Postmeiotische Expression und funktionelle Charakterisierung von Lamin B3 in der Spermatogenese der Maus

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

vorgelegt von

Wolfgang Schütz

aus

Heilbronn

Würzburg 2005

Eingereicht am:

.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:	
Gutachter:	Prof. Dr. Ricardo Benavente
Gutachter:	Prof. Dr. Clemens Müller-Reible

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:	
--------------------------------	--

Für Monika

EINLEITUNG		.1
1.1 Die Spe	rmatogenese bei Säugern	. 1
1.1.1 Die	e Meiose	. 4
1.1.2 Die	e Spermiogenese	. 8
1.1.2.1	Bildung des Flagellums	. 9
1.1.2.2	Bildung des Akrosoms	. 9
1.1.2.3	Morphologie des Zellkerns während der Spermiogenese	11
1.1.2.4	Reorganisation des Chromatins	13
1.1.3 Ge	netische Aktivität während der Spermatogenese	14
1.1.4 Die	e Spermatogenese verläuft nach einem konstanten Zeitplan	15
1.2 Die Ker	nhülle	17
1.2.1 Str	uktur der Kernhülle	17
1.2.2 Pro	oteine der Kernhülle	19
1.2.2.1	LBR (Lamin B Rezeptor)	21
1.2.2.2	Lamina-assoziierte Polypeptide 1 und 2 (LAP1, LAP2)	21
1.2.2.3	MAN1	22
1.2.2.4	Emerin	22
1.2.3 Die	e Kernlamina und die Lamine	23
1.2.3.1	Molekulare Struktur der Lamine	23
1.2.3.2	Die Proteinfamilie der Lamine	25
1.2.3.3	Lokalisation und Funktion der Lamine	27
1.2.4 Die	e Kernhülle in Keimzellen	30
1.3 Ziel der	Arbeit	32
2 MATER	RIAL	33
2.1 Biologi	sches Material	33
2.1.1 Ze	Illinien	33
2.1.2 Tie	ere	34
2.1.3 Ba	kterienstämme	34
2.1.4 An	tikörper	35
2.2 Moleku	larbiologisches Material	38
2.2.1 Pla	ısmidvektoren	38
2.2.2 En	zyme	43
2.2.3 Oli	igonukleotide	43
2.2.4 Gr	ößenstandards	43
2.2.5 Kit	ts und Kitbestandteile	44
2.3 Chemik	alien	44
2.4 Geräte .		44

3	M	ETHODEN	47
3.1	Mi	krobiologische Methoden	47
3.	.1.1	Flüssigkultur von Bakterien	47
3.	.1.2	Photometrische Bestimmung der Bakteriendichte in einer Flüssigkultur	48
3.	.1.3	Glycerinkultur	48
3.	.1.4	Bakterienkultur auf Agarplatten	48
3.	.1.5	Herstellung kompetenter Bakterien	49
3.	.1.6	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien	50
3.2	Gev	winnung angereicherter Zellfraktionen mit verschiedenen Spermatogenesestadien aus	
	den	Hoden von Mäusen durch zentrifugale Elutriation (Grabske et al., 1975; Meistrich,	
	197	7)	50
3.	.2.1	Präparation der Hoden und Herstellung der Zellsuspension	53
3.	.2.2	Vorbereitung des Elutriators	54
	3.2.	2.1 Zusammenbau und Anschließen des Rotors	54
	3.2.	2.2 Befüllen des Rotors	54
3.	.2.3	Eichen der Pumpe	55
3.	.2.4	Durchführung eines Laufes	55
	3.2.	4.1 Standardlauf	56
	3.2.	4.2 Verkürztes Protokoll zur Gewinnung einer Fraktion mit angereicherten	
		Keimzellen aller Entwicklungsstadien	56
3.	.2.5	Weiterverarbeitung der Zellen	57
	3.2.	5.1 Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer	57
	3.2.	5.2 Gewinnung von RNA aus durch Elutriation angereicherter Zellen	57
	3.2.	5.3 Western-Blot-Analyse durch Elutriation angereicherter Zellen	58
3.	.2.6	Reinigung des Rotors	58
3.3	Mo	lekularbiologische Methoden	58
3.	.3.1	Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben	58
3.	.3.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (DNA und RNA)	60
3.	.3.3	RT-PCR (Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion)	60
	3.3.	3.1 Reverse Transkription	60
	3.3.	3.2 PCR (polymerase chain reaction)	61
3.	.3.4	PCR mit genomischer DNA	63
3.	.3.5	Kolonie-PCR	64
3.	.3.6	Gerichtete Mutagenese mit Hilfe der PCR	64
	3.3.	6.1 Endständige Mutationen (Punkt- oder Deletionsmutationen am 5'- oder 3'-	
		Ende einer cDNA)	64
	3.3.	6.2 Interne Mutationen (Deletionen oder Insertionen)	65

3.3.7	Restriktionsverdau	67			
3.3.8	Verdau von PCR-Produkten				
3.3.9	Herstellung glatter (blunt) Enden durch Auffüllen von 5'-Überhängen oder				
	Entfernung von 3'-Überhängen	68			
3.3.10	Beladungspuffer für die DNA-Gelelektrophorese	68			
3.3.11	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese	69			
3.3.12	Gelextraktion von DNA-Fragmenten (Qiagen)	70			
3.3.13	Reinigung von Nukleinsäuren	71			
3.3.	3.1 Wizard [®] SV Gel and PCR Cleanup System (Promega)	71			
3.3.	3.2 Extraktion mit Phenol/Chloroform	71			
3.3.14	Fällung von Nukleinsäuren (DNA und RNA)	71			
3.3.15	Klonierung von PCR-Fragmenten in den Vektor pCR [®] 2.1-TOPO [®]	72			
3.3.16	Klonierung von DNA-Fragmenten	73			
3.3.	6.1 Gewinnung des Inserts	73			
3.3.	6.2 Dephosphorylierung des Vektors	74			
3.3.	6.3 Ligation und Transformation	74			
3.3.	6.4 Test der erhaltenen Klone	75			
3.3.17	Gewinnung von Plasmid-DNA	75			
3.3.	7.1 GTE-System (alkalische Lyse)	75			
3.3.	7.2 PEQLAB Plasmid Mini Präp	76			
3.3.18	Gewinnung genomischer DNA	77			
3.3.19	DNA-Sequenzierung	77			
3.4 Pro	einbiochemische Methoden	78			
3.4.1	SDS-PAGE	78			
3.4.	.1 SDS-PAGE nach Laemmli (1970)	79			
3.4.	.2 SDS-PAGE nach Thomas und Kornberg (1975)	81			
3.4.2	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	83			
3.4.3	Trocknen von SDS-Gelen	83			
3.4.4	Western Blot (Proteintransfer auf eine Membran; Matsudaira, 1987)	83			
3.4.	.1 Proteintransfer	83			
3.4.	.2 Spezifischer Proteinnachweis mit Antikörpern	85			
3.4.		85			
3.4.5	Strippen eines Western Blots (Entfernung der Antikörper)	85			
3.4.	5.1 Standardmethode mit β-Mercaptoethanol	85			
3.4.	5.2 Sanfte Methode mit Glycin-Puffer	86			
3.4.6	Herstellung und Aufreinigung eines Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteins	86			
3.4.	5.1 Expression des GST-Fusionsproteins in Bakterien	86			

	3.4.6	.2 Aufreinigung des GST-Fusionsproteins	
	3.4.7	Herstellung und Aufreinigung eines Proteins mit einem His-Tag	89
	3.4.7	.1 Expression des Proteins in Bakterien	89
	3.4.7	2 Aufreinigung unter nicht-denaturierenden Bedingungen	89
	3.4.7	.3 Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen	
	3.4.8	Dialyse von Proteinen	
	3.4.9	Bestimmung der Proteinkonzentration im SDS-Gel	
	3.4.10	Fällung von Proteinen	
	3.4.1	0.1 Proteinfällung mit Methanol und Chloroform	
	3.4.1	0.2 Proteinfällung mit Aceton	
	3.4.11	Affinitätsreinigung eines Antiserums	
	3.4.1	1.1 Affinitätsreinigung über Western Blot	
	3.4.1	1.2 Affinitätsreinigung über eine Matrix aus CNBr-Sepharose	
	3.4.12	Salzextraktion	
	3.4.1	2.1 Salzextraktion von Kulturzellen	
	3.4.1	2.2 Salzextraktion von Keimzellen	
	3.4.13	Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion über einen "Pull-Down-Assay"	100
	3.4.1	3.1 Gewinnung des Proteinextrakts	101
	3.4.1	3.2 Herstellung der Säule	101
	3.4.1	3.3 Durchführung des Bindungsassays	102
	3.4.1	3.4 Proben für die SDS-PAGE	103
3	.5 Mik	oskopie	103
	3.5.1	Analyse von Fluoreszenzpräparaten am Epifluoreszenzmikroskop	103
	3.5.2	Analyse am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM)	103
	3.5.3	Lebendbeobachtung von Zellen unter dem Mikroskop	104
	3.5.3	.1 Herstellung von Lebendbeobachtungskammern	104
	3.5.3	.2 Analyse unter dem Mikroskop	104
	3.5.4	Fixierung von Zellen	105
	3.5.4	.1 Fixierung mit Formaldehyd	105
	3.5.4	.2 Fixierung mit Methanol/Aceton	105
	3.5.5	Immunfluoreszenz bei Kulturzellen	105
	3.5.6	Immunfluoreszenz bei Gefrierschnitten und Gewebeabklatschen	107
	3.5.6	.1 Gewinnung und Vorbereitung des Gewebes	107
	3.5.6	.2 Anfertigung von Gefrierschnitten	107
	3.5.6	.3 Anfertigung von Gewebeabklatschen	107
	3.5.6	.4 Immunfluoreszenz bei Gefrierschnitten und Gewebeabklatschen	108
	3.5.7	Immunfluoreszenz auf Paraffinschnitten	108

	3.5.7.1		Gewinnung und Einbettung des Gewebes	108
3.5.7.2 Anfertigung von Paraffinschnit			Anfertigung von Paraffinschnitten	108
	3.5.	7.3	Immunfluoreszenz auf Paraffinschnitten	109
3.5.8 DNA-Färbung mit Propidiumiodid			A-Färbung mit Propidiumiodid	109
	3.5.9	FRA	AP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)	110
	3.5.	9.1	Experimentelles Prinzip	110
	3.5.	9.2	Durchführung	111
	3.5.	9.3	Auswertung mit Microsoft [®] Excel	112
	3.5.	9.4	Durchführung eines Student'schen t-Tests	114
	3.5.10	FLI	P (Fluorescence Loss in Photobleaching)	115
	3.5.	10.1	Experimentelles Prinzip	115
	3.5.	10.2	Durchführung	116
	3.5.	10.3	Auswertung mit Microsoft [®] Excel	116
	3.6 Zel	lkultı	ır	117
	3.6.1	Kul	tivierung von Zellen	117
	3.6.2	Pas	sagieren adhärenter Zelllinien	118
	3.6.3	Ein	frieren von Kulturzellen	119
	3.6.4	Auf	ftauen von Kulturzellen	119
	3.6.5	Tes	t der Zellkultur auf eine Kontamination mit Mycoplasmen	119
	3.6.6	Tra	nsfektion von Kulturzellen	120
	3.6.	6.1	Transfektion eukaryontischer Zellen mit Effectene [™] (Qiagen)	121
	3.6.	6.2	Transfektion von Zellen mit Lipofectamine [™] (Invitrogen)	121
	3.6.	6.3	Transfektion mit MATra (IBA)	122
	3.6.	6.4	Transfektion mit CaCl ₂	122
4	Er	GEBI	NISSE	124
	4.1 Exp	oressi	onsmuster von Lamin B3	124
	4.1.1	Lan	nin B3 ist spezifisch in Hoden exprimiert	124
	4.1.2	Exp	pressionsmuster von Lamin B3 im Verlauf der Spermatogenese	125
	4.1.3	Um	verteilung von Lamin B3 im Verlauf der Spermatogenese	129
	4.2 Pro	teind	omänen von Lamin B3, die die Lokalisation des Proteins und die Morphologie	
	des	Zelll	kerns beeinflussen	131
	4.2.1	Her	stellung der cDNA-Konstrukte	132
	4.2.	1.1	Gewinnung und Klonierung der wildtypischen cDNA von Lamin B3	132
	4.2.	1.2	Herstellung N-terminaler Deletionsmutanten von Lamin B3	133
	4.2.2	Die	Expression N-terminal trunkierter Lamin-B3-Proteine in COS-7-Zellen zeigt	
		dies	selben Effekte wie wildtypisches Lamin B3	134
	4.2.3	Her	stellung chimärer Lamin-Moleküle mit EGFP oder MYC-Epitop	136

4	.2.4	Der spezifische N-Terminus von Lamin B3 spielt weder eine Rolle bei der	
		korrekten Lokalisation des Proteins an der Kernhülle noch bei den Veränderungen	
		der Zellkernmorphologie	. 137
4.3	Die	besonderen Eigenschaften von Lamin B3 beeinflussen die Integrität des Zellkerns in	
	tran	sfizierten COS-7-Zellen	. 140
4	.3.1	Das Verhalten endogener Kernhüllenkomponenten in mit Lamin B3 transfizierten	
		COS-7-Zellen	. 140
4	.3.2	Lamin B3 weist im Vergleich zu Lamin B2 eine erhöhte Mobilität auf	. 142
	4.3.2	2.1 Biochemische Eigenschaften von Lamin B3	. 142
	4.3.2	2.2 Bestimmung der Mobilität von Lamin B3 mit FRAP	. 144
	4.3.2	2.3 Ermittlung der Ursache für die Erholung der Fluoreszenz innerhalb der	
		Kernhülle mit Hilfe von FLIP	. 146
4.4	Suc	he nach putativen Interaktionspartnern von Lamin B3 in Keimzellen	. 149
4	.4.1	"Pull-Down-Assay"	. 149
4	.4.2	Klonierung von MSY-Proteinen	. 151
5	Dis	KUSSION	153
5.1	Exp	ressionsmuster und Lokalisation von Lamin B3 im Verlauf der Spermatogenese	. 154
5.2	Eige	enschaften von Lamin B3 und die Bedeutung des spezifischen N-Terminus	. 156
5.3	Lan	nin-B3-bindende Proteine	. 158
5.4	Sch	lussfolgerungen und Ausblick	. 160
6	Zus	SAMMENFASSUNG	163
	SUN	ЛМАRY	164
7	LIT	ERATURVERZEICHNIS	165
ANHA	ANG		183
I	Olig	zonukleotide	183
II	Abk	cürzungen	191
Енри	NWÖ	rti iche Erki ärung	194
PURI	IKAT	IONSLISTE	195
IEDE	NGT 4		107
LERE	INSLA	UF	17/
DANI	SAGU	JNG	198

Einleitung

Bei allen höheren eukaryontischen Organismen, die sich sexuell fortpflanzen, ist die Bildung der haploiden Gameten, der Keimzellen, ein essentieller Entwicklungsprozess. Bei der Befruchtung verschmelzen schließlich zwei haploide Gameten zu einer Zygote, aus der sich ein neues Individuum mit diploidem Chromosomensatz entwickelt, das sich genetisch von seinen Eltern unterscheidet. Die Prozesse, die zur Reduktion und Rekombination des Chromosomensatzes führen, laufen in zwei aufeinander folgenden besonderen Zellteilungen ab, die unter dem Begriff Meiose zusammengefasst werden. Die Meiose und die damit verbundene Reduktion und Rekombination des Chromosomensatzes sind allerdings nur Teilaspekte innerhalb eines langen und komplexen Differenzierungsprozesses, aus dem schließlich die reifen Gameten hervorgehen.

Dieser Prozess beginnt bereits während der Embryonalentwicklung mit der Einwanderung der Urkeimzellen in die sich bildende Gonadenanlage. Dort vermehren sich diese Vorläuferzellen über mitotische Teilungen und differenzieren sich zu Gonien (Oogonien als Vorläuferzellen für die Bildung von Oozyten bzw. Eiern und Gonozyten als Vorläuferzellen für die Bildung von Spermatogonien).

Im Falle der Oogenese, der Bildung weiblicher Gameten, durchlaufen die Oogonien eine definierte Anzahl mitotischer Teilungen, bis mehrere Millionen dieser Zellen vorhanden sind. Gegen Ende der Embryonalentwicklung sterben die meisten davon ab (über Apoptose), der Rest durchläuft die Meiose bis zum Erreichen der Prophase der ersten meiotischen Teilung. In diesem Stadium bleiben die Oozyten bis zur Geschlechtsreife arretiert. Ab diesem Zeitpunkt reift periodisch eine kleine Gruppe oder einzelne Oozyten aus diesem Vorrat zu Eiern heran.

Die Spermatogonien ruhen dagegen als Stammzellen bis zum Erreichen der Geschlechtsreife. Dann reifen, ausgehend von diesen Stammzellen, die männlichen Gameten in einem als Spermatogenese bezeichneten Prozess heran.

1.1 Die Spermatogenese bei Säugern

Die Spermatogenese lässt sich grob in drei Abschnitte einteilen, die im Folgenden jeweils genauer beschrieben werden (siehe auch Russell et al., 1990): (1) eine Proliferationsphase der Stammzellen, der Spermatogonien, (2) die Meiose, die zur Reduktion und Rekombination des Chromosomensatzes führt, und (3) die Spermiogenese, eine Differenzierungsphase, während der sich die aus der Meiose hervorgegangenen haploiden Zellen zu reifen Spermien entwickeln.

Die Spermatogenese findet in den Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti) in den Hoden (Testes) statt. Wie im einleitenden Abschnitt bereits erwähnt, beginnt dieser Prozess bereits während der Embryonalentwicklung mit der Einwanderung der Urkeimzellen in die sich bildende Gonadenanlage. Dort werden die Urkeimzellen in den Samensträngen eingeschlossen und differenzieren zu den sog. Gonozyten, die nach einigen mitotischen Teilungen die Zellteilungen einstellen und bis zur Geburt ruhen. Bei Mäusen differenzieren die Gonozyten etwa vier Tage nach der Geburt zu Spermatogonien vom Typ A_S (S = single bzw. stem cell), beim Menschen geschieht dies noch vor der Geburt (de Rooij,

2001; Brinster, 2002). Mit dem Erreichen der Geschlechtsreife bilden sich aus den Samensträngen die Samenkanälchen, deren Epithel sich zu Sertoli-Zellen ausdifferenziert. Die Spermatogonien sitzen an der Tubuswand und beginnen, sich zu teilen. Dabei entstehen über mitotische Teilungen neben neuen A_S- auch als bereits differenziert geltende Spermatogonien vom Typ A₁. Durch Zellteilung gehen daraus A₂-Spermatogonien hervor, die über Mitosen A₃-Spermatogonien bilden, aus denen wiederum



Abb. 1-1: Zelltypen und Bildung eines synzytialen Klons während der Spermatogenese (verändert aus "Developmental Biology, 6th Edition"; nach Bloom und Fawcett, 1975).

mitotisch A₄-Spermatogonien hervorgehen (siehe Abbildung 1-1). Aus den A₄-Spermatogonien entstehen mitotisch intermediäre Spermatogonien, die sich über eine weitere Zellteilung zu Typ-B-Spermatogonien differenzieren. Diese teilen sich erneut und es entstehen die primären Spermatozyten, die schließlich in die Meiose eintreten. Es gibt Hinweise darauf, dass alle Typ-A-Spermatogonien Stammzellen sind, sich also über Mitose selbst erneuern könnten (Dym, 1994), doch neuere Erkenntnisse legen nahe, dass es unter den Typ-A-Spermatogonien diesbezüglich Unterschiede gibt. So sind nur die As-Spermatogonien als Stammzellen anzusehen, während die A1- bis A4-Spermatogonien bereits differenziert sind und über eine definierte Anzahl mitotischer Teilungen zu primären Spermatozyten differenzieren (sechs Teilungen bei den meisten Säugern) und sich nicht mitotisch selbst erneuern können (Zusammenfassungen in de Rooij und Grootegoed,

1998; de Rooij, 1998, 2001; Cooke und Saunders, 2002). So wurde über Transplantationsexperimente mit Spermatogonien aus wildtypischen Mäusen in sterile männliche Tiere festgestellt, dass unter den Typ-A-Spermatogonien nur der A_S-Typ in der Lage ist, ein Keimzellen-depletiertes Samenkanälchen zu besiedeln und damit die Fertilität des Empfängertieres wieder herzustellen (Brinster und Avarbock, 1994; Brinster und Zimmermann, 1994; de Rooij, 2001; Brinster, 2002).

Die primären Spermatozyten durchlaufen die erste meiotische Teilung, in der Rekombination und Reduktion des Chromosomensatzes stattfinden, wobei die homologen Chromosomen getrennt und zufällig auf die beiden Tochterzellen, die sekundären Spermatozyten, verteilt werden. Die sekundären Spermatozyten durchlaufen anschließend ohne vorherige DNA-Synthesephase die zweite meiotische Teilung, die prinzipiell einer Mitose gleicht, in der jeweils die Schwesterchromatiden voneinander getrennt und auf die Tochterkerne verteilt werden (Übersicht zur Meiose in Zickler und Kleckner, 1998). Die aus der zweiten meiotischen Teilung hervorgehenden haploiden Zellen werden als Spermatiden bezeichnet und differenzieren in der Spermiogenese zu Spermien (siehe 1.1.2). Wie in Abbildung 1-1 dargestellt, verläuft die Zytokinese der einzelnen Zellteilungen von Spermatogonien (mit Ausnahme der A_S-Zellen bei Teilung zur Erneuerung) und Spermatozyten nicht vollständig, die Zellen bleiben vielmehr über Zytoplasmabrücken miteinander verbunden (Dym und Fawcett, 1971) und bilden so ein Synzytium. Über diese Verbindungen ist Stoffaustausch möglich und die genotypisch haploiden Spermatiden können so phänotypisch als diploid angesehen werden (Braun et al., 1989).

Die Spermatogenese, die Bildung von Spermien aus Spermatogonien, verläuft in den Samenkanälchen des Hodens. Dabei sitzen die Spermatogonien an der Tubuswand, während sich spätere Stadien (Spermatozyten, Spermatiden) weiter innen in Richtung des zentralen Lumens des Kanälchens befinden (siehe Abbildung 1-2).



Abb. 1-2: Querschnitt durch ein Samenkanälchen.

Gezeigt ist die schematische Abbildung eines Querschnitts durch einen Hoden mit Nebenhoden (links), durch ein komplettes Samenkanälchen (Mitte) und eine Ausschnittsvergrößerung daraus (rechts). Gut zu erkennen ist, dass die Entwicklung der Keimzellen in den Interstitien der Sertoli-Zellen abläuft und dass sich die Keimzellen im Verlauf der Spermatogenese vom Rand des Kanälchens, wo sich die Spermatogonien befinden, zur Mitte hin bewegen. Dort werden die fertigen Spermatozoen in das zentrale Lumen hinein abgegeben (nach Dym, 1977).

Die Entwicklung der Keimzellen läuft in den Interstitien der Sertoli-Zellen ab, die dabei Schutz- und Versorgungsfunktion übernehmen. Eine Sertoli-Zelle ist mit bis zu 50 Keimzellen verschiedenster Stadien assoziiert (Siu und Cheng, 2004). Zellkontakte (Tight Junctions) zwischen den Sertoli-Zellen führen zur Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke, die das Samenkanälchen in zwei Subkompartimente unterteilt: (1) das basale Kompartiment, das Spermatogonien und sehr frühe primäre Spermatozyten enthält und (2) das adluminale Kompartiment, in dem Keimzellen aller späteren Stadien enthalten sind

(Dym und Fawcett, 1970; Russell et al., 1990). Die Keimzellen wandern während ihrer Reifung, die hormonell und über Kommunikation der verschiedenen Zellen des Hodengewebes reguliert wird (Steinberger, 1971; Cooke und Saunders, 2002), vom Rand des Samenkanälchens auf das zentrale Lumen zu, in das die fertigen Spermien abgegeben werden (siehe Abbildung 1-2). Dabei durchdringen sie die Blut-Hoden-Schranke, was u.a. durch eine dynamische Umstrukturierung unterschiedlicher Zellkontakte ermöglicht wird. Die Wanderung der Keimzellen und die Dynamik der Zellkontakte werden über Hormone und komplexe Wechselwirkungen zwischen Keim-, Sertoli-Zellen und extrazellulärer Matrix reguliert (Steinberger, 1971; Russell, 1977; Cheng und Mruk, 2002; Siu und Cheng, 2004).

Die Samenkanälchen liegen im Hoden als stark gewundene Röhren bzw. Schläuche vor und sind von einer festen Hülle umgeben, der Tunica albuginea. Die in den Samenkanälchen gebildeten Spermien gelangen über die Rete testis, in der die Kanälchen mit beiden Enden münden und zusammengeführt werden, und die anschließenden abführenden Hodenkanälchen (Ductuli efferentes) in den Nebenhoden (Epididymis), wo sie weitere Reifungsschritte durchlaufen (so erlangen die Spermien z.B. erst im Nebenhoden ihre Beweglichkeit; Yanagimachi, 1994) und schließlich gespeichert werden. Die Reifung der Spermien ist allerdings auch im Nebenhoden noch nicht vollständig abgeschlossen. Den letzten Reifungsschritt, die sog. Kapazitation, der den Spermien die Akrosomenreaktion und damit die Befruchtung einer Eizelle ermöglicht, durchlaufen die Spermien erst nach einer gewissen Verweildauer im weiblichen Geschlechtstrakt (Chang, 1951; Austin, 1952).

Neben den Samenkanälchen, in denen die Spermatogenese abläuft, gibt es ein zweites Hauptkompartiment im Hoden. Dieses wird gebildet von den Räumen zwischen den Samenkanälchen, den Interstitien. In diesem Kompartiment befinden sich neben Blutgefäß- und Lymphsystem als wichtigster zellulärer Bestandteil die Leydig-Zellen. Diese sind für die Produktion von Androgenen, v.a. Testosteron, verantwortlich und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Spermatogenese (Russell et al., 1990; Cooke und Saunders, 2002).

1.1.1 Die Meiose

Wie in den beiden vorangegangenen Abschnitten erwähnt, resultiert die Meiose in der Reduktion des diploiden zu einem haploiden Chromosomensatz. Die Meiose ist in ihrem Ablauf mit der Mitose gut vergleichbar, doch kommt es bei der Meiose in zwei aufeinander folgenden Teilungen zu der beschriebenen Reduktion des Chromosomensatzes (siehe Abbildung 1-3; Übersichten in Zickler und Kleckner, 1998; Baarends und Grootegoed, 2003; Page und Hawley, 2003; Petronczki et al., 2003). Wie bei einer Mitose wird die DNA in einer S-Phase vor dem Eintritt in die Meiose verdoppelt. In beiden Teilungsvarianten sind die Chromatiden der kondensierten Chromosomen über Proteinkomplexe miteinander verbunden, bei der Meiose kommt es aber zusätzlich zu einer Assoziation der jeweils homologen Chromosomenpaare und die beteiligten Proteinkomplexe sind aus spezifischen Varianten aufgebaut (Nasmyth, 2001). Die meiotischen Teilungen lassen sich dabei wie

eine Mitose in Phasen einteilen (Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase). In der ersten meiotischen Teilung, auf die weiter unten noch etwas genauer eingegangen wird, werden die homologen Chromosomen voneinander getrennt und zufällig auf die Tochterzellen verteilt. Allein durch diese zufällige Verteilung "väterlicher" und "mütterlicher" Chromosomen auf die Tochterzellen ergeben sich 2ⁿ Möglichkeiten (n = Chromosomenzahl im haploiden Genom) für die Bildung von Gameten. Diese Anzahl der Möglichkeiten wird durch Rekombinationsereignisse, bei denen Abschnitte zwischen den homologen Chromosomen ausgetauscht und Allele neu kombiniert werden, noch stark erhöht. Die zweite meiotische Teilung verläuft wie eine Mitose, die Schwesterchromatiden werden voneinander getrennt und auf die entstehenden Tochterkerne verteilt. Allerdings findet vor der zweiten meiotischen Teilung, aus der schließlich die Spermatiden hervorgehen, keine DNA-Replikation statt.



Abb. 1-3: Schematischer Vergleich zwischen Mitose und Meiose (aus Zickler und Kleckner, 1998).

Die entscheidenden Prozesse, die für die Paarung der homologen Chromosomen, deren Segregation und für die Rekombination essentiell sind, laufen alle in der Prophase der ersten meiotischen Teilung (Prophase I) ab. Die Prophase I weist einige Besonderheiten auf, wobei die Dauer dieser Phase besonders bemerkenswert ist. Diese schwankt im Tierreich und bei Oo- und Spermatogenese zwischen einigen Tagen und mehreren Jahren. Aufgrund der morphologischen Veränderungen des Zellkerns und der Chromosomen während dieser Phase, lässt sich die Prophase in fünf Stadien unterteilen: Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakinese (Übersicht in Zickler und Kleckner, 1998).

Im Leptotän (leptos, griech. dünn) kondensieren die Chromosomen und sind so im Lichtmikroskop als dünne Fäden erkennbar. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Chromosomen mit ihren Telomeren in der inneren Kernmembran verankert sind (Wettstein und Sotelo, 1967; Esponda und Gimenez-Martin, 1972). Die Chromosomenachsen der Chromatiden werden über meiosespezifische Kohäsin- und Kondensinkomplexe (Übersichten in Hirano, 2002; Nasmyth, 2002; Haering und Nasmyth, 2003; Jessberger, 2005) zusammengehalten. Dadurch bilden sich die Axialelemente (AE) aus.

Im folgenden **Zygotän** (zygos, griech. Paar) kommt es zu einer charakteristischen Umverteilung der Telomere, die sich dann alle in einem enger umgrenzten Bereich der Kernhülle an einem Pol des Zellkerns befinden. Die Struktur, die sich durch die aus einem Bereich der Kernhülle ausstrahlenden Chromosomen bildet, erinnert an einen Blumenstrauß und wird daher auch als Bouquet bezeichnet (Übersicht in Zickler und Kleckner, 1998). Die Telomere verteilen sich im Übergang zum folgenden Pachytän (siehe unten) wieder gleichmäßig über den gesamten Bereich der Kernperipherie, wobei sie ständig in der Kernhülle verankert bleiben (Scherthan et al., 1996; Zickler und Kleckner, 1998). Bei der beobachteten Dynamik der Telomere scheinen sie selbst eine entscheidende Rolle zu spielen (Scherthan, 2001, 2003; Tanemura et al., 2005).

Neben der Ausbildung der Bouquet-Struktur kondensieren die Chromosomen im Zygotän weiter und die jeweils homologen Chromosomen beginnen, sich zu paaren und bilden die sog. Bivalente, wobei sie fortlaufend über den Synaptonemalkomplex (SC), eine proteinöse Struktur, miteinander verknüpft werden (siehe Abbildung 1-4). Auslöser von Chromosomenpaarung und Synapse ist, zumindest bei Säugern und bei Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*), neben anderen Mechanismen die Einführung von DNA-Doppelstrangbrüchen (Page und Hawley, 2003). Der SC ist eine hoch konservierte Struktur, die bereits in den 50er-Jahren mit Hilfe der Elektronenmikroskopie in meiotischen Zellen entdeckt wurde (Fawcett, 1956; Moses, 1956; siehe Abbildung 1-4).





Gezeigt sind die elektronenmikroskopische Aufnahme eines SC in einer Ratten-Spermatozyte im Zygotän (A; verändert aus Russell et al., 1990) und daneben (B) eine schematische Darstellung der SC-Struktur. Das Chromatin ist in Schleifen in den Lateralelementen (LE) verankert. Die LEs sind über die Transversalfilamente (TF) mit dem Zentralelement (CE) verbunden, das im Grunde einen Überlappungsbereich der TFs darstellt. Die Zentralregion bezeichnet den gesamten Bereich, der zwischen beiden LEs liegt. Die Anordnung und Orientierung der TF-Proteine ist unterhalb des Schemas abgebildet (verändert aus Page und Hawley, 2004).

Durch Anlagerung der am Aufbau des SC beteiligten Proteine an und zwischen die AEs homologer Chromosomen kommt es in einem fortschreitenden Prozess zur kompletten Synapse der Chromosomen. Die AEs werden innerhalb des SC als Lateralelemente (LE) bezeichnet, in denen das Chromatin in Schleifen verankert ist (Roeder, 1997). Der Bereich zwischen den AEs wird als zentrale Region (CR) bezeichnet. Bei Nagetieren sind die AEs ca. 50 nm breit und die CR misst etwa 100 nm. In der Mitte der CR erkennt man bei den meisten Spezies eine elektronendichte Struktur, das sog. Zentralelement (CE), das senkrecht über Transversalfilamente (TF) mit beiden LEs verbunden ist (siehe Abbildung 1-4; Übersichten in von Wettstein et al., 1984; Schmekel und Daneholt, 1995; Heyting, 1996; Zickler und Kleckner, 1999; Page und Hawley, 2004). Neben einer möglichen Funktion als strukturelles Element, das die Chromosomen zusammenhält, während diese weiter kondensieren, scheint der SC mit seinen Bestandteilen auch Vorgänge mit zu beeinflussen, die bei der Rekombination eine Rolle spielen (Übersicht in Page und Hawley, 2003).

Im folgenden **Pachytän** (pakhus, griech. dick), dem zeitlich längsten Abschnitt der Meiose, in dem auch die genetische Rekombination stattfindet, sind die SCs vollständig ausgebildet und die Synapse damit abgeschlossen. Die Geschlechtschromosomen (X und Y) paaren sich nicht über ihre gesamte Länge, sondern nur in einem kleinen homologen Bereich, der pseudoautosomalen Region (PAR). Zusätzlich sind diese Chromosomen transkriptionell inaktiv, was mit der Bildung von Heterochromatin einhergeht. Dadurch bilden die Geschlechtschromosomen einen mikroskopisch sichtbaren Bereich innerhalb des Zellkerns, der als "XY-Body" bezeichnet wird und mit der Kernhülle assoziiert ist (Solari, 1974; Handel, 2004). Die Telomere sind im Pachytän wieder über die gesamte Kernperipherie verteilt, aber noch immer in der Kernhülle verankert. Außerdem erscheinen zusätzliche elektronendichte Strukturen im Kerninnern, die mit dem SC assoziiert sind, die Rekombinationsknoten (recombination nodule, RN; Carpenter, 1975). Man unterscheidet frühe und späte RNs, wobei die späten RNs weniger zahlreich sind und mit Crossover-Ereignissen und Chiasmata (zu sehen im Diplotän; Details im folgenden Abschnitt) in Verbindung gebracht werden (Zickler und Kleckner, 1999; Carpenter, 2003; Page und Hawley, 2003).

Im **Diplotän** (diploos, griech. doppelt) lösen sich die SCs auf und die homologen Chromosomen trennen sich wieder. Sie bleiben lediglich an den Stellen miteinander verbunden, an denen Crossover stattgefunden hat. Diese Überkreuzungsstellen werden als Chiasmata bezeichnet. Die dann folgende **Diakinese** ist nur ein sehr kurzes Zwischenstadium, das zur Prometaphase der ersten meiotischen Teilung überleitet, in deren weiterem Verlauf die homologen Chromosomen schließlich voneinander getrennt und auf die entstehenden Tochterzellen (sekundäre Spermatozyten) verteilt werden. Diese Zellen durchlaufen dann ohne zwischenzeitliche DNA-Synthesephase die zweite meiotische Teilung, wobei jeweils die Schwesterchromatiden der Chromosomen voneinander getrennt und auf die Tochterzellen verteilt werden, die als Spermatiden bezeichnet werden.

1.1.2 Die Spermiogenese

Die aus den beiden meiotischen Teilungen hervorgehenden runden Spermatiden reifen in der sich anschließenden Spermiogenese, einem komplexen Differenzierungsprozess, der mit tief greifenden strukturellen und physiologischen Veränderungen einhergeht, zu hoch spezialisierten Zellen, den Spermatozoen (siehe Abbildung 1-5). Bei Mäusen dauert dieser Prozess, während dem es zu keinen weiteren Zellteilungen kommt, etwa 2 Wochen (Clermont und Trott, 1969). In Abbildung 1-5 ist die Spermiogenese mit den damit verbundenen strukturellen Veränderungen der Spermatiden dargestellt.



Abb. 1-5: Spermiogenese.

(A) Gezeigt ist die Spermiogenese in der Ratte. Die Ziffern bezeichnen die verschiedenen Stadien, in denen sich die Spermatiden jeweils befinden. Die Einteilung erfolgt anhand charakteristischer Merkmale wie Lage und/oder Form des Zellkerns, Entwicklungsgrad des Akrosoms, Verteilung der Mitochondrien und anderes mehr (siehe dazu auch Russell et al., 1990). Im letzten Stadium (19) wird ein großer Teil des Zytoplasmas abgestoßen (als residual body = RB; Zeichnung aus Russell et al., 1990; nach Clermont und Rambourg, 1978). (B) Schematische Darstellung einiger Stadien der Spermiogenese. Die Ziffern bezeichnen ebenfalls die entsprechenden Entwicklungsstadien der Zellen (verändert nach de Kretser und Kerr, 1994).

Während der Differenzierung der Spermatiden zu Spermatozoen kommt es zu vielen verschiedenen Veränderungen in den Zellen, die meist zur gleichen Zeit ablaufen (Übersicht in Russell et al., 1990). Die junge, undifferenzierte Spermatide besitzt keine ungewöhnliche Morphologie mit annähernd rundem Nukleus und Zellkörper. Diese Morphologie der runden Spermatide verändert sich aber im Verlauf der Spermiogenese dramatisch, die Zelle wie auch der Zellkern selbst strecken sich, sie elongieren. Man spricht dann auch von der elongierten Spermatide. Doch nicht nur die äußere Gestalt der Spermatide ändert sich, auch interne Strukturen und Organellen erfahren eine grundlegende Reorganisation. Parallel zur Elongation der Zelle bildet sich aus dem Golgi-Apparat das Akrosom (siehe unten) und aus dem Zentriolenpaar wächst das Flagellum (Axonem), der Spermienschwanz (siehe unten). Die Veränderungen in Struktur und Zusammensetzung des Akrosoms werden maßgeblich dazu verwendet, die Spermatiden verschiedener Differenzierungsstadien zu klassifizieren (siehe Abbildung 1-5; Leblond und Clermont, 1952; Russell et al., 1990). Im Folgenden werden einige der wichtigsten Prozesse und Strukturen detaillierter beschrieben, die während der Spermiogenese zu beobachten sind.

1.1.2.1 Bildung des Flagellums

Die Bildung des Flagellums beginnt bereits sehr früh in der Spermiogenese. Das Zentriolenpaar wandert in die Zellperipherie und bildet dann den Ausgangspunkt zur Bildung eines Flagellums, das Mikrotubuli enthält, die im 9+2-Muster angeordnet sind (Tilney et al., 1973). Dieses Auswachsen des Flagellums bewirkt, dass sich die Zytoplasmamembran zusammen mit dem wachsenden Flagellum, das sie umhüllt, streckt. Das Zentriolenpaar bewegt sich dann Richtung Zellkern, an dessen Oberfläche es "andockt". Dabei entsteht eine kleine Vertiefung in der Oberfläche des Zellkerns, die als "implantation fossa" bezeichnet wird (Fawcett und Phillips, 1969). Diese Anheftungsstelle befindet sich immer am posterioren Pol des Zellkerns, der Seite, die dem Akrosom gegenüberliegt. Die Anheftung des Flagellums an den Zellkern bewirkt zusätzlich eine Einstülpung der Plasmamembran am posterioren Pol in Richtung des Zellkerns. Im weiteren Verlauf entwickeln sich weitere Strukturen im Bereich des Spermienschwanzes, der sich dann in Mittel-, Haupt- und Endstück einteilen lässt (siehe Abbildung 1-6 A; Eddy und O'Brien, 1994)

1.1.2.2 Bildung des Akrosoms

In sehr frühen Stadien besitzen die Spermatiden noch kein Akrosom, dieses entsteht erst im weiteren Verlauf der Spermiogenese. Das Akrosom beinhaltet Komponenten, die später für die Befruchtung der Eizelle wichtig sind, z.B. Rezeptormoleküle, die eine Bindung des Spermiums an die Eizelle vermitteln, oder Enzyme, die es dem Spermium ermöglichen, die Zona pellucida der Eizelle zu durchdringen (Übersichten in Eddy und O'Brien, 1994; Tulsiani et al., 1998; Abou-Haila und Tulsiani, 2000). Die Proteine werden über das endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat in proakrosomale Vesikel verpackt. Diese verschmelzen dann schließlich und bilden so das Akrosom. Das Akrosom besitzt zunächst eine sphärische Morphologie, flacht aber ab, nachdem es auf den Zellkern trifft, und

legt sich um den vorderen (anterioren) Teil des Kerns. Das Akrosom kann jetzt in zwei Domänen aufgeteilt werden, das anteriore Akrosom (AA; auch Akrosomenkappe) und das posteriore Akrosom (PA; auch äquatoriales Segment; siehe Abbildung 1-6). Das Akrosom bewirkt außerdem eine Subkompartimentierung des Zellkerns in eine akrosomale und eine postakrosomale Region (AR und PAR; Abbildung 1-6). Die Membran des Akrosoms, die der Kernhülle zugewandt ist, wird innere Akrosomenmembran (IAM) genannt, die der Kernhülle abgewandte Membran äußere Akrosomenmembran (OAM = outer acrosomal membrane).



Abb. 1-6: Schematische Darstellung der Struktur von Spermium und Akrosom.

(A) Schematische Abbildung eines standardisierten Säugerspermiums (nach Fawcett, 1975). (B) Schematische Darstellung des Spermienkopfes mit Akrosom und den damit verbundenen Strukturen: akrosomale Region (AR), postakrosomale Region (PAR), anteriores Akrosom (AA), posteriores Akrosom (PA), äußere Akrosomenmembran (OAM) und innere Akrosomenmembran (IAM); PT = perinukleäre Theka; PM = Plasmamembran (verändert aus Downing Meisner et al., 2005). Näheres im Text.

Während der frühen Phase der Akrosomenbildung wandert der Spermatidenkern zur Zelloberfläche (vgl. Abbildung 1-5), wodurch die OAM und die Plasmamembran in engem Kontakt zueinander liegen. Das Akrosom dehnt sich noch etwas weiter dem Kern anliegend aus, bis es vom anterioren Pol ausgehend einen großen Teil des Kerns bedeckt. Morphologisch sind danach keine Veränderungen mehr zu beobachten, die Reifung des Akrosoms ist aber noch lange nicht abgeschlossen. Diese vollzieht sich erst im Nebenhoden bzw. im weiblichen Geschlechtstrakt (Übersichten in Clermont et al., 1993; Abou-Haila und Tulsiani, 2000; Yoshinaga und Toshimori, 2003).

Der zytoplasmatische Bereich um den Zellkern, auch zwischen Nukleus und Akrosom (siehe Abbildung 1-6), wird als perinukleäre Theka (PT) bezeichnet und enthält in verschiedenen Bereichen unterschiedliche Komponenten. So entstehen Domänen der Kernhülle, was beim Befruchtungsvorgang später eine Rolle spielt (Übersicht in Toshimori und Ito, 2003). Im Bereich der PT zwischen Akrosom und Zellkern wurde eine Zytoskelett-Struktur beschrieben, die die IAM mit der Kernhülle verbindet, das **Akroplaxom**, das neben F-Actin und Myosin noch Sak57 enthält, ein Keratin-5-Ortholog (Kierszenbaum et al., 2003a, b; Kierszenbaum und Tres, 2004). Das Akroplaxom wird flankiert von einer begrenzenden Ringstruktur ("marginal ring", MR). Der MR enthält Bündel aus Intermediärfilamenten, was zu einer an Desmosomen erinnernden Struktur führt, die eine Anheftungsstelle am unteren (posterioren) Ende der IAM mit einer gegenüberliegenden Anheftungsstelle an der Kernhülle verbindet. Knapp unterhalb des MR weist die Kernhülle eine kleine Vertiefung auf, die den Kern an

dieser Position ebenfalls ringförmig umspannt (Kierszenbaum und Tres, 2004; Abbildung 1-7). Das Akroplaxom scheint wichtig zu sein für die Bildung des Akrosoms und später für dessen Stabilisierung und relativer Position zum Zellkern während der Spermiogenese. Außerdem wird eine wichtige Rolle des Akroplaxoms bei der Elongation des Spermatidenkerns diskutiert. Dies wird belegt durch Untersuchungen an Knockout-Mäusen, die kein funktionelles Akroplaxom besitzen. Diese Tiere entwickeln kein intaktes Akrosom und zeigen den Phänotyp der Globozoospermie, sie bilden Spermien mit runden Köpfen aus (Toshimori und Ito, 2003; Kierszenbaum und Tres, 2004).

1.1.2.3 Morphologie des Zellkerns während der Spermiogenese

Zu Beginn der Spermiogenese weist der Spermatidenkern in den meisten Spezies eine annähernd sphärische Gestalt auf. Im Verlauf des Differenzierungsprozesses verändert sich seine Morphologie jedoch dramatisch. Der Zellkern des fertigen Spermiums, das in das Tubuslumen abgegeben wird, weist eine für die jeweilige Art charakteristische Gestalt auf. Die Spermienköpfe der meisten Säuger sind spatelförmig, es gibt allerdings auch zahlreiche ungewöhnliche Kopfformen. Die Spermienköpfe bei Nagern sind meist sichel- bis hakenförmig, wobei jede Art eine charakteristische Spermienmorphologie aufweist, die bei Labormäusen teilweise sogar stammspezifisch ist (Leblond und Clermont, 1952; Fawcett, 1975; Handel, 1987; Russell et al., 1990; Eddy und O'Brien, 1994; Breed, 2005; Downing Meisner et al., 2005).

Mit dem Beginn der Elongation des Kerns erscheint in Spermatiden die Manschette, eine primär aus Mikrotubuli aufgebaute markante Struktur (siehe Abbildungen 1-5 B und 1-7). Die Manschette bildet einen Ring aus Mikrotubuli, der den Zellkern knapp unterhalb des MR des Akroplaxoms umspannt. Von diesem Ring ausgehend durchziehen dann Mikrotubuli das Zytoplasma der Spermatide in Richtung des Flagellums. Die Manschette fungiert u.a. als "Transportorganell", das spezifische Komponenten an die Stelle der Zelle dirigiert, wo diese z.B. für die Kompaktierung des Zellkerns und seine morphologische Umstrukturierung benötigt werden. Außerdem scheint die Manschette wichtig zu sein für die Verformung der gesamten Zelle und für die Abschnürung des Zytoplasmas am Ende der Spermiogenese. (Übersichten in Russell et al., 1990; Clermont et al., 1993; Toshimori und Ito, 2003). Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die morphologischen Veränderungen, die der Zellkern während der Spermiogenese erfährt, auf ein komplexes Wechselspiel verschiedener Strukturen in der Spermatide und die Interaktion mit der umgebenden Sertoli-Zelle zurückzuführen sind (siehe Abbildung 1-7). Das Akrosom wird über das Akroplaxom stabil mit der darunter liegenden Kernhülle verbunden. Im Randbereich des Akroplaxoms (innerhalb des MR) erkennt man sogar eine direkte Verankerung des Akrosoms in der Kernhülle über Strukturen, die in ihrer Organisation an Desmosomen erinnern. Möglicherweise reicht diese Verankerung sogar bis zur Kernlamina. Der MR des Akroplaxoms und die damit eng assoziierte Ringstruktur der Manschette könnten zusammen wie eine Hülse auf den Kern einwirken, die diesen in die Länge zieht, wenn sich beide Strukturen, fest mit dem Nukleus verbunden, nach unten in Richtung Flagellum bewegen. Als Gegenpol dazu könnten Strukturen am Spermienkopf wirken, die ihn in der Sertoli-Zelle verankern, die "tubulobulbar complexes" (TBC; Russell und Clermont, 1976; Russell et al., 1990). Die TBCs, die aus einem röhrenförmigen Schaft und einem globulären Kopf aufgebaut sind, haben neben ihrer Funktion als Stabilisatoren der Verbindung zwischen Keim- und Sertoli-Zelle auch eine Bedeutung für die kontrollierte Abgabe der fertigen Spermien in das Tubuslumen über Modifikation und Auflösung von Zellkontakten (Übersichten in Russell et al., 1990; Toshimori und Ito, 2003; Kierszenbaum und Tres, 2004).





(A) Schematische Darstellung des komplexen Wechselspiels zwischen Strukturen in der Spermatide und zwischen Keim- und Sertoli-Zelle. Gezeigt sind das Akrosom, das Akroplaxom und die Manschette mit ihren relativen Positionen in einer Spermatide eines früheren Stadiums. Die Ausschnittsvergrößerungen zeigen Bestandteile des Akroplaxoms (oben), wie F-Actin und Sak57/K5, ein Keratin-5-Ortholog (näheres siehe Text), und den MR ("marginal ring", die ringförmige Struktur, die das Akroplaxom begrenzt) mit den Anheftungsstellen an Akrosom und Kernhülle. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Spermatide (unten) mit assoziierter Sertoli-Zelle (oben), die als Ausschnitt den Bereich zeigt, in dem der MR des Akroplaxoms, das Ende des Akrosoms und die Manschette eng miteinander assoziiert sind. IF = Intermediärfilament (Abbildung verändert aus Kierszenbaum und Tres, 2004).

1.1.2.4 Reorganisation des Chromatins

Der Zellkern verändert während der Spermiogenese nicht nur seine Gestalt, sondern es kommt zusätzlich zu einer drastischen Reduktion seiner Größe. In Mäusen weist ein Spermienkern ein etwa 40fach geringeres Volumen auf als der Zellkern einer gewöhnlichen Leberzelle (Wyrobek et al., 1976; Russell et al., 1990). Um den haploiden Chromosomensatz in diesem eng begrenzten Raum unterbringen zu können, ist es notwendig, dass die DNA in einer anderen Form verpackt wird als es in somatischen Zellen der Fall ist, in denen nukleosomales Chromatin den Ausgangspunkt für die Verpackung des Erbguts darstellt.

In diesem Fall stellt das Nukleosom die erste Verpackungsstufe dar. Ungefähr 146 Basenpaare der DNA werden um einen Kern aus acht Histonmolekülen gewickelt (Histonoktamer aus je zwei Molekülen der Core-Histone H2A, H2B, H3 und H4; Kornberg, 1974; McGhee und Felsenfeld, 1980). Histone sind kleine, basische Proteine mit einer molekularen Masse zwischen 11 und 15 kDa, die mit 20-30 % einen hohen Anteil der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin besitzen. Diese auch als 11-nm-Fibrille bezeichnete Struktur der ersten Verpackungsstufe kondensiert weiter zu übergeordneten Strukturen über Interaktionen mit Histon H1 (Proteinfamilie mit einer durchschnittlichen molekularen Masse von 22,5 kDa) und verschiedenen Nicht-Histon-Proteinen (Felsenfeld und McGhee, 1986; Horn und Peterson, 2002). Der Verpackungsgrad der DNA wird über sekundäre Modifikationen der Core-Histone wie Acetylierung, Methylierung oder Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren reguliert (Strahl und Allis, 2000; Peterson und Laniel, 2004). Außerdem existieren Varianten der Core-Histone, die nur in bestimmten Domänen der Chromosomen wie Telomeren oder Centromeren im Chromatin vorhanden sind oder nur in bestimmten Geweben exprimiert werden (Brown, 2001; Khochbin, 2001; Malik und Henikoff, 2003; Sarma und Reinberg, 2005). Auch in Keimzellen wurden schon zahlreiche Varianten der Histone nachgewiesen. Bereits während der Proliferationsphase der Spermatogonien werden teilweise die vorhandenen Histone durch spezifische Varianten ersetzt. Die Zusammensetzung des Chromatins ändert sich im Verlauf der Spermatogenese in Bezug auf die Histone mehrmals (Churikov et al., 2004; Govin et al., 2004).

In elongierenden Spermatiden erfährt das Chromatin dann eine völlige Neustrukturierung. Die Histone werden zunächst durch Transitionsproteine (TP) ersetzt, kleine DNA-bindende Proteine, die basischer sind als Histone. Es wurden inzwischen vier TPs identifiziert (TP1-TP4), wobei TP1 und TP2 die am besten charakterisierten sind. Die TPs haben eine molekulare Masse zwischen 6 und 13 kDa und weisen einen Gehalt an Argininen und Lysinen von jeweils 10-20 % auf (Dadoune, 2003; Meistrich et al., 2003). Im weiteren Verlauf der Chromatinkondensation während der Spermiogenese werden die TPs ebenfalls ersetzt, und zwar durch den Einbau der Protamine P1 und P2, sehr kleine und noch basischere Proteine als die TPs. Die Protamine haben eine molekulare Masse von ungefähr 5 kDa und bestehen zu etwa 50 % aus der basischen Aminosäure Arginin. Die DNA im Spermienkern weist im Vergleich zu einem Metaphasechromosom, das den höchsten Kondensationsgrad einer somatischen Zelle darstellt, eine nochmals 6fach höhere Verdichtung auf (Ward und Coffey, 1991). Es gibt zwei

Modelle, die zu erklären versuchen, wie das mit Protaminen verpackte Chromatin aussieht. Beim ersten Modell liegen die Protamin-Moleküle in der kleinen Furche der DNA und neutralisieren so die Ladung deren Zuckerphosphat-Rückgrats. Gleichzeitig kommt es zu Wechselwirkungen zwischen benachbart liegenden Protamin-Molekülen, was zu einer engen Assoziation parallel laufender DNA-Abschnitte führt (Balhorn, 1982). Im zweiten Modell interagieren die Protamine nicht längs in der kleinen Furche liegend mit einem DNA-Molekül, sondern gleichzeitig mit drei parallel laufenden Molekülen, die es als globuläre Struktur miteinander vernetzt (Raukas und Mikelsaar, 1999; Übersichten in Braun, 2001; Dadoune, 2003). In dieser extrem kondensierten Form nimmt das Chromatin eines Spermiums etwa 90 % des Kernvolumens ein. Wäre die DNA der Keimzelle über Nukleosomen verpackt, müsste der Spermiums nicht vollständig mit Protaminen verpackt, einige Bereiche bleiben über Histone in Nukleosomen organisiert. Wie hoch der Anteil des nukleosomalen Chromatins ist, der erhalten bleibt, schwankt zwischen verschiedenen Arten; beim Menschen ist er mit 10-15 % relativ hoch. Die Telomere bleiben immer als nukleosomales Chromatin erhalten (Zalenskaya et al., 2000).

1.1.3 Genetische Aktivität während der Spermatogenese

Die allgemeine Transkriptionsrate in Keimzellen ist zu Beginn der Meiose sehr gering, steigt dann aber in der Prophase I zum Pachytän hin stark an. Vom folgenden Diplotän an nimmt die Transkriptionsaktivität wieder ab und wird über die restliche Dauer der Meiose eingestellt. In Spermatiden wird dann wieder viel RNA-Synthese betrieben, die dann aber im Zuge der Umstrukturierung des Chromatins endgültig eingestellt wird (Handel, 1987; Eddy und O'Brien, 1998; Dadoune et al., 2004). Neben einer veränderten Transkriptionsrate in Keimzellen, viele Komponenten wie manche Transkriptionsfaktoren sind stark überexprimiert im Vergleich zu somatischen Zellen, werden auch zahlreiche keimbahnspezifische Proteine exprimiert. Zum einen handelt es sich dabei um Varianten somatisch exprimierter Proteine, die entweder durch die Verwendung eines anderen Promotors (dieser wird von einem hodenspezifischen Transkriptionsapparat erkannt und gebunden; dies führt entsprechend zu einem anderen Startpunkt für die Transkription) oder durch alternatives Spleißen entstehen können. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung einer alternativen Polyadenylierungsstelle in der RNA (Venables und Eperon, 1999; Eddy, 2002; Sassone-Corsi, 2002; Venables, 2002; Kimmins et al., 2004a; 2004b). Beispiele für solche keimbahnspezifischen Isoformen sind die Histon-Varianten (siehe 1.1.2.4). Zum anderen werden Proteine in Keimzellen exprimiert, die sonst in keinem anderen Gewebe vorhanden sind, wie z.B. die Protamine oder die TPs (siehe 1.1.2.4). Die Expression keimzellspezifischer Gene steht häufig unter dem Einfluss besonderer Transkriptionskomplexe. Einer der am besten charakterisierten Transkriptionsfaktoren in Verbindung mit der Spermatogenese ist CREM (= cAMP responsive element modulator). CREM ist zwar auch in somatischen Zellen vorhanden, wird in Keimzellen aber von einem spezifischen Aktivator-Komplex reguliert (Sassone-Corsi, 2002; Monaco et al., 2004).

Aber nicht nur die Transkription in Keimzellen unterliegt einer besonderen Regulation, sondern auch die Translation der mRNAs bestimmter Gene. So werden beispielsweise die mRNAs der TPs und der Protamine zunächst 3-7 Tage in RNPs (= Ribonukleoprotein-Komplex) gespeichert, bevor die entsprechenden Proteine in einem späteren Stadium dann synthetisiert werden, in dem wegen der Chromatinstruktur keine Transkription mehr möglich ist (Dadoune, 2003). In Keimzellen sind einige solche RNA-bindenden Proteine bekannt, die zur Speicherung und verzögerten Translation verschiedener mRNAs beitragen (Hecht, 1998; Elliott, 2003). Im Falle der mRNA für Protamin 1 wird die Repression der Translation über die Bindung eines Komplexes aus den Proteinen MSY2 und MSY4 an den nicht translatierten 3'-Bereich des Moleküls vermittelt (Gu et al., 1998; Hecht, 1998; Davies et al., 2000; Giorgini et al., 2001). Die spätere Aktivierung der Translation regulieren dann spezifische andere Proteinkomplexe (Elliott, 2003). Für die Aktivierung der Protamin-1-Translation wurde beschrieben, dass der Komplex mit der reprimierten mRNA an der Kernhülle am posterioren Pol des Spermatidenkerns an das Protein LBR (Lamin B Rezeptor; siehe 1.2.2.1) binden muss, damit die Translation initiiert werden kann (Mylonis et al., 2004). Die Proteine MSY2 und MSY4 gehören zu einer großen Gruppe DNA- und RNA-bindender Proteine, die in fast allen Spezies identifiziert wurden. Ihr Name, Y-Box-Proteine, wurde von der Y-Box abgeleitet, ein strukturelles DNA-Motiv, das sequenzunabhängig von ihnen erkannt und gebunden wird (Übersichten in Wolffe, 1994; Matsumoto und Wolffe, 1998). In Keimzellen der Maus wurde bisher neben den oben erwähnten Y-Box-Proteinen MSY2 und MSY4 noch MSY2a nachgewiesen, eine kurze Spleißvariante von MSY2 (Gu et al., 1998). Neben der Komplexierung der mRNA kann die Translation auch über eine spezifische Aktivierung mit Hilfe besonderer Faktoren oder die Modifikation des Poly-A-Schwanzes reguliert werden (Übersicht in Elliott, 2003).

1.1.4 Die Spermatogenese verläuft nach einem konstanten Zeitplan

Wie unter 1.1 beschrieben, lässt sich die Spermatogenese in drei größere Phasen unterteilen: eine Proliferationsphase der Spermatogonien, die Meiose und schließlich die Spermiogenese (Russell et al., 1990). Dabei folgt dieser Entwicklungsprozess einem festen Zeitplan, der für jede Tierart eine spezifische Dauer aufweist. So dauert die Entwicklung eines Spermiums, ausgehend von einer Spermatogonie 35 Tage in der Maus (Clermont und Trott, 1969), 52 Tage in der Ratte (Clermont und Harvey, 1965) und 75 Tage beim Menschen (Clermont, 1963). Dabei bestimmt allein das genetische Programm der Keimzelle selbst den Rhythmus der Reifung und der Zellteilungen. Dies belegen Transplantationsexperimente, bei denen Keimzellgemische aus Ratte in keimzelldefiziente Mäuse übertragen wurden (Übersicht in Brinster, 2002). Die Spermatogonien aus der Ratte besiedeln die Samenkanälchen der keimzelldefizienten Maus und initiieren die Spermatogenese, aus der reife Rattenspermien hervorgehen. Der Entwicklungsprozess dauert exakt 52 Tage, wie es für Ratten beschrieben wurde (Clermont und Harvey, 1965; Franca et al., 1998). Sertoli-Zellen haben keinen Einfluss auf die Dauer der Spermatogenese, denn im Rahmen solcher Transplantationsexperimente siedeln sich keine Sertoli-Zellen des Spendertieres an, sodass die Geschwindigkeit der Spermienentwicklung nur durch die Keimzellen selbst bestimmt wird (Russell und Brinster, 1996; Franca et al., 1998). Aber nicht nur der gesamte Prozess, sondern auch die einzelnen Phasen, in die sich die Spermatogenese unterteilen lässt, weisen jeweils eine konstante Dauer auf. Bei der Maus läuft die Proliferationsphase der Spermatogonien in 11 Tagen ab, für die Meiose werden 10 Tage benötigt und nach weiteren 14 Tagen ist die Spermiogenese durchlaufen; das ergibt insgesamt 35 Tage für die Spermatogenese (Clermont und Trott, 1969; Eddy, 2002).

Die erste Spermatogenese-Welle setzt bei Mäusen wenige Tage nach der Geburt ein. Dabei kommt es zunächst zu einer Vermehrung der Spermatogonien, in dieser Altersstufe der einzige Keimzelltyp im Hoden. Am Tag 12 nach der Geburt erscheinen die ersten sehr frühen Spermatozyten (Leptotän). Bis zum Tag 21 sind Spermatozyten der verschiedenen Meiosestadien der vorherrschende Zelltyp in den Hoden der Maus (siehe Tabelle 1-1). Spermatiden sind vereinzelt ab Tag 18 nach der Geburt vorhanden, aber erst nach 21 Tagen bilden sie eine nachweisbare Zellpopulation im Gewebe. Nach 25 Tagen sind die Spermatiden dann der dominierende Zelltyp in den Hoden der Maus (siehe Tabelle 1-1; Bellvé et al., 1977; Malkov et al., 1998).

Zelltyn	Tag nach der Geburt								
Zentyp	8	10	12	14	16	18	20/21	24/25	
Spermatogonien	27	18	15	12	17	10	~ 10	~ 10	
Spermatozyten	-	15	25	42	39	49	~ 50	~ 30	
Spermatiden	-	-	-	-	-	< 1	~ 5	~ 30	
		Erste Zellen im Leptotän	Erste Zygotän- Stadien	Erste Zellen im frühen Pachytän		Erste Zellen im späten Pachytän	runde Spermatiden erscheinen	elongierte Spermatiden erscheinen	

Tab. 1-1: Relative Mengen verschiedener Keimzellstadien in den Hoden neugeborener Mäuse

In der Tabelle sind die relativen Mengen von Keimzellen verschiedener Stadien der Spermatogenese in den Hoden der Maus. Das Alter der Maus ist angegeben in Tagen nach der Geburt, die Angaben zu den Zellmengen sind in Prozent (%; nach Bellvé et al., 1977; Malkov et al., 1998). Die relativen Zellmengen ergeben zusammengenommen keine 100 %, da ausschließlich Keimzellen verschiedener Entwicklungsstadien aufgeführt sind. Mengenanteile anderer im Hoden vorhandener Zelltypen wie Sertoli- oder Leydig-Zellen sind nicht angegeben.

In adulten Tieren leiten die Spermatogonien periodisch in konstanten Abständen (bei der Maus alle 8,5 Tage; Clermont und Trott, 1969) immer wieder neue Spermatogenese-Wellen ein. Dadurch kommt es in den Samenkanälchen in Querschnitten zu unterschiedlichen Assoziationen von Keimzellen verschiedener Entwicklungsstadien, die sich entlang des Tubus ebenfalls periodisch wiederholen. Diese Assoziationen werden dazu verwendet, den jeweiligen Schnitt einem bestimmten Stadium zuzuordnen (Übersicht in Russell et al., 1990).

1.2 Die Kernhülle

1.2.1 Struktur der Kernhülle

Der Besitz eines Zellkerns (= Nukleus) ist eines der wichtigsten Merkmale, das eine eukaryontische Zelle auszeichnet und wodurch sie sich von einer prokaryontischen unterscheidet. Der Zellkern nimmt in einer durchschnittlichen somatischen Zelle etwa 10 % des Gesamtvolumens ein und ist im Gegensatz zum relativ einfach aufgebauten Nukleoid einer prokaryontischen Zelle eine sehr komplexe Struktur. Diese Komplexität besteht nicht nur im Hinblick auf seine strukturelle Organisation, sondern besonders auch bei Betrachtung der vielfältigen Prozesse, die mit diesem zentralen Organell der Zelle assoziiert sind, wie beispielsweise DNA-Replikation und -Transkription, mRNA-Prozessierung und die Ribosomen-Biogenese. Neben den Proteinen, die für die gerade genannten Prozesse benötigt werden, enthält der Zellkern als wichtigsten Bestandteil die Erbinformation der Zelle in Form der DNA. Diese ist über ihre gesamte Länge mit zahlreichen Proteinen assoziiert und liegt mehr oder weniger stark verpackt als Chromatin vor (siehe auch 1.1.2.4; Horn und Peterson, 2002).

Das Kerninnere und die dort befindlichen Komponenten werden durch die Kernhülle vom umgebenden Zytoplasma abgegrenzt. Die Kernhülle selbst ist eine komplexe Struktur, an deren Aufbau zwei Membranen, die äußere und die innere Kernmembran (ONM = outer nuclear membrane bzw. INM = inner nuclear membrane), die Kernporenkomplexe (NPC = nuclear pore complex), die Kernlamina und zahlreiche andere Proteine beteiligt sind (Übersicht in Gerace und Burke, 1988; vgl. Abbildung 1-8). Beide Membranen, INM und ONM, weisen eine sehr ähnliche Lipidzusammensetzung auf, unterscheiden sich in Bezug auf die mit ihnen assoziierten Proteine allerdings sehr stark. Die ONM bildet mit dem ER ein zusammenhängendes Membransystem, wobei die funktionellen Eigenheiten beider Strukturen vergleichbar sind. Durch dieses Kontinuum von ONM und ER wird die freie Diffusion größerer Proteine über das Lumen des ER oder die ER-Membran zur Kernhülle hin ermöglicht. Die INM ist mit zahlreichen integralen und peripheren Proteinen assoziiert, über die Strukturen im Kerninnern wie beispielsweise das Chromatin mit der Kernhülle verbunden werden (siehe auch 1.2.2; Worman und Courvalin, 2000; Foisner, 2001; Burke und Ellenberg, 2002). Obwohl sich die ONM und die INM deutlich in Proteinzusammensetzung und Funktion unterscheiden, stellen sie ein Kontinuum dar, denn sie sind im Bereich der Kernporen miteinander verbunden. In diesen Bereichen befinden sich die NPCs, große Proteinkomplexe, die aus mehreren hundert Einzelproteinen aufgebaut sind. So beträgt die molekulare Masse eines einzelnen NPC ca. 125 MDa (Reichelt et al., 1990; Cronshaw et al., 2002; Hetzer et al., 2005). Über die NPCs ($\emptyset \sim 9$ nm) findet ein geregelter Stoffaustausch zwischen Zyto- und Nukleoplasma statt. Einige kleinere Moleküle können dabei frei diffundieren, andere und größere werden aktiv durch die Poren geschleust (Übersichten in Gorlich und Kutay, 1999; Wente, 2000; Hetzer et al., 2005).

Auf nukleoplasmatischer Seite liegt der INM die Kernlamina an, ein dünnes (Schichtdicke schwankt und liegt zwischen ca. 10 und 50 nm), proteinöses Netzwerk, das hauptsächlich aus Laminen aufgebaut ist (Übersicht in Krohne, 1998). Die Lamina ist über Interaktionen mit verschiedenen integralen Proteinen der INM mit dieser verbunden und trägt in der Interphase zur strukturellen Stabilität des Zellkerns bei und spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle bei einigen anderen Prozessen, die mit dem Zellkern assoziiert sind, wie beispielsweise die Chromatinorganisation, DNA-Replikation oder Transkription (siehe 1.2.3.3; Übersichten in Gruenbaum et al., 2003; 2005). In Abbildung 1-8 ist eine vereinfachte schematische Darstellung der Kernhülle gezeigt, die neben deren Struktur auch einige der beteiligten Proteine enthält und deren Wechselwirkungen untereinander skizziert.



plasm Abb. 1-8: Die Kernhülle.

Gezeigt ist ein schematischer Querschnitt der Kernhülle mit äußerer und innerer Kernmembran (ONM bzw. INM), einem beide Membranen durchspannenden Kernporenkomplex und einer kleinen Auswahl beteiligter INM-Proteine (RFBP = ",ring finger binding protein"; TBR = Lamin B Rezeptor; LAP = Lamina-assoziiertes Polypeptid; LEM = homologe Domäne in LAP2-Isoformen, Emerin und MAN1). Es gibt Wechselwirkungen mit der Kernlamina (A-[blau] und B-Typ-Laminen [orange]), Chromatin (BAF = ,,barrier-to-autointegration factor"; HP1 = Heterochromatinprotein 1; HA95 = homolog zu AKAP95 [= "A-kinase anchoring protein 95"]) und mit dem Transkriptionsapparat (GCL = ",germ cell-less"; E2F/DP-Komplex; pRB = Retinoblastoma-Protein). Näheres zu einigen dieser Proteine im Text (Abbildung aus Maidment und Ellis, 2002).

Die Kernhülle, die für die strukturelle und funktionelle Integrität des eukaryontischen Zellkerns sorgt, zeigt im Verlauf des Zellzyklus eine hohe Dynamik. Beim Übergang von der Pro- zur Prometaphase während der Mitose zerfällt die Kernhülle. Die Membranen zerfallen in kleinere Vesikel und verteilen sich zusammen mit den damit assoziierten Proteinen im Zytoplasma (Gerace und Blobel, 1980; Daigle et al., 2001). Es gibt zwei Modellvorstellungen darüber, wie die Kernhülle in Vesikel zerfällt und wie die vorhandenen Proteine verteilt werden. Beide Modelle wurden anhand experimenteller Daten entwickelt, unterscheiden sich jedoch grundlegend voneinander. Im ersten Modell bilden die von der Kernhülle abgeleiteten Vesikel eine eigene, isolierte Population, verglichen mit den aus dem Zerfall des ER hervorgegangenen Vesikeln (Vigers und Lohka, 1991; Sasagawa et al., 1999; Collas und Courvalin, 2000), während im zweiten Modell die Membrankomponenten der Kernhülle und ihre integralen Proteine in das Membransystem des ER aufgenommen werden. Damit existieren keine

spezifischen Vesikel-Populationen, die entweder Bestandteile der Kernhülle oder ER-Komponenten enthalten. Es sind vielmehr in allen Vesikeln Bestandteile beider Strukturen, Kernhülle und ER, enthalten (Ellenberg et al., 1997; Yang et al., 1997). In jüngerer Zeit wurde ein weiteres, hauptsächlich auf theoretischen Überlegungen basierendes Modell vorgeschlagen, das die beiden ursprünglichen Versionen kombiniert. In dieser Variante werden die Proteine der Kernmembran zwar in das ER aufgenommen, allerdings halten sie sich getrennt von den allgemeinen ER-Bestandteilen innerhalb von Mikrodomänen auf, was wiederum zu unterschiedlichen Vesikel-Populationen in der Mitose führt (Mattaj, 2004).

Am Ende der Mitose wird die Kernhülle dann stufenweise wieder neu gebildet. Dies beginnt zunächst mit der Anlagerung von NPC-Komponenten an das Chromatin. Im nächsten Schritt kommt es zur Anlagerung von Membranvesikeln, die zu größeren Systemen fusionieren. Zu diesem Zeitpunkt kommt es bereits zur Anlagerung verschiedener INM-Proteine wie LAPs2 (LAP = Lamina-assoziiertes Polypeptid), LBR (= Lamin B Rezeptor) oder Emerin zwischen Chromatin und Membran. Die Lamine werden größtenteils durch die Porenkomplexe einer geschlossenen Kernhülle in den Kern transportiert und bilden dann spät im Zellzyklus die Kernlamina aus (Benavente et al., 1989; Chaudhary und Courvalin, 1993; Ellenberg et al., 1997; Haraguchi et al., 2000; Übersichten zu Kernhülle und Zellzyklus in Burke und Ellenberg, 2002; Hetzer et al., 2005).

1.2.2 Proteine der Kernhülle

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben und in Abbildung 1-8 dargestellt, ist die Kernhülle eine komplexe Struktur, die sich aus zahlreichen Komponenten zusammensetzt. Sowohl bei Invertebraten als auch bei Vertebraten ist mittlerweile eine ganze Reihe kernhüllenassoziierter Proteine identifiziert worden (vgl. Tabelle 1-2). Dabei nimmt die Komplexität der Kernhülle und entsprechend die Anzahl der vorhandenen Kernhüllenproteine mit der Stufe der Evolution zu (Übersichten in Dechat et al., 2000; Georgatos, 2001; Gruenbaum et al., 2003). Tabelle 1-2 enthält eine unvollständige Zusammenstellung der bisher bekannten Kernhüllenproteine, deren Anzahl stetig steigt. Eine kleine Auswahl davon wird im Anschluss etwas näher beschrieben.

Protein	Lokalisation	Assoziierte Proteine	Organismus	Besondere Domänen	Referenz (Erstbeschreibung)
AKAP149	INM	PP1, PKARII; RNA	Vertebraten	TM	Steen et al., 2000
Emerin	INM	Lamine (A und B), BAF, GCL, MAN1, Actin u.a.	Vertebraten Drosophila C. elegans	LEM TM	Bione et al., 1994
GCL	NP nahe INM	Emerin, LAP2β, Chromatin, MAN1	Vertebraten Drosophila C. elegans	BTB/POZ	Jongens et al., 1992
Lamin A/C	Lamina	siehe 1.2.3	Vertebraten Drosophila	siehe 1.2.3.1	Fisher et al., 1986; McKeon et al., 1986 siehe auch 1.2.3

Tab. 1-2: Proteine der Kernhülle (ohne Bestandteile der Kernporenkomplexe).

Protein Lokalisation Assoziierte Proteine		Organismus	Besondere Domänen	Referenz (Erstbeschreibung)	
Lamin B1/B2	Lamina	siehe 1.2.3	Vertebraten Drosophila C. elegans	siehe 1.2.3.1	Gerace et al., 1978 siehe auch 1.2.3
LAP1A-C	INM	Lamine A, B1, C	Vertebraten	ТМ	Senior und Gerace, 1988; Foisner und Gerace, 1993; Martin et al., 1995
LAΡ2α, ζ	NP	Lamine A. B1. C. BAF. GCL	Vertebraten	LEM	Foisner und Gerace, 1993: Harris
LAΡ2β-ε	INM	HA95, pRb, Chromatin	Vertebraten	LEM TM (β-ε)	et al., 1994; Berger et al., 1996
LBR	INM	Lamin B, HP1, p18, HA95, Histone (H3/H4-Tetramer); DNA	Vertebraten Seeigel Drosophila	8 TM	Worman et al., 1988; 1990
MAN1	INM	BAF, GCL, Btf, Emerin, Lamine A, B1	Vertebraten Drosophila C. elegans	LEM TM	Lin et al., 2000
Matefin/SUN-1	INM	Lamine	Vertebraten C. elegans	2 TM SUN	Dreger et al., 2001; Fridkin et al., 2004
Nesprin-1 (α, β)	INM, ONM	Lamin A, Emerin, Unc-84, Actin	Vertebraten Drosophila C. elegans	TM "Spectrin- Repeats"	Zhang et al., 2001
Nesprin-2 (α-γ)	INM, ONM	Lamin A, Emerin, Unc-84, Actin	Vertebraten Drosophila C. elegans	TM "Spectrin- Repeats"	Zhang et al., 2005
Nurim	INM	?	Vertebraten Drosophila	5 TM	Rolls et al., 1999
p18	INM, ONM	Lamin B, LBR	Vertebraten		Simos et al., 1996
RFBP	INM	RUSH	Säuger	9 TM ATP-Bindung	Mansharamani et al., 2001
SUN-2	INM	?	Vertebraten	TM SUN	Schirmer et al., 2003; Hodzic et al., 2004
Unc-83	ONM	Unc-84	C. elegans	TM	Starr et al., 2001
Unc-84	INM, ONM	Unc-83, ANC-1	C. elegans	TM SUN	Malone et al., 1999
UNCL (= Unc-50)	INM, ONM	RNA	Säuger C. elegans	RNA-Bindung	Lewis et al., 1987

Die Tabelle enthält eine unvollständige Zusammenstellung der bekannten Kernhüllenproteine ohne Berücksichtigung der Kernporenkomplexe. Die verwendeten Abkürzungen bedeuten: INM und ONM = integrales Membranprotein der inneren bzw. äußeren Kernmembran; NP = Nukleoplasma; TM = Transmembrandomäne; LEM = homologe Domäne, entdeckt in den Proteinen <u>L</u>AP2, <u>E</u>merin und <u>M</u>AN1; SUN = homologe Domäne, entdeckt in den Proteinen <u>S</u>ad1 und <u>Un</u>c-84; AKAP = "A-kinase anchoring protein"; GCL = "germ cell-less"; LAP = Lamina-assoziiertes Polypeptid; LBR = Lamin B Rezeptor; BAF = "Barrier-to-autointegration factor"; pRb = Retinoblastoma-Protein; HP1 = Heterochromatinprotein 1; Unc = "uncoordinated movement"; RFBP = "ring finger binding protein"; HA95 = "homolog zu AKAP95".

1.2.2.1 LBR (Lamin B Rezeptor)

Der Lamin B Rezeptor (LBR, auch bezeichnet als p58; ~74 kDa) ist das als erstes identifizierte integrale Membranprotein der INM. Er besitzt 8 Transmembrandomänen, mit denen er in der INM verankert ist, während N- und C-Terminus in das Nukleoplasma ragen (Worman et al., 1988; 1990). Über verschiedene Domänen im Bereich des N-Terminus kann der LBR sowohl mit B-Typ-Laminen als auch mit Chromatin interagieren (Ye und Worman, 1994, 1996; Ye et al., 1997). Die Bindung an das Heterochromatinprotein 1 (HP1; Ye und Worman, 1996) erfolgt wahrscheinlich innerhalb eines Komplexes mit einem Histon-H3/H4-Tetramer (Polioudaki et al., 2001), wobei die Histone die entsprechenden, mit repressivem Chromatin assoziierten Modifikationen aufweisen müssen (Strahl und Allis, 2000; Lachner et al., 2001; Peterson und Laniel, 2004). Dies lässt vermuten, dass der LBR für die Organisation des Chromatins im Zellkern eine wichtige Rolle spielt, z.B. über die Verankerung transkriptionell inaktiven Chromatins an der Kernperipherie.

Dem C-terminalen Bereich des Proteins konnten bislang keine Interaktionspartner zugeordnet werden, doch weist diese Domäne eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zur C14-Sterolreduktase von *Saccharomyces cerevisiae* auf. Darüber hinaus konnte die Expression des menschlichen LBR in Sterolreduktase-defizienten Hefestämmen die damit verbundenen Defekte kompensieren, allerdings konnte die Sterolreduktase-Aktivität noch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden (Silve et al., 1998). Klinische Bedeutung besitzt der LBR dadurch, dass Mutationen in diesem Gen zur Pelger-Huët-Anomalie führen können (Hoffmann et al., 2002; Gruenbaum et al., 2003)

1.2.2.2 Lamina-assoziierte Polypeptide 1 und 2 (LAP1, LAP2)

Die Lamina-assoziierten Polypeptide 1 (LAP1) wurden über Zellfraktionierungsexperimente gefunden, wobei diese Proteine in derselben Fraktion vorhanden waren wie die Kernlamina und die Kernporenkomplexe, wodurch sie ihren Namen erhielten (Senior und Gerace, 1988). Die Proteine besitzen neben einer Transmembrandomäne einen langen N-terminalen Bereich, der ins Nukleoplasma ragt, sowie einen kurzen C-Terminus, der sich innerhalb des perinukleären Raums (Bereich zwischen INM und ONM) befindet. Von den LAPs1 existieren mindestens drei Isoformen, die durch alternatives Spleißen eines Gens entstehen: LAP1A, LAP1B und LAP1C (Senior und Gerace, 1988; Foisner und Gerace, 1993; Martin et al., 1995). LAP1A und LAP1B binden an die Lamine A und C, sowie an Lamin B1, wobei die Affinität zu A-Typ-Laminen deutlich höher ist. Für LAP1C konnte bisher nur eine Interaktion mit Lamin B1 nachgewiesen werden (Foisner und Gerace, 1993; Worman und Courvalin, 2000).

Die LAPs2 bilden eine größere Proteinfamilie, deren Mitglieder durch alternatives Spleißen eines Gens hervorgehen, und die ursprünglich als Thymopoietine bezeichnet wurden. Beim Menschen konnten bisher nur drei Varianten nachgewiesen werden (α , β , γ ; Harris et al., 1994), während bei der Maus bereits sieben Varianten bekannt sind (α , β , β ', γ , δ , ε , ζ , Berger et al., 1996; Übersicht in Dechat et al., 2000). Die meisten Varianten der LAPs2 (β - ε) besitzen wie die LAPs1 einen kurzen C- Terminus, der sich im perinukleären Raum befindet, eine Transmembrandomäne und einen nukleoplasmatisch lokalisierten N-Terminus. Ausnahmen hiervon bilden die beiden verbleibenden Isoformen (α , ζ), die keine Transmembrandomäne besitzen und ausschließlich im Nukleoplasma vorliegen. Alle Mitglieder der LAP2-Familie besitzen eine ungefähr 40 Aminosäuren umfassende Domäne im Bereich des N-Terminus, die LEM-Domäne (Domäne wurde entdeckt in den Proteinen LAP2, Emerin und <u>M</u>AN1). Über diese LEM-Domäne interagieren die LAPs2 beispielsweise mit BAF ("barrier-toautointegration factor"; Furukawa, 1999; Shumaker et al., 2001), einem kleinen (89 Aminosäuren) DNA-bindenden Protein, das u.a. bei der Ausbildung einer übergeordneten Chromatinstruktur beteiligt ist (Cai et al., 1998; Lee und Craigie, 1998).

Für LAP2β wurden bereits zahlreiche Interaktionen mit anderen Proteinen beschrieben, darunter B-Typ-Lamine (Foisner und Gerace, 1993; Furukawa und Kondo, 1998), Chromatin (Furukawa et al., 1997), BAF (Shumaker et al., 2001) oder GCL ("germ cell-less"; Nili et al., 2001). GCL ist ein ubiquitär exprimiertes, bei der Regulation von Transkription beteiligtes Protein (Jongens et al., 1992; de la Luna et al., 1999; Kimura et al., 1999). Über die Interaktion mit GCL kann LAP2β somit die Repression E2F/DP3-abhängig exprimierter Gene regulieren, da GCL hemmend auf den Faktor DP3 wirkt (Nili et al., 2001).

1.2.2.3 MAN1

MAN1 wurde mit Hilfe von Autoimmunantikörpern aus Patienten entdeckt und charakterisiert. Das Protein hat eine molekulare Masse von ungefähr 82 kDa, besitzt zwei Transmembrandomänen, mit denen es in der INM verankert ist, wodurch sich sowohl N- als auch C-Terminus im Nukleoplasma befinden. In der Nähe des N-Terminus befindet sich die LEM-Domäne, über die es wie die LAPs2 mit BAF und damit assoziierten Proteinen interagieren kann (Lin et al., 2000).

Für MAN1 wurde eine direkte Interaktion mit SMAD-Proteinen (R-SMAD) nachgewiesen, die bei der Übermittlung von Signalen nach der Bindung von Wachstumsfaktoren der TGF-β-Familie beteiligt sind. MAN1 wirkt hemmend auf diese Signaltransduktionskette und kann somit maßgeblich die Expression SMAD-abhängig exprimierter Gene beeinflussen (Osada et al., 2003; ten Dijke und Hill, 2004). Darüber hinaus bindet MAN1 an Emerin, einem weiteren INM-Protein (siehe 1.2.2.4), und an einige Proteine, die auch mit Emerin interagieren, wie beispielsweise die Lamine A und B1, sowie GCL. Diese Gemeinsamkeiten von MAN1 und Emerin lassen auf ähnliche, teilweise überlappende Funktionen beider Proteine schließen (Mansharamani und Wilson, 2005).

1.2.2.4 Emerin

Emerin ist ein ubiquitär exprimiertes Kernhüllenprotein mit einer ungefähren molekularen Masse von 34 kDa (beim Menschen), es besitzt eine Transmembrandomäne, der N-Terminus liegt im Nukleoplasma und der C-Terminus im perinukleären Raum. Am N-Terminus befindet sich die LEM-Domäne, mit der das Protein über BAF mit Chromatin interagieren kann (Bione et al., 1994; Manilal et al., 1996; Lee et al., 2001). Für Emerin konnten Interaktionen mit zahlreichen Proteinen nachgewiesen werden. Es bindet z.B. an die Lamine A/C und B1 (Fairley et al., 1999), MAN1 (Mansharamani und Wilson, 2005), nukleäres Myosin und F-Actin (Fairley et al., 1999), BAF und GCL (Lee et al., 2001; Holaska et al., 2003). Wie unter 1.2.2.3 beschrieben, überlappen die Bindungspartner und die Funktionen von Emerin und MAN1 (Mansharamani und Wilson, 2005).

Auch Emerin hat wie der LBR klinische Bedeutung; Mutationen im Emerin-Gen führen zur Xchromosomal vererbten Form der Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD; Bione et al., 1994; Gruenbaum et al., 2003).

1.2.3 Die Kernlamina und die Lamine

Wie schon unter 1.2.1 beschrieben, besteht die Kernhülle neben ONM, Kernporenkomplexen und INM aus einer weiteren Komponente, der Kernlamina. Hauptstrukturelemente der Kernlamina sind die Lamine, Proteine aus der Familie der Intermediärfilament-(= IF)-Proteine, die ein Netzwerk ausbilden, das auf karyoplasmatischer Seite in den Bereichen zwischen den Kernporenkomplexen eng mit der INM assoziiert ist (Gerace et al., 1978; Aebi et al., 1986). Diese Assoziation wird sowohl durch die Interaktion mit INM-Proteinen als auch über hydrophobe Wechselwirkungen mit den Porenkomplexen gefestigt, wodurch gleichzeitig die Kernporenkomplexe stabilisiert und miteinander vernetzt werden (Aaronson und Blobel, 1975; Dwyer und Blobel, 1976; Scheer et al., 1976; Aebi et al., 1986; Übersichten in Krohne, 1998; Foisner, 2001; Krohne et al., 2005). In bestimmten Zelltypen kann die Lamina als elektronendichte, mit der INM assoziierte, Struktur erkannt werden, die eine Dicke von über 50 nm aufweist, was allerdings eher die Ausnahme darstellt, denn in den meisten Zellen liegt die Schichtdicke der Lamina, die auch innerhalb einer Zelle schwanken kann, bei ungefähr 15 nm (Fawcett, 1966; Dwyer und Blobel, 1976; Aebi et al., 1986; Krohne, 1998). Die Lamina verleiht der Kernhülle bzw. dem Zellkern mechanische Stabilität, beeinflusst darüber hinaus aber auch zahlreiche zelluläre Prozesse wie DNA-Replikation, Transkription oder Apoptose (siehe 1.2.3.3; Übersichten in Stuurman et al., 1998; Gruenbaum et al., 2000; 2003; 2005).

1.2.3.1 Molekulare Struktur der Lamine

Die Lamine bilden eine der sechs Klassen (Klasse V) der IF-Proteinfamilie. Die IF-Proteine haben molekulare Massen zwischen 60 und 80 kDa und bilden normalerweise Filamente mit einem Durchmesser von 7-12 nm, aus denen beispielsweise Strukturen des Zytoskeletts aufgebaut sind (McKeon et al., 1986; Stewart, 1993). Die Lamine, die sich in zwei Gruppen einteilen lassen (A- und B-Typ-Lamine; vgl. Abbildung 1-10 unter 1.2.3.2), weisen wie alle IF-Proteine prinzipiell eine dreigeteilte Molekülstruktur auf. Sie besitzen eine zentrale, α -helikale Stäbchendomäne, die von einer kurzen N-terminalen und einer großen, globulären C-terminalen Domäne flankiert wird (vgl. Abbildung 1-9; Krohne, 1998; Stuurman et al., 1998). Die zentrale Stäbchendomäne beinhaltet Heptadwiederholungen hydrophober Aminosäuren, was charakteristisch für Proteine ist, die "coiledcoil"-Strukturen ausbilden (McKeon, 1987; Stuurman et al., 1998). Sie besteht aus insgesamt vier α helikalen Segmenten (1A, 1B, 2A und 2B), die über drei hoch konservierte Linkerbereiche (L1, L12 und L2) miteinander verbunden sind. Im Unterschied zu anderen IF-Proteinen enthalten die Linkerregionen der Lamine keine Proline, die als Helix-Brecher gelten, und die α -helikale Organisation der Stäbchendomäne bleibt wahrscheinlich auch im Bereich der Linkersequenzen erhalten. Ein weiterer Unterschied der Lamine zu anderen IF-Proteinen ist die um 42 Aminosäuren verlängerte Helix 1B (Parry et al., 1986; Stuurman et al., 1998). Über die α -helikale Stäbchendomäne kommt es bereits während oder direkt nach der Translation zur Ausbildung von parallel angeordneten "coiled-coil"-Homodimeren (= Doppelwendel-Dimere; Krohne et al., 1987; Krohne, 1998).



Abb. 1-9: Struktur des Lamin-Moleküls.

Schematische Darstellung der molekularen Struktur der Lamine. Zur Vereinfachung sind die Helices 2A und 2B zu einer Domäne zusammengefasst. Neben der dreigeteilten Struktur des Moleküls sind die wichtigsten Domänen eingezeichnet, die bei Polymerbildung und Lokalisation des Moleküls in der Kernhülle eine wichtige Rolle spielen (NLS = Kernlokalisations-Signal [,,nuclear localisation signal"]; CaaX = Aminosäuresequenz, beginnend mit Cystein, gefolgt von zwei aliphatischen und einer beliebigen Aminosäure). Näheres im Text (Abbildung verändert aus Krohne, 1998).

Die zentrale Stäbchendomäne wird auf beiden Seiten, sowohl im N- als auch im C-Terminus, flankiert von Phosphorylierungsstellen, die von der p34/cdc2-Kinase phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung dieser Stellen führt zur Depolymerisation der Lamina zu Beginn der Mitose und dem damit verbundenen Zusammenbruch der gesamten Kernhülle. Diese Phosphorylierung beeinflusst allerdings lediglich die Stabilität übergeordneter Polymerstrukturen der Lamine, die Bildung von Dimeren ist davon nicht beeinträchtigt (Heald und McKeon, 1990; Peter et al., 1990; Dessev et al., 1991; Heitlinger et al., 1991; Nigg, 1992a, b).

Innerhalb der C-terminalen Domäne liegen außerdem noch zwei Motive, die bei der korrekten Lokalisation der Lamine an der Kernhülle eine Bedeutung haben. Zum einen ein Kernlokalisations-Signal (NLS = "nuclear localisation signal"), das die Translokation der Proteine in den Zellkern bewirkt (Loewinger und McKeon, 1988) und zum andern die CaaX-Box (C = Cystein, a = aliphatische Aminosäure; X = beliebige Aminosäure) am Ende des Carboxyterminus, die für die Lokalisation der Proteine an der Kernhülle verantwortlich ist (Übersichten in Nigg, 1992a; Krohne, 1998). Das Cystein in diesem Motiv wird farnesyliert und die letzten drei Aminosäuren (aaX) proteolytisch abgespalten. Anschließend erfolgt zusätzlich die Methylierung des Cysteins. Das CaaX-Box-Motiv und die damit assoziierten Modifikationen sind essentiell für die Lokalisation der Lamine an der Kernhülle (Holtz et al., 1989; Krohne et al., 1989; Kitten und Nigg, 1991; Nigg et al., 1992; Hennekes und Nigg, 1994; Firmbach-Kraft und Stick, 1995; Moir et al., 1995), reichen aber nicht aus, diese Proteine dort dauerhaft zurückzuhalten (Schmidt-Zachmann et al., 1993). Bei Lamin A (siehe 1.2.3.2) folgt noch ein weiterer Prozessierungsschritt, bei dem das vorher modifizierte Cystein und weitere 14 Aminosäuren durch eine spezifische Protease (ZMPSTE24) abgespalten werden (Pendas et al., 2002). Lamin C, das keine CaaX-Box besitzt (siehe 1.2.3.2 und Abbildung 1-10), kann nur bei vorhandenem Lamin A über die Bildung von Heterodimeren in die Kernhülle integriert werden (Horton et al., 1992; Pugh et al., 1997; Vaughan et al., 2001).

Im Zellkern kommt es zu einer longitudinalen Anlagerung der Kopf- und Schwanzdomänen der Dimere, wodurch polare Filamente entstehen, die sich dann wahrscheinlich unterhalb der INM in antiparalleler Orientierung aneinanderlagern und dadurch die fibrilläre Schicht der Kernlamina ausbilden (Krohne, 1998; Stuurman et al., 1998). Bei der longitudinalen Aneinanderlagerung der Dimere spielen die Randbereiche der zentralen Stäbchendomäne und die ersten 10 Aminosäuren der flankierenden Domänen eine entscheidende Rolle. Im Gegensatz zum Großteil der Stäbchendomäne, dessen Aminosäuresequenz sehr variabel ist, sind diese Bereiche hoch konserviert. Mutationen in diesen Bereichen verhindern die Ausbildung der Filamente, die Dimerbildung ist aber nicht beeinträchtigt (Stuurman et al., 1996; 1998; Strelkov et al., 2002).

Wie die neu gebildeten Lamin-Polymere schließlich in die vorhandene Kernhülle bzw. Kernlamina eingebunden werden, ist noch nicht geklärt. *In vitro* bilden die Lamin-Filamente durch laterale Aneinanderlagerung parakristalline Strukturen mit einem regelmäßigen Muster heller und dunkler Banden, die *in vivo* bisher nur in isolierten Kernhüllen von *Xenopus*-Oozyten in ähnlicher Form gefunden wurden (Aebi et al., 1986; Klapper et al., 1997; Stuurman et al., 1998).

1.2.3.2 Die Proteinfamilie der Lamine

Wie im vorigen Abschnitt bereits erwähnt, werden die Lamine in zwei Gruppen eingeteilt, die A- und die B-Typ-Lamine (vgl. Abbildung 1-10). Die Einteilung erfolgt anhand struktureller und biochemischer Eigenschaften, sowie durch Unterschiede im Expressionsmuster oder beim Verhalten während der Mitose (Übersichten in Krohne und Benavente, 1986; Gerace und Burke, 1988; Stuurman et al., 1998).

A-Typ-Lamine besitzen einen neutralen isoelektrischen Punkt (IEP) und sind während der Mitose als gelöste Proteine frei im Zytoplasma verteilt. Bei B-Typ-Laminen liegt der IEP mehr im sauren pH-

Bereich und während der Mitose bleiben B-Typ-Lamine mit Membranen assoziiert. Bei allen B-Typ-Laminen ist die CaaX-Box vorhanden, die auch nach den stattfindenden posttranslationalen Modifikationen erhalten bleibt, während von den A-Typ-Laminen nur das Lamin A eine CaaX-Box aufweist, die aber im Zuge der Prozessierung des Proteins entfernt wird. Ein weiterer wichtiger Unterschied liegt im Expressionsmuster beider Lamin-Gruppen. B-Typ-Lamine sind ubiquitär exprimiert, während A-Typ-Lamine nur in differenzierten Zellen oder Geweben nachgewiesen werden können (Krohne und Benavente, 1986; Stewart und Burke, 1987; Röber et al., 1989; Broers et al., 1997).

Die Anzahl der exprimierten Lamine ist speziesabhängig. In Pflanzen (*Arabidopsis* und *Oryza*) und in Hefe (*S. cerevisiae* und *S. pombe*) wurde kein Lamin-Gen gefunden. Im Tierreich scheint dann der Zusammenhang zwischen Evolutionsstufe und Komplexität der Kernhülle mit der damit verbundenen Anzahl exprimierter Kernhüllenproteine, der unter 1.2.2 beschrieben wurde, auch bei den Laminen zu existieren. Im Genom von *Caenorhabditis elegans* wurde nur ein Lamin-Gen entdeckt, das für das Ce-Lamin, ein B-Typ-Lamin, kodiert (Liu et al., 2000). Bei *Drosophila* wurden dagegen bereits zwei Lamin-Gene entdeckt, die für das Lamin Dm_o, ein B-Typ-Lamin, bzw. für das Lamin C, ein A-Typ-Lamin, kodieren (Gruenbaum et al., 1988; Bossie und Sanders, 1993). In Vertebraten findet man drei bis vier Lamin-Gene, bei Säugern sind es normalerweise drei: zwei kodieren für B-Typ-Lamine (*LMNB1* und *LMNB2*; Höger et al., 1988; 1990; Zewe et al., 1991), das dritte für A-Typ-Lamine (*LMNA*; Fisher et al., 1986; McKeon et al., 1986). Die Proteine, die aus diesen Genen bei Säugern hervorgehen, sind in Abbildung 1-10 schematisch abgebildet und zusammengefasst.

Das Gen *LMNB1* kodiert nur für ein Protein, das Lamin B1, während durch das Gen *LMNB2* zwei Isoformen kodiert werden, die über alternatives Spleißen entstehen. Zum einen das Lamin B2, das zweite, ubiquitär exprimierte, somatische Lamin, und zum andern die nur in Keimzellen exprimierte Variante, das Lamin B3. Lamin B3 unterscheidet sich von seiner somatischen Isoform erheblich. Der N-Terminus und die Helices 1A und 1B von Lamin B2 sind durch eine nicht-helikale Domäne aus 84 Aminosäuren ersetzt, deren Sequenz keinerlei Homologie zu bekannten Proteinen aufweist (Furukawa und Hotta, 1993).

Aus dem Gen *LMNA* gehen über alternatives Spleißen mindestens drei Isoformen hervor. Die häufigsten sind die Lamine A und C, die sich nur in ihren C-terminalen Schwanzdomänen voneinander unterscheiden, sonst sind sie vollkommen identisch (Fisher et al., 1986). Mit dem Lamin C2 existiert auch ein A-Typ-Lamin, das spezifisch nur in Keimzellen exprimiert wird. Wie bei Lamin B3 ist auch im Lamin C2 der N-Terminus und ein erheblicher Teil der zentralen Stäbchendomäne durch eine spezifische Sequenz ersetzt (vgl. Abbildung 1-10 und siehe unter 1.2.4; Furukawa et al., 1994). In humanen Zellen konnte eine vierte Lamin-A-Variante nachgewiesen werden, das Lamin A Δ 10, das sich vom Lamin A lediglich durch das Fehlen des kurzen Exons 10 unterscheidet (Machiels et al., 1996), allerdings existieren keine genaueren Daten bezüglich Expressionsprofil oder Funktion dieser Isoform.



Abb. 1-10: Die Protein-Familie der Lamine.

Schematische Darstellung der verschiedenen, bei Säugern bekannten Lamine. Die Lamine A (70 kDa) und C (65 kDa) sind Produkte eines Gens (*LMNA*), die über alternatives Spleißen entstehen. Das Lamin A∆10 ist eine weitere Variante des Lamin-A-Gens, bei der das Exon 10 im Vergleich zu Lamin A fehlt. Lamin C2 (52 kDa) ist schließlich eine keimzellspezifische Variante des Lamin-A-Gens. Der Pfeil markiert die Stelle der proteolytischen Prozessierung des Lamins A nach Isoprenylierung der CaaX-Box. Die Lamine B1 und B2 (jeweils ca. 67 kDa) sind durch verschiedene Gene kodiert (*LMNB1* bzw. *LMNB2*), Lamin B3 ist eine keimzellspezifische Spleißvariante des Lamin-B2-Gens (53 kDa). Die für die Lamine B3 und C2 spezifischen Aminosäuresequenzen sind fett eingezeichnet (näheres im Text; molekulare Massen beziehen sich auf die Lamine der Maus; Abbildung verändert aus Krohne, 1998).

1.2.3.3 Lokalisation und Funktion der Lamine

Entdeckt wurden die Lamine als Hauptstrukturelement der Kernhülle, der sie als filamentöses Netzwerk von innen her anliegen und die sie stabilisieren. Gleichzeitig werden die Kernporenkomplexe miteinander vernetzt und stabilisiert (Aaronson und Blobel, 1975; Dwyer und Blobel, 1976; Scheer et al., 1976; Aebi et al., 1986; Übersicht in Krohne et al., 2005). Kurz nach Entdeckung der Kernlamina konnten die Lamine mit Hilfe spezifischer Antikörper einerseits als Bestandteil dieser Struktur definiert und andererseits ihre Lokalisation in der Kernperipherie nachgewiesen werden (Gerace et al.,
1978). Dass die Lamine tatsächlich eine wesentliche Rolle spielen sowohl für die Stabilität der Kernhülle und damit die Struktur des Zellkerns als auch bei der Verteilung der Kernporenkomplexe, konnte mehrfach experimentell bewiesen werden. So führt eine Reduktion des Lamingehalts einer Zelle zu einer erhöhten Brüchigkeit der Kernhülle und darüber hinaus zu einer auffälligen Umverteilung der Kernporenkomplexe, die unnormale Aggregate ausbilden, und schließlich zum Absterben der Zelle (Lenz-Böhme et al., 1997; Sullivan et al., 1999; Liu et al., 2000; Schirmer et al., 2001). Auch die korrekte Lokalisation anderer Kernhüllenproteine wird maßgeblich durch die Lamine bzw. eine intakte Kernlamina gewährleistet. So haben Lamin-Knockout-Experimente gezeigt, dass das Fehlen einer intakten Lamina eine Fehlverteilung bestimmter INM-Proteine wie Emerin oder Unc-84 (siehe 1.2.2) zur Folge hat (Sullivan et al., 1999; Gruenbaum et al., 2002; Lee et al., 2002).

Wie unter 1.2.1 beschrieben, zeigt die Kernhülle im Verlauf des Zellzyklus eine hohe Dynamik, sie zerfällt zu Beginn der Mitose und bildet sich danach um die entstandenen Tochterkerne neu aus. Auch für diese Prozesse haben die Lamine eine wichtige Bedeutung (Übersicht in Gruenbaum et al., 2003). Eingeleitet wird die Auflösung der Kernhülle durch die Phosphorylierung verschiedener Proteine, darunter die Lamine (vgl. 1.2.3.1; Heald und McKeon, 1990; Peter et al., 1990; Dessev et al., 1991; Peter et al., 1991), die Kernporenkomplexe (Favreau et al., 1996) und andere Kernhüllenproteine wie beispielsweise LAP1 und LBR (Qian et al., 1998). Mit Hilfe von Lamin-Mutanten, die an den entscheidenden Stellen nicht mehr phosphoryliert werden können, konnte die Bedeutung dieser Modifikation für die Depolymerisation der Lamina zu Beginn der Mitose gezeigt werden. Die Expression dieser Mutanten verhinderte den Abbau der Lamina und führte damit zum Stopp des Zellzyklus in dieser Phase (Heald und McKeon, 1990). Auch für die Neubildung des Zellkerns am Ende der Mitose sind die Lamine wichtig. So verhindert die Depletion der Lamine in verschiedenen Ansätzen (RNAi oder Antikörperinjektion) die Neubildung der Kernhülle und die Ausbildung von Kernporenkomplexen (Benavente und Krohne, 1986; Burke und Gerace, 1986; Dabauvalle et al., 1991; Liu et al., 2000). Dabei ist nur ein kleiner Anteil der Lamine an der Initiation der Kernhüllenbildung beteiligt. der größte Teil der Proteine wird erst später durch die Kernporenkomplexe in den neu gebildeten Kern importiert und dort in die Lamina integriert (Moir et al., 2000).

Neben ihrem Einfluss auf die strukturelle Integrität des Zellkerns wurden in jüngerer Zeit immer mehr zelluläre Vorgänge identifiziert, in die die Lamina involviert ist. So wurde von Newport et al. (1990) gezeigt, dass nach Depletion des *Xenopus*-Lamins L_{III} zwar kleine brüchige Zellkerne gebildet werden können, die aber keine DNA replizieren können. Die Fähigkeit zur DNA-Replikation kann über die Zugabe von gereinigtem Lamin L_{III} zum depletierten Eiextrakt, der für die Kernbildung eingesetzt wird, wiederhergestellt werden (Goldberg et al., 1995). In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass Lamine neben ihrer Lokalisation an der Kernperipherie auch innerhalb des Nukleoplasmas nachgewiesen wurden (Goldman et al., 1992; Bridger et al., 1993; Moir et al., 1994; Holaska et al., 2003; Übersicht in Stuurman et al., 1998). Besonders interessant ist dabei die Tatsache, dass Lamin B1 an

den Orten im Nukleoplasma vorhanden war, wo auch DNA-Replikation nachgewiesen werden konnte (Moir et al., 1994).

Die Lamina spielt auch eine wichtige Rolle bei der Organisation des Chromatins während der Interphase. So ist transkriptionell inaktives Heterochromatin in vielen Spezies mit der Lamina assoziiert (Fawcett, 1966; Paddy et al., 1990; Übersichten in Goldman et al., 2002; Gruenbaum et al., 2003). Darüber hinaus konnte eine direkte Interaktion der Lamine mit Chromatin und mit bestimmten DNA-Sequenzen (MARs [= "matrix attachment regions"] und SARs [= "scaffold attachment regions"]) nachgewiesen werden (Luderus et al., 1992; 1994; Taniura et al., 1995; Zhao et al., 1996). Außerdem interagieren die Lamine indirekt über ihre zahlreichen Wechselwirkungen mit anderen Kernhüllenproteinen mit Chromatin und sind somit auch in andere Chromatin-assoziierte Prozesse involviert (siehe 1.2.2 und Tabelle 1-2). So beeinflussen die Lamina und ihre assoziierten Proteine wichtige zelluläre Prozesse wie die Transkription durch die RNA-Polymerase II (Spann et al., 2002) und die Aktivität des E2F/DP3-Komplexes und die damit verbundene Transkription der entsprechenden Gene (Nili et al., 2001). Außerdem gehören die Lamine zu den ersten Proteinen, die während der Apoptose angegriffen und durch spezifische Kaspasen abgebaut werden (Übersichten in Gruenbaum et al., 2000; 2003; 2005). Die Expression mutierter Lamine, die nicht mehr durch die Kaspasen abgebaut werden können, führt zu einer 12- bis 16-stündigen Verzögerung des apoptotischen Prozesses (Rao et al., 1996). Eine Übersicht über die verschiedenen Interaktionen und Beteiligungen der Lamina an zellulären Prozessen gibt Abbildung 1-11.





Die Verbindungslinien deuten entweder eine direkte Interaktion an oder weisen auf einen Einfluss der Lamine auf einen mit ihr verbundenen Prozess hin (z.B. DNA-Replikation oder -Transkription). Einige der angezeigten Interaktionen sind im Text beschrieben, die Bedeutung der Abkürzungen ebenfalls (siehe dazu auch Tabelle 1-2 unter 1.2.2); X und Y stehen für nicht identifizierte Proteine (Abbildung aus Gruenbaum et al., 2005).

A-Typ-Lamine haben, wie schon für LBR und Emerin beschrieben (siehe 1.2.2.1 und 1.2.2.4), klinische Bedeutung, denn Mutationen im Lamin-A-Gen führen zu zahlreichen Erbkrankheiten: die autosomal dominant-rezessiv vererbte Form der EDMD (Bonne et al., 1999), verschiedene Formen der Lipodystrophie (Cao und Hegele, 2000; Caux et al., 2003), eine Form des Charcot-Marie-Tooth-Syndroms (De Sandre-Giovannoli et al., 2002) oder die Hutchinson-Gilford-Progerie (Cao und Hegele, 2003; De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003). Die Zahl der Krankheiten, die mit Mutationen in den Laminen A und C oder anderen Kernhüllenkomponenten assoziiert sind, wächst stetig (Übersichten in Broers et al., 2004; Worman und Courvalin, 2004; Gruenbaum et al., 2005; Smith et al., 2005), Mutationen in B-Typ-Laminen sind meist schon während der Embryonal-entwicklung letal, da diese Proteine essentielle Zellbestandteile sind (Harborth et al., 2001).

1.2.4 Die Kernhülle in Keimzellen

Es kristallisierte sich schon früh heraus, dass es in Bezug auf Struktur und Proteinzusammensetzung der Kernhülle deutliche Unterschiede zwischen somatischen Zellen und Zellen der Keimbahn gibt. Lange Zeit nahm man an, dass in Keimzellen während der Spermatogenese überhaupt keine Lamina vorhanden wäre (Fawcett, 1966; Stick und Schwarz, 1982). Dies konnte später durch den Nachweis der Expression von Lamin B1 in Spermatogenesestadien der Ratte widerlegt werden. Allerdings erscheint die Kernlamina in Keimzellen dünner und strukturell aufgelockerter als die in somatischen Zellen (Vester et al., 1993). Eine im Vergleich zu somatischen Zellen deutlich verringerte Expressionsrate in Keimzellen wurde sowohl für Lamin B1 als auch für die LAPs2 nachgewiesen. Darüber hinaus konnte für beide Kernhüllenkomponenten eine drastische und zugleich interessante Umverteilung im Verlauf der Spermiogenese festgestellt werden: die zu Beginn der Spermiogenese über den gesamten Bereich der Kernhülle verteilten Proteine konzentrierten sich mit Fortschreiten des Differenzierungsprozesses immer mehr am posterioren Pol der Zelle (Vester et al., 1993; Alsheimer et al., 1998; 1999). In Bezug auf die Lamine war schon länger bekannt, dass sie ein gewebs- und entwicklungsspezifisches Expressionsmuster zeigen (Benavente et al., 1985; Krohne und Benavente, 1986) und bei Xenopus konnte in den 80er Jahren mit dem Lamin L_{IV} ein keimbahnspezifisches Lamin identifiziert werden, das nur in Keimzellen während der Spermiogenese exprimiert wird (Benavente und Krohne, 1985). In Säugern konnte von den somatischen Laminen lediglich das Lamin B1 nachgewiesen werden, die Lamine A, C und B2 scheinen nicht exprimiert zu sein. Dafür werden mit den Laminen C2 und B3 zwei keimbahnspezifische Varianten dieser Proteine exprimiert (siehe 1.2.3.2 und Abbildung 1-10; Smith und Benavente, 1992; Furukawa und Hotta, 1993; Furukawa et al., 1994). Die Expression von Lamin C2 ist auf primäre Spermatozyten beschränkt, das Protein taucht im späten Zygotän der Prophase I der Meiose auf, ist über die Dauer des Pachytäns vorhanden und ist schließlich mit Einsetzen des Diplotäns nicht mehr nachweisbar (vgl. Abbildung 1-12; Alsheimer und Benavente, 1996). Für Lamin B3 wurde das Expressionsmuster im Verlauf der Spermatogenese noch nicht im Detail untersucht, konnte allerdings bisher nur in meiotischen Zellen nachgewiesen werden (Furukawa und Hotta, 1993).



Abb. 1-12: Expressionsmuster der bekannten Lamin-Isoformen in Keimzellen während der Spermatogenese. Die Abkürzungen bedeuten: L = Leptotän; Z = Zygotän; P = Pachytän; D = Diplotän (Abbildung nach Alsheimer und Benavente, 1996).

Lamin C2 ist eine kürzere Spleißvariante des Lamin-A-Gens (vgl. Abbildung 1-10 unter 1.2.3.2), die im C-terminalen Bereich vollkommen identisch mit Lamin C ist. Allerdings sind die gesamte Nterminale Domäne und ein Teil der α -helikalen Stäbchendomäne, die komplette Helix 1A und ein Teil der Helix 1B, durch eine kurze Sequenz aus sechs Aminosäuren (GNAEGR) ersetzt (Furukawa et al., 1994). Diese kurze Sequenz ist eine Signalsequenz für eine Myristylierung, eine hydrophobe Modifikation wie die Farnesylierung der CaaX-Box. Diese Myristylierung des Lamins C2 ist erforderlich, dass das Protein an die Kernhülle gelangen kann, wo es nicht wie Lamin B1 eine gleichmäßige Verteilung aufweist, sondern vielmehr diskontinuierlich in Aggregaten über die Kernperipherie verteilt erscheint. Interessanterweise liegen alle Stellen, an denen die Synaptonemalkomplexe (SC) meiotischer Chromosomen in der Kernhülle verankert sind, ausschließlich in Bereichen, wo auch Lamin C2 vorhanden ist (Alsheimer et al., 1999; 2000). Lamin C2 scheint demnach eine Rolle zu spielen bei den Bewegungen der Telomere während der Prophase der ersten meiotischen Teilung in der Kernhülle, die essentielle meiotische Prozesse wie SC-Ausbildung oder Rekombination positiv beeinflussen (Scherthan et al., 1996; Trelles-Sticken et al., 2000). Weitere Hinweise auf die große Bedeutung von Lamin C2 in der Spermatogenese brachte die Untersuchung von Lamin-A-Knockout-Mäusen (Sullivan et al., 1999). Die Spermatogenese lief nur noch bis zum Pachytän und es waren extrem viele apoptotische Zellen vorhanden (Alsheimer et al., 2004). Über die Mechanismen oder eventuelle Bindungspartner, mit Hilfe derer Lamin C2 den meiotischen Prozess beeinflusst, ist allerdings noch nichts bekannt.

Lamin B3 ist die zweite, keimbahnspezifische Lamin-Variante. Bei dieser kurzen Spleißvariante des Lamin-B2-Gens ist der gesamte N-Terminus und die komplette Helix 1 (die Helices 1A und 1B) des Lamins B2 durch 84 Aminosäuren ersetzt, deren Sequenz keinerlei Ähnlichkeit zu einem bekannten Protein zeigt (vgl. Abbildung 1-10 unter 1.2.3.2; Furukawa und Hotta, 1993). Das Expressionsmuster von Lamin B3 in der Spermatogenese ist noch nicht im Detail analysiert, die bisher verfügbaren Daten

belegen die auf Zellen der Keimbahn beschränkte Expression des Proteins, das lediglich in Spermatozyten nachgewiesen wurde (Furukawa und Hotta, 1993).

Über eine mögliche Funktion von Lamin B3 existieren noch keine Daten und die Bedeutung von Lamin C2 für die Spermatogenese ist auch noch längst nicht geklärt. Bedenkt man dann zusätzlich noch die Vielzahl der Funktionen, die von einer intakten Kernlamina in einer somatischen Zelle abhängen (vgl. 1.2.3.3), und welche zellulären Reorganisationsprozesse in Keimzellen ablaufen, so muss die besondere Ausstattung der Keimzellen in Bezug auf die Kernhüllenproteine einen funktionellen Hintergrund haben.

1.3 Ziel der Arbeit

Das Expressionsmuster von Lamin C2 in der Spermatogenese ist exakt bestimmt und auch die funktionelle Charakterisierung des Proteins hat begonnen. Von Lamin B3, der zweiten Lamin-Variante, die ausschließlich in Keimzellen exprimiert wird, existieren dagegen noch kaum Daten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst das Expressionsmuster dieses Proteins im Verlauf der Spermatogenese der Maus detailliert aufgeklärt werden.

Darüber hinaus sollte die Bedeutung der besonderen N-terminalen Domäne von Lamin B3 aufgeklärt werden. Dafür musste zunächst die cDNA von Lamin B3 gewonnen werden. Anschließend sollte über die Expression mutierter Lamin-B3-Proteine im heterologen Zellkultursystem der Einfluss einzelner Subdomänen innerhalb des spezifischen N-Terminus bestimmt werden. Da sich häufig die Bedeutung eines Proteins über die mit ihm assoziierten Proteine herleiten lässt, sollten außerdem spezifische Bindungspartner von Lamin B3 in Keimzellen gesucht und charakterisiert werden.

2 Material

2.1 Biologisches Material

2.1.1 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Datenbank	Kulturbedingungen	Zitat
	Swiss Albino Maus,	DSMZ: ACC 173	DMEM (1000 ^{mg} / ₁ D-Glucose	Todaro und Green, 1963;
	Fibroblasten		+ 10 % ECS	Todaro et al., 1965
3T3			+ 1 % Pen/Strep	
			+ 1 % L-Glutamin	
			\Rightarrow 37 °C + 5 % CO ₂	
	Grüne Meerkatze,	DSMZ: ACC 60	DMEM (1000 ^{mg} / ₁ D-Glucose und Natriumpyruvat	Gluzman, 1981
	Nere		+ 10 % FCS	
COS-7			+ 1 % Pen/Strep	
			+ 1 % L-Glutamin	
			\Rightarrow 37 °C + 5 % CO ₂	
	Homo sapiens, Cervixkarzinom	DSMZ: ACC 57	DMEM (1000 ^{mg} / ₁ D-Glucose und Natriumpyruvat	Scherer et al., 1953
	CorviakaiZillolli		+ 10 % FCS	
HeLa			+ 1 % Pen/Strep	
			+ 1 % L-Glutamin	
			\Rightarrow 37 °C + 5 % CO ₂	
	Homo sapiens, Leherzellkarzinom	DSMZ: ACC 180	DMEM (1000 ^{mg} / ₁ D-Glucose und Natriumpyruvat	Aden et al., 1979; Knowles et al. 1980
	Leoorzenkurzmom		+ 10 % FCS	et u, 1900
HEP-G2			+ 1 % Pen/Strep	
			+ 1 % L-Glutamin	
			\Rightarrow 37 °C + 5 % CO ₂	
	Drosophila	DSMZ: ACC 130	Schneiders Drosophilamedium	Schneider, 1972
	melanogaster		+ 10 % FCS	
Schneider S2			+ 1 % Pen/Strep	
			⇒ 20-25 °C ohne CO ₂ (Schalen mit Parafilm abdichten)	
	Ratte, Vena Cava		DMEM (1000 ^{mg} / ₁ D-Glucose und Natriumpyruvat	Franke et al., 1980
			+ 10 % FCS	
SMC-RV			+ 1 % Pen/Strep	
			+ 1 % L-Glutamin	
			\Rightarrow 37 °C + 5 % CO ₂	

 Tabelle 2-1: Verwendete Zelllinien, Herkunft und Kultivierungsbedingungen.

In der Tabelle sind alle verwendeten Zelllinien aufgeführt, zusammen mit ihrer Herkunft und den Bedingungen für die Kultivierung. Die Endkonzentration an L-Glutamin bei Zugabe von 1 % (v/v) beträgt 2 mM (SL: 200 mM). Die Arbeitskonzentrationen für Penicillin und Streptomycin betragen jeweils 100 μg_{ml} (SL: je 10 $m g_{ml}$ in physiologischer Kochsalzlösung). Genauere Angaben finden sich im Internet bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; http://www.dsmz.de) über die angegebene DSMZ-Nummer.

2.1.2 *Tiere*

Die verwendeten Mäuse wurden entweder über Harlan-Winkelmann (Borchen) bezogen oder stammten aus der Nachzucht des Tierstalls. Es wurde mit folgenden Stämmen gearbeitet:

- Balb/C (Harlan-Winkelmann)
- CD1 (Tierstall)
- C57BL/6N (Harlan-Winkelmann, Tierstall)

2.1.3 Bakterienstämme

Aufgelistet sind alle verwendeten Bakterienstämme mit ihren Genotypen. Die aufgeführten Gene bezeichnen mutierte Allele. Gene auf dem F-Episom (sofern eines vorhanden ist [F']) sind wildtypisch, wenn nicht anders aufgeführt. Wenn nicht anders angegeben, stammen die verwendeten Bakterienstämme ursprünglich von der Firma Stratagene.

E. coli XL1-blue:

Dieser Stamm wurde standardmäßig zur Klonierung und Vermehrung von Plasmiden verwendet. Mit einem geeigneten Plasmid ist eine Blau-Weiß-Selektion positiver Klone möglich.

Genotyp: endA1 supE44 hsdR17 recA1 gyrA46 thi-1 relA1 lac [F' proAB + $lacI^{q}Z\Delta M15 \operatorname{Tn}10(\operatorname{Tet}^{r})$]

E. coli XL10-gold ultracompetent cells:

Dieser Stamm wurde wie *E. coli* XL1-blue für Klonierungen und Plasmidvermehrung eingesetzt, dieser Stamm zeichnet sich allerdings durch eine gesteigerte Transformationseffizienz aus. Mit einem geeigneten Plasmid ist eine Blau-Weiß-Selektion positiver Klone möglich.

Genotyp: Tet^r $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacl^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]

Der Stamm ist resistent gegenüber Chloramphenicol in Konzentrationen bis 40 $^{\mu g}/_{ml}$, aber sensitiv bei einer Konzentration von 100 $^{\mu g}/_{ml}$.

E. coli BL21-CodonPlus[™](DE3)-RIL:

Dieser Stamm wurde ausschließlich zur bakteriellen Expression rekombinanter Proteine verwendet. Er zeichnet sich dadurch aus, dass er weder Lon-Protease- noch OmpT-Protease-Aktivität zeigt, was die Wahrscheinlichkeit der Degradation eines Proteins bei der Aufreinigung deutlich senkt. Die Dcm-Methylase wurde ins Genom integriert.

Genotyp: E. coli B F⁻ ompT hsdS($r_B^- m_B^-$) dcm⁺ Tet^r gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]

E. coli TOP10 One Shot[®]:

Diese chemisch kompetenten Zellen sind im TOPO TA Cloning[®] Kit der Firma Invitrogen enthalten und wurden zur Transformation einer "TOPO-Reaktion" verwendet. Mit einem geeigneten Plasmid ist eine Blau-Weiß-Selektion positiver Klone möglich.

Genotyp: F^- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (Str^r) endA1 nupG

E. coli TOP10F' One Shot[®]:

Diese chemisch kompetenten Zellen sind alternativ im TOPO TA Cloning[®] Kit der Firma Invitrogen enthalten und wurden zur Transformation einer "TOPO-Reaktion" verwendet. Mit einem geeigneten Plasmid ist eine Blau-Weiß-Selektion positiver Klone möglich, allerdings musste wegen der konstitutiven Expression des Lac-Repressors zusätzlich IPTG ausgestrichen werden.

Genotyp: F' { $lacI^{q}$ Tn10 (Tet^r)} mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^r) endA1 nupG

2.1.4 Antikörper

Antikörper	Antigen	Herkunft	Hersteller	BestNr.	IF	WB	Bemerkungen
L3F4	somatische Lamine (A, C, B1, B2)	Maus monoklonal	e. H. A. Smith	-	unverdünnt	unverdünnt	Smith, 1992; Vester et al., 1993 Jedes Aliquot sollte getestet werden!
XIII D4	LAPs 2 (α, β, γ)	Maus monoklonal	e. H. A. Smith	-	1:5 - 1:50 (je nach Aliquot)	1:10 - 1:500 (je nach Aliquot)	Smith, 1992; Alsheimer et al., 1998 Jedes Aliquot muss getestet werden auf Sauberkeit und Verdünnbarkeit!
R27	A-Typ-Lamine (A, C, C2)	Maus monoklonal	e. H. G. Krohne	-	unverdünnt	unverdünnt	Höger et al., 1991 Smith und Benavente, 1992 Jedes Aliquot sollte getestet werden!
X-223	Lamin B2	Maus monoklonal (Ascites)	e. H. G. Krohne	-	1:200	1:1000	Höger et al., 1990
α-Β3 2113	Lamin B3 (N-Terminus) + GST	Kaninchen polyklonal	e. H. (Seqlab)	-	nicht geeignet, Reinigung notwendig gereinigt: 1:5 - 1:10	1:10000 Reinigung notwendig gereinigt: 1:200 - 1:500	Kann auch zur Detektion von GST- Fusionsproteinen eingesetzt werden, auch ungereinigt. Für IF und Blots mit Gewebeproben muss zuvor eine Affinitätsreinigung durchgeführt werden (siehe 3.4.11)! Kein BSA verwenden!

Tabelle 2-2: Auflistung der verwendeten Antikörper

Antikörper	Antigen	Herkunft	Hersteller	BestNr.	IF	WB	Bemerkungen
α-Β3 2127	Lamin B3 (N-Terminus) + GST	Kaninchen polyklonal	e. H. (Seqlab)	-	nicht geeignet, Reinigung notwendig	1:10000 Reinigung notwendig	Kann auch ungereinigt zur Detek- tion von GST-Fusionsproteinen ein- gesetzt werden. Für IF und Blots mit Gewebeproben muss vorher eine Affinitätsreinigung durchgeführt werden (siehe 3.4.11)! Dieses Serum ist insgesamt weniger gut geeignet als das Serum "α-B3 2113".
α-SCP1	SCP1 + GST	Kaninchen polyklonal	e. H. (Seqlab)	-	nicht getestet	Reinigung notwendig gereinigt: 1:200 - 1:500	Öllinger et al., 2005 Kann auch zur Detektion von GST- Fusionsproteinen eingesetzt werden. Affinitätsreinigung notwendig!
α-SCP3 (Serum 13)	SCP3	Meer- schweinchen polyklonal	e. H.	-	nicht getestet	1:2000	Alsheimer und Benavente, 1996
α-Tubulin	β-Tubulin	Maus	Sigma	T4026	1:200	nicht getestet	-
α-HIS	Epitop aus 4-6 Histidinen	Maus polyklonal	e. H. Zentgraf	-	nicht getestet	1:50	-
α-MYC	MYC-Epitop	Maus monoklonal	Invitrogen	R950-25	1:200	1:1000	Funktioniert bei stärker exprimierten Proteinen in der IF auch in höheren Verdünnungen (bis 1:400).
Anti- Kaninchen Peroxidase	IgG (H+L)	Ziege	Promega	W4011	-	1:7500 - 1:10000	-
Anti- Kaninchen Texas Red	IgG (H+L)	Ziege	Dianova	111-075- 003	1:50	-	-
Anti- Kaninchen Cy2	IgG (H+L)	Ziege	Dianova	111-225- 003	1:50	-	-
Anti- Kaninchen Cy3	IgG (H+L)	Ziege	Dianova	111-165- 003	1:50	-	-
Anti-Maus Peroxidase	IgG (H+L)	Ziege	Promega	W4021	-	1:7500	-
Anti-Maus Texas Red	IgG + IgM (H+L)	Ziege	Dianova	115-075- 044	1:50	-	-

Antikörper	Antigen	Herkunft	Hersteller	BestNr.	IF	WB	Bemerkungen
Anti-Maus Cy2	IgG + IgM (H+L)	Ziege	Dianova	115-225- 044	1:50	-	-
Anti-Maus Cy3	IgG + IgM (H+L)	Ziege	Dianova	115-165- 044	1:50	-	-
Anti- Meerschw. Peroxidase	IgG (H+L)	Ziege	Dianova	106-035- 003	-	1:7500 - 1:10000	-
Anti- Meerschw. Texas Red	IgG + IgM (H+L)	Ziege	Dianova	106-076- 003	1:50	-	-

In der Tabelle sind alle verwendeten Antikörper mit Angaben zur Herkunft (aus welchem Organismus wurde der Antikörper gewonnen), dem erkannten Antigen und zur Bezugsquelle (e. H. bedeutet eigene Herstellung) aufgeführt. In den Spalten "IF" und "WB" ist angegeben, in welcher Verdünnung der jeweilige Antikörper eingesetzt werden muss. Für Immunfluoreszenzen (IF) wurden die Antikörper immer in PBS verdünnt, für Western Blots (WB) in 5-10 % Milch (w/v) in TBST.

2.2 Molekularbiologisches Material

2.2.1 Plasmidvektoren

• pBluescript SK+





Dieser Vektor stammt von der Firma Stratagene. Gezeigt ist die Karte des Vektors pBluescript SK + mit der Sequenz der "multiple cloning site", die von den Promotoren T3 und T7 flankiert wird. Dieser Vektor wurde für die Subklonierung und Fusion von DNA-Fragmenten mit Hilfe von PCR verwendet. Zur Selektion positiver Bakterienklone trägt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz.

• pCR[®]2.1-TOPO[®]

lacZα ATG Hind III Kpn I Sac I BamHI Spel erse Prin M13 Re CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTG GTA CCG AGC TCG GAT CCA CTA GTC CTT TGT CGA TAC TGG TAC TAA TGC GGT TCG AAC CAT GGC TCG AGC CTA GGT GAT BstXI EcoR GTA ACG GCC GCC AGT GTG CTG GAA TTC GCC C CAT TGC CGG CGG TCA CAC GAC CTT AAG CGG G GGC GAA TTC TGC CCG CTT AAG ACG EcoR V BstX I Not I Xho I AGA TAT CCA TCA CAC TGG CGG CCG CTC GAG CAT GCA TCT AGA GGG CCC AAT TCT ATA GGT AGT GTG ACC GCC GGC GAG CTC GTA CGT AGA TCT CCC GGG TTA TCG CCC AGC GGG AGT GAG TCG TAT TAC AAT TCA CTG GCC GTC GTT TTA CAA CGT CGT GAC TGG GAA AAC TCA CTC AGC ATA ATG TTA AGT GAC CGG CAG CAA AAT GTT GCA GCA CTG ACC CTT TTG Plac lac



Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®] 3931 nucleotides

 $\begin{array}{l} LacZ\alpha \text{ fragment: bases } 1\text{-}547 \\ \text{M13 reverse priming site: bases } 205\text{-}221 \\ \text{Multiple cloning site: bases } 234\text{-}357 \\ \text{T7 promoter/priming site: bases } 364\text{-}383 \\ \text{M13 Forward (-20) priming site: bases } 391\text{-}406 \\ \text{f1 orgin: bases } 548\text{-}985 \\ \text{Kanamycin resistance ORF: bases } 1319\text{-}2113 \\ \text{Ampicillin resistance ORF: bases } 2131\text{-}2991 \\ \text{pUC origin: bases } 3136\text{-}3809 \\ \end{array}$

• pGEX-5X-1



Abb. 2-2: Karte des Vektors pCR[®]2.1-TOPO[®]. Er ist Bestandteil des "TOPO TA Cloning[®] Kits" der Firma Invitrogen. Er wurde für die Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhang verwendet. Der Vektor besitzt ein Lac-Operon, das eine Blau-Weiß-Selektion ermöglicht. Zur Selektion transformierter Bakterien trägt dieser Vektor sowohl eine Ampicillin- als auch eine Kanamycin-Resistenz.

Abb. 2-3: Der Vektor pGEX-5X-1 ist Teil eines bakteriellen Expressionssystems der Firma Amersham Pharmacia Biotech. Eine inserierte cDNA wird als Fusionsprotein exprimiert, wobei an den N-Terminus des gewünschten Proteins das Enzym Glutathion-S-Transferase (GST) angehängt wird. Der GST-Anteil ermöglicht die Aufreinigung des Fusionsproteins über eine Matrix aus Glutathion-Sepharose. Nach der Reinigung kann der GST-Anteil enzymatisch abgespalten werden. Zur Selektion trägt dieser Vektor eine Ampicillin-Resistenz.

• pET-21a



pET-21a-d(+) cloning/expression region

Abb. 2-4: Dieser Vektor der Firma Novagen ermöglicht die Expression eines Proteins mit einem "His-Tag" an dessen C-Terminus. Das "His-Tag" ermöglicht die Reinigung des Proteins über eine Matrix aus Ni-NTA-Agarose. Soll ausschließlich das C-terminale "His-Tag" angehängt werden, muss die entsprechende cDNA mit ihrem 5'-Ende über NdeI kloniert werden, sonst wird N-terminal zusätzlich ein "T7-Tag" angehängt. Zur Selektion transformierter Bakterien trägt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz.

pEGFP-N1



• pEGFP-N2

pEGFP-N2 Vector Information PT3053-5 GenBank Accession #: U57608 Catalog #6081-1 Ase I SnaB I ApaL MCS pUC ori Eco0109 | HSV TK poly A EGFI pEGFP-N2 BsrG | (1393) 4.7 kb SV40 poly A Not | (1406) Xba 1* (1416) f1 SV40 ori Afl II (1644) Dra III (1878) Stu I <u>STOP</u> T<u>AG C</u>GC TAC CGG ACT C<u>AG ATC</u> AGC TČA AGC TTC GAĂ TTC TGC AGT ČGA CGG TAC CỔC GGG CCC GGỔ ATC CAC CGG ČCG GTC GCC ACC ATG GTG Sac | ''' Fc/136 ||

• pEGFP-N3



Abb. 2-5: Diese 3 Vektoren stammen von der Firma Clontech. Sie ermöglichen die Expression eines Fusionsproteins aus EGFP (enhanced green fluorescent protein) und dem gewünschten Protein in eukaryontischen Zellen. Dabei wird das EGFP an den C-Terminus des gewünschten Proteins fusioniert. Die 3 Vektoren unterscheiden sich lediglich in ihrem Leseraster in Bezug auf die EGFP-Sequenz.

pEGFP-C1



• pEGFP-C2



• pEGFP-C3

 pEGFP-C3 Vector Information
 PT3052-5

 GenBank Accession #: U57607
 Catalog #6082-1





Abb. 2-6: Diese 3 Vektoren stammen ebenfalls von der Firma Clontech. Auch sie ermöglichen die Expression Fusionsproteins EGFP eines aus (enhanced green fluorescent protein) und dem gewünschten Protein in eukaryontischen Zellen. Dabei wird das EGFP den **N-Terminus** an des gewünschten Proteins fusioniert. Die 3 Vektoren unterscheiden sich lediglich in ihrem Leseraster in Bezug auf die EGFP-Sequenz.

2.2.2 Enzyme	
Collagenase	Sigma-Aldrich (München)
DNase I	Roche (Mannheim)
Klenow-Fragment	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
OB-Protease	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Pfu-DNA-Polymerase	Promega (Mannheim), AG Seibel
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Frankfurt a. M.)
Reverse Transkriptase MMULV	Promega (Mannheim)
Ribonuklease Inhibitor (RNasin)	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
RNase A	Serva (Heidelberg)
Shrimp Alkalische Phosphatase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Taq-DNA-Polymerase	Promega (Mannheim), AG Seibel
Tfl-DNA-Polymerase	Promega (Mannheim)
Trypsin	Gibco Life Technologies (Karlsruhe)
Trypsin Inhibitor	Serva (Heidelberg)

2.2.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide für die spezifische Amplifikation von cDNA-Fragmenten oder für Sequenzierungen wurden bei der Firma Thermo Electron (früher Interactiva, Ulm) bzw. bei Biomers (Ulm) bestellt. Der für die Reverse Transkription verwendete Oligo(dT)-Primer wurde von der Firma Promega (Mannheim) bzw. MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Alle verwendeten Primer sind im Anhang detailliert aufgelistet.

2.2.4 Größenstandards

Lambda DNA/EcoRI+HindIII, Marker 3	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas (St- Leon-Rot)

2.2.5 Kits und Kitbestandteile

ABI Prism [®] BigDye [™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
Bulk GST Purification Module (mit Glutathion Sepharose [®] 4B)	Amersham Pharmacia Biotech (Braunschweig)
E.Z.N.A. [®] Plasmid Mini Präp Kit I	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
E.Z.N.A. [®] Tissue DNA Kit II	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
ECL [™] Detection Kit	Amersham Pharmacia Biotech (Braunschweig)
Effectene [™] Transfection Reagent	Qiagen (Hilden)
Lipofectamine [™] Reagent	Invitrogen (Karlsruhe)
Magnet Assisted Transfection (MATra)	IBA GmbH (Göttingen)
Ni-NTA-Agarose	Qiagen (Hilden)
QIAquick [®] Gel Extraction Kit [®]	Qiagen (Hilden)
TOPO TA Cloning [®] Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Wizard [®] SV Gel and PCR Cleanup System	Promega (Mannheim)

2.3 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und Lösungsmittel in Analysequalität von den Firmen Applichem (Darmstadt), Ferak (Berlin), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (München) bezogen.

2.4 Geräte

Biophotometer	Eppendorf (Hamburg)
Brutschrank, CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus-Holding (Hanau)
Drehtisch Reax 2	Heidolph, über Hartenstein (Würzburg)
Drystar Geltrockner	H. Hölzel GmbH
Elutriationseinheit:	Beckman (München)
J2-21M/E Centrifuge JE-6B Rotor	
Feinwaage Mettler AC 100	Mettler (Düsseldorf)
Flachbett-Scanner, X-Finity Pro 42	Quatographic Technology GmbH (Braunschweig)

Fluoreszenzmikroskop Axiophot Stereo	Zeiss (Oberkochen)
HB050 mit Quecksilberlampe	
Gefriermikrotom 2800 Frigocut E	Reichert-Jung
Gewebekulturschalen	Greiner Labortechnik (Frickenhausen)
Graphitblotter	über Hartenstein (Würzburg)
Heizblock	Liebisch, über Hartenstein (Würzburg)
Homogenisator RW20	Janke & Kunkel, über Hartenstein (Würzburg)
Hybridisierungsofen MINI 10	Thermo Hybaid (Ulm)
Kippschüttler WS5	Laborgerätebau Edmund Bühler (Tübingen)
Konfokales Laser Scanning Mikroskop (CLSM)	Leica Lasertechnik GmbH (Heidelberg)
Kühlzentrifuge Minifuge T	Heraeus (Hanau)
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments (Bad Homburg)
Laborwaage Mettler PJ 3600 DeltaRange®	Mettler (Düsseldorf)
Magnetrührer M35	GLW (Würzburg)
pH-Meter WTW pH521	über Hartenstein (Würzburg)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg) Gilson (Darmstadt)
Proteingelkammer Mini V8	Gibco Life Technologies (Karlsruhe)
Schlittenmikrotom	Leitz (Wetzlar)
Sequenzierer	ABI PRISM ^{TR} 310 Genetic Analyser Perkin Elmer, Applied Biotems GmbH (Weiterstadt)
Sofortbildkamera	Polaroid
Sonifier B12	Branson Sonic Power Company, über Gerhard Heinemann (Schwäbisch Gmünd)
Stabilisiertes Netzgerät 250 V 1 A	Dipl. Ing. L. Fischer (Heidelberg)
Sterile Bank	Steril GARD Hood Class III Müller Labortechnik (Windhagen)
The Denley Mixer A257, Multi Axle Rotator	über Hartenstein (Würzburg)
Thermocycler	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)

Thermocycler Gradient Thermocycler TECHNE PROGENE Tischzentrifuge 5415 C Vortex L24 Wasserbad WTH 500 über Hartenstein (Würzburg)

PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen) über Thermo-Dux (Wertheim) Eppendorf (Hamburg) GLW (Würzburg)

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Flüssigkultur von Bakterien

Lösungen:

•	LB-Medium (Luria Bertami) 1 l:	10 g Bacto-Trypton (Gibco)
		5 g Hefeextrakt (Gibco)
		10 g NaCl
		pH 7,4 (NaOH)
		⇒ autoklavieren
•	2x YT-Medium 1 1:	16 g Bacto-Trypton (Gibco)
		10 g Hefeextrakt (Gibco)
		5 g NaCl
		pH 7,0-7,4 (NaOH)
		⇒ autoklavieren
•	NZY ⁺ -Medium 1 l:	10 g NZ-Amin (Gibco)
		5 g Hefeextrakt (Gibco)
		10 g NaCl
		pH 7,0-7,4 (NaOH)
		⇒ autoklavieren
		⇒ folgende sterilfiltrierte Zusätze vor Gebrauch zugeben:
		12,5 ml 1 M MgCl ₂
		12,5 ml 1 M MgSO ₄
		20 ml 20 % (w/v) Glucose
•	Antibiotika-Stammlösungen:	siehe Tabelle 3-1

Tabelle 3-1: Stammlösungen und Arbeitskonzentrationer	n der für die Bakterienkultur verwe	ndeten Antibiotika.
---	-------------------------------------	---------------------

Antibiotikum	Stammlösung	Lösungsmittel	Lagerung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	50 ^{mg} / _{ml}	H ₂ O	4 °C	50 ^{µg} / _{ml} (1:1000)
Chloramphenicol	$10^{\text{mg}}/_{\text{ml}}$	MetOH	4 °C	$50 \ ^{\mu g}/_{ml} (1:200)$
Kanamycin	50 ^{mg} / _{ml}	H_2O	4 °C	$50 {}^{\mu g}\!/_{ml} (1:1000)$
Tetracyclin	$5^{mg}/ml$	EtOH	- 20 °C	$25 \ ^{\mu g}/_{ml} (1:200)$

Durchführung:

Für eine Übernachtkultur (ÜNK) wurden ca. 10 ml Medium in einem Greinerröhrchen vorgelegt und je nach verwendetem Bakterienstamm zur Selektion ein Antibiotikum zugesetzt. Ampicillin, Chloramphenicol und Kanamycin wurden in Endkonzentrationen von 50 ^{µg}/_{ml} eingesetzt, Tetracyclin

wurde in einer Konzentration von 15^{µg}/_{ml} verwendet. Zum Animpfen wurde etwas Bakterienmaterial aus einer Glycerinkultur oder eine Bakterienkolonie von einer Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze in das Medium überführt. Die Kultur wurde dann bei 37 °C über Nacht geschüttelt. In der Regel wurde LB-Medium verwendet, bei manchen Anwendungen, wie z.B. einer *in-vivo*-Expression von Proteinen in Bakterien, ist 2x YT- oder NZY⁺-Medium unter Umständen besser geeignet und liefert höhere Ausbeuten.

Für Flüssigkulturen größerer Volumina bzw. für Kulturen zur *in-vivo*-Expression wurde zunächst, wie beschrieben, eine ÜNK angesetzt. Mit 0,5-5 ml dieser ÜNK wurde dann am nächsten Tag die Kultur für die Proteinexpression angeimpft. Die Kulturen wurden in Volumina zwischen 20 und 300 ml angesetzt, je nach dem, ob die Expression nur getestet werden sollte, oder ob das Protein in größeren Mengen zur Verfügung stehen sollte.

3.1.2 Photometrische Bestimmung der Bakteriendichte in einer Flüssigkultur

Zur Bestimmung der Bakteriendichte in einer Flüssigkultur wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch ermittelt. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm $8 \cdot 10^8$ Zellen pro Milliliter. Als Nullwert wird nicht angeimpftes Kulturmedium verwendet.

3.1.3 Glycerinkultur

Um Bakterien längere Zeit aufzubewahren, wurden Glycerinkulturen angesetzt. Zur Herstellung wurden 100-200 µl steriles Glycerin mit 900 µl einer ÜNK vermischt und bei -70 °C gelagert. Um aus einer Glycerinkultur eine Flüssigkultur zu machen, wurde mit einer sterilen Pipettenspitze über die Glycerinkultur gestrichen und die anhaftenden Bakterien in ein mit LB-Medium gefülltes Greinerröhrchen überführt.

3.1.4 Bakterienkultur auf Agarplatten

Für die Herstellung von Agarplatten wurden 1,5 % Agar (Select Agar, Gibco) in LB-Medium eingewogen und das Gemisch autoklaviert. Nachdem sich die Lösung nach dem Autoklavieren auf etwa 50 °C abgekühlt hatte, wurde für Selektionsplatten ein Antibiotikum zugegeben; Ampicillin, Chloramphenicol und Kanamycin in Endkonzentrationen von 50 μ g/ml, Tetracyclin wurde in einer Konzentration von 15 μ g/ml verwendet. Der flüssige Agar wurde anschließend so in sterile Petrischalen gegossen, dass der Boden einer Schale gerade bedeckt war. Nach Erstarren des Agars wurden die Schalen umgedreht, um ein Auftropfen von Kondenswasser auf den Nährboden zu verhindern. So wurden die Platten über Nacht bei RT zum Trocknen aufbewahrt. Die kurzfristige Lagerung (3-4 Wochen) erfolgte bei 4 °C.

Will man aus einer Flüssig- eine Plattenkultur herstellen, dann pipettiert man ca. 100-200 µl der Kultur auf die Platte und streicht sie anschließend mit einem sterilen Drygalski-Spatel aus. Eine

andere Möglichkeit ist, Bakterien mit Hilfe einer sterilen Impföse auf die Platte zu überführen und auszustreichen.

3.1.5 Herstellung kompetenter Bakterien

Um Bakterien mit Plasmiden transformieren zu können, benötigt man kompetente Bakterien, d.h. Bakterien, die DNA aus ihrer Umgebung in sich aufnehmen können. Es gibt zahlreiche Bakterienarten, die eine natürliche Kompetenz besitzen, aber man kann auch andere Arten durch eine Modifikation der Lipiddoppelschicht, die sie umgibt, chemisch kompetent machen (Chung et al., 1989).

Lösungen:

• LB-Medium (siehe 3.1.1)

Durchführung:

Zunächst wurde eine ÜNK (mit entsprechendem Antibiotikum; siehe 2.1.3) mit einer Einzelkolonie des entsprechenden Bakterienstammes, XL1-blue, XL10-gold oder BL21-CodonPlusTM(DE3)-RIL, angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 100 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) mit 1 ml der ÜNK angeimpft. Dieser Ansatz wurde bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 inkubiert, was nach ca. 2 h der Fall war. Dann wurde die Kultur auf zwei 50-ml-Röhrchen verteilt und bei 1000 g und 4 °C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1/40 des Ausgangsvolumens (2,5 ml) eiskaltem TSS aufgenommen und resuspendiert. Die Suspension wurde in Aliquots zu 100 µl auf vorgekühlte Eppendorf-Gefäße verteilt (Bakterien und Gefäße immer auf Eis lassen) und dann in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -70 °C und war mehrere Wochen möglich.

Testen der Kompetenz:

Die Qualität kompetenter Bakterien lässt sich ausdrücken in "colony forming units" (cfu) pro Mikrogramm eingesetzter Plasmid-DNA. Ein akzeptabler Wert liegt bei 10^7-10^9 ^{cfu}/_{µg} Plasmid-DNA, bezogen auf den pUC-Vektor.

Zur Ermittlung der Kompetenz wurden 10, 100 und 1000 pg pUC-Vektor-DNA (Transformation von Bakterien: siehe 3.1.6), die auf den Platten erscheinenden Bakterienkolonien ausgezählt und damit die Transformationsrate für 1 µg DNA des pUC-Vektors berechnet.

3.1.6 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Lösungen:

• LB-Medium (siehe 3.1.1)

Ein Aliquot (100 µl) kompetenter Bakterien wurde mit 50-150 ng Plasmid-DNA vermischt. Die eingesetzte Menge Plasmid-DNA richtete sich nach dem verwendeten Bakterienstamm. Bei Bakterien der Stämme XL1-blue oder XL10-gold waren 50 ng DNA meist ausreichend für eine Transformation, während bei BL21-Bakterien mehr DNA eingesetzt werden musste. Der Ansatz wurde 30-60 Minuten auf Eis inkubiert, dann für 30 Sekunden bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt, nach dem der Ansatz sofort wieder auf Eis gestellt wurde. Anschließend wurden 900 µl LB-Medium zugegeben und das Gefäß 1 h bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden zwei Verdünnungen auf entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen (je nach Antibiotikaresistenz, die das transformierte Plasmid trägt). Zunächst wurden 100 µl entnommen und ausgestrichen ($^{1}/_{10}$), der Rest wurde bei 10000 rpm für 30 sek in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 100 µl abgenommen, in denen das Pellet vorsichtig resuspendiert wurde. Anschließend wurde alles auf einer zweiten Platte ausgestrichen ($^{9}/_{10}$).

3.2 Gewinnung angereicherter Zellfraktionen mit verschiedenen Spermatogenesestadien aus den Hoden von Mäusen durch zentrifugale Elutriation (Grabske et al., 1975; Meistrich, 1977)

Durch die zentrifugale Elutriation kann man aus dem sehr heterogenen Gemisch, das eine Suspension aus den Zellen eines Hodens darstellt, Fraktionen einzelner Zelltypen mit z.T. hoher Reinheit erhalten.



Abb. 3-1: Schematischer Aufbau der Elutriationskammer. V₁, V₂, V₃ geben die Kraft des Pufferstromes in unterschiedlichen Bereichen der Kammer an; S₁, S₂, S₃ geben die Sedimentationsraten kleiner, mittlerer und großer Partikel an.

Die Trennung beruht dabei auf einem Gleichgewicht zwischen Zentrifugalkraft und der Kraft, mit der ein entgegengesetzter Pufferstrom auf ein Partikel wirkt. Dieses Gleichgewicht ist für jedes Partikel, abhängig von dessen Form, Größe und Dichte, verschieden. Die Zentrifugalkraft bewirkt, dass ein Partikel, wenn dessen Dichte größer als die des Puffers ist, in der Kammer des Rotors sedimentiert. Diese Kraft

kann nun ausgeglichen werden durch einen entgegengesetzten Pufferstrom. Dessen Kraft auf das Partikel hängt von seiner Geschwindigkeit ab. Abbildung 3-1 zeigt schematisch den Aufbau einer Elutriationskammer, in der sich durch ihre Form bedingt ein Geschwindigkeitsgradient des Pufferstromes ausbildet (da der Puffer von außen mit konstanter Geschwindigkeit zugeführt wird, ist die Strömungsgeschwindigkeit in der Kammer abhängig von der Querschnittsfläche im Innern der Kammer). Auf Zellen bezogen heißt das, dass sich "oben" kleine Zellen sammeln, während "unten" die großen akkumulieren. Die kleinen Zellen können nun aus der Kammer gedrückt werden, wenn entweder die Geschwindigkeit des Pufferstromes erhöht, oder die der Zentrifugation gesenkt wird. In beiden Fällen werden die Zellen mit dem Puffer aus der Kammer gedrückt und können aufgesammelt werden. Werden die Parameter in geeigneter Weise verändert, dann entweichen nur Zellen eines Typs. Es hat sich gezeigt, dass bei der Trennung von Zellen vor allem deren Größe entscheidend ist.

Durchgeführt wurde die Gewinnung von Zellen der unterschiedlichen Spermatogenesestadien in einer Beckman J2-21M/E Centrifuge mit dem JE-6B Elutriationsrotor. Einen schematischen Überblick über den Aufbau des Systems liefert Abbildung 3-2, die außerdem den Weg des Puffers und der Zellen verdeutlicht.



Abb. 3-2: Übersicht über den Aufbau des Elutriationssystems JE-6B.

Lösungen:

Alle Lösungen wurden am Tag vor der Elutriation angesetzt und bei 4 °C gelagert (außer FKS, Ethanol und Seifenlösung), damit sie kühlen und entgasen konnten. Da die Dichte der Puffer (v.a. beim Elutriationspuffer) enorm wichtig ist, und die Dichte temperaturabhängig ist, musste die Temperatur der verwendeten Puffer und Lösungen möglichst konstant bei 4 °C \pm 1 °C gehalten werden. Enzymatische Zusätze der Puffer (Trypsin, Collagenase und DNase I) wurden erst am Tag des Gebrauchs zugegeben.

•	PBS (pH 7,4):	140 mM NaCl
		2,6 mM KCl
		6,4 mM Na ₂ HPO ₄
		1,4 mM KH ₂ PO ₄
•	DPBS (pH 7,2-7,4):	PBS
		+ 0,01 % MgCl ₂
		+ 0,01 % CaCl ₂
		\Rightarrow CaCl ₂ in H ₂ O bidest. vorlösen und dann unter Rühren
		zugeben, um ein Ausfallen des Calciums als Hydroxid
		zu verhindern.
•	Elutriationspuffer:	DPBS
		+ 0,5 % BSA (Sigma)
•	Verdaulösung:	DPBS
		+ 0,1 % Glucose
		+ 0,1 % Trypsin (Serva, 4 ml 2,5%ige Lösung pro
		100 ml Verdaulösung; am Tag des Gebrauchs)
		$+ 2 \mu^{g}/ml}$ DNase I (Roche, 1 Spatelspitze pro 100 ml; am
		Tag des Gebrauchs)
		+ Collagenase (Sigma, 1 kleiner Löffel pro 100 ml; am
		Tag des Gebrauchs)
•	NDA-Puffer:	DPBS
		+ 0,2 % (w/v) NDA (2-Naphtol-6,8-Disulfonsäure als
		Kaliumsalz, Kodak)
		+ DNase I (Roche, 1 Spatelspitze pro 100 ml; am Tag
		des Gebrauchs)

- FKS (10 ml pro 100 ml Verdaulösung)
- H₂O bidest. (2-3 l; gekühlt und entgast)

- 70 % Ethanol (200-500 ml)
- Seifenlösung (500-1000 ml; 3-4 ml flüssige Handseife auf 1 l destilliertes Wasser)

Die jeweils benötigte Puffermenge richtet sich nach der Anzahl der präparierten Hoden und der damit verbundenen Anzahl der Läufe, die durchgeführt werden müssen. Tabelle 3-2 gibt eine Übersicht über die benötigten Puffermengen in Abhängigkeit des Experimentes.

Tabelle 3-2: Benötigte Puffermengen für die Elutriation.			
	5-15 Mäuse (10-30 Hoden)	Mehr als 15 Mäuse (> 30 Hoden)	
Anzahl Läufe	1	2	
DPBS	41	41	
Verdaulösung	100 ml	100 ml	
NDA-Puffer	100 ml	200 ml	
Elutriationspuffer	31	31	

3.2.1 Präparation der Hoden und Herstellung der Zellsuspension

Vor Beginn der Präparation mussten die später benötigten Zentrifugen (Heraeus, Sorvall mit GSA-Rotor und Elutriator) auf 4 °C vorgekühlt und ein Wasserbad auf 31 °C vorgeheizt werden. Ein Becherglas mit kaltem DPBS musste für die Aufnahme der entnommenen Hoden auf Eis bereitgestellt werden. Außerdem wurde noch eine Glas-Petrischale benötigt, die Puffer mussten vervollständigt (Collagenase, DNase, Trypsin) und das FKS bereitgestellt werden.

Für die Gewinnung der Hoden wurden 39-42 Tage alte Mäuse (Harlan-Winkelmann) zunächst mit CO_2 eingeschläfert. Anschließend wurde ihnen vor der Präparation noch das Genick gebrochen. Den toten Mäusen wurde dann die Bauchdecke geöffnet und die Hoden entnommen. Die Hoden sollten möglichst von allen anhaftenden Geweben und Gewebeteilen befreit und dann sofort in das eisgekühlte DPBS überführt werden. Danach wurde etwas eiskaltes DPBS in eine Glas-Petrischale gegeben, in der die Hoden weiterverarbeitet wurden. Die Tunica albuginea wurde mit zwei Uhrmacherpinzetten aufgerissen und mitsamt dem Rete testis von den Tubuli contorti abgestreift, wobei möglichst viele der anhaftenden Blutgefäße mit entfernt werden sollten. Das übrig gebliebene lockere Gewebe wurde in der Glasschale mit Hilfe zweier Rasierklingen zerkleinert und dann mit einer Spritze ohne Kanüle durch wiederholtes Aufziehen und Ausdrücken feiner in seine Bestandteile zerlegt. Danach wurde die Suspension in die Spritze ohne Kanüle aufgezogen und anschließend mit aufgesetzter Kanüle ($\emptyset_i = 0.9$ mm) in ein 50-ml-Zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 ml Verdaulösung pro 10 Hoden resuspendiert. Zum Resuspendieren wurde zunächst eine kleine Menge Medium auf das Zellpellet gegeben und die Zellen durch auf- und abpipettieren mit

einer abgeschnittenen blauen Spitze vom Gefäßboden gelöst. Fester anhaftende Zellen wurden nicht mit der Spitze abgeschabt, sondern von der Gefäßwand gelöst, indem die Pipettenspitze knapp über den Zellen gehalten und dann schnell abpipettiert wurde. Die Zellen lösten sich dann durch den Flüssigkeitsstrom ab. Die Suspension wurde dann in eine verschließbare Kunststoffflasche überführt, in die Flasche wurde ein Rührfisch gegeben und die Suspension 45 min bei 31 °C im Wasserbad unter sanftem Rühren inkubiert. Die Verwendung von Kunststoff war ab diesem Schritt wichtig, da Zellen an Glas adhärieren und so verloren gehen können.

Nach 45 min wurde der Verdau durch Zugabe von 10 ml FKS pro 100 ml Verdaulösung gestoppt und die Suspension durch ein Drahtnetz (300 µm Maschenweite) filtriert. Das Filtrat wurde auf 50-ml-Zentrifugenröhrchen verteilt und 10 min bei 450 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 ml NDA-Puffer pro 10 Hoden aufgenommen. Die Suspension wurde dann durch ein in DPBS eingeweichtes Nylonnetz (25-30 µm Maschengröße) filtriert und auf 50-ml-Zentrifugenröhrchen verteilt. In den Zentrifugenröhrchen wurde die Suspension bis zur Verwendung bei 4 °C auf einem Rollinkubator gelagert.

3.2.2 Vorbereitung des Elutriators

3.2.2.1 Zusammenbau und Anschließen des Rotors

Der Rotor wurde zusammengesetzt, wobei zunächst die beiden Kammern eingebaut und dann der "Bearing Assembler" auf die Rotorachse gesetzt wurde. Anschließend wurde der Rotor in die Zentrifuge (J2-21M/E, Beckman) eingesetzt und das Schlauchsystem angeschlossen. Der Einlassschlauch wurde an den oberen, der Auslassschlauch an den unteren Anschluss des Aufsatzes angeschlossen. Nachdem zusätzlich der Überdruckschlauch an dem Überdruckventil angebracht worden war, wurde der Elutriator auf 4 °C vorgekühlt (Temperatureinstellung des Programms nachprüfen).

3.2.2.2 Befüllen des Rotors

Zunächst wurde die Blasenfalle so an die Pumpe angeschlossen, dass die lange Nadel als Auslass und die kurze Nadel als Einlass diente. Der Pumpenschlauch wurde in auf Eis stehendes destilliertes Wasser gehängt und die Pumpe zum Befüllen der Blasenfalle auf Stufe 3-4 gestellt. Zum Befüllen wurde die Blasenfalle umgedreht und bis ca. $^{2}/_{3}$ mit Wasser gefüllt, dann wurde sie umgedreht und befestigt. Während sich die Elutriationskammer füllte, wurde der Rotor per Hand angedreht, wodurch bereits die meisten Luftblasen entfernt werden konnten. Unterstützt wurde dieses erste Entlüften durch leichtes Klopfen an den Schläuchen in der Nähe der Anschlüsse. Sobald das Wasser den Auffangbehälter erreicht hatte, wurde die Pumpe auf Stufe 1 zurückgestellt und der Elutriator geschlossen. Die Zentrifuge wurde programmiert (Rotor = 6, Speed = 3000 rpm, Time = 4 h, Temperature = 4 °C) und dann gestartet.

Jetzt wurden restliche Luftblasen aus dem System entfernt. Dazu wurde zunächst der Abflussschlauch abgedrückt (der Druck im System durfte 10 bar auf keinen Fall überschreiten) und dann wieder losgelassen, wodurch weitere Luftblasen entfernt werden konnten. Außerdem wurde die Rotorumdrehungszahl variiert: die Zentrifuge wurde gestoppt, der Schlauch abgedrückt als die Umdrehungszahl bei ca. 1200 rpm war, dann bei ca. 750 rpm wieder losgelassen und umgekehrt. Diese Prozedur wurde so lange wiederholt, bis keine Luftblase mehr aus dem System kam. War das System luftblasenfrei, wurde das destillierte Wasser durch Elutriationspuffer ersetzt, der ebenfalls auf Eis stehen musste. Sollte später während eines Laufes eine Luftblase auftauchen, müsste der Versuch abgebrochen werden.

3.2.3 Eichen der Pumpe

Zum Eichen der Pumpe wurde diese auf exakt 1,00 eingestellt. Der Abflussschlauch wurde in einen mit Wasser ausgespülten 50-ml-Messzylinder gehängt und gewartet, bis der Flüssigkeitsstand die 10-ml-Marke erreicht hatte. Dann wurden genau 2 min abgestoppt und die Flüssigkeitsmenge gemessen. Davon wurden die "vorgelegten" 10 ml abgezogen, das Ergebnis dann protokolliert (ml_I). Dann wurde die Pumpe auf exakt 2,00 gestellt und die Flüssigkeitsmenge nach genau 1 min wie oben gemessen und protokolliert (ml_{II}). Aus diesen Werten konnte dann mit der unten angegebenen Gleichung ermittelt werden, welcher Pumpleistung in ^{ml}/_{min} eine Einheit auf der Pumpenskala entsprochen hat.

$$\left(\frac{ml_{I}}{2} + \frac{ml_{II}}{2}\right) \div 2 = \frac{ml}{\min \cdot Skaleneinheit}$$

Mit diesem Wert konnten jetzt die jeweiligen Pumpeneinstellungen für den Lauf berechnet werden, indem einfach die geforderte Pumpleistung durch diesen ermittelten Wert geteilt wurde.

3.2.4 Durchführung eines Laufes

Pro Lauf konnten die Zellen aus maximal 30 Hoden getrennt werden, weil sonst die Kammer überladen gewesen wäre. Wurden mehr Mäuse präpariert, dann mussten mehrere Läufe durchgeführt werden. In diesem Fall wurde vor jedem weiteren Lauf die Pumpe neu geeicht.

Bei der Gewinnung der verschiedenen Zelltypen durch zentrifugale Elutriation bekommt man keine absolut reinen Zellfraktionen, sondern lediglich Fraktionen, die vorwiegend einen Zelltyp enthalten. Tabelle 3-3 gibt einen Überblick über die einzelnen Fraktionen (siehe unten) mit ihren Bestandteilen.

Fraktion	Hauptbestandteil	Verunreinigung
0	Blutzellen, Spermatider	1 verschiedener Stadien
3	runde Spermatiden	elongierte Spermatiden
4/5	Spermatozyten	Spermatiden
6	Pachytän-Spermatozyten	Spermatiden

Tabelle 3-3: Inhalte der Elutriationsfraktionen

3.2.4.1 Standardlauf

Bevor mit dem Lauf begonnen wurde, wurden geeignete Auffangbehälter für die einzelnen Fraktionen auf Eis (Zentrifugenbecher für den GSA-Rotor) und ein großer Erlenmeyer-Kolben für den Abfall bereitgestellt.

Die Zellsuspension wurde aus dem Kühlraum geholt und der Rotor damit beladen. Dazu wurde die Pumpe so eingestellt, dass sie eine Pumpleistung von 19,8 $^{ml}/_{min}$ hatte (siehe Tabelle 3-4). Die Zentrifuge lief bei 3000 rpm (vgl. Programm unter 3.2.2.2). Der Lauf wurde dann mit den Einstellungen aus Tabelle 3-4 durchgeführt.

Fraktion	rpm	^{ml} / _{min}	Zeit
0	3000	19,8	bis Blasenfalle klar
3	3000	38,0	4 min
4/5	2000	24,8	6 min
6	2000	33,2	4 min

Tabelle 3-4: Einstellungen für Standardlauf.

Fraktion 0 wurde nicht gesammelt, sondern gleich ins Abfallgefäß geleitet. Beim Wechsel zwischen den Fraktionen war zu beachten, dass, wenn die Pumpleistung erhöht wurde, zuerst der Auslassschlauch in das neue Auffanggefäß überführt wurde, bevor die Pumpe verstellt worden ist. Genauso verfahren wurde bei Verminderung der Rotorumdrehungszahl. Beim Übergang zwischen Fraktion 3 und Fraktion 4/5 wurde zuerst die Pumpe verstellt, dann der Schlauch überführt und erst zum Schluss die Umdrehungszahl der Zentrifuge geändert.

3.2.4.2 Verkürztes Protokoll zur Gewinnung einer Fraktion mit angereicherten Keimzellen aller Entwicklungsstadien

Für Bindungsassays zur Identifikation putativer Bindungspartner von Lamin B3 in Keimzellen (siehe 3.4.13) wurde ein verkürztes Elutriationsprotokoll (siehe Tabelle 3-5) verwendet, das lediglich den größten Teil der im Hoden vorhandenen somatischen Zellen abtrennt. Man erhält Keimzellen aller Entwicklungsstadien, lediglich die Spermatiden, die weit fortgeschritten in der Spermiogenese sind, gehen dabei teilweise verloren.

Der Anfang des Protokolls ist identisch mit dem des Standardlaufes, der Rotor wird mit der Zellsuspension bei folgenden Einstellungen beladen: Pumpleistung bei $19.8 \text{ }^{\text{ml}}/_{\text{min}}$ und

Geschwindigkeit der Zentrifuge bei 3000 rpm. Der Lauf wurde dann mit den in Tabelle 3-5 angegebenen Werten durchgeführt.

Fraktion	rpm	^{ml} / _{min}	Zeit
0	3000	19,8	bis Blasenfalle klar
3-6	2000	33,2	6 min

Tabelle 3-5: Verkürztes Elutriationsprotokoll.

Beim Wechsel von Fraktion 0 auf Fraktion 3-6 wurde zunächst der Schlauch ins neue Auffanggefäß überführt, bevor die Einstellungen an Pumpe und Zentrifuge verändert worden sind.

3.2.5 Weiterverarbeitung der Zellen

Die gewonnenen Fraktionen wurden bei 450 g und 4 °C 10 min abzentrifugiert (Sorvall mit GSA-Rotor bei ca. 1600 rpm). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in insgesamt 10 ml kaltem PBS resuspendiert und die Suspension dann in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen noch 2-mal mit je 10 ml kaltem PBS gewaschen. Vor der abschließenden Zentrifugation wurden noch die Zellzahlen der einzelnen Fraktionen bestimmt.

3.2.5.1 Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde aus jeder Fraktion eine Probe entnommen (Suspension muss gut vermischt sein) und 1:5 in PBS verdünnt. Die Auszählung erfolgte dann mikroskopisch mit einer Neubauer-Zählkammer. Im Mittelsteg dieser Kammer sind Zählnetze eingraviert. Diese bestehen aus vier Großquadraten, die jeweils in 16 Kleinquadrate unterteilt sind. Der Abstand zwischen dem gravierten Glassteg und dem aufgelegten eingeschliffenen Deckglas beträgt 0,1 mm. Die Fläche eines Großquadrates beträgt 1 mm², somit beträgt das Volumen eines Großquadrates 0,1 µl. Es wurden stets vier Großquadrate ausgezählt, wobei darauf zu achten war, dass Zellen, die auf den Begrenzungslinien zwischen den Quadraten lagen, nicht doppelt gezählt wurden. Aus der Anzahl der gezählten Zellen konnte die Zellzahl im Gesamtvolumen mit folgender Gleichung ermittelt werden.

$$16 \cdot \frac{\emptyset Zellzahl}{Kleinquadrat} \cdot 10^4 \cdot Verdünnungsfaktor \cdot Ausgangsvolumen = Gesamtzellzahl$$

3.2.5.2 Gewinnung von RNA aus durch Elutriation angereicherter Zellen

Für die Gewinnung von RNA aus den Zellen wurde die Suspension nach dem Zählen 10 min bei 450 g und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet schließlich in ca. 1 ml TriFast[™] pro 10⁷ Zellen aufgenommen (siehe 3.3.1).

3.2.5.3 Western-Blot-Analyse durch Elutriation angereicherter Zellen

Auch bei der Präparation der Zellen für die Analyse im Western Blot wurde die Suspension zunächst 10 min bei 450 g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dann so in SDS-Probenpuffer (siehe 3.4.1.1) aufgenommen, dass idealerweise $1 \cdot 10^5$ Zellen in 1 µl enthalten waren. Die Zellen bzw. die darin enthaltenen Proteine wurden durch Inkubation bei 95 °C vollständig im Probenpuffer gelöst. Danach wurden sie bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.2.6 Reinigung des Rotors

Wenn alle Läufe durchgeführt waren, wurde zunächst das Zellpellet, das sich während des Versuches am Kammerboden gebildet hatte, herausgespült. Dazu wurde die Zentrifuge gestoppt, bei ca. 1200 rpm der Abflussschlauch abgedrückt und bei ca. 750 rpm wieder losgelassen. Durch diese Prozedur wurde das Pellet herausgeschwemmt. Die Zentrifuge konnte abgeschaltet werden. Das System wurde mit 0,5-1 l Seifenlösung (3-4 ml flüssige Handseife pro Liter Wasser) und anschließend mit etwa 1 l destilliertem Wasser gespült. Zum Schluss wurde noch mit 200-500 ml 70%igem Ethanol nachgespült.

Danach wurden die Schläuche gelöst, der Rotor entnommen und wieder auseinandergebaut, damit er gut austrocknen konnte. Zuerst wurde der "Bearing Assembler" abgebaut und zerlegt, dann die Kammern entnommen. Die Rotorachse wurde nicht entfernt. Die Zentrifuge wurde über Nacht zum Austrocknen offen gelassen, ebenso wurden Rotor und Rotorteile erst am nächsten Tag wieder verpackt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben

Lösungen:

- peqGOLD TriFast[™] (Phenolreagenz zur Isolierung von DNA, RNA und Proteinen)
- Chloroform (frei von Zusätzen wie Isoamylalkohol)
- Isopropanol (p.a.)
- Ethanol (p.a., 75 %)
- PBS (pH 7,4; siehe 3.2)
- DEPC-H₂O (H₂O bidest. mit 0,1 % DEPC versetzen und nach kurzer Inkubationszeit autoklavieren)

peqGOLD TriFast[™] ist ein gebrauchsfertiges Reagenz, das die gleichzeitige Isolierung von RNA, DNA und Proteinen aus vielerlei Materialien ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Reagenz ausschließlich zur RNA-Isolierung aus Kulturzellen, verschiedenen Geweben und Zellen der Keimbahn der Maus verwendet. Die Durchführung erfolgte weitestgehend nach den Angaben im Herstellerprotokoll.

Um RNA aus Kulturzellen zu isolieren, wurden diese im Monolayer kultiviert, wobei die relative Ausbeute an mRNA höher ist, wenn die Zellen noch nicht konfluent sind (sie bilden noch keine geschlossene Zellschicht auf dem Schalenboden), da in diesem Zustand die Expression bestimmter Gene stark heruntergeregelt wird. Das Kulturmedium wurde abgenommen und verworfen. Dann wurde peqGOLD TriFastTM auf die Zellen gegeben (Faustregel: 500 µl bei einer Schale mit Ø 35-50 mm, 1 ml bei einer Schale mit Ø 100 mm und 1,5-2 ml bei einer Schale mit Ø 150 mm), die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren lysiert und vom Schalenboden gelöst. Das Zelllysat wurde anschließend in ein Eppendorf-Gefäß überführt und wie im Kurzprotokoll beschrieben weiterverarbeitet.

Für die Gewinnung von RNA aus den unter 3.2 oder 3.4.12.2 gewonnenen Zellsuspensionen wurde pro 10⁷ Zellen 1 ml TriFast[™] zum Pellet gegeben und die Zellen darin resuspendiert.

Bei der RNA-Isolierung aus Geweben wurde ein etwa 100 mg schweres Gewebestückchen zunächst mit einem Skalpell fein zerkleinert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Das zerkleinerte Gewebe wurde anschließend in 1 ml TriFast[™] mit Hilfe eines Eppendorf-Teflon-Homogenisators homogenisiert. Anschließendes Auf- und Abpipettieren verbesserte zusätzlich die Lyse.

- *Kurzprotokoll:* 1. 100 mg Hodengewebe oder ca. 10⁷ Zellen wurden in 1 ml TriFast[™] aufgenommen und homogenisiert. Die Proben wurden 5 min bei RT inkubiert.
 - Zugabe von 200 µl Chloroform pro eingesetztem Milliliter TriFast[™]. Die Proben für 15 sek kräftig schütteln und danach 3-10 min bei RT stehen lassen. Anschließend 5 min bei 12000 g zentrifugieren. Die obere wässrige Phase in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführen.
 - Zugabe von 600 µl Isopropanol pro eingesetztem Milliliter TriFast[™]. Die Proben mischen und f
 ür 5-15 min bei RT inkubieren. Anschlie
 ßend 10 min bei 12000 g zentrifugieren.
 - Überstand abnehmen und verwerfen, das Pellet 2-mal in 75 % Ethanol waschen. Bei den Waschschritten wurde jeweils 10 min bei 12000 g zentrifugiert.
 - 5. Lösen der RNA in DEPC-H₂O.

Wenn die RNA sofort weiter verwendet wurde, z.B. für eine RT-PCR, dann wurde die Gesamtmenge fotometrisch bestimmt (siehe 3.3.2), die benötigte Menge abgenommen und verarbeitet, der Rest wurde bei -20 °C aufbewahrt. Für eine längerfristige Aufbewahrung (länger als 3-4 Wochen) wurde die RNA-Lösung wieder gefällt (mit Na-Acetat und Ethanol, siehe 3.3.14) und in 70 % Ethanol bei

-20 °C aufbewahrt. Wurde die isolierte RNA nicht sofort weiterverarbeitet, dann wurde das Kurzprotokoll nur bis zum ersten Waschschritt durchgeführt und die RNA in 75 % Ethanol bei -20 °C aufbewahrt.

3.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (DNA und RNA)

Die Konzentrationsbestimmung der gewonnenen RNA wurde mit Hilfe einer fotometrischen Absorptionsmessung durchgeführt. Die RNA wurde, 1:60 verdünnt in H₂O bidest., gegen einen entsprechenden Leerwert bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine Absorption von 1 OD entspricht etwa 40^{µg}/_{ml} RNA. Mit dem Verhältnis der optischen Dichte bei 260 bzw. 280 nm ließ sich die Reinheit der Nukleinsäure abschätzen, da Proteine bei 280 nm absorbieren. Reine RNA sollte eine Ratio von ca. 2,0 besitzen. Die Absorption bei 230 nm spiegelt Verunreinigung durch Kohlenhydrate, Peptide, Phenol oder andere aromatische Verbindungen wider. Der Quotient OD₂₃₀/OD₂₈₀ sollte bei reinen Proben bei ca. 2,2 liegen. Die Messwerte der isolierten RNAs lagen stets im Rahmen der angestrebten Ratio.

Auch die Konzentrationen von dsDNA, also Plasmiden, oder aus dem Gel eluierter DNA-Fragmente wurden fotometrisch bestimmt. Die Messungen wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt. Die Absorption von 1 OD entspricht bei dsDNA ca. 50 $^{\mu g}/_{ml}$. Reine DNA sollte ein Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ von ca. 1,8 besitzen.

Tabelle 3-6: Bestimmung von Nukleinsäurekonzentration und -reinheit.			
	OD ₂₆₀ = 1 entspricht	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ ≥	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀ ≥
dsDNA	$50 \ ^{\mu g}/_{ml}$	1,8	2,2
ssDNA	$37 ^{\mu\text{g}}\text{/}_{ml}$	1,8	2,2
RNA	$40 \ ^{\mu g}\!/_{ml}$	2,0	2,2
Oligonukleotide	$30 \ ^{\mu g}\!/_{ml}$	1,8	2,2

3.3.3 **RT-PCR** (Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion)

3.3.3.1 Reverse Transkription

Die RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) gliedert sich in zwei Abschnitte. Zunächst wird RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in DNA übersetzt. Da mRNA nur aus Exons besteht, unterscheidet sich die bei dieser Prozedur entstehende DNA von der im Genom des Organismus, aus dem die RNA isoliert wurde. Man nennt die entstandene DNA cDNA, wobei das c für "complementary" steht. Man nutzt diese Technik beispielsweise für die Klonierung unbekannter cDNA-Sequenzen, indem man zunächst die isolierte Gesamt-RNA in cDNA umschreibt und dann mit spezifischen Primern (die Sequenzen können z.B. aus dem entsprechenden Gen eines verwandten Organismus stammen) die gesuchte cDNA amplifiziert.

Pipettierschema für eine RT-Reaktion (20 µl):

RNA (1 μ g) mit sterilem, bidest. Wasser auf 12 μ l auffüllen, 3 min bei 70 °C im Thermocycler denaturieren und bis auf 40 °C abkühlen lassen, dann:

+ 1 μl RNase-Inhibitor (MBI)	$40 \text{ U/}_{\mu l}$
+ 4 μl RT-Puffer (Promega)	10x
+ 1 µl dNTPs (MBI)	10 mM je Nukleotid
+ 1 µl Oligo(dT) Primer (MBI)	$500 ^{\mu\text{g}}\text{/}_{ml}$
+ 1 μl Reverse Transkriptase MMULV (Promega)	$200 \text{ U/}_{\mu l}$

Durch Auf- und Abpipettieren gut mischen und im Thermocycler 1 h bei 37 °C inkubieren, 5 min bei 95 °C hitzeinaktivieren und schließlich bei 4 °C kühlen. Aus einem RT-Ansatz wurden 2 µl in eine sich anschließende PCR eingesetzt. Der RT-Ansatz konnte mehrere Wochen stabil bei 4 °C gelagert werden, um für weitere PCR-Reaktionen verwendet zu werden.

3.3.3.2 PCR (polymerase chain reaction)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ermöglicht eine selektive Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Sie basiert auf der Tatsache, dass ein DNA-Doppelstrang bei Erhitzung "schmilzt", d.h., dass sich die beiden Einzelstränge voneinander lösen. Mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase lassen sich die entstandenen Einzelstränge verdoppeln. Dafür benötigt die Polymerase Primer, die die Zielsequenz umrahmen und deoxy-Nukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Man benötigt also zumindest Kenntnis über Teile der Sequenz, oder aber ähnliche Sequenzen, aus der sich die erforderlichen Primer ableiten lassen.

Primer und Primerdesign:

Der Erfolg einer PCR hängt sehr stark von den verwendeten Primern ab, die bestimmte Eigenschaften besitzen sollten. Sie sollten nicht mit sich selbst oder dem anderen Primer hybridisieren können, sie sollten keine Schleifen bilden können und wenn möglich sollte ihre komplementäre Sequenz nur einmal auf der eingesetzten DNA vorkommen. Außerdem sollten die Schmelztemperaturen der beiden verwendeten Primer etwa gleich hoch sein und der G/C-Gehalt ihrer Sequenzen zwischen 40 und 60 % liegen. Die Schmelztemperatur gibt an, bei wieviel Grad Celsius die Hälfte dieser komplementären Sequenzen als Doppelstrang vorliegen. Diese Temperatur kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$T_m = 2 \circ C \cdot (A+T) + (G+C)$$

Die PCR-Reaktion ist umso spezifischer, je näher die Annealing-Temperatur bei der Schmelztemperatur der beiden Primer liegt. Die Annealing-Temperatur wurde anfangs meist ca. 5 °C unter T_m gewählt und bei suboptimalen Ergebnissen nach oben (unspezifische Amplifikation, erkennbar als "Schmier" bei der Gelelektrophorese) oder unten (kein Amplifikationsprodukt) variiert. Die Primer wurden teilweise mit Hilfe des Programms "Fast PCR, Microsoft Visual Studio 6.0 SP5, 2002" am Computer entworfen und von Thermo Electron (früher Interactiva) oder biomers (beide Ulm) bezogen.

Durchführung der PCR Reaktion

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde entweder Tfl-Polymerase, die aus *Thermus flavus* isoliert und von Promega bezogen wurde, oder Taq-Polymerase, die ursprünglich aus dem Organismus *Thermophilus aquaticus* stammt, benutzt. Die Taq-Polymerase wurde entweder von der AG Seibel im Lehrstuhl selbst hergestellt bzw. von der Firma Promega (Mannheim) bezogen. Taq-Polymerase hat wie Tfl-Polymerase die Eigenschaft, dass sie einen Überhang aus A-Nukleotiden am 3'-Ende des Produkts anfügt. Diese Polymerase besitzt keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität (Fehlerkorrektur) und kann während der Elongationsphase ca. 1000 Nukleotide pro Minute verarbeiten.

Sollten die DNA-Fragmente mit sehr hoher Genauigkeit amplifiziert werden (für die Klonierung in Expressionsvektoren oder bei der Generierung von Punktmutationen) wurde Pfu-Polymerase (Promega/AG Seibel) herangezogen. Diese Polymerase hängt keine überhängenden A-Nukleotide am 3'-Ende des Produkts an, besitzt aber 3'-5'-Exonuklease- und eine "Proof-reading"-Aktivität. Die Pfu-Polymerase kann während der Elongationsphase lediglich 500 Nukleotide pro Minute verarbeiten. Dieser Wert muss bei der Bestimmung der Elongationszeit einer PCR berücksichtigt werden.

Pipettierschema für Taq-Polymerase (50-µl-PCR-Ansatz):

- Template-DNA (10-100 ng Plasmid-DNA, 1-2 µl RT-Reaktion oder 0,4 4 µg gen. DNA)
- 3 µl MgCl₂ (25 mM)
- 5 µl Taq-DNA-Polymerase 10x Reaction Buffer
- 1 µl dNTPs (Mix, SL je Nukleotid 10 mM, MBI)
- 1 μ l 5'-Primer (SL 100 ^{pmol}/_{μ l}, Thermo/biomers)
- 1 μ l 3'-Primer (SL 100 ^{pmol}/_{μ l}, Thermo/biomers)
- 1 μ l Taq-DNA-Polymerase (5 ^U/_{μ l}, Promega/AG Seibel)
- auf 50 μ l mit H₂O bidest. auffüllen

Pipettierschema für Pfu-Polymerase (50-µl-PCR-Ansatz):

- 10-100 ng DNA
- 5µl Pfu-DNA-Polymerase 10x Reaction Buffer mit MgSO₄ (Promega/AG Seibel)
- 1 µl dNTPs (Mix, SL je Nukleotid 10 mM, MBI)
- 1 μ l 5'-Primer (SL 100 ^{pmol}/_{μ l}, Thermo/biomers)
- 1 μ l 3'-Primer (SL 100 ^{pmol}/_{μ l}, Thermo/biomers)
- 1 µl Pfu-DNA-Polymerase (2-3 ^U/_{µl}, Promega/AG Seibel)
- auf 50 μ l mit H₂O bidest. auffüllen

Der Ansatz wurde in ein 0,5-ml-PCR-Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert, wobei die Polymerase zum Schluss zugegeben wurde. Das Ganze wurde gut vermischt und im Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert:

•	Initiale Denaturierung	2 min 94 °C	
•	Denaturierung	30 sek 94 °C	
•	Annealing	30 sek (Temperatur je nach verwendetem Primer)	20 20 Zuklan
•	Elongation	1 min pro 1000 Basen (Zeit aufrunden!) bei Taq 72 °C	7 20-30 Zykieli
		1 min pro 500 Basen (Zeit aufrunden!) bei Pfu 72 °C	
•	Finale Elongation	10' 72 °C	
•	Kühlung	∞4 °C	

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte im 1%igen Agarosegel (siehe 3.3.11).

3.3.4 PCR mit genomischer DNA

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus genomischer DNA unterscheidet sich vor allem dadurch von PCR-Reaktionen mit anderen Templates, dass man deutlich mehr Template-DNA einsetzen muss (4-8 μ g). Das liegt daran, dass das gewünschte Gen in deutlich geringerer Kopienzahl je μ g DNA vorliegt als beispielsweise bei Plasmid-DNA.

So enthalten 100 ng Plasmid DNA bei einer Plasmid-Größe von 3 kb etwa 33 Milliarden Kopien. Geht man von einer durchschnittlichen DNA-Menge von 6 µg pro Zelle aus, dann sind bei nicht repetitiven Genen in 6 µg nur 2 Kopien vorhanden. Mit folgender Formel kann man die Anzahl der vorhandenen Basen aus der DNA-Masse berechnen:

$$n = m \cdot 9,869 \cdot 10^{20} bp/g$$

n = Anzahl bp

m = DNA-Masse in g

Das durchschnittliche molekulare Gewicht eines Basenpaares beträgt 610 ^g/_{mol}. Um die DNA-Masse aus der Anzahl der Basenpaare zu berechnen, benutzt man diese Formel:

$$m = n \cdot 1,013 \cdot 10^{-21} \text{ g/bp}$$

m = DNA-Masse in g n = Anzahl bp
3.3.5 Kolonie-PCR

Nach der Klonierung von DNA-Fragmenten in bakterielle Vektoren wurden die erhaltenen Klone u.a. durch Kolonie-PCR auf eine erfolgreiche Ligation hin überprüft. Außerdem war es möglich, die Orientierung, in der das einklonierte DNA-Fragment in den Vektor inseriert hatte, herauszufinden. Für die PCR wurde statt isolierter DNA etwas Bakterienmaterial als "Template" eingesetzt und mit geeigneten Primern überprüft, ob das Insert im Vektor war (5'- und 3'-Primer binden innerhalb der inserierten Sequenz oder an Sequenzbereiche des Vektors, die vor und hinter dem Insert liegen) bzw. in welcher Orientierung es inseriert hatte (5'-Primer bindet im Vektor, 3'-Primer am 3'-Ende des Inserts, oder umgekehrt). Hierfür wurde eine von der AG Seibel hergestellte Taq-DNA-Polymerase verwendet.

Pipettierschema für Kolonie-PCR (25 µl-PCR-Ansatz):

- 1,5 µl MgCl₂ (25 mM)
- 2,5 µl Taq-DNA-Polymerase 10x Reaktionspuffer
- 0,5 µl dNTPs (Mix, SL je Nukleotid 10 mM, MBI)
- 0,25 μ l 5'-Primer (SL 10 ^{pmol}/_{μ l}, Thermo/biomers)
- 0,25 μ l 3'-Primer (SL 10 ^{pmol}/_{μ l}, Thermo/biomers)
- 0,5 μ l Taq-DNA-Polymerase (5 ^U/_{μ l}, AG Seibel)
- auf 25 μ l mit H₂O bidest. auffüllen

Durchführung:

Zunächst wurde je nach Anzahl der zu testenden Klone ein "Master-Mix" des 25-µl-PCR-Ansatzes pipettiert, der auf PCR-Reaktionsgefäße verteilt wurde. Die zu testende Bakterienkolonie wurde von einer Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt. Mit der Pipettenspitze wurde ein Teil des Bakterienmaterials auf eine neue Replika-Agarplatte übertragen, die man bei 37 °C inkubierte, um am Abend eine Übernachtkultur animpfen zu können (siehe 3.1.1). Der Rest des Bakterienmaterials in der Pipettenspitze wurde mit dem PCR-Ansatz vermischt. Programm für den Thermocycler: siehe 3.3.3.2.

3.3.6 Gerichtete Mutagenese mit Hilfe der PCR

3.3.6.1 Endständige Mutationen (Punkt- oder Deletionsmutationen am 5'- oder 3'-Ende einer cDNA)

Mutationen, die am Anfang oder am Ende einer cDNA-Sequenz liegen, können einfach über einen 5'bzw. 3'-Primer eingeführt werden, der das auszutauschende Nukleotid beinhaltet. Auf diese Weise kann z.B. das Stopp-Codon am Ende der cDNA-Sequenz entfernt werden, um ein C-terminales Fusionsprotein exprimieren zu können. Der Basenaustausch funktioniert mit dieser Methode nur ungefähr bis zur Position 15-20 in der DNA-Sequenz, sonst werden die Primer zu lang und die PCR funktioniert nicht mehr. Außerdem ist darauf zu achten, dass der Basenaustausch nicht die letzte Base des Primers am 3'-Ende betrifft, da diese Falschpaarung sonst von der Pfu-Polymerase durch ihre Proof-Reading-Fähigkeit erkannt und die damit verbundene 3'-5'-Exonukleaseaktivität "ausgebessert" werden würde – die Mutation würde korrigiert werden. Es sollten mindestens 2-3 korrekt paarende Nukleotide als Puffer hinter der Mutation liegen, um diese Korrektur durch die Polymerase zu verhindern.

Endständige Deletionen werden ebenso über geeignete Primer, die an der gewünschten Position innerhalb der cDNA-Sequenz binden, eingeführt.

Mit den Primern können auch über "Überhänge" geeignete Restriktions-Schnittstellen eingeführt werden, die eine folgende Klonierung des über die PCR gewonnenen Fragments ermöglichen oder erleichtern. Solche Überhänge in der Primer-Sequenz sollten nicht mehr als 60 % der Gesamtlänge des Primers ausmachen und mehr als 15 Nukleotide sind kaum möglich. Zur Klonierung von DNA-Fragmenten oder PCR-Produkten siehe 3.3.16 bzw. 3.3.15. Bei Überhängen ist außerdem darauf zu achten, dass bei der PCR die Annealing-Temperatur in den ersten 2-3 Zyklen nicht an die T_m des gesamten Primers angepasst, sondern lediglich über den komplementären Bereich ohne Überhang ermittelt wird.

3.3.6.2 Interne Mutationen (Deletionen oder Insertionen)

Zum Einfügen einer internen Deletion benötigt man ein Primerpaar, das die geplante Deletion flankiert, und zwar so, dass der 5'-Primer am 3'Ende der Deletion, und der 3'-Primer am 5'-Ende der Deletion bindet. Bei der PCR, die in solchen Fällen ausschließlich mit der Pfu-Polymerase (Promega) durchgeführt wurden, wird dann das gesamte Plasmid inklusive des Inserts amplifiziert mit Ausnahme der Nukleotide, die innerhalb des Bereiches der gewünschten Deletion liegen. Man erhält somit ein relativ langes, lineares DNA-Molekül. Dieses wird schließlich über eine Ligation (siehe 3.3.16.3) zu einem ringförmigen Plasmid geschlossen und dann in *E. coli* XL1-blue bzw. XL10-gold transformiert (siehe 3.1.6). Die Ligase benötigt für die Verknüpfung zweier freier DNA-Enden phosphorylierte 5'-Enden, die bei einem PCR-Produkt aber normalerweise nicht vorliegen. Diese erhält man durch die Verwendung von Primern, die eine Phosphat-Gruppe an ihrem 5'-Ende tragen (siehe unten), oder durch eine Kinasierung des PCR-Produktes (Durchführung entspricht der einer Primerkinasierung).

Durchführung:

Die phosphorylierten 5'-Enden für die spätere Ligation des PCR-Produktes wurden fast ausschließlich über die Verwendung phosphorylierter Primer eingeführt.

Protokoll für Phosphorylierung der Primer (20 µl):

- 1 µl Primer (100 pmol)
- 2 µl T4 DNA Ligasepuffer (10x, MBI)
- 2 µl rATP (25 mM, Stratagene)
- 2 μ l T4-Polynukleotidkinase (10 ^U/_{μ l}, MBI)
- 13 μ l H₂O bidest.

Der Ansatz wurde gemischt und 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kinase 15 min bei 68 °C hitzeinaktiviert. Nach der Hitzeinaktivierung wurde der Ansatz bis zur Verwendung bei 4 °C gekühlt. Primer wurden vor einer Mutagenese-PCR immer frisch phosphoryliert. Aus einem Phosphorylierungsansatz wurden jeweils direkt 2,5 μ l (entspricht etwa 12,5 pmol) für eine Mutagenese-PCR eingesetzt (Durchführung einer PCR mit Pfu-Polymerase: siehe 3.3.3.2).

Im Anschluss an die PCR wurde die Template-DNA durch Zugabe von 1 µl des Restriktionsenzyms DpnI verdaut. Nach einer Inkubation für 1 h bei 37 °C wurde das Restriktionsenzym bei 80 °C für 15 min hitzeinaktiviert. DpnI hat die Eigenschaft, nur methylierte und hemimethylierte DNA zu schneiden. DNA, die aus den verwendeten Bakterienstämmen (*E. coli* XL1-blue, XL10-gold und TOP10) isoliert wird, ist immer methyliert und kann so von DpnI geschnitten werden. Ein PCR-Produkt trägt keine Methylgruppen und wird demnach nicht verdaut. Durch diesen Verdau der Ausgangs-DNA wird die Anzahl der falschpositiven Klone stark reduziert, was die Identifikation der Klone, die ein Plasmid mit der gewünschten Mutation tragen, erleichtert.

Der gesamte Ansatz wurde im 1%igen Agarosegel (siehe 3.3.11) analysiert und das PCR-Produkt aus dem Gel eluiert (siehe 3.3.12). Anschließend erfolgte die Ligation (siehe 3.3.16.3), wobei 17 µl der Gelextraktion eingesetzt wurden. Bei geringeren DNA-Mengen erfolgte die Ligation grundsätzlich über Nacht bei 16 °C. Der Ligationsansatz wurde dann wie unter 3.1.6 beschrieben in Bakterien transformiert.

Im Folgenden wurden 4-6 Klone mit Hilfe von PCR, Restriktionsverdau (siehe 3.3.7) oder Sequenzierung (siehe 3.3.19) auf die Mutation hin analysiert. Positive Klone wurden im Bereich des Inserts komplett durchsequenziert, um PCR-Fehler ausschließen zu können. Außerdem wurden positive Klone sicherheitshalber in "frische" Plasmide umkloniert (Umklonierung: siehe 3.3.16), um Fehler innerhalb der Vektorsequenz durch die PCR auszuschließen.

3.3.7 Restriktionsverdau

Restriktionsverdaus wurden durchgeführt zur Umklonierung von DNA-Fragmenten, zur Linearisierung von Vektoren und zur Analyse von Klonen, um festzustellen, ob ein Insert in den Vektor ligiert hatte und eventuell, um die Orientierung des Inserts im Vektor zu bestimmen.

Für solche Verdaue benötigt man Restriktionsenzyme (genauer: Restriktionsendonukleasen). Diese schneiden DNA an definierten Sequenzen. Man unterscheidet Restriktionsenzyme vom Typ I, II und III. In der Molekularbiologie werden meistens Vertreter des Typs II, sog. Nukleasen, und dort speziell die Endonukleasen verwendet, die jeweils eine spezifische Nukleotidsequenz erkennen und innerhalb des DNA-Stranges darin schneiden. Dabei können je nach verwendetem Restriktionsenzym glatte (blunt) oder kohäsive (sticky) Enden entstehen. Schnittstellen mit überhängenden Enden können effizient mit komplementären Enden ligiert werden, die mit demselben Enzym geschnitten wurden, was man sich auch bei der Umklonierung von DNA-Fragmenten zu Nutze machen kann.

Standardansatz für einen Restriktionsverdau (20 µl):

- 1-2 µg Plasmid-DNA
- 2 µl 10x Puffer (MBI, passend zum verwendeten Enzym)
- H_2O bidest. bis zu einem Volumen von 19 µl
- 1 µl Restriktionsenzym (MBI)

Der Ansatz wurde gemischt und 1-2 h bei 37 °C (Temperatur ist abhängig vom verwendeten Enzym!) inkkubiert. Anschließend wurden 4 μ l 6x DNA-Beladungspuffer zugegeben und der Verdau im 1% igen Agarosegel analysiert (siehe 3.3.11).

Wurde die verdaute DNA für Folgeversuche benötigt, erfolgte vor der Gelelektrophorese je nach Enzym ein Inaktivierungsschritt bei 65-85 °C für 15 min.

3.3.8 Verdau von PCR-Produkten

Die PCR ermöglicht das Anhängen von Restriktionsstellen an das 5'- und 3'-Ende des PCR-Produkts. Damit diese Schnittstellen erkannt und geschnitten werden können, müssen sie einen Überhang von einer oder mehreren Basen besitzen. Die Mindestanzahl der Basen in diesem Überhang ist dabei abhängig vom verwendeten Enzym. Entsprechende Tabellen finden sich im Katalog von MBI oder auf http://www.fermentas.com/techinfo/re/restrdigpcrii.htm.

Die in dieser Arbeit am häufigsten verwendeten Schnittstellen benötigen meist nur 1 Base Überhang, standardmäßig wurden jedoch immer mindestens 3-4 Basen angehängt.

Das PCR-Produkt kann entweder direkt verdaut werden durch Zugabe des Restriktionsenzyms zum PCR-Ansatz (falls die Pufferzusammensetzung es zulässt), oder nach einem Reinigungsschritt (siehe auch 3.3.13) über einen normalen Restriktionsverdau (siehe 3.3.7).

3.3.9 Herstellung glatter (blunt) Enden durch Auffüllen von 5'-Überhängen oder Entfernung von 3'-Überhängen

Das große Fragment der *E.coli*-DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) ermöglicht es durch seine 5'-3'-Polymerase-Aktivität den zum 5'-Überhang komplementären Strang aufzufüllen, oder einen 3'-Überhang durch seine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität zu entfernen. Dadurch erhält man "glatte" Enden für eine blunt-Ligation.

Standard-Ansatz (20 µl):

- 100 ng bis 4 µg DNA
- 2 µl 10x Klenow-Puffer (MBI)
- 0,5 µl dNTPs (Mix, SL je Nukleotid 10 mM, MBI)
- 0,5 µl Klenow-Enzym (10 U/µl, MBI)
- mit H_2O bidest. auf 20 µl auffüllen

Durchführung:

Der Ansatz wurde gemischt, 15 min bei 37 °C inkubiert und 10 min bei 70 °C hitzeinaktiviert. Anschließend wurde die DNA über ein Agarosegel aufgetrennt und durch Gelextraktion wieder gewonnen. Alternativ zum Klenow-Fragment kann man die Überhänge auch unter Verwendung der Pfu-Polymerase "glätten", die ebenfalls 5'-3'-Polymerase- und 3'-5'-Exonuklease-Aktivität besitzt. Der Ansatz muss dann an die Polymerase angepasst werden (siehe 3.3.3.2) und bei 72 °C inkubiert werden. Hitzeinaktivierung ist nicht möglich, aber das Enzym kann durch Gelextraktion (siehe 3.3.12) oder andere Reinigungsschritte entfernt werden (siehe 3.3.13).

3.3.10 Beladungspuffer für die DNA-Gelelektrophorese

Neben dem herkömmlichen DNA-Beladungspuffer mit Bromphenolblau und Xylencyanol wurde häufig ein Puffer mit Orange G verwendet. Viele der analysierten cDNAs haben eine Länge zwischen 300 und 500 Basenpaaren und laufen somit genau im gleichen Bereich des Gels wie Bromphenolblau (läuft bei ~300 bp im 1%igen Agarosegel). Das ist störend beim Fotografieren der Gele oder bei einer Gelextraktion. Anstelle des Bromphenolblaus wurde deshalb Orange G verwendet, das etwa auf der Höhe von 50 Basenpaaren läuft. Es kann gut zur Markierung der Lauffront eingesetzt werden. Xylencyanol FF läuft auf einer Höhe von ca. 4000 bp. Tabelle 3-7 zeigt eine Übersicht über verschiedene Laufpuffer, die entsprechend der aufgetrennten Fragmentlängen beliebig eingesetzt werden können. Lösungen:

• 6x DNA-Beladungspuffer: 60 % Glycerin

30 % 0,2 M EDTA

10 % H₂O bidest.

- 4 % Orange G in 6x DNA-Beladungspuffer
- 1 % Bromphenolblau in 6x DNA-Beladungspuffer
- 2 % Xylencyanol in 6x DNA-Beladungspuffer

Tabelle 3-7:	Zusammensetzung	der verschiedenen	6x DNA-Bela	dungspuffer.

für je 1 ml	6x Ultra Fast	6x Fast	6x Slow	6x Slow/ Ultra Fast	6x Slow/Fast
6x Beladungspuffer	950 µl	910 µl	955 µl	865 µl	865 µl
Orange G (4 %)	50 µl	-	-	50 µl	-
Bromphenolblau (1 %)	-	90 µl	-	-	90 µl
Xylencyanol FF (2 %)	-	-	45 µl	25 µl	45 µl

3.3.11 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren besitzen wegen der vielen Phosphatgruppen eine negative Nettoladung. Bringt man sie in ein elektrisches Feld, dann wandern sie zur positiv geladenen Anode. Als Matrix für diese Wanderung wird im Allgemeinen ein Agarosegel verwendet, durch das die Nukleinsäuren ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Durch die Agarose können kleinere Nukleinsäure-Fragmente schneller wandern als größere. Die Trennschärfe hängt von der Agarose-Konzentration im Gel ab (vgl. Tabelle 3-8). Diese sollte dem Größenbereich der erwarteten Fragmente angepasst werden.

Lösungen:

- 10x TBE (pH 8,2): 890 mM Tris/HCl
 890 mM Borsäure
 20 mM EDTA
- 6x DNA-Probenpuffer (siehe 3.3.10)
- Laufpuffer (1x TBE)
- Ethidiumbromid-Stammlösung (10^{mg}/_{ml})

Tabelle 3-8: Abhängigkeit des Trennbereiches von der Agarosekonzentration.

% Agarose	optimaler Trennbereich
0,3	5-60 kb
0,6	1-20 kb
0,7	0,8-10 kb
0,9	0,5-7 kb
1,2	0,4-6 kb
1,5	0,2-3 kb
2,0	0,1-2 kb

Durchführung:

Für ein 1% iges Gel wurden 0,4 g Agarose (low EEO, Applichem oder PEQLAB) in 40 ml 1x TBE gelöst und aufgekocht. Nachdem die Lösung auf etwa 50 °C abgekühlt war, wurde 1 μ l der



Abb.3-5:DNA-MarkerIII im 1%igenAgarosegel.Größen-angaben in bp.

Ethidiumbromid-Stammlösung zugegeben. Die Lösung wurde gut gemischt und in einen Gelschlitten mit eingestecktem Kamm gegossen, der mit Tesafilm abgedichtet worden war. Nach ca. 30 min war das Gel vollständig ausgehärtet und konnte verwendet werden. Das Ethidiumbromid wurde zugegeben, um die DNA-Banden sichtbar zu machen. Es interkaliert in die DNA und erzeugt bei Anregung durch UV-Licht eine orange Fluoreszenz. Das Gel wurde mit dem Gelschlitten in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt und mit Laufpuffer überschichtet. Dann wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen und eventuell vorhandene Luftblasen aus den Taschen entfernt (das Gel sollte vollständig mit Laufpuffer bedeckt sein). Anschließend wurden die zu analysierenden Proben mit einem entsprechenden Volumen 6x Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Um die Größen der aufgetrennten DNA-

Fragmente bestimmen zu können, wurde in einer Spur ein Gemisch aus Fragmenten definierter Größe als Marker mit aufgetragen. Es wurde immer der Marker III (MBI) verwendet, mit EcoRI und HindIII verdaute λ -DNA (vgl. Abbildung 3-5), von dem 1 µg aufgetragen wurde. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt, und wurde beendet, wenn das Bromphenolblau aus dem Probenpuffer etwa $^{2}/_{3}$ des Gels durchlaufen hatte. Die durch das Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden wurden mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und über eine Videokamera mit angeschlossenem Drucker oder mit einer Polaroid-Kamera dokumentiert.

3.3.12 Gelextraktion von DNA-Fragmenten (Qiagen)

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem *QIAquick*[®] *Gel Extraction Kit*[®] der Firma Qiagen durchgeführt. Die gewünschten Banden wurden mit einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend die DNA aus dem Gel eluiert. Vorgegangen wurde dabei nach Herstellerprotokoll, die finale Elution der DNA wurde immer mit 30 µl H₂O bidest. durchgeführt.

Es wurden Agarosen (low EEO) der Firmen Applichem oder PEQLAB verwendet, die eine niedrige Bindungsaffinität zu Nukleinsäuren besitzen, was die Elution der DNA erleichtert und somit höhere Ausbeuten möglich macht. Die eluierte DNA stand sofort ohne weitere Bearbeitungsschritte für Folgeversuche zur Verfügung.

3.3.13 Reinigung von Nukleinsäuren

3.3.13.1 Wizard[®] SV Gel and PCR Cleanup System (Promega)

Neben der Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Gelen ist eine mögliche Anwendung solcher Extraktionskits die direkte Reinigung eines PCR-Produktes oder eines Restriktionsverdaus ohne Gelelektrophorese. Die Gelelektrophorese hat allerdings den Vorteil, dass unerwünschte Nukleinsäurefragmente abgetrennt werden können. Für die direkte Reinigung eines DNA-Fragments (PCR- oder Restriktionsfragment) wurde ausschließlich das *Wizard*[®] *SV Gel and PCR Cleanup System* der Firma Promega verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben im Herstellerprotokoll. Die Reinigung mit Hilfe dieses Kits war verlustarm und lieferte DNA hoher Reinheit, die für weitere Versuche sehr gut geeignet war.

3.3.13.2 Extraktion mit Phenol/Chloroform

Um DNA aus einem Reaktionsansatz zu isolieren, der einen hohen Proteinanteil besaß, wurde zur DNA-Lösung ein Volumenanteil Phenol gegeben, gut gemischt und anschließend zentrifugiert (10 min, 12000 rpm, RT). Die obere, wässrige Phase, in der die DNA gelöst vorliegt, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumenanteil Chloroform versetzt, um das in der wässrigen Phase gelöste Phenol zu entfernen. Nach kräftigem Schütteln und erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde wieder die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, ein zweites Mal mit einem Volumenanteil Chloroform versetzt und analog wie zuvor verfahren. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis kein Phenol mehr in der wässrigen Phase vorhanden war. Die DNA konnte nun aus der wässrigen Lösung durch Natriumacetat/Ethanolfällung (siehe 3.3.14) isoliert werden.

3.3.14 Fällung von Nukleinsäuren (DNA und RNA)

Nukleinsäuren (DNA und RNA) wurden immer mit Natriumacetat und Ethanol gefällt. Dazu wurde der DNA-Lösung zunächst ¹/₁₀ Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,2 und dann 2,5 Volumina 100 % Ethanol (p.a.) zugegeben. Standardmäßig wurden Nukleinsäuren in 100-µl-Ansätzen gefällt, kleinere Ansätze von Verdaus oder Sequenzierungen wurden auf 100 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde gemischt und anschließend 20-30 min bei 12000 g zentrifugiert. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde der Ansatz vor der Zentrifugation 30 min bis über Nacht bei -20 °C inkubiert. Eine Alternative zur Verbesserung der DNA-Präzipitation ist das Durchfrieren des Ansatzes in flüssigem Stickstoff. Vor der anschließenden Zentrifugation musste der Ansatz bei RT aufgetaut werden (eine Zentrifugation des gefrorenen Eppendorf-Gefäßes kann zu dessen Zerbersten führen). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet 2-mal mit 70 % Ethanol gewaschen. Zum Waschen wurde das 70%ige Ethanol auf das Pellet pipettiert und anschließend bei 12000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet schließlich in der gewünschten Menge Puffer gelöst.

Zur Erhöhung der Ausbeute konnte außerdem Glykogen in einer Endkonzentration von 26 $^{\mu g}/_{ml}$ (bei einem 100-µl-Ansatz entsprach das 2,6 µl einer SL mit 10 $^{mg}/_{ml}$) zusätzlich zum Na-Acetat und Ethanol zugegeben werden. Zentrifugiert und gewaschen wurde analog zur Standardmethode ohne Glykogen.

Für die Fällung von RNA sollte anstelle von 3 M Natriumacetat 4 M Lithiumchlorid verwendet werden. Lithiumchlorid hat gegenüber anderen Salzen zur Fällung von RNA den Vorteil, dass es DNA, Protein und Kohlenwasserstoffe nur sehr schlecht fällt (Barlow et al., 1963). Deshalb eignet sich mit Lithiumchlorid gefällte RNA besser für cDNA-Synthesen oder *in-vitro*-Translationen (Cathala et al., 1983).

3.3.15 Klonierung von PCR-Fragmenten in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®]



Abb. 3-6: Prinzip des TOPO TA Cloning[®] Kits der Firma Invitrogen.

Die Klonierungsmethode des TOPO TA Cloning[®] Kits (Invitrogen) macht sich die Tatsache zu Nutze, dass Taq- und Tfl-Polymerasen durch ihre terminale Transferase-Aktivität einen 3'-Überhang aus Deoxyadenosinen an das PCR-Produkt anfügen. Der Vektor liegt in linearisiertem Zustand vor und besitzt einen 3'-Überhang aus Thymidinen. Außerdem ist das Enzym Topoisomerase I kovalent an die offenen 3'-Enden des Vektors gebunden. Durch die Ligationsaktivität der Topoisomerase I wird ein PCR-Produkt mit 3'-A-Überhang schnell und effizient in den Vektor integriert, wobei das Enzym dissoziiert. Das Prinzip ist in Abbildung 3-6 verdeutlicht. Diese Methode erlaubt auch eine Vor-

auswahl möglicher positiver Klone über Blau/Weiß-Selektion, wobei die positiven, also die Klone mit integriertem PCR-Produkt, weiß bleiben, während die Klone ohne Insert blau werden. Ohne Insert wird das *lacZ*-Gen exprimiert und X-Gal als Substrat der β -Galaktosidase gespalten, wobei ein blauer Farbstoff entsteht. Das PCR-Produkt inseriert zwischen Promotor und *lacZ*-Gen, sodass keine Expression dieses Gens mehr möglich ist. Nach der Ligation wurde der Ansatz in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 bzw. TOP10F' (Invitrogen) transformiert. Die Transformation wurde dann in zwei Verdünnungen auf LB_{Kan}- oder LB_{Amp}-Platten (mit X-Gal für Blau/Weiß-Selektion) ausgestrichen. Kurzprotokoll:

•	Ansatz (6 µl):	PCR-Produkt	0,5-4 µl
		"Salt Solution" (Invitrogen)	1 µl
		Steriles H ₂ O bidest.	bis zu einem Volumen von 5 μ l
		TOPO [®] -Vektor (Invitrogen)	1 µl

- Meistens wurden halbe Ansätze verwendet. Bei sehr geringen Konzentrationen des Inserts oder sehr großen Inserts (größer 2,5 kb) sollte jedoch ein ganzer Ansatz pipettiert werden.
- Ansatz mischen und 5 min bei RT (22-23 °C) inkubieren (bei sehr großen Fragmenten oder geringer Insertmenge auf 30 min verlängern)
- Ansatz zu einem Aliquot chemisch kompetenter E. coli TOP10 oder TOP10F' geben
- 5-30 min auf Eis inkubieren.
- 30 sek Hitzeschock bei 42 °C, danach sofort auf Eis.
- Zugabe von 250 µl SOC-Medium (Invitrogen, sollte RT haben) und 1 h Schütteln bei 37 °C.
- Ausplattieren auf LB_{Kan}- oder LB_{Amp}-Platten in 2 Verdünnungen (40 μl, 260 μl) mit 40 μl X-Gal (SL 40 ^{mg}/_{ml} in DMF, Applichem; ca. 1 h vor Verwendung ausstreichen und einziehen lassen) für Blau/Weiß-Selektion (bei TOP10F'-Zellen müssen zusätzlich 40 μl IPTG (SL 100 mM in H₂O bidest., Applichem) ausplattiert werden).
- Inkubation über Nacht bei 37 °C.

3.3.16 Klonierung von DNA-Fragmenten

3.3.16.1 Gewinnung des Inserts

Wenn man eine bestimmte cDNA in einem speziellen Plasmidvektor haben möchte, muss das entsprechende DNA-Fragment zunächst gewonnen werden. Liegt die cDNA z.B. in einem anderen Plasmid vor, wird das Fragment über einen Restriktionsverdau (siehe 3.3.7) ausgeschnitten. Um genügend Insert zu erhalten, wurden meistens 3-4 Ansätze mit jeweils 2 μ g DNA verdaut, anschließend über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und die gewünschte DNA aus dem Gel eluiert (siehe 3.3.12). Wurde die DNA über eine PCR gewonnen, wurde das PCR-Produkt verdaut (siehe 3.3.8), der Verdau anschließend mit Na-Acetat/Ethanol gefällt und in 10-20 μ l H₂O bidest. aufgenommen.

Sollte ein PCR-Produkt direkt über glatte Enden kloniert werden, so wurden die Primer vor der PCR, die in solchen Fällen grundsätzlich mit Pfu-Polymerase durchgeführt wurde, phosphoryliert, um eine Ligation des PCR-Produktes zu ermöglichen (siehe auch 3.3.6.2).

3.3.16.2 Dephosphorylierung des Vektors

Die Dephosphorylierung wurde bei ungerichteter Klonierung, d.h., wenn nur ein Restriktionsenzym verwendet wird, durchgeführt, um die Autoligationsrate des Vektors zu vermindern. Die Ligase benötigt phosphorylierte Enden, um zwei DNA-Moleküle miteinander verbinden zu können. Durch die Entfernung der Phosphatgruppe am 5'-Ende des DNA-Stranges kann der geöffnete Vektor nicht mehr durch die Ligase geschlossen werden, was die Anzahl der Falschpositiven reduziert. Die Dephosphorylierung war nicht notwendig bei gerichteter Klonierung, d.h., wenn mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten wird, da eine Ligation von nicht-komplementären Enden nicht möglich ist. Der Vektor wurde zunächst linearisiert, das Restriktionsenzym 10 min bei 85 °C hitzeinaktiviert und dann der Ansatz mit Na-Acetat und Ethanol gefällt (siehe 3.3.14). Das Pellet wurde so in H₂O bidest. resuspendiert, dass in 1 µl etwa 100 ng DNA enthalten waren.

Pipettierschema eines Standardansatzes (5 µl):

- 100-150 ng linearisierter Vektor
- 0,5 µl 10x SAP-Puffer (MBI)
- bis zu einem Volumen von 4 μ l mit H₂O bidest. auffüllen
- 1 µl Shrimp alkalische Phosphatase (1 $^{U}/_{\mu l}$, MBI)

Der Ansatz wurde gemischt und 1-2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym 15 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Der Ansatz wurde bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt, was mehrere Wochen möglich war.

3.3.16.3 Ligation und Transformation

Pipettierschema für einen Standard-Ligationsansatz (20 µl):

- 1 Dephosphorylierungsansatz (5 µl, 100-150 ng Vektor).
- 300 ng Insert (ca. 3fache Menge [Anzahl der Moleküle! Vgl. 3.3.4] im Vergleich zum Vektor)
- 1,5 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer (MBI)
- H_2O bidest. bis zu einem Volumen von 19 µl
- 1 μ l T4-DNA-Ligase (5 ^U/_{μ l}, MBI)

Der Ansatz wurde vermischt und 30-60 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz für eine Transformation in *E.-coli*-Bakterien vom Stamm XL1-blue oder XL10-gold eingesetzt (siehe 3.1.6).

Kurzprotokoll einer Transformation:

- Ligationsansatz mit einem Aliquot (100 μl) kompetenter Bakterien mischen und Inkubation auf Eis f
 ür 30-60 min.
- Hitzeschock für 30 sek bei 42 °C, dann wieder auf Eis.
- Zugabe von 900 µl LB-Medium und 1 h Schütteln bei 37 °C.
- Ausplattieren auf Selektionsplatten.

3.3.16.4 Test der erhaltenen Klone

Die Klone wurden mit Hilfe der Kolonie-PCR (siehe 3.3.5) auf eine Insertion der cDNA in den Vektor hin überprüft, wenn dies möglich war. Bei ungerichteten Klonierungen wurde ebenfalls die Orientierung der inserierten cDNA analysiert. Waren diese Tests über PCR nicht möglich, wurden die Klone über Restriktionsverdau (siehe 3.3.7) oder Sequenzierung (siehe 3.3.19) getestet. Alle über PCR gewonnenen Inserts wurden in jedem Fall vollständig sequenziert, um Fehler durch die Polymerase auszuschließen.

3.3.17 Gewinnung von Plasmid-DNA

3.3.17.1 GTE-System (alkalische Lyse)

Eingesetzt wurde diese Methode (Li et al., 1997) vor allem zum Testen von Klonen nach einer Ligation und Transformation, wenn dies über Kolonie-PCR nicht möglich war. Die gewonnene Plasmid-DNA kann aber auch für Klonierungen, Transfektionen oder PCR eingesetzt werden (je nach Reinheit; vgl. 3.3.2).

Lösungen:

•	Lösung 1 (GTE-Puffer):	50 mM Glucose
		10 mM EDTA
		25 mM Tris/HCl, pH 8,0
		+ 1 Spatelspitze RNase A
		⇔ Lagerung bei 4 °C
•	Lösung 2 (Lysispuffer):	0,2 N NaOH
		1 % (w/v) SDS
•	Lösung 3 (Kaliumacetatlösung):	60 ml Kaliumacetatlösung (SL 5 M)
		11,5 ml Eisessig
		28,5 ml H ₂ O bidest.

• 100 % Ethanol (p.a., auf Eis vorkühlen)

Durchführung:

Zunächst wurde das Plasmid in den Bakterien vermehrt. Dazu wurde vom betreffenden Klon eine 10ml-ÜNK in Selektionsmedium hergestellt. Am nächsten Morgen wurden 1,5 ml dieser ÜNK in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und 30 sek bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl GTE-Puffer durch Vortexen resuspendiert. Danach wurden 200 µl Lösung 2 zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren des Gefäßes gemischt. Dabei muss die Lösung klar werden; sollte dies nicht passieren, wurden entweder zu viele Bakterien verwendet, oder es liegt eine Kontamination mit Hefe vor (Geruchstest, ein Tropfen mikroskopieren). Ist die Bakterienlyse unvollständig (trübe Lösung), führt dies zu einer stark verminderten DNA-Ausbeute. Zum Schluss wurden 150 µl Lösung 3 zugegeben und der Ansatz kurz und kräftig geschüttelt. Nach einer 30-sekündigen Zentrifugation bei 13000 rpm zum Pelletieren der Zelltrümmer wurden 400 µl des Überstandes in ein frisches Gefäß überführt und 400 µl eiskaltes Ethanol (100 %, p.a.) zugegeben. Beim Abnehmen des Überstandes war darauf zu achten, dass kein ausgefallenes SDS mit verschleppt wurde, weil dies nachfolgende Reaktionen stören könnte. Für eine höhere Reinheit der Präparation wurde der gesamte Überstand in ein frisches Gefäß überführt und dann 400 µl des Überstandes nach einer weiteren 5-minütigen Zentrifugation abgenommen, in ein frisches Gefäß gegeben und mit Ethanol versetzt. Der Ansatz wurde kurz gemischt und dann sofort 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand sorgfältig abgenommen und das Pellet 5-10 min luftgetrocknet (nicht komplett austrocknen lassen!). Zum Schluss wurde das Pellet in 30 µl H₂O bidest. aufgenommen. Von der GTE-Plasmid-Präparation wurden entweder 10 µl in einem Restriktionsverdau (siehe 3.3.7) eingesetzt, oder entsprechend 1-2 µg, nachdem die Konzentration fotometrisch bestimmt worden war (siehe 3.3.2). Die Ausbeuten lagen im Durchschnitt bei etwa 30 µg aus 1,5 ml ($E_{260}/E_{280} \approx 1,7$).

3.3.17.2 PEQLAB Plasmid Mini Präp

Diese Methode ist eine Kombination aus alkalischer Lyse und Adsorption der DNA an ein Silika-Gel unter Hochsalz-Bedingungen. Die DNA wird dabei nicht gefällt, sondern an das Gel gebunden und anschließend mit einem Niedrigsalz-Puffer (z.B. H₂O bidest.) bei pH 7,0-8,5 eluiert. Die durch diese Methode gewonnene Plasmid-DNA besitzt eine sehr hohe Reinheit und ist somit auch für empfindlichere Reaktionen wie Sequenzierungen einsetzbar.

Durchgeführt wurde die Präparation mit dem *E.Z.N.A*[®] *Plasmid Mini Präp Kit I* der Firma PEQLAB nach Herstellerprotokoll, ausgehend von 7 ml Übernachtkultur. Eluiert wurde mit 50 μ l H₂O bidest., was normalerweise zu Konzentrationen zwischen 400-1000 ^{ng}/_{µl} führte. Die Säulchen können ohne Verlust an Ausbeute und Reinheit mehrmals für dasselbe Plasmid verwendet werden.

3.3.18 Gewinnung genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA aus Kulturzellen wurde das *E.Z.N.A.*[®] *Tissue DNA Kit II* der Firma PEQLAB verwendet. Das Prinzip ist dem der PEQLAB Plasmid Mini Präp ähnlich und läuft über eine reversible Bindung der DNA an ein Silika-Gel unter bestimmten Pufferbedingungen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Genomische DNA wurde bei 4 °C gelagert, um ein Brechen der langen DNA-Moleküle beim Einfrieren bzw. Auftauen zu vermeiden.

3.3.19 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten nach dem von Fred Sanger und Alan Coulson (1977) entwickelten Prinzip. Dies beruht auf der enzymatischen Synthese von DNA-Strängen, die an einem modifizierten Nukleotid abbricht. Als modifizierte Nukleotide kommen dabei Dideoxy-Nukleosid-Triphosphate (ddNTPs) zum Einsatz, an die eine DNA-Polymerase wegen der fehlenden 3'-OH-Gruppe am Zuckeranteil des Nukleotids kein weiteres anfügen kann. Auf diese Weise bekommt man DNA-Fragmente verschiedenster Längen, die alle an ihren Enden ein ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP oder ddGTP) tragen. Früher mussten vier parallele Ansätze gefahren werden, jeweils einer für die vier verschiedenen Nukleotide (A, T, C, G). Die Reaktionen wurden mit Radioisotopen durchgeführt, um die DNA-Fragmente zu markieren, die anschließend über spezielle Sequenziergele aufgetrennt wurden, mit denen dann ein Röntgenfilm belichtet wurde. Aus den Bandenmustern konnte dann die DNA-Sequenz abgelesen werden.

In einer verfeinerten Methode kommen Fluoreszenz-markierte ddNTPs zum Einsatz, wobei jedes Nukleotid mit einem anderen Farbstoff markiert ist (Adenin: R6G, grün; Thymin: ROX, rot; Cytosin: TAMRA, gelb; Guanin: R110, blau). In diesem System wird die zu sequenzierende DNA mit einem entsprechenden Primer und einem Premix (*ABI PRISM[®] BigDye*™ *Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*), der dNTPs, markierte ddNTPs, Taq-DNA-Polymerase, MgCl₂ und den Puffer enthält, gemischt und in einer PCR amplifiziert. So entstehen DNA-Fragmente verschiedenster Längen, mit jeweils einem markierten Nukleotid an ihren Enden, wobei Fragmente gleicher Länge auch den gleichen Farbstoff als Markierung tragen. Diese Fragmente werden in einem Kapillar-Gelsystem der Größe nach aufgetrennt und mit einem Laser angeregt. Ein Fotoelement registriert die Wellenlänge des von den ddNTPs emittierten Lichtes und schickt diese Messdaten an einen Computer, der die Einzelmesswerte schließlich zu einer Sequenz zusammenfügt.

Durchführung:

Standardansatz einer Sequenzierreaktion (10 µl):

- 300-400 ng DNA
- 50 pmol Primer
- H_2O bidest. bis zu einem Volumen von 8 µl
- 2 µl Premix (BigDyeTM, PE Applied Biosystems)

Dieser Ansatz wurde gut vermischt und anschließend in einem Thermocycler bei folgendem Programm inkubiert:

•	initiale Denaturierung	1 min 96 °C	
•	Denaturierung	30 sek 96 °C	
•	Primer-Annealing	15 sek (Temperatur je nach Primer)	> 25 Zyklen
•	Elongation	4 min 60 °C	J
•	Kühlung	4 °C	

Die Annealing-Temperatur wurde je nach Primer gewählt. Die Annealing-Temperaturen für die zur Sequenzierung verwendeten Primer sind im Anhang aufgelistet.

Nach der Reaktion wurde der Ansatz mit Na-Acetat und Ethanol gefällt (siehe 3.3.14), das Pellet 5-10 min luftgetrocknet und in 25 µl TSR (Template Supression Reagent, PE Applied Biosystems) aufgenommen. Nach einer Inkubation für 2 min bei 90 °C wurde der Ansatz kurz gevortext, dann kurz zentrifugiert und anschließend in ein Sequenzier-Cap mit aufgesetztem Septum überführt. Mit den erhaltenen Sequenzen wurde ein Sequenzvergleich im Internet durchgeführt.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 SDS-PAGE

Das gebräuchlichste Verfahren zur Auftrennung und Reinheitskontrolle von Proteinen ist die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Wanderungsgeschwindigkeit von Molekülen im elektrischen Feld hängt normalerweise von drei Faktoren ab: der Größe, ihrer Form und ihrer elektrischen Ladung. Bei der SDS-PAGE ist jedoch allein die Masse für die Wanderungsgeschwindigkeit ausschlaggebend. Dies erreicht man dadurch, dass dem Gel und dem Laufpuffer SDS, ein Detergenz mit stark amphipatischen Eigenschaften, zugegeben wird. Es zerlegt oligomere Proteine in ihre Untereinheiten und denaturiert sie. An die entfalteten Peptid-Ketten binden SDS-Moleküle und verleihen ihnen eine stark negative Ladung. Zur vollständigen Denaturierung gibt man außerdem Thiole zu, um die Disulfidbrücken der Proteine zu spalten.

3.4.1.1 SDS-PAGE nach Laemmli (1970)

Lösungen:

•	Lösung A:	30 % (w/v) Acrylamid			
		0,8 % (w/v) Bisacrylamid			
•	Lösung B (Trenngelpuffer):	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8			
•	20 % (w/v) SDS				
•	Lösung D (Sammelgelpuffer):	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8			
•	Laufpuffer (1 l):	6,0 g Tris/HCl			
		28,8 g Glycin			
		1,0 g SDS			

- 10 % (w/v) APS (Ammoniumpersulfat) in H₂O
- TEMED (Roth)

•	Probenpuffer (pH 6,8):	100 mM Tris/HCl, pH 6,8		
		1 % (w/v) SDS		
		10 % (v/v) Glycerin		
		5 % (v/v) β -Mercaptoethanol		
		Spatelspitze Bromphenolblau (Roth, bis Lösung tiefblau)		

• 0,5%ige Agarose-Lösung

Durchführung:

Es wurden ausschließlich Minigele mit dem "Mini V8"-Gelsystem der Firma Gibco Life Technologies gefahren. Zunächst wurden 2 Glasplatten mit eingesetzten seitlichen Spacern mit 2 Klammern zusammengesetzt und unten und teilweise seitlich mit Tesafilm abgeklebt. Ein Kamm wurde eingesetzt, um die Gießhöhe für das Trenngel zu markieren. Das Trenngel wurde so hoch gegossen, dass noch Platz für etwa 3 bis 5 mm Sammelgel war. Anschließend wurde der Kamm entfernt und die Seiten und der Boden wurden mit 0,5%iger Agarose abgedichtet. Dazu wurde die flüssige Agarose-Lösung an den Seiten in den Aufbau pipettiert und der Boden etwa 3 mm hoch damit ausgegossen. Während die Agarose aushärtete, wurde die Trenngel-Lösung, wie in Tabelle 3-9 angegeben, zusammenpipettiert. Die angegebenen Mengen sind ausreichend für 2 Minigele. APS und das zum Schluss zugegebene TEMED lösten die Polymerisation der Gelmatrix aus. Die Lösung wurde gut vermischt und mit einer Pasteur-Pipette in den Aufbau bis knapp über die Markierung gegossen. Das frisch gegossene Trenngel wurde mit destilliertem Wasser überschichtet, weil die Polymerisation unter Luftabschluss besser abläuft.

	8 %	10 %	12 %	15 %
Lösung A	2,5 ml	3,125 ml	3,75 ml	4,5 ml
Lösung B	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
20 % SDS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
10 % APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
H ₂ O	2,35 ml	1,7 ml	1,05 ml	0,35 ml

Tabelle 3-9: Pinettierschema für Trenngel bei SDS-PAGE nach Laemmli

Das Trenngel wurde 30-45 min aushärten gelassen, dann konnte das Sammelgel gemäß Tabelle 3-10 zusammenpipettiert werden.

Tabelle 3-10: Pipettierschema Samme		
	5 %	
Lösung A	1,5 ml	
Lösung D	2,55 ml	
20 % SDS	50 µl	
10 % APS	100 µl	
TEMED	10 µl	
H ₂ O	5,85 ml	

Taballa 3 10. Dipatti

Nachdem das Wasser vom Trenngel entfernt worden war, wurden APS und TEMED zur Sammelgellösung gegeben. Die Lösung wurde gut gemischt und anschließend mit einer Pasteur-Pipette auf das Trenngel gegossen. Das Sammelgel wurde bis zum Rand des Aufbaus gegossen und dann vorsichtig und luftblasenfrei ein Kamm eingesetzt. Nach mindestens 30 min Wartezeit konnte das Gel beladen werden.

Vor dem Beladen wurden die Gele nach Entfernung des Tesafilms in die mit Laufpuffer gefüllte Kammer gesetzt. Es musste soviel Laufpuffer in der Kammer sein, dass auch die obere Kathode vom Puffer bedeckt war. Anschließend wurde vorsichtig der Kamm entfernt und Gelreste und Luftblasen mit Hilfe einer Pipette aus den Taschen entfernt. Die aufzutragenden Proben wurden in Probenpuffer aufgenommen und kurz vor dem Beladen bei 90-100 °C 10 min denaturiert. Zusätzlich zu den Proben wurde als Größenstandard der "Protein Molecular Weight Marker" der Firma MBI Fermentas aufgetragen (siehe Abbildung 3-7 und Tabelle 3-11). Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 100 V, bis die Lauffront das Gelende erreicht hatte.

I abelle 3-11: Protein Molecular Weight Marker (MBI)			-	—116.0kDa				
Protein Gewicht			_	—66.2kDa				
β-Galaktosidase	116000							
Rinderserum-Albumin (BSA)	66200		-	— 45.0kD a				
Ovalbumin	45000		-	— 35.0kD a				
Laktat-Dehydrogenase	35000		-	— 25.0kD a				
Bsp98I (Restriktionsenzym)	25000							
β-Lactoglobulin	18400		-	—18.4kDa	Abb	3-7.	Protein	Molecular
Lysozym	14400		-	—14.4kDa	Weigh	t Mark	er" (MBI)	
						it i		

Mal 2 11. D .

Wenn die Gele fertig gelaufen waren, wurden sie aus der Kammer genommen und entweder geblottet (siehe 3.4.4) oder mit Coomassieblau gefärbt (siehe 3.4.2).

3.4.1.2 SDS-PAGE nach Thomas und Kornberg (1975)

Lösungen:

•	Acrylamid-SL für Trenngel:	30 % (w/v) Acrylamid 0,15 % (w/v) Bisacrylamid
•	Acrylamid-SL für Sammelgel:	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
•	Trenngel-Puffer (pH 8,8):	3 M Tris/HCl 0,4 % (w/v) SDS
•	Sammelgel-Puffer (pH 6,8):	0,75 M Tris/HCl 0,4 % (w/v) SDS
•	10 % (w/v) APS	
•	TEMED	
•	1%ige Agarose-Lösung	
•	Laufpuffer (pH 8,8):	50 mM Tris/HCl
		380 mM Glycin

Probenpuffer (siehe 3.4.1.1) •

Durchführung:

Es wurden ausschließlich große Kornberg-Gele gefahren. Zunächst wurden 2 Glasscheiben mit den eingesetzten seitlichen und dem unteren Spacer zusammengeklammert. Dann wurde der Aufbau mit 1%iger Agarose-Lösung an den Seiten und unten abgedichtet. Es wurde ein Kamm eingesetzt, um die

0,1 % (w/v) SDS

Gießhöhe für das Trenngel markieren zu können. Die Höhe wurde so gewählt, dass zwischen Kamm und Trenngel etwa 5-10 mm Platz für das Sammelgel blieben. Anschließend wurde der Kamm wieder entfernt und die Trenngel-Lösung nach Tabelle 3-12 zusammenpipettiert und gut vermischt. Dabei wurden APS und TEMED wieder zum Schluss zugegeben. Die angegebenen Mengen sind ausreichend für ein Gel.

	10 %	16 %
H ₂ O	12,3 ml	6,3 ml
Acrylamid-SL für Trenngel	10 ml	16 ml
Trenngel-Puffer	7,5 ml	7,5 ml
APS	0,6 ml	0,6 ml
TEMED	25 µl	25 μl

 Tabelle 3-12: Pipettierschema Trenngel nach Kornberg.

Die Lösung wurde dann zwischen die beiden Glasplatten in den Aufbau gegossen. Das frisch gegossene Trenngel wurde sofort mit destilliertem Wasser überschichtet, damit es besser polymerisieren konnte. Nach ca. 30 min war die Polymerisation abgeschlossen und das Sammelgel konnte gegossen werden. Dazu wurde zunächst das Wasser vom Trenngel entfernt und dann die Sammelgel-Lösung wie in Tabelle 3-13 beschrieben angesetzt, gut vermischt, und anschließend mit einer Pasteur-Pipette auf das Trenngel gegossen. Nach dem Gießen wurde sofort ein Kamm eingesetzt, oder, bei Gelen für die Antiserenreinigung (siehe 3.4.11.1), mit destilliertem Wasser überschichtet.

	3,9 %
H ₂ O	12,3 ml
Acrylamid-SL (Sammelgel)	2,6 ml
Sammelgel-Puffer	5 ml
APS	0,6 ml
TEMED	25 µl

Tabelle 3-13: Pipettierschema Sammelgel.

War das Sammelgel nach 30-60 min ausgehärtet, wurde der untere Spacer entfernt und das Gel in die Gelkammer eingespannt. Dann wurde der obere Tank mit Laufpuffer gefüllt, um zu testen, ob das System gut abgedichtet war. War dies der Fall, so wurde auch der untere Tank soweit gefüllt, bis die Unterseite des Gels im Laufpuffer eingetaucht war. Anschließend wurden eventuell vorhandene Luftblasen mit Hilfe einer Spritze mit gebogener Kanüle entfernt. Zum Schluss wurde der Kamm entfernt und das Gel konnte beladen werden. Die Proben wurden analog zum Laemmli-Gelsystem vorbereitet und aufgetragen. Auch hier wurde der "Protein Molecular Weight Marker" der Firma MBI als Größenstandard mit aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei einer konstanten Stromstärke von 16 mA. Am nächsten Morgen wurde der Lauf dann bei einer konstanten Spannung von 120 V weitergeführt, bis die Lauffront das Gelende erreicht hat. Das Gel wurde entweder geblottet (siehe 3.4.4) oder mit Coomassie gefärbt (siehe 3.4.2).

3.4.2 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Lösungen:

•	Coomassie-Färbelösung:	0,25 % (w/v) Brillant Blau R250 (Roth)
		40 % (v/v) Methanol
		8 % (v/v) Essigsäure
•	Entfärbelösung:	25 % (v/v) Methanol
		10 % (v/v) Essigsäure

Durchführung:

Für die Coomassie-Färbung wurde das Gel 30 min in der Färbelösung sanft geschüttelt und anschließend über Nacht in Entfärber gelegt. Durch Zugabe eines gefalteten weißen Papiertuches konnte die Entfärbung beschleunigt werden. Außerdem macht das Papier einen Wechsel der Entfärbelösung überflüssig. Coomassie färbt spezifisch Proteine. Das gefärbte Gel wurde auf einem Leuchtschirm fotografiert oder eingescannt.

3.4.3 Trocknen von SDS-Gelen

Um Coomassie-gefärbte Gele längere Zeit aufzubewahren, wurden sie getrocknet. Dazu wurde das Gel mit Hilfe einer flexiblen Folie auf ein Whatman-Papier überführt, sodass zwischen Papier und Gel keine Luftblasen entstehen. Dann wurde das Gel mit Frischhaltefolie bedeckt und in einem Drystar-Geltrockner 90 min bei 75 °C und maximaler Vakuumleistung getrocknet. Nach Ablauf der Trockenzeit wurde das Gel zum Abkühlen im Trockner belassen und konnte dann entnommen werden.

3.4.4 Western Blot (Proteintransfer auf eine Membran; Matsudaira, 1987)

3.4.4.1 Proteintransfer

Lösungen:

•	CAPS-Puffer (pH 10):	50 mM CAPS
		10 % (v/v) Methanol
		1 mM Mercapto-Propionsäure (Sigma)
•	TBS (pH 7,4):	150 mM NaCl
		10 mM Tris/HCl
•	TBST (pH 7,4):	TBS mit 0,1 % (v/v) Tween [®] 20
		- 83 -

- 10 % (w/v) Milch in TBST, pH 7,4-7,6
- 3% (w/v) BSA (Roth) in TBS
- Ponceau S (Sigma; 0,2 % Ponceau S in 3 % TCA)
- ECL-Lösungen 1+2 (Amersham Pharmacia Biotech)

Durchführung:

Das Gel wurde nach Beendigung der Elektrophorese aus der Kammer genommen und die zum Abdichten eingegossene Agarose und das Sammelgel wurden mit Hilfe eines Spatels entfernt. Außerdem wurde die rechte untere Ecke des Gels entfernt, um die Orientierung des Gels zu markieren. Anschließend wurde das Gel etwa 10 min in CAPS-Puffer inkubiert. Währenddessen wurden die Nitrozellulose und die Whatman-Filter auf Gelgröße zugeschnitten. Dann wurde der Blot wie in Abbildung 3-8 dargestellt aufgebaut. Geblottet wurde elektrisch in einer Graphit-Blotting-Kammer. Die Whatman-Filter und die Nitrozellulose wurden kurz in CAPS-Puffer getränkt, bevor sie in den Aufbau eingesetzt wurden. Um eventuell vorhandene Luftblasen aus dem System zu entfernen, wurde ein Zentrifugenröhrchen mit sanftem Druck darübergerollt. Beim Gel wurden die erkennbaren Luftblasen mit der Hand vorsichtig nach außen gedrückt, die Nitrozellulose wurde lediglich aufgelegt.



Abb. 3-8: Aufbau Western Blot.

War der Blot soweit aufgebaut, wurde die Kathodenplatte aufgelegt und die Kammer ans Netzgerät angeschlossen. Anschließend wurde 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 1 ${}^{mA}/{}_{cm^2}$ geblottet, wobei sich eine Spannung von ca. 12 V einstellen sollte, die sich am Ende des Transfers etwa auf 40 V erhöht hatte. Lag diese Spannung deutlich darüber, befanden sich noch Luftblasen im System.

Nach 1 h wurde der Blot abgebaut und der Transfer durch eine Färbung mit Ponceau S überprüft. Dazu wurde der Blot in einer Glasküvette mit Ponceau S bedeckt und kurz unter Schütteln inkubiert (1-5 min). Ungebundenes Ponceau S wurde mit deionisiertem Wasser abgespült. Die Markerbanden wurden mit einem Spatel durchgestochen, dann wurde die Membran entweder 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C abgesättigt (mit 10 % Milch pH 7,4-7,6 oder 3 % BSA, je nach Antikörper).

3.4.4.2 Spezifischer Proteinnachweis mit Antikörpern

Der in Milch oder BSA abgesättigte Blot wurde 1 h mit dem in Absättigungslösung verdünnten Antikörper bei RT inkubiert. Es wurde immer die Absättigungslösung verwendet, mit der bereits abgesättigt worden war, die Verdünnung war abhängig vom verwendeten Antikörper (siehe 2.1.4). Nach der Antikörperinkubation wurde der Blot kurz in TBS oder TBST gespült und anschließend 3-mal 10 min gewaschen. Danach wurde 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert (Verdünnung und Puffer siehe 2.1.4). Anschließend wurde wieder 3- bis 4-mal 10 min in TBS oder TBST gewaschen. Die Detektion erfolgte dann über ECL (siehe 3.4.4.3).

3.4.4.3 Detektion über Peroxidase und ECL (enhanced chemiluminescence)

Für eine Detektion über ECL musste ein Sekundärantikörper verwendet werden, der an Peroxidase gekoppelt war. Die ECL-Reaktion wurde im Anschluss an die oben beschriebenen Waschschritte durchgeführt. Dafür wurden die beiden ECL-Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt, der Blot damit benetzt und 1-3 min inkubiert. Durch die Peroxidase wird die ECL-Lösung so umgesetzt, dass Licht in Form chemischer Lumineszenz emittiert wird. Danach wurde die Lösung abgetropft und der Blot faltenfrei in Frischhaltefolie eingeschlagen. Anschließend wurde mit dem Blot ein Röntgenfilm (Cronex) belichtet. Die Expositionsdauer lag je nach Signal zwischen 1 Sekunde und über Nacht. Der Röntgenfilm wurde 1-3 min im Entwicklerbad inkubiert und dann nach kurzem Spülen mit Wasser fixiert. Zum Schluss wurde der Film noch gründlich mit Wasser gespült und getrocknet. Zur Dokumentation wurden die Filme eingescannt und mit Adobe Photoshop bearbeitet.

3.4.5 Strippen eines Western Blots (Entfernung der Antikörper)

3.4.5.1 Standardmethode mit β-Mercaptoethanol

Lösungen:

- Strip-Puffer (50 ml): 100 mM Tris/HCl pH 6,7
 2 % (w/v) SDS
 390 μl β-Mercaptoethanol
- TBS oder TBST (siehe 3.4.4.1)

Durchführung:

Der Blot wurde zunächst gut in TBS oder TBST gewaschen, dann 30 min (nicht länger!) bei 50 °C unter Schütteln in Strip-Puffer inkubiert. Anschließend wurde der Blot sehr gründlich mit TBS oder TBST gewaschen. Danach konnte der Blot neu abgesättigt und mit einem neuen Antikörper entwickelt werden.

3.4.5.2 Sanfte Methode mit Glycin-Puffer

Lösungen:

- 100 mM Glycin, pH 2,5
- TBS oder TBST (siehe 3.4.4.1)

Durchführung:

Der Blot wurde kurz in H_2O bidest. gewaschen, dann 2 mal 30 min (oder 3-mal 15 min) bei Raumtemperatur unter Schütteln in einer großzügigen Menge Glycinpuffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran gründlich mit H_2O bidest. gewaschen (mehrfach wechseln!). Vor einer erneuten Absättigung wurde der Blot zum Äquilibrieren ca. 5 min in TBS oder TBST inkubiert.

3.4.6 Herstellung und Aufreinigung eines Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteins

Um ein gewünschtes Protein als GST-Fusionsprotein zu exprimieren, musste zunächst die entsprechende DNA-Sequenz gewonnen und im Leseraster in den Vektor pGEX-5X-1 (Amersham Pharmacia Biotech) inseriert werden (siehe 3.3.16 und 2.2.1). Bei Expression dieses Konstrukts in Bakterien erhält man ein Fusionsprotein, das aus der Glutathion-S-Transferase, einem Enzym, das ursprünglich aus *Schistosoma japonicum* stammt und eine molekulare Masse von ca. 26 kDa besitzt, und dem spezifischen Protein besteht. Über den GST-Anteil ist dann eine Aufreinigung des Proteins möglich.

3.4.6.1 Expression des GST-Fusionsproteins in Bakterien

Für die Expression wurden Bakterien vom Stamm *E. coli* BL21-CodonPlus[™](DE3)-RIL verwendet (siehe auch 2.1.3).

Lösungen:

- LB-Medium (siehe 3.3.1)
- IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactosid, Applichem; SL 1 M in H₂O)

Durchführung:

Es wurde, wie unter 3.3.1 beschrieben, eine Flüssigkultur hergestellt, die bei Erreichen einer OD_{600} von 0,4-0,9 durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert worden ist. Vor der Induktion wurde eine Probe abgenommen, die parallel zur induzierten Kultur weitere 4-6 h bei 37 °C inkubiert wurde, bevor die Bakterien durch 10-minütige Zentrifugation bei 3000 g pelletiert und geerntet worden sind. Diese Probe (nicht induzierte Kontrolle) diente später, zusammen mit einer vor dem Ernten der Bakterien entnommenen Probe (induzierte Kontrolle), als Kontrolle für die Induktion. Die Pellets wurden bei -20 °C bis zur Verwendung aufbewahrt.

3.4.6.2 Aufreinigung des GST-Fusionsproteins

Lösungen:

- Glutathion Sepharose[®] 4B (Amersham, 75% ige Suspension in 20 % Ethanol)
- PBS (siehe 3.2)

•	Aufschlusspuffer:	PBS (siehe 3.2)
		+ 1 % (v/v) Triton™ X-100
•	Elutionspuffer (pH 8,0):	50 mM Tris/HCl pH 8,0
		+ 10 mM reduziertes Glutathion (Amersham)

Durchführung:

Die Reinigung wurde in der Batch-Methode in 15-ml-Greiner-Röhrchen durchgeführt. Die Mengen, die von den einzelnen Lösungen benötigt wurden, richteten sich nach dem Kulturvolumen bzw. der erwarteten Proteinausbeute und können mit Tabelle 3-14 ermittelt werden.

			erwartete	Ausbeute	
	Formel	50 mg	10 mg	1 mg	50 µg
Kulturvolumen	Х	201	41	400 ml	20 ml
Resuspensionsvolumen (RV)	$RV = X/_{20}$	1000 ml	200 ml	20 ml	1 ml
Sepharose-Säulenvolumen (SV)	$SV = {^{RV}}_{100} = {^{X}}_{2000}$	10 ml	2 ml	200 µl	10 µl
Originalsuspension	SV · 1,33	13,3 ml	2,66 ml	266 µl	13,3 µl
PBS pro Waschschritt	$SV \cdot 10$	100 ml	20 ml	2 ml	100 µl
Elutionspuffer pro Schritt	$SV \cdot 1$	10 ml	2 ml	200 µl	10 µl

Tabelle 3-14: Benötigtes Material für GST-Aufreinigung.

Herstellung der Sepharose-Matrix:

Für die Herstellung der "Bulk-Matrix" wurde die entsprechend benötigte Menge 75% ige Original-Suspension in ein 15-ml-Greiner-Röhrchen gegeben. Bei größeren Reinigungen wurden entsprechend mehr Ansätze in 15-ml-Röhrchen vorbereitet. Es wurde 5 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Es folgten 2 Waschschritte mit PBS, um restliches Ethanol zu entfernen. Dazu wurde mit jeweils dem 10fachen Säulenvolumen kaltem PBS gut resuspendiert und erneut 5 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde schließlich abgenommen und verworfen. Zum Schluss wurde 1 Säulenvolumen kaltes PBS zugegeben, was zu einer 50% igen Sepharose-Suspension in PBS führte, die später direkt für die Reinigung eingesetzt wurde. In PBS kann die Sepharose bei 4 °C etwa einen Monat gelagert werden.

Aufschluss der Bakterien:

Das Bakterienpellet wurde aufgetaut und in ¹/₂₀ Volumen der Ausgangskultur Aufschlusspuffer resuspendiert. Die Suspension wurde 10-20 min bei 22-25 °C auf einem Rollinkubator inkubiert und anschließend auf Eis mit wenigen, möglichst kurzen Ultraschallstößen sonifiziert. Nach der Sonifikation wurde die Suspension weitere 20 min rollend bei 22-25 °C inkubiert. Dieser Schritt sollte die Micellen auflösen, die sich bei der Sonifikation bilden und Proteine einschließen konnten. Vor der anschließenden 15-minütigen Zentrifugation bei 10000 g und 4 °C wurde eine Probe abgenommen, die separat zentrifugiert wurde. Pellet und Überstand der Probe wurden getrennt bei -20 °C aufbewahrt ("Sonifikat Pellet" und "Sonifikat Überstand") und dienten als Kontrollen, wie gut sich das Protein aus den Bakterien hatte gewinnen lassen. Der Überstand der zentrifugierten Suspension wurde für die Reinigung verwendet, das Pellet konnte verworfen werden.

Reinigung nach der Batch-Methode:

Der Überstand wurde mit der entsprechenden Menge der vorbereiteten Bulk-Matrix vermischt und die Mischung dann 30 min bei 22-25 °C unter Rollen inkubiert. Anschließend wurde 5 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert. Vom Überstand wurde eine Probe ("Durchlauf") für die Analyse in der SDS-PAGE abgenommen, der Rest wurde verworfen. Es folgten 3 Waschschritte mit jeweils dem 10fachen Säulenvolumen kaltem PBS. Nach jedem Waschschritt wurde 5 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände der Waschschritte wurden gesammelt und für die Analyse im SDS-Gel ("W1-3") aufbewahrt. Anschließend wurde das an die Sepharose-Matrix gebundene Fusionsprotein eluiert. Dazu wurde pro Elutionsschritt 1 Säulenvolumen Elutionspuffer zugegeben und gemischt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 22-25 °C wurde 5 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand, der das gereinigte Fusionsprotein enthielt, abgenommen. Es wurde 3- bis 5-mal eluiert und die Elutionen getrennt aufbewahrt ("E1"-"E5"). Kurzfristig wurden die Proben bei 4 °C, längerfristig bei -20 °C gelagert.

Proben für die SDS-PAGE:

Die Pellets der Proben aus Kultur und Sonifikat wurden in der entsprechenden Menge SDS-Probenpuffer aufgenommen (1 ml Probe \Rightarrow 1 ml Probenpuffer), von den Überständen, Wasch- und Elutionsfraktionen wurden jeweils 10 µl mit 10 µl Probenpuffer vermischt und die Hälfte davon dann aufgetragen.

Bestimmung der Proteinkonzentration:

Die Konzentration des Fusionsproteins in den Elutionsfraktionen kann näherungsweise über die E_{280} , die Extinktion der Lösung bei 280 nm, bestimmt werden. Für GST allein wurde ermittelt, dass eine E_{280} von 1 einer Konzentration von ca. 0,5 ^{mg}/_{ml} entspricht. Die Ausbeuten aus den Reinigungen wurden alle auf diese Weise bestimmt. Alternativ ist eine Konzentrationsbestimmung über SDS-PAGE möglich (siehe 3.4.9).

3.4.7 Herstellung und Aufreinigung eines Proteins mit einem His-Tag

Für die Herstellung und Expression eines Proteins mit "His-Tag" wurde der Vektor pET21a der Firma Novagen verwendet. Wird die cDNA eines Proteins in diesen Vektor inseriert, so wird N-terminal ein "T7-Tag" und C-Terminal ein Anhang aus sechs Histidinen angefügt. Das "T7-Tag" lässt sich über Klonierung mit dem Restriktionsenzym NdeI entfernen (siehe auch 2.2.1). Über die sechs Histidine ist eine Aufreinigung z.B. über Ni-NTA-Agarose möglich.

3.4.7.1 Expression des Proteins in Bakterien

Auch für die Expression eines Proteins mit "His-Tag" wurde der Bakterienstamm *E. coli* BL21-CodonPlus[™](DE3)-RIL verwendet. Die Durchführung entspricht der unter 3.4.6.1 beschriebenen zur Expression eines GST-Fusionsproteins.

3.4.7.2 Aufreinigung unter nicht-denaturierenden Bedingungen

Lösungen:

• Ni-NTA-Agarose (Qiagen)

•	Lysispuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄
		300 mM NaCl
		1 % Triton X-100
		⇔ pH 7,8
•	Waschpuffer (nicht denaturierend):	Lysispuffer ohne Triton + 10 % (v/v) Glycerin Verschiedene pH-Werte einstellen: ⇒ pH 6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0
•	N	1 M Trig/HCl pH 0 5

Vorbereitung der Säule:

Die Reinigung von Proteinen über ein "His-Tag" wurde immer mit Hilfe von Säulen durchgeführt. Für die Reinigung eines Proteins aus einer 200- bis 400-ml-Kultur wurden 4-6 ml Originalsuspension der Ni-NTA-Agarose (Qiagen) in eine entsprechende Säule pipettiert (ergibt ein Säulenvolumen von 2-3 ml). Die Flüssigkeit wurde durchlaufen gelassen und verworfen. Die Säule wurde mit mindestens 20 ml Lysispuffer gewaschen und äquilibriert. Danach war die Säule fertig und konnte beladen werden. Beim Zugeben neuer Pufferlösung musste darauf geachtet werden, dass das Säulenmaterial nicht zu stark aufgewirbelt wird. Außerdem musste ein Trockenlaufen der Säule vermieden werden.

Aufschluss der Bakterien:

Die Pellets der induzierten Bakterien wurden aufgetaut und vorsichtig in 2-5 ml Lysispuffer pro Gramm Pellet (\approx 5-10 ml pro 100 ml Kulturvolumen) resuspendiert, um Schaumbildung zu vermeiden. Das weitere Vorgehen gleicht dem bei der Reinigung eines GST-Fusionsproteins (siehe 3.4.6.2).

Reinigung über die Ni-NTA-Agarose-Säule:

Der Überstand des zentrifugierten Sonikats wurde vorsichtig auf die äquilibrierte Säule gegeben. Ein Teil des Durchlaufs wurde gesammelt, um die Bindung des Proteins an die Säule überprüfen zu können, der Rest wurde verworfen. Anschließend folgte die Reinigung des Proteins über einen diskontinuierlichen pH-Gradienten nach folgendem Protokoll.

Protokoll einer Proteinreinigung über "His-Tag" unter nicht-denaturierenden Bedingungen:

	5-10 ml	Probe	⇒	einen Teil aufbewahren, den Rest verwerfen
\triangleright	15 ml	Waschpuffer pH 6,0	⇔	komplett sammeln
۶	5 ml	Waschpuffer pH 5,5		
\triangleright	3 ml	Waschpuffer pH 5,0		
\triangleright	3 ml	Waschpuffer pH 4,5		r in Aliqueta è 1 ml commeln
\succ	3 ml	Waschpuffer pH 4,0	ſ	
\triangleright	3 ml	Waschpuffer pH 3,5		
\triangleright	3 ml	Waschpuffer pH 3,0	J	

Zu jeder Fraktion wurde 1/10 Volumen Neutralisierungspuffer gegeben bzw. vorgelegt, um eine mögliche saure Hydrolyse des eluierten Proteins unter den gegebenen pH-Bedingungen zu verhindern. Die Fraktionen wurden in Aliquots zu je 1 ml aufgefangen, um den Zeitpunkt der Elution des Proteins besser eingrenzen zu können, was eine höhere Reinheit und Proteinkonzentration bewirkt. Bei der Durchführung musste, wie bei der Beschreibung der Säulenherstellung bereits erwähnt, darauf geachtet werden, dass die Säule nicht trockenläuft und dass bei Zugabe neuen Puffers das Säulenmaterial nicht zu stark aufgewirbelt wird.

Nach der Elution wurde die Säule mit mindestens 40 ml Lysispuffer gewaschen. Die Säule konnte einige Wochen bei 4 °C in Lysispuffer gelagert werden und es konnten mehrere Reinigungen damit durchgeführt werden. Die Lagerung der gereinigten Proteine erfolgte kurzfristig bei 4 °C, längerfristig bei -20 °C.

Proben für die SDS-PAGE:

Von allen Fraktionen, inklusive "Sonifikat", "Sonifikat Pellet" und "Durchlauf", wurde soviel abgenommen, was relativ zum Volumen der Bakterienkultur 500 µl entspricht. Das bedeutet bei einer 200-ml-Kultur, dass von jeder Fraktion folgender Anteil abgenommen wurde:

$$\frac{200000\,\mu l}{500\,\mu l} = 400 \Longrightarrow \frac{1}{400}$$
 einer jeden Fraktion wurde als Probe verwendet

Die entsprechenden Volumina wurden abgenommen und für die SDS-PAGE vorbereitet. Je nach Volumen wurde sie entweder direkt mit Probenpuffer versetzt oder zunächst mit Methanol/Chloroform gefällt (siehe 3.4.10.1) und dann in Probenpuffer gelöst.

Bestimmung der Proteinausbeute:

Zunächst wurde die Konzentration entweder näherungsweise über die E_{280} (vgl. 3.4.6.2) oder über SDS-PAGE bestimmt (vgl. 3.4.9) und diese dann mit den Volumina der Elutionsfraktionen verrechnet.

3.4.7.3 Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen

Lösungen:

•	Puffer A (Lysispuffer):	100 mM NaH ₂ PO ₄
		10 mM Tris/HCl
		8 M Harnstoff
		⇒ pH 8,0
•	Puffer B (Waschpuffer):	wie Puffer A
		⇒ pH 6,3
•	Puffer C (Waschpuffer):	wie Puffer A
		⇔ pH 5,9
•	Puffer D (Waschpuffer):	wie Puffer A
		⇔ pH 4,5
•	Neutralisierungspuffer:	1 M Tris/HCl pH 9,5

Vorbereitung der Säule:

Die Vorbereitung der Säule und die Menge des benötigten Säulenmaterials entsprechen denen bei nicht-denaturierenden Reinigungsbedingungen. Vor dem Beladen mit der Probe wurde die Säule mit mindestens 20 ml Puffer A äquilibriert.

Aufschluss der Bakterien:

Die Pellets der induzierten Bakterien wurden aufgetaut und vorsichtig in 5 ml Puffer A pro Gramm Pellet ($\approx 5-10$ ml pro 100 ml Kulturvolumen) resuspendiert. Beim Resuspendieren sollte darauf geachtet werden, dass nicht zuviel Schaum entsteht. Die Suspension wurde dann 30-60 min bei Raumtemperatur unter Rollen inkubiert. Optional kann die Lyse durch eine zusätzliche Sonifikation verbessert werden. Vor der anschließenden 15-minütigen Zentrifugation bei 10000 g und 4 °C wurde vom Lysat eine Probe abgenommen, die 500 µl der Ausgangs-Bakterienkultur entspricht (siehe auch 3.4.6.2 und 3.4.7.2) und separat zentrifugiert.

Reinigung über die Ni-NTA-Agarose-Säule:

Der Überstand des zentrifugierten Sonifikats wurde vorsichtig auf die äquilibrierte Säule gegeben. Ein Teil des Durchlaufs wurde gesammelt, um die Bindung des Proteins an die Säule überprüfen zu können, der Rest wurde verworfen. Anschließend folgte die Reinigung des Proteins über einen diskontinuierlichen pH-Gradienten nach folgendem Protokoll.

Protokoll einer Proteinreinigung über "His-Tag" unter denaturierenden Bedingungen:

۶	5-10 ml	Probe	⇔	einen Teil aufbewahren, den Rest verwerfen
۶	40 ml	Puffer A pH 8,0	⇔	komplett sammeln
۶	15 ml	Puffer B pH 6,3	٦	
\triangleright	10 ml	Puffer C pH 5,9	}	\Rightarrow in Aliquots à 1 ml sammeln
≻	10 ml	Puffer D pH 4,5	J	

Zu jeder Fraktion ab pH 6,3 und darunter wurde 1/10 Volumen Neutralisierungspuffer zugegeben bzw. vorgelegt. Auch hier wurden kleine Aliquots à 1 ml aufgefangen, um den Zeitpunkt der Elution besser eingrenzen zu können (siehe auch 3.4.7.2). Die gereinigten Proteine konnten im Harnstoffpuffer mittelfristig bei 4 °C und längerfristig bei -20 °C gelagert werden.

Proben für die SDS-PAGE und Bestimmung der Proteinausbeute:

Die Proben für die Analyse der Reinigung in der SDS-PAGE und die Ermittlung der Proteinausbeute erfolgten analog wie bei einer Reinigung unter nicht-denaturierenden Bedingungen (siehe 3.4.7.2).

3.4.8 Dialyse von Proteinen

Es ist häufig der Fall, dass der Puffer, in dem das Protein nach der Reinigung vorliegt, inkompatibel zu einem Folgeexperiment ist. Die Dialyse ist eine einfache Möglichkeit, um das Protein von einem Puffer A in einen Puffer B zu überführen. Das Protein in Puffer A wird in einen Dialyseschlauch gefüllt, durch dessen Wand nur sehr kleine Moleküle passen (auf jeden Fall muss die Porengröße so gewählt werden, dass das Protein nicht durchpasst). Der Schlauch wird in ein Gefäß gegeben, das ungefähr das 2000fache Volumen Puffer B enthält; dadurch wird Puffer A extrem stark verdünnt, was dazu führt, dass das Protein am Ende der Dialyse (fast) ausschließlich in Puffer B vorliegt.

Durchführung:

Der Schlauch musste zunächst 30-60 min lang in 2 mM EDTA (pH 8,0) gekocht werden. Dann wurde er an einem Ende durch einen Knoten verschlossen. Anschließend wurde die Proteinlösung eingefüllt und der Schlauch auch am anderen Ende verschlossen. Ein Ende des Schlauches wurde so an einem Schwimmer befestigt, dass das andere Ende des Schlauches nicht den Gefäßboden berührte. Die Dialyse erfolgte unter Rühren über Nacht bei 4 °C im Kühlraum.

3.4.9 Bestimmung der Proteinkonzentration im SDS-Gel

Um die ungefähre Konzentration eines gereinigten und dialysierten Proteins zu bestimmen, wurden unterschiedliche Volumina der zu bestimmenden Proteinlösung im SDS-Gel mit BSA-Standards (bovines Serumalbumin) verglichen.

3.4.10 Fällung von Proteinen

3.4.10.1 Proteinfällung mit Methanol und Chloroform

Ausgangsmenge für den Standard-Ansatz waren 400 μ l wässrige Proteinlösung, kleinere Volumina wurden entsprechend auf 400 μ l mit H₂O bidest. aufgefüllt; für größere Volumina wurden die Puffermengen entsprechend hochgerechnet. Zu diesen 400 μ l Proteinlösung wurden 400 μ l Methanol (100 %, p.a.) und 300 μ l Chloroform (100 %, p.a.) zugegeben; bei Zugabe des Chloroforms wurde die Lösung trübe. Der Ansatz wurde durch Schütteln vermischt und anschließend bei 13000 rpm für 5 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen (die Proteine befinden sich in der weißlichen Interphase). Zum Rest wurden 300 μ l Methanol (100 %, p.a.) gegeben, das Ganze vorsichtig vermischt und bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet kurz luftgetrocknet und dann in entsprechender Menge Probenpuffer für die SDS-PAGE aufgenommen. Bei schwerlöslichen Pellets wurde zunächst in einer kleinen Menge (2-4 μ l) 2 M Harnstoff vorgelöst und dann erst Probenpuffer zugegeben. Die Proben wurden so lange bei 95 °C inkubiert, bis sich das Pellet vollständig gelöst hatte, dann konnten die Proben bei -20 °C langfristig gelagert werden.

3.4.10.2 Proteinfällung mit Aceton

Zu einer proteinhaltigen Lösung wurden 6,5 Volumina Aceton (100 %, p.a., -20 °C) zugegeben, die Mischung mindestens 30 min bei -20 °C inkubiert (besser über Nacht) und dann bei 10000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet 2-mal mit 70% igem Aceton (p.a., -20 °C) gewaschen. Dabei wurde jeweils unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde schließlich wie unter 3.4.10.1 beschrieben in Probenpuffer gelöst.

3.4.11 Affinitätsreinigung eines Antiserums

3.4.11.1 Affinitätsreinigung über Western Blot

Lösungen:

- TBST (siehe 3.4.4.1)
- Absättigungspuffer: TBST + 10 % (w/v) Milch (oder 3 % BSA; siehe 3.4.4.1)
 Elutionspuffer: 100 mM Glycin pH 2,5
 Neutralisierungspuffer: 1 M Tris/HCl pH 9,5

Durchführung:

Für eine Affinitätsreinigung über Western Blot wurde zunächst eine SDS-PAGE gefahren (siehe 3.4.1), bei der in nur einer Spur (Sammelgel mit einer einzelnen, breiten Tasche) gereinigtes Protein aufgetrennt worden ist, gegen das ein Antikörper aufgereinigt werden sollte. Die Proteine wurden wie

unter 3.4.4.1 beschrieben geblottet und mit Ponceau S gefärbt. Dann wurde die gewünschte Proteinbande mit Kugelschreiber oder Bleistift markiert. Nach dem Absättigen wurde 3 h mit dem Antiserum (Verdünnung etwa 10-100fach höher als normal) inkubiert. Der Blot wurde gewaschen, die Bande ausgeschnitten und fein zerstückelt. Die kleinen Stücke wurden in ein Eppendorf-Gefäß überführt und zum Strippen des Blots 500 µl Elutionspuffer zugegeben. Nach 10 min Inkubation unter Schütteln wurde 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und sofort mit 50 µl Neutralisierungspuffer vermischt. Diese Lösung konnte direkt als Antiserum verwendet werden; die geeigneten Verdünnungen mussten empirisch ermittelt werden. Das Pellet wurde mit TBST gewaschen und konnte für eine weitere Reinigung eingesetzt werden.

3.4.11.2 Affinitätsreinigung über eine Matrix aus CNBr-Sepharose

Lösungen:

•	CNBr-Sepharose (Pulver, Sigma):	
	⇒ Eigenschaften:	➤ 100 mg Pulver ergeben ~350 µl Säulenvolumen
		Bindungskapazität beträgt 25-60 mg
		α-Chymotrypsinogen pro Milliliter Säulenvolumen
•	Quellungspuffer:	10 mM HCl
•	Bindungspuffer (pH 8,8):	200 mM NaHCO ₃
		500 mM NaCl
		\Rightarrow pH 8,8 mit Na ₂ CO ₃
•	Absättigungspuffer:	Bindungspuffer + 200 mM Glycin
•	Waschpuffer 1 (pH 4,0):	100 mM Na-Acetat
		500 mM NaCl
		⇔ pH 4,0 mit Essigsäure
•	Waschpuffer 2 (pH 6,8):	100 mM Glycin
		⇒ pH 6,8
•	PBS (siehe 3.2)	
•	PBS + 0,1 % Triton X-100	
•	PBS + 300 mM NaCl	
•	Elutionspuffer:	100 mM Glycin pH 2,5
•	Neutralisierungspuffer:	1 M Tris/HCl pH 9,5

Durchführung:

Herstellung der Säule:

Das zu bindende Antigen sollte in Bindungspuffer vorliegen, eventuell muss vorher entsprechend gegen Bindungspuffer dialysiert werden (siehe 3.4.8). Die entsprechende Menge Säulenmaterial wurde zunächst in einem 15-ml-Röhrchen mit 1-5 ml Quellungspuffer gequollen. Anschließend wurde 1 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig und möglichst vollständig abgenommen (Vorsicht: die Sepharose wird sehr leicht mit abgesaugt) und verworfen. Danach wurde direkt das zu bindende Protein in Bindungspuffer zugegeben, das Ganze gründlich vermischt und 3 h bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 4 °C) auf dem Rollinkubator inkubiert. Nach einer anschließenden 1-minütigen Zentrifugation bei 500 g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Die Säule wurde dann 2-3 h bei Raumtemperatur unter Rollen in Absättigungspuffer inkubiert. Nach einer Zentrifugation unter den oben beschriebenen Bedingungen wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Die Säule wurde zunächst mit Waschpuffer, dann mit Bindungspuffer gewaschen. Diese beiden Schritte wurden 5-mal wiederholt. Abschließend wurde noch 2-mal mit PBS gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschritten wurde jeweils unter den oben beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Die Säule wurde bei 4 °C in PBS gelagert. Zur Stabilisierung der gebundenen Proteine wurde Natriumazid (NaN₃) in einer Endkonzentration von 0,01 % zugegeben.

Kurzprotokoll der Säulenherstellung:

- Zwischen den Schritten wurde immer 1 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert
- Gefriergetrocknete CNBr-Sepharose in 1-5 ml Quellungspuffer quellen lassen; Überstand verwerfen
- Zugabe des zu bindenden Antigens (muss in Bindungspuffer vorliegen, evtl. dialysieren) und Inkubation bei RT für 3 h (oder über Nacht bei 4 °C)
- 2-3 h bei RT mit Absättigungspuffer freie Bindungsstellen absättigen
- Waschen mit Waschpuffer
- Waschen mit Bindungspuffer 5x
- 2x waschen mit PBS •
- Lagerung bei 4 °C in PBS + 0,01 % NaN₃

Affinitätsreinigung:

Direkt vor Gebrauch wurde die Säule nochmals mit PBS gewaschen. Die Säule wurde für die Bindung der Antikörper in ein 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend wurde das Antiserum in geeigneter Verdünnung in PBS für 3 h bei Raumtemperatur unter Rollen inkubiert, um eine ständige Durchmischung zu gewährleisten. Je nach Antikörper kann zur Stabilisierung der Proteine BSA zugegeben werden (0,5 % Endkonzentration, Sigma).

Nach der Bindung der Antikörper wurde die Säule zum Waschen wieder in ein 15-ml-Röhrchen überführt. Gewaschen wurde 2-mal mit PBS, gefolgt von zwei Waschschritten mit PBS + 0,1 % Triton. Danach folgten zwei Waschschritte mit PBS + 300 mM NaCl, bevor 2-mal mit PBS und schließlich 2mal mit Waschpuffer 2 gewaschen wurde. Beim zweiten Waschschritt mit Glycin-Puffer wurde die Säule wieder in ein 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Zwischen allen Waschschritten wurde wie bei der Säulenherstellung beschrieben zentrifugiert. Im Anschluss wurden die gebundenen, spezifischen Antikörper von der Säule eluiert. Die Elution erfolgte mit jeweils 200-300 µl Elutionspuffer durch ständiges Auf- und Abpipettieren für 30 Sekunden. Nach einem folgenden Zentrifugationsschritt für 1 min bei 500 g und 4 °C wurde der Überstand, der den gereinigten Antikörper enthält, vorsichtig abgenommen und in ein auf Eis vorgekühltes Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Neutralisierung des pH-Werts in den Elutionsfraktionen wurde jeweils 1/10 Volumen Neutralisierungspuffer zugegeben bzw. vorgelegt. Standardmäßig wurden 6 Elutionsfraktionen gesammelt, die dann zur Stabilisierung der Antikörper mit 0,01 % Natriumazid (NaN₃, Endkonzentration) versetzt wurden. Je nach Antikörper kann zusätzlich noch BSA (Sigma) in einer Endkonzentration von 0,5 % zugegeben werden. Die Lagerung der affinitätsgereinigten Antikörper war bei 4 °C 2-6 Wochen möglich, wobei die Haltbarkeit stark vom gereinigten Antiserum abhängt. Die Reinigung wurde über Immunfluoreszenzen auf Gefrierschnitten bzw. Gewebeabklatschen (siehe 3.5.6) getestet. Die geeigneten Verdünnungen für Immunfluoreszenzen oder Western Blot mussten empirisch ermittelt werden.

Die Säule wurde im Anschluss an die Elution wieder in ein 15-ml-Röhrchen überführt und nochmals 10 min in Elutionspuffer inkubiert, bevor sie 3-mal mit PBS gewaschen worden ist. Die Säule konnte mehrfach für eine Affinitätsreinigung verwendet werden und wurde bei 4 °C in PBS + 0,01 % Natriumazid gelagert, was 4-6 Wochen möglich war.

Kurzprotokoll der Affinitätsreinigung:

- Zwischen den Schritten wurde immer 1 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert
- Säule 1- bis 2-mal waschen mit PBS
- Zugabe des Antiserums (200-250 μl Serum ad 1000 μl mit PBS) und Inkubation für 3 h bei RT; bei B3-Serum: zunächst 2 h auf GST-, dann 3 h auf B3NT-GST-Säule)
- 2x waschen mit PBS
- 2x waschen mit PBS + 0,1 % Triton
- 2x waschen mit PBS + 300 mM NaCl
- 2x waschen mit PBS
- 2x waschen mit 100 mM Glycin pH 6,8
- 6x eluieren mit jeweils 200 µl Elutionspuffer durch 30-sekündiges Auf- und Abpipettieren
- Zugabe von 1/10 Volumen Neutralisierungspuffer zu den Antikörperelutionen
- Zugabe von 0,01 % NaN₃ (Endkonzentration) und Lagerung bei 4 °C
- Säule 10 min in Elutionspuffer inkubieren, danach 3x mit PBS waschen, danach Lagerung bei 4 °C in PBS + 0,01 % NaN₃

Angaben für das Antiserum gegen Lamin B3:

Für das Antiserum gegen Lamin B3 wurden die besten Ergebnisse erzielt, wenn 200-250 µl Rohserum mit PBS auf 1000 µl aufgefüllt und über eine 500-µl-Säule gereinigt wurden. Gereinigt wurde das Serum sequentiell über zwei Säulen: an die erste Säule war gereinigtes GST-Protein gekoppelt, an die zweite gereinigtes B3NT-GST-Fusionsprotein. Das Rohserum wurde zunächst 2 h mit Säule 1, dann anschließend 3 h mit Säule 2 inkubiert. Eluiert wurde meist mit 200 µl Elutionspuffer. Die Verdünnungen für die Fluoreszenz lagen bei etwa 1:5 bis 1:10, für den Western Blot zwischen 1:200 und 1:1000, wobei die Elutionsfraktionen 3 und 4 in der Regel die besten Ergebnisse lieferten. Weder für die Reinigung noch für die Lagerung dieses Serums darf BSA verwendet werden.

3.4.12 Salzextraktion

Die Löslichkeit bzw. die Resistenz einiger Proteine gegen höhere Salzkonzentrationen ist eine charakteristische Eigenschaft insbesondere bei Strukturproteinen, wie z.B. Bestandteilen des Zytoskeletts oder der Kernlamina.

Lösungen:

•	PBS (siehe 3.2):	 + 1 mM PMSF (vgl. Puffer 1; siehe nächste Seite) + 0,5 mM DTT (vgl. Puffer 1)
•	SL DNase I:	50 ^{mg} / _{ml} in 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 1 mM MgCl ₂ 50 % (v/v) Glycerin ⇒ bei -20 °C aufbewahren (max. 3-4 Wochen!)
•	Proteinase-Inhibitoren-Mix: (nach Dhadialla und Raikhel, 1990)	 5 mM α-Aminocopronsäure 1 mM Benzamidin 1 mM EDTA 2 ^{μg}/_{ml} Aprotinin 2 ^{μg}/_{ml} Antipain 2 ^{μg}/_{ml} Chymostatin 2 ^{μg}/_{ml} Leupeptin
		2 ^{µg} / _{ml} Pepstatin ⇒ als SL (100x in H ₂ O) angesetzt

•	Puffer 1 (pH 7,4):	10 mM Tris/HCl pH 7,4
		0,1 % (v/v) Triton X-100
		3 mM EDTA (direkt vor Gebrauch zugeben;
		SL 200 mM in H ₂ O, pH 8,0)
		1 mM PMSF (direkt vor Gebrauch zugeben;
		SL 200 mM in 100 % Methanol; bei -20 °C)
		0,5 mM DTT (direkt vor Gebrauch zugeben;
		SL 1 M in H ₂ O; bei -20 °C)
		Inhibitoren-Mix $^{1}/_{100}$ verdünnt zugeben
•	Puffer 2 (pH 7,8):	10 mM Tris/HCl pH 7,4
		10 mM MgCl ₂ (vor Gebrauch zugeben)
		5 mM CaCl ₂ (vor Gebrauch zugeben)
		1 mM PMSF (vgl. Puffer 1)
		0,5 mM DTT (vgl. Puffer 1)
•	Puffer 3 (pH 7,4):	10 mM Tris/HCl pH 7,4
		4 M NaCl
		1 mM PMSF (vgl. Puffer 1)
		0,5 mM DTT (vgl. Puffer 1)
		Inhibitoren-Mix ¹ / ₅₀ verdünnt zugeben

3.4.12.1 Salzextraktion von Kulturzellen

Mit diesem Versuch wurden Unterschiede in der Löslichkeit verschiedener transfizierter und endogener Proteine in Kulturzellen untersucht. Verwendet wurden die aus Affen stammenden COS-7-Zellen, da diese die besten Transfektionsraten aufwiesen. Pro Ansatz wurden 2 Minischälchen (\emptyset 35 mm) angesetzt. Bei Transfektionen wurde in jede Schale 1 Deckgläschen gelegt, um die Transfektionsrate durch eine mikroskopische Analyse feststellen zu können. Die Puffer wurden immer direkt vor Benutzung vervollständigt, denn PMSF verliert seine Aktivität bei Raumtemperatur bereits nach 30 min. Puffer 1 muss auf Eis vorgekühlt werden, Puffer 2 und 3 sollten bei Verwendung etwa Raumtemperatur haben.

Zu Beginn wurde das Kulturmedium abgenommen und verworfen, bevor die Zellen vorsichtig mit 1 ml PBS pro Schale gewaschen worden sind. Zum Ernten der Zellen wurde zunächst pro Schale 1 ml PBS zugegeben, worin die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Schalenboden gelöst wurden. Durch zusätzliches Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vollständig vom Boden gelöst und außerdem weiter vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in ein 15-ml-Röhrchen gegeben, dann wurden die Kulturschalen mit insgesamt 1 ml PBS nachgespült, was ebenfalls in dieses Röhrchen gegeben wurde (Gesamtvolumen bei 2 Minischälchen: 3 ml). Die Suspension wurde gut durchmischt und dann gleichmäßig auf zwei 1,5-ml-Eppendorf-Gefäße verteilt. Das eine diente als unbehandelte Kontrolle, damit die Gesamtmenge des analysierten Proteins abgeschätzt werden konnte und somit das Ergebnis der Fraktionierung besser zu interpretieren war. Die Kontrollzellen wurden 30-60 sek bei 13000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge pelletiert, der Überstand verworfen und die Zellen schließlich in 2-4 μ l 2 M Harnstoff vorgelöst und dann durch Zugabe von 10 μ l SDS-Probenpuffer vollständig gelöst (so lange kochen, bis Lösung klar ist!).

Die andere Hälfte der Zellsuspension wurde zunächst 10 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen und das Pellet schließlich in 500 µl Puffer 1 resuspendiert. Die Suspension wurde 10 min auf Eis inkubiert, wobei regelmäßig durch Invertieren des Gefäßes gemischt wurde. Anschließend wurde 10 min bei 1600 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde als Probe (Überstand 1) gesammelt, das Pellet wurde in 500 µl Puffer 2 aufgenommen. Dann wurden 200 µg (4 µl der SL) DNase I direkt ins Gefäß gegeben und das Ganze durch Schütteln gut vermischt. Dabei sollte durch den Verdau der DNA nach kurzer Zeit das Pellet zerfallen. Dieser Schritt soll DNAbindende Proteine besser in Lösung bringen. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf dem Drehinkubator bei Raumtemperatur wurden 500 µl Puffer 3 zugegeben und weitere 10 min unter den gleichen Bedingungen inkubiert, bevor 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert worden ist. Der Überstand wurde gesammelt (Überstand 2) und das Pellet wurde, wie das Pellet der unbehandelten Kontrollzellen, in SDS-Probenpuffer aufgenommen und gelöst. Die Proteine der gesammelten Überstände wurden mit Methanol/Chloroform gefällt (siehe 3.4.10.1) und in insgesamt 10-15 µl SDS-Probenpuffer gelöst. Auch hier empfiehlt es sich, die Pellets in 2-4 µl 2 M Harnstoff vorzulösen. Sehr wichtig dabei ist, die Proben so lange zu behandeln, bis die Proteine vollständig gelöst sind (Lösung klar). Bei der Analyse des Experiments in der SDS-PAGE wurden alle Proben vollständig aufgetragen, was bedeutet, dass in den 3 Fraktionen der Salzextraktion insgesamt die gleiche Menge Protein vorhanden sein muss wie in der unbehandelten Kontrollgruppe.

3.4.12.2 Salzextraktion von Keimzellen

Um die Löslichkeit bestimmter Proteine in Keimzellen zu untersuchen, wurden 1-2 Mäuse wie unter 3.2.1 beschrieben getötet und die Hoden entnommen. Auch die Herstellung der Zellsuspension erfolgte weitgehend wie bei der Elutriation (siehe 3.2). Die Tunica albuginea wurde in kaltem PBS auf Eis von den Hoden entfernt und das Gewebe mit Hilfe zweier Rasierklingen zerkleinert. Durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren bzw. mit Hilfe einer Spritze ohne Kanüle wurden die Zellen weitgehend vereinzelt und die Suspension schließlich durch ein in PBS getränktes Nylonnetz (Maschenweite 25-30 μ m) filtriert. Nach Bestimmung der Zellzahl (siehe 3.2.5.1) wurde die Suspension ebenfalls halbiert, eine Hälfte für die Extraktion, die andere Hälfte als Kontrolle. Der Versuch wurde durchgeführt wie bei Kulturzellen. Bei mehr als 2·10⁷ Zellen (Gesamtzellzahl) muss mehr Puffer 1 verwendet werden. Dann musste für die Inkubation mit Puffer 1 ein Glasspitzröhrchen verwendet werden. Die Mengen der anderen Puffer blieben gleich. Beim Lösen der Pellets in SDS-
Probenpuffer wurde soviel Puffer verwendet, dass pro Mikroliter die Proteine aus $1 \cdot 10^5$ Zellen enthalten waren. Bei der SDS-PAGE wurden von den Proben dann 5 µl aufgetragen, was $5 \cdot 10^5$ Zellen entsprach.

3.4.13 Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion über einen "Pull-Down-Assay"

Über einen "Pull-Down-Assay" kann man relativ einfach und schnell eine mögliche Interaktion zweier Proteine nachweisen. Dazu wird eines der Proteine an einer Säulenmatrix immobilisiert, das andere in einem Extrakt dann mit dieser Matrix inkubiert. Nach Wasch- und Elutionsschritten wird dann bestimmt, ob eine Bindung vorliegt oder nicht. Dieser Assay bietet auch die Möglichkeit, ein unbekanntes Protein zu identifizieren, das mit einem spezifischen Protein interagiert. Dazu gibt man Gesamtzellextrakt über eine Säule, an die das Protein gekoppelt ist, nach dessen mögliche Interaktionspartnern gesucht werden soll.

Lösungen:

•	Lysispuffer:	50 mM Tris/HCl pH 7,4					
		300 mM NaCl					
		1 % (v/v) Triton X-100					
		Trypsin-Inhibitor (eine Spatelspitze zugeben am Tag des					
		Gebrauchs; nur bei Trypsin-Behandlung)					
		 50 mM Tris/HCl pH 7,4 300 mM NaCl 1 % (v/v) Triton X-100 Trypsin-Inhibitor (eine Spatelspitze zugeben am Ta Gebrauchs; nur bei Trypsin-Behandlung) 1 mM PMSF (SL 200 mM in Methanol; ¹/₂₀₀ verdü am Tag des Gebrauchs zugeben) 50 mM Tris/HCl pH 7,4 1 % (v/v) Triton X-100 Wie Lysispuffer, aber 150 mM NaCl (mit Verdünnungspuffer 1:1 verdünnter Lysispuffe Wie Lysispuffer, ohne Trypsin-Inhibitor 50 mM Tris/HCl pH 7,4 50 mM Tris/HCl pH 7,4 					
		am Tag des Gebrauchs zugeben)					
•	PBS (siehe 3.2)						
•	Verdünnungspuffer:	50 mM Tris/HCl pH 7,4					
		1 % (v/v) Triton X-100					
•	Waschpuffer:	Wie Lysispuffer, aber 150 mM NaCl					
		(mit Verdünnungspuffer 1:1 verdünnter Lysispuffer)					
•	Elutionspuffer 1:	Wie Lysispuffer, ohne Trypsin-Inhibitor					
•	Elutionspuffer 2:	50 mM Tris/HCl pH 7,4					
		500 mM NaCl					
		1 mM PMSF (SL 200 mM in Methanol; 1/200 verdünnt					
		am Tag des Gebrauchs zugeben)					

- Glutathion Sepharose[®] 4B (Amersham, 75% ige Suspension in 20 % Ethanol)
- Bakterienpellet mit induziertem GST und GST-Fusionsprotein
- Aufschlusspuffer für Bakterien (siehe 3.4.6.2)

3.4.13.1 Gewinnung des Proteinextrakts

Lösungen:

- Lysispuffer
- PBS (siehe 3.2)

Durchführung:

Die Zellen wurden durch eine Behandlung mit Trypsin (siehe auch 3.6.2) oder nach Entfernung des Kulturmediums in PBS mit Hilfe eines Zellschabers geerntet. Nach Bestimmung der Zellzahl (entweder mit einer Neubauer-Zählkammer (siehe 3.2.5.1) oder durch Abschätzen der Pelletgröße nach Zentrifugation) wurde 10 min bei 450 g und 4 °C zentrifugiert und das Pellet anschließend in 1 ml Lysispuffer pro 5.10⁶ Zellen resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch eine Inkubation der Suspension bei 4 °C unter ständiger Durchmischung für 20 min. Danach wurde bei 15000 g und 4 °C 15 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in Aliquots à 1 ml in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Extrakte konnten bei -70 °C mehrere Monate gelagert werden.

Für Extrakte aus Keimzellen wurden 10 Mäuse wie unter 3.2.1 beschrieben präpariert. Die Keimzellen aus den Hoden wurden über das kurze Elutriationsprotokoll angereichert (siehe 3.2.4.2) und wie für Kulturzellen beschrieben weiterverarbeitet (siehe oben).

3.4.13.2 Herstellung der Säule

Lösungen:

- Glutathion Sepharose[®] 4B (Amersham, 75% ige Suspension in 20 % Ethanol)
- Bakterienpellet mit induziertem GST und GST-Fusionsprotein
- Aufschlusspuffer für Bakterien (siehe 3.4.6.2)
- PBS (siehe 3.2)
- Waschpuffer (siehe 3.4.13)
- Elutionspuffer 2 (siehe 3.4.13)

Durchführung:

Gesucht wurde nach einem Protein, das mit Lamin B3 interagiert und spezifisch in Keimzellen exprimiert wird. Verwendet wurde ein Fusionsprotein aus dem B3-spezifischen N-Terminus und GST, das bereits zur Herstellung und Affinitätsreinigung des anti-B3-Antikörpers verwendet worden war. Für diesen Ansatz mussten vier Säulen eingesetzt werden. Zwei Säulen mit gebundenem B3NT-GST-Fusionsprotein, um sichergehen zu können, dass ein gefundener Interaktionspartner eine Keimbahn-spezifische Expression aufweist; eine Säule wird demnach mit Keimzellextrakt, die andere mit Extrakt aus somatischen 3T3-Zellen inkubiert. Zwei weitere Säulen mit derselben Extraktkombination, aber

mit gekoppeltem GST, wurden eingesetzt, um die spezifische Bindung an den N-Terminus von Lamin B3 zeigen und eine Bindung an den GST-Anteil ausschließen zu können.

Die induzierten Bakterien, die entweder B3NT-GST oder GST exprimiert hatten, wurden wie unter 3.4.6.2 beschrieben aufgeschlossen und die Proteine an die Sepharose-Matrices gebunden. Die Säulenvolumina betrugen für jedes Protein 200 µl (für zwei Säulen à 100 µl; die Säulen für die verschiedenen Extrakte wurden in einem Ansatz hergestellt, um identisches Ausgangsmaterial für den Bindungsassay zu erhalten). Im Anschluss an die Bindung der Proteine an die Sepharose wurde anstelle von PBS 3-mal mit Waschpuffer gewaschen. Nach Transfer der Sepharose in ein 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß folgte eine Inkubation für 30 min bei 4 °C auf dem Rollinkubator mit 800 µl Elutionspuffer 2. Nach Zentrifugation für 1 min bei 4 °C und 500 g (wie bei den Waschschritten auch) wurde der Überstand abgenommen und aufbewahrt (Weiterverarbeitung siehe 3.4.13.4). Die Säule wurde wieder in ein 15-ml-Röhrchen überführt und 3-mal mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurden die Säulen bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.4.13.3 Durchführung des Bindungsassays

Lösungen:

- Proteinextrakt (siehe 3.4.13.1)
- Waschpuffer (siehe 3.4.13)
- Verdünnungspuffer (siehe 3.4.13)
- Elutionspuffer 1 (siehe 3.4.13)
- Elutionspuffer 2 (siehe 3.4.13)

Durchführung:

Zuerst wurde der Proteinextrakt aufgetaut; pro Säule wurden vier Aliquots (= 4 ml) verwendet. Die Extrakte wurden 1:1 mit Verdünnungspuffer gemischt, damit die Salzkonzentration vor der Bindung auf 150 mM NaCl eingestellt war. Von diesen verdünnten Extrakten wurden jeweils 200 µl für die Analyse in der SDS-PAGE abgenommen. Die Säulen wurden nochmals mit Waschpuffer gewaschen und auf insgesamt vier Ansätze verteilt, bevor sie mit den verdünnten Extrakten bei 4 °C für 4 h unter Rollen inkubiert worden sind. Folgende vier Kombinationen wurden angesetzt:

- Keimzellextrakt auf B3NT-GST-Säule
- Keimzellextrakt auf GST-Säule
- 3T3-Zellextrakt auf B3NT-GST-Säule
- 3T3-Zellextrakt auf GST-Säule

Nach der folgenden Zentrifugation bei 500 g und 4 °C für 1 min wurden die Überstände abgenommen und verworfen, nachdem jeweils 200 µl des "Durchlaufs" für die Analyse in der SDS-PAGE

abgenommen worden waren. Dann wurden die vier Säulen je 4-mal mit 1-1,5 ml Waschpuffer gewaschen. Nach jedem Waschschritt wurde unter den oben angegebenen Bedingungen zentrifugiert. Von den Überständen aller vier Waschschritte wurden jeweils 200 µl für die Analyse in der SDS-PAGE abgenommen, der Rest wurde verworfen. Im Anschluss an die Waschschritte wurde mit jeweils 800 µl Elutionspuffer 1 bei 4 °C für 30 min eluiert. Die Überstände der nachfolgenden Zentrifugation unter obigen Bedingungen wurden gesammelt, dann wurde ein weiteres Mal mit 800 µl Elutionspuffer 2 unter denselben Bedingungen wie bei der ersten Elution eluiert. Nach der letzten Zentrifugation unter wieder denselben Bedingungen wurden die Überstände gesammelt und anschließend zusammen mit den anderen Proben und auch den Säulen für die Analyse in der SDS-PAGE vorbereitet (siehe 3.4.13.4).

3.4.13.4 Proben für die SDS-PAGE

Die Proben aus der Säulenherstellung sind lediglich für die Überprüfung des Bakterienaufschlusses und der Bindung der Proteine an die Säule. Vorbereitung der Proben und die Auftragsmengen sind unter 3.4.6.2 beschrieben. Die Proteine in der Elutionsfraktion direkt nach Vorbereitung der Säulen wurden mit Methanol/Chloroform gefällt (siehe 3.4.10.1), in SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 95 °C für 10 min denaturiert. Die gesamte Probe wurde aufs Gel aufgetragen.

Die Weiterverarbeitung der restlichen Proben des Bindungsassays verlief analog. Die Proteine aller gesammelten Überstände wurden mit Methanol/Chloroform gefällt und schließlich in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Auch in diesen Fällen wurden die Proben vollständig aufs Gel aufgetragen. Die Säulen wurden in jeweils 100 µl 2x Probenpuffer aufgenommen und bei 95 °C für 10 min denaturiert. Von diesen Proben wurden jeweils 2 µl aufgetragen.

3.5 Mikroskopie

3.5.1 Analyse von Fluoreszenzpräparaten am Epifluoreszenzmikroskop

Für die mikroskopische Analyse von Fluoreszenzpräparaten wurde ein Zeiss Axiophot HB050 mit Quecksilberlampe verwendet. Zur Dokumentation wurde ein digitales Kamerasystem der Firma Pixelfly verwendet (CCD-Sensor). Die erhaltenen Daten wurden mit Adobe Photoshop bearbeitet.

3.5.2 Analyse am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM)

Verwendet wurde ein konfokales Mikroskop des Typs TCS-SP der Firma Leica (Bensheim). Bei der konfokalen Mikroskopie wird ein im Präparat vorhandener Fluoreszenzfarbstoff durch einen Laserimpuls bei einer spezifischen Wellenlänge angeregt, worauf dieser seinerseits Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Dieses emittierte Licht wird durch eine Blende im optischen System des Mikroskops (das sog. Pinhole) zurück auf ein Kameraelement geleitet. Dieses Pinhole lässt fast ausschließlich emittiertes Licht der Fokusebene des Anregungslasers durch. Dadurch kann man mit einem konfokalen Mikroskop optische Schnitte durch ein Präparat legen, die als Ergebnis ein Bild liefern, das neben einer guten Auflösung in den x- und y-Ebenen auch eine gute Auflösung in der z-Ebene besitzt.

Angeregt wurden die Fluorochrome durch einen Ar/Kr-Laser bei 488 nm für EGFP, Cy2 oder SYTOX[®] Green (Molecular Probes) und bei 568 nm für TRITC, Texas Red, Cy3 oder Propidiumiodid (Applichem). Einfache optische Schnitte wurden aufgenommen entweder unter Verwendung des 40 x (N.A. = 1,25) oder eines 63 x (N.A. = 1,4) Neofluar Ölimmersionsobjektivs. Dabei wurde bei einem Pinhole zwischen 0,4 und 0,7 4- bis 8fach akkumuliert (senkt den Hintergrund durch unspezifisch auftretende Fluoreszenzsignale). Wurden im selben Präparat mehrere Fluorochrome analysiert, wurden sie sequentiell aufgenommen, was ein Durchscheinen des einen Farbkanals, den sog. "Crosstalk", in den anderen verhinderte.

3.5.3 Lebendbeobachtung von Zellen unter dem Mikroskop

3.5.3.1 Herstellung von Lebendbeobachtungskammern

Um lebende Zellen an einem Mikroskop zu beobachten, wurden Lebendbeobachtungskammern hergestellt. Dazu wurde zunächst auf einen Objektträger (OT) mit Folienstift der Umriss eines Deckgläschens gezeichnet. Dieser OT diente als Vorlage. Auf diese Vorlage wurde ein frischer OT gelegt und dann mit Fixogum (ein elastischer Montagekleber der Firma Marabu) ein an einer Seite offener Ring mit der Größe eines Deckgläschens aufgetragen. Zur besseren Dosierung des Klebers wurde eine abgeschnittene gelbe Pipettenspitze auf die Fixogum-Tube gesteckt. Nach einer Trockenzeit von 5-10 min konnten die Kammern benutzt werden.

3.5.3.2 Analyse unter dem Mikroskop

Für die *in-vivo*-Lokalisation von EGFP-Fusionsproteinen wurden 7 µl Zellkulturmedium in den Ring einer Lebendbeobachtungskammer pipettiert und ein mit transfizierten Zellen bewachsenes und auf der nicht bewachsenen Seite sorgfältig abgewischtes Deckgläschen aufgelegt. Überschüssiges Medium wurde mit einer Pipette entfernt und das Deckgläschen mit einem geschlossenen Ring aus Fixogum abgedichtet. Das Fixogum sollte dann für mindestens 10 min trocknen. Wurden die Zellen ohne diese Wartezeit mit einem Ölobjektiv mikroskopiert, "schwimmt" das Deckgläschen. Das heißt, dass die Zellen ständig in Bewegung sind. Das ist vor allem bei Messreihen für FRAP oder FLIP (siehe 3.5.9 und 3.5.10) sehr störend. Die eingedeckelten Zellen waren bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von mindestens 2 h vital.

3.5.4 Fixierung von Zellen

3.5.4.1 Fixierung mit Formaldehyd

Durch die Behandlung mit Formaldehyd werden freie funktionelle Gruppen der zellulären Proteine chemisch vernetzt und dadurch fixiert.

Lösungen:

- PBS (siehe 3.2)
- 1-2 % Formaldehyd (v/v) in PBS pH 7,4

Durchführung:

Auf Deckgläschen kultivierte Zellen wurden kurz in PBS gewaschen und dann für 5-10 min bei Raumtemperatur in 2 % Formaldehyd in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen kurz in PBS gewaschen. Die Zellen durften nicht austrocknen und wurden je nach Experiment sofort weiterverarbeitet.

3.5.4.2 Fixierung mit Methanol/Aceton

Lösungen:

- PBS (siehe 3.2)
- Methanol (100 %, p.a., -20 °C)
- Aceton (100 %, p.a., -20 °C)

Durchführung:

Auf Deckgläschen kultivierte Zellen wurden kurz in PBS gewaschen und dann 3 min bei -20 °C in Methanol inkubiert. Nach einer folgenden Inkubation für 5-7 min in Aceton bei -20 °C wurden die Zellen luftgetrocknet und konnten so einige Tage aufbewahrt werden.

3.5.5 Immunfluoreszenz bei Kulturzellen

Lösungen:

- PBS (siehe 3.2)
- 1-2 % Formaldehyd in PBS pH 7,4 (alternativ: 1-2 % PFA (w/v) in PBS pH 7,4; zum Lösen

auf 65 °C erhitzen!)

- 0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS pH 7,4
- 100 mM Glycin in PBS pH 7,4 (optional)

• PBT (Blockpuffer; optional):

PBS pH 7,4 + 1,5 % BSA + 0,1 % Tween 20

- Primär- und Sekundärantikörper (Verdünnung in PBS; siehe 2.1.4)
- Hoechst 33258 (SL 5^{µg}/_{ml}; Roche) od. SYTOX[®] Green S-7020 (SL 500 nM; Molecular Probes)
- Mowiol: 10 g Mowiol (Hoechst) in 40 ml KH₂PO₄-freiem PBS (pH 8,0) 16 h rühren; 20 ml Glycerin zugeben und nochmals 16 h rühren; ungelöste Partikel abzentrifugieren und Überstand aliquotiert bei -20 °C aufbewahren.

Durchführung:

Vor Beginn der Immunlokalisation wurden die auf Deckgläschen gezogenen Zellen 5-10 min mit Formaldehydlösung fixiert (siehe auch 3.5.4.1). Danach wurden die Zellen durch eine 10-minütige Inkubation mit Triton permeabilisiert, damit die Antikörper in die Zellen gelangen können. Bei Fixierung mit Methanol/Aceton fixiert (siehe 3.5.4.2), müssen die Zellen nicht permeabilisiert werden. Bevor die Deckgläschen in eine Feuchtkammer überführt wurden, wurde optional 10 min mit Glycinpuffer inkubiert, um den Hintergrund zu minimieren, insbesondere nach Fixierung mit Formaldehyd. Nach diesem Absättigungsschritt folgte die Inkubation für 30 min mit dem primären Antikörper in geeigneter Verdünnung (siehe 2.1.4). In einigen Fällen wurde vor der Antikörperinkubation ein weiterer optionaler Absättigungsschritt eingeschoben: eine 30-minütige Inkubation mit PBT. Bei Antikörpern, die in Anwesenheit von BSA keine sauberen Signale liefern, wie beispielsweise das Antiserum gegen Lamin B3, muss dieser Schritt weggelassen werden. Von dem verdünnten Primärantikörper wurden pro Deckglas 30-50 µl verwendet. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Deckgläschen 5-10 min in PBS gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper für 30 min inkubiert.

Die an FITC, Cy2, Texas Red oder Cy3 gekoppelten Sekundärantikörper wurden nach Herstellerangaben mit PBS verdünnt (siehe 2.1.4). Um DNA bzw. Zellkerne sichtbar zu machen, wurden der Sekundär-Antikörperlösung 10 min vor Ablauf der Inkubationszeit 10 µl Hoechst 33258 (5 ^{µg}/_{ml}) oder SYTOX[®] Green (500 nM) zugegeben. Nach Waschen in PBS (10 min) wurde die Rückseite der Deckgläschen vorsichtig mit einem fusselfreien Papiertuch getrocknet. Es wurde ein kleiner Tropfen Mowiol auf einen Objektträger gegeben und das feuchte Deckgläschen vorsichtig mit den Zellen nach unten darauf gelegt, um Lufteinschlüsse zu vermeiden.

Bei Doppelimmunfluoreszenzen wurde zunächst mit dem ersten, danach mit dem zweiten Primärantikörper inkubiert. Danach wurde ein Gemisch der entsprechenden Sekundärantikörper eingesetzt.

3.5.6 Immunfluoreszenz bei Gefrierschnitten und Gewebeabklatschen

3.5.6.1 Gewinnung und Vorbereitung des Gewebes

Lösungen:

- kaltes PBS (siehe 3.2)
- Methylbutan (mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt)

Durchführung:

Um Gewebe für die Immunlokalisation auf Gefrierschnitten oder Gewebeabklatschen zu erhalten, wurde zunächst eine Maus getötet und die Hoden (oder ein anderes Gewebe) entnommen (siehe 3.2.1). Ein Hoden wurde anschließend in eiskaltem PBS in 2-3 Stücke zerteilt und in auf etwa -150 °C mit flüssigem Stickstoff vorgekühltem Methylbutan eingefroren. Gelagert wurden die Gewebestücke in Methylbutan bei -70 °C. Bevor Schnitte angefertigt wurden, mussten die Gewebe mindestens über Nacht bei -70 °C liegen.

3.5.6.2 Anfertigung von Gefrierschnitten

Lösungen:

• Jung Einbettmedium für Gefrierschnitte (Leica Instruments GmbH)

Durchführung:

Es wurden 4-7 µm dicke Schnitte angefertigt. Zuerst wurde ein Tropfen Einbettmedium auf den vorgekühlten Objektteller gegeben. Darauf wurde dann das Gewebestück gelegt. Das Gewebe durfte auf keinen Fall vollständig im Medium eingebettet sein. Dann wurde das Gewebe zunächst angeschnitten, um einerseits einen guten Querschnitt zu bekommen, und andererseits das evtl. schlechter erhaltene, außen liegende Gewebe zu entfernen. Die Schnitte wurden durch langsames und gleichmäßiges Schneiden angefertigt und auf einen Objektträger übertragen. Danach wurden sie mindestens 10 min an der Luft getrocknet bevor sie weiterverarbeitet worden sind.

3.5.6.3 Anfertigung von Gewebeabklatschen

Die Gewebe wurden zunächst wie bei Gefrierschnitten (oder mit Rasierklinge) angeschnitten. Die Schnittfläche wurde leicht auf einen Objektträger gedrückt, wodurch einige Zellen haften blieben. Die Strukturerhaltung des Gewebes ist bei dieser Methode relativ schlecht und es gibt häufig Bereiche des Präparats mit mehreren Zellschichten. Dafür sind die Präparate einfach und sehr schnell anzufertigen.

3.5.6.4 Immunfluoreszenz bei Gefrierschnitten und Gewebeabklatschen

Die Immunlokalisation verläuft genau wie für Kulturzellen beschrieben. Auch die Schnitte bzw. Abklatsche wurden zunächst fixiert und anschließend mit Antikörpern behandelt. Bei Immunfluoreszenzen mit Gewebeproben wurde grundsätzlich 30-45 min mit Glycinpuffer abgesättigt.

3.5.7 Immunfluoreszenz auf Paraffinschnitten

3.5.7.1 Gewinnung und Einbettung des Gewebes

Lösungen:

- PBS (siehe 3.2)
- 1 % PFA (Paraformaldehyd; w/v) in PBS pH 7,4
- Ethanolreihe (50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %)
- tertiäres Butanol
- Paraffin (flüssig; bei 60 °C)

Durchführung:

Es wurde eine Maus getötet und die Hoden (oder anderes Gewebe) entnommen (siehe 3.2.1). Die Hoden wurden wie für Gefrierschnitte beschrieben zerkleinert und dann 3 h (oder über Nacht) bei Raumtemperatur mit 1 % PFA fixiert. Im Anschluss daran wurde das Gewebe zunächst 1 h in PBS gewaschen. Dann wurde das Gewebe zur langsamen und schonenden Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe von 50 % bis 90 % Ethanol jeweils 30 min und schließlich in 100 % Ethanol für 1 h inkubiert. Nach der Entwässerung wurde das Gewebe für 1 h in tertiäres Butanol überführt, bevor es über Nacht bei 60 °C in flüssigem Paraffin inkubiert worden ist. Dadurch wurde die im Gewebe vorhandene Flüssigkeit vollständig durch das Paraffin ersetzt. Am nächsten Tag wurde das Gewebe zum Aushärten in frisches Paraffin überführt. In Paraffin eingebettetes Gewebe kann bei 4 °C mehrere Jahre aufbewahrt werden.

3.5.7.2 Anfertigung von Paraffinschnitten

Der das Gewebe umgebende Paraffinblock wurde zugeschnitten, um das Gewebe weitestgehend vom Paraffin zu befreien. Dabei sollte in etwa eine konische Form entstehen. Der Paraffinblock wurde an der Unterseite erhitzt und auf einen Holzblock geklebt. Damit wurde er dann ins Schlittenmikrotom eingesetzt. Es wurden 2-6 µm dicke Schnitte angefertigt. Das Gewebe ließ sich besser schneiden, wenn es sich nicht zu stark erwärmt hatte. Die Schnitte wurden mit Hilfe eines feuchten Pinsels vorsichtig auf einen Objektträger mit einem kleinen Wassertropfen überführt, der zum Strecken der Schnitte auf eine 60 °C heiße Heizplatte gelegt wurde. Nachdem sich die Schnitte gestreckt hatten, wurde möglichst rasch das Wasser abgesaugt und die Objektträger nochmals auf die Heizplatte gelegt,

bis die Schnitte anfingen, leicht glasig zu werden. Anschließend mussten die Schnitte mindestens über Nacht austrocknen.

3.5.7.3 Immunfluoreszenz auf Paraffinschnitten

Lösungen:

- Xylol bzw. Roti[®]-Histol (Roth)
- Ethanolreihe (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %)
- H₂O bidest.
- Antigen Unmasking Solution (Vector Laboratories)
- PBS (siehe 3.2)
- Materialien und Lösungen für die Immunfluoreszenz (siehe 3.5.5)

Durchführung:

Die Schnitte wurden zunächst für 2 x 5 min in Roti[®]-Histol bzw. Xylol entparaffiniert und dann in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Dazu wurden die Schnitte zunächst 10 min in 100 % Ethanol inkubiert, dann in einer absteigenden Reihe je 90 sek in 90 % bis 60 % Ethanol. Nach einer Inkubation in 50 % Ethanol für 5 min wurden die Schnitte weitere 5 min in H₂O bidest. gewaschen (können auch länger im Wasser sein).

In der Zwischenzeit wurde die Antigen Unmasking Solution nach Herstellerangaben 1:100 verdünnt und im Autoklaven vorgeheizt (das Vorheizen am besten starten, wenn die Schnitte ins 90%ige Ethanol überführt werden). Die Schnitte wurden in die vorgeheizte Unmasking Solution überführt, das Ganze in den Autoklaven gegeben und 1 min autoklaviert. Die Schnitte werden in H₂O bidest. und PBS gewaschen, bevor anschließend mit der Immunlokalisation begonnen wurde. Das Protokoll setzte ein mit der Permeabilisierung durch 0,1 % Triton in PBS. Bei Paraffinschnitten wurde ebenfalls wie bei Gefrierschnitten immer mindestens 30 min mit Glycinpuffer geblockt und PBT verwendet, falls der Antikörper BSA-kompatibel war.

3.5.8 DNA-Färbung mit Propidiumiodid

Lösungen:

- PBS (siehe 3.2)
- 1-2 % Formaldehyd in PBS pH 7,4
- RNase A (100 $^{\mu g}/_{ml}$ in PBS; Lagerung bei 4 °C)
- 0,01 % Triton in PBS
- Propidiumiodid (SL 1 $^{mg}/_{ml}$ in H₂O bidest. [= 1,5 M]; Lagerung bei 4 °C; Applichem)

• Mowiol (siehe 3.5.5)

Durchführung:

Propidiumiodid färbt spezifisch Nukleinsäuren und ermöglicht die Färbung der Zellkerne bei einer Immunfluoreszenz mit einem roten Farbstoff. Die Durchführung der Färbung entspricht prinzipiell der bei den Farbstoffen Hoechst 33258 oder SYTOX[®] Green, nur muss bei Propidiumiodid vorher die RNA in der Zelle verdaut werden, da sonst außer dem Zellkern auch das gesamte Zytoplasma leuchtet. Nach Fixierung der Zellen oder Schnitte (siehe 3.5.4) werden sie 10 min mit Triton permeabilisiert (dieser Schritt ist bei Methanol/Aceton-Fixierung nicht notwendig). Anschließend wird die RNA durch eine Inkubation mit RNase A (100 ^{µg}/_{ml}) für 20 min bei 37 °C in einer Feuchtkammer verdaut. Nach einem kurzen Waschschritt wurde 5-10 min mit Propidiumiodid (Endkonzentration ≈ 330 ^{µg}/_{ml}; SL 1:3000 verdünnt in PBS) in einer Feuchtkammer gefärbt. Nach einem abschließenden Waschschritt wurde mit Mowiol eingedeckelt. Die Färbung lässt sich problemlos bei einer Immunfluoreszenz integrieren, der RNase-A-Verdau muss dabei direkt nach der Permeabilisierung erfolgen. Die Propidiumiodid-Lösung (330 ^{µg}/_{ml}) wird dann wie Hoechst 33258 oder SYTOX[®] Green direkt zum Sekundärantikörper gegeben.

3.5.9 FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

3.5.9.1 Experimentelles Prinzip

Die Methode wurde ursprünglich entwickelt, um die Dynamik membrangebundener Moleküle zu untersuchen (Axelrod et al., 1976). Die Entwicklung der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie hat es ermöglicht, die Untersuchungen auf intrazellulär lokalisierte Partikel auszudehnen. Für die Analyse der Dynamik eines spezifischen Proteins bedient man sich des bisher einzigen bekannten fluoreszierenden Proteins und der von ihm abgeleiteten Farbvarianten, dem "Green Fluorescent Protein" (GFP), das ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert worden war (zusammengefasst in Tsien, 1998).

Für die *in-vivo*-Markierung eines Proteins wird es als Fusionsprotein exprimiert, das EGFP ("enhanced green fluorescent protein", eine verbesserte GFP-Variante) beinhaltet und somit ohne eine Behandlung mit Antikörpern unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden kann. Zur Untersuchung der Dynamik des betreffenden Proteins wird nun durch eine Bestrahlung mit hoher Laserenergie das EGFP in einem bestimmten Bereich der Zelle irreversibel ausgebleicht (dabei wird nur das Chromophor, nicht aber das Protein selbst geschädigt), und anschließend wird die Erholung der Fluoreszenz innerhalb dieses Bereiches gemessen. Die Erholung der Fluoreszenz erfolgt ausschließlich aufgrund des Austausches gebleichter durch intakte EGFP-Fusionsproteinmoleküle.

3.5.9.2 Durchführung

Für Mobilitätsmessungen von EGFP-Fusionsproteinen wurden COS-7-Zellen auf Deckgläschen ausgesät, am nächsten Tag mit den entsprechenden Vektorkonstrukten transfiziert und am darauf folgenden Tag für die Messungen eingesetzt. Dazu wurden die Zellen in Lebendbeobachtungskammern eingedeckelt (siehe 3.5.3) und innerhalb der folgenden 30-60 min bei RT mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop der Firma Leica (TCS-SP) analysiert. EGFP-Fusionsproteinexprimierende Zellen wurden bei einer Wellenlänge von 488 nm (50 mW nominale Leistung, Pinhole = 0,7, 40 x Neofluar Ölimmersionsobjektiv, N.A. = 1,25), mit einem Ar/Kr-Laser analysiert. Für eine FRAP-Messung bei sich langsam erholenden Proteinen wurde zunächst eine 4fach akkumulierte Aufnahme der Zelle vor dem Bleichen gemacht ("prebleach scan"). Anschließend wurde ein Punkt mit einem Durchmesser von ~1 μ m durch Bestrahlung für 3 Sekunden mit den oben genannten Einstellungen gebleicht. Danach wurden in folgenden Abständen bei gleicher Laserpower mit 2facher Akkumulation Bilder aufgenommen: 20 Bilder im Abstand von 4 Sekunden, 10 Bilder im Abstand von 72 Sekunden, 20 Bilder im Abstand von 12 Sekunden und 10 Bilder im Abstand von 22 Sekunden. Der durchschnittliche Fluoreszenzverlust während der Erholungsphase lag bei 15-17 %.

Für eine FRAP-Messung bei einem sich sehr schnell erholenden Fusionsprotein wurde wie oben zunächst eine Aufnahme der Zelle vor dem Bleichen gemacht ("prebleach scan"; Einstellungen: 18 mW nominale Leistung, Pinhole = 0,7, 40 x Neofluar Ölimmersionsobjektiv, N.A. = 1,25). Anschließend wurde ein Punkt mit einem Durchmesser von ~1 μm für 1 Sekunde bei maximaler Laserpower gebleicht. Danach wurden in folgenden Abständen bei sehr geringer Laserpower (4 % der Bleichintensität) Bilder aufgenommen: 20 Bilder im Abstand von 1 Sekunde, 10 Bilder im Abstand von 2 Sekunden, 10 Bilder im Abstand von 5 Sekunden und 20 Bilder im Abstand von 10 Sekunden. Der durchschnittliche Verlust an Fluoreszenz, der durch die Aufnahmen während der Erholungsphase entstand, lag in diesem Fall bei 2-3 %. Für die spätere Auswertung (siehe unten) mussten die Fluoreszenzintensitäten in 3 Feldern über den Verlauf der Messung quantitativ erfasst werden: (1) der Bleichpunkt selbst, (2) ein Bereich des Hintergrundes und (3) die gesamte Zelle bzw. der Teil der Zelle, der ein Fluoreszenzsignal aufweist (siehe auch Abbildung 3-9). Die Daten wurden über die Software des Mikroskops exportiert und später in Microsoft[®] Excel ausgewertet (siehe unten).



Abb. 3-9: Messfelder bei einem FRAP-Experiment.

Gezeigt ist die schematische Darstellung einer Zelle, die ein EGFP-Fusionsprotein exprimiert, das ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist. Für die Auswertung muss die Fluoreszenzintensität in den folgenden Bereichen gemessen werden, die durch gestrichelte blaue Linien markiert sind: im Bleichpunkt (1), im Hintergrund außerhalb der Zelle (2) und der gesamte Bereich, in dem eine Fluoreszenz vorhanden ist (3; = "ganze Zelle").

3.5.9.3 Auswertung mit Microsoft[®] Excel

Die FRAP-Erholungskurven wurden nach Phair und Misteli (2000) mit Hintergrund-bereinigten Bildern erstellt. Aufgrund der gemessenen und aufgezeichneten Fluoreszenz-Intensitätswerte konnte die relative Intensität nach folgender Formel berechnet werden:

$$I_{rel} = \frac{T_0 \cdot I_t}{T_t \cdot I_0}$$

- T₀ = Fluoreszenzintensität des gesamten Zellvolumens vor dem Bleichpuls, korrigiert um den Hintergrundwert
- T_t = Fluoreszenzintensität des gesamten Zellvolumens zum Zeitpunkt t, korrigiert um den Hintergrundwert
- I_0 = Fluoreszenzintensität der Akkumulation vor dem Bleichpuls
- I_t = Fluoreszenzintensität der Akkumulation zum Zeitpunkt t, korrigiert um den Hintergrundwert

Die quantitativen Werte, die zur Erstellung der Kurven schließlich verwendet wurden, stellen den Durchschnitt von mindestens 10 gemessenen Zellen dar. Die statistische Signifikanz der ermittelten Werte wurde mit Hilfe eines t-Tests bestimmt (siehe 3.5.9.4).

Auswertung mit Excel:

Die über die Steuerungssoftware des Mikroskops gesammelten Messdaten wurden zur Auswertung zunächst in Microsoft[®] Excel importiert. Man erhält die Werte der Fluoreszenzintensitäten für den Bleichpunkt, den Hintergrund und die ganze Zelle im Verlauf des Experiments (Abbildung 3-10).

Microsoft Excel - FRAP_WT_14b.xls [Schreibgeschützt]									
📓 Datei Bearbeiten Ansicht Einfügen Format Extras Daten Eenster ?									
🗅 🖙 🖬 🔒 🖏 🎒 🖪 ζ, 🖤 🐰 🛍 🋍 • 🝼 🗠 🖓 🐁 Σ • 🔞 ź↓ 🕻 🏙 🛷 100% 💌 🖓 🖕 Arial									
	H5	-	fx =(((B5-D5)*(15	(30,63)/((30,63	3)*(F5-D5)))		
	A	В	С	D	E	F	G	Н	1
1	Bleich	punkt	Hinter	grund	Ganze	Zelle			
2									
3	Stack Prof	ile 4	Stack Prof	ile 5	Stack Prof	ile 6			
4	Wavelengt	Channel 1	Wavelengtl	Channel 1	Wavelengt	Channel 1			
5	0	31,15	0	0,52	0	16,02		1,000149	
6	1	2,43	1	0,77	1	21,75		0,040014	
7	2	2,75	2	0,66	2	16,33		0,067595	
8	3	3,09	3	0,56	3	14,57		0,091261	
9	4	2,76	4	0,47	4	14,26		0,083782	
10	5	2.05	5	0.50	E	44.00		0.000470	

Abb. 3-10: Auswertung der FRAP-Daten mit Excel.

Die Abbildung zeigt als Beispiel die Daten, die bei einer Messreihe eines FRAP-Experiments erhalten wurden. Die Spalten B, D und F enthalten die Werte der Fluoreszenzintensitäten in den Messfeldern für den Bleichpunkt (B), den Hintergrund (D) und die ganze Zelle (F). In Spalte H stehen die berechneten, relativen Fluoreszenzintensitäten für den Bleichpunkt (Hintergrund-bereinigt, vgl. Formel oben). Im Feld $, f_x^{cc}$ ist die Formel zu sehen, die in Zelle H5 eingetragen werden muss:

,,=(((B5-D5)*(gZ-H))/((BP-H)*(F5-D5)))"

Im Feld bereits für die Zahlenwerte der ersten Wertezeile ausgerechnet (gZ: Zahlenwert ganze Zelle; H: Zahlenwert Hintergrund; BP: Zahlenwert Bleichpunkt; jeweils in Zeile 5). In Abbildung 3-10 ist dargestellt, wie die relative Fluoreszenzintensität innerhalb des Bleichpunktes in Excel berechnet wurde. In einer weiteren Spalte werden dann die Hintergrund-bereinigten relativen Fluoreszenzintensitäten innerhalb des Bleichpunktes zu den jeweiligen Zeitpunkten des Experiments mit der folgenden Formel berechnet, die so eingegeben werden muss:

"=(((B5-D5)*(gZ-H))/((BP-H)*(F5-D5)))"

- gZ = Zahlenwert für die Fluoreszenzintensität der ganzen Zelle in der ersten Wertezeile
- H = Zahlenwert für die Fluoreszenzintensität des Hintergrunds in der ersten Wertezeile
- **BP** = Zahlenwert für die Fluoreszenzintensität innerhalb des Bleichpunktes in der ersten Wertezeile

Für die erste Zeile muss ein Wert von ~1 herauskommen. Die Berechnung aller Werte in der gesamten Spalte wird durch "Ziehen" der Zelle vorgenommen (Anklicken der rechten unteren Ecke der Zelle – Mauszeiger wird zum kleinen +-Zeichen – und ziehen mit der Maus bis zum Ende der Spalte). Diese Berechnung der Werte wurde für alle Einzelmessreihen eines Proteinkonstrukts durchgeführt. Anschließend wurden die Werte aller Messreihen gemittelt. Diese Mittelwerte bildeten dann die Grundlage für die FRAP-Kurve eines Proteins. Aus den Kurven lassen sich einige Eigenschaften des Proteins ablesen. In Abb. 3-11 sind drei FRAP-Kurven dargestellt, wie sie prinzipiell aussehen können: eine (blau) repräsentiert die Erholungskurve eines vollständig mobilen Proteins, abzulesen an der vollständigen Erholung der Fluoreszenz im Bleichpunkt, was den Austausch aller Moleküle des untersuchten Proteins innerhalb dieses Feldes bedeutet; die zweite Kurve (violett) gehört zu einem völlig immobilen Protein, es findet kein Austausch von Molekülen statt; die dritte Kurve (rot) entsteht bei der Messung eines Proteins, dessen Moleküle sich in mindestens 2 Gruppen aufteilen lassen, zum Teil sind sie mobil, aber ein anderer Teil der Moleküle ist immobil. Der immobile Anteil des Proteins kann am Grad der Erholung der relativen Fluoreszenzintensität im Bleichpunkt direkt abgelesen werden.



Abb. 3-11: Beispiele für FRAP-Kurven.

Gezeigt werden die Erholungskurven einer FRAP-Messung drei verschiedener Proteine. Ein Protein ist vollständig mobil (blau), eines immobil (violett) und das dritte (rot) ist teilweise mobil und erholt sich rasch bis zu einem Maximum, allerdings sind etwa 40 % der Moleküle dieses Proteins immobil.

Neben der absoluten Erholung ist vor allem die Geschwindigkeit dieser Erholung ein Maß für die Mobilität bzw. Dynamik eines Proteins. Um dies quantifizieren zu können, werden die sog. t_{30} -, t_{50} - oder t_{80} -Werte bestimmt, eben die Zeitpunkte, an denen die relative Fluoreszenzintensität sich zu 30, 50 bzw. 80 % erholt hat. Um diesen Zeitpunkt zu berechnen, bedient man sich der Beschreibung einer

Kurve in einem engen Bereich näherungsweise als Gerade. Es werden die Zeitpunkte bestimmt, an denen die relativen Fluoreszenzintensitäten direkt über bzw. unter dem entsprechenden Erholungswert liegen. Aus den Datenpaaren bzw. Koordinaten dieser Messpunkte (Zeit/relative Fluoreszenzintensität) kann über die folgende Gleichung der exakte Wert für die Zeit t bestimmt werden:

$$t_{X} = t_{1} + \frac{t_{2} - t_{1}}{F_{2} - F_{1}} \cdot (X - F_{1})$$

- t_X : Zeitpunkt t, an dem die Erholung X % entspricht (z.B. t_{30} bei 30 %)
- t_1 : letzter Zeitpunkt t, bei dem die Erholung noch nicht X % erreicht hat
- t_2 : erster Zeitpunkt t, bei dem die Erholung über X % liegt
- F_1 : relative Fluoreszenzintensität zur Zeit t_1
- F₂ : relative Fluoreszenzintensität zur Zeit t₂
- X : relative Fluoreszenzintensität, für die der Zeitpunkt des Erreichens gesucht wird (z.B. X = 0,3 für t_{30})

Die Berechnung dieser Werte wurde für jede einzelne Messreihe durchgeführt, die Ergebnisse aller Messreihen wurden anschließend gemittelt. Um die statistische Signifikanz unterschiedlicher Werte beim Vergleich von Proteinkonstrukten beurteilen zu können, wurde ein t-Test durchgeführt (siehe 3.5.9.4).

3.5.9.4 Durchführung eines Student'schen t-Tests

Um beurteilen zu können, ob sich die errechneten Mittelwerte zweier Proteinkonstrukte signifikant voneinander unterscheiden, wurde ein ungepaarter Student'scher t-Test durchgeführt. Der dabei errechnete P-Wert ist ein Maß für die statistische Signifikanz ($P \le 0.05$ bedeutet, dass die ermittelten Daten statistisch signifikant sind). Der t-Test wurde mit Hilfe eines frei zugänglichen Online-Tools durchgeführt, das auf der Internetseite <u>http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm</u> zu finden ist (siehe auch Abbildung 3-12). Für die Berechnung des P-Werts wurden neben den für ein Proteinkonstrukt ermittelten Mittelwerten noch die Standardabweichung und die Anzahl der einzelnen Datenreihen, die diesen Mittelwerten zu Grunde liegen, benötigt. Die Berechnung mit Hilfe des Online-Tools gliedert sich in vier Schritte (vgl. Abbildung 3-12):

1. Auswahl des Eingabeformats ("Choose data entry format"):

Zu treffende Auswahl: Enter mean, SD and N (also Mittelwert, Standardabweichung und Anzahl der Messreihen).

2. Eingabe der Messdaten ("Enter data")

Label = Namen der Reihen, Mean = Mittelwert für ein Proteinkonstrukt, SD = berechnete Standardabweichung für diesen bestimmten Zeitpunkt, N = Anzahl der Einzelreihen.

3. Auswahl des Tests ("Choose a test"):

Zu treffende Auswahl: Unpaired t test.

4. Berechnung (Calculate now):

Anschließend erfolgt mit Schritt 4 ("Calculate now") die Berechnung des P-Wertes.

Das Ergebnis für den P-Wert wird anschließend ausgegeben mit zusätzlicher Beschreibung der statistischen Signifikanz in Worten (vgl. Abbildung 3-12).

t test calculator		Unpaired t test results				
A f test compares the means of two groups. For example, co differs between a control and treated group, between men a	ompare whether systolic blood pressure nd women, or any other two groups.	P value and statistical significance: The two-tailed P value is less than 0.0001 By conventional criteria, this difference is considered to be extremely statistically significant.				
Don't confuse f tests with correlation and regression. The f t blood pressure) between two groups. Use correlation and re- (perhaps blood pressure and heart rate) vary together. Also f tests (and related nonparametric tests) compare exactly but	test compares one variable (perhaps gression to see how two variables don't confuse <i>t</i> tests with ANOVA. The m groups, ANOVA (and related	Confidence interval: The mean of B3 minus B2 equals 30.100 95% confidence interval of this difference: From 23.890 to 36.310				
nonparametric tests) compare three or more groups. Finally, a contingency table (Fishers or chi-square test). Use a <i>t</i> test (e.g., blodd pressure, weight or enzyme activity). Use a conti variable (e.g., pass vs. fail, viable vs. not viable).	don't confuse a / test with analyses of t to compare a continuous variable ngency table to compare a categorical	Intermediate values used in calculations: t = 10.1832 df = 18 standard error of difference = 2.956				
1. Choose data entry format	3. Choose a test	Learn more:				
C Enter up to 50 rows. C Enter or paste up to 2000 rows. C Enter mean, SEM and N. E Enter mean, SD and N.	Outpaired t test. C Welch's unpaired t test (used rarely). (You can only choose a paired t test	GraphPad's web site includes portions of the manual for GraphPad Prism that can help you learn statistics. First, review the meaning of <u>Pvalues</u> and <u>confidence intervals</u> . Next check whether you <u>chose an appropriate test</u> . Then learn how to interpret results from an <u>unpaired</u> or <u>paired</u> test. These links include GraphPad's popular analysis checklists.				
Caution: Changing format will erase your data.	if you enter individual values.) Help me decide.	Review your data:				
		Group	B3	B2		
2. Enter data	4. View the results	Mean	52.300	0 22.200		
Help me arrange the data	Calculate now	SD	8.400	0 4.100		
Label: B3 B2		SEM	2.656	6 1.297		
Mean: 52.3 22.2	Clear the form	N	10	10		
SD: 8.4 4.1						
N: 10 10						

Abb. 3-12: Online-Tool für die Durchführung eines t-Tests.

Im linken Teil der Abbildung ist die Eingabemaske des Tools abgebildet. Genaueres zur Eingabe der Daten findet sich im Text. Auf der rechten Seite ist die Ausgabe des Ergebnisses eines t-Tests mit Angabe des P-Werts und Angaben zur statistischen Signifikanz in Worten abgebildet.

3.5.10 FLIP (Fluorescence Loss in Photobleaching)

3.5.10.1 Experimentelles Prinzip

Auch bei FLIP-Experimenten bedient man sich Fusionsproteinen, die zum Teil aus GFP oder seinen Derivaten bestehen (Tsien, 1998). Die Methode wurde entwickelt, um festzustellen, ob zwei Kompartimente einer Zelle miteinander in Verbindung stehen. Man untersucht beispielsweise ein Protein, von dem man weiß, dass es innerhalb des Zellkerns sowohl mit Chromatin assoziiert ist als auch an der Kernhülle zu finden ist. Des Weiteren hat man mit FRAP festgestellt, dass es mobil ist. Mit FLIP kann jetzt untersucht werden, ob die Populationen an Chromatin und Kernhülle unabhängig voneinander sind, oder ob sie zusammenhängen, ob also Moleküle zwischen beiden Subkompartimenten hin- und herwechseln. Dazu wird in einem Subkompartiment wiederholt die Fluoreszenz ausgebleicht und parallel im anderen Subkompartiment die Fluoreszenzintensität beobachtet. Nimmt diese dort ab, so hängen beide Populationen zusammen und es findet Molekülaustausch statt, bleibt sie konstant, so findet kein Austausch zwischen beiden Subkompartimenten statt.

3.5.10.2 Durchführung

Für FLIP-Experimente wurden COS-7-Zellen wie für FRAP beschrieben vorbereitet, transfiziert und in Lebendbeobachtungskammern eingedeckelt (siehe 3.5.9.2 und 3.5.3). Auch die Einstellungen am CLSM entsprachen denen beim FRAP beschriebenen. Es wurde zunächst wie bei FRAP eine Aufnahme mit 4facher Akkumulation gemacht ("prebleach scan"), danach wurde alle 15 sek. gescannt (wie beim "prebleach scan" mit 4facher Akkumulation) und anschließend gebleicht. Gebleicht wurde ein ~1 µm großer Bereich durch Bestrahlung mit dem Laser für 4 sek. Der durchschnittliche Fluoreszenzverlust während des Experiments durch das Scannen lag bei 15-20 %.

Bei FLIP-Experimenten ist es wichtig, dass neben der "manipulierten" Zelle eine Kontrollzelle im selben Bildausschnitt liegt. Außerdem sollte die Fluoreszenzintensität, also die Stärke der Expression des Fusionsproteins, bei Kontrollzelle und "manipulierter" Zelle gleich sein. Durch diese Kontrollzelle lässt sich der durch das Scannen verursachte Fluoreszenzverlust später herausrechnen, was besonders dann wichtig ist, wenn sich das Protein sehr langsam in der Zelle bewegt oder nur ein kleiner Teil der Moleküle einen mobilen Anteil bilden.

Für die spätere Auswertung (siehe unten) müssen die Fluoreszenzintensitäten in folgenden Bereichen gemessen werden: (1) der Bereich, von dem man wissen möchte, ob er in Verbindung mit dem gebleichten Feld steht, (2) ein Bereich des Hintergrunds außerhalb von Zellen und (3) ein Kontrollfeld, von dem man weiß, dass es nicht mit dem Bleichpunkt in Verbindung steht bzw. eine Kontrollzelle (siehe auch Abbildung 4-16). Die Daten wurden schließlich mit Microsoft[®] Excel ausgewertet (siehe unten).

3.5.10.3 Auswertung mit Microsoft[®] Excel

Die relative Fluoreszenzintensität in den untersuchten Bereichen wurde mit Hilfe Hintergrundbereinigter Bilder durchgeführt. Die relative Fluoreszenzintensität in einem ausgewählten Bereich zu einem bestimmten Zeitpunkt lässt sich mit folgender Formel berechnen:

$$I_{rel} = \frac{I_t}{I_0}$$

 I_0 = Fluoreszenzintensität vor Beginn des Experiments, korrigiert um den Hintergrundwert

 I_t = Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t, korrigiert um den Hintergrundwert

Diese Berechnung wurde für die "manipulierte" und die Kontrollzelle durchgeführt, so erhält man für beide jeweils eine abnehmende Kurve für die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit mit der Zeit. Die eigentliche FLIP-Kurve erhält man dann durch Verrechnen der Kurve der Kontrollzelle mit der Kurve der "manipulierten" Zelle mit folgender Formel:

$$I_{FLIP} = (I_{rel_{manipulierteZelle}} - I_{rel_{Kontrollzelle}}) + 1$$

Die Werte, die zur Erstellung der FLIP-Kurven schließlich verwendet wurden, stellen Mittelwerte von mindestens 10 Messreihen an unabhängigen Zellen dar. Die statistische Signifikanz wurde wie beim FRAP durch einen Student'schen t-Test bestimmt (siehe 3.5.9.4).

Auswertung mit Excel:

Die gesammelten Daten wurden in Excel importiert und dann wie in Abbildung 3-13 dargestellt ausgewertet. Bei der Untersuchung, ob die Fluoreszenz von EGFP-Laminen in der Kernhülle abnimmt, wurden drei Bereiche der Kernhülle gemessen und zur Berechnung der relativen Fluoreszenzintensität gemittelt; in der Abbildung ist zur vereinfachten Darstellung aber nur ein Wert verwendet worden. Für die Mittelwertbildung müssen die Formeln entsprechend angepasst werden.

🔀 Microsoft Excel - FLIP_WT_0804_1.xls [Schreibgeschützt]											
	🔊 Datei Bearbeiten Ansicht Einfügen Format Extras Daten Eenster ?										
□ 🖙 🖬 🔒 🔁 🎒 🖏 🖏 🖏 🗈 💼 - 🝼 🗠 - 😪 - 🍓 Σ - 🔞 ટੈ↓ 🕻 🛍 🛷 100% 🔻 [?] _ Arial 🔹 🔹						10 • F <i>K</i>					
ľ	H5 ▼ f _* =((B5-D5)/(33,82-1,61))										
ſ		A	В	С	D	E	F	G	Н	1	J
l	1	manipu	ulierte	Hintor	arund	Kontre	مالمحلله				
l	2	Zel	le	Timter	grunu	Konuk	JIZEIIE				
	3	Stack Prof	ile 1	Stack Prof	ile 2	Stack Prof	ile 3				
l	4	Wavelengt	Channel 1	Wavelengt	Channel 1	Wavelengt	Channel 1				
	5	0	33,82	0	1,61	0	23,15		1,00000255	0,9996876	1,00031494
l	6	1	33,07	1	1,71	1	23,05		0,97366066	0,99078477	0,98287589
I	7	2	33,44	2	1,65	2	24,07		0,98695175	1,04073203	0,94621972
I	8	3	33,10	3	1,61	3	24,90		0,97757706	1,08117813	0,89639892
ſ	a	Л	30.00	1	1.64	1	25.12		0.00853344	1 08005/02	0.81857852

Abb. 3-13: Auswertung der FLIP-Daten mit Microsoft[®] Excel.

Die Abbildung zeigt vereinfacht die Daten, die aus einer FLIP-Messung erhalten wurden. In den Spalten B, D und F sind die Fluoreszenzintensitäten der manipulierten Zelle (B), des Hintergrunds (D) und der Kontrollzelle enthalten (F). In Spalte H stehen die errechneten Fluoreszenzintensitäten der manipulierten Zelle, in Spalte I die der Kontrollzelle und in Spalte J die Daten der tatsächlichen FLIP-Kurve. Die Werte werden mit folgenden Formeln berechnet: Spalte H: "=((B5-D5)/(mZ-H))"; Spalte I: "=((F5-D5)/(K-H))"; Spalte J: "=((H5-I5)+1)" (mZ: Zahlenwert der manipulierten Zelle; K: Zahlenwert der Kontrollzelle; H: Zahlenwert des Hintergrunds; jeweils in Zeile 5).

3.6 Zellkultur

3.6.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung von Zellen wurde unter Einhaltung aller Sicherheitsmaßnahmen bei keimarmen Bedingungen durchgeführt. Das Zellwachstum wurde mit Hilfe eines Inversmikroskops mit Phasenkontrasteinrichtung überprüft. Grundsätzlich galten die in Tabelle 3-15 angegebenen Richtwerte für die verwendeten Kulturgefäße. Angaben zu Medien und Kultivierungsbedingungen befinden sich im Kapitel 2.1.1.

Gefäß	Fläche (mm²)	Zelldichte beim Aussäen	Zelldichte bei Konfluenz	Wachstums- medium (ml)	PBS (ml)	Trypsin (ml)
Flaschen						
TC 25	2500	$0,7\cdot 10^6$	$2,8\cdot 10^6$	5	2	1
TC 80	8000	$2,0 \cdot 10^{6}$	$8,0\cdot 10^6$	15	6	2
Schalen						
35 mm	962	$0,3 \cdot 10^{6}$	$1,2\cdot 10^6$	2,5	2	0,5
60 mm	2827	$0,7\cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^{6}$	5	5	1
100 mm	7854	$2,0 \cdot 10^{6}$	$8,0\cdot 10^6$	10	10	2
150 mm	17671	$5,0 \cdot 10^{6}$	$20,0\cdot 10^6$	20	15	4

Tabelle 3-15: Richtwerte für die Kultivierung von Zellen.

Die Anzahl der Zellen bei Konfluenz war abhängig von den jeweiligen Zelltypen, die angegebenen Werte beziehen sich auf HepG2-Zellen.

3.6.2 Passagieren adhärenter Zelllinien

Lösungen:

- PBS (siehe 3.2); steril und vorgewärmt auf 37 °C
- Zellkulturmedium (siehe 2.1.1); vorgewärmt auf 37 °C
- Trypsin-EDTA-Lösung: PBS
 + 0,06 % Trypsin
 + 0,53 mM EDTA
 - ⇒ sterilfiltrieren

Durchführung:

Alle 2-3 Tage, wenn die Zellen konfluent waren, wurden sie gesplittet und neu ausgesät. Je nach Proliferationsverhalten wurden die Zellen so ausgesät, dass sie nach 2-3 Tagen wieder die Konfluenz erreichten. Dafür wurde zuerst das Zellkulturmedium abgesaugt. Dann wurden die Zellen mit 2 ml (bei einer 25-cm²-Zellkulturflasche) warmem PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsinlösung überschichtet. Die Zellen wurden dann je nach Zelltyp etwa 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich die Zellen vom Flaschenboden lösen. Die Ablösung wurde am Umkehrmikroskop beobachtet. In eine frische Flasche wurden inzwischen 4-4,3 ml Zellkulturmedium vorgelegt. Durch leichtes Klopfen der Flasche wurde das Ablösen der Zellen unterstützt. Dann wurden die Zellen mit 5 ml warmem Zellkulturmedium vom Boden der Flasche abgespült. Die frische Flasche wurde mit 0,7-1 ml Zellsuspension angeimpft (für HepG2, COS-7).

3.6.3 Einfrieren von Kulturzellen

Lösungen:

- PBS (siehe 3.2)
- Trypsinlösung (siehe 3.6.2)
- Zellkulturmedium (siehe 2.1.1)
- Einfriermedium (Zellkulturmedium mit 10 % DMSO und 20 % FCS)

Durchführung:

Die Zellen einer konfluenten Flasche wurden wie unter 3.6.2 beschrieben trypsinisiert und in 5 ml Medium aufgenommen. Sie wurden in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 1000 g pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 3,6 ml Einfriermedium resuspendiert. Je 1,8 ml der Suspension wurden dann in ein Kryoröhrchen gefüllt. Die Röhrchen wurden in eine Einfrierbox gestellt und diese eben in eine -70-°C-Truhe platziert.

Die Einfrierbox bewirkt ein langsames Einfrieren der Zellen (1 °C Temperatursenkung pro 1 h), was die Bildung von tödlichen Kristallen verhindert. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen dann in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert.

3.6.4 Auftauen von Kulturzellen

Das für die Zelllinie verwendete Kulturmedium wurde im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Dann wurde das aus dem Stickstoffbehälter entnommene Kryoröhrchen vorsichtig im Wasserbad so lange aufgetaut, bis gerade noch ein Rest gefroren war. Anschließend wurde das Kryoröhrchen mit 70% igem Alkohol desinfiziert und der Inhalt in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit 10 ml vorgewärmtem Medium gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 1000 g für 5 min. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml frischem, vorgewärmtem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine 25-cm²-Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Beginnend mit dem ersten Tag nach dem Auftauen erfolgte ein Mediumwechsel bzw. das Umsetzen der Zellen alle 2-3 Tage.

3.6.5 Test der Zellkultur auf eine Kontamination mit Mycoplasmen

Lösungen:

- Vgl. PCR mit *Taq*-Polymerase (siehe 3.3.3.2)
- Primer 1 (myco_5': 5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT A-3')
- Primer 2 (myco_3': 5'-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3')

Durchführung:

Zunächst wurden 1,5 ml des Zellkulturmediums in ein Eppendorf-Gefäß überführt und anschließend 5 min bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und wieder bei 13000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen, das Pellet schließlich in 25 µl H₂O bidest. gelöst. Diese Lösung wurde mit Hilfe einer PCR auf die Anwesenheit Mycoplasma-spezifischer Gene hin getestet. Mit den verwendeten Primern wird ein Abschnitt der 16S-rDNA spezifisch in Mycoplasmen amplifiziert. Ist ein PCR-Produkt mit einer Länge von ~720 bp nachweisbar, liegt eine Kontamination mit Mycoplasmen vor.

PCR-Ansatz (lfach):

- 5 µl Lösung (siehe oben)
- 1,5 µl MgCl₂ (25 mM)
- 2,5 µl Taq-DNA-Polymerase 10x Reaktionspuffer
- 0,5 µl dNTPs (Mix, SL je Nukleotid 10 mM, MBI)
- 0,5 µl Primer 1 (SL 10 ^{pmol}/_{µl}, Thermo/biomers)
- 0,5 μ l Primer 2 (SL 10 ^{pmol}/_{μ l}, Thermo/biomers)
- 0,5 μ l Taq-DNA-Polymerase (5 ^U/_{μ l}, AG Seibel)
- 14 µl H₂O bidest.

PCR-Programm:

٠	Initiale Denaturierung	5' 94 °C	
•	Denaturierung	30'' 94 °C)
•	Annealing	30'' 60 °C	
•	Elongation	45" 72 °C	J
•	Kühlung	∞ 4 °C	

Die Analyse erfolgte anschließend über ein Agarosegel (siehe 3.3.11).

3.6.6 Transfektion von Kulturzellen

Transfektion bedeutet das Einbringen von DNA in eukaryontische Zellen. Genau wie bei der Transformation von Bakterien muss die DNA die Zellmembran passieren und kann dann unabhängig von der Transfektionsmethode in den Zellkern gelangen. Dort wird die Information der DNA in RNA umgesetzt, und es kann zur Expression der im Vektor kodierten Gene kommen. Es wurden mehrere Methoden zur Transfektion von Kulturzellen angewendet (siehe unten).

3.6.6.1 Transfektion eukaryontischer Zellen mit Effectene[™] (Qiagen)

Effectene[™] ist ein nicht-liposomales Lipid, welches unter spontaner Mizellenbildung die DNA in Lipidmoleküle hüllt. Nach Herstellerangaben soll dabei keine Größen- und Ladungsvarianz auftreten, wie dies bei liposomalen Transfektionen der Fall ist. Die Transfektionsraten bei COS-7-Zellen lagen mit Effectene[™] bei 40-90 %.

Lösungen:

- Qiagen Effectene[™] Transfection Reagent Kit (enthält Effectene[™], Enhancer und Puffer EC)
- PBS (siehe 3.2; steril)
- Zellkulturmedium (siehe 2.1.1)

Durchführung:

Die Transfektion von Zellen in Minischälchen (\emptyset 35 mm) wurde mit 500 ng Plasmid-DNA weitgehend nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurde am Vortag ein Minischälchen mit vier Deckgläschen mit 4·10⁵ COS-7-Zellen ausgesät. Pro Minischälchen wurden 500 ng DNA eingesetzt. Die DNA wurde mit Puffer EC auf 100 µl aufgefüllt, gemischt und mit 3,2 µl Enhancer versetzt. Nach 2bis 5-minütiger Inkubation bei RT wurden 10 µl EffecteneTM zugegeben und vermischt. Während einer weiteren Inkubation von 5-10 min bei RT wurden die Zellen einmal mit 2 ml PBS gewaschen und mit 1600 µl Medium überschichtet. Dann konnte die Mischung aus DNA und Transfektionsreagenz mit 600 µl Medium versetzt und tropfenweise auf die Zellen pipettiert werden. Die Inkubation mit dem Transfektionsreagenz erfolgte immer über Nacht. Transfizierte Zellen wurden am nächsten oder übernächsten Tag für weitere Experimente verwendet, ohne dass das Medium zuvor gewechselt wurde. Bei den angewandten Inkubationszeiten konnte keine zelltoxische Wirkung beobachtet werden.

3.6.6.2 Transfektion von Zellen mit Lipofectamine[™] (Invitrogen)

Die Transfektion mit LipofectamineTM erfolgte nach Herstellerprotokoll. Im Gegensatz zu EffecteneTM benötigt man für dieses Protokoll zusätzlich serumfreies Medium (Optimem), da die Serumproteine mit der Transfektion interferieren würden. Zellen wurden wie für eine Transfektion mit EffecteneTM am Vortag ausgesät.

Lösungen:

- PBS (siehe 3.2; steril)
- Optimem (serumfreies Medium, Gibco Life Technologies)
- Zellkulturmedium (siehe 2.1.1)
- Lipofectamine[™] (Invitrogen)

Durchführung:

Pro Minischale wurden 2 Eppendorfgefäße vorbereitet. In Gefäß A wurden 12 µl Lipofectamine[™] mit 88 µl Optimem gemischt, in Gefäß B 4 µg Plasmid-DNA mit Optimem auf 100 µl aufgefüllt. Dann wurden die Inhalte von Gefäß A und B vereinigt, gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen, mit 1 ml Optimem überschichtet und wieder in den Brutschrank gestellt. Für die Transfektion wurde die DNA-Lipofectamine[™]-Mischung mit 800 µl Optimem vorsichtig vermischt und tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 4-5 h im Brutschrank inkubiert, dann wurde das Medium gewechselt. Bei längeren Inkubationszeiten zeigte sich, dass Lipofectamine[™] im Vergleich zu Effectene[™] zytotoxisch wirkt.

3.6.6.3 Transfektion mit MATra (IBA)

Bei dieser Methode (MATra = Magnet Assisted Transfection) werden die DNA-Moleküle zunächst an magnetischen Partikeln immobilisiert. Anschließend werden die mit der zu transfizierenden DNA beladenen Partikel mit Hilfe eines magnetischen Feldes in die Zellen gezogen.

Lösungen:

- MATra-Reagenz (IBA)
- PBS (siehe 3.2) und Zellkulturmedium (siehe 2.1.1); beides vorgewärmt auf 37 °C

Durchführung:

Die Zellen wurden wie bei den anderen Transfektionsmethoden auf Deckgläschen in Minischälchen ausgesät. Für die Transfektion wurden 1,5 µg Plasmid-DNA in 500 µl serum- und zusatzfreiem Medium verdünnt (alternativ geht auch PBS). Das MATra-Reagenz wurde gut gemischt (evtl. Vortex) und dann wurden 1,5 µl (entspricht 1 µl pro 1 µg DNA) zur DNA-Lösung gegeben und das Ganze erneut gut gemischt. Während der anschließenden Inkubation für 20-30 min bei RT wurde bei den Zellen das Medium abgenommen, 1-mal mit PBS gewaschen und dann 1,5 ml Kulturmedium vorgelegt. Dann wurde die DNA-Partikel-Mischung dazugegeben und das Schälchen für 15 min auf die Magnetplatte gestellt. Optional wird abschließend nochmals ein Mediumwechsel durchgeführt.

3.6.6.4 Transfektion mit CaCl₂

Lösungen:

• PBS (siehe 3.2) und Zellkulturmedium (siehe 2.1.1); beides vorgewärmt auf 37 °C

•	Transfektionslösung:	100 mM HEPES
		500 mM CaCl ₂
		⇒ pH 7,00 (muss für jede Zelllinie optimiert werden!)
		\Rightarrow sterilfiltrieren und Lagerung bei -20 °C

• 2x HBS:

50 mM HEPES 280 mM NaCl 1,5 M Na₂PO₄ ⇔ pH 7,00 (vgl. Transfektionslösung!) ⇔ sterilfiltrieren und Lagerung bei -20 °C

Durchführung:

Die Zellen wurden wie für eine Transfektion mit einem der oben beschriebenen Reagenzien oder Kits am Vortag ausgesät, allerdings musste die Zelldichte beim Aussäen so gewählt werden, dass die Schalen zum Zeitpunkt der Transfektion weniger als 50 % bewachsen waren. 1 h vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt, ohne zwischendurch mit PBS zu waschen. Es wurden 1,5-2 ml Medium vorgelegt. Während dieser Zeit wurden 2 µg Plasmid-DNA (Standardwert, muss evtl. nach oben korrigiert werden) in 250 µl Transfektionslösung aufgenommen. Zu diesem Gemisch wurden 250 µl 2x HBS gegeben und das Ganze gut vermischt (Vortex) und 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die DNA-haltige Lösung zu den Zellen pipettiert, die dann 2-5 h im Brutschrank inkubiert worden sind. Schließlich wurde nach dieser Inkubationszeit das Medium gewechselt. Die einzelnen Faktoren wie Zelldichte zur Zeit der Transfektion, pH-Werte oder DNA-Menge müssen

für jede Zelllinie empirisch bestimmt werden, für COS-7-Zellen lieferten die folgenden Bedingungen die besten Ergebnisse (bis zu 30 % Transfektionsrate): Zelldichte unter 50 %, pH 6,85, 2 μg DNA.

4 Ergebnisse

4.1 Expressionsmuster von Lamin B3

Lamin B3 wurde von Furukawa und Hotta (1993) erstmals beschrieben. Die Autoren zeigten, dass das Protein selektiv in Hoden exprimiert wird und dort spezifisch in Spermatozyten, also meiotischen Zellen, allerdings zeigten sie keine Daten zu postmeiotischen Stadien. Bei weiteren Untersuchungen des Expressionsmusters von Lamin B3 in Ratten und Mäusen konnte das Protein außer in Spermatozyten auch in postmeiotischen Zellen nachgewiesen werden, allerdings war eine exakte Charakterisierung nicht möglich (Schütz, 2001; Öllinger, 2002). Wegen dieser im Vergleich mit der Literatur nicht ganz stimmigen Daten, sollte das Expressionsmuster dieses Proteins genauer untersucht werden.

4.1.1 Lamin B3 ist spezifisch in Hoden exprimiert

Zunächst wurde die hodenspezifische Expression des Proteins überprüft. Dafür wurden die Proteine verschiedener Gewebe der Maus in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose transferiert. Auf der Membran vorhandene Lamin-B3-Proteinmoleküle wurden mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (α -B3 2113, affinitätsgereinigt; siehe 2.1.4), der in einem Kaninchen gegen ein Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase und dem spezifischen N-Terminus von Lamin B3 (GST-B3 NT) hergestellt worden war (Schütz, 2001; siehe Abbildung 4-1), und ECL nachgewiesen.



Abb. 4-1: Konstrukt für die Antikörperherstellung.

Schematische Darstellung des Konstruktes, das zur Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen Lamin B3 in einem Kaninchen verwendet wurde. Oben ist ein Schema von Lamin B3 mit seinen auffälligsten Domänen dargestellt, dem spezifischen 84 Aminosäuren umfassenden N-Terminus (NT_B3), der zentralen coiled-coil-Domäne (2), die im Vergleich zu somatischen Laminen stark verkürzt ist, einem NLS und der CaaX-Box. Darunter ist das Konstrukt abgebildet, das für die Antikörperherstellung verwendet wurde: ein Fusionsprotein aus GST und dem spezifischen N-Terminus von Lamin B3 (NT_B3). X_a bezeichnet eine Erkennungssequenz, an der das Fusionsprotein mit dem Faktor X_a gespalten werden kann.

Das Ergebnis dieser Western-Blot-Analyse bestätigte eindeutig die hodenspezifische Expression von Lamin B3. Mit dem verwendeten Antikörper konnte ausschließlich in Hoden ein Protein mit einer für Lamin B3 zu erwartenden molekularen Masse von ca. 53 kDa nachgewiesen werden, alle anderen untersuchten Gewebe waren negativ (siehe Abbildung 4-2).



Abb. 4-2: Western-Blot-Analyse verschiedener Gewebe auf die Expression von Lamin B3.

Die Proteine verschiedener Gewebe wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Anschließend wurde vorhandenes Lamin-B3-Protein mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (α-B3 2113, affinitätsgereinigt) und ECL detektiert. Er erzeugt ein eindeutiges Signal in Hoden, alle anderen Gewebe sind negativ. Es wurden in jeder Spur vergleichbare Proteinmengen aufgetrennt, die Auftragsvolumina der einzelnen Gewebe wurden empirisch über SDS-PAGE bestimmt. Die mit "M' bezeichnete Spur enthält die Proteine des "Protein Molecular Weight Marker" (MBI).

4.1.2 Expressionsmuster von Lamin B3 im Verlauf der Spermatogenese

In jüngerer Zeit konnten bei Ratten und Mäusen Daten gesammelt werden, die eine Expression von Lamin B3 außer in Spermatozyten auch in Keimzellen postmeiotischer Stadien belegen konnten (Schütz, 2001; Öllinger, 2002; vgl. auch Furukawa und Hotta, 1993). Allerdings blieb vieles unklar bezüglich der Expression und der spezifischen Lokalisation des Proteins in Keimzellen, vor allem in Spermatozyten, in denen es nie durch Immunfluoreszenzmikroskopie hatte nachgewiesen werden können. Dies widersprach den im Western und Northern Blot erzielten Ergebnissen mit Keimzell-fraktionen, die durch zentrifugale Elutriation gewonnen wurden. Eine Prüfung der Elutriation ergab, dass die Fraktionen, die bei der Trennung bzw. spezifischen Anreicherung von Keimzellen einzelner Entwicklungsstadien gesammelt werden, bei Mäusen eine deutlich stärkere Verunreinigung mit Zellen anderer Stadien aufweisen als bei Ratten. Insbesondere die Spermatozytenfraktion ist stark verunreinigt; sie enthält annähernd die gleiche Menge an Spermatiden wie Spermatozyten vorhanden sind (siehe 3.2.4, Tabelle 3-3; Meistrich, 1977). Dies könnte die widersprüchlichen Ergebnisse von Immunfluoreszenz im Vergleich zu Western und Northern Blot erklären.

Für eine genauere Analyse des zeitlichen Expressionsmusters von Lamin B3 im Verlauf der Spermatogenese der Maus wurde daher ein anderer Ansatz als die Elutriation gewählt. Es wurden die Gesamt-RNA und die Proteine aus den Gesamthoden verschieden alter Mäuse verwendet. Bei Mäusen setzt die Spermatogenese etwa am 10. Tag nach der Geburt ein, vorher sind in den Samenkanälchen nur Spermatogonien vorhanden. Je nach postnatalem Alter der Maus in Tagen findet man unterschiedliche relative Mengen der verschiedenen Spermatogenesestadien in den Samenkanälchen (Angaben dazu siehe 1.1.4, Tabelle 1-1; Bellvé et al., 1977; Malkov et al., 1998).

Für die Analyse der Lamin-B3-Expression auf Ebene der mRNA wurde die Gesamt-RNA aus einer Zellsuspension des Gesamthodens (Herstellung der Suspension siehe 3.2.1) mit TriFAST[™] isoliert und anschließend über RT-PCR die spezifische mRNA von Lamin B3 mit den Primern LB3-5'lang und LB3ko3'genom (521-bp-Fragment; 30 Zyklen, Annealing-Temperatur 61 °C; Details zu den Primern sind im Anhang beschrieben) nachgewiesen. Die mRNA von Lamin B3 konnte nicht in Hoden nachgewiesen werden, die neben Spermatogonien nur Spermatozyten enthielten (postnatales Alter der Mäuse 12-18 Tage), sondern war nur bei 21 und 25 Tage alten Mäusen vorhanden (siehe Abbildung 4-3 A). Im Alter von 21 Tagen nach der Geburt sind bei Mäusen etwa 5 % der im Samenkanälchen vorkommenden Zellen Spermatiden. Dieser relative Anteil der Spermatiden steigt deutlich von Tag 21 bis Tag 25 (siehe 1.1.4, Tabelle 1-1), was gut im Einklang mit der Verstärkung des Signals an Tag 25 im Vergleich zu Tag 21 steht (Abbildung 4-3 A). Dieses Ergebnis belegt, dass die Expression der mRNA von Lamin B3 nicht in Spermatozyten während der Meiose, sondern erst nach Abschluss der Meiose in Spermatiden stattfindet. Zur Kontrolle wurde mit derselben RNA die Expression von SYCP3 analysiert, einem Hauptbestandteil des Synaptonemalkomplexes, der spezifisch in Spermatozyten während der Prophase I der Meiose exprimiert wird (Lammers et al., 1994; Parra et al., 2004). Der Nachweis der mRNA von SYCP3 erfolgte mit Hilfe der Primer SCP3-forward und SCP3reverse (30 Zyklen, Annealing-Temperatur 52 °C; Details zu den Primern finden sich im Anhang). Die mRNA von SYCP3 konnte schwach bereits in 12 Tage alten Mäusen nachgewiesen werden, dem Zeitpunkt, wenn erste Zygotän-Spermatozyten in den Hoden vorhanden sind (siehe 1.1.4, Tabelle 1-1). Das Signal nimmt bis zum Tag 18 stark zu, was mit der Erhöhung des relativen Anteils an Pachytän-Spermatozyten (voll ausgebildeter Synaptonemalkomplex) in den Samenkanälchen einhergeht, danach sinkt die Signalstärke wieder bis zum Tag 25 (Abbildung 4-3 A). Diese Abnahme der Signalstärke für die SYCP3-mRNA korreliert mit der Abnahme der relativen Menge von Spermatozyten bei gleichzeitiger Zunahme der Spermatidenzahl in den Samenkanälchen der Mäuse dieser Altersstufen (siehe 1.1.4, Tabelle 1-1).

Für die Analyse des Expressionsmusters von Lamin B3 auf Proteinebene wurden dieselben Zellsuspensionen von Gesamthoden aus Mäusen verwendet, von denen ein Teil jeweils für die Gewinnung der RNA verwendet worden war. Die Proteine dieser Zellen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis von Lamin-B3- bzw. SYCP3-Proteinmolekülen erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper (siehe 3.4.4.2) und ECL. Das Ergebnis zeigt deutlich, dass Lamin B3 erst in Spermatiden, also postmeiotischen Zellen, exprimiert wird: das Protein konnte erst in 25 Tage alten Mäusen nachgewiesen werden (Abbildung 4-3 B). Die Diskrepanz zwischen Auftauchen der mRNA und des Proteins kann entweder an der Verzögerung bedingt durch den Translationsvorgang liegen, oder an der höheren Empfindlichkeit des Nachweises über RT-PCR im Vergleich zum Western Blot. Die vergleichende Analyse der SYCP3-Expression auf Proteinebene ergab dasselbe Bild wie bei der RT-PCR: Zunahme des Signals von Tag 12 bis Tag 18, dann Abnahme der Signalstärke bis zum Tag 25, was exakt mit der Schwankung der relativen Zahl meiotischer Zellen in den Hoden der Mäuse der verschiedenen Altersstufen zusammenhängt (Abbildung 4-3 B; siehe auch 1.1.4, Tabelle 1-1; Bellvé et al., 1977; Malkov et al., 1998).



Abb. 4-3: Expressionsmuster von Lamin B3 im Verlauf der Spermatogenese.

Für die Analyse des Expressionsmusters wurden Zellsuspensionen aus Gesamthoden von Mäusen verschiedener Altersstufen (12-25 Tage) hergestellt. Aus einem Teil dieser Suspensionen wurde die Gesamt-RNA gewonnen, die restlichen Zellen wurden für die SDS-PAGE vorbereitet. (A) Analyse des Expressionsmusters von Lamin B3 im Vergleich zu SYCP3 auf RNA-Ebene mit Hilfe von RT-PCR. Eingesetzt wurde je 1 μ g Gesamt-RNA. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte im 1%igen Agarosegel. (B) Analyse auf Proteinebene über Western Blot. Die Proteine der Zellsuspensionen wurden in einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert, die Detektion vorhandener Lamin-B3oder SYCP3-Protein-Moleküle erfolgte über spezifische Antikörper und ECL. Pro Spur wurden die Proteine aus 2,5·10⁵ Zellen aufgetrennt.

Die Ergebnisse aus Western Blot und RT-PCR zeigen eindeutig, dass Lamin B3 ausschließlich in Spermatiden – also postmeiotischen Zellen – exprimiert wird.

In einem nächsten Schritt sollte dieser Befund durch eine histologische Analyse über Immunfluoreszenzmikroskopie mit dem Lamin-B3-spezifischen Antikörper überprüft werden. Dazu wurden 2 µm dicke Schnitte von in Paraffin eingebettetem Hodengewebe angefertigt. Untersucht wurden die Gewebe einer adulten Maus, deren Hoden alle Zellstadien der Spermatogenese enthalten, und einer 18 Tage alten Maus, deren Hoden neben den somatischen Zelltypen nur Spermatogonien und Spermatozyten enthalten, aber noch keine Spermatiden. Das Ergebnis bestätigte die in Blot und RT-PCR erzielten Daten, die eine rein postmeiotische Expression von Lamin B3 zeigten. Die Kernhülle in runden Spermatiden weist die für Lamine typische ringförmige Fluoreszenz auf, während die somatischen Zellen sowie Spermatogonien und Spermatozyten negativ sind (Abbildung 4-4 A). Dies wird bestätigt durch das Ergebnis der Immunfluoreszenzanalyse auf dem Hodenschnitt einer 18 Tage alten Maus. In diesem Fall ist der gesamte Schnitt negativ, weil in diesem Entwicklungsstadium noch keine Spermatiden vorhanden sind (Abbildung 4-4 B). Überraschenderweise erzeugte der Lamin-B3-spezifische Antikörper neben der für Lamine typischen Fluoreszenz entlang der Kernhülle zusätzlich ein Signal im Nukleoplasma runder Spermatiden (Abbildung 4-4 A, 4-5 und 4-6 A).



Abb. 4-4: Immunfluoreszenzanalyse des Expressionsmusters von Lamin B3 während der Spermatogenese. Gezeigt ist die indirekte Immunfluoreszenz auf 2 μ m dicken Hodenschnitten von in Paraffin eingebetteten Geweben aus einer adulten (A) und einer 18 Tage alten Maus (B). Für die Immunfluoreszenz wurde ein spezifischer Antikörper gegen Lamin B3 verwendet (α -B3 2113, affinitätsgereinigt). Gebundene Antikörper wurden mit Hilfe geeigneter, an Cy2 gekoppelter Sekundärantikörper detektiert. Parallel wurden dieselben Schnitte mit dem DNA-spezifischen Fluorochrom Hoechst 33258 angefärbt (A', B'). Die Auswertung der Präparate erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiophot), ausgestattet mit einer digitalen Kamera (Pixelfly). Eichstriche entsprechen jeweils 50 μ m.

Die nukleoplasmatische Lokalisation von Lamin B3 in runden Spermatiden konnte bestätigt werden durch eine Immunfluoreszenzanalyse von Hoden-Gefrierschnitten mit Geweben einer adulten Maus mit dem Lamin-B3-spezifischen Antikörper, die am konfokalen Laser Scanning Mikroskop ausgewertet wurden (Abbildung 4-5). Durch die etwa 5 μ m dicken Gefrierschnitte wurden am Mikroskop (Leica TCS-SP) optische Schnitte in einem Abstand von ca. 0,4 μ m gelegt (Abbildung 4-5 A-C). Die Aufnahmen wurden mit einem 40 x Neofluar Ölimmersionsobjektiv (N.A. = 1,25) bei einem Pinhole von 0,4 gemacht. Parallel zur Lokalisation von Lamin B3 in runden Spermatiden wurde

die Verteilung der LAPs2 in denselben Zellen untersucht, Proteine, von denen bekannt ist, dass sie Bestandteile der inneren Kernmembran sind (zusammengefasst in Dechat et al., 2000; Worman und Courvalin, 2000). Während die Verwendung des gegen die LAPs2 gerichteten Antikörpers (XIII D4) wie erwartet ein Signal im Bereich der Kernhülle lieferte (siehe auch Alsheimer et al., 1998), führte die Verwendung des Lamin-B3-Antikörpers neben einer Kernhüllenfluoreszenz zu einer eindeutigen Markierung des Nukleoplasmas in runden Spermatiden (Abbildung 4-5 E-G).



Abb. 4-5: Immunfluoreszenz-Analyse von Lamin B3 in runden Spermatiden, ausgewertet am CLSM. Gezeigt ist die Immunfluoreszenz-Analyse an einem ca. 5 μ m dicken Hoden-Gefrierschnitt einer adulten Maus. Für die Immunfluoreszenz wurde der für Lamin B3 spezifische Antikörper (α -B3 2113, affinitätsgereinigt) mit einem geeigneten, an Cy2 gekoppelten Sekundärantikörper verwendet. Dargestellt ist eine Serie optischer Schnitte durch das Präparat im Abstand von jeweils 0,4 μ m (A-C). In (E) ist die Vergrößerung des in (C) weiß umrahmten Ausschnitts abgebildet (dieselbe Schnittebene). Für die Vergrößerung ist zusätzlich ein Vergleich der Lokalisation von Lamin B3 (E) mit der der LAPs2 (F) abgebildet. Die LAPs2 wurden mit Hilfe des Antikörpers XIII D4 und einem geeigneten, an Texas Red gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Übereinanderlagerung beider Fluoreszenzsignale ist in (G) abgebildet. Neben den Antikörperfärbungen ist zusätzlich das dichromatische Bild desselben Bildausschnitts abgebildet (D, H). Eichstriche entsprechen 10 μ m (A-D) bzw. 5 μ m (E-H).

4.1.3 Umverteilung von Lamin B3 im Verlauf der Spermatogenese

Im vorigen Abschnitt wurde gezeigt, dass Lamin B3 erst in postmeiotischen runden Spermatiden exprimiert wird. Dort zeigt es in der Immunfluoreszenz das für Lamine zu erwartende ringförmige Signal im Bereich der Kernhülle. Zusätzlich zu dieser Lokalisation konnte Lamin B3 aber auch im Kerninneren nachgewiesen werden, was einen Unterschied zu den anderen in Keimzellen exprimierten Laminen darstellt, den Laminen B1 und C2, die ausschließlich an der Kernhülle zu finden sind (Vester et al., 1993; Alsheimer et al., 1999).

Dieses Verteilungsmuster von Lamin B3, wie es in runden Spermatiden beobachtet werden konnte (Abbildung 4-6 A), veränderte sich in späteren Stadien der Spermiogenese. Der Antikörper erzeugte kein ringförmiges Fluoreszenzsignal mehr, es war vielmehr eine Umverteilung des Proteins zu einem Pol des Spermatidenkerns hin zu beobachten. Diese Polarisierung der Lamin-B3-Verteilung nimmt mit Fortschreiten des Differenzierungsprozesses der Keimzellen in der Spermiogenese immer weiter zu (Abbildung 4-6 B-E). Dass es sich dabei um den posterioren Pol des Zellkerns handelt, konnte durch einen Vergleich der Lokalisationen von Lamin B3 und Tubulin festgestellt werden. Tubulin befindet sich in diesen Zellen vor allem im Bereich der sog. Manschette, an der im weiteren Verlauf der Spermiogenese das Flagellum, der Spermienschwanz, entsteht (Abbildung 4-6 D-E, Pfeil in D').



Abb. 4-6: Umverteilung von Lamin B3 im Verlauf der Spermiogenese. Bildlegende siehe nächste Seite.

Abb. 4-6: Umverteilung von Lamin B3 im Verlauf der Spermiogenese (siehe vorherige Seite).

Gezeigt ist die indirekte Immunfluoreszenz auf 2 μ m dicken Hodenschnitten von in Paraffin eingebetteten Geweben aus einer adulten Maus. Für die Immunfluoreszenz wurde der Anti-Lamin-B3-Antikörper (α -B3 2113, affinitätsgereinigt) verwendet. Gebundene Antikörper wurden über einen geeigneten, an Cy2 gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Präparate wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiophot) mit angeschlossener digitaler Kamera (Pixelfly) ausgewertet. Lamin B3 konnte sowohl in runden (A, B) als auch in elongierten Spermatiden (C) nachgewiesen werden. Zusätzlich ist deutlich die Umverteilung des Proteins im Verlauf des Differenzierungsprozesses der Spermatiden zu einem Pol des Zellkerns hin erkennbar (A-C). Zur spezifischen Anfärbung der DNA wurde der Schnitt parallel zu den Antikörpern mit Hoechst 33258 behandelt (A'-C'). In (D-E) ist eine detailliertere Analyse der Verteilung von Lamin B3 abgebildet. Dazu wurde eine vergleichende Lokalisation von Lamin B3 (D, E; α -B3 2113, affinitätsgereinigt) und Tubulin (D', E'; α -Tubulin, Sigma) durchgeführt. Deutlich erkennbar ist, dass Lamin B3 selektiv am posterioren Pol des Zellkerns lokalisiert ist, sowohl in runden (D-D''; Pfeil in (D') markiert den Spermienschwanz) als auch in elongierten (E-E'') Spermatiden. Parallel zur Antikörperbehandlung wurde die DNA spezifisch mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 angefärbt (D'', E''). Die Eichstriche entsprechen 10 μ m (A-C) bzw. 5 μ m (D-E).

Zusammengefasst konnte eindeutig gezeigt werden, dass Lamin B3 ausschließlich in postmeiotischen Zellen während der Spermiogenese exprimiert wird. Das Protein ist in runden Spermatiden im Bereich der Kernhülle lokalisiert, aber zusätzlich auch im Nukleoplasma. Dieses Verteilungsmuster verändert sich im weiteren Verlauf der Spermiogenese: die Verteilung von Lamin B3 erscheint immer stärker konzentriert in Richtung des posterioren Pols des Zellkerns runder und elongierter Spermatiden, bis es in noch weiter fortgeschrittenen Stadien nicht mehr nachweisbar war.

4.2 Proteindomänen von Lamin B3, die die Lokalisation des Proteins und die Morphologie des Zellkerns beeinflussen

In der Erstbeschreibung von Lamin B3 (Furukawa und Hotta, 1993) wurde gezeigt, dass dieses Protein bei ektopischer Expression in Kulturzellen zwar an der Kernhülle lokalisiert ist, dass diese Expression aber auch zu dramatischen Veränderungen der Morphologie des Zellkerns führt; es konnte ein Wechsel von annähernd kugel- hin zu hakenförmig beobachtet werden. In dieser Arbeit (Furukawa und Hotta, 1993) wurden auch Daten präsentiert, die einen Einfluss des spezifischen N-Terminus von Lamin B3 in diesem Prozess sowie bei der korrekten Lokalisation des Proteins an der Kernhülle vermuten lassen: wurde ein mutiertes Lamin B3 exprimiert, dem die ersten 59 Aminosäuren fehlten, so waren keine Veränderungen der Zellkernmorphologie erkennbar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte diese mögliche Bedeutung der spezifischen N-terminalen Domäne auf die Lokalisation des Proteins und ihr Einfluss auf die spezifischen biochemischen Eigenschaften des Proteins genauer untersucht werden. Parallel sollte dabei das exakte Epitop innerhalb der N-terminalen Domäne von Lamin B3 bestimmt werden, das für die beobachteten Effekte verantwortlich ist. Außerdem sollte geklärt werden, auf welche Weise Lamin B3 die Stabilität und funktionelle Integrität der Kernhülle in transfizierten Kulturzellen beeinflusst. Dazu wurden zunächst die wildtypische und einige mutierte cDNAs von Lamin B3, die für unterschiedlich stark trunkierte Proteinvarianten kodieren, hergestellt und in geeignete Expressionsvektoren kloniert.

4.2.1 Herstellung der cDNA-Konstrukte

4.2.1.1 Gewinnung und Klonierung der wildtypischen cDNA von Lamin B3

Als Ausgangspunkt für die Gewinnung der cDNA von Lamin B3 diente zum einen das Konstrukt, das für die Proteinexpression zur Antikörperherstellung verwendet worden war (GST-B3_NT, vgl. Abbildung 4-1), und zum andern ein cDNA-Klon von Lamin B2 (PMID: X54098; Höger et al., 1990). Zunächst wurde das DNA-Fragment, das für den Lamin-B3-spezifischen N-Terminus kodiert, aus dem Vektor pGEX-5X-1 mit dem Restriktionsenzym EcoRI ausgeschnitten und in den mit demselben Enzym restringierten Vektor pBluescript SK⁺ eingesetzt (Konstrukt: pBI-B3_NT). Positive Klone wurden auf die Orientierung der inserierten Sequenz hin überprüft. Die benötigte Orientierung war 5'-3' (T3-Promotor – Insert (5'-3') – T7-Promotor). In einem zweiten Schritt wurde der Sequenzbereich, der in Lamin B3 und Lamin B2 identisch ist, über PCR mit Pfu-Polymerase und den Primern *LB3/B2-5'* und *LB3/B2-3'* (Details zu den Primern finden sich im Anhang) amplifiziert und anschließend in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] zwischenkloniert. Aus einem Klon mit passend orientiertem DNA-Fragment (M13_{rev} – Insert (3'-5') – M13_{fwd}) wurde das einklonierte DNA-Fragment mit den Enzymen EcoRV und KpnI herausgeschnitten und als zweites Insert in das oben beschriebene Konstrukt pBI-B3_NT eingesetzt (Konstrukt: B2/B3 in pBI-B3_NT).

Dieses Konstrukt diente als Template für eine PCR mit Pfu-Polymerase und den Primern *B3spez3*' und *LB3/B2-5*' (Details zu den Primern finden sich im Anhang). Nach der Ligation des PCR-Produkts lag die vollständige cDNA von Lamin B3 im Vektor pBluescript SK⁺ vor. Die spezifische cDNA von Lamin B3 wurde über eine erneute PCR mit Pfu-Polymerase und den Primern *LB3-5*' und *LB3/B2-3*' (Details zu den Primern finden sich im Anhang) gewonnen und in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert. Zur Klonierung der cDNA von Lamin B3 in eukaryontische Expressionsvektoren wurde diese wieder über eine PCR mit Pfu-Polymerase und Primern, die Schnittstellen einführten (*B3_5'mutGFP(XhoI)*) und *B3_3'CaaX-WT(KpnI)*; Details sind im Anhang beschrieben), gewonnen. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit den entsprechenden Enzymen verdaut (XhoI und KpnI) und dann in den mit denselben Enzymen restringierten Expressionsvektor pEGFP-N1 eingesetzt. Die Transfektion dieses Konstrukts führt zur Expression von Lamin B3 ohne EGFP, welches ebenfalls im verwendeten Vektor kodiert ist (B3_WT, siehe auch Abbildung 4-7 B).



Abb. 4-7: Übersicht aller verwendeten Konstrukte.

(A) Schematische Darstellung der Lamine B2 und B3. In Lamin B3 sind der nichthelikale Kopfbereich (NT_B2) und große Teile der zentralen α -helikalen Domäne (Helices 1A und 1B) ersetzt durch eine 84 Aminosäuren umfassende Domäne, spezifisch für Lamin B3 (NT_B3). (B) Schematische Übersicht der in den verschiedenen Analysen verwendeten Proteinkonstrukte.

4.2.1.2 Herstellung N-terminaler Deletionsmutanten von Lamin B3

N-terminale Deletionsmutanten wurden alle über PCR mit Pfu-Polymerase und entsprechenden Primern, die Schnittstellen mit einführen (siehe Anhang für weitere Details), hergestellt. Wie für die wildtypische cDNA beschrieben, wurden die PCR-Produkte – mit zu den durch die Primer eingeführten Schnittstellen passenden Restriktionsenzymen (XhoI und KpnI) – verdaut und in den Vektor pEGFP-N1 eingesetzt (die Vektorkonstrukte führten zur Expression verkürzter Lamin-B3-Moleküle ohne das ebenfalls im Vektor kodierte EGFP). Es wurden zunächst drei N-terminale

Deletionsmutanten von Lamin B3 hergestellt (siehe auch Abbildung 4-7 B): (1) B3_ Δ N25, es fehlen die ersten 25 Aminosäuren (PCR mit den Primern *B3_5'dN25AS(XhoI)* und *B3_3'CaaX-WT(KpnI)*; Details siehe Anhang), (2) B3_ Δ N42, es fehlen die ersten 42 Aminosäuren (PCR mit den Primern *B3_5'dN42(XhoI)* und *B3_3'CaaX-WT(KpnI)*; Details siehe Anhang) und (3) B3_ Δ N59, es fehlen die ersten 59 Aminosäuren (von diesem Konstrukt wurde beschrieben, dass es die Kernmorphologie nicht beeinflusst (Furukawa und Hotta, 1993); PCR mit den Primern *B3_5'dN59AS(XhoI)* und *B3_3'CaaX-WT(KpnI)*; Details zu den Primern siehe Anhang).

4.2.2 Die Expression N-terminal trunkierter Lamin-B3-Proteine in COS-7-Zellen zeigt dieselben Effekte wie wildtypisches Lamin B3

Die ektopische Expression des wildtypischen Lamin-B3-Proteins in COS-7-Zellen führte zu vergleichbaren Effekten, wie sie von Furukawa und Hotta (1993) beschrieben worden waren. Das Protein konnte in der Immunfluoreszenz mit dem spezifisch Lamin B3 bindenden Antikörper größtenteils im Bereich der Kernhülle nachgewiesen werden, wo es gleichmäßig verteilt war. Zusätzlich konnte für einen nicht unerheblichen Anteil des Proteins eine Lokalisation im Nukleoplasma nachgewiesen werden (siehe Abbildungen 4-8 A und 4-10 A), wie es bereits für die *in-vivo*-Situation in Spermatiden gezeigt worden war (vgl. Abbildungen 4-4 A, 4-5 und 4-6 A-B). Am auffälligsten waren aber die zu beobachtenden Veränderungen der Kernmorphologie in den Zellen, die Lamin B3 exprimierten: die Zellkerne wiesen eine gelappte bis hakenförmige Gestalt auf (siehe Abbildungen 4-8 A und 4-9 A, A'), während nicht transfizierte Kontrollzellen einen "normalen", näherungsweise sphärischen Nukleus besaßen (vgl. Abbildung 4-10 D und E). Um auszuschließen, dass dieser Effekt nicht nur als ein zelltypspezifisches Artefakt bei Expression von Lamin B3 in COS-7-Zellen auftritt, wurden noch andere Zelllinien getestet. Doch in allen untersuchten Zelllinien (COS-7, HepG2, RV-SMC und 3T3) konnte bei Expression von Lamin B3 der oben beschriebene Phänotyp beobachtet werden (siehe Abbildung 4-8 A-D).





Gezeigt ist die Immunfluoreszenz auf Zellen verschiedener Linien, die wildtypisches Lamin B3 (B3_WT) exprimieren. Um die Verteilung von Lamin B3 in den Zellen zu analysieren, wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch dieses Protein bindet (α-B3 2113, affinitätsgereinigt). Gebundene Antikörper wurden mit Hilfe von an Cy2 (A) bzw. Texas Red (B-D) gekoppelten, geeigneten Sekundärantikörpern nachgewiesen. Die Auswertung der Präparate erfolgte entweder an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiophot) mit angeschlossener Digitalkamera (Pixelfly; A-C) oder am CLSM (Leica TCS-SP; D). Eichstrich entspricht 10 μm.

Um zu klären, inwieweit der spezifische N-Terminus bzw. welcher genaue Bereich innerhalb dieser Domäne einerseits die Lokalisation des Proteins und andererseits die Veränderungen des Zellkerns in transfizierten Zellen beeinflusst, wurden die unter 4.2.1.2 beschriebenen Deletionsmutanten von Lamin B3 (vgl. Abbildung 4-7 B) in COS-7-Zellen exprimiert und mit Hilfe von Immunfluoreszenz mit dem Lamin-B3-spezifischen Antikörper analysiert. Die durch die beiden N-terminal trunkierten Varianten von Lamin B3, B3_ΔN25 und B3_ΔN42, ausgelösten Phänotypen waren identisch zu dem in Zellen, die wildtypisches Lamin B3 (B3_WT) exprimierten. Beide Proteine zeigten eine Lokalisation und eine Beeinflussung der Kernmorphologie, die von wildtypischem Lamin B3 (B3_WT) nicht zu unterscheiden waren (Abbildung 4-9 A-C).



Abb. 4-9: Expression verschiedener N-terminaler Deletionsmutanten von Lamin B3 in COS-7-Zellen.

Gezeigt ist die Immunfluoreszenz von COS-7-Zellen, die wildtypisches Lamin B3 (A) bzw. N-terminale Deletionsmutanten des Proteins, in denen die ersten 25 (B) oder die ersten 42 Aminosäuren (C) fehlen, exprimieren. Die Immunfluoreszenz wurde mit Hilfe des spezifisch gegen Lamin B3 gerichteten Antikörpers (α -B3 2113, affinitätsgereinigt) und geeigneter, an Texas Red gekoppelter Sekundärantikörper durchgeführt. Die DNA wurde parallel zur Antikörperbehandlung mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 angefärbt (A'-C'). Die Präparate wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiophot), ausgestattet mit einer digitalen Kamera (Pixelfly), ausgewertet. Eichstrich entspricht 10 µm.

Das Konstrukt B3_ Δ N59 konnte mit dem zur Verfügung stehenden Antikörper nicht mehr detektiert werden, wodurch eine Analyse der Lokalisation dieses Proteins nicht möglich war. Allerdings konnte in der DNA-Färbung deutlich beobachtet werden, dass ein großer Anteil der Zellen deformierte Kerne aufwies (nicht gezeigt). Diese Beobachtung war überraschend, da für diese Deletion der ersten 59 Aminosäuren beschrieben worden war, dass sie bei Expression in Kulturzellen keine Veränderung der Zellkernmorphologie hervorruft (Furukawa und Hotta, 1993). Für die weitere Analyse der Bedeutung des N-Terminus sollte dieser vollständig entfernt werden. Um solch ein Konstrukt nachweisen zu können, musste ein "Tag" – eine Markierung – eingeführt werden.
4.2.3 Herstellung chimärer Lamin-Moleküle mit EGFP oder MYC-Epitop

Für die Herstellung eines wildtypischen EGFP-Lamin-B3-Fusionsproteins (EGFP-B3_WT; siehe Abbildung 4-7 B) wurde die entsprechende cDNA aus dem Vektor pEGFP-N1 ausgeschnitten und in den Vektor pEGFP-C3 eingesetzt. Dadurch entstand ein Fusionsprotein aus Lamin B3, das am N-Terminus das EGFP trägt.

Für die Einführung des MYC-Epitops ("MYC-Tag"; Evan et al., 1985) am N-Terminus von Lamin B3 wurden die synthetischen Oligonukleotide *Oligo_NTmyc-sense* und *Oligo_NTmyc-antisense* als zweites Insert über die Schnittstellen Eco47III und XhoI vor die im Vektor pEGFP-N1 liegende cDNA von Lamin B3 eingesetzt (Details zu den Oligos und zur Insertion finden sich im Anhang; Konstrukt: MYC-B3_WT; siehe auch Abbildung 4-7 B).

Um einen Einfluss des MYC-Epitops oder des EGFP-Fusionsanteils der Proteine ausschließen zu können, wurden alle drei wildtypischen Lamin-B3-Varianten (B3_WT, MYC-B3_WT und EGFP-B3_WT) in COS-7-Zellen exprimiert und ihr Verhalten bzw. ihre Effekte analysiert. Die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop ergab, dass die Effekte beider chimären Proteine EGFP-B3_WT und MYC-B3_WT nicht vom wildtypischen Konstrukt B3_WT zu unterscheiden waren. Beide Proteine waren ausschließlich im Kern nachzuweisen, und dort hauptsächlich im Bereich der Peripherie der stark deformierten Zellkerne. Wie beim Protein B3_WT war auch hier in beiden Fällen ein eindeutiges nukleoplasmatisches Signal erkennbar (Abbildung 4-10 A-C). Das Anhängen des MYC-Epitops bzw. EGFP an den N-Terminus von Lamin B3 beeinflusst demnach nicht die Eigenschaften des Proteins, bezogen auf seine korrekte Lokalisation in der Zelle und seinen Einfluss auf die Morphologie des Zellkerns.

Um einen unspezifischen Effekt, ausgelöst durch EGFP oder das MYC-Epitop, in den transfizierten Zellen ausschließen zu können, wurden als zusätzliche Kontrolle chimäre Lamin-B2-Proteine hergestellt, die entweder EGFP oder das MYC-Epitop an ihrem N-Terminus aufweisen (siehe auch Abbildung 4-7 B). Die wildtypische cDNA von Lamin B2 wurde durch eine PCR mit den Primern *B2NT-5'(XhoI)* und *B3_3'CaaX-WT(KpnI)* (Details zu den Primern siehe Anhang) aus einem cDNA-Klon von Lamin B2 (PMID: X54098; Höger et al., 1990) gewonnen. Das PCR-Produkt wurde dann, wie unter 4.2.1.1 und 4.2.1.2 beschrieben, mit XhoI und KpnI verdaut und in die Vektoren pEGFP-N1 (für das Konstrukt MYC-B2) und pEGFP-C3 (für das Konstrukt EGFP-B2) eingesetzt. Das Anhängen des MYC-Epitops verlief analog wie oben für das Konstrukt MYC-B3_WT beschrieben durch Insertion der beiden synthetischen Oligonukleotide *Oligo_NTmyc-sense* und *Oligo_NTmyc-antisense* vor die cDNA von Lamin B2 in den Vektor pEGFP-N1. Die Analyse dieser chimären Lamin-B2-Proteine in COS-7-Zellen ergab das für Lamin B2 erwartete Bild: sowohl EGFP-B2 als auch MYC-B2 befinden sich ausschließlich in der Peripherie nicht deformierter Zellkerne (Abbildung 4-10 D-E).



Abb. 4-10: Einfluss von N-terminal fusioniertem EGFP oder MYC-Epitop an Lamin B2 und Lamin B3. Gezeigt ist die Analyse der Expression verschiedener Lamin-B2- (EGFP-B2 und MYC-B2; D und E) und Lamin-B3-Konstrukte (B3_WT, MYC-B3_WT und EGFP-B3_WT; A-C) in COS-7-Zellen. Die Verteilung der Proteine B3_WT (A), MYC-B3_WT (B) und MYC-B2 (E) wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper (α-B3 2113, affinitätsgereinigt; α-MYC, Invitrogen) analysiert. Gebundene Antikörper wurden über geeignete, an Cy2 bzw. Texas Red gekoppelte Sekundärantikörper detektiert. Um die Verteilung der EGFP-Fluoreszenz bei den Proteinen EGFP-B3_WT (C) und EGFP-B2 (D) zu analysieren, wurden die Zellen lediglich in 1-2 % Formaldehyd fixiert. Die Auswertung der Präparate erfolgte am CLSM (Leica TCS-SP). Eichstrich entspricht 10 μm.

4.2.4 Der spezifische N-Terminus von Lamin B3 spielt weder eine Rolle bei der korrekten Lokalisation des Proteins an der Kernhülle noch bei den Veränderungen der Zellkernmorphologie

Um zu klären, ob der spezifische N-Terminus von Lamin B3 doch eine Rolle bei der korrekten Lokalisation des Proteins an der Kernhülle spielt und an den beobachteten Veränderungen in der Zellkernmorphologie beteiligt ist, wurden vier weitere Proteinkonstrukte hergestellt: (1) EGFP-B3 $\Delta N84$, (2) MYC-B3 Δ N84, (3) MYC-B2/B3 (der B3-spezifische N-Terminus wurde gegen die nichthelikale Kopfdomäne von Lamin B2 ausgetauscht) und (4) B3/B2 (die Kopfdomäne in Lamin B2 wurde gegen den spezifischen N-Terminus von Lamin B3 ausgetauscht). Die cDNAs der N-terminal trunkierten Proteine wurden über PCR mit den Primern B3-5'dN84(XhoI) und B3 3'CaaX-WT(KpnI) (Details zu den Primern siehe Anhang) aus der wildtypischen Lamin-B3-cDNA gewonnen und in die Vektoren pEGFP-C3 (EGFP-B3 ΔN84) und pEGFP-N1 (in diesem Fall zusammen mit der Sequenz für das MYC-Epitop; MYC-B3 ΔN84) eingesetzt. Für MYC-B2/B3 wurde zunächst mit der cDNA von Lamin B2 (PMID: X54098; Höger et al., 1990) als Matrize eine PCR mit den Primern LB3/B2-5' und B2NT-3'neu durchgeführt und das PCR-Produkt über eine Ligation geschlossen. Aus diesem Vektorkonstrukt wurde der Sequenzabschnitt, der für das Konstrukt B2/B3 kodiert, über PCR mit den Primern B2NT-5'(XhoI) und B3 3'CaaX-WT(KpnI) amplifiziert und anschließend über XhoI und KpnI zusammen mit der Sequenz des MYC-Epitops in den Vektor pEGFP-N1 eingesetzt. Für die Herstellung von B3/B2 wurde die gesamte cDNA-Sequenz von Lamin B2 ohne den nichthelikalen Kopfbereich über PCR mit den Primern B2coil1A-5' und B3 3'CaaX-WT(KpnI) herausamplifiziert und in das Vektorkonstrukt pBl-B3 NT eingesetzt (musste die gleiche Orientierung aufweisen wie das Insert für B3 NT!; siehe auch Herstellung der wildtypischen cDNA von Lamin B3 unter 4.2.1.1). Über PCR mit den Primern *LB3spez3*' und *B2coil1A-5*' und anschließende Ligation des PCR-Produkts wurden beide Teile miteinander verknüpft. Die vollständige Sequenz von B3/B2 wurde schließlich über eine PCR mit den Primern *B3_5'mutGFP(XhoI)* und *B3_3'CaaX-WT(KpnI)* gewonnen und dann über XhoI und KpnI in den Vektor pEGFP-N1 eingesetzt (Konstrukt: B3/B2). In Abbildung 4-7 B sind alle verwendeten Konstrukte schematisch dargestellt.

Diese Konstrukte wurden jetzt verwendet, um eine mögliche Bedeutung der 84 Aminosäuren umfassenden N-terminalen Domäne von Lamin B3 bei der korrekten Lokalisation des Proteins oder den Veränderungen der Morphologie der Zellkerne zu klären. Ein Einfluss dieser Domäne auf die korrekte Lokalisation von Lamin B3 konnte durch die Expression der Proteine EGFP-B3 AN84 und MYC-B3 ΔN84 in COS-7-Zellen ausgeschlossen werden, da deren Expression zu demselben Phänotyp führte, wie er bereits für wildtypisches Lamin B3 beschrieben wurde (siehe Abbildung 4-10 A-C). Die Proteine waren hauptsächlich an der Kernperipherie lokalisiert mit einem zusätzlichen, deutlichen Signal im Nukleoplasma, wo sie homogen verteilt waren. Außerdem führte die Expression der N-terminal trunkierten Varianten von Lamin B3 in COS-7-Zellen ebenfalls zu hakenförmigen Zellkernen, wie sie schon beim wildtypischen Protein beobachtet werden konnten (Abbildung 4-11 A und B). Dies belegt eindeutig, dass die N-terminale Domäne von Lamin B3 nicht für die Lokalisation des Proteins an der Kernhülle verantwortlich ist. Dieser Prozess scheint auch bei diesem Lamin über den von den somatischen Isoformen her bekannten Weg abzulaufen, nämlich die Farnesylierung des Cysteins in der C-terminalen CaaX-Box (zusammengefasst in Krohne, 1998). Dies konnte durch die Expression des Proteins MYC-B3 Δ CaaX in COS-7-Zellen bestätigt werden; die cDNA wurde über PCR mit den Primern B3 5'mutGFP(XhoI) und B3 3'dCaax(KpnI) gewonnen und (zusammen mit der Sequenz des MYC-Epitops, siehe 4.2.3) über XhoI und KpnI in den Vektor pEGFP-N1 eingesetzt. Dieses Protein war homogen im Nukleoplasma verteilt, die Nukleolen blieben ausgespart (Abbildung 4-11 C).

Die auch bei Expression der N-terminal trunkierten Proteine EGFP-B3_ΔN84 und MYC-B3_ΔN84 auftretenden Deformationen der Zellkerne waren unerwartet, da von Furukawa und Hotta (1993) beschrieben worden war, dass dieser Effekt spezifisch durch den Lamin-B3-spezifischen N-Terminus hervorgerufen wird. Diese Unstimmigkeit konnte mit der Analyse der Proteine MYC-B2/B3 und B3/B2 in transfizierten COS-7-Zellen geklärt werden. Das Protein MYC-B2/B3 war an der Kernperipherie lokalisiert und verursachte die Ausbildung hakenförmiger Zellkerne (Abbildung 4-11 D). Das Protein war demnach in seinem Verhalten nicht von wildtypischem Lamin B3 zu unterscheiden. Das Verhalten des anderen Proteins, B3/B2, entsprach dagegen exakt dem von wildtypischem Lamin B2 bzw. den Konstrukten EGFP-B2 und MYC-B2. B3/B2 konnte ausschließlich im Bereich der Kernhülle nachgewiesen werden und bei den Zellkernen transfizierter COS-7-Zellen waren keine Auffälligkeiten vorhanden; sie behielten ihre normale Gestalt (Abbildung 4-11 E).



Abb. 4-11: Analyse unterschiedlich mutierter Lamin-Proteine in COS-7-Zellen.

Gezeigt ist die Fluoreszenzanalyse verschiedener Lamin-B3- und Lamin-B2-Proteine, bei denen Domänen entweder deletiert (A-C) oder ausgetauscht (D, E) wurden. Die Verteilung der Proteine mit MYC-Epitop (B-D) und des Proteins B3/B2 (E) wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper (α -MYC, Invitrogen; α -B3 2113, affinitätsgereinigt) untersucht. Gebundene Antikörper wurden über geeignete, an Cy2 bzw. Texas Red gekoppelte Sekundärantikörper nachgewiesen. Zellen, die EGFP-B3 Δ N84 exprimierten (A), wurden vor der Auswertung lediglich fixiert (1-2 % Formaldehyd). Die Auswertung aller Präparate erfolgte schließlich am CLSM (Leica TCS-SP). Eichstrich entspricht 10 µm.

Dieses Experiment (vgl. Abbildung 4-11 D und E) belegt, dass der N-Terminus von Lamin B3 auch nicht für die Deformation der Zellkerne in transfizierten COS-7-Zellen verantwortlich ist. Besonders interessant ist dabei das Verhalten des Proteins MYC-B2/B3 (Abbildung 4-11 D), das hauptsächlich an der Kernhülle zu finden ist und die Ausbildung hakenförmiger Zellkerne induziert. Dieses Protein stellt ein somatisches Lamin B2 dar, in dem die Aminosäuren 27-206 fehlen, der Bereich, der die Helices 1A und 1B der zentralen Domäne umfasst. So gibt dieser Versuch genügend Hinweise darauf, dass nicht der 84 Aminosäuren umfassende N-Terminus für die beobachteten Kerndeformationen ist, sondern vielmehr die im Vergleich zu Lamin B2 stark verkürzte zentrale, α -helikale Domäne in Lamin B3, die bei allen Intermediärfilamentproteinen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung stabiler Filamente und übergeordneter Polymerstrukturen spielt (zusammengefasst in Stuurman et al., 1998; Herrmann und Aebi, 2004). Außerdem wurde beschrieben, dass die Expression einer Lamin-B1-Mutante, in der ein großer Bereich der zentralen Stäbchendomäne deletiert ist, in Kulturzellen vergleichbare Effekte bei den Zellkernen transfizierter Zellen auslösen kann, wenngleich der exakte Phänotyp etwas von dem abweicht, der durch die Expression von Lamin B3 ausgelöst wird (Schirmer et al., 2001; siehe 5.2).

4.3 Die besonderen Eigenschaften von Lamin B3 beeinflussen die Integrität des Zellkerns in transfizierten COS-7-Zellen

4.3.1 Das Verhalten endogener Kernhüllenkomponenten in mit Lamin B3 transfizierten COS-7-Zellen

Im vorigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass die Verkürzung der zentralen α-helikalen Domäne in Lamin B3, verglichen mit der somatischen Isoform Lamin B2, die Ursache für die beobachteten Verformungen der Zellkerne in transfizierten COS-7-Zellen ist. Aber weshalb verändern die Zellkerne in transfizierten Zellen ihre Form? Denkbar wäre, dass die ektopische Expression von Lamin B3 das Verhalten endogener Proteinkomponenten der Kernhülle beeinflusst. Eine dramatische Umverteilung von Kernhüllenkomponenten bewirkt dann den Verlust der strukturellen Integrität der Kernperipherie, was im Endeffekt zur Deformation des Zellkerns führt. Um dies zu klären, wurde in mit Lamin B3 transfizierten COS-7-Zellen die Verteilung endogener Kernhüllenproteine in der Immunfluoreszenz analysiert. In Abbildung 4-12 A-C ist gezeigt, dass die Verteilung der endogenen Lamine durch die ektopische Expression von B3 WT nicht beeinflusst zu sein scheint. Weder mit einem Antikörper, der spezifisch alle somatischen Lamine erkennt (Abbildung 4-12 A), noch mit einem Antikörper, der spezifisch alle A-Typ-Lamine erkennt (Abbildung 4-12 B), konnte eine außergewöhnliche, für somatische Lamine untypische, Verteilung festgestellt werden. Auch die Lokalisation von Lamin B2, der somatischen Isoform von Lamin B3, zeigte keinerlei Veränderung oder Auffälligkeit in Zellen, die Lamin B3 exprimierten im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen (Abbildung 4-12 C). Zusammengefasst ist keines der endogenen Lamine durch Lamin B3 in seiner Verteilung beeinflusst. Als nächstes wurde die Verteilung einer der am besten charakterisierten Gruppen von mit Laminen interagierenden Proteinen untersucht, den Lamina-assoziierten Polypeptiden 2 (LAPs2; Foisner und Gerace, 1993; zusammengefasst in Dechat et al., 2000; Worman und Courvalin, 2000). Die Immunfluoreszenz mit einem spezifisch die LAPs2 erkennenden Antikörper zeigte, dass auch diese Proteine in transfizierten Zellen ein im Vergleich zu nicht transfizierten Kontrollzellen unverändertes Verteilungsmuster aufwiesen (Abbildung 4-12 D). Dies lässt vermuten, dass die ektopische Expression von Lamin B3 in COS-7-Zellen die Wechselwirkungen der LAPs2 mit anderen Proteinen des Zellkerns offensichtlich nicht dramatisch beeinflusst. Anhand der Daten kann man annehmen, dass die auftretenden Deformationen der Zellkerne nicht dadurch zustande kommen, dass die Expression von Lamin B3 in den Zellen eine grundlegende Umorganisation endogener Proteinkomponenten der Kernhülle induziert.



Abb. 4-12: Vergleichende Lokalisation von B3_WT und endogenen Kernhüllenproteinen in COS-7-Zellen. Gezeigt ist die Verteilung von ektopisch exprimiertem B3_WT in COS-7-Zellen (A-D, erste Spalte). In der zweiten Spalte ist die Antikörperfärbung endogener Kernhüllenkomponenten abgebildet, die dritte Spalte zeigt die Übereinanderlagerung der beiden Bilder aus den Spalten 1 und 2. Die Verteilung aller untersuchten Proteine wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper (B3_WT: α-B3 2113, affinitätsgereinigt, A-D; alle somatischen Lamine: MAK L3F4, A; alle A-Typ-Lamine: MAK R27, B; Lamin B2: MAK X-223, C; LAPs2: MAK XIII D4, D) untersucht. Gebundene Antikörper wurden über geeignete, an Cy2 bzw. Texas Red gekoppelte Sekundärantikörper detektiert. Die Auswertung der Präparate erfolgte am CLSM (Leica TCS-SP). Eichstrich entspricht 10 μm.

4.3.2 Lamin B3 weist im Vergleich zu Lamin B2 eine erhöhte Mobilität auf

4.3.2.1 Biochemische Eigenschaften von Lamin B3

Eine andere mögliche Ursache für die auftretenden Kernverformungen ist, dass es sich um einen sekundären Effekt handelt, der durch eine lokale Destabilisierung bzw. "Aufweichung" des Kernlamina-Polymers durch den Einbau von Lamin-B3-Molekülen entsteht. Es wurde schon in mehreren Arbeiten berichtet, dass die Zusammensetzung der Lamina in verschiedenen Geweben bzw. Zelltypen sehr variabel sein kann. So sind in ausdifferenzierten Zellen oder beispielsweise in Muskelzellen B-Typ-Lamine nur schwach exprimiert und die dort vorhandene Lamina wird hauptsächlich aus A-Typ-Laminen aufgebaut. Dagegen besteht die Kernlamina in stark proliferierenden Zelltypen hauptsächlich aus den Lamin-Subtypen B1 und B2 (Broers et al., 1997; Jansen et al., 1997). Kürzlich publizierte Daten belegen, dass die Interaktionen zwischen Molekülen der verschiedenen Lamin-Subtypen in ihrer Stärke stark variieren (Schirmer und Gerace, 2004). So können 50 % der Interaktionen zwischen Lamin-B2-Molekülen bereits mit 3 M Harnstoff gelöst werden, während bei Lamin-A-Interaktionen 8 M Harnstoff nötig sind. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Lamin B2 die Löslichkeit endogener Lamine erhöht, also die Stabilität der Kernlamina verringert, und dass eine Überexpression von Lamin A die Löslichkeit endogener Komponenten der Kernhülle verringert und damit die Stabilität der Laminastruktur erhöht. Dies zeigt, dass die Zusammensetzung des Lamin-Polymers dessen Stabilität beeinflusst (Schirmer und Gerace, 2004).

Durch einen biochemischen Ansatz, mit dem wir die Löslichkeit der verschiedenen, transient in COS-7-Zellen exprimierten, Proteinkonstrukte von Lamin B2 und B3 bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen analysierten, wollten wir feststellen, ob Lamin B3 andere Bindungseigenschaften als somatisches Lamin B2 besitzt. Das Konstrukt MYC-B2 ist mit 2 M Kochsalz praktisch unlöslich und konnte demnach fast ausschließlich im Hochsalz-Pellet (Abbildung 4-13 HP) nachgewiesen werden mit einem zusätzlichen schwachen Signal im Niedrigsalz-Überstand (TÜ), wie es anhand der Daten von Schirmer und Gerace (2004) zu erwarten war. Die Proteine B3 WT und MYC-B3 WT, also wildtypisches Lamin B3, waren außer im Hochsalz-Pellet auch in erheblichen Mengen sowohl im Niedrig- als auch im Hochsalz-Überstand nachweisbar (Abbildung 4-13 TÜ und HÜ). Dies zeigt, dass die Bindungsstärke zwischen Lamin-B3-Molekülen im Vergleich zu der bei Lamin B2 gemessenen, die für Lamine ohnehin relativ schwach ist, nochmals drastisch verringert ist. Durch den Einbau von Lamin-B3-Molekülen in das Polymer der Kernlamina kann dies dann letzten Endes dazu führen, dass es zu einer Aufweichung der Kernhüllenstruktur kommt, die dann schließlich den mechanischen Belastungen, denen der Zellkern ausgesetzt ist, nicht mehr standhalten kann, was sich in den beobachteten Verformungen manifestiert. Der hohe Anteil an Lamin B3, der im Niedrigsalz-Überstand nachgewiesen werden kann, korreliert sehr gut mit der Tatsache, dass immer ein erheblicher Anteil des Proteins in der Immunfluoreszenz im Nukleoplasma hatte nachgewiesen werden können.

Interessanterweise konnte ein vergleichbares Löslichkeitsprofil für wildtypisches Lamin B3 in Hoden nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass dieses Protein auch in Keimzellen für Lamine unge-

wöhnliche biochemische Eigenschaften aufweist und dass das heterologe Zellkultursystem diesbezüglich, zumindest näherungsweise, die Verhältnisse in Keimzellen widerspiegelt.

Die beiden Proteine MYC-B3_ Δ N84 und MYC-B2/B3 zeigen ein ähnliches Löslichkeitsprofil wie wildtypisches Lamin B3 (B3_WT und MYC-B3_WT; Abbildung 4-13). Dies belegt, dass die N-terminale Domäne von Lamin B3 nur eine untergeordnete Bedeutung für die Bindungsstärke des Proteins hat. Der wesentliche Faktor für die erhöhte Löslichkeit dieser Proteine ist die verkürzte zentrale Stäbchendomäne. Die Daten von Schirmer und Gerace (2004) deuten sogar darauf hin, dass nicht die allgemeine Verkürzung dieser Domäne die Hauptursache für die verminderte Bindungsstärke von Lamin B3 ist, sondern vielmehr die Deletion des N-terminalen "Kopfes" der Stäbchendomäne. Ein somatisches Lamin B2, dem ein großer Bereich innerhalb der α -helikalen Domäne fehlt, deren "Kopf"- und "Schwanz"-Bereiche aber noch vorhanden sind, zeigt kaum veränderte Bindungseigenschaften im Vergleich zu wildtypischem Lamin B2; die Bindungsstärke ist bei der Deletionsmutante sogar noch etwas höher (Schirmer und Gerace, 2004). Diese Randbereiche der zentralen Domäne wurden schon für die Ausbildung polymerer Strukturen bei Intermediärfilamenten allgemein und bei Laminen im speziellen als essentiell beschrieben (Stuurman et al., 1996; 1998; Herrmann et al., 2000; Strelkov et al., 2002; Herrmann und Aebi, 2004; Strelkov et al., 2004).



Abb. 4-13: Analyse der Bindungsstärke durch Extraktion mit Niedrig- und Hochsalzpuffern. Bildlegende siehe nächste Seite.

Abb. 4-13: Analyse der Bindungsstärke durch Extraktion mit Niedrig- und Hochsalzpuffern (vorherige Seite).

Zur Analyse der Bindungsstärke wurden Suspensionen transient transfizierter COS-7- oder Keimzellen verwendet. Die Hälfte wurde als unbehandelte Kontrolle (K) direkt für die Gelelektrophorese vorbereitet, die andere Hälfte zunächst in Niedrigsalzpuffer und Triton X-100 extrahiert. Der Überstand wurde als Niedrigsalzoder Tritonüberstand (TÜ) gesammelt, das Pellet sukzessiv mit DNase I und 2 M NaCl extrahiert. Der resultierende Überstand wurde als Hochsalzüberstand (HÜ), das Pellet, das die unlöslichen Proteine enthält, als Hochsalz-Pellet (HP) gesammelt. Bei transient transfizierten COS-7-Zellen wurde jeweils die komplette Probe, bei Keimzellen die Proteine aus $2,5 \cdot 10^5$ Zellen aufgetragen. Die Proteine wurden in einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die analysierten Proteine wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper (α -B3 2113, affinitätsgereinigt; α -MYC, Invitrogen) nachgewiesen. Gebundene Antikörper wurden mit geeigneten Sekundärantikörpern und ECL sichtbar gemacht.

4.3.2.2 Bestimmung der Mobilität von Lamin B3 mit FRAP

Ob die verringerte Salzstabilität lediglich auf einer verminderten Bindungsstärke zwischen den Molekülen beruht, oder ob eine dynamische Bindung der Moleküle, also eine erhöhte Mobilität von Lamin B3, die Ursache dafür ist, wurde mit Hilfe von "fluorescence recovery after photobleaching" (FRAP) untersucht. Ein kleines Feld im Bereich der Kernhülle wurde gebleicht und anschließend die Erholung der Fluoreszenzintensität innerhalb dieses Feldes analysiert (Abbildung 4-14; Tabelle 4-1). Wie es bereits für Lamin B1 beschrieben worden war (Moir et al., 2000), zeigte EGFP-B2 erwartungsgemäß nahezu keine Erholung der Fluoreszenz (Abbildung 4-14; Tabelle 4-1). Die Fluoreszenz erreichte nach 200 s etwa 21 % der Ausgangsintensität, wobei der größte Teil auf unvollständiges Bleichen zurückzuführen ist, bedingt durch das experimentelle System. EGFP-B3 WT zeigte dagegen eine signifikant stärkere Erholung der Fluoreszenz auf etwa 52 % der Ausgangsintensität nach 200 s (P < 0,0001; Abbildung 4-14; Tabelle 4-1). Darüber hinaus erholte sich die Fluoreszenz überraschend schnell für ein Lamin, nach 42,9 s waren 30 % und nach 184,2 s bereits 50 % der Fluoreszenzintensität vor dem Bleichpuls erreicht (t 30, t 50; Tabelle 4-1; Abbildung 4-14). Die Mobilität des Proteins EGFP-B2/B3, das ein somatisches Lamin B2 darstellt, dem ein großer Bereich der zentralen Stäbchendomäne fehlt (coils 1A und 1B), war ebenfalls signifikant erhöht. Die ermittelten dynamischen Eigenschaften entsprachen fast exakt denen von EGFP-B3 WT (Abbildung 4-14; Tabelle 4-1). Die Mobilität der Deletionsmutante von Lamin B3, dem Protein EGFP-B3 ΔN84, war im Vergleich zu EGFP-B3 WT noch leicht erhöht. In diesem Fall waren etwa 61 % Proteinmoleküle mobil und die Erholung der Fluoreszenz verlief signifikant schneller, 30 % und 50 % der Fluoreszenzintensität vor dem Bleichpuls waren bereits nach 17.8 s (P = 0,0034) bzw. 76,1 s (P = 0.0015) erreicht (Abbildung 4-14; Tabelle 4-1). Doch verglichen mit der extremen Steigerung der Mobilität der Proteine EGFP-B3 WT und EGFP-B2/B3 zu der von EGFP-B2, hat die Wegnahme der spezifischen N-terminalen Domäne von Lamin B3 nur eine untergeordnete Bedeutung für die Mobilität des Proteins.



Abb. 4-14: "Fluorescence recovery after photobleaching" (FRAP; Bildlegende siehe nächste Seite). - 145 -

Abb. 4-14: "Fluorescence recovery after photobleaching" (FRAP; siehe vorherige Seite).

(A) FRAP-Analyse von EGFP-B3_WT, EGFP-B2, EGFP-B3_ΔN84 und EGFP-B2/B3, exprimiert in COS-7-Zellen. Ein kleiner Bereich innerhalb der Kernhülle wurde gebleicht (Pfeile) und die Erholung der Fluoreszenzintensität innerhalb dieses Bereiches über die Zeit gemessen. (B-D) Quantitative Auswertung der FRAP-Experimente. Die Erholungskinetiken von EGFP-B3_WT sind jeweils verglichen mit denen von EGFP-B2 (B), EGFP-B3 ΔN84 (C) oder EGFP-B2/B3 (D). Eichstrich entspricht 10 μm.

	0	5					
	mobile Fraktion	Erholung bei t=316 s		t 30		t 50	
Experiment	Mittelwert Erholung [%]	Erholung [%] ± SD	t-Test	Zeit [s] ± SD	t-Test	Zeit $[s] \pm SD$	t-Test
EGFP-Lamin-B3_WT	52,1	$52,3 \pm 8,4$		$42,9\pm26,2$		$184,2\pm90,6$	
EGFP-Lamin-B2	21,0	$22,2 \pm 4,1$	P<0,0001				
EGFP-Lamin-B3_AN84	61,4	$61,7 \pm 14,8$	P=0,0720	$17,8 \pm 12,6$	P=0,0034	$76,1 \pm 43,6$	P=0,0015
EGFP-B2/B3	58,4	$58{,}8\pm21{,}9$	P=0,3528	$44,2 \pm 25,9$	P=0,9026	$180,6\pm173,7$	P=0,9554

Tabelle 4-1: Erholungskinetiken der FRAP-Analysen.

Angegeben sind die Werte für die innerhalb der Messung maximal erreichte Erholung der Fluoreszenzintensität innerhalb des Bleichpunktes. Die Werte für t 30 und t 50 geben die Zeiten an, die zum Erreichen von 30 % bzw. 50 % der Ausgangs-Fluoreszenzintensität benötigt wurde. Alle Werte stellen Mittelwerte aus mindestens 10 gemessenen Zellen dar. Die Standardabweichung ist jeweils angegeben (± SD). Die Erholungskinetiken von Lamin-B2- und mutierten Lamin-B3-Fusionsproteinen wurden mit denen von EGFP-B3_WT verglichen. Die statistische Signifikanz der Daten wurde mit Hilfe des Student'schen t-Tests ermittelt.

4.3.2.3 Ermittlung der Ursache für die Erholung der Fluoreszenz innerhalb der Kernhülle mit Hilfe von FLIP

Im vorigen Abschnitt konnte eindeutig gezeigt werden, dass Lamin B3 in transfizierten COS-7-Zellen ein mobiler Bestandteil der Kernhülle ist. Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, wie die gemessene Erholung der Fluoreszenzintensität zustande kommt. Eine Möglichkeit wäre, dass nicht gebleichte Proteine durch laterale Diffusion innerhalb der Kernhülle in den ausgebleichten Bereich wandern. Eine andere Möglichkeit ist, dass gebleichte Moleküle innerhalb der Kernperipherie durch intakte Moleküle aus dem Nukleoplasma ausgetauscht werden, denn Lamin B3 konnte in allen Experimenten neben der Kernhülle auch immer im Nukleoplasma verteilt nachgewiesen werden (siehe auch Abbildungen 4-8, 4-10, 4-12 und 4-14). Die Moleküle im Bereich des Nukleoplasmas sind sehr mobil, was durch die FRAP-Analyse des Proteins EGFP-B3_ACaaX gezeigt werden konnte. Bei Ausbleichung eines Bereiches im Nukleoplasma erholte sich die Fluoreszenzintensität darin vollständig in weniger als einer Minute (Abbildung 4-15).



Abb. 4-15: FRAP von EGFP-B3_ Δ CaaX. Gezeigt ist die Erholungskinetik von EGFP-B3_ Δ CaaX im Nukleoplasma. Ein Feld mit einem Durchmesser von etwa 1 μ m wurde gebleicht und anschließend die Erholung der Fluoreszenz in diesem Bereich gemessen.

Ob tatsächlich ein Austausch von Lamin-B3-Molekülen zwischen Kernhülle und Nukleoplasma stattfindet, sollte mit Hilfe von "fluorescence loss in photobleaching" (FLIP) ermittelt werden. Dafür wurde ein kleiner Bereich innerhalb des Nukleoplasmas wiederholt gebleicht und in drei Feldern im Bereich der Kernhülle die Fluoreszenzintensität im Verlauf des Experiments gemessen. Parallel wurden in einer nicht manipulierten Kontrollzelle ebenfalls drei Felder innerhalb der Kernperipherie vermessen, um den Verlust der Fluoreszenzintensität durch das Scannen herausrechnen zu können (vgl. Abbildung 4-16 A). Für EGFP-B2 konnte praktisch kein Fluoreszenzverlust innerhalb der Kernhülle nachgewiesen werden, wie anhand der Daten aus den FRAP-Analysen auch zu erwarten war (Abbildungen 4-14 und 4-16 B; Tabellen 4-1 und 4-2). Für EGFP-B3_WT dagegen konnte ein im Vergleich zu EGFP-B2 signifikanter Fluoreszenzverlust in der Kernperipherie gemessen werden (Abbildung 4-16 B; Tabelle 4-2). Nach 10 Minuten betrug der Verlust der Fluoreszenzintensität 5,2 % für EGFP-B2 und 19,2 % für EGFP-B3_WT (P = 0,0032; Tabelle 4-2). Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass bei Lamin B3 tatsächlich ein Molekülaustausch zwischen Kernhülle und Nukleoplasma stattfindet.





Gezeigt ist die FLIP-Analyse von EGFP-B2 und EGFP-B3_WT, exprimiert in COS-7-Zellen. (A) Schematische Darstellung der experimentellen Durchführung am CLSM. Ein Bereich ($\emptyset \approx 1 \ \mu m$) innerhalb des Nukleoplasmas wurde wiederholt gebleicht. Nach dem Bleichpuls wurden die Fluoreszenzintensitäten innerhalb der markierten Bereiche (Ellipsen) gemessen. Mit den Intensitätsdaten aus der manipulierten und der Kontrollzelle konnten die Werte für die FLIP-Kurve errechnet werden. Die Abbildung zeigt zwei COS-7-Zellen, die EGFP-B3_WT exprimieren. (B) Vergleich der FLIP-Kurven für EGFP-B3_WT und EGFP-B2. Eichstrich entspricht 10 μm .

Tabelle 4-2: F	LIP-Analyse von	EGFP-B3	WT und	EGFP-B2

	Fluoreszenzverlust zur Zeit t=300 s		Fluoreszenzverlust zur Zeit t=600 s		
Experiment	Verlust [%] \pm SD	t-Test	Verlust [%] \pm SD	t-Test	
EGFP-B3_WT	11,1 ± 5,9		$19,2 \pm 9,3$		
EGFP-B2	6,4 ± 7,6	P=0,0546	5,2 ± 7,2	P=0,0032	

Angegeben ist der Fluoreszenzverlust innerhalb der Kernhülle während des FLIP-Experiments. Die Werte stellen jeweils Mittelwerte aus mindestens 10 Einzelmessungen dar. Die Standardabweichung (± SD) ist für jeden Wert angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines Student'schen t-Tests ermittelt. Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass Lamin B3 eine mobile Komponente der Kernhülle in transfizierten COS-7-Zellen ist, wobei ein Austausch von Molekülen zwischen Kernhülle und einer im Nukleoplasma lokalisierten Fraktion des Proteins stattfindet. Für diese deutlich erhöhte Mobilität von Lamin B3 ist eindeutig die zu somatischem Lamin B2 stark verkürzte zentrale Stäbchendomäne (es fehlen die Helices 1A und 1B) verantwortlich. Die biochemische Charakterisierung des Proteins in Keimzellen lässt die Vermutung zu, dass Lamin B3 auch dort vergleichbare mobile Eigenschaften haben könnte.

4.4 Suche nach putativen Interaktionspartnern von Lamin B3 in Keimzellen

4.4.1 "Pull-Down-Assay"

Ein viel versprechender Ansatz, die Funktion von Lamin B3 bestimmen zu können und welche Rolle der spezifische N-Terminus des Proteins dabei spielt, ist die Identifikation spezifischer Interaktionspartner. Über diese kann dann möglicherweise eine Bedeutung des Proteins und der Domäne abgeleitet werden, die weder für die korrekte Lokalisation des Proteins noch für dessen Bindungsstabilität von Bedeutung ist. Gesucht wurde ein spezifisch in Keimzellen exprimiertes und mit Lamin B3 über dessen N-Terminus als Bindungsstelle interagierendes Protein. Dafür wurde als Ansatz ein "Pull-Down-Assay" (siehe 3.4.13) durchgeführt. Als Köder wurde dasselbe Fusionsprotein an die Säule gekoppelt, das bereits für die Antikörperherstellung verwendet worden war, GST-B3 NT (Schütz, 2001; Abbildung 4-1). Diese Säulenmatrix wurde dann verwendet, um mit der N-terminalen Domäne von Lamin B3 interagierende Proteine aus einem Extrakt angereicherter Keimzellen aller Stadien herauszufiltern. Um keimbahnspezifische Proteine identifizieren zu können, wurde parallel eine identische Säulenmatrix mit einem Extrakt aus 3T3-Zellen inkubiert. Als zusätzliche Kontrolle wurden beide Extrakte parallel mit einer Säulenmatrix, an die lediglich GST gekoppelt war, inkubiert, um eine spezifische Interaktion gefundener Proteine mit dem N-Terminus von Lamin B3 zeigen zu können. In Abbildung 4-17 ist das Ergebnis des Assays dargestellt. In beiden Elutionen (300 mM bzw. 500 mM NaCl) konnte eine spezifische Proteinbande bei 50-55 kDa im SDS-Gel nachgewiesen werden, die nur bei der Kombination aus Säulenmatrix mit gebundenem Fusionsprotein GST-B3 NT und Keimzellextrakt vorhanden war (Abbildung 4-17 C rechte Seite und D linke Seite, Pfeilspitzen).





Gezeigt ist die Auswertung des unter 3.4.13 beschriebenen "Pull-Down-Assays" mit Hilfe von SDS-PAGE. Dafür wurden die Proteine der einzelnen Proben in 12%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und nach der Gelelektrophorese mit Coomassie angefärbt. (A) Kontrollen für den Herstellungsprozess der verschiedenen Säulenmatrices (GB3 = GST-B3_NT; GST = GST). (B-D) Analyse der Proben aus dem "Pull-Down-Assay". Die Spuren sind jeweils bezeichnet mit der Kombination aus Säulenmatrix und verwendetem Proteinextrakt (KB = Proteinextrakt aus Keimzellen; 3T3 = Proteinextrakt aus 3T3-Zellen; GB3 = GST-B3_NT als Köder; GST = GST als Köder). Die Pfeilspitzen in den Elutionsfraktionen (C und D) bezeichnen Proteinbanden, die spezifische Bindungspartner mit der N-terminalen Domäne von Lamin B3 enthalten könnten. Das aufgetragene Säulenmaterial dient als Kontrolle dafür, dass ausreichende Mengen des jeweilig richtigen Köderproteins vorhanden gewesen sind. In den mit "M" bezeichneten Spuren wurden Markerproteine bekannter Größe aufgetrennt ("Protein Molecular Weight Marker", MBI), Angaben in Dalton.

Die mit Pfeilspitzen markierten Proteinbanden (Abbildung 4-17 C und D) wurden aus den Gelen ausgeschnitten und anschließend massenspektrometrisch am DKFZ in Heidelberg untersucht. Diese Analyse ergab, dass in den Banden die als keimbahnspezifisch beschriebenen Proteine MSY2, MSY2a und MSY4 vorhanden sind. Diese Proteine sind RNA- bzw. DNA-bindend und u.a. bei der regulierten Expression von Protaminen während der Spermatogenese beteiligt (Gu et al., 1998; Braun, 2000; Davies et al., 2000; Giorgini et al., 2001).

4.4.2 Klonierung von MSY-Proteinen

In einem nächsten Schritt sollte die im "Pull-Down-Assay" gefundene, mögliche Interaktion zwischen Lamin B3 und den MSY-Proteinen überprüft werden. Um die dafür vorgesehenen Ansätze wie Kotransfektionen in Kulturzellen, "Blot-Overlay-Assays" oder "Yeast-Two-Hybrid"-System durchführen zu können, mussten zunächst die entsprechenden cDNAs von MSY2, MSY2a und MSY4 gewonnen werden. Dazu wurde aus der Gesamt-RNA, die aus den Hoden von Balb/C- bzw. CD1-Mäusen extrahiert worden war, mit Hilfe reverser Transkription die cDNA gewonnen. Daraus wurden dann die cDNAs für MSY2 mit den Primern *MSY2-5 'lang* und *MSY2-3 'lang*, für MSY2a mit den Primern *MSY2a-5 'lang* und *MSY2-3 'lang* und *MSY4-5 'lang* (Details zu den Primern finden sich im Anhang) amplifiziert und in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert. Die Sequenzanalyse zeigte schließlich, dass es gelang, MSY2a erfolgreich zu klonieren, wobei ein Klon die korrekte Sequenz aufwies (siehe Abbildung 4-18). Dieser Klon wies bis auf einen Aminosäureaustausch (R80E) die identische Sequenz auf, wie sie für MSY2a beschrieben worden war (PMID: AF073955; Gu et al., 1998).

CLUSTAL	W	(1.82)	multiple	sequence	alignment
---------	---	--------	----------	----------	-----------

MSY2a_cds MSY2a_1305_1	MSRRAGQAGSAKALAIQVLGTVKWFNVRNGYGFINRNDTKEDVFVHQTAIKRNNPR EFAIMSRRAGQAGSAKALAIQVLGTVKWFNVRNGYGFINRNDTKEDVFVHQTAIKRNNPR **********************************	56 60
MSY2a_cds MSY2a_1305_1	KFLRSVGDGETVEFDVVEGEKGARAANVTGPGGVPVKGSRYAPNRRFRRFIPRPRPAAP KFLRSVGDGETVEFDVVEGEKGAEAANVTGPGGVPVKGSRYAPNRRFRRFIPRPRPAAP *******************************	116 120
MSY2a_cds MSY2a_1305_1	PPMVAEAPSGGTEPGSEGERAEDSGQRPRRRRPPPFFYRRRFVRGPRPPNQQQPIEGSDG PPMVAEAPSGGTEPGSEGERAEDSGQRPRRRRPPFFYRRRFVRGPRPPNQQQPIEGSDG ***********************************	176 180
MSY2a_cds MSY2a_1305_1	VEPKETAPLEGDQQQGDERVPPPRFRPRYRRPFRPRPPQQPTTEGGDGETKPSQGPTDGS VEPKETAPLEGDQQQGDERVPPPRFRPRYRRPFRPRPPQQPTTEGGDGETKPSQGPTDGS ************************************	236 240
MSY2a_cds MSY2a_1305_1	RPEPQRPRNRPYFQRRRQQPPGPRQPIAAETSAPINSGDPPTTILE 282 RPEPQRPRNRPYFQRRRQQPPGPRQPIAAETSAPINSGDPPTTILE-KGEF 290 **********	

Abb. 4-18: Sequenzanalyse des MSY2a-Klons.

Gezeigt ist der Vergleich der Sequenz des Klons MSY2a_1305_1 in pCR[®]2.1-TOPO[®] mit der Datenbank auf Proteinebene (MSY2a_cds). Die schwarz umrahmten Aminosäuren bezeichnen Start- bzw. Stopp-Codon. Die rot umrahmten Aminosäuren markieren einen Austausch.

Weitere Datenbankanalysen ergaben jedoch, dass es sich bei diesem Aminosäureaustausch um ein Allel handelt, denn EST-Klone, die aus Balb/C-Mäusen abgeleitet sind, entsprechen der Datenbanksequenz (PMID: AF073955; Gu et al., 1998), während Klone, die z.B. aus CD1-Mäusen abgeleitet sind, der Sequenz des über RT-PCR gewonnenen Klons entsprechen. Dieser Klon ist demnach für weiterführende Experimente geeignet, welche im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht abgeschlossen werden konnten. So sollte die cDNA-Sequenz dieses MSY2a-Klons in einen geeigneten bakteriellen Expressionsvektor inseriert werden (pET-21a oder pGEX-5X-1[2,3]; siehe 2.2.1), damit genügend MSY2a-Protein hergestellt und aufgereinigt werden kann. Damit sollte dann durch einen "Pull-Down-Assay" mit MSY2a als Köder an der Säule Lamin B3 aus einem Keimzellextrakt gefischt werden. Daneben wäre mit gereinigtem MSY-Protein ein "Blot-Overlay-Assay" möglich und natürlich auch die Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen die MSY-Proteine.

Eine weitere Möglichkeit, die Interaktion von Lamin B3 mit den MSY-Proteinen zu bestätigen, ist das "Yeast-Two-Hybrid"-System. Dazu müssten die entsprechenden cDNAs der MSY-Proteine und von Lamin B3 in die entsprechenden Hefe-Vektoren inseriert werden. Über Kreuzungstests der unterschiedlichen Hefe-Klone kann dann eine mögliche Bindung der Proteine bestätigt werden.

Für Kotransfektionsexperimente in Kulturzellen muss die MSY-cDNA in eukaryontische Expressionsvektoren inseriert werden, wie z.B. die pEGFP-Vektoren (siehe 2.2.1). In Transfektionsexperimenten können zunächst die Lokalisationen der Proteine untersucht werden. In Doppeltransfektionsstudien (Koexpression von MSY2a und Lamin B3 in Kulturzellen) kann danach analysiert werden, ob die Verteilung eines der beiden Proteine durch die gleichzeitige Expression des anderen beeinflusst wird.

Generell muss bei diesen Ansätzen beachtet werden, dass einerseits alle drei MSY-Proteine (MSY2, MSY2a und MSY4) mit dem Lamin-B3-spezifischen N-Terminus im "Pull-Down-Assay" gefischt wurden und dass andererseits in den Komplexen, die beispielsweise die Protamin-1-mRNA reprimieren, sowohl MSY2- als auch MSY4-Proteine vorhanden sind (Davies et al., 2000). Dies könnte darauf hindeuten, dass für eine Interaktion dieser Proteine mit Lamin B3 ein Zusammenspiel mehrerer Vertreter der MSY-Proteine notwendig sein kann, was wiederum bedeuten könnte, dass bei einem "Pull-Down-Assay" zum Fischen von Lamin B3 ein Gemisch aus allen drei MSY-Proteinen als Köder eingesetzt werden muss.

Trotz allem sprechen einige Dinge für eine Interaktion zwischen Lamin B3 und den MSY-Proteinen. So deckt sich das Expressionsmuster der MSY-Proteine (Gu et al., 1998; Davies et al., 2000) weitgehend mit dem von Lamin B3 und obwohl sich die Y-Box-Proteine, bedingt durch ihre Bindung an mRNA zu deren Speicherung, größtenteils im Zytoplasma befinden, wurden sie ebenfalls im Zellkern nachgewiesen (Gu et al., 1998). Außerdem wurde schon früh ein Zusammenhang zwischen Kernhülle und Protaminen postuliert, da diese zuerst in der Kernperipherie nachweisbar sind (Biggiogera et al., 1992). Und neuere Arbeiten zeigen sogar einen direkten Einfluss von Kernhüllenkomponenten auf die Expression oder Aktivierung von Protaminen und Transitionsproteinen (Kimura et al., 2003; Mylonis et al., 2004; siehe auch 5.3).

5 Diskussion

Die Spermatogenese ist ein komplexer Differenzierungsprozess, der in den Samenkanälchen des Hodens abläuft und über Hormone und ein Netzwerk an Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zelltypen und extrazellulärer Matrix reguliert wird (siehe 1.1; Übersicht in Russell et al., 1990; Siu und Cheng, 2004). Während der Meiose kommt es zur Reduktion und Rekombination des genetischen Materials. Während dieser Vorgänge kommt es zu charakteristischen Bewegungen der Chromosomen, die dabei in der Kernhülle verankert sind (Übersicht in Zickler und Kleckner, 1998). In der Spermiogenese, dem Differenzierungsprozess im Anschluss an die Meiose, aus dem die fertigen Spermien hervorgehen, folgen dann tief greifende Veränderungen der Zellen (siehe 1.1.2): es bilden sich spermienspezifische Strukturen aus, fast das gesamte Zytoplasma wird abgestoßen und nicht zuletzt vollzieht sich eine grundlegende Neuorganisation des Chromatins, bei der die Histone entfernt und schließlich durch Protamine ersetzt werden (Dadoune, 2003; Churikov et al., 2004; Govin et al., 2004). Parallel zu diesen strukturellen Veränderungen in der Zelle ändert sich die Morphologie des Spermatidenkerns dramatisch. Er flacht ab und bekommt eine längliche Form, bei Nagern bilden sich die unterschiedlichsten (artspezifisch) hakenförmigen Spermienköpfe aus (Leblond und Clermont, 1952; Fawcett, 1975; Russell et al., 1990; Breed, 2005). Bei diesem Prozess scheint vor allem der Akroplaxom-Akrosom-Manschetten-Komplex maßgeblich beteiligt zu sein. Dieser Komplex ist im Bereich des "marginal ring" (MR; siehe 1.1.2.2 und Abbildung 1-7 unter 1.1.2.3) fest mit der Kernhülle verbunden, was als mechanische Verankerung des Zellkerns während der Elongationsphase dienen könnte (Kierszenbaum und Tres, 2004). Damit dieser komplexe Differenzierungsprozess ablaufen kann, exprimieren Keimzellen zahlreiche keimbahnspezifische Varianten somatischer Proteine und auch der Mechanismus der Genexpression ist in diesen Zellen teilweise modifiziert, die durch besondere keimbahnspezifische Mechanismen bzw. Faktoren reguliert wird (Übersichten in Hecht, 1998; Eddy, 2002; Venables, 2002; Dadoune et al., 2004; Grimes, 2004; Kimmins et al., 2004b; Monaco et al., 2004; Tanaka und Baba, 2005). Bei vielen Proteinen, die erst sehr spät in der Spermiogenese benötigt werden, zu einem Zeitpunkt, an dem wegen der Umstrukturierung des Chromatins keine Transkription mehr stattfinden kann, erfolgt die regulierte Translation der zu einem vorherigen Zeitpunkt synthetisierten und anschließend deponierten mRNAs ebenfalls über besondere Mechanismen (Übersichten in Braun, 1998; Hecht, 1998; Braun, 2000; Elliott, 2003; Kleene, 2003). Die Struktur des Chromatins in Keimzellen unterscheidet sich bereits in den Spermatogonien von der in somatischen Zellen, denn das nukleosomale Chromatin früher Stadien in der Spermatogenese besteht teilweise aus keimbahnspezifischen Varianten der Histone, die im weiteren Verlauf des Differenzierungsprozesses sukzessiv schließlich durch Protamine ersetzt werden (zusammengefasst in Sassone-Corsi, 2002; Dadoune, 2003). Doch nicht nur in Bezug auf das Chromatin und seine Organisation weisen Keimzellen einige Besonderheiten auf, sondern auch bei Betrachtung der Kernhülle in diesen Zellen wurde früh deutlich, dass sie sich in Struktur und Proteinzusammensetzung stark von der einer somatischen Zelle unterscheidet. So wurde beispielsweise lange Zeit angenommen, dass in Zellen der Keimbahn keine Kernlamina vorhanden wäre (Fawcett, 1966; Stick und Schwarz, 1982), was durch deren Nachweis in der Spermatogenese der Ratte widerlegt werden konnte (Vester et al., 1993). Darüber hinaus konnte auch für die Kernlamina in Keimzellen eine besondere Proteinausstattung nachgewiesen werden, die sich durch keimzellspezifische Lamin-Isoformen auszeichnet (Alsheimer und Benavente, 1996; Alsheimer et al., 1999).

5.1 Expressionsmuster und Lokalisation von Lamin B3 im Verlauf der Spermatogenese

Die in Säugern bekannten Lamin-Varianten und ihr jeweiliges Expressionsmuster in Keimzellen während der Spermatogenese sind in Abbildung 5-1 zusammengefasst. Von den in somatischen Geweben exprimierten Isoformen konnte nur Lamin B1 in Keimzellen nachgewiesen werden, wo es in allen Stadien vorhanden ist (Vester et al., 1993). Die Lamine A und C sind während des gesamten Entwicklungsprozesses nicht nachweisbar, dafür wird in Spermatozyten während der Prophase der ersten meiotischen Teilung mit Lamin C2 eine Lamin-A-Isoform exprimiert (Furukawa et al., 1994; Alsheimer und Benavente, 1996). Auch Lamin B2 konnte in keinem Stadium der Spermatogenese nachgewiesen werden (Vester et al., 1993), dafür ist mit Lamin B3, einer kurzen Spleißvariante von Lamin B2, neben Lamin C2 ein weiteres Keimbahn-spezifisches Lamin vorhanden (Furukawa und Hotta, 1993). Im Rahmen dieser Arbeit konnten eindeutige Beweise gesammelt werden, dass die Expression von Lamin B3 in der Spermatogenese auf postmeiotische Stadien in der Spermiogenese beschränkt ist. Sowohl die mRNA als auch das Protein konnten erst in runden Spermatiden detektiert werden, während in Spermatozyten keine Lamin-B3-Expression nachweisbar war.





Gezeigt ist die Zusammenfassung der bekannten Lamin-Expression im Verlauf der Spermatogenese als schematische Darstellung. Die Abkürzungen bedeuten: L = Leptotän; Z = Zygotän; P = Pachytän; D = Diplotän. Die Daten der Expressionsmuster der einzelnen Lamine stammen aus: Lamine A/C, B1 und B2 (Vester et al., 1993); Lamin C2 (Furukawa et al., 1994; Alsheimer und Benavente, 1996; Alsheimer et al., 1998); Lamin B3 (die vorliegende Arbeit).

Diese Daten scheinen im Widerspruch zu einer früheren Arbeit zu stehen, die Lamin B3 als spezifisch in Spermatozyten während der Meiose exprimiert beschrieben hatte (Furukawa und Hotta, 1993), allerdings wurden darin weder Immunfluoreszenzen mit einem spezifischen Antikörper noch Daten zu

postmeiotischen Stadien präsentiert. Bei genauerer Betrachtung besteht sogar kein wirklicher Widerspruch zwischen den Daten beider Analysen, denn Furukawa und Hotta (1993) konnten Lamin B3 nicht nachweisen in den Hoden neun Tage alter Mäuse, in denen außer Spermatogonien keine Keimzellen vorhanden sind (Bellvé et al., 1977; Malkov et al., 1998), aber in den Hoden adulter Mäuse (70 Tage alt). Weitere Altersstufen wurden nicht auf eine Expression von Lamin B3 hin analysiert. Außerdem konnten die Autoren Lamin B3 in einer Fraktion angereicherter Spermatozyten nachweisen (Furukawa und Hotta, 1993), allerdings sind die Spermatozytenfraktionen sowohl bei der durch die Autoren angewandten Methode (Chandley et al., 1977) als auch bei anderen Anreicherungsverfahren mit Spermatiden verunreinigt (Grabske et al., 1975; Meistrich, 1977). Diese Verunreinigung war vermutlich die Ursache für den positiven Nachweis von Lamin B3 in Spermatozyten (vgl. dazu auch Schütz, 2001; Öllinger, 2002). Zusammengenommen zeigen die vorliegenden Daten eindeutig, dass Lamin B3 spezifisch in Spermatiden (postmeiotische Stadien) während der Spermiogenese exprimiert wird, wo es zusammen mit Lamin B1 am Aufbau der Kernlamina beteiligt ist. Damit zeigt Lamin B3 ein vergleichbares Expressionsmuster wie das Lamin L_{IV} aus Xenopus laevis, das ebenfalls nur während der Spermiogenese exprimiert wird (Benavente und Krohne, 1985). Ob beide Proteine ähnliche Funktionen haben könnten, kann momentan nicht abgeschätzt werden, da vom Lamin L_{IV} noch kaum etwas bekannt ist, außer dem vergleichbaren Expressionsmuster und der molekularen Masse von ca. 80 kDa, womit es deutlich größer ist als Lamin B3 (53 kDa).

Während der Spermiogenese kommt es zu einer grundlegenden Umstrukturierung der Kernhülle. Diese zeigt sich beispielsweise durch die Umverteilung einiger Kernhüllenkomponenten; die Lokalisation dieser Proteine zeigt mit Fortschreiten des Differenzierungsprozesses eine zunehmende Polarisierung zu einem Pol des Spermatidenkerns hin und einige sind in späteren Stadien schließlich nicht mehr nachweisbar (Alsheimer et al., 1998). So konnte die fortschreitende Anreicherung am posterioren Pol der Spermatidenkerne, wie sie in der vorliegenden Arbeit für Lamin B3 eindeutig gezeigt werden konnte, bereits für andere Kernhüllenkomponenten in Spermatiden nachgewiesen werden, wie Lamin B1 (Vester et al., 1993), die LAPs2 (Alsheimer et al., 1998) und LBR (Mylonis et al., 2004).

Diese Umverteilung von Kernhüllenproteinen zum posterioren Pol des Spermatidenkerns könnte bei der Ausbildung der spermienspezifischen Chromatinorganisation und -verteilung eine wesentliche Rolle spielen (Alsheimer et al., 1998 und Referenzen darin). Diese Annahme basiert auf der Tatsache, dass die oben angeführten Proteine direkt oder indirekt mit Chromatin interagieren (vgl. Abbildung 1-8 und Tabelle 1-2 unter 1.2.1 bzw. 1.2.2) und dass in Spermatiden das Chromatin nur im Bereich des posterioren Pols mit der Kernhülle verbunden ist. Darüber hinaus ändern neben den oben erwähnten Proteinen auch die Kernporenkomplexe im Verlauf der Spermiogenese ihre Verteilung und befinden sich schließlich nur noch am posterioren Pol des Spermatidenkerns (Clermont et al., 1993).

5.2 Eigenschaften von Lamin B3 und die Bedeutung des spezifischen N-Terminus

Lamin B3 ist eine kurze Spleißvariante des somatischen Lamins B2. Im Unterschied zur Isoform Lamin B2 und allen anderen somatischen Laminen besitzt Lamin B3 eine nicht-helikal organisierte N-terminale Domäne aus 84 Aminosäuren. Diese Domäne weist keinerlei Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen oder Proteindomänen auf. Sie ersetzt im Vergleich zu Lamin B2 dessen N-Terminus und die komplette Helix 1 der zentralen Stäbchendomäne (siehe 1.2.4 und Abbildung 1-10 unter 1.2.3.2; Furukawa und Hotta, 1993). Die ektopische Expression dieses Lamins in Kulturzellen verursacht einen interessanten Phänotyp. Das Protein wird in die Kernhülle eingebaut und es kommt zu morphologischen Veränderungen des Zellkerns, der seine annähernd runde Gestalt verliert und eine hakenförmige annimmt. Als Auslöser dieses Effektes wurde die Lamin-B3-spezifische Domäne beschrieben. Darüber hinaus wurde dieser in Kulturzellen beobachtete Effekt mit den morphologischen Veränderungen, die in Keimzellen während der Spermatogenese auftreten, in Verbindung gebracht (Furukawa und Hotta, 1993).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Epitope innerhalb des N-Terminus von Lamin B3 bestimmt werden, die für diese Effekte in Kulturzellen verantwortlich sind. Durch Transfektionsexperimente, die zur Expression von wildtypischen sowie N-terminal trunkierten Lamin-B3-Proteinen führten, konnte eindeutig belegt werden, dass diese Domäne keinen Einfluss auf die Zellkernmorphologie in transfizierten Zellen hat. So verursachte sowohl die Expression des wildtypischen Proteins als auch die Expression einer Lamin-B3-Mutante ohne N-Terminus (MYC-B3 ΔN84; vgl. Abbildung 4-7 unter 4.2.1.1) den oben beschriebenen Phänotyp in transfizierten Kulturzellen. Außerdem konnten durch die Expression eines Lamin-B2-Proteins, dessen N-Terminus durch die Lamin-B3-spezifischen 84 Aminosäuren ersetzt wurde (B3/B2; vgl. Abbildung 4-7 unter 4.2.1.1), keine deformierten Kerne in transfizierten Zellen induziert werden. In diesem Zusammenhang lieferte die Lamin-B3-Mutante, bei der die 84 spezifischen Aminosäuren durch den N-Terminus von Lamin-B2 ausgetauscht wurden (MYC-B2/B3 bzw. EGFP-B2/B3; vgl. Abbildung 4-7 unter 4.2.1.1), die interessantesten Daten. Die Expression dieses Proteins führte ebenfalls zur Ausbildung deformierter Kerne. Dabei ist besonders interessant, dass dieses Protein einem somatischen Lamin B2 entspricht, dem der erste Teil der zentralen Stäbchendomäne fehlt (die Helices 1A und 1B), ein wichtiges Strukturelement aller Mitglieder der IF-Proteinfamilie (Übersichten in Stuurman et al., 1998; Herrmann und Aebi, 2004). Zusammenfassend belegen die gesammelten Daten eindeutig, dass die beobachteten Deformationen der Kerne transfizierter Zellen nicht durch den spezifischen N-Terminus von Lamin B3 verursacht werden, sondern vielmehr auf die stark verkürzte Stäbchendomäne in diesem Protein zurückzuführen sind.

Dieser Befund passt gut zu den Ergebnissen anderer Arbeiten, die eine entscheidende Rolle der zentralen Domäne bei der Ausbildung polymerer Lamin-Strukturen belegen (Heald und McKeon, 1990; Stuurman et al., 1996; Schirmer et al., 2001). In einer dieser Studien konnte die Bedeutung des zentralen Bereiches der Stäbchendomäne gezeigt werden. Die Deletion eines großen Bereiches dieser Domäne, deren N- und C-terminale Randbereiche noch vorhanden waren, führte zu einer signifikanten

Störung der heterotypischen Lamin-Interaktionen. Die Expression dieser internen Lamin-Deletionsmutante führte ebenfalls zur Deformation der Kerne transfizierter Zellen, allerdings stellte sich der Phänotyp erst nach 30-40 h ein und außerdem konnte in diesen Zellen eine drastische Umverteilung endogener Kernhüllenkomponenten wie A-Typ-Lamine, LAPs2 und LBR beobachtet werden (Schirmer et al., 2001). Bei mit Lamin B3 transfizierten Zellen stellte sich der Phänotyp sehr viel früher ein (nach 10-16 h) und die Verteilung endogener Kernhüllenproteine war nicht merklich beeinflusst. Dieser Unterschied erklärt sich wahrscheinlich dadurch, dass beide Proteine, Lamin B3 und das Lamin B1 mit einer intern verkürzten Stäbchendomäne, unterschiedlich stark mit endogenen Kernhüllenkomponenten interagieren und diese beeinflussen können, wobei dafür der in Lamin B3 fehlende N-terminale Kopf der zentralen Stäbchendomäne und/oder die dynamischen bzw. biochemischen Eigenschaften dieses Proteins verantwortlich sein könnten (siehe unten; Schirmer et al., 2001; Schirmer und Gerace, 2004).

Der Vergleich der Lamine B2 und B3 offenbart einige bemerkenswerte Unterschiede beider Isoformen. Neben den durch die Lamin-B3-Expression ausgelösten Deformationen der Zellkerne fiel zunächst auf, dass sich beide Proteine in der Kernperipherie befanden, im Gegensatz zu Lamin B2, das ausschließlich dort zu finden war, konnte Lamin B3 auch in erheblichen Mengen im Nukleoplasma nachgewiesen werden. Dass dieser Befund nicht lediglich auf eine Überexpression des Proteins zurückzuführen ist, zeigt die Tatsache, dass Lamin-B2-Moleküle unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen überhaupt nicht oder nur in sehr viel geringerer Menge im Nukleoplasma vorhanden waren. Außerdem konnte dieselbe Verteilung von Lamin B3 in Spermatiden gefunden werden, den Zellen, die dieses Protein normalerweise exprimieren: Lamin B3 war sowohl in der Kernhülle als auch im Nukleoplasma nachweisbar. Der Vergleich der Ergebnisse aus der biochemischen Analyse der Lamine B2 und B3 zeigt durch die bessere Löslichkeit von Lamin B3 im Vergleich zu Lamin B2, dass Lamin B3 eine sehr geringe Bindungsstärke (Definition siehe Schirmer und Gerace, 2004) aufweist. Das bedeutet, dass Lamin-B3-Moleküle kein stabiles Polymer ausbilden und mit endogenen Kernhüllenproteinen weniger gut interagieren können, wodurch diese entsprechend weniger stark beeinflusst werden als beispielsweise durch das von Schirmer et al. (2001) beschriebene Lamin B1 mit zentral verkürzter Stäbchendomäne. Unterstützt wird diese Annahme durch die Daten aus den FRAPund FLIP-Experimenten, die eindeutig belegen, dass ein beträchtlicher Anteil der Lamin-B3-Moleküle in transfizierten Kulturzellen mobil ist, wobei ein ständiger Austausch zwischen Kernhülle und Nukleoplasma stattfindet. Lamin B2 dagegen ist vollkommen immobil, wie es für somatische Lamine schon mehrfach beschrieben wurde (Broers et al., 1999; Moir et al., 2000; Daigle et al., 2001; Gilchrist et al., 2004).

Was ist die Ursache für die geringe Bindungsstärke und die hohe Mobilität von Lamin B3? Der N-Terminus hat darauf keinen Einfluss, denn sowohl ein mutiertes Lamin B3 ohne die spezifische Domäne als auch ein Lamin B3, dessen spezifischer N-Terminus gegen den von Lamin B2 ausgetauscht wurde (MYC-B2/B3 bzw. EGFP-B2/B3; vgl. Abbildung 4-7 unter 4.2.1.1), zeigen dieselben Eigenschaften wie wildtypisches Lamin B3 in Bezug auf Bindungsstärke und Mobilität. Alle Daten deuten darauf hin, dass allein die trunkierte zentrale Stäbchendomäne von Lamin B3 für die beobachteten Eigenschaften verantwortlich ist. In der Tat existieren die größten Unterschiede in den Eigenschaften zwischen den Laminen B2 und B3, unabhängig von einem eventuellen Austausch oder dem Fehlen der N-terminalen Domäne, was nur einen sehr untergeordneten Einfluss auf das Verhalten von Lamin B3 hat. Und bei genauerer Betrachtung ist es nicht die generelle Verkürzung, sondern vielmehr das Fehlen des N-terminalen Kopfstückes dieser Domäne durch die Deletion der Helices 1A und 1B. Denn gerade für ein Lamin B2, dessen zentrale Stäbchendomäne intern verkürzt ist, die aber beide Randbereiche noch aufweist, wurde eine im Vergleich zu wildtypischem Lamin B2 sogar noch leicht erhöhte Bindungsstärke ermittelt (Schirmer und Gerace, 2004). Außerdem gibt es weitere Arbeiten, die die Bedeutung der N- und C-terminalen Randbereiche der Stäbchendomäne für die Polymerisation der Lamine aufzeigen (Heald und McKeon, 1990; Stuurman et al., 1996; 1998; Strelkov et al., 2002; Herrmann und Aebi, 2004; Strelkov et al., 2004).

Bei den durch die ektopische Expression von Lamin B3 in Kulturzellen induzierten Zellkerndeformationen handelt es sich wohl um einen unspezifischen, sekundären Effekt. Dieser ist bedingt durch die Aufweichung der Kernhülle in Zellen, die Lamin B3 exprimieren. Es ist schon länger bekannt, dass die Zusammensetzung der Kernlamina in Bezug auf das Mengenverhältnis der einzelnen Isoformen deren Stabilität bestimmt und dass Zellen, die stark proliferieren, einen höheren Anteil an B-Typ-Laminen aufweisen (ein höherer Anteil an B-Typ-Laminen senkt die Stabilität der Kernlamina) als Zellen, die voll ausdifferenziert sind und sich kaum noch teilen. In diesen Zellen überwiegen häufig die A-Typ-Lamine (Broers et al., 1997; Jansen et al., 1997; Schirmer und Gerace, 2004). Durch die Expression von Lamin B3 ist ein Kernhüllenprotein vorhanden, das eine extrem geringe Bindungsstärke aufweist und darüber hinaus zwischen Kernlamina und Nukleoplasma pendelt. Beide Eigenschaften würden eine starke Schwächung und damit Aufweichung der Kernhülle bewirken, wodurch dann, bedingt durch die mechanischen Kräfte, denen der Zellkern ausgesetzt ist, die beobachteten Verformungen als sekundärer Effekt entstehen.

5.3 Lamin-B3-bindende Proteine

Bislang wurde kein Hinweis gefunden, welche funktionelle Bedeutung der spezifische N-Terminus von Lamin B3 haben könnte. Daher wurde durch einen "Pull-Down-Assay" versucht, ein in Keimzellen exprimiertes Protein zu finden und zu charakterisieren, das mit Lamin B3 über dessen N-terminale Domäne interagiert. Dies kann schließlich Rückschlüsse auf die Funktion der spezifischen Domäne und die Bedeutung von Lamin B3 in der Spermatogenese ermöglichen. Durch die Suche mit einem Fusionsprotein aus GST und dem aus 84 Aminosäuren bestehenden N-Terminus von Lamin B3 konnten erste putative Bindungspartner gefunden werden, die durch eine massenspektrometrische Analyse als die Y-Box-Proteine MSY2, MSY2a und MSY4 identifiziert werden konnten (Gu et al., 1998; Davies et al., 2000). Y-Box-Proteine sind DNA- bzw. RNA-bindende Proteine, die bei der

regulierten Translation gespeicherter mRNAs beteiligt sind (Übersichten in Wolffe, 1994; Matsumoto und Wolffe, 1998). Für MSY2 wurde jüngst beschrieben, dass es die mRNAs zahlreicher Proteine bindet und damit speichert, jedoch präferenziell die mRNAs solcher Proteine, die in späteren Stadien der Spermiogenese translatiert werden wie Transitionsproteine und Protamine (Yang et al., 2005b). Die Bedeutung der MSY-Proteine bei der Regulation der Protamin-Translation wurde schon früher beschrieben; sie verhindern die Translation der entsprechenden mRNAs in früheren Stadien der Spermiogenese und sorgen somit für eine zeitgenaue Synthese dieser Proteine in späteren Stadien (Braun, 1998, 2000; Davies et al., 2000; Giorgini et al., 2001, 2002). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass MSY2 essentiell für die Keimzellentwicklung ist, da ein spezifischer Knockout des entsprechenden Gens in weiblichen und männlichen Tieren zur Sterilität führt, wobei die Spermatogenese größtenteils im Pachytän abbricht, wo es zu einer stark erhöhten Apoptoserate kommt, oder in frühen Spermatidenstadien während der Spermiogenese (Yang et al., 2005a). Die Interaktion von MSY2, MSY2a und MSY4 mit Lamin B3 muss zwar noch mit Hilfe einiger Kontrollansätze überprüft und bestätigt werden, allerdings sprechen schon jetzt einige Fakten für eine mögliche Interaktion. (1) Das Expressionsmuster der MSY-Proteine deckt sich größtenteils mit dem von Lamin B3, denn auch die MSY-Proteine sind in der Spermiogenese exprimiert, wenngleich ihre Expression bereits während der meiotischen Phase beginnt (Gu et al., 1998; Davies et al., 2000). Y-Box-Proteine befinden sich, bedingt durch ihre Bindung an mRNAs zur Speicherung, zwar größtenteils im Zytoplasma, wurden aber ebenso im Zellkern nachgewiesen (Gu et al., 1998). (2) Ein weiteres Argument, das die eventuelle Interaktion von Lamin B3 mit den Y-Box-Proteinen als möglich erscheinen lässt, ist, dass schon früher ein Zusammenhang zwischen Kernhülle und Protamineinbau postuliert wurde. Dies basierte auf der Beobachtung, dass die Protamine zuerst in der Kernperipherie nachweisbar sind (Biggiogera et al., 1992). Mylonis et al. (2004) konnten dann schließlich die molekulare Verbindung zwischen Kernhülle und Protaminverfügbarkeit nachweisen. Sie konnten zeigen, dass Protamin 1 über eine Bindung an das Kernhüllenprotein LBR (siehe 1.2.2.1) aktiviert werden muss, bevor es die Transitionsproteine vom Chromatin verdrängen kann. (3) Und mit GCL (siehe 1.2.2; Jongens et al., 1992; de la Luna et al., 1999; Kimura et al., 1999) konnte ein weiterer Kernhüllenbestandteil in Keimzellen nachgewiesen werden, der die Chromatinstruktur in Spermatiden beeinflusst. GCL-Knockout-Mäuse weisen eine gestörte Expression der Transitionsproteine und Protamine auf, wobei die Transkription der entsprechenden mRNAs nicht beeinflusst zu sein scheint. Im Endeffekt kommt es zu einer fehlerhaften Chromatinreorganisation und schon in Spermatozyten stellen sich starke Deformationen der Zellkerne ein, was schließlich zu einer stark verminderten Fertilität führt (Kimura et al., 2003; Maekawa et al., 2004).

5.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Spermatogenese ist ein hoch komplexer Differenzierungsprozess und insbesondere während der Spermiogenese kommt es zu einer grundlegenden Neuorganisation der zellulären Strukturen. Für jede einzelne Phase der Spermatogenese, die Vermehrungs- und Erhaltungsphase der Spermatogonien, die meiotischen Teilungen und schließlich die Spermiogenese, ist in den Keimzellen eine spezifische Ausstattung an Proteinen vorhanden, damit die jeweiligen Vorgänge ablaufen können. Diese Proteinausstattung beinhaltet neben einzigartigen Proteinen auch keimbahnspezifische Varianten somatischer Proteine. (Übersichten in Eddy und O'Brien, 1998; Hecht, 1998; Eddy, 2002; Dadoune, 2003; Grimes, 2004; Kimmins et al., 2004b; Monaco et al., 2004).

Auch die Kernhülle weist in Keimzellen einige Besonderheiten auf. So ist nur eine somatische Lamin-Isoform in der Spermatogenese exprimiert, das Lamin B1, wobei die Proteinmenge deutlich geringer ist als in einer somatischen Zelle (Vester et al., 1993). Die Zusammensetzung der Kernlamina ändert sich mindestens zweimal im Verlauf der Spermatogenese. So wird während der Prophase der ersten meiotischen Teilung das Lamin C2 exprimiert, eine kurze Isoform von Lamin C (Furukawa et al., 1994; Alsheimer und Benavente, 1996). Dieses Lamin ist essentiell für die Spermatogenese, denn in Mäusen, die keine A-Typ-Lamine exprimieren, stoppt die Meiose im Pachytän, hauptsächlich aufgrund gravierender Fehler bei der Chromosomenpaarung (Alsheimer et al., 2004). In postmeiotischen Stadien wird dann neben Lamin B1 das Lamin B3 exprimiert, eine "natürliche Deletionsmutante" von Lamin B2, das durch die fehlenden Helices 1A und 1B der zentralen Domäne besondere Eigenschaften besitzt. Eine Konsequenz aus der Verkürzung der Stäbchendomäne ist eine Reduktion der Stabilität eines Lamin-B3-Polymers, was schließlich zusammen mit der geringeren Menge von Lamin B1 zu einer signifikanten Aufweichung bzw. Flexibilisierung der Kernlamina führen könnte. Eine solche flexible Lamina könnte eine strukturelle Grundvoraussetzung sein für die während der Spermiogenese ablaufenden morphologischen Veränderungen des Zellkerns und die Umverteilung einiger Kernhüllenkomponenten zum posterioren Pol, wie die Lamine B1 und B3 (Vester et al., 1993; die vorliegende Arbeit), die LAPs2 (Alsheimer et al., 1998), LBR (Mylonis et al., 2004) und die Kernporenkomplexe (Clermont et al., 1993). Die biologische Relevanz dieser Umverteilung ist noch unklar, auch wenn postuliert wurde, dass sie zur Ausbildung der spermienspezifischen Chromatinorganisation beiträgt (Alsheimer et al., 1998; Referenzen darin). Interessanterweise ziehen sich diese Kernhüllenproteine aus der anterioren Hälfte des Spermatidenkerns zurück, wenn das Akrosom beginnt, sich auszudehnen und dabei diesen Bereich zu umschließen. Parallel dazu bildet sich außerdem noch der Akroplaxom-Akrosom-Manschetten-Komplex (Kierszenbaum et al., 2003a; Kierszenbaum und Tres, 2004). Im Bereich des "marginal ring" (MR; siehe 1.1.2.2 und Abbildung 1-7 unter 1.1.2.3) ist dieser Komplex mit der Kernhülle verbunden, sodass die sich zurückziehende Lamina und ihre assoziierten Proteine beispielsweise bei der Positionierung der Manschette oder der Formgebung des Akrosoms beteiligt sein könnten. Für somatische Zellen wurden bereits mehrere Verbindungen zwischen Kernhülle und zytoplasmatischen Komponenten beschrieben, wodurch ein zusammenhängendes Netzwerk entsteht, das nukleoplasmatische Bestandteile, Kernhülle und Zytoskelett mit assoziierten Faktoren verbindet (Übersichten in Gruenbaum et al., 2003; 2005). Andererseits könnte dieser Rückzug aus der vorderen Region des Kerns auch primär dazu dienen, Platz für die Komponenten zu schaffen, die bei der Ausbildung spezifischer Domänen innerhalb der Spermienkernmembran und des Akrosoms beteiligt sind, die später beim Befruchtungsvorgang eine Rolle spielen (Übersichten in Tulsiani et al., 1998; Toshimori und Ito, 2003).

Über eine mögliche Bedeutung der im Nukleoplasma lokalisierten Lamin-B3-Moleküle lässt sich nur spekulieren, eine Funktion als strukturelle Komponente ist allerdings eher unwahrscheinlich, da sich ein bedeutender Anteil von Lamin B3 als leicht löslich erwiesen hat. Hier könnte die durch den "Pull-Down-Assay" gefundene, mögliche Interaktion von Lamin B3 mit den Y-Box-Proteinen MSY2, MSY2a und MSY4 (Gu et al., 1998; Davies et al., 2000) die Verbindung herstellen. So wäre ein Einfluss von Lamin B3 auf die kontrollierte Expression eines spermatidenspezifischen Proteins denkbar, wie es mit LBR und GCL bereits für zwei Kernhüllenproteine gezeigt wurde (Kimura et al., 2003; Mylonis et al., 2004). Durch die im Zellkultursystem gezeigte Dynamik von Lamin B3 ist auch eine Funktion als Übermittler oder Transporter denkbar. Welche Funktionen Lamin B3 in der Kernhülle und im Nukleoplasma möglicherweise hat, könnte durch die Identifikation und Charakterisierung interagierender Proteine geklärt werden.

Diese Überprüfung bzw. Bestätigung der Bindung von MSY2, MSY2a und/oder MSY4 an Lamin B3 ist auch eines der ersten Projekte, die durchgeführt werden sollen. Zur Überprüfung der Bindung der Y-Box-Proteine an Lamin B3 müssen die entsprechenden cDNAs einerseits in prokaryontische Expressionsvektoren inseriert werden, um gereinigte Proteine für "Blot-Overlay"- oder "Pull-Down-Assays" zur Verfügung zu haben. Außerdem eröffnen die aufgereinigten MSY-Proteine Möglichkeit, spezifische Antikörper gegen diese Proteine herzustellen, was eine Analyse im Gewebe ermöglichen würde. Ein weiterer Ansatz ist die Durchführung von Koexpressionsstudien im Zellkultursystem. Über eine Beeinflussung der Verteilung eines der Proteine in der Zelle bei gleichzeitiger Expression des anderen kann auf eine Interaktion geschlossen werden. Die letzte Möglichkeit, die eine Interaktion nachweisen kann, ist ein Test im "Yeast-Two-Hybrid"-System, das auch dazu verwendet werden soll, einen neuen "Screen" einer Keimzellenbank durchzuführen, um so neue Bindungspartner zu finden. Die Arbeiten an diesen Projekten haben bereits begonnen, die meisten Vektorkonstrukte sind hergestellt und der "Yeast-Two-Hybrid-Screen" ist in Vorbereitung.

Ein weiteres Vorhaben, das geplant ist, sind Analysen der Polymerisationseigenschaften von Lamin B3 *in vitro*. Anhand dieser Daten könnten Rückschlüsse gezogen werden auf die Struktur eines Lamin-B3-Polymers, wenn Lamin B3 überhaupt größere polymere Strukturen ausbildet. Diese strukturellen Informationen könnten dann weitere Hinweise darauf geben, welche Bedeutung Lamin B3 für die Lamina in Keimzellen hat. Außerdem könnte eine mögliche Funktion des spezifischen N-Terminus von Lamin B3 in diesem Zusammenhang gefunden werden. Die Ergebnisse aus den Experimenten im heterologen Zellkultursystem schließen eine Bedeutung dieser Domäne für eine Stabilisierung des Polymers zwar eher aus, doch könnten Epitope enthalten sein, die, zumindest in Keimzellen, die dynamischen Eigenschaften von Lamin B3 regulieren.

Das wichtigste und interessanteste Projekt für die Zukunft ist jedoch die Generierung einer Knockout-Maus, die spezifisch nur Lamin B3 nicht exprimiert. Dieses Modell könnte zeigen, welche Bedeutung Lamin B3 für die Spermiogenese hat.

6 Zusammenfassung

Die Lamine gehören zu einer Familie von Proteinen, die als strukturelle Hauptelemente die Kernlamina ausbilden, einen wesentlichen Bestandteil der Kernhülle eukaryontischer Zellen. In Säugern exprimieren differenzierte somatische Zellen die Lamine A, C, B1 und B2. Die Kernhülle in Keimzellen unterscheidet sich in Bezug auf Struktur und Proteinzusammensetzung deutlich von der einer somatischen Zelle. So exprimieren Keimzellen Lamin B1 als einziges der somatischen Lamine und zwei kurze keimbahnspezifische Spleißvarianten, die Lamine C2 und B3. Die vorliegende Arbeit enthält eine detaillierte Analyse des Expressionsmusters und der zellulären Verteilung von Lamin B3 im Verlauf der Spermatogenese der Maus. Die Daten aus RT-PCR, Western Blot und Immunfluoreszenz belegen eindeutig, dass Lamin B3 ausschließlich in postmeiotischen Stadien während der Spermiogenese exprimiert wird. In runden Spermatiden konnte das Protein an der Kernhülle und überraschenderweise auch im Nukleoplasma nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Spermiogenese kommt es zu einer Umverteilung des Proteins, es konzentriert sich zunehmend am posterioren Pol des Spermatidenkerns. Damit ist die Lamina während der Säuger-Spermiogenese nur aus B-Typ-Laminen aufgebaut und Lamin B3 ist in Säugern das erste Beispiel für ein Lamin, das selektiv nur in postmeiotischen Stadien der Spermatogenese exprimiert wird.

Die ektopische Expression von Lamin B3 in Kulturzellen führt zu einer Deformation der Zellkerne, die eine hakenförmige Gestalt annehmen. Mit Hilfe von Transfektionsexperimenten in COS-7-Zellen konnte eindeutig gezeigt werden, dass die auftretenden morphologischen Veränderungen der Kerne transfizierter Zellen auf die trunkierte zentrale Stäbchendomäne in Lamin B3 zurückzuführen ist. Darüber hinaus zeigte das Protein eine stark erhöhte Löslichkeit im Vergleich zu Lamin B2 und die Analyse transfizierter Kulturzellen mit "fluorescence recovery after photobleaching" (FRAP) und "fluorescence loss in photobleaching" (FLIP) ergab, dass ein erheblicher Anteil der Lamin-B3-Moleküle eine hohe Mobilität aufweist, die ebenfalls ausschließlich durch die kurze Stäbchendomäne begründet ist. Die Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass Lamin B3 die Kernhülle in Keimzellen flexibler macht, was eine Voraussetzung für einige Vorgänge in der Spermiogenese sein könnte.

Mit einem Fusionsprotein aus GST und dem 84 Aminosäuren umfassenden N-Terminus von Lamin B3 wurde über einen "Pull-Down-Assay" nach möglichen Interaktionspartnern in Keimzellen gesucht. Mit MSY2, MSY2a und MSY4 wurden drei hoch interessante Kandidaten identifiziert. Sie gehören zu den Y-Box-Proteinen, DNA- und RNA-bindende Proteine, die bei der Speicherung und späteren Translation von mRNAs beteiligt sind, u.a. die mRNA von Protamin 1 (diese Form der Regulation von Genexpression hat in der Spermatogenese große Bedeutung). Die Interaktion von Lamin B3 mit diesen Proteinen muss noch überprüft werden, würde aber einen weiteren Bezug zwischen Kernhülle und Chromatinreorganisation in der Spermiogenese herstellen, wie es für die Kernhüllenproteine GCL und LBR bereits gezeigt werden konnte. Außerdem wäre es ein erster Hinweis auf eine funktionelle Bedeutung der N-terminalen Domäne von Lamin B3.

Summary

Lamins are members of a protein family that are the main structural elements of the nuclear envelope in eukaryotic cells. Differentiated mammalian somatic cells express lamins A, C, B1 and B2. The composition and structural organisation of the nuclear lamina in spermatogenic cells differ significantly from that of somatic cells: among the somatic lamins they only express lamin B1 but, additionally, two germ line-specific isoforms could be found, namely lamins C2 and B3. This study contains a detailed investigation of the expression pattern and localisation of lamin B3 during mouse spermatogenesis. By combining RT-PCR, immunoblotting, and immunofluorescence microscopy, it turned out, that lamin B3 is selectively expressed in postmeiotic stages during spermiogenesis. In round spermatids, lamin B3 is distributed in the nuclear periphery and, notably, also in the nucleoplasm. In the course of spermiogenesis, lamin B3 becomes redistributed as it concentrates progressively to the posterior pole of spermatid nuclei. The results show that during mammalian spermiogenesis the nuclear lamina is composed of B-type isoforms only, namely lamin B1 and the germ line-specific lamin B3. Lamin B3 is the first example of a mammalian lamin that is selectively expressed during postmeiotic stages of spermatogenesis.

When ectopically expressed in culture cells, lamin B3 causes severe deformation of nuclei which adopt a hook-like configuration. Transfection experiments in COS-7 cells could prove that the observed nuclear deformations are due to the shortened rod domain of lamin B3. Cell fractionation experiments revealed that lamin B3 can be solubilised more easily than lamin B2. In addition, fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) and fluorescence loss in photobleaching (FLIP) analyses of transfected COS-7 cells showed that considerable amounts of lamin B3 molecules exhibit a significantly increased mobility compared to lamin B2. The increased solubility of lamin B3 compared to lamin B2 as well as the mobility of that protein is only determined by its shortened rod domain. Taken together, these data lead to the conclusion that lamin B3 reduces the stability of the nuclear periphery, what might be an important prerequisite for some reorganisation processes during spermiogenesis to occur.

Via a pull-down assay using a fusion protein containing GST and the 84 amino acid long N-terminal domain of lamin B3 a screen for interaction partners of lamin B3 was performed. With MSY2, MSY2a and MSY4 three interesting candidates were found. These proteins belong to the large family of Y-box containing proteins, which are DNA and RNA binding proteins. They are involved in storage and subsequent translation of various mRNAs, e.g. the mRNA of protamine 1 (this mechanism for regulation of gene expression is a major principle in spermatogenesis). The interaction between lamin B3 and the Y-box proteins has to be verified but it would provide an additional link between reorganisation of chromatin and the nuclear envelope as it has already been reported for other proteins of the nuclear envelope like GCL or LBR. Besides that it could be a first evidence for a specific function of the lamin B3 N-terminal domain.

7 Literaturverzeichnis

- Aaronson, R. P. and Blobel, G. (1975). Isolation of nuclear pore complexes in association with a lamina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1007-11.
- Abou-Haila, A. and Tulsiani, D. R. (2000). Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys* **379**, 173-82.
- Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. and Knowles, B. B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282, 615-6.
- Aebi, U., Cohn, J., Buhle, L. and Gerace, L. (1986). The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* **323**, 560-4.
- Alsheimer, M. and Benavente, R. (1996). Change of karyoskeleton during mammalian spermatogenesis: expression pattern of nuclear lamin C2 and its regulation. *Exp Cell Res* 228, 181-8.
- Alsheimer, M., Fecher, E. and Benavente, R. (1998). Nuclear envelope remodelling during rat spermiogenesis: distribution and expression pattern of LAP2/thymopoietins. *J Cell Sci* 111 (Pt 15), 2227-34.
- Alsheimer, M., von Glasenapp, E., Hock, R. and Benavente, R. (1999). Architecture of the nuclear periphery of rat pachytene spermatocytes: distribution of nuclear envelope proteins in relation to synaptonemal complex attachment sites. *Mol Biol Cell* 10, 1235-45.
- 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 U S A* 97, 13120-5.
- Alsheimer, M., Liebe, B., Sewell, L., Stewart, C. L., Scherthan, H. and Benavente, R. (2004). Disruption of spermatogenesis in mice lacking A-type lamins. *J Cell Sci* 117, 1173-8.
- Austin, C. R. (1952). The capacitation of the mammalian sperm. Nature 170, 326.
- Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E. and Webb, W. W. (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J* 16, 1055-69.
- Baarends, W. M. and Grootegoed, J. A. (2003). Chromatin dynamics in the male meiotic prophase. *Cytogenet Genome Res* 103, 225-34.
- Balhorn, R. (1982). A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. J Cell Biol 93, 298-305.
- Barlow, J. J., Mathias, A. P., Williamson, R. and Gammack, D. B. (1963). A Simple Method for the Quantitative Isolation of Undegraded High Molecular Weight Ribonucleic Acid. *Biochem Biophys Res Commun* 13, 61-6.
- Bellvé, A. R., Cavicchia, J. C., Millette, C. F., O'Brien, D. A., Bhatnagar, Y. M. and Dym, M. (1977). Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol* 74, 68-85.
- Benavente, R., Krohne, G. and Franke, W. W. (1985). Cell type-specific expression of nuclear lamina proteins during development of Xenopus laevis. *Cell* 41, 177-90.
- 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 U S A* 82, 6176-80.
- 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, 1847-54.

- Benavente, R., Scheer, U. and Chaly, N. (1989). Nucleocytoplasmic sorting of macromolecules following mitosis: fate of nuclear constituents after inhibition of pore complex function. *Eur J Cell Biol* **50**, 209-19.
- 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 localization of the mouse thymopoietin/lamina-associated polypeptide 2 gene and its alternatively spliced products. *Genome Res* 6, 361-70.
- Biggiogera, M., Muller, S., Courtens, J. L., Fakan, S. and Romanini, M. G. (1992). Immunoelectron microscopical distribution of histones H2B and H3 and protamines in the course of mouse spermiogenesis. *Microsc Res Tech* 20, 259-67.
- Bione, S., Maestrini, E., Rivella, S., Mancini, M., Regis, S., Romeo, G. and Toniolo, D. (1994). Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* **8**, 323-7.
- Bloom, W. and Fawcett, D. W. (1975). Textbook of Histology, 10th Ed. Saunders, Philadelphia.
- Bonne, G., Di Barletta, M. R., Varnous, S., Becane, H. M., Hammouda, E. H., Merlini, L., Muntoni, F., Greenberg, C. R., Gary, F., Urtizberea, J. A. et al. (1999). Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* **21**, 285-8.
- Bossie, C. A. and Sanders, M. M. (1993). A cDNA from Drosophila melanogaster encodes a lamin C-like intermediate filament protein. *J Cell Sci* 104 (Pt 4), 1263-72.
- Braun, R. E., Behringer, R. R., Peschon, J. J., Brinster, R. L. and Palmiter, R. D. (1989). Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature* 337, 373-6.
- Braun, R. E. (1998). Post-transcriptional control of gene expression during spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 9, 483-9.
- Braun, R. E. (2000). Temporal control of protein synthesis during spermatogenesis. *Int J Androl* 23 Suppl 2, 92-4.
- Braun, R. E. (2001). Packaging paternal chromosomes with protamine. Nat Genet 28, 10-2.
- Breed, W. G. (2005). Evolution of the spermatozoon in muroid rodents. J Morphol 265, 271-90.
- Bridger, J. M., Kill, I. R., O'Farrell, M. and Hutchison, C. J. (1993). Internal lamin structures within G1 nuclei of human dermal fibroblasts. *J Cell Sci* 104 (Pt 2), 297-306.
- Brinster, R. L. and Avarbock, M. R. (1994). Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11303-7.
- Brinster, R. L. and Zimmermann, J. W. (1994). Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11298-302.
- Brinster, R. L. (2002). Germline stem cell transplantation and transgenesis. Science 296, 2174-6.
- Broers, J. L., Machiels, B. M., Kuijpers, H. J., Smedts, F., van den Kieboom, R., Raymond, Y. and Ramaekers, F. C. (1997). A- and B-type lamins are differentially expressed in normal human tissues. *Histochem Cell Biol* 107, 505-17.
- Broers, J. L., Machiels, B. M., van Eys, G. J., Kuijpers, H. J., Manders, E. M., van Driel, R. and Ramaekers, F. C. (1999). Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. *J Cell Sci* 112 (Pt 20), 3463-75.
- Broers, J. L., Hutchison, C. J. and Ramaekers, F. C. (2004). Laminopathies. J Pathol 204, 478-88.

Brown, D. T. (2001). Histone variants: are they functionally heterogeneous? Genome Biol 2, REVIEWS0006.

- Burke, B. and Gerace, L. (1986). A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *Cell* 44, 639-52.
- Burke, B. and Ellenberg, J. (2002). Remodelling the walls of the nucleus. Nat Rev Mol Cell Biol 3, 487-97.
- Cai, M., Huang, Y., Zheng, R., Wei, S. Q., Ghirlando, R., Lee, M. S., Craigie, R., Gronenborn, A. M. and Clore, G. M. (1998). Solution structure of the cellular factor BAF responsible for protecting retroviral DNA from autointegration. *Nat Struct Biol* 5, 903-9.
- Cao, H. and Hegele, R. A. (2000). Nuclear lamin A/C R482Q mutation in canadian kindreds with Dunnigantype familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 9, 109-12.
- Cao, H. and Hegele, R. A. (2003). LMNA is mutated in Hutchinson-Gilford progeria (MIM 176670) but not in Wiedemann-Rautenstrauch progeroid syndrome (MIM 264090). *J Hum Genet* 48, 271-4.
- Carpenter, A. T. (1975). Electron microscopy of meiosis in Drosophila melanogaster females: II. The recombination nodule--a recombination-associated structure at pachytene? *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 3186-9.
- Carpenter, A. T. (2003). Normal synaptonemal complex and abnormal recombination nodules in two alleles of the Drosophila meiotic mutant mei-W68. *Genetics* **163**, 1337-56.
- Cathala, G., Savouret, J. F., Mendez, B., West, B. L., Karin, M., Martial, J. A. and Baxter, J. D. (1983). A method for isolation of intact, translationally active ribonucleic acid. *DNA* 2, 329-35.
- Caux, F., Dubosclard, E., Lascols, O., Buendia, B., Chazouilleres, O., Cohen, A., Courvalin, J. C., Laroche, L., Capeau, J., Vigouroux, C. et al. (2003). A new clinical condition linked to a novel mutation in lamins A and C with generalized lipoatrophy, insulin-resistant diabetes, disseminated leukomelanodermic papules, liver steatosis, and cardiomyopathy. J Clin Endocrinol Metab 88, 1006-13.
- Chandley, A. C., Hotta, Y. and Stern, H. (1977). Biochemical analysis of meiosis in the male mouse. I. Separation of DNA labelling of specific spermatogenic stages. *Chromosoma* 62, 243-53.
- Chang, M. C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168, 697-8.
- Chaudhary, N. and Courvalin, J. C. (1993). Stepwise reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *J Cell Biol* **122**, 295-306.
- Cheng, C. Y. and Mruk, D. D. (2002). Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev* 82, 825-74.
- 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 U S A* **86**, 2172-5.
- Churikov, D., Zalenskaya, I. A. and Zalensky, A. O. (2004). Male germline-specific histories in mouse and man. *Cytogenet Genome Res* 105, 203-14.
- Clermont, Y. (1963). The cycle of the seminiferous epithelium in man. Am J Anat 112, 35-51.
- Clermont, Y. and Harvey, S. C. (1965). Duration of the Cycle of the Seminiferous Epithelium of Normal, Hypophysectomized and Hypophysectomized-Hormone Treated Albino Rats. *Endocrinology* 76, 80-9.
- Clermont, Y. and Trott, M. (1969). Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of 3H-thymidine and radioautography. *Fertil Steril* 20, 805-17.
- Clermont, Y. and Rambourg, A. (1978). Evolution of the endoplasmic reticulum during rat spermiogenesis. *Am J Anat* 151, 191-211.
- Clermont, Y., Oko, R. and Hermo, L. (1993). Cell biology of mammalian spermiogenesis. In *Cell and Molecular Biology of the Testis*, (eds C. Desjardins and L. L. Ewing), pp. 332-376. Oxford University Press: New York, Oxford.

Collas, I. and Courvalin, J. C. (2000). Sorting nuclear membrane proteins at mitosis. Trends Cell Biol 10, 5-8.

- Cooke, H. J. and Saunders, P. T. (2002). Mouse models of male infertility. Nat Rev Genet 3, 790-801.
- Cronshaw, J. M., Krutchinsky, A. N., Zhang, W., Chait, B. T. and Matunis, M. J. (2002). Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* 158, 915-27.
- Dabauvalle, M. C., Loos, K., Merkert, H. and Scheer, U. (1991). Spontaneous assembly of pore complexcontaining membranes ("annulate lamellae") in Xenopus egg extract in the absence of chromatin. *J Cell Biol* 112, 1073-82.
- Dadoune, J. P. (2003). Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. Microsc Res Tech 61, 56-75.
- Dadoune, J. P., Siffroi, J. P. and Alfonsi, M. F. (2004). Transcription in haploid male germ cells. *Int Rev Cytol* 237, 1-56.
- Daigle, N., Beaudouin, J., Hartnell, L., Imreh, G., Hallberg, E., Lippincott-Schwartz, J. and Ellenberg, J. (2001). Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells. J Cell Biol 154, 71-84.
- Davies, H. G., Giorgini, F., Fajardo, M. A. and Braun, R. E. (2000). A sequence-specific RNA binding complex expressed in murine germ cells contains MSY2 and MSY4. *Dev Biol* 221, 87-100.
- de Kretser, D. M. and Kerr, J. B. (1994). The cytology of the testis. In *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition, (eds E. Knobil and J. D. Neill): Raven Press, New York.
- de la Luna, S., Allen, K. E., Mason, S. L. and La Thangue, N. B. (1999). Integration of a growth-suppressing BTB/POZ domain protein with the DP component of the E2F transcription factor. *Embo J* 18, 212-28.
- de Rooij, D. G. and Grootegoed, J. A. (1998). Spermatogonial stem cells. Curr Opin Cell Biol 10, 694-701.
- de Rooij, D. G. (1998). Stem cells in the testis. Int J Exp Pathol 79, 67-80.
- de Rooij, D. G. (2001). Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* **121**, 347-54.
- De Sandre-Giovannoli, A., Chaouch, M., Kozlov, S., Vallat, J. M., Tazir, M., Kassouri, N., Szepetowski, P., Hammadouche, T., Vandenberghe, A., Stewart, C. L. et al. (2002). Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet* **70**, 726-36.
- De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., Lyonnet, S., Stewart, C. L., Munnich, A., Le Merrer, M. et al. (2003). Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* **300**, 2055.
- Dechat, T., Vlcek, S. and Foisner, R. (2000). Review: lamina-associated polypeptide 2 isoforms and related proteins in cell cycle-dependent nuclear structure dynamics. *J Struct Biol* 129, 335-45.
- **Dessev, G., Iovcheva-Dessev, C., Bischoff, J. R., Beach, D. and Goldman, R.** (1991). A complex containing p34cdc2 and cyclin B phosphorylates the nuclear lamin and disassembles nuclei of clam oocytes in vitro. *J Cell Biol* **112**, 523-33.
- Dhadialla, T. S. and Raikhel, A. S. (1990). Biosynthesis of mosquito vitellogenin. J Biol Chem 265, 9924-33.
- Downing Meisner, A., Klaus, A. V. and O'Leary, M. A. (2005). Sperm head morphology in 36 species of artiodactylans, perissodactylans, and cetaceans (Mammalia). *J Morphol* 263, 179-202.
- Dreger, M., Bengtsson, L., Schoneberg, T., Otto, H. and Hucho, F. (2001). Nuclear envelope proteomics: novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11943-8.

- **Dwyer, N. and Blobel, G.** (1976). A modified procedure for the isolation of a pore complex-lamina fraction from rat liver nuclei. *J Cell Biol* **70**, 581-91.
- **Dym, M. and Fawcett, D. W.** (1970). The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* **3**, 308-26.
- Dym, M. and Fawcett, D. W. (1971). Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol Reprod* 4, 195-215.
- **Dym, M.** (1977). The male reproductive system. In *Histology, 4th edition*, (eds L. Weiss and R. O. Greep), pp. 929-1038: McGraw-Hill, New York.
- Dym, M. (1994). Spermatogonial stem cells of the testis. Proc Natl Acad Sci USA 91, 11287-9.
- Eddy, E. M. and O'Brien, D. A. (1994). The spermatozoon. In *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition, (eds E. Knobil and J. D. Neill): Raven Press, New York.
- Eddy, E. M. and O'Brien, D. A. (1998). Gene expression during mammalian meiosis. In *Meiosis and Gametogenesis*, (ed. M. A. Handel): Academic Press, San Diego.
- Eddy, E. M. (2002). Male germ cell gene expression. Recent Prog Horm Res 57, 103-28.
- Ellenberg, J., Siggia, E. D., Moreira, J. E., Smith, C. L., Presley, J. F., Worman, H. J. and Lippincott-Schwartz, J. (1997). Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J Cell Biol* 138, 1193-206.
- Elliott, D. (2003). Pathways of post-transcriptional gene regulation in mammalian germ cell development. *Cytogenet Genome Res* **103**, 210-6.
- Eriksson, M., Brown, W. T., Gordon, L. B., Glynn, M. W., Singer, J., Scott, L., Erdos, M. R., Robbins, C. M., Moses, T. Y., Berglund, P. et al. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423, 293-8.
- Esponda, P. and Gimenez-Martin, G. (1972). The attachment of the synaptonemal complex to the nuclear envelope. An ultrastructural and cytochemical analysis. *Chromosoma* **38**, 405-17.
- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G. and Bishop, J. M. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 5, 3610-6.
- Fairley, E. A., 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 (Pt 15), 2571-82.
- Favreau, C., Worman, H. J., Wozniak, R. W., Frappier, T. and Courvalin, J. C. (1996). Cell cycledependent phosphorylation of nucleoporins and nuclear pore membrane protein Gp210. *Biochemistry* 35, 8035-44.
- Fawcett, D. W. (1956). The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytol* **2**, 403-6.
- Fawcett, D. W. (1966). On the occurrence of a fibrous lamina on the inner aspect of the nuclear envelope in certain cells of vertebrates. Am J Anat 119, 129-45.
- Fawcett, D. W. and Phillips, D. M. (1969). The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoon. *Anat Rec* 165, 153-64.
- Fawcett, D. W. (1975). The mammalian spermatozoon. Dev Biol 44, 394-436.

Felsenfeld, G. and McGhee, J. D. (1986). Structure of the 30 nm chromatin fiber. Cell 44, 375-7.

- Firmbach-Kraft, I. and Stick, R. (1995). Analysis of nuclear lamin isoprenylation in Xenopus oocytes: isoprenylation of lamin B3 precedes its uptake into the nucleus. *J Cell Biol* **129**, 17-24.
- Fisher, D. Z., Chaudhary, N. and Blobel, G. (1986). cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 6450-4.
- 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**, 1267-79.
- Foisner, R. (2001). Inner nuclear membrane proteins and the nuclear lamina. J Cell Sci 114, 3791-2.
- Franca, L. R., Ogawa, T., Avarbock, M. R., Brinster, R. L. and Russell, L. D. (1998). Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol Reprod* 59, 1371-7.
- Franke, W. W., Schmid, E., Vandekerckhove, J. and Weber, K. (1980). Permanently proliferating rat vascular smooth muscle cell with maintained expression of smooth muscle characteristics, including actin of the vascular smooth muscle type. *J Cell Biol* **87**, 594-600.
- Fridkin, A., Mills, E., Margalit, A., Neufeld, E., Lee, K. K., Feinstein, N., Cohen, M., Wilson, K. L. and Gruenbaum, Y. (2004). Matefin, a Caenorhabditis elegans germ line-specific SUN-domain nuclear membrane protein, is essential for early embryonic and germ cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6987-92.
- Furukawa, K. and Hotta, Y. (1993). cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *Embo J* 12, 97-106.
- 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, 426-30.
- Furukawa, K., Glass, C. and Kondo, T. (1997). Characterization of the chromatin binding activity of laminaassociated polypeptide (LAP) 2. *Biochem Biophys Res Commun* 238, 240-6.
- Furukawa, K. and Kondo, T. (1998). Identification of the lamina-associated-polypeptide-2-binding domain of B-type lamin. *Eur J Biochem* 251, 729-33.
- Furukawa, K. (1999). LAP2 binding protein 1 (L2BP1/BAF) is a candidate mediator of LAP2-chromatin interaction. J Cell Sci 112 (Pt 15), 2485-92.
- Georgatos, S. D. (2001). The inner nuclear membrane: simple, or very complex? Embo J 20, 2989-94.
- Gerace, L., Blum, A. and Blobel, G. (1978). Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution. *J Cell Biol* **79**, 546-66.
- Gerace, L. and Blobel, G. (1980). The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* 19, 277-87.
- Gerace, L. and Burke, B. (1988). Functional organization of the nuclear envelope. *Annu Rev Cell Biol* **4**, 335-74.
- Gilbert, S. F. (2000). Developmental Biology: Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Gilchrist, S., Gilbert, N., Perry, P., Ostlund, C., Worman, H. J. and Bickmore, W. A. (2004). Altered protein dynamics of disease-associated lamin A mutants. *BMC Cell Biol* 5, 46.
- Giorgini, F., Davies, H. G. and Braun, R. E. (2001). MSY2 and MSY4 bind a conserved sequence in the 3' untranslated region of protamine 1 mRNA in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* **21**, 7010-9.
- Giorgini, F., Davies, H. G. and Braun, R. E. (2002). Translational repression by MSY4 inhibits spermatid differentiation in mice. *Development* **129**, 3669-79.

- **Gluzman, Y.** (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**, 175-82.
- 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** (**Pt 11**), 3451-61.
- Goldman, A. E., Moir, R. D., Montag-Lowy, M., Stewart, M. and Goldman, R. D. (1992). Pathway of incorporation of microinjected lamin A into the nuclear envelope. *J Cell Biol* **119**, 725-35.
- Goldman, R. D., Gruenbaum, Y., Moir, R. D., Shumaker, D. K. and Spann, T. P. (2002). Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev* 16, 533-47.
- Gorlich, D. and Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 607-60.
- Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S. and Khochbin, S. (2004). The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* 271, 3459-69.
- Grabske, R. J., Lake, S., Gledhill, B. L. and Meistrich, M. L. (1975). Centrifugal elutriation: separation of spermatogenic cells on the basis of sedimentation velocity. *J Cell Physiol* **86**, 177-89.
- Grimes, S. R. (2004). Testis-specific transcriptional control. Gene 343, 11-22.
- Gruenbaum, Y., Landesman, Y., Drees, B., Bare, J. W., Saumweber, H., Paddy, M. R., Sedat, J. W., Smith, D. E., Benton, B. M. and Fisher, P. A. (1988). Drosophila nuclear lamin precursor Dm0 is translated from either of two developmentally regulated mRNA species apparently encoded by a single gene. J Cell Biol 106, 585-96.
- Gruenbaum, Y., Wilson, K. L., Harel, A., Goldberg, M. and Cohen, M. (2000). Review: nuclear lamins-structural proteins with fundamental functions. J Struct Biol 129, 313-23.
- Gruenbaum, Y., Lee, K. K., Liu, J., Cohen, M. and Wilson, K. L. (2002). The expression, lamin-dependent localization and RNAi depletion phenotype for emerin in C. elegans. *J Cell Sci* 115, 923-9.
- 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.
- Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R. D., Shumaker, D. K. and Wilson, K. L. (2005). The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 21-31.
- Gu, W., Tekur, S., Reinbold, R., Eppig, J. J., Choi, Y. C., Zheng, J. Z., Murray, M. T. and Hecht, N. B. (1998). Mammalian male and female germ cells express a germ cell-specific Y-Box protein, MSY2. *Biol Reprod* 59, 1266-74.
- Haering, C. H. and Nasmyth, K. (2003). Building and breaking bridges between sister chromatids. *Bioessays* 25, 1178-91.
- Handel, M. A. (1987). Genetic control of spermatogenesis in mice. In Spermatogenesis Genetic Aspects, (eds W. Hennig Nijmegen and U. Scheer): Springer Verlag, Heidelberg.
- Handel, M. A. (2004). The XY body: a specialized meiotic chromatin domain. Exp Cell Res 296, 57-63.
- Haraguchi, T., Koujin, T., Hayakawa, T., Kaneda, T., Tsutsumi, C., Imamoto, N., Akazawa, C., Sukegawa, J., Yoneda, Y. and Hiraoka, Y. (2000). Live fluorescence imaging reveals early recruitment of emerin, LBR, RanBP2, and Nup153 to reforming functional nuclear envelopes. *J Cell Sci* 113 (Pt 5), 779-94.
- 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, 4557-65.
- Harris, C. A., Andryuk, P. J., Cline, S., Chan, H. K., Natarajan, A., Siekierka, J. J. and Goldstein, G. (1994). Three distinct human thymopoietins are derived from alternatively spliced mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6283-7.
- Heald, R. and McKeon, F. (1990). Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* 61, 579-89.
- Hecht, N. B. (1998). Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. Bioessays 20, 555-61.
- Heitlinger, E., Peter, M., Haner, M., Lustig, A., Aebi, U. and Nigg, E. A. (1991). Expression of chicken lamin B2 in Escherichia coli: characterization of its structure, assembly, and molecular interactions. J Cell Biol 113, 485-95.
- Hennekes, H. and Nigg, E. A. (1994). The role of isoprenylation in membrane attachment of nuclear lamins. A single point mutation prevents proteolytic cleavage of the lamin A precursor and confers membrane binding properties. *J Cell Sci* 107 (Pt 4), 1019-29.
- Herrmann, H., Strelkov, S. V., Feja, B., Rogers, K. R., Brettel, M., Lustig, A., Haner, M., Parry, D. A., Steinert, P. M., Burkhard, P. et al. (2000). The intermediate filament protein consensus motif of helix 2B: its atomic structure and contribution to assembly. *J Mol Biol* **298**, 817-32.
- Herrmann, H. and Aebi, U. (2004). Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu Rev Biochem* 73, 749-89.
- Hetzer, M., Walther, T. C. and Mattaj, I. W. (2005). Pushing the Envelope: Structure, Function, and Dynamics of the Nuclear Periphery. *Annu Rev Cell Dev Biol.*
- Heyting, C. (1996). Synaptonemal complexes: structure and function. Curr Opin Cell Biol 8, 389-96.
- Hirano, T. (2002). The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes Dev* 16, 399-414.
- Hodzic, D. M., Yeater, D. B., Bengtsson, L., Otto, H. and Stahl, P. D. (2004). Sun2 is a novel mammalian inner nuclear membrane protein. *J Biol Chem* 279, 25805-12.
- Hoffmann, K., Dreger, C. K., Olins, A. L., Olins, D. E., Shultz, L. D., Lucke, B., Karl, H., Kaps, R., Muller, D., Vaya, A. et al. (2002). Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huet anomaly). Nat Genet 31, 410-4.
- Höger, T. H., Krohne, G. and Franke, W. W. (1988). Amino acid sequence and molecular characterization of murine lamin B as deduced from cDNA clones. *Eur J Cell Biol* 47, 283-90.
- Höger, T. H., Zatloukal, K., Waizenegger, I. and Krohne, G. (1990). Characterization of a second highly conserved B-type lamin present in cells previously thought to contain only a single B-type lamin. *Chromosoma* 99, 379-90.
- Höger, T. H., Grund, C., Franke, W. W. and Krohne, G. (1991). Immunolocalization of lamins in the thick nuclear lamina of human synovial cells. *Eur J Cell Biol* 54, 150-6.
- Holaska, J. M., Lee, K. K., Kowalski, A. K. and Wilson, K. L. (2003). Transcriptional repressor germ cellless (GCL) and barrier to autointegration factor (BAF) compete for binding to emerin in vitro. *J Biol Chem* 278, 6969-75.
- Holtz, D., Tanaka, R. A., Hartwig, J. and McKeon, F. (1989). The CaaX motif of lamin A functions in conjunction with the nuclear localization signal to target assembly to the nuclear envelope. *Cell* 59, 969-77.
- Horn, P. J. and Peterson, C. L. (2002). Molecular biology. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription. *Science* 297, 1824-7.

- Horton, H., McMorrow, I. and Burke, B. (1992). Independent expression and assembly properties of heterologous lamins A and C in murine embryonal carcinomas. *Eur J Cell Biol* 57, 172-83.
- Jansen, M. P., Machiels, B. M., Hopman, A. H., Broers, J. L., Bot, F. J., Arends, J. W., Ramaekers, F. C. and Schouten, H. C. (1997). Comparison of A and B-type lamin expression in reactive lymph nodes and nodular sclerosing Hodgkin's disease. *Histopathology* 31, 304-12.
- Jessberger, R. (2005). How to divorce engaged chromosomes? Mol Cell Biol 25, 18-22.
- Jongens, T. A., Hay, B., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1992). The germ cell-less gene product: a posteriorly localized component necessary for germ cell development in Drosophila. *Cell* **70**, 569-84.
- Khochbin, S. (2001). Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* 271, 1-12.
- Kierszenbaum, A. L., Rivkin, E. and Tres, L. L. (2003a). Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Mol Biol Cell* 14, 4628-40.
- Kierszenbaum, A. L., Rivkin, E. and Tres, L. L. (2003b). The actin-based motor myosin Va is a component of the acroplaxome, an acrosome-nuclear envelope junctional plate, and of manchette-associated vesicles. *Cytogenet Genome Res* **103**, 337-44.
- Kierszenbaum, A. L. and Tres, L. L. (2004). The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol* 67, 271-84.
- Kimmins, S., Kotaja, N., Fienga, G., Kolthur, U. S., Brancorsini, S., Hogeveen, K., Monaco, L. and Sassone-Corsi, P. (2004a). A specific programme of gene transcription in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 8, 496-500.
- Kimmins, S., Kotaja, N., Davidson, I. and Sassone-Corsi, P. (2004b). Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ-cell differentiation. *Reproduction* 128, 5-12.
- Kimura, T., Yomogida, K., Iwai, N., Kato, Y. and Nakano, T. (1999). Molecular cloning and genomic organization of mouse homologue of Drosophila germ cell-less and its expression in germ lineage cells. *Biochem Biophys Res Commun* 262, 223-30.
- Kimura, T., Ito, C., Watanabe, S., Takahashi, T., Ikawa, M., Yomogida, K., Fujita, Y., Ikeuchi, M., Asada, N., Matsumiya, K. et al. (2003). Mouse germ cell-less as an essential component for nuclear integrity. *Mol Cell Biol* 23, 1304-15.
- Kitten, G. T. and Nigg, E. A. (1991). The CaaX motif is required for isoprenylation, carboxyl methylation, and nuclear membrane association of lamin B2. *J Cell Biol* **113**, 13-23.
- Klapper, M., Exner, K., Kempf, A., Gehrig, C., Stuurman, N., Fisher, P. A. and Krohne, G. (1997). Assembly of A- and B-type lamins studied in vivo with the baculovirus system. *J Cell Sci* **110** (**Pt 20**), 2519-32.
- Kleene, K. C. (2003). Patterns, mechanisms, and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells. *Cytogenet Genome Res* **103**, 217-24.
- Knowles, B. B., Howe, C. C. and Aden, D. P. (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209, 497-9.
- Kornberg, R. D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. Science 184, 868-71.
- Krohne, G. and Benavente, R. (1986). The nuclear lamins. A multigene family of proteins in evolution and differentiation. *Exp Cell Res* 162, 1-10.
- 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, 3801-8.

- Krohne, G., Waizenegger, I. and Hoger, T. H. (1989). The conserved carboxy-terminal cysteine of nuclear lamins is essential for lamin association with the nuclear envelope. *J Cell Biol* 109, 2003-11.
- Krohne, G. (1998). Lamin assembly in vivo. Subcell Biochem 31, 563-86.
- Krohne, G., Benavente, R., Scheer, U. and Dabauvalle, M. C. (2005). The nuclear lamina in Heidelberg and Wurzburg: a personal view. *Eur J Cell Biol* 84, 163-79.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**, 116-20.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lammers, J. H., Offenberg, H. H., van Aalderen, M., Vink, A. C., Dietrich, A. J. and Heyting, C. (1994). The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol* 14, 1137-46.
- Leblond, C. P. and Clermont, Y. (1952). Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. *Am J Anat* **90**, 167-215.
- 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, 4567-73.
- Lee, K. K., Starr, D., Cohen, M., Liu, J., Han, M., Wilson, K. L. and Gruenbaum, Y. (2002). Lamindependent localization of UNC-84, a protein required for nuclear migration in Caenorhabditis elegans. *Mol Biol Cell* **13**, 892-901.
- Lee, M. S. and Craigie, R. (1998). A previously unidentified host protein protects retroviral DNA from autointegration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1528-33.
- 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 nuclear envelopes, clustering of nuclear pore complexes, and accumulation of annulate lamellae. *J Cell Biol* 137, 1001-16.
- Lewis, J. A., Elmer, J. S., Skimming, J., McLafferty, S., Fleming, J. and McGee, T. (1987). Cholinergic receptor mutants of the nematode Caenorhabditis elegans. *J Neurosci* 7, 3059-71.
- Li, B., Pilcher, K. Y., Wyman, T. E. and Machida, C. A. (1997). Rapid preparation and identification of insert-containing recombinant plasmid DNA. *Biotechniques* 23, 603-6, 608.
- Lin, F., Blake, D. L., Callebaut, I., Skerjanc, 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 polypeptide 2 and emerin. *J Biol Chem* 275, 4840-7.
- Liu, J., Rolef Ben-Shahar, T., Riemer, D., Treinin, M., Spann, P., Weber, K., Fire, A. and Gruenbaum, Y. (2000). Essential roles for Caenorhabditis elegans lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes. *Mol Biol Cell* 11, 3937-47.
- Loewinger, L. and McKeon, F. (1988). Mutations in the nuclear lamin proteins resulting in their aberrant assembly in the cytoplasm. *Embo J* 7, 2301-9.
- Luderus, M. E., de Graaf, A., Mattia, E., den Blaauwen, J. L., Grande, M. A., de Jong, L. and van Driel, R. (1992). Binding of matrix attachment regions to lamin B1. *Cell* **70**, 949-59.
- Luderus, M. E., den Blaauwen, J. L., de Smit, O. J., Compton, D. A. and van Driel, R. (1994). Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. *Mol Cell Biol* 14, 6297-305.

- Machiels, B. M., Zorenc, A. H., Endert, J. M., Kuijpers, H. J., van Eys, G. J., Ramaekers, F. C. and Broers, J. L. (1996). An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10. *J Biol Chem* 271, 9249-53.
- Maekawa, M., Ito, C., Toyama, Y., Suzuki-Toyota, F., Kimura, T., Nakano, T. and Toshimori, K. (2004). Stage-specific expression of mouse germ cell-less-1 (mGCL-1), and multiple deformations during mgcl-1 deficient spermatogenesis leading to reduced fertility. *Arch Histol Cytol* 67, 335-47.
- Maidment, S. L. and Ellis, J. A. (2002). Muscular dystrophies, dilated cardiomyopathy, lipodystrophy and neuropathy: the nuclear connection. *Expert Rev Mol Med* 2002, 1-21.
- Malik, H. S. and Henikoff, S. (2003). Phylogenomics of the nucleosome. Nat Struct Biol 10, 882-91.
- Malkov, M., Fisher, Y. and Don, J. (1998). Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biol Reprod* 59, 84-92.
- Malone, C. J., Fixsen, W. D., Horvitz, H. R. and Han, M. (1999). UNC-84 localizes to the nuclear envelope and is required for nuclear migration and anchoring during C. elegans development. *Development* 126, 3171-81.
- Manilal, S., Nguyen, T. M., Sewry, C. A. and Morris, G. E. (1996). The Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein, emerin, is a nuclear membrane protein. *Hum Mol Genet* 5, 801-8.
- Mansharamani, M., Hewetson, A. and Chilton, B. S. (2001). Cloning and characterization of an atypical Type IV P-type ATPase that binds to the RING motif of RUSH transcription factors. *J Biol Chem* **276**, 3641-9.
- Mansharamani, M. and Wilson, K. L. (2005). Direct binding of nuclear membrane protein MAN1 to emerin in vitro and two modes of binding to barrier-to-autointegration factor. *J Biol Chem* 280, 13863-70.
- Martin, L., Crimaudo, 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, 8822-8.
- Matsudaira, P. (1987). Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem* 262, 10035-8.
- Matsumoto, K. and Wolffe, A. P. (1998). Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends Cell Biol* **8**, 318-23.
- Mattaj, I. W. (2004). Sorting out the nuclear envelope from the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 65-9.
- McGhee, J. D. and Felsenfeld, G. (1980). Nucleosome structure. Annu Rev Biochem 49, 1115-56.
- 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**, 463-8.
- McKeon, F. D. (1987). Nuclear lamin proteins and the structure of the nuclear envelope: where is the function? *Bioessays* 7, 169-73.
- Meistrich, M. L. (1977). Separation of spermatogenic cells and nuclei from rodent testes. *Methods Cell Biol* 15, 15-54.
- Meistrich, M. L., Mohapatra, B., Shirley, C. R. and Zhao, M. (2003). Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 111, 483-8.
- Moir, R. D., Montag-Lowy, M. and Goldman, R. D. (1994). Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication. *J Cell Biol* **125**, 1201-12.
- Moir, R. D., Spann, T. P. and Goldman, R. D. (1995). The dynamic properties and possible functions of nuclear lamins. *Int Rev Cytol* 162B, 141-82.

- Moir, R. D., Yoon, M., Khuon, S. and Goldman, R. D. (2000). Nuclear lamins A and B1: different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells. *J Cell Biol* 151, 1155-68.
- Monaco, L., Kotaja, N., Fienga, G., Hogeveen, K., Kolthur, U. S., Kimmins, S., Brancorsini, S., Macho, B. and Sassone-Corsi, P. (2004). Specialized rules of gene transcription in male germ cells: the CREM paradigm. *Int J Androl* 27, 322-7.
- Moses, M. J. (1956). Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. J Biophys Biochem Cytol 2, 215-8.
- Mylonis, I., Drosou, V., Brancorsini, S., Nikolakaki, E., Sassone-Corsi, P. and Giannakouros, T. (2004). Temporal association of protamine 1 with the inner nuclear membrane protein lamin B receptor during spermiogenesis. *J Biol Chem* 279, 11626-31.
- Nasmyth, K. (2001). Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu Rev Genet* **35**, 673-745.
- Nasmyth, K. (2002). Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* 297, 559-65.
- Newport, J. W., Wilson, K. L. and Dunphy, W. G. (1990). A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly. *J Cell Biol* 111, 2247-59.
- Nigg, E. A. (1992a). Assembly and cell cycle dynamics of the nuclear lamina. Semin Cell Biol 3, 245-53.
- Nigg, E. A. (1992b). Assembly-disassembly of the nuclear lamina. Curr Opin Cell Biol 4, 105-9.
- Nigg, E. A., Kitten, G. T. and Vorburger, K. (1992). Targeting lamin proteins to the nuclear envelope: the role of CaaX box modifications. *Biochem Soc Trans* 20, 500-4.
- Nili, E., Cojocaru, G. S., Kalma, Y., Ginsberg, D., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Berger, R., Shaklai, S., Amariglio, N. et al. (2001). Nuclear membrane protein LAP2beta mediates transcriptional repression alone and together with its binding partner GCL (germ-cell-less). *J Cell Sci* 114, 3297-307.
- Öllinger, R. (2002). Das zeitliche Expressionsmuster von Lamin B3 während der Spermatogenese der Maus. Biozentrum der Universität Würzburg: Diplomarbeit.
- Öllinger, R., Alsheimer, M. and Benavente, R. (2005). Mammalian protein SCP1 forms synaptonemal complex-like structures in the absence of meiotic chromosomes. *Mol Biol Cell* 16, 212-7.
- **Osada, S., Ohmori, S. Y. and Taira, M.** (2003). XMAN1, an inner nuclear membrane protein, antagonizes BMP signaling by interacting with Smad1 in Xenopus embryos. *Development* **130**, 1783-94.
- Paddy, M. R., Belmont, A. S., Saumweber, H., Agard, D. A. and Sedat, J. W. (1990). Interphase nuclear envelope lamins form a discontinuous network that interacts with only a fraction of the chromatin in the nuclear periphery. *Cell* 62, 89-106.
- Page, S. L. and Hawley, R. S. (2003). Chromosome choreography: the meiotic ballet. Science 301, 785-9.
- Page, S. L. and Hawley, R. S. (2004). The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. Annu Rev Cell Dev Biol 20, 525-58.
- Parra, M. T., Viera, A., Gomez, R., Page, J., Benavente, R., Santos, J. L., Rufas, J. S. and Suja, J. A. (2004). Involvement of the cohesin Rad21 and SCP3 in monopolar attachment of sister kinetochores during mouse meiosis I. *J Cell Sci* 117, 1221-34.
- Parry, D. A., Conway, J. F. and Steinert, P. M. (1986). Structural studies on lamin. Similarities and differences between lamin and intermediate-filament proteins. *Biochem J* 238, 305-8.

- Pendas, A. M., Zhou, Z., Cadinanos, J., Freije, J. M., Wang, J., Hultenby, K., Astudillo, A., Wernerson, A., Rodriguez, F., Tryggvason, K. et al. (2002). Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet* 31, 94-9.
- Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J. C. and Nigg, E. A. (1990). In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* **61**, 591-602.
- Peter, M., Heitlinger, E., Haner, M., Aebi, U. and Nigg, E. A. (1991). Disassembly of in vitro formed lamin head-to-tail polymers by CDC2 kinase. *Embo J* 10, 1535-44.
- Peterson, C. L. and Laniel, M. A. (2004). Histones and histone modifications. Curr Biol 14, R546-51.
- Petronczki, M., Siomos, M. F. and Nasmyth, K. (2003). Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* **112**, 423-40.
- Phair, R. D. and Misteli, T. (2000). High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature* 404, 604-9.
- 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 Rep* 2, 920-5.
- Pugh, G. E., Coates, P. J., Lane, E. B., Raymond, Y. and Quinlan, R. A. (1997). Distinct nuclear assembly pathways for lamins A and C lead to their increase during quiescence in Swiss 3T3 cells. *J Cell Sci* 110 (Pt 19), 2483-93.
- Qian, Y., Barton, R. and Worman, H. J. (1998). Nuclear Lamin-Binding Proteins: Plenum Press, New York.
- Rao, L., Perez, D. and White, E. (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 135, 1441-55.
- Raukas, E. and Mikelsaar, R. H. (1999). Are there molecules of nucleoprotamine? *Bioessays* 21, 440-8.
- Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E. L., Jr., Jarnik, M., Engel, A. and Aebi, U. (1990). Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J Cell Biol* 110, 883-94.
- Röber, R. A., Weber, K. and Osborn, M. (1989). Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study. *Development* 105, 365-78.
- Roeder, G. S. (1997). Meiotic chromosomes: it takes two to tango. Genes Dev 11, 2600-21.
- Rolls, M. M., Stein, P. A., Taylor, S. S., Ha, E., McKeon, F. and Rapoport, T. A. (1999). A visual screen of a GFP-fusion library identifies a new type of nuclear envelope membrane protein. *J Cell Biol* 146, 29-44.
- Russell, L. and Clermont, Y. (1976). Anchoring device between Sertoli cells and late spermatids in rat seminiferous tubules. *Anat Rec* 185, 259-78.
- **Russell, L.** (1977). Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am J Anat* **148**, 313-28.
- Russell, L. D., Ettlin, R. A., SinhaHikim, A. P. and Clegg, E. D. (1990). Histological and histopathological evaluation of the testis: Cache River Press, Clearwater.
- Russell, L. D. and Brinster, R. L. (1996). Ultrastructural observations of spermatogenesis following transplantation of rat testis cells into mouse seminiferous tubules. *J Androl* 17, 615-27.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci US A* 74, 5463-7.

- Sarma, K. and Reinberg, D. (2005). Histone variants meet their match. Nat Rev Mol Cell Biol 6, 139-49.
- Sasagawa, S., Yamamoto, A., Ichimura, T., Omata, S. and Horigome, T. (1999). In vitro nuclear assembly with affinity-purified nuclear envelope precursor vesicle fractions, PV1 and PV2. *Eur J Cell Biol* 78, 593-600.
- Sassone-Corsi, P. (2002). Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* 296, 2176-8.
- Scheer, U., Kartenbeck, J., Trendelenburg, M. F., Stadler, J. and Franke, W. W. (1976). Experimental disintegration of the nuclear envelope. Evidence for pore-connecting fibrils. *J Cell Biol* 69, 1-18.
- Scherer, W. F., Syverton, J. T. and Gey, G. O. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 97, 695-710.
- Scherthan, H., Weich, S., Schwegler, H., Heyting, C., Harle, M. and Cremer, T. (1996). Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J Cell Biol* 134, 1109-25.
- Scherthan, H. (2001). A bouquet makes ends meet. Nat Rev Mol Cell Biol 2, 621-7.
- Scherthan, H. (2003). Knockout mice provide novel insights into meiotic chromosome and telomere dynamics. *Cytogenet Genome Res* **103**, 235-44.
- Schirmer, E. C., Guan, T. and Gerace, L. (2001). Involvement of the lamin rod domain in heterotypic lamin interactions important for nuclear organization. *J Cell Biol* **153**, 479-89.
- Schirmer, E. C., Florens, L., Guan, T., Yates, J. R., 3rd and Gerace, L. (2003). Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics. *Science* 301, 1380-2.
- Schirmer, E. C. and Gerace, L. (2004). The stability of the nuclear lamina polymer changes with the composition of lamin subtypes according to their individual binding strengths. *J Biol Chem* 279, 42811-7.
- Schmekel, K. and Daneholt, B. (1995). The central region of the synaptonemal complex revealed in three dimensions. *Trends Cell Biol* 5, 239-42.
- Schmidt-Zachmann, M. S., Dargemont, C., Kuhn, L. C. and Nigg, E. A. (1993). Nuclear export of proteins: the role of nuclear retention. *Cell* 74, 493-504.
- Schneider, I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of Drosophila melanogaster. J Embryol Exp Morphol 27, 353-65.
- Schütz, W. (2001). Untersuchungen zum zeitlichen Expressionsmuster von Lamin B3 während der Spermatogenese von *Rattus norvegicus*. Biozentrum der Universität Würzburg: Diplomarbeit.
- 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, 2029-36.
- Shumaker, D. K., Lee, K. K., Tanhehco, Y. C., Craigie, R. and Wilson, K. L. (2001). LAP2 binds to BAF.DNA complexes: requirement for the LEM domain and modulation by variable regions. *Embo J* 20, 1754-64.
- Silve, S., Dupuy, P. H., Ferrara, P. and Loison, G. (1998). Human lamin B receptor exhibits sterol C14reductase activity in Saccharomyces cerevisiae. *Biochim Biophys Acta* 1392, 233-44.
- Simos, G., Maison, C. and Georgatos, S. D. (1996). Characterization of p18, a component of the lamin B receptor complex and a new integral membrane protein of the avian erythrocyte nuclear envelope. J Biol Chem 271, 12617-25.

- Siu, M. K. and Cheng, C. Y. (2004). Dynamic cross-talk between cells and the extracellular matrix in the testis. *Bioessays* 26, 978-92.
- Smith, A. and Benavente, R. (1992). Identification of a short nuclear lamin protein selectively expressed during meiotic stages of rat spermatogenesis. *Differentiation* 52, 55-60.
- Smith, A. (1992). Identifizierung und Charakterisierung von Meiose-spezifischen Zellkern-Proteinen. Biozentrum der Universität Würzburg: Dissertation.
- Smith, E. D., Kudlow, B. A., Frock, R. L. and Kennedy, B. K. (2005). A-type nuclear lamins, progerias and other degenerative disorders. *Mech Ageing Dev* 126, 447-60.
- Solari, A. J. (1974). The behavior of the XY pair in mammals. Int Rev Cytol 38, 273-317.
- Spann, T. P., Goldman, A. E., Wang, C., Huang, S. and Goldman, R. D. (2002). Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. J Cell Biol 156, 603-8.
- Starr, D. A., Hermann, G. J., Malone, C. J., Fixsen, W., Priess, J. R., Horvitz, H. R. and Han, M. (2001). unc-83 encodes a novel component of the nuclear envelope and is essential for proper nuclear migration. *Development* 128, 5039-50.
- Steen, R. L., Martins, S. B., Tasken, K. and Collas, P. (2000). Recruitment of protein phosphatase 1 to the nuclear envelope by A-kinase anchoring protein AKAP149 is a prerequisite for nuclear lamina assembly. *J Cell Biol* 150, 1251-62.
- Steinberger, E. (1971). Hormonal control of mammalian spermatogenesis. Physiol Rev 51, 1-22.
- Stewart, C. and Burke, B. (1987). Teratocarcinoma stem cells and early mouse embryos contain only a single major lamin polypeptide closely resembling lamin B. *Cell* **51**, 383-92.
- Stewart, M. (1993). Intermediate filament structure and assembly. Curr Opin Cell Biol 5, 3-11.
- Stick, R. and Schwarz, H. (1982). The disappearance of the nuclear lamina during spermatogenesis: an electron microscopic and immunofluorescence study. *Cell Differ* 11, 235-43.
- Strahl, B. D. and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. Nature 403, 41-5.
- Strelkov, S. V., Herrmann, H., Geisler, N., Wedig, T., Zimbelmann, R., Aebi, U. and Burkhard, P. (2002). Conserved segments 1A and 2B of the intermediate filament dimer: their atomic structures and role in filament assembly. *Embo J* 21, 1255-66.
- Strelkov, S. V., Schumacher, J., Burkhard, P., Aebi, U. and Herrmann, H. (2004). Crystal structure of the human lamin A coil 2B dimer: implications for the head-to-tail association of nuclear lamins. *J Mol Biol* 343, 1067-80.
- Stuurman, N., Sasse, B. and Fisher, P. A. (1996). Intermediate filament protein polymerization: molecular analysis of Drosophila nuclear lamin head-to-tail binding. *J Struct Biol* **117**, 1-15.
- Stuurman, N., Heins, S. and Aebi, U. (1998). Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. J Struct Biol 122, 42-66.
- Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Bhatt, H., Anver, M., Bhat, N., Nagashima, K., Stewart, C. L. and Burke, B. (1999). Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol* 147, 913-20.

Tanaka, H. and Baba, T. (2005). Gene expression in spermiogenesis. Cell Mol Life Sci 62, 344-54.

Tanemura, K., Ogura, A., Cheong, C., Gotoh, H., Matsumoto, K., Sato, E., Hayashi, Y., Lee, H. W. and Kondo, T. (2005). Dynamic rearrangement of telomeres during spermatogenesis in mice. *Dev Biol* 281, 196-207.

- Taniura, H., Glass, C. and Gerace, L. (1995). A chromatin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones. *J Cell Biol* 131, 33-44.
- ten Dijke, P. and Hill, C. S. (2004). New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* **29**, 265-73.
- Thomas, J. O. and Kornberg, R. D. (1975). An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 2626-30.
- Tilney, L. G., Bryan, J., Bush, D. J., Fujiwara, K., Mooseker, M. S., Murphy, D. B. and Snyder, D. H. (1973). Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *J Cell Biol* **59**, 267-75.
- Todaro, G. J. and Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 17, 299-313.
- Todaro, G. J., Habel, K. and Green, H. (1965). Antigenic and cultural properties of cells doubly transformed by polyoma virus and SV40. *Virology* 27, 179-85.
- Toshimori, K. and Ito, C. (2003). Formation and organization of the mammalian sperm head. *Arch Histol Cytol* 66, 383-96.
- Trelles-Sticken, E., Dresser, M. E. and Scherthan, H. (2000). Meiotic telomere protein Ndj1p is required for meiosis-specific telomere distribution, bouquet formation and efficient homologue pairing. *J Cell Biol* 151, 95-106.
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. Annu Rev Biochem 67, 509-44.
- Tulsiani, D. R., Abou-Haila, A., Loeser, C. R. and Pereira, B. M. (1998). The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res* 240, 151-64.
- Vaughan, A., Alvarez-Reyes, M., Bridger, J. M., Broers, J. L., Ramaekers, F. C., Wehnert, M., Morris, G. E., Whitfield, W. G. F. and Hutchison, C. J. (2001). Both emerin and lamin C depend on lamin A for localization at the nuclear envelope. *J Cell Sci* 114, 2577-90.
- Venables, J. P. and Eperon, I. (1999). The roles of RNA-binding proteins in spermatogenesis and male infertility. *Curr Opin Genet Dev* 9, 346-54.
- Venables, J. P. (2002). Alternative splicing in the testes. Curr Opin Genet Dev 12, 615-19.
- Vester, B., Smith, A., Krohne, G. and Benavente, R. (1993). Presence of a nuclear lamina in pachytene spermatocytes of the rat. *J Cell Sci* 104 (Pt 2), 557-63.
- Vigers, G. P. and Lohka, M. J. (1991). A distinct vesicle population targets membranes and pore complexes to the nuclear envelope in Xenopus eggs. J Cell Biol 112, 545-56.
- von Wettstein, D., Rasmussen, S. W. and Holm, P. B. (1984). The synaptonemal complex in genetic segregation. *Annu Rev Genet* 18, 331-413.
- Ward, W. S. and Coffey, D. S. (1991). DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 44, 569-74.
- Wente, S. R. (2000). Gatekeepers of the nucleus. Science 288, 1374-7.
- Wettstein, R. and Sotelo, J. R. (1967). Electron microscope serial reconstruction of the spermatocyte-I nuclei at pachytene. *J de Microsc.* **6**, 557-576.
- Wolffe, A. P. (1994). Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. *Bioessays* 16, 245-51.

- Worman, H. J., Yuan, J., Blobel, G. and Georgatos, S. D. (1988). A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8531-4.
- 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* 111, 1535-42.
- Worman, H. J. and Courvalin, J. C. (2000). The inner nuclear membrane. J Membr Biol 177, 1-11.
- Worman, H. J. and Courvalin, J. C. (2004). How do mutations in lamins A and C cause disease? *J Clin Invest* 113, 349-51.
- Wyrobek, A. J., Meistrich, M. L., Furrer, R. and Bruce, W. R. (1976). Physical characteristics of mouse sperm nuclei. *Biophys J* 16, 811-25.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition, (eds E. Knobil and J. D. Neill): Raven Press, New York.
- Yang, J., Medvedev, S., Yu, J., Tang, L. C., Agno, J. E., Matzuk, M. M., Schultz, R. M. and Hecht, N. B. (2005a). Absence of the DNA-/RNA-binding protein MSY2 results in male and female infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5755-60.
- Yang, J., Medvedev, S., Reddi, P. P., Schultz, R. M. and Hecht, N. B. (2005b). The DNA/RNA-binding protein MSY2 marks specific transcripts for cytoplasmic storage in mouse male germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1513-8.
- Yang, L., Guan, T. and Gerace, L. (1997). Integral membrane proteins of the nuclear envelope are dispersed throughout the endoplasmic reticulum during mitosis. *J Cell Biol* **137**, 1199-210.
- 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, 11306-11.
- 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, 14653-6.
- 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. *J Biol Chem* 272, 14983-9.
- Yoshinaga, K. and Toshimori, K. (2003). Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation. *Microsc Res Tech* **61**, 39-45.
- Zalenskaya, I. A., Bradbury, E. M. and Zalensky, A. O. (2000). Chromatin structure of telomere domain in human sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 213-8.
- Zewe, M., Hoger, T. H., Fink, T., Lichter, P., Krohne, G. and Franke, W. W. (1991). Gene structure and chromosomal localization of the murine lamin B2 gene. *Eur J Cell Biol* 56, 342-50.
- 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, 4485-98.
- Zhang, Q., Ragnauth, C. D., Skepper, J. N., Worth, N. F., Warren, D. T., Roberts, R. G., Weissberg, P. L., Ellis, J. A. and Shanahan, C. M. (2005). Nesprin-2 is a multi-isomeric protein that binds lamin and emerin at the nuclear envelope and forms a subcellular network in skeletal muscle. *J Cell Sci* 118, 673-87.
- Zhao, K., Harel, A., Stuurman, N., Guedalia, D. and Gruenbaum, Y. (1996). Binding of matrix attachment regions to nuclear lamin is mediated by the rod domain and depends on the lamin polymerization state. *FEBS Lett* 380, 161-4.

Zickler, D. and Kleckner, N. (1998). The leptotene-zygotene transition of meiosis. Annu Rev Genet 32, 619-97.

Zickler, D. and Kleckner, N. (1999). Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet* 33, 603-754.

Anhang

I Oligonukleotide

	n		r	r	r				1	
Bemerkungen		5'-Primer für Lamin B3; auch für Sequenzierungen geeignet.	5'-Primer für Lamin B3; für RT-PCR verwendet (Expressionsmuster) und zur Bestimmung des Introns, in dem das B3-spezifische Exon liegt.	Bindungsbereich entspricht dem 5'-Ende des 5'-NTR der Lamin B3- cDNA.	5'-Primer für Lamin B3; enthält eine Xhol-Schnittstelle im Überhang.	5'-Primer für Lamin B3, allerdings wird dabei die erste Aminosäure von Glycin nach Valin ausgetauscht; eine Xhol-Schnittstelle wird eingeführt + zusätzlicher Überhang, um das PCR-Produkt verdauen zu können.	5'-Primer für Lamin B3; verwendet für Mutagenese- und Kolonie-PCR, mit B3-Klonen in pEGFP-Vektoren; führt eine Xhol-Schnittstelle mit zusätzlichem Überhang ein, damit PCR-Produkt direkt verdaut werden kann; wurde zusammen mit dem Primer "B3_3'CaaX-WT(KpnI)" verwendet.	5'-Primer für Lamin B3; bewirkt eine Deletion der ersten 25 Amino- säuren; führt eine Xhol-Schnittstelle ein, wobei das PCR-Produkt direkt verdaut werden kann; wurde zusammen mit dem Primer "B3_3'CaaX-WT(Kpn1)" verwendet.	5'-Primer für Lamin B3; bewirkt eine Deletion der ersten 42 Amino- säuren; führt eine Xhol-Schnittstelle ein, wobei das PCR-Produkt direkt verdaut werden kann; wurde zusammen mit dem Primer "B3_3'CaaX-WT(KpnI)" verwendet.	5'-Primer für Lamin B3; bewirkt eine Deletion der ersten 59 Amino- säuren; führt eine Xhol-Schnittstelle ein, wobei das PCR-Produkt direkt verdaut werden kann; wurde zusammen mit dem Primer "B3_3'CaaX-WT(Kpn1)" verwendet.
Herkunft Primersequenz		Mus musculus	Mus musculus	Mus musculus	Mus musculus	Mus musculus	Mus musculus	Mus musculus	Mus musculus	Mus musculus
NCBI Zugangsnr.	nin B2	D13455	D13455	D13455	D13455	D13455	D13455	D13455	D13455	D13455
Bereich der Primerbindung	min B3 und Lar	1-18 Lamin B3	-3-18 Lamin B3	-135115 Lamin B3	1-18 Lamin B3	1-18 Lamin B3	1-18 Lamin B3	104-116 Lamin B3	164-181 Lamin B3	178-191 Lamin B3
T _{anneal}	ner für La	50 °C	61 °C	50 °C	55-60 °C	55-58 °C	3x 55 °C 65-68 °C	3x 55 °C 65-68 °C	3x 55 °C 65-68 °C	3x 55 °C 65-68 °C
T _m (o. Ü.)	Prin				53,2 °C	48,9 °C	53,2 °C	12,0 °C	39,0 °C	24,3 °C
T_{m}		53,1 °C	63,0 °C	55,3 °C	65,1 °C	62,4 °C	72,1 °C	72,2 °C	71,4 °C	72,4 °C
Sequenz		5'-ATG GGG GAG TCG GAA TCC-3'	5'-CCC ATG GGG GAG TCG GAA TCC-3'	5'-GTG GAG CCA CAA GGC CCT AT-3'	5'-Act cga gAT GGG GGA GTC GGA ATC C-3'	5'-Act ega gAT GGT GGA GTC GGA ATC C- 3'	5'-GAC TCA GAT ete gag ATG GGG GAG TCG GAA TCC-3'	5'-CCC GCC ctc gag ATG GAG ACC GTG G- 3'	5'-GGG AGG ete gag ATG GAG TAT GTG AAA CGA CGT-3'	5'-ACC CCC ete gag GAT GCC TGT GAA GTC AGA-3'
Bezeichnung		LB3-5'	LB3-5'lang	LB3-5'_lead(dCC)	LB3-5'_XhoI	LB3-5'Val_Xhol	B3_5'mutGFP(Xhol)	B3_5'dN25AS(Xhol)	B3-5°dN42(Xhol)	B3_5'dN59AS(XhoI)

Bezeichnung	Sequenz	$T_{\rm m}$	T _m (o. Ü.)	$\mathrm{T}_{\mathrm{anneal}}$	Bereich der Primerbindung	NCBI Zugangsnr.	Herkunft Primersequenz	Bemerkungen
B3-5'dN82(Xhol)	5'-AGG GTC ctc gag ATG GAG CAG GAG GTA CGG-3'	71,2 °C	39,2 °C	3x 55 °C 65-68 °C	247-261 Lamin B3 613-627 Lamin B2	D13455 X54098	Mus musculus	5'-Primer für Lamin B3; bewirkt eine Deletion der ersten 82 Amino- säuren; führt eine XhoI-Schnittstelle ein, wobei das PCR-Produkt direkt verdaut werden kann; wurde zusammen mit dem Primer "B3_3'CaaX-WT(KpnI)" verwendet.
B3-5'dN84(Xhol)	5'-CCC ACA ete gag ATG GAG GTA CGG GAG ACC C-3'	72,7 °C	43,3 °C	3x 55 °C 65-68 °C	253-268 Lamin B3 619-633 Lamin B2	D13455 X54098	Mus musculus	5'-Primer für Lamin B3; bewirkt eine Deletion der ersten 84 Amino- säuren, entfernt also den kompletten B3-speziffschen N-Terminus; führt eine Xhol-Schnittstelle ein, wobei das PCR-Produkt direkt verdaut werden kann; wurde zusammen mit dem Primer "B3_3'CaaX- WT(KpnI)" verwendet.
LB3/B2-5'	5'-GAG GTA CGG GAG ACC CGA CGG-3'	61,3 °C	ı	55-58 °C	253-273 Lamin B3 619-632 Lamin B2	D13455 X54098	Mus musculus	setzt dort an, wo die gemeinsame Sequenz von Lamin B3 und B2 anfängt; wurde für "Außenrum-PCR" verwendet für die Herstellung von Lamin B3 und des Konstrukts B2/B3 (entspricht B2Δcoil1); wurde auch zur Sequenzierung (50 °C Annealing) von Lamin B3- Klonen verwendet.
LB3/B2-3'	5'-AGC AGA CCA TAA AAA AGT AGT TTT AGG-3'	52,7 °C	ı	i	Lamin B3	D13455	Mus musculus	
LB3spez3'	5'-CTG CTC TCT TGT GGG GAC CCT-3'	56,9 °C		50 °C	252-232 Lamin B3	D13455	Mus musculus	Bindungsbereich entspricht dem 3°-Ende des Lamin B3-spezifischen N-Terminus.
LB3spez3'neu	5'-CCC TGC TCT CTT GTG GGG A-3'	54,8 °C		50 °C	253-235 Lamin B3	D13455	Mus musculus	siehe LB3spez3', aber Primer bindet 1 Base weiter hinten und führt ein überzähliges Nukleotid ein; damit entsteht ein Überhang aus 2 Basen am 3'-Ende des PCR-Produkts ("B3-spez. N-Terminus"; PCR mit "LB3-5"); wurde verwendet für pET-21a-Klonierung wegen Leseraster des "His-Tags"!
LB3-3'TGA	5'-TCA CAT CAG TCG GCA CCC-3'	51,9 °C	ı	50 °C	1425-1407 Lamin B3 XXX-XXX Lamin B2	D13455 X54098	Mus musculus	Bindungsbereich entspricht dem 3'-Ende der kompletten cDNA- Sequenzen von Lamin B3 bzw. Lamin B2. Achtung: in der Sequenz fehlt ein G-Nukleotid (zwischen den Basen im Rahmen)!
B3_3'CaaX-WT(Kpnl)	5'-GAC CGT GGg gta ccT TTC ACA TCA GTC GGC A-3'	72,8 °C	38,8 °C	3x 55 °C 65-68 °C	1425-1411 Lamin B3 1779-1765 Lamin B2	D13455 X54098	Mus musculus	wildtypischer 3'-Primer für Lamin B3/B2; führt eine KpnI-Schnittstelle mit zusätzlichem Überhang ein, damit das PCR-Produkt direkt verdaut werden kann. Wurde als 3'-Primer für alle N-terminalen Deletions- mutanten verwendet. Auch für Kolonie-PCR geeignet!
B3_3'CaaX-mutG(KpnI)	5'-TGG GGC Agg tac cTT TCA CAT CAG TCG GCC-3'	72,9 °C	40,8 °C	3x 55 °C 65-68 °C	1425-1412 Lamin B3 1779-1766 Lamin B2	D13455 X54098	Mus musculus	3'-Primer für Lamin B3/B2; führt einen Aminosäureaustausch innerhalb der CaaX-Box ein: Cystein nach Glycin)
B3_3'CaaX-mutG(neu)	5'-GAC CGT GGg gta ccT TTC ACA TCA GTC GGC C-3'	73,1 °C	40,8 °C	3x 55 °C 65-68 °C	1425-1412 Lamin B3 1779-1766 Lamin B2	D13455 X54098	Mus musculus	Achtung: Austausch 1st die letzte Base (3 ⁷) des Primers, d.h. bei PCR mit Pfu-Polymerase wird dieser gewollte Austausch "korrigiert"!

- 184 -

Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	T	Т _т (о. Ü.)	T _{anneal}	Bereich der Primerbindung	NCBI Zugangsnr.	Herkunft Primersequenz	Bemerkungen
B3_3'dCaax(Kpn1)	5'-TCA CAT ggt acc TCA GCC CCT TGA GGT AGT CCT-3'	69,7 °C	47,7 °C	3x 55 °C 65-68 °C	1410-1393 Lamin B3 1764-1747 Lamin B2	D13455 X54098	Mus musculus	3'-Primer für Lamin B3/B2; führt zu einer vollständigen Deletion der CaaX-Box; führt eine Kpnl-Schnittstelle mit einem zusätzlichen Überhang ein, damit das PCR-Produkt direkt verdaut werden kann. Auch für Kolonie-PCR geeignet.
B2NT-5'(XhoI)	5'-CTA TAA cte gag ATG GCG TCT CTG CCG CCC-3'	70,6 °C	60,5 °C	3x 55 °C 65-68 °C	1-18 Lamin B2	X54098	Mus musculus	Besitzt einen Überhang mit Xhol-Schnittstelle + 6 Nt, damit das PCR- Produkt direkt verdaut werden kann.
B2NT-3°	5'-CTC CTT CTC CTG CAG CCG AGA CAG-3'	62,4 °C			78-55 Lamin B2	X54098	Mus musculus	Bindungsbereich entspricht dem 3'-Ende des B2-spezifischen N- Terminus vor der Coil 1A; Primer fehlerhaft!
B2NT-3'neu	5'-CTC CTT CTC CTG CAG CCG AGA CAG-3'	62,4 °C			78-55 Lamin B2	X54098	Mus musculus	siehe B2NT-3'; Primer aber OK!; verwendet für die Herstellung des Konstrukts B2/B3
B2coil1A-5°	5'-GAG CTC CGT GAA CTG AAC GAC CG- 3'	61,8 °C			79-101 Lamin B2	X54098	Mus musculus	setzt am Anfang der coil1 A von Lamin B2 an; wurde verwendet für die Klonierung der B3/B2-Chimäre
3'B2spez	5'-CTC CTC AAA CAC ACT CTT GC-3'	47,0 °C		50 °C	618-599 Lamin B2	X54098	Mus musculus	3'-Primer, der direkt am Ende des Bereiches ansetzt, der spezifisch nur in Lamin B2 vorkommt; PCR-Produkt mit "B2NT-5'(Xhol)" beinhaltet den B2-spezifischen N-Terminus inkl. coil 1A und 1B.
			Primer fi	ür die Einf	ührung eines "N	AYC-Tags"		
LB3-3'_myc(a)	5'-GAT GAG TTT TTG TTC TGC GCC CCT TGA GGT AGT CCT TGG-3'	75,2 °C	56,4 °C	3x 53 °C 67-70 °C	1410-1390 Lamin B3 1764-1750 Lamin B2	D13455 X54098	Mus musculus	Diese beiden Primer wurden für eine "Außenrum-PCR" eingesetzt, um direkt vor die CaaX-Box ein "MYC-Tag" (Evan et al., 1985) einzuführen. Primer 1 (myc(a)) ist ein 3'-, Primer 2 (myc(b))
LB3-3'caax_myc(b)	5'-TCA GAA GAG GAT CTG AAT CGA CTG ATG TGA AAC CTG-3'	73,9 °C	55,8 °C	3x 53 °C 67-70 °C	1411- +6 Lamin B3 1765- +6 Lamin B2	D13455 X54098	Mus musculus	ein 5'-Primer. PCR hat nie funktioniert, wahrscheinlich sind die Überhänge mit der MYC-Tag-Sequenz zu lang!
B3_3'MYC(a)-HindIII	5'-aag ett TTG TTC TGC GCC CCT TGA GGT AGT CCT TGG-3'	74,2 °C	56,4 °C	3x 55 °C 67-70 °C	1410-1390 Lamin B3 1764-1744 Lamin B2	D13455 X54098	Mus musculus	3'-Primer, der einen Teil des "MYC-Tags" einführt (PCR mit "B3_5'mutGFP(Xhol)" als 5'-Primer); dabei wird die Nukleotid- Sequenz des "Tags" so verändert, dass eine HindIII-Schnittstelle entsteht (hat keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz!).
Oligo_B3mycl(sense)	5'-agc ttA TCT CAG AAG AG <mark>G A</mark> JTC TGA ATT GCC GAC TGA TGT GAA Agg tae-3'	74,9 °C		I	МҮС	ı	Invitrogen	Diese beiden Oligos wurden annealt (96 °C, 2°, dann in 0,5-°C. Schritten à 20 Sekunden langsam von 80 °C bis 50 °C abgekühlt). Die entstehende doppelsträngige DNA stellte einen Teil des "MYC-Tags"
Oligo_B3mycII(antisense)	<i>5'-</i> eTT TCA CAT CAG TCG GCA ATT CAG A <u>IT</u> CTC TTC TGA GAT a-3'	71,3 °C		I	МҮС	ı	Invitrogen	dar und die Enden wiesen Ubernange auf, als ware das Molekui aus einem Verdau mit HindIII und Kpnl hervorgegangen. Bei der anschließenden Sequenzierung ergab sich, dass die eingerahmten Nukleotide fehlten!

Bernerkungen	siehe oben; die Oligos wurden nachgeliefert.	Mit diesen Oligos konnte das "Tag" erfolgreich eingefügt werden.	Erzeugung einer Mutante von Lamin B3/B2 mit C-terminalem "MYC- Tag", aber ohne CaaX-Box	Beide Oligos ergeben ein Insert, das Überhänge besitzt, als wäre es mit Eco47III (blumt) und Xhol verdaut; Annealing verläuft analog wie oben beschrieben. Nach dem Annealing wurde das Fragment über die beiden	genannten Schnittstellen vor die B3-Inserts in den Vektor (pEGFP-N1) kloniert; Ergebnis war eine Lamin B3-Mutante mit einem N-terminalen "MYC-Tag".	Ein N-terminal mit "MYC" fusioniertes Protein kann mit diesem Primer amplifiziert werden und über Ndel in den pET-21a-Vektor kloniert werden (bakterielle Expression eines "MYC-Proteins"); PCR- Produkt kann direkt verdaut werden.			interne 5°-Sequenzierprimer für Lamin B3 und Lamin B2	
Herkunft Primersequenz	Invitrogen	Invitrogen	Invitrogen	Invitrogen	Invitrogen	Invitrogen	n B2	Mus musculus	Mus musculus	Mus musculus
NCBI Zugangsnr.	ı	-	-	-	ı	ı	3 und Lami	D13455 X54098	D13455 X54098	D13455 X54098
Bereich der Primerbindung	MYC	MYC	MYC	МҮС	МҮС	МҮС	ıer für Lamin B	502-520 Lamin B3 868-886 Lamin B2	797-817 Lamin B3 1163-1183 Lamin B2	1121-1139 Lamin B3 1487-1505 Lamin B2
T _{anneal}	I	-	3x 55 °C 65 °C	I	I	3x 55 °C 63 °C	enzierprin	50 °C	50 °C	50 °C
T _m (o. Ü.)	ı		47,8 °C	ı	ı	58,4 °C	ielle Sequ	ı	ı	ı
T_m	74,9 °C	71,3 °C	69,1 °C	68,2 °C	72,4 °C	66,0 °C	spez	55,6 °C	55,1 °C	56,8 °C
Sequenz	5'-age thA TCT CAG AAG AGG ATC TGA ATT GCC GAC TGA TGT GAA Agg tac-3'	5'-cTT TCA CAT CAG TCG GCA ATT CAG ATC CTC TTC TGA GAT a-3'	5'-CCG Cgg tac ¢TC AAT TCA GAT CCT CTT CTG AG-3'	5'-get ATG GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG e-3'	5'-teg agC AGA TCC TCT TCT GAG ATG AGT TTT TGT TCC ATa gc-3'	5'-CGA Aca tat gGA ACA AAA ACT CAT CTC AGA AGA GG-3'		5'ATG CGC GTG GAG TCC CTC-3'	5'-CAC GGA TCA CCA TCT CTC GG-3'	5'-AGT ATG TGC TGC GGG CCG-3'
Bezeichnung	Oligo_:B3mycl(sense)	Oligo_:B3mycII(antisense)	B3myc3'_dCaax(KpnI)	Oligo_NTmyc-sense	Oligo_NTmyc-antisense	MYC_5'(Ndel)		LB3_seql-5'	LB3_seqII-5'	LB3_seqIII-5'

Oligonukleotide

Bemerkungen	ZU	für RT-PCR verwendet (Expressionsmuster) zusammen mit "LB3-5'lang".	Primerpaar für die Bestimmung des Expressionsmusters von SYCP3	durch RT-PCR (Kontrolle für Lamin B3).	zur Bestimmung, ob B3-spezifisches Exon im Intron 1 liegt; hat nicht funktioniert.	zur Bestimmung, ob B3-spezifisches Exon im Intron 4 liegt; hat nicht funktioniert.	zur Bestimmung, ob B3-spezifisches Exon im Intron 1 liegt; zusammen mit "LB3-5' lang" verwendet.	zur Bestimmung, ob B3-spezifisches Exon im Intron 4 liegt; zusammen mit "LB3-5' lang" verwendet.		5'-Primer für die Amplifikation von MSY2 (zusammen mit "MSY2-3'").	5'-Primer für die Amplifikation von MSY2a (zusammen mit "MSY2-3'").	3'-Primer für die Amplifikation von MSY2 bzw. MSY2a; zusammen mit "MSY2-5" bzw. "MSY2a-5".	5'-Primer für die Amplifikation von MSY4 (zusammen mit "MSY4-3"").	3'-Primer für die Amplifikation von MSY4 (zusammen mit "MSY4-5").	5'-Primer für die Amplifikation von MSY2 (zusammen mit "MSY2-3'lang").	5'-Primer für die Amplifikation von MSY2a (zusammen mit "MSY2-3'lang").
Herkunft Primersequenz	mischen Seque	Mus musculus	Rattus norvegicus	Rattus norvegicus	Mus musculus	Mus musculus	Mus musculus	Mus musculus		Mus musculus	Mus musculus	Mus musculus	Mus musculus	Mus musculus	Mus musculus	Mus musculus
NCBI Zugangsnr.	s in der geno		X75785	X75785	·	-	-	-		AF073954	AF073955	AF073954 AF073955	AF246224	AF246224	AF073954	AF073955
Bereich der Primerbindung	ng des B3-Exon	genom. LB2	-11-10 SYCP3	811- +3 SYCP3	genom. LB2	genom. LB2	genom. LB2	genom. LB2	SY-Primer	1-17 MSY2	1-16 MSY2a	1083-1062 MSY2 849-828 MSY2a	1-17 MSY4	1102-1123 MSY4	1-25 MSY2	1-24 MSY2a
T_{anneal}	okalisierur	61 °C	52 °C	52 °C	ė	ė	55,0 °C	55,0 °C	MS	ė	ė	i	ė	ė	65 °C	65 °C
T _m (o. Ü.)	CR und L		ı	ı	ı	ı	ı	ı		,	ı	ı		ı	1	ı
T_{m}	für RT-P	62,3 °C	56,4 °C	54,4 °C	53,0 °C	53,6 °C	63,3 °C	64,0 °C		55,9 °C	56,5 °C	54,4 °C	59,8 °C	60,0 °C	71,2 °C	76,1 °C
Sequenz	Primer	5'-GAG GGA CTC CAC GCG CAT GC-3'	S'-GGC TTC GTC AGA TGC TTC GAG-3'	5'-GAC TCA TCA GAA TAA CAT GGA TTG AAG-3'	5'-AGG GCC TTA CAA TTC TCA GCT AG- 3'	5'-ATA GGA CAG ACA GCT ACA CAG AGA AAC-3'	5'-GGC TCA GGG CCT TAC AAT TCT CAG CTA G-3'	5'-GGA CAG ACA GCT ACA CAG AGA AAC ACC CC-3'		5'-ATG AGC GAG GCG GAG GC-3'	5'-ATG AGC CGG AGG GCG G-3'	5'-TCA CTC CAG TAT GGT GGT GGG-3'	5'-ATG AGC GAG GCG GGC GA-3'	5'-TCA CTC GGC ACT GCT CTG TTC G-3'	5'-ATG AGC GAG GCG GAG GCG TCA GTG G-3'	5'-ATG AGC CGG AGG GCG GGG CAG GCA-3'
Bezeichnung		LB3ko3'genom	SCP3-forward	SCP3-reverse	B3pos_int1-3'	B3pos_int4-3'	B3pos_int1lang3'	B3pos_int4lang		MSY2-5'	MSY2a-5'	MSY2-3'	MSY4-5'	MSY4-3'	MSY2-5'lang	MSY2a-5'lang

- 187 -

Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	T_{m}	T _m (o. Ü.)	T _{anneal}	Bereich der Primerbindung	NCBI Zugangsnr.	Herkunft Primersequenz	Bemerkungen
MSY2-3'lang	5'-TCA CTC CAG TAT GGT GGT GGG GGG GTC C-3'	71,0 °C	ı	65 °C	1083-1055 MSY2 849-821 MSY2a	AF073954 AF073955	Mus musculus	3'-Primer für die Amplifikation von MSY2 bzw. MSY2a (zusammen mit "MSY2-5'lang" bzw. "MSY2a-5'lang").
MSY4-5'lang	5'-ATG AGC GAG GCG GGC GAG GCC ACC A-3'	76,1 °C		i	1-25 MSY4	AF246224	Mus musculus	5'Primer für die Amplifikation von MSY4 (zusammen mit "MSY4-3'lang").
MSY4-3'lang	5'-TCA CTC GGC ACT GCT CTG TTC GGT AGC TGG-3'	71,5 °C		i	1094-1123 MSY4	AF246224	Mus musculus	3'-Primer fùr die Amplifikation von MSY4 (zusammen mit "MSY4-5'lang").
MSY2_3'TGA-(EcoRl)	5'-GCT Aga att cTC CAG TAT GGT GGT GGG-3'	61,0 °C	47,7 °C	55 °C	1080-1062 MSY2 846-828 MSY2a	AF073954 AF073955	Mus musculus	3'-Primer für MSY2/2a, wobei das Stopp-Codon deletiert wird und eine EcoRI-Schnittstelle angefügt wird; Das PCR-Produkt kann direkt verdaut werden
MSY2a_5'(NdeI)	5'-CGA Aca tat gAG CCG GAG GGC GG-3'	67,0 °C	56,5 °C	55 °C	1-16 MSY2a	AF073955	Mus musculus	5'-Primer für MSY2a zur Klonierung über Ndel in den pET-21a- Vektor; PCR-Produkt kann direkt verdaut werden
		spezie	elle Seque	nzierprim	er für MSY2, M	SY2a und M	SY4	
MSY2_Seql-5'	5'-GTG GAG TTT GAT GTC GTG GAA GG- 3'	57,2 °C	I	50 °C	436-458 MSY2 202-224 MSY2a	AF073954 AF073955	Mus musculus	interner 5'-Sequenzierprimer für MSY2/2a; Sequenzqualität variabel.
MSY_SeqA-5'	5'-GGC AAT CCA AGT CCT GGG C-3'	56,5 °C	I	50 °C	276-294 MSY2 42-60 MSY2a	AF073954 AF073955	Mus musculus	interner 5'-Sequenzierprimer für MSY2/2a; gute Sequenzen.
MSY2_3'-SeqI	5'-GCT GTT GGG GTG GCC TG-3'	54,3 °C	I	50 °C	885-867 MSY2 667-650 MSY2a	AF073954 AF073955	Mus musculus	Interne 3'-Sequenzierprimer für MSY2/2a; Sequenzqualität sehr
MSY_Seq3'-II	5'-CCC TTC GCT GCC AGG TTC-3'	55,4 °C	ı	50 °C	637-619 MSY2 903-885 MSY2a	AF073954 AF073955	Mus musculus	variabel.

Oligonukleotide

					1	1										
Bemerkungen		dient zur Amplifikation der cDNA von EGFP aus den pEGFP-C- Vektoren; bringt eine EcoRI-Schnittstelle mit + Überhang, damit PCR- Produkt verdaut werden kann.	siehe "EGFP5'_EcoRI"	dient zur Amplifikation der cDNA von EGFP aus den pEGFP-C- Vektoren; bringt eine HindIII-Schnittstelle mit + Überhang, damit PCR-Produkt verdaut werden kann.	siehe "EGFP_5'(HindIII)"		Primerpaar, das zur Amplifikation eines Abschnittes der 16S rDNA enseifisch in Musselsemen vervendet vorrde, um eine Ventaminotion	einer Zellkultur mit Mycoplasmen nachzuweisen.		Sequenzierprimer für den Vektor pCR®2.1 TOPO® Können auch für Kolonie-PCR eingesetzt werden, zusammen mit	einem spezifischen Primer innerhalb des Inserts (die Verwendung beider M13-Primer ist nicht empfehlenswert).	Sequenzierprimer; Sequenz leitet sich ab aus den T3- und T7- Promotor-Sequenzen des Vektors "pBluescript SK ⁺ "; in anderen	Vektoren mit diesen Promotoren können diese Sequenzen mehr oder weniger abweichen! Nur bedingt für Kolonie-PCR geeignet	5°-Sequenzierprimer für den Vektor pET-21a	3'-Sequenzierprimer für den Vektor pET-21a; funktioniert nicht gut	3'-Sequenzierprimer für den Vektor pET-21a; sehr kurze Sequenzen
Herkunft Primersequenz	GFP	Clontech	Clontech	Clontech	Clontech	Mycoplasmen				Invitrogen	Invitrogen	Stratagene	Stratagene	Novagen	Novagen	Novagen
NCBI Zugangsnr.	erung von E(U57606	U57606	U57606	U57606	ellkultur mit			mer			-		L20317	L20317	L20317
Bereich der Primerbindung	tion und Kloni	pEGFP-C2	pEGFP-C2	pEGFP-C2	pEGFP-C2	mination der Z			Sequenzierprii	391-406	205-221	752-771 pBluescript	626-647 pBluescript	321-341 pET-21a	253-234 pET-21a	232-211 pET-21a
Tanneal	e Amplifika	3x 55 °C 65 °C	3x 55 °C 65 °C	3x 55 °C 65 °C	3x 55 °C 65 °C	iner Kontar	0° 09	60 °C	Allgemeine	48-50 °C	48-50 °C	44 °C	44 °C	52-53 °C	44-50 °C	50-53 °C
$ \begin{array}{c} T_m \\ (o, \ddot{U}.) \end{array} \\$	ner für die	49,4 °C	48,2 °C	49,4 °C	48,2 °C	achweis ei	ı		7	ı	,		,	,		ı
T_m	Prin	68,5 °C	68,5 °C	69,3°C	68,7 °C	ier zum N	56,8 °C	59,5 °C		44,0 °C	36,0 °C	44,8 °C	44,9 °C	56,1 °C	47,9 °C	59,0 °C
Sequenz		5'-GGT Cga att cAT GGT GAG CAA GGG CG-3'	5'-GTC Cga att cGT ACA GCT CGT CCA TGC C-3'	5'-CGG TCa age ttA TGG TGA GCA AGG GCG-3'	5'-GAG TCC aag ett GTA CAG CTC GTC CAT GCC-3'	Prin	5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT A- 3'	5'-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3'		5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'	5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'	5'-CGA TCC CGC GAA ATT AAT ACG-3'	5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'	5'-GGC AGC AGC CAA CTC AGC TTC-3'
Bezeichnung		EGFP5'_EcoRI	EGFP3'_EcoRI	EGFP_5'(HindIII)	EGFP_3'(HindIII)		myco_5'	myco_3'		M13 forward (-20)	M13 reverse	T3	T7	pET21a_5'seq	pETT7-3	pET_3'seq

Bezeichnung	Sequenz	T_m	$\substack{T_m\\(o, \vec{U}.)}$	$\mathrm{T}_{\mathrm{anneal}}$	Bereich der Primerbindung	NCBI Zugangsnr.	Herkunft Primersequenz	Bemerkungen
pGEX 5° Sequencing Primer	5'-GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG- 3'	67,9 °C		50-60 °C	869-891 pGEX-5X-1	U13856	Amersham Pharmacia Biotech	Sequenzierprimer für die pGEX-Vektoren; bedingt für Kolonie-PCR
pGEX 3' Sequencing Primer	5'-CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG- 3'	64,6 °C		50-60 °C	1044-1022 pGEX-5X-1	U13856	Amersham Pharmacia Biotech	geeignet (besser zusammen mit einem Primer, der im Insert bindet)
pEGFP-N Sequ. Primer MCS Insert ("grün")	5'-GCT GGT TTA GTG AAC CGT CAG A-3'	53,5 °C		48-50 °C	566-587 pEGFP-N1	U55762	Clontech	5'-Sequenzierprimer für die Vektoren pEGFP-N1 (N2, N3); bedingt für Kolonie-PCR geeignet (besser zusammen mit einem Primer, der im Insert bindet)
pEGFP-N Sequ. Primer GFP Insert ("schwarz")	5'-CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G-3'	67,6 °C		48-60 °C	749-728 pEGFP-N1	U55762	Clontech	3'-Sequenzierprimer für die Vektoren pEGFP-N1 (N2, N3); bedingt für Kolonie-PCR geeignet (besser zusammen mit einem Primer, der im Insert bindet)
pEGFP-C Sequ. Primer GFP Insert	5'-ACA TGG TCC TGC TGG AGT TCG T-3'	57,2 °C		48-50 °C	pEGFP-C1	U55763	Clontech	5'-Sequenzierprimer für die Vektoren pEGFP-C1 (C2, C3)
pEGFP-Cx_3'seq	5'-CAG GGG GAG GTG TGG GAG G-3'	58,6 °C		50 °C	pEGFP-C1	U55763	Clontech	3'-Sequenzierprimer für die Vektoren pEGFP-C1 (C2, C3)
In der Tahelle sind alle verw	endeten Oligonukleotide aufveführt Besitzen die	Primer Ül	terhänge	so ist zusäts	zlich zur Schmel	ztemneratur d	es øesamten Pr	mers (T) auch die des Bereiches ohne Üherhang (T o Ü) angegeben

In det labeite sind eine verwendeen Ongonukreoude aurgeunt. Destizen die Frinder Oot nange, so ist zusatzien zu schnietzenperatur des gesamen Frinders (1,m, auch die Gestenens onne Ootenang (1,m, o.O.) augegeoen. Die T_{ameal} gibt an, bei welcher Temperatur das jeweilige Oligonukleotid eingesetzt worden ist. Der Bindungsbereich des Primers gibt die Position in der Nukleotid-Sequenz an, wo der Primer bindet. Bei cDNA-Sequenzen ist das Start-Codon (ATG) immer von Position 1-3, Bereiche davor werden mit einem Minus-Zeichen, Bereiche nach dem Stopp-Codon (TGA, TAA, TAG) entsprechend mit einem Plus-Zeichen gekennzeichnet.

II Abkürzungen

%	Prozent
R	registered
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μΜ	Mikromolar
A	Ampère
AA	anteriores Akrosom
Abb.	Abbildung
AE	axiales Element
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AR	akrosomale Region
BAF	barrier-to-autointegration factor
bp	Basenpaar
BSA	Bovines (Rinder-) Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C-	Carboxy-
(-terminal, -Terminus)	(-terminal, -terminus)
ca.	circa
CaaX-Box	Aminosäuremotiv: Cystein- aliphatisch-aliphatisch-beliebig
CAPS	Cyclohexylamino-1- Propansulfonsäure
cDNA	complementary DNA
CE	zentrales Element
cfu	colony forming unit
CLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
CR	zentrale Region
CREM	cAMP resonsive element modulator
Су	Cyanin
d.h.	das heißt
Da	Dalton
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat
ACTD	
uCII	Desoxy-Cytosin-Triphosphat

DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxy-Guanosin-Triphosphat
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
ds	double stranded, doppelsträngig
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidin-Triphosphat
E. coli	Escherichia coli
e.H.	eigene Herstellung
ECL	enhanced chemiluminescence
EDMD	Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie
EDTA	Ethylendiamid-Tetraacetat
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	et altera (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
FCS, FKS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FLIP	fluorescence loss in photobleaching
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
g	Gramm Erdbeschleunigung (~9,81 m·s ⁻²)
GCL	germ cell-less
GFP	green fluorescent protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTE	Glucose-Tris-EDTA
h	Stunde
H ₂ O bidest.	doppelt destilliertes Wasser

HEPES	Hydroxyethyl-Piperazin-1- Ethansulfonsäure
HRP	Meerettich-Peroxidase [= ,,horse radish peroxidase'']
IAM	innere Akrosomenmembran
IEP	isoelektrischer Punkt
IF	Immunfluoreszenz Intermediärfilament
IgG(M)	Immunglobulin Klasse G(M)
INM	innere Kernmembran
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
Kan	Kanamycin
kb, kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
1	Liter
LAP	Lamina-assoziiertes Polypeptid
LB	Luria Bertami
LBR	Lamin B Rezeptor
М	molar [= Mol pro Liter]
m	Meter
mA	Milliampère
MAK	monoklonaler Antikörper
MAR	matrix attachment region
MATra	magnet assisted transfection
MCS	multiple cloning site
MetOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mol	Stoffmenge (1 Mol = $6,022 \cdot 10^{23}$ Teilchen)
MR	marginal ring
mRNA	messenger RNA
mV	Millivolt
N- (-terminal, -Terminus)	Amino- (-terminal, -terminus)
N.A.	numerische Apertur
NDA	2-Naphtol-6,8-Disulfonsäure
ng	Nanogramm

NLS	Kernlokalisations-Signal
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NPC	Kernporenkomplex
OAM	äußere Akrosomenmembran
OD	optische Dichte
ONM	äußere Kernmembran
p.a.	per analysem (für die Analyse)
PA	posteriores Akrosom
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR	pseudoautosomale Region postakrosomale Region
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBT	Blockpuffer: PBS + BSA + Tween [®] 20
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
pН	potentia hydrogenii
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
РТ	perinukleäre Theka
RN	Rekombinationsknoten
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur Reverse Transkription Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-Polymerase- Kettenreaktion
S	Svedberg-Einheit (Sedimentations- Konstante)
s, sek	Sekunde
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase
SAR	scaffold attachment region
SCP, SYCP	Synaptonemalkomplexprotein $(1, 2, 3)$
(1, 2, 3) SDS	(1, 2, 3) Natriumdodeculsulfat
SI	Stammlösung
SOG	sagenennt
sog.	su genalin
SS	single stranded, einzelstrangig

THE REPORT OF THE PARTY OF THE	
Tab.	Tabelle
TBC	tubulobulbar complex
TBE	Puffer mit Tris, Borsäure und EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	$TBS + Tween^{$ $\otimes} 20$
ТСА	Trichloressigsäure
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TF	Transversalfilament
T _m	Schmelztemperatur
ТР	Transitionsproteine
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
tRNA	transfer RNA
TSR	Template suppression reagent
TSS	transformation and storage solution
ТМ	Trademark
U	Unit
u.a.	unter anderem
ÜNK	Übernacht-Kultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
WB	Western Blot
WT	Wildtyp, wildtypisch
X-Gal	Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D- Galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Weiterhin habe ich noch keinen Promotionsversuch unternommen oder diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Würzburg, den

.....

Wolfgang Schütz

Publikationsliste

Publikationen:

Alsheimer M., Drewes T., Schütz W. and Benavente R. (2005).

The cancer/testis antigen CAGE-1 is a component of the acrosome of spermatids and spermatozoa. Eur. J. Cell Biol. 84(2-3):445-452

Schütz W., Alsheimer M., Öllinger R. and Benavente R. (2005).

Nuclear envelope remodeling during mouse spermiogenesis: Postmeiotic expression and redistribution of germline lamin B3.

Exp. Cell Res. 307(2):285-291

Schütz W., Benavente R. and Alsheimer M. (2005).

Dynamic properties of germ line-specific lamin B3: The role of the shortened rod domain. Eur. J. Cell Biol. 84(7):649-662

Poster auf internationalen Tagungen:

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie und der Gesellschaft für

Entwicklungsbiologie in Bonn, 26.-29. März 2003.

Poster:

Schütz W., Alsheimer M., Öllinger R. and Benavente R.

Expression pattern and nuclear envelope association mechanism of mouse germline-specific lamin B3.

28. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie in Heidelberg, 16.-19. März 2005. Poster:

Schütz W., Öllinger R., Benavente R. and Alsheimer M.

Expression pattern and dynamic properties of mammalian germline-specific lamin B3.

Lebenslauf

	Persönliche Daten
	Wolfgang Schütz,
	geboren am 26.04.1972 in Heilbronn am Neckar,
	verheiratet
	Schulausbildung
1978 - 1982	Grundschule in Güglingen
1982 - 1991	Zabergäu-Gymnasium Brackenheim
Abschluss:	Abitur
	Bundeswehr
10/1991 - 07/1992	Grundwehrdienst beim LVR 4 in Mosbach
07/1992 - 09/1995	Zeitsoldat beim LVR 4 in Mosbach
	Hochschulausbildung
11/1995 - 01/2001	Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität
	Würzburg mit den Studienschwerpunkten
	Zell- und Entwicklungsbiologie, Mikrobiologie und Biotechnologie
01/2000 - 01/2001	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie
	am Biozentrum der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
	bei Prof. Dr. R. Benavente.
	Thema: Untersuchungen zum zeitlichen Expressionsmuster von
	Lamin B3 in der Spermatogenese von Rattus norvegicus.
02/2001 - 01/2005	Praktische Doktorarbeit als wissenschaftlicher Angestellter der
	Julius-Maximilians-Universität Würzburg am Lehrstuhl für
	Zell- und Entwicklungsbiologie bei Prof. Dr. R. Benavente.
	Thema: Postmeiotische Expression und funktionelle Charakterisierung
	von Lamin B3 in der Spermatogenese der Maus.
01/2005 - 10/2005	Anfertigung der Dissertationsschrift und Abschluss der Promotion.
12/2004 - 01/2005	Organisation und Durchführung eines Praktikums für
	Lehramtsstudenten im Rahmen eines Lehrauftrages.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Ricardo Benavente bedanken für die Überlassung des interessanten Themas, sein Interesse am Fortgang der Arbeit und dafür, dass er sich immer Zeit nimmt für die Lösung eines Problems.

Prof. Dr. Clemens Müller-Reible möchte ich sehr herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Ein weiteres großes Dankeschön gilt Dr. Manfred Alsheimer für die gute Betreuung während der praktischen Arbeit; er kann (fast) immer mehrere Gründe nennen, die am Scheitern eines Versuches schuld sein können.

Für die Überlassung einiger Antikörper und cDNAs bedanke ich mich herzlich bei Prof. Dr. Georg Krohne.

Für eine erstklassige Laboratmosphäre bei Andrea, Hannes und Rupi, sowie allen zwischenzeitlich in der Arbeitsgruppe Benavente werkelnden Personen.

Bei Ellen und Claudia für den Sequenzierservice und ein dickes Dankeschön an Natalia und Reinhild für einen perfekten Zellkultur-Service.

Danke an Norbert, der für eine nahezu perfekte Ausstattung des Lehstuhls mit Computern sorgt, die auch funktionieren.

Auch bei allen anderen nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Lehstuhls für Zell- und Entwicklungsbiologie möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Bei meinen Eltern, die immer für mich da sind und mich in jeder Form unterstützen.

Das letzte und größte Dankeschön gilt Monika – einfach für alles.