. Kontrollen für die phänotypischen Veränderungen der injizierten Embryonen

Da im Folgenden nicht nur die Reduktion der Proteinmengen, sondern auch die phänotypischen Veränderungen der injizierten Embryonen untersucht werden sollen, wurde anfangs überprüft, ob die Injektion eines ‘‘Morpholinos‘‘ oder die Co-Injektion mit GFP-mRNA die Entwicklung der Embryonen beeinträchtigt (Abb. VII.3).



**Abb. VII. 3: Auswirkungen der Injektionen an 24 h alten Zebrafischembryonen**

Embryonen wurden 24 h zuvor A) nicht injiziert (Kontrolle), B) mit 100 ng/μl gecappter GFP-mRNA injiziert (mRNA) oder C) mit 0,75 mM Kontrollmorpholino (K-Mo) + GFP-mRNA injiziert; Embryonen stammen alle aus dem selben Gelege

Abbildung VII.3 zeigt, dass sich die Embryonen, die entweder mit einem Kontrollmorpholino (0,75 mM) und der gecappten mRNA des GFP's (Abb. VII.3C) oder ausschließlich mit der GFP-mRNA (Abb. VII.3B) injiziert wurden nicht gravierend von den nicht injizierten Embryonen unterscheiden (Abb. VII.3A). Innerhalb der drei Varianten (Abb. 3A, B, C) können zwar Unterschiede in der Entwicklungsgeschwindigkeit wahrgenommen werden, diese beruhen jedoch auf individuellen Effekten. Allgemein sei anzumerken, dass injizierte Embryonen eine kleine Entwicklungsverzögerung zu zeigen scheinen.

### VII. 1. 4 Entwicklungsstand eines 48 Stunde alten Zebrafischembryos

48 Stunden nach der Befruchtung sind schon einige Anlagen des Embryos wie Kopf, Augen, Herz, Darm, Schwanz, Rückgrat und Notochord deutlich zu erkennen. Das Notochord kann als transientes, mesodermales „Rückgrat“ bezeichnet werden, welches für die Differenzierung des Nervensystems essentiell ist. Diese Abbildung (VII.4) soll als Orientierung für die späteren phänotypischen Analysen dienen.

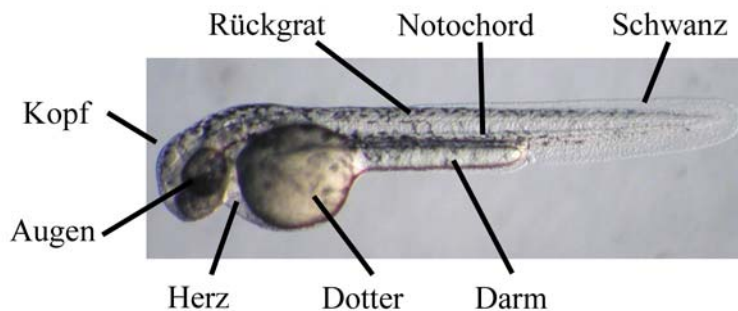
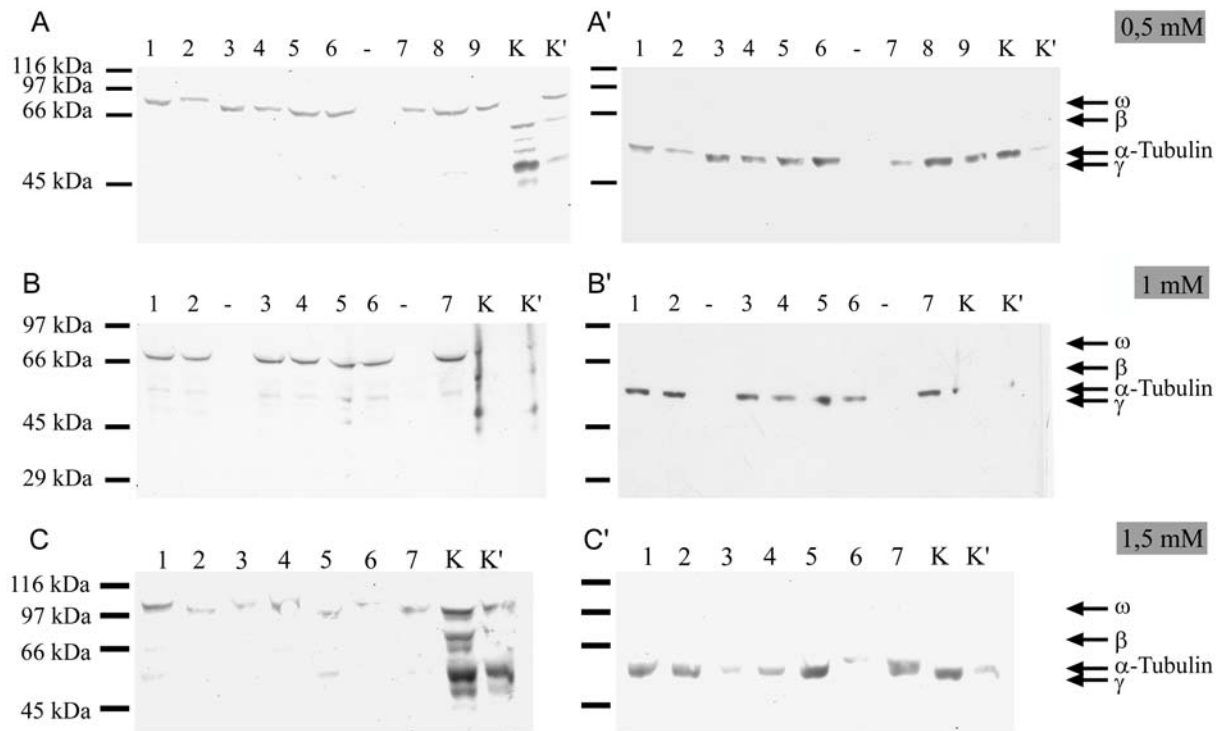


Abb. VII. 4: Phänotyp eines nicht injizierten Zebrafischembryos 48 h nach der Befruchtung

### VII. 1. 2. Reduktion des zLAP2 mit Hilfe des Morpholinos Mo-LAP2

Das Morpholino Mo-LAP2 (Kapitel 3.1.12) trägt im Vergleich zu den anderen hier verwendeten Morpholinos eine Besonderheit. Es ist komplementär zu einem Bereich der LAP2 mRNA die 1 Base vor dem ATG beginnt und 21 bp nach dem ATG endet. Vor der genomischen Analyse des zLAP2 (Kapitel IV.1.1) waren wir der Meinung, dass an Position 5 nach dem ATG ein Thymin kodiert ist, und bestellten das Morpholino dementsprechend. Da sich dies jedoch als Fehler erwies (Kapitel IV.1.1.1.6) enthält das Morpholino Mo-LAP2 eine Fehlpaarung. Trotz dieser Fehlpaarung gelang es bei verschiedenen Injektionen mit unterschiedlich konzentriertem Mo-LAP2 (0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM) die Translation der vorhandenen LAP2 mRNAs zu verhindern (Abb. VII.5).





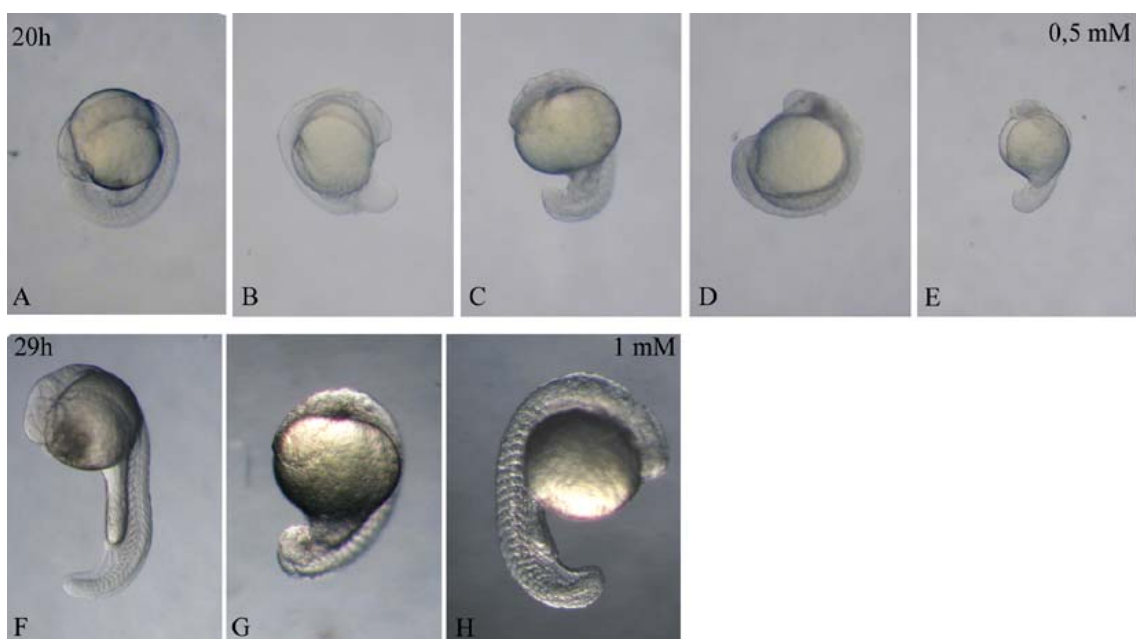
**Abb. VII. 5: Reduktion der LAP2 Expression durch Injektion eines LAP2 spezifischen Morpholinos**

Zebrafisch Embryonen wurden mit 0,5 mM (A, A'), 1 mM (B, B') und 1,5 mM (C, C') Morpholino Mo-LAP2 injiziert und nach 24 h in einem 12% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Spuren 1-9 (A, A') bzw. 1-7 (B, B', C, C') enthalten die gesamten Proteine injizierter Embryonen, Spuren K, K' (A, A', B, B', C, C') enthalten die gesamten Proteine nicht injizierter Embryonen; die Western Blots wurden mit Antikörpern gegen LAP2 (A, B, C) und gegen  $\alpha$ -Tubulin (A', B', C') inkubiert; verwendete Antikörper: zLAP2-1 (A, B, C), anti- $\alpha$ -Tubulin (A', B', C'); Marker: zeigen Größen von 116, 97, 66, 45, 29 kDa;  $\omega$  Isoform (~84 kDa),  $\beta$  Isoform (~63 kDa),  $\gamma$  Isoform (~45 kDa),  $\alpha$ -Tubulin (~55 kDa); Gele (A,B,C) sind nicht gleichmäßig gelaufen, daher stimmen die molekularen Massen oft nicht mit der Erwartung überein, die Kontrollen zeigen jedoch die wildtypische Expression

Abb. VII. 5 zeigt drei Western Blots von Zebrafischembryonen die 24 Stunden zuvor mit 0,5 mM (Abb. VII. 5A, A'), 1 mM (Abb. VII. 5B, B') und 1,5 mM (Abb. VII. 5C, C') Mo-LAP2 injiziert wurden. Die Blots wurden jeweils mit Antikörpern gegen den aminoterminalen Teil des LAP2 inkubiert und sollten somit, zumindest in den Kontrollen die drei Isoformen zLAP2 $\omega$  (~84 kDa), zLAP2 $\beta$  (~63 kDa) und zLAP2 $\gamma$  (~45 kDa) zeigen (vgl. Abb. VII. 1) Leider können die Kontrollspuren (K; Abb. VII.5) bei diesen Blots kaum verwendet werden. Entweder waren die Proteine schon degradiert (Abb. VII. 5C) oder die Homogenisierung war nicht ausreichend (Abb. VII.5B). Nur eine einzige Kontrolle zeigt ausschließlich die erwarteten Banden für die drei LAP2 Isoformen (K'; Abb. VII.5A). Der LAP2 Antikörper detektiert auf allen drei Blots (Abb. VII.5A, B, C) in den beladenen Spuren jeweils eine Bande, die mit ihrem Molekulargewicht zwischen 66 und 97 kDa liegt. Dies entspricht dem Molekulargewicht der größten Isoform (LAP2 $\omega$ ). Auch bei längerer Exposition konnten auf

dem Röntgenfilm keine Banden entdeckt werden, die den anderen Isoformen entsprechen. Anhand der Beladungskontrollen (Abb. VII.5A', B', C') steht ebenfalls fest, dass zumindest bei der Injektion von 0,5 mM und 1 mM gleiche Mengen von Protein in den Spuren vorhanden waren (Abb. VII.5A', B'). Die Beladung des dritten Blots zeigt zwar starke Schwankungen in der Beladungskontrolle (Abb. VII. 5C'), dennoch kann man deutlich erkennen, dass in allen Spuren das LAP2 $\omega$  vorhanden ist (Abb. VII.5C).

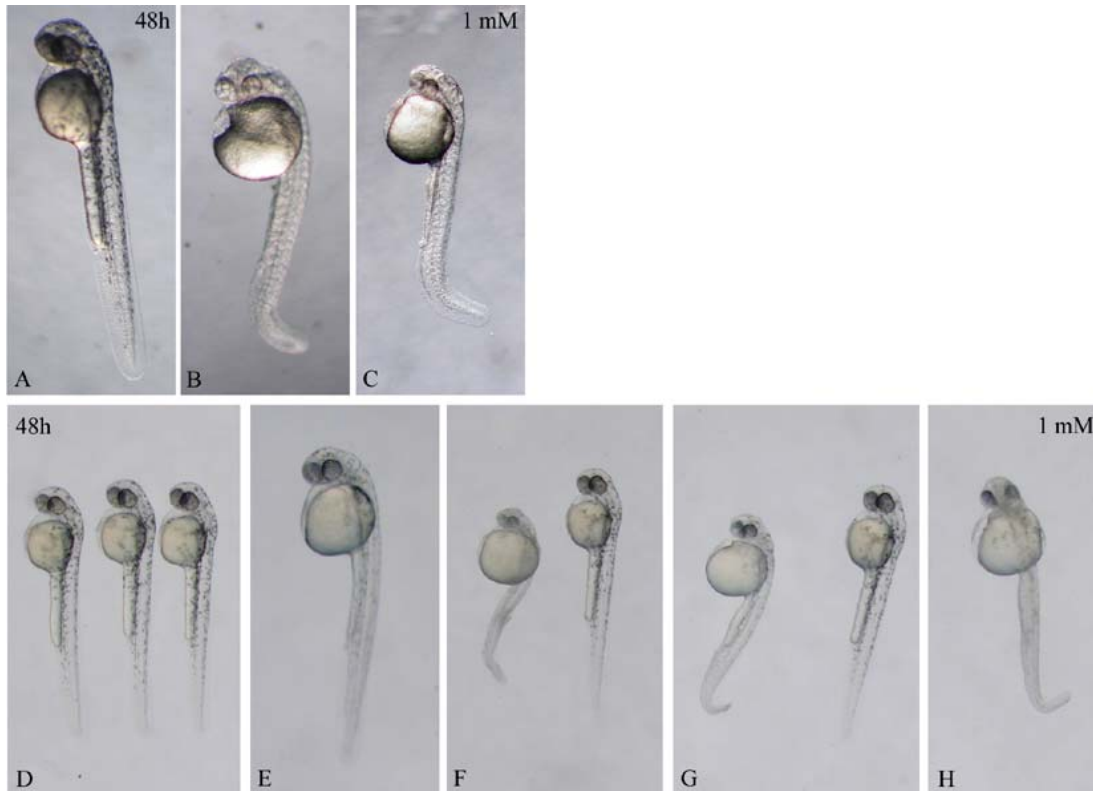
Die Reduktion der LAP Isoformen scheint sich auf die Entwicklung der Embryonen auszuwirken (Abb. VII.6).



**Abb. VII. 6: Zebrafisch Embryonen 20-29 h nach der Injektion mit Morpholino gegen LAP2**  
Embryonen wurden mit 0,5 mM (B-E) und 1 mM (G, H) Mo-LAP2 injiziert und nach 20 h (A-E) bzw. 29 h (F-H) aufgenommen. Nicht injizierte Embryonen (A, F) dienen zur Kontrolle; Embryonen A-E und F-H stammen aus den selben Gelegen

Nach 20-30 Stunden scheinen die mit 0,5 mM (Abb. VII.6B-E) bzw. 1 mM (Abb. VII.6G, H) Mo-LAP2 injiziert Embryonen, eine enormen Entwicklungsverzögerung gegenüber den nicht injizierten Embryonen (Abb. VII.6A, F) zu besitzen. Da diese Verzögerung gravierender ausfällt als bei den Kontrollen aus Abbildung VII.3 kann dies als Effekt der LAP2 Reduktion angesehen werden. Auffällig ist, dass die Bildung der Kopfregion, der Augen und des Schwanzes nicht nur verlangsamt sondern auch fehlerhaft erscheint.

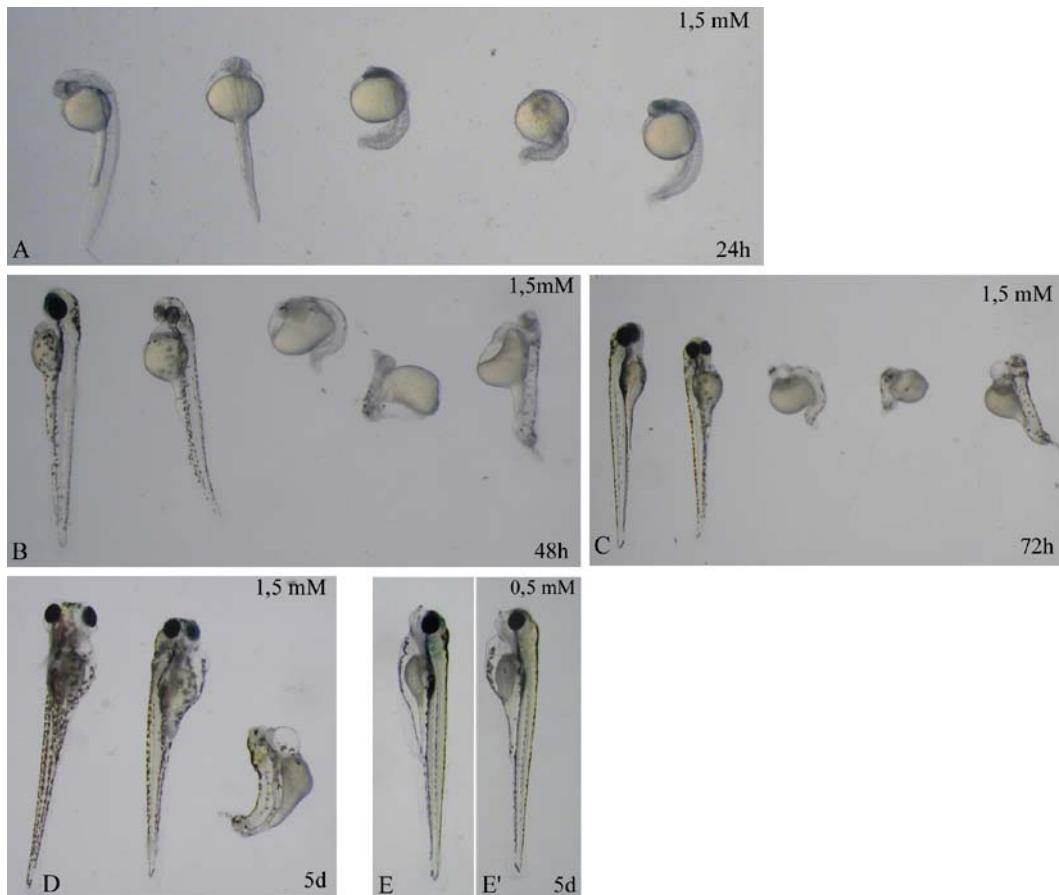
Diese morphologischen Veränderungen können nach 48 Stunden noch besser beschrieben werden (Abb. VII.7).



**Abb. VII. 7: Zebrafisch Embryonen 48 h nach der Injektion mit Morpholino gegen LAP2**  
 Embryonen wurden mit 1 mM (B, C, E, F, G, H) Mo-LAP2 injiziert und nach 48 h (A-H) aufgenommen. Nicht injizierte Embryonen (A, D, sowie rechter Embryo in F und G) dienen zur Kontrolle; Embryonen (A-C) und (D-H) stammen aus den selben Gelegen

Die zwei Embryonen aus Abbildung 6G und 6H wurden nach 48 Stunden erneut untersucht (Abb. VII.7B, C) und mit Embryonen aus einer weiteren Injektion mit 1 mM Mo-LAP2 (Abb. VII.7 F-H) verglichen. Die Größe und Entwicklung des Kopfes lassen Vermutungen zu, dass die Entwicklung des Gehirns ebenso wie die der Augen in Mitleidenschaft gezogen wurden. Die Augen sind etwas kleiner und nicht so stark pigmentiert wie bei den Kontrollembryonen (Abb. VII.7A, D) was für eine fehlerhafte Entwicklung spricht. Das Rückgrat erscheint in den vorderen Segmenten leicht gebogen und endet häufig in einer abgeknickten Schwanzspitze. Diese extreme Fehlstellung des Schwanzes ist jedoch nicht bei allen Embryonen zu erkennen (Abb. VII.7F). Anhand von Abbildung VII.7G und 7H, auf denen ein injizierter Embryo (links) direkt neben einem nicht injizierten Embryo (rechts) liegt, wird auch deutlich, dass nicht nur die Ausbildung bestimmter Regionen sondern auch die Größe der Embryonen reduziert wird.

Bei einer Injektionsstudie mit 1,5 mM Mo-LAP2 wurden 4 von 6 gut leuchtenden Embryonen über einen Zeitraum von 5 Tagen beobachtet (Abb. VII.8).



**Abb. VII.8: Zebrafischembryonen mit anfänglich reduzierter LAP2-Expression**

Zebrafischembryonen wurden mit 1,5 mM (A-D) bzw. 0,5 mM (E') Mo-LAP2 injiziert. Aufnahmen der selben Embryonen nach 24 h (A), 48 h (B), 72 h (C), 5 Tagen (5d; D); nicht injizierte Kontrolle: (linker Embryo in A, B, C, D und E); Embryonen in E und E' aus dem selben Gelege, Aufnahmen nach 5 Tagen

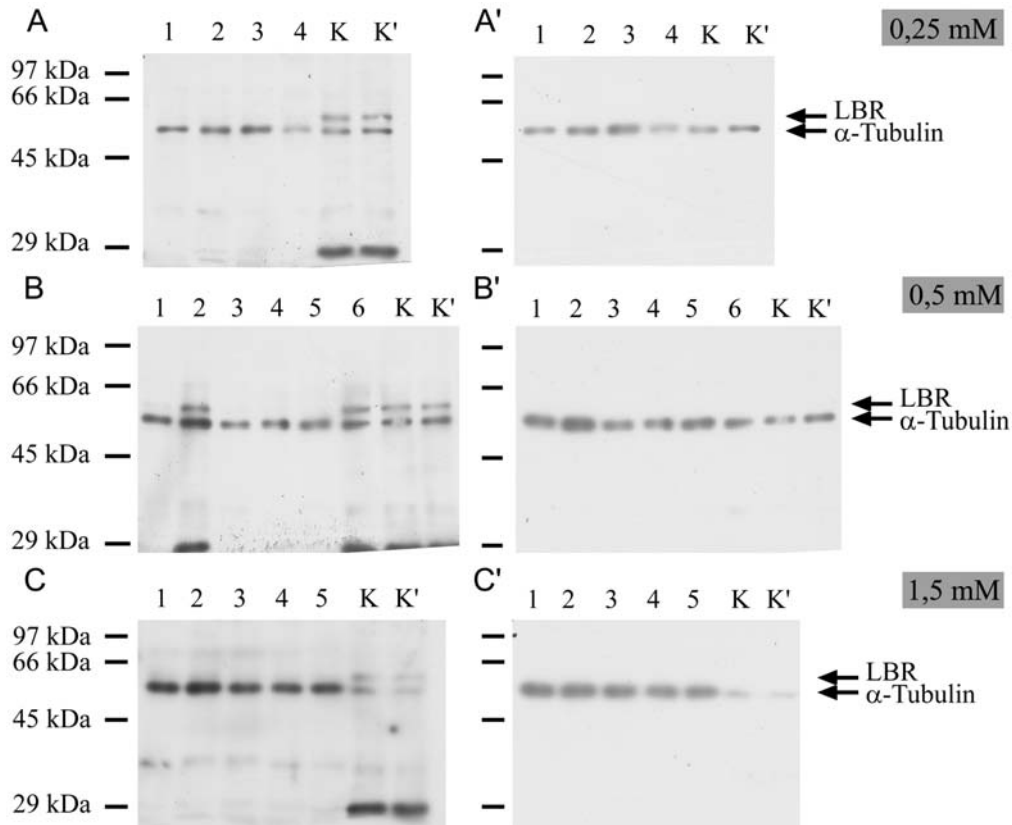
Vergleichbar mit zuvor injizierten Embryonen (Abb. VII.6, 7) ist auch bei der Injektion mit 1,5 mM Mo-LAP2 nach 24 Stunden eine verzögerte Entwicklung zu erkennen (Abb. VII.8A; linker Embryo: Kontrolle). Obwohl bei der Untersuchung 24-29 Stunden nach der Injektion nur geringfügige Unterschiede zu Embryonen festgestellt werden können, die mit einer geringeren Konzentration injiziert wurden (vgl. Abb.VII.6 mit VII.8A), so zeigt sich der Effekt um so drastischer nach 48 Stunden (vgl. Abb.VII.7 mit VII.8B). Während bei einem der Embryonen nur eine leichte Deformation des Schwanzes und eine kleine Ausbildung des Kopfes und der Augen zu erkennen ist (Abb.VII.8.2. Embryo von links), zeigen die drei anderen Embryonen eine enorme Veränderung in ihrer Körperform. Der Körper erscheint stark reduziert und gleichzeitig dorsalisiert. Weder Augen noch Kopf wurden gebildet und auch die Anlage des Darms und des Schwanzes sind nicht, oder nur teilweise erfolgt (Abb. VII.8B 3., 4., 5. Embryo von links). Nach 72 Stunden sind bei allen Embryonen immer noch Herzschläge zu beobachten. Bei Embryo 2 und 5 (Abb. VII.8C; 2. und 5. Embryo von links) bildet sich eine Blase im Bereich des Herzens, die bei Embryo 2 nicht so stark ausgeprägt ist

wie bei Embryo 5. Innerhalb der folgenden 2 Tage sind zwei der sehr stark beeinträchtigten Embryonen gestorben. Bei den verbleibenden injizierten Embryonen (Abb. VII. 8D, 2. und 3. Embryo) ist die Blase in der Herzregion angeschwollen. Der mittlere Embryo zeigt im Gegensatz zu der nicht injizierten Kontrolle (Abb. VII.8D, linker Embryo) eine wesentlich geringere Ausbildung des Kopfes, wodurch die Augen näher beieinander zu stehen scheinen. Ein 5 Tage alter Embryo, der mit 0,5 mM Mo-LAP2 injiziert wurde (Abb. VII.8E') zeigt im Vergleich zu einem Kontrollembryo (Abb. VII.8E') keine größeren Unterschiede. Dennoch ist auch hier ein schwächer ausgeprägter Kopf sowie eine Blase im Bereich des Herzens zu erkennen.

Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass sich der Verlust der LAP2 $\beta$  und  $\gamma$  Isoform innerhalb der ersten 24 Stunden sowohl auf die Entwicklungsgeschwindigkeit als auch auf die Ausbildung von Kopf und Schwanz auswirkt.

### VII. 1. 3. Reduktion des LBR

Durch die Identifikation des Zebrafisch LBRs und die selbst hergestellten polyklonalen Antikörper (Kapitel V.1.6) konnte ebenfalls eine Untersuchung an Zebrafischembryonen erfolgen, die sich mit der Reduktion des zLBR beschäftigt. Das zur Reduktion verwendete Morpholino Mo-LBR ist 25 "Nukleotide" lang und beginnt sich 13 bp vor dem Startcodon an die mRNA anzulagern. Die Injektion mit drei verschiedenen Konzentrationen (0,25 mM, 0,5 mM, 1,5 mM), sowie die anschließenden Auswertungen der Embryonen, erfolgte nach dem oben beschriebenen Prinzip. Durch eine Auftrennung der injizierten Embryonen in einer SDS-PAGE, mit anschließender Antikörperinkubation gegen zLBR bzw.  $\alpha$ -Tubulin, konnten Aussagen über die Reduktion getroffen werden (Abb. VII.9).



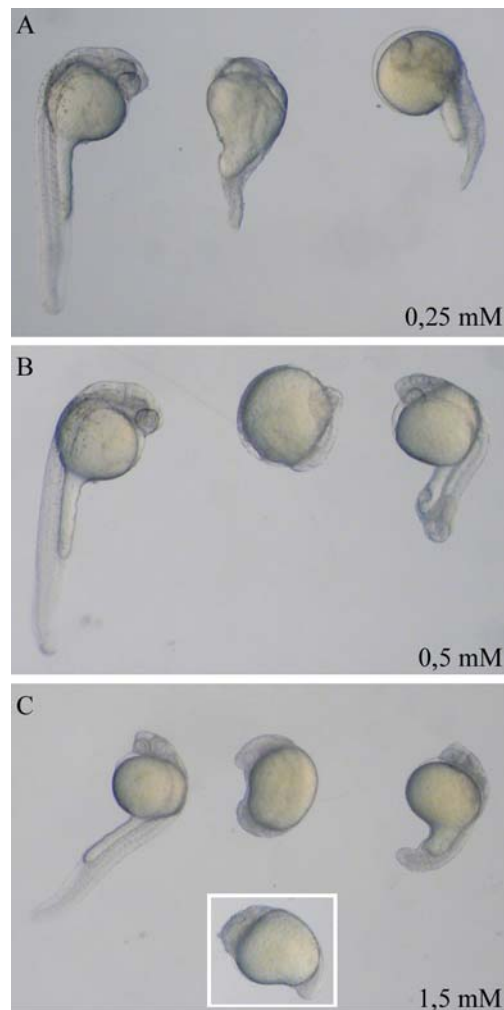
**Abb. VII. 9: Western Blot Analyse von 24 h alten Zebrafischembryonen, die mit Mo-LBR injiziert wurden**

Embryonen wurden mit 0,25 mM (A, A'; Spur: 1-4), 0,5 mM (B, B'; Spur: 1-6) und 1,5 mM (C, C'; Spur: 1-5) Mo-LBR injiziert und nach 24 h in einem 12% Polyacrylamidgel aufgetrennt; K, K': nicht injizierte Embryonen; Antikörperinkubation des Western Blots mit Serum D gegen zLBR (A, B, C) und  $\alpha$ -Tubulin (A', B', C'); Blots wurden nach Inkubation gegen  $\alpha$ -Tubulin nur mit 1x TBST gewaschen, daher sind bei der Inkubation mit Serum D noch die Signale des  $\alpha$ -Tubulins zu erkennen; LBR (63 kDa),  $\alpha$ -Tubulin (~55 kDa), Marker: zeigt 97, 66, 45 und 29 kDa

Die zur Beladungskontrolle durchgeführte Antikörperinkubation gegen das  $\alpha$ -Tubulin (Abb. VII.9A', B', C') belegt die gleichmäßige Beladung fast aller Spuren. Im Falle der 0,25 mM Injektion scheint beim Auftragen der Kontrollen (K, K': Abb. VII.9A, A') ein Teil der Proteinmenge verlorengegangen zu sein, was sich an der Stärke der Bande bemerkbar macht. Für die Detektion des zLBRs wurde auf Serum D zurückgegriffen, da es beim Antikörpertest mit Zebrafischembryonen ein deutlicheres Signal zeigte als Serum B (Abb. V.12; Kapitel V.1.8). Bei der Analyse dieser Western Blots zeigt die Inkubation mit Serum D in allen Kontrollspuren (K, K': Abb. VII.9A, B, C) eine deutliche Reaktion mit einem Polypeptid von 58-60 kDa. Bei der Injektion von 1,5 mM Mo-LBR (Abb. VII.9C, Spur 1-5) ist die Expression des LBRs genauso wie bei der Injektion von 0,5 mM (Abb. VII.9C, Spur 1, 3, 4, 5) oder 0,25 mM (Abb. VII.9C, Spur 1-4) reduziert.

Die phänotypischen Auswirkungen der Mo-LBR Injektion wurden ebenfalls untersucht. Hierfür wurde wiederum das Mo-LBR in den Konzentrationen 0,25 mM, 0,5 mM und 1,5 mM in die Embryonen injiziert.

Die für Immunblots (Abb. VII.9) verwendeten Embryonen zeigten nach 20-24 Stunden, bis auf eine Entwicklungsverzögerung, kaum gravierende Unterschiede zu den Kontrollen. Weitere Injektionen, bei denen die Tiere über einen Zeitraum von 4 Tagen beobachtet wurden, zeigten jedoch einige Entwicklungsstörungen.



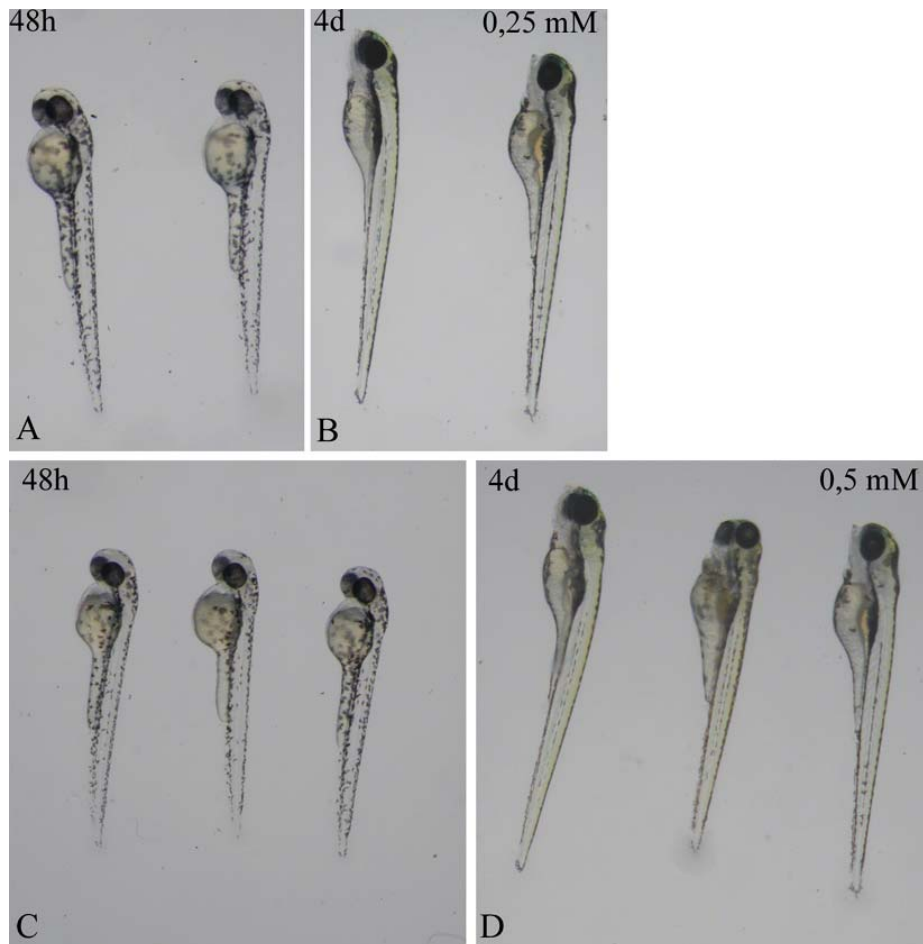
**Abb. VII. 10: Phänotypische Auswirkung einer Morpholino Injektion gegen den LBR nach 30 h**

Embryonen wurden mit 0,25 mM (A), 0,5 mM (B) und 1,5 mM (C) Mo-LBR injiziert und nach ~ 30 h fotografiert. Linker Embryo: nicht injizierte Kontrolle

Nach ungefähr 30 Stunden konnte bei den Embryonen, mit reprimierter LBR Expression neben einer verzögerten Entwicklung auch eine fehlerhafte Entwicklung des Kopfes und eine auffällige Krümmung des Rückgrats (Abb. VII.10A, B, C; linker Embryo: nicht injizierte Kontrolle) beobachtet werden. Mit zunehmender Konzentration des injizierten Morpholinos scheint die verlangsamte Entwicklung zuzunehmen. Embryonen die nach der Injektion eine



starke Fluoreszenz zeigten, wurden meist für die Western Blot Analyse verwendet oder starben innerhalb der ersten 48 Stunden (3-4 untersuchte Embryonen). Embryonen die unter UV-Anregung weniger stark leuchteten und somit wohl keine komplette Reduktion des LBRs besaßen, erschienen phänotypisch fast wildtypisch und zeigten auch keine lebensbedrohlichen Entwicklungsstörungen (Abb. VII.11).



**Abb. VII.11: 2-4 Tage alte, mit Mo-LBR injizierte, Zebrafischembryonen**

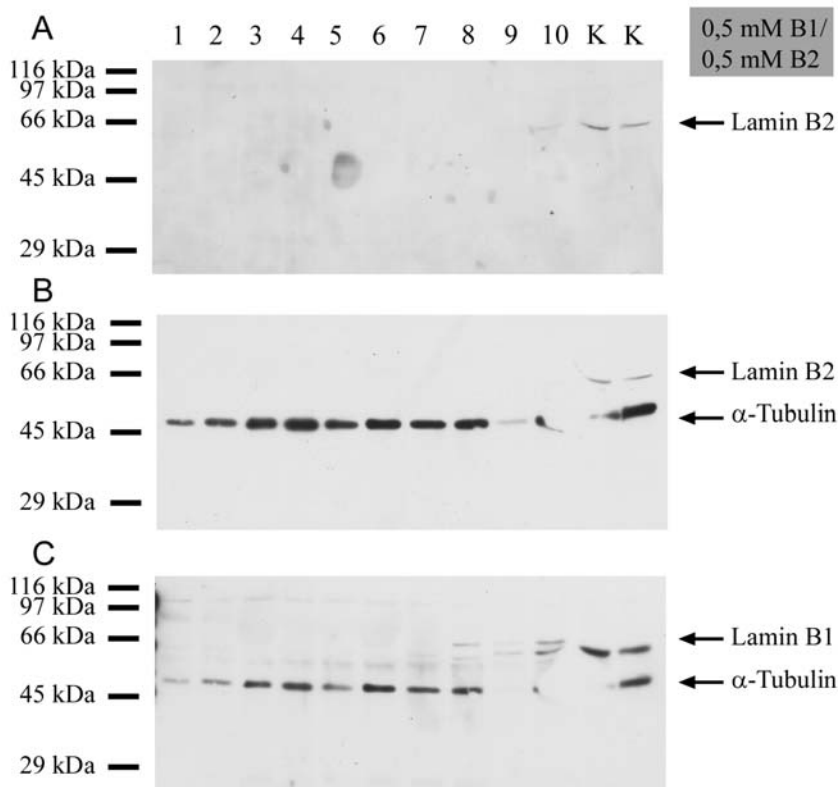
Embryonen wurden mit 0,25 mM (A, B) und 0,5 mM (C, D) Mo-LBR injiziert und nach 48 h (A, C) und 4 Tagen (B, D) aufgenommen. Embryonen aus A, B und C, D identisch; linker Embryo: Kontrolle (A, B, C, D); Tiere fast wildtypisch, wahrscheinlich aufgrund einer unvollständigen Reduktion des LBRs

Die Western Blot Analysen belegten eindeutig eine reprimierte LBR Expression durch die Injektion des LBR spezifischen Morpholinos (Mo-LBR). Die Auswirkungen auf die Embryonen scheinen sehr stark von der Menge des injizierten Morpholinos abzuhängen. Bei einer starken Fluoreszenz und somit starken Repression vermitteln diese Ergebnisse eine erhöhte Letalität. Die Injektion einer geringen Menge oder einer nicht exakten Injektion kann jedoch auch zu fast wildtypischen Embryonen führen.



### VII. 1. 4. Reduktion der Lamine B1 und B2

Da den Laminen eine Reihe von wichtigen Funktionen zugesprochen wird, sollte überprüft werden, ob die Reduktion der B-Typ Lamine durch die Repression von Lamin B1 und B2, Auswirkungen auf die Entwicklung der Zebrafischembryonen hat. Deshalb wurden zwei Morpholinos (Mo-zLamin B1; Mo-zLamin B2) zusammen mit der mRNA des GFPs coinjiziert. Die Morpholinos sollen sowohl die Expression des Lamin B2 (Mo-Lamin B2) als auch die Expression von Lamin B1 (Mo-Lamin B1) reprimieren. Die verwendeten Konzentrationen von 0,5 mM und 1 mM beziehen sich jeweils auf beide Morpholinos. Die anschließende Reduktionsanalyse mit Hilfe eines Immunblots erfolgte 24 Stunden nach der Injektion. Hierfür wurden die Blots mit drei verschiedenen Antikörpern gegen Lamin B2 (155-8),  $\alpha$ -Tubulin (anti  $\alpha$ -Tubulin) und Lamin B1 (L<sub>1</sub>H/B) inkubiert (Abb. VII.12 und Abb. VII.13).

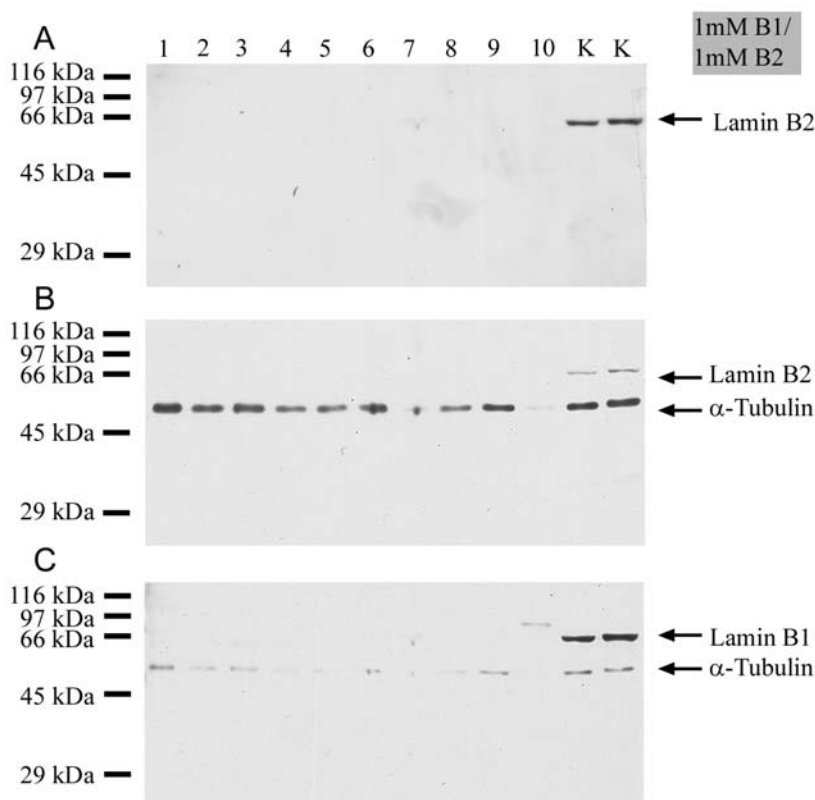


**Abb. VII. 12: Reduktion des Lamin B1 und Lamin B2 durch Injektion spezifischer Morpholinos**

Embryonen wurden mit einer Mischung aus Mo-Lamin B1 und Mo-Lamin B2 mit einer jeweiligen Konzentration von 0,5 mM injiziert. Auftrennung der gesamten Proteine von Embryonen 24 h nach der Injektion in einem 12% Polyacrylamidgel; Spuren 1-10: injizierte Embryonen, Spuren K, K': nicht injizierte Embryonen; Antikörperinkubation des Western Blots gegen Lamin B2 (A),  $\alpha$ -Tubulin (B) und Lamin B1 (C), verwendete Antikörper: 155-8 (A), anti  $\alpha$ -Tubulin (B), L<sub>1</sub>H/B (C), Marker: zeigt 116, 97, 66, 45 und 29 kDa; Lamin B1 (~66 kDa), Lamin B2 (~66 kDa),  $\alpha$ -Tubulin (~55 kDa); Inkubation erfolgte zuerst gegen Lamin B2, dann gegen  $\alpha$ -Tubulin und letztlich gegen Lamin B1, zwischen den jeweiligen Inkubationen wurden die Blots für 2 h in 1x TBST gewaschen und über Nacht bei 4°C in 5% Milch (in 1x TBST) inkubiert. Gel ist etwas ungleichmäßig gelaufen (vgl. Spur 1 mit K)

Die Co-Injektion der 0,5 mM konzentrierten Morpholinos zeigt eine deutliche Reduktion der Lamin Expression (Abb. VII.12A, C). Der Antikörper gegen Lamin B2 erkennt in den Kontrollspuren (K, K'; Abb. VII.12A) ein Protein mit einem Molekulargewicht von ~66 kDa. In den übrigen Spuren (1-10) können dagegen keine Signale detektiert werden. Die anschließende Beladungskontrolle (Abb. VII.12B) belegt eine vergleichbare Proteinmenge in Spur 2-7 und Spur K'. Während in Spur 1 etwas weniger Gesamtprotein enthalten ist, erscheinen Spur 9, 10 und K bei der Inkubation mit anti  $\alpha$ -Tubulin kein Protein zu enthalten. Dies ist jedoch eher auf einen Fehler beim ECL-Nachweis, zum Beispiel durch Luftblasen beim Transfer der Nitrocellulose, zurückzuführen, denn die Inkubation mit Antikörpern gegen die Lamine zeigten zumindest in Spur K eine vergleichbare Proteinmenge zur 2. Kontrolle (vgl. Spur K und K' in Abb. VII.12A bzw. C). Mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen Lamin B1, konnte ebenfalls eine Reduktion der Expression bei injizierten Embryonen nachgewiesen werden (Spur 1-7 Abb. VII.12). In den Kontrollen ist ein Signal bei 66 kDa deutlich zu erkennen (K, K'; Abb. VII.12C).

Bei einer Injektion mit der doppelten Menge an Morpholinos (1 mM) wird ein vergleichbares Ergebnis erzielt (Abb. VII. 13).



**Abb. VII. 13: Reduktion des Lamin B1 und Lamin B2 durch Injektion spezifischer Morpholinos**

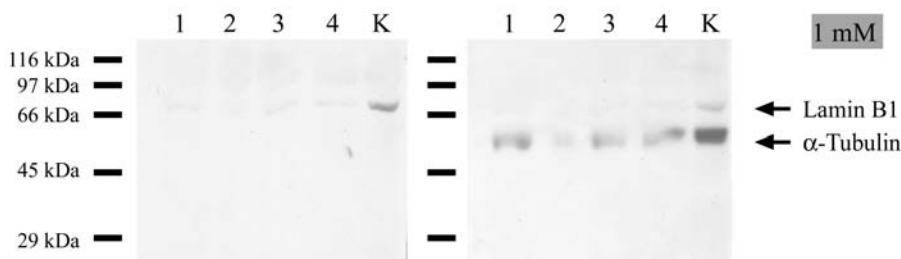
Embryonen wurden mit einer Mischung aus Mo-Lamin B1 und Mo-Lamin B2 mit einer jeweiligen Konzentration von 1 mM injiziert. Auftrennung der Embryonen 24 h nach der Injektion in einem

## VII. Morpholino Injektionen

12% SDS-PAGE; Spuren 1-10: injizierte Embryonen, Spuren K, K': nicht injizierte Embryonen; Antikörperinkubation des Western Blots gegen Lamin B2 (A),  $\alpha$ -Tubulin (B) und Lamin B1 (C), verwendete Antikörper: 155-8 (A), anti  $\alpha$ -Tubulin (B), L<sub>H/B</sub> (C), Marker: zeigt 116, 97, 66, 45 und 29 kDa; Lamin B1 (~66 kDa), Lamin B2 (~66 kDa),  $\alpha$ -Tubulin (~55 kDa); Inkubation erfolgte zuerst gegen Lamin B2, dann gegen  $\alpha$ -Tubulin und letztlich gegen Lamin B1, zwischen den jeweiligen Inkubationen wurden die Blots für 2 h in 1x TBST gewaschen und über Nacht bei 4°C in 5% Milch (in 1x TBST) geblockt

Die Beladung der einzelnen Spuren erscheint, bis auf Spur 7 und 10 gleichmäßig und vergleichbar mit den Kontrollen (Abb. VII. 13B). Die Antikörper gegen Lamin B2 bzw. Lamin B1 detektieren nur in den Kontrollspuren Proteine mit einem Molekulargewicht von 66 kDa (K, K'; Abb. VII.13A, C). Der Antikörper L<sub>H/B</sub> erkennt in Spur 9 ein weiteres Signal bei 97 kDa (Abb. VII.13 C). Dies scheint jedoch eher auf ein Aggregat oder ein unregelmäßiges Laufverhalten in Spur 9 zurückzuführen zu sein.

Bei den vorhergegangenen Analysen (Abb. VII.12 bzw. 13) besteht die Möglichkeit, dass der Antikörper gegen Lamin B1 eventuell auch mit dem Lamin B2 oder mit dem zuvor verwendeten Antikörper gegen Lamin B2 reagiert. Um auszuschließen, dass die Ergebnisse aus Abbildung VII. 12C bzw. 13C falsch interpretiert wurden, wurde in einem weiteren Versuch nur das Lamin B1 durch die Injektion von 1 mM Mo-Lamin B1 reprimiert (Abb. VII.14).



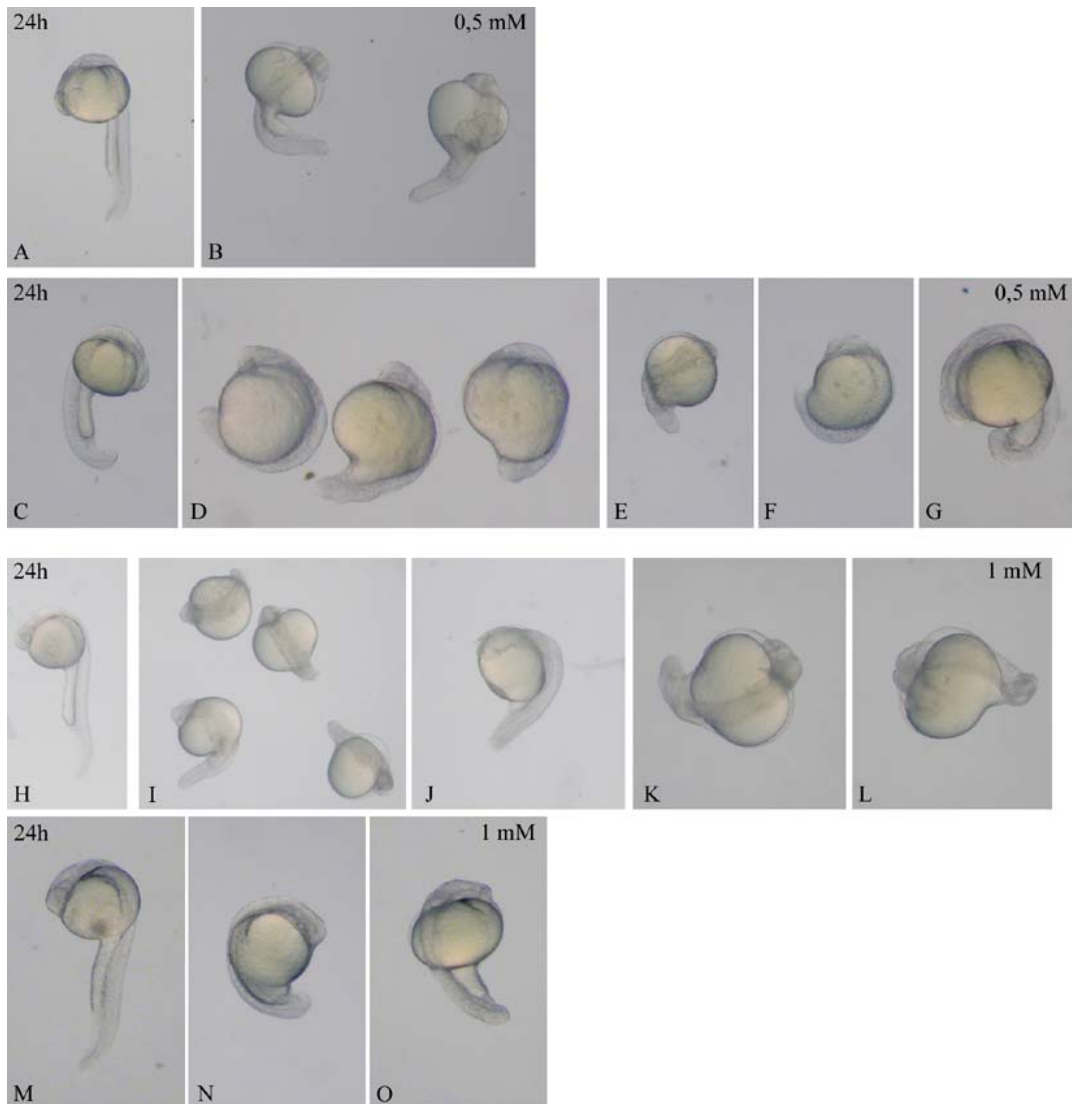
**Abb. VII. 14: Reduktion des Lamin B1 durch Injektion des Morpholinos Mo-Lamin B1**

Injektionsmenge: 1 mM Mo-Lamin B1, Spur 1-4: injizierte Embryonen, Spur K: nicht injizierter Embryo; Auftrennung in einer 12% SDS-PAGE 24 h nach der Injektion; Inkubation mit Antikörpern gegen Lamin B1 (A) und  $\alpha$ -Tubulin (A'); verwendete Antikörper: L<sub>H/B</sub> (A), anti  $\alpha$ -Tubulin (B); Marker: zeigt 116, 97, 66, 45 und 29 kDa; Lamin B1 (~66 kDa),  $\alpha$ -Tubulin (~55 kDa)

Der mit dem Antikörper L<sub>H/B</sub> inkubierte Western Blot (Abb. VII.14A) erkennt in der Kontrollspur (K) ein eindeutiges Signal bei 66 kDa während in den übrigen Spuren (1-4) kein Signal auftritt. Aufgrund der Beladungskontrolle (Abb. VII.14B), die in den Spuren 1, 3, 4 und K eine deutliche Menge an  $\alpha$ -Tubulin zeigt, können 2 Schlussfolgerungen gezogen werden. Zum einen, dass die Injektion von Mo-Lamin B1 die Expression des Lamin B1 reprimiert und zum anderen, dass die verwendeten Antikörper gegen Lamin B1 kein Lamin B2 erkennen. Das bedeutet, dass selbst wenn die beiden Laminantikörper sich gegenseitig

beeinflussen, die Reduktion des Lamin B1 bei der Co-Injektion beider Lamin Morpholinos (Abb. VII.12C bzw.13C) erfolgt ist.

Die Reduktion der B-Typ Lamine durch eine Co-Injektion von Mo-LaminB1 und Mo-Lamin B2 hat ebenfalls Auswirkungen auf die Entwicklung der Embryonen.



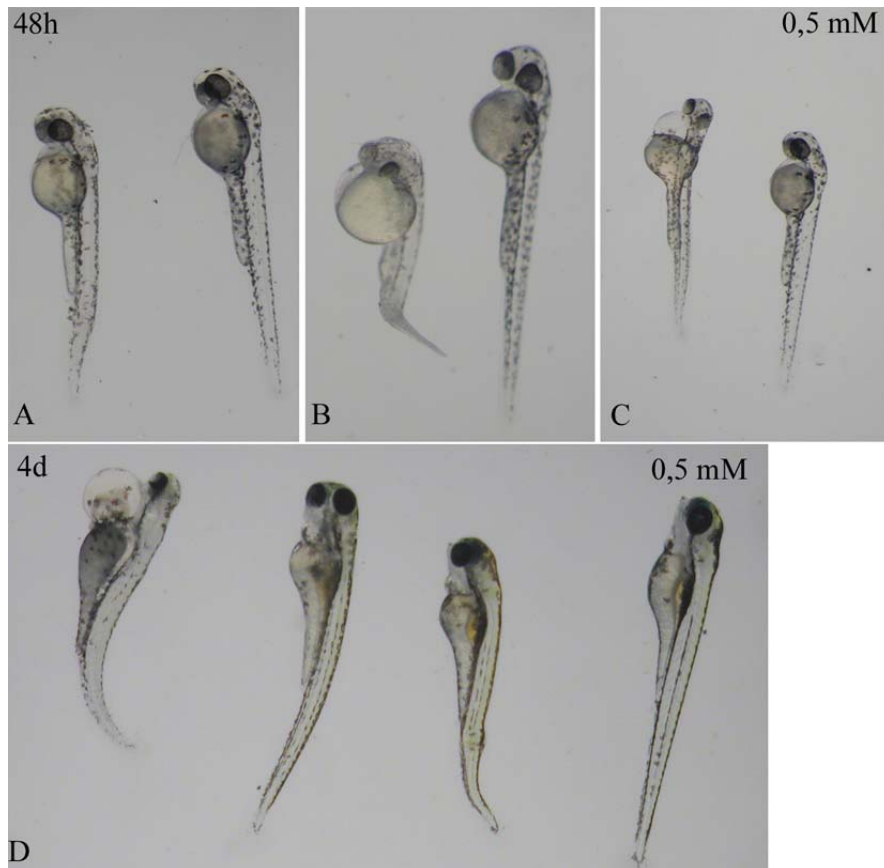
**Abb. VII. 15: Phänotypische Auswirkungen nach dem Verlust der B-Typ Lamine**

Embryonen wurden mit 0,5 mM (B, D-G) bzw. 1 mM (I-L, N, O) Mo-Lamin B1 und Mo-Lamin B2 coinjiziert. Kontrollembryonen (A, C, H, M). Aus einem Gelege stammende Embryonen: (A, B), (C-G), (H-L), (M-O); Aufnahmen nach ~ 30 h

Die injizierten Embryonen zeigen nach 30 Stunden im Vergleich zu den nicht injizierten Embryonen (Abb. VII.15A, C, H, M) aus dem selben Gelege eine deutliche verzögerte Entwicklung (Abb. VII.15). Während die Anlagen von Kopf und Augen in diesem Stadium noch keine Auffälligkeiten zeigen, scheint die Ausbildung des Rückgrats und des Schwanzes in machen Fällen etwas beeinträchtigt zu sein (Abb. VII.15B, E, K). Dieses Ergebnis ist

sowohl bei den Embryonen zu finden, die mit 0,5 mM (Abb. VII.15B, D-G) als auch bei denen, die mit 1 mM (Abb. VII.15I-L, N,O) behandelt wurden. Eine Verstärkung von phänotypischen Effekten ist in diesem Fall nicht zu erkennen.

Einige mit 0,5 mM Morpholino injizierte Embryonen, die für 4 Tage bei 26°C gehalten wurden, zeigten unterschiedliche Veränderungen (Abb. VII.16).



**Abb. VII. 16: 2-4 Tage alte Zebrafisch Embryonen nach einer Repression der B-Typ Lamine**  
Embryonen wurden mit 0,5 mM Mo-Lamin B1 und Mo-Lamin B2 injiziert und nach 48 h (A B, C) und 4 Tagen (D) aufgenommen; rechter Embryo: nicht injizierte Kontrolle; linke(r) Embryo/nen: injizierte Embryonen

Nach 48 Stunden kann bei den Embryonen eine Deformation des Rückgrats festgestellt werden. Diese äußert sich entweder in einem Abknicken des Schwanzes (Abb. VII.16A, B, C) oder einem “Anheben“ des Kopfes (Abb. VII.16C, D). Das Anheben des Kopfes kann in diesem Fall aber auch auf der Ausbildung der Blase im Bereich des Herzens beruhen. Nach 4 Tagen leben von den 5 untersuchten Embryonen noch 3, die alle eine unterschiedliche Veränderung zeigen (Abb. VII.16; rechter Embryo nicht injizierte Kontrolle). Zum Einen zeigen 2 Embryonen eine deutliche Reduktion in der Größe. Das Rückgrat aller drei injizierten Embryonen ist auffällig gebogen und die Kopfform ist rundlicher als die der Kontrolle. Dies kann aber auch durch die etwas breitere Ausbildung der Herzregion so erscheinen.

Somit scheint die Reduktion von zwei relativ essentiellen Proteinen zwar die Entwicklung der Embryonen zu beeinflussen, aber ob dies auch die Letalität innerhalb der ersten 4 Tage erhöht kann noch nicht beantwortet werden.

## VII.2. Diskussion

### **Reduktion integraler Membranproteine und B-Typ Lamine durch Morpholinos**

Mit Hilfe verschiedener Morpholinos sollte untersucht werden, inwieweit es möglich ist integrale Membranproteine, wie die LAP2s und den LBR, sowie die essentiellen B-Typ Lamine, Lamin B1 und Lamin B2, zu reprimieren. Dadurch sollte versucht werden einen Einblick insbesondere in die Funktion von integralen Membranproteinen der inneren Kernmembran zu bekommen. Da RNA-Interferenz-Experimente an Kulturzellen von Vertebraten keinen Phänotyp, zum Beispiel nach der Herunterregulierung des LAP2, ergeben hatten (Haborth et al., 2001) sollte die Funktionsanalyse im vielzelligen Organismus durchgeführt werden. Es sollten insbesondere die phänotypischen Auswirkungen beobachtet werden. Die vier verwendeten Morpholinos (Mo-LAP2, Mo-LBR, Mo-Lamin B1, Mo-Lamin B2) waren alle in der Lage die Expression der entsprechenden Proteine innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Injektion zu verhindern (Abb. VII.5, 9, 12). Dieser Verlust zeigte bei den Embryonen unterschiedlich starke Effekte. Obwohl bekannt ist, dass die Injektion an sich zu einer leichten Entwicklungsverzögerung führt, waren die Verzögerungen nach der Injektion der Morpholinos (0,5 mM) wesentlich drastischer als bei der Injektion von Kontrollmorpholinos (0,75 mM) oder reiner mRNA eines GFPs (vgl. Abb. VII.6, 10, 15 mit Abb. VII.3). Vor dem Hintergrund, dass die Reduktion dieser Proteine die Kernorganisation oder die Stabilität des Kernes beeinflussen, ist diese Verzögerung nicht verwunderlich.

Neben dieser Entwicklungsverzögerung schien sich die Repression von Lamin B1 und B2 mit Hilfe der Morpholinos (Mo-Lamin B1, Mo-Lamin B2) innerhalb der ersten 24 Stunden kaum auf die Embryonen auszuwirken. Zum Teil entstand der Eindruck, dass die Schwanzregion etwas in Mitleidenschaft gezogen wurde, aber im Bereich des Kopfes wurden, im Vergleich zu nicht injizierten Embryonen, keine Unterschiede festgestellt (Abb. VII.15). Dies bestätigen auch Aufnahmen von späteren Entwicklungsstufen (Abb. VII.16). Leider konnten nur Embryonen über einen längeren Zeitraum beobachtet werden, die mit einer geringen Menge an Mo-Lamin B1 und Mo-Lamin B2 (je 0,5 mM) injiziert wurden. Aber schon bei diesen Konzentrationen ist eine Deformation der Schwanz- und der Herzregion festzustellen, während der Kopf immer noch mit dem der nicht injizierten Embryonen vergleichbar zu sein scheint. Das jedoch ein so geringer Effekt bei der Reduktion von zwei, als essentiell bekannten Proteinen, auftritt, kann mit der Existenz eines weiteren B-Typ Lamins, dem

Lamin LIII, erklärt werden. Das Lamin LIII wurde zuerst in *Xenopus* beschrieben und ist das einzige Lamin, das in den Oocyten, den Eiern oder den ersten Entwicklungsstufen des *Xenopus* zu finden ist (Stick and Krohne et al., 1982; Benavente et al., 1985). Im Zebrafisch wurde ebenfalls ein Lamin LIII identifiziert, das nicht nur strukturell sondern auch im Expressionsverhalten mit dem des *Xenopus* vergleichbar ist (Hofemeister et al., 2002). Die Entwicklung von Amphibien und Zebrafischen ähnelt sich in bezug auf ihre Oogenese und die ersten Entwicklungsstufen (Kane, 1999). So zeichnen sich zum Beispiel *Xenopus* und Zebrafisch durch eine schnelle Zellteilung in der frühen Embryonalentwicklung aus, in der keine Transkription stattfindet. Dennoch sind für das Wachstum genügend Proteine vorhanden, die entweder als maternale Proteine oder als maternale RNA in den Eiern vererbt wurden (Hausen et al., 1985). Im Zebrafisch beginnt die Transkription der mRNA ungefähr im mittleren Blastulastadium. Bis dahin müssen alle Abläufe durch die Translation der maternalen RNAs oder die vorhandenen Proteine abgedeckt sein. Das Lamin LIII scheint im Zebrafisch bis zur späten Gastrulation die funktionellen Aufgaben der B-Typ Lamine zu übernehmen, denn erst zu diesem Zeitpunkt ist die Transkription des essentiellen Lamins B2 immunologisch nachzuweisen (Schoft et al., 2003). Die Repression der B-Typ Lamine B2 und Lamin B1, mit Hilfe der Morpholinos, beginnt also erst am Ende der Gastrulation, während noch genügend Mengen von Lamin LIII vorhanden sind. Somit ist verständlich, dass der Verlust dieser Proteine nicht zu einem sofortigen Zusammenbruch der Lamina führt. Da die Konzentration der Morpholinos bei jeder Zellteilung abnimmt, wird wohl in den späteren Stadien die Translation der Lamin mRNA nur zum Teil blockiert. Dies beeinflusst zwar die Entwicklung des Embryos, wirkt sich aber, zumindest bei geringen Morpholino Konzentrationen, nicht letal auf sie aus.

Eine ähnliche Situation findet man auch bei der Repression der LAP2 Proteine mit Hilfe des Mo-LAP2. Obwohl das Morpholino die Translation des LAP2 $\beta$  und des LAP2 $\gamma$  innerhalb der ersten 24 Stunden verhindert, ist die Konzentration des maternal synthetisierten LAP2 $\omega$ , unabhängig von der injizierten Morpholino Konzentration, unbeeinflusst (Abb. VII.5). Das LAP2 $\omega$  ist, vergleichbar zum Lamin LIII, ebenfalls ein Protein, das maternal vererbt wird. Bis zum Gastrulastadium ist das LAP2 $\omega$  das einzige LAP2 und kann bis zu 36 Stunden nach der Befruchtung in Zebrafischembryonen nachgewiesen werden (Schoft et al., 2003). Erst mit Beginn der späten Gastrula werden die somatischen LAP2 Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$  exprimiert und verdrängen langsam die  $\omega$  Isoform. Durch das Fehlen der beiden somatischen LAP2s scheint nicht nur die Entwicklungsgeschwindigkeit, sondern auch die Ausbildung von Kopf und Schwanz beeinflusst zu sein. Nach 48 Stunden sind deutliche Deformationen der Kopf-, Herz-



und Schwanzregion zu erkennen (Abb. VII.7, 8). Diese Effekte können durch eine höhere Morpholino-Dosis noch verstärkt werden (Abb. VII.8 D,E, E'). Die Anwesenheit von LAP2 $\omega$  und der Verdünnungseffekt bei den Morpholinos durch die fortschreitende Zellteilung, scheinen aber die Auswirkungen auf den Embryo zu beschränken. Ähnliche phänotypische Beobachtungen wurden auch von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt (mündliche Aussage Micheline Paulin-Levasseur), die zusätzlich noch eine erhöhte Letalität der injizierten Embryonen festgestellt haben. Dies war bei meinen Versuchen erst bei einer hohen Morpholino-Konzentration möglich (1,5 mM; Abb. VII.8). Dieser zusätzliche Befund kann auf zwei, im Vergleich zu meinen Untersuchungen, Unterschieden beruhen. Zum einen wurden bei dieser Arbeitsgruppe wahrscheinlich eine größere Anzahl von Embryonen über einen längeren Zeitraum beobachtet und zum anderen wurde ein Morpholino injiziert, das sich vom hier verwendeten Mo-LAP2 unterscheidet. Wie zuvor beschrieben, enthielt unser Morpholino Mo-LAP2 an Position 6 (5 Basen nach ATG) eine Fehlpaarung, die das von Paulin-Levasseur verwendete Morpholino nicht aufweist. Obwohl bekannt ist, dass Morpholinos mit bis zu drei Fehlpaarungen funktionsfähig sind, ist es denkbar, dass die Bindungseigenschaften beeinflusst werden. Daher ist es möglich, dass das von uns verwendete Morpholino zwar die Expression reprimiert, dieses aber in einem geringeren Maß als das von Paulin-Levasseur.

Den drastischsten Effekt, ausgelöst durch eine Morpholino Injektion, konnte bei der Repression des LBRs beobachtet werden. 24 Stunden nach der Injektion war im Embryo keine LBR zu detektieren, was auf eine Reduktion oder eine völlige Repression des Proteins hindeutet (Abb. VII.9). Schon innerhalb der ersten 24-30 Stunden zeigten die Embryonen eine gestörte Entwicklung, die sowohl die Entwicklungsgeschwindigkeit, als auch die Ausbildung von Kopf, Rücken und Schwanz betrifft (Abb. VII.10). Obwohl nur eine geringe Anzahl von Embryonen untersucht wurde, entstand der Eindruck, dass der Verlust des LBRs nicht nur die Entwicklung beeinflusst sondern sich auch, innerhalb der ersten 48 Stunden, letal auf die Embryonen auswirkt. Die wenigen Embryonen, die nach einer Injektion von geringen Mengen an Mo-LBR, die ersten 48 Stunden überlebt haben, erscheinen von ihrem Phänotyp eher wildtypisch (Abb. VII.11), was wahrscheinlich auf eine unvollständige Repression des LBRs zurückzuführen ist. Es ist bekannt, dass der Verlust, oder die Expression fehlerhafter LBRs zu enormen Schäden bei Tier und Mensch führen kann. Die Pelger Huët Anomalie ist eine autosomal dominante Krankheit, bei der der Verlust des LBRs sowohl die Entwicklung beeinflusst als auch Skelettanomalien und eine veränderte Chromatinverteilung im Kern hervorruft (Hoffmann et al., 2002). Die Krankheit wirkt sich je nach genetischem

Hintergrund, unterschiedlich aus, jedoch scheinen homozygote Patienten kaum eine Überlebenschance zu besitzen. Ähnliches wurde bei ichthyosis-Mäusen gefunden, deren LBR-Gen verschiedene Defekte aufwies. Bei homozygoten Mäusen sank die Überlebensrate drastisch, während heterozygote Mäuse, mit verschiedenen Einschränkungen, lebensfähig waren (Shultz et al., 2003). Da die Repression des LBRs, mit Hilfe des Morpholinos, mit einem homozygoten Defekt des Gens gleichzusetzen ist, ist die geringe Überlebensrate der Zebrafischembryonen verständlich. Das dennoch einige Tiere überlebt haben, kann vielleicht damit erklärt werden, dass nicht alle mRNAs des LBR blockiert wurden und eine geringe Menge, die im Western Blot nicht detektierbar war, exprimiert wurde. Eindeutig ist jedoch der Unterschied zu den Repressionsversuchen der LAP2s und der Lamine. Während in diesen Fällen eine embryonale Variante der Proteine vorhanden blieb (LAP2 $\omega$  oder Lamin LIII) und die Aufgaben zum Teil übernommen haben, konnte beim LBR keine Kompensation stattfinden, was sich in wesentlich deutlicheren Entwicklungsdefekten zeigte. Neben solchen komplementierenden Faktoren, wie die maternalen Proteine, besteht auch die Möglichkeit, dass andere Kernmembranproteine komplementierende Wirkungen besitzen können. Bei *C. elegans* konnte zum Beispiel eine überlappende Funktion von Emerin und MAN1 beobachtet werden, die bei RNA-Interferenz-Versuchen von MAN1 dazu führte, dass diese Funktion zum Teil durch das Emerin erfüllt wurde. Erst nach der Herunterregulierung beider Gene wurden ein letaler beobachtet (Liu et al., 2003). Inwieweit sich die Funktionen des LAP2s, des LBRs oder der B-Typ Lamine mit Funktionen anderer Proteine überlappen, so dass deren Expression eine komplementierende Wirkung haben könnte, bleibt jedoch noch zu klären.

Obwohl die hier beobachteten Auswirkungen recht einheitlich und mit anderen Befunden vergleichbar sind, sollten sie dennoch mit Vorsicht interpretiert werden. Durch die geringe Anzahl der untersuchten Embryonen wäre eine Verallgemeinerung der gefundenen Phänotypen noch etwas verfrüht. Für eine sinnvolle statistische Analyse reichen die hier untersuchten Embryonen nicht aus und selbst ein Vergleich zwischen den einzelnen Injektionen wird durch eine unterschiedliche Befruchtungs- oder Absterberate sowie manchmal recht kleine Gelege erschwert. Hinzu kommen systembedingte Ungenauigkeiten, die jedoch bei den Untersuchungen aller Arbeitsgruppen auftreten. Zum einen bedarf es genügend Erfahrung und Übung die Embryonen immer an einer ähnlichen Stelle zu injizieren, zum anderen folgt das injizierte Flüssigkeitsvolumen eher einem subjektiven Maß. Da die verwendeten Injektionsnadeln nicht unter standardisierten Bedingungen gezogen werden, unterscheiden sie sich oft in ihrer Länge und Dicke. Folglich unterscheiden sich die Nadeln häufig in ihrer Öffnung und das injizierte Volumen von ~1 nl muss zu Beginn der Injektion

nach Augenmaß abgeschätzt werden. Ist dieses geschehen, werden alle Embryonen einer Injektionsrunde mit dem selben Volumen injiziert, aber inwieweit der Unterschied zu dem Volumen einer anderen Injektion besteht, kann nicht geprüft werden. Obwohl mit genügend Erfahrung die Abweichungen sehr gering sind, ist die Frage berechtigt, ob nicht gerade bei solch einem geringen Volumen schon eine minimale Abweichung einen großen Unterschied macht. Dass die für diese Arbeit durchgeführten Injektionen nicht alle miteinander verglichen werden können, zeigt sich schon daran, dass nach 24 Stunden Unterschiede in der Fluoreszenz des GFPs, und damit auch in der Menge des injizierten Morpholinos, zu erkennen waren.

Dennoch geben diese Ergebnisse Hinweise auf die möglichen Effekte, die die Reduktion der verschiedenen Proteine bei den Zebrafischen bewirken könnten und diese scheinen nicht ganz unrealistisch zu sein. Fest steht, dass die Morpholinos in der Lage waren die gewünschten Proteine zu reprimieren. Nun müssten die Injektionen soweit optimiert werden, dass eine größere Anzahl von Embryonen untersucht werden kann und somit eine sinnvolle statistische Auswertung erfolgen kann. Weiterhin müsste geklärt werden bis zu welchem Stadium diese Repression anhält, und ob es möglich ist durch eine erhöhte Morpholino-Konzentration den Verdünnungseffekt bis über dieses Stadium hinaus entgegen zu wirken.

## VIII. Literaturverzeichnis

- Aebi, U., Cohn, J., Buhle, L. and Gerace, L.** (1986) The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* **323**: 560–564
- Alsheimer, M., Fecher, E. and Benavente R.** (1986) Nuclear envelope remodelling during rat spermiogenesis: distribution and expression pattern of LAP2/thymopoietins. *J. Cell Sci.* **111**: 2227–2234
- Alsheimer, M., von Glasenapp, E., Schnolzer, M., Heid, H. and Benavente, R.** (2000) Meiotic lamin C2: The unique amino-terminal hexapeptide GNAEGR is essential for nuclear envelope association. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 13120–13125
- Arbustini, E., Pilotto, A., Repetto, A., Grasso, M., Negri, A., Diegoli, M., Campana, C., Scelsi, L., Baldini, E., Gavazzi, A., and Tavazzi, L.** (2002) Autosomal dominant dilated cardiomyopathy with a trioventricular block: A lamin A/C defect-related disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**: 981–990
- Ashery-Padan R., Weiss, A. M., Feinstein, N. and Gruenbaum, Y.** (1997) Distinct regions specify the targeting of otefin to the nucleoplasmic side of the nuclear envelope. *J. Biol. Chem.* **272**: 2493–2499
- Battaile, K. and Steiner, R.** (2000) Smith-Lemli Opitz Syndrome: The First Malformation Syndrome Associated with Defective Cholesterol Synthesis. *Molecular Genetics and Metabolism* **71**: 154–162.
- Belmont, A. S., Bignone, F. and Ts'o, P. O.** (1986) The relative intranuclear positions of Barrbodies in XXX non-transformed human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **165**: 165–179
- Benavente, R., Krohne, G. and Franke, W. W.** (1985) Cell type-specific expression of nuclear lamina proteins during development of *Xenopus laevis*. *Cell* **41**: 177–190
- Benavente, R. and Krohne, G.** (1985) Change of karyoskeleton during spermatogenesis of *Xenopus*: expression of lamin LIV, a nuclear lamina protein specific for the male germ line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 6176–6180
- Benavente, R. and 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
- Bengtsson, L. and Wilson, K. L.** (2004) Multiple and surprising new functions for emerin, a nuclear member protein. *Curr Opin Cell Biol.* **16**: 73–79
- Berger, R., Theodor, L., Shoham J., Gokkel, E., Brok-Simoni, F., Avraham, K. B., Copeland, N. G., Jenkins N. A., Rechavi, G. and Simon, A. J.** (1996) The characterization and localisation of the mouse thymopoietin/lamina-associated polypeptide 2 gene and its alternatively spliced products. *Genome Res.* **6**: 361–370
- Birnboim, H. C. and Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513–1523
- Bonne, G., Di Barletta, M. R., Varnous, S., Becane, H. M., Hammouda, E. H., Merlini, L., Muntoni, F., Greenberg, C. R., Gary, F., Urtizbera, J. A., Duboc, D., Fardeau, M., Toniolo, D. and Schwartz, K.** (1999) Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat. Genet.* **21**: 285–288
- Bonne, G., Mercuri, E., Muchir, A., Urtizbera, A., Becane, H. M., Recan, D., Merlini, L., Wehnert, M., Boor, R., Reuner, U., Vorgerd, M., Wicklein, E. M., Eymard, B., Duboc, D., Penisson-Besnier, I., Cuisset, J. M., Ferrer, X., Desguerre, I., Lacombe, D., Bushby, K., Pollitt, C., Toniolo, D., Fardeau, M., Schwartz, K. and Muntoni, F.** (2000). Clinical and molecular genetic spectrum of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy due to mutations of the lamin A/C gene. *Ann. Neurol.* **48**: 170–180
- Braunagel, S. C., Parr, R., Belyavski, M. and Summers, M. D.** (1998) Autographa californica nucleopolyhedrovirus infection results in Sf9 cell cycle arrest at G2/M phase. *Virology* **244**: 195–211

- Brodsky, G. L., Muntoni, F., Miodic, S., Sinagra, G., Sewry, C. and Mestroni, L.** (2000) Lamin A/C gene mutation associated with dilated cardiomyopathy with variable skeletal muscle involvement. *Circulation* **101**: 473–476
- Buendia, B., Santa-Maria, A. and Courvalin, J. C.** (1999) Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J. Cell Sci.* **112**: 1743–1753
- Burke, B., and Gerace, L.** (1986) A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *Cell* **44**: 639–652
- Cai, M., Huang, Y., Ghirlando, R., Wilson, K. L., Craigie, R. and 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
- Chin, D. J., Luskey, K. L., Anderson, R. G., Faust, J. R., Goldstein, J. L. and Brown, M.** (1982) Appearance of crystalloid endoplasmic reticulum in compactin-resistant Chinese hamster cells with 500-fold increase in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**: 1185–1189
- Chung, C. T., Niemela, S. L. and 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.* **86**: 2172–2175
- Cohen, M., Lee, K. K., Wilson K. L. and Gruenbaum Y.** (2001) Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional evolution of the nuclear Lamina. *Trends in Biochemical Sciences* **26**: 41–47
- 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
- Dabauvalle, M. C., Loos, K., Merkert, H. and Scheer, U.** (1991) Spontaneous assembly of pore complex-containing membranes (“annulate lamellae”) in *Xenopus* egg extract in the absence of chromatin. *J. Cell Biol.* **112**: 1073–1082
- 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. and Foisner, R.** (2000a) Review: lamina-associated polypeptide 2 isoforms and related proteins in cell cycle-dependent nuclear structure dynamics. *J Struct Biol.* **129**: 335–345
- Dechat, T., Korbei, B., Vaughan, O. A., Vlcek, S., Hutchison, C. J. and Foisner, R.** (2000b) Lamina-associated polypeptide 2 $\alpha$  binds intranuclear A-type lamins. *J. Cell Sci.* **113**: 3473–3484
- Del Pino, E. M., Sáenz, F. E. , Pérez, O. D., Brown, F. D., Ávila ,M. E., Barragán, V. A., Haddad, N., Paulin-Levasseur, M. and Krohne, G** (2002) The LAP2 (lamina-associated polypeptide 2) expression in fish and amphibians. *Int. J. Dev. Biol.* **46**: 227–234
- Dhe-Paganon, S., Werner, E. D., Chi, Y. I. and Shoelson, S. E.** (2002) Structure of the globular tail of nuclear lamin. *J. Biol. Chem.* **277**: 17381–17384
- Fairley, E. A. L., Kendrick-Jones, J. and 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
- Favreau, C., Worman, H. J., Wozniak, R. W., Frappier, T. and Courvalin, J. C.** (1996) Cell cycle-dependent phosphorylation of nucleoporins and nuclear pore membrane protein Gp210. *Biochemistry* **35**: 8035–8044

- Foisner, R. and 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
- Furukawa, K., Inagaki, H. and Hotta, Y.** (1994) Identification and cloning of an mRNA coding for a germ cell-specific A-type lamin in mice. *Exp. Cell Res.* **212**: 426–430
- Furukawa, K., Pante, N., Aebi, U. and Gerace, L.** (1995) Cloning of a cDNA for lamina associated polypeptide 2 (LAP2) and identification of regions that specify targeting to the nuclear envelope. *EMBO J.* **14**: 1626–1636
- Furukawa, K., Fritze, C. E. and Gerace, L.** (1998) The major nuclear envelope targeting domain of LAP2 coincides with its lamin binding region but is distinct from its chromatin interaction domain. *J. Biol. Chem.* **273**: 4213–4219
- Furukawa, K., Sugiyama, S., Osouda, S., Goto, H., Inagaki, M., Horigome, T., Omata, S., McConnell, M., Fisher, P. A. and Nishida, Y.** (2003) Barrier-to-autointegration factor plays crucial roles in cell cycle progression and nuclear organization in *Drosophila*. *J Cell Sci.* **15**: 3811-3823
- Furukawa, K., Inagaki, H. and Hotta, Y.** (1994) Identification and cloning of an mRNA coding for a germ cell-specific A-type lamin in mice. *Exp. Cell Res.* **212**: 426–430
- Gajewski, A. and Krohne, G.** (1999) Subcellular distribution of the *Xenopus* p58/Lamin B Receptor in oocytes and eggs. *Journal of Cell Science* **112**: 2583-2596
- Gant, T. M., Harris, C. A. and Wilson, K. L.** (1999) Roles of LAP2 proteins in nuclear assembly and DNA replication: Truncated LAP2beta proteins alter lamina assembly, envelope formation, nuclear size, and DNA replication efficiency in *Xenopus laevis* extracts. *J. Cell Biol.* **144**:1083–1096
- Garg, A., Speckman, R. A. and Bowcock, A. M.** (2002) Multisystem dystrophy syndrome due to novel missense mutations in the amino-terminal head and alpha-helical rod domains of the lamin A/C gene. *Am. J. Med.* **112**: 549–555
- Genschel, J., Bochow, B., Kuepferling, S., Ewert, R., Hetzer, R., Lochs, H. and Schmidt, H.** (2001) A R644C mutation within lamin A extends the mutations causing dilated cardiomyopathy. *Hum. Mutat.* **17**: 154
- Georgatos, S. D.** (2001) The inner nuclear membrane: simple, or very complex? *EMBO Journal*, **20**: 2989-2994
- Gerace, L. and Blobel, G.** (1980) The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* **19**, 277-287
- Glöckner, C.** (2004) Biochemische Untersuchung des Lamin B Rezeptors. *Diplomarbeit, Universität Würzburg*
- Goldberg, M., Jenkins, H., Allen, T., Whitfield, W. G., and Hutchison, C. J.** (1995). *Xenopus* lamin B3 has a direct role in the assembly of a replication competent nucleus: Evidence from cell-free egg extracts. *J. Cell Sci.* **108**:3451–3461
- Goldberg M., Lu, H., Stuurman, N., Ashery Padan, R., Weiss, A. M., Yu, J., Bhattacharyya, D., Fisher, P.A., Gruenbaum, Y. and Wolfner, M. F.** (1998) Interactions among *Drosophila* nuclear envelope proteins lamin, otefin and YA. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 4315-4323
- Goldman, R. D., Chou, Y. H., Prahlad, V. and Yoon, M.** (2002) Intermediate filaments: dynamic processes regulating their assembly, motility, and interactions with other cytoskeletal systems. *FASEB J. Suppl.* **2**: 261-265
- Gotzmann, J., Vlcek, S. and Foisner, R.** (2000) Caspase-mediated cleavage of the chromosomebinding domain of lamina-associated polypeptide 2. *J. Cell Sci.* **113**: 3769–3780
- Gruenbaum, Y., Wilson, K. L., Harel, A., Goldberg, M. and Cohen, M.** (2000) Review: Nuclear lamins - structural proteins with fundamental functions. *J. Struc. Biol.* **129**: 313-323

- 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. Cytol.* **226**: 1-62
- Haraguchi, T., Koujin, T., Segura-Totten, M., Lee, K. K., Matsuoka, Y., Yoneda, Y., Wilson, K. L. and 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. and Weber, K.** (2001) Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci.* **114**: 4557-4565
- Harris, C. A., Andryuk, P. J., Cline, S. C., Natarajan, A., Siekierka, J. J. and Goldstein, G.** (1994) Three distinct human thymopoietins are derived from alternatively spliced mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 6283-6287
- Harris, C. A., Andryuk, P. J., Cline, S. W., Mathew, S., Siekierka, J. J. and Goldstein, G.** (1995) Structure and mapping of the human thymopoietin (TMPO) gene and relationship of human TMPO beta to rat lamin-associated polypeptide 2. *Genomics* **28**: 198-205
- Hausen, P., Wang, Y. H., Dreyer, C. and Stick, R.** (1985) Distribution of nuclear proteins during maturation of the *Xenopus* oocyte. *J Embryol Exp Morphol.* **89**: 17-34
- Heald, R. and McKeon, F.** (1990) Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell.* 1990 **61**: 579-589
- Heasman, L., Kofron, M. and Wyhlie, C.** (2000)  $\beta$ -Catenin signalling activity dissects in the early *Xenopus* embryo: a novel antisense approach, *Dev. Biol.* **222**: 124-134
- Herrmann, H. and Aebi, U.** (2004) Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu. Rev. Biochem.* **73**: 749-789
- Hesse, M., Zimek, A., Weber, K. and Magin, T. M.** (2004) Comprehensive analysis of keratin gene clusters in humans and rodents. *Eur J Cell Biol.* **83**:19-26
- Hofemeister, H., Weber, K. and Stick, R.** (2000) Association of prenylated proteins with the plasma membrane and the inner nuclear membrane is mediated by the same membranetargeting motifs. *Mol. Biol. Cell* **11**: 3233-3246
- 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
- Höger, T. H., Krohne, G. and Kleinschmidt, J. A** (1991) Interaction of *Xenopus* lamins A and LII with chromatin in vitro mediated by a sequence element in the carboxyterminal domain. *Exp Cell Res.* **197**: 280-289
- Holaska, J. M., Lee, K. K., Kowalski, A. K. and 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
- Holtz, D., Tanaka, R. A., Hartwig, J. and 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
- Horton, J. D., Shah, N. A., Warrington, J. A., Anderson, N. N., Park, S. W., Brown, M. S. and Goldstein, J. L.** (2003) Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SCRE target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 12027-12032

- Howard, E.W., Newman, L.A., Oleksyn, D.W., Angerer, R.C. and Angerer, L.M.** (2001) SpKrl: a direkt target of  $\beta$ -catenin regulation required for endoderm differentiation in sea urchin embryos *Development*. **128**: 365-375
- Hukriede, N., Fisher, D., Epstein, J., Joly, L., Tellis, P., Zhou, Y., Barbazuk, B., Cox, K., Fenton-Noriega, L., Hersey, C., Miles, J., Sheng, X, Song, A. Waterman, R., Johnson, S. L., Dawid, I. B., Chevrette, M., Zon, L. I., McPherson, J. and Ekker M.** (2001) The LN54 radiation hybrid map of zebrafish expressed sequences. *Genome Res.* **11**: 2127-2132
- Isacc, C., Pollard, J. W. and Meier, U. T.** (2001) Intranuclear endoplasmic reticulum induced by Nopp140 mimics the nucleolar channel system of human endometrium. *J. Cell Sci.* **114**: 4253-4264
- Izumi, M., Vaughan, O. A., Hutchison, C. J. and Gilbert, D. M.** (2000) Head and/or CaaX domain deletions of lamin proteins disrupt preformed lamin A and C but not lamin B structure in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **11**: 4323-4337
- Jongens, T. A., Hay, B., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1992) The germ cell-less gene product: Aposteriorly localized component necessary for germ cell development in *Drosophila*. *Cell* **70**: 569-584
- Jongens, T. A., Ackerman, L. D., Swedlow, J. R., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1994) Germ cell-less encodes a cell type-specific nuclear pore-associated protein and functions early in the germ-cell specification pathway of *Drosophila*. *Genes Dev.* **8**: 2123-2136
- Kane D. A.** (1999) Cell cycles and development in embryonic zebrafish. *Methods Cell Biol.* **59**: 11-26
- Kihlmark, M., Imreh, G. and Hallberg, E.** (2001) Sequential degradation of proteins from the nuclear envelope during apoptosis. *J. Cell Sci.* **114**: 3643-3653
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullman, B. and Schilling, T. F.** (1995) Stages of embryonic development of zebrafish. *Developmental Dynamics* **203**: 253-310
- Klapper, M., Exner, K., Kempf, A., Gehrig, C., Stuurman, N., Fisher, P. A., Krohne, G.** (1997) Assembly of A- and B-type lamins studied in vivo with the baculovirus system. *J. Cell Sci.* **110**: 2519-2532
- Klüver, N.** (2003) Funktionelle Analyse von Lamin-Mutanten *in vivo*. *Diplomarbeit, Universität Würzburg*
- König, A., Happle, R., Bornholdt, D., Engel, H., Grzeschik, K. H.** (2000) Mutations in the NSDHL gene, encoding a  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, cause CHILD syndrome. *Am. J. Med. Gen.* **90**: 339-346
- Kos, R., Reedy, M. V., Johnson, R. L. and Erickson, C.A.** (2001) The winged-helix transcription factor FoxD3 is important for establishing the neural crest lineage and repressing melanogenesis in avian embryos. *Development* **128**: 1467-1479
- Krohne, G.** (1989) Lamin assembly in vivo. *Subcell Biochem.* **31**: 563-686 *Intermediate Filaments*, Kapitel 19
- Krohne, G., Wolin, S. L., McKeon, F. D., Franke, W. W. and Kirschner, M.W.** (1987) Nuclear lamin LI of *Xenopus laevis*: cDNA cloning, amino acid sequence and binding specificity of a member of the lamin B subfamily. *EMBO J.* **6**: 3801-3808
- Krohne, G., Stuurman, N. and Kempf, A.** (1998) Assembly of *Drosophila* lamin Dm0 and C mutant proteins studied with the baculovirus system. *Eur. J. Cell Biol.* **77**: 276-283
- Kyhse-Andersen, J.** (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: 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
- Lang, C. and Krohne, G.** (2002) 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



- Lang, C., Paulin-Levasseur, M., Gajewski, A., Alsheimer, M., Benavente, R. and Krohne, G.** (1999) Molecular characterization and developmentally regulated expression of *Xenopus* lamina-associated polypeptide 2 (XLAP2). *J. Cell Sci.* **112**: 749-759
- Lee, M. S. and Craigie, R.** (1998) A previously unidentified host protein protects retroviral DNA from autointegration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 1528-1533
- Lee, K. K., Gruenbaum, Y., Spann, P., Liu, J. and Wilson K. L.** (2000) *C. elegans* nuclear envelope protein emerin, 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. and Wilson, K. L.** (2001) Distinct functional domains in emerin bind lamin A and DNA-bridging protein BAF. *J. Cell Sci.* **114**: 4567-4573
- 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
- Lin F, Blake, D. L., Callebaut, I., Skejanc, I. S., Holmer, L., McBurney, M. W., Paulin-Levasseur, M. and Worman H. J.** (2000) MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated peptide 2 and emerin. *J. Biol. Chem.* **275**: 4840-4847
- Liu, J., Song, K. and Wolfner, M. F.** (1995) Mutational analyses of fs(1)Ya, an essential, developmentally regulated, nuclear envelope protein in *Drosophila*. *Genetics* **141**: 1473-1481
- Liu, J., Ben-Shaharm, T. R., Riemer, D., Treinin, M., Spann, P., Weber, K., Fire, A. and 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. and Gruenbaum, Y.** (2003) Man1 and emerin have overlapping function(s) essential for chromosom segregation and cell division in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **8**: 4598-4603
- Lloyd, D. J., Trembath, R. C. and Shackleton, S.** (2002) A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum. Mol. Gen.* **11**: 769-777
- Lourim, D. and Krohne, G.** (1993) Membrane-associated lamins in *Xenopus* egg extract: Identification of two vesicle populations. *J. cell. Biol.* **123**: 501-512
- Lourim, D. Kempf, A. and Krohne, G.** (1996) Characterisation and quantitation of three B-type lamins in *Xenopus* oocytes and eggs: Increase of Lamin L<sub>1</sub> protein synthesis during meiotic maturation. *J. Cell Sci* **109**: 1775- 1785
- Malone, C. J. Fixsen, W. D., Horvitz, H. R. and 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
- Marelli, M., Lusk, C. P., Chan, H., Aitchison, J. D. and Wozniak, R. W.** (2001) A link between the synthesis of nucleoporins and the biogenesis of the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* **153**: 709-724
- Marshall, W. F. and Sedat, J. W.** (1999) Nuclear architecture. *Probl. Cell Differ.* **25**: 283-301.
- Martin, L., Crimauddo, C., and Gerace, L.** (1995). cDNA cloning and characterization of lamina-associated polypeptide 1C (LAP1C), an integral protein of the inner nuclear membrane. *J. Biol. Chem.* **270**: 8822-8828
- Martins, S. B., Eide, T., Steen, R. L., Jahnsen, T., Skalhegg, B. S., and Collas, P.** (2000) HA95 is a protein of the chromatin and nuclear matrix regulating nuclear envelope dynamics. *J. Cell Sci.* **113**: 3703-3711

- Maske, C. P., Hollinshead, M. S., Higbee, N. C., Bergo, M. O., Young, S. G. and Vaux, D. J. (2003)** A carboxylterminal interaction of lamin B1 is dependent on the CAAX endoprotease Rce1 and carboxymethylation. *J Cell Biol.* **162**:1223-1232
- McKeon, F. D. (1987)** Nuclear lamin proteins and the structure of the nuclear envelope: where is the function? *Bioessays.* **7**: 169-173
- McKeon, F. D., Kirschner, M. W. and Caput, D. (1986)** Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* **319**: 463-468
- Mislow, J. M., Holaska J. M., Kim, J. S., Lee K. K., Segura-Totten, M., Wilson, K. L. and McNally, E. M. (2002b)** Nesprin-1 $\alpha$  self-associates and binds directly to emerin and Lamin A in vitro; *FEBS Lett.* **525**: 135-140
- Mislow, J. M., Kim, M. S., Davis, D. B., and McNally, E. M. (2002a)** Myne-1, a spectrin repeat transmembrane protein of the myocyte inner nuclear membrane, interacts with lamin A/C. *J. Cell Sci.* **115**: 61-70
- Moir, R. D., Spann, T. P., and Goldman, R. D. (1995)** The dynamic properties and possible functions of nuclear lamins *Int. Rev. Cytol.* **162**: 141-182
- Nasevicius, A. and Ekker, S.C. (2000)** Effectively targeted gene knock-down in zebrafish. *Nature Genetics* **26**: 216-220
- Newport, J. W., Wilson, K. L. and Dunphy, W. G. (1990)** A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly. *J. Cell Biol.* **111**: 2247-2259
- Newport J and Spann T. (1987)** Disassembly of the nucleus in mitotic extracts: membrane vesicularization, lamin disassembly, and chromosome condensation are independent processes. *Cell.* **48**: 219-230
- Nigg, E. A. (1992)** Assembly and cell cycle dynamics of the nuclear lamina. *Semin. Cell Biol.* **3**: 245-253
- Nili, E., Cojocaru, G. S., Kalma, Y., Ginsberg, D., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Berger, R., Shaklai, S., Amariglio, N., Brok-Simoni, F., Simon, D. J. and Rechavi, G. (2001)** Nuclear membrane protein, LAP2beta, mediates transcriptional repression alone and together with its binding partner GCL (germ cell-less). *J. Cell Sci.* **114**: 3297-3307
- Ohkuma, M., Park, S. M., Zimmer, T., Menzel, R., Vogel, F., Schunck, W. H., Ohta, A. and Takagi, M. (1995)** Proliferation of intracellular membrane structures upon homologous overproduction of cytochrome P-450 in *Candida maltosa*. *Biochim Biophys Acta.* **1236**: 163-169
- Padan, R., Nainudel-Epsztejn, S., Goitein, R., Fainsod, A. and Gruenbaum, Y. (1990)** Isolation and characterization of the *Drosophila* nuclear envelope otefin cDNA. *J. Biol. Chem.* **265**: 7808-7813
- Polioudaki, H., Kourmouli, N., Drosou, V., Bakou, A., Theodoropoulos, P. A., Singh, P. B., Giannakouros, T. and 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
- Qian, Y., Barton, R. and Worman, H. J. (1998)** Nuclear Lamin-Binding Proteins. *Plenum Press, New York*
- Raff, J. W. (1999)** The missing (L) UNC? *Curr Biol.* **9**: 708-710
- Rao, L., Perez, D. and White, E. (1996)** Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J. Cell Biol.* **135**: 1441-1455
- Ravid, T., Avner, R., Polak-Charcon, S., Faust, J. R. and Roitelman, J. (1999)** Impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase degradation in lovastatin-resistant cells. *J. Biol. Chem.* **4**: 29341-29351

- 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
- Schoft, V. K., Beauvais, A. J., Lang, C., Gajewski, A., Prüfert, K., Winkler, C., Akimenko, M. A., Paulin-Levasseur, M. and 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
- Schuler, E., Lin, F. and Worman, H. J.** (1994) Characterisation of the human gene encoding LBR, an integral protein of nuclear envelope inner membrane. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 11312-11317
- Senior, A. and Gerace, L.** (1988) Integral membrane proteins specific to the inner nuclear membrane and associated with the nuclear lamina. *J. Cell Biol.* **107**: 2029-2036
- Shultz, L., Lyons, B., Burzenski, L. M., Gott, B., Samuels, R., Schweitzer, P. A., Dreger, C., Herrmann, H., Kalscheuer V., Olins, A. L., Olins, D. E., Sperling, K. and Hoffmann, K.** (2003) Mutations at the mouse ichthyosis locus are within the lamin B receptor gene: a single gene modle for human Pelger Huët anomaly. *Human Molecular Genetics* **12**: 61-69
- Shuman, S.** (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol Chem.* **269**: 32678-32684
- Silve, S., Dupuy, P. H., Ferrara, P. and Loison, G.** (1998) Human Lamin B Receptor exhibits sterol C14-reductase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1392**: 233-244
- Simos, G. and 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**: 225-228
- Smith, S. and Bloble, G.** (1994) Colocalisation of vertebrate lamin B and lamin B receptor (LBR) in nuclear envelope and in LBR-induced membrane stacks of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 10124-10128
- Snapp, E. L., Hegde, R. S., Francolini, M., Lombardo, F., Colombo, S., Pedrazzini, E., Borgese, N. and Lippincott-Schwartz, J.** (2003) Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *J Cell Biol.* **163**: 257-269
- Sohail, M. and Southern, E.M.** (2000) Selecting optimal antisense agents; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **44**: 23-34
- Soullam, B. and 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
- Spann, T. P., Moir, R. D., Goldman, A. E., Stick, R. and 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. and Goldman, R.** (2002) Alteration of nuclear lamin organisation inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *J. Cell Biol.* **156**: 603-608
- Stearns, T.** (1997) Motoring to the finish: kinesin and dynein work together to orient the yeast mitotic spindle. *J Cell Biol.* **138**: 957-960
- Stick, R. and Krohne, G.** (1982) Immunological localization of the major architectural protein associated with the nuclear envelope of the *Xenopus laevis* oocyte. *Exp Cell Res.* **138**: 319-3
- Stick, R.** (1988) cDNA cloning of the developmentally regulated lamin LIII of *Xenopus laevis*. *EMBO J.* **7**: 3189-3197

- Stuurman, N., Heins, S. and Aebi, U.** (1998) Nuclear Lamins: Their Structure, Assembly, and Interactions. *Journal of Structural Biology*, **122**: 42-66
- Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Bhatt, H., Anver, M., Naryan, B., Nagashimi, K., Stewart, C. L. and Burke, B.** (1999) Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophie. *J. Cell Biol.* **147**: 913-920
- Summerton, J.** (1999) Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type; *Biochem. Biophys. Acta* **1498**: 141-158
- Summerton, J. and Weller, D.** (1997) Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Acid Drug Dev.* **7**: 187-158
- Umland, T. C., Wei, S. Q., Craigie, R. and Davies, D. R.** (2000) Structural basis of DNA bridging by barrier-to autointegration factor. *Biochemistry* **39**: 9130-9138
- Vlcek, S., Just, H., Dechat, T. and Foisner, R.** (1999) Functional diversity of LAP2alpha and LAP2beta in postmitotic chromosome association is caused by an alpha-specific nuclear targeting domain. *EMBO J.* **18**: 6370-6384
- Vlcek, S., Korbei, B. and Foisner, R.** (2002) Distinct functions of LAP2alpha's unique C-terminus in cell proliferation and nuclear assembly. *J. Biol. Chem.* **277**: 18898-18907
- Vogel, A.** (2002) Funktionelle Analyse des *Xenopus* Lamins B<sub>2</sub> (LII) *in vivo* durch Kompartimentierungsexperimente und Depletierung der mRNA. *Diplomarbeit, Universität Würzburg*
- Wagner, N., Weber, D., Seitz, S. and Krohne, G.** (2004) The lamin B receptor of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Science*, **117**: 2015-2028
- Waterham, H. R., Koster, J., Romeijn, G. J., Hennekam, R. C. M., Vreken, P., Andersson, H. C., FitzPatrick, D. R., Kelley, R. I. and Wanders, R. J. A.** (2001): Mutations in the 3β-hydroxysterol Δ<sup>14</sup>-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 3β-Hydroxysterol Δ<sup>14</sup>-Reductase deficiency due to mutations in the Lamin B Receptor gene. *Am. J. Hum. Genet.* **72**: 1013-1017
- Wilkinson, F. L., Holaska, J. M., Zhang, Z., Sharma, A., Manilal, S., Holt, I., Stamm, S., Wilson, K. L. and Morris, G. E.** (2003) Emerin interacts *in vitro* with the splicing-associated factor, YT521-B. *Eur. J. Biochem.* **270**: 2459-2466
- Wilson, K. L., Zastrow, M. S. and Lee, K. K.** (2001) Lamins and disease: Insights into nuclear infrastructure. *Cell* **104**: 647-650
- Worman, H. J., Yuan, J., Blobel, G. and Georgatos, S. D.** (1988) A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 8531-8534
- Worman, H. J., Evans, C. D. and 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
- Wu, W., Lin, F. and Worman, H. J.** (2002) Intracellular trafficking of MAN1, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *J. Cell Sci.* **115**: 1361-1372
- Yang, L., Guan, T. and Gerace, L.** (1997a) Lamin-binding fragment of LAP2 inhibits increase in nuclear volume during the cell cycle and progression into S phase. *J. Cell Biol.* **139**: 1077-1087

**Ye, Q., Callebaut, I., Pezhman, A., Courvalin, J. C. and Worman, H. J.** (1997) Domain-specific interactions of human HP1-type Chromodomain Proteins and inner nuclear membrane protein LBR. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 14983-14989

**Ye, Q. and 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. and 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

**Zhang, Q., Skepper, J. N., Yang, F., Davies, J. D., Hegyi, L., Roberts, R. G., Weissberg, P. L., Ellis, J. A. and Shanahan, C. M.** (2001) Nesprins: A novel family of spectrin-repeat containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *J. Cell Sci.* **114**: 4485-4498

**Zheng, R. R., Ghirlando, R., Lee, M. S., Mizuuchi, K., Krause, M. and Craigie, R.** (2000) Barrier to autointegration factor (BAF) bridges DNA in a discrete higher-order nucleoprotein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 8997-9002

## IX. Anhang

## IX. 1. Exon-/Introngrößen der genomischen LAP2 Sequenzen

**Tab. 1: Exon-/Introngrößen des humanen LAP2s**  
vgl. genomische Sequenz auf CD

Exon/Intron	Größe (bp)	Exon/Intron	Größe (bp)
Ex 1	279	Ex 6a	120
In 1	11738	In 6a	92
Ex 2	127	Ex 6b	96
In 2	3667	In 6b	413
Ex 3	159	Ex 6c	107
In 3	984	In 6c	1301
Ex 4	1520	Ex 7	89
In 4	3132	In 7	1125
Ex 5	98	Ex 8	252
In 5	6657		

**Tab. 2: Exon-/Introngrößen des Zebrafisch LAP2s**  
vgl. genomische Sequenz auf CD

Exon/Intron	Größe (bp)	Exon/Intron	Größe (bp)
Exon 1	237	Exon 9	90
Intron 1	4969	Intron 9	96
Exon 2	118	Exon 10	93
Intron 2	1332	Intron 10	121
Exon 3	150	Exon 11	60
Intron 3	1076	Intron 11	83
Exon 4	137	Exon 12	126
Intron 4	3300	Intron 12	1126
Exon 5	102	Exon 13	126
Intron 5	219	Intron 13	213
Exon 6	69	Exon 14	104
Intron 6	80	Intron 14	1648
Exon 7	129	Exon 15	364
Intron 7	1735		
Exon 8	69	untrans. 3'	184
Intron 8	84	untrans. 5'	58

**Tab. 3: Exon-/Introngrößen des Hühner LAP2s**  
vgl. genomische Sequenz auf CD

Exon/Intron	Größe (bp)	Exon/Intron	Größe (bp)
untrans. 5'	mind. 80	In 5	104
Ex 1	240	Ex 6	96
In 1	9073	In 6	554
Ex 2	127	Ex 7	111
In 2	1551	In 7	1206
Ex 3	159	Ex 8	95
In 3	906	In 8	1189
Ex 4	101	Ex 9	292
In 4	4575	untrans. 3'	1557
Ex 5	120		

## IX. 2. Translation der cDNA Sequenz des Hühner LAP2

Sequenz des Hühner LAP2 EST Klons 335862.3 (BBSRC Chick EST Datenbank)

Übersetzt mit CLONE in alle drei Leseraster . An Position 205 führt ein zusätzliches Nukleotid zu einem vorzeitigem Stopcodon (TAA). Kodierende Sequenz: Leseraster 1 (bis Position 205) und Leseraster 3

```

1  atgcccgagt tcttgccgga cccctcggtc ctgacgaagg agaagctgaa gagcgagctg
   M P E F L A D P S V L T K E K L K S E L
   C P S S W R T P R S - R R R S - R A S
   A R V L G G P L G P D E G E A E E R A

61  atgcccaaca atgtgagcct gccgggccc gagcagcgcaggacgtcta cgtgcagctc
   I A N N V S L P G G E Q R K D V Y V Q L
   - S P T M - A C R A A S S A R T S T C S
   D R Q Q C E P A G R R A A Q G R L R A A

121  tacctgcagc acctcaccgc ccgcaaccgc cccgccgtcg cgcagcccga cttctccagc
   Y L Q H L T A R N P P A V A Q P D F S S
   S T C S T S P P A T R P P S R S P T S P
   L P A A P H R P Q P A R R R A A R L L Q

181  gacgaggagc gggagcccac ccccatcggc gcccggggcc gcggggccc gcgtcggacgg
   D E E R E P T P I G A R G R G A A V G R
   A T R S G S P P P S A P G A A G P P S D
   R R G A G A H P H R R P G P R G R R R T

241  aaagccacaa agaaaactga caaactcagg gcagaggaaa aggatgactt agatgtaaca
   K A T K K T D K L R A E E K D D L D V T
   G K P Q R K L T N S G Q R K R M T - M -
   E S H K E N - Q T Q G R G K G - L R C N

301  gagctcagta atgaagatct tcaagagcag cttatgaagt atggaataaa tcttgccca
   E L S N E D L Q E Q L M K Y G I N P G P
   Q S S V M K I F K S S L - S M E - I L A
   R A Q - - R S S R A A Y E V W N K S W P

361  attgtagcta ccacaaggaa actttatgag aaaaagctgt tgaaactgat ggaacaaggt
   I V A T T R K L Y E K K L L K L M E Q G
   Q L - L P Q G N F M R K S C - N - W N K
   N C S Y H K E T L - E K A V E T D G T R

421  ccagaactga agacacctat gcctctccca gtgatttctt caactactga gaacaccaga
   P E L K T P M P L P V I S S T T E N T R
   V Q N - R H L C L S Q - F L Q L L R T P
   S R T E D T Y A S P S D F F N Y - E H Q

481  cagaatggaa ataatgattc tgaccagtac agtgacaatg aagaagagcc aaagactgag
   Q N G N N D S D Q Y S D N E E E P K T E
   D R M E I M I L T S T V T M K K S Q R L
   T E W K - - F - P V Q - Q - R R A K D -

541  ctgaggcttg agaagagaga acctctgaaa ggcaggatga agactccagt aacctcaaa
   L R L E K R E P L K G R M K T P V T L K
   S - G L R R E N L - K A G - R L Q - H S
   A E A - E E R T S E R Q D E D S S N T Q

601  caaagaagag ttgttgagca caaccagact tattctcaag atggagttac tgagactgtc
   Q R R V V E H N Q T Y S Q D G V T E T V
   N K E E L L S T T R L I L K M E L L R L
   T K K S C - A Q P D L F S R W S Y - D C

661  tggacaagtg gatcttcaaa aagtggacct cttcaggcat tttctagga gtctacaaga
   W T S G S S K S G P L Q A F S R E S T R
   S G Q V D L Q K V D L F R H F L G S L Q

```

L D K W I F K K W T S S G I F - G V Y K  
 721 **gtgtcaagaa gaacaccaag gaaaagggtg gaagctacat tacagttgcc tgtagatgat**  
 V S R R T P R K R V E A T L Q L P V D D  
 E C Q E E H Q G K G W K L H Y S C L - M  
 S V K K N T K E K G G S Y I T V A C R -  
 781 **gctgttatat cagagagtac tctatagct gaaactatat tgactgcaag caacgagacc**  
 A V I S E S T P I A E T I L T A S N E T  
 M L L Y Q R V L L - L K L Y - L Q A T R  
 C C Y I R E Y S Y S - N Y I D C K Q R D  
 841 **ctagttggca ataggggtgcc tggaaatttc aagcatgcag ctctacatt gccaatcagt**  
 L V G N R V P G N F K H A A P T L P I S  
 P - L A I G C L E I S S M Q L L H C Q S  
 P S W Q - G A W K F Q A C S S Y I A N Q  
 901 **gaaccctcag acatgccccag aagaacacca aagaaaccac tgatgacagc tgaagtgcc**  
 E P S D M P R R T P K K P L M T A E V P  
 V N P Q T C P E E H Q R N H - - Q L K C  
 - T L R H A Q K N T K E T T D D S - S A  
 961 **ggagagaact catacagaag aacgaaaagt agaaaggat attcttaagg aaatgttccc**  
 G E N S Y R R T K S R K G Y S - G N V P  
 P E R T H T E E R K V E R D I L K E M F  
 R R E L I Q K N E K - K G I F L R K C S  
 1021 **ttatgaagtc tctacaccta caggaatcag cgctagctgc cgtagaccaa tcaaaggagc**  
 L - S L Y T Y R N Q R - L P - T N Q R S  
 P Y E V S T P T G I S A S C R R P I K G  
 L M K S L H L Q E S A L A A V D Q S K E  
 1081 **tgctagccgg cctatcgagc acactgactt caaatggat gaaagtttct ttaagtatgc**  
 C - P A Y R A H - L Q N G - K F L - V C  
 A A S R P I E H T D F K M D E S F F K Y  
 L L A G L S S T L T S K W M K V S L S M  
 1141 **tccaaaatac agtacctcaa gtgacatcaa gtctgagaaa ccttcaacaa aaaaagaacg**  
 S K I Q Y L K - H Q V - E T F N K K R T  
 A P K Y S T S S D I K S E K P S T K K E  
 L Q N T V P Q V T S S L R N L Q Q K K N  
 1201 **ctccgttccc ctgtggataa** aaattcttct ctttgttctt gtttcagtct tcttgttttc  
 L R S P V D K N S S L C S C F S L L V F  
 R S V P L W I K I L L F V L V S V F L F  
 A P F P C G - K F F S L F L F Q S S C F  
 1261 agtttatcag tctatgaaa ctaatcaagg aaatccttcc tcgaaatata tttctgtgtt  
 1321 cactcaggac agttccaatt ga

**Abb. IX. 1: Hühner LAP2β Sequenz (cLAP2β)**

Identifiziert als EST Klons 335862.3 (BBSRC Chick EST Datenbank); Kleinbuchstaben: Nukleotidsequenz, Großbuchstaben: Aminosäuresequenz; fett: kodierende/kodierte Sequenz; unterstrichen: Start- (ATG) und Stopcodon (TAA), Kursiv-unterstrichen: Bereich mit Leserasterschub und vorzeitigem Stopcodon)



### IX.3. Genomische Sequenzen

Genomische Sequenzen sind nur auf CD gespeichert.

Dabei sind die nicht translatierten Regionen (kursiv), die Start- und Stopcodons (unterstrichen) und die Exons (fett, blau) markiert.

#### Genomische Sequenz von zLAP2 mit Exon und Intron

Genomische Sequenz stammt aus contig10273.2 ([www.ensembl.org/ Danio\\_rerio](http://www.ensembl.org/Danio_rerio)); Exons wurden an cDNA-Sequenz von zLAP2 $\omega$  (AJ320190) angeglichen. Exon/Intron mit Hilfe des Spidey Programms von NCBI ermittelt und modifiziert.

Blau: Exons wurden durch cDNA Sequenz ersetzt, da durch Nukleotidunterschiede im contig mehrere Stopcodons auftraten. Kleinbuchstaben: Sequenz die nicht in Klon ICRFc71O1293Q5 (RZPD, Berlin, Germany) gefunden wurde.

#### Genomische Sequenz von hLAP2 mit Exon und Intron

Die Exonssequenzen stammen aus der NCBI Datenbank und wurden von Harris und Berger veröffentlicht (Harris, et al. 1995; Accession: U18266-18271 und Berger et al., 1996; Exon 6a, 6b,6c). Die genomische Sequenz stammt aus der Datenbank des Sanger Institutes. Sie ist auf dem menschlichem Chromosom 12 lokalisiert und umfasst hier nur einen Teil (97330414–97451641). Blau: Exons; Rot:  $\alpha$ -spezifisches Exon 4 mit eigenem Stopcodon; grau unterlegt: Nukleotidunterschiede

#### Genomische Sequenz von cLAP2 mit Exon und Intron

Die genomische Sequenz stammt aus contig.36.871.141571 ([www.ensembl.org/ Gallus\\_gallus](http://www.ensembl.org/Gallus_gallus)). Exons wurden aus EST-Klon 335862.3 der BBSRC Chick EST Datenbank ([www.chick.umist.ac.uk](http://www.chick.umist.ac.uk)) übernommen. Dabei wurde das zusätzliche Nukleotid entfernt. Untranslatierte Region ist durch den EST-Klon bekannt.

#### Genomische Sequenz des zLBR

Die genomische Sequenz stammt aus contig.9684 ([www.ensembl.org/ Danio\\_rerio](http://www.ensembl.org/Danio_rerio)). Die cDNA-Sequenz wurde über die Sequenzierung von Klon MPMGp567K10194Q3 (RZPD) ermittelt und diese repräsentiert die Exons. Exon 7, Intron 7 und Exon8 wurden aus Klon ICRFc71M10137Q5 (RZPD) sequenziert, da die contig.9684- Sequenz hier nicht eindeutig definiert war. Dieser Bereich ist in die hier aufgeführte Sequenz mit aufgenommen. Dabei unterscheiden sich der EST-Klon MPMGp567K10194Q3 (RZPD) und der genomische Klon ICRFc71M10137Q5 (RZPD) in Exon 7 mit 5 Nukleotiden (cDNA: TTTTGTG; genomische DNA: ACTCTG). In dieser Sequenz wurde Exon 7 an die cDNA-Sequenz angeglichen (grau unterlegt).

## IX. 4. Sequenz des Zebrafisch LBRs

TTT CACAGAGGGAGGAACCAGTTCAGAGCGGGGCCAGCGTTTTAAACAATATTCTTTATTTATGAACTTC  
 CACGGATAAGCTTTAGTGATTTTAGGAAAATAAGGTCGACTGAAGTAAACAAAGATGCCGCCCTGCAAGGTTT  
 CAGATTGGAGATACTGTAATGGCCGCTGGCCCGCAGTAACCTTTATTATGAGGTCAAGGTGATGAGTTTTG  
 ATAACAAGACTCGCCTCTACACCGTCATCTACAAAGATGGTACTGAGCTGGAGCTGAAGGAGTCAGACATCAC  
 GAGTGTGGTCATTTTTCAAACCTGCTGGACGGTCGAGGTCAAGATCTCGATCACGGGACGCTCGCCAGGACGT  
 TCATCGGCACGTTCCCGGGACGCCACGTCGCAGTCGCTCCCGTTCACCAGCTAGGACCCGCGCAGAGCTTAT  
 CTCGCACACAAAAGTGCCCAAGGAAAACCAAGAAGTGCTGGAGGTTGACTCACTCCTGTGGCGATGAAACA  
 CGAGAACAACAGCAGCAACAGCAAATCTGAGAGAAAGAGGAAAATAATACAGCTAAAGCAGCTCCTGTAGTC  
 ACAGAGGAGAAGACAGAGACTGAATCAGAGAACCAGACAGGTGACGATATAATCTACGGCGCAGGAAGGACC  
 AGGGTGATGGCAAGGCTGTAGAGCTGGAGAAAGCCGTAGAGTCTGAGCCGTTATTGCAAACATAAGCACCAGC  
 AGCCGTCAAGACCCGCGATCTGGAGTTTGGAGGAAGAGTCGGTGTGCTTTTCCGTGATGTTTCTGCTGCCAGGG  
 CTGTGTTGGTATGCTCATTCTGTGGGCAGAAAGATGCCAGTCTCCAGAGCTTCTCTTGGAGCTTCCCGCTC  
 TTCAGTCTGTCTGGGATTGCCAGGTCTTTGGCATCGTCTCTGCTCTGGCTTCTCTTCCAGGCCGCTCCTCCTT  
 GCTCCCTGTGCGAAAGCTTGTGAAGGAATGCCACTTAAGAAATGGGAAAACCTTGAATACAGGATTAATGGT  
 TTCTATGCATTACTCCTCACGGCTGTGGCAGCAGGTGTGCTGTGTACCAGGAGGTGGATCTCAGCTACATCC  
 ATGCACACTTCTTGCAGTTCTACACCTCTGCCCTGCTCATCGCAACTCTCCTCAGCATCTACCTGTTTCATCCG  
 CTCCCGCTGGGCATCTAAAGATGAGCTAGCTCCCGGAGGAA[TTTTTG]GCTACATCATTTATGACTTCTTCATG  
 GGCAGAGAGTTAAATCCCCGTATCAAAGCTTCGATATTAGTTCTTCTGTGAAATGGCCCTGGACTGATGG  
 GTTGGGTGTTGATCAACTTTGCGATGTTGCTTGTGAAATGAAGCAGCAGAATCTGGAGAATCCGCTCAGC  
 GATGCTCCTGGTCAACATCTTCCAGCTCCTGTGGGTTCATCGATGGCTTGTGGCATGAGGAGAAGCTGCTGACT  
 ATGATGGACATAATGTATGATGGCTTTGGATTTATGTTGACATTTGGAGATTTGGCTTTTGTCCCTTTACAT  
 TCACATGTCAAGCATACTACTAGTCACCCATCCCAATGAGCTCAGTGTCTGGATCATTACTCTCATTGC  
 TATGAACGGAGTGGGATACTATATTTTTCAGGAAAGCCAACTCAGAAAGTTTGCCTTCAGGAAAACCCCTTCT  
 GACCCGGCAGTGTATCATCTGAAAACCTATCCTACTGCAACCCGAAAGAGTCTCATTGTGTCTGGTCTCTGGG  
 GTTTTGTCCGTCATCCCAATTACCTGGGGGACATCATGCTTTGGCTTGGCTTCTACCATGCGGGTTCAA  
 CACTCTGGTCCCTTATTTTTACCTGATCTATTGGTCACTCTGCTGGCGCACGGAACCGCACGACGAGCGT  
 AAGTGCAGGAAAAAGTACGGCTCTGCATGGGAAGAGTACTGCCAAGCTGTCCCGTACCGCATTTTCCCAAGAG  
 TATACTGAgacttagtctgttatggacactcggggcctaaacaccaggatgacaccgaacatcaaacagggaa  
 tgagtacattagcagcttagcctcctttttaaagtccttttaaaaacaaaaacaattacaattgagcaccaaaat  
 caaaccaatttttcagtcacaaagcgtttacggattgtggacactgccccagtttgcagagtttgatctctta  
 gatgtatattatgacttagtctgttatggacactcggggcctaaacaccaggatgacaccgaacatcaaacag  
 ggaatgagtcattagcagcttagcctcctttttaaagtccttttaaaaacaaaaacaattacaattgagcacca  
 aatcaaaccaatttttcagtcacaaagcgtttacggattgtggacactgccccagtttgcagagtttgatctc  
 cttagatgtatattatnngtacatagtttttttttttttttaactcttaaatgtgttgcaataactctca  
 acttgccatctcatctgatgtacacacataacacatttaacgtatttgcttggctatttaccattgactttt  
 ttttatgcacattgtgtaattgctttttgtatattgtgtatgagggatttttttatagtgtatagnaaggaa  
 ac

## Abb. IX. 2: Zebrafisch Lamin B Rezeptor

Sequenzierung des EST-Klon MPMGp567K10194Q3 (RZPD); grau unterlegt: Lage der Primer  
 von Oben nach Unten: P5, P4, P3, P2, P, P(+A); normal: bekannter Bereich (Vera Schoft); fett:  
 neu sequenzierter Bereich; unterstrichen: Start- und Stopcodon; umrandete Nukleotide:  
 Abweichungen zur genomischen Sequenz (cDNA: TTTTTG; genomische DNA: ACTCTG).

## IX. 5. pCS2P+Polylinker II

In die erste Multiple cloning site (MCS 1) wurde über *Bam*HI und *Eco*RI ein Fragment kloniert, welches für die KOZAK Sequenz, die cDNA des GFPs und ein Stopcodon kodiert.

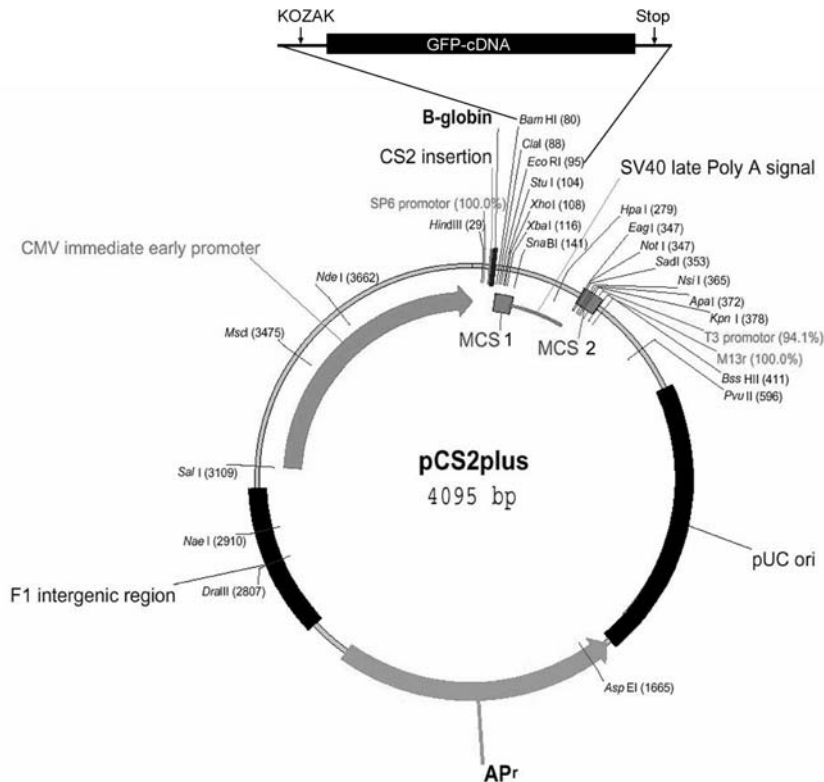


Abb. IX. 3: Schematische Darstellung des pCS2P+polylinker II Vektors mit Schnittstellen der Restriktionsenzymen in den beiden multiple cloning site (MSC) (Dave Turner, Ann Arbor, USA).

## IX. 6. Abkürzungen

### IX. 6.1. Allgemeine Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium; Eurobio, Biotechnology
DMSO	Dimethylsulfoxid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiotreitol
DNA	Desoxyribonukleinsäure

---

ECL	Enhanced Chemiluminescence
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm bzw. Standardwert der Erdbeschleunigung
GFP	Green Fluorescent Protein
GST	Glutathion S Transferase
h	Stunde
IIF	indirekte Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
LAP	Lamin assoziiertes Polypeptid
LBR	Lamin B-Rezeptor
kDa	Kilodalton
m	Meter
mA	Milli-Ampere
MCS	multiple cloning site
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
$\mu$	Mikro
NPC	Nuclear pore complex (Kernporenkomplex)
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAM	Rabbit-anti-mouse (Antikörper)
RT	Raumtemperatur
hPa	Hectopascal
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin

Tris	Tris-(hydrothymethyl)-aminoethan
TSR	Transmissionssuppressionsreagenz
U	Unit
ÜN	über Nacht
V	Volt
Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

### IX.6. 2. Abkürzungen der Aminosäuren

<b>Aminosäure</b>	<b>3-Buchstaben-Code</b>	<b>1-Buchstaben-Code</b>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Prp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Kristina Prüfert  
Geburtsdatum: 27.12.1974  
Geburtsort: Bremen  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1981-1983 Dr. Albert-Liebmann-Schule, Aschaffenburg  
1983-1984 Volksschule, Heinrichsthal  
1984-1986 Günewald-Volksschule (Grund-, Hauptschule), Aschaffenburg  
1986-1995 Friedrich Dessauer Gymnasium, Aschaffenburg  
Juli 1995 allgemeine Hochschulreife

### Auslandsaufenthalt:

Juli 1995- Sep. 1996 Auslandsaufenthalt in Amerika

### Studium:

1996-2000 Biologiestudium an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Studienschwerpunkte:  
Verhaltensphysiologie und Soziobiologie  
Genetik und Neurobiologie  
Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik

2000-2001 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität-Würzburg, bei Herrn Prof. Dr. E. Buchner  
Thema: Gezielte Mutagenese des Cystein-String-Proteins in *Drosophila melanogaster*

2001-2004 Promotionsstudium in der Abteilung Elektronenmikroskopie am Biozentrum der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, bei Herrn Prof. Dr. G. Krohne  
Thema: Lamina assoziierte Polypeptide 2, Lamin B Rezeptor und Lamine: Untersuchungen an Vertebratenmodellen

## Publikationsliste

**Schoft, V. K., Beauvais, A. J., Lang, C., Gajewski, A., Prüfert, K., Winkler, C., Akimenko, M.A., Paulin-Levasseur, M. and 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

**Prüfert, K., Winkler, C. Paulin-Levasseur, M. and Krohne, G.** (2004) The Lamina-associated polypeptide 2 (LAP2) genes of zebrafish and chicken: no LAP2 $\alpha$  Isoform is synthesised by non-mammalian vertebrates. *Eur. J. Cell Biol.* **83**: 403-411

**Prüfert, K., Vogel, A. and Krohne, G.** The lamin CxxM motif promotes nuclear membrane growth. *J. Cell Sci.* im Druck

**Prüfert, K., Alsheimer, M., Benavente, R. and Krohne, G.** Properties of meiotic lamin C2 expressed in somatic cultured cells: an electron microscopical study. Eingereicht bei *Eur. J. Cell Biol.*

### Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Abteilung der Elektronenmikroskopie der Universität Würzburg angefertigt. Bei allen die in irgendeiner Form daran beteiligt waren, möchte ich mich auf diesem Wege bedanken:

Ein besonderes Dank geht an Georg Krohne, für die freundliche Aufnahme in sein Labor und die Möglichkeit mich während meiner Promotion mit diesen interessanten Themen beschäftigen zu können. Dank seiner ansteckenden Begeisterung, engagierten Betreuung und seinen niemals ausgehenden Ideen konnten selbst die obligatorischen Durststrecken ohne Weiteres bewältigt werden. Danke für drei tolle Jahre als Promotionsstudent!

Herr Müller-Reible danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Carmen Lang bedanke ich mich ganz herzlich für die große Hilfestellung am Anang meiner Promotion.

Ein großes Dankeschön geht an die gesamte EM-Abteilung besonders Nicole Wagner, Claudia Gehrig, Daniela Bunsen und Elisabeth Meyer-Natus für ein super gutes Arbeitsklima. Es hat riesig Spass gemacht mit euch zusammenzuarbeiten und unsere Kuchen-, Kekse-, Schokoladen-Gelage werde ich sehr vermissen.

Weiterhin danke ich allen Praktikanten, Zulassungskandidaten und Diplomanden, die mich in dieser Zeit begleitet haben und immer gut gelaunt für ein schönes Arbeitsklima im Labor gesorgt haben.

Manfred Alsheimer danke für die Überlassung seiner Lamin Konstrukte und besonders für die einleuchtenden Erklärungen bei meinen unzähligen Computerfragen.

Ebenso danke ich Natalia Prikhodovski für ihre Hilfe in der Zellkultur und Ellen Fecher für die schnelle Sequenzierung meiner "tausend" Proben.

Ein großer Dank geht auch an alle übrigen Mitarbeiter der Zoologie I, die alle ein großes Herz für uns "Kellerkinder" bewiesen haben.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an Christoph Winkler und seine Arbeitsgruppe, Cordula Neuner, Matthias Schäfer und Daniel Liedtke, die mir die Arbeit mit den Zebrafischen ermöglicht haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Bei Julie und Johanna möchte ich mich herzlich für die vielen Punkte, Kommas und sonstigen Verbesserungsvorschläge für diese Arbeit bedanken.

Ein ganz großer Dank geht an Stefan, ohne den ich wohl jetzt nicht da wäre wo ich bin. Danke für die aufmunternden Worte wenn mal was was nicht so lief wie es sollte und für die unendliche Geduld in den letzten paar Wochen dieser Arbeit.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei all meine Freunden und meinen Eltern bedanken, die mich immer unterstützt haben und mir immer wieder gezeigt haben, dass die Arbeit zwar Spass machen soll, aber auch noch andere Dinge im Leben wichtig sind.



## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst 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

Kristina Prüfert

**Genomische Sequenz des humanen LAP2**

Sanger Institut, Ausschnitt des humanen Chromosoms 12 NCBI34 (97330414.-.97451641)  
unterstrichen: Start- und Stopcodon  
blau fett: Exons; bekannt durch Harris et al., 1994; 1995 und Berger et al., 1996  
normal: Introns

kursiv: bekannte untranslatierte Regionen

grau unterlegt: keine Übereinstimmungen zwischen der Datenbank Sequenz und den veröffentlichten Sequenzen (Harris et al., 1994; 1995; Berger et al., 1996)

CGGCAAAGGCTGTGGGGAGGGGGCTTCGCAGATCCCCGAGATGCGCGGAGTTCCTGGAAGACCCCTCGGTCTGACAAAAGACAAGTTGA  
AGAGTGAGTTGGTGCACAACAATGTGACGCTGCCGGCCGGGGAGCAGCGCAAAGACGTGTACGTCCAGCTCTACCTGCAGCACCTCACG  
GCTCGCAACCGCCCGCCTCCCGCCGGCACCACAGCAAGGGGCCCGGACTTCTCCAGTGACGAAGAGCGCGAGCCACCCCGGT  
CCTCGGCTCTGGGGCCCGCCGGCCGGGAGCCGAGCAGCCGTCCGGCAGGTAAGGACGCGGGGCCGGGGCTACAAAGCGGGCGGCTT  
TGGCGGTTGCCGCGCGCTCGCCGCGCTTTCGAGCCCCCTCCCGGGCGCCCCCTCGGGCTCCAGGTGCGGGGCTGTCCCTGCG  
CCCCCTCGCTCGCCCTTCCCAGCGGGGCTGCAGCGCCGAGGAGCGAGGAGCCAGAAAGTTGGGGCCGGGGTTCGCTTCTTTGACG  
TGTGGTCTGGGAGGTGTGGAGTTGCGTTGGCGGCTTGTGTTGACGCGAGTCCGCGCTTCCCTGGACCACCGCCCTGCACG  
GGGCGTTTAGACGGGACTTCCGTGCCCTTTCGAAAGCTCTGGAGGGTGGCCCCAAAATGCTATAGGTTAAGTTCGAGCGTTTTCCCG  
CTTTATTAAGTAAATGACTCGCAGCAGAGTCTCAGAGCGCTCCCTGGAGGGCAACTGATGACACTCTAATTTCTAACAAAATTTGAA  
ATGAGGAAATCCCCTTTTTTATACTTTTGCCTGTGGAGGGCTTTTGAACCGTTTATGTTTTCTAGTTTTGTTTTAATTTTTCCCAGC  
AACAGGCCATCTTTGGCGGAACAGGTTTCATGCCGAATTTAAAGGAGCATTTTAAACTATATTTTTAGGCGCCTATTATAATTTTTAG  
TTTTTATTTATTTATTTTTTAGATGGAGTGTGCGACTTGTGTCAGGCTGGAGTGAATGGCGAGATCTCGGCTCACCGCAACCTCC  
ACCTCCCGGTTCAAGCGATTTCTCCTGCTCAGCTCCGACTCCGAGTGGGATACAGGCATGCGCCCGCCCGGCTGATTTGTGTA  
TTTTTTAGTAGAGACGGGTTTCTCCAAGTTGGTTCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAGGTGGTCTCCCGCTCGGCTCACAAA  
GTGCTGGGATAACAGGCGTGAGCCACCGGGCCCGCCCTGCAACAAATATTTGAAAATTGCAGTTTGGATTGCGTTTTCCACATAT  
TGGTAAATTTGCTTGAGGAAACGAAAGACTTAGGATTCAGGAAAATTTATTTATGACATTCTGGTGCATCAGTATTGCAATTTGGA  
ATGCTGATCCTGGTTAAATCTCAAATCGGCTCCAGCAAAGCATGTTTTGTTTTCAGAATAGTTTTGCTTTTTTACCTGTGGATTTAATA  
TGCTTTTTGTTGGTTTGTCTATGCTGCCAGTTACCAGGCTCAAATCGTAATAGGATGAAGCTAAAACCTAGTAATTTGGTGAACATA  
AAATGCCTTGTAAAGACAGTGAATGTGGTGTGTTGGAGTGTGTTGGAAATGATCACTAGTTTAAACGAAATTTCTCTTCAAAT  
TTACTTTAGTTTTTAAAGAACCTGTCTAATGTGTTTTCCCGCTACTCAGGCAGAAATGAAAGACAAATGTAATAGACACATGTAAT  
TAATTGAAAATCTTATTCTCGGCTTCAGAGAAGTTGAAAGTTTACCAAACGCTTTCAGTCCGGTGTCTGGCACATAGTAGTGCCAAAT  
ATTTGTACAATAAATAAAGACCAATCACACCTTATTGTTTAAACATCTTGTGTTGCGGAAAGCTTCTTAAATTTCTAATAAACAAT  
TTACTTTTGAATAAAAAGCGTACCCGCTTACCCGTTATGTTTTCCCTGCTCTGAAAAAGAAGGTAGTATTTAAACTCTTTAAGTAGAGTT  
GGTTGAGGCGGGCGCGGTGGCTCACGCTGTAAAGCCCGCACTTTGGGAGGCCAGGCGGGTGGATCACCTGAGGTCAGGAGTTCTAG  
ACCAGCTGGCCCATATGGTGAACCCCGTTTCTACTAAGAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA  
GAGAATCGTTGAACCCGGGAGGCGGAGTTGCACTGAGCCGAGATCGCGCTCCGACTCCAGCTTGGGGACAAGACGAGACTTCG  
TCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTTGTTTTGAAAATAATATTTAAATCAGCACACTTTATAAAAAACCTAATTTTTCTATAGAACCCTT  
CATTGGTCTCTGTGCAAAAGTATTAACCGTGAAGTTTTTGGTTGTATGTTTTATAATAGAATTACTGGTTATTTTATTTAGCGGGAT  
CTCGCTTTGTTGCCAGGCGGAGTGCAGGGATGTGATCATAGCTTACTGCAGCTCAAACCTTTGGCTCACGAGAGCTCCTGCCTC  
AGCTTCCCTGAGTAGCAAGGGCAACGGGGCATGCACCGCTACACCCGGCTAATTTTCTAATCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGT  
ACACAGGCTTCTGTGTTGTCCAGGCTGGTCTAGAACTCTGGCCTCAAGCAATCCTGCCTCAGCCTGGTTCCTATTTATTTGAGGA  
TGATTTCTTTACAGAAACAACCATCTCAGTTTTAATGTTTTCTATCAGCCACTTGGTAAAAGAGAGTTATGTCCCCATCTACCT  
TGATTTCTTTGGGGGTAAGAGACCTAAATGTAATAAATTTTTAATTAAGATTATCCAGCAATTTGAGTTCTTACCAAGTGTCTT  
AACTACTGGGTTTAAACTTTGGGGATTTAAATGAATGTGTTTATTTACTTGTCTGTCCAACCTCATATGTTAATTGAAGTTGGTTA  
GCATCATGTAATAAAGTTTGTAGTAAAATGAAGGTTTTTTTTTTTTTTGAGACGAGTCTTGCTCTGTGCGCCAGTCTGGGGTGGGTTGC  
GCGATCTTGGTCACTGCAAGCTCTGCCTCGTGGTTTCATGCCATTTTCCCTGCCTCCGCTCCGAGTAGCTGGGACTACAGGCGCCCG  
CCACCACCCCCAGCTAATTTTTGTATTTTTTAGTAGAGATGGGGTTTACCCTGTAGCCAGGATGGCCTCGATCTCCTGACCTCGTG  
ATCTCCCGCTCGGCTCTCAAAGTGTGGGATTCAGGCGGTGAGCCACCGCCAGCCAAATGAAGTAAATTTTTGTTGTTGTTAT  
TTGTTTTGTTTTGTTTGTGTT  
AATGATTTCTCTGCTCGACCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGGCGTATACTACTATACCCGGCTAATTTTTGTATTTTTTAGTAGAGAA  
GGGTTTTCGCCATGTTGGCCAGGCTGGTCTGGAACACCTGACCTCAGGTGATCTGTCCCCCTGGGCTTTCAAAGTGTGGGAATGCAA  
GGATGAGCGACGGCACCCAGCCAGAAGTCATGTTTTTTAGAGTACCTAGTAGGTCTATTGGCATGGTAATTAAGCTCTTTACGTTTCA  
TTAATTTATTTATCCATATAAAGAAAACCTTACTTCATAATTACAGGTTTTAAATGTCTTCTACCTGGAGTATTTAAACTCAAGAGGTG  
TTTACCCTTGACTGAGCTTAATAGCCATGCCAACAACTGAAGAAAAATATGGTAGTCAGCGTCATTTTCTGTTTTAAAGTACGTTAA  
GTACAAGTAGTATAAATTAGGAGTCTGTTTCGATGTTTTTATCAGCCATAGGAAAAAATAATTTAAGTTTACAGGAAAAGAAATTTAT  
AATAATTTATGTAATAATTTATCATGTCAATTCCTCTTATATGTACTATATTTTACGTTTTTGGTCAATTTTTAGCCCATATAAAAAATA  
ATACCAGTCAATTTCTTTTTTTTTCTTTCTTTCTTTTTTTCTTTTTTTTGTAGATGGAGTCTTGCTCTGTCCAGCAGCCTAGA  
GTGAGTGGCGTGTGTCAGCTCACTGCAACCTCTGCCTCCCGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGATTA  
CAGGTGCCACCACTGCGCCCGCTAATTTTTGTATTTTTTAGTGGAGACGGGTTTACCATCTTGGCCAGGCTGGTCTCAAACCTCCTG  
ACCTCAGTTGATCCACCCGCTGAGCCTCCCAAAGTGTGGGATTACAGGCATGAGCCACCGCGCCCGGCAACCATATTTTTCCCTTC  
CTTCT  
ATCTCGGCTCACTGCAACCTCTGCCTCCAAATTCAGCAATCTCCTACCTCAGCTCCTGAGTAGCTGGTATTACTTACAGGCACAC  
ACCCTACTCTGGTTAATTTTTGTATTTTTTAGTAGAGCAAGGTTTTACCATGTTGGTTCAGGCTGCTCGAACTCTGACCTCGTGA  
TCCACCTGCCTCGGCTCCCAAAGTGTGGAATTACAGGAGTGAAGCACTCACCCGGCAATACCAGGTCTTATTTCTTTTTTTCTTTT  
TTTTTTTTGAAACGGAGTCTCAGTCTGTCTATCCAGCTGGAGTGCAGTGGTGAATCTCGGCTCCCTGCAAGCTCTGCCTAGCTGAGAC  
TACAGGTGCCGCCACCACGCTGGCTAATTTTATGATTTTTTAGTAAAGACTGTTAGCCAGGATGGTCTCTATCTCTGATCTGGTGA  
TCTGCCCGCTCGGCTCCAGAGTTCTGGAATTACAGGCATGAGCCACCGCTCCCGGCTCCAGGTCATATTTCTTAAAGAATATTTA  
TAATCTTCTGCATAATGGAGTGGTAAAAGGAATAAAGAATAATTTATTTATATTTATAGGAGAAAGCCAAATTTATGTTTGGAGTTGCA  
GATAAGGGAGATTTTTAACATTTTAAAGACAAATCAAGCATTAAATGTGGATTTGGCAAGATTAACATTTGCATGCATATACCTTCTAT

TTAATCATGGGTTTATGAGGAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAGACGGAGTGTGCTCTGTACCCAGGCTGGACTGCAGTGG  
CGTGATCTCCACTCACTGCAAGCTCTGCCTCCTGGGTTACAGCCATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCAGATTAGCTGGGGCTACGTGGTGGC  
ACCTGCCACCACCCCGGCTAATTTTTTTTGTATTTTTTAGTAGAGACGGAGTTTCACTGTGTAGCCAGGATGGTCTGCCTCTCTGATC  
TCTGTAGCTCCCGCCTCAGCCTCCCAGAGTGTGGGATTACAGACGTGAGCCACCGTCCCAGCCTATGGGGAACATTTTTAATTA  
TAAGAAATTTGTTTCATTTTCAGCTTCTACCATAGTCTCTTGGATTCACTTGGTATAATGTGACAAAACCTTTGCATGTTAAAAAGTTTTGTT  
TTTTTTTTGTTTTCTTATTTCTAAGCTTTTTATTTTTATGTATCTTGTACCAATATTTTTAGGTGTTGAAACTACCTAGATTGTGGACA  
CAAAAATAAACATTTACAGAGTTGGCAGTCTGCCTTTTTGTTTTAAGAGGCAGAGCCTGAAGGTGTAGCTATTTGGATCTAGTGGAGCA  
TAATATTTCTGAATGATCTGTTCTGGTGAATTAAGAGTGTGTGTTTTGAGAAGGAGTCTTGCCTGTCATCCAGGCTGGAGTGCAGTGGC  
GCGATCTCGGCTCACTGCAACCTCCACCTCCCGGGTTCAAGTGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGGAGCTGGGATTACAAGCGTGCA  
CCACCATGCCAGCTAATTTTTTTATTTTTAGTAGAGACAGTTTACCATGTTGGTTCAGGCCGGTCTCAAACCTCTCCTGACTTTTGTG  
ATCTGCCCCCTTAGCCTCCTAAAGTACTGGGATTACAGCCGTGAGCCACCACCGCTGTCTGTGTGTTTTGTTTTTTTTTAAAGAGATA  
GGGTCTCGCTCTGTCCCTCAGACTGTAGTGCAGTGGTATGATCATAGCTCACTGCAGCCTCAAACCTCTGGGCTCAAGCCTCTGGAATA  
GCTGGGACTACAGGTGTGTGCCACCATGCCTAGCTGATTTTTAAAAATTTTTATAGAGATAGTCTCACTATGTTGACCAGGCTGGTCTTG  
AATTCCTGGCCTCAAGGGATCCTCCTGCTTAGGCCTCCCAAAGCGTTGGGATTGTAGGTGTGAGCTGCTGCTCCTGCCAAATATGAA  
TTCTCAATAGGAAATATTTGAAGACCTGGAAGAACAATAAAGCATGCTACCAATAGGAAATGTTAATTAATCAAAAATTTACCACC  
ACTGTATAATAAGGTGTTAAGTTTACAGACTTGTGAATAATAGAGTTATAGATTCAAATTCAGGTCTGCCACTTATTCATATGACACT  
GAACAGTGTCTTAATCTAAGTCTCTATTTTTACCTGAAATAGAGGAATAACCTAATAGCTACTTAATCAGATTGAGGAGTACATGCC  
ATTGCATATGTGAAGTGTCTAGTGTAGTAAATTAATAGCCATTAATGATTTCTGAATTTTTGTTTTTAAATGTCAAGGCAATATAGTG  
CAATGTTACTAAAAATAAATTTGGGAAACGAATAAGGTAGATAAGTGAAAGTGACATGTATATCATAGCATGCAGATTTCTGAGTTA  
GTGAAGAGCATGCTTGAACCTCAGTTTTCTGAGTTGTGAGATGGGATATTAGCATTTTATTCATAGATTTTTTAGGACTCTGTAAGTT  
AATGCAAAGACACTTGAACACAACCTCAGTACCTAATACATAAAGTGCCACTAGAATATATTGTTATGGTTCAACATCTTTATACT  
AGAGGTAGAGATTAAGGAATTAGAGAAGCTCATCGGTGATATCATAGAGCTGTTGGGTTTTGAAGTTGAAAAATACGTTAGAGATCAT  
CGGTTAGCATAGTAGGTAATTTTTGAGTGAACCTTAAAGTGATCTACTTAAAGGAACAAGCTTTCTGGAGGCAGAAATTTAATGCA  
ACTGATGCTTCCCTTTTTCTGACTGAAACCTGCTAATCATGTACAGCACACTGTCTCCTAATTTTTTATCCTTATTAATAATCTGAGATTTA  
TAAAAATGACATCACTTTTTCTGGAACTTTTTCTGACAGATTAAAAAACCACATGTTTACTGTGTGCAGTGGCTCACACCTGTAATCCC  
AGCACTTTGGGAGGCCGAGGCAGGTGGATCACCTGAGGTGAGAAATTCGAGACCAGCCTGGCCAACATGGTGAATCCTGTCTCTTCTA  
AAAATACAAAAATTAGTTAGTTCGGGTATGGTGTGCGCGCTTGAATTTTCAGCTGCTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCTCTTGAACC  
TGGGAGATGGAGGCATGCCACTGCACCTTAGCCTGGGCAACAGAGTGAGACTCCATCTCAAAAAAAAAAAAAATCACGTTTTTGGTTTT  
AATTTATCTGACTTACCTTATGTAGATTTGTTGGTCACTTATTTAAGATACTTTGTTTTCAGCTGATGTTTTTTCATTATGTTGAAGGAA  
ATATAATTGATTTCTTTCTTTCTTTCTTTTCTTTTACTTGGCGAAGTCTGCCTTATCACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCAATCTGGCT  
CGTGCAATCTCCGCTCCCAATTCAGTGAATTTCTCCAGCCTCAGCCTGCCGCTAGCTAGGACTATAGGCGTGTAGCCATCACACCTG  
GCTAATTTTTGTATTTTTTAGTAGAGATGGGTTTTACCCTGTTGGCCAGGCTGGTCTCAAACCTCTGACCTCAACGGGAGATCCTCCCT  
CCTCGGCTCCCAAAGTGCTAGAATTACAGACATGAGCCACTGCCGAGAATTTGTTTTTACTTAGATTTGATAGGCTGTTATTTCTAA  
TAAGAAATGGATTTTCAAAAAATAAATTAATTTCTTCCCTCCAGATTTGACAAAACATTTATCAGGGGGCTATTCCTGTATCAGTCTTT  
TTAGAAATGTTTAGATGCTTGAATAAGAATAAGGATGATAGTGCCTGCTTTCTGTTGCTTGCCTCAATGCTGCATCCAGATCAC  
CTGGGCTACACAATAACAACAGATTAATCTGGCCAAAGTGAAGAATCAGAAATGGGTAAGACCTTTCCAAATAGAGGTAACAAGAGTT  
AAGATTTGGGCTGGGTGCTTGGCTCAGCCTGATATCCAGCACTTTGGAAAGCTGAGGTGGGCAAAATCACAGCTCAGAGTTTGA  
GACTAGCCTGGCCAAAATGGTGAACCTGTCTCTACTGAAAGTACAAAAATTAGCTGGGCGTGGTGGCATGCACCTGTAGTCCCAGAT  
ACTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGAGTTGCTTGAACCTGGGAGGCAGAAGGTTGCAGCAAGGCAAGATGGCGCTACTGCACCTCAGCCTGG  
GCGAGAGAGTTAAGAGACTCCACTTGAAGAAAGAAAAAAGAGTTAAGATTTTTTTTGGAGACAGAGTCTTGTCTATCGCCAG  
GCTGGAGGGCAGTGGCATGATGTCGACTCACTGCAACCTCCGCTCCAGATTCAGCAATTTCTCCTGCCTCAGCTTCCAGGTAGCTG  
GGATTACAGGCATGTGCCACCACACCCGGCTAATTTTTGCAATTTTTAAAGAGACGGGGTTTTACCCTGTTGGCCATGCTGGTCTCGAA  
CTCCTGACTTCAAGTGTACCCACCCTTGGTCTCCCAAAGTGTGGGATTACAGGCATGAGCCACTGCACCTGGCCCAAAGAGATTTCT  
TTGAAAACCTCTCAGCGGGTTTGAAGTTGGAATTTCCGAGTGTATTTAGTAGTAATTTGAACATTTCCGTTGGTAGTGGGAT  
TATGTACAAATAAATTTGAACCTGATTGATTGTTTTTCCATGTTTTATTTTTATTTAAGCATTATTTAGTTTTTCTGTACTACCTGACT  
GCATTTTTTGGAAAATTTGAGTAAGTCAAGTAACTAGGATTAAGTTTGTGTTGATTAATCTTTTCTGAAAGAAATAAGTCTTAGAACT  
CTTAGACCCTAGGCAACTATTTGGATATTATGGTGTGGGTTGCTTCCAGATATGAGCCTGACAGTTCTAGGTGAGTCAATGTATGTGA  
ATTAAGCCTGCTAAAAGTACTCTCACTGTAACCTCTCCACAGCCGTCTATTTAAGATTTCTCGTAAGTTGACATAAATGTTCTTATGAG  
CAGTATTTTTTTGGTGAAGGTTTTTTGGCTTCTGATTATAGAAATGATAGCCATTAGCAGCTTTTTAAAGAAATTTCTCATATCTGT  
CTTTATTTGAAGTATTTAGGCAAGTTCCATGGCTCAGCCCTGATAATCTAGGACTTTGGGAGGCTCAGCGGGCATAAACATTTGGGG  
TCAGGAGTTCAAGACAGCCTGGCCAAACATGTGAAACCCGCTCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCGGGCGTGGTGGTGCACACCT  
GTAATCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCACTTGGACCTTGGATGCAGAGGTTGCAGTGCAGCAAGATTGCGCCACTGCA  
CTCCAGCCTGGATAAGAGTGCAGGCACAGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGATTTGATTTGAGCCTGACAATTTAGGTGAGAACATTT  
TTATTGTTAAAAACAGTAATTCAGTACATAGTCAAATCATGACTGATTTTTCCCTAATATTAATTTGAAAGTGAAGCATTCCATACAA  
CTTGATAATTTAGCCTTTTTCGTAAAATTTACTTTGATGTTGCCATTGTTAATTTAGCCATTTTTTTGTTTCACTACTCTGATGTTTTT  
TCTGTGACTCACTGAGGCATTTGTGAGGCTGTTGGCCAGCCTTAAAGGTAATCCGTAATTTTGTCTTTTTTATTTGTTCAACCTTG  
GAAATTTATAGTTTTTCCAGTAAATACTGCCTTTGTAGAAATTAATTTAAAACTTTCAAATTTTTCCCTCAAAGTTGTTTTCAAGTTAT  
TTTACTATTTTTTAGTAAACTGGTGGTACAGAAGTTAATCTGGTGACTAAACTGTGTACAGGTGATAAATTAACCATGAAGTCTGTCA  
GATTTCTTCCCTAAGTCATAAATACTGACTTAAAATAACTGTGTTACAAGGAGTTTACAGTCTGTCTCCTATCCTTGGGGTGGAGATT  
GGTTCAGGACCCGGCCATGGATATCAAACCTGGGGATGCTTTAGTAAGTCCCTTAATATAAAGTGGTGTAGTAACTACACACATCC  
TCCCTTATACTTCAGATCATCTCTAGATTACTTATAACGCCTAATACAATGTAAGTGTATGTAATAGTTGTTATACTGTATTTTTGT  
TAGTGTTTTTTATGTCGATGTCCTTTTTTTTTCCCAAGTATTTTTGATCTGTGGTGGTGAATTCACATATGTAGAACCACTGTA  
TTCATTTGGGAGAATGGAGGCCAAGTGTATTTCAATTTGGCTTCTTAAGTTCTCATATGCTGTTAAAGAAAATCAATTTGGCCGGG  
GCAGTGGCTCATGCTGTAATCCAGCATTTTGGGAGGCTGAGTGGGCAGATAACAGGTTCAAGAGATCGAGACATCTGGCCAAACA  
TGTTGAAACCCGCTCTACTAAAAGTACAAAAATTAGCTGGGCGTGGTGGCGCACACCTGTACTCTCAGTACTCGGGAGGCTGAGGC  
AGGAGAATCGCTTGAACCCGGGAGTCCGAGGTTGCAGTGCAGCAAGATTGCACCCTGCGCTCCAGCCTGGCAACAGAGCGAGACTCCA  
CCTCAAAAAAAAAAAGAAAAGAAAAGAAAATCAATTTCTATATATGATCTAAGTGTAAAGCCTGTATGGTAAAGTCTTAAACTTTCTG  
GATTAATTTAAATTTTTAAGGATTATCAAAAAGTTAGTAAGTAGCATTATGATCATTTAGATGAAAAATGTTAAGCCAGTCTGGCTT  
TACTTTCCATGGTTATGCTGATCTGTTCCGTTGCCATTGGAGTTATATGCTTTAAGAAATGAAATATAATTTTTGGTTATTTAGGCT  
GTGTGCAGTGGTTTACAACCTGAATCCTAACACTTTGGGAGGCCAAGGTGGGCTGATCACTTGTAGTCCAGGAGTTTGGAGCCAGCCTGG

GCAACATGGCAAAAACCCATCTCTACAAAAA...  
CTGTAGTCCCAGCTATTTGGGAGACTGAGGTGGGAGGATCGCTTCAGCCTGGGAGGTGGGGGTTGCAGTGAAC...  
TACTCCAGCCGGGTGACATAGCTAGACCCGTGTATCATTAAAAA...  
TCTTTAAGTTACTTGTCTGGCTGTGCGGTTTGTATGATTACAGTTCAACTTAGAAAAGTGTCTCCAATAAGT...  
TGGAAATTGCTAAGGCCTAATATTACTATAAACCAATTTGGTAGTGAGTTGCATGTTTATGTTATACAGGTTAT...  
CACTTTAATTTCATATGAAATGATTACTGGACTTTGTTTACAGAAAGCCACAAAAAACTGTATAAACCAGACA...  
ATCTAGATGTAACAGAGCTCACTAATGAAGATCTTTTGGATCAGCTTGTGAAATACGGAGTGAATCCTGGT...  
ATAAAATTTCAAATACAGTATCTTTTCTCTGAAGCAGGACCCCAAATTTTCTCTCTTTTGGTTTGGTGGT...  
GTTTGTCAATTAATCATTGTTTATCAGCAGAACCTGTGTTTCTTTGACTGTAATGAGTGAATAAAATGAGAGG...  
CTCCAAAATTAACCTCTATTGTTGAGATTGTTTTATATGGTGCTTATATCGTACTTTTTTTTTTTTTTTGGT...  
TTTTTTTGGAGACGGAGTCTTGTCTGTGCGCCAGGCTGTAGTGCAAGTGCAGCGATCTCGGCTCCCTGCAAG...  
TGCCATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGACTACAGGCGCCCGCTGCCACGCTGGCTAATTTTT...  
ATGGGATTTACCGTGTAGCAAGGATGGTCTCGATCTTCTGACCTTGTGATCCGCTGCCTCGGCTCCCAAAG...  
GTGTGAGCCACCGTGCCTGGCCACTTATATCGTACTTCTGCTGAGACGTGGGTCTTGTATGCAATTTGAG...  
GCTGGGCAAATTTGCCAAATAAATGAGTTAATGGCCGGGCGCAGTAGCTCACACCTGTAATCCCAACACTT...  
AGGATTTGCTGTGCCAGGATGGAAGAACAGCATGAGCAACATAGGAGATCCCATCTGCAGAAAATTTTAA...  
GGTGTCAAAAATCTATTGTTCCAGCTACTTAGGAGGCTGAGGAGGAGATTGTTGAGATGGTGGGGGAAGT...  
CCGTGATGGCTACTGTACTTACGCCAGGGGAGTGGAGCAAGACCCTGTCTCAAAAAAATAAATAAAGGG...  
GTTAGTGACAGACTTCTTCTAATGAAGTTATTAATTCCTAGCCTAGTACCCTATTTTTTTTTTTTTTTT...  
TGTTGCCAGGCTAGAGTACAATGGTGTGATCTTGGCTCACTGCAACCTCTGCCTCCAGGTTCAAGCAGTT...  
CGAATAGCTGGGATTACAGGCACCTGCCACCATGCCCGGCTAATTTTTTATATTTTAGTAGAGATGGGGT...  
TGGTGTGAAACTCCCGACTCAGGTGATCCCAACCTCAGGCTCCCAAAGTGTGGGATTACAGGTGAGCCAC...  
CTTTTTCAATTTATCATAAAAAGTACCCTTTTTGAAAGTCTTATCTGATTGGAATTTAGGAAATTAAC...  
ACTAAATACACTGGATTTCCATCGTTGGATTACTTTTTAGGTGATGAAGATTTTGCAGTGTGATTATGC...  
GCAATAACCTCAAGATGAGAAAATTCATTTTTATTATTTTTTTTTTTTGGACAAGGCTTTTGTCTGTGTC...  
GGCACAGTCATGGCTTACTGCAGCCTCAGCTTAGGCTCAAGCAGTCCACCTCAGCCTCTCAAGTAGCTGG...  
CCATTTCCCGGCTAATTTTTGTAGTTTTTGTAGGGATGGGGGCACACTATATTGCCAGGGTGGTCTTGA...  
CTCCACATTTAGGCTCCCTAAGTCTTAGGATTACAGGCATGAGTCACTGCATCTGGTCTTGTATCTTCA...  
AGTAGATTTGGTAGGTTTTGTCTATAGGTATAGTTGCAAAATAAGATTTAGATTTTAAATGATAAGTCT...  
TCATAAGCTTATTCATATACAGTACCAACAGATATATAACACTTTTTAAAAATGTTTTTGTAAAAAGT...  
TAGTTCATGCCTGTAATCCCAACACTTTGGGAGGCCAAGGTGGTGAATTTGCTTGAAGTTCAGGAGTT...  
GTGAAACCTTGTCTCTATTTAAAAAAGTAGCCAGGCATGTAGTGCACACTTGTAGTCTTAGCTACTCAG...  
AGGATTGCTTAAAGCCACAAGTTTCAAGGTTGCAGTGTAGCTATGATCGCACCCTGCAGTGCAGCCTGG...  
TCAAAAAAAGAAAATTTCCAAAAGGGAGACACTGAAAAATGTGTGTTATAATATCAGCCTACATTA...  
AAGCTGTTTCACTTAAGGCTATTTATATAACATTTCTGGACACATGTTGCTCTTAAAAAATCCATTA...  
GAGTTAAGGAAGAGATAACAGTTAATGTAACAACAAATCTATTTGGTTTTAACTGTCACTGATGTTCA...  
AATCAATTTTGTCTTGTGATATGTGTTTTCCATAAAAGGTCATTTTAACTGCAAAGTGTATATTTAA...  
CTTTTCCCATAACTGAATACAGGCATATTAATGTCTTAGAGTTTGGAAATTTAATCATAGTTATTTTT...  
TACATGTGATTTTTCTACCTTGGCAAGTACTATTACGTAGTAGTAGAGAAAATAAATGCAAGACTTCA...  
CTTTTTCAGTAGATGGTCTATAGAAAAGCCTGTATTAACCTACTATGTATTTTCATGCTATTA...  
CTGTTGTA...  
TCCCTGCCTCAGCTTCTGAGTGGCTGGGATTACAGGCGCCACCACCAGGCCAGCTAATTTTTGTATTT...  
CACCATTGTTGTCAGGCTTGTCTTGAACCTGTGACCTTAGGTGATCCACCCGCTTGGCCTCTGGAGG...  
CCACCAGTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAGACAGCATCTTACTTCTCTCCAGCTGGACAGT...  
GCAACCTCTGCCTTCCAATTTCAAGTGATTCTCTGTCTCAGCCTCCAAGTAGCTGGGATCACAGGCGT...  
ATTTTTGTATTTTAGTAGAGATAGTTCCCTGTGTGGCCAGGCTGGTCTCGAAGTCTGACCTCAAGT...  
CCCAAAGTGGTGGGTTTACAGTCGTGAGCCACTATGTCTGGCCGATTATATGGTATTTTTTTTTTT...  
AAAGGGTGAATAAGCTTAAATGTTGCTGAAGATAGTCTGAGCTGCATCCGTAATGAAACAATACAG...  
CTTAATCCAGGAACAACAGGAAAGCTATATGAGAAAAGTCTTGGAACTGGAACAAGGAACAAGAATCA...  
GCCAACAAATTTCTTCTTTCAGCAGAAAATACAAGGCAGAATGGAAGTAATGATTTCTGACAGATA...  
TAAATGATGTTAATCAAATGTATGGAATTTTTTACACTCAAATTCAGTGACCATGAAGAAAGTAA...  
ATACACAAATTTTATTCGTGTCATTAGAGTAATCTGTAATTTGATTTAAATACTTTTTATTGAAA...  
AATTCATAATTTCCATCACCTGAAATGCAAGTAACTTTGTCTTTTTTGTCAAAATCTCATTTTT...  
AGTAAAGGCAAAGTTTCTCGTACTTACCTGTACCTATCACCTCCACAGAAGTAACTACTATTATA...  
TATATTTACATACACATCTGTCTAATACATGGTATTATTTTATACTTTAAGAATAAAAAATTTA...  
TCACTTGTCTTTTCTTACTCCATATTTTTTGAATCTAATCTGTTAATTACATATCTGTTTATCTT...  
GCATTTAAATATGGCATAATTTTCTCTGTTCTTATTGATAGGCATTTAAATTTGTCGAGTTTTTGT...  
TAAAGCAAATATTTGACTATAATTTTAGTAGACTGTATAGTATCTTAAATTTGATCATGATGTT...  
GTGAAATAAATGTCCTTTAAAAATATAAATACAACTTGATTTTTGTAACTTTTAAATTAATATG...  
AGATTGTTTATATCTCAATAAGCTTTGTCTACCAGGGCAAATCTGGCAGATTAGTTCAGAATATG...  
GCACATTTTTTAGCAAAGAGGCCAAAGAAATAAATCAGCTCAACACAGGTAATGCTTAAACTTCT...  
GAAAGAAACACAAGAGTGAAGTCCACTAGGATATTGTTCTTTTTCTGAACTTGAACCTCTCCCT...  
AGGGTATTTCTTTTCTGAAATCTCCACCCGCTCTCTTTGGGAGTACCGAAGTACAGGCAGCTA...  
GACCTACCTAGGGAGCCTCTTGTGGCCAAAACCTTGCTGGCAGGGGACAGTTGCAGAAGTAGCCT...  
ATGCAAGTCTAGCCATGATAGGTGTTTAGAGAAAAGTCTTCTGTCATCTTCTCAGCCTGAACACAG...  
CTTCTCCTTCACTGATTAAGAAACCACCCTGGTACTATAAAGACATAGTAGAAAATATTTGCGGT...  
CCATTATGTCCTGAGAGGTCCATATTTAGATCAATCGCCTCTCCAGTAAAGGAAAGCACTAGAAG...  
AATTTCTCGCCACTTGGCCAGGCAATCAGAGATTATGTCAATTTCTGTGGTCCAGGGTGGGTAG...  
ACTCTATGCCCCACTGGATGTAGAAAACATACAGAAGAGAATTGATCAGTCTAAGTTTCAAGAACT...

AAAGTCCCTAGACTGAGTGAAGTCAAGTGGAGGAAAGGGATTAGGTTCCCTTTGTGGCATTTCAGAACATACCTGGATCCGAACCTGAT  
GTCTTCTTTTGCAAAACCTGGTGTCTCTCATTCACTCACTACCTTAGGTTAGAAAGTGGCTAAGCAATCACAGCATGATAAAATAGATG  
CCTCAGAACTATCTTTCCCTTCCATGAATCTATTTAAAGTAATTTGAAGAAGTGGCAGCAAGTTGACAGGCAGCTGCCTTCACTG  
GCATGCAAATATCCAGTTTCTCCAGGGAGGCAACACAGATATTCAGTTCCAAAAGTAGATGATGAAATCCTAGGGTTTATTTCTGA  
AGCCACTCCACTAGGAGGTATCAAGCAGCCTCCACTGAGTCTTGCAATCAGCAGTTGGACTTAGCACTCTGTAGAGCATATGAAGCTG  
CAGCATCAGCATTGAGATTGCAACTCACACTGCCTTTGTAGCTAAGGCTATGCAGGCAGACATTAGTCAAGCTGCACAGATTCTTAGC  
TCAGATCCTAGTCTGACCCACCAAGCGCTTGGGATTCTGAGCAAAACATATGATGCAGCCTCATATATTTGTGAAGCTGCATTTGATGA  
AGTGAAGATGGCTGCCATACCATGGGAAATGCCACTGTAGGTCGTGCATACCTCTGGCTGAAGGATTGCAAAATTAATTTAGCTTCTA  
AGAATAAGCTGGCTTCCACTCCCTTTAAAGGTGGAAACATTATTTGGAGGAGAAGTATGCAAAGTAATTAAGGCGTGGAAATAAACAC  
TAGTAAATTAAGGACAAAAGACATCTATCTTATCTTTCAAGTACTTTATGCCAACATTTTCTTTCTGTTAAGGTTGTTTTAGTTTC  
CAGATAGGGCTAATTACAAAATGTTAAGCTTCTACCCATCAAATACAGTATAAAAGTAATGGCTGTGTAGAACTACTTGTCTTTTCT  
AAAGATTGCGTAGATAGGAAGCCTGGTACAAAACATTTAACGCTTTCTAGATCACATATTAGTCTCTAAGTTGTTTTCTGTTTCTCTGC  
TTTACTTATGTTTTTACAATTTCTCCAAAACCTAAGAAAATTTCTAATTAGGATATAAGGAGTATTTACTGTTCAATAGAATAATATGCATC  
CTCCTTTATACCTAGGACAGAAATTAACATTTGTACACATTCAGAACAGTGTATGTTTCTTTTGGATACTTTTATCTCAGTATCTTT  
TCACGTTCCATAACTTGTCCATATTTTTGTCTCATATTTTCTACTTTTCTTTGTTATTTATTCATGTCTGCAACATCAATCATAGTAGT  
CTAGATTAAGTCAACTCAAGCACCAGTCTACAACTGTTACTTATCCACAGGCAAGATAAGCATGCACAAGAATTTAAATCTAGAGAT  
ACTTTTTAGTCAATGACAGGATTTGATTTTTTAGCAAAATTTTATTAATAGCTAAAGCAATGTATTGATTTTACACTCTGATGCAAGTA  
ATTTATCTCTTCAATTGACTGGTAGCAACCAATTCATGGACCAGTACCATGGACCACACTTTGAGAAACACTTCTTTGGATAATAATAGA  
TATCCTGGGATAGTGCATGTTACCATCTATTTTGTGAGATAAATGGGGCCTTTTAAAAAATAATACTTTGCTTTTATGATATATTTGAT  
TTTGTGGAAAGTTAAGTTTAGCAATATAGACTCTAAAAGCAAAATTAATTTTTTAAAGCCATAAGAAATTAATACTATATCCCAGTATCT  
GTATGTCTGTATAAAGCAGTGTATTATCATGTTTTCATTTCTGTGATTGTAAGTTAAGAGTCTTAAGTGCAGAGGATTGTGGAAAGTA  
GTAGCCTTAAGCATAATAAAATATGGTCTCTTGGGTACTCCCTCTGGCCATTACCACATTTCTTAGATTATATGTGTCCATTTTGCAGC  
TTTCTGAGAGTAAATTTTATTTGTGCTTCTGAAATGTACATGTATACATGTAACCTACTGAGTGCATATGTGATTTTTAAAAATGATTA  
CTGTAGAATGCTTCTGCAAAATCAATAAAGTTGTTAAATTTGAACAGTGTGTGTGGTCTCCAGAAACATGTTGTTCTGTGTGCTTTAT  
TCTTGGAGTTGCAACAAGTTAAATATTTGTATATGAACACCCCTTTTCCATTTTCATCATTGAAACTCACTTTGACATTTTCAAGTGTATA  
ATTGAAAATATTTCTGATTATGGTATGGTTTTTCTTCTGTTTGGAGACCATGTTTTTATTGACTGTTGGAATCTAAATTTATAAGAGGAA  
TTAATCTGTAAACAGATACCTTATTCGTTTAAACCGATTTCTATCCACTACTAATGGTTTTTTTTTACTTTGTGCTTTCTAGTTCTTAGA  
TTCTGAGTTAAACAAAGCATAAAATAGATTTTTATTTGCTGGGGGTTGTACCAAAACATAGATACATTTGACAGATCCATTTGATAGAAGTGT  
TGGGATAGTGGACTTGAATCTTAGTCTAAATAAAGACTGAACCTGTTTAAACTAATCTTGATAAAAACTACTGTTTCTGTTTTGGGAACCT  
GCAAGTATTAATAGATCTGTACTAAGTATTAACACTGGAAGTGTAGCAAGCAGATAGTGTCTTTGACCACTTTTCCACACA  
AGTTTCAAGTTTCAATGATAAACTTTAGAATTTGACTTCTCTTTCTGTCTCTTCAAGTAAAGTAATCTAACTTAAATTTTTTGGTAGTAGAA  
GTTTTAGAAATAACAACCTGACTAATTTGCTATACCATGATAAATGTCTACAAAAAGGGATTTTTTTTTTTTTGAAATGAAGTTTCGCT  
CTTGTCCCAAAGCTGGAGTGCAATGGTGTGATCTCAGCTCGCTGCAACCTCCGCTCCAGGTTCAAGCAATTTCTCTGCCTTAGCCT  
CCTGAGTAGCTGGGATTACAGTGTCTGCCACCAACCTGGCTAATGTTTGTATTTTTAGTAGAGACGGGGTTTACCATGTTGGCCAG  
GATGGTCTTAAGCTGACCTCAGTGTATCCGCCACCTCGGCTTCCAAAGTGTGGGATTACAAGCGTGAGCCACCATGCCCTGCCAGG  
GATGTTAATCAAAAACCTGCTTTTCAAACCTAGATCTTCAATGATGATGAAATTTAAGACTAGGAGACTGGAATATGAAGCCTATTA  
AAAAATACATATCCTTGGCTTTAGGTTAATAACTATCATGTTGACAGTGTATAAAGTATTGGCTTCTTTTCAAAGAAATGTTATTTTT  
TATTATAAGGACTGGGACGAGAAAGTACCTGTGATTGGTCTGATTTTTTCTGTGAACAAGATTCTTCTTTTACCTGAGTTGTACCTAGGT  
TTTTTATAACTACATCAAAAAAGCTTTTATATTTGACTTATTAATGTTATGGCAGTTACTTATAGAAGCTTGGTACTATATGGATTTTT  
TTCATTTTTTAACTTTCCCTTCTATGTTCCAAATTTTAAATTTAGTAAAGTCAACCTTTGCTGTACAGTATAGTATACCTGTATGGACAAA  
ACAATGGTAAACAATTTGTTATTTTTAAATGGCCTTTTTTCCACATCTAAATTTGTTCTTACTGAAAAGCTTTTCTGGGAGCATTTTGAACT  
CACTTTCATGTTCAAAGCTATGAGTCCAGATAAAGGAAAGGAGAAATAGGTAGGAAGAAGTGGTTGTGATGAAAGGGTAAGGGAGATA  
AGCAAAAATGGGATAAATAAAGAAACAGTTTTCAAGCAAAATGCAGTTAAACAAATTTGGACTAGTGGATTTACCAGTAGACTTGT  
TTTTCACTTTTAAATGCTTAAACCAAGGTTCCCGATTAATATAGGATAACATCATATTTATGAGTATTTATGAGTGTTCAGAGAAATGGT  
TTCTCCAATGTTATTTCCAGACTCTAAATAGAGCTCAAGCTTGAGAAGAGAGAACCCTAAAGGGCAGAGCAAAGACTCCAGTAACAC  
TCAAGCAAAGAAGATTGAGCACAATCAGTATCTTTAGTTTTATTACCACCGTGTACAGGTATAAATAACCTCTGACAACACTAATC  
CATGTTTTTAGCTTTAATGGTTGACACCCAGATTCAGCAGCGTCAATAAACCTAATTCTGTTGTTAAATGATACTAAAAATCTAAACT  
TTGTGGGTTTTGTGATGTTGATGACCTGTGATTACAGCAAAAGCAAATTTTTAATGTCTCATTTGTGTTGAGTCTGTGCTAGATGTAG  
TTCAAAGCCAGTTATATGTTGTTTTGAAAGAAATATTTAAAGGTTGGAAATATCTAGACACTTTTGTACATAATTTCTTTAAAGGCCAA  
TGAAGGGTTTTATATTGTTGTTTTGTCTCTAGATTTCTGACTTTGATTTTTATTTGCTTTGCTTTGCTTTGCTTTGCTTTGCTTTGCTTAA  
ACTCAGAAGCTAGTCTGGTCTAAGACTACAGTTTTTCTTTCTTATTTTCCAGATGAAAATTTACCTTTTCTATTGTGGGAGAGGCGTTTC  
AGTTTTTCAAAGGGAAATGTAGGAAACTAAGGAGAAAATAAGCATAGGTATAAATGAACAGAGAACAATTTATTGACTAACCTAGTAT  
TGTTTTACAGAGAACAATTTATTGACTAACCTAGTATTGTTTACAGAGAACAATTTATTGACTAATGCAGCATTGATTTGGCTGATGCTT  
TATAAGACAGCTATTCTAGAGTCAATTTCTTACCCTGCTATGTCTAGCTGGATGATTTGTCTAGTTGGTTATCTTTTCCATCTCCT  
ATTTGTCACTTTGTGTTGTTTTGTTGTGACGGAGTTTTGCTCTTGTCAACCCGGCTGGAGTGCAGTGGCGTATCCCATCTCATTTGCAAC  
CTCCACCTTGTGGGCTCAAGCATTCTCCTGCCTCAGCCTCCAAGTAGCTGGGATTTACAGGCACATGCCACCACGCTCAGCTCAATTT  
TTGATTTTTTATGATAGACAGGGTTTTACCCTGTTGGCCAGGCTGGTCTCAAACCTCCTGACCTCAGGTGATCCACCTGCATTTGGCCTCC  
GAAAGTGTGGGATTACAGGTGTGAGCCACCGCGCCAGCCTGTTTGTGTTTTTAAATCAAATCCTTAGAGGAATTTATTCTTGATTCC  
TTAAGGCAAGTCACTCTCTCTTCAATTTGATGTAGTTGATAAGTTGAATTTCAAGACGATTTGTTAGAAATGAGCTTTGTGACAAGAA  
CATACAGAGCATTGAATGAATGAAGACTTTGTTAACATAGAACCAAAATACTGGAATACATGTTTTATTGCCCTTTTATGTAGTAGTCTT  
AACAAATAGCTTCAGGAGCATGCTGAAGAATAAGGAAATAGGCCGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGCCG  
AGGCGGGCGGATCACCTGAGGTTCCGGAGTTCCGAGACGAGCCTGACCAACATGAGAGAAACCCCTGTCTCTACTAAAAATACAAAATTAGCC  
AGCATGGTGGTGCATGCTAATCTAGCTACTCCGAGGCTGAGGCAGGAAATCGCTTGAACCTTTGAGGCGGAGGTTGCTGTGA  
GCCGAGATCGGCCATTGCATCTAGCCTGGGCAACAAGAGCGAAACTCTGTCTCAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA  
TGGTCTAAGGGATAATTGAGTTGGAGGAATCTAACTGAGGAGCAGAATAAATAGTCAAAGGAGTGTAGGTTTATGATGACAGGCAGAAAT  
TAGACAGTGGCTTTATTGACAGAAAATTTAAACATGTAGAAGAGTGGAGGGAAGAGTTAATGACCTCCAGTCATAGATGTGCCACAG  
TTGTGATGTTTTTACCAGTTTGGTTTTCATACCCACACCTCCAGCTTTTTTAAATTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGACAGAAATC  
TCACTCTGTCGCCAGGTTGGAGTGCAGTGGCACAATCTCGGCTCACTTGAACCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCAGTTCTCCTGCTTC  
AGCCTCCTGAGTAGCTGGGATTACAGGTTCCCGCCACCATGCCAGCTAGTTTTTGAATTTCTTAGTAGAGACCAGGTTTACCATGTTG  
GCCAAGCTGGTCTGAACTCCTGACCTCAGGTGATCCACCCGCTTGGCCTCCAGATTGCTGGGATTACAGGCATGAGCTACCCGACC

TGGCAATAAATGCTTTTGATTTTATTTTGGCTTTTCCCTGGAGTATATTAAGCAGTCTTTGACATAGTGTTCACACATTAAAA  
AGTCAGCATTTTAGCATATATCTCTGAAAGATAAGTGTATTTCCAGTGACAATGCCAATATCACACCTAATAAAAATTAATAATTTATTT  
GTATCTAATTCATGTTTAAATTTCTCTAGTTTTCAGAAATGTTTCGTTTATGATTATGTTGTTCAAATCAGGATCCAGACAGGATCCACA  
TATCCGGTTTGTATTTTGGTTTGTACTCTCTCAAGTCTGTAGCTGTACCACGTTAACTTTTCTTCCCTCCATTTATTTGGTGA  
AGAAACCAGGTCATTACAGAAATTTCCCAACATTCTCGAATTTGTTAGGTTGCTTCTTTATGTCAATTAATTAGCTTCTCTATACGCTGCA  
TTTTCTGTAGAGTGGGTTAGATCTGTAGTGAGGCTATGCAGTAGACCTTTCTGTGATAGAAATTTTTCATACCTGTGCTATCCGTTACA  
GTAGCCACTAGCTATTGAATACTTCGATGGTGACTAGTGAGGCTGAGAACTCTGTTTGGCTTTGTGTTGTTGTTGTTTTGTTTTG  
TTGTTTTGTTTTTGGAGATGGAGTTTCATTCTTTTGGCAAGGTTGGTGTGATCTCAGCTCCCCACAACCTCTGCCTCCCAAGTTCAAG  
CGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGATTACAGGCATGTGCCACCACGCCCGGCTAATTTTGTATTTTATGATAGACGGG  
GTTTTCTCCGTGTTGGTCAGGCAGGCTCTCGAACTCCCAGCTCAGGTGATCCACCCGCTCAGCTCCCAAAATGCTGGGATTACAGGCG  
TGAGCCACTGCGCTGGCGAAACTATGTTTTAATTTAATTTAAATTAATTTCAATGACCATATGTGGCTAGTGGCTACCATATTTG  
GACGGCACAGATCCAGAGGGTTGGTCAGATCCATGTCCAGTTTCTTTCAAGAATACTTAAATGATATAGCGGCTTCTCTGTACATC  
GTTTTAGGAGGTATAGAATGTCTTTCTGGCGATGCTAAAATTAGTAATTGATTTAGATTTTGAAGATTAATCCATCTGTTATAAGAT  
CCACATTGCTCTTTCATTTAATGGTTCTAACAGCCATTGTCATATGATTATTGCCTAGGCTATTATTTTGGGTTTTTTTTATGTATT  
GAATTTATGATCAGTTACAGTCATCATTCTTTTTGATGTTCCATTGTGCCATCTGTAGCCATTAGGAATTACTAAGTTGGTTCCTGT  
ATTTTTAATTCCTTCCCCATTTATCTTTGATAGTTTCTTGTGTTTTCTGGAATAGTAAGACGTCACAGGCTCATGTATACTTCTGCGT  
CATGCCTGGAATCAGCCATGTTTCTAAGGAACCGTGATCCTTTTAAATAGATAACTATTGGAAGCAACAATTTGGATGCTGACATGT  
TCATTCTCATGGTTGTCAATGTTTCTGGGCTTTTTCAGTAGGTAGTGTAGGTAATCATGAATTAATGGTGATAATTTCAAATTTATA  
AATACAGGCTAATTTTGGGTTATGTTTACTTGTATCATTTTTTATCTTATGTGAATATCTTGGTCTTCAAATGATGTTGTTACTTAT  
GTAAGTATCACACATATATGTGTTTCTAAATAATACAGTATTACTACTAACAATAAGACTGTTAAATGCAATTTGGGCTTTTGTTTTC  
CTTGTCTTTAGGACATATCCCACTAGAATGTAATGTCAAACACTGTGCTTAAAGTCACTTGAAGAATTTTTTTGTGTACATACAGCCA  
CCAACTTAATAGTTAGGTTTTTTGTTCTCTAATGCTAGGATTGCTTTTTCTTTTATTTTAAATGTTGTTGAGAGTATAATGTAG  
TTTTATGTTAGGCAAAAATAAGGTAGAGTCAGAAATTTGGCTCTGTCTTTTCCCTCCATCTACAGATAAGCAATTTTATTGTTTTGAT  
TTATATTTTTGTTCTTTTTTAAAAATAAAGTAAATATATAGATTTTTATATGCTCCTTTTACATAAAAATGCAGCTGCTTTGTACAT  
TTCCATTTTTTAACTAAACCTAGAGATCACTCCATATCGGAACGTAGCCATCTTCTCATTGCTTTGTACAACGCAATTTTATGTGTTG  
CATTTTATGGATGTAATTTAATTAACCACTCTCCATTTGGTGAATATTTGAGTTGTTTTCAGCTGTATGTTGCTATGAATAATG  
CCAGGATGAACCATGGAGCAGCATTGTCATGTCCTGCTATTTTTTGGCAGTTTATCTTGGGGAAGCGTACCAGTAAAATTGCTA  
GGTAATTTACCATTACATTTCTCTGCATATGAGTTGAAGCATTGTCATTTCCACCAGCAGTGTGTTGAAAGTACTGTTCTCAAATGGA  
GGAATATGAGGCTTTTTTGTGTTTTGTTTTTAAATAAAGTTAGTACGAGTAACCATATTTGGTCATGTTTTACTTAAATGATAGG  
CTTCAAGATGGCTTTTAGTTATCTCAGGAGCTTTAGAAATTTACTTTCCAGACTGGAGAGATTTGATTTAATTTAGTTAGT  
TGGGGCATTGCTTTTTTTTTTTTTTAAAGCTCTCCTTGATGGTACTGTGCCACAAGGATTGAGAATCTCAGATATAAAACTACC  
TTTCCGTCTATTCAAATAGTTGGTAATTTGACTATTAAAAACCACTTACTCTGGCCAGGTGCAGTGGCTCACACCTGTAATCCCCGCAC  
TTTGGGAGGCCAGGTGGGTGGATCACCTGAGGTGAGGAGACCAGCCTGGCCAACTAGGCAAACCTGTCTCTACTGAAAATACAAAA  
AAATCAGCCAAGTGTGCTGGTGCCTGTAATCCAGCTACTCAGGAGGGTGAAGCAGGAGAACTCACTTGAACCTCGCAGGTGGAGG  
TTGCGGTGAGTGGAGATTGCACCCTGACTCCAGCCTGGGCAACAGAGCGAGATTCTGTCTCAAAAAATAAATAAAAATAAAAATTA  
AAAGCAGTTACTCTGTGATGTCGTGAATTTGTTTACAAGTTTCTCTTTTGACAATTTTGCATTCAGCAATACTTCTAATTTGAT  
AGGATGAGGAACCCAGAGCTTACAGATTGACATTTAAACTCTTATAATCAATTTCAAATATAGATAAATAACAAAACCATGATTATG  
AGACTATGTCTGTAACCTGTGGGTTTTGGTAGTATTACATCCAGCCATTTAGGCATATTTTATTGGATGACCCTCCTGTACAGGATT  
AAAGTTTTAAAAAAAATCTGTCTTTAATAGACATTGACTTGGACCTAAAACCATCAGTAATCTAGGTTAAATATTGGCGTGAAGCAA  
AAGTGACAACAGAAGGACTCTACTATAACTGATCATTGATGGATGTTCTGTAGTTAAAAGAAATTTAAAAGAACTCATCTGGTAATA  
GCGACTTCAAACCTGAAAACCTTAAACTACTTGAATGCGGAATTTCCGGCCCTACAGCTACAGAACTCAGAATCTGCATTTAACAGAA  
CTTCAAGTGATTGATAGGCACATTACAATTTAAGAAGAATGATCTAATGGGTTTTAAACCAGTATGTAAGAATGCTGGATTCTTTAA  
AAATGATCAGTGAACATAGAAATTAATCTGAGACTGAGAATTAATCTGAGGAGCTGTTTTCTGTCTTTCTGTAGTGACATGGATAGC  
ATTGAGATTTGAAAGTCACTTGGCTTGGCATTTCATTAAGAGTGAACAGGGTTTTTGTGGCTACCTAATTTTGTATCTGTTTTCC  
AAGAAAAATTTGACACCTGAGAATTTTTTAGTTCAAATAAGCTATATGTTGGATTATAATTTAAACTGATTCTACTAAAATGATTATA  
CCATATGAAAATAAATGTTTATGCTAACAATTAACAAAGTTGTATTTTTGTTTTTAAAAGGAACTGACTTATAATAGATGACTTTT  
TTCTAAGTCAATGATCAGTCTGCTTTTTGTTTTAGACAGAGATGTAGCTCCAATACTAGAGCCAAATAGCACACAGTGAATCAAAAAGGGA  
ACTGGTGATAGTTGATGTGCTTTTTTTCCATAATGTTTATAATTTGTGAGCTACTATAGGTGGATTCTTTAGTGTATTTTAGCACTTT  
TTAAGTGTTTCTGATGCTAAATATCAGTTCAATTAATACATTTAGGAATTTTTGAGGACATAGCCTTTGTTGAAATGCTGGCATT  
TGGAGACTTCTAATTTTCAATGGCTTCTCAGTGTGCCAGTATGCGGCTTATAAAGTATTTGATGTTAGCAATGACTTTTAAATGTTGTA  
TGCTTGAATAGAGCTATTCTCAAGCTGGAATACTGAGACTGAATGGACAAGTGGATCTTCAAAGGCGGACCTCTGCAGGCATTA  
**AGGGAATCTACAAGAGGGTCAAGAAGAATCCAAGGAAAAGG**GTGATGCAAGGCTTATTCCTTGGGTTTTCAGATTTGTAGGGTTTTAG  
TATTATTTTATATTTATTGTTTTTGTGTTTTTCAAACCTAACAG**GTGGAACCTCAGAACATTTTCGTATAGATGGTCCAGTAATTC**  
**AGAGAGTACTCCCATAGCTGAACTATAATGGCTTCAAGCAACGAATCCTTA**GTAATATGTTTCATAAACTATACAAGTGGTATTCTT  
TGTAATTTACCCCTTAATTTGGAATGGGGAGGTGGTGAATTTTGGCAAATCTCAAATTTACATGTTTTTTTTTTTTTAACAATTTAAAC  
TGATTTTCCCATATAGTTCTGAATTTAGAAATTTTCCATAAATCAATTTATGTAAGAATCTAATTCATTGTACAAGAAAGTAT  
AAGGATATTTTTTGTAAAAATTTGAAGAATGAGGCTTCATATGTGAGGCACTAAGTTGTGTTTGTAGGCTGTGTTGCTTAAATCTTT  
ACTAAGGGAAAAATTTCTAATATTACAGAGATAAAAATATCTTTCTTTTCTTTTAAAGTGTCTGTGTTATGTTTGGATAAATCTGAGTCTG  
AATAATTTGAATCTTGGCAG**GTGTCAATAGGGTACTGGAATTTCAAGCATGCATCTCTATTCTGCCAATCACTGAATCTCAGAC**  
**ATACCAGAAAGACACCAAGAAACCATTGACAAAGAGCT**GAAATGAATACAATTTAGATCGATGCTATCATTGATCTTTCAAAGA  
GGAAATATAAATATTTGTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGTGGGAGGGAGCAGAGCTTCTTTATTGGGTGGTGTGTGTAATATG  
CATAAATATTTTAAAGGACACTTTTATTAGTGAACAGAAATAAATACTAATATAGTTTGGATGCTAATACTACTTCTTCCACTGTA  
TCCCTCTAAGTTAGTTTCAAGGAGTGGTCAATTTCTGTTCTGCTTATAATATGTTCTGTTTGTGTCATGGATGCAAGTTGAAAGTG  
CTGCTGGGCTATGAGGGAGGCTACACTTTCTTTTGTGACGGTCAAATAAAGACTTTAACATAACTTTCATGTGTTGCTGGAATGGGT  
TAACTCCTGTGTAATTAAGCTTGAAGTACTAACTGCATGGTGCATTTAATTTGAATGAATCTTTACAAAAGGAGCCGAAACATTTAT  
TATTTTGTCTGGACATAAAGGTAACAGTAAAACAAGCTAAACATTTATTTTTTTTTTAAATTTGGGCATATTGCATTGACTATAATTTT  
AAAACATATAGTAAAGTTTGTAAAGGTTTCATGTTAAGTATCTTCTGTATTTTATCTTTTACTACAGAATTTCTTAAATAAATGAAGAAAC  
AGTATACTTTTTTTTTTTTTTGAACCGGAGTCTTGTCTGTGCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACGGTCTCAGCTCACTGCAACCTCCGC  
CTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCTGCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGATTACGGGTGCCCGCCACCAGCCAGCTAATTTTTGTATT  
TTTAGTAGAGATGGGATTTCACTATGTTGGTCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAGGTGATCCACCCGCTCAGCCTCCCAAAGTG

CTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCGTACCCGGCCCAACAATATACTCTTAATAGTAAAAAACAAAATCAATGAGGGAATTAGCATTGCC  
ATGTTAGATTACTGAATTTTTTCCCCCAGTTATTTAAATGTGTGGCAGTTTTTCACTCCAATAACCACATATATAAGGTATCTTCAAG  
AAATTTGAAGAGAGCCTTGGAAAGCATGTGGATACCTAAATAATAATTTAGAAATGGCAGCTGTAAAATCTATGATAGATTTAAAGGCAT  
TTTGTTCTCTAAAACCTACTATTTATGTTTTAATTATTGCATGTTTACACTAAAATTTAACTTGTGGTTGTTTGTCTGTTTCTTA  
TTAG**GTGGGAGAAAAAACAGAGGAAAGAAGAGTAGAAAAGGGATATTCTTAAGGAAATGTTCCCCTATGAAGCATCTACACCAACAGGAA  
TTAG**GTATTTCAGATACATTTAAACAAGTACTAGTGTATTCTAGTAGGGAATCTTTATTTTTAATTCTTCATCACAAAGTTACTGTACTT  
CTGCTCAGAAATTAAGCTGTTTTTTGGAGCCAGGTACAATGGTACATGCCTGTAGTCCCAGCTACTCAAGAGACTAAGGCAGGTGGATT  
GCTTAAGCCCAGGAGTTCGAGACCAGTCTGGGCAACATAATGAGACTCTGTCTACCCACCGACTTTTAAATAAATAAGTGAACGAACTG  
TTCTTTTGGGAGCAGTTTAATTCCCCTAAGCCCACCAGTAAATATCTTGAAAGTTGAATGAGTTTCAAAATGCGATTGGTAAATGGA  
GGATTTTAAATAAATCACTTACTTACTACTTAAATTCATATGTTAAAATCTAAACGAAAATCTAGTGAGAAATAGTTTTTCCCCCTAA  
GTTTCTCTTTTCTAATTGAAAAGGCTGTGTTTTATGTATCTTAATTTTAACTGAAAGAAACACAGCCAAAACCTGTTTGTTTTTCTCT  
TTACTCTAAACATGAGCTTTGAAGAGCCTTTAAGAAGGCAGGTTTAGTACTATTTATCAGTGTCTGAATATCTTTTTCTAATAAAG  
GATGCATCGAACTTTTTTTTTTTTTTTGAGACGGAGTTTTGCTCTGTTGCCAGGCTGGAGTACAGTGGCGTGATCTCGGCTCACTACA  
ACCTCCACCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGATTACAGGCACCCACCATCATGCCCGGCTAATT  
TTTGTATTTTTGTAGAGACAGAGTTTACCATGTTGGCCAGGCTAGTCTTGAACCTCCTGACCTCAGGTGATCTGCCCGCTTGGCCTCC  
CAAAGTGC TGGGATTGCAGGCGGAGCCACCATGCCAGCCCATCTAACTTTTAAAATAGAAAATATGTAGAAGTTTTAAATAGGTTGA  
CTGACCTCACTGCTTTATATGTATCAATTTTCTACTGTTACCTCAGGGAATGTGCTTGGAATTAGGAGTGGCAATGACATTTTATGTTA  
TTTTCTCTAAATCATGCCTTTATCTAAAATTATTTTTCTTTTCTCTTTCACTCCAACAG**TGCTAGTTGCCGCAGACCAATCAAAGGG  
GCTGCAGGCCGGCCATTAGAACTCAGTGATTTCAAGATGGAGGAGTCTTTTTCATCTAAATATGTTCCCTAAGTATGTTCCCTTGGCAGA  
TGTC**AAGTCAGAAAAGACAAAAAGGGACGCTCCATTCCCGTATGGATAAAAATTTGCTGTTTGTGTTGTGGCAGTTTTTTGTTTT  
**TGGTCTATCAAGCTATGAAACCAACCAAGTAAATCCCTTCTCTAA**TTTTCTTCATGTTGACCCTAGAAAATCCAACCTGAATGGTATCT

**Genomische Sequenz des Hühner LAP2**

Sanger Instiut contig36.87.1.141571; Ausschnitt von Chromosom 1 (Position 43431143 - 43569007)

unterstrichen: Start- und Stopcodon

blau fett: Exons; bekannt durch Datenbank-Sequenz (EST 335862, BBSRC Chick EST

Datenbank)

normal: Introns

kursiv: bekannte untranslatierte Regionen

*CGCTGTGGAGCTGGGTGCCTGGCGCGGGCAGCGCTCCCCTCCTCCCGCGCTTTGTTGGTGCCTCGGCGGGCGG*  
*CGGCG***ATGCCCGAGTCTTGGCGGACCCCTCGGTCTGACGAAGAGAAGCTGAAGAGCGAGCTGATCGCCAACAATGTGAGC**  
**CTGCCGGCGGCGAGCGCAAGGACGTCTACGTGCAGCTCTACCTGCAGCACCTCACCGCCCGCAACCCGCCCGCTGCG**  
**CGACCCGACTTCTCCAGCGAGGAGCGGGAGCCACCCCATCGCGCCCGGGGCGCGGGCCCGTCCGACGGT**  
GTGCCCGCGCGCCCTCCCGGGCCCTCTGTCCGCCCTCCCGCCCGCCCGGCTCGGGGCCCGCTGGGGCGCAGCGCT  
CCGCCCGCCCGCCCGGGCCCGGGCGGCCCGGAGCCCGCCTGAAGCGCGCCCGGCAAACAGCCCCACGTGGAAGGCT  
GTGAAGGAACGGCTTGTGTTTTGGTTAATGAAGTGCCTGTTTTAGTACGGTCTGTTAATGTAGCTGTCTGCTCCTACGG  
CTGAGCACGTGTTTTAGAGCCAAGTGTCTCTGTGTCTGTTAGGCGCTTTTGGATGTAGTTCTTAATATTGTGTATGTTTT  
TTTTCCCTTTGGATATGCGTGATTTTTCCCTTTTAACTCTAACAAGCGCTATGTAACGCTCACGTGTTATTTAAGCGATTG  
TTTAATTCATAAATGAAAAGTGAACATGTCTGTCTGGCTCATAAGGATTTGTTGGCTGCAGGAGCTAGATCTGTGTGACATT  
ACATTACTTGTATTGTATCTGAATCGTCCCCTTTAAAGCTCACTTGTAAAGCCAGAGCAGAGACCCTTTAAAGATATT  
CCGTACTTCAAACCTAAAAACAACCCACACCAACAGCACTCAAACCTGATAGACTGAAAAATGCACCTAGAAGATTTCTAATC  
AATGGTTCTGCTTTTTCAACATCTGCCTAATTAACAACCTGACGTTTTCTGTGGGAGAAATGTATGCAAGACTTAACACTGA  
ACTCAGCACTCCTTAATATAGTGGTCCGCTGCAGCGTTTTTAAGTGCTTCCAAGTGAATAGGATGAGTTGAATCCAGT  
GTGTAAGCAGCTTGTGTCAGGAAGGAGTCCCTGGAGTTTTGTTGTTTTTCCCTTCCCTTTCCAGGGCTTGAGCTT  
AAACAATTAGAGGTGGCTTTTCTGTGTTTACACAGTGGGTGTTACTCTTACACTTTTACTTTTGTAAACAATGTCTGTAAGG  
CTCTCTGCTGTTTTCTGTGCTCTTGGTTAATTTTCAGAGCAGTGAATTTGAAAAACGTGACAGATATTTCAAGGGCTGCTGGTGGC  
AGCTGTTTGGATTTGAGTGTCTGCATCCTATTTGAGGGGCTCCGTTATGGAACAGAGTGAATATCTTGATAAGAGGGAAC  
AGAAGGAAAGCGTTCAGACCTCTGAAAGAGGGAACGAAAATATGGGGCAAAGGGAAGGTACCTGACTGCAAGGCTCTGTG  
GATTTAATAGAAGAACTGTGATTTTTATCTAAGTGTCTTCTAAGGCCCTGGAAACAAAGCGGGTTTGGCACTCTGTTTTT  
CCCTCTGTGTGTAATTTGATTGTTTTATCTTGCCTATTTCTTTTAAAGTGTGCGCTTAAAGAGGATGGGAAAAGGTGGTGTG  
GTGACTTAAAGTGGGGCGGTCTGACTTGCAGTGATACAGTAAACGTGGATAAAAAGGAACAAAATGCAGTGTCTACTAGTTT  
CGTTTTTATTTGTGTGGAGCTTAGACATTTGGCATTGTGGCTTGGGGGAAAATGTAACACAGGTGTTGCAAACTTTAGG  
GGTCACTGATGGCATCTTCTGTGCTTGTGGCAGTCTTAAACAATAAAAAAATGAAGTGTCTTAATTTAGAAATGCAAGAA  
GACTCTTCAGTGCAGATGACGCATTCGCGGCTAGAGTGAACCTGCTAAAATCCGTTGGATAGATTTGCATCTTCATAGGATCA  
TAGAATGGCCTGGGTTGAAAAGGACCACAATGATCATCGAGTTTCAACCCACTGCTATGTGCAGGGTCAACAACCACAGAC  
CAGGCTGCCAGAGCCACATCCAGCCTGGCCTTGAATGCCCTCCAGGGATGGGGAGGGTCTGCCCCGTTGTGATCTGTTATTT  
CTTTATTTCTTTAGATGGGGTTTTTTGTTTTTAAAGACTATAGAATTAAGGAACTCGATGCAGAAAACCTGCTCTGTCTG  
TGGGTAACCGGTGCCCTGATGCGTGGAGGAGAGAGAGAACAGGACCAGAAATGTAAGCAAGAGGTGTTTTGAGT  
AGAGAGGAGCAAGTGAACCTGTCTGATGCGCTCAAGTTAGTGTCTTACTCACTCGGAATACCAACACAGCAGCGTCCGCT  
TTGTGCTCCACGCGCCCTGCCTGCTAAGTCCCGTCTGCCGAGGGGAGCTGTCTGTGCTTCCGGTGTCCGATCGTCCCGG  
CCTGCCGCACTGTGCCAAATGCATCGCGCCCTTTCTGTGTGCAGAGACTGCGCTCGACGCAGCACCCCCCTTCTGTCTGCG  
CGGGCGGGGCTGGAGGGCGGTGCCGCCGAGAACCCCTCCTTCCCGTTCGCTGGGGTTTCTCCGGGTGTTTTTGGGA  
AACGAGTTCAGCGCAGCGCTCTGAGCGTCTGTGCTGCAGCTGCTAGGAAGGTGGGACTGTGTCCAAGCTACCCCTTCTCAAAC  
AAAAACCTCAATATGCTGGTGTGTAAGCTGAGGTGGTGTAGGACAAGTGTCTTTCCCTCCAGCGATGTTGTTCTGTCTCA  
TGCTTGTTTATATTTACTTCTTTTAACTTAACTCTGTATACAGCAATGGATATACATGTGATTAGGATGAGTGTCTGAGCAGATCC  
AACCTGAAAGGATTTTTTTTTCTGCAGGGTGTTCAGGCCCTGGGGATGCTTTGGAATGGCAGCTCTTTAGGCAGACAGTGC  
ATTTTTCTTTTTCTTTTTGGAACGTGATGTTTCAACCGAAGTATTTTAGTGTGGTAAGAGCTTGTGAAAACCTCAGTCTCTTA  
TGAACGTAAATGTGGCGCAGTAATGGCATGTGCTGCGTCTGCTATGCACAGGGTCCCGTCAAGATACATAAAGTTGACTAAGT  
AGAAGTAAACTTAAATATTGTTTCAAATTTACAGGGAAGCTCTTTCAGAGTATCTTTAAAATGTGAACGCTTCTCTAAAGT  
AACACTTATCTAATGTTTTGGGAGGGTTGGATGTGCTTTGTTGTAGCCGTTTATGCTTACCATGAGAGGTAAGCATATAATG  
TCTTAAAATGTTACTTCTCTGAGCCTCACTTCTGTAGTGTGCTGGAATATCCAGCTCTTCTAGCTGTACTGATGTGTATTGT  
TCTGTTGTTTTGTTGTTCTGGGGGAAAGCTGTTTTCTCTATTTTCACACAGTGGTGTGTGAGGATAGTGGCTGGTACTGGAGA  
CACCTTTTTCTGCAGGGGAAACTGTGTGGGTGCTTATGGTATTGGTTGGTCTTAAAGCTGGATGTCTGGATGGATATTTCTAG  
CTCAAAGGAGAAATAACTACAAAATAGTATTTTTGCCTTTGTAAGAGGTAGATGCTTTAAAGTGAATATCAAAAATATCATCT  
TGATGTTGTTGCCATAACAGGAGCTGTTTCAAGGCTCAGAAGGTGTAGTTTTTTCATGACTGAACTTACTGGTCTTTTTATGTCT  
CCCTGGAAGAACTTTTGTGAAACACTGAGTGAATTTTGGACTTCTAAAATGGTGATTTGGGAAAGATCACTCAGATGTCTTC  
TCGCTTCTGTTGATGAAGGTGTAATGAGGACATTTGCAGATGAGAGGCTATTCTTAACTTTATAGGAAATACCTATCAGATA  
AAGATGGCTTTTTGTTGTTTTTAAATTAATACAGTTTTTAAAAAACAACAACACTAGCTTCACTTGTAGTGGTATGATAGG  
AATAATATCTTTCAGCTGATATAAGTGTACAGTCTCAACTTCTCCACTGGAATGGGAAGATGGTGAATTTGGAAGTTA  
TGAAGATGAGGACCATGAAAGATGGGACTGCATGCTTGGATAGGTGAGAGAATGTGAAGTTTCAATGTGCTGCTCAGTGCATCTA  
CTCATGTTTTCTGTATGACTATCTCTGATTATGATGTGTTGTACAAAATGTGACTCAGTAACTTCGATACCTTGCCTTTGA  
GAGCTTGTAAAGTCTTTAAGTTCGTGTCAGTTTTCTCAAGCTCTGTCTCCTGGTCAAGTGTTCAGCTGTCTGAGTGGTGAACC  
ATCTGTTAGTTGATTTCTTGTATTTGCTTGTCTCTGAACTTCTACTCTTTCATCAGATTTCTTTGAAAATAGCTCTTCCCAT  
GCAGTATTCACCTGCTTTCAGGACACATGCATTCCTTCACTGAGTAAAAATGGAATTTAGTGACTGGGGGTGGAGGAGGAGGA  
GGTGTAAAGTCCATAAATCTTATCGTTTAGGACTGCTACTTTGCATAGACGCTGAGGTCTGGCAGCTCTTCTAGGGGTAAAA  
GGCAGAATTTCTCAAAGCTGACTTTTCAACATCTCTGATTAACCTGCGGTATAATTTCCATTGTTTTATCTGTTTTGTCTATAAA  
GCTTTGTAATGTATTAGTGTTCAGACAAAATTATACTATGGCAGAAAATGTTTGTATATAAATTGAATAAAAAGTGAAGGGG  
AATAGACATCAGTGTTTCAACGTGCAAGCCTGGCAACTGCGGTTACTTATCTTTCCGAGAGAAATAAGCGTCAACAGGGATG



ACTCTGTACAAACTGGAGAGTTAAAGAGCATCCGTGTTGACATGATTTGGGCTTCCCTTAGCCTGTCTTAACCTCATTACAGAGGA  
ATACTAAAGAAGCCCTGAGCCTTTCTGCTGCTGGTGTGAAGCTGCACCTGTTTGAGATTTAAAGCCCTTGAATATCTTAATGT  
GGTGCCATTTAACTAAGGATTTGAAAATACTTTTGTAGTACCATAGCTGTTTGCATAATGACTTCTTGATGATATTACTCCT  
GCTTGTCTGATGATCAGTTCTGGAAGCTAGTGAAGTACAGTACAGTCTGCCTGACAAACTGACCTGACCTGCTGCTTACTTT  
CTCATCAGCAAGAATAGCAAAGGTGAAGTAAGCAATAGCTTTCGAAGTATGAATTCACATAACTTAAACTTTTTGCTCCTTCCC  
TGTTAGTGAAGAAGGTGGAAGTTTTCAGTGCAGGTAGATAAATCTGAGAAGGTGACCTTTTCTATTTTGTGTTTTCTGTT  
GTTGTAGAAGTGCAGCTGTGTGGGAGTCCCATCCTTATAATTCACTTAAACACTTGTTTGGAGGCTTGTGACTATCTGATG  
TAAACTGAGCATGACAGATAGCTACCAAAGTCTATCTATTTGATAGGAATGGATCTCTCTAGTGAAGTATGCTGATCCTCT  
CATTTTTTTTCTAGAAAATGGCCATGGCTGGATATTTTTTTTCTTAATGCTGCTAGCTCTGGTTGGGATTATGAGATCCT  
CTGATAAGGATTTGTGAGTCTGGGTACAGCGCTACAAGAATATTTACAGGATTATGGGCAAAGTACCACCTTACTTCAGCAAA  
TCCTGGTGTTCACCACAGTTTTTGTTTTAAACACTTAAACTTTTAAATTTTTTCAATAGACACAAGATCAGGAAAATGTGGGTGT  
TCTTTTGTGTTGATTTGTTATCATTTCAAGTGGGGGGAAAAAATGATGAATTTTAAAGCCAATCCTTTTGACCTGTCTCCGA  
GGATACTCTCATGAATAAGTTGCCATGCACAGAAAGTGCAGTGGTGTGTTTGTAGTATAACAACAACCGTGTGTTGCTGAGAT  
TCATGCTGTCTACAGACAGGACAGGAAAGAAATTTTTTCATCCCTTGTGCTTCTGGGACTGATCCTTAGTAGTTAAGTTTCA  
GCTTTTGAATGAGTGAATCATTGCTTCCGCCGGGTGAAACACTGGCTGGATGGCCGGGCCAAAGAGTTGTGGTCAATGGA  
GTTAAATCCAGCTGGCAGCTGGTTCATGAGCAGTGTCCCCAGGGCTCGTACTGGGGCTGCTTCTATTTAACATCTTTATTA  
TGATCTTGATGAGGGGATTGAGTGCACCTTAGTAAGTTTGTGGATGACCAAGCTGGGAGGGAGTTTCATGTGCCTGAGG  
GGAGAAAGGCACCTACAGAGGACCTGGATAGACTGGATGGGCCAGGCAAACTGTGTGAGTTTCAATAGGGCCAAGTGT  
TGGGTCTGCATTTTGGTCAACAACCCAGGAAACCCTACAGGCTTGGGGAGGAGTGGCTGGAAAGCTGCCTCATGGAAAAG  
GGACCTTGGTGTACTGTTGGACAGTCCGCTGAATATGACCAGCAGTGTGCCAGGTGGCCAAGAAGGCCAATGGCATCCTGG  
CTTGTATCAGGAATGCTGTGGTGTGAGCAGGACTAGGGAAGTCACTTGCCTTCTACTCAGCATTGGTGTGAGTCTCACCTTGT  
CTGTGTTTCAAGTTTGGGCACCCCAATACAGAAAGGACATTGAGGTGCTGGAGCAGGACTAAAGAAGGGCAACAAGGCTTGTGA  
AGGGCTTGGAGAATACTCCTATGAGGAGAGACTGAAGAACTGGGGCTGTTTGTAGTCTGGGAAAAGGATGCTGAGGGGAGAC  
CTAAATCTCTCAATATCTGAAAGTGTCTGCAGTGTAGAGCGGGTGTGCTCTCTCTCACTGGTGACAGGATGAGGGGAAATG  
GCCTCAAGTTGCACCAGGGTAAGTTTAGGTTGGATATCAGGAAAACTTCTTTACAGAGAGGGTGTAAAGCATGGGAATGGG  
CTCCCCAGGGAGGTGGTTGAGTCCACCTTCTGAAAGTGTAAAAAACCGTTTGGATGTGGTGTCTCAGGACATGATTTAGCA  
GAGGTTGTTAGACTTAGGGTAGTATGGTCAGGTTGTGGTTGGACACGATCTTTAAGATCTTTTTCAACCTGAGTGAATCTAT  
GGTCTGCTTAAAGGAGAATAAGTATTTCAAAAAGTAAAGGCTGAAGACCTCACAGAATCAGGATAATCAATGTGCCTGGCTGT  
GCTATTGAAAGACTCAGATTACTTTTACTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTT  
CAGTTTGTGGTAAATGTAAGTATACAGAATAATCAACAAGGAAATGGTATTTGGAAAAAATAACCAAGCTACTATTATA  
TGTGAGTTTACTTGCATTGCTGGATCGTATTACTGATAAAGTTGCATTATGTCTGATGAAAAGTTTCTGTAAAAACATCTGATAG  
AACACCAAAATATTTCTGCTGTGTATTTTCCGACAGGACAGCCTTCTGTGTGTGTAAAGTATAGAAAATTAATGATATC  
TTAAATATGGCTTTTCAAGTCTTTTAAAGAGGCACTGGAAATTCATGTCTTGCACCATGATAGTTTTTACAGAAAATACCAAAGT  
ATTTATCCAGTCAATCTGACTAGTGTGTGTGAACACTGGAGATGCTCAATAGTCTAAACAGATCCTAACAAACAAAATCCAGCA  
TATGTTTTGAAGCTCTTCACTGTTGCAACGTTTTCAGTAGTCCAGGAAGTCCAGAGATGAAAATTTCTTATTAATACAATAACAC  
TACTTTGTGTTAAGTGTAACTAATAGATTTAAAAAGTAAAGTACAAATTTCTAATTTCTGCTTGCAGTGCAGGTTGCTTGGT  
TTTTGCTACAGGATAAATAGTCCACTTTTGTAGATACTTGAAGCTTAGAAAGATTTTTTTTTTACATGATAAAGGAAGGGAATGGCAGATTC  
ATAGCTCCTTTTATCAGTCAATTAGACAAAAGTGGCCACTTTGATTTTTATCCATTCTTTCAGACTGCTTGGGTCTTTTTCTTAAA  
ATTAAGAAAACAGTGAAGTTTCAAGGATTCTATTTGCTTTTTCAGCTGTTAATTTTAAAGTTTCACTTGTGTTTACAACAAT  
CCAGGATTTAAAGAAAATCTAAGTTAATTAGGGAGGCAATTATATGGGAAAATCTTATACAGTTGCTGTTTAGCTTTAAAAATA  
TCAAGACTAAGCTTGCCTACAAACAGTGGTAGAAGTGCACAAAATGCTGTCTAGTTACTATTGACTCATATCAATGGTCTT  
CTTACAGTCTTTTGTGCTATCTTAGTAAATAGATCAAGAAAAAGCTTTTAAATCATGAATGGATGTTACAGCTTATTTACAT  
TGGGAATTAAGTCTTTCAATAAATAGCAGGAGACTTAAAGTCTTCTGGGCAATCAAGTTGAATCACATTAAGTGTATTT  
ATTTGTGCTGTTTTATATACTGCAACTTTGAGATACTTGTGAAATAGTTACCTTAGGTTTCTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTT  
GTTCCTAAGCATATTTATTTCTGCCGTCATACCTCGTCAACCCCTTGAAGATCTTGGAGCCTGGAAATGCCTATGGTAGCAACA  
TTTGTCAACTTGAGAAGCCTTTGTGTTCCGCTCCGATATTTGTGAAACAGCTAATTTGGGAGTAGCATTTTGGCAGATTATTT  
TTGATAACAATCTGTGTGTTGCCAAGTGTTCAGAAAGTGTGCCAGAGTTGTTTGTAGGATTGAGTAGGATGCAGTAGGAAC  
GACCTAAGGAGATAGGGAGGGTGTGAAAATTTGGGGTATTCTTGACTTTGCCTTTCCCTCTCTCACTTTCATATCATCATGT  
AATCTCCAGAGATGTTAGGAGAAGAGGGGGAATAGGATTTGGGGAATCTGATTTGGGAGTGTGTGTTTACTGAGGAACTAT  
TTCCAAATGTTAGAGGAAGGATTTGACCTGCTAAATGGAAGGATAATACAAAAAAGGCAATGGAATGGAATGTGCATATTT  
TGTAGCTTAGAGTAGTACTGGATAAATGTTTGAAGTTTACCTTTTCAATCATTGGAGAGTTATCCCTCCATTTGTATAACG  
CAAATTAACAGTGGTGCAGATAATGAGTAAGATATTTATTTACGGAGGCATCTTATAATGGGCATTTCTTTTATGACTA  
GGAAACGTTTGTATGTAATTTTCAATAGGTGTAATGGTTTGAAGTGTTCGTGTATGCTTTACTTTTGTAGTTGGGAATGGGTAGG  
ACAAGAAATAAATTTCTAATGGCTTTCTTAACTGCCTGTGCTCTCAGAATAAAAAAGTGTCTGCATTAATTTGGAAGC  
ATTTCTGCCTTTTGTTTTACAGAAAGCCAAGAAACTGACAAACTCAGGGCAGAGGAAAAGGATGACTTAGATGTAACAG  
AGCTCAGTAATGAAGATCTTCAAGAGCAGCTTATGAAGTATGGAATAAATCTTGGCCCAATTGTAGGTATGTCAACTAACTA  
AACTTCGGTCTGCTGAATAGTCTAAAGTTCTCTGATATGATTGCTTGTGTTAGTAAACAGTACTGTTGCAATTTTATTTTCCACTGAA  
GATGTTTTTCAATGAACTATTTACATTAATAATGCTTGAAGCTTTCTGTGTAGGCAAAATTCGAGTTTATTTCCCTTATGTTT  
TATGCTAGCTATACTTGTTCACCTCCTTTTCTGAGCTATGCAACTATTAAGATCAGCACTGTGGAAATAGGTCTGATAC  
AGAGGTTGAGATCTGGAGCCTGCTTAAATAGCAAGTACTTCTTACATAAATAATTTAAGATCTGAGGGCAGAATGATCGTAGAA  
CTTCTTCCCGAGAGCATTTCTACTCTCTGCATTACAGCATTAGTGTTTTTCTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTT  
CCTTGCATTTCCATCTGTATACACTGACCTACTTCAGCAGGGTGGATGGCAAAAAGTACCAGCCCAAGTTAATCCCTGCTTCA  
GGCCTCTCTGTGATACAGAGTAAAGGTCCTTGCCTTTGAGTGTGCACTGGCCTGATGGCAAGATAATTTAATTTTAACTTACA  
ACTCTTTCAGTAGGAGATAGTTAATCTGACACCCGAGCCTTCTGTGGAATGTGTTTGAATAAGAGTGAATGCAATGCAATGATA  
AAGTCTGGAGTCTTGTGTGATTTCAAAATAGTTTCTGCGTAATATTTCTGTTAGCTGTTTCTGTATGCTTCTCATTCAACCT  
CTTTCTCTTGGATAGGGCTCAAGGCTCCTGGACAACCTAAATAACTATGCAGTCCCTAGAAAATATGTTTCAAGCTTTAAATAA  
AACTTTAGTTCCTGTTACAGGGTGTGGATTCTGTTTCTGTGACAGCTTTTATATATAAGGAAGGCTTTTTCAGAAAGATTTTA  
TATAAGGCTGGATTTTGTGTTGCTAGCAGTGCAGGCACTGGTTATTTCTACAGATTTTTTTTGTAGCACAGTCTGTATGTGA  
ATGTATGCAACAGCTTTTGTGTTTAACTAACAGTTGGAACAGGTGTGCTTACTTACCCACCTCTGGTGTCTGGGCTGGA  
TTTTGAAAGCAGGGCAAATGTTAAACTAAGGAGGCAGATGTTAATTTCCAGGATAAATTTAATTTCCAGGGCTAAAAGGACAGT

GTTGGAATCTGCATGGATACTTTTCTTTGCGATTTTCAATCTCATTAAAGTTTTTGTGGTGGTATGACAACCTCATGTCCACATGT  
GTGAAACAACATAAAAAGCAGACAGAGTCTTTCATCTTTCATCTACTTCTGTAGATGAATGCTCGCAACAGTAGGTGTACCAACAG  
ATGTCAGCTTGTCCAGAGTCTTCTTGAACCAAAGACTCAAGCTTTAGAGGTAACAATTATATAGCTAGATATATATGCTGTGGGT  
ATACAGACAGATTA AAAAATAGAGAATATGTGTATGGAAATTCCTTAAGAATACATAAATAAGTTCTAGCAGTCAGGTCAGGAA  
AGACCAAACTGTATCTCTAGCATGTATCCTTTGCTACAGCTACCACAAGGAACTTTATGAGAAAAAGCTGTTGAACTGAT  
GGAACAAGGTCCAGAACTGAAGACACCTATGCCTCTCCAGTGATTTCTTCAACTACTGAGAACCAGACAGAATGGAATA  
ATGATTTCTGACCAGTACAGTGACAATGAAGAAGGTAAGCCTGAAGCGGAACATGCATGCAAACTATTCAAATATGTATGAGT  
AACACTTGGAGTAGAAGAAGTATCTAAAGAGAACATGATCTGCTGTTTGTGTGAGTCTTAAAGATACTGTAGTAGACTATGTTG  
TTTGTGTACTTCTTCATGGAGTGTAGCACAGTGACCCAGGAGGCATTCTGGGAAATGAAATTTTATTAGTAAACTGCCTCCTT  
TCTTATTAATCCAGTTCCCTACAGACCTGAGCCTGTAATATGATGGGTAGGAGAAGTGGATATTAAGTGTTCACCTGTTCTT  
TGCACCTCAACTTTGAGATTCATCTTATGACGCACGAGTAGTTACCTTTATTTTGTAGTTAGTGTGTCAATGTTTAAAGTTGAT  
GCTTACTTCTAAACAGTTTAAATTTCTTCATATGATAAATTCCTCTTATGCTCTGATCCTTAGGGACCTGGAGTGGGTCCACTGA  
TTTATTTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGGTTCTGCTGTTTTAATATCAAGAAGTGTATAGAGGCTGGAGAGGTAGAATCTGAAAC  
ATACCATGTATCTTACAAAAGTAATGATATAGGCCTTCAAGGAACATCACTTTGGTTAAAGTAACGCAATCTGATACCAGT  
TTCTAAGTATAACATCTGAATTGGTCAAAGGTTGTCTGAATTATAGGATTTTTTTTTTTTAGGACAGAAGCTCGTATGCTTTGGG  
TCAGTTAAAGTTATTTCTCAGAAGACTGTTCTTCATTGGAAAAACTTAACCTATACTTGCAGGCTGTTTAAAGGAAACAGTAG  
TTCATAAAGTTTGATACCTCTTTAAATGAATTTTATTGAGCTAATTTAAACCAATTGCAGTTTATCAATCAGTAATATTATAG  
AAACCAGTTATTTAACTCATTACAGAGCCAAAGACTGAGCTGAGGCTTGGAGAAGAGAGAAGCTCTGAAAGGCAGGATGAAGA  
CTCCAGTAACACTCAAACAAGAAGAGTGGTTGAGCACAAACAGGTATGTTTCAATTTAGTGGCATCTAGAACAGCTCCTAACT  
GCAGGAGTGTACTACTAAACATAATCACATTTGACTAAGTGGGCTATGCTGTTCTTAAAGTTTGGTGGCGTTCTTTGTTT  
TAAGAAAGCCTATTCTAATACAGCATGAAAATCTTGTGAATTAACATACATCTGCTACTTTTTGTCTGTCTGTTAATGTTCAA  
ATCATGGTCTGCTACTTGTACACTTGCAGTGTCTGTAGCTCACCTTTGAGGAGAAGCTTAGGCAACCTTTACATGTTTACG  
TTTCAAATCTGACAGATAGTGGTGGAGGTACTGATGTTCTGTGTATATTTATAAACGACTTAATAAAGGAGCAATTTCT  
TCAAAAAAATAAATCTGAAAATATTTTTGTGAGAAACTTTTTCAGTACTCATGTACACTGTATTTCTATCTATTTTTTAGT  
GCCTATCTATAGATAAAACAGAAGTGTGTATACATTTGGTATGTTCTAGTTGTGGTTTAAATGTAACAATGTATAAATCATGCG  
TTTTTGTAAAGAAATACATGTGTATATATACTCATGCAACATCTCTGTGGTATCTATTTCTCAGCCGACCACATAGCAGCA  
TTACTAGACTGCGCATCAATTTATTAGAAAGCTTCTCCTTAGAAAAATAACTATTTTTAACTTCAAAGTATGTACCTCTTGTCT  
CTTCAATACTACTATTAGTTCTCTTGGCCAAAGGGGATTTTACTAAAGTACCTCAGGCTTTCAAACCTGCTGACTAAATACTG  
GATTCAGTGTGGTGGCTGTATCTTCTTATGATGTGACAGTGTCACTAAATATCCTGCTGCCAGCTTAGATTACTTAGGA  
TATTTACAGTGTACTCATCTGACCAATAAGTAGCAGAGTTATGCTACATTAAGAAGTGTCCAGAAAACACTTCCAGGAGGGA  
GCAATCTGACCTGTTAATGCTCTCATCTGGTAATATCAGGCTAATTAAGAGACTAGTCTTTTTCTCAAGATTGTATAGAATGGA  
AATGCCACGTTGTTCTATTTAGGTGGTAGGTGTATATAACAAGCATGTACATACAGCTCTGTGCATTACAGTTATAGAGTTCC  
TCAGTACTTCTGCTATATTTCACTGTATTTTAGGGGTGAAGACTAACTTATCTTTCTTCTACAATCAAACAAGCACAT  
AGCTCAACACACGAAATCAATACTCTTAACTTATTTCACTTTGACCTCATGATGGTCTTTATAATGGGATCAGAATCATAAG  
GTTCTCTATTTTAGGGATTATTTCTTTCTAAGTCAATGGTCTATCCAGAAATCCCTGCTAGCTTCAAGTGTGGTGGAGGCATTT  
AATTTGGCTGTCAACAAATCTTTGTAATCTTTAGGTACCTGCATCTTTTTTATGTGTTTTTGTGGTATTTTTTAGGTGATGAG  
GAGTTATTCTAATTTTTAAATCTAATTTTGTCTAATAATATAAAGTTAATTTACTCTTCTTTTGTCAATCTTTTGTGTGGT  
TATAGATGTAATATTTTTGTCAGTTTGCATATTTTTAAATGCCAGTAGTTAATCAAAGGAGTATCACTTGAATGCCATCTTTGT  
GGATTAGTCCAAATGACAAATCTTTAAGAAGTCTCAAGTTTATAAAACCTTTTGGCTTTAAACTCGTACTGCTGCTTTAAA  
AGAAAAAACACCATCACCTTATAAATGCTTGAACCAAAAGCAAAGAGGAAGCAAAGCTCAAATGTTTTTGGCTAGCAAATA  
AAACTGGAAGATTTGGAAGATGGTAACCTTTATTTCTTCTTGTGAAATGGAATCTCTAGACTGCAAATGATGTGTCTAGTGAC  
TGTACTCATTCTGCAGAATTAGATGCAACTCCTGTTTGTCTGCTGGCATTGAATCAAAGATTGAAGCTCTGAAGAATGGTGGG  
ACTAAAGTAGTTGGCAGTGTGATATGAACAATATTAGTCACTTATGGATCCTATGCTGCAGTATTTCTAGCATAGATAGTCT  
AAAACCTGGAAGACTGTCATCTGTTGCTGAAGCTTGGCAGTGGTGGATTTAGTGTCTTTCTTTGCAATCTTTTGTGTGGT  
TCTGTGGAGGCTGGTGTAAAAACCAGAGAAGGAGGTGAGGGGAGGCATTGACTTGTCTTATCAGCTGGGTAGCAGCAATGGGC  
TAGATGAATTTGAGTCTGCTCTTTGTAACATAATCGCTCCTCATAGTGAACATAAGAAATTTGGAAGAAAAAGTAACTTTGA  
ATGTAATCTTCCAGTCAAGACAGGTGAATATAGAGTTAGAAAGTCAAAGTGTGAGCTCAAGGCCACATAGTAGGTGAGAAAGAG  
GTGGACTAAGCTGTGTAATATTAAGGAGTCTTAGAGCTTAGAATTTACTTCTCTTCTTGTGGAATTTCTGCGGTGGCATTC  
TGGATGTGTGTGTTCCCTACTCTTGTTTACTCTTTGATTTTATTTTTTTTATTACCTGTGTAACGACTTCTCGGATATCAA  
ACATGAGTGTGTAGTCTGACATAGACATATATTTGTGTATGCCATGTGAAAAGCATAGAACTTTGTTGTTGTAAGTATGAT  
AGTTCAAGTTAATCATTTACCCGTGTCAGTTGAACGCATGTTCTGAATGATACTTCTGAACAGTATTGCATCTTTCTCTGACT  
ATATAACAGGTTACTGGTGTATCTAAATATTACGCTTTAATAGAGCTTATGTACTTCAAGTATTGTGGGATAAGCAGAGAACA  
CCTGTTCATTAATGAAGAAGATAGTAGTACTGAAGACATTTGGTATTTTTTTTTTCTGGTCTATTGAATAGGCTCTGCTGAAG  
TTGGGATGGGTCTCATGACAGTACATTTAATCTTTTCTGGATTTTTTCAAGATTTCTCTATTACTTAAAGCATATGACTT  
TCAACCACCTGGAGGCTCAGTATGTAGTTCTTATTTACTGAAGACTTCTTTAGAAAAAGTTCCTAGTAAACCTCCTACTA  
ATGGAAGCTCCCTGAGCTCTGCATTTGTAGGACGAGAAAATGTCTTGTCTGTGTTCTTGTAGTAGAATTTGAGTTGAACC  
TCTCTGAAATTAGTGTTTTTTTTTTCTAAAGCTTCTGAGGAAGAACCCTCAAGTAGAAAAGAGGACATGATGAATGTTTCA  
GATTAAGCTTTCTTAAACAGGGGATGTGAGAAGTTAGTATCTAGTGAATGTATAAATAGAGATTAGGAGACCTTTTCATCAGAA  
GTCTATTTAAATTTGAAGGAATATCTGAGACATAGGCTGAAATATATAGTTCTGTATGAAATGTCTGAATCTATTTGGACTTG  
AGATCTGTTCAATAATATGTCAATCAGTTATCAGACTATTTCAACGACTTTGAAGTGTAGCAAAACACTTGTGCTCCCTCTGC  
TGGTTATGTAGTAGTTGTAATACTTCTGTTTAAATTTATAAAACTGCTCAGCTTATAGTTTCAATGGAGTAACTTTCAGAGATA  
CAAGTGGGAAACTGAGAAGGGTGGTGTATACTTTTTTTTTTTTTTACTCTTGATAAATGAGTACCTTTTCAGCTAATCTCTCTG  
AATGACTGTTTTTGTGGGCTAATTTCTCCAGTGAAGTTATTTTGTCTGCCAGCTGTACAACCTCCATCTGCACCAATTTGTA  
ACTTACAAAAGTTTTGTTAACGCACCAGTGGAAAGAGATGATAGATTTTCAATCAACAAAGGATTTTTCTTTGATTGTTTTTA  
AATAAAACAAAATCTTAGGTCTATTTTGAAGAAGCAGGCTGTCCCTCATCTCCGCTCCTTCTAGATTTATGCTTAGAATAAG  
ATTTGAGGAATGTTTTGATTTAAACATAAAACTTGCAGTAAGGCTGTGGGATTTGATCTATGCTTGTACTGGCTATGAAAGT  
CAGGCACTTTGCTATTACTTGGGTTTTATTGTGAAGTGTTTAAGCTTGGCCATTTAAACCCACAGTTAGTGAGACTTTTTATTA  
CAGTGGAAACTTCTAAGATTATAAAAAACATCTCCCTTTCCACTGCTGGAGATGAGATATTGTTGATATGCAGATGACTGTG  
CATGAACTGTCTGCAGGAGAGAATACATTTGTGGTTGAATAAGTTGTGCATTTCTGCTGTGATCGTAAGGTTTTTTTTTTTT  
TTTTTGTAGGGAGTAAATGTAACAAGCCTAAAAGTCAAGATATCCACTGTCTGATTTGGCAGTGTACTTGAAGCATCGGTTA

TTTCATGCTATTGCAGTGAGAAGATAATCAGTTTTTACTGTTAGGTGTTATCTAGTCAGTTCAGTATTTGAAAAACAGTTAAC  
TCTAACCTTAGCATTGTGGTCATCACTGCCTGTTTTAGCTAGCTAGTTGTTATTGGATCCAAGGTTACTGGGTTTTCTTCTGTTT  
GTTTTTGGTGTGGGGTGTGTTTTGCTTTTAGTTCTAGATATGTTCTGGAGTATGTATGCTATTTTGGCTTTTGGTTGTGTGTAT  
CCAAATGTTGAGAGTTCGCTTTTCATGTTTATGATGTTGTTGATACCTTGAATAGACTTATTCTCAAGATGGAGTTACTGAGAC  
**TGTTCTGGACAAGTGGATCTTCAAAAAGTGGACCTCTTCAGGCATTTTTCTAGGGAGTCTACAAGAGTGTCAAGAAGAACCACCA  
GGAAAAGG**GTGATGAGAGGCTTATTATAATAGAAAAGCTTATTTTTTCTACTATGAGGGTCCCAGTGGCTATTTTTATTCAACT  
GTTTTCTTTTGTGTTTTTAAACAAAACAG**GTGGAAGCTACATTACAGTTGCCTGTAGATGATGCTGTTATATCAGAGAGTACT  
CCTATAGCTGAAACTATATTGACTGCAAGCAACGAGACCTA**GTAAATATGCTTAGTAAATATTTAATGAATAACGCAAGTAG  
TATTTTTCTGTAATATACCTTTATAATATGCCTTTACTGACAGAATCGTTGTTTTAAACAGGCTGTTTTTAAAGAAAGTAGGA  
CTTCTTTTATTAGTAGTCTTGAACCATATGTTGAGTACAGTAAATATAGTGCCTAGTGGTGTCTACTGGAGATGGGACTAGG  
TAGACACATGGATTTCATGCTTTTTCTGGGGGGAGGTTGAGAAGACCTCTTCAAAAAGCTTAGATCTTTTTTAAATTTAAGTA  
CATATAGAATATCTGCTTTAAAGCTTCGCTTTTTCTGTGAACTAATTAGCTTCTATGTTTCTAAGTGGCTTAAACTATTTAGA  
ATGATAAGCATTGCATTTCTTTGCTTATTTTCAGAGTACCTGTTACATAACCTTCAGTGAATTCCTAACATGCGTATATTTGA  
TGCAGATAAGGGTTTTGTGTTTAGTTCTGTCTCCCTTCCCATTCTTACTTTGTGTTTTGGTTAATTCTGAGTTTTGAACAA  
TTTGAATCTTGGCAG**GTTGGCAATAGGGTGCCTGGAATTTCAAGCATGCAGCTCCTACATTGTCAATCAGTGAACCCCTCAGA  
CATGCCCAGAAGAACCACCAAGAACCCTGATGACAGCTGAA**GTAAATTAAACTTAGATTGTTATTGCTTACTCTCTTTGA  
AGAAGTTCTTGTGTATGGATTTATCTGTAGTACAGAAGGGGTGGAGGCTCATTGCCAGATGGCATGATAGTGTAACT  
TAAACTAGCATTGTATGACATCAGAGTATATATTTTTCTTATCCTTCATTGTTTCGTAAGGTGAAAGAATCCTCT  
TTTTGGACAATTTTTGTCTTATGTTGTGTGGAAAGTACTTCTTTCTTTTAAACTATATTAATAGTTCAAAGGGTGGAAATGT  
TATCTAGCTCTGATCTTATAGATCAGCATATCCTGAGGAAAAAAACTGAAGGACTAAAGTGGTAGGATTACTTGAATCAA  
AGTCTGAATTTAGAAAGCAACTGCAGATTTCTGTTAGCTACCAAAAAAGAAAATGGTTCTTACACTCTGTTAGCCTATTCAAG  
CTGTTGAGATTATTTGGATAAATGTCTAAAGCATTGAGGGTATATGTAATTGTACTTATTAATGTAGTGTAGTACTGGATTA  
CTGTTGAATTTTACATACAAAATAACTTTGGCTGAATTTAAATGGAGTTCATTGCTCCATGTAGATATTTGATATACAACT  
TGCAATTTACTTGTGAGGCTGCTTTTACCAATGGATCTGAGATTTAGAACTTGAAGGCTTAAAGCTTCTTATAATACAAACT  
ACTGATGTTTAGGCTTAATGGTCAAATAAGAAGATTGTGGGAAAAGTTGATGTTTTCTTCAAACCTGCATAGTGTTCACTGT  
ACTATGGCATTGTCTGTTACAGCAAAAAGAGACAGATTGCCACACCAATGCTTGTTTAATCACATTGGCCGAAACACTCCT  
ATGATGTGCTCAACACAGCCATGATAGAGGTGATTGGTTAAGTTTTTGGATCATCTAGATCATTGGCTGCATATGTATTGTA  
TTTTATGACATATTTCTTATCTTAAAGGAAACTGAGGAGAGCAGTGAATGCATTAAGACACCAAAAGTGACCAGACAGCTGCCA  
ATAATTAAGGTTAACTAACTTTTAAACTCAGGAATTAAGTTCTAAAATGTCACCTGGGTGGCTCAGGTGCTTCTTACAAAC  
TACACGTGATTTAGTGTACTGAGTATGTTAAGCAGGACCTGCTGTTTTGAAGTTTGTGGGCTTATAATGGTTTTTGTGTTTCT  
CTAG**GTGCCGGAGAGACTCATACAGAAGAACGAAAAGTAGAAAGGGATATTCTTAAAGGAAATGTTCCCTTATGAAAGTCTCA  
CACCTACAGGAATCAG**GTATTGCTGATATTTATGGGGGCTTGTCTCAAGAAGTGTGAAACTATTTAAGCTGAGAAGGGTCTG  
ATTTATATTGCTAGATATCTGAGGAGTGGTTTTGCAATTTAGACTTAGTGGCAGTTGAGACAAGTGTGAGCTCTTCTGTTCTG  
CATACTTAGTTTTATAGCCAAAAAGCCTTTTTCTTATTTAAAGTGGGGAGCAGGGGAATGGGGTAGCATTATAGCAGTAA  
TTACTGTAGTAACTTGTGGAGGTTAAATGGAAAAGCCTCTCCATGGTTTCTAGTATGGCTAGATACGACTGTTTTAGCCCC  
TGCTGTTAGTTAAGAGAAGGCTCCAGCATAGATTTGAGATTTTTTGAAGCAAACATTTTCAAATAGTCTCTTCTGTT  
ATGTAATTTGATTTTAAAGGATTTTGTAGTCAAGCATCACTCTTGTGTAATAAAGCTGGCATTGCAAATGGATGGACTTGGAAA  
CTTAGTACTTCAACAATAAACTGAAATAGCCCTCTGGATAACTAAGCAGTGGATACAGCTGACTGCTCTTTTAGAAACTG  
ACTGCTACTGCGTACTGTTATCTGAGATTGAGTGGGGGCTGTGGAGTCAATGCTGTTTTTCAATGGAAATATTTCTAAGTTTGT  
TAGGAAGCAAAGGTGACAGAGCAATGGATAGAAAAAATAAAACAAAGAAAACAGCATAATTTTTAACAAAAATAGTGCCCG  
CAAGACTTAGTTCAAATAGATTAATAACAACAGATTCTTGCAAGTGGTTTTCTTAATCCTTGGCTGTCTTGTCAATTTGCCCTGTG  
CACTGACTTGGACATCAGTGGTGTTTAATGGCCTGAGACAATCTAGCTTTAGAAGTCCCAGAGAGACTGCAGAAGTGTATGA  
GTTGAGATACAAGTGCAGATGCTTCTGCCATTTATTTCTTGTCAATGAGAGTATGTGGATAGGGTGACAAAGTGGCATT  
TGAGGTTTTTTAAAGGATATTTTGAACCTTGAACCTGATGTTAACCCTCAACAGTTATAATGGTACCGCTAAAGCTTTATA  
GACAGGTATTCCAGGTACTGTGTTCACTGGAATAATTTATAGTTCTTCAAGTTATGCTAAAATTTTTTTTGGCTACTTCCAGGAT  
TGCTCTTTTAAACACAGCGGTGTTTTTGTCTTCTAATTAACAG**CGCTAGCTGCCGTAGACCAATCAAGGAGCTGCTAGCCGG  
CCTATCGAGCACACTGACTTCAAAATGGATGAAAGTTTCTTAAAGTATGCTCCAAAATACAGTACCTCAAGTGACATCAAGTC  
TGAGAAAACCTTCAACAAAAAAGAACGCTCCGTTCCCTGTGGATAAAAAATTTCTTCTTTGTTCTTGTGTTTCACTCTTCTGT  
TTTCAGTTTATCAGTCTATGGAACCTAATCAAGGAACTCTTCTCGAAATATATTCTGTGTTCTACTCAGGACAGTTCCAAT  
TGA**CTATCTTTTGAAGGCACACCCGATTTGATCTCTGTTTTTAAATGTAGAGAACTCTCCCGCCCTCTCGTGGCTCAAG  
GACTACTCAGAAATATGTGATTGGAACTGATAAATTTGGATAAATCAAGCAAACCTAATACTAAACGGACTGGTAACTTTCT  
TGGACTTTGGACTAGTAGGAGATCACTTTGCCATAGGAGTAACATTTTTTTTTAGGCTTTTGAACCTTTTGTAGGCTTTATTTTT  
TTAATGTGGACATCTTCAAATTCATTTTTGAGAACTGTATATTTGTTTTTGCAGGAACTTGGAGGCTGAGAAGGGCAAAAA  
TGTACTAAAATGTGAAGCTGTGTTTTTAAAGCTTTTCACTGTACAGGAAAAGAGTTGACTTTTTGCTTGGTAGATCTTGGGA  
AGATTACGAAGGGAGGAGGATTTGTAAACAGATGAATGATGGAGATGCATTTTTGTATGCATTTTTTCAAGTAAACGAATTA  
AACTGA  
ATTTGATCTCTTAGGATATAGGGGGAGAGTACAACAGCTTTTCTGTAGGTTACTGTAACTTTTTAGTAAATGTAACTGTAAA  
CCTGTTTTGCATTTCTGTAAAAGTCTTAGTATCACATTAGTAACTGTTTTAAGTGAACATTTAAATGTATCACTTCACTTACT  
GCTTACAGTGTCTAGGAGTTCAAGTATGAATTGGCAACAGATGTCTTAGGAACTTATTTATAGTAATATGCGTGGAAAATAA  
AAATTCATCAAATATAAATTTGCTACTAAATCTTCTTTGGGGTAAAAGTTGTTATCTAAGGTAGTCTAAATTCATTTTTA  
GCAGTGGTCTTTTTTTCTTAAATGAAGTCTTTCCATCACAGCTTTGTGATTATCTTTGAATATTCATGTAGAGAGGATTTCTC  
CAAGTGTGAAAATTCATATGAAGTTTTATTTCTTATATGAAGAGGGCATTGCTGCATTTTCTTGCACAATTTCTCTGAG  
GTGAGATTTACTACATTCATGCAGTTGAGTATTTTCTCAGTGGAAAGCTGCTAAAACACTCAATATTGTATAACTTGTGTTGA  
GCAGGCACTGACTTACTACTACCAATGAGGAGTGAATAGCAACACTTTTAAATGAATGTATTCATTTTGTGCTTTAA  
ATCTGCAGCATACAGATGTTCACTCTATTGCTTCTGACAAAAATGCATAAAGTCACTATTCTTGAAGTGTACTTTATG  
AAAAGCTGAGAACTTTAGTTAATGGTCTATTTTTACTATAGGTACAATTTACTGTGTAGACTAGCTATGGGAGAACATTTCT  
CTGTGACCTTTGGGACAAAGATGGTAATTTGTAGCAAGCTATAGGTTTCTTCTGTTAAGATTTAATGTTTTTTTTTCTTT  
TATCTGCTTTCTGAGTAAATCAAATAGCTGAACCTTGTGTCCATCCTATAGAAAATTTGAACACATGACATTTCTTTTGGT  
TCAAAATGCAGAAAATAAAATGATTTTAAATGTGTGTGAATTTCTTACCAAAATAAACGCATGCTGGAAAAGAAGCAAGC  
A



## Genomische Sequenz des Zebrafisch LAP2

Sanger Institute contig: ctg10273.2 Ausschnitt von Position 97875 bis 117202  
unterstrichen: Start- und Stopcodon

Kleinbuchstaben: Sequenz die nicht im genomischen Klon ICRFc71O1293Q5 (RZPD) gefunden wurden

blau fett: Exons; Sequenz von zLAP2 $\omega$  (AJ320190) übernommen

normal: Introns

kursiv: bekannte untranslatierte Regionen

ACATCTTTTCAAATGTCTTGTGTTTTAAACCCAAAGGAAGATATTTTGAAGAATGGTGAAACCAGTATGCATTGAATTTCCCTA  
TTTGCCCTCCAAATCTTTAAAATACATTATATTGTATTAATTTCTTTAGATGAATTGCTACTTTTATATCGTATTGTTTACTTC  
CTCAATGAAGCAGCTGTTAAGTAGTTAATTTTTAGTCTTATTCTTAATTATTGTTCTTTCTACTCGTTATGCGAAGTGAATC  
TCCTATAAACAAAGAGGTCGAACCTGCTATTATTCGCCAGTGATTTTTAAATAGTCCACCCGCCAATCAGAAGGCTCCTTTCTG  
CGGCGCATCCAATAGGGTCTCTCTCCTAAGGTGGTCACTGATCCCATAAAAAGAAATCAGCCCCAGGCAGCGATAGTGTC  
TGCTGGAACCAACAGACATGTTGGAATTTCTGGAAGACCCGTCCTGCTTACTAAAGACAAGCTTAAAGTGCATTG  
**CTGGCCAATAATGTTGCTCTCCCGAACGGCGATCAGCGAAAGGACGTGTACGTGCAGCTGTACTTAAAGAATCTG  
ACCGTGCAAAACAAAAAAGTAGCGGCTCTCCAGATGTCTTTTCCAGCGACGAGGAGCTTCTCCAGCGCCCGTG  
GTCTCCAACAGGAGCCGCTCCGGCAGG**GTGGGTTGTTTGGAGATGCTTGTCTTTGTTTGTAGCTACACATGGATTGT  
GAATCAGATGTGGTTGACGTAATTCGCAGGTTGAATTGTTATTATTTTTATCAAGGCATGTATCTTTTAAAAGCC  
TGTTTGTGTTGGTAAAAGTTGAGAGGTTGGTATTATTAAGTTTATTGTTGTAAGTGTGTAGTGTGAGCCTGCACAT  
GTCTCGCAAATGAAAACAAACCCGGCATGGCGAACTTTTTTACTATGGTGTCCGGTTTTGTGAACGAATCGTTACTTT  
TTCACTTGAATCATTTCAGTGAATCACTTAACGTCGGTTTTGAACGATTCTTTCAAATAAATGTGGTTTTGTGCTTT  
GTGCTATGCTTGAATGAGATTTACAGTTGTGAACCTCAATTTTTACTTTAATGAGTACTATTAATAATAGATACAT  
AATATTATAGTCGAGGACTTGTTTTGCTCTTGATGTTAATGAATACACATTATATTAATAATATATATGCTTAA  
TCCGTGCAACTAAGGCTAATGGAAATATTATAAACTACCATAATATAATCAAACACTTTGAATGCTTATTGCTA  
TAATATGTTGCTACTGATGTGAGGAAATGCAGTTCCATTAATGAGTCAAAATTTGAAATGAATTGTTCAAAAAGA  
ACCGATTCTTATTCGTCGAACATCCTATTACTATCCCTGCGACAGTTTCCCGCTTAAATGACTTGGCCTGAT  
TCATTGCATTACTAATAATAGTTCAAAGCCATAACTCCATCTGGCAAATTCATAAATGATGACTTTGTAGGGA  
TTATTAAGTATTCTAAATGAAAGTGCAGTCTTTGTGTAATCTTTTACACATCTGATTAAGGTGTTGCCATTGAG  
AAGATGTAAGCCCAAATTTGAATGAGAAATATGGGAAGATTAATAAACCATAAATTAATAATCCAGCGAACTAA  
GCCTTGAGATGGCTTCTTGAGTTTTGTTAAATCAATGAAACATCTGGGTAAAACACTTAGAGAAAGTGGGAGTTTTT  
CTCCCTTCACTTGTATTTGCTGCTATTTATAAACAATAGTCTGTAGTTTTGGATTGTTCTAGTGCATGCCCTGG  
TGCTTTTTTCTTACCTTTTTCTATCAGATGTAATTTTATGTCTGTTGACGCTGTTATTAAGCGGGAATACTACA  
AGTTTGTAGTTGGTTCTGTTTTTATAACCAACCTGATAAGCTCACTCCCCACCCCTGCAACTACACAGGAGTCC  
TTTTATGTTTTACAGAGATGTTTGTGTTAAGGGCACCTCCAGTGTCTCGTGAATGAGATAGTGTGCCTGTCATT  
CTAAAATCTTCCCGCACAGCATTACTCCATTAACTCTCTCTCTCTTTCTTTCTCTCTTCTATATATAGTCT  
GGCAATAGGTTTTCTTTAGGAATAAAACCCCTTTAGAGTATGTGATTTATCAAGGTTGAAATCCATTCGTAAGGT  
AGATCTCTTAAATTAAGACTCAAGAGTTTTTCAGTGTTTTAGATGACTGTTTATACTTTGTGCATTTATTTATCAT  
TTGTTTTAAATATTTCTTCACTTACTGTTAGTCTTTTTATAAATCACAATTAATTTATTTTCTTATTTTGTGT  
GTTATGATACAACTATGATAATAATAACAATACTATGCAGCCCTATAGACCCCATATTAAGGCTTTGAGCAGA  
TAGCTGCAGGTCTAGGAGCTGTAGAATAATTCAAGAACTGCACAAGGCTGTTTTTATAGTGGGTTTGGTCCCCTT  
ATTGAGGAAATAGATTCTTGTGTGAAGGAATTCATATGTTGGCTGCCAGATGTGTGTGTGTTGCATTCCTCTTTG  
AAGCTCCTGTGTCTGAGATAGTAATTTAGAAACATTCGACACGCACTCACAGTCAATTTCTGGGATGTTTTGT  
TGTGACCGGTTAGAAATTTGCAACAATCGTGACCTATAAAGATGATTGATTGATTATGTCATCACTGCATAGTG  
AGAGTTATGAGAGTTGTTGTGTTCAAATAAAAACGGGCTTTGAAGCTCTGATGCAAAAGCCATAAATGGGCCAAAT  
GTGGTTAACCAAAAACATCATGCTGCTTTTATTGCTAATTTCCAAAGCGATGACATTTAGTATGAAGCATGTGT  
GTGTAACGGCATATGCTAAGCCACAGGACTGAAGGTGAGAAAAAACTTATCGCTTATCGCAAACCAGCAATGTC  
AGAAAAGCAAAAGTTTTGCTCTGAAACTTTATGCTAAATCCAAAATTTTTTATTTGTAGCTTAGAAAATGTAATATT  
CTTTAAATTCGTAAGTAATTTTGGATGTTGAAATATGTTCTCAGACTTGTAACAAGCAGCATTTGGTAATGTTT  
TTGTTATTGGGTTATAGTAAAATAATTTAGTAAATAGTTTATGTTTTTATTTAATACAGTAACTGAATAATCAAA  
TGTAATGAATGTCTTCAGTGGAGTGCCTAAAACACATGAAATTAAGAGAAGGTAAAGAGACCCGATTGGAGGAG  
GCTCGTTCTTTATCCTCGCGCTGCAGGGGCTGTTTAACTGTTTTCTCATTAGTGAAGTGTTCAGATTTTCTAC  
TTACAAAGTAAGCCATGCAAATAGCAAACGCACCATGGCTAGACGCAACTGACTCTTAAAGGGAATGTGAGATGA  
GGCTGTATTTTTCCATCATTAAAATAGCAAAGTGGGTTTGGAAACGCCCTAAAGCTTTTGGCCATATGCGCTTCA  
TACTTTGCGCCTAGATCGATAAAATAGTGCCCTAAATCGGCAAACCTATAGCCTATTTGGTTTTATTTATGAGCGGT  
TTCAGAGCGCACTCTTATGGAGAGGAAACCCAGACTCTCTGACTTGTAGCCAGCGTGTFTTCCAAAGCAGAGCACA  
TTAATAAAGTTTTGTTTTGCGCGTCTTTCTCCAGTTGTGCAAAATAAACTGAGGTGTTTCGGATGTAGATCCAGG  
ACAGAGGCAATCACCATCAGTGTGGTTTTGGCATCAACTCCTCTGTGTCAAACCTGCAGAATTTCTTTTTCATGTC  
GCTTCTTTCTCAAATATGTTTGTAGGCGTATGATACAGGTGTTATAGTCCCAGGTTAGCAAATATGTCAGCA  
AACTTTAAAAAATAAATCGGTTAATGAATACCATTAATCGGTTAAAAATGGTTAATCGGTTATTTTAAACG  
TTCCTAAGTCAAATAATAGTGCATATTTTTGTTTTATAAACAATTCATAAATAAATTAATCATTATTTATTTTCA  
AATAACAAACAGTAAAACAATTTTTAATGCCTGAGTGCTTTTAAAACCCCTTACACAGTACAGGCCTTCAAAA  
CACTTGCAAAATGATCAATTATAAGACTTAACATTGTGTATACTTGTGATGTGACTATTGCGAATGATCATTG

CGAAATCGATGCTGAGACATTATATTGTGCAGTCCTAATTCATTCAAATGAACTGAATTATGGCAGAAATGTGAG  
CTCTAATTTTCAGCCAACATGCTAATCCAGAGTTGTGCATGTATAAAATGTGTCTGCTCATCTCCAAAACCCATT  
TTAGTTACTAGCCTCCTTTTTTTTCACTGACATGCTGCATTTTGACAGTCCACACAGGGTGTCCGCGGTGCTTAAA  
AAGAATGTAAAAGTTGATAAATCAATGTAAAGACATTTAAGGCCCTTAAACGTTTTAAATGCTATTTTACAAAGT  
AGTAATTTTTTTGTATCATTTTTGTATGCAATTGTATGTTTGTATGCTAAAAGTTTGCCTAAATTATTTCTGCAA  
TATGCTGATTTATGAAATCAATAAAATCCTACTAGATTTATTCAATATATGAATAACATTTTAGTTTTGGATTAA  
TTTCTTACATTAATATTTCAGTAAATATTCTGCGAGTTAAAATCTGGCCAGTGTTCAGTTGAAAAGTGGTTGTA  
AGGTCTTAAAAATGCATGGAAAGAGTCATAAATAGGTCTTAAAAGCCATTGAATTTGACTCTCTGATTCCTGTATA  
TATATACTGTGCACAGAACTTGATAAATGGAGGTTGTCTGTAGACTGAGTGACGTTTTTCTCCTCTGTCTGTC  
CTGCTGGAATGCTCAGATTTATGTTTTTTTTTTGTTTGTGTTTTTTTTTTTGGAGTAGGCAGTGTTCAGATCAGC  
CCTGATCAAGGCCCTCACTGCAGCTCATAACGCTTCATGATCTACTCCTGCCCTTCCAAACACATTCCTCCT  
CCACTTCACTGTTTTACCTCTACTTTTTCTAGTCACATGGTCCCGTTTTGTGGATCAGGGCTCTACTCCAGGGAAT  
GTGGCTGGATTTGCATTGTTCTGCTTTTCGTTCCACATTAGAAAACCTGCGTTTGCAATGCCTTTAGTCCCATCA  
CTGTGGCACTTTGCATGTGCAGTATCCCTTTTCAATTCAGTGCCTGAATGACTTTTTATTTATATAAAATCAA  
AATTTTTCAAGTGGTTGTGTACTTTGCATATTTTTTTTTTACCCTCACACTTAAGTTTTACAGTAGGTGATGTAT  
GCATATTTTACATTATAGTTTCTTGAGATAAGTACAGGTTGAGCCAAAAACAGTTAAATATGTACTGAAAAACA  
CCCCTCTTGTGTACGGCAACGGATAAGAGTTAACTCCACCCATGTGCCTCCAAGCTGTTTCTCTGTATTTAT  
AGTATGTATATAGTATTTTATATAGTATGGTATACGGTATGTTTATGGGCTGAGGGAAAGCTTGCTTGAGTTCCCT  
CCCTGGTTGCTCTTATTGTATAATATGGAGCCTGTCAGGCGTGTAAAACACTCGTTGCTTTAACAAAGTTCAATA  
CTTTACCATGATGTCATCTGTACATAGTGCAGCGTGCAGTCAATTTAAAAATGTGCACATCAAACATTTAAATGAG  
CTGCATCATGGCTGATGGTCATTAATGTGAGGCTTTTTCTTTACAGAAAAGCCAGGAAAAACCGACAAAAGTTCCG  
**TCCTGACGATGTTGATGTGACGGAGTTGAGCAATGAGGGTTTTGAAGGACCTGTTGCTAAAAGTATGGCCTGAATGC  
TGGACCCATTGTTGGT**GAGCCGATTTAAGGATTCAACTTCAAAAAGTAAATATTTGCATGTGTTGTATAGTTCC  
TTCAGATCATGGGTCTCAAACCTCAATTCCTGGAGGCCCGCACCTCTGCACAGTTGTGCCCTAATACTATTCTAAG  
ACAGCTGATCAAACATCGGGATGTTCCAGAGTAGTCTTGAACACCTTGAATAGTTGGATCAGGTGTGTCTGAT  
TAGGGCTGGTCAAAGCTGTGTAGAGCTGTGGCCCTCCAGGAATTAAGTTTGAGACCTATGAGACAAAAGACAAG  
AAAAAGCAAACGTATACATTTAAAGGCCCCCAAAACATATATTTGGTCAGTTAAATCATACTATTGCTGACCTTACA  
AAGTTTTTTTTGTAAAGTGTAACTAATTAACAATACATAAAGCTGTTCTGAAAAACCAATGTTAATTCAGTTTTG  
GTGGGAAATGGTTTTATTTGAGAGCTAGAATTTATTCCTAATGTTTACAAAAGTCACCTTTTTGGGTTAAAAGTAA  
TTATCAGTTGTTACAGAAAAATAACATGCAGAGCTTTTTTTTTTTTATATTTTATATATTTTTTTTAAATCATTAA  
CTAAATCACAGTTTTATGATCAAAGAAAATTAATGTTGTAATGATGTAGAATGAGATTTGAAATGCATTTTTTAT  
TGCTAGAAAAAGAGGAAAGAGAAAAATCATCTAAAATGCATCTTATAATGGAAAAACCTCAAGAAATGTAAGAGG  
TCATAAAACCTTTTTCTTCCACTCAGCATAAAACAGCAACTAAACCAAGTGTAGATTCTGGAAATGATCCAGAT  
GATGTTCTGCTGTTGTGCTATCAGTAAATCAGCAGTTTACCCGAGCACGCAGATTTCCATGTTTTTCCATCTCAG  
TCCTGAATGGCTACAATGTCCTTAAATGGATGTTGGAAAGCTCCTCAGTATAGCGGCATGATATTGAAAAAAAC  
TGACATTGCAGTTTTTTGTTTATGATGAGTTAAATAACTCTATTTGGAAAGAATTCATAATTTTACATCGTGATA  
ATTCACAAAAGTAAATAGTGCATTTATTACAAAAGTGAATAAGCAAATCACACACATGAGTACAATAGAGCAAAG  
ATACATATCAAATAGACGGTGCTTTATTTTTCAATTTTACCTCAATACTGTTCCGGATTTCCAGAAAAACCAAGTGG  
AATCAAGTGGAAAATAACACACTAGTCTTAATTGTAATAACAACATATATCTCCTAAATATATGTGTTCTTTAATA  
AACATTACATTTTGGGCAGGATGATTCTTGTGTAGACCTAATACTGACATTTAATGTCTTCTTACATCAG**CATC  
CACTAGGAAGGTGTATGAGAAGCGGCTTCAGAAGCTGCTGGATCAGGGTCTCCTGTAGCTGTGGCTCTTCCCTC  
AGAGAGCTCACAGACTGATGGCAATCAGAATGGCAACAATGATTAGACCAGTACAGCGACAGGGAGGAAG**GTAA  
CACATTACCAAAATACCTAAAAAAAATAAATCTGACATTTGACTAATTTTATCTTCTTGCATTTTTATATTTCTA  
TGTAATAACAATTTTTCTGACATAAAGCTCTACTTGGATAAAAATCATTACCTTTGATGGAATAATCTTGCAG  
AGGAGTGAATCAAAGAAATGCAAGAATGAATTTAAGATAGAACAAGACAAAAGTGAATAATAGTCCGATA  
TTCAGGTACCGTATTACACTACGATATCATCATGATATATTGCCCTGATAATGACAGGTCACCATATTAGTGAT  
GTATCGCAAGAAAACCATCCACAATATATCATATTTGTAATCAAGAGGGATAAATGCATTTAAAGTCATAAGATA  
TACTACTTTTTATTAACATCACATATATTTCTTAGAATTGCAACATTTGATATGAGGTTCAATCTGCCATTTATAG  
AATAGCCACCTTATGTATATCGCTATTTTGTCTGCTTCTGATTTTTGTAATTCGTGATGTGGATAATTCAGCTCTACAGTT  
TTTTAACCTACAGTGTATAACATATCTGCTTCTGATTTTTGTAATTCGTGATGTGGATAATTCAGCTCTACAGTT  
CAAAAAGTGACTTATTGATGTTTTAGTAGTTTGA AAAAATATGTTTAAAGAAATAATAATATGGAAAGAAAAAAT  
AGTGTAATAATAAAAATGTACTGGCAGATTTTGTACCGTTATGCAACACCAACACCATATATCACTTTAAACTA  
TTAAAATAAAAAGTCTCTTTTTTAAACTTTTTCAAGGTTAAAAGTTGTTGGAGGAATGATCAAGGTCTCATGATGCA  
ATAAAAATACATAAAACAAATATAGAAAACCTACTAATTTAAGGATATTTCAATTAAGTATATATTAATTCAAAC  
AGTTCAATGTAATGCAACTTGTGTTTTAATGTTTTTATTAATGTATTATATTTGTATTATTCATAAAAATATT  
TTTGCTATGACGATATTGTCAAATAAGCTGGCGTTATAATAAATAAATAAGATGCAATAGTATGAACTTGTTTAA  
CTTCGTCTTGCATGTCTGTTAG**AAACCGTAGCTCCGGCCCCCGTACTGTGCCTGAACCAGAAGTGGAGGCTGAA  
CTGATCCCTGTTGTGGAGAGACCAGTCAGGAGTCAGGGAAAAACACCAGTGACCAGCAGGACACGCAGTGGGCAA  
CACACTAGG**TAAGGATGAAATTTGGTGCATTCATTCTTTCCCTTTTCCAGGTGTTTTAAATGTTATTACATCAG  
TTTGATCATGTGCAAGGTGCTTCCATACTATGAACGAATAAACCATGTTACGTGACTCGATATGAGCAAGTGG  
AAAATAAGCATGTGAAAAGGATGTGGGTGGCAAGGAGAAGGATTGCTTTGTTGTAAGTACTGATAAAAAACATCCATA  
AAGTTACATGTTAGGTCATGTTAGGGTATGCGGTGAGTAAAGTACATGAGCCAAGTCAAATACATGAATGTTTAA  
TCCCCTTACACTTGTGTTAGTGTGTTTTATCATTTTAAATTTCTTATCTTGCATCCTGTTTTTTTTTTTACGTAAAAA

CTTGCTTTTCCACTAAATGACTTGGCAAGTTTGTCAATTGTTTTCAACACACCTGTTTTTGTATTATTTGTATCATGT  
AATGCATACTTTTTTACTGAGAAATTCCTCATTATGTCTGTACAAATAATTACTTACAAAATTCACAGAATTA  
GAGGGTTGTGAAAGTTTACATGCAGATATTTTTAAAAACAGTAACTGAAATTTGTTTTCCGAACACTCCAAAATATC  
CAGTTAGTTTATTTTCCATTTAATGAATCTGCTGGTTGGTTGCAATCAAGCAAGTAAGTGTGTAATGTAAGTGGT  
CTCATTTAGTTGATTAATTCGAACTGTTCTTAAAAAGAAGTTTTCAGACTGTGTGGTAAATGAAAACAAAATCCCC  
AGACTGTAGATATGAGGGCCACTTGATTTAATTACAGCTAGCAGCTCTCCTCATTTTCATATCCCTTGTCTGTT  
TTTTTTTTTTTTTTTACTTCGGCTTTAAGTTGACCCAGACTTTAATCCTCTTTTATTTATCTTCTTATTCCTTCC  
CTTCTTTCCCTTCCAGACATGCGTAGCTTTCTCATTGCTGTGTGACTTTACTCAGTTCTGCATATCTGAACTTTTC  
TGTTTAGGCTTCTTGTAAACCTCTAGCTGAGAGGATTCTGTTATCAAAGACTTTTAAAACCTTTTATAAAGTTCAC  
ACAGTATCACTACATGCCTCCACCCTTACTGGACAAAAAAGAAAAGAACCAATTTTCTCTCAATATAAATAA  
TTCCTTTTTCTTTTTTAAACCCATCCAACCTGAATATATTCCAGCTTTTTCTTTTATGAGTACTGCAGCACCAC  
CTGCTGTAGAAAAGACCTGACGTTCTTCAGGCTGTACATGACTATAATATGTGCACATTGTGTATTAATGTTTC  
CATTCTGGATTTGAAAACAATAATGTAACAATATCATCAAAAATAACAATATTACGGTTTCATGGTATTGTGATTA  
TTGCTCTAAAATATATTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAAAACTTCAAATATTTCCGAGCAGTAAACATGTCAGGC  
TGAATAATTCAAATGAATCAATGACTTCTGCTGTCAATCATTAGTTTCAAAAACACAACTATTTCTATTCCAAA  
CGGCGGTACACTTTGTCCCATGTCTATTTGCAACGAAATCTTATTGTAAGTGGTTAGCAACTTGTATCTTGACTA  
TTTTTGAATGTTTTAACCATGGTATTGTTAATGCATTTATTGAATTTATTGTATGTTTTATAATCGCAGAACTGC  
GAGGAAAAAACTTCTGTTTAGGTTACACAAACACTTTTGAAGAGGAAAAATATAAATTTATAATATAAATGGA  
ACTCATTTTAAATGAATCGAGTTGAATTACATTTCTTTTAGTTTATTCTTGATTGTTTCAGTCCAGGGGTGTCCCT  
GGAGGGCCGAGCTTTGCACAGTTTAGTTCCAACCTACTCCAACACACGTAAGGTGCGGTCCACTGGGCTTTT  
CCTCCCATAGACTTCTATTTCATACACACAAAATGCGTCAGACTGGAAGCGTGGGGTTCATGCGGCAAGTTTCGCA  
GGTTGCTGCGGTGCAAAGTTCAAGTTTGGTGAACCTGACCTGCGAAATCACATCACTTGACTGCGTGAGAACAA  
TCGAGGATCAAAACATGACATCTCTGGACAGAAATTTAAAAACATGGAGCAATCGCTCGCTTTCAAAAATGTCTTA  
ATAATCTTGTTTAATCCCGCCCTTTTTTGCAGCGACACACGACAGAATATCGCATGCTCAAACCTCTGTGACCGCA  
GCTTAACTGTAGGTTTTAAACAAGCCTGAAGGACTTAATTAGTTTTCATCAGGTGTGTTCAATTATGTTTGTACTG  
AACTGTGCAGAGCTGTTTGTGTTGACACCTGTGGTTAGTTTAAATACAAAATTTAATGATTCATTATCTTTT  
TGGCTTAGTCCCTTGATTAATCTGGGGTACCACAGGGAATGTTCAACCAACTGTTAATCCAAATGTAAAAGA  
ATGTATATTGTTAATTCTAATAATATTACTCAAAATACTACATTTTGTAGTTAATTTGAATATATTTTTTCATG  
TTAAGTTTTTATTCTGAAATGTTGTCACTAGGGATGTGTATTATTAATATAGACACATTTATCAACAAAATTAAG  
TCCAAAAGTATGTTATATATGACAAATGGAATAATTAAGATTTAATGTTTTATTGTTATTATTTTTTTTATTG  
TTTCTATTTTATTATCTCTATATTAATTGTACATGGAAATGACATCTGTCTCATCTCTCATTTCTACATCATAACCA  
AGACAAAATAACTGCCAACACAAAACCTTTTTTTCATGATTTACATCACTAATATGTTTACAGGGTGTGAGTCT  
TAAAGTGCCTTATCTTAAATCTAAATTTTAGGCTTATAAAGTCTTACATTATCTGAAATATCATGTTGTAGATC  
TTAAATCTTTTTTAAATGTGTATAACTTCCCGCTGTTCCGGGTAAAGCCATCCAATGTGTCCAATACCCATAC  
AATCACCACAATCCATCTCAATAAAAATTTAAACTATGTATTTTAAAAGGTAATTTGTACCCTCTATTTAACAT  
AATGGTTTTAATTATTTTCTCATAGCTCTCATATGTGTCAATTTGAAACTTTACTAAACGTGAAATGAGCCAAAAT  
TTCATTATAATGGTCTTAAAAATGTCTGAAATGTTTTAAATTTAACTAGGTGTAACCTGCAGAAACCTGATT  
TAAAAGTAATATCTCATAGCCTAAATCATTGCAAATCAAGTTCCTTGTTTTTCTGTTGATCTCTCGACATGACT  
ACTCCTCATCTAAATGTTTTTCTGCTCCAGAGCTGTTTGTCTGAAATGTAAGCTGGTAGACCTTTCCCATGTGT  
GATGTTTAGGAGGATGTGGAGGAGGAGGACTGGCCCGTCTTGAATGTTAAGAGAAAGTTGAAGAGATCCTCTCAC  
AGGCCGGATCAGATGGTTCTGCGCAGCGACGACACC

GTAACTCAATCTGTGGTTATGTTACTAATGCACATCACC  
TGTTTTCTGGGTGTGGTGGTGAAGTCAAAAATACGTTTCCAGGACGTGCACAGGGTGTGTTTGGGTTTGCACACAGG  
TGAACACTGTGTTTTCTGTGCTCGTATTTGTTTCTCAAATAAGGTGAGGGTGGTGTGACCTATTTTGTCTGCTCA  
ATGGTTTTACGTGATGTGTGGGTTTGCAGGAGAACTCTGAGCTCTCGTCTGCAGAGTCTTTTCCGAG  
GATAGGAGAAGAACAGGACCTGGGGTAGGTGGTAGAGAGGCAATCATAGTGTCAAAGTTATTAGCTTGACCTGAA  
GAACCTGCTTCTGTCTCACATTATAAAGGCAGGCAGGAGAGAGACCAGGCCCTTTGCTTTTGCAGACAGGACATCAA  
AACTCTCATCCAAGAGTGAATCGCTGAGACGCCGAGTGCACCGGTCCGCTCAGTTCTGAATGAGGCCCTCATCCC  
CTGACAAGGTGTTGTTCTCGGTATAATCCCTCTACTGAGATTTTCAATTTGACATGAATAACAGGACATCTGAGGG  
TTCTTTGAGATTTCAAAGGTTTCAATCGAAGTCTGGGTCAATTTCTGTTAAGCAGTACTTTTTTCAAATTTTAAACCGA  
ATTTTGTATCGTGCTTTTAGAGTCTGTGTATGTTATTTACACAATTTGGATCTATTTAACAGTTATAAAAATTACA  
CCAACGTTTGCACAAAATATTGTTTTTTTTTATTTTACTAAAACATTTTGTAGCTGATTATTAATTTACAGAGTG  
TGTAACGGTTGGTGTATCGGTTTCTTTGTGTTGTGTAAGTAAGGATCAGATCTGACACCAAATCACGTCTTGGA  
CGGACTGTTTTATTCTCGTAAACGGATAAAAAAACACAGTGTATCAGTTCCAGCAGTTTACCTGGCAACCGGCAA  
TGATGGGTGCATATTAACAATTATAAAAAGGAAAAGATACATTGTGAATAATAAAAACAAAACAGATCAACAAAAA  
TATATATTTTACAAGAGCACGTGCTCACCACGACCACTTTCTTGGCTGGCGCAATAATAATGACCTATTTCGGAA  
CTAGTTTATAACATGCCACCAGCCAATAAACAGAGAGGGCAGTCAATTTAGAAAATAAAGGGCCATGTACATAATAG  
AAAAGCATGTATAAGCATTTTTTATAACATGTTAGAAGTGTATGTAATAAATAAAAAAACTAAAAATAATTACTGTAT  
TGACTTATGTAACTAGAAAAAAATCTAAATTTTCAACTACACAGGAACTACTGCATAAGAAAAGGTGATATA  
AGATAAGCACGTTACTAGTATTATTAAGCTAATTAGAATTTTATTACTCATAGCAATCTCCCAATATGTGGGGCT  
TTCTAGACCTTAATTTAATTAGTTTGTAGATAAACCTATATTCTTCTACAGTGGGGAAAATTTACAAGAAAATTA  
GAACAATACAATAATTGCACAAAATAAAGCAAGGCAACATTTCAAAGGAAAACATGTTTCAATCAGATTATTTAGA  
ATTAATAATTTTTTAAATAAATTCATAATAATTGCTACAACCCATGTTGACATTTTTTTCTTTTGTGTTAATTT  
TAAAGATTTTATGCATTTTTTAAAAATTCATAATATAACAAGTTTTTTTGTAAACCAGTTTTTAAAGTTATTTTGTCA

AATTATTAAATGTGGGGCCAAAGAAATGGACTGCCTAATGCTGAGTTTACTGACTGCATGATTTTACTGCTGATTTT  
GACTCTCCTAAAAGGTTTTGGGAAATCAGTGACAAATGCCTGAAATCACAGGCCAATTAGTGCTCGTTACATAA  
TTAATAACCACACAGTGTAAACTATCAAAAACTAAAACTATCACCTCGTTATGTAGTTATCAACAAAAAATATA  
CTTTGTGACTTGCCTGTTTACGTGTTACTTACTGTGTGTGATTGGTTATGAGACGTAGTTTGGACAAAAGTTGTC  
AGTGATTTCTCCTATTTTAAAGTCATGCAATGTTGTTGCCGATCCATCTTGCAGTGTAAAACAAAGCAGCGATGAA  
ACGCTAGCCCAGATAGTCATGCAGTGTAAAAACATCTGTGACACAACACTTTGAAAAATCCTACAGTCTGAACTC  
GGCATAAAAGTGCTGACCCTCTGTTATAATATTTTCATTCATTTTCCGCAAGAAATTCATCATGTGTTTGTGTTGG  
GAATCATGTGTTTTGTAG**GATTTCTCTGAGCCCTCAATAGTGAAGGAGGTGTCTGTTTCTCTGATGAGGATGAAA**  
**GTACAGCCTTTGGTAGGTCAGTAGAAAGCATTTCATGAACATCATGTATCTAGTGCCACCGTGTACTTACTTAC**  
ATTGCTCTTACATTAATAAAG**ACAGTGCCGAAGGATCCCAAACCTCTAAGCGCTACTCCATGTCGCAACAGAA**  
**TCAAACAAACGCCAGTATCCAGTCTGAACAACAAG**GTGTGAGAGCTATGTTTCTTAAAGCATCCATAAATATAA  
AAGCCTCGCATTTAACAGTTGAGCTGATTGGTTTTGCCTCTTGTGGTTTTCTTTTGTAG**CATGATGAGAATACTGCT**  
**GACATCCCCTCCCCTCCGCATAGACAATCCAGTGCAGAGCCACTAGTTTCTCTGATTAATACTGCTTGTGTTGAG**  
GTGAAGATGCACACATTTACATCTCTAGTTGATGCTTTTCCAGCTTTTAAAGCAATATATTAGATCTATCCAGTCTTC  
ATTTTGGAAATTAATTGCATGTTTATTATGCTACATTAATAAATCAG**GTGGATGACCAGGGTATGCAGGACGTCTT**  
**GAGCTGTAGATCTGCAAAATGGTGGTCTTCTG**GTATGTTTCCGAGTTATGCACTGCTTATAACTCTATTAAATATA  
CATTTTGGCAGCTTATGAGGCTCTGTTTATTCTCTAAAG**GCCAGGGTGTGAGATCTGCTGCCGTATCGAAGCTT**  
**TCAAAGCCTGTTTTGAGTGCAGAGCAAACCTTCAAACCTTGGTAGACATGATGTGCTGTCTCTCGCCTTCCAGT**  
**GATCGACAAAAAGAG**GTTTTCCCATCACATTCATTCCTTACAAGAACTTCTGTTTGGTTTCTGAGGACTCTCTT  
ACTGTGTCATGTGAACTTTCTCAGGTTTGCAGATTGCAAAATGTGTTTTTTTTGAAAGTAATGGAGCAGTTTTAGT  
AGGGTTGGGTGTGTTATTTTTTATATCATTATTTTTTTATCAACAGTAATATTGTAATGTTTTCACTTTGTACC  
ATCAAGCAAGCATAACCACAATTCCTAAATATCTTCAAATCATCACAGCTAATATTGATCGAGTTGCATTTGTAGA  
CAACATTTGTTTGTGTTTTCTGTTTTGCCAATGTTAATAGCTCAAGAACCAAAGCAGAAATATTTGTACATCTCAGAG  
AGCAACATTGCAGTAATCATTGAGTAAACAAAACAGTGATCCTTTTATAAACAGTACATTTTCTAAATGAA  
TCAGTGTGTTGAACATATCGTGTGAATGAATCACTCCTTGAACACCACCACCAACCAGCATTCATTCATTCATTT  
TCTTTTAAAGCTTTCATCCCTTTAATTAATCAGGGTTCCGCAAGCTGGAATGAACCGCTAATTTAGTCAATTTATCTG  
ATGCAGCGGATGCTCTTCCAGCCGCAACTCATCACTGGGAAACACCCACCAGCAGTTTATGCAATTTATCTG  
ACCGACTTGAATCTGTAAACATGCAGATAAATGTTTTTCAATCAAATATTGTTTAAATGCTAAGGTTGACAAATC  
CCGGTTTTGATGGGACAATTGTTGAACTTTTAATTACACGCTAATATGATGATAACTCTCCAAAATCACCTTACAT  
AAAGAACTTATTCACCTTGTGTACATGCTCTACAATAAGCTGTCAACGCAACATTTATAATGTTTACTCTTCTGG  
TCCAAAGTGTGTTACTTTCTTTCTCTGGATGATCTTAAAGCCACAGTAAGGATGTTTTTCTGACAGATATCACACA  
TGCACACTTATAAACTCACAGGAAGCAGGTTAATGTGTTTGCATAATGGGCAAAATTTGTCTAAGGGGAAGATAAC  
TAGCAGTAAATAACCTTATTCTGATAAAGAAAAACAGGTTAAATGTTTACTTGTATTATTGTCTGCTTAAACAT  
GCATGTAAATCTTCTGTTAGTCATCATTAAAGCTTTTATTGTTTATCAG**GAGAGCTGTGGTTCCACCACAGACC**  
**ATCCCAAATCAAGACATTCAAAATCACCCCTTCTCTCCCAAATCACTCCTGTCCGAGGACTCGATAACAAGC**  
**TGATGGATATGAAGGAGACAATGATG**GTAACTTTGGAGCTACATGGTGTGGGCTCCACCCGGTGGTTAATTTGGG  
ATGAGGACATTTGAATAATGATTTTGGGCTCACTCGTGTATACTTGGCTGTGATGTTACATAATGTTTTCCCTT  
TTAGTTTTTTAAAGTGAAAGCTGAAAACATTTTTTGAATCGCAGTGATCTGTGTTTCAAAATTTTGTGGCTCTTTT  
GTTCTTGTGCGCAG**GTTGAAAAGGTGTGAGCCATTGATCAGACCCCCGAGGGCGGTGGAGAGAGACGTGCTTAAAG**  
**AAATCTTCCCCTGAAAACCTCAACACTCCCCTGGAATCAG**GTATGGAGCCAGATCATTCAAAATTTCTGAA  
CATTTTCTGAGAACAAAGCTCAAGTCAAAGTGTCTGTTTTTAAAAATGTACTTCAAATGGGACATGAATTTACGG  
TTTACTTCTATTATTTTAAAAATGTTAAACTTGTAAACCAATTCGAATTTGGCACATTTTCACTTATAAAAAA  
ATATGACAAGACCTGACGTTTTAGCTTGTACAAAAACAAGCACAAAATCAAACAATTCATGACAGAACACATC  
CTTGATCACTGTGCTGCTCCTTCCATCTGATGAATTTCTCATAGCCATAGCCAGTATAGACATAAAGTGTAT  
TGCATGCATTTTATGTTAAATGTAGTGCAAATGTGACAGGACTGACATAAACATGGGGACGTTTTTAAAAATG  
TTTTATTTGTGGAATGTATTTAGAATTTTATGTTTTGTAATCAATTTGATGTGAATGATAGCAACTTAAACTTGTCTAT  
TTGTGGCACTTTTTATTCTAAATAACAAAATATTAAAGCTATACTGTAGGTTCAATTTGAGCCAAGGACAATGAC  
AGGTTTTGTACATTTTGTAAAGTGTTTTTAATAAGACAAAAACTCTGAGAACCAAATGAATCATATATTTCTTTA  
CAAAACAACCTCGCAGAAATCAACCATCAGTCCATTTTACACATTTGGGAATAAAATACTTTTTTATACTGTATTTG  
TTTTTTTATTTCAAGGACAGATAATGCAAATTTTTGGTAGAATGTCTAATAAAATCGTCTTAAAAATGACAATATT  
GTTTATCGCAATATTTTGGTGAATATATCATAACAAGAAATATGGATATTGTGACGGGTGTAAGTGTTCGTGTT  
TTTGCAGAAAAAATTTCTGAACTCAACAATACATTATGACATTTAGAAATGTGCTGTTTCACTTGCCTTTTAAA  
GCAAATTTAAACATTTGTTTTTATTAATCCACATAACTATGGACACTTGGGGAAAAAATGTATACAGTTTTAAG  
CATAATAATATAAAAAATGATAATTCTAGAAATTTGTAATGGTGGAAACATTTAAATAAAAGTGTATATAAAGGGT  
GTACAGACCCTGAAAAAATGTAACGTACAGTCCATTTTTCTTGGCTTTCTTTTTAAGGATTTTTGGGTAATGTTTCA  
AATGTTAAGTTTAAATAACAATGTTTTGGCTACATTTTCCAGACAGTTATATTGTCCTGACATTTTTTTTTTTTT  
TTTGGCAACATGCTTAATGTTTTTTTTTATATATGTGTATATATAATTTTAAATTTGAAAACTACCATGGTCAATC  
GAAATGTTCCATGGTTGTATGTGTGAAATATATATTTTTTTTTTATTTCTGTCAAGGTCATTTGTCAACACCCCAA  
TATATAAGTACATGTAGCAAAAAATATTAACGTAAATTAACAATTAAGTAATATGCATGTATGCAAGTATAAA  
ACTGGAGTATTTTTGTTATATTTGTATTGTAATTTATATTTTTTGTATATTTTTGTTATAAAAAATATATAT  
CACCCAAATATATCACTTGTTTTTTAGTAAAAAAGAAATCCATTTTTGAAGGAAATTTGCCAAAAATTTGCTGTTT  
TCTGAGAATCAAAGTTAAAAAATTTCTAATGTATCTT**CGCGACCTGCCGTCCGGCAATCAGAGGACGCT**  
**GGTCTGCCCTGATCGACACATGGCTCAACGAATCCCGTCAGCGTCTTTCTGATCTTAAACAAACCACCTCTCC**



TCTTCGTTCTCCTCCACCTCGTCCTACACAGAGTCCAGATCTGTTCCCCGCGTGTCTCCATCCCTCTGTCTGCC  
TCCAAGTCCACAGCGCCTCCTACAGTAAAGAGCAGATCCCGCCGCAGTCTGCCGGTGTGGGTCCAGCTGGTCCTG  
CTGAGCGCCGTGGCCGGATTCTGTTCTTCATCTACCAGGCCATGGAGACTAATGACGCGGGACTGTTCAAGCAG  
AGCGGCACAGATGACAGTACCAGCAAATAAAAAAAATAATAAGAAAAATACTTAACCAATGCGCCCCTATGGTG  
ATTCAGCAGCCATTGACTTTAAACTGCGAACTTTATATATTCAAGCAGTGACAGACACTCATTTTCTCTACTTTT  
TGCTCTTCCAAATGAACCGGTTTAGAGGAATGATTTTAAAACGGTCACTTTTCTTGCTTTTGTGA

**Genomische Sequenz des Zebrafisch LBRs**

Ausschnitt aus contig9684 (Sanger Institut) von Position 64777-83503  
fett blau: Exons

rot kursiv: untraslatiertes Exon 1'

kursiv: untranslatierte bekannte Regionen

unterstrichen Start- und Stopcodon

Kleinbuchstaben: Abweichungen der contig-Sequenz zum EST-Klon

**MPMGp567K10194Q3 (RZPD)**

grau unterlegt: durch Sequenzierung angeglichenes Exon 7

Kasten in Exon 7: durch Sequenzierung belegte Abweichung des EST-Klons

MPMGp567K10194Q3 (RZPD) vom genomischen Klon ICRFc71M10137Q5 (RZPD);

hier genomische Variante

TCACCGATCAACTGTCTGGCCTGAAGAGGACTCCATTTTGTAACCTCGATTCTCTTCAAGCTCAAATGCCT  
CGCTCCAATCAACGCTCACGCAAAGCCCTCCTTTGACCAATCAGAAAATTCAGAAAATTTAAAAACAGGACG  
CCCCACCAATCACAGCGCTTCCCGCCCTCAACAACGCTGGTAGGTTGAGCAGT*CACAGAGGGAGGAACGAG*  
*TTTCAGAGCGGGGGCCAGCGTTTTAAACAATATTCCTTTATTTTATGAACTTCCACGGAT AAGCTTTAGTGAT*  
*TTTTAGGAAAATAAGGTCGACTGAAG*GTAAGAAAAGTTTTATAAAATGACTTTGCGTGCTTAAAGTTTTTGTCT  
TGGGAATGTATTTATTGGGATTGCGTAGTTAACGGTACAGAAATACATTCAGCGCTCAGTCCGACCCAACTC  
TCTTTCTGAAGTACACATAACATGTTGCTTGTCTTTCTGCATATCTCTATATGAAAGATACAGTTTGTAGAAA  
CATTATGTTTTCTATTATGTGTAATTCCTAAAGCTGTTATTTGTTGTTTTGGTATTTGACTTGTATTGAAAC  
TCCGTTTTCCAGCCGAGTCGTTGCACAGGAACTTTGGGCACGGCGCGCATTTACTGCTCCTCCATCACAGCT  
CGTCTGTTTTACCACACTAATAACAACCTTTATACTGTTTTATCAACTAGTTTTGAATTCATAATTTATATCGA  
ACCATTCAGTTTCATTACGTTGTTTTGTCACGAAAGTGCACGTCGACTCTCCACTCTTGTGTAAAATAATC  
GCACATAGAGATCATTTTACTCTGCTTTGACAGTAAATATGTGTTAAATACACTATACGTTTCATTGTAATAG  
CTGTTTTTTGTTCCCATAGTTTCATTGATTCTCGTTTAAATGTTGCTGTTTACGAGTCTCTCACATGCAGAC  
TGACAATGGTTTTGAATACATGACGTTTTCCCTCCATTCCGGTGTCAATCTTCTGCTGTGTTAAAGGAGCAG  
CATGGCAATCCACACTAGAGCCTNTAGATCACATTTAAACTACACAAAAGCTTAAACACAAACAGCTTAAATT  
TCCATATTGACTTTTTATGAAATATGTAGGATTTATATCCAATCTTCAAATATATAAGATGTGGTGTCTGT  
TGTAAGTTTTTTGAGTAAGATTAATAAATGAAAACCGTGACCATTGTTGTCTGAAATACTATTGCTTTAAAA  
GATTTAAGTAGTAGTAGTAGTAGTTGAGTTGTAGTAGTAGTTTGAATAGCTGCTGGCAGTGATAGTAA  
GCGCGCGCGTGTCTGCTGTGCCCACATATTTGCATAACAAAACAGGCAGACTCCGCCCCTCACATTTCTC  
AGTTAAATCTTTTGTCTGTGGTTTTACCTAACTCCCTGAAGCACATGGGATATCTGGATTTCTGCAGGAC  
TTCAACTCAGTGTGGT  
ATGGTTTTAGGGTTAAGGCTTATGTTTTATGGCCTTTCTTTCCATATGGCTTTAATATGAAGTTCGGGGT  
GTTTCCCTGTATGGT  
TCATTTTGACAAAATTAATGTGTGGTGGTAGGGCTGGGCCGATAAACGATATTATATCAAATTCGGATAAT  
TTATGTGTGATAACTATGATTGATTTGGGCTTTTTTACTCTATATTGATCTAAGAGCCAATCACACAGCA  
GGAATGTACAGCAATGGAATCTAGAAGTGTGTTGATTATAATTTCCCTGCTAAAAATTTGGTTATGCTATT  
TAATTGACGCTTTTCAATTTTGGCGCTTCAGTCATTGTTGGGATACCTTTGAACCTGTTAGCATTAACTA  
AATATATTGTTATTGTTCAATATGGAATAAATTAATCGAGGTTGCATTTTGGCCATATCGCCCAGCCCTAG  
TTAGTGGCAAGTAACTGTTTCATGTATTGGTGTGGTTTTGCTCTGTGAATTTTTAATATCTGAATTTT  
AGAATGTTACACATGTGTGTTATGATGAATTGCTGTCTTTAATGGTAGACTGGTGTTTTTTTATATTAGAG  
ATTGTTTAGCCTTTTATTTTCAATTTACATTACAGATGTTTTGTTGAAATATGTCATAAGGGATATTTCAGA  
AAATATTTCAGTTACATTTTAAGCTTTTATTATACCTGGAATAATAATAATAATAGATTTTTAAAAATTTT  
TTGGTGGGTTTTATTTTCTATTATTATATTCTGCATAATTTTGCAGTCTGAATTAGCCATGGGACGATTACCG  
GTTTCGAGGTTTACCACAGTTTGGGAAAGACAAGGTTTTAAAACCGCAAAGTTATGTTATACCATTCTCTAA  
GGTATGTGTAAGGTATTTTTGT  
ACATCAGAAGTCAATGATTTAATTAATGAATATTTACCGTGACATGTTTACTGTTTCAAAAATATTATAAATG  
TTTTCTAAAAATAAAATATATTGTGTTCAATAAGGTAAGGTAAGTGTTTTTTTAACCCTGCATTTTAAAAAAG  
CACATTTTAGACCAGTAATCACAAATATCGTGAAACTGTGATATTTTTTATCCAGGGTTATCATACCCGTTCAA  
ACTTATACTGGCCCATGCCTAGTCTGAATTAGGGCTGCACAGAAAAAACATTAATCACGATTAATAATGGCA  
ATTATTTGTTTTGATTAACTTTTATTTCACTTGTGTATTATTGAATTTTACAGCCACAAATATAGAAAAA  
AACAAACATGACAATATTTATTTACTGATTGTGGGTAAACAAATATCGTTATTGTGATAAAAAATATTATTA  
TCGTACAACCTAGTCTGAATGGTTGTAGTTTTTTATTTTTGTTAAATCTTTGCAGTAAGGTTTCATTTGTTA  
AAATAAGTTACGTTAATGTAGTCAATGTAAGCTTCTAAGCAGTTATTCATCTTAGTTAATGTTGCTAATGTT  
AACTAATTCATATATTGGTAACCGATTAGGCATGGCCGGTATATGATCTGATGGTATTAGGCTGGGCGA  
TTTTGGCCTAAAATCAAATCTGATTAATTGAGCATTTTTAACTCAATACGAATAATGAATGATTTCTTTTAT  
TTATTTATTTATTTAATTTTTTGGCCCTCTCTGTGCCCTGTGGTATGTGCCTGTGTGAAGCCTGCTCCAGATCA  
TTCCTGCACTTGACACAGAAGTGTAAACAGAGCGGGTACGTCGACTCCACATGCGGTAAGGGAAGTAATT  
GAAAAAAAATGACCTGGAAAATGTTGATCGATTAAGGTTCTGAATGATTTTGATTACTTTTTCAATTAAT  
CACCTGCGGTAGATGGTATGATAACCTTTGGATAAAAAATATTATGGTTTGCAGGATTTGCAGGGCTCAACAA  
TAAGGACTGCCCTATGGCCCGGGCCAGTGTGAAAGATGCTTTGGACAGTAGACAGGATTTACTTGGCCCG  
ATTTGGAAAAGTGTGCTGCTCACTAAAGTTAACTTGCCTGCGACTATTAGTCAATTTGTGTGCATTTTAAAG  
CTTGAGCTTTTTTGGTCTTAAATGCTATCTTCTCTGATGTGCGATTGCTTTTTCGGATCTCCTATCTGTTTTG  
AAGCACGCTATTTTTTTCCGTATCCTGGTAACAACCGTACAGCGAAGAGACGGCAACATGGCAGCAATATC  
AAATTAAGGCTAAATTAATAAATTTTTATAACGCTCTTGAAGCAGACATTTACATGAAAACACAACGAAAA  
AAATGGTGATTATTTTTATTTTTTATTTAATTAATTTATTTTTTTTGCACAATTTGCCAGTCAGCCACCTTTT

GTAAATAATTTCAAACCTGCAATAAAAATACCTCCACATTTCCATAATGCAATTTTCGTTTGCATAGCTCTG  
AATTGTGCTCATACATTTATTAACATTTTTCAAATATTGAAATTTCTAGATTTACAGAAAGTTATTTTTGCAC  
ATTTATTTAAAATATGTGGCTAAAAAATAAGCATTAACTTGCTTTTTTTATTTATTTTTTTAATGGGGCCA  
GTGAAAATTTGGGCAGGGCAAGTAAAAATCTGAACCATTTGGCCCGATTGGACCAGTAGAAAAATCCCTTAGT  
GTTGAACCCCTGTATTGTGATTACTACTCTAAATGCATTTTTTTTAAAAATGTCCGGGTAAAAAACTAAAACTT  
TTTCCCTTTGAACACAATATATTTTACATTGAGGAACATGTCAGACTAAATAATTCAAATAAATCATTGAC  
TTCTGCTGTCTACATTAGTTTCAAAAAACAAATTTCTTTACAATTTAAAACCTTCGTCTTTGGATGTCTTTT  
CTGCTGGAGATAATGTTGTCCAAAAAAAACAAAAAGAAAATAAAAAAAAATCTTACATATACCATAAGA  
ATGGTAAAAACAGTAACTTTTGTACTTTTCAAATCGTGGTATTATCTTGAAAGCGTTTTTTTTTTTTTTCTTAC  
ATGTTGGTTTTACGTTATAAGGCTAAAATATTTTAGCATATTTATTTTAGAACAAAATTTTTTAAAAATATTT  
GTAAAATGTTGAGTAAAAAGCTATCTTACAGATTTTAAAGAAAACCTTCAAATTTAGTGTAACTTTGTTT  
TGGGACTCTATTCTTTAGAAAACCAACAAAAGGGTGTAGTGTATCTAGATCCAAATGTAATTAACCTAAAAAG  
AACAGAAAAGTTGCTTCTGTTGGTTATACGTTGGAAAGATAGATGTTAAAAGTCTCTCATCTGCCAGAAGTT  
GATGTTACAGGTACCTGTGTGATGTTAGAATCCCTGGCATAAAAAGCTATTGAGAACCTCAACAATAGCGCTGT  
TGCAGAGAGTACAGTGTGTAATTCAGACCCATCAGCACTTCTCAGGCTGCAGCTGACATCACCGCTTT  
TTTTGCATCAGGCCATGTGCAGCTACTCTGGTGTTCCTTATGCTTACCATTGAATGTGTTTGAATACT  
CACTGAGAATCTGTAAGGCTAAAATACTAGTTTGAACGGAACACGCAATGCGTTTTTGAAGGTGAAGTGTG  
TCTTTTTTTCTATGTAATAACTTAAATATGCAGGGCAACTGTAATGAAGCAATTCATAGCATATACCTGT  
ACTGTGGCACAGTTAACTAGGGCCCTGTGATTTCTATGATTTCAAAAAATGAACATAATCCAATCATATAAAA  
TTAAAATGTATTTTACTCTATAGTGCAGAATATCACTGAATTTTAAACATGATTTTGCATGAAGAATTCGG  
AAGCAGTGCACCTACATTTAACAATGATTTGAATTAGTGTCTTTTAAATATATAAACTACAAAAACAAATGTTT  
TGAGCATGTTTTGAGGTTAAGCGTTGAAGTCTGTTTGCCTTGTTTTCTACTTGTGTTTTAGTATAACTTAA  
TCAGAATGCTTAACTGGTTGTAATACTGTTTGGTGTACTACTGCACCAGAATGAAATTTAGAAAATGTTT  
TTGAAAACAAATCTTTGCACCTTAAACAAGCAAAATTAATTTATATATGCTAAATGATGTCTGTGCGTAAAGGTT  
TCCCTATCCACAAGAGCAAAAAGCGAAAGTGAACCTTAAATTTACGTCGTGTAGATAGCAAATGCGCTTATGGTG  
TGACCGAGCTGGCAGTTAAAGGCAATGGGAGATGACGCTCTGATTGGTTTATTCTCAAAAACACATATAAC  
TCGTTAGGAAAATAAACTCAACCCTTTTAGACCATGTCCACGGCGCAAAGCAGATTTTCTGTCTCATAT  
TAGCAGATATGAATTTCTGACACACCCTGAATGCGTTTTGCGCCCTGCGCTTTCCGTTTTGCGCATGGACCGTC  
AAAATAGAGCCAAATCATTAACAAAAGTTGAGTGTTTAATAGTTAAGAACTCCATAAAAATGTGTTGTATGG  
AATATGGAATACTTTAATTTATTTATGATATGTTTTTATGCTTGTGAAATGATTTCTTTCTTTTTTTTAA  
AGTAAACAAAGATGCGCGCTGCAAGTTTTCAGATTGGAGATACTGTAATGGGCGCTGCGCCCGGCTTAAAC  
TTTTATATGAGGTCAAGGTGATGAGTTTTGATAACAAGACTCGCCTCTACACCGTCATCTAcaaagatggta  
ctgagctggagctGAAGGAGTCAGACATCAGGTATGAAGCCTCTCTGACAGGTTTTCCAACATGACTCAA  
GAGCATCCTTTGCTTTAGTTGAACCTCATCTGACAGTCTATTTGAAATAGCTTGCATGACACATTTACCTGTC  
TAATTAGCAAACAGAAAATGGGCCAGATGTGTTACTTATTTCTTTATATCTTTAGAAAAGATATTGAGCATA  
CTGATTGATAAGTTGATATTTAATATTTCTGTTATTTGATTACTCACCATCATATTTGTTCTAATCCCTCGAG  
AGCTTTGTTTATCTTTGTAACACAAAATAGTATATATTTGAATAGAATCCATGGGCTTTTTGACCCCTCAC  
TACAGCAACGGTTCAGAGATGTTCAAAGTCCAGACAAGGAACCAAAAACCTTGTCAAAAACATTCCATGTGAC  
TTCAGTGGTCATTATACGGTTTTATGAAGCTCCAAGATTAGATCTATGTGCCAAACAGCTGTAAGGACATGG  
TTTGCATATGCTTCTATACGTCAGATTAACGTGCACATTTACTATGAGTAATACAACAGTTGGGTGTTACA  
CTGCTGACTCTAATGCAAAATACATTTGTACAGCCTGTGGTAAACACGCTTTCTAATCTGACGCAGAATACAC  
CGGTGAACATAAGTTGTTTTTAGCATTTTTTTGTCACAAAAGTTGTCTTGCAGCTTCTTATAGTTACAGTTG  
AACACTGAAGTCACATGGAATGTTTTGAGTGTCTTTTAGAACAATTTCTGTCTATGGGGAGTCAGAGTCAAAA  
TATAGTAATTTGTGTTTCTAAGATCTAAAATCTCCATCAGATTGGATGTGAGAGTGAGAAATGAATAAGAA  
TTTACATTTTTGGGTGAACATACTCTTAAATTTGTCAAAAGGCTTGGTTCACCCAAAAATAAAAAATTTCTGAGC  
TCTTTTGAACATGAAAAGAAGATATTTGAAAAATTTTGAAGCCATTGATTTTTCATAGTTTTTAATTTTAA  
CTATGAATGACAGTGGATACTGGTTTCTTGCATTCTTCAACATATCTTTTTGTGACTGGCACTATGAATGTG  
ACCTACATTATGACAAATAATAACATAATGTTGATTTCTAATTAATATTTGTTGCCTTTGTTGACAGTGTG  
GTCATTTTTCAAACCTGCTGGACGTCGAGGTCAAGATCTCGATCACCGGGACGCTCGCCAGGACTTCAATCG  
GCACGTTTCCCGGGGACGCCACGTCGAGTCGCTCCGTTTACCAGCTTAGGACGCGCCGACAGAGCTTCACTC  
CGCAGCACAGAAGTGCAGCAAGGAAAAACTCAAAGAAGTGTGAGGTTTCGACTCACCTCTGTGTAAGGTTT  
TACTTGCAGTGGGTGTGCACATTAAGTCAAATGTTAAGGCTTGCCTTATTTATTTAGCTGTTTTATGATT  
ACAATGGTGATAGGGCTGAACAATATTTAGTTTGTGCATTGATATCACAATATGTGTATCTGCAATAGTCAC  
ATGGCAGGAATAGATTATTTATTAATATTAAAAAAAGATATTAACAGAAAGGTTGCTGGTTCGAGCCTC  
AACTGGTTTCAAGTGGCGTTTCTGTGTGGAGTTTGCATGTTCTCCCTGCATTTGCGTTGGTTTCTCTGGGTG  
CTCCGGTTTCCCCACAGTCCAAGACATGCGGTACAGGTGAATGGATGGGCTAAATGTCTTAGTGTAT  
AAGTGTGATAGGGTGGTTTTCCAGAGATGGGTTGCAGCCAGAAGGGCATCCTCTGTGTAAAACATGTGCTG  
GCTAAGTTGGCAGTTCATTCCGCTGTGGCTACCCCTGGATTAATAAAGGGACTAAGCCGAAAAGAAAATAAT  
AAATGAATGATATTAACATTTAGTATATCAAAGTATTTATACAGTAATGACCATGTTATTTGATGGTTGATT  
GTTCAAGTTTTTGTATTTAAATAGTGTAGACTACCAAGAAAACCATAAAACACTGTTTATTTAACTTCAATTT  
TTACTCTGCTATTTATATATATGCTTGTAAATTTATTTGATTTATATGCAGATCTACTGCATAGAAAAATAATA  
GATCCTCGTTAATGTAATGAATAAAAATCTATCCAAATAGAGCTGTTCAAGTCTCCTGTGAAATTTATATCT  
ATATCACAATATAACAAGTTGCTAAAAAAAATACCAGAAAGTCAAGTTTTTCAATAACGTGACGCCCTA  
AAATTTATATAATTTTTTTTAAATATAGGAATATTTTGAATATTTATTTGCAGTCTAAAAATAAATTTCTTTA  
TTAATGTGTTTAAATGTAATTTACACATGATGGAATCTTGCAAAAACATTGCTCTTTTTTTTTAACATTTGT  
GCCACTTTTTTGTAAATGTTTTGTAACAACATAGATATTTATTTTTTTAGGAATAATTAATTAATAGAAGAT  
TCAAATTAACAAAATTTATTTGAAATAGAAAGCTTTAAATTTGTAACCTTAATTTTCCATAAAATGCATTTTT  
GCTTTCATTACTTGATTTCTTTCTGATCTAACTTGACTCAGTCTTGTAAATAGTTACACTTATTTTTGGG  
TTTTAATTTCTTTCACATCAGTTAACTCATGTTTACTGTGTTATCTCATTGTCTTTCTCGTGAGTTCAAG  
TCACATATCCTTGACTGTCTATCTGTTTTCAGGCGATGAAACACGAGAACACAGCAGCAACAGCAAATCTGAG

AAGAAAGAGGAAAATAATACAGCTAAAGCAGCTCCTGTAGTCACAGAGGTATGAATGCATCAGCGATTCA  
TTATCAATAAAATTTTGATCACTAGCAGCAGCAAGTAAACCATCTTAATGTATCCTGTCAAAAACCTGGTCTT  
GTGAAGGCTGGAATGTCATGATGCATGCATGTTGTGCCCTCCATGTGTGACAGGAGCCATTTAGTTGTTC  
CACAAGCTAAAGCTGACTGTGGCTCTGTTTAATCATACTGTGCACGTTTTTCAGCATTTTTTCTCCCTCGT  
GGGCAAAATTGAACAGGTTTACAAAGCATGACCAGACTGCTTAAGCTTTACATTAGTACAGTCACGTTATAG  
AAAAGGCACAAGGTTTCAGTGGTAAACCTTTAGTCTTTGCATGACACAACGCATAAACTTTTACACATAAAT  
GTTTTTACTCTATTTAAACATGCAGTAATAGTTTTAAAGGAGGGTGTGAACATAAATGTTAAAACCTCAGAAAT  
TTGGATTTGGTTAGATGTAAAATATTTGTAATGCTCTCCAAACCTGCATGTATTTTCATAAAATTTAGTT  
AAATGTTACTAACTTTATTTTTCCCTTCAGTAGCATTTTTTTAGTGCTGCTTAATATTTCTGTTTGAATA  
GAAATCGCTTATTTAATAAATTTGTCACATTTTAAATAGTCATTTCTTAATAAGTGTCAATTTTCAAAACA  
AAAAAAGTTGGTTCTGTTTCAACAGATGTGAAATTTATTTATTTTGTAACTGTAAAATAATTTATGCTACT  
ATTCAGTCTTGACTCACTGTAACGGGTGTAACAGGAGAAGACAGAGACTGAATCAGAGAACCAGACAGGTGGA  
CGATAATAATCTACGGCGCAGGAAGGACCAGGGTGTAGGCAAGGCTGTAGAGCTGGAGAAAGCCGTAGAGTCT  
GAGCCGTTATTGCAAACTAAAGCACCAGCAGCCGTCAAGACCGCCGATCTGGAGTTTGGAGGAAGAGTCGGT  
AAGCCTTTATCGATTTAATTTAATACTGTACTGTATGGCTTGCCGAAAATTAGAGCGCCCGTTAAATGGCTT  
AACATTTTCGCCAATGAATTTTCGGTGGCCAAAAATTTGGTTTGTCTTAATAACAACACACTCTAAGATTT  
ACATTTGTCACATTTCTGGCTTTAGACCAATCTAGAGTAAAAAAGGTCAGAGCTCAGATTTGTTAT  
TGACATAAATTTTTCGCGATTTGATATAATATCGTTTATCGGCCCTACCAACTGTATTTCTACTCTTTT  
GATAGACTGTGTTTTCAGTAGCATTTTCCCCACATTTACTTATTTGTTAATGGTCTAGAATTTGTCTCTTTGG  
GTTAAAAATATAGGTTGTTGGGCTTCAAAAATATAATTTAGCATCATTATCGCAATGTAGACATTTGCAG  
TGCAATGTTGAGTCTCAATTATAGTTGACCAGGAGCCAAAACACATGTGATCTGTAGAGTCACTGCAAGT  
TTACCACAATAGAGCTAAAGTTTATCATCAGAATGTGTTTTAAGGCTGTGAGACTGCACTGCAAAAATG  
CTTTTCTTACCAAGATATTTGGACTAGAAAACAAGAAATGGAGAAGCATTTTCTATACAAGCAAAACACAT  
GTTTTTCAGAAAATAATAGCCCAAATTAAGTGACTTTCTCTTCAACAAGCAAAATAATCTGTGCACAAAAGCAT  
TTTTTCCATTGTGAATATTTAATTTCTGTACGCGAGTACTTTTAGACTCTCCAGAAAATGTTAAAGCTTTT  
TATTTAAGCCATCTGGATGAATTTGATTTGAGAATTTCAAAAATTAGTGCAGATAAGTAAAATATCGTAAC  
ATCAGATTTTGTAAATTTGTGTCCAAATAGTAAATAAAAATATAAGGCTTAAAATAAACAACATATAG  
CTTAAAGTTTTAAATTTCTTTTTACTACAGGTTAACAGCATCATGCACAGAAAATATAATATAGGAATAC  
TGTCAGATTTATTTCTTAATGTTTGTGTTGAAAAGTGAAATGATTTATGATAAAAAGATTTGGCTCCCTCTC  
TCCTCAGGGTGTCTTCTGATGTTTCTGTCTGCTGAGGCTGTGTTGGTATGCTCATTCTCTGTGGGCA  
GAAGGATGCCAGTCTCCAGACTTTCTCTTGAGCTTTCCCGCTCTTCAGTCTGTCTGGGATGCCAGGCTCTT  
TGGCATCGTCTGCTCTGGCTTCTCTTCCAGGCCCTCTCTCTGCTCCCTGTGCGAAAGGTACCGTCCAC  
AACACATGACTCCCGTGACCTGAGTTTAAAGCGCATGACCACATAACTCTGTGGCTCTCTTTTTTGTGTG  
CATGTTAGCTGCTGTAAGCAGGCTAGATTAGATTAATCACTGGAAGTGGCATGCAGATTGAAAGCCTCGCT  
GGAAAACATCTGGTTTTGATTTCCAGACTCTTAAGGGTAATTAAGATAGGATCTAAAATTTGCTGCGCTTTT  
CCATGAGTTTGGGTTAAGCTGATTTATTTCAAGATGAGTTTGTGCAAAAATCGTTTTAATAGCGAGTACGTT  
TCTGAATTTGTTTTATGTTTGTCTGGCAATTTTAGTTTTAGTTGCACTCTGTGACCTTTAGGAGCTTGATGT  
ATCAACTGTCATCTAGTTTAAACAATGGTGGAAATATATAGCTTGTGTACAAGTAACAACCTTGGTTCTTTATT  
AGAACCTTTAAAATAACAGCAGTTTTAAAGGTGTTTTATCCAGTTTTGCAGTTATCTGTTTTTAAACGCATCT  
TGCATAAGCCGAAACATCTCTTTGACAATTTTGTAAAGCATATTACCTTTTAGATTGTGTGTTTTTATGAT  
TAAAATGATTAGATTTTAGAACAGAAATTAATACATGTTTGTGTCATACCTCAAGGATTTGGGTTATTAGGC  
TGGTTTTTACACAAATATTGCAGAACCATTTGTTTGAACCGACACTAGTTCCAGTGTTAACCTGTTAATAT  
ACTAAAGCACTTACTTAATACTTTAAATAGTTTTTCATTTTAGTTTTGTGCTTTAGTCATTTTTTATTAA  
TATATATATATATATATATATATATATAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA  
CACTCTTTCTTTATGTTTTTGTATTTGAAAAAATAAGACAAAAGAATAATCTTCATCCCTTTTAGTGAAT  
TAAAATTGCAAATCAATGTAATAAAGTAGCGTATAACAATACAGATAAATGACTGTTAGTACTGCAGTACTG  
ACAATACTACCCTTTAAAAGTACAGTATTTTGAAGTTTCAGTATCCTTACCATAGTACCTTACATGAAGTC  
TGCAACCCTAATTTATAATTTATTTTATTTTACGCTTTTAACTGACTTGTGTTCTCTTGTAAAATTTGTGTGTG  
TCTCTCTCTCTCTCTCTCTTTTGTGTCGCTTCTCTCAATCCCTCACCTACAGCTTGTGTAAGGAATGCC  
ACTTAAAGATGGGAAAACCTTTGAAATACAGGATTAATGGTGCAGACTTCAAAAATTTCTGATATCAGAACT  
AATCTATATGGAATTTTTAAAATTTGACTGATTTAAAAGCTTAATTTCTTTCTGCGTCAGTTTTCTATGC  
ATTACTCTCACGGCTGTGGCAGCAGGTGTGCTGTGTACCAGGAGGTGGATCTCAGCTACATCCATGCACA  
CTTCTGCAAGTTTACACCTCTGCCCTGCTCATCGCAACTCTCTCTCAGCATCTACCTGTTTATCCGCTCCCG  
CTGGGCATCTAAAGATGAGCTAGCTCCCGGAGGAACTCTGTGTAAGGCCATATAAAAATCAGCCAGCACTAA  
CTGACTTCTTCTCTTTGGTTTTAGCATTTTTTCACTTGTGGTTTTTCAAAAATGGTTTTATATCCTCATTAT  
TCACGCTCAAAGGGATAGTTACCCAAAATGTAAGTTTACTCATCCTCGAAGAGTCCAGGCTTTAGGGAT  
TCTTTATTTCTGGTCAACTTAAAGAAGATTTTGAAGAAGCTGAGGACCAGACATTTTCTTTTATTCTTTAA  
TATAGAATTAATAGTAACCAATTTTCCCTTTTTTTTTTATTTTTTTTTTTAGTGTTCACCTAAAAGTCACT  
AAACTGGTTTGGACCAAGTAAACCGATGGGTAATGATGACAATTTTCAAGTTTTTAAAGTTTTGGATGAACTA  
TCCCTTTAAATAATCGTCCAAGCTGTCTCATAACTCTTCTCGTTTTTCACTGTGCTGTGATTAGGATAAAC  
CAGCTACAATGTTTTATGATTATGAAATAAGCCTTTTCAAGTAAATATGCCATTTAAATGTTAGGCTTAGGT  
ATTTTTAAAAGATTTATACATAATTTTTTATTTATTTCTCTAGGCTACATCATTATGACTTCTTATGGGCA  
GAGAGTTAAATCCCGTATCAAAAGCTTCGATATTAAGTTCTTGTGAAATGCGCCCTGGACTGATGGGTT  
GGTGAATATTGGTATTTGTTTGGCAAGCCTCATTCAAGGGTTCCACAGGTCAGGGTTATGGAATATCATA  
TAATATTAATTTATTTATTTATTTATTTTCGTCCAAATAAAGATCACTGGTAGTGTGAATCAAGGTTATTTTTGT  
AAACCAAACTTGGTCTAAAAGCATTTTCTTTAACTGGCATAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAA  
AAAACAACTGATTAGATTTTGGCAATGTATGCAGTCAATTGTCTCTGTATAAATCATTTTTAAAATAATA  
TCTTTATCTTTTAACTTTAATAAAAAATCTAATCCAGCAATGAGACCATTGCGGATACACACATTTGCGATA  
TGTATGCTCAAATTAATGTAATGTTTCAAGCCTTAAAGCAAACTTTTTTTTTAGCAAAATGAAGAAAATGTGTTGT

AAAAATGCCATCTACAGGTGGTTCTCTAAACAGCCAAATTATTGCTTTTGATAATTATTATTTTATTTTCAGT  
TTTCAGAGGTTAATTTGTTATTTTGGTTAATTTGGGTAATTTATGGGTGGCATTTTTGTATGGAGTTTGCAT  
GTTCTCCCCGTGGTTGTGTGGGTTTCTCTGAGTGCCTCGGTTTCCCCACAAGCCAAAGACATGTGCTGTA  
GGTGAATTGGGTAAGCTAAAATTTGTTTATAGTGTATATGTGTGAATGAGTGTATGGGTGTTTCCAGTGATT  
GGTTGCAGCTGGAAGGCATCCGCTGCGTAAAACATGCTGGATAAGTTGGTGGTTCATCCACTGTGGCAAC  
CTCTGATTAGTAAAGGACTAAGCCAAAACAAAATGAATGTTCAATTTTTGTACTTTAATACTGTTACTCT  
CCCCAGAAAACTTTTAATTTTGTCTAGTCACATTTATATATTTTATCCAAATGCACTGCGTAGAAAAAG  
ACTTGATCATGCCAGTCAATCTAAATGAATGAATGAAATCTTTCTAAATAGAGCTATTCAAATCATCAGGTG  
ATATTATAGTCACATCGCAGCAAAAACAAACCTTGCAATGTCAGATTTTTTCAATATTGTGCAGCCTAATAA  
GCATGTTTAAAGTACATGATCTTTAATATGAAGTAGTTTGCCTTAATCTTTCATCATTTTAACTTTTTTTCAT  
TTGCATCTTTATGGTTTTGGATTTCATGTCTGTTCAAACCTTCAAACATTTTATTTTTTATCACTAAGCGTTTG  
CTCTTCACTTAACTGTAAGCTGTGCAAGCTCCACACTTTGCTTTGGTTGGCATTGGACTTTTTTTGTTAACTA  
AATTGATAAATATATAAAAACCTAAATGTAATAAAAATGTGTTTCCAAAAACTAAAATAATACTAACGAAGCTA  
AAGCCAAAGCTAAAACCTAACCTCAAATTTACAGCAAAAGTAAAAGCATTGAAATAAAAATTCATATCTATAA  
TAATAACCTTGGTGTGAATGAGGCTTGGTTAAACTGTTTTTGTAAACTGATGTTGTAATTTACTCCCTCTTGT  
GATCAAAATGATTAGTAATTTCTCAGATCTTGTGTGATGTTTTTTGTTTTGTTTCTATAAAAATTTTGGACATA  
TACTGAAGAAACACAATTTGTCGGTTTGTTCACAGGTTGTTGATCAACTTCAAACATTTTATTTTTTATCACTAAGCGTTTG  
CTCTTCACTTAACTGTAAGCTGTGCAAGCTCCACACTTTGCTTTGGTTGGCATTGGACTTTTTTTGTTAACTA  
AATTGATAAATATATAAAAACCTAAATGTAATAAAAATGTGTTTCCAAAAACTAAAATAATACTAACGAAGCTA  
AAGCCAAAGCTAAAACCTAACCTCAAATTTACAGCAAAAGTAAAAGCATTGAAATAAAAATTCATATCTATAA  
TAATAACCTTGGTGTGAATGAGGCTTGGTTAAACTGTTTTTGTAAACTGATGTTGTAATTTACTCCCTCTTGT  
GATCAAAATGATTAGTAATTTCTCAGATCTTGTGTGATGTTTTTTGTTTTGTTTCTATAAAAATTTTGGACATA  
TACTGAAGAAACACAATTTGTCGGTTTTGCTTCTCTATCAGGAGTGGGATACTATATTTTTTTCAGGAAACCTGAA  
TCTCAGAAGTTTGGCTTtAGGAAAAACCTTCTGACCCGGCAGTGTcTCGTACGTGTTTTGAAATGGATGAA  
CCAACACATGAATATATATGATTTTTGTTTTTTTTTGGATTGGTCAATTTAGATGTTTTTTTTTTTTTATATCCT  
ATCAGATCTGAAAACCTATTCTACTGCAACtGGAAAAGTCTCATTTGTTCTGGTCTCTGGGGTTTTCGTCCG  
TCATCCCAATTACCTGGGGGACATCATCATGGCTTTGGCTTGGTCTCTACCATGCGGTGAGTGTGTTGACTTC  
ATTTTACCAGAGACCTCTAGCTTTGTTTCTATGTTGTGCTGTGTCATCAAAATGCTAAATAATTACCTCAT  
GATTGAGATCATCTCACAAAGTGTCTAATGTTTTATGCAATTTTTGTGATATAAACCATTAAATGCCAAT  
GACTTTAGAAAATGTAAACAGCTGTAGTTCTTGA AAAACAACCGCTGTCTGAAAAATATACAGATATCCATAA  
ATTTATTTGTAGAAACACTCATTTAATTGCAAACCTATTACTATTATGCAAATAAAAATATATATTTAATTAT  
TGTATGAACTAATACAAAAACAACTACTATAATAACAACAGATTTTTTTTTCAAATTTTAAAGAGCCTCTAT  
CATGATTA AAAAAGTTATATTTTTGGTTTTGAGGCTCTAACAACAGGCTGATATGCATGGAAGGTCAAAA  
AACACTTTCGAGTCTTATAATATGCGTTTTATTTTTACCTAATTATCCAGCGACTCCCATATGCTTTATTTA  
GTAAGTCATTTGTGCCAAAACCTTCTTAGCAGATACTAATTTGGACTGATTGATCCGATGACCCAGTCT  
ATTGCGATTTGTCAGTCTGCGTTTCAAGTGTGAGACCAAGAAATGGCCACCAGCTTGTCAACAATTTTGAA  
GTAGCAGAGTTTAAAGTGTGAGCCCAATGCAGGAGTACATTAAGCAATGCAGTTTAAACACCAGCATATTGCT  
CTATTCTTAAACGTAAATAAAAACAGCGACACACATTCAGTATTAATCCACACAGTGGCAAAAGCTGAACTA  
TTTTGAAACTTGACCGCCGCACGTGTGTAAGGACAGACGATGGTGGCCATAGCTTTGAGAAAATGGCAAAATGG  
CAGAGGTGTTTTTATAAACGATATGAGAATATAAAAAGTTAAACAGATACACTACAAGTGGTTACGAGTATC  
AAAACAATTA AACACATAAATTTGCAAGCTAGTGA AAAACAATCGCACTTGAGTTACTTGCACTTGTGAAATTTG  
AGGTTGAAACTGATCCATGAACGTGTGCACTGTAAAGTTTCTGTCAAGCTCTGACAAAAGTCCCATACATCAAT  
GGCTTTTTCTGATCATGTTTTTAAACAACCGCAGACGAATCCTCTGTTGTAACATGTAGATTGCTGTAGA AAC  
AACACAGCACAAAGGCTGGGGCTTCAATGCTGAGGTATTTATTGCAAAAATAAACTTCAACCCTGACTCTTC  
ACAGTTTCATCTTTGGGTGGAGAAAATAACATTAACCTTCTTTTCACTTTCAGAGCACAGCGTCTTCATGAC  
ATGATTC AACCGGATCTGCTACAGTGTGTTGCTTCTTTTTCTTTCTATTGTTTGTGGCGGGGCCAGGGG  
TTAAATTTTCCAGGTCAGCGTGCACAACAATGGGTGGGGCTTGGTTCGTACATCACTGATAATATATT  
TAAACAACCTGAGTCAAATCTTTTATAGATGAATCAAAGTTTTTAACTCCGAATTTGAGCCTAAGCTTGATA  
TATCACTTCACTTAAAGCTGTTACACACTGCATAGAAGGTCATTTTCAA AAAACACATAATAGGCCTCTTTGA  
TAATATTA AAAAATAATATATTTTTGAAATGTGTATAATGAATATTGTTATGCAATATAAATGATATACTATA  
TATTTAATTTTTTTAAAATGTTTTTAGCTTTTAAATTTTAAACCATGGAGCTTTTATTTTTGGTGGAAAACCTG  
CACAGAAAATCCTGAAATGCTTCTCTTTTGTGACAACCTGATATATAATTCCTTCTTTTAAAATCTTGCGA  
AGACATTTGGGTGAANTGTTAAGTTTTCATATATATACGCCCTTGAATGACACTGAAAACATTTCTATCAAAG  
ATGACAATGATTTATATAAATTA AAAAGCAATAAACCATATCACATTTGTA GAATTAATTAAGAATCTACTG  
GTAATTTGGCAAGTGACATTTGTTAATGTACTGACCACTGTCGATTGTTATTATTTTATGATTCAGTGTTTT  
GATAAAAATGATATCTGACTAAAGCCAGCATTTGATTTCTGTGCTTTTCTGTAGGGTTCAAACAATCTGGTCCC  
TTATTTTTTACCTGATCTATTTGGTCACTCTGCTGGTGCACCGTAACGCACGGGACGAGCGTCACTGCAAGAA  
AAAGTACGGCTCTGCATGGGAAGAGTACTGCAAAGCTGTCCCCTACCCTATTTCCCAAGAGTATACTGAGA  
CTTAGTCTGTTATGGACACTCGGGGCTTAAACACCAGGATGACACCGAACATCAGACAGGGAATGAGTCAAT  
AGCAGCTTAGCCTCTTTTTAAAGTCTTTTAAAAACA AAAACAATTA CAATTTGAGCACCAAAAATCAAACCAA  
TTTTTCAGTCAACAAGCGTTTACGGATTGTGGCACTGCCCCAGTTTGCAGAGTTTGTCTTTAGATGTAT  
ATTAATGTACATATGTTTTTTTTTTTTTTTTTAACTTTAAATTTGTGTTGCATAATCCTCAACTTGCCATCTC  
ATCTGATGTACACACATATACACATTTAACTGATTTTGGCTATTTACCATTGACTTTTTTTTTATGACAC  
ATTTGTGAATGCTTTTGTATATTGTGTATGATGGGATTTTTTTATATGTGTATAGTAAGGAAAAGATGTAAT  
GTTCTTCTCAGGACCAGCAATTTGTGAAAAAAAATAACAAAAAAAACAACATAAAAATAAGCAA