

---

**Molekulare Charakterisierung und  
entwicklungsspezifische Expression der  
Kernmembranproteine Emerin und MAN1  
im Tiermodell *Xenopus laevis***

---



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

vorgelegt von

Martin Alexander Gareiß

aus

Marktheidenfeld

Würzburg 2006

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde von September 2002 bis Juni 2006 am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie (Prof. Dr. Dr. U. Scheer) am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg durchgeführt.

Eingereicht am: .....

***Mitglieder der Promotionskommission:***

**Vorsitzender:** Prof. Dr. Martin J. Müller

**Erstgutachter:** Prof. Dr. Marie-Christine Dabauvalle

**Zweitgutachter:** Prof. Dr. Clemens Müller-Reible

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und von mir selbstständig durchgeführt und verfasst wurde.

Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Neben dem akademischen Grad „Diplom-Biologe Univ.“ habe ich keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 23. Oktober 2006 .....

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Als erstes danke ich Prof. Marie-Christine Dabauvalle für die Zuteilung dieses interessanten Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in ihrem Labor und insbesondere für die Betreuung meiner Arbeit.

Anschließend gilt mein aufrichtiger Dank Prof. Clemens Müller-Reible für die enge Zusammenarbeit mit dem Institut für Humangenetik und seine Bereitschaft, das Zweitgutachten zu erstellen.

Des Weiteren möchte ich den Geldgebern meinen Dank aussprechen: der DFG für die Finanzierung unseres Teilprojektes des Sonderforschungsbereichs SFB 581 und dem Muskeldystrophie-Netzwerk ‚MD-NET‘, das durch die pekuniäre Unterstützung die Verbrauchsmaterialien und Chemikalien finanzierte.

Herrn Prof. H. Zentgraf und seinen MitarbeiterInnen vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg danke ich für die Mithilfe an der Herstellung des spezifischen Xemerin-Antikörpers.

Großer Dank geht an alle Mitglieder des Lehrstuhls für Zell- und Entwicklungsbiologie für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre und die einträgliche Zusammenarbeit.

Dennoch möchte ich einige Personen besonders hervorheben:

Prof. U. Scheer, Prof. G. Krohne, PD R. Hock und Dr. M. Alsheimer möchte ich für die Bereitstellung einiger Antikörper und wissenschaftliche Diskussionen und Anregungen danken.

Dr. N. Wilken und Dr. T. Krüger für die Pflege der Lehrstuhlrechner und Hilfestellung bei Aufnahmen am confokalen Laser-Scanning Mikroskop.

Hannah, Rike, Sebastian, und Steffi sowie diversen DiplomandInnen möchte ich für die tolle Arbeitsatmosphäre in unserem Labor danken.

Reinhild und Natalia bin ich für die hervorragende Unterstützung bei der Zellkultur und Transfektionen dankbar.

Ellen und Claudia möchte ich namentlich für ihre dankenswerte Beihilfe bei den Sequenzierungen erwähnen.

Danke an Elina, Kathrin, Tanja und Johanna und allen technischen Mitarbeiterinnen für ihren helfenden Beistand bei zahlreichen Versuchen.

Abschließend möchte ich Barbara ganz herzlich für ihr Interesse an meiner Arbeit danken, dass sie jederzeit für mich da war, mir Halt gegeben und mich immer unterstützt hat.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>9</b>
	<b>SUMMARY .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>DIE KERNHÜLLE.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>DIE KERNLAMINA .....</b>	<b>15</b>
2.2.1	ZUSAMMENSETZUNG DER KERNLAMINA .....	15
2.2.2	AUFGABEN DER KERNLAMINE .....	17
2.2.3	ENTWICKLUNGSSPEZIFISCHE EXPRESSION VON LAMINEN .....	20
2.2.4	DIE LAMINA-ASSOZIIERTEN PROTEINE .....	21
2.2.4.1	Der Lamin B Rezeptor (LBR).....	23
2.2.4.2	Die LEM-Domänen-Proteine.....	24
2.2.4.2.1	Lamina assoziierten Polypeptide 1 und 2.....	24
2.2.4.2.2	Emerin.....	25
2.2.4.2.3	MAN1 .....	28
2.2.4.3	Weitere mit der inneren Kernmembran assoziierten Proteine .....	30
2.2.4.3.1	Nesprine-1, -2 und -3.....	30
2.2.4.3.2	SUN-Domänenproteine.....	30
2.2.4.3.3	BAF .....	31
2.2.4.3.4	GCL und Btf.....	32
<b>2.3</b>	<b>MUTATIONEN IN KERNHÜLLENPROTEINEN VERURSACHEN ERBKRAKHEITEN .....</b>	<b>32</b>
2.3.1.1	Die Emery—Dreifuss Muskeldystrophie .....	35
2.3.1.2	Das Buschke—Ollendorff-Syndrom .....	36
2.3.2	HYPOTHETISCHE MECHANISMEN DER LAMINOPATHIEN .....	37
<b>2.4</b>	<b>DAS MODELLSYSTEM XENOPUS LAEVIS .....</b>	<b>39</b>
<b>2.5</b>	<b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>BIOLOGISCHES MATERIAL .....</b>	<b>42</b>
3.1.1	VERSUCHSTIERE .....	42
3.1.2	BAKTERIENSTÄMME .....	42
3.1.3	ZELLINIEN .....	42
3.1.4	ANTIKÖRPER.....	42
3.1.4.1	Primär-Antikörper .....	42
3.1.4.2	Sekundär-Antikörper.....	44
<b>3.2</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITSMITTEL .....</b>	<b>45</b>
<b>3.3</b>	<b>EXPRESSIONSVEKTOREN.....</b>	<b>45</b>
3.3.1.1	pBluescript II SK (+), Stratagene, Heidelberg .....	45
3.3.1.2	pCMV-Myc, Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg.....	46
3.3.1.3	pCR2.1TOPO, Invitrogen, Karlsruhe .....	46
3.3.1.4	pDsRed1-C1, Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg .....	47
3.3.1.5	pEGFP-C1, Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg.....	47
3.3.1.6	pQC6xHis, zur Verfügung gestellt von Prof. Zentgraf, Heidelberg .....	48
3.3.1.7	pQE-30, -31, -32 Qiagen, Hilden .....	48
3.3.2	ENZYME .....	49
3.3.3	OLIGONUKLEOTIDE.....	49
3.3.4	GRÖßENSTANDARDS.....	49
3.3.5	KITS UND KITSBESTANDTEILE .....	49
<b>3.4</b>	<b>CHEMIKALIEN.....</b>	<b>49</b>
<b>3.5</b>	<b>GERÄTE.....</b>	<b>50</b>

<b>4</b>	<b>METHODEN</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>MIKROBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>51</b>
4.1.1	FLÜSSIGKULTUR VON BAKTERIEN	51
4.1.2	BESTIMMUNG DER BAKTERIENDICHTE EINER FLÜSSIGKULTUR DURCH PHOTOMETRISCHE MESSUNG	51
4.1.3	GLYZERINKULTUR	51
4.1.4	HERSTELLUNG VON LB-AGAR-SELEKTIONSPLATTEN	51
4.1.5	HERSTELLUNG VON CHEMISCH KOMPETENTEN BAKTERIEN	52
4.1.5.1	Bestimmung der erreichten Kompetenz	52
4.1.5.2	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien	52
<b>4.2</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>52</b>
4.2.1	ISOLIERUNG VON RNA AUS ZELLEN UND GEWEBEN	52
4.2.2	PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER KONZENTRATION VON NUKLEINSÄUREN	53
4.2.3	REVERSE TRANSKRIPTION	53
4.2.4	REALTIME-(QUANTITATIVE) PCR	53
4.2.4.1	Reaktionsansatz für Realtime-PCR	54
4.2.4.2	Standardbedingungen für Realtime-PCR	55
4.2.5	KLASSISCHE RT-PCR	55
4.2.6	VERMEHRUNG VON DNA-ABSCHNITTEN DURCH DIE PCR (POLYMERASE KETTENREAKTION)	55
4.2.7	PRIMER UND PRIMERDESIGN	56
4.2.8	KOLONIE-PCR	56
4.2.9	PUNKTMUTAGENESE	57
4.2.10	PRIMERDESIGN FÜR EINE PUNKTMUTAGENESE	57
4.2.11	PLASMID-DNA ISOLIERUNG	58
4.2.11.1	GTE-System (alkalische Lyse)	58
4.2.11.2	Nukleinsäure-Isolierung von Plasmid-DNA	59
4.2.11.2.1	MiniPrep	59
4.2.11.2.2	MidiPrep	59
4.2.12	RESTRIKTIONSVERDAU	59
4.2.13	VERDAU VON PCR-PRODUKTEN	59
4.2.14	BELADUNGSPUFFER FÜR DIE DNA-GELELEKTROPHORESE	60
4.2.15	AUFTRENNUNG VON DNA-FRAGMENTEN DURCH AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	60
4.2.16	NUKLEINSÄURE-ISOLIERUNG AUS AGAROSE-GELEN	61
4.2.17	AUFREINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN	61
4.2.18	FÄLLUNG VON NUKLEINSÄUREN	62
4.2.19	SEQUENZIERUNG VON NUKLEINSÄUREN	62
4.2.20	AT-KLONIERUNG VON PCR-FRAGMENTEN	63
4.2.21	KLONIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN	63
4.2.21.1	Gewinnung des Inserts	63
4.2.21.2	Dephosphorylierung des Vektors	64
4.2.21.3	Phosphorylierung von Primern	64
4.2.22	LIGATION	64
4.2.23	ISOLIERUNG VON RNA MIT PEQGOLD TRIFAST™	65
4.2.24	RNA-GELELEKTROPHORESE	65
4.2.25	ISOLIERUNG VON POLY-A-MRNA (POLYATTRACT® ISOLATION SYSTEM, PROMEGA)	66
4.2.26	IN-VITRO-TRANSKRIPTION/ MARKIERUNG VON RNA-SONDEN MIT DIGOXYGENIN	66
4.2.27	NORTHERN BLOTTING (TRANSFER VON RNA)	67
4.2.27.1	Spezifischer Nachweis einer RNA auf einem Northern Blot	68
4.2.27.2	Detektion über alkalische Phosphatase NBT/BCIP	68
4.2.27.3	Detektion über Peroxidase und ECL (Enhanced Chemi-Luminescence)	69
4.2.28	ISOLIERUNG VON ZELLKERNEN AUS KULTURZELLEN (A6-ZELLEN)	69
4.2.28.1	Mengenbestimmung von Partikeln mit der Neubauer-Zählkammer	70
<b>4.3</b>	<b>PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN</b>	<b>70</b>
4.3.1	IN VITRO EXPRESSION IM RETIKULOZYTENLYSAT	70
4.3.2	HERSTELLUNG UND AUFREINIGUNG VON FUSIONSPROTEINEN	71
4.3.2.1	Expression von C-terminalen Hexa-Histidin-Fusionsproteinen in Bakterien	71
4.3.2.2	Aufreinigung von Proteinen mit einem Histidin-Tag unter denaturierenden Bedingungen	71

4.3.2.2.1	Säulenvorbereitung .....	72
4.3.2.2.2	Aufschluss der Bakterien .....	72
4.3.2.2.3	Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose-Säule .....	72
4.3.2.3	Protokoll einer Proteinreinigung über „Histidin-Tag“ unter denaturierenden Bedingungen .....	72
4.3.2.3.1	Aufbereitung der Säulenmatrix .....	72
4.3.2.3.2	Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE.....	73
4.3.2.3.3	Bestimmung der Proteinausbeute .....	73
4.3.2.4	Aufreinigung unter nativen Bedingungen .....	73
4.3.2.4.1	Vorbereitung der Säule .....	73
4.3.2.4.2	Aufschluss der Bakterien.....	73
4.3.2.4.3	Reinigung über die Ni-NTA-Agarose-Säule .....	73
4.3.2.4.4	Probenvorbereitung für die SDS-PAGE und Bestimmung der Proteinausbeute: .....	74
4.3.3	RENATURIERUNG VON PROTEINEN DURCH DIALYSE.....	74
4.3.4	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION.....	74
4.3.4.1	Durch eine BSA-Konzentrationsreihe .....	74
4.3.4.2	Durch Extinktionsmessung ( $E_{280}$ ) .....	75
4.3.4.3	Bradford-Test.....	75
4.3.4.4	BCA-Protein-Assay.....	75
4.3.5	EXTRAKTION VON PROTEINEN AUS KULTURZELLEN.....	75
4.3.6	EXTRAKTION VON PROTEINEN AUS ZELLEN VON ORGANEN UND GEWEBEN .....	75
4.3.7	FÄLLUNG VON PROTEINEN .....	76
4.3.7.1	Proteinfällung mit Methanol und Chloroform .....	76
4.3.7.2	Fällung von Proteinen mit Aceton .....	76
4.3.8	EINDIMENSIONALE SDS-POLYACRYLAMID GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) NACH KORNBERG (1975) .....	76
4.3.9	ZWEIDIMENSIONALE GELELEKTROPHORESE.....	79
4.3.9.1	Erste Dimension: NEPHGE.....	79
4.3.9.1.1	Vorbereitung der Proben.....	80
4.3.9.2	Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamid-Flachgele .....	80
4.3.10	WESTERNBLOT (SEMIDRY-ELEKTROBLOT + WETBLOT).....	80
4.3.10.1	Semidry-Verfahren nach Towbin .....	80
4.3.10.2	Wetblot-Verfahren.....	82
4.3.11	FÄRBUNG VON SDS-GELN.....	83
4.3.11.1	Coomassie-Färbung .....	83
4.3.11.2	PageBlue™-Färbung .....	83
4.3.11.3	Silberfärbung von Proteingelen.....	83
4.3.11.4	Trocknen von SDS-Gelen .....	84
4.3.12	SPEZIFISCHER PROTEINNACHWEIS MIT ANTIKÖRPERN.....	84
4.3.13	DETEKTION ÜBER PEROXIDASE UND ECL (ENHANCED CHEMI-LUMINESCENCE) .....	84
4.3.14	ENTFERNEN VON GEBUNDENEN ANTIKÖRPERN (STRIPPEN).....	84
4.3.15	AFFINITÄTSREINIGUNG EINES ANTISERUMS .....	85
4.3.15.1	Affinitätsreinigung über Western Blot .....	85
4.3.15.1.1	Renaturierung eines Western Blots .....	85
4.3.15.2	Affinitätsreinigung über eine Matrix aus CNBr-Sepharose .....	86
<b>4.4</b>	<b>ZELLBIOLOGISCHE METHODEN .....</b>	<b>87</b>
4.4.1	INDIREKTE IMMUNLOKALISATION IN ZELLEN UND GEWEBEN .....	87
4.4.2	FIXIERUNG VON ZELLEN .....	87
4.4.2.1	Fixierung mit Formaldehyd—Triton .....	87
4.4.2.2	Fixierung mit Methanol—Aceton .....	88
4.4.3	INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ BEI KULTURZELLEN .....	88
4.4.4	INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ BEI GEFRIERSCHNITTEN UND PARAFFINEINBETTUNGEN .....	89
4.4.4.1	Gewinnung und Vorbereitung des Gewebes.....	89
4.4.4.2	Gefriersubstitution.....	89
4.4.4.3	Anfertigung von Gefrierschnitten .....	89
4.4.4.4	Anfertigung von Quetschpräparaten.....	89
4.4.5	INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ VON PARAFFINSCHNITTEN .....	90
4.4.5.1	Einbettung von Embryonen und Organen .....	90
4.4.5.2	Anfertigung von Paraffinschnitten .....	90
4.4.5.3	Indirekte Immunfluoreszenz auf Paraffinschnitten .....	90

<b>4.5</b>	<b>ARBEITEN MIT XENOPUS LAEVIS</b> .....	<b>91</b>
4.5.1	STIMULIERUNG DER EIREIFUNG .....	91
4.5.2	ISOLIERUNG VON <i>XENOPUS LAEVIS</i> HODEN .....	91
4.5.3	<i>IN VITRO</i> FERTILISATION .....	91
4.5.4	EMBRYONENHALTUNG .....	92
4.5.5	WHOLE-MOUNT <i>IN SITU</i> -HYBRIDISIERUNGEN VON EMBRYONEN .....	92
4.5.5.1	Fixierung der Embryonen .....	92
4.5.5.2	Hybridisierung .....	92
4.5.5.3	Nachweis gebundener Digoxigenin-markierter RNA-Sonden .....	93
4.5.5.4	Paraffineinbettung nach Whole-mount <i>in situ</i> -Hybridisierung .....	94
4.5.6	PRÄPARATION VON OOZYTEN .....	94
4.5.6.1	Manuelle Isolierung von Kern und Zytoplasma von Oozyten .....	95
4.5.6.2	Manuelle Isolierung von Kernhüllen .....	95
<b>4.6</b>	<b>ZELLKULTUR</b> .....	<b>95</b>
4.6.1	KULTIVIEREN VON ZELLEN .....	95
4.6.2	PASSAGIEREN ADHÄRENTER ZELLINIEN .....	96
4.6.3	EINFRIEREN VON KULTURZELLEN .....	96
4.6.4	AUFTAUEN VON KULTURZELLEN .....	97
4.6.5	TEST DER ZELLKULTUR AUF EINE KONTAMINATION DURCH MYCOPLASMEN .....	97
4.6.6	TRANSFEKTION VON KULTURZELLEN .....	98
4.6.6.1	Transfektion mit Effectene™ (Qiagen) .....	98
4.6.6.2	Transfektion mit Lipofectamine™ (Invitrogen) .....	98
4.6.6.3	Transfektion mit CaCl <sub>2</sub> .....	99
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>100</b>
<b>5.1</b>	<b>MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG DES INTEGRALEN TYP-II MEMBRANPROTEINS EMERIN VON XENOPUS LAEVIS</b> .....	<b>100</b>
5.1.1	SUCHE NACH ORTHOLOGEN DURCH BLAST-SUCHE IN DER EST-DATENBANK .....	100
5.1.1.1	Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der Xemerin1-cDNA .....	101
5.1.1.2	Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der Xemerin2-cDNA .....	102
5.1.2	SEQUENZANALYSEN DER NUKLEOTID- SOWIE DER AMINOSÄURESEQUENZEN .....	102
5.1.2.1	Identifikation putativer Phosphorylierungsstellen in den Sequenzen des <i>Xenopus laevis</i> Xemerins1 bzw. -2 und Vergleich mit dem humanen Emerin .....	104
5.1.2.2	Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von Xemerin1 und -2 mit dem Homologen Protein von <i>Xenopus tropicalis</i> .....	104
5.1.2.3	Vergleichende Untersuchungen von Emerin-Proteinen verschiedener Spezies .....	105
<b>5.2</b>	<b>UNTERSUCHUNG DER ZELLULÄREN LOKALISATION VON XEMERIN1 UND -2 MIT EGFP- UND MYC-FUSIONS-KONSTRUKTEN</b> .....	<b>107</b>
5.2.1	LICHTMIKROSKOPISCHE LOKALISATION DER EGFP -XEMERIN1- BZW. -2-FUSIONSPROTEINE .....	109
5.2.2	LICHTMIKROSKOPISCHE LOKALISATION DER C-MYC-XEMERIN1- BZW. -2-FUSIONSPROTEINE .....	109
5.2.3	KOLOKALISATION DER EGFP- BZW. C-MYC-XEMERIN1- BZW. -2 FUSIONSPROTEINE .....	111
<b>5.3</b>	<b>HERSTELLUNG SPEZIFISCHER XENOPUS EMERIN-ANTIKÖRPER</b> .....	<b>111</b>
5.3.1	BAKTERIELLE EXPRESSION UND AUFREINIGUNG DES REKOMBINANTEN ANTIGENS FÜR DIE IMMUNISIERUNG .....	112
5.3.1.1	Weitere Xemerin-Fusionsproteine für die bakterielle Expression und Aufreinigung .....	112
5.3.1.2	Expression der Fusionsproteine in induzierten Bakterienkulturen .....	113
5.3.2	ÜBERPRÜFUNG DER SPEZIFITÄT DES MONOKLONALEN XEMERIN-ANTIKÖRPERS DURCH IMMUNBLOT .....	117
<b>5.4</b>	<b>VERTEILUNGSMUSTER VON XEMERIN IN ORGANEN UND GEWEBEN ADULTER TIERE</b> .....	<b>119</b>
5.4.1	ANALYSE DURCH IMMUNBLOT .....	119
5.4.2	INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ-UNTERSUCHUNGEN .....	120
<b>5.5</b>	<b>VERTEILUNGSMUSTER VON XEMERIN IM OVAR</b> .....	<b>121</b>
<b>5.6</b>	<b>NACHWEISGRENZE DES ANTIKÖRPERS 59/7 IM IMMUNBLOT</b> .....	<b>123</b>
<b>5.7</b>	<b>IDENTIFIKATION DER XENOPUS EMERIN-FORMEN 1 UND 2 DURCH ZWEIDIMENSIONALE GELELEKTROPHORESE NEPHGE</b> .....	<b>124</b>
<b>5.8</b>	<b>EXPRESSION VON XENOPUS EMERIN WÄHREND DER FRÜHEN EMBRYOGENESE</b> .....	<b>126</b>
<b>5.9</b>	<b>ANALYSE DER EMBRYONALEN XEMERIN-FORMEN 1 UND 2 DURCH ZWEIDIMENSIONALE GELELEKTROPHORESE NEPHGE</b> .....	<b>128</b>

<b>5.10</b>	<b>RT-PCR-ANALYSEN WEISEN AKTIVIERUNG DER GENTRANSKRIPTION NACH.....</b>	<b>129</b>
<b>5.11</b>	<b>QUANTIFIZIERUNG DER BANDENINTENSITÄT DER RT-PCR PRODUKTE .....</b>	<b>131</b>
<b>5.12</b>	<b>QUANTIFIZIERUNG DER VORHANDENEN cDNA-MENGE DURCH QUANTITATIVE REALTIME RT-PCR .....</b>	<b>132</b>
<b>5.13</b>	<b>UNTERSUCHUNG DER GEWEBESPEZIFISCHE EXPRESSION VON XEMERIN DURCH WHOLE-MOUNT IN SITU HYBRIDISIERUNG .....</b>	<b>133</b>
<b>5.14</b>	<b>PARAFFIN-DÜNNSCHNITTE VON EMBRYONEN NACH WHOLE-MOUNT IN SITU HYBRIDISIERUNG</b>	<b>135</b>
<b>5.15</b>	<b>UNTERSUCHUNG DER GEWEBESPEZIFISCHE EXPRESSION VON XEMERIN DURCH RT-PCR-ANALYSEN .....</b>	<b>136</b>
<b>5.16</b>	<b>INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ VON PARAFFIN-DÜNNSCHNITTEN.....</b>	<b>137</b>
<b>5.17</b>	<b>UNTERSUCHUNG VON XENOPUS LAEVIS MAN1 (XMAN1).....</b>	<b>139</b>
5.17.1	SUCHE NACH DEM HOMOLOGEN PROTEIN DURCH BLAST-SUCHE IN DER EST-DATENBANK.....	139
5.17.2	NUKLEOTIDSEQUENZ UND ABGELEITETE AMINOSÄURESEQUENZ VON XENOPUS MAN1 .....	140
5.17.3	SEQUENZANALYSEN DER NUKLEOTID- SOWIE DER AMINOSÄURESEQUENZEN .....	141
5.17.3.1	Vergleichende Untersuchungen von MAN1-Proteinen verschiedener Spezies .....	143
<b>5.18</b>	<b>UNTERSUCHUNG DER ZELLULÄREN LOKALISATION VON XMAN1 DURCH EGFP- UND MYC-FUSIONSKONSTRUKTEN .....</b>	<b>144</b>
5.18.1	LICHTMIKROSKOPISCHE LOKALISATION DES EGFP-XMAN1-FUSIONSPROTEINS .....	145
5.18.2	LICHTMIKROSKOPISCHE LOKALISATION DES C-MYC-XMAN1-FUSIONSPROTEINS.....	145
<b>5.19</b>	<b>HERSTELLUNG SPEZIFISCHER XENOPUS MAN1-ANTIKÖRPER .....</b>	<b>147</b>
5.19.1	BAKTERIELLE EXPRESSION UND AUFREINIGUNG DES REKOMBINANTEN ANTIGENS FÜR DIE IMMUNISIERUNG	147
5.19.1.1	Weitere XMAN1-Fusionsproteine für die bakterielle Expression und Aufreinigung .....	148
5.19.1.2	Expression der Fusionsproteine in induzierten Bakterienkulturen.....	148
5.19.2	ÜBERPRÜFUNG DER SPEZIFITÄT DES POLYKLONALEN XMAN1-ANTIKÖRPERS .....	151
<b>5.20</b>	<b>UNTERSUCHUNG VON XENOPUS LAEVIS EMERIN-MAN1-INTERAKTIONEN.....</b>	<b>153</b>
5.20.1	IN VITRO SYNTHESE VON XENOPUS LAMIN A, EMERIN UND MAN1.....	153
5.20.1.1	Co-Immunpräzipitations-Analysen.....	154
<b>6</b>	<b><u>DISKUSSION .....</u></b>	<b><u>157</u></b>
<b>6.1</b>	<b>IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON EMERIN DES AFRIKANISCHEN KRALLenfROSCHS XENOPUS LAEVIS .....</b>	<b>157</b>
<b>6.2</b>	<b>XENOPUS LAEVIS CODIERT FÜR ZWEI EMERIN-FORMEN .....</b>	<b>158</b>
<b>6.3</b>	<b>XEMERIN-EXPRESSIONSMUSTER WÄHREND DER EMBRYONALENTWICKLUNG VON XENOPUS LAEVIS.....</b>	<b>160</b>
<b>6.4</b>	<b>ÜBERLAPPENDE FUNKTIONEN VON XEMERIN UND XMAN1 WÄHREND DER FRÜHEN EMBRYOGENESE ..</b>	<b>163</b>
<b>6.5</b>	<b>GEMEINSAME AUFGABEN VON XEMERIN UND XMAN1 BEI DER GENREGULATION.....</b>	<b>164</b>
<b>6.6</b>	<b>ABSCHLIEßENDE ANMERKUNGEN UND AUSBLICK.....</b>	<b>166</b>
<b>7</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS .....</u></b>	<b><u>168</u></b>
<b>8</b>	<b><u>ANHANG .....</u></b>	<b><u>177</u></b>
<b>8.1</b>	<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>177</b>
<b>8.2</b>	<b>OLIGONUKLEOTIDE .....</b>	<b>180</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>.....</b>	<b>185</b>
<b>PUBLIKATIONS LISTE</b>	<b>.....</b>	<b>186</b>

### 1 Zusammenfassung

Mutationen im humanen Emerin-Gen (*EMD*) verursachen beim Menschen eine seltene Form einer angeborenen Muskelschwäche, die X-gebundene Emery-Dreifuss Muskeldystrophie (EDMD1; OMIM 310300). Der klinische Phänotyp dieser genetischen Störung manifestiert sich in der zweiten und dritten Lebensdekade des Patienten durch Verkürzungen der Nacken-, Ellenbogen- und Achillessehnen, durch progressiven Muskelschwund am Oberkörper sowie durch Störung der Reizweiterleitung und eine Kardiomyopathie, die sehr oft zu einem plötzlichen Herzstillstand führt. Zwar wurden die Funktionen dieses ubiquitären Kernmembranproteins bislang intensiv erforscht, allerdings blieben die krankheitsverursachenden Mechanismen, die für den späten Ausbruch der gewebespezifischen Erkrankung verantwortlich sind, noch weitestgehend unverstanden.

Um Erkenntnisse über die pathologische(n) Funktion(en) des integralen Membranproteins Emerin gewinnen zu können, wurde in dieser Arbeit dessen spatio-temporäre Transkriptions- und Expressionsmuster während der frühen Embryonalentwicklung von Vertebraten im Modellsystem *Xenopus laevis* charakterisiert.

Durch EST-Datenbankanalysen konnten im pseudotetraploiden Organismus *Xenopus laevis* zwei Emerin-Gene identifiziert werden, die als Xemerin1 und Xemerin2 bezeichnet wurden. Im Vergleich zu dem orthologen humanen und murinen Emerin wiesen die *Xenopus* Emerin-Formen Gemeinsamkeiten, allerdings auch Unterschiede auf. Strukturanalysen zeigten, dass die 180 Aminosäuren langen Polypeptide eine konservierte LEM-Domäne im N-Terminus sowie einen einzelnen hydrophoben Transmembranbereich im C-Terminus hatten. Im Unterschied zu dem längeren Säuger-Emerin (254 Reste bei *Homo sapiens*, 259 Reste bei *Mus musculus*) konnte allerdings kein Kernlokalisierungssignal und auch kein serinreicher Sequenzbereich festgestellt werden. Ein Vergleich putativer Phosphorylierungsstellen ergab jedoch, dass Xemerin1 drei äquivalente Stellen wie das humane Emerin aufwies.

Durch Herstellung spezifischer monoklonaler Antikörper und rekombinanter Fusionsproteine wurde die subzelluläre und gewebespezifische Lokalisation der Xemerin-Proteine untersucht. Ähnlich wie für Säuger-Emerin konnte durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie und Immunblot eindeutig gezeigt werden, dass Xemerin1 und -2 integrale Proteine der inneren Kernmembran sind und ubiquitär in differenzierten Zellen exprimiert werden. Interessanterweise war in Oozyten weder in der Immunfluoreszenz noch im Immunblot Xemerin nachweisbar.

Mit dem zweidimensionalen Gelelektrophorese-Verfahren NEPHGE konnte gezeigt werden, dass der von uns hergestellte monoklonale Antikörper 59/7 beide Xemerin-Formen erkannte und die Proteine durch unterschiedliche molekulare Massen und isoelektrische Punkte

voneinander zu trennen waren. Xemerin2 wies in 5-tage alten Embryonen einen höheren isoelektrischen Punkt auf als in adulten somatischen Kulturzellen.

Durch Immunoblotting embryonaler Proteine aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien konnte gezeigt werden, dass Xemerin1 und -2 im Laufe der Embryogenese von *Xenopus laevis* erstmals im Entwicklungsstadium 43 (nach Nieuwkoop and Faber, 1975) exprimiert werden. In diesem Kontext sollte erwähnt werden, dass *Xenopus* A-Typ Lamine hier bereits ab dem Entwicklungsstadium 28 nachgewiesen wurden, obwohl in früheren Untersuchungen von einer späteren Expression (zwischen Stadium 40-50) berichtet wurde. Unerwarteterweise konnte durch RT-PCR-Analysen eine Aktivität der Xemerin-Gene während der gesamten Embryogenese belegt werden, da die entsprechenden mRNA-Transkripte in allen untersuchten Entwicklungsstadien nachgewiesen wurden. Northernblot- und Sequenzanalysen der Xemerin-mRNA zeigten außerordentlich große untranslatierte Bereiche mit snRNP-Bindungsmotiven. Durch zwei voneinander unabhängige Analyseverfahren (Bandenquantifizierung und quantitative Realtime-PCR) wurde festgestellt, dass die Xemerin-Genaktivität ab dem Stadium 30 deutlich zunahm. Äußerst interessant war in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass exakt zu diesem Zeitpunkt die Aktivität des XMAN1-Gens, einem weiteren Protein der inneren Kernmembran, signifikant herunterreguliert wurde.

Whole-mount *in situ* Hybridisierungsversuche zeigten einen Xemerin-Expressionschwerpunkt in neuro-ektodermalen Geweben von Tadpole-Embryonen, wie dies zeitgleich von zwei anderen Arbeitsgruppen auch von XMAN1 (auch SANE genannt) berichtet wurde (Osada et al., 2003; Raju et al., 2003). Durch indirekte immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen longitudinaler Embryodünnschnitte konnte ein deckungsgleiches Xemerin-Translationsmuster nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde angenommen, dass Xemerin und XMAN1 überlappende Funktionen aufweisen könnten. Durch die Herstellung rekombinanter XMAN1-Fusionproteine konnte zunächst gezeigt werden, dass XMAN1 eine identische subzelluläre Verteilung wie Xemerin aufwies. Anschließend konnten *in vitro* Bindungsassays eine direkte Wechselwirkung von XMAN1 mit beiden Xemerin-Formen sowie mit *Xenopus* Lamin A nachweisen. Leider konnte – trotz intensiver Bemühungen – bis heute kein Antikörper gegen XMAN1 generiert werden. Es bleibt daher ungeklärt, ob XMAN1 auch *in vivo* mit Xemerin eine überlappende Funktion durch die Übergabe des Staffelstabes während der Embryogenese hat.

Trotzdem konnte diese Arbeit durch die Charakterisierung von *Xenopus* Emerin die Grundlagen für weitere intensive Forschungen legen. Diese Arbeit zeigt eindeutig, dass das Modellsystem *Xenopus laevis* durchaus mit dem Säugermodell Maus konkurrenzfähig ist, um die krankheitsverursachende Mechanismen der Emery-Dreifuss Muskeldystrophie aufzuklären.

### Summary

Mutations in the human emerin gene *EMD* cause a rare form of an inherited muscle dysfunction of striated muscle, named Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD1; OMIM 310300). The clinical phenotype of this genetic perturbation is manifested in 2<sup>nd</sup>-3<sup>rd</sup> decade by contraction of the cervical, elbow and Achilles tendons, by progressive muscle wasting and disturbance of the conduction system and cardiomyopathy, often leading to sudden death. Extensive investigations were made on the functions of this ubiquitous nuclear membrane protein, but the disease causing mechanisms remain obscure leading to the late onset of this tissue specific disease.

To allure insights of the pathological function(s) of emerin this work examines the spatio-temporal transcription and expression patterns of emerin during development of the vertebrate model *Xenopus laevis*.

Sequence analysis of EST-databases identified two emerin genes in the pseudo-tetraploid organism *Xenopus laevis*, Xemerin1 and Xemerin2, respectively. In comparison to the human and murine orthologues *Xenopus* emerins exhibit both similarities and differences. Structural analyses revealed an N-terminal conserved LEM-domain in the C-terminus and a unique hydrophobic transmembrane domain in the carboxy tail. Unlike the extended mammalian emerin (*Homo sapiens* 254 residues, *Mus musculus* 259 residues) neither a nucleus localization signal nor a serinerich region could be detected. However, comparison of the putative phosphorylation sites showed three equivalent sites as for the human emerin.

Synthesis of specific monoclonal antibodies and recombinant fusion proteins elucidate the subcellular and tissue-specific localization of Xemerins. Similar to mammalian emerins immunofluorescence microscopy and immunoblotting showed clearly that both Xemerin1 and Xemerin2 are integral nuclear membrane proteins expressing ubiquitously in differentiated cells. Intriguingly, in oocytes Xemerin was undetectable by immunofluorescence and immunoblotting, respectively.

Two-dimensional gel electrophoresis NEPHGE proved that our self-made monoclonal antibody 59/7 recognized both Xemerins highlighting two different molecular masses and isoelectric points. Interestingly, Xemerin2 exhibits an increased isoelectric point in 5-days old larvae than in adult somatic culture cells.

Immunoblotting of embryonic proteins derived from different developmental stages showed that Xemerin1 and -2 are expressed in stage 43 (Nieuwkoop and Faber, 1975) during *Xenopus* embryogenesis for the first time. In this context, it is noteworthy that *Xenopus* A-type lamins – in contrast to previous reports – are already detectable in stage 28. Unexpectedly, RT-PCR analyses proved activity of the Xemerin genes during entire embryogenesis in all stages examined yet. Northern-blotting and sequence analyses of the Xemerin mRNA revealed exceeding untranslated regions with snRNP binding motives. Two independent techniques (band-quantification and quantitative real-time-PCR) bared a significantly increased activity of the Xemerin-genes upon stage 30. Outstanding interest provided the awareness, that exactly at this moment the activity of XMAN1, another inner nuclear membrane protein, was significantly down regulated.

Whole mount *in situ* hybridizations exhibited stressed Xemerin expression in neuro-ectodermal tadpole tissues, as simultaneously reported for XMAN1 (also known as SANE) by to other groups (Osada et al., 2003; Raju et al., 2003). Congruent expression patterns of Xemerin proteins were provided by indirect immunofluorescence of embryonic thin-sections.

These results corroborate the theory that XMAN1 and Xemerin could have overlapping functions. At first, recombinant fusion proteins showed an identical subcellular distribution of XMAN1 in comparison with Xemerin. Hence, *in vitro* binding assays proved direct interaction between Xemerins and XMAN1 as well as with *Xenopus* A-type lamins. Unfortunately, there is no functional XMAN1 antibody available up to now. Thus, it remains unclear if XMAN1 has overlapping functions with Xemerins during embryogenesis *in vivo*.

Nevertheless, by characterizing *Xenopus* emerin this work displayed fundamental features for further studies. This opus definitely showed that the model system *Xenopus laevis* is competitive to the mammalian model 'mouse' elucidating the disease causing mechanisms of Emery-Dreifuss muscular dystrophy.

## 2 Einleitung

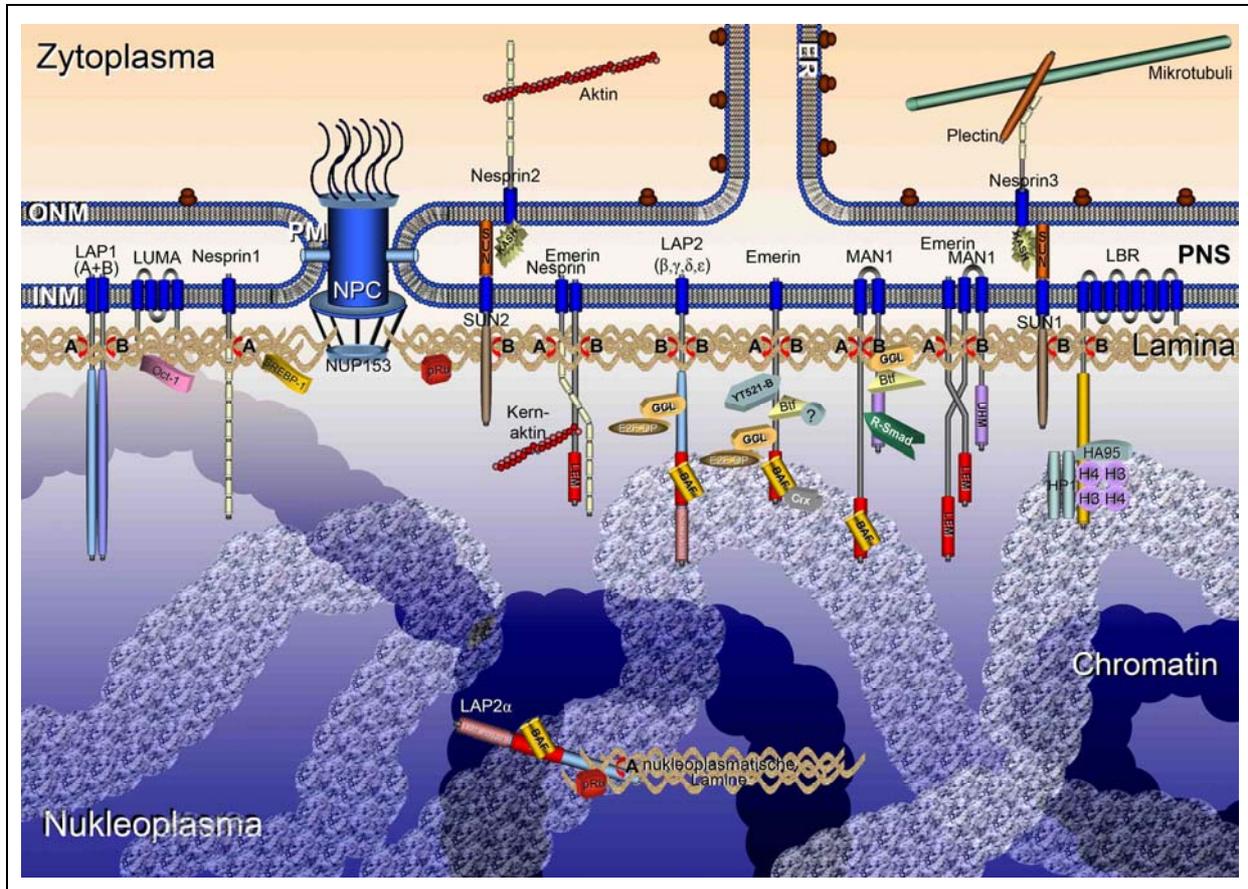
### 2.1 Die Kernhülle

In eukaryontischen Zellen läuft der Prozess der DNA-Transkription im Unterschied zu Prokaryonten räumlich getrennt von der Translation ab. Die Kernhülle dient dabei als Barriere zwischen dem Kerninhalt und dem Zytoplasma. Im Kern, der auch Nukleus genannt wird, befindet sich die genetische Information des Organismus in Form der Desoxyribonukleinsäure (DNA). Die DNA ist mit einer Reihe von Proteinen assoziiert, welche das Chromatin bilden. Das Chromatin weist unterschiedliche Kondensationszustände auf (Horn and Peterson, 2002). Neben der Speicherfunktion von Chromosomen erfüllt der Kern zahlreiche Aufgaben, zu denen die DNA-Replikation und –Transkription, die mRNA-Prozessierung und Ribosomenbiogenese zählen. Im Zytoplasma dagegen erfüllen vielfältigste Zellorganellen, wie zum Beispiel das Endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, die Mitochondrien oder die Ribosomen, essentielle Funktionen.

Die Kernhülle kann in drei charakteristische Membranbereiche aufgeteilt werden, die aus einer Lipiddoppelmembranschicht aufgebaut sind (siehe Abbildung 2-1: (a) die äußere Kernmembran steht mit dem Zytoplasma in direkten Kontakt. Sie bildet mit dem rauen ER eine kontinuierliche Verbindung und hat - biochemisch gesehen - eine ähnliche Zusammensetzung. Aus diesem Grund können des Öfteren in diesem Membranbereich Ribosomen eingelagert sein. Die Kernhülle wird durch Kernporenkomplexe durchbrochen. An diesen Stellen befindet sich (b) die Porenmembran. In diesem Membranbereich sind die Kernporenkomplexe in der Kernhülle verankert und die äußere Lipiddoppelschicht mit der inneren Kernmembran verbunden. Es wird geschätzt, dass sich solch ein Kernporenkomplex aus ungefähr 50 verschiedenen Proteinen zusammensetzt (Cronshaw et al., 2002), die einen oktogonalen Porenkanal von etwa 9 nm Durchmesser ausbilden. Durch die hochmolekularen Kernporenkomplexe (125 MDa) findet ein Austausch zwischen dem Nukleoplasma und dem Zytoplasma statt. Mit wenigen Ausnahmen können Moleküle, die kleiner oder die gleiche Größe wie der Porendurchmesser haben, ungehindert diffundieren. Der Import oder Export von Molekülen, die eine größere Molekulare Masse als 60 kDa aufweisen, läuft hingegen im Allgemeinen aktiv ab (Nigg, 1997; Soullam and Worman, 1995). (c) Der dritte Membranbereich steht mit dem Chromatin in Verbindung und wird als innere Kernmembran bezeichnet. Dieser unterscheidet sich grundsätzlich von den beiden anderen Membranbereichen, indem er spezifische integrale Membranproteine mit den unterschiedlichsten Aufgaben und Funktionen enthält. Die meisten dieser Proteine können mit Chromatin und Laminen, die ein dichtes proteinöses Netzwerk unterhalb der INM bilden, eine Verbindung eingehen. Lamine zählen zur Familie der Typ V Intermediärfilamente und

## Einleitung

sind eng mit den zytoplasmatischen Intermediärfilamentproteinen verwandt. Deswegen wird diese Struktur zusammen mit den Proteinen, die mit dieser Laminschicht verbunden sind, als „Lamina“ bezeichnet.



**Abbildung 2-1:** Übersicht der Organisation der Kernhülle (Foisner, 2001; Roux and Burke, 2006). Der schematische Querschnitt zeigt die innere und äußere Kernmembran (INM und ONM) sowie die Porenmembran (PM), einen Kernporenkomplex (NPC) und einige ausgewählte Proteinbestandteile. Dazu gehören die Lamina, die sich aus A- und B-Typ Laminoligomeren zusammensetzt, und Proteine, die mit den Kernlaminen assoziiert sind. Als INM-Proteine sind die Lamina-assoziierten Proteine 1 und 2 (LAP1 und 2), LUMA, Nesprin1, SUN1 und -2, Emerin, MAN1, Young Arrest (YA) und der Lamin B Rezeptor (LBR) dargestellt. SUN1 und -2 interagieren mit den ONM-Proteinen Nesprin2 bzw. Nesprin3 im perinukleären Spalt (PNS), die wiederum mit Zytoskelettelementen (Aktin oder Mikrotubuli [über Plectin]) assoziiert sind. Der PNS bildet mit dem Lumen des mit Ribosomen besetzten Endoplasmatischen Retikulums (ER) ein Kontinuum. Diverse lösliche Proteine interagieren mit der Lamina oder den nukleoplasmatischen Domänen einiger INM-Proteine und stellen dadurch die Verbindung gewisser Chromatinbereiche an die Kernhülle her. Zu diesen Chromatinlinker-Proteinen gehören der Barrier-to Autointegration Factor (BAF) und das Heterochromatinprotein 1 (HP1). Andere Proteine binden direkt oder indirekt an die Lamina oder an Lamin-assoziierte Proteine (SREBP-1= ‚Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1‘; pRb= ‚Retinoblastoma Protein‘; E2F-DP-Komplex; GCL= ‚Germ Cell-less‘; YT521-B= Spleißfaktor; Btf= ‚Bcl2-assoziiierter Transkriptionsfaktor‘; R-SMAD= ‚Rezeptor-vermittelte SMAD‘; HA95= homolog zu AKAP95 [= ‚A-kinase anchoring protein 95‘]; H3/H4= ‚Histonprotein 3/4‘). Außerdem sind die mögliche Assoziation zwischen Laminen und dem NPC-Protein NUP153, sowie Interphase-Chromosomen dargestellt. Weitere Erläuterungen sind im Text zu finden.

## 2.2 Die Kernlamina

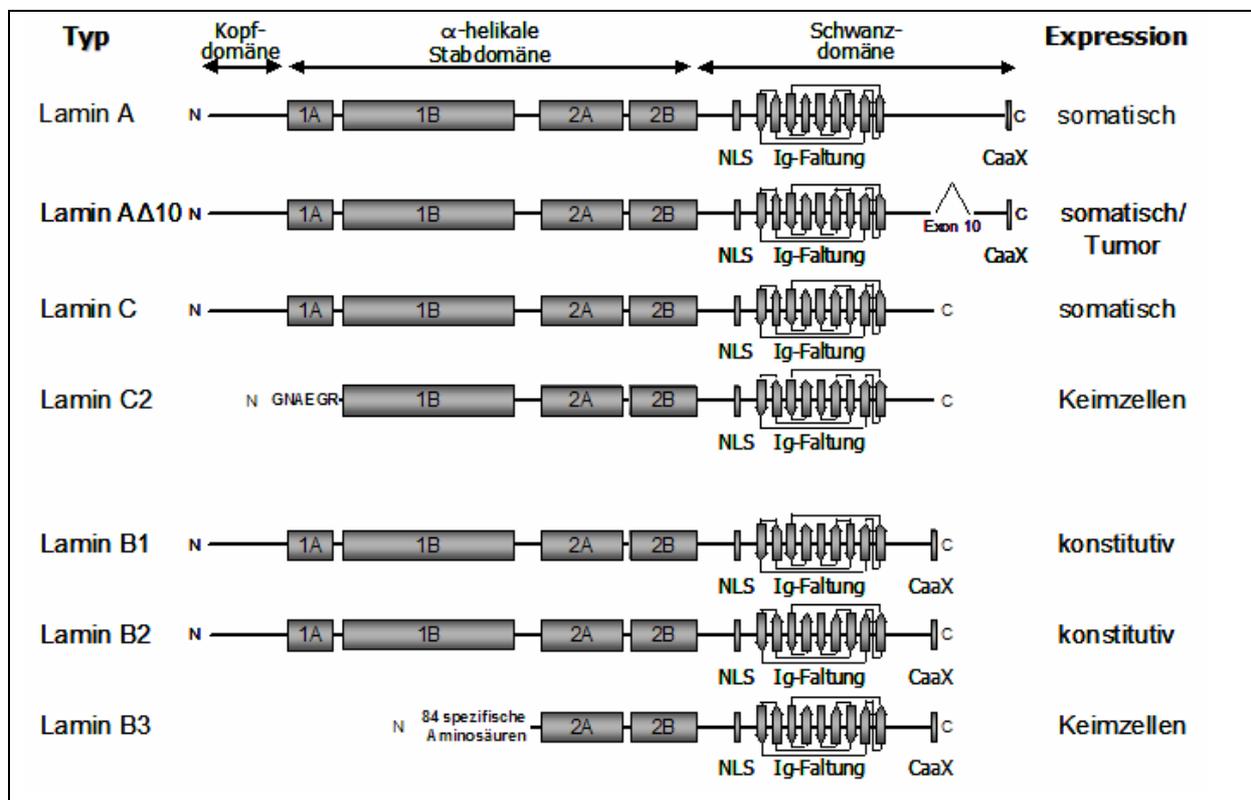
### 2.2.1 Zusammensetzung der Kernlamina

Es gibt zwei Subklassen von Kernlaminen, die A-Typ und die B-Typ Lamine. Sie werden aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften und ihres Verhaltens während der Zellteilung unterschieden (Gruenbaum et al., 2003; Gruenbaum et al., 2005):

- A-Typ Lamine haben einen neutralen isoelektrischen Punkt und verteilen sich während der Mitose als lösliche Proteine im Zytoplasma. Bei Säugern gibt es vier A-Typ Lamin-Isoformen (Lamin A, C,  $\Delta 10$  und C2), die durch ein einziges Gen (*LMNA*) kodiert werden und durch alternative Spleißprozesse entstehen. A-Typ Lamine werden gewebe- und entwicklungspezifisch exprimiert. Das Lamin C2 kommt exklusiv in Spermien vor.

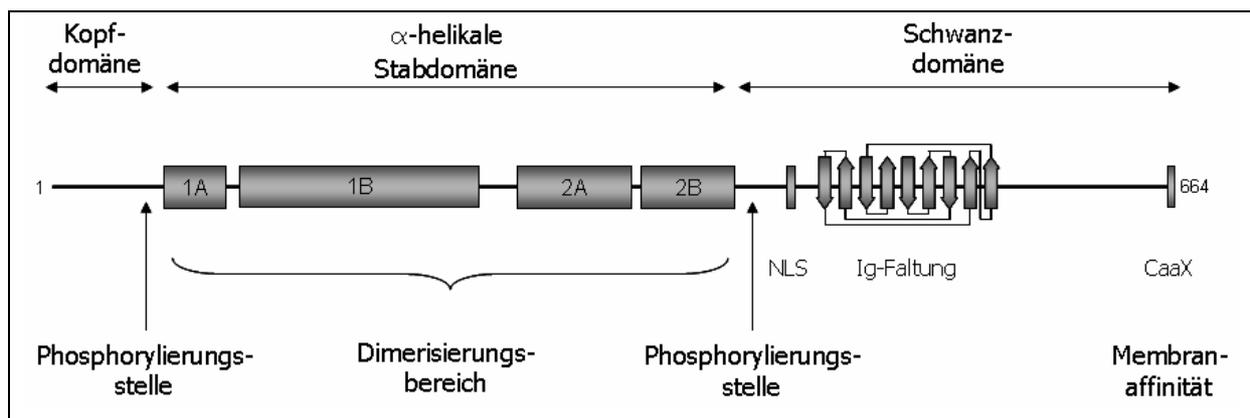
- B-Typ Lamine besitzen dagegen einen sauren isoelektrischen Punkt und bleiben während der Mitose an Membranvesikel angelagert. B-Typ Lamine werden bei Säugern von zwei Genen, *LMNB1* und *LMNB2*, kodiert. Das Lamin B2-Gen erzeugt zwei Spleiß-Isoformen, Lamin B2 und das Keimbahn-spezifische Lamin B3. B-Typ Lamine werden in allen Zellen bereits in der frühen Embryonalentwicklung exprimiert und sind für die Überlebensfähigkeit der Zelle und des Organismus essenziell.

Der überwiegende Anteil der Kernlamine ist in der Kernperipherie, jedoch ist auch eine kleinere Menge im Kerninneren zu finden.



**Abbildung 2-2:** Bekannte Lamin-Isoformen von Säugern (Moir and Spann, 2001).

Lamine sind wie Intermediärfilamentproteine aus drei strukturellen und funktionellen Bereichen aufgebaut (Abbildung 2-2): eine kurze amino-terminale Kopfdomäne, eine  $\alpha$ -helikale Stabdomäne, deren Hauptmerkmal eine tandemartig wiederholte Abfolge von sieben Aminosäuren darstellt und eine globuläre carboxy-terminale Schwanzdomäne. Im Unterschied zu den zytoplasmatischen Intermediärfilamentproteinen weisen die Lamine jedoch ein Kernlokalisierungssignal (NLS) auf, durch das sie in den Kern dirigiert werden. Die meisten Lamine besitzen in der C-Terminalen Domäne ein so genanntes CxxM-Motiv (Cystein - zwei  $\chi$ -beliebige Aminosäuren - Methionin), das einer Isoprenylierung unterzogen wird. Dadurch wird die Anlagerung der Lamine an hydrophobe Lipidmembranen ermöglicht. Die  $\alpha$ -helikale Stabdomäne ist bei allen Intermediärfilamenten ähnlich, enthält vier Helices (1A, 1B, 2A und 2B) und ist für die Polymerisation der Laminfilamente essenziell. Diese helikalen Bereiche werden durch stark konservierte Linkerregionen L1, L12 und L2 voneinander getrennt. Die Stabdomäne ist essenziell für die Zusammenlagerung der Lamine und wird von Phosphorylierungsstellen, den SP/TP-Motiven (Serin, Prolin / Threonin, Prolin) flankiert, die während der Mitose durch die p34<sup>cdc2</sup>-Kinase phosphoryliert werden (Abbildung 2-3). Durch das Anhängen der Phosphatgruppen erfahren die Lamine eine Konformationsänderung, wodurch die Intermediärfilamente depolymerisieren und die Kernhülle zerfällt. Lamine lagern sich nach der Translation in mehreren Schritten zusammen: Zunächst bilden zwei Laminmoleküle Homodimere. Danach ordnen sich diese Dimere longitudinal an, wodurch eine „Kopf-zu-Schwanz“-Anordnung entsteht. Diese antiparallele Anordnung endet schließlich in der Ausbildung eines filamentösen Netzwerks (Stuurman et al., 1998).



**Abbildung 2-3:** Schemazeichnung eines Lamin-Moleküls; verändert nach (Krohne, 1998)

Bislang konnten keine Lamin-Gene bei Pflanzen, wie z.B. im Reis *Oryza* oder bei *Arabidopsis thaliana* sowie bei einzelligen Eukaryonten, wie der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* oder der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* gefunden werden. Es wird daher vermutet, dass sich die Lamine während der Evolution beim Übergang von einer

„geschlossenen“ zur „offenen“ Mitose entwickelt haben. Hefen durchlaufen eine geschlossene Mitose, bei der sich die Mitosespindel im Kern aufbaut und die Kernhülle erhalten bleibt. Im Gegensatz dazu besitzen Vertebraten eine offene Mitose, bei der die Kernhülle in den meisten Fällen aufgelöst wird. Die Kernhülle beginnt beim Übergang von der Prophase in die Prometaphase zu zerfallen und wird während der späten Anaphase / frühen Telophase wieder neu gebildet. Der Nematode *Caenorhabditis elegans* und die synzytischen Embryonen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* weisen eine Zwischenstufe der geschlossenen Form der Hefen und der offenen Mitose bei Vertebraten auf.

Das *C.elegans* – Genom enthält nur ein einziges B-Typ Lamin-Gen (*lmn-1*), das für ein einzelnes Protein, das Ce-Lamin kodiert (Liu et al., 2000). Bei *Drosophila* existieren dagegen zwei Lamin-Gene: ein B-Typ Lamin, *Dm0* und ein A-Typ Lamin, *Lamin C* (Bossie and Sanders, 1993; Riemer et al., 1995; Smith et al., 1987). Wie bereits erwähnt, besitzen Säuger drei, andere Vertebraten vier verschiedene Lamin-Gene. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Zahl der Lamin-Gene, und ihrer Spleiß-Isoformen, sowie die Komplexität der Kernhülle, einschließlich der Anzahl der Kernmembranproteine, und die Zeitdauer der Auf- und Abbauprozesse während der Evolution stetig zunahm (Gruenbaum et al., 2003).

### 2.2.2 Aufgaben der Kernlamine

Mehr als 20 Jahre wurde angenommen, dass die Kernlamina ausschließlich eine mechanische Stützfunktion erfüllt. Ihre filamentöse Vernetzung trägt dazu bei, dass die Form und die Stabilität des Kerns erhalten werden. Neuere Studien ergaben, dass die Lamine darüber hinaus eine Reihe weiterer wichtiger Aufgaben übernehmen:

(I) Lamine sind am Prozess des Kernhüllen Ab- und Aufbaus während der Zellteilung beteiligt (Dabauvalle and Scheer, 1991; Gruenbaum et al., 2003; Lopez-Soler et al., 2001; Newport et al., 1990). Während der Zellteilung werden die Phosphorylierungszustände der Lamine durch eine Zellzyklus-abhängige p34<sup>cdc2</sup>-Kinase verändert, wodurch die Lamina destabilisiert wird, und der Zerfall der Kernhülle im Übergang von der Prophase zur Prometaphase beginnt (Moir et al., 2000b). In dem Zeitraum, in denen die Tochterchromosomen voneinander getrennt werden, sind die Lamine recht mobil. Wie mit FRAP-(„Fluorescence Recovery After Photobleaching“)-Experimenten gezeigt werden konnten, weisen die A- und B-Typ Laminmoleküle während der Telophase und der frühen G1-Phase Halbwertszeiten von etwa 30 Minuten auf. Nach der Kernhüllenneubildung hingegen, wenn sich die Lamine wieder zu einem dichten Netzwerk zusammengelagert haben, sind die Laminpolymere nahezu immobil, wie FRAP-Halbwertszeiten von ungefähr 3 Stunden belegen (Moir et al., 2000c). Durch Immunodepletions- und Mikroinjektions-

Experimente von dominant-negativen Laminen, denen die Aminoternale Kopfdomäne fehlte, konnte durch eine Verhinderung des Kernhüllenabbaus nachgewiesen werden, dass Lamine bei dem Zerfall der Kernlamina essenziell sind (Lopez-Soler et al., 2001; Spann et al., 1997).

(II) Eine intakte Lamina ist ebenfalls für eine korrekte postmitotische Reorganisation der Kernporenkomplexe notwendig. In *Xenopus* Eiextrakten konnte eine direkte Interaktion mit dem Porenmembranprotein NUP153 nachgewiesen werden (Smythe et al., 2000). NUP153 befindet sich auf der Kernseite der NPCs und der Einbau von NUP153 erfolgt zur selben Zeit wie die Zusammenlagerung der Lamina (Stuurman et al., 1998). Wird das Laminassembly inhibiert, fehlt in den Porenkomplexen NUP153 (Smythe et al., 2000). Auch in humanen und *C.elegans* Zellen konnte eine fehlerhafte NPC-Organisation beobachtet werden, wenn die Lamin-Expression in diesen Zellen inhibiert ist (Liu et al., 2000; Schirmer and Gerace, 2004). Auch bei der Fruchtfliege *Drosophila* inhibierte eine reduzierte B-Typ Lamin-Menge (Lamin Dm0) die Verteilung von NPCs und induzierte die Bildung von „Annulate Lamellae“, zytoplasmatischen Membranstapel, die Kernporen-ähnliche Strukturen aufweisen (Lenz-Bohme et al., 1997).

(III) Lamine sind bei der Organisation der Chromatinstruktur maßgeblich beteiligt. Insbesondere kondensiertes Chromatin mit niedriger Transkriptionsaktivität, wie z.B. interkalares Heterochromatin sowie Zentromer- und Telomerbereiche von Chromosomen, werden in unmittelbarer Nähe der Lamina vorgefunden (Marshall and Sedat, 1999). Ebenfalls steht das inaktive X-Chromosom in weiblichen Säugerzellen in sehr engem Kontakt mit der Lamina-Region (Belmont et al., 1986). Spezielle zytologische Anfärbemethoden von humanen Chromosomen, mit denen die räumliche Organisation des Chromatins innerhalb des Zellkerns aufgelöst wurde, konnten zeigen, dass Gen-reiche Chromosomen vorwiegend im zentralen Bereich des Kerns lokalisieren, gen-arme Chromosomen dagegen in der Kernperipherie (Boyle et al., 2001). Auch bei der Hefe *S.cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die Telomere (Heun et al., 2001) und Gene mit einer verminderten Genaktivität an der Kernperipherie lokalisieren (Hediger and Gasser, 2002).

(IV) Ein weiterer wichtiger Prozess, an dem die Lamine beteiligt sind, ist die DNA-Replikation und –Reparatur. Bei Kernrekonstitutions-Experimenten, aus denen das *Xenopus* B-Typ Lamin immunodepletiert wurde, bildeten sich nach Zugabe von Spermien-DNA kleine und fragile Kerne, die eine Membranhülle mit NPCs besaßen (Jenkins et al., 1993; Newport et al., 1990). Allerdings konnten diese Kerne ihre DNA nicht replizieren. Erst nachdem aufgereinigtes Lamin zu den depletierten Extrakten gegeben wurde, konnte die DNA-Replikation wieder ablaufen (Goldberg et al., 1995). Um Bildungen von Artefakten, die durch die Immundepletion entstehen können, zu umgehen, wurden Lamin-Mutanten hergestellt,

die trotz der Anwesenheit einer endogener wildtypischen Laminpopulation dominant-negative Effekte aufzeigten. Die Injektion dieser Lamin-Konstrukte, denen die N-terminale Kopfdomäne fehlte, führte zum Abbau des Lamina-Netzwerks und zur Bildung von kleinen fragilen Kernen, die nicht zur DNA-Replikation fähig waren (Ellis et al., 1997; Lopez-Soler et al., 2001; Spann et al., 1997). Die depolymerisierten endogenen Lamine bildeten daraufhin nukleoplasmatische Aggregate, in denen auch Faktoren nachgewiesen werden konnten, die an der Elongationsphase der DNA-Replikation beteiligt sind. Diese Faktoren, zu denen das PCNA („Proliferating Cell Nuclear Antigen“) und der RFC („Replication Factor Complex“) gehören, sind auch bei normalen Zellen mit den nukleoplasmatischen Laminen assoziiert. Lamine sind auch bei DNA-Reparaturprozessen beteiligt. Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte zeigen, dass in Kulturzellen, die mutierte Lamin-Formen exprimierten, in DNA-Reparaturzentren die ATR-Kinase fehlte, die ein Marker-Enzym für die Antwort auf DNA-Schäden ist (Manju et al., 2006).

(V) Lamine beeinflussen durch die Interaktion mit der RNA-Polymerase II und spezifischen Transkriptionsfaktoren die Gentranskription. Durch Mikroinjektionsversuche mit Laminkonstrukten, denen die N-terminale Kopfdomäne fehlte, konnte gezeigt werden, dass eine intakte Lamina die Voraussetzung für die Transkription durch die RNA-Polymerase II ist. Auf die RNA-Polymerasen I und III scheinen die Lamine jedoch keinen Einfluss zu haben (Spann et al., 2002). Aber nicht nur die RNA-Polymerasen selbst, sondern auch Transkriptionsfaktoren interagieren mit der Lamina. So konnte für mehrere dieser Faktoren gezeigt werden, dass ihre Aktivität durch die Bindung an die Kernperipherie unterdrückt wird. Oct-1 beispielsweise, ein Kollagenase-Repressor mit einer POU-Domäne, kolokalisiert in jungen Zellen mit B-Typ Laminen an der Kernperipherie. Wenn die Zellen altern, löst sich Oct-1 vom Kernrand ab und die Expression von Kollagenase-Genen wird induziert (Imai et al., 1997). Ein weiteres Beispiel ist das Retinoblastoma Protein (pRb), das an A-Typ Lamine und an den E2f-DP3-Komplex bindet. Erst wenn pRb aus diesem Komplex entlassen wird, werden zellzyklus-abhängige Gene aktiviert (Mancini et al., 1994). Der Transkriptionsfaktor „Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1“ (SREBP-1) ist ein Transkriptionsfaktor bei Fettzellen, der bei der Cholesterol-Biosynthese benötigt wird. Durch die Störung der Bindung von SREBP-1 an A-Typ Lamine wird eine Degeneration der Adipozyten verursacht (Favreau et al., 2003; Lloyd et al., 2002).

(VI) Neben der Transkription von Genen scheinen die Lamine auch bei Differenzierungsprozessen beteiligt zu sein. So konnte durch die Überexpression von ektopischen A-Typ Laminen in Mauszellen (Zelllinie C2C12) gezeigt werden, dass die Expression des Regulationsfaktors Myogenin, der bei der Muskeldifferenzierung essenziell ist, inhibiert wird (Mariappan and Parnaik, 2005). Diese Hypothese konnte durch eine weitere Studie

unterstützt werden. Bei der normalen Muskeldifferenzierung wird das pRb dephosphoryliert und bindet an das Lamina-assoziiertes Polypeptid-2 (LAP2 $\alpha$ ). In C2C12-Mauszellen, die mit mutierten A-Typ Laminen transfiziert wurden, ist dieser pRb—LAP2 $\alpha$ -Komplex jedoch unterbrochen, wodurch gezeigt werden konnte, dass Lamine bei der Differenzierung der Skelettmuskulatur notwendig sind (Markiewicz et al., 2005).

(VII) Der programmierte Zelltod oder Apoptose ist in Vielzellern ein wichtiger Prozess, der bei der Embryonalentwicklung und bei der Stressantwort eine entscheidende Rolle spielt. Apoptose kann durch Zelltransformation, Virusinfektionen oder durch Zugabe von chemischen Substanzen ausgelöst werden. Wichtige Merkmale apoptotischer Zellen sind morphologische Veränderungen des Zellkerns, zu denen die Kondensation des Chromatins, Fragmentierung der DNA und der proteolytische Abbau von Kernhüllen-Proteinen zählen. An den proteolytischen Degradationsprozessen sind Cystein-Proteasen, die so genannten Caspasen beteiligt (Buendia et al., 2001; Earnshaw, 1995). In Vertebratenzellen konnten für die Caspase 6 als exklusive Substrate die Lamine A und C identifiziert werden. Der Abbau der Lamine leitet die Ablösung des Chromatins von der Kernhülle und die Fragmentierung der DNA-Moleküle im Kerninneren ein (Ruchaud et al., 2002). Deswegen scheint der proteolytische Abbau von Laminen bei Apoptose-Prozesse wichtig zu sein. Kulturzellen, in denen die Lamin Expression durch RNA-Interferenz (RNAi) unterdrückt wurde, Säugerzellen, in denen die A-Typ Lamin-Gene ausgeschaltet wurden, sowie Zellen von Progeriepatienten, die Träger von A-Typ Laminmutationen sind, weisen ebenfalls morphologische Veränderungen auf, die charakteristisch für die Apoptose sind (Harborth et al., 2001; Scaffidi and Misteli, 2006; Sullivan et al., 1999).

(VIII) Die Kernwanderung und -positionierung innerhalb von Zellen spielt bei vielen Entwicklungsprozessen eine entscheidende Rolle und wird durch das Zytoskelett vermittelt. Durch Untersuchungen an *C.elegans* -Mutanten konnten die Proteine UNC-84 und UNC-83 identifiziert werden, die die Lamine mit Komponenten des Zytoskeletts verbinden. Werden diese Verbindungen durch Mutationen in den entsprechenden Genen unterbrochen, wird die Kernwanderung gestört und die Zellen sterben (Lee et al., 2002; Starr et al., 2001). Dadurch konnte auch erstmals eine direkte Verbindung von Kernstrukturelementen mit dem Strukturgerüst der Zelle gezeigt werden (Haque et al., 2006).

### **2.2.3 Entwicklungsspezifische Expression von Laminen**

Lamine werden in allen Zellen von tierischen Vielzellern (Metazoa) exprimiert. Bei *Drosophila* ist das B-Typ Lamin Dm0 essenziell, das A-Typ Lamin -Lamin C- ist jedoch erstmals in Stadium 12-Embryonen nachweisbar (Riemer et al., 1995). Bei Wirbeltieren ist die Zusammensetzung der Lamina wie bereits erwähnt komplexer. Der Eiextrakt von

*Xenopus laevis* enthält drei maternale B-Typ Lamine, Lamin LI, Lamin LII und Lamin LIII, wobei der größte Anteil das Lamin LIII ausmacht. Die Menge von Lamin LIII nimmt während der Embryonalentwicklung ab, und ist in Tadpole-Stadien nicht mehr nachzuweisen. Das einzige A-Typ Lamin ist erst nach den B-Typ Lamine ab dem Entwicklungsstadium 28 (Gareiss et al., 2005) bzw. Stadium 40 (Lang et al., 1999) nachgewiesen werden, und wird in fast allen somatischen Zellen exprimiert (Wolin et al., 1987) und schließlich erscheint das Keimbahn-spezifische Lamin LIV (Benavente and KrohneG, 1985).

Auch in frühen Säugerembryonen werden die B-Typ Lamine Lamin B1 und Lamin B2 von der befruchteten Zygote an exprimiert. Die A-Typ Lamine, Lamin A und Lamin C, sind nur bis zum 4-Zellstadium nachweisbar. Sie werden erst wieder am achten Tag der Embryonalentwicklung exprimiert (Stewart and Burke, 1987). In Adulten können A-Typ Lamine in allen Kernen ausdifferenzierter Zellen nachgewiesen werden. In geschlechtsreifen Individuen werden dann auch in spezifischen Keimbahnzellen die Lamin B3 und C2 exprimiert (Furukawa and Hotta, 1993; Schutz et al., 2005).

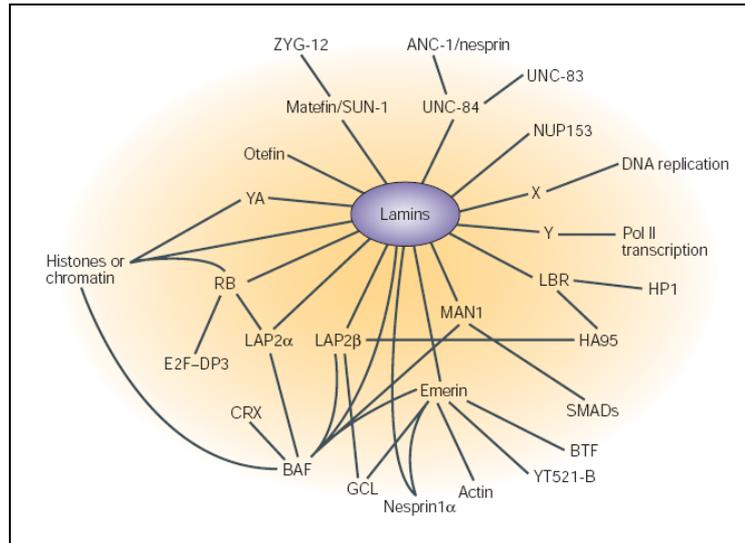
Vögel, insbesondere das Huhn *Gallus gallus*, besitzen ebenfalls drei Lamin-Gene. Wie auch bei den Säugern, sind die B-Typ Lamine in allen Zellen nachweisbar; die A-Typ Lamine erscheinen ebenfalls erst in den späten Stadien der Embryogenese. Im Unterschied zu *Xenopus* und Säugern exprimiert das Huhn alle drei Lamine in ihren Keimzellen (Lehner et al., 1987). Das Expressionsprofil der Lamine während der frühen Embryonalentwicklung und in somatischen Zellen scheint daher bei allen Vertebraten ähnlich zu sein. Lediglich in den Keimzellen kommen verschiedene Laminformen vor.

### **2.2.4 Die Lamina-assoziierten Proteine**

An der komplexen Struktur der Kernlamina sind neben den Laminen auch zahlreiche andere Komponenten beteiligt (Abbildung 2-4). So konnten bislang über 30 verschiedene Proteine u. a. durch Proteom-Analysen identifiziert werden (Dreger et al., 2001; Schirmer et al., 2003). Die Komplexität der Kernhülle und die Anzahl der assoziierten Proteine nehmen während der Evolution mit jeder Höherentwicklung zu (Dechat et al., 2000a; Georgatos, 2001; Gruenbaum et al., 2003; Gruenbaum et al., 2005). In Tabelle 2-1 wurde ein Teil der bislang identifizierten Kernhüllenproteine, deren Zahl ständig zunimmt, aufgelistet. Die meisten Proteine zeichnen sich durch eine lange N-terminale Domänen auf, die in das Nukleoplasma ragen und die die Verbindungen zu Laminen bzw. Chromatin vermittelt werden.

## Einleitung

Nach dem Diffusions-Retentions-Modell (Ostlund et al., 2006; Reichart et al., 2004; Soullam and Worman, 1995; Wu et al., 2002) werden diese Proteine im rauen Endoplasmatischen Retikulum im Zytoplasma exprimiert. Durch laterale Diffusion entlang der Membranen gelangen sie schließlich in die innere Kernmembran, wo sie durch spezifische Wechselwirkungen mit anderen Kernproteinen an ihrer Position gehalten werden.



**Abbildung 2-4:** Übersichtsdarstellung der Interaktionen von Kernlamina-Proteinen; nach (Gruenbaum et al., 2005).

Nachfolgend werden einige Beispiele prominenter Kernhüllenproteine näher beleuchtet.

**Tabelle 2-1:** Lamina-assoziierte Proteine exklusive der Kernporenkomplex-Proteine.

Protein	Lokalisation	Assoziierte Proteine	Organismus	Besondere Domänen	Referenz/ Erstbeschreibung
AKAP149	INM	PP1, PKARII, RNA	Vertebraten	TM	Steen et al., 2000
Bocksbeutel- $\alpha$	INM	Lamin Dm0	<i>Drosophila</i>	LEM TM	Wagner et al., 2004
Bocksbeutel- $\beta$	NP	Lamin Dm0	<i>Drosophila</i>	LEM	Wagner et al., 2004
Emerin	INM	Lamine A und B, BAF, GCL, MAN1, Actin, Btf, u.a.	Vertebraten <i>Drosophila</i> <i>C.elegans</i>	LEM TM	Bione et al., 1994
GCL	NP nahe INM	Emerin, LAP2 $\beta$ , Chromatin, MAN1	Vertebraten <i>Drosophila</i> <i>C.elegans</i>	BTB/POZ	Jongens et al., 1992
Lamin A/C	Lamina	Siehe	Vertebraten <i>Drosophila</i>	siehe	Fischer et al., 1986; McKeon et al., 1986
Lamin B1/B2	Lamina	Siehe	Vertebraten <i>Drosophila</i> <i>C. elegans</i>	Siehe auch 1.2.3	Gerace et al., 1978
LAP1A-C	INM	Lamina A, B1, C	Vertebraten	TM	Senior und Gerace, 1988; Foisner und Gerace, 1993; Martin et al., 1995
LAP2 $\alpha$ , $\zeta$	NP	Lamine A, B1, C, BAF, GCL, HA95, pRb, Chromatin	Vertebraten	LEM	Foisner und Gerace, 1993; Harris et al., 1994; Berger et al., 1996
LAP2 $\beta$ - $\epsilon$	INM	Lamin B, HP1, HA95, Histone (H3/H4-Tetramer); DNA	Vertebraten	LEM TM ( $\beta - \epsilon$ )	Harris et al., 1994; Berger et al., 1996
LBR	INM	Lamin B, HP1, HA95, Histone (H3/H4-Tetramer); DNA	Vertebraten Seeigel <i>Drosophila</i>	8 TM	Worman et al., 1988; 1990 Schild-Prüfert et al., 2006
LUMA	INM	?	Vertebraten <i>Drosophila</i>	4 TM	Dreger et al., 2001
MAN1	INM	BAF, GCL, Btf, Emerin, Lamine A, B1, R-Smads	Vertebraten <i>Drosophila</i> <i>C.elegans</i>	LEM 2 TM	Lin et al., 2000 Wagner et al., 2006
Nesprin-1 ( $\alpha, \beta$ )	INM, ONM	Lamin A, Emerin, Unc-84, Actin	Vertebraten <i>Drosophila</i> <i>C.elegans</i>	TM "Spectrin-Repeats"	Apel, et al. 2000 Mislow, et al. 2002 Zhang et al., 2001
Nesprin-2 ( $\alpha - \gamma$ ) (NUANCE)	INM, ONM	Lamin A, Emerin, Unc-84, Actin	Vertebraten <i>Drosophila</i> <i>C.elegans</i>	TM "Spectrin-Repeats"	Padmakumar, et al. 2004 Zhang et al., 2002 Zhen et al., 2002

Protein	Lokalisation	Assoziierte Proteine	Organismus	Besondere Domänen	Referenz/ Erstbeschreibung
Nesprin-3 ( $\alpha, \beta$ )	ONM	Plectin, IF	Säuger	TM "Spectrin-Repeats"	Wilhelmsen et al., 2005
Nurim	INM	?	Vertebraten <i>Drosophila</i>	5 TM	Rolls et al., 1999
Otefin	INM	Lamin Dm0, Chromatin	<i>Drosophila</i>	LEM	Padan et al., 1990
p18	INM, ONM	Lamin B, LBR	Vertebraten		Simos et al., 1996
RFBP	INM	RUSH	Säuger	9 TM ATP-Bindung	Mansharamani et al., 2001
SUN-1/ Matefin	INM	A- und B-Typ Lamine	Vertebraten <i>C.elegans</i>	2 TM SUN	Fridkin et al., 2004 Tzur et al., 2006
SUN-2	INM	?	Vertebraten	TM SUN	Schirmer et al., 2003 Hodzic et al., 2004
Unc-83	ONM	Unc-84	<i>C.elegans</i>	TM	Starr et al., 2001
Unc-84	INM, ONM	Unc-83, ANC-1	<i>C.elegans</i>	TM SUN	Malone et al., 1999
UNCL (= Unc-50)	INM, ONM	RNA	Säuger <i>C.elegans</i>	RNA-Bindung	Lewis et al., 1987
YA	Nähe INM	Lamin Dm0, Chromatin, Histon H2B	<i>Drosophila</i>	Zinkfinger SPKK	Liu et al., 1995 Lopez and Wolfner, 1997
ZYG-12	INM	Matefin/SUN-1, Zentrosomen	Vertebraten <i>Drosophila</i>	TM	Malone et al., 2003

In dieser Tabelle sind alle bislang bekannten Kernhüllenproteine ohne Berücksichtigung der Kernporenkomplex-Proteine weitestgehend vollständig aufgelistet. AKAP = „A-kinase anchoring protein“; BAF = „Barrier-to-autointegration factor“; GCL = „Germ cell-less“; HA95 = „homolog zu AKAP95“; HP1 = Heterochromatin-Protein 1; INM und ONM = integrale Membranproteine der inneren bzw. äußeren Kernmembran; LAP = Lamina-assoziiertes Polypeptid; LEM = L<sup>A</sup>P2, Emerin, MAN1-Homologie-Domäne; LBR = Lamin B Rezeptor; NP = Nukleoplasma; pRb = Retinoblastoma-Protein; RFBP = „ring finger binding protein“; SUN = Sad-1/Unc-84-Homologie-Domäne; TM = Transmembran-Segment; Unc = „uncoordinated movement“.

#### 2.2.4.1 Der Lamin B Rezeptor (LBR)

Das erste charakterisierte integrale Protein der inneren Kernmembran, das charakterisiert wurde ist der Lamin B Rezeptor (LBR). Er besitzt eine Molekulare Masse von ~74 kDa enthält acht putative Transmembransegmente und assoziiert mit Lamin B (Courvalin et al., 1990; Worman et al., 1990; Worman et al., 1988). Vom LBR ist bekannt, dass er neben der Bindung an B-Typ Lamine auch an der Chromatin-Organisation beteiligt ist. So konnte gezeigt werden, dass globuläre N-terminale Bereiche das Heterochromatin Protein (HP1) binden können (Ye et al., 1997; Ye and Worman, 1996) und mit dem Histon H3/H4-Tetramer und mit HA95, einem Homologon der A-Kinase Ankerprotein AKAP95, assoziiert sind (Polioudaki et al., 2001). Unmittelbare Wechselwirkung konnte auch mit doppelsträngiger (ds)DNA nachgewiesen werden (Duband-Goulet and Courvalin, 2000). Das besondere in der Sequenz des LBR ist die hohe Homologie zur C14-Sterolreduktase der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Allerdings konnte für das humane Protein noch keine eindeutige Enzymaktivität nachgewiesen werden (Silve et al., 1998). Das Protein ist für die Embryonalentwicklung des Zebrafischs *Danio rerio* oder der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* essenziell, da eine Unterdrückung der LBR-Gene zum Absterben der Embryonen oder zum Stillstand in der Entwicklung führten (Schild-Prufert et al., 2006; Wagner et al., 2004). Ein weiterer Hinweis für die funktionale Wichtigkeit des LBR stammt aus genetischen Untersuchungen von

Patienten, die an der Pelget—Huët-Anomalie (PHA; OMIM 169400) leiden und Mutation im Lamin B Rezeptor-Gen *LBR* (1q42.1) aufweisen (Hoffmann et al., 2002).

### **2.2.4.2 Die LEM-Domänen-Proteine**

Die LEM-Domäne ist ein konservierter Proteinabschnitt, der aus etwa 45 Aminosäuren besteht und der bei einer Gruppe von Kernproteinen gefunden wird. Für die Namensgebung sind das Lamina-assoziierte Polypeptid 2 (LAP2), Emerin und MAN1 verantwortlich, denen dieses Motiv gemeinsam ist (Laguri et al., 2001). Kernresonanzspektroskopie-(NMR)-Analysen sagten für das LEM-Motiv eine gewundene Struktur aus zwei Helices voraus, die durch eine 11-12 Reste lange Schlaufe getrennt sind (Cai et al., 2001). Die LEM-Domäne vermittelt die Assoziation an ein kleines DNA-bindendes Protein, dem ‚Barrier-to-Autointegration Factor‘ (BAF) (Segura-Totten and Wilson, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass BAF direkt mit LAP2, Emerin und MAN1 interagiert, und dadurch INM-Proteine an Chromatinstrukturen vermittelt (Lee et al., 2001; Mansharamani and Wilson, 2005; Shumaker et al., 2001). Durch die Bindung an Histon- und Linker-Proteine könnte BAF und seine INM-Bindungspartner an der Organisation von Chromatin-Strukturen beteiligt sein (Montes de Oca et al., 2005).

#### **2.2.4.2.1 Lamina assoziierten Polypeptide 1 und 2**

Wie bereits der Name sagt, wurden diese Proteine durch Proteinextraktionsexperimente identifiziert, bei denen sie nicht von der Kernlamina getrennt werden konnten (Senior and Gerace, 1988). Charakterisiert werden diese Proteine durch einen langen aminoterminalen Bereich, der in das Nukleoplasma ragt, ein Transmembran-Segment, das die innere Kernmembran durchspannt und einen kurzen Carboxyterminus, der im perinukleären Raum zwischen der inneren Kernmembran und der äußeren Kernmembran lokalisiert. Bei Säugern werden diese Proteine von zwei Genen exprimiert, aus denen durch alternative Spleißprozesse eine Vielzahl von Isoformen erzeugt wird. So kodiert das LAP1-Gen für die Varianten LAP1A, LAP1B und LAP1C (Foisner and Gerace, 1993; Martin et al., 1995; Senior and Gerace, 1988), wobei LAP1A und LAP1B miteinander interagieren und Heterodimere ausbilden können. Alle drei Isoformen besitzen ein Bindungsmotiv für die Kalzium-abhängige cdc2-Kinase und weisen Affinitäten zu A-Typ und B-Typ Laminen auf (Foisner and Gerace, 1993; Worman and Courvalin, 2000).

Die Lamina-assoziierten Polypeptide 2 wurden früher als Thymopoietine bezeichnet und konnten in allen bislang untersuchten Vertebraten nachgewiesen werden. Sie bilden eine größere Proteingruppe, die sich aus Spleiß-Isoformen eines einzelnen Gens *TMPO* (12q22) zusammensetzt. Beim Menschen konnten bislang drei Isoformen (LAP2 $\alpha$ , LAP2 $\beta$  und LAP2 $\gamma$ )

(Harris et al., 1994), bei der Maus dagegen bis zu sieben Spleißvarianten identifiziert werden (LAP2 $\alpha$ , - $\beta$ , - $\beta'$ , - $\gamma$ , - $\delta$ , - $\varepsilon$  und - $\zeta$ ) (Berger et al., 1996). Die einzelnen LAP2-Isoformen werden durch den Aufbau ihrer C-terminalen Endbereiche und ihrer Lokalisation im Kern unterschieden. Die Spleißvarianten LAP2 $\alpha$  und LAP2 $\zeta$  besitzen kein Transmembran-Segment und liegen durch die fehlende Verankerung in die innere Kernmembran im Nukleoplasma vor. Die anderen Isoformen sind dagegen in der inneren Kernmembran verankert und haben einen langen nukleoplasmatischen Aminoterminus (Dechat et al., 2000b). Sämtliche LAP2-Isoformen besitzen die konservierte LEM-Domäne, mit der sie durch die Interaktion mit BAF mit dem Chromatin in Verbindung stehen (Shumaker et al., 2001).

Die am besten charakterisierten LAP2-Isoformen sind LAP2 $\alpha$  und LAP2 $\beta$ . Für diese Proteine konnten direkte Bindungen an A- und B-Typ Lamine nachgewiesen werden (Lang and Krohne, 2003). Im Gegensatz zu Säugern konnten beim Huhn und beim Zebrafisch keine LAP2 $\alpha$ -Isoformen gefunden werden (Prufert et al., 2004). LAP2 $\alpha$  spielt vermutlich bei der Zellzyklusregulierung und bei Differenzierungsprozessen von Adipozyten durch Bindung an das Retinoblastoma Protein pRb eine Rolle (Dorner et al., 2006; Markiewicz et al., 2002a) und hat zusammen mit LAP2 $\beta$  bei der Chromatin-Organisation eine maßgebliche Funktion (Dechat et al., 2004; Martins et al., 2000). Beide Isoformen gehen Interaktionen mit E2F-Transkriptionsfaktoren ein und können dadurch die Transkription spezifischer Gene reprimieren (Parise et al., 2006; Somech et al., 2005b). Neuere Studien ergaben, dass Mutationen im *TMPO*-Gen beim Menschen zur dilatierten Kardiomyopathie (DCM1T; OMIM 188380) führen (Taylor et al., 2005), welche auch durch Mutationen im für A-Typ Lamine kodierenden *LMNA*-Gen verursacht werden kann (Decostre et al., 2005).

### **2.2.4.2.2 Emerin**

Ein weiteres integrales Membranprotein der INM, dessen Funktion bei Säugetieren sehr genau untersucht wurde, ist Emerin (Holaska and Wilson, 2006; Squarzone et al., 1998). Emerin wird durch das *EMD*-Gen kodiert, das auf dem X-Chromosom (Xq28) kartiert wurde (Emery, 2000). Das Protein wird ubiquitär in allen Geweben exprimiert und besitzt eine Molekulare Masse von  $\sim 34$  kDa (Dabauvalle et al., 1999; Manilal et al., 1996). Orthologe Emerin-Gene konnten sowohl beim Nematoden *C.elegans* (Ce-Emerin) (Lee et al., 2000) als auch beim afrikanischen Krallenfrosch *X.laevis* identifiziert werden (Gareiss et al., 2005). Emerin gehört -wie die Lamina-assoziierten Polypeptide und MAN1- zur Familie der LEM-Domänenproteine (Laguri et al., 2001). Wie bereits erwähnt, vermittelt die etwa 45 Aminosäure-Reste umfassende konservierte LEM-Domäne die Bindung an das Chromatin-assoziierte Protein BAF („Barrier-to-Autointegration Factor“) (Margalit et al., 2005; Segura-Totten and Wilson, 2004), die während des Zellzyklus durch unterschiedliche

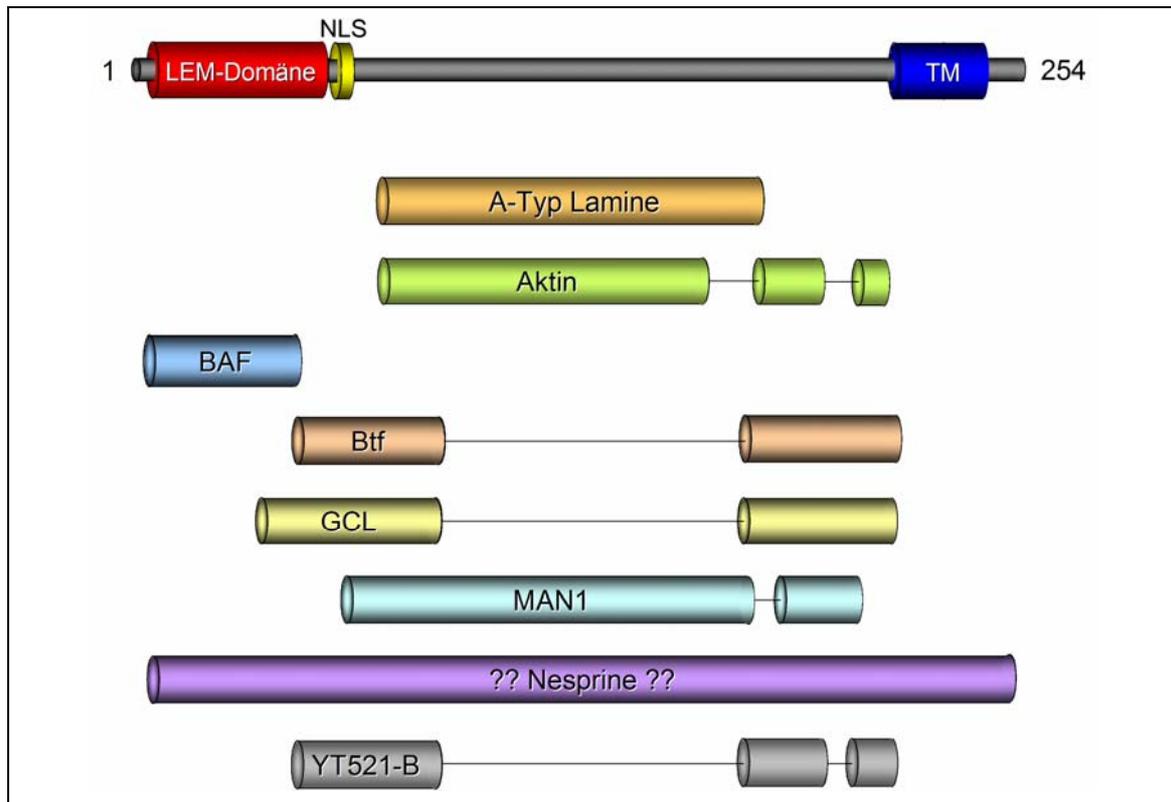
Phosphorylierungszustände reguliert wird (Hirano et al., 2005; Nichols et al., 2006). *In vitro*-Bindungsstudien konnten zeigen, dass entweder eine Bindung mit BAF oder eine Assoziation mit dem reprimierenden Transkriptionsfaktor GCL („Germ-Cell-Less“) zustande kommt (Holaska et al., 2003). Jüngste Studien konnten für Emerin neue Funktionen zeigen; Jaque und Stevenson (Jaque and Stevenson, 2006) konnten nachweisen, dass die cDNA des humanen Immundefizienz-Typ-1 Virus (HIV-1) mit Emerin assoziiert und Emerin-BAF-Komplexe für die Integration der viralen DNA ins Genom benötigt wird. Makrophagen, denen Emerin fehlte, konnten dagegen nicht mit dem HI-Virus infiziert werden (Li and Craigie, 2006).

Emerin ist in der Lage, A- und B-Typ Lamine direkt zu binden (Clements et al., 2000; Lee et al., 2001), was für die korrekte Lokalisation in der Kernhülle essenziell ist. Fehlt die direkte Bindung an die Lamin-Proteine, diffundiert Emerin ins raue Endoplasmatische Retikulum (Burke and Stewart, 2002; Sullivan et al., 1999). Emerin scheint in der Kernhüllen-Architektur eine stabilisierende Funktion auf die Lamin-Polymere auszuüben. So konnte gezeigt werden, dass in Emerin-defizienten Zellen die Löslichkeit von Lamin A erhöht ist und Lamin C vor allem im Nukleoplasma identifiziert wurde (Markiewicz et al., 2002b). In der späten Telophase co-lokalisiert Emerin *in vivo* schneller mit A-Typ Laminen und nicht als LBR, LAP2 $\beta$  und B-Typ Lamine (Dabauvalle et al., 1999).

Emerin hat aber nicht nur einen Einfluss auf die Lamina-Struktur, sondern auch auf Kernarchitektur-Moleküle. So konnte gezeigt werden, dass Emerin *in vivo* direkt an globuläres (G-) Kernactin bindet (Lattanzi et al., 2003) und *in vitro* auch das filamentöse (F-) Actin durch Bindung an die spitzen Polymer-Enden stabilisiert (Holaska et al., 2004). Es gibt bei Differenzierungsprozesse im Muskel Hinweise, dass die Bindung von Emerin an Actin durch Phosphatasen gesteuert werden könnte (Maraldi et al., 2004). Emerin weist eine Reihe von spezifischen Phosphorylierungsstellen auf (Ellis et al., 1998; Schlosser et al., 2006) und könnte dadurch bei Zellzyklus- oder Differenzierungsprozessen in unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen vorliegen und die Affinität zu verschiedenen Bindungspartner könnte so gesteuert werden.

Weitere architektonische Funktionen könnte Emerin durch die Bindung an Nesprine zukommen. Zur Familie der Nesprine gehören Strukturproteine der INM, die in ihrer Primärstruktur Spektrin-Wiederholungen aufweisen, und die beim Menschen von zwei Genen, *SYNE1* (6q25) und *SYNE2* (14q23.2), kodiert werden (Warren et al., 2005). Die Nesprin-Gene werden alternativ gespleißt und bilden mindestens sieben unterschiedliche Isoformen. Die Transkriptionsvariante Nesprin-1 $\alpha$  bindet mit einer hohen Affinität von 4 nM an Emerin und an Lamin A (Mislow et al., 2002). Auch von den Isoformen Nesprin-2 $\alpha$  und Nesprin-2 $\beta$

ist bekannt, dass sie mit Emerin Bindungen eingehen können und für die korrekte Verteilung von Emerin an der Kernhülle verantwortlich sind (Libotte et al., 2005; Zhang et al., 2005).



**Abbildung 2-5:** Schemazeichnung eines Emerin-Moleküls mit den Bindungsbereichen der potentiellen Interaktionspartner; (Holaska and Wilson, 2006; Schlosser et al., 2006).

Emerin scheint bei der Genregulierung zumindest eine indirekte Rolle zu spielen: Emerin ist durch zwei Repressor-Bindungs-Domänen (RBD-1 und-2) in der Lage, die beiden Genregulatoren GCL (Holaska et al., 2003) und Btf (Haraguchi et al., 2004) direkt zu binden, sowie den Spleißfaktor YT521-B (Wilkinson et al., 2003). Außerdem ist die Primärstruktur von Emerin der Aminosäuresequenz des Lamina-assoziierten Polypeptids-2 $\beta$  (LAP2 $\beta$ ) sehr ähnlich, welches ebenfalls Bindungen mit GCL eingehen kann und die Genexpression unterdrückt (Nili et al., 2001). GCL unterdrückt durch die Bindung an die DP3-Untereinheit des E2F-DP3-Heterodimers die Transkription von Genen (de la Luna et al., 1999). Btf ist ein proapoptotischer Transkriptionsrepressor, der nach dem Anschalten des Apoptose-Signalwegs aus dem Kerninneren durch die mögliche Bindung an Emerin an die Kernhülle dirigiert wird (Haraguchi et al., 2004). Die Interaktion mit dem Spleißfaktor YT521-B wurde durch einen Hefe-2-Hybrid-System-Screen identifiziert (Wilkinson et al., 2003). Wenn Emerin an YT521-B bindet, wird die Auswahl von Splicing-Sites *in vivo* beeinträchtigt (Wilkinson et al., 2003). Weitere Hinweise für eine Gen-regulatorische Funktion von Emerin stammen aus Bindungsstudien mit einem weiteren LEM-Domänen-Protein, MAN1. Es konnte gezeigt werden, dass Emerin direkt an MAN1 bindet (Mansharamani and Wilson, 2005). Von MAN1

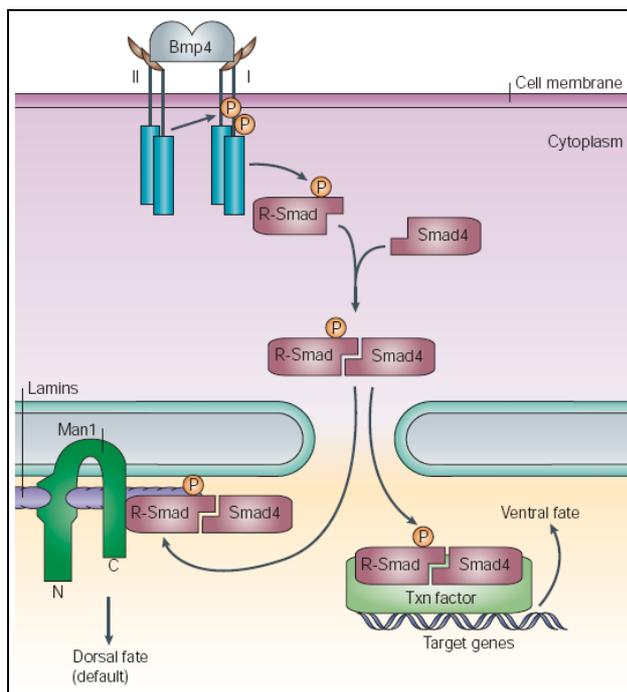
ist bekannt, dass es die Signalweitergabe im TGF $\beta$ -Signalweg regulieren kann (Lin et al., 2004). Deswegen könnte auch Emerin an diesem Signalweg beteiligt sein. Weiterhin konnte durch cDNA-Microarray-Analysen eine veränderte Genexpression in Emerin-defizienten Kulturzellen im Vergleich zu normalen Kontrollzellen nachgewiesen werden, die durch ‚Rescue‘-Versuchsansordnungen mit ektopisch exprimierten Emerin-Konstrukten teilweise wieder hergestellt werden konnte (Tsukahara et al., 2002).

### **2.2.4.2.3 MAN1**

Wie bereits erwähnt, ist MAN1 ein weiteres LEM-Domänen-Protein (Laguri et al., 2001). MAN1 konnte das erste Mal durch Autoimmunantikörper eines Patienten, der an einer Kollagen-Gefäßkrankheit leidet, identifiziert werden (Lin et al., 2000). MAN1 wird beim Menschen durch das *LEMD3*-Gen (12q14) kodiert, und hat eine Molekulare Masse von ~83 kDa. MAN1-Orthologe konnten in *C.elegans*, *X.laevis* und bei *Drosophila* identifiziert werden (Lin et al., 2000; Osada et al., 2003; Wagner et al., 2006). Sequenzanalysen sagen zwei putative Transmembran-Segmente, mit denen es in der INM verankert ist, und einen langen aminoterminalen und einen kürzeren carboxyterminalen Bereich voraus, die beide in das Nukleoplasma ragen (Lin et al., 2000). Der Aminoterminus enthält die konservierte LEM-Domäne und ist zusammen mit der ersten Transmembran-Domäne für eine korrekte Lokalisation an der inneren Kernmembran ausreichend (Wu et al., 2002). Außerdem bindet der gesamte aminoternale Bereich von MAN1 an Lamin A und B1 sowie an Emerin (Cai et al., 2001; Laguri et al., 2001; Lin et al., 2000; Wolff et al., 2001), wodurch dieser Proteinabschnitt den Kontakt an das Chromatin und die Kernlamina vermittelt. Wie bereits erwähnt wurde, interagiert die LEM-Domäne mit DNA und dem Chromatin-bindenden Protein BAF (Montes de Oca et al., 2005; Shumaker et al., 2001). BAF bindet jedoch augenscheinlich nicht nur im N-terminalen sondern auch im C-terminalen Bereich von MAN1, von dem bekannt ist, dass er auch die Transkriptionsregulatoren GCL und Btf bindet (Mansharamani and Wilson, 2005). Strukturanalysen des C-Terminus sagen eine globuläre Domäne (aa 655-758) und eine RRM-(,RNA-Recognition-Motif‘)-ähnliche Domäne (aa 782-911), die ein U2AF Homologie-Motiv (UHM) aufweist, voraus (Kielkopf et al., 2004).

Der C-terminale Bereich von MAN1 bindet auch direkt an rezeptor-vermittelte SMAD (R-Smad)-Proteine, die am BMP-(,Bone-Morphogenetic-Protein‘)-Signalweg beteiligt sind. BMP ist ein Mitglied der TGF $\beta$ -(,Transforming-Growth-Factor‘)-Superfamilie, die eine essenzielle Rolle bei der Embryonalentwicklung und der Zelldifferenzierung spielt (ten Dijke and Hill, 2004). Das orthologe MAN1 von *X.laevis* (XMAN1 oder SANE) inhibiert die Signalweitergabe von BMP4 durch die direkte Interaktion an die R-Smads 1, 5 oder 8 und blockiert dadurch die Ventralisierung der sich entwickelnden Embryonen (Osada et al., 2003; Raju et al., 2003):

Nach Bindung des Signalmoleküls BMP4 an Zelloberflächen-Rezeptoren, wird R-SMAD im Zellinneren durch die aktivierten Rezeptoren phosphoryliert. Durch den veränderten Phosphorylierungszustand, kann R-Smad nun mit einem Co-Smad ein Heterodimer ausbilden und gelangt in den Zellkern. Dort bindet es an Transkriptionsfaktoren und aktiviert viele Gene, die wiederum für weitere Transkriptionsfaktoren kodieren (ten Dijke and Hill, 2004). Durch die Bindung des R-SMAD—Co-SMAD-Komplexes an MAN1 werden daher die ventralisierenden Zielgene in den Embryonalzellen nicht aktiviert. Ein ähnlicher antagonistischer Effekt konnte auch beim humanen MAN1 beobachtet werden: Durch die Bindung an die MH2-Domäne der R-Smads (Smad1, Smad2 oder Smad3) wurde der



**Abbildung 2-6:** MAN1 inhibiert die Signalweitergabe im BMP-Signalweg. Aus (Gruenbaum et al., 2005).

nachgeschaltete TGF $\beta$ -Signalweg inhibiert (Lin et al., 2004; Pan et al., 2005). Damit konnte zum ersten Mal für ein Lamin-abhängiges INM-Protein eine direkte Beteiligung an einer Signaltransduktion nachgewiesen werden.

MAN1 spielt neben der Beteiligung an TGF- $\beta$ -Signalkaskaden eine essenzielle Rolle bei der Überlebensfähigkeit von Embryonen. RNAi-Experimente beim Nematoden *C.elegans* haben ergeben, dass die Reduktion des Expressionslevels von Ce-MAN1 um 90% zum Absterben von 15% der Wurmembryonen im 100-Zellstadium führte. Ein Co-Knockdown

von Ce-MAN1 zusammen mit Ce-Emerin war hingegen für alle Embryonen letal (Liu et al., 2003). Weitere essenzielle Erkenntnisse über MAN1 stammen aus Untersuchungen von Erbkrankheiten beim Menschen: Mutationen im *LEMD3*-Gen verursachen sklerosierende Knochendysplasien, die durch eine erhöhte Knochendichte sowie Veränderungen der Haut gekennzeichnet sind (Hellemans et al., 2004). MAN1 scheint daher bei der Transkription von gewebespezifischen Genen eine regulatorische Funktion zu übernehmen.

### 2.2.4.3 Weitere mit der inneren Kernmembran assoziierten Proteine

#### 2.2.4.3.1 Nesprine-1, -2 und -3

Nesprine-1 und -2, die von den Genen *SYNE1* (6q25) und *SYNE2* (14q23.2) kodiert werden, sind Typ-II integrale Membranproteine, die eine variable Anzahl von Spektrin-Wiederholungen, ein konserviertes KASH-(Klarsicht, ANC-1 und Syne-Homologie)-Motiv und ein einzelnes Transmembransegment (KLS-Domäne) am Aminoterminus aufweisen (Apel et al., 2000; Zhang et al., 2001). Nesprine werden ubiquitär exprimiert. Durch alternatives Spleißen wird eine große Anzahl von Nesprin-Isoformen erzeugt, die sich in ihrem Molekulargewicht und ihren biochemischen Eigenschaften unterscheiden. Von kleineren Familienmitgliedern ist bekannt, dass sie Emerin und A-Typ Lamine im Kerninneren binden können (Mislow et al., 2002). Größere Nesprin-Isoformen, zu denen das *C.elegans*-Ortholog ANC-1 gehört, sind dagegen in der Lage, die ONM mit intrazellulären Organellen und dem Actinzytoskelett über eine Calponin-homologe Domäne zu vernetzen (Starr and Han, 2002). Vor kurzem konnte eine dritte Nesprinform identifiziert werden, Nesprin-3 (Wilhelmsen et al., 2005). Wie auch bei Nesprin-1 und -2 werden durch alternative Spleißprozesse zwei Isoformen (Nesprin-3 $\alpha$  und - $\beta$ ) erzeugt. Im Gegensatz zu seinen verwandten Familienmitgliedern (Nesprin 1 und 2) besitzt Nesprin-3 jedoch keine Aktinbindungsdomäne am Aminoterminus, welche die Verbindung mit Mikrofilamenten herstellt. Dennoch gibt es Hinweise darauf, dass Nesprin-3 über das zytoplasmatische Linkerprotein Plektin Interaktionen mit dem Intermediärfilamentsystem eingehen kann.

Daher scheinen die Nesprine vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Kernpositionierung und -Migration durch die Verknüpfung der äußeren Kernmembran an das Zytoskelett zu spielen (Warren et al., 2005).

#### 2.2.4.3.2 SUN-Domänenproteine

Aus einem Pool von isolierten NE-Proteinfraktionen konnten durch massenspektroskopische MALDI-(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization)-Analysen weitere INM-Polypeptide identifiziert werden, die mit einem 16-BAC (16-Benzyldimethylhexadecy-Ammoniumchlorid)-Gel elektrophoretisch aufgetrennt wurden (Dreger et al., 2001). Dazu gehören neben LUMA, einem integralen Membranprotein der INM mit vier Transmembran-Segmenten, auch die SUN-Domänenproteine. Die SUN-Domänenproteine, die ebenfalls bis zu vier Transmembranbereiche aufweisen, haben als Gemeinsamkeit am Carboxyterminus einen ~200 Reste langen konservierten Bereich, der eine starke Homologie zu dem *Caenorhabditis elegans* UNC-84 Protein und zum Spindelkörper-Protein Sad1p der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* aufweist (Worman and Gundersen, 2006). Dieser

Homologiebereich wird deswegen als SUN-(Sad1/UNC-84-Homologie)-Domäne bezeichnet und lokalisiert wahrscheinlich in dem perinukleären Spalt zwischen der inneren und der äußeren Kernmembran (Roux and Burke, 2006; Tzur et al., 2006). Mutationen im SUN-Domänenprotein UNC-84 führt bei *C.elegans*-Embryonen zu einer unkoordinierten Bewegung („Uncoordinated Movement“) und zum Zelltod. Deswegen übernehmen SUN-Proteine vermutlich bei der Kernwanderung und -Positionierung eine wichtige Funktion (Malone et al., 1999). Bei Säugern konnten bislang fünf Genkandidaten gefunden werden, die für SUN-Domänenproteine codieren (Crisp et al., 2006; Hodzic et al., 2004). Die Säugerproteine SUN-1 und -2 weisen eine ähnliche Topologie wie UNC-84 auf. Zumindest von SUN-1 konnte gezeigt werden, dass seine nukleoplasmatische Domäne mit dem farnesylierten Prelamin A interagiert. Deswegen wird vermutet, dass SUN-1 bei Lamin-Targeting und/oder dem Laminaassembly eine Funktion übernimmt (Crisp et al., 2006). Die SUN1-Domänenproteine sind bei Metazoa evolutionär konserviert, und scheinen wie die Nesprinproteine eine tragende Rolle bei der mechanischen Verknüpfung zwischen Nukleoskelett und verschiedenen Zytoskelett-Strukturen zu spielen (Haque et al., 2006). Interessanterweise konnte eine neuere Studie eine direkte Bindung zwischen SUN-1 und den Nesprinen-1 und -2 nachweisen (Padmakumar et al., 2005). Darüber hinaus liegen Hinweise vor, dass die SUN-Proteine für die Assoziation der Nesprine an die äußere Kernhülle notwendig sind, da das Fehlen von SUN2 zu einer Mislokalisierung der Nesprine führte (Crisp et al., 2006; Zhen et al., 2002). Somit scheinen die SUN-Proteine -neben den Nesprinproteine- bei der Verknüpfung von nukleoplasmatischen Stützstrukturen mit dem Zytoskelett essenziell zu sein (Worman and Gundersen, 2006).

### **2.2.4.3.3 BAF**

Der ‚Barrier-to-Autointegration-Factor‘ (BAF) ist ein kleines evolutionär konserviertes Protein, das die Autointegration von retroviraler cDNA ins Wirtsgenom unterbinden kann (Lee and Craigie, 1994). BAF bildet Homodimere aus und ist bei Metazoa hoch konserviert, zeigt aber keine Homologien zu anderen bekannten Proteinen auf (Cai et al., 1998). BAF kolokalisiert mit den LEM-Domänenproteinen LAP2 $\beta$ , Emerin und MAN1 sowie mit den Chromatin-Proteinen Histon H3 und dem Linkerhiston H1.1 (Mansharamani and Wilson, 2005; Montes de Oca et al., 2005). Die FRAP-Untersuchungen der Bindungskinetik ergaben, dass die BAF-Moleküle während der Interphase hoch mobil sind (260 ms Halbwertszeit) und daher nur für Sekundenbruchteile in einem Proteinkomplex assoziiert sind. Die LEM-Domänenproteine sind dagegen mit Halbwertszeiten von etwa 1 Minute etwas immobilere (Shimi et al., 2004). Während der Neubildung der NE muss BAF an Emerin assoziiert sein, damit Emerin an die Chromosomen binden kann (Lee et al., 2001). Die ektopische Expression einer BAF-Mutante

in Kulturzellen beeinträchtigte die Assoziation von Emerin und Lamin A an der sich neu bildenden Kernhülle (Haraguchi et al., 2001). Durch die simultane Bindung von DNA und LAP2 $\beta$  dirigiert BAF das Chromatin an die Kernlamina und die INM (Segura-Totten and Wilson, 2004). Umgekehrt konnte durch RNAi-Experimente bei *C.elegans* durch Herunterregulierung von Ce-Lamin oder Ce-MAN1 und Ce-Emerin gezeigt werden, dass Ce-BAF nach der Mitose nicht mehr an der Kernperipherie lokalisiert (Liu et al., 2003). Die Depletion des Ce-BAF verursachte dagegen gravierende Defekte bei der Mitose und einen letalen oder sterilen Phänotyp bei den Embryonen (Margalit et al., 2005). Daher scheint BAF eine entscheidende Rolle bei der Chromatinorganisation und mitotischen Prozessen zu zu kommen. Wang und Kollegen (Wang et al., 2002) konnten eine weitere Funktion des Proteins aufzeigen: BAF scheint bei der Regulation von gewebespezifischer Genexpression beteiligt zu sein, da er mit Homöobox-Transkriptionsfaktoren, wie z.B dem CRX („Cone-Rod Homeobox“) interagiert und dadurch die Aktivierung spezifischer Gene reprimiert.

**2.2.4.3.4 GCL und Btf**

„Germ-Cell-Less“ (GCL) wurde ebenfalls zum ersten Mal bei *Drosophila* charakterisiert: GCL ist ein stark konservierter Faktor, der an der Kernperipherie lokalisiert und für die Ausbildung von Keimbahnzellen in den Fliegenembryonen verantwortlich ist (Jongens et al., 1994). Bei Säugern konnten homologe Proteine gefunden werden, die mit der DP3-Untereinheit des Transkriptionsfaktors E2F-DP3 interagieren (Leatherman et al., 2000).

Der „BCL-2 verwandte Transkriptionsfaktor“ (Btf) ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das vorwiegend im Kern lokalisiert ist und an DNA bindet (Kasof et al., 1999). Btf besitzt wie GCL Transkriptions-regulierende Funktionen, da seine DNA-Bindungsdomäne die Aktivierung von Genen, die an der Apoptose beteiligt sind, unterdrücken kann (Sabbatini et al., 1995). Btf konnte als Interaktionspartner von Emerin identifiziert werden (Haraguchi et al., 2004).

**2.3 Mutationen in Kernhüllenproteinen verursachen Erbkrankheiten**

**Tabelle 2-2:** Envelopathien und Laminopathien, verändert nach (Somech et al., 2005a).

Erkrankung	Vererbung	Klinischer Phänotyp	Protein	Referenz (Erstbeschreibung)
Emery-Dreifuss Muskeldystrophie	X-gebunden	Langsames Fortschreiten von Kontrakturen und Muskelschwäche, Skelettmuskelschwund und Kardiomyopathie	Emerin	Bione et al., 1994 Nagano et al., 1996 Manilal et al., 1998
Emery-Dreifuss Muskeldystrophie	AD	Langsames Fortschreiten von Kontrakturen und Muskelschwäche, Skelettmuskelschwund und Kardiomyopathie	Lamin A/C	Bonne et al., 1999
Emery-Dreifuss Muskeldystrophie	AR	Langsames Fortschreiten von Kontrakturen und Muskelschwäche, Skelettmuskelschwund und Kardiomyopathie	Lamin A/C	Raffaele di Barletta et al. (2000)
Gliedergürtel Muskeldystrophie	AD	Langsame progressive Schwächung der Knochengürtelmuskulatur, später Entwicklung von Kontrakturen und Herzstörungen	Lamin A/C	Muchir et al., 2000 Kitaguchi et al., 2001

## Einleitung

Erkrankung	Vererbung	Klinischer Phänotyp	Protein	Referenz (Erstbeschreibung)
Dilatierte Kardiomyopathie mit Leitungssystem-Erkrankung	AD	Dilatierte Kardiomyopathie	Lamin A/C LAP2	Fatkin et al., 1999 Verga et al., 2003 Taylor et al., 2005
Charcot-Marie-Tooth	AR	Motorische und sensorische Neuropathie, Diabetes	Lamin A/C	Tazir et al., 2003
Mandibuloacral Dysplasie	AD	Postnatale Wachstumsretardation, Schädel- und Gesichts-Anomalien, Skelettverformungen, gesprenkelte Hautpigmentierung	Lamin A/C	Novelli et al., 2002
Dunnigan-Typ familiäre partielle Lipodystrophie	AD	Verlust der subkutanen Fettschicht, Bildung von Fettgewebewucherungen (Gesicht und Hals), Insulinresistenz, Diabetes	Lamin A/C	Cao and Hegele, 2000
Hutchinson-Gilford Progerie Syndrom	<i>de novo</i> Mutation	Vorzeitiges Altern, Kleinwuchs, Haarausfall, Schädel- und Gesichts-Disproportionen, verzögerte Zahnbildung, gealtert-aussehende Haut, Osteoporose und Gelenkprobleme. Früher Tod durch Arteriosklerose und Herzgefäßerkrankung	Lamin A/C	Eriksson et al., 2003 De Sandre-Giovannoli et al., 2003
Atypisches Werner'sche Syndrom	AR	Sklerodema-ähnliche Haut, Grauer Star, subkutane Kalzifizierung, frühreife Arteriosklerose Diabetes mellitus, frühzeitig gealterte Gesichtszüge	Lamin A/C	Chen et al., 2003 Vigorous et al., 2001
Restriktive Dermopathie	AR	Früher neonataler letaler Verlauf. Intra-uterinale Wachstumsverzögerung, feste und steife Haut mit Erosionen, Mineralisierungs-Defekte des Schädelknochens, Lungen-Hypoplasie	Lamin A/C	Navarro et al., 2004
Restriktive Dermopathie	AR	Früher neonataler letaler Verlauf. Intra-uterinale Wachstumsverzögerung, feste und steife Haut mit Erosionen, Mineralisierungs-Defekte des Schädelknochens, Lungen-Hypoplasie	ZMPSTE24 (FACE-1)	Shultz et al., 2003
Pelger-Huët Anomalie	AD	Überlobulierte Neutrophilen-Kerne, raues Chromatin, unterschiedliche Grade der Entwicklungsverzögerung, Epilepsie und Skelett-Abnormalitäten	Lamin B Rezeptor	Hoffmann et al., 2002
Greenberg Skelett-Dysplasie	AR	Letaler Verlauf, Hydrops fetalis (Flüssigkeitsansammlungen im Fötus), Kurze Gliedmaßen, abnormale Knorpel-/Knochen-Kalzifizierung	Lamin B Rezeptor	Waterham et al., 2003
Buschke-Ollendorff Syndrom	AD	Dermatofibröse Hautveränderungen mit sklerotische Bereiche in den Knochenenden	MAN1	Debeer et al., 2003 Hellemans et al., 2004

In dieser Tabelle sind alle bislang identifizierten Envelopathien und Laminopathien aufgelistet. Charakteristisch für Laminopathien sind Mutationen im Gen für A-Typ Lamine und in Genen, die für Proteine der inneren Kernhülle kodieren. Eine Ausnahme bildet die Zink-Metalloprotease ZMPSTE24 (auch FACE-1 genannt), die an der Reifung der A-Typ Lamine beteiligt ist. Klinisch zeichnen sich Laminopathien durch einen gewebe-spezifischen Phänotyp aus, der sich schädigend in Herz- und Skelettmuskeln, Nerven- und Hautzellen, Fettgewebe oder Knochenstrukturen manifestiert. Abkürzungen zur Vererbung: AR = autosomal rezessive bzw. AD = autosomal dominante Erbfolge.

In den vergangenen zehn Jahren konnten durch humangenetische Untersuchungen zahlreiche Mutationen in Genen, die für Lamine und Lamina-assoziierte Proteine kodieren, identifiziert werden. Diese genetischen Veränderungen verursachen verschiedenartige Erbkrankheiten, die jedoch eine Gewebe-spezifische Pathologie als gemeinsames Charakteristikum aufweisen. Die klinischen Symptome betreffen ausschließlich Herz- und Skelettmuskeln, Fettgewebe, Knochenstrukturen, Haut- und Nervenzellen oder eine Kombination dieser Gewebe. Zusammenfassend werden diese Krankheitsformen auch als „LAMINOPATHIEN“ oder „ENVELOPATHIEN“ bezeichnet (siehe Tabelle 2-2) (Muchir and Worman, 2004; Somech et al., 2005a).

Mutationen im *LMNA*-Gen (1q21) verursachen beim Menschen seltene aber schwere Erbkrankheiten, zu denen die autosomal dominante Form (EDMD2; OMIM 181350) und die

autosomal rezessiv-vererbte Form der Emery—Dreifuss Muskeldystrophie (EDMD3; OMIM 604929), die Gliedergürtel—Muskeldystrophie (LGMD-1B; OMIM 159001), die dilatierte Kardiomyopathie 1A (DCM1A; OMIM 115200), die familiäre Dunnigan-Typ Partial-Lipodystrophie 2 (FPLD2; OMIM 151660), die Mandibuloacrale Dysplasie (MAD; OMIM 248 370), die Charcot—Marie—Tooth Typ-2 Erkrankung (CMT2; OMIM 605588), das atypische Werner'sche Syndrom (WRN; OMIM 27700), das Hutchinson—Gilford Progerie-Syndrom (HGPS; OMIM 176670) sowie eine seltene Form der angeborenen Dermatopathie (OMIM 275210) gehören (Agarwal and Garg, 2006; Ben Yaou et al., 2005; Gruenbaum et al., 2005; Mattout et al., 2006; Somech et al., 2005a).

Neben diesen primären Laminopathien konnten jedoch auch sekundäre Laminopathien identifiziert werden, bei denen Mutationen in Genen vorgefunden wurden, die für Lamina-assoziierte Proteine kodieren. Mutationen im *EMD*-Gen, das für das integrale Membranprotein Emerin codiert, verursacht die X-gebundene Form der Emery—Dreifuss Muskeldystrophie (EDMD1; OMIM 310300) (Bione et al., 1994) auf die nachfolgend noch näher eingegangen wird (siehe 2.3.1.1). Eine Nonsense-Mutation im *STE24*-Gen, das für die Zink-Metalloprotease ZMPSTE24 (auch FACE-1 genannt) codiert, verursacht auffallenderweise den selben Phänotyp wie die Restriktive Dermatopathie (Navarro et al., 2004) oder wie das Hutchinson-Gilford Progerie Syndrom (Denecke et al., 2006). Der erklärende Zusammenhang findet sich in der Tatsache, dass ZMPSTE24 für die posttranslationale Prozessierung des Lamin A-Vorläuferpeptids benötigt wird (Navarro et al., 2004). Ein anderes Beispiel für eine Envelopathie stammt aus genetischen Untersuchungen eines Patienten, der an einer dilatierten Kardiomyopathie leidet: hier konnte die krankheitsverursachende Mutation im *TMPO*-Gen kartiert werden, das für das Lamina-assoziierte Polypeptid 2 codiert (Taylor et al., 2005). Eine weitere Envelopathie wird durch Mutationen im Gen verursacht, das für den Lamin B Rezeptor codiert, der eine große Sequenzähnlichkeit zur C14-Sterolreduktase der Hefe aufweist. Homozygote Mutationsträger leiden an einer Greenberg Skelettdysplasie (OMIM 215140) (Waterham et al., 2003), wohingegen heterozygote Patienten Symptome einer Pelger-Huët-Anomalie (OMIM 169400) aufweisen (Hoffmann et al., 2002). Beide seltenen Krankheiten, die entweder autosomal rezessiv (Greenberg) oder autosomal dominant (Pelger-Huët) vererbt werden, zeichnen sich durch Cholesteroldefizite während der frühen Embryogenese aus, die sich in einer geistigen Zurückgebliebenheit, cranofacialen Anomalien sowie schweren Defekten in der Knochenbildung manifestieren. Auch beim Buschke—Ollendorff-Syndrom (OMIM 166700) oder der Osteopoikilose (OMIM 166700) treten Störungen in der Knochenstruktur auf. Auch hier konnten die krankheitsverursachenden Mutationen in einem Gen, das für ein Kernhüllenprotein codiert, kartiert werden: *MAN1* (Hellemans et al., 2004). Da in dieser

Arbeit neben Emerin auch mit dem orthologen *Xenopus* MAN1-Protein gearbeitet wurde, wird auf diese Erbkrankheit ebenfalls noch nachfolgend (siehe 2.3.1.2) näher eingegangen.

Eine Vorstellung, was ein völliger Funktionsverlust von A-Typ Laminen für den Organismus bedeutet, erhielt man durch genetisch veränderte Säugetiermodelle. Mit „Knockout“(KO)-Mäusen, in denen das *Lmna*-Gen ausgeschaltet wurde, konnten die Auswirkungen des kompletten Verlusts der A-Typ Lamine, untersucht werden (Sullivan et al., 1999). Homozygote KO-Mäuse zeigen zur Geburt einen normalen Phänotyp. Jedoch ist nach 2 – 3 Wochen eine signifikante Retardierung des Größenwachstums um bis zu 50% gegenüber gesunden oder heterozygoten Mäusen festzustellen. Histologische Auswertungen von Gewebeschnitten zeigten eine schwere Dystrophie der Skelett- und Herzmuskulatur. Außerdem konnten weitere Anomalien unter anderem in den Nervenzellen beobachtet werden, die letztendlich in einer Degeneration der Axone endete. Die Überlebensdauer der *Lmna*<sup>-/-</sup> Mäuse beträgt nur 8 Wochen (Sullivan et al., 1999).

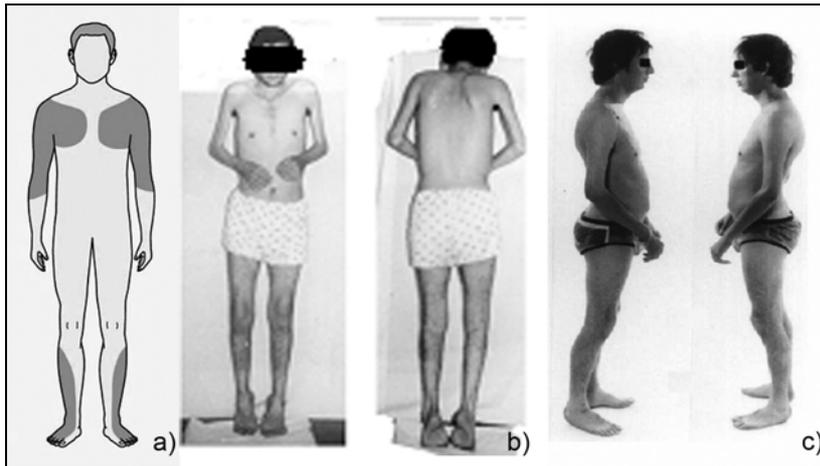
Das Ausschalten von Genen der B-Typ Lamine durch RNAi, verursachte Apoptose (Harborth et al., 2001). Die Notwendigkeit von Lamin B1 oder Lamin B2 in diesen Zellen beweist, dass jedes dieser B-Typ Lamine eine spezifische Haushaltsfunktion haben muss, die der Zelle die Überlebensfähigkeit sichert. Da Mutationen im *LMNB1*- oder *LMNB2*-Gen für Zellen letal sind, könnte dadurch erklärt werden, dass bislang bei humanen Erbkrankheiten keine Mutationen in diesen Genen gefunden wurden.

### **2.3.1.1 Die Emery—Dreifuss Muskeldystrophie**

Auch Mutationen im *EMD*-Gen (Xq28), das für das integrale Membranprotein Emerin kodiert, verursachen die rezessiv vererbte X-chromosomal verbundene Form der Emery—Dreifuss Muskeldystrophie (EDMD; OMIM 310300). Die EDMD wurde das erste Mal 1966 beschrieben (Emery, 2000) und ist eine Muskelschwäche mit mild verlaufendem Krankheitsbild, das eine große Variationsbreite bei den pathologischen Effekten aufzeigt (siehe Abbildung 2-7).

Bis zum heutigen Tag konnten über 100 krankheitsverursachende Veränderungen im *EMD*-Gen kartiert werden, von denen die meisten Nonsense- oder Frameshift-Mutationen darstellen, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation führen. Aus diesem Grund ist Emerin durch zytologische oder biochemische Untersuchungen in den Patientenzellen nicht nachweisbar (Yates et al., 1999).

Das Fehlen dieses ubiquitären Proteins äußert sich durch klinische Symptome, die bereits in der ersten Lebensdekade auftreten. Es kommt zu Verkürzungen der Ellbogen- und Achillessehnen, so dass die Arme nicht mehr vollständig gestreckt werden können und die Patienten gezwungen sind, auf den Zehenspitzen zu laufen. Der zunehmende Schwund von



**Abbildung 2-7:** Klinischer Phänotyp von Emery–Dreifuss Muskeldystrophie-Patienten. a) Betroffenen Muskelpartien: Oberarme, Oberkörper und Unterschenkel. b) 25-jähriger EDMD-Patient mit auffällig verkürzten Achilles- und Ellenbogensehnen, sowie typischen Muskelschwund an Oberarmen und Unterschenkeln. c) 18-jähriger EDMD-Patient mit schwächer ausgeprägtem Phänotyp.

Nacken- und Oberkörpermuskulatur sowie die der Unterschenkel führen zu einer weiteren Einschränkung in der Beweglichkeit. Das gravierendste Symptom ist jedoch die progressive Herzmuskelschwäche, die – wenn sie unerkannt bleibt – in der zweiten bis dritten Lebensdekade zum plötzlichen Herzstillstand führen kann.

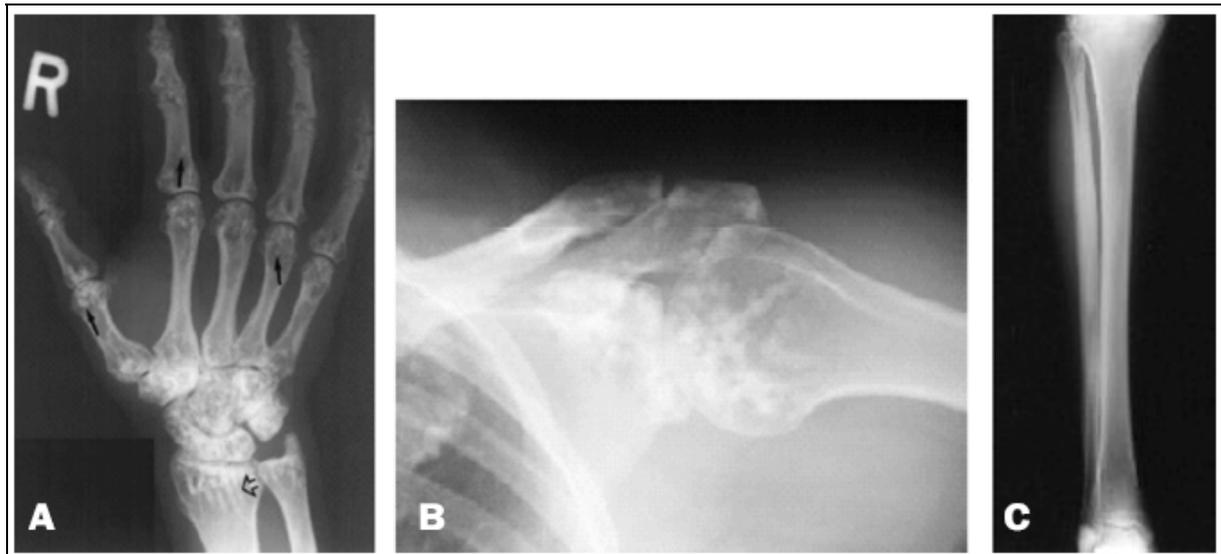
Durch die rechtzeitige

Applikation eines Herzschrittmachers kann jedoch die Lebenserwartung der EDMD-Patienten entscheidend verlängert werden (Emery, 1989; Gayathri et al., 2006). Der Phänotyp der A-Typ Laminen-assoziierten EDMD-Formen (EDMD2 und EDMD3, siehe 2.3) ist mit der X-chromosomal ererbten Form vergleichbar.

### 2.3.1.2 Das Buschke–Ollendorff-Syndrom

Mutationen im *LEMD3*-Gen (12q14), das für das integrale INM-Protein MAN1 kodiert, verursachen gewebespezifische Erbkrankheiten (Hellemans et al., 2004). Klinische Symptome dieser Erkrankungen manifestieren sich in Verdichtungen der Knochenstrukturen, zu denen u.a. das Buschke-Ollendorff-Syndrom (BOS; OMIM 166700) gezählt wird (siehe Abbildung 2-8).

Das Buschke-Ollendorff-Syndrom ist eine seltene – autosomal-dominant vererbte – Erbkrankheit mit einem milden Phänotyp. Buschke-Ollendorff–Syndrom-Patienten weisen neben den Knochenverdichtungen, die Defekten der Osteopoikilose ähneln, auch dermale Aberrationen auf. Die Osteopoikilose ist eine skelettale Dysplasie, die durch eine symmetrische, jedoch ungleiche Verteilung von multiplen hyperostotischen Bereichen in unterschiedlichen Teilen des Skeletts gekennzeichnet ist (Debeer et al., 2003; Kim et al., 2003). Die Defekte in der Knochenstruktur und –dichte treten in der zweiten oder dritten Lebensdekade auf, und sind vielfach mit Gelenkschmerzen und –versteifungen verbunden.



**Abbildung 2-8:** Klinischer Phänotyp des Buschke—Ollendorff Syndroms. Röntgenaufnahmen zeigen Defekte in der Knochenstruktur. A) Verdichtungen in den Knochen der rechten Hand, die vor allem an den Enden auftreten: kleine Pfeile = Verdichtungen in den Ossae digitorum manus, sowie in der Ulna (großer Pfeil). B) Osteopoikilose-Läsionen in der linken Schulter. C) Radiografische Aufnahme der Tibia; die Läsionen treten als klar definierte sklerotische Verdichtungen auf, die sich hauptsächlich in einer linearen Verteilung entlang der Längsachse des Knochens manifestieren. Aus Kim et al., 2003 bzw. Debeer et al., 2003.

Bereits bei der Geburt können bei Buschke-Ollendorff-Syndrom-Patienten Dermato-fibrosen – auffällige Strukturveränderungen der Haut – auftreten, die am Rumpf und/oder den proximalen Extremitäten zu finden sind. Derartige dermale Anomalien werden vorrangig durch Veränderungen des Bindegewebs-Naevus verursacht und führen zu einer erhöhten Konzentration von extrazellulären Matrixproteinen, wie Elastin oder Kollagen (Woodrow et al., 2001).

### 2.3.2 Hypothetische Mechanismen der Laminopathien

Bislang konnte noch nicht vollständig verstanden werden, welche molekularen Mechanismen hinter den Laminopathien stecken. Das größte Mysterium dieser Erbkrankheiten ist, warum Mutationen in ubiquitär exprimierten Kerngerüstproteinen gewebespezifische pathologische Phänotypen zur Folge haben. Zurzeit werden vier verschiedene Modelle vorgeschlagen, mit denen die krankheitsverursachenden Prinzipien erklärt werden könnten.

Beim Strukturmodell werden die Auswirkungen der meist heterozygoten Punktmutationen auf die molekulare Zusammensetzung der Polypeptide betrachtet. Die krankhafte Veränderung einer einzelnen DNA-Base im Gen führt meist zum Austausch einer Aminosäure oder zu einem vorzeitigen Translationsstopp. Diese strukturellen Defekte im molekularen Aufbau der Proteine könnten dazu führen, dass die Stabilität der Laminpolymere und – komplexe oder die Laminbindung an strukturelle Membranproteine der INM, des Chromatins oder des Nukleoskeletts herabgesetzt ist. Dies könnte wiederum eine geschwächte

Laminastruktur zur Folge haben, wodurch die betroffenen Zellkerne nicht mehr in der Lage wären, mechanischem Stress unbeschadet zu widerstehen. Diese Strukturhypothese konnte teilweise durch Untersuchungen an Patientenzellen bestätigt werden, die an Patientenzellen durchgeführt wurden. Laminopathische Zellkerne wiesen auffällige morphologische Veränderungen, wie z.B. eine verdickte Lamina, eine blasenbildende Kernmembran und ausgestülptes Chromatin auf (Muchir et al., 2003). Lamin A-defiziente Mauszellen konnten mechanischen Belastungen nur eingeschränkt widerstehen und starben früher als normale Kontrollzellen (Lammerding et al., 2004).

Eine weitere Hypothese für die molekularen Mechanismen der Laminopathien ist die ER-Retentionstheorie. Dieses Modell spekuliert darüber, dass die krankheitsverursachenden Mutationen in A-Typ Laminen ihre Interaktionsfähigkeit mit anderen Kernmembranproteinen störend beeinträchtigt. Durch die fehlende Bindung an Laminastrukturen, könnten bestimmte INM-Proteine nicht mehr an der NE immobilisiert werden und nach dem Retentionsmodell im Lipidbilayer frei diffundieren und sich entlang der inneren Kernmembran durch die Porenmembran und der äußeren Kernmembran ins raue Endoplasmatische Retikulum bewegen können (Ohba et al., 2004; Soullam and Worman, 1995). Das ER-Retentionsmodell wird von der Beobachtung unterstützt, dass das Lamin-bindende INM-Protein Emerin bei Mutationen in den Laminen ins ER diffundiert (Di Blasi et al., 2000; Ellis et al., 1999). Es wird spekuliert, ob fehlgeleitete INM-Proteine im ER mit ER-Proteinen interagieren könnten und dadurch metabolische Funktionen, wie z.B. Fettsäurestoffwechsel in Adipozyten oder Kalziumhomöostase im Muskel negativ beeinträchtigen könnten (Gotzmann and Foisner, 2005). Mit diesem Modell könnten auch die gravierenden unterschiedlichen Symptome, die bei der frühzeitigen Alterung des Hutchinson—Gilford Progerie Syndroms beobachtet werden, erklärt werden.

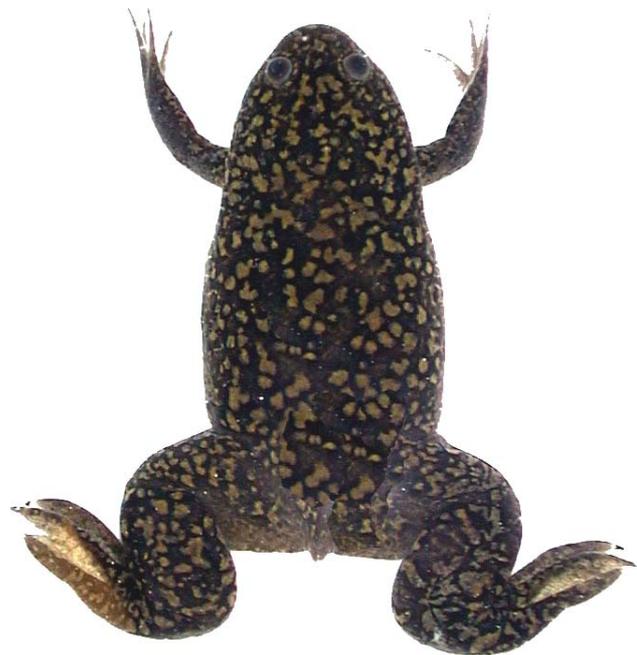
Das Genexpressionsmodell nimmt an, dass Mutationen in Lamina-Proteinen die Aktivierung von bestimmten Genen negativ beeinflussen könnten. Diese könnte durch verschiedene Mechanismen verursacht werden: (a) Da viele Lamina-Proteine und die Lamina direkt an DNA und Chromatin binden, könnten Mutationen diese Wechselwirkungen herabsetzen und dadurch eine epigenetische Umordnung der Chromatinstrukturen an der Kernperipherie verursachen (Goldman et al., 2004; Scaffidi and Misteli, 2005). (b) Es ist bekannt, dass Lamina-Proteine bei der Transkriptionskontrolle eine maßgebliche Rolle spielen. So konnte von Laminen gezeigt werden, dass sie die Aktivität der RNA Polymerase II inhibieren können (Spann et al., 2002). Außerdem wurden Interaktionen mit transkriptionellen Regulatorproteinen, wie dem Retinoblastoma Protein pRb (Markiewicz et al., 2002a), dem ‚Germ-Cell-Less‘ GCL (Holaska et al., 2003) und dem Sterol-Reduktase-Bindungsprotein-1

SREBP-1 (Lloyd et al., 2002) nachgewiesen. Mutationen könnten diese Interaktionen unterbinden und dadurch die Aktivität bestimmter Gene ermöglichen.

Die vierte Hypothese schlägt vor, dass die Zellproliferation durch krankhaft veränderte Lamina-Proteine gestört sein könnte. Wie bereits erwähnt, gehen Laminkomplexe mit dem Retinoblastoma Protein pRB Wechselwirkungen ein. Vom pRb ist bekannt, dass es an Prozessen beteiligt ist, die das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung kontrollieren. Insbesondere wird pRb für den Austritt aus dem Zellzyklus benötigt. So konnte von Muskelzellen gezeigt werden, die eine Muskeldystrophie-verursachende Lamin-Mutante exprimieren gezeigt werden, dass sie sich nicht vollständig differenzieren konnten (Favreau et al., 2004). Auch Mauszellen, denen A-Typ Lamine fehlen, weisen einen reduzierten pRb-Level auf und zeigen Defekte im Zellzyklus (Johnson et al., 2004). Es wird angenommen, dass pRb durch die Bindung an Laminakomplexe vor einem proteolytischen Abbau geschützt wird und dadurch pRb-vermittelte Signalwege, wie die Muskel- und Adipozytendifferenzierung oder auch Zellalterungsprozesse beeinflusst sein könnten.

### **2.4 Das Modellsystem *Xenopus laevis***

Die Lamina-Proteine von Säugern sind bislang recht gut charakterisiert worden. Allerdings wurde das Expressionsverhalten während der frühen Embryogenese und insbesondere während der Organogenese von Wirbeltieren nur unzureichend beleuchtet. Ein hervorragendes Modellsystem der Entwicklungsbiologie von Vertebraten stellt der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* dar, da er sich insbesondere für Studien der frühen Embryogenese eignet. Unter

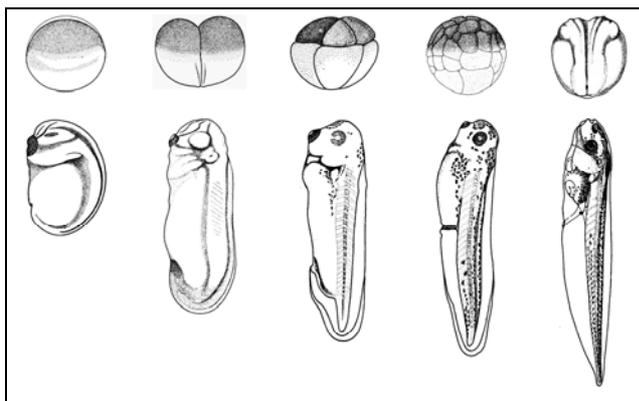


**Abbildung 2-9:** Adulter weiblicher Afrikanischer Krallenfrosch *Xenopus laevis*. Quelle: Xenbase.org

Laborbedingungen ist die Haltung und Aufzucht der Tiere einfach durchzuführen, da die genügsamen Tiere ein Temperaturbereich von 16 bis 22°C tolerieren. Die adulten Weibchen haben eine durchschnittliche Körpergröße von etwa 10 Zentimetern, Männchen sind etwa um ein Drittel kleiner (siehe Abbildung 2-9).

Die aus dem südlichen Afrika stammenden Amphibien weisen an den inneren drei Zehen schwarze Krallen auf, die für die Gattung namensgebend sind. Ein weiterer Vorteil ist die leichte Zugänglichkeit von Embryonen, da die Tiere durch die Injektion des humanen

Schwangerschaftshormons Choriongonadotropin (hCG) in den dorsalen Lympfsack zur Paarung oder Eiablage stimuliert werden können. Aus diesem Grund wird *X.laevis* auch als Apothekerfrosch bezeichnet, da er bis in die 1960er Jahre hinein als biologischer Schwangerschaftstest verwendet wurde. Löste die Injektion von Morgenurin einer vermeintlich schwangeren Frau bei weiblichen Fröschen nach 12 Stunden die Eiablage aus, wurde dies als Indikation gewertet. Im Allgemeinen werden bei der Eiablage bis zu 1000 Stück abgelaicht, wobei die Größe der reifen Oozyten und Froscheier 1,0 bis 1,3 Millimeter beträgt. Dieser große Durchmesser ermöglicht dem Experimentator leichte Manipulationen, wie zum Beispiel Transplantationen von Gewebestückchen oder Mikroinjektionen von Proteinen, RNA oder Plasmid-DNA. Die sich entwickelnden Embryonen sind relativ widerstandsfähig gegenüber diesen Eingriffen und weisen darüber hinaus eine gewisse Resistenz gegenüber Infektionen auf. Ein weiterer Vorteil dieses Modelltieres ist die einfache Handhabung für eine *in vitro* Befruchtung: binnen 12 Stunden nach der Hormoninjektion reifen die Oozyten im Ovar heran. Die Weibchen können durch leichtes Massieren zur Eiablage stimuliert werden. Der Laich wird mit einem operativ präparierten Hoden durch Überstreichen synchron befruchtet und die sich entwickelnden Embryonen durchlaufen simultan die sehr schnell stattfindende Embryogenese. Unter optimalen Bedingungen schlüpfen bereits nach etwa 72 Stunden die schwimmfähigen Kaulquappenlarven aus den durchsichtigen Gallerthüllen. Der Ablauf der Embryogenese wurde von Nieuwkoop und Faber bereits vor ca. 30 Jahren systematisiert und die jeweiligen charakteristischen Entwicklungsstadien können anhand dieser Normtafel bestimmt werden (Nieuwkoop and Faber, 1975). Siehe dazu auch Abbildung 2-10.



**Abbildung 2-10:** Beispiele chronologisch geordneter Embryonalstadien, nach (Nieuwkoop and Faber, 1975)

*Xenopus laevis* gehört zu den am besten charakterisierten entwicklungsbiologischen Modellsystemen. Es konnte gezeigt werden, dass grundlegende Abläufe während der Entwicklung von *X.laevis* auch evolutionär konserviert sind und daher molekulare Mechanismen, Signalwege und beteiligte Faktoren auch auf entfernt verwandte und höhere Organismen, wie den Menschen übertragbar sind (De

Robertis and Sasai, 1996). Auch wenn die genetische Information des afrikanische Krallenfroschs nur zu etwa einem Drittel mit dem Genom von *Homo sapiens* identisch ist, können dennoch orthologe Gene und Proteine gefunden werden. Genetische Analysen sind bei *X.laevis* jedoch im Moment nur eingeschränkt möglich, da das Genom des Tieres mit 18

Chromosomen und etwa  $3,1 \cdot 10^9$  bp noch nicht vollständig durchsequenziert wurde (Olmo and Morescalchi, 1978) und durch eine Pseudotetraploidie, die vor etwa 30 Millionen Jahren stattgefunden hat, zusätzlich erschwert wird (Hughes and Hughes, 1993; Shain et al., 1997). Im Vergleich dazu besitzt sein nächster Verwandter *Xenopus tropicalis* nur 10 Chromosomen und eine Genomgröße von  $1,7 \cdot 10^9$  bp (de Sa and Hillis, 1990; Hirsch et al., 2002).

### **2.5 Zielsetzung der Arbeit**

Innerhalb der letzten Jahre konnte eine Reihe von Strukturproteinen der inneren Kernhülle identifiziert werden. Durch die Erkenntnis, dass Mutationen in den Genen, die für diese Proteine kodieren, vererbte gewebespezifische Krankheiten beim Menschen verursachen, wurde auf die Identifizierung der physiologischen Aufgaben dieser Kernhüllenkomponenten eine erhöhte Aufmerksamkeit gelenkt. Das integrale Membranprotein Emerin konnte bereits bei Säugetieren wie *Homo sapiens* und *Mus musculus* aber auch bei Invertebraten wie *Caenorhabditis elegans* charakterisiert und diverse Interaktionspartner identifiziert werden. Da bekannt ist, dass Mutationen im Emerin-Gen beim Menschen bestimmte Formen der Emery–Dreifuss Muskeldystrophie verursachen, ist dieses Protein – abgesehen von den Laminen – besonders intensiv untersucht worden. Allerdings konnten bislang keine Erkenntnisse über die erstmalige Aktivierung des Emerin-Gens und über die Translation des Proteins bei Vertebraten erbracht werden. Dies könnte helfen, die molekularen Mechanismen dieser laminopathischen Erbkrankheit zu verstehen und insbesondere die Prozesse, die bei der Bildung der Organe und Gewebe, beispielsweise der Muskulatur, beteiligt sind aufzuklären.

Mit dieser Arbeit sollte das räumliche und zeitliche Transkriptions- und Expressionsmuster des integralen Membranproteins Emerin während der frühen Embryonalentwicklung mit Hilfe des Vertebratenmodells *Xenopus laevis* charakterisiert werden. Durch Sequenzanalysen von Gendatenbanken wurde zunächst das orthologe Protein im Frosch gefunden und mit der Sequenz des humanen Emerins verglichen. Nach den molekularbiologischen Untersuchungen sollten spezifische Antikörper gegen das *Xenopus*-Emerin generiert und das Protein anschließend immunzytologisch und biochemisch analysiert werden. Durch die gewonnenen Erkenntnisse des embryonalen Expressionsprofils wurde die Aufmerksamkeit auf einen potentiellen Interaktionspartner, das integrale Kernmembranprotein MAN1 gelenkt und *in vitro* Bindungsstudien durchgeführt.

## 3 Material

### 3.1 Biologisches Material

#### 3.1.1 Versuchstiere

Der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* wurde von einer französischen Tierfarm bezogen (Xenopus Express France, F-43270 Vernassal, www.xenopus.com) oder stammten aus der institutseigenen Nachzucht.

#### 3.1.2 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus™ (DE3)-RIL	Stratagene, Heidelberg
<i>E. coli</i> M15	Qiagen, Hilden
<i>E. coli</i> TOP10 OneShot®	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> XL 1-Blue	Stratagene, Heidelberg

#### 3.1.3 Zelllinien

**XIKE-A6:** (*Xenopus laevis* kidney epithelium, line A6, American Type Culture Collection). Diese Zelllinie stammt aus Nierenepithelgewebe von *Xenopus laevis*. Die Zellen wurden in DMEM mit Earle`s Salzen und 10% FCS bei 27°C kultiviert.

**XTC:** Die Zelllinie stammt aus embryonalem Gewebe von *Xenopus laevis*. Die Zellen wurden in RPMI mit 20% FCS, 2% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

**HEK293:** (Human Epithelium Kidney). Diese Zelllinie stammt aus menschlichem Nierenepithelgewebe. Die Zellen sind Derivate von 293 und exprimieren EBNA1. Dadurch können hohe Transfektionseffizienzen mit einem Vektor (pCEP4) erreicht werden, das den Epstein-Barr Virus (EBV) oriP enthält. Die Zellen wurden in Eagle`s MEM (Minimum Essential Medium) mit Earle`s Salzen mit 0.25 mg/mL G-418 supplementiert und 10% FCS bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Kultur gehalten.

**HeLa:** Die Zelllinie stammt aus dem Epithelgewebe eines menschlichen Cervix-Karzinoms. Die Zellen wurden in Eagle`s MEM (Minimum Essential Medium) mit Earle`s Salzen und 10% FCS bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Kultur gehalten.

**HEp-2 :** (Human Epidermoid carcinoma). Die Zelllinie stammt aus epidermalem Karzinomgewebe des menschlichen Larynx. Die Zellen wurden in 90% DMEM (Dulbecco`s Modified Minimum Essential Medium) mit 10% FCS, 1% Natriumpyruvat und 1% MEM-non-essential-aminoacids bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

**COS-7:** (*Cercopithecus aethiops*). Fibroblasten-ähnliche Nierenzelllinie von CV-1 Zellen der grünen Meerkatze abgeleitet. Diese Zellen wurden in 90% DMEM mit 10% FCS bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> in Kultur gehalten.

#### 3.1.4 Antikörper

##### 3.1.4.1 Primär-Antikörper

hEmerin (NCL-emerin)	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen über:	Homo sapiens Emerin Maus, monoklonal IF: 1:200, IB: 1:1000 Medac, Hamburg
hLamin B	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen über:	Homo sapiens B-Typ Lamine Maus, monoklonal IF: 1:200 Prof. Dr. Georg Krohne

## Material

---

hLamin B1 (8287)	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen über:	Homo sapiens Lamin B1 Mensch, autoimmun AK IF: 1:200 Prof. Dr. Ulrich Scheer
hLBR	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen über:	Homo sapiens Lamin B Rezeptor Meerschweinchen, monoklonal IF: 1:800 Christine Dreger
mAb 4/4	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen über:	Homo sapiens Nucleoporin Maus, monoklonal IF: 1:5000 Prof. Dr. Georg Krohne
xFibrillarin (P2G3)	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen über:	Xenopus laevis Fibrillarin Maus, monoklonal IF: 1:100; IB: 1:1000 Prof. Dr. Ulrich Scheer
XLamin LII (x223)	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen über:	Xenopus laevis Lamin LII Maus; monoklonal IF: 1:200; IB: 1:1000 Lourim et al. 1996; JCS(109) pp.1775-85
XLamin B-type (S49H2)	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen über:	Xenopus laevis B-Typ Lamine Maus, monoklonal IF: 1:200 Prof. Dr. Georg Krohne
hLamin A/C (R27G3)	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen über:	Homo sapiens Lamin A/C Maus, monoklonal IF: 1:200; IB: 1:1000 Prof. Dr. Georg Krohne
XLamin A/C (X-94-7)	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen über:	Xenopus laevis Lamin A/C Maus, monoklonal IF: 1:200; IB: 1:1000 Prof. Dr. Georg Krohne

## Material

---

Xgp62	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen über:	Xenopus laevis Porenkomplex-Protein Meerschweinchen, polyklonal IF: 1:100; IB: 1:1000 Prof. Dr. Georg Krohne
XHiston H1A (xH1A)	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen über:	Xenopus laevis Histonkomplex-Protein Kaninchen, polyklonal IF: 1:100; IB: 1:1000 PD Dr. Robert Hock
XEmerin (#59/7)	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen über:	Xenopus laevis Emerin Maus, monoklonal IF: 1:1; IB: 1:10 Prof. Dr. Hanswalter Zentgraf
Anti-His	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen über:	C-terminales Hexahistidin Maus, monoklonal IF: 1:1; IB: 1:10 Prof. Dr. Hanswalter Zentgraf
Anti-GFP	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen über:	Green fluorescence protein BLOT Maus, monoklonal IB: 1:2000 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Anti-c-Myc	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen über:	c-Myc Epitop-Tag Maus, monoklonal IF: 1:200; IB: 1:1000 BD Biosciences, Heidelberg
XMAN1 gp#2	Antigen: Herkunft: Verdünnung: Bezogen über:	Xenopus laevis MAN1 Meerschweinchen, polyklonal IF: 1:200; IB: 1:200 Eigene Herstellung; Prof. Dr. Georg Krohne

### 3.1.4.2 Sekundär-Antikörper

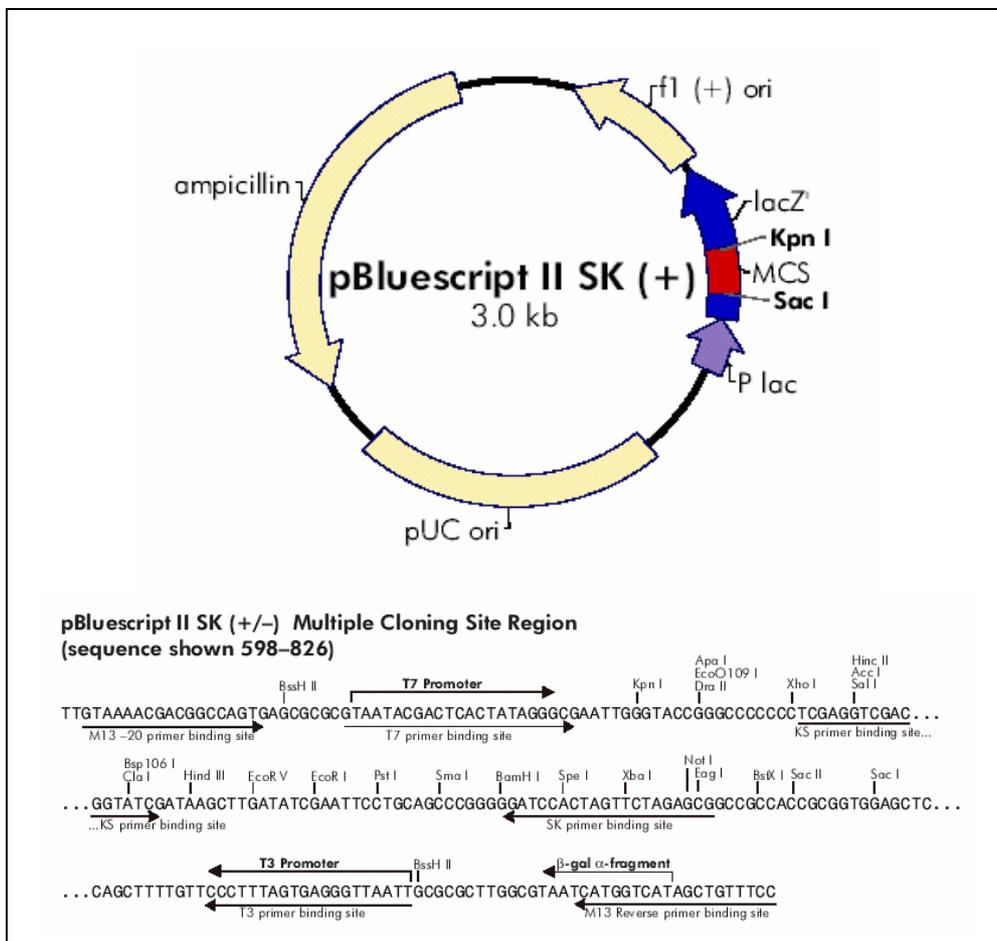
Ziege IgG anti-Maus	Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	1:5000	Dianova
Ziege IgG anti-Meerschwein	Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	1:5000	Dianova
Ziege IgG anti-Rabbit	Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	1:5000	Promega
Ziege IgG anti-Maus	TexasRed gekoppelt	1:1000	Dianova

Ziege IgG anti-Maus	Cy3 gekoppelt	1:1000	Dianova
Ziege IgG anti-Maus	Cy2 gekoppelt	1:1000	Dianova
Ziege IgG anti-Maus	FITC gekoppelt	1:1000	Dianova
Ziege IgG anti-Mensch	TexasRed gekoppelt	1:1000	Dianova
Ziege IgG anti-Meerschwein	TexasRed gekoppelt	1:1000	Dianova
Ziege IgG anti-Meerschwein	DTAF gekoppelt	1:25	Dianova

### 3.2 Molekularbiologische Arbeitsmittel

### 3.3 Expressionsvektoren

#### 3.3.1.1 pBluescript II SK (+), Stratagene, Heidelberg

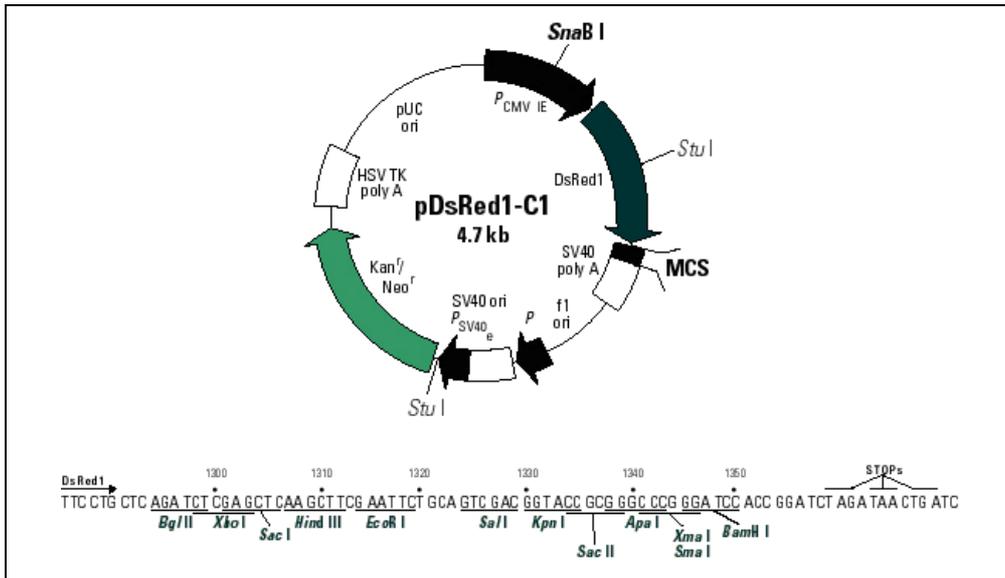


**Abbildung 3-1:** Vektorkarte von pBluescript II SK(+), Stratagene, Heidelberg.

Dieser Vektor wurde von der Firma Stratagene bezogen. Die Karte zeigt den schematischen Aufbau des Vektors mit der Multiplen Klonierungs-Stelle (MCS). Die MCS wird von einer T7 bzw. T3-Promotor-Region flankiert. Der Vektor wurde zur RNA-Sondenherstellung für die in situ Hybridisierungen verwendet. Positive Bakterienklone können durch Ampicillin-Zugabe und Blau-Weiß-Selektion identifiziert werden.



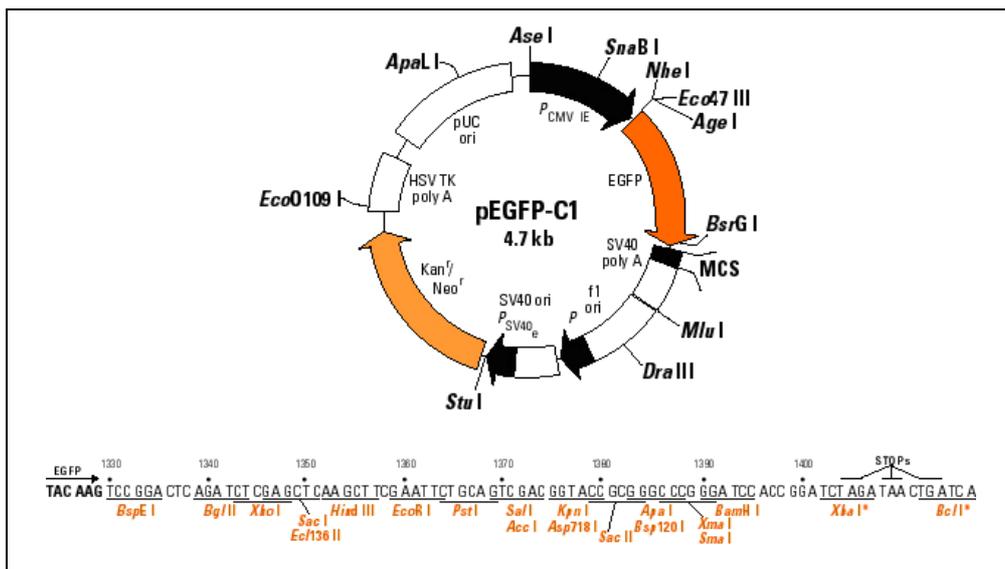
### 3.3.1.4 pDsRed1-C1, Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg



**Abbildung 3-4:** Vektorkarte und Multiple Klonierungs-Stelle (MCS) des dsRed1-C1 Vektors; Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg..

pDsRed1-C1 kodiert für ein rot-fluoreszierendes Protein (RFP), das für die Expression in Säugerzellen optimiert wurde (Extinktions-Maximum = 558 nm; Emissions-Maximum = 583 nm). Das RFP wurde ursprünglich aus einem Verwandten der Indo-pazifischen Seeanamone *Discosoma sp.* isoliert. Hohe Expressionslevel werden in tierischen Zellen durch den menschlichen Cytomegalovirus (CMV)-Promotor erreicht. Durch die SV40-Region des Vektors wird ein Polyadenylierungs-Signal an das entstehende Transkript angefügt. Gene, die in die MCS kloniert werden, erhalten am Aminoterminus den rot-fluoreszierenden Anhang. Die auf diese Weise markierten Proteine können durch Immunofluoreszenz-Studien in (lebenden) Zellen untersucht werden.

### 3.3.1.5 pEGFP-C1, Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg

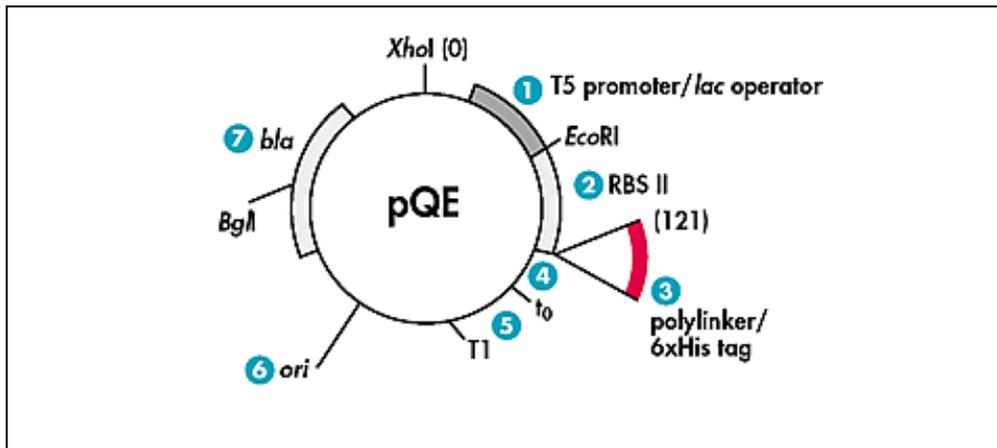


**Abbildung 3-5:** Vektorinformationen von pEGFP-C1; Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg..

pEGFP-C1 kodiert für das verstärkt leuchtende grün-fluoreszierende Protein (EGFP), das für die Expression in Säugerzellen optimiert wurde (Extinktions-Maximum = 488 nm; Emissions-Maximum = 507 nm). Das GFP wurde

ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert. Hohe Expressionslevel werden in tierischen Zellen durch den menschlichen Cytomegalovirus (CMV)-Promotor erreicht. Durch die SV40-Region des Vektors wird ein Polyadenylierungs-Signal an das entstehende Transkript angefügt. Durch das Klonieren von Genen in die MCS des pEGFP-C1 Vektors werden die entstehenden Proteine am N-Terminus mit dem EGFP fusioniert. Die grünleuchtenden Fusionsproteine können dadurch mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie lokalisiert werden. Neben diesem Vektor stehen noch andere Vektoren zur Verfügung (pEGFP-C2 oder -C3), die in der MCS entweder einen veränderten Leseraster („reading-frame“) aufweisen oder das grün-fluoreszierende Protein am carboxyterminalen Ende des zu untersuchenden Proteins anhängen (pEGFP-N1, -N2 oder -N3). Alle EGFP-Vektoren weisen ein Kanamycin-Resistenzgen auf.

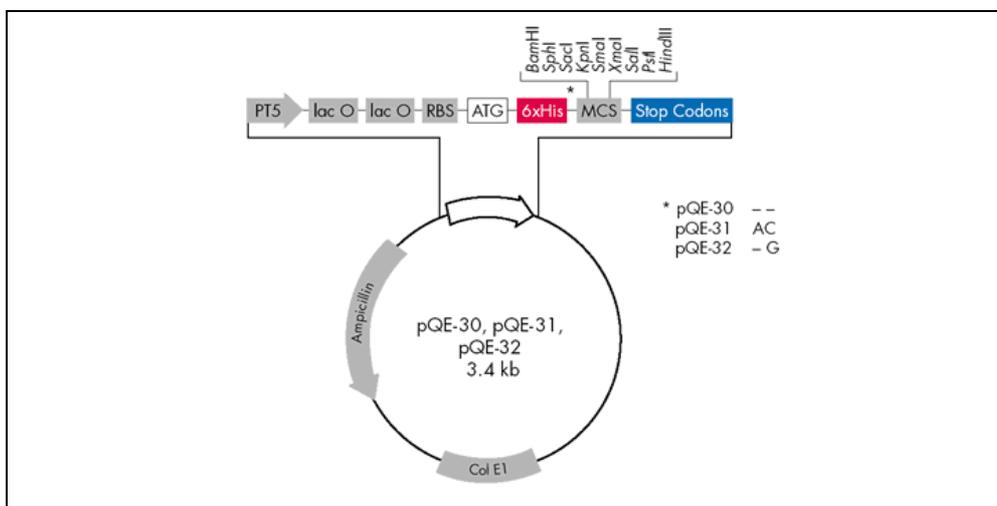
### 3.3.1.6 pQC6xHis, zur Verfügung gestellt von Prof. Zentgraf, Heidelberg



**Abbildung 3-6:** Vektorinformation zu pQC6xHis, zur Verfügung gestellt von Prof. Hanswalter Zentgraf, Heidelberg

Dieser Expressionsvektor ist ein Derivat des kommerziell erhältlichen Vektors pQE-8 von Qiagen GmbH, Hilden. Der Vektor wurde im Labor von Prof. Hanswalter Zentgraf verändert, so dass nun am Carboxyterminus des zu exprimierenden Gens sechsmal hintereinander die Aminosäure Histidin angefügt wird. Der Vektor ist für die Expression in Bakterienzellen optimiert und verfügt über eine Ampicillin-Kassette. Durch Zugabe des künstlichen Induktors Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) wird das Lactose-Operon aktiviert, und das Protein mit dem 6-fachen Histidin-Epitop von den Bakterienzellen exprimiert. Dieser His-Tag ist stark immunreaktiv und sehr gut für eine Proteinaufreinigung über eine Ni-NTA-Säule geeignet.

### 3.3.1.7 pQE-30, -31, -32 Qiagen, Hilden



**Abbildung 3-7:** Vektorinformation zu pQE-30, -31, -32; Qiagen, Hilden.

Der Vektor pQE-30 ist ein Teil des QIAexpress™ Systems der Firma Qiagen, Hilden. Ebenso wie bei den EGFP-Vektoren existieren auch hier verschiedenen Leseraster. Die inserierte cDNA wird als Fusionsprotein mit einem N-terminalen „6xHis-Tag“ exprimiert. Durch die Bindung der Histidine an eine Nickelsäule kann das in Bakterien exprimierte Protein aufgereinigt werden. Der Vektor besitzt eine Ampicillin-Resistenz.

### 3.3.2 Enzyme

Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Collagenase	Sigma-Aldrich, München
DNase I	Roche, Mannheim
Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase	Finnzymes, Frankfurt/Main
Pfu-DNA-Polymerase	Institutseigene Herstellung
Proteinase K	Serva, Heidelberg
Reverse Transkriptase MMULV	Promega, Mannheim
Restriktionsenzyme, div.	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot; New England Biolabs, Frankfurt/Main
Ribonuklease Inhibitor	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
RNase A	Serva, Heidelberg
T4-DNA-Ligase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T7-RNA-Polymerase	Roche, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Institutseigene Herstellung
Trypsin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe

### 3.3.3 Oligonukleotide

Die für die DNA-Amplifikationen verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurde bei der Firma biomers.net GmbH (Ulm) bestellt. Oligo(dT)-Primer für die RT-PCR wurden von der Firma Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) bezogen.

### 3.3.4 Größenstandards

Lambda DNA/EcoRI+HindIII, Marker 3	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
FastRuler™ DNA Ladder, Middle Range	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Precision Plus Protein™ Standards, Dual Color	Bio-Rad, München

### 3.3.5 Kits und Kitsbestandteile

ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Amersham ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit	Amersham, Braunschweig
CNBr-aktivierte Sepharose	Amersham, Braunschweig
E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Effectene™ Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Lipofectamine™ Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Protein-A Sepharose	Amersham, Braunschweig
QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
TOPO® - Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
TNT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems	Promega GmbH, Mannheim

## 3.4 Chemikalien

Wenn nicht anders aufgeführt, wurden alle Chemikalien und Lösungen bei folgenden Firmen eingekauft: Applichem (Darmstadt), Calbiochem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Fluka (Berlin) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen). Sofern es notwendig war, wurden sie in Analysenqualität angewendet. In technischer Qualität wurden Ethanol und Methanol für die Wasch- und Entfärbelösungen sowie für die Blottingpuffer eingesetzt.

### 3.5 Geräte

Biophotometer  
Brutschrank, CO<sub>2</sub>-Auto-Zero  
Drehtisch, regelbar  
Drystar Gelrockner  
Elektrophorese System für Minigele  
Eisbereiter  
Feinwaage AC 100  
Flachbettscanner, X-Finity Pro 42  
Fluoreszenzmikroskop Axiophot Stereo HB050 mit Quecksilberlampe  
Gefriermikrotom 2800 Figocut E  
Gewebekulturschalen  
Graphit-Blottingkammer  
Heizblock  
Homogenisator RW20  
Hybridisierungsöfen MINI 10  
Kippschüttler WS5  
Konfokales Laserscanning Mikroskop (CLSM)  
Kühlschrank  
Kühlzentrifuge  
Kühlzentrifuge RC5B  
Kühlzentrifuge Minifuge RF und GL  
Laborwaage PB3002 DeltaRange®  
Lichtmikroskop (Zellkultur)  
Magnetrührer M35  
Netzgerät, stabilisiert  
pH-Meter pH 525  
Pipetten  
Proteingelkammer Mini V8  
Powersupply ECPS 3000/150  
Schlittenmikrotom  
Sequenzierer ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser  
Schüttler Certomat R und S  
  
Schwenktisch 3013  
Sofortbildkamera  
Sonifier B12  
  
Stereomikroskop Wild M8  
Sterilbank Steril GARD Hood Class III  
Thermocycler  
Thermocycler Gradient  
Thermocycler TECHNE PROGENE  
Tiefkühlschrank (-20°C)  
Tiefkühltruhe (-70°C) C585  
Tischzentrifuge Sigma  
Tischzentrifuge 5414 R, kühlbar  
Ultramikrotom Microm HM500 OM  
Ultra-Thurrax®  
Ultrazentrifugen LB-70  
Umkehrmikroskop IM35  
UV-Stratalinker  
UV-Transilluminator Typ IL-350.M  
Vortex L46  
Wasserbad WTH 500  
  
Eppendorf, Hamburg  
Heraeus-Holding, Hanau  
Heidolph, über Hartenstein, Würzburg  
H. Hözl GmbH, über Hartenstein, Würzburg  
Bio-Rad, München  
Scotsman, über Hartenstein, Würzburg  
Mettler, Düsseldorf  
Quatographic Technology GmbH (Braunschweig)  
Zeiss, Oberkochen  
  
Reichert-Jung  
Greiner Labortechnik, Fickenhausen  
Cti, über Hartenstein, Würzburg  
Liebisch, über Hartenstein, Würzburg  
Janke & Kunkel, über Hartenstein, Würzburg  
Thermo Hybaid, Ulm  
Edmund Bühler, Tübingen  
Leica Lasertechnik GmbH, Heidelberg  
Liebherr, Bieberach  
Eppendorf, Hamburg  
Sorvall, Du Pont, Badhomburg  
Heraeus-Christ, Osterode  
Mettler, Düsseldorf  
Leitz, Wetzlar  
GLW, Würzburg  
Fischer, über Hartenstein, Würzburg  
WTW, über Hartenstein, Würzburg  
Eppendorf, Hamburg  
Gibco BRL, Karlsruhe  
Pharmacia, über Hartenstein, Würzburg  
Leitz, Wetzlar  
Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt  
B. Braun Biotech International, über Hartenstein, Würzburg  
GLF, über Hartenstein, Würzburg  
Polaroid  
Branson Sonic Power Company, über Gerhard  
Heinemann, Schwäbisch Gmünd  
Leica, Heidelberg  
Müller Labortechnik, Windhagen  
Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen  
Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen  
Über Thermo-Dux, Wertheim  
Privileg, Quelle  
New Brunswick Scientific,  
Heraeus-Christ, Osterode  
Eppendorf, Hamburg  
Zeiss, Oberkochen  
Bachhofer, Reutlingen  
Beckman Instruments GmbH, München  
Zeiss, Oberkochen  
Stratagene Europe, Amsterdam  
Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen  
GLW, über Hartenstein, Würzburg  
Köttermann, über Hartenstein, Würzburg

## 4 Methoden

### 4.1 Mikrobiologische Methoden

#### 4.1.1 Flüssigkultur von Bakterien

*Erforderliche Lösungen:*

LB-Medium (Luria Bertami) 1L:

10 g Bacto™ Trypton (BD)  
5 g Hefeextrakt (Roth)  
10 g NaCl  
⇒ pH 7.5 (NaOH)  
⇒ autoklavieren

Antibiotika-Stammlösungen:

100 mg/mL	in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	Ampicillin
50 mg/mL	in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	Kanamycin
15 mg/mL	in Isopropanol (100%, p.a.)	Tetracyclin

*Durchführung:*

Für eine Übernachtkultur (ÜNK) wurden etwa 7 mL Medium in einem Falconröhrchen eingefüllt. Zur Selektion der sich vermehrenden Bakterienzellen wurde ein Antibiotikum zugegeben. Ampicillin wurde in einer Endkonzentration von 100 µg/mL eingesetzt, Kanamycin wurde mit einer Konzentration von 50 µg/mL und Tetracyclin mit einer Konzentration von 15 µg/mL verwendet. Zum Animpfen des Selektionsmediums wurden mit einer keimfreien Pipettenspitze entweder Bakterienzellen aus einer Glycerinkultur oder durch eine Bakterienkolonie von einer LB-Agar-Selektionsplatte übertragen. Die Lösung wurde anschließend bei 37°C über Nacht mit 200 Umdrehungen pro Minute (rpm) geschüttelt. Für größere Volumina oder für *in vivo* Expressionskulturen wurde zunächst - wie soeben beschrieben - eine ÜNK angesetzt. Am nächsten Tag wurde die Großkultur mit einem Zehntel ihres Eigenvolumens mit einer ÜNK angeimpft.

#### 4.1.2 Bestimmung der Bakteriendichte einer Flüssigkultur durch photometrische Messung

Zur Bestimmung der Zelldichte wurde der Extinktionskoeffizient einer Bakterienlösung bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht bei einer Messküvette mit einer Dicke von einem Zentimeter annähernd  $8 \cdot 10^8$  Zellen pro Milliliter. Als Referenzwert wird steriles Selektionsmedium eingesetzt.

#### 4.1.3 Glycerinkultur

Glycerinkulturen werden zum Aufbewahren von Bakterienzellen über einen längeren Zeitraum verwendet. 830 µL einer Übernachtkultur werden mit 170 µL des Frostschutzmittels Glycerin versetzt, gemischt und anschließend bei -70°C aufbewahrt. Ausgehend von dieser Glycerinkultur konnte jederzeit eine neue ÜNK angeimpft werden, indem mit einer sterilen Pipettenspitze etwas eingefrorenes Bakterienmaterial in ein mit Selektionsmedium gefülltes Falconröhrchen übertragen wurde.

#### 4.1.4 Herstellung von LB-Agar-Selektionsplatten

Um Agarplatten herzustellen, wurde 1 % (w/v) Agar-Agar (Roth, Karlsruhe) in LB-Medium eingewogen und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde das Gemisch abgekühlt und bei etwa 50°C das entsprechende Antibiotikum zugegeben; Die Endkonzentration von Ampicillin betrug 100 mg/mL, die von Kanamycin 50 mg/mL und von Tetracyclin 15 mg/mL. Die Antibiotika-haltige Agarlösung wurde nun zügig in sterile Petrischalen gegossen und bis zum vollständigen Auspendern bei Raumtemperatur abkühlen lassen. Nach Festwerden der Lösung wurden die Schalen um 180° gedreht und das sich bildende Kondenswasser während den folgenden 6 Stunden bei Raumtemperatur abtrocknen lassen. Anschließend konnten die Platten bei 4°C für etwa 4 Wochen aufbewahrt und verwendet werden.

Um Bakterienwachstum auf den Selektionsplatten zu ermöglichen, wurden etwa 100 µL einer Flüssigkultur auf die Platte pipettiert und mit einem abgeflamten Drygalski-Spatel aufgebracht. Alternativ zu dieser Methode ist es auch möglich, Bakterien mit einer ausgeglühten Impföse auf einer Platte auszustreichen.

### 4.1.5 Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien

Damit Bakterien Klonierungsvektoren aus ihrer Umgebung aufnehmen, müssen sie dafür kompetent sein. Dies wird durch eine Modifikation ihrer Zellmembran, die eine Lipiddoppelschicht darstellt, erreicht (Chung et al., 1989).

#### *Erforderliche Lösungen:*

- LB-Medium (siehe oben)
- Tetracyclin: 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in Isopropanol (100%, p.a.)

TSS (Transformation and Storage Solution):

LB-Medium  
+ 10 % (w/v) PEG 3350  
+ 5 % (v/v) DMSO  
+ 50 mM  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{MgSO}_4$  oder  $\text{MgCl}_2$ )  
⇒ pH 6.5  
⇒ sterilfiltrieren und aliquotiert lagern bei  $-20^\circ\text{C}$

#### *Durchführung:*

Zunächst wurde ein Bakterienstamm (z. B. XL1-blue) mit einer Impföse aus einer Glycerinkultur auf einer entsprechenden Selektionsplatte (z. B. 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Tetracyclin) ausgestrichen. Am folgenden Tag wurde mit einer Einzelkolonie eine ÜNK angeimpft und bei  $37^\circ\text{C}$  und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 250 mL Selektionsmedium (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Tetracyclin) mit einem Zehntel des Eigenvolumens aus der ÜNK angeimpft. Die Bakterien wurden nun bei  $37^\circ\text{C}$  und unter Schütteln (200 rpm) für etwa 4 Stunden bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0.7 bis 0.8 vermehrt. Die Bakterienzellen wurden in 250 mL Zentrifugenbechern bei 1.000 g und  $4^\circ\text{C}$  für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment in 2,5 mL eiskaltem TSS aufgenommen und gründlich resuspendiert. Das Bakteriengemisch wurde in 100  $\mu\text{L}$  Portionen in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße aliquotiert, und umgehend in flüssigem Stickstoff schock-gefroren. Die kompetenten Bakterien konnten nun mehrere Wochen bei  $-70^\circ\text{C}$  aufbewahrt werden.

#### 4.1.5.1 Bestimmung der erreichten Kompetenz

Die erzielte Kompetenz der Bakterienzellen kann mit folgender mathematischer Gleichung berechnet werden: Anzahl der nach der Transformation Kolonie bildenden Bakterieneinheiten („colony forming units“ = cfu) dividiert durch die eingesetzte Menge an Plasmid-DNA in Mikrogramm. Wünschenswert ist ein Wert von  $10^7$ - $10^9$  cfu/ $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA, in Bezug auf den pUC18-Vektor.

Um die Kompetenz der Bakterienzellen möglichst genau zu berechnen, wurden 10, 100 und 1.000 pg der pUC18-Vektor-DNA in die Bakterien transformiert (Transformation von Bakterien siehe 4.1.5.2), die sich auf den Selektionsplatten bildenden Kolonien ausgezählt und daraus die Transformationsrate für 1  $\mu\text{g}$  DNA des pUC18-Vektors extrapoliert.

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

Ein Aliquot chemisch kompetenter Bakterienzellen (100  $\mu\text{L}$ ) wird auf Eis aufgetaut und mit 50-200 ng Plasmid-DNA vermischt und 60 Minuten auf Eis ruhen lassen. Der Ansatz wurde anschließend für 30 Sekunden einem Hitzeschock bei  $42^\circ\text{C}$  ausgesetzt und sofort wieder für 2 Minuten auf Eis gestellt. Im Anschluss wurde dem Aliquot 900  $\mu\text{L}$  LB-Medium ohne Antibiotika-Zusätze zugegeben, und das Gemisch 1 Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  und 200 rpm geschüttelt. Nach dieser Zeit wurden die Bakterienzellen für 5 Minuten bei 1.500 g sedimentiert, der Überstand bis auf etwa 100  $\mu\text{L}$  abgenommen und das Pellet in diesem Volumen resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension auf eine entsprechende Selektionsplatte, die sich nach dem jeweiligen Antibiotikum-Gen auf dem transformierten DNA-Vektor richtet, mit einem Drygalski-Spatel ausplattiert.

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1 Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben

#### *Erforderliche Lösungen:*

peqGOLD TriFast™: Phenol-Reagenz zur gleichzeitigen Isolation von RNA, DNA und Proteinen

Chloroform (frei von Zusätzen wie Isoamylalkohol)

Isopropanol

PBS (pH 7.4):	140 mM	NaCl
	6,4 mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
	2,6 mM	KCl
	1,4 mM	$\text{KH}_2\text{PO}_4$

75 % Ethanol

DEPC-H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> mit 0,1 % DEPC versetzen, unter Rühren über Nacht bei 37°C inkubieren und anschließend autoklavieren.

peqGOLD TriFast™ kann für die nacheinander abfolgende Extraktion von RNA, DNA und Proteinen aus ein und demselben Ausgangsmaterial verwendet werden. Die Isolierungsmethode (Chomczynski and Sacchi, 1987) von Gesamt-RNA aus Zellen oder Geweben verbindet die Zell-Lyse und RNA-Extraktion in einem Arbeitsschritt. peqGOLD Trifast™ besteht aus einer einphasigen Lösung aus Guanidinisothiocyanat und Phenol. Nach der Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich das in der Lösung homogenisierte organische Material in drei Phasen, wobei die RNA und die DNA im oberen wässrigen Überstand angesammelt wird, Proteine dagegen in der unteren organischen Phase enthalten sind. Die Ausführung erfolgte nach der Arbeitsanweisung des Herstellers.

Kulturzellen, die in einer 3,5 cm-Minischale bis zu einem Wachstum von 75 %iger Konfluenz (etwa 1 · 10<sup>6</sup> Zellen) kultiviert wurden, wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 1 mL TriFast™ durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren lysiert.

Um RNA aus Embryonen zu isolieren, wurden 10 Embryonen in 750 µL TriFast™ mit einem Eppendorf-Teflon-Homogenisator homogenisiert.

### 4.2.2 Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Ausbeute der isolierten RNA wurde durch Absorptionsmessung photometrisch bestimmt. Die 1:100 verdünnte RNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht dabei einer Menge von etwa 40 µg/mL RNA. Das Verhältnis OD<sub>260</sub> zu OD<sub>280</sub> gibt über die Reinheit der isolierten Ribonukleinsäure Auskunft, da Proteine bei 280 nm absorbieren. Die Ratio von aufgereinigter RNA sollte bei Werten zwischen 1.8 und 2.0 liegen. Die Absorption bei 230 nm Wellenlänge gibt Auskunft über Verunreinigung durch aromatische Verbindungen, Phenol, Peptide oder Kohlenhydrate. Der Quotient OD<sub>230</sub> über OD<sub>280</sub> sollte bei reinen Proben einen Wert von annähernd 2.2 betragen. Die Messwerte von verwendeten RNAs lagen immer im Bereich der erforderlichen Ratio.

Auch die Konzentration von dsDNA –in der Regel Plasmide– wurde photometrisch bestimmt. Die Messungen wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Eine OD von 1 entspricht bei dsDNA ca. 50 µg/mL. Gereinigte DNA sollte ein Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> von etwa 1.8 aufweisen.

	<b>OD<sub>260</sub> = 1 entspricht</b>	<b>OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> ≥</b>	<b>OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> ≥</b>
<b>dsDNA</b>	50 µg/mL	1.8	2.2
<b>ssDNA</b>	37 µg/mL	1.8	2.2
<b>RNA</b>	40 µg/mL	2.0	2.2
<b>Oligonukleotide</b>	30 µg/mL	1.8	2.2

### 4.2.3 Reverse Transkription

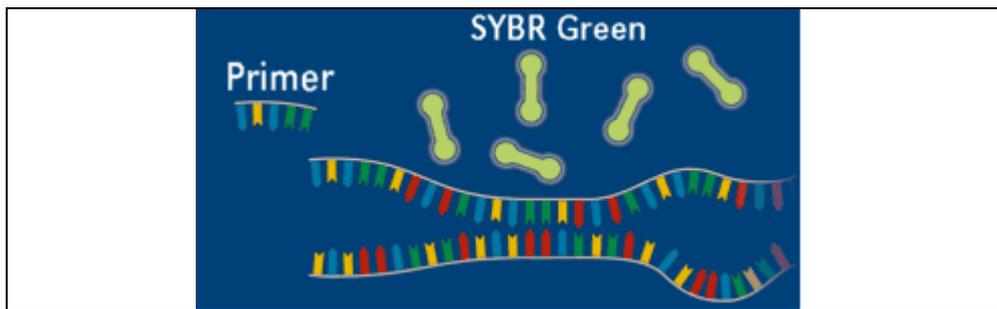
Die Reverse Transkription wurde verwendet, um die Anwesenheit von bestimmten mRNAs in Embryonen, die verschiedene Entwicklungsstadien erreicht hatten, nachzuweisen. Die Anwesenheit einer mRNA zeigt an, ob das entsprechende Gen zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Entwicklung angeschaltet ist. Der Nachweis erfolgte mit zwei Testverfahren: der quantitativen Realtime-PCR oder der klassischen RT-PCR.

### 4.2.4 Realtime-(Quantitative) PCR

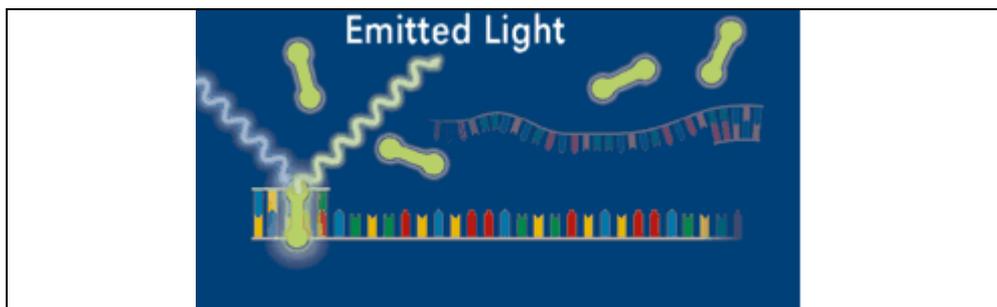
Die Realtime-PCR stellt die modernste Methode der Quantifizierung von Nukleinsäuren dar. Hierbei werden nicht absolute Mengen an PCR-Produkt gemessen, sondern es wird die Kinetik der PCR-Reaktion ausgenutzt: in den frühen Zyklen treten meist nur nicht-detektierbare Mengen an PCR-Produkt auf, und auch die späten Zyklen (sog. Plateauphase) sind weitgehend uninformativ. Die quantitative Information in einer PCR-Reaktion wird von den wenigen Zyklen geliefert, in denen die DNA-Menge logarithmisch vom Background bis in die Plateauphase hinein ansteigt. Oft fallen nur 4 oder 5 von 40 Zyklen in diesen "log-linearen" Teil der Kurve. Die Information aus diesen wenigen Zyklen wird dadurch erhalten, dass die Probe in Aliquots unterteilt und nach jedem Zyklus eines dieser Aliquots entnommen wird. Über eine gelelektrophoretische Auftrennung wird der Anteil an PCR-Produkt mittels Fluoreszenzfärbung des Gels quantifiziert. Zum Färben des Gels wird entweder Ethidiumbromid oder SYBR®GREEN I verwendet. Beide Farbstoffe interkalieren in doppelsträngige DNA und können so PCR-Produkte sichtbar machen. Die Helligkeit des Fluoreszenzsignals wird gemessen und die Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl in einem Diagramm aufgetragen. Durch die Mitführung von Standardwerten mit bekannten DNA-Konzentrationen können DNA-Mengen anhand der gemessenen Fluoreszenzsignale quantifiziert werden.

Die Quantifizierung mit Hilfe eines LightCyclers™ vereinfacht diesen Prozess. Die Fluoreszenz der Proben wird kontinuierlich nach jedem Zyklus gemessen. Es wird SYBR®GREEN I eingesetzt, einen Farbstoff, der vermutlich

in die kleine Furche der DNA bindet. SYBR®GREEN I besitzt im nicht gebundenen Zustand eine relativ niedrige Fluoreszenz.

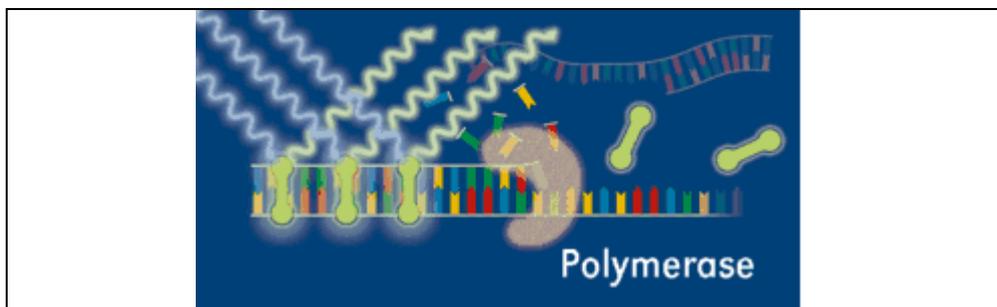


**Abbildung 4-1:** Der Reaktionsansatz enthält dsDNA, Primer und SYBR®GREEN I.



**Abbildung 4-2:** SYBR®GREEN I interkaliert in dsDNA und emittiert Licht.

Wenn die DNA-Menge in der PCR-Reaktion ansteigt, steigt proportional auch die Fluoreszenz des Farbstoffs.



**Abbildung 4-3:** Die DNA-Polymerase synthetisiert DNA, es interkaliert mehr SYBR®GREEN I und die Fluoreszenz steigt.

SYBR®GREEN I ist einfach zu verwenden, da es keine Sequenzspezifität besitzt, dadurch aber auch an jedes doppelsträngige Produkt bindet, egal ob es sich dabei um das gewünschte Produkt oder ein unspezifisches Nebenprodukt handelt. Um ausschließen zu können, dass die Fluoreszenz aus unspezifischen Nebenprodukten resultiert, wird im Anschluss an die PCR-Reaktion eine Schmelzkurve durchgeführt. Ist die Schmelztemperatur des gewünschten Produkts erreicht, kann eine starke Verringerung des Fluoreszenzlevels detektiert werden. Unspezifische Produkte schmelzen meist bei niedrigeren Temperaturen als die längeren spezifischen Produkte. Dies ermöglicht es Fluoreszenzsignale aus unspezifischen Produkten aus der Messung auszuschließen.

### 4.2.4.1 Reaktionsansatz für Realtime-PCR

10x Reaktionspuffer	5,0 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	3,5 µl
dNTPs 5,0 mM	2,0 µl
Forward Primer (100 µM)	0,5 µl
Reverse Primer (100 µM)	0,5 µl
Hot GoldStar Polymerase (0,025 U/µl)	0,25 µl
SYBR®GREEN I stock (1/2000 in DMSO)	1,5 µl
Template	4,0 µl

⇒ auf 50 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> auffüllen

### 4.2.4.2 Standardbedingungen für Realtime-PCR

10 min.	94°C	first delay
40 Zyklen		
15 s	94°C	
1 min.	60°C	

### 4.2.5 Klassische RT-PCR

Die RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion) besteht aus zwei Arbeitsschritten. Im ersten Abschnitt wird die mRNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben. Da eukaryontische mRNA ausschließlich aus Exons besteht, unterscheidet sich die so hergestellte DNA von genomischer DNA, die zusätzlich nicht-kodierende intronische DNA-Abschnitte enthält. Die durch die Reverse Transkription synthetisierte DNA wird aus diesem Grund auch als cDNA bezeichnet, wobei das „c“ für „complementary“ steht. Diese Arbeitstechnik kann zum Nachweis eines Gens, das zu einem bestimmten Zeitpunkt aktiviert ist, verwendet werden. Dabei wird die Anwesenheit einer bestimmten mRNA –das unmittelbare Produkt eines angeschalteten Gens– mit Hilfe von spezifischen Primern nachgewiesen.

Pipettierschema für eine RT-Reaktion (20 µL):

Zu 1 µg Gesamt-RNA wurde 1 µL Oligo(dT)Primer pipettiert und mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 8 µL Endvolumen aufgefüllt, 5 Minuten bei 70°C erhitzt und abschließend folgende Lösungen zugesetzt:

1 µL	RNase Inhibitor (40 U/µL, MBI Fermentas GmbH)
4 µL	5-facher RT-Puffer Promega)
1 µL	dNTPs (10 mM je Nukleotid, MBI Fermentas GmbH)
1 µL	Reverse Transkriptase MMULV (200 U/µL, Promega)
5 µL	DEPC-H <sub>2</sub> O

Nach gründlichem Durchmischen des Ansatzes fand die Synthese-Reaktion für 1 Stunde bei 42°C statt. Die Reverse Transkriptase wurde im Anschluss durch eine 5-minütige Erhitzung bei 95°C inaktiviert. Die cDNA wurde entweder direkt anschließend in einer PCR eingesetzt oder kurzfristig bei -20°C aufbewahrt. Für die PCR-Amplifikation wurden stets 2 µL cDNA eingesetzt.

### 4.2.6 Vermehrung von DNA-Abschnitten durch die PCR (Polymerase Kettenreaktion)

Mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, bestimmte DNA-Abschnitte millionenfach *in vitro* zu vervielfältigen. Die Grenzen der zu kopierenden Nukleinsäurebereiche werden durch kurze, künstlich hergestellte DNA-Stücke, so genannte Oligonukleotid-Primern, eingefasst. Die Arbeitstechnik basiert auf einer sich zyklisch wiederholenden Einzelstrang-DNA-Synthese durch thermostabile DNA-Polymerasen, die aus thermophilen Archaeobakterien (wie z. B. *Thermus aquaticus*) isoliert wurden. Neben den Primern benötigt die Polymerase Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), die Grundbausteine eines DNA-Moleküls. Ein PCR-Zyklus gliedert sich in drei charakteristische Schritte:

- (1) Denaturierung (= „Aufschmelzen“) des DNA-Doppelstrangs bei 95°C.
  - (2) Annealing (= „Anlagerung“) der im Überschuss vorliegenden Oligonukleotid-Primer bei 50 – 60°C; die Primer bilden das 5'-Ende der neu zu synthetisierenden Komplementärstränge.
  - (3) Elongation (= „Verlängerung“) des komplementären Tochterstrangs durch die DNA-Polymerase bei 72°C.
- Nach wiederholtem Denaturierungsschritt (1) bilden nun die beiden neu gebildeten DNA-Abschnitte ihrerseits eine Matrize aus. Durch die Dublettierung der DNA nach jedem Zyklusdurchlauf kommt es zu einer exponentiellen Anreicherung des gewünschten DNA-Fragmentes (2<sup>n</sup>), wobei „n“ die Anzahl der Zyklusdurchläufe widerspiegelt. Im Normalfall wird ein PCR-Zyklus 25-35 Mal wiederholt.

#### *Durchführung der PCR*

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Taq-Polymerase verwendet. Das Enzym wurde entweder von der Firma Promega (Mannheim) bezogen oder am Institut selbst hergestellt. Die Taq-Polymerase besitzt die Fähigkeit, am 3'-Ende des PCR-Produkts Adenosin-Überhänge anzufügen. Sie arbeitet mit einer Syntheseleistung von ca. 1000 Basen pro Minute und besitzt keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (Fehlerkorrektur).

Für die Klonierung in Expressionsvektoren oder bei der Erzeugung von Punktmutationen mussten amplifizierte DNA-Bereiche ein hohes Maß an Genauigkeit bezüglich des Ausgangstemplates aufweisen. Zu diesem Zweck wurden DNA-Polymerasen mit einer Korrekturlese (Proofreading)-Funktion herangezogen. Es wurde zum einen mit der Pfu-Polymerase (Promega/eigene Herstellung) aus *Pyrococcus furiosus* gearbeitet, die eine niedrigere Syntheseleistung von 500 Basen pro Minute aufweist. Zum anderen wurde die High Fidelity Polymerase Phusion™ (Finnzymes) verwendet, die eine 6fach niedrigere Fehlerrate wie die Pfu-Polymerase aufweist, dabei jedoch 8fach schneller arbeitet. Es handelt sich um bei dem Enzym um eine optimierte Form der Pfu-Polymerase. Die

## Methoden

---

jeweiligen Syntheseleistungen der verschiedenen DNA-Polymerasen mussten bei der Bestimmung der Elongationszeiten einer PCR berücksichtigt werden.

### *Pipettierschema für Taq-Polymerase (50 µL-Ansatz):*

4 µL	Template-DNA	(5 ng Plasmid-DNA, 100 ng cDNA)
	MgCl <sub>2</sub>	(25 mM)
5 µL	Taq-DNA-Polymerase 10-fach Puffer	(Promega, eigene Herstellung)
1 µL	dNTP-Mix	(10 mM SL je Nukleotid, MBI)
1 µL	5'-Primer	(10 <sup>pmol</sup> /µL SL, biomers.net GmbH)
1 µL	3'-Primer	(10 <sup>pmol</sup> /µL SL, biomers.net GmbH)
0,2 µL	Taq-DNA-Polymerase	(5 <sup>U</sup> /µL, Promega, eigene Herstellung)
auf 50 µL	mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> auffüllen	

### *Pipettierschema für Pfu-Polymerase (50 µL-Ansatz):*

5-100 ng	Template-DNA	
5 µL	Pfu-DNA-Polymerase 10-fach Puffer mit MgSO <sub>4</sub>	(Promega, eigene Herstellung)
1 µL	dNTP-Mix	(10 mM SL je Nukleotid, MBI)
1 µL	5'-Primer	(10 <sup>pmol</sup> /µL SL, biomers.net GmbH)
1 µL	3'-Primer	(10 <sup>pmol</sup> /µL SL, biomers.net GmbH)
1 µL	Taq-DNA-Polymerase	(3 <sup>U</sup> /µL, Promega, eigene Herstellung)
auf 50 µL	mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> auffüllen	

Der Ansatz wurde auf Eis in einem 0,5 mL-PCR-Reaktionsgefäß zusammen pipettiert, wobei die DNA-Polymerase zum Schluss zugegeben wurde. Der Ansatz wurde gründlich vermischt, abzentrifugiert und in einer PCR-Maschine mit folgendem Programm erhitzt:

	Initiale Denaturierung	2 min	96°C
	Denaturierung	30 sec	96°C
25 - 35	Primer-Annealing	30 sec	(Temperatur je nach Primer)
Zyklen	Elongation	1 min pro 1000 Basen (Taq)	72°C
		1 min pro 500 Basen (Pfu)	68°C
	Finale Elongation	5 min	72°C
	Kühlung	∞	8°C

Die Auswertung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1%igen Agarose-Gel (siehe 4.2.15).

### 4.2.7 Primer und Primerdesign

Der Erfolg einer PCR hängt im Wesentlichen von den verwendeten Primern ab, an die gewisse Anforderungen gestellt werden müssen: Zum einen sollten sie nicht mit sich selbst hybridisieren oder an den anderen Primer binden können. Zum anderen sollten sie insbesondere im 3'-Bereich keine Haarnadelstrukturen ausbilden und ihre komplementäre Sequenz darf auf der eingesetzten DNA nur einmal vorkommen. Es sollte darauf geachtet werden, dass die Schmelztemperatur der beiden eingesetzten Primer etwa gleich hoch sind und der G/C-Gehalt ihrer Sequenzen zwischen 40 – 60 % liegt. Zur Berechnung der Schmelztemperatur kann folgende empirische Formel herangezogen werden:

$$T_m = 4 \sum (G,C) + 2 \sum (A,T) - 5$$

Zur Insertion eines PCR-Produkts in einen Klonierungsvektor, wurden an die 5'-Enden der Primer geeignete Schnittstellen für spezifische Restriktionsenzyme angehängt. Zusätzlich zur Schnittstellensequenz wurden bis zu drei weitere Basen angehängt, um ein einwandfreies Schneiden der Enzyme zu gewährleisten. Die veränderte Schmelztemperatur, die durch das Anfügen von Schnittstellen resultierte, wurde nach 5 Zyklen bei der Annealingtemperatur berücksichtigt und dementsprechend erhöht. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden mit der Software „OLIGO“ designt und von der Firma biomers.net GmbH (Ulm) in Kartuschen-gereinigter Qualität bezogen.

### 4.2.8 Kolonie-PCR

Nach der Klonierung von DNA-Fragmenten in Klonierungsvektoren wurden selektierte Bakterienkolonien mit einer Kolonie-PCR auf eine erfolgreiche Ligation hin überprüft. Außerdem ist es mit dieser Methode möglich, die Orientierung des inklonierten DNA-Fragments festzustellen. In der PCR-Reaktion wurde statt isolierter DNA gepickte Bakterienzellen als „Template“ eingesetzt und mit geeigneten Primern überprüft, ob das DNA-Fragment

## Methoden

---

in den Vektor inseriert war (5'- und 3'-Primer binden im flankierenden MCS-Bereich) und welche Orientierung das DNA-Insert hatte (5'-Primer bindet im Vektor, 3'-Primer im Insert, oder umgekehrt. Für diese Ansätze wurde im Allgemeinen die Instituts-eigene Taq-Polymerase eingesetzt.

*Pipettierschema für eine Kolonie-PCR (25 µL-Ansatz):*

2 µL	Bakterien-Suspension	
2 µL	MgCl <sub>2</sub>	(25 mM)
2,5 µL	Taq-DNA-Polymerase 10-fach Puffer	(eigene Herstellung)
0,5 µL	dNTP-Mix	(10 mM SL je Nukleotid, MBI)
0,5 µL	5'-Primer	(10 <sup>pmol</sup> /µL SL, biomers.net GmbH)
0,5 µL	3'-Primer	(10 <sup>pmol</sup> /µL SL, biomers.net GmbH)
0,2 µL	Taq-DNA-Polymerase	(5 <sup>U</sup> /µL, eigene Herstellung)
auf 25 µL	mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> auffüllen	

*Durchführung:*

Zunächst wurde je nach Anzahl der zu überprüfenden Bakterienklone ein „Master-Mix“ des 25 µL-Ansatzes angesetzt, der auf PCR-Reaktionsgefäße verteilt wurde. Die zu testende Bakterienkolonie wurde von einer LB-Agar-Selektionsplatte mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt. Mit der Spitze wurde ein Teil der Bakterienzellen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in einem geringen Volumen (6 µL) LB-Selektionsmedium resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 2 µL als Template im PCR-Ansatz eingesetzt. Die verbliebenen 4 µL Bakteriensuspension wurden mit 16 µL LB-Selektionsmedium ergänzt und während der PCR-Zeit bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Nach der Auswertung der PCR-Produkte konnte aus dieser Mini-Bakterienkultur direkt eine Übernachtskultur angeimpft werden. Programm für die PCR-Maschine siehe 4.2.10 (Initiale Denaturierung erfolgte 5 Minuten lang, zum Aufkochen der Bakterien).

### 4.2.9 Punktmutagenese

Zum Erzeugen einer Punktmutation (Insertion bzw. Deletion einer Base) in einer DNA-Sequenz wurde nach einer Arbeitsanleitung des QuickChange® Site-Directed Mutagenese Kit (Stratagene) gearbeitet. Dazu wird ein Primerpaar benötigt, das die gewünschte Mutation aufweist. Die Mutationsstelle wird zu beiden Seiten von ca. 15 Basen flankiert. Der zu mutierende DNA-Bereich muss in einem Klonierungsvektor inseriert sein. Die Primer binden an die komplementären DNA-Bereiche (mit Ausnahme der punktmultierten Stelle). In einer PCR-Reaktion verlängert eine Pfu-DNA-Polymerase die Primer und synthetisiert die DNA-Stränge des gesamten Vektors. Durch den Einbau der Primer entsteht ein mutiertes Plasmid mit versetzten Lücken. Anschließend wird der PCR-Ansatz (50 µL) mit der DNA-Endonuklease *Dpn*I (0,5 µL = 2.5<sup>U</sup>/µL) für 1 Stunde bei 37°C verdaut. *Dpn*I schneidet spezifisch methylierte und hemi-methylierte DNA und wird zum Entfernen des parentalen DNA-Templates verwendet. Plasmid-DNA, die aus *E.coli*-Bakterien isoliert wurde, ist immer methyliert und kann deswegen von *Dpn*I beseitigt werden. Deshalb werden nur die Template-DNA oder Hybride aus einem mutierten und einem Template-Strang verdaut, nicht aber die mutierten Plasmide. Nach einer 15-minütigen Hitzeinaktivierung (85°C) der Endonuklease *Dpn*I wurde der zurückbleibende Vektor, der die gewünschte Punktmutation im Insert enthält, in kompetente XL1-Blue Bakterienzellen transformiert und vermehrt. Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA isoliert und mit geeigneten Primern sequenziert. Die Punktmutagenese wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 4.2.10 Primerdesign für eine Punktmutagenese

Die Primer einer punktgerichteten Mutagenese müssen nachfolgende Eigenschaften aufweisen:

- 5'- und 3'-Primer müssen die gewünschte Mutation enthalten und jeweils an dieselbe Sequenz der komplementären DNA-Stränge binden.
- Die Primer müssen eine Länge von 25 – 45 Basen aufweisen und ihre Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) sollte mindestens 78°C betragen.
- Für die Berechnung der Schmelztemperatur von Primern zur Herstellung von Punktmutanten wurde diese Formel benutzt:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$$

N = Länge des Primers in Basen

% GC = GC-Gehalt in ganzen Zahlen

% mismatch = Anteil an Nichtpaarungen in ganzen Zahlen

- Die gewünschte Mutation sollte in der Mitte des Primers liegen, links und rechts flankiert von 15 Basen, die homolog zur Template-Sequenz sein müssen.

## Methoden

---

### Durchführung:

#### Pipettierschema:

X µL	Template-DNA	(5, 10, 25, 50 ng)
5 µL	10-fach Pfu-Puffer	(eigene Herstellung)
2 µL	MgCl <sub>2</sub>	(25 mM)
1 µL	dNTP-Mix	(10 mM SL je Nukleotid, MBI)
2 µL	5'-Primer	(10 pmol/µL SL, biomers.net GmbH)
2 µL	3'-Primer	(10 pmol/µL SL, biomers.net GmbH)
0.5 µL	Pfu-DNA-Polymerase	(2.5 U/µL, eigene Herstellung)
auf 50 µL	mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> auffüllen	

Der Ansatz wurde gründlich vermischt und anschließend im PCR-Gerät mit folgendem Programm inkubiert:

15 Zyklen	initiale Denaturierung	5 min	95°C
	{ Denaturierung Primer Annealing Elongation (500 <sup>nt</sup> /min)	30 sec	95°C
		1 min	55°C
		X min	68°C
	Kühlung	∞	4°C

### 4.2.11 Plasmid-DNA Isolierung

#### 4.2.11.1 GTE-System (alkalische Lyse)

Diese Methode nach Li (Li et al., 1997) wurde immer dann eingesetzt, wenn ein Testen der Klone nach einer Ligation und Transformation mit der Kolonie-PCR nicht möglich war. Die isolierte Plasmid-DNA kann allerdings auch für Klonierungen, Transfektionen oder PCR in Abhängigkeit von ihrem Reinheitsgrad (siehe 4.6.6) eingesetzt werden.

#### Lösungen:

Lösung 1 (GTE-Puffer):	50 mM	Glucose
	25 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	10 mM	EDTA
	+ 1	Spatelspitze RNase A
		⇒ Aufbewahrung 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 <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

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

#### Durchführung:

Das zu isolierende Plasmid wurde im ersten Schritt in einer Bakterien-ÜNK vermehrt. Am nächsten morgen wurde 1,5 mL dieser ÜNK in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und 30 Sekunden bei 10.000 g in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die sedimentierten Bakterienzellen wurden in 100 µL GTE-Puffer resuspendiert. Danach wurden 200 µL Lösung 2 zugegeben und durch 6-maliges Invertieren gemischt. Abschließend wurden 150 µL Lösung 3 zugegeben und der Ansatz wiederum 6-Mal invertiert. Nach einer 30-sekündigen Zentrifugation bei 10.000 g zum Pelletieren der Zellreste wurden 400 µL des Überstandes in ein frisches Gefäß überführt und 400 µL eiskaltes Ethanol (100 %, p.a.) zugegeben. Beim Abnehmen des Überstandes ist darauf zu achten, dass kein ausgefallenes SDS 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 überführt und mit Ethanol versetzt. Der Ansatz wurde kurz vermischt und dann direkt im Anschluss 5 Minuten bei 10.000 g abzentrifugiert. Das Sediment wurde 15 Minuten bei 37°C getrocknet und abschließend in 30 µL H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgenommen. Von der GTE-Plasmid-Präparation wurden 1-2 µg in einem Restriktionsverdau (siehe 4.2.12)

eingesetzt, nachdem die Konzentration photometrisch bestimmt wurde (siehe 4.2.2). Im Durchschnitt lag die Plasmid-DNA-Ausbeute bei etwa 30 µg aus 1,5 mL Übernachtskultur.

### 4.2.11.2 Nukleinsäure-Isolierung von Plasmid-DNA

Diese Methode ist eine Kombination aus alkalischer Lyse und Adsorption der DNA an eine Silikagel-Matrix unter Hochsalz-Bedingung. Die DNA wird dabei nicht gefällt, sondern an die Matrix gebunden und anschließend mit einem Nidrigsalz-Puffer (oder H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>) bei pH 7.0 – 8.5 eluiert. Die durch diese Menge gewonnene Plasmid-DNA besitzt einen sehr hohen Reinheitsgrad und ist auch in sensitiveren Reaktionen, wie z. B. Sequenzierungen oder Transfektionen verwendbar.

#### 4.2.11.2.1 MiniPrep

Die Präparation wurde mit dem *E.Z.N.A.® Plasmid MiniPrep Kit I* der Firma peqlab Biotechnologie GmbH nach Herstellerprotokoll ausgehend von 7 mL Übernachtskultur durchgeführt. Eluiert wurde mit 50 µL H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, was Ausbeuten von 200 bis 500 ng/µL erbrachte.

#### 4.2.11.2.2 MidiPrep

Isolierung von größeren Mengen Plasmid-DNA aus *E.coli* wurde mit dem NucleoBond® AX-100 MidiPrep-Kit der Firma Macherey-Nagel durchgeführt.

Es wurde 100-ml-Bakterien-Übernachtskultur verwendet. Die Durchführung erfolgte genau nach dem Protokoll des Herstellers. Die sedimentierte Plasmid-DNA wurde in 100 µL H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgenommen, wobei Ausbeuten von 1,5 bis 3 µg/µL erzielt wurden.

### 4.2.12 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme wurden zur Klonierung von DNA-Fragmenten und zur Linearisierung von Vektoren. Restriktionsenzyme (oder Endonukleasen) schneiden DNA an definierten Stellen und werden in drei Klassen eingeteilt. In der Molekularbiologie finden vor allem die Vertreter des Typs II, so genannte Nukleasen, Verwendung. Diese Enzyme erkennen jeweils eine spezifische Nukleotidsequenz und schneiden den DNA-Strang innerhalb dieses Bereichs. Dabei können je nach verwendetem Restriktionsenzym glatte (blunt) oder kohäsive (sticky) Enden entstehen. Schnittstellen mit kohäsiven, so genannten überhängenden Enden können effizient mit komplementären Enden ligiert werden, die mit demselben Enzym geschnitten wurden. Durch Verwendung zweier verschiedener Restriktionsendonukleasen kann darüber hinaus die Insertionsrichtung des zu klonierenden DNA-Bereichs in einen Vektor beeinflusst werden.

*Standardansatz für einen Restriktionsverdau (50 µL):*

3 µg	Plasmid-DNA
5 µL	10-fach Restriktions-Puffer (MBI Fermentas GmbH)
1 µL	Restriktionsenzym (5 U/µL, MBI Fermentas GmbH)

⇒ mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> auf ein Endvolumen von 50 µL auffüllen.

Der Ansatz wurde gründlich gemischt, abzentrifugiert und für eine Stunde bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 5 µL 10-facher DNA-Beladungspuffer zugegeben und der Verdau in einem 0,8 %igen TAE-Agarose-Gel analysiert (siehe 4.2.15).

Wurde die verdaute DNA für Folgeversuche benötigt, erfolgte eine Gelextraktion (siehe 4.2.16).

### 4.2.13 Verdau von PCR-Produkten

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann an einen zu klonierenden DNA-Bereich Restriktionsstellen sowohl am 5'- wie auch am 3'-Ende angehängt werden. Dies wurde durch entsprechendes Primerdesign erreicht, indem die gewünschten Schnittstellen am 5'-Anfang des Primers an die genspezifische Sequenz angefügt wurden. Damit die flankierenden Schnittstellen eines PCR-Produktes von Endonukleasen erkannt und geschnitten werden, ist meist ein zusätzlicher Überhang von mehreren Basen notwendig. Die Mindestanzahl der Basen dieses Überhangs ist vom verwendeten Enzym abhängig. Entsprechende Vorgaben sind im Katalog oder auf der Homepage des Enzymherstellers (<http://www.fermentas.com/techinfo/re/restrdigpcrrii.htm>) zu finden.

Standardmäßig wurden in dieser Arbeit 3 Basen Überhang an die Schnittstelle angefügt. Der Restriktionsverdau wurde bei unsauberen Amplifikationen nach Gelextraktion (siehe 4.2.16) oder bei deutlichem PCR-Produkt nach einer Aufreinigung durchgeführt.

#### 4.2.14 Beladungspuffer für die DNA-Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurde ein DNA-Beladungspuffer mit Bromphenolblau und Xylencyanol verwendet, wobei in 1 %igen Agarose-Gelen Bromphenolblau auf der Höhe von ~ 300 bp und Xylencyanol bei ~ 4.000 bp mitläuft.

*Lösungen*

6-facher DNA-Beladungspuffer:	10 mM	Tris-HCl (pH 7.6)
	60 mM	EDTA
	60 %	Glyzerin
	0.03 %	Bromphenolblau
	0.03 %	Xylencyanol

#### 4.2.15 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren weisen aufgrund ihres Ribosephosphat-Rückgrates eine negative Nettoladung auf. Im elektrischen Feld wandern DNA-Moleküle daher stets zur positiv geladenen Anode. Im Allgemeinen findet die Auftrennung in einer Trägermatrix statt. Als Trägermaterial wird Agarose (D-Galaktose mit glykosidisch verbundener 3,6-Anhydrogalactose) verwendet, die aus den Rotalgen-Gattungen *Gelidium* und *Gracillaria* gewonnen wird. Die langkettigen Kohlenhydrat-Moleküle sind stark Wasser-bindend und daher für die Gelierfähigkeit des Agarose-Gels verantwortlich. Im Gel werden die Nukleinsäuren bei ihrer Wanderung der Größe nach aufgetrennt. Durch die maschenartige Vernetzung der Agarose-Moleküle können kleinere DNA-Fragmente schneller wandern als größere. Die Trennschärfe hängt von der Agarosekonzentration des Gel (vgl. Tabelle 2-1) und vom Elektrophorese-Puffer ab (vgl.

Tabelle 4-2). Diese sollte dem Größenbereich der aufzutrennenden DNA-Moleküle angepasst werden.

**Tabelle 4-1:** Verschiedene Agarosekonzentrationen bei entsprechenden PCR-Produktlängen.

Agarosekonzentration	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

**Tabelle 4-2:** Pufferparameter für Gelelektrophorese.

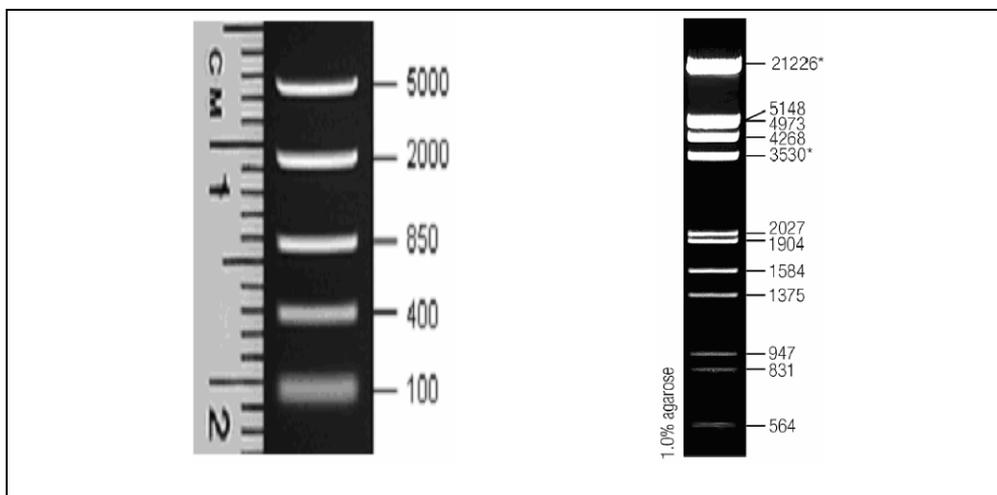
Elektrophorese-puffer	Optimaler Trennbereich	Laufdauer (min)	Max. Spannung (V/cm)
TBE	0.1-5 kb	30	10
TAE	5-60 kb	40	7
SB	0.1-10 kb	5	40

*Lösungen:*

20-fach SB-Puffer (1 L) (Brody and Kern, 2004)	200 mM 650 mM	NaOH Borsäure (ca. 40g) ⇒ pH einstellen auf 8.5
50-fach TAE-Puffer (1 L)	2 M 1 M 50 mM	Tris-HCl Eisessig EDTA
5-fach TBE-Puffer (1 L)	445 mM 445 mM 10 mM	Tris-HCl Borsäure 20 mL 0,5 M EDTA pH8.0
6-fach DNA-Ladepuffer (siehe 4.2.14)		
Laufpuffer (1-fach SB)		
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/mL	in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

### Durchführung:

Für die Herstellung eines 1 %igen Gels wurden 0,5 g Agarose (peqGOLD™ Universal-Agarose, PeqLab Biotechnologie GmbH) in 50 mL des entsprechenden DNA-Elektrophoresepuffers aufgekocht. Nachdem die Lösung auf etwa 50°C abgekühlt war, wurden 3 µL der Ethidiumbromid-Stammlösung zugegeben. Die Lösung wurde gründlich durchmischt und in einen Gelschlitten mit eingestecktem Kamm gegossen, der mit einem Klebeband abgedichtet wurde. Eventuell im Gel vorhandene Luftblasen können durch die Flamme eines Gasfeuerzeugs zum Platzen gebracht werden. Nach etwa 30 Minuten war das Gel vollständig auspolymerisiert und konnte verwendet werden. Ethidiumbromid ist notwendig, um die DNA im Gel sichtbar zu machen. Es lagert sich an die DNA an und leuchtet im ultravioletten Licht rötlich. Das Gel wird im Gelschlitten in eine Elektrophoresekammer gesetzt und mit 1-fachem Elektrophorese-Puffer etwa einen Zentimeter überschichtet. Anschließend wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen und eventuell vorhandene Luftblasen aus den Taschen entfernt. Die zu analysierenden Proben wurden mit einem entsprechenden Volumen 6-fachen DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Um die Längen der aufgetrennten DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde in einer Spur ein Gemisch aus DNA-Molekülen definierter Größe als Marker aufgetragen. Es wurde entweder die gebrauchsfertige FastRuler™ DNA Ladder, Middle Range (Fermentas GmbH) verwendet (vgl. Abbildung 4-4, links), von der 2 µL aufgetragen wurde. Alternativ dazu wurde der Marker III (Fermentas GmbH) eingesetzt, der sich aus mit *EcoRI* und *HindIII* verdauter λ-DNA zusammensetzt (vgl. Abbildung 4-4, rechts). Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung durchgeführt (richtet sich nach jeweiligen Puffer; siehe Tabelle 4-2). Die durch das Ethidiumbromid gefärbten DNA-Moleküle wurden mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und über eine Videokamera mit angeschlossenem Video-Printer oder mit einer Polaroid-Kamera dokumentiert.



**Abbildung 4-4:** Verwendete DNA-Größenmarker. Links: FastRuler™ DNA Ladder, Middle Range (Fermentas GmbH); Rechts: Marker III (Fermentas GmbH).

### 4.2.16 Nukleinsäure-Isolierung aus Agarose-Gelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde mit dem *E.Z.N.A. Gel Extraction Kit* (peqlab Biotechnologie GmbH) durchgeführt. Die gewünschten Banden wurden mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel herausgetrennt und die DNA anschließend aus dem Gel extrahiert. Es wurde nach der Arbeitsanleitung des Herstellers verfahren, die finale Elution der DNA erfolgte je nach Verwendung in 40 – 50 µL H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>. Die verwendete Universal Agarose hatte keinen negativen Einfluss auf die Elution oder die Höhe der Ausbeute. Von der eluierten DNA wurden jedes Mal 5 µL zur optischen Kontrolle auf ein SB-Gel aufgetragen. Nach der Elution konnte die DNA unmittelbar ohne weitere Bearbeitungsschritte für nachfolgende Versuche zur Verfügung.

### 4.2.17 Aufreinigung von Nukleinsäuren

*E.Z.N.A. Gel Extraction Kit* (peqlab Biotechnologie GmbH)

Neben der Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen konnte das *E.Z.N.A. Gel Extraction Kit* auch zur direkten Aufreinigung von PCR-Produkten oder eines Restriktionsverdaus ohne Gelelektrophorese verwendet werden. Die Auftrennung eines Restriktionsansatzes über ein Agarose-Gel hat allerdings den Vorteil, dass störende Nukleinsäure-Fragmente aus einem Ansatz entfernt werden können. Für die direkte Reinigung eines DNA-Fragments (PCR- oder Restriktionsfragment) wurde ausschließlich das *E.Z.N.A. Gel Extraction Kit* der Firma peqlab Biotechnologie GmbH verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben der Arbeitsanweisung des Herstellers. Die Ausbeuten der aufgereinigten Nukleinsäuren waren verlustarm und hatten einen hohen Reinheitsgrad, so dass nachfolgende Reaktionen ohne Beeinträchtigungen durchgeführt werden konnten.

#### 4.2.18 Fällung von Nukleinsäuren

DNA wurde stets mit Natriumacetat und Ethanol ausgefällt. Dazu wurde der gelösten DNA zuerst  $\frac{1}{10}$  Volumen 3 M Na-Acetat pH 5.2 und anschließend 2,5 Volumina 100 %iges Ethanol (p.a.) zugegeben. Im Allgemeinen wurden Nukleinsäuren in 100  $\mu$ L-Ansätzen gefällt, kleinere Mengen von Verdaus oder Sequenzierungen wurden auf 100  $\mu$ L aufgefüllt. Der Ansatz wurde gemischt und anschließend 30 min bei 13.000 g zentrifugiert. Nach der Sedimentation der DNA wurde der Überstand verworfen und die DNA in 70 %igem Ethanol gewaschen und für 5 min bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut entfernt, das Sediment für 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen  $H_2O_{bidest.}$  aufgenommen. Für die Fällung von RNA wurde statt des Na-Acetats 4 M Lithiumchlorid eingesetzt. Lithiumchlorid hat bei der Fällung von RNA gegenüber anderen Salzen den Vorteil, dass es DNA, Proteine und Kohlenwasserstoffe nur sehr geringem Maße fällt (Barlow et al., 1963). Daher eignet sich mit Lithiumchlorid gefällte DNA besser für cDNA-Synthesen oder *in vitro*-Translationen (Cathala et al., 1983).

#### 4.2.19 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Die in dieser Arbeit sequenzierte DNA wurde nach der Didesoxymethode des zweifachen Nobelpreisträgers Frederick Sanger (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Das Prinzip beruht auf einer enzymatischen Kettenabbruch-Synthese: Mit Hilfe einer DNA-Polymerase wird wie bei einer Polymerase-Kettenreaktion (siehe 4.2.6) von einem Primer ausgehend ein bestimmter Einzelstrang-Abschnitt verlängert. In den PCR-Ansatz werden allerdings zusätzlich modifizierte DNA-Bausteine in niedriger Konzentration zugegeben. Diesen so genannten Didesoxynukleotiden (ddNTPs) fehlt die 3'-Hydroxylgruppe an der Desoxyribose: Werden sie in den neusynthetisierten Strang eingebaut, stoppt die Verlängerung durch die DNA-Polymerase. Durch das Fehlen des 3'-Hydroxylendes kann keine weitere Phosphodiesterbindung geknüpft und somit keine weiteren Desoxyribonukleotide (dNTPs) eingebaut werden. Der Einbau erfolgt zufällig, so dass mit statistischer Wahrscheinlichkeit DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen, die an ihrem 3'-Ende mit einem ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP) enden.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Arbeitssystem (ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems, Weiterstadt) sind die ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, wodurch die synthetisierten DNA-Fragmente unterschiedlichster Länge mit einer spezifischen Farbe markiert sind. Dabei tragen Fragmente gleicher Länge den gleichen Farbstoff. Die Mischung dieser DNA-Moleküle wird in einem Kapillar-Gelsystem elektrophoretisch aufgetrennt. Ein Laser bringt an einem Messfenster die Fluoreszenz-Farbstoffe zum Leuchten wobei ein angeschlossenes Fotoelement die Wellenlänge des emittierten Lichts aufnimmt. Die registrierten Messdaten werden an einen Computer weitergeleitet, der die einzelnen Fluoreszenz-Signale über eine geeignete Software schließlich zu einer Sequenz zusammensetzt.

##### Durchführung:

Standardansatz einer Sequenzierungs-Reaktion (20  $\mu$ L):  
 300 ng Plasmid-DNA  
 5  $\mu$ L Premix (BigDye™, Applied Biosystems)  
 10 pmol Sequenzierungsprimer (Forward **oder** Reverse)  
 ⇒ mit HPLC- $H_2O$  auf ein Endvolumen von 20  $\mu$ L auffüllen

Der Ansatz wurde gründlich vermischt und in einer PCR-Maschine mit folgendem Programm gecycelt:

	initiale Denaturierung	2 min	94°C
<b>25 Zyklen</b>	{	Denaturierung	30 sec 94°C
		Primer Annealing	30 sec 50°C
		Elongation	3 min 60°C
	Kühlung	∞	4°C

Die Annealing-Temperatur richtete sich je nach verwendetem Primer, betrug in der Regel jedoch 50°C. Nach Beendigung des Cycle-Programms wurde die sequenzierte DNA mit Na-Acetat und Ethanol gefällt (siehe 4.2.18). Anschließend wurde das Sediment 30 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet und in 25  $\mu$ L HiDi Formamid (Applied Biosystems) gründlich für eine Minute resuspendiert. Um das Resuspendieren zu umgehen, konnte das Sediment eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in HiDi Formamid inkubiert werden. Die in Lösung gebrachte DNA wurde anschließend in einem Sequenzierungs-Gefäß mit aufgesetztem Septum überführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Software Chromas 1.45 geöffnet und durch Sequenzvergleich mit einem frei zugänglichem Internetprogramm (<http://genome.cs.mtu.edu/align/align.html>) ausgewertet.

## 4.2.20 AT-Klonierung von PCR-Fragmenten

Das Prinzip des *TOPO TA Cloning® Kits* (Invitrogen, Karlsruhe) basiert auf der Eigenschaft von Taq- und Tfl-Polymerasen, die durch ihre terminale Transferase-Aktivität stets einen 3'-Überhang aus Desoxyadenosinen an PCR-Produkte anfügen. Der Klonierungsvektor pCR2.1TOPO besitzt in der Klonierungs-Site einen 3'-Überhang aus Thymidinen und liegt linearisiert vor. Darüber hinaus ist das Enzym Topoisomerase I kovalent an den 3'-Enden gebunden. PCR-Produkte mit 3'-Adenosin-Überhängen werden durch die Ligationseigenschaften der Topoisomerase schnell und effizient in den Vektor integriert, wobei das Enzym dissoziiert. Nach der Transformation des zirkulären Vektors in kompetente *E.coli* (TOP10 bzw. XL 1-Blue) ermöglicht der Aufbau des Vektors eine Vorselektionierung der hochgewachsenen Kolonien durch Blau/Weiß-Selektion. Bakterienklone, die einen Vektor ohne integrierten PCR-Insert aufgenommen haben, nehmen eine blaue Färbung an, wohingegen Klone mit integriertem Insert weiß bleiben. Der Farbstoff wird von den Bakterien selbst produziert: Ohne Insert wird das *lacZ*-Gen exprimiert und X-Gal als Substrat der  $\beta$ -Galaktosidase gespalten, wodurch der blaue Farbstoff entsteht. Das PCR-Produkt wird zwischen Promotor und *lacZ*-Gen in den Vektor inseriert, wodurch die Expression dieses Gens nicht mehr möglich ist. Nach der Ligation wurden die transformierten Bakterienzellen auf LB-Ampicillin ( $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) + Kanamycin ( $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ )-Platten ausplattiert, die eine Stunde zuvor mit X-Gal und IPTG bestrichen wurden.

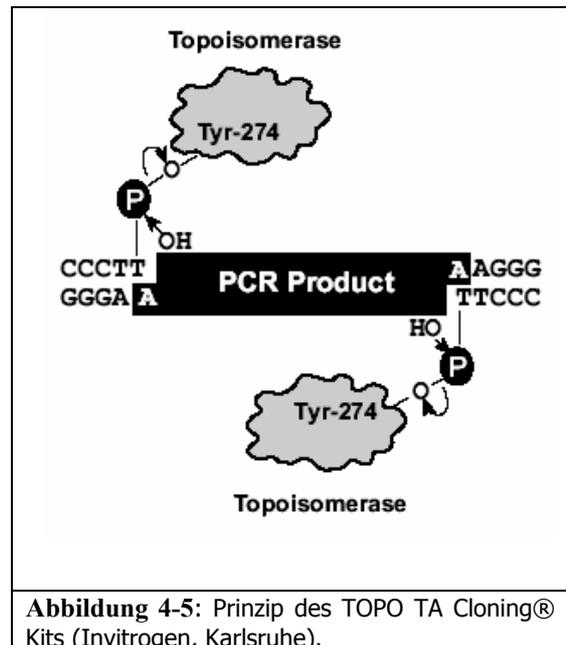


Abbildung 4-5: Prinzip des TOPO TA Cloning® Kits (Invitrogen, Karlsruhe).

### Durchführung:

Ligation (5 $\mu\text{L}$ ):	0,5 – 3,5 $\mu\text{L}$	PCR-Produkt
	1 $\mu\text{L}$	Salt Solution (Invitrogen)
	0,5 $\mu\text{L}$	pCR2.1TOPO®-Vektor
	⇒ mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf 5 $\mu\text{L}$ auffüllen	

Der Ansatz wird gründlich gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der Ansatz zu einem Aliquot chemisch kompetenter *E.coli* (TOP10 oder XL-1 Blue) gegeben und für 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Danach wird für 30 Sekunden ein Hitzeschock bei  $42^\circ\text{C}$  durchgeführt und die Bakterienzellen danach sofort für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wird mit 250  $\mu\text{L}$  SOC-Medium (Invitrogen) aufgefüllt und 1 Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  und 200 rpm geschüttelt. Die Bakterienzellen werden danach auf LB-Ampicillin ( $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) + Kanamycin ( $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ )-Platten ausplattiert, welche eine Stunde zuvor mit X-Gal und IPTG bestrichen wurden. Es folgt eine Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  für 12 Stunden.

## 4.2.21 Klonierung von DNA-Fragmenten

### 4.2.21.1 Gewinnung des Inserts

Um ein bestimmten Bereich eines Gens in einen Expressions-Vektor klonieren zu können, musste das DNA-Fragment zunächst mit Hilfe der PCR vermehrt werden, die grundsätzlich mit Pfu-Polymerase oder Phusion™ High Fidelity Polymerase mit „Proof-reading“-Funktion durchgeführt wurde. Dabei wurden Primer mit 5'-überhängenden Schnittstellen verwendet, um das PCR-Fragment in den Vektor ligieren zu können. Im Anschluss an die PCR wurde das DNA-Fragment grundsätzlich zuerst aufgereinigt (siehe 4.2.17), verdaut und anschließend über eine Gelelektrophorese aufgetrennt, ausgeschnitten und extrahiert (siehe 4.2.16).

Befand sich der zu klonierende Gen-Abschnitt bereits in einem Vektor, wurde das Fragment über einen Restriktionsverdau (siehe 4.2.12) ausgeschnitten. Um genügend Insert zu erhalten wurden 2 Ansätze mit jeweils 3  $\mu\text{g}$  DNA verdaut, anschließend über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und die gewünschte DNA aus dem Gel eluiert (siehe 4.2.16).

Wurde ein PCR-Produkt direkt über glatte („blunt“) Enden kloniert, so mussten die Primer vor der Reaktion phosphoryliert werden, um eine Ligation in den Expressionsvektor zu ermöglichen (siehe 4.2.21.3). Auch hier wurde eine DNA-Polymerase mit Korrektur-Lese-Funktion („proof-reading“) eingesetzt.

### 4.2.21.2 Dephosphorylierung des Vektors

Die Dephosphorylierung eines geschnittenen Klonierungsvektors wurde immer dann durchgeführt, wenn nur ein Restriktionsenzym verwendet wurde (ungerichtete Klonierung), um die Autoligationsrate des Vektors zu verringern. Eine DNA-Ligase benötigt phosphorylierte Enden, um zwei DNA-Moleküle miteinander verbinden zu können. Durch das Entfernen der Phosphatgruppe am 5'-Ende der geschnittenen DNA-Stränge kann der linearisierte Vektor nicht mehr von der Ligase geschlossen werden, wodurch die Anzahl der Falschpositiven Bakterienklone nach der Transformation signifikant verringert werden kann. Autoligation kann bei der Verwendung von zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen prinzipiell ausgeschlossen werden, da nicht-komplementäre Enden nicht verbunden werden können.

#### *Durchführung:*

Nach Linearisierung des Vektors, wurde das Restriktionsenzym entweder hitzeinaktiviert (z. B. 10 Minuten bei 85°C, abhängig von der verwendeten Endonuklease) oder über eine Gelelektrophorese aufgereinigt.

#### *Pipettierschema eines Dephosphorylierungs-Ansatzes (20 µL):*

10 µL	Linearisierter Vektor (1 µg)
2 µL	10-facher CIAP-Puffer (MBI Fermentas GmbH)
1 µL	Calf Intestine Alkaline Phosphatase (1 U/µL, MBI Fermentas GmbH)
<hr/>	
⇒ auf 20 µL mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> auffüllen	

Der Ansatz wurde 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die CIAP 15 Minuten bei 85°C hitzeinaktiviert. Der Ansatz konnte entweder direkt weiter verwendet oder für etwa 4 Wochen bei -20°C aufbewahrt werden.

### 4.2.21.3 Phosphorylierung von Primern

Um ein PCR-Produkt direkt über glatte DNA-Enden in einen Vektor ligieren zu können, müssen Primer verwendet werden, die am 5'-Ende eine Phosphatgruppe tragen. Das Anhängen der Phosphatgruppe wird als Kinasierung bezeichnet. Als Alternative kann auch das PCR-Produkt selbst kinasiert werden, wobei die Durchführung nach dem Protokoll der Primerphosphorylierung erfolgte.

#### *Durchführung:*

Die phosphorylierten 5'Enden für die spätere Ligation des PCR-Produktes wurden im Allgemeinen über die Verwendung kinasierter Primer eingeführt.

#### *Protokoll für die Phosphorylierung der Primer (20 µL-Ansatz):*

1 µL	Primer (100 pmol/µL)
2 µL	10-facher T4 DNA Ligasepuffer (MBI Fermentas GmbH)
2 µL	rATP (25 mM, Stratagene)
2 µL	T4-Polynukleotidkinase (10 U/µL, MBI Fermentas GmbH)
<hr/>	
⇒ Mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> auf 20 µL auffüllen	

Der Ansatz wurde gemischt und 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kinase für 15 Minuten bei 68°C hitzeinaktiviert. Nach der Hitzeinaktivierung wurde der Ansatz bis zur Verwendung bei 4°C gekühlt. Phosphorylierte Primer wurden vor einer PCR immer frisch kinasiert verwendet. Aus einem Phosphorylierungsansatz wurden jeweils direkt 1 µL (entspricht 10 pmol) für eine PCR eingesetzt (Durchführung einer PCR mit „Proof-reading“-Polymerase siehe 4.2.6).

### 4.2.22 Ligation

Durch die Ligation können DNA-Fragmente kovalent miteinander verbunden werden, wenn die zu verbinden DNA-Stränge entweder überlappende Enden mit jeweils komplementären Sequenzen besitzen oder glatte phosphorylierte 5'-Enden in räumlich engen Kontakt treten. Dadurch lässt sich ein bestimmter DNA-Abschnitt in einen Klonierungsvektor dauerhaft integrieren. Bei der Ligation sollte das molekulare Verhältnis zwischen Insert und linearisierten Vektor wenigstens 3:1 betragen.

#### *Pipettierschema eines Ligations-Ansatzes (20 µL):*

100 ng	Linearisierter und aufgereinigter Vektor
300 ng	Geschnittenes und aufgereinigtes Insert
2 µL	10-facher T4-DNA Ligase Puffer (MBI Fermentas GmbH)
1 µL	T4-DNA Ligase (5 U/µL, MBI Fermentas GmbH)
<hr/>	
⇒ Mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> auffüllen auf 20 µL	

Der Ansatz wurde 1 Stunde oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde der Gesamtansatz für eine chemische Transformation in *E.coli*-Bakterien eingesetzt (siehe 4.1.5.2).

### *Kurzprotokoll einer Transformation:*

Der Ligationsansatz wurde mit einem Aliquot (100 µL) chemisch kompetenter Bakterien gemischt und auf Eis für eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte für 90 Sekunden ein Hitzeschock bei 42°C. Danach wurden die Bakterien sofort für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wird mit 900 µL LB-Medium (ohne Antibiotika) aufgefüllt und 1 Stunde bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Die Bakterienzellen werden danach auf Selektionsplatten ausplattiert und bei 37°C für 12 Stunden inkubiert.

### *Test der erhaltenen Klone:*

Mit einer Kolonie-PCR (siehe 4.2.8) wurde überprüft, ob die selektierten Bakterienklone den Klonierungsvektor mit dem inserierten DNA-Abschnitt aufgenommen haben. Bei ungerichteten Klonierungen wurde darüber hinaus die Orientierung des Inserts analysiert. Konnte mit der PCR keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden, wurden die Klone mit einem Restriktionsverdau (siehe 4.2.12) überprüft. Im Allgemeinen wurden bei Expressionsvektoren die inserierten DNA-Fragmente vollständig sequenziert, um Fehler während der Klonierung auszuschließen.

### **4.2.23 Isolierung von RNA mit peqGOLD TriFast™**

Das peqGOLD TriFast™-Reagenz (PqLab GmbH, Erlangen) ist eine monophasische Lösung, die aus Phenol und Guanidinisothiocyanat besteht. Bei der von Chomczynski und Sacchi (1987) entwickelten Methode zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe finden die Zell-Lyse und die RNA-Extraktion in einem Schritt statt. Nach Herstellerangaben werden zur Isolierung von Gesamt-RNA 50 – 100 Milligramm eines Gewebes pro einem Milliliter des peqGOLD TriFast™-Reagenz eingesetzt. Die Gewebeproben wurden zusammen mit dem entsprechenden Volumen des peqGOLD TriFast™-Reagenz homogenisiert. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden pro Milliliter peqGOLD TriFast™ 200 Mikroliter Chloroform zugegeben und für 15 Sekunden gemischt (Vortex). Nach einer weiteren Inkubationszeit von 3 Minuten bei Raumtemperatur wurde bei 12.000g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Dabei trennte sich eine leichtere durchsichtige wässrige Phase von einer Interphase und einer rötlichen Phenolphase. Die RNA befindet sich in der wässrigen Phase, die nach einer Überführung in ein sauberes 15-mL Zentrifugenröhrchen mit einem Milliliter Isopropanol pro Milliliter peqGOLD TriFast™ versetzt und gemischt wurde. Während einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur fiel ein Großteil der RNA aus. Die RNA wurde durch Zentrifugation (12.000g, 4°C, 10 Minuten) sedimentiert und der Überstand verworfen. Mehrmaliges Waschen des Sediments mit 350 Mikrolitern 70%igem Ethanol und anschließendes Zentrifugieren (7.500g, 4°C, 5 Minuten) befreit den Niederschlag von Phenolresten, Isopropanol und Salzen. Nach sorgfältiger Abnahme des Überstands wurde das Sediment bei Raumtemperatur für 15 Minuten getrocknet, bis es fast durchsichtig war. Anschließend wurde die RNA in RNase-freiem DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Wenn nötig kann die RNA zum besseren Lösen für 10 Minuten auf 65°C erhitzt werden. Nach Zugabe eines RNase-Inhibitors konnte die RNA für mehrere Wochen bei -70°C aufbewahrt werden.

### **4.2.24 RNA-Gelelektrophorese**

RNA-Moleküle können nach dem gleichen Prinzip wie DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Allerdings wird für ein RNA-Agarose-Gel ein anderes Puffersystem verwendet, das Formaldehyd enthält. Diese Chemikalie stabilisiert denaturierte RNA und verhindert die Degradation.

#### *Erforderliche Lösungen*

10-facher RNA-Laufpuffer (pH 7.0)	200 mM	MOPS
	50 mM	Na-Acetat
	10 mM	EDTA
Probenpuffer	20 µL-Ansatz	500 µL-Ansatz
	10 µL	250 µL
	3,5 µL	87,5 µL
	1 µL	25 µL
	5,5 µL	137,5 µL
RNA-Beladungspuffer (pH 7.0)	1 mM	EDTA
	50 %	(v/v) Glycerin
	0,25 %	(w/v) Bromphenolblau
	0,25 %	(w/v) Xylencyanol
	40 µg/mL	Ethidiumbromid

### Durchführung:

Für ein 1 %iges RNA-Gel wurden 0,4 g Agarose (PeqLab) in 30 mL H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> und 4 mL 10-fach RNA-Laufpuffer aufgekocht. Nachdem die Lösung auf etwa 50°C abgekühlt war, wurden 6,8 mL 37 %ige Formaldehydlösung zugegeben, gründlich vermischt und in einen Gelschlitten mit eingestecktem Kamm gegossen. Nach etwa 30 Minuten war das Gel auspolymerisiert und konnte verwendet werden.

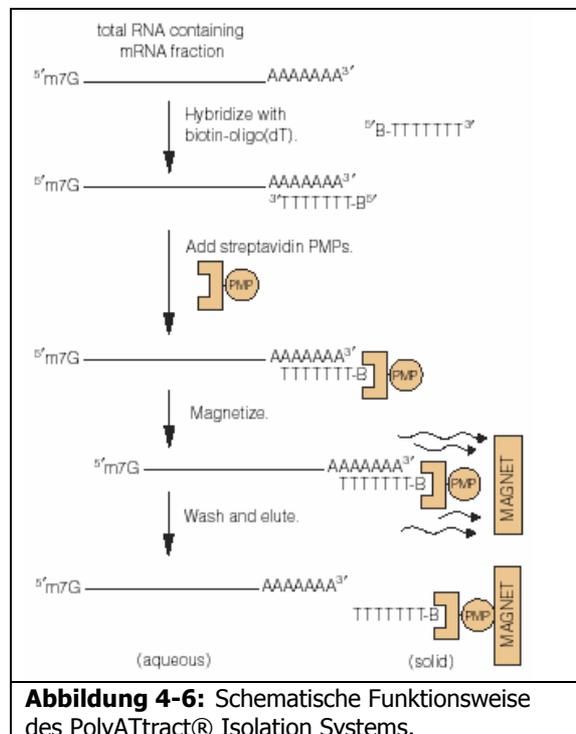
RNA-Gele wurden für anschließende Northern Blottings (siehe 4.2.27) oder zur Überprüfung von RNA-Sonden verwendet. Als Größenstandard für die aufgetrennten RNA-Moleküle wurde die ribosomale RNA (5S = 120nt, 5.8S = 156nt, 18S = 2300nt und 28S = 4200nt rRNA) herangezogen.

Das Gel wurde pro Spur mit 10 µg Gesamt-RNA oder 5 µg Poly(A)-RNA geladen. Eine RNA-Antisense-Sonde wurde in 2 Verdünnungen getestet; eine Spur wurde mit einem Mikroliter, eine zweite mit 5 µL Sondenlösung beladen. Die aufzutragende RNA wurde in einer entsprechenden Menge RNA-Probenpuffer aufgenommen und für 5 Minuten bei 70°C zur Denaturierung der RNA erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt und mit  $\frac{1}{10}$  Volumen Beladungspuffer vermischt. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben vorsichtig in die Taschen eines mit Laufpuffer überschichteten Gels gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanten 10 V/cm und wurde beendet, sobald die Bromphenolblau-Front etwa  $\frac{2}{3}$  in das Gel gelaufen war. Die RNA-Banden konnten mit einem UV-Transilluminator durch das im Beladungspuffer enthaltene Ethidiumbromid sichtbar gemacht und über eine Videokamera mit angeschlossenen Videoprinter oder mit einer Polaroid-Kamera dokumentiert werden.

### 4.2.25 Isolierung von Poly-A-mRNA (PolyATtract® Isolation System, Promega)

Mit dem PolyATtract® Isolation System von Promega ist es möglich, mRNA aus einem Gemisch von Gesamt-RNA zu isolieren. Das System nutzt dabei die Tatsache, dass eukaryontische mRNA am 3'-Ende durch eine Aneinanderreihung von Adenosinen markiert ist, dem so genannten Poly-A-Schwanz.

Das System benutzt biotinylierte Oligo(dT) Primer, die in einer Gesamt-RNA-Lösung spezifisch an die 3'-Poly(A)-Bereiche von eukaryontischen mRNAs binden. Die gebundenen mRNA-Moleküle werden durch Streptavidin-gekoppelte Paramagnetische Partikel (PMPs) aus der Lösung heraus gefangen: Das Protein Streptavidin besitzt die Fähigkeit, mit sehr großer Affinität ( $K_d \sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$ ) an Biotin zu binden. Das Streptavidin wiederum ist kovalent an die PMPs gekoppelt, die durch einen Magnetstand angezogen werden können (siehe Abbildung 4-6). Nachdem die nicht-gebunden Bestandteile der Gesamt-RNA-Lösung durch Wasch-Schritte von den gebunden mRNAs isoliert sind, können die mRNAs aus der gebunden Phase durch Zugabe von DEPC-H<sub>2</sub>O wieder in Lösung gebracht werden. Die eluierte Fraktion enthält am Ende der Isolation ausschließlich mRNAs, die für weitere Versuche wie z.B. RT-PCR (siehe 4.2.5) oder Northern Blots (siehe 4.2.27) verwendet werden können. Die Durchführung erfolgte nach Anweisung des Herstellers (#Z5210, Promega).



### 4.2.26 In-vitro-Transkription/ Markierung von RNA-Sonden mit Digoxygenin

Durch die Hybridisierung mit einer antisense-RNA-Sonde ist es möglich, die Anwesenheit einer spezifischen mRNAs nachzuweisen. Die Grundlage dieser Arbeitstechnik ist die Tatsache, dass RNA-Moleküle –genauso wie DNA– an ein Molekül mit der revers-komplementären Sequenz binden (=hybridisieren) können. Diese RNA:RNA-Hybride können u. a. durch nicht-radioaktive Markierung des bindenden homologen RNA-Moleküls (Sonde) durch Digoxygenin nachgewiesen werden. Durch die Verwendung bestimmter Klonierungsvektoren ist es möglich, einzelsträngige RNA-Moleküle durch RNA- Polymerasen *in vitro* herzustellen. Solche Vektoren sind so konstruiert, dass die multiple Klonierungsstelle (MCS) von unterschiedlichen Promotoren flankiert wird. An diese spezifischen DNA-Abschnitte binden die jeweiligen RNA-Polymerasen. Der Promotor, der in dieser Arbeit verwendeten T7-RNA Polymerase liegt im Klonierungsvektor pBluescript SK+ (siehe 2.3.1.1) im 3'-Bereich der MCS. Um daher von einer cDNA einen Antisense-RNA-Strang herstellen zu können, muss dieser DNA-Abschnitt zunächst durch ungerichtete Klonierung in umgekehrter („falscher“) Orientierung in den Vektor inseriert werden. Durch den Einsatz einer geeigneten Restriktionsendonuklease wurde das Plasmid anschließend im 5'-Bereich des Inserts linearisiert (siehe Abbildung 2-1) und durch die T7-RNA-Polymerase in eine Antisense-RNA-Sonde transkribiert. Umgekehrt konnte im Bedarfsfall durch eine Linearisierung am 3'-Ende des Matrizenstrangs und der T3-RNA-Polymerase eine der

mRNA entsprechende „sense“ RNA synthetisiert werden. Da RNA-Polymerasen Digoxigenin-markiertes UTP (Dig-UTP) als Substrat annehmen und in das naszierende RNA-Molekül einbauen können, lässt sich durch diese Technik eine markierte Sonde herstellen.

### *Pipettierschema eines Transkriptions-Ansatzes (20 µL):*

13 µL	Linearisierter und aufgereinigter Vektor (1,5 µg)
2 µL	10-facher Transkriptionspuffer (Roche Diagnostics GmbH)
1 µL	RNase Inhibitor (40 U/µL, MBI Fermentas GmbH)
2 µL	DIG RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics GmbH)
0,2 µL	T7 RNA-Polymerase (20 U/µL, Roche Diagnostics GmbH)
0,8 µL	DEPC-H <sub>2</sub> O

Der Transkriptionsansatz wurde für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die synthetisierte RNA-Sonde wurde sofort im Anschluss mit 2,5 µL 4M LiCl und 75 µL 100%igem Ethanol (p.a.) für eine Stunde bei -70°C gefällt. Anschließend wurde die RNA zentrifugiert (13.000g, 8°C, 30 min), das Sediment zwei Mal in 250 µL 75%igem Ethanol (p.a., in DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt) gewaschen (13.000g, 8°C, 5 min). Danach wurde das Sediment 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µL DEPC-H<sub>2</sub>O (+ 1 µL RNase Inhibitor) resuspendiert. Die Sonde wurde bis zum Gebrauch bei -70°C für mehrere Monate aufbewahrt.

### 4.2.27 Northern Blotting (Transfer von RNA)

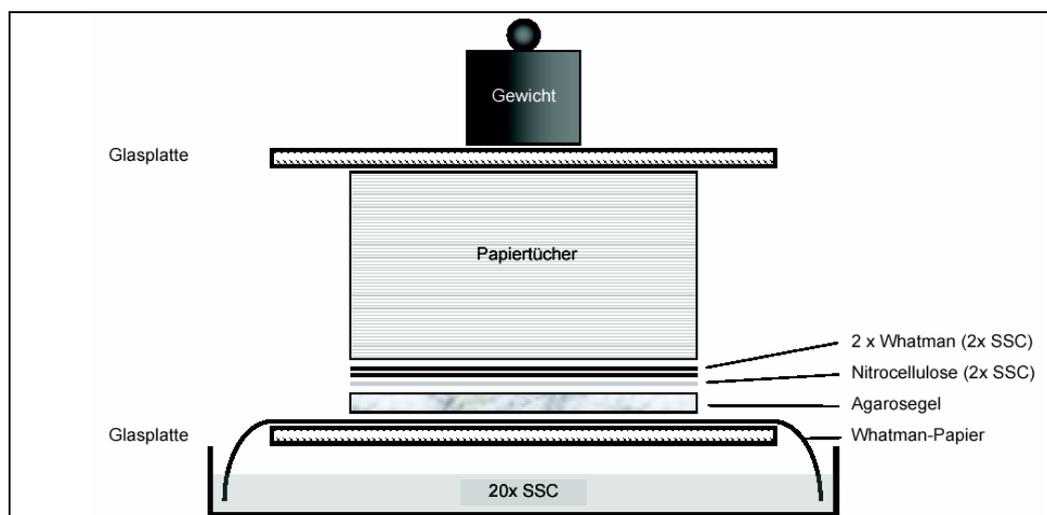
#### *Erforderliche Lösungen:*

20-fach SSC (pH 7.0):	3 M NaCl
	0,3 M Na-Citrat
	⇒ pH einstellen auf 7.0
2-fach SSC:	1:10 Verdünnung

#### *Durchführung:*

Das RNA-Gel wurde nach Ablauf der Elektrophorese 30 Minuten in 20-fachem SSC äquiliert. Anschließend wurde das Transfersystem –wie in Abbildung 4-7 dargestellt –aufgebaut. Das Gel wurde mit der Oberseite nach unten auf das Whatman-Papier gelegt, um ein spiegelverkehrtes Abbild des Gels auf dem Blot zu vermeiden. Nicht zu transferierende Randbereiche des Gels wurden mit Parafilm bedeckt und die in 2-fachem SSC äquilibrierte Nitrocellulose-Membran auf das Gel gelegt. Auf die Membran folgten zwei in 2-fachem SSC getränkte Whatman-Filter und darauf ein etwa 5 Zentimeter hoher Stapel mit saugfähigen Zellstofftüchern. Der 2-fache SSC-Puffer wird durch die Kapillarkraft des Zellstoffs durch das Gel in den Papierstapel gesogen, wodurch die RNA-Moleküle vom Gel auf die Nitrozellulose transferiert werden. Die Dauer des Transfers richtete sich nach der Größe der zu blottenden Moleküle: In der Regel erfolgte der Transfer innerhalb von vier Stunden, kürzere RNA-Sonden ließen sich bereits nach 2 Stunden auf die Membran übertragen.

Nach Beendigung des Transfers wurde die Nitrozellulose für 2 Minuten in 2-fachem SSC gespült und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die transferierte RNA musste anschließend durch Bestrahlung mit UV-Licht an die Membran fixiert werden.



**Abbildung 4-7:** Schematischer Aufbau für den Transfer von RNA-Molekülen (Northern Blot).

## 4.2.27.1 Spezifischer Nachweis einer RNA auf einem Northern Blot

Durch eine markierte RNA-Sonde kann eine spezifische RNA auf einem Northern Blot nachgewiesen werden (siehe 4.2.27). Durch diese Arbeitstechnik ist festzustellen, ob eine bestimmte RNA zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhanden und damit das entsprechende Gen aktiv ist. Dadurch ist es möglich ein zeitliches Expressionsmuster dieses Gens zu erstellen.

### Erforderliche Lösungen:

Prähybridisierungslösung	5-faches SSC 50 % (v/v) 0,1 % (w/v) 0,02 % (w/v) 5 % (w/v)	(Endkonzentration) Formamid Laurylsarcosinat SDS Blockierungsreagenz (Best. Nr. 1 096 176, Roche)
	⇒ zum Lösen auf 60°C erwärmen	
Hybridisierungslösung	Ca. 7,5 µL Sondenlösung in 20 mL Prähybridisierungslösung	
Waschpuffer 1:	2x + 0,1 % (w/v)	SSC SDS
Waschpuffer 2:	0,1x + 0,1 % (w/v)	SSC SDS
DIG-Puffer 1 (pH 7.5):	100 mM 150 mM	Maleinsäure NaCl

### Durchführung:

Der Blot wurde im Allgemeinen für eine Stunde bei 50°C in Prähybridisierungslösung inkubiert, um alle unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Die Höhe der Temperatur richtet sich nach der verwendeten Sonde, wobei wichtige Kriterien der G/C-Gehalt, die Länge und der Homologiegrad der Sonde darstellen. Nach der Prähybridisierung wurde der Blot bei gleicher Temperatur mit der Hybridisierungslösung inkubiert.

Am darauf folgenden Tag wurde der Blot zweimal für 15 Minuten bei RT mit Waschpuffer 1 und anschließend zweimal für 15 Minuten bei Hybridisierungstemperatur mit Waschpuffer 2 gewaschen. Nach den Waschschrritten wurde die Nitrozellulose für eine Minute in DIG-Puffer 1 äquilibriert und anschließend die Antisense-Sonde durch anti-DIG-Antikörper nachgewiesen.

## 4.2.27.2 Detektion über alkalische Phosphatase NBT/BCIP

### Erforderliche Lösungen:

DIG-Puffer 1 (pH 7.5):	100 mM 150 mM	Maleinsäure NaCl
DIG-Puffer 2:	1 % (w/v)	Blockierungsreagenz (Best. Nr. 1 096 176, Roche)
	⇒ In DIG-Puffer 1 bei 60°C lösen.	
Antikörperlösung:	Anti-DIG-Fab-Fragmente aus dem Schaf, gekoppelt an alkalische Phosphatase (Roche) ⇒ $1/5.000$ verdünnt in DIG-Puffer 2	
DIG-Puffer 3 (pH 9.5)	100 mM 100 mM 50 mM	Tris-HCl NaCl MgCl <sub>2</sub>
NBT (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, Roth)	50 mg/mL	In 70% Dimethylformamid
BCIP (p-Nitrotetrazoliumblau, Roth)	50 mg/mL	In 100% DMF
Färbelösung (NBT/BCIP)	10 mL + 66 µL + 33 µL	DIG-Puffer 3 NBT BCIP

### *Durchführung*

Die Nitrozellulose wurde für 30 Minuten in DIG-Puffer 2 abgesättigt und anschließend weitere 30 Minuten in Antikörperlösung inkubiert. Der Blot wurde danach zweimal für 15 Minuten in DIG-Puffer 1 gewaschen, anschließend vier Minuten in DIG-Puffer 3 äquilibriert und abschließend mit Färbelösung überschichtet. Durch die alkalische Phosphatase entsteht ein braun-violetter Niederschlag. Die Entwicklung erfolgte unter Ausschluss von Licht und dauerte je nach Versuch zwischen einer Minute und mehreren Stunden. Wenn nötig wurde die Färbelösung nach etwa vier Stunden erneuert. Zum Abstoppen der Färbereaktion wurde der Blot gründlich mit  $H_2O_{bidest.}$  gewaschen. Das Färberegebnis des Blots wurde entweder fotografiert oder mit einem Flachbettscanner dokumentiert.

### **4.2.27.3 Detektion über Peroxidase und ECL (Enhanced Chemi-Luminescence)**

Der Nachweis von Digoxygenin-markierten RNA-Sonden über Peroxidase und ECL hat die Vorteile, dass durch die kürzere Entwicklungsdauer ein schnelleres Ergebnis erzielt werden kann.

#### *Erforderliche Lösungen:*

DIG-Puffer 1 (pH 7.5):	100 mM 150 mM	Maleinsäure NaCl
DIG-Puffer 2:	1 % (w/v)	Blockierungsreagenz (Best. Nr. 1096 176, Roche) ⇒ In DIG-Puffer 1 bei 60°C lösen.
Antikörperlösung:	Anti-DIG-Fab-Fragmente aus dem Schaf, gekoppelt an Peroxidase (Roche) ⇒ $1/1.000$ verdünnt in DIG-Puffer 2	

ECL-Lösungen 1 + 2 (Amersham Pharmacia Biotech)

#### *Durchführung:*

Die Durchführung des Nachweises erfolgte nach dem selben Protokoll wie die Detektion mit alkalischer Phosphatase: der Blot wurde eine halbe Stunde in DIG-Puffer 2 abgesättigt, anschließend 30 Minuten mit der Antikörperlösung inkubiert und zweimal für 15 Minuten mit DIG-Puffer 1 gewaschen. Die ECL-Reaktion wurde ohne Verzögerung durchgeführt. Dazu wurden die beiden ECL-Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt und für eine Minute über den Blot pipettiert. Durch die Peroxidase wird die ECL-Lösung umgesetzt, so dass Licht in Form von chemischer Lumineszenz emittiert wird. Danach wurde die Lösung abgetropft und der Blot möglichst faltenfrei in eine lichtdurchlässige Klarsichtfolie eingeschlagen. Anschließend wurde ein Röntgenfilm (Agfa Cronex 5) mit dem Blot belichtet. Die Expositionsdauer betrug je nach Signalstärke zwischen einer Sekunde und 30 Minuten. Der Röntgenfilm wurde für 15 Sekunden in Entwicklerlösung gehalten, kurz in Wasser gespült und anschließend für eine Minute in der Fixierlösung fixiert. Abschließend wurde der Röntgenfilm gründlich mit Wasser abgespült und getrocknet. Für die Dokumentation des Ergebnisses wurde der Film mit einem Flachbettscanner digitalisiert und mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe® Photoshop® 7.0 bearbeitet.

### **4.2.28 Isolierung von Zellkernen aus Kulturzellen (A6-Zellen)**

Zur Anreicherung von nukleären Proteinen wurden aus Kulturzellen Kerne isoliert und anschließend in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.

#### *Erforderliche Lösungen:*

PBS (pH 7.4):	140 mM 6,4 mM 2,6 mM 1,4 mM	NaCl $Na_2HPO_4$ KCl $KH_2PO_4$
TKM-Puffer (pH 7.2):	10 mM 70 mM 3 mM	Tris-HCl KCl $MgCl_2$
Lysis-Puffer (pH 7.2):	10 mM 0,5 mM	Tris-HCl Phenylmethylsulfonyl Fluorid PMSF (Serva; SL: 200 mM in 100 % Isopropanol)

### *Durchführung:*

Als Ausgangsmaterial dienten durch Zellkultur vermehrte A6, XTC oder HeLa-Zellen. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei einer Temperatur von 4°C und unter Anwesenheit von Proteaseinhibitoren (PMSF) durchgeführt, um einen proteolytischen Abbau der Proteine vorzubeugen. Für einen Kernisolierungsansatz wurden Kulturzellen in vier großen Plastik-Petrischalen (Ø 14 cm) bis zu einer Zelldichte von maximal 2-3 · 10<sup>6</sup> Zellen pro Milliliter Kulturmedium kultiviert. Das Medium wurde vorsichtig entfernt und die Zellen mit 5 mL eiskaltem PBS gewaschen, das PBS wiederum entfernt und 5 mL eiskalter TKM-Puffer auf die Zellen pipettiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Schale abgelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Schale wurde noch einmal mit 5 mL TKM-Puffer ausgespült, um den Verlust von Zellen so gering wie möglich zu halten. Danach wurden die Zellen für fünf Minuten mit 1.000 g bei 4°C abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 10 mL Lysis-Puffer resuspendiert und für 20 – 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der hypotonische Lysis-Puffer ließ die Zellen aufquellen und erleichterte das anschließende Aufbrechen der Zellen. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen mit einem Glas- / Teflon-Homogenisator mit 25 Hüben homogenisiert, um die Zellkerne vom Zytoplasma zu trennen. Nach dem Homogenisieren wurde der vollständige Aufschluss der Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert und gegebenenfalls der Aufschlussvorgang wiederholt. Die Anzahl der Kerne wurde in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Anschließend wurden die Kerne für 10 Minuten bei 1.500 g und 4°C sedimentiert und anschließend in einem entsprechenden Puffer aufgenommen. Dabei wurde das eingesetzte Volumen so gewählt, dass eine Konzentration von 1 · 10<sup>6</sup> Kerne pro 20 µL eingestellt wurde.

### **4.2.28.1 Mengenbestimmung von Partikeln mit der Neubauer-Zählkammer**

Die Auszählung von Zellen oder Kernen erfolgte stets lichtmikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer, wodurch die Anzahl der Partikel pro Volumeneinheit berechnen ließ. Im Mittelsteg der Kammer sind Zählnetze eingraviert. Diese bestehen aus mehreren Großquadraten, wobei ein Großquadrat in 16 Kleinquadrate aufgeteilt ist. Die Höhe der Kammer beträgt 0,1 mm und wird durch den Abstand zwischen Steg und einem Glasdeckplättchen festgelegt, das auf den Glassteg der Zählkammer in Querrichtung geschoben wird. Das Deckgläschen sitzt korrekt auf, wenn so genannten Newton'schen Ringe zu sehen. Die Fläche eines Großquadrats beträgt 1 mm<sup>2</sup>, wodurch sich ein Volumen des Großquadrates von 0,1 mm<sup>3</sup> (= 0,1 µL) ergibt. Es wurden stets 4 Großquadrate ausgezählt, wobei darauf zu achten war, dass Zellen oder Kerne, die auf den Begrenzungslinien zwischen den Quadraten lagen, nicht doppelt gezählt wurden. Aus dem Durchschnittswert der ausgezählten Zellen pro Großquadrat konnte die Zellzahl im Gesamtvolumen mit nachfolgender Formel berechnet werden:

$$16 \times \emptyset \text{ Zellzahl pro Kleinquadrat} \times 10^4 \times \text{Verdünnung} = \text{Anzahl pro mL}$$

## **4.3 Proteinbiochemische Methoden**

Proteinase-Inhibitormix (1-fach):	1 mM	Benzamidin
(nach Dhadialla and Raikhel, 1994)	1 mM	EDTA
	2 µg/mL	Aprotinin
	2 µg/mL	Antipain
	2 µg/mL	Chymostatin
	2 µg/mL	Leupeptin
	2 µg/mL	Pepstatin (in DMSO lösen!)

⇒ als 100-fachen Mix ansetzen, aliquotieren und bei -20°C lagern

### **4.3.1 In vitro Expression im Retikulozytenlysat**

Mit Retikulozyten-Systemen ist es möglich, eukaryontische Proteine *in vitro* in einem gekoppelten Transkriptions-/ Translationsschritt zu synthetisieren. Im Allgemeinen werden in diesen Systemen RNAs eingesetzt, die von RNA-Polymerasen *in vitro* synthetisiert wurden. Das verwendete „TNT® Quick Coupled Transcription/ Translation System“ der Firma Promega vereinfacht diesen Prozess, indem PCR-Produkte mit angefügtem T7-RNA-Polymerase-Promotor direkt zu einem TNT® Quick Master Mix zugegeben werden. In dieser Mischung sind bereits alle Komponenten vorhanden, um ein cDNA-PCR-Produkt in das entsprechende Protein zu translatieren. Während des Translationsprozess wird die markierte Aminosäure [<sup>35</sup>S] Methionin in das entstehende Polypeptid eingebaut, um das exprimierte Protein durch Autoradiografie nachweisen zu können.

### *Durchführung (Standardprotokoll des Herstellers):*

16 µL	TNT® Quick Master Mix
1 µL	[ <sup>35</sup> S] Methionin, 1000 Ci/mmol, 10 mCi/mL (Amersham, Produktnr.: AG1094)
2 µL	PCR-generiertes DNA-Template mit angehängtem T7-Pomotor
1 µL	Steriles nukleasefreies H <sub>2</sub> O

Die Reaktion wurde für 90 Minuten bei 30°C inkubiert. Das Transkriptionsprodukt wurde durch SDS-PAGE (siehe 4.3.8) aufgetrennt. Das 18%ige Polyacrylamid-Gel wurde nach Beendigung der Elektrophorese für 30 Minuten in Fixierungslösung (10% Essigsäure, 50% techn. Methanol) inkubiert und anschließend in Anti-Cracking-Lösung (7% Essigsäure, 7% techn. Methanol, 10% Glycerin) äquilibriert und für 90 Minuten auf einem Vakuumtrockner getrocknet. Das exprimierte Protein wurde durch Autoradiografie (3 bis 6 Tage bei -70°C) nachgewiesen. Anschließend wurden die markierten Proteine für *in vitro* Bindungsstudien (Immunpräzipitation) eingesetzt.

### 4.3.2 Herstellung und Aufreinigung von Fusionsproteinen

Um Histidin-Fusionsproteine herstellen zu können, wurde zunächst der entsprechende kodierende DNA-Abschnitt unter Berücksichtigung des Leserasters in den Expressionsvektor pQC-6×His inkloniert und in Bakterien transformiert. Bei der Expression dieses Konstrukts entsteht ein Protein, das am Carboxyterminus sechs Histidinreste trägt. Durch diese spezifische Aminosäureabfolge ist es möglich, das Fusionsprotein über Ni-NTA-Agarosekügelchen aufzureinigen. Die Histidine bilden dabei mit dem immobilisierten Nickelatomen eine starke Affinität aus, wodurch das Fusionsprotein an die Trägermatrix bindet. Proteine, die keine Abfolge von Histidinen besitzen, bleiben mobil und werden durch Waschschriffe aus der Säulenmatrix entfernt. Durch stufenweise Absenkung des pH-Wertes wird die Affinität zwischen Histidinresten und Nickelatomen sukzessive geschwächt, so dass sich das Protein bei einem bestimmten Säuregrad von den Agarosekügelchen eluieren lässt.

#### 4.3.2.1 Expression von C-terminalen Hexa-Histidin-Fusionsproteinen in Bakterien

Für die Expression eines Proteins mit Histidin-Anhang („Tag“) wurde der Bakterienstamm M15 verwendet (siehe auch 2.1.2).

*Erforderliche Lösungen:*

LB-Selektionsmedium (siehe 4.1.1)

IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid; SL: 1M in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>)

*Durchführung:*

Zunächst wurde der Klonierungsvektor in M15-Zellen transformiert. Am nächsten Tag wurde eine Übernachtskultur von einer Bakterienkolonie angeimpft. Nach 12-stündiger Vermehrung der Zellen wurden diese 1:10 mit LB-Selektionsmedium verdünnt und weiter bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Nach dem die Bakterienkultur eine Zelldichte von OD<sub>600</sub> = 0,5 – 0,8 erreicht hatte, wurden die Expression des Fusionsproteins durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration = 1 mM) in den Zellen induziert. Die Induktionsdauer betrug vier Stunden. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurde kurz vor der IPTG-Induktion ein definiertes Volumen aus der Expressionskultur entnommen und ebenfalls für vier Stunden bei den selben Bedingungen weiter kultiviert. Diese Probe diente zum einen als Wachstumskontrolle der Bakterienzellen. Durch parallele Messung der Zelldichten konnte eine eventuelle zytotoxische Wirkung des exprimierten Proteins erkannt werden. Zum anderen diente die nicht-induzierte Probe in vergleichenden Analysen als Kontrolle, ob das Fusionsprotein nach der Induktion von den Bakterienzellen im gewünschten Maß exprimiert wurde. Beide Kulturen wurden anschließend für 10 Minuten bei 5.000 g zentrifugiert. Die Bakteriensedimente konnten entweder direkt für die Aufreinigung verwendet oder für einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert werden.

#### 4.3.2.2 Aufreinigung von Proteinen mit einem Histidin-Tag unter denaturierenden Bedingungen

*Erforderliche Lösungen:*

Ni-NTA-Agarose (Qiagen)

Denaturierungspuffer (pH 8.0):

6 M	Guanidinhydrochlorid
100 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
10 mM	Tris-HCl
⇒ pH einstellen auf 8.0	

Waschpuffer (pH 8.0):

8 M	Harnstoff
100 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
10 mM	Tris-HCl
⇒ pH einstellen auf 8.0	

Waschpuffer (pH 6.3)

Zusammensetzung wie Waschpuffer (pH 8.0)  
⇒ pH einstellen auf 6.3

Elutionspuffer A (pH 5.9)

Zusammensetzung wie Waschpuffer (pH 8.0)  
⇒ pH einstellen auf 5.9

Elutionspuffer A (pH 4.5)	Zusammensetzung wie Waschpuffer (pH 8.0) ⇒ pH einstellen auf 4.5	
Elutionspuffer B	6 M 200 mM	Guanidinhydrochlorid Essigsäure
Neutralisationspuffer (pH 9.5)	1 M	Tris-HCl ⇒ pH einstellen auf 9.5

### 4.3.2.2.1 Säulenvorbereitung

Die Aufreinigung von Proteinen mit einem Histidin-Tag wurde stets mit einer Säule durchgeführt. Für die Aufreinigung eines Proteins aus einer 250-mL-Kultur wurden 2 mL Ni-NTA-Agarose-Suspension (Qiagen) auf eine entsprechende Säule (BD Biosciences) pipettiert, was einem Säulenvolumen von 1 mL entsprach. Nachdem die überschüssige Lagerungsflüssigkeit durch die Säule geflossen war, wurde die Agarosematrix mit 6 mL Denaturierungspuffer äquilibriert. Nach diesem Vorgang war die Säule gebrauchsfertig und konnte beladen werden. Bei der Zugabe eines neuen Puffers wurde stets darauf geachtet, dass kein Säulenmaterial aufgewirbelt wurde. Darüber hinaus musste ein Trockenfallen der Agarosematrix vermieden werden.

### 4.3.2.2.2 Aufschluss der Bakterien

Die Bakteriensedimente wurden entweder aus Eis aufgetaut oder unmittelbar nach der Zentrifugation in 5 mL Denaturierungspuffer pro Gramm Pellet (entspricht in etwa 250 mL Kulturvolumen) resuspendiert. Der Resuspensionsvorgang wurde stets auf Eis durchgeführt und es wurde darauf geachtet, dass sich möglichst kein Schaum bildete. Die Suspension wurde anschließend für 30 Sekunden sonifiziert. Danach wurde die Lyse über Nacht bei 4°C unter Rotation durchgeführt. Am nächsten morgen wurden die lysierten Bakterienzellen für 10 Minuten bei 10.000 g (4°C) abzentrifugiert.

### 4.3.2.2.3 Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose-Säule

Der Überstand des zentrifugierten Sonifikats wurde vorsichtig auf die mit 6 mL Denaturierungspuffer äquilibrierte Säulenmatrix gegeben. Ein Teil des Säulendurchflusses wurde aufbewahrt, um die Bindung des Proteins an die Säule zu überprüfen, der Rest wurde verworfen. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe und danach die Elution des gereinigten Proteins durch sukzessive Absenkung des pH-Wertes.

### 4.3.2.3 Protokoll einer Proteinreinigung über „Histidin-Tag“ unter denaturierenden Bedingungen

2 mL	Ni-NTA-Agarose	(entspricht Säulenvolumen von 1 mL)	
6 mL	Denaturierungspuffer	(Äquilibrieren der Säulenmatrix)	
5-10 mL	Überstand Lysat	(Nach 10-minütiger Zentrifugation; 10.000 g; 4°C)	
10 mL	Denaturierungspuffer	(pH 8.0)	
5 mL	Waschpuffer	(pH 8.0)	
5 mL	Waschpuffer	(pH 6.3)	
3 mL	Elutionspuffer A	(pH 5.9)	⇒ Eluat in Aliquots à 500 µL aufsammeln
3 mL	Elutionspuffer A	(pH 4.5)	⇒ Eluat in Aliquots à 500 µL aufsammeln
6 mL	Elutionspuffer B		⇒ Eluat in Aliquots à 500 µL aufsammeln
⇒	Säulenaufbereitung		

Zu jedem Aliquot wurde  $\frac{1}{10}$  Volumen Neutralisationspuffer zugegeben bzw. vorgelegt. Das Eluat wurde in kleine Aliquots à 500 µL aufgefangen, um den Zeitpunkt der Elution besser eingrenzen zu können (siehe auch 4.3.2.2.3). Die aufgereinigten Proteine konnten im neutralisierten Elutionspuffer für mehrere Tage bei 4°C oder über einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert werden, ohne dass Degradationserscheinungen auftraten.

### 4.3.2.3.1 Aufbereitung der Säulenmatrix

Für die Aufreinigung desselben Proteins konnte eine Ni-NTA-Agarose-Säule mehrmals wieder verwendet werden, so lange bis sich die bläuliche Farbe der Matrix nach grau verfärbte. Dazu wurde das Ni-NTA-Agarose-Material nach der Protein-elution wie folgt aufbereitet. Nachdem der Elutionspuffer B vollständig durch die Säule geflossen war, wurden 20 mL 0,5 M NaOH-Lauge auf die Säule pipettiert und für 30 Minuten einwirken gelassen. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit 30%iger Ethanol-Lösung gespült und konnte für mehrere Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

### 4.3.2.3.2 Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE

Von allen Fraktionen einschließlich des Sonifikats, Sediment des Sonifikats sowie dem Durchfluss wurde soviel abgenommen, dass es einem Volumen von 500  $\mu\text{L}$  der ursprünglichen Bakterienexpressionskultur entsprach. Bei einer 250-mL-Kultur errechnet sich das abgenommene Volumen wie folgt:

$$\frac{250.000 \mu\text{L}}{500 \mu\text{L}} = 500 \Rightarrow \frac{1}{500} \text{ einer jeden Fraktion musste eingesetzt werden.}$$

Die entsprechenden Volumina wurden abgenommen und für die SDS-PAGE vorbereitet. Je nach Volumen wurden sie entweder direkt im 2-fachen SDS-Probenpuffer (siehe 4.3.8) aufgenommen oder vorher mit Methanol/Chloroform gefällt (siehe 4.3.7.1) und dann im 1-fachen SDS-Probenpuffer (siehe 4.3.8) aufgenommen.

### 4.3.2.3.3 Bestimmung der Proteinausbeute

Die Konzentration der in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurde entweder näherungsweise über die Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm ( $E_{280}$ ) (siehe auch 4.3.4.2) oder über eine BSA-Standardreihe im SDS-Polyacrylamidgel abgeschätzt (siehe 4.3.4.1) und anschließend mit den Volumina der Elutionsfraktionen verrechnet.

### 4.3.2.4 Aufreinigung unter nativen Bedingungen

*Erforderliche Lösungen:*

Ni-NTA-Agarose (Qiagen)

Lysis-Puffer (pH 7.8):

300 mM	NaCl
50 mM	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$
1 % (v/v)	Triton-X-100

⇒ pH einstellen auf 7.8

Waschpuffer (versch. pH-Werte):

300 mM	NaCl
50 mM	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$
10 % (v/v)	Glyzerin

Verschiedene pH-Werte einstellen:  
⇒ pH 6.0; 5.5; 5.0; 4.5; 4.0; 3.5; 3.0

Neutralisationspuffer (pH 9.5)

1 M	Tris-HCl
-----	----------

⇒ pH einstellen auf 9.5

#### 4.3.2.4.1 Vorbereitung der Säule

Die Vorbereitung der Säule und die Menge des benötigten Säulenmaterials entsprachen der Arbeitsvorschrift unter denaturierenden Bedingungen. Vor dem Beladen der Säule wurde die Säule mit 10 mL Lysis-Puffer äquilibriert.

#### 4.3.2.4.2 Aufschluss der Bakterien

Die Sedimente der induzierten Bakterienzellen wurden entweder langsam aufgetaut oder direkt nach der Zentrifugation vorsichtig in 5 mL Lysis-Puffer je Gramm Sediment (entspricht etwa 5 mL pro 250 mL Kulturvolumen) auf Eis resuspendiert, um Degradation der Proteine und Schaumbildung zu vermeiden. Anschließend wurden die Bakterien durch 30-sekündige Sonifikation auf Eis aufgeschlossen und die Proteine über Nacht bei 4°C unter Rotation extrahiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Reste der Bakterienzellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 10.000g (4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die Aufreinigung über die Ni-NTA-Agarose-Säule verwendet.

#### 4.3.2.4.3 Reinigung über die Ni-NTA-Agarose-Säule

Der Überstand des zentrifugierten Sonifikats wurde vorsichtig auf die äquilibrierte Säule gegeben. Ein Teil des Durchflusses wurde gesammelt, um die Bindung des Proteins an die Säule zu überprüfen, der Rest wurde verworfen. Anschließend erfolgte die Aufreinigung und Elution des Proteins durch sukzessive Erniedrigung des pH-Wertes im Waschpuffer.

### *Protokoll einer Proteinaufreinigung unter nativen Bedingungen:*

2 mL	Ni-NTA-Agarose	(entspricht Säulenvolumen von 1 mL)
10 mL	Lysis-Puffer	(Äquilibrieren der Säulenmatrix)
5-10 mL	Überstand Lysat	(Nach 10-minütiger Zentrifugation; 10.000 g; 4°C)
10 mL	Waschpuffer	(pH 6.0) ⇒ Eluat in Aliquots à 500 µL aufsammeln
3 mL	Waschpuffer	(pH 5.5) ⇒ Eluat in Aliquots à 500 µL aufsammeln
3 mL	Waschpuffer	(pH 5.0) ⇒ Eluat in Aliquots à 500 µL aufsammeln
3 mL	Waschpuffer	(pH 4.5) ⇒ Eluat in Aliquots à 500 µL aufsammeln
3 mL	Waschpuffer	(pH 4.0) ⇒ Eluat in Aliquots à 500 µL aufsammeln
3 mL	Waschpuffer	(pH 3.5) ⇒ Eluat in Aliquots à 500 µL aufsammeln
3 mL	Waschpuffer	(pH 3.0) ⇒ Eluat in Aliquots à 500 µL aufsammeln
⇒	Säulenaufbereitung	

Zu jeder Eluatfraktion wurde  $\frac{1}{10}$  Volumen Neutralisationspuffer zugegeben oder vorgelegt, um eine eventuelle saure Hydrolyse des eluierten Proteins unter den gegebenen pH-Bedingungen zu vermeiden. Auch hier wurden Aliquots à 500 µL gesammelt, um den Zeitpunkt der Elution besser eingrenzen zu können. Durch dieses Vorgehen werden eine größere Reinheit und eine höhere Konzentration des aufgereinigten Proteins erreicht. Bei der Durchführung wurde immer darauf geachtet, dass die Säule unter keinen Umständen trocken lief und bei Zugabe von neuen Puffern möglichst kein Säulenmaterial aufgewirbelt wurde.

Nach der Elution wurde die Säule für die Aufbereitung mit mindestens 20 mL Lysis-Puffer gewaschen. Eine gebrauchte Säule konnte einige Wochen bei 4°C in Lysis-Puffer gelagert und für mehrere Aufreinigungen desselben Proteins wieder verwendet werden. Die eluierten Proteinfraktionen wurden nach Zugabe von Proteaseinhibitoren (siehe 4.3) bei -20°C aufbewahrt.

#### 4.3.2.4.4 Probenvorbereitung für die SDS-PAGE und Bestimmung der Proteinausbeute:

Die Proben für die Analyse der Reinigung in der SDS-PAGE und die Bestimmung der Proteinausbeute erfolgten nach demselben Prinzip wie bei einer Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen (siehe 4.3.2.3.3).

### 4.3.3 Renaturierung von Proteinen durch Dialyse

Ist die Aufreinigung von Proteinen nur unter denaturierenden Bedingungen möglich, kann das Polypeptid durch Dialyse renaturiert werden. Das Protein kann seine natürliche Faltung wieder annehmen, wenn der Harnstoff sukzessive aus dem Puffer entfernt wird. Im Gegensatz zu den Pufferbestandteilen ist das zu dialysierende Protein nicht in der Lage, durch die semipermeable Membran zu diffundieren. Durch langsames Absenken der Harnstoffkonzentration im den Dialyseschlauch umgebenden Medium, strömt der Harnstoff aufgrund des osmotischen Gradienten durch die Membran nach außen.

#### *Durchführung:*

Der Dialyseschlauch wird mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  gründlich durchgespült und an einem Ende mit Dialyseklammern verschlossen. Anschließend wird die Proteinlösung eingefüllt und der Schlauch mit einer weiteren Klammer verschlossen. Es ist darauf zu achten, dass sich im Schlauch ausreichend Raum für einströmenden Puffer befindet. Anschließend erfolgte die renaturierende Dialyse unter ständigem Rühren.

#### *Protokoll einer Proteinrenaturierung durch Dialyse:*

1 h bei RT	6 M Harnstoff/1-fach PBS (siehe 4.2.28)	(1 L)
1 h bei RT	4 M Harnstoff/1-fach PBS	(Zugabe von 0,5 L 1-fach PBS)
1 h bei 4°C	3 M Harnstoff/1-fach PBS	(Zugabe von 0,5 L 1-fach PBS)
1 h bei 4°C	2 M Harnstoff/1-fach PBS	(Zugabe von 1 L 1-fach PBS)
1 h bei 4°C	1 M Harnstoff/1-fach PBS	(frisch ansetzen)
1 h bei 4°C	1-fach PBS	
ÜN bei 4°C	1-fach PBS	

#### 4.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

##### 4.3.4.1 Durch eine BSA-Konzentrationsreihe

Mit einer standardisierten Konzentrationsreihe bovines Serumalbumins (BSA), die auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und durch eine SDS-PAGE aufgetrennt wird, kann die ungefähre Menge eines aufgereinigten und dialysierten Proteins in einer Lösung abgeschätzt werden.

### 4.3.4.2 Durch Extinktionsmessung ( $E_{280}$ )

Die Konzentration von Proteinen kann näherungsweise auch durch die Extinktionswerte der Lösung bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt werden. Es wurde dabei empirisch ermittelt, dass eine Extinktionseinheit ( $E_{280} = 1$ ) einer Proteinkonzentration von  $500 \mu\text{g}/\text{mL}$  entspricht.

### 4.3.4.3 Bradford-Test

Eine genauere Proteinquantifizierung ermöglicht der Bradford-Test (Bradford, 1976). Die Bestimmungsgrenze des Tests liegt zwischen 1 und  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$  Protein. Reduzierende Chemikalien wie z. B.  $\beta$ -Mercaptomethanol dürfen nicht in der zu messenden Lösung vorhanden sein, da sie das Messergebnis negativ beeinflussen.

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva) bindet in saurer Lösung an kationische und nichtpolare, hydrophoben Proteinreste. Durch die Bindung verändert sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffs und verschiebt sich zu einem Maximum bei 595 nm. Mit einer Kalibrierungsreihe eines bekannten Proteins (BSA) ist eine Berechnung der genauen Proteinmenge möglich.

#### *Durchführung:*

Das Bradford-Reagenz (Biorad) wird 1:5 mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  verdünnt. und in eine Messküvette vorgelegt. Anschließend werden 0, 1, 2 und  $5 \mu\text{g}$  BSA zu der Verdünnung hinzupipettiert und gründlich gemischt. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit wird die Optische Dichte der Referenzreihe bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Photometer gemessen. Aus den ermittelten Werten wird eine Eichgerade erstellt, deren Steigung als Berechnungsgrundlage für unbekannte Proteinlösungen dient.

### 4.3.4.4 BCA-Protein-Assay

Bicinchoninsäure (BCA) erzeugt eine Färbung mit einwertigen Kupferionen. Diese Tatsache macht sich unter anderem das BCA-Protein-Assay zur quantitativen, photometrischen Proteinbestimmung zu Nutze. Dabei reagieren zweiwertige Kupferionen quantitativ mit Proteinen zu einwertigen Kupferionen. Diese geben mit der Bicinchoninsäure einen violetten Komplex der photometrisch ausgewertet werden kann.

Wie beim Bradford-Nachweis dient eine Referenzreihe zur Ermittlung einer Eichgeraden, die als Berechnungsgrundlage unbekannter Proteinlösungen verwendet wird.

## 4.3.5 Extraktion von Proteinen aus Kulturzellen

Zur Gewinnung von exprimierten Proteinen aus transfizierten Kulturzellen wurde ein Gesamtproteinextrakt hergestellt und anschließend in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.

#### *Erforderliche Lösungen:*

PBS (siehe 4.2.28)

Extraktions-Puffer (pH 7.4):	50 mM	Tris-HCl
	150 mM	NaCl
	0,5% (v/v)	Triton-X-100
	0,2 mM	PMSF

#### *Durchführung:*

Als Ausgangsmaterial wurden durch Zellkultur vermehrte A6, COS-7, HeLa oder HEK 293-Zellen verwendet. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei einer Temperatur von  $4^\circ\text{C}$  und unter Anwesenheit von Proteaseinhibitoren (PMSF) durchgeführt, um einen proteolytischen Abbau der Proteine vorzubeugen.

Für einen Gesamtproteinextraktionsansatz wurden Kulturzellen in 10 mittleren Plastik-Petrischalen ( $\varnothing$  10 cm) bis zu einer Zelldichte von maximal  $2-3 \cdot 10^6$  Zellen pro Milliliter Kulturmedium kultiviert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgeschabt, mit einer Pipette in zwei 50 mL-Röhrchen überführt und für 10 Minuten bei  $500 \text{ g}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellsedimente in insgesamt 50 mL eiskaltem PBS gewaschen und vereinigt. Die Zellen wurden erneut zu den oben angegebenen Bedingungen abzentrifugiert und der Überstand danach verworfen. Das Sediment wurde in 5 mL eiskaltem Extraktionspuffer resuspendiert und unter Rotation für 20 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert, wodurch die Zellen aufgeschlossen und die Proteine in Lösung gingen. Anschließend wurde die Suspension für 20 Minuten bei  $11.000 \text{ g}$  zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und in flüssigem Stickstoff bei  $-195,8^\circ\text{C}$  schock-gefroren. Danach konnten die Proteinproben für mehrere Monate bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt werden.

## 4.3.6 Extraktion von Proteinen aus Zellen von Organen und Geweben

Zur Gewinnung von Proteinen aus Zellen von Organen und Geweben wurde ein Gesamtproteinextrakt nach einem Protokoll von John Newport (Newport and Dunphy, 1992) hergestellt und anschließend in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 4.3.8).

## Methoden

---

### *Erforderliche Lösungen:*

PBS (siehe 4.2.28)

Homogenisierungs-Puffer (pH 7.7):	250 mM	Sucrose
	2.5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	50 mM	KCl
	1 mM	DTT
	10 mM	HEPES
	20 mM	EDTA
	5 µg/mL	Cytochalasin B
	0,2 mM	PMSF

Triton-X-100  
10% SDS-SL  
DNase I (100 U/µL)  
2-fach SDS-Probenpuffer (siehe 4.3.8)

### *Durchführung:*

Einen anästhesierten Frosch wurden die entsprechenden Organe und Gewebe entnommen und kurz in eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde das Gewebestück abgetropft und mit 10 Volumenanteilen (w/v) des eiskalten Homogenisierungs-Puffers versetzt (Bsp.: 0,5 g Leber in 5 mL Homogenisierungs-Puffer). Anschließend wurde das Organstück mit einem Ultra-Thurrax® (Fa. Bachhofer, Reutlingen) für 60 Sekunden bei 20.000 rpm auf Eis zerkleinert. Erst nach der Homogenisierung wurden 1 % Triton-X-100, 0.1% SDS und 10 U/mL DNase I in der Endkonzentration zugegeben, um eine unnötige Schaumbildung zu vermeiden. Anschließend wurde die DNA in den Proben für 30 Minuten im 37°C warmen Wasserbad verdaut. Danach wurden noch vorhandene größere Bestandteile für 5 Minuten bei 750 g und 4°C sedimentiert und der Überstand anschließend abgenommen. Danach wurde der Überstand mit dem selben Volumenanteil an 2-fachen SDS-Probenpuffer versetzt, die Proteine für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und abschließend für 5 Minuten bei 1.000 g abzentrifugiert. Vom Überstand wurden im Allgemeinen 20 µL auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen.

## **4.3.7 Fällung von Proteinen**

### **4.3.7.1 Proteinfällung mit Methanol und Chloroform**

Für eine Fällung wurden 400 µL einer wässrigen Proteinlösung mit 400 µL Methanol (100%, p.a.) und 300 µL Chloroform (100%, p.a.) vermischt. Nach Zugabe von Chloroform wurde die Lösung milchig. Anschließend wurde die Suspension für 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen, wobei sich die Proteine in der weißlichen Interphase befinden. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, der verbleibende Rest mit 300 µL Methanol (100%, p.a.) erneut vermischt. Es folgte eine weitere Zentrifugation für eine Minute bei 13.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinsediment für 15 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Schwerlösliche Präzipitate wurden zunächst in einem kleinen Volumen (5 µL) 2 M Harnstoff vorgelöst und dann in 1-fach SDS-Probenpuffer (siehe 4.3.8) gelöst. Die gefällten Proteinproben wurden so lange bei 95°C erhitzt, bis sie vollständig in Lösung gegangen waren. Anschließend konnten die Proteine für längere Zeit bei -20°C aufbewahrt werden.

### **4.3.7.2 Fällung von Proteinen mit Aceton**

Proteine, die sich in wässriger Lösung befinden, können durch Zugabe von 6,5 Volumina Aceton (100%, p.a., -20°C) gefällt werden. Der Präzipitationsvorgang kann durch eine 2-stündige Inkubation bei -70°C (oder über Nacht bei -20°C) gefördert werden. Nach der Inkubationszeit wurden die gefällten Proteine für 10 Minuten bei 5.000 g (4°C) zentrifugiert. Das Sediment wurde nach Abnahme des Überstands für 15 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet und schließlich in 1-fachem SDS-Probenpuffer gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

## **4.3.8 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Thomas und Kornberg (1975)**

Proteingemische können durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt werden. Im Allgemeinen hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von Molekülen in einem elektrischen Feld von drei Faktoren ab: Ihrer Größe, der Form und ihrer elektrischen Ladung. In der SDS-PAGE spielt bei der Wanderungsgeschwindigkeit ausschließlich die Masse eine grundlegende Rolle. Dies wird durch die Zugabe von Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) erreicht. SDS ist ein starkes anionisches Detergenz und besitzt die Fähigkeit, die Eigenladungen von Proteinen zu überdecken, oligomere Proteine in ihre Untereinheiten zu unterteilen und dadurch zu denaturieren. Pro Gramm Protein binden etwa 1,4 g SDS, wodurch Proteine eine negative Gesamtladung erhalten. Bei der Probenvorbereitung wird SDS im Überschuss hinzugegeben und die Proteine auf

## Methoden

---

95°C erhitzt, wodurch Sekundär- und Tertiärstrukturen zerstört werden. Durch Zugabe von Thiolen ( $\beta$ -Mercaptoethanol) werden Disulfidbrücken der Proteine durch Reduktion gespalten und liegen dadurch vollständig gestreckt vor.

Die denaturierten Proteingemische wurden in einem diskontinuierlichen Gelsystem aufgetrennt, wobei sich das SDS-Polyacrylamidgel aus dem Sammel- und dem Trenngel zusammensetzt. Die beiden Systeme unterschieden sich in ihrer Acrylamidkonzentration, sowie ihrem pH-Wert. Das Durchwandern des Sammelgels durch das angelegte elektrische Feld bewirkt eine lokale und starke Fokussierung der Proteine, wohingegen die Proteine im sich anschließenden Trenngel aufgrund ihrer molekularen Masse aufgetrennt werden.

Zur Auftrennung der Proteinproben wurde das Gel- und Puffersystem nach Thomas und Kornberg (Thomas and Kornberg, 1975) mit Acrylamidkonzentrationen von 12% oder 18% verwendet.

### *Erforderliche Lösungen:*

Lösung A: 30% Acrylamid-Bis-Lösung für das Trenngel:  
30 g Acrylamid + 0,15 g Bis (N,N'-Methylen-diacrylamid) auf 100 mL  $H_2O_{\text{bidest}}$ .

Lösung A': 30% Acrylamid-Bis-Lösung für das Sammelgel (nach Laemmli, 1970):  
30 g Acrylamid + 0,8 g Bis (N,N'-Methylen-diacrylamid) auf 100 mL  $H_2O_{\text{bidest}}$ .

Lösung B: Trenngelpuffer (pH 8.8):  
3 M Tris-HCl; pH 8.8  
0,4% SDS

Lösung C: Sammelgelpuffer (pH 6.8):  
0,75 M Tris-HCl; pH 6.8  
0,4% SDS

10% (w/v) APS (Ammoniumpersulfat) in  $H_2O_{\text{bidest}}$ .

TEMED

0,5%ige Agarose-Lösung

Elektrophoresepuffer (pH 8.8):  
50 mM Tris-HCl; pH 8.8  
380 mM Glycin  
0,1% (w/v) SDS

1-facher SDS-Probenpuffer nach Laemmli (1970), pH 6.8:

100 mM Tris-HCl; pH 6.8  
10% (v/v) Glycerin  
1% (w/v) SDS  
5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

### *Durchführung:*

Es wurden entweder Groß- oder Minigele mit Gelapparaturen der Firma Gibco Life Technologies (München) verwendet. Zunächst wurden zwei Glasplatten, die Abstandshalter (Spacer) sowie der Kamm mit 70%igem Ethanol gründlich gereinigt, um Fett- und Proteinreste zu entfernen. Anschließend wurden die Glasplatten mit seitlich eingesetzten Spacern mit zwei Klammern zusammengesetzt und unten und seitlich mit Tesafilm abgeklebt. Der Kamm wurde eingesetzt, um die Gießhöhe für das Trenngel zu markieren. Das Trenngel wurde so weit gegossen, dass zwischen Trenngel und unteren Ende des Kamms bei einem Großgel 1,5 cm und bei einem Minigel 1,0 cm Abstand eingehalten wurde. Anschließend wurde der Kamm entfernt und die Unterseite und die Flanken mit 0,5%iger Agarose abgedichtet. Dazu wurde die flüssige Agaroselösung an den Seiten in den Aufbau pipettiert und der Boden etwa 5 mm hoch ausgegossen. Während die Agarose auspolymerisierte, wurde die Trenngel-Lösung nach angegebenem Pipettierschema (siehe Tabelle 2-2) zusammengemischt. APS und das zum Schluss zugegebene TEMED lösten die Polymerisation der Gelmatrix aus. Die Lösung wurde gründlich vermischt und mit einer Pasteur-Pipette bis knapp über die Markierung in den Gelplatten-Aufbau gegossen. Das frisch gegossene Trenngel wurde vorsichtig mit destilliertem Wasser überschichtet, um zum einen die Polymerisation unter Luftausschluss zu beschleunigen und um zum anderen eine gleichmäßige Polymerisationsgrenze zu erreichen. Nach etwa einer halben Stunde war die Gellösung vollständig auspolymerisiert.

**Tabelle 4-3:** Pipettierschema Trenngel nach Thomas und Kornberg (je 1 Gel):

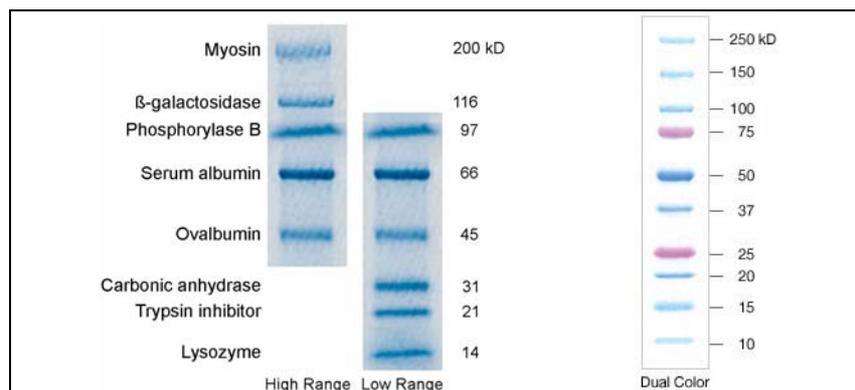
Lösung:	Minigel		Großgel	
	12%	18%	12%	18%
H <sub>2</sub> O	1,7 mL	0,7 mL	13,6 mL	5,7 mL
A	2,0 mL	3 mL	16 mL	24 mL
B	1,25 mL	1,25 mL	10 mL	10 mL
APS	50 µL	50 µL	400 µL	400 µL
TEMED	1,66 µL	1,66 µL	13,3 µL	13,3 µL

Nach dem die Polymerisation des Trenngels abgeschlossen war, konnte das Sammelgel gegossen werden. Zunächst wurde das überschichtete Wasser abgegossen und anschließend die Sammelgel-Lösung wie in Tabelle 4-4 aufgeführt zusammenpipettiert, gründlich vermischt und anschließend mit einer Pasteur-Pipette auf das Trenngel gegossen. Nach dem Gießen wurde sofort der Kamm eingesetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass sich keine Luftblasen bildeten.

**Tabelle 4-4:** Pipettierschema Sammelgel (je 1 Gel):

Lösung:	Minigel	Großgel
H <sub>2</sub> O	1,55 mL	3,1 mL
A'	325 µL	0,65 mL
C	625 µL	1,25 mL
APS	75 µL	150 µL
TEMED	2,5 µL	5 µL

Nach etwa 15 Minuten war das Sammelgel ausgehärtet und der untere Spacer oder der Tesafilm konnte entfernt werden. In die untere Kammer der Elektrophorese-Apparatur wurde Elektrophoresepuffer eingefüllt und das Gel in die Kammer eingespannt, so dass die Unterseite des Gels im Laufpuffer eingetaucht war. Eventuell vorhandene Luftblasen wurden anschließend mit Hilfe einer Spritze mit gebogener Kanüle entfernt. Dann wurde der Kamm vorsichtig aus dem Sammelgel gezogen und dabei eventuell verschobene Taschenstege mit einem sauberen Spatel wieder aufgerichtet. Danach wurde der obere Tank befüllt, wobei darauf geachtet wurde, dass das System gut abgedichtet war. Die Taschen wurden mit einer Pipette gespült, um Gelreste und Luftblasen zu entfernen. Die aufzutrennenden Proteinproben wurden in Probenpuffer aufgenommen und kurz vor dem Beladen bei 95°C für 5 Minuten aufgeköcht und anschließend für 1 Minute bei 10.000 g abzentrifugiert. In eine Geltasche eines Minigels konnte ein maximales Probevolumen von 30 µL bzw. 60 µL in eine Geltasche eines Großgels mit einer Gelladespitze pipettiert werden. Zur Molekulargewichtsbestimmung der aufgetrennten Proteinproben wurden Referenzproteine („High- und Low-Range“ oder „Broad-Range Dual Color“-Marker) der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH (München) verwendet (siehe Abbildung 4-8). Vom Marker wurden 3 µL aufgetragen.



**Abbildung 4-8:** Verwendete Protein-Größenmarker für die SDS-PAGE. Links: High- und Low-Range-Marker; Rechts: Broad-Range Dual Color-Marker (alle Bio-Rad Laboratories GmbH).

Zur Markierung der Lauffront wurde in die leeren Geltaschen 5 µL Bromphenolblau in Probenpuffer aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einem Minigel bei 100 V für etwa einer Stunde; Großgele wurden über Nacht bei 25 mA gefahren. Die Elektrophorese wurde gestoppt, als die Bromphenolblaufront etwa 0,5 cm von der unteren Gekante entfernt war. Das Gel wurde aus den Platten genommen und an einer Ecke markiert (in der Regel links unten), um das Beladungsschema nachvollziehbar zu machen. Das Trenngel wurde mit einem Skalpell vom Sammelgel getrennt und entweder mit Coomassie® Brilliant Blue (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg), oder PageBlue™ (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) gefärbt werden (siehe 4.3.11.2).

### 4.3.9 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte nach der Methode von O'Farrell und Ivarie (O'Farrell and Ivarie, 1979). Dabei werden die Proteine zuerst nach ihrer Netto-Eigenladung in einem pH-Gradienten separiert und in der zweiten Dimension unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt.

#### 4.3.9.1 Erste Dimension: NEPHGE

Die Nichtgleichgewichts-pH Gradienten-Gelelektrophorese (NEPHGE) wird hauptsächlich zur Auftrennung basischer Proteine eingesetzt. Die Proteine migrieren bei dieser Technik nicht bis zu ihrem isoelektrischen Punkt (IEP), da der pH-Gradient bei längeren Laufzeiten im alkalischen Bereich instabil wird und die Elektrophorese deswegen vor dem Erreichen des Gleichgewichtszustands beendet werden muss. Die Proteine wandern von der Anode (+) zur Kathode (-), wobei der Kathodenpuffer alkalisch ist. Die Dauer der Elektrophorese richtet sich nach der Ladung der aufzutrennenden Proteine. Bei stark basischen Proteinen muss daher die Laufzeit entsprechend verkürzt werden.

##### *Erforderliche Lösungen:*

Lysispuffer 1:	9,5 M	Harnstoff
	0,5%	SDS
	5%	β-Mercaptoethanol
	2%	Ampholine; pH 2 – 11
Lysispuffer 2:	9,5 M	Harnstoff
	5%	(w/w) Nonidet P40
	5%	β-Mercaptoethanol
	2%	Ampholine; pH 2 – 11
Überschichtungslösung:	6 M	Harnstoff
	5%	(w/w) Nonidet P40
	1%	Ampholine; pH 2 – 11
30% Acrylamid-Bis-Lösung:	28,38 g	Acrylamid
	1,62 g	Bis (N,N'-Methylendiacylamid) auf 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
10% Nonidet P40	10 g	Nonidet P40 auf 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
Anoden-Puffer:	10 mM	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Kathoden-Puffer:	20 mM	NaOH
SDS-Probenpuffer (für 2. Dimension)	60 mM	Tris-HCl, pH 6.8
	10%	Glycerin
	5%	β-Mercaptoethanol
	2%	SDS

Die Lysispuffer 1 und 2 sowie die Überschichtungslösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Alle übrigen Lösungen wurden vor Gebrauch frisch angesetzt.

##### **Silikonisieren der Glasröhrchen:**

Die Glasröhrchen mit einer Länge von 13 Zentimetern und einem Innendurchmesser von 2 Millimetern wurden in einen Messzylinder mit Silikonisierungslösung (Serva, Heidelberg) überschichtet. Nach einer 5-minütigen Einwirkzeit wurde die Lösung wieder entfernt und die Röhrchen in einem Heihschrank für eine Stunde bei 80°C getrocknet.

Nach dem Abkühlen der silikonisierten Glasröhrchen wurden die Rundgele der ersten gegossen. Vor dem Einfüllen der Gelmischung wurden die Röhrchen am unteren Ende mit mehreren Lagen Parafilm dicht verschlossen.

##### *Zusammensetzung des Rundgels (10 mL Lösung - ausreichend für etwa 12 Rundgele):*

5,5 g	Harnstoff
1,33 mL	30%ige Acrylamid-Bis - Lösung
2 mL	10%ige Nonidet NP 40 - Lösung
2 mL	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
0,5 mL	Ampholine pH 2 – 11
15 µL	10% APS
10 µL	TEMED

Nachdem der Harnstoff durch Erwärmen vollständig gelöst war, wurden Ampholine, APS und TEMED zugegeben. In die silikonisierten Glasröhrchen wurde die Gellösung mit einer langen Pasteur-Pipette luftblasenfrei bis zu einer Höhe von etwa 12 Zentimetern eingefüllt. Anschließend wurde die Gellösung mit 100 µL H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> vorsichtig überschichtet und darauf geachtet, dass die Röhrchen senkrecht ausgerichtet waren, um eine gleichmäßige Polymerisation der Geloberfläche zu ermöglichen. Grundsätzlich wurden die Rundgele am Vorabend gegossen, damit das Aushärten über Nacht stattfinden konnte. Danach wurde die Geloberfläche gründlich mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gespült, der Parafilm entfernt und das untere Ende der Röhrchen mit Gaze-Stoff überzogen, um ein Herausgleiten der Gele während der Elektrophorese zu verhindern. Die Röhrchen wurden in die Elektrophoresekammer für Rundgele eingesetzt und die untere Kammer mit Kathodenpuffer (20 mM NaOH) aufgefüllt.

### 4.3.9.1.1 Vorbereitung der Proben

Die aufzutrennende Proteinprobe wurde in Probenpuffer nach Laemmli (siehe 4.3.8) aufgenommen und durch 5-minütiges Erhitzen auf 95°C gelöst. Nachdem die Lösung abgekühlt war, wurden die Proteine durch Zugabe von 9 Volumenanteilen Aceton bei -20°C für mindestens 3 Stunden oder über Nacht ausgefällt. Die präzipitierten Proteine wurden für 10 Minuten bei 1.000 g abzentrifugiert und zweimal mit 90%igem Aceton gewaschen. Das unter Stickstoff getrocknete Sediment wurde in 30 µL Lysispuffer 1 gelöst. Nach Zugabe von 30 µL Lysispuffer 2 wurden unlösliche Bestandteile abzentrifugiert und die Probe auf das Rundgel aufgetragen.

Die aufgetragene Probe wurde mit 20 µL Überschichtungslösung überschichtet und das Röhrchen bis zum oberen Rand mit Anodenpuffer (10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) aufgefüllt.

Als Farbmarker für stark basische Proteine wurde Cytochrom C (IEP > 11) auf ein separates Rundgel geladen.

*Elektrophorese-Bedingungen:*

Obere Kammer: Anode (+)  
Untere Kammer: Kathode (-)

Bei konstanter Spannung:	15 min	200 V
	30 min	300 V
	90 min	400 V

Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn das Cytochrom C noch etwa 2 Zentimeter vom Gel-Ende entfernt war. Die Rundgele wurden mit einer Wasser-gefüllten Spritze mit einem aufgesteckten Silikon Schlauch vorsichtig aus dem Glasröhrchen herausgepresst. Anschließend wurden die Gele für 20 Minuten in SDS-Probenpuffer (für die zweite Dimension) äquilibriert. Danach wurde der SDS-Probenpuffer abgesaugt und die Rundgele entweder sofort auf die Flachgele der 2. Dimension aufgetragen. Alternativ dazu konnten die Rundgele bei -20°C für mehrere Wochen aufbewahrt werden.

### 4.3.9.2 Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamid-Flachgele

Die Flachgele wurden – wie unter 4.3.8 beschrieben gegossen, ohne jedoch Kämmen zum Formen von Geltaschen einzusetzen.

Die äquilibrierten Rundgele der ersten Dimension wurden gleichmäßig gestreckt auf die Oberfläche der Sammelgele gelegt und mit flüssiger 1% Agarose-Lösung in SDS-Probenpuffer für die zweite Dimension eingegossen, so dass eine durchgehende Verbindung zwischen Rund- und Sammelgel hergestellt wurde. Nach Auspolymerisation der Agarose wurde zur Markierung der Lauffront an einer Seite des Gels Bromphenolblau (in Wasser und Glycerin gelöst) aufgetragen. Außerdem wurde in einen flüssigen Agarosetropfen (1% Agarose in SDS-Probenpuffer) 5 µL eines Protein Größensstandards pipettiert und nach dem Festwerden ebenfalls an eine Seite des Gels angefügt.

*Elektrophorese-Bedingungen:*

16 – 18 h bei 17 – 18 mA

Nach der Elektrophorese wurden die Flachgele geblottet oder angefärbt (siehe 4.3.10 oder 4.3.11).

### Bestimmung des pH-Gradienten im Rundgel:

Zur Bestimmung des pH-Gradienten in einem Rundgel wurde ein separat aufgetrenntes Gel der ersten Dimension in 5 mm lange Stücke unterteilt. Diese wurden einzeln in mit 3 mL H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gefüllte 15 mL-Röhrchen überführt und über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen gründlich geschüttelt und der pH-Wert jeder Probe bestimmt.

### 4.3.10 Westernblot (semidry-Elektroblot + Wetblot)

#### 4.3.10.1 Semidry-Verfahren nach Towbin

Nach der Auftrennung der Proteingemische durch die SDS-PAGE (siehe 4.3.8) wurden die Polypeptide nach der von Towbin (Towbin et al., 1979) beschriebenen Methode elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Anschließend konnten die auf der Membran immobilisierten Proteine mit Antikörpern inkubiert und durch spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen und mit Hilfe von enzymgekoppelten Sekundärintikörpern nachgewiesen werden.

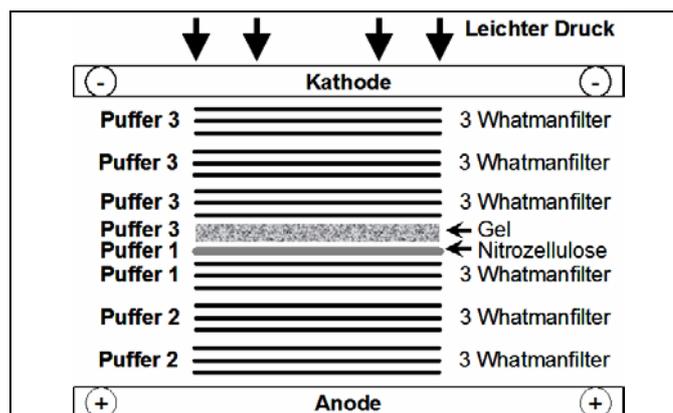
## Methoden

### Erforderliche Lösungen:

Westerblot-Puffer 1:	25 mM Tris-HCl 20% (v/v) Methanol ⇒ pH einstellen auf 10.4
Westerblot-Puffer 2:	300 mM Essigsäure 20% (v/v) Methanol ⇒ pH einstellen auf 10.4
Westerblot-Puffer 3:	25 mM Tris-HCl 40 mM DL-Norleucin 20% (v/v) Methanol ⇒ pH einstellen auf 9.4
TBST (pH 8.0)	10 mM Tris-HCl, pH 8.0 150 mM NaCl 0,05 % (w/v) Tween® 20
Absättigungslösung:	10 % (w/v) Magermilchpulver in TBST ⇒ pH einstellen auf 7,8
oder:	1 % (w/v) BSA (Sigma) in TBST
Ponceau S	Gebrauchsfertige 0,2%ige Lösung (Serva)
ECL-Lösungen 1 und 2	(Amersham Pharmacia Biotech)

### Durchführung:

Nach Beendigung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das Gel aus der Kammer genommen und das Sammelgel mit einem Skalpell vom Trenngel entfernt. Durch das Abschneiden der linken unteren Ecke wurde die Orientierung des Gels markiert. Anschließend wurde das Gel für 15 Minuten im Westernblot-Puffer 3 äquilibriert. Während dieser Zeit wurden die Nitrozellulose-Membran und die Whatman-Filter auf die Gelgröße zugeschnitten. Danach wurde der Westernblot -wie in Abbildung 4-9 dargestellt- aufgebaut. Der Transfer erfolgte mit einer Glaskohlenstoff-Elektroden-Blottingkammer (Fa. Cti GmbH, Idstein/Taunus). Jeweils drei Whatman-Filter wurden kurz in den jeweiligen Westernblot-Puffern eingeweicht, bevor sie in der Blottingkammer übereinander geschichtet wurden. Um Luftblasen-Bildungen zu vermeiden, wurden die Whatman-Filter mit einem Zentrifugenröhrchen mit sanftem Druck gewalzt. Luftblasen unter dem Gel wurden vorsichtig mit befeuchteten Fingern heraus gestrichen, die Nitrozellulose-Membran wurde nur aufgelegt.



**Abbildung 4-9:** Schematischer Aufbau eines Westernblots.

Nach dem vollständigen Übereinanderschichten wurde die Kathodenplatte aufgesetzt und die Kammer an eine Stromquelle angeschlossen. Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von  $0,8 \text{ mA cm}^{-1}$  für 1,5 Stunden. Danach wurde der Blot abgebaut und die transferierten Proteine mit Ponceau S auf der Nitrozellulose-Membran nachgewiesen. Dazu wurde der Blot in einer Glasschale mit etwa einem Zentimeter Ponceau S überschichtet und für 5 Minuten unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit entsalztem Wasser entfärbt und für Dokumentationszwecke eingescannt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran entweder über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  oder für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 10% (w/v) Magermilch in TBST, pH 7.8 oder mit 1% BSA in TBST in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper abgesättigt.

### 4.3.10.2 Wetblot-Verfahren

Alternativ zum Semidry-Verfahren wurde auch der Wetblot-Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulose-Membran durchgeführt.

#### *Erforderliche Lösungen:*

Blottingpuffer: 10 mM CAPS (SL: 0,5 M; pH 11.0)  
10% (v/v) Methanol  
⇒ pH einstellen auf 10

TBST (siehe 4.3.10.1)

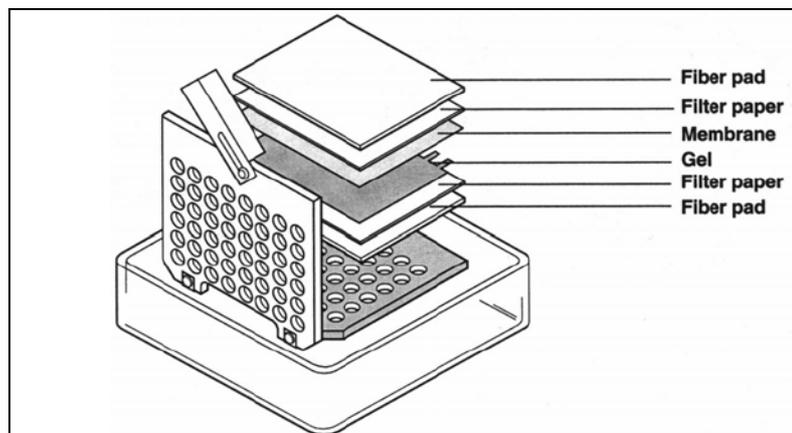
Absättigungslösung: 10 % (w/v) Magermilchpulver in TBST  
⇒ pH einstellen auf 7,8

oder: 1 % (w/v) BSA (Sigma) in TBST

Ponceau S Gebrauchsfertige 0,2%ige Lösung (Serva)

#### *Durchführung:*

Nachdem die Lauffront des Gels etwa zwei Zentimeter vor dem unteren Ende erreicht hatte, wurde die Elektrophorese abgebrochen und das Gel abgebaut. Das Sammelgel wurde mit einem Skalpell abgetrennt und die linke untere Ecke zur Orientierung entfernt. Anschließend wurde das Trenngel für 15 Minuten im Blottingpuffer äquilibriert. In der Zwischenzeit wurden die Whatman-Filter und die Nitrozellulose-Membran auf Gelgröße zugeschnitten. Der Wetblot wurde im Mini-TransBlot-System (Firma Bio-Rad) durchgeführt. Es konnten 2 Minigele gleichzeitig geblottet werden. Der Aufbau erfolgte wie in Abbildung 4-10 angegeben: Die Whatman-Filter und die Nitrozellulose-Membran wurden in Blottingpuffer getränkt und wie in der Grafik abgebildet aufgebaut. Es war darauf zu achten, dass keine Luftblasen zwischen den Schichten oder dem Gel entstanden.



**Abbildung 4-10:** Schematischer Aufbau eines Wetblots.

Das Sandwich wurde zusammen mit einem Kühlakku in die mit Blottingpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt, wobei auf eine korrekte Ausrichtung des Gels hinsichtlich der Kathode geachtet wurde. Der Transfer erfolgte für 45 Minuten bei einer konstanten Spannung von 50 V und einer Stromstärke von 175 mA. Die Stromstärke sank im Verlauf des Transfers auf etwa 110 mA ab. Danach wurde der Blot abgebaut und die Nitrozellulose-Membran gründlich mit  $H_2O_{bidest.}$  gespült. Danach wurde der Blot abgebaut und die transferierten Proteine mit Ponceau S auf der Nitrozellulose-Membran nachgewiesen. Dazu wurde der Blot in einer Glasschale mit etwa einem Zentimeter Ponceau S überschichtet und für 5 Minuten unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit entsalztem Wasser entfärbt und für Dokumentationszwecke eingescannt oder wie unter 4.3.10.1 beschrieben abgesättigt und mit spezifischen Antikörpern inkubiert.

## 4.3.11 Färbung von SDS-Gelen

### 4.3.11.1 Coomassie-Färbung

*Erforderliche Lösungen:*

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

⇒ nach dem Ansetzen der Lösung filtrieren!

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

*Durchführung:*

Nach Beendigung der elektrophoretischen Auftrennung der Proteingemische durch die SDS-PAGE wurde das Gel für 3 Stunden unter leichter Bewegung in die Coomassie-Färbelösung gelegt. Danach wurde das Gel über Nacht in Entfärbelösung überführt. Durch Zugabe eines geknoteten weißen Zellstofftuchs konnte der Entfärbungsvorgang beschleunigt werden und auf ein Austauschen der Entfärbelösung verzichtet werden. Der Coomassie-Farbstoff lagert sich an basische und aromatische Seitenketten von Aminosäuren an und weist damit Proteine unspezifisch nach. Die angefärbten Proteinbanden wurden anschließend eingescannt.

### 4.3.11.2 PageBlue™-Färbung

Alternativ zur Coomassie-Färbung wurden Gele mit der gebrauchsfertigen Färbelösung PageBlue™ (MBI Fermentas GmbH) gefärbt. Der Vorteil dieses Reagens ist die hohe Sensitivität von bis zu 5 Nanogramm Protein und der geringere Zeitaufwand. Nach der SDS-PAGE wurden die Gele 3-mal für 5 Minuten in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  bei 75°C gewaschen, um das SDS auszuwaschen. Anschließend wurde das Gel für 20 Minuten in 60°C warme PageBlue™-Färbelösung unter leichter Bewegung inkubiert. Anschließend wurde das Gel erneut 3-mal für 5 Minuten in etwa 75°C warmes  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  entfärbt. Die angefärbten Proteinbanden konnten danach zu Dokumentationszwecken eingescannt werden.

### 4.3.11.3 Silberfärbung von Proteingelen

*Erforderliche Lösungen:*

Fixierlösung:	4,75 g	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ in 240 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
	+ 10 mL	25%iges Glutaraldehyd
Färbelösung:	230 mL	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
	4,6 mL	1M NaOH
	4,9 mL	$\text{NH}_4\text{OH}$
	1,94 g	$\text{AgNO}_3$ in etwa 20 mL der oben angegebenen Lösungen <i>langsam</i> unter Rühren zugeben; dann sukzessive auf 250 mL auffüllen.
Reduktionslösung:	25 mL	99,7% EtOH p.a.
	1,5 mL	1%ige Zitronensäure (frisch ansetzen!)
	55 µL	37% Formaldehyd

⇒ auf 250 mL mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  auffüllen

*Durchführung:*

Vor der Silberfärbung wurden die Gele im Allgemeinen mit Coomassie gefärbt (siehe 4.3.11.1). Durch diese Vorfärbung konnte die Hintergrundfärbung deutlich reduziert werden.

Nach gründlichem Entfärben wurde das Gel dreimal für 20 Minuten in entionisiertem Wasser gewaschen. Danach erfolgte eine 15-minütige Inkubation in Fixierlösung unter leichter Bewegung. Anschließend wurde das fixierte Gel erneut für 20 Minuten mit entionisiertem Wasser gewaschen. Durch die darauf folgende 20-minütige Inkubation mit der Färbelösung wurde das Gel mit den Silberionen getränkt. Überschüssige Silberionen wurden durch anschließendes Waschen in entionisiertem Wasser für 15 Minuten entfernt. Nach dem Waschen erfolgte der eigentliche Färbeschritt. Dazu sollte das Waschwasser vollständig entfernt sein. Nach Zugabe von 250 mL Reduktionslösung und kurzem Schwenken entsteht ein rotbrauner Niederschlag aus Silbercarbonat, der aus reduziertem Silber besteht. Nach etwa 30 Sekunden färbte sich der Hintergrund des Gels gelblich und die Proteinbanden erschienen hellbraun. Nach etwa 3 – 5 Minuten wurde die Reaktion gestoppt und die Reduktionslösung durch entionisiertes Wasser ersetzt. Dieser Waschvorgang wurde mehrmals wiederholt. Bei der Silberfärbung muss beachtet werden, dass der Färbvorgang nach dem Abstoppen der Reduktionsreaktion noch nicht abgeschlossen ist, und die angefärbten Proteinbanden noch nachdunkeln.

Nach Abschluss der Färbereaktion konnten die Gele im Durchlicht fotografiert oder direkt eingescannt werden.

### 4.3.11.4 Trocknen von SDS-Gelele

Die gefärbten SDS-Gele wurden getrocknet, um sie für einen längeren Zeitraum aufbewahren zu können. Das entfärbte Gel wurde zunächst auf ein befeuchtetes Whatman-Filterpapier gelegt und mit einer in Wasser eingeweichten Zellophan-Folie bedeckt. Anschließend wurde das Gel in einem Drystar-Geltrockner für 1,5 Stunden bei maximaler Vakuumeistung und 75°C getrocknet. Nach dem Trocknungsprozess wurde das Gel entnommen und bei Bedarf zwischen zwei Glasplatten geglättet.

Alternativ dazu wurden die entfärbte Gele Luftblasen-frei zwischen zwei in Wasser eingeweichten Zellophan-Folien gelegt und in einen Plexiglasrahmen gespannt. Überschüssiges Wasser wurde durch Abtropfen entfernt. Nach etwa 12 Stunden waren die Gele bei Raumtemperatur vollständig getrocknet und konnten aus dem Rahmen genommen werden. Überstehende Zellophanreste wurden abgeschnitten.

### 4.3.12 Spezifischer Proteinnachweis mit Antikörpern

Der Blot wurde nach dem Proteintransfer zunächst mit Magermilch- oder BSA-Lösung abgesättigt (siehe 4.3.10.1). Anschließend wurde der Blot unter Rotation für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem verdünnten Primärantikörper inkubiert, wobei sich die Verdünnung nach dem verwendeten Antikörper richtete (siehe 2.1.4.1). Alternativ dazu konnte die verdünnte Primärantikörper-Lösung auch über Nacht bei 4°C und unter Rotation mit dem Blot inkubiert werden. Danach wurde der Blot für 3-mal 10 Minuten in TBST gewaschen. Die anschließende Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Rotation. Die Verdünnung war wiederum vom jeweils verwendeten Antikörper abhängig (siehe 2.1.4.2). Im Allgemeinen wurde der Sekundärantikörper in der Absättigungslösung verdünnt, mit der zuvor die unspezifischen Bindungsstellen auf der Nitrozellulose-Membran abgeblockt wurden (Magermilch oder BSA). Nach dieser Inkubation wurde der Blot erneut 3-mal 10 Minuten mit TBST gewaschen. Sollte auf dem Blot ein zusätzliches Protein mit einem weiteren spezifischen Antikörper nachgewiesen werden, wurde der Blot anschließend mit dem zweiten Primärantikörper inkubiert und nach dem bereits beschriebenen Waschprozess mit dem entsprechenden Sekundärantikörper behandelt werden. Danach wurde der Blot wieder dreimal in TBST gewaschen. Die Detektion der spezifisch gebundenen Antikörper erfolgte anschließend mit ECL (siehe 4.3.13).

### 4.3.13 Detektion über Peroxidase und ECL (Enhanced Chemi-Luminescence)

Zum Nachweis von spezifisch gebundenen Primärantikörpern mit Hilfe der „Enhanced Chemiluminescence“-ECL-Detektion, müssen Sekundärantikörper verwendet werden, an die das Enzym Peroxidase (isoliert aus Meerrettich) gekoppelt ist. Die ECL-Reaktion wurde im Anschluss an die oben beschriebenen Antikörperinkubations- und Wasch-Schritte durchgeführt. Die beiden ECL-Reagenzien wurden im Verhältnis von 1:1 gemischt, die Nitrozellulose-Membran mit dieser Lösung befeuchtet und für zwei Minuten unter leichter Bewegung inkubiert. Die Peroxidase katalysiert die chemische Reaktion der Substanz „Luminol“ mit der Substanz „Perhydrol“ in dem Gemisch. Dadurch wird Licht in Form von chemischer Lumineszenz emittiert. Nach der Einwirkzeit wurde die Lösung abgetropft und der Blot Falten- und Luftblasen-frei in Frischhaltefolie eingeschlagen. Anschließend wurde auf die Membran ein Röntgenfilm (Cronex) unter Ausschluss von Licht (Dunkelkammer) in eine Filmkassette gelegt. Das emittierte Licht reicht aus, um den Röntgenfilm zu schwärzen. Die Expositionsdauer richtete sich nach der Intensität des Lichtsignals. Im Allgemeinen wurden Zeiten zwischen einer und 30 Minuten gewählt. Der Röntgenfilm wurde anschließend im Entwicklerbad für 15 – 30 Sekunden inkubiert und nach kurzem Spülen in Wasser in Fixierlösung für eine Minute fixiert. Abschließend wurde der Film gründlich mit entionisiertem Wasser abgespült, getrocknet und zur Dokumentation eingescannt und mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop editiert.

Der Blot wurde gründlich in TBST gewaschen und luftdicht im Dunkeln bei 4°C für mehrere Wochen gelagert.

### 4.3.14 Entfernen von gebundenen Antikörpern (Strippen)

Um eine Nitrozellulose-Membran für eine weitere Antikörperinkubation verwenden zu können, müssen zunächst die gebundenen Antikörper entfernt werden. Die Antigen-Antikörper-Bindung kann durch Zugabe von reduzierenden Reagenzien oder einem saurem pH-Wert bei mittlerer Hitze gelöst werden.

*Erforderliche Lösungen:*

Strippingpuffer (50 mL):	100 mM	Tris-HCl, pH 6.7
	2%	(w/v) SDS
	390 µL	β-Mercaptoethanol

TBST (siehe 4.3.10.1)

### *Durchführung:*

Der Blot wurde zunächst gründlich mit TBST gewaschen und dann für exakt eine halbe Stunde bei 50°C in Strippingpuffer unter leichter Bewegung inkubiert. Anschließend wurde die Membran in einem großen Volumen TBST für dreimal 10 Minuten gewaschen. Danach konnte der Blot erneut abgesättigt und mit einem anderen Primärantikörper inkubiert werden.

### **4.3.15 Affinitätsreinigung eines Antiserums**

#### **4.3.15.1 Affinitätsreinigung über Western Blot**

##### *Erforderliche Lösungen:*

TBST (siehe 4.3.10.1)

Absättigungspuffer: TBST mit 10% (w/v) Magermilch (oder 1% BSA)

Elutionspuffer:                    10 mM Glycin  
   500 mM NaCl  
   200 µg/mL BSA  
⇒ pH einstellen auf 2.3

Neutralisationspuffer:            100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 9.2)

Na-Phosphatpuffer:                6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
   120 µg/mL BSA  
   0,03% (w/v) NaN<sub>3</sub>  
⇒ pH einstellen auf 7.5

##### *Durchführung:*

Zunächst wurde durch eine SDS-PAGE das Protein, gegen das der Antikörper aufgereinigt werden sollte, aufgetrennt. Dabei wurde in alle Taschen das Proteingemisch geladen und in die beiden äußeren Taschen der Protein-Größenstandard aufgetragen. Die Proteine wurden wie unter 4.3.10 beschrieben geblottet und durch Ponceau S Färbung auf der Membran sichtbar gemacht. Anschließend wurde die gewünschte Proteinbande mit einem Bleistift markiert. Nach Absättigung (oder Renaturierung, siehe 4.3.15.1.1) und Waschen (3 × 10 Minuten) des Blots wurde das Antiserum (Verdünnung 10-fach höher als normal) eine Stunde bei Raumtemperatur unter Rotation inkubiert. Dann wurde der Blot 3 × 10 Minuten in TBST gewaschen, die mit Bleistift markierte Bande mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in etwa 5 mm große Stücke unterteilt. Die Membranstücke wurden in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 250 µL Elutionspuffer (eiskalt) zugegeben und für 30 Sekunden gevortext. Durch diesen Schritt wurden die Antikörperbindung gelöst und befanden sich im Überstand. Dieser wurde abgenommen und unverzüglich mit einem halben Volumen (entspricht 125 µL) versetzt. Der Elutionsschritt wurde insgesamt drei Mal durchgeführt. Anschließend wurden die neutralisierten Überstände mit Centricon® Zentrifugenfilter (Millipore GmbH, Schwalbach) eingengt, um die Antikörperkonzentration zu erhöhen. Nach der Volumenreduktion (10 – 15-fache) wurde das gleiche Volumen (etwa 25 µL) Na-Phosphatpuffer zugegeben, um die Antikörper während der Lagerung zu stabilisieren. Die Antikörper-Lösung konnte direkt als Antiserum verwendet werden; die geeigneten Verdünnungen wurden empirisch ermittelt.

#### **4.3.15.1.1 Renaturierung eines Western Blots**

Um die Bindungsaffinität mancher Antikörper zu verbessern, konnten die auf die Nitrozellulose-Membran geblotteten Proteine vor Inkubation mit dem Antiserum renaturiert werden.

##### *Erforderliche Lösungen:*

TBST (siehe 4.3.10.1)

Renaturierungspuffer:            4 M Harnstoff  
   50 mM NaCl  
   10 mM Tris-HCl  
   2 mM EDTA  
   1 mM DTT  
⇒ pH einstellen auf 7.5

Absättigungspuffer: TBST mit 10% (w/v) Magermilch (oder 1% BSA)

### *Durchführung:*

Die Auftrennung des Proteins, gegen das der Antikörper gereinigt werden sollte, wurde wie unter 4.3.8 beschrieben mit einer SDS-PAGE durchgeführt und die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Nach Anfärbung der Membran mit Ponceau S und Markierung der Proteinbande wurde der Blot für 3 Stunden bei Raumtemperatur oder alternativ über Nacht bei 4°C und unter Rotation mit dem Renaturierungspuffer inkubiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen in TBST für je 10 Minuten. Danach wurde die Nitrocellulose-Membran für 30 Minuten bei Raumtemperatur und unter Rotation mit dem Absättigungspuffer inkubiert und wiederum in TBST gewaschen (3 × 10 Minuten). Danach konnte das Antiserum wie unter 4.3.15.1 beschrieben mit der Membran inkubiert und die Antikörper aufgereinigt werden.

### 4.3.15.2 Affinitätsreinigung über eine Matrix aus CNBr-Sepharose

#### *Erforderliche Lösungen:*

Aktiviert CNBr-Sepharose (Amersham):

- ⇒ Eigenschaften:
- 100 mg Pulver ergeben ca. 350 µL Säulenvolumen
  - Bindungskapazität: 25-60 mg Protein/mL Säulenvolumen

Quellungspuffer: 10 mM HCl

Bindungspuffer (pH 8.8): 200 mM NaHCO<sub>3</sub>  
500 mM NaCl  
⇒ pH mit Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> einstellen auf 8.8

Absättigungspuffer: Bindungspuffer + 200 mM Glycin

Waschpuffer 1 (pH 4.0) 100 mM Na-Acetat  
500 mM NaCl  
⇒ pH einstellen mit Essigsäure auf 4.0

Waschpuffer 2 (pH 6.8): 100 mM Glycin  
⇒ pH einstellen auf 6.8

PBS (siehe 4.2.28)

PBS + 0,1 % Triton-X-100

PBS + 300 mM NaCl

Elutionspuffer: 100 mM Glycin; pH 2.5

Neutralisationspuffer: 1 M Tris-HCl; pH 9.5

### *Durchführung:*

#### **Herstellung der Säule:**

Das zu bindende Antigen sollte in Bindungspuffer vorliegen oder gegebenenfalls vorher gegen Bindungspuffer dialysiert werden (siehe 4.3.3). Die entsprechende Menge Säulenmaterial wurde zunächst in einem 15 mL-Röhrchen mit 1 – 5 mL Quellungspuffer gequollen. Anschließend wurde 1 Minute bei 500 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und vollständig entfernt. Es sollte darauf geachtet werden, beim Abnehmen eine Pipettenspitze mit möglichst kleinem Öffnungsdurchmesser zu verwenden, da die Sepharose sehr leicht abgesaugt werden kann. Als Alternative kann auch eine ausgezogene Glas-Pasteurpipette herangezogen werden. Anschließend wurde das zu bindende Protein in Bindungspuffer zugegeben, gründlich vermischt und 3 Stunden bei Raumtemperatur (oder bei 4°C über Nacht) unter Rotation inkubiert. Nach einer anschließenden 1-minütigen Zentrifugation bei 500 g und 4°C wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Die Säule wurde danach 2 – 3 Stunden bei Raumtemperatur unter Rotation in Absättigungspuffer inkubiert. Nach einer Zentrifugation unter den oben angegebenen Bedingungen wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Die Säule wurde zunächst mit Waschpuffer, dann mit Bindungspuffer gewaschen. Diese beiden Schritte wurden insgesamt fünfmal wiederholt. Abschließend wurde noch zweimal mit PBS gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschritten wurde jeweils eine Minute bei 500 g und 4°C zentrifugiert. Die Säule konnte danach für einige Wochen bei 4°C in PBS gelagert werden. Zur Stabilisierung der gebundenen Proteine hat sich die Zugabe von Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) in einer Endkonzentration von 0,01% als nützlich erwiesen.

#### **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 Stunden bei Raumtemperatur unter Rotation inkubiert, um eine gründliche Durchmischung zu gewährleisten. Zur Stabilisierung empfindlicher Antikörper empfiehlt es sich BSA (Sigma) in einer Endkonzentration von 0,5% zuzugeben.

Nach der Bindung der Antikörper wurde die Säule zum Waschen in ein 15 mL-Röhrchen überführt. Es wurde zweimal mit PBS gewaschen; anschließend zweimal mit PBS + 0,1 % Triton-X-100. Danach folgten zwei Waschschrte mit PBS + 300 mM NaCl, bevor zweimal mit PBS und abschließend zweimal mit Waschpuffer 2 gewaschen wurde. Beim zweiten Waschschrte mit Glycin-Puffer wurde die Säule wieder in ein 1,5 mL-Eppendorf-Gefäß überführt. Zwischen allen Waschschrten 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 Zentrifugationsschrte für 1 Minute 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 Neutralisation des sauren pH-Werts in den Elutionsfraktionen wurde jeweils  $\frac{1}{10}$  Volumen Neutralisationspuffer zugegeben bzw. vorgelegt. In der Regel wurden sechs Elutionsfraktionen gesammelt, die dann zur Stabilisierung der Antikörper mit Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ; Endkonzentration = 0,01%) versetzt wurden. Die Lagerung der affinitätsgereinigten Antikörper war bei 4°C etwa 2 – 6 Wochen möglich. Die Reinigung wurde über Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten und fixierten Zellen überprüft. Die geeigneten Verdünnungen für Immunfluoreszenzen oder Immunblot wurden empirisch ermittelt.

Die Säule wurde abschließend in ein 15 mL-Röhrchen überführt und für weitere 10 Minuten in Elutionspuffer inkubiert, bevor sie dreimal mit PBS gewaschen wurde. Die Säule konnte mehrfach für eine Affinitätsreinigung verwendet werden und konnte in PBS + 0,01% Natriumazid für 4 – 6 Wochen bei 4°C gelagert werden.

### 4.4 Zellbiologische Methoden

## Mikroskopie

Für die mikroskopische Untersuchung von Zellpräparaten wurde ein Zess Axiophot HB050 mit Quecksilberlampe verwendet. Die fluoreszierenden Zellen wurden mit einem digitalen Kamerasystem der Firma Pixelfly (CCD-Sensor) dokumentiert. Die aufgenommenen Bilder wurden anschließend mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop editiert.

### 4.4.1 Indirekte Immunlokalisation in Zellen und Geweben

Durch die Immunlokalisation ist es möglich, die Verteilung bestimmter Proteine innerhalb einer Zelle mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen. Im Allgemeinen wird die Technik der indirekten Immunfluoreszenz verwendet. Bei diesem Verfahren erkennt ein spezifischer Primärantikörper das zu analysierende Protein. Danach wird ein universeller Sekundärantikörper eingesetzt, der kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist und der an den Primärantikörper bindet. Dies hat zum einen den Vorteil, dass das Fluoreszenzsignal verstärkt wird –ein Primärantikörper wird in der Regel von mehreren Sekundärantikörpern markiert– zum anderen können die Sekundärantikörper mit unterschiedlichen Farbstoffen gekoppelt sein, so dass zwei oder mehrere verschiedene Proteine in einer Zelle sichtbar gemacht werden können. Die Farbstoffe erzeugen bei Anregung durch ein Licht mit einer bestimmten Wellenlänge eine spezifische Fluoreszenz. Das Fluoreszenzmuster, das mit unter dem Mikroskop beobachtet werden kann entspricht dem Verteilungsmuster des untersuchten Proteins in den Zellen oder Geweben.

### 4.4.2 Fixierung von Zellen

Bevor die Zellverteilung bestimmter Proteine durch indirekte Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden kann, müssen die Zellen zuerst fixiert und in einem nachfolgenden Schrit permeabilisiert werden, um die Zugänglichkeit der Antikörper ins Innere der Zellen zu gewährleisten. Generell wurde mit zwei verschiedenen Methoden gearbeitet: der Formaldehyd–Triton- bzw. der Methanol–Aceton-Fixierung.

#### 4.4.2.1 Fixierung mit Formaldehyd–Triton

Durch die Behandlung mit Formaldehyd werden lösliche und freie funktionelle Gruppen zellulärer Proteine chemisch vernetzt und dadurch immobilisiert. Das Detergenz Triton sorgt dafür, dass die Lipidmembranen der Zellen partiell durchlässig werden.

*Erforderliche Lösungen:*

Paraformaldehyd-Lösung: 2% (w/v) Paraformaldehyd in PBS  
⇒ zum Lösen auf maximal 60°C erhitzen

Triton-Lösung: 0,1% (v/v) Triton™ X-100 in PBS

PBS (pH 7.4): 140 mM NaCl  
6,4 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
2,6 mM KCl  
1,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

### *Durchführung:*

Auf Deckgläschen gewachsene Kulturzellen wurden kurz in PBS gewaschen und anschließend für 5 – 10 Minuten bei Raumtemperatur in Paraformaldehyd-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen kurz in PBS gewaschen und danach für 10 Minuten in der Triton-Lösung bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach der Permeabilisierung wurden die Zellen dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen und konnten für die indirekte Immunfluoreszenz verwendet werden.

### **4.4.2.2 Fixierung mit Methanol—Aceton**

Die Arbeitsschritte dieser Methode werden bei -20°C durchgeführt, wodurch empfindliche Zellstrukturen besonders schonend fixiert werden. Durch die Behandlung mit Methanol wird den Zellen das Wasser entzogen und dadurch die Proteinstrukturen fixiert. Das Lösungsmittel Aceton sorgt für die notwendige Permeabilisierung der Zellwände und Lipidmembranen.

### *Erforderliche Lösungen:*

Methanol: 100% (techn.), -20°C

Aceton: 100% (techn.), -20°C

PBS (siehe 4.4.2.1)

### *Durchführung:*

Auf Deckgläschen gewachsene Kulturzellen wurden kurz in PBS gewaschen und anschließend für 3 Minuten bei -20°C in Methanol entwässert. Anschließend wurden die Deckgläschen für 10 Minuten in Aceton bei -20°C gestellt. Danach wurden die Zellen für 30 Minuten luftgetrocknet und konnten anschließend für die indirekte Immunfluoreszenz verwendet werden.

### **4.4.3 Indirekte Immunfluoreszenz bei Kulturzellen**

### *Erforderliche Lösungen:*

PBS (siehe 4.4.2.1)

PBT (Blockpuffer; optional):  
PBS (pH 7.4)  
+ 1,5% (w/v) BSA (Sigma)  
0,1% (v/v) Tween® 20

Primär- und Sekundärantikörper: (Verdünnung in PBS; siehe 2.1.4)

Hoechst 33258 (SL 5 µg mL<sup>-1</sup>; Serva)

Mowiol:  
10 g Mowiol (Hoechst)  
⇒ in 40 mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-freiem PBS (pH 8.0) für 16 h rühren;  
⇒ 20 mL Glycerin zugeben und nochmals 16 h rühren;  
⇒ ungelöste Partikel abzentrifugieren und Überstand aliquotiert bei -20°C aufbewahren.

### *Durchführung:*

Nach der Fixierung der Kulturzellen (Formaldehyd—Triton bzw. Methanol—Aceton) wurden die Deckgläschen gegebenenfalls mit PBS befeuchtet und in eine Feuchtekammer für die Antikörperinkubation überführt, da die Zellen niemals austrocknen durften. In manchen Fällen wurde noch ein 30-minütiger Absättigungsschritt mit PBT durchgeführt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem verdünnten Primärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Pro Deckglas wurden 50 µL der Verdünnung aufpipettiert. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Deckgläschen dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert.

### 4.4.4 Indirekte Immunfluoreszenz bei Gefrierschnitten und Paraffineinbettungen

#### 4.4.4.1 Gewinnung und Vorbereitung des Gewebes

*Erforderliche Lösungen:*

Eiskaltes PBS (siehe 4.4.2.1)

Methylbutan (mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt)

*Durchführung:*

Um Gewebe für die indirekte Immunfluoreszenz von Gefrierschnitten zu erhalten, wurde ein Frosch anästhesiert und sakrifiziert, und die zu untersuchenden Organe entnommen (siehe 4.5.2 Hodenentnahme) oder anästhesierte Embryonen unterschiedlicher Stadien verwendet. Größere Organe wurden in eiskaltem PBS in kleinere Stücke von etwa einem halben Zentimeter Durchmesser zerteilt und in mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Methylbutan für 2 Minuten schock-gefroren. Anschließend wurden die Gewebestücke bei -70°C aufbewahrt. Um Gefrierschnitte durchführen zu können, mussten die Organe mindestens für 12 Stunden eingefroren und mit Methylbutan durchtränkt sein.

#### 4.4.4.2 Gefriersubstitution

*Erforderliche Lösungen:*

100% Ethanol (p.a., -70°C)

*Durchführung:*

Alternativ zur Paraffineinbettung von Embryonen und Geweben wurde eine Gefriersubstitution durchgeführt. Nachdem die Gewebe in mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Methylbutan schock-gefroren für 2 Minuten waren, wurden sie in -70°C kaltes Ethanol (p.a.) überführt und für eine Stunde inkubiert. Danach wurde das Ethanol durch frisches und auf -70°C vorgekühltes Ethanol erneuert. Die Gewebe verblieben für eine Woche im Ethanol, wobei der Alkohol täglich ausgetauscht wurde. Dadurch wurde das Wasser im Gewebe sukzessive durch das Ethanol ersetzt. Um eine indirekte Immunfluoreszenz durchführen zu können, wurden die Gewebe wie unter 4.4.5.2 beschrieben in Paraffin eingebettet und Schnitte angefertigt.

#### 4.4.4.3 Anfertigung von Gefrierschnitten

*Erforderliche Lösungen:*

Jung Einbettmedium für Gefrierschnitte (Leica Instruments GmbH)

*Durchführung:*

Im Allgemeinen wurden Schnitte mit einer Dicke von 5 Mikrometern angefertigt. Zunächst wurde ein Tropfen Einbettmedium auf einem vorgekühlten Objektträger vorgelegt. Darauf wurde das zu schneidende und in Methylbutan gelagerte Gewebestück gelegt, wobei darauf geachtet wurde, dass das Gewebe nur zu etwa einem Drittel ins Medium eingebettet wurde. Die Gewebeprobe wurde daraufhin angeschnitten, um zum einen eine gute Schnittfläche zu erzeugen, und um zum anderen das eventuell schlecht erhaltene außen liegende Gewebe zu entfernen. Die Schnitte wurden durch langsames und gleichmäßiges Schneiden angefertigt und auf einen auf etwa -20°C vorgekühlten Objektträger übertragen. Anschließend wurden die Präparate für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, bevor sie für die indirekte Immunfluoreszenz verwendet wurden.

#### 4.4.4.4 Anfertigung von Quetschpräparaten

Zur Herstellung von Quetschpräparaten von *Xenopus laevis* Embryonen wurden zunächst einige Objektträger für zwei Minuten in Aceton gelegt und danach trocken gerieben, um sie von Fettresten zu befreien. Anschließend wurden zwei bis vier Embryonen mit einer sauberen Glas-Pasteurpipette auf den Objektträger pipettiert, überschüssiges Medium entfernt und mit einem Deckglas bedeckt. Das Präparat wurde dann in flüssigem Stickstoff bei -195,8°C schock-gefroren. Nach etwa 15 Sekunden wurde das Deckglas mit einem Skalpell abgesprengt und das Präparat für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend konnte es für Immunfluoreszenz-Untersuchungen verwendet werden.

#### 4.4.4.5 Indirekte Immunfluoreszenz von Gefrierschnitten und Quetschpräparaten

Die indirekte Immunfluoreszenz von Gefrierschnitten und Quetschpräparaten wurde wie für Kulturzellen beschrieben durchgeführt. Auch die Schnitte und Quetschpräparate wurden zunächst in -20°C kaltem Methanol dehydriert, die Aceton-Behandlung wurde jedoch weggelassen. Nach der Trocknung der Präparate wurden die Antikörper und der Hoechst-Farbstoff inkubiert. Teilweise wurden die Gewebeproben mit BSA abgesättigt.

### 4.4.5 Indirekte Immunfluoreszenz von Paraffinschnitten

#### 4.4.5.1 Einbettung von Embryonen und Organen

*Erforderliche Lösungen:*

PBS (siehe 4.4.2.1)

2% PFA (Paraformaldehyd; w/v) in PBS pH 7.4

Ethanolreihe (techn., 33%, 66%, 100%)

Tertiäres Butanol

Paraffin (flüssig; bei 60°C)

*Durchführung:*

Um von Embryonen oder Geweben Paraffinschnitte herstellen zu können, mussten diese zunächst in Paraffin eingebettet werden. Wie in 4.4.4.1 beschrieben, wurde aus einem sakrifizierten Frosch Organe und Gewebe entnommen oder anästhesierte Embryonen für 3 – 12 Stunden in 2 % PFA fixiert. Danach wurden die Gewebe für eine Stunde unter langsamer Bewegung in PBS gewaschen. Danach wurde das Gewebe zur langsamen und schonenden Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (33%, 66%, 100%) für jeweils 30 Minuten inkubiert. Nach der Entwässerung wurden die Präparate für eine Stunde in 50°C vorgewärmtes tertiäres Butanol überführt, bevor es danach für eine Stunde in einem 60°C warmen 1:1-Gemisch aus tertiärem Butanol und Paraffin inkubiert wurde. Anschließend wurden die Gewebe über Nacht bei 60°C in flüssigem Paraffin inkubiert, wodurch die im Gewebe vorhandene Flüssigkeit vollständig durch das Paraffin ersetzt wurde. Am darauf folgenden Tag wurden die Gewebe zum Aushärten in frisches Paraffin überführt. In Paraffin eingebettetes Gewebe kann bei 4°C mehrere Jahre gelagert werden.

#### 4.4.5.2 Anfertigung von Paraffinschnitten

Zunächst wurde der das Gewebe umgebende Paraffinblock mit einem Skalpell auf Form getrimmt, um das Gewebe weitestgehend vom Paraffin zu befreien. Es sollte dabei eine pyramidenförmige Form entstehen. Der Paraffinblock wurde an der Unterseite erhitzt und auf einen Holzblock fixiert. Danach konnte er ins Schlittenmikrotom eingesetzt werden. Es wurden 3-5 µm dicke Schnitte angefertigt. Um einen leichten Schnittvorgang zu erreichen, sollte das Gewebe beim Einbettungsprozess nicht über 70°C erwärmt worden sein. Eine Serie von 5-10 Schnitten wurden vorsichtig mit einer Pinzette auf einen permanent positiv geladenen Adhäsions-Objektträger (Micron) mit einem kleinen Tropfen Wasser überführt, der zum Ausstreuen der Schnitte auf eine 60°C warme Heizplatte für etwa 10 Sekunden gelegt wurde. Nachdem sich die Schnitte gestreckt hatten, wurde das überschüssige Wasser entfernt und die Präparate für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur vollständig getrocknet. Die Präparate konnten bei 4°C für mehrere Tage aufbewahrt werden.

#### 4.4.5.3 Indirekte Immunfluoreszenz auf Paraffinschnitten

*Erforderliche Lösungen:*

Roti<sup>®</sup>-Histol (Roth)

Ethanolreihe (techn., 100%, 90%, 70%, 50%)

PBS-25% Ethanol

PBS

*Durchführung:*

Die Schnitte wurden zunächst für dreimal 5 Minuten in Roti<sup>®</sup>-Histol deparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Dazu wurden die Präparate zunächst zweimal 10 Minuten in 100% Ethanol inkubiert, dann in einer absteigenden Reihe für jeweils 5 Minuten in 90% bis 50% Ethanol. Danach folgte eine Inkubation für 5 Minuten in 25%igem Ethanol in PBS und anschließend drei 5-minütige Waschschrte in PBS.

Optional wurden die Paraffinschnitte mit einer Antigen-Unmasking-Solution demaskiert. Nach Herstellerangaben wurde die Lösung 1:100 verdünnt und auf 90°C vorgewärmt. Anschließend wurden die rehydrierten Präparate in einen Autoklaven gegeben und für eine Minute mit feuchter Hitze bei Überdruck behandelt. Danach wurden die Schnitte dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen, bevor mit der indirekten Immunfluoreszenz fortgefahren wurde. Das Protokoll wurde mit der Permeabilisierung durch 0,1% Triton<sup>™</sup> X-100 in PBS begonnen.

## 4.5 Arbeiten mit *Xenopus laevis*

### 4.5.1 Stimulierung der Eireifung

*Erforderliche Lösungen:*

HCG (Humanes Choriongonadotropin):	2 U/ $\mu$ L	(Sigma)
	⇒ lyophilisiertes Hormon in 5 mL sterilem H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> lösen	
1-fach MMR (pH 7.8): (Marc's Modified Ringer)	100 mM	NaCl
	15 mM	HEPES
	2 mM	KCl
	2 mM	CaCl <sub>2</sub>
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	⇒ pH einstellen auf 7.8	

*Durchführung:*

Geschlechtsreife *Xenopus laevis* Weibchen können durch Injektion des menschlichen Schwangerschaftshormon HCG (humanes Choriongonadotropin) zur Eireifung und Abbläichen stimuliert werden. Abhängig von der Körpergröße wurden den Tieren 300 bis 800 Einheiten des Hormons in den dorsalen Lymphsack gespritzt. Nach 12 Stunden beginnt das stimulierte Weibchen mit der Eiablage, die durch sanftes Massieren des Hinterleibs gefördert werden kann. Die Eier wurden direkt in 1-fachem MMR in eine 150-mm-Kulturschale abgelaicht. Injizierte Tiere konnten nach einer 3-monatigen Ruhephase erneut stimuliert werden.

### 4.5.2 Isolierung von *Xenopus laevis* Hoden

*Erforderliche Lösungen:*

Anästhesierungsmedium MS 222:	0,2 % (w/v)	(3-Aminobenzoesäure-ethylester-methansulfonat)
	⇒ in Leitungswasser lösen und bei 4°C lagern	
Hodenaufbewahrungs-Medium:	1-fach	MMR (Endkonzentration)
	+ 30% (v/v)	FCS (fetales Kälberserum)
	+ 1% (v/v)	Penicillin/Streptomycin

*Durchführung:*

Geschlechtsreife *Xenopus laevis* Männchen wurden für 20 Minuten in Anästhesierungsmedium MS222 betäubt und anschließend auf Eis gelegt. Die entnommenen Hoden wurden sofort in Hodenaufbewahrungs-Medium überführt und konnten für maximal 7 Tage bei 4°C gelagert werden.

### 4.5.3 *In vitro* Fertilisation

*Erforderliche Lösungen:*

1-fach MMR:	(siehe 4.5.1)
0,1-fach MMR:	1:10 Verdünnung von 1-fach MMR
Cystein-Lösung (pH 7.8)	2% (w/v) Cystein-HCl
	⇒ in 0,1-fach MMR lösen
	⇒ pH einstellen auf 7.8

Die frisch abgelaichten Froscheier wurden zunächst mit 1-fachem MMR gründlich gewaschen. Anschließend wurde die Salzlösung vollständig entfernt. Der Hoden wurde mit einem sauberen Skalpell in Längsrichtung aufgeschnitten und mit einer Pinzette vorsichtig über die Eier gestrichen. Nach 5 Minuten wurden die befruchteten Eier mit 0,1-fachem MMR überschichtet. 15 Minuten später drehen sich die befruchteten Eier mit der pigmentierten animalen Seite nach oben. Eine erfolgreiche Befruchtung konnte durch das Verschwinden des hellen Chromosomenflecks am animalen Pol nach etwa einer halben Stunde beobachtet werden. 45 Minuten nach der Befruchtung wurde die Gallerthülle chemisch entfernt. Das 0,1-fache MMR wurde durch die Cystein-Lösung (pH 7.8) ersetzt und etwa 5 Minuten einwirken lassen. Das Cystein drängt sich in die Disulfid-Brücken der Gallerthülle, wodurch diese voneinander getrennt werden. Unter der Stereolupe wurde das Auflösen der Gallerthülle ständig kontrolliert, da ein zu langes Einwirken der Cystein-Lösung ebenfalls die Embryonenproteine negativ beeinträchtigen kann.

### 4.5.4 Embryonenhaltung

*Erforderliche Lösungen:*

0,1-fach MMR:		(siehe 4.5.1)
Aktivkohle-Agarschalen (1 L):	20 g	Aktivkohle
	20 g	Agar-Agar
	⇒ aufkochen und auf 50°C abkühlen lassen	
	5 g	Sulfodiazin

Nach Entfernung der Gallerthülle wurden die Embryonen in Aktivkohle-Agarschalen überführt, wo sie sich weiter entwickelten. Aktivkohle und das Antibiotikum Sulfodiazin wirken sich förderlich auf die Entwicklungsrate aus. Die Embryonen wuchsen in 0,1-fachem MMR bei einer Temperatur von etwa 23°C heran. Die erreichten Entwicklungsstadien wurden anhand der Normentafel nach Nieuwkoop und Faber (Nieuwkoop and Faber, 1975) bestimmt.

### 4.5.5 Whole-mount *in situ*-Hybridisierungen von Embryonen

Die Whole-mount *in situ*-Hybridisierung von Embryonen wurde nach einer modifizierten Methode von Harland (Harland, 1991) durchgeführt.

Inkubations- und Waschschriffe erfolgten in Eppendorf-GefäÙe unter leichten Bewegungen. Falls nicht anders angegeben, wurden pro Eppendorf-GefäÙ 0,5 mL der jeweiligen Lösung angegeben. Die Lösungen wurden bei den einzelnen Schritten durch vorsichtiges Pipettieren ausgetauscht. Alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden - falls nichts anderes angegeben - bei Raumtemperatur durchgeführt. Es musste beim Wechsel von Lösungen darauf geachtet werden, dass die Embryonen niemals trocken fielen und nicht mit der Pipettenspitze berührt oder angesaugt wurden.

#### 4.5.5.1 Fixierung der Embryonen

*Erforderliche Lösungen:*

MEMFA (pH 7.4):	100 mM	MOPS
	2 mM	EGTA
	1 mM	MgSO <sub>4</sub>
	3,7 % (v/v)	Formaldehyd (37%, p.a.)
	⇒ pH einstellen auf 7.4 und lichtgeschützt lagern	

Methanol (100%, techn.)

*Durchführung:*

Zuerst wurde wie unter 4.5.3 beschrieben eine *in situ*-Fertilisation durchgeführt und die befruchteten Froscheier mit Cystein-Lösung von der Gallerthülle befreit. Nachdem die Embryonen das jeweilige Entwicklungsstadium, das nach der Normentafel von Nieuwkoop und Faber (1975) identifiziert wurde, erreicht hatten, wurden diese abgesammelt und in Eppendorf-GefäÙe überführt. Das 0,1-fache MMR wurde abgenommen und die Embryonen in 1 mL MEMFA für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde das Fixativ entfernt und durch ein 1:1 MEMFA:Methanol-Gemisch ersetzt und für drei Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch abgenommen und durch 100%iges technisches Methanol ersetzt. Die fixierten Embryonen konnten bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt werden.

#### 4.5.5.2 Hybridisierung

*Erforderliche Lösungen:*

MEMFA (pH 7.4):	100 mM	MOPS
	2 mM	EGTA
	1 mM	MgSO <sub>4</sub>
	3,7 % (v/v)	Formaldehyd (37%, p.a.)
	⇒ pH einstellen auf 7.4	
	⇒ lichtgeschützt lagern	

PBS (pH 7.4):	140 mM	NaCl
	6,4 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2,6 mM	KCl
	1,4 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

PBSw:	PBS	
	+ 0,1% (v/v)	Tween-20

## Methoden

---

TBS (pH 7.4):	150 mM 10 mM ⇒ pH einstellen auf 7.4	NaCl Tris-HCl
20-fach SSC (pH 7.0):	3 M 0,3 M ⇒ pH einstellen auf 7.0	NaCl Na-Citrat
Hybridisierungslösung:	0,5 g 25 mL 12,5 mL ⇒ zum Lösen auf 65°C erhitzen, dann: 9,75 mL 0,5 mL 0,1 mL 0,25 mL 0,25 mL 1,25 mL	Blocking Reagenz (Roche, Mannheim) Formamid 20-fach SSC H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> Hefe-tRNA (SL: 100 mg/mL) Heparin (SL: 50 mg/mL) Tween-20 (SL: 20%) CHAPS (SL: 10%) EDTA (SL: 200 mM)

2-fach SSC + 0,1 % CHAPS

0,2-fach SSC + 0,1 % CHAPS

Die in Methanol fixierten Embryonen wurden zunächst in einer absteigenden Methanolreihe (75%; 50%; 25% Methanol in PBSw) für jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur rehydriert und anschließend 3 × 5 Minuten in PBSw gewaschen. Danach erfolgte für 25 Minuten bei Raumtemperatur ein Proteinase K-Verdau (10 µg/mL Proteinase K in PBSw + 1-2 mM CaCl<sub>2</sub>). Nach dieser Inkubationszeit wurden die Embryonen kurz in 1 mL PBSw gespült und weitere zweimal 5 Minuten in PBSw gewaschen, um einen enzymatische Abbau der Zelloberflächen abzustoppen. Diese enzymatische Perforierung erleichtert bei der *in situ*-Hybridisierung die Zugänglichkeit der RNA-Sonden bei der Diffusion in das embryonale Gewebe. Nach der Perforierung des Gewebes durch den Proteinase K-Verdau erfolgte die Refixierung in 4% Paraformaldehyd in PBS für 20 Minuten. Anschließend wurden die Embryonen kurz in 1 mL PBSw gespült und danach 3 × 5 Minuten in PBSw gewaschen, um die Fixierung abzustoppen. Dann wurden die Embryonen zunächst für drei Minuten in einem 1:1-Gemisch aus PBSw:Hybridisierungslösung und danach für 3 Minuten in 100% Hybridisierungslösung inkubiert. Die Embryonen wurden daraufhin mit 1 mL frische Hybridisierungslösung überschichtet und für 1 Stunde bei 65°C in einem Wasserbad inkubiert, um endogene Phosphatasen zu inaktivieren. Nicht inaktivierte Phosphatasen verursachen bei der anschließenden Detektion eine starke Hintergrundfärbung. Anschließend wurden die Embryonen in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt mit 0,5 mL überschichtet und für 2,5 Stunden bei 55°C im Wasserbad prähybridisiert. Nach diesem Zeitraum wurde pro Hybridisierungsansatz 100 ng Antisense-RNA-Sonde mit 3 µL Hybridisierungslösung versetzt und für 5 Minuten bei 95°C im Heizblock denaturiert. Während dieser Zeit wurden je Ansatz 100 µL Hybridisierungslösung auf 55°C vorgewärmt und die denaturierte RNA-Sonde dazupipettiert. Die RNA-Sonden/Hybridisierungslösung wurde zu den mit 0,5 mL Hybridisierungslösung überschichteten Embryonen gegeben, was eine Endkonzentration der Antisense-RNA-Sonde von 100 ng je 0,6 mL Hybridisierungslösung ergab. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 55°C im Wasserbad.

Am nächsten Morgen wurden die Embryonen zunächst mit frischer Hybridisierungslösung, dann mit einem 1:1-Gemisch aus Hybridisierungslösung:2-fach SSC/0,1% CHAPS und anschließend in 2-fach SSC/0,1% CHAPS für je 3 Minuten gespült. Dann wurden die Embryonen für 2 × 15 Minuten in 2-fach SSC/0,1% CHAPS bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte ein 3-minütiges Waschen in 0,2-fach SSC/0,1% CHAPS bei Raumtemperatur. Dann wurden die Embryonen für 2 × 15 Minuten in 0,2-fach SSC/0,1% CHAPS bei 60°C inkubiert und anschließend in einem 1:1-Gemisch aus TBS und 0,2-fach SSC/0,1% CHAPS für 3 Minuten bei Raumtemperatur gespült. Abschließend erfolgte ein 5-minütiges Waschen in TBS bei Raumtemperatur.

### 4.5.5.3 Nachweis gebundener Digoxigenin-markierter RNA-Sonden

*Erforderliche Lösungen:*

TBS (pH 7.4):	150 mM 10 mM	NaCl Tris-HCl; pH 7.4
TBSx (pH 7.4):	TBS + 0,1%	(v/v) Triton™ X-100
Antikörperpuffer:	12,75 mL 2,25 mL	TBSx Ziegenserum (hitzeinaktiviert, 30 min bei 56°C)

## Methoden

---

Alkalischer Phosphatasepuffer (AP):

100 mM	Tris-HCl, pH 9.5
100 mM	NaCl
50 mM	MgCl <sub>2</sub>

⇒ pH einstellen auf 9.5

NBT / BCIP: (siehe 4.2.27.2)

Methanolreihe: (33%, 66%, 100%; techn.)

BABB: Benzylalkohol:Benzyloacetat 2:1

### *Durchführung:*

Während den nachfolgenden Arbeitsschritten wurde darauf geachtet, dass die Embryonen auf keinen Fall austrockneten, die dies eine starke Hintergrundfärbung und eine Deformation der Embryonen verursachte. Nach dem Waschen wurden die Embryonen bei Raumtemperatur für drei Minuten in TBSx inkubiert. Anschließend wurden sie für zwei Stunden in Antikörperpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Der Antikörperpuffer wurde danach abgenommen und durch den verdünnten Antikörper (anti-DIG-alkalische Phosphatase; Verdünnung 1:5.000 in Antikörperpuffer) ausgetauscht. Die Embryonen wurden in dieser Lösung unter leichter Bewegung über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung durch TBSx ersetzt und die Embryonen dreimal für 10 Minuten in TBSx bei Raumtemperatur gewaschen. Danach wurden die Embryonen für eine Viertelstunde bei Raumtemperatur im alkalischen Phosphatase-Puffer (AP) gewaschen. Anschließend wurde zu 10 mL AP-Puffer 66 µL NBT und 33 µL BCIP pipettiert. Von diesem Ansatz wurde zu jedem Ansatz 500 µL hinzugefügt und die Embryonen darin für etwa 45 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Die Farbreaktion wurde beendet, wenn eine deutliche Färbung zu sehen war. Dazu wurde die „Detektionslösung“ abgenommen und durch die Stopplösung ersetzt (zweimal für je 5 Minuten). Danach wurden die Embryonen in einer aufsteigenden Methanolreihe (33%, 66%, 100%) dehydriert. Anschließend konnten die Embryonen in Methanol bei -20°C für mehrere Wochen aufbewahrt werden. Um die Strukturen der embryonalen Gewebe aufzuhellen, wurden die Embryonen für 30 Minuten in BABB eingelegt. Durch das Aufklaren konnten die Hybridisierungssignale besser beobachtet und mit einer computerunterstützten Digitalkamera (Pixera) dokumentiert werden.

### 4.5.5.4 Paraffineinbettung nach Whole-mount *in situ*-Hybridisierung

Im Wesentlichen erfolgte die Paraffineinbettung der Embryonen nach der Whole mount *in situ*-Hybridisierung wie bei der Paraffineinbettung von Geweben zur Vorbereitung für die indirekte Immunfluoreszenz (siehe 4.4.5.2).

Nach der Farbreaktion wurden die Embryonen wie unter 4.5.5.3 beschrieben mit einer ansteigenden Methanolreihe dehydriert. Nach der Entwässerung wurden die Embryonen für eine Stunde in 50°C vorgewärmtes tertiäres Butanol überführt, bevor sie danach für eine Stunde in einem 60°C warmen 1:1-Gemisch aus tertiärem Butanol und Paraffin inkubiert wurden. Anschließend wurden die Embryonen über Nacht bei 60°C in flüssigem Paraffin inkubiert, wodurch die im Gewebe vorhandene Flüssigkeit vollständig durch das Paraffin ersetzt wurde. Am darauf folgenden Tag wurden die Gewebe zum Aushärten in frisches Paraffin überführt.

Von den in Paraffin eingeblockten Embryonen wurden am Schlittenmikrotom wie unter 4.4.5.2 beschrieben Schnitte mit einer Dicke von 20 Mikrometern angefertigt. Nach dem Spreiten der Schnitte auf den Objektträgern und der Entfernung des Paraffins wurden die Schnitte mit Mowiol (siehe 4.4.3) eingebettet und ein Deckglas aufgelegt. Die Dokumentation erfolgte mit einer computergestützten Digitalkamera (Pixera) und einem Durchlichtmikroskop.

### 4.5.6 Präparation von Oozyten

#### *Erforderliche Lösungen:*

Anästhesierungsmedium MS 222: 0,2 % (w/v) (3-Aminobenzoessäure-ethylester-methansulfonat)

⇒ in Leitungswasser lösen und bei 4°C lagern

Barth-Medium (pH 7.6):

90 mM	NaCl
10 mM	HEPES
2 mM	NaHCO <sub>3</sub>
1 mM	KCl
0,8 mM	MgSO <sub>4</sub>
0,4 mM	CaCl <sub>2</sub>
0,3 mM	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

⇒ Zugabe von eine Spatelspitze Phenolrot

⇒ pH 7.6 mit NaOH einstellen

### *Durchführung:*

Für die Präparation von Oozyten wurden *Xenopus laevis* Weibchen für 20 Minuten in vorgewärmtes (Raumtemperatur) Anästhesierungsmedium MS222 gegeben. Nachdem sicher gestellt war, dass die Tiere vollständig narkotisiert waren, wurden sie mit dem Rücken auf eine Alufolie auf Eis gelegt, um ein zu frühes Aufwachen zu vermeiden. Mit einem Einschnitt von einem Zentimeter wurde die Bauchhöhle geöffnet. Durch diese Öffnung wurden Teile des wieder nachwachsenden Ovars entnommen und in Barth-Medium gelegt. Die Wunde wurde zugenäht und die Frösche konnten nach dem Aufwachen zurück in ein Zuchtbecken gegeben werden. Die Oozyten konnten bis zur weiteren Verwendung höchstens 48 Stunden bei 16 °C in Barth-Medium aufbewahrt werden.

#### **4.5.6.1 Manuelle Isolierung von Kern und Zytoplasma von Oozyten**

##### *Erforderliche Lösungen:*

3:1-Medium (pH 7.4):

3 mM	Tris-HCl (pH 7.4)
4 mM	NaCl
12 mM	KCl

⇒ pH einstellen auf 7.4

### *Durchführung:*

Zur Separation von Kern und Zytoplasma wurden defollikulierte Oozyten in 3:1-Medium überführt. Mit Uhrmacherpinzetten wurden diese behutsam aufgerissen und die Kerne freigelegt. Für die Auftrennung der Proteine durch eine SDS-PAGE wurden die Kerne sofort in kaltes Ethanol (100%, p.a., -20°C) überführt, in dem die Proteine für wenigstens 2 Stunden bei -20°C gefällt wurden.

Das Zytoplasma wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und durch auf- und abpipettieren homogenisiert. Durch eine anschließende Zentrifugation wurden unlösliche Proteinbestandteile, wie z. B. Dotterschollen, für 5 Minuten bei 11.000 g sedimentiert. Der Überstand, in dem sich die löslichen Proteine befinden, wurde in Aceton gefällt (siehe 4.3.7.2).

#### **4.5.6.2 Manuelle Isolierung von Kernhüllen**

Die Methode zur manuellen Isolierung von Oozytenkernhüllen wurde von Krohne und Franke (Krohne and Franke, 1983) beschrieben und von Frau Prof. Dr. Dabauvalle durchgeführt.

##### *Erforderliche Lösungen:*

3:1-Medium (pH 7.4) mit MgCl<sub>2</sub>:

+ 7 mM	(siehe 4.5.6.1) MgCl <sub>2</sub>
--------	--------------------------------------

### *Durchführung:*

*Xenopus laevis* Weibchen wurde zunächst Ovar entnommen (siehe 4.5.6). Bis zur weiteren Verwendung wurde das Ovar in Barth-Medium aufbewahrt. Die Oozyten wurden anschließend defollikuliert und in 3:1-Medium mit MgCl<sub>2</sub> überführt. Mit Uhrmacherpinzetten wurden diese behutsam aufgerissen und der Kern freigelegt. Mit einer speziellen Glaspasteurpipette, deren Durchmesser an der Saugöffnung kleiner als ein Kern ist, wurden die Kerne aufgebrochen und Kerninhalt und Kernhüllen getrennt. Nach der Separation wurden die Kernbestandteile sofort in kaltes Ethanol (100%, p.a., -20°C) überführt und für wenigstens 2 Stunden bei -20°C gefällt. Nach der Inkubationsdauer wurden die präzipitierten Proteine für 10 Minuten bei 5.000 g sedimentiert, getrocknet und in 1-fachem SDS-Probenpuffer aufgenommen. Anschließend konnten die Proteine für 5 Minuten bei 95°C aufgekocht, auf ein Polyacrylamid-Gel geladen und durch SDS-PAGE aufgetrennt werden.

## **4.6 Zellkultur**

### **4.6.1 Kultivieren von Zellen**

Die Zellvermehrung wurde unter sterilen Bedingungen und unter Berücksichtigung der allgemeinen Sicherheitsvorschriften durchgeführt. Der Zustand und das Wachstum der Zellen wurden durch ein Inversmikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung kontrolliert. Im Allgemeinen dienten die in Tabelle **4-5** aufgeführten Richtwerte für die verwendeten Kulturgefäße. Angaben zu Medien und Kultivierungsbedingung sind im Kapitel 2.1.3 aufgeführt.

**Tabelle 4-5:** Übersicht der Kultivierungsrichtwerte.

Gefäß	Fläche (mm <sup>2</sup> )	Zelldichte beim Aussäen	Zelldichte bei Konfluenz	Kulturmedium (mL)	PBS (mL)	Trypsin (mL)
<b>Flaschen</b>						
TC 25	2500	$0,7 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	5	2	1
TC 80	8000	$2,0 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6$	15	6	2
<b>Schalen</b>						
35 mm	960	$0,3 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	2,5	2	0,5
60 mm	2830	$0,7 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$	5	5	1
100 mm	7850	$2,0 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6$	10	10	2
150 mm	17670	$5,0 \times 10^6$	$20,0 \times 10^6$	20	15	4

Die Anzahl der Zellen bei Konfluenz ist abhängig von den jeweiligen Zelllinien; die angegebenen Richtwerte beziehen sich auf HeLa-Zellen.

### 4.6.2 Passagieren adhärenter Zelllinien

*Erforderliche Lösungen:*

1-fach PBS (siehe 4.4.2.1): Autoklaviert, vorgewärmt auf 37°C

Kulturmedium (siehe 2.1.3): Steril, vorgewärmt auf 37°C

Trypsin-EDTA-Lösung:

	PBS
+ 0,06 %	Trypsin
+ 0,53 mM	EDTA

⇒ sterilfiltrieren

*Durchführung*

Wenn die Zellen nach drei bis vier Tagen eine 100%ige Konfluenz erreicht haben gesplittet, verdünnt und neu ausgesät. Die Verdünnung richtete sich dabei nach der Vermehrungsrate der jeweiligen Zelllinie und wurde so gewählt, dass die Zellen nach drei bis vier Tagen wieder eine vollständige Konfluenz erreichten. Das Passagieren der Zellen gestaltete sich folgendermaßen: Zunächst wurde das verbrauchte Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit vorgewärmten und sterilen PBS gewaschen (z. B.: 5 mL bei einer 60 mm Kulturschale) und mit 1 mL Trypsinlösung überschichtet. Das Trypsin wirkte etwa 5 Minuten bei Raumtemperatur auf die Zellen ein, bis sie sich vom Gefäßboden lösten. Das Ablösen der Zellen wurde am Inversmikroskop kontrolliert und gegebenenfalls durch leichtes Stoßen der Flasche erleichtert. In der Zwischenzeit wurden in ein frisches Kulturgefäß 4 – 4,7 mL Zellmedium vorgelegt. Nach dem vollständigen Ablösen wurde der Trypsinverdau durch Zugabe von 5 mL warmen Zellkulturmedium abgestoppt und die Zellen vom Gefäßboden abgespült. Die neue Kulturflasche wurde mit 0,3 – 1 mL dieser Zellsuspension angeimpft (für HeLa-Zellen).

### 4.6.3 Einfrieren von Kulturzellen

*Erforderliche Lösungen:*

1-fach PBS (siehe 4.4.2.1): Autoklaviert, vorgewärmt auf 37°C

Trypsinlösung (siehe 4.6.2): Sterilfiltriert, vorgewärmt auf 37°C

Zellkulturmedium (siehe 2.1.3): Steril, vorgewärmt auf 37°C

Einfriermedium (Zellkulturmedium mit 10 % DMSO und 20 % FCS)

*Durchführung:*

Nachdem eine Zellcharge eine vollständige Konfluenz erreicht hatte, wurden die Zellen wie unter 4.6.2 beschrieben mit Trypsin abgelöst und in 5 mL Kulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1000 g sedimentiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 3,6 mL Einfriermedium resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 1,8 Milliliter in ein Kryoröhrchen aliquotiert. Das Röhrchen wurde in eine Einfrierbox mit Isopropanol gestellt und bei -70°C für 24 Stunden aufbewahrt.

Die Einfrierbox hat den Vorteil, dass die Temperatur im Inneren mit etwa 1°C pro Stunde langsam absinkt, wodurch eine Bildung von zellschädigenden Eiskristallen verhindert wird. Nach 24 Stunden wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff überführt und dort für einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden.

## 4.6.4 Auftauen von Kulturzellen

Zunächst wurde das entsprechende Zellkulturmedium im Wasserbad auf 37°C angewärmt. Danach wurde das aus dem Stickstoffbehälter entnommene Kryoröhrchen ebenfalls in das Wasserbad gestellt und solange aufgetaut, bis etwa noch ein Rest von 30 % eingefroren blieb. Das Röhrchen wurde dann desinfiziert und der aufgetaute Inhalt in ein 15-mL-Zentrifugenröhrchen mit 10 mL vorgewärmten Medium überführt. Die Zellen wurden für fünf Minuten bei 1000 g sedimentiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellsediment in 5 mL frischem und vorgewärmtem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in eine 25-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach etwa 24 Stunden wurde lichtmikroskopisch kontrolliert, ob sich die aufgetauten Zellen wieder am Gefäßboden anhefteten. Danach erfolgte ein erneuter Mediumwechsel und ein routinemäßiges Passagieren der Zellen konnte beginnen.

## 4.6.5 Test der Zellkultur auf eine Kontamination durch Mycoplasmen

Bei Mycoplasmen handelt es sich um die kleinsten selbstständig vermehrungsfähigen Bakterien aus der Klasse der Mollicutes. Mycoplasmen sind als parasitär lebende Bakterien die Ursache für zahlreiche Krankheiten beim Menschen, Tieren und Pflanzen. In der Regel töten Bakterien aus der Klasse der Mollicutes ihren Wirt jedoch nicht ab. Vielmehr verursachen sie chronische Infektionen und verkörpern damit eine sehr erfolgreiche und Art des Parasitismus. Neben den pathogenen Eigenschaften der Mycoplasmen spielt die Infektion von Zellkulturen mit Mycoplasmen (hauptsächlich *Mycoplasma orale*) eine wichtige Rolle. Der Nachweis von Mycoplasmen kann über verschiedene Methoden erfolgen. Als schnelle und billige Standardmethode hat sich jedoch die PCR etabliert.

### Erforderliche Lösungen:

Vgl. PCR mit Taq-Polymerase (siehe 4.2.6)

5'-Primer: (myco\_5': 5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT A-3')

3'-Primer: (myco\_3': 5'-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3')

### Durchführung:

Zunächst wurden 1,5 mL des vermeintlich kontaminierten Zellkulturmediums in ein Eppendorf-Gefäß überführt, um störende Zellbestandteile für 5 Minuten bei 3.000 g zu sedimentieren. Die Überstand mit den eventuell darin enthaltenen Mycoplasmen wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und erneut für 10 Minuten bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen, das Sediment dagegen in 25 µL H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgenommen. Diese Suspension wurde mit einer PCR auf die Anwesenheit von Mycoplasmen-spezifischer Gene überprüft. Mit den verwendeten Primern wird ein Abschnitt 16S-rDNA dieser Bakterien amplifiziert. Eine Kontamination von Mycoplasmen liegt vor, wenn ein PCR-Produkt von etwa 720 nt nachweisbar ist.

### 1-facher PCR-Ansatz (25 µL):

25 µL	Lösung (siehe oben)	
2 µL	MgCl <sub>2</sub>	(25 mM)
2,5 µL	Taq-DNA-Polmerase 10-fach Puffer	(Promega, eigene Herstellung)
0,5 µL	dNTP-Mix	(10 mM SL je Nukleotid, MBI)
0,5 µL	5'-Primer (myco_5')	(10 pmol/µL SL, biomers.net GmbH)
0,5 µL	3'-Primer (myco_3')	(10 pmol/µL SL, biomers.net GmbH)
0,1 µL	Taq-DNA-Polymerase	(5 U/µL, eigene Herstellung)
⇒ auf 25 µL mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> auffüllen		

### PCR-Programm:

	Initiale Denaturierung	5 min	96°C
<b>35 Zyklen</b>	{	Denaturierung	30 sec 96°C
		Primer-Annealing	30 sec 60°C
		Elongation	45 sec 72°C
	Finale Elongation	2 min	72°C
	Kühlung	∞	8°C

Die Auswertung der PCR-Reaktion erfolgt im Anschluss durch Gelelektrophorese (siehe 4.2.15).

### 4.6.6 Transfektion von Kulturzellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in Zellkulturzellen. Es wird dabei zwischen dem zeitweiligen Einbringen des Plasmids in die Wirtszelle (transiente Transfektion) und der dauerhaften Integration in das Genom (stabile Transfektion) unterschieden. Wie bei einer Transformation von Bakterienzellen muss die Plasmid-DNA die Zellmembran passieren. In einem von der Transfektion unabhängigen Prozess, wandert das Plasmid in den Zellkern, wo die Information der DNA in mRNA übersetzt und ins Zytoplasma exportiert wird. Dort kommt es dann zur Expression des vom Vektor integrierten Gens. Je nach verwendeter Zelllinie eignen sich verschiedene Transfektions-Verfahren (siehe unten).

#### 4.6.6.1 Transfektion mit Effectene™ (Qiagen)

Effectene™ ist ein nicht-liposomales Lipid das unter spontaner Mizellenbildung die DNA umhüllt. Nach Angaben des Herstellers tritt dabei keine Größen- und Ladungsvarianz auf, wie dies bei liposomalen Transfektionen der Fall ist. Mit diesem Reagenz konnten 30-80 % aller Zellen transfiziert werden.

##### *Erforderliche Lösungen:*

Qiagen Effectene™ Transfection Reagent Kit (enthält Effectene™, Enhancer und Puffer EC)

1-fach PBS (siehe 4.4.2.1, autoklaviert)

Zellkulturmedium (siehe 2.1.3)

##### *Durchführung:*

Für eine Transfektion mit Effectene™ wurde am Vortag in einer 35-mm-Kulturschale mit vier Deckgläschen die zu transfizierenden Zellen mit einer Konzentration von  $0,25 \cdot 10^6$  Zellen ausgesät. Für einen Ansatz wurde 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die DNA-Lösung wurde mit Puffer EC auf ein Volumen von 100 µL ergänzt und 3,2 µL Enhancer zugegeben. Die Mischung wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden 10 µL Effectene™ zugegeben und vermischt. Anschließend wurde die Lösung erneut für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Während dieser Zeit wurden die zu transfizierenden Zellen mit 2 mL vorgewärmten PBS gewaschen und mit 1,6 mL Kulturmedium überschichtet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Effectene™-Mischung 0,6 mL Kulturmedium zugegeben und tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Die Einwirkdauer der Transfektionslösung betrug wenigstens 24 Stunden. Transfizierte Zellen wurden am darauf folgenden Tag für weitere Experimente verwendet, ohne dass ein Wechsel des Kulturmediums notwendig war. Es wurden keine zytotoxischen Effekte während der Einwirkzeit beobachtet.

#### 4.6.6.2 Transfektion mit Lipofectamine™ (Invitrogen)

Die Transfektion mit Lipofectamine™ erfolgte nach Angaben des Herstellers. Im Unterschied zu Effectene™ ist jedoch ein zusätzliches Medium (OptiMEM®) erforderlich, das kein Serum enthält. Laut Protokoll des Herstellers mindern Serumbestandteile die Transfektionsrate des Transfektionsreagenz Lipofectamine™. Die Aussaat der zu transfizierenden Zellen erfolgte wie bei der Transfektion mit Effectene™ am Vortag.

##### *Erforderliche Lösungen:*

Lipofectamine™ (Invitrogen)

OptiMEM® (serumfreies Medium, Gibco Life Technologies)

1-fach PBS (siehe 4.4.2.1, autoklaviert)

Zellkulturmedium (siehe 2.1.3)

##### *Durchführung:*

Für die Transfektion von Zellen in einer 35-mm-Zellkulturschale wurden zwei Eppendorf-Gefäße benötigt. Im ersten Gefäß wurden 12 µL Lipofectamine™ mit 88 µL OptiMEM® vermischt und in dem zweiten Gefäß 2 µg Plasmid-DNA mit OptiMEM® auf ein Volumen von 100 µL aufgefüllt. Dann wurden die Inhalte der beiden Reaktionsgefäße vereinigt und gründlich vermischt. Während einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die zu transfizierenden Zellen mit 2 mL vorgewärmten PBS gewaschen und mit einem Milliliter OptiMEM® überschichtet. Für die Transfektion wurde die DNA-Lipofectamine™-Lösung mit 0,8 µL OptiMEM® vermischt und tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Anschließend wurden die Zellen für 2 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert und danach das serumfreie Medium durch 2,5 mL Kulturmedium ersetzt. Bei längeren Inkubationszeiten mit der Transfektionslösung konnte einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum haben.

### 4.6.6.3 Transfektion mit $\text{CaCl}_2$

Das kostengünstigste Transfektionsverfahren ist die Kalzium-Phosphat-Präzipitation. In einem Gemisch aus Kalziumchlorid und Natriumphosphat bindet sich die zu übertragende DNA an ausfallendes Kalziumphosphat. Die ausgefallenen Kristalle werden von den Zellen durch Endozytose aufgenommen. Allerdings sind die Transfektionsraten dieses Verfahrens gering und liegen im Allgemeinen zwischen 10 und 30 Prozent. Die in dieser Arbeit verwendeten HEK-293-Zellen sind speziell auf dieses Transfektionsverfahren modifiziert. Durch eine transiente Transfektion wird das Gen *EBNA1* kontinuierlich in diesen Zellen exprimiert. Das Gen kodiert für den Epstein-Barr Virus (EBV) Rezeptor, der an der Zelloberfläche der HEK-293 Zellen präsentiert wird. Plasmide, die die Promotorsequenz des Epstein-Barr Virus (EBV oriP) aufweisen, werden durch den Rezeptor gebunden und dadurch eine sehr hohe Transfektionseffizienz erreicht (60-80%). In dieser Arbeit wurde in den Klonierungsvektor pCEP4, der eine EBV oriP-Sequenz aufweist, die zu exprimierenden Gensequenzen inseriert. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion geerntet und die exprimierten Proteine extrahiert und standen für nachfolgende Versuche zur Verfügung.

#### *Erforderliche Lösungen:*

PBS (siehe 4.4.2.1) und Zellkulturmedium (siehe 2.1.3); beides vorgewärmt auf 37°C

2-fach BBS (pH 6.95):	50 mM	BES
	280 mM	NaCl
	1,4 mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
	⇒ mit NaOH auf pH 6.95 einstellen, sterilfiltrieren, aliquotiert bei -20°C aufbewahren	
2 M $\text{CaCl}_2$ :	⇒ sterilfiltrieren, aliquotiert bei -20°C aufbewahren	

#### *Durchführung:*

Am Vortag der Transfektion wurden die HEK-293 Zellen mit einer Konzentration von  $1 \cdot 10^5$  Zellen in 10-mm-Kulturschalen ausgesät, so dass 24 Stunden nach der Aussaat eine Konfluenz von 20-30% erreicht wurde. Für eine Transfektion wurde 10 µg Plasmid-DNA für eine 10-mm-Schale eingesetzt. 438 µL DNA-Lösung (= 10 µg) wurde mit 62 µL 2M  $\text{CaCl}_2$  vermischt. Anschließend wurden 500 µL des 2-fachen BBS unter leichtem Vortexen (Stufe 3-4) tropfenweise zur DNA/BBS-Lösung zugegeben. Danach wurde die Suspension durch mehrmaliges Invertieren gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Lösung erneut durch Invertieren vermischt und direkt im Anschluss gleichmäßig auf die Zellen verteilt. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Zellmedium mit der Transfektionslösung abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit vorgewärmten PBS gewaschen und anschließend mit neuem Medium überschichtet. Nach weiteren 24 Stunden im Brutschrank konnten die Zellen geerntet werden.

## 5 Ergebnisse

Die Motivation dieser Arbeit ist die relativ neue Erkenntnis, dass Mutationen im ubiquitären Kernmembranprotein Emerin eine angeborene gewebespezifische Myopathie der Skelett- und Herzmuskulatur beim Menschen, die so genannte Emery—Dreifuss Muskeldystrophie auslösen (Bione et al., 1994). Daraus lässt sich schließen, dass Emerin zumindest in den betroffenen Geweben wichtige Funktionen erfüllen muss. Allerdings konnte bislang noch nicht geklärt werden, welche molekularen Mechanismen diesen degenerativen Phänotyp auslösen. Da die klinischen Symptome dieser besonderen Form der Muskeldystrophie erst verhältnismäßig spät, nämlich in der zweiten bis dritten Lebensdekade der Patienten, auftreten, sollte mit dieser Arbeit herausgefunden werden, wann das Emerin-Gen während der Entwicklung von Wirbeltieren aktiviert und das Protein zum ersten Mal translatiert wird. Aus diesem Grund wurde das Modellsystem *Xenopus laevis* ausgewählt, da die Ontogenese dieses afrikanischen Krallenfroschs außergewöhnlich schnell abläuft.

### **5.1 Molekulare Charakterisierung des integralen Typ-II Membranproteins Emerin von *Xenopus laevis***

#### **5.1.1 Suche nach Orthologen durch BLAST-Suche in der EST-Datenbank**

Ausgehend von der Sequenz des murinen (NM\_007927) und humanen Emerins (NM\_000117) wurde eine EST- („Expressed Sequence Tags“)-Datenbank von *Xenopus laevis* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) nach homologen Proteinen durchsucht. Es konnten zwei EST-Sequenzen identifiziert werden, die eine deutliche Übereinstimmung mit dem aminoterminalen Bereich des humanen Emerins aufwiesen (Accession-Nummern: BG407317 und CF270265). Da aber diese Sequenzen lediglich einen Teil des offenen Leserasters repräsentierten und nicht die volle Länge des kodierenden Bereichs umfassten, wurden die korrelierenden EST-Klone (IMAGp998F069476Q3 und IMAGp998H0912163Q3) ausgesucht und für eine umfassende Sequenzierung über das RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Heidelberg) bezogen. Beide cDNAs stammten aus der Milz eines adulten afrikanischen Krallenfroschs und waren in den Expressionsvektor pCMV-SPORT6 der Firma Invitrogen inseriert.

Da die Nukleotidsequenzen nur einen Teil des Offenen Leserasters („Open Reading Frame“, ORF) wiedergaben, wurden beide cDNAs durch Sequenzierung vollständig ermittelt. Die EST-Sequenz des Klons IMAGp998F069476Q3 (BG407317) wurde als Xemerin1 (XEMD1) bzw. die Nukleotidsequenz des EST-Klons IMAGp998H0912163Q3 (CF270265) als Xemerin2 (XEMD2) bezeichnet und unter den Zugangsnummern AY425621 (für XEMD1) bzw. AY766060 (für XEMD2) bei der GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) registriert.

5.1.1.1 Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der Xemerin1-cDNA

1	cccacgctc	cgccagcttt	tgagaaacaa	caaccggtct	gcaattgcag	gagcttcccc	
							<b>M E N Y K H M T D</b> ·
61	gctaaccgag	ccccgtacc	tgaggactgc	acaaa <u>ATGGA</u>	AAATTATAAA	CACATGACTG	
							<b>· D E L I E T L Q K C N I T H G P I V G T ·</b>
121	ACGATGAAC	TATTGAAAC	CTGKAGAA	GCAACATCAC	ACATGGTCCT	ATTGTCGGTA	
							<b>· T R T L Y E K K L Y E Y E R S K T R N P ·</b>
181	CTACTCGGAC	TTATATGAG	AAGAACTTT	ATGAATATGA	ACGCAGCAAG	ACTAGGAATC	
							<b>· Y P L G S Y E S K T H Y R N R A N E E D ·</b>
241	CGTATCCTCT	AGGTTCTCTAC	GAGAGCAAAA	CACACTACAG	AAACAGAGCG	AATGAAGAGG	
							<b>· L A D E N Y Y E E K T V T R T Y Q Y P Q ·</b>
301	ACTTGGCGGA	TGAGAATTAT	TACGAAGAGA	AAACAGTTAC	CAGAACCTAC	CAGTATCCCC	
							<b>· A R P R T T F D R L E R E P L Y K E N T ·</b>
361	AAGCACGACC	ACGAACCACC	TTTGATCGGC	TTGAACGAGA	ACCACTCTAT	AAAGAAAACA	
							<b>· Y Q P I S Q M R H L G A T Q R V E P R R ·</b>
421	CGTACCAGCC	CATATCCCAG	ATGCGCCATC	TGGGGGCAAC	ACAGAGGGTA	GAGCCTCGCA	
							<b>· P I R V K Q N E E K P C K R Y F P A W L ·</b>
481	GGCCAATCCG	TGTGAAGCAA	AATGAAGAGA	AACCCTGTAA	GAGATACTTC	CCAGCGTGGT	
							<b>· Q I L L L L L F V G F L A A V Y F L Q E ·</b>
541	TGCAGATTCT	CTTACTTCTC	CTGTTCTGTTG	GTTTCTGTCG	CGCTGTTTAC	TTCCTGCAGG	
							<b>· P D V N P S R L E S N *</b>
601	AGCTGACGT	CAATCCATCC	AGGCTGGAAA	GTAAC <u>TAA</u> t	aaatcagcgt	tagcggatct	
661	accacaatg	ttgcacacta	tgctttaagg	cagggctgtc	catcttcagc	ctcaagggt	
721	ttaaatgggg	agcatccatc	tgtgttcaac	atgagctgaa	<u>aatggttaat</u>	tgaaaaatta	
781	atattttct	ttattttttt	taattttttt	tactattttc	ctacttgaat	ttcccacttg	
841	ctatcggtt	ctcactttgg	aatagaaaag	tagtttcaaa	ttcacctttc	tgtctttcat	
901	cgacctgtg	aagaaaagct	attgacgttt	cctaattgaga	tcaattggca	gaacttgtgt	
961	aaagctctc	ttactgacct	catgtggaac	aaagtggtta	ttgcatatta	aaataatgat	
1021	<u>tgggtttg</u>	ctctactaag	gacatgtgaa	tggtttaaaa	tagcagaaga	<u>gagatttatt</u>	
1081	<u>ttaa</u> tattgc	cttttttttg	gagttggaca	gcccagggta	gatccttgtg	tgtgtgctgt	
1141	agtgatcagt	tacaccgatt	tgtttaact	gtatgaatgg	aatatgcaca	gattcacact	
1201	<u>gggggtatta</u>	<u>atggaaat</u>	<u>atggaaat</u>	<u>atggaaat</u>	<u>atggaaat</u>	<u>atggaaat</u>	
1261	aatgatcttg	cactgectct	tattgctttt	atcatttata	gcagagacta	acaaaacagt	
1321	tgacccttag	cagaataaag	cgtgcacat	taactgtaat	atctgttgca	attaagttgt	
1381	tgccactgtt	tccacaatta	aagggcatgc	aaaaccccaa	gatcatttgc	tatttttatg	
1441	gaaaagggc	acaaccagca	cctctatgct	acagtcocct	cttcccctga	gtcacactct	
1501	ttctgctgaa	catccatagc	aatgcacaag	cacagtcagc	cttgggtgac	ctgtgcttta	
1561	aagaagacct	taagctcccc	taagttccag	gcattgcccc	cctatctttc	ccctcgatgt	
1621	gtttatcacc	cttaaatgca	gagtagtgca	gctggagctac	ctgtgcocat	cttggccgat	
1681	ttcgtgtagt	cttogggtct	caatggccaat	ttgcaggctt	cgtcacaaca	aagagatcct	
1741	aagactacag	gaagatccgg	aagatgggtc	ctaaagcaca	ctttagagag	tggggggggc	
1801	aatgcctgga	agcttagggg	cggggcttat	ggtggttagt	tctcctttaa	ggcaatgagg	
1861	agtgcaggag	acctgcattt	caattgggtt	agtactgctg	cctatgggaa	ggcctgtatc	
1921	tgttaactgt	atgtgcaaac	<u>cgatcttggg</u>	gagttagttg	cactttaaca	ggtagtggcc	
1981	taaaatgtat	actgtatata	ttaaaaatg	attttttttc	gccccatggt	ctacacaaat	
2041	agtgtatggt	cagacaagta	aatataacat	acacaaaaat	ggctgtgggc	taaggactag	
2101	cccttgcatc	atttagatgt	gcttcggcct	ttctggggct	<u>gaattttatt</u>	<u>tttaaa</u> tatg	
2161	actatgccac	caaggggagt	gtgacgctcc	ccccttgcgc	tttacagtgc	attatataag	
2221	tttatatatt	<u>gggtttta</u>	gtgttccctt	ggatcccact	gggcttctcg	aattgcagct	
2281	gctgagata	tgacaaatag	gttgtcttaa	agaaacacta	accgcaaagt	aatgtgtgct	
2341	ttcatttaat	gtttagcat	gggggaagcc	ttcttctctg	caccaggtaa	agggcacatgt	
2401	aatatggct	tattgtgat	caataaatg	caaatacact	tttggctgtc	ctcactgaca	
2461	tttaacagg	catagtgtgt	aagtgtagt	gcattttctc	cagagttaca	ttttaattta	
2521	aatatgtgtt	gattaacact	caacaattgt	gcccaggat	agttgtatct	atcctttacc	
2581	taaaccataa	agtacggggg	ctcagtggtg	gcccaggaca	ttcatttctg	cacattttac	
2641	atgtgtgtgg	gaataggctg	tctttctaac	agcactgggg	caaaatactc	aggtgggact	
2701	gtccaaaaca	agacctttta	ttggatgtag	atgggtgggg	tgagttgcat	ttcaacaata	
2761	attgcaagtt	ctgctcttgc	cagggccctg	gccactcttt	gggtagaaaa	aaggtcgtat	
2821	ttggatggga	gctgcegtac	tgcttttagt	aaacacttcc	ctccgacggc	accatctacc	
2881	actagattgc	aatgttttat	caaaggctat	agcgcacagc	tattt <u>agtta</u>	<u>ttga</u> actgca	
2941	actttccaca	cccactataa	ttaactaata	<u>gtattgg</u> cat	ttccaagggg	ggcactgtgt	
3001	cattctgtag	ctcttaatat	agacagacga	gaggctcatt	cccagcttga	taataataag	
3061	cgtttggtat	agaaccactt	gttatcagca	cttactgtat	agtgtgagac	gtttttgtta	
3121	tattcagtg	atgtgtgtgt	gtgtgtgtat	atataatata	atataatata	atataatata	
3181	atactgtttg	ctccatcaaa	tatgtaccg	tgagcagggg	gcttccatgt	ttcacac <u>aat</u>	
3241	<u>ttttta</u> atca	ataaatgtt	ttatgaaaaa	aaaaaaaaaa	gg		

**Abbildung 5-1:** Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des *Xenopus laevis* Emerin1 (AY425621). Der kodierende Bereich ist in Großbuchstaben, der 3'- bzw. 5'-UTR (nicht translatierte Bereich) ist in Kleinbuchstaben dargestellt. Das Start- bzw. Stopp-Codon ist fett gedruckt und unterstrichen. Die LEM-Domäne ist rot, das Transmembran-Segment blau gefärbt. Die snRNP-Bindungsmotive sowie das Polyadenylierungssignal sind hellgrau hinterlegt.

### 5.1.1.2 Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der Xemerin2-cDNA

1	ccacgcgtcc	gcccacgcgt	ccggtcgtgc	aggagcttcc	cctgtcagaa	ctgccagaca	
							<b>M E N Y K R M S D D E L I</b> ·
61	ccatacttta	aggactgccc	aaa <u>ATG</u> GAAA	ATTATAAACG	CATGAGCGAC	GATGAGCTTA	
							<b>· E T L Q K C N I T H G P I V G T T R T L</b> ·
121	TTGAAACGCT	GCAGAAATGC	AACATTACAC	ACGGGCCTAT	TGTCGGTACG	ACTCGGACTT	
							<b>· Y E K K L Y E Y E</b> R S K T R N Q Y P L G ·
181	TATATGAAAA	GAAACTTTAT	GAGTATGAAC	GCAGCAAAAC	TAGGAATCAG	TATCCTCTAG	
							· S Y E S K T H Y R N R A N E E D L E D E ·
241	GTTCTCTACGA	GAGCAAAACA	CACTACAGAA	ACAGAGCGAA	CGAAGAGGAC	TTGGAGGATG	
							· D F Y V E K T V T R T Y Q Y P Q A R S R ·
301	AGGATTTTTA	CGTAGAGAAA	ACCGTTACCA	GAACCTACCA	ATATCCCCAA	GCACGATCAC	
							· V T F D Q L E G E P L Y K E N T Y Q P I ·
361	GAGTCACCTT	TGATCAGCTT	GAGGGAGAAC	CACTCTATAA	AGAAAACACG	TACCAGCCCA	
							· S Q M R Q M G T T Q R V E P R R P I H V ·
421	TATCCAGAT	GCGCCAAATG	GGGACAACAC	AGAGGGTGA	GCCTCGCAGG	CCGATCCATG	
							· K Q N E E N P S K R Y F P <b>V W L Q I L F</b> ·
481	TGAAGCAGAA	CGAAGAGAAC	CCCAGCAAGA	GATACTTCCC	AGTGTGGCTG	CAGATTCTCT	
							<b>· L F L F V G F L A A L Y F L Q E</b> P D D N ·
541	TCCTGTTCTT	GTTCTGTTGGT	TTCCTGGCCG	CTCTTTACTT	CCTGCAGGAA	CCCGACGACA	
							· P F M L E S N *
601	ATCCATTCAT	GCTGGAGAGT	AACTGA	tcaa	atctgcgtta	gtgggtgtacg	atctaccagc
661	aatacagtat	gcttcaaggc	agggctgtcc	atcttcagcc	tcaaaggcct	taatggggca	taattggggca
721	gtatccacct	gtgttctaca	tgagctgaaa	atgtagtctg	cctattgggt	ttcactaaaa	ttcactaaaa
781	aaaaaaaaat	tatatatata	tatcacattc	taatctatac	tatataaaag	tactttcaat	tactttcaat
841	tctgactga	cctgcttaag	aaagacgttt	cttactcaaa	tcaattggca	aaacatattg	aaacatattg
901	aaagctctat	tgattggcct	catgtggaac	aatgggtgtg	tattgcgtat	taaataaaat	taaataaaat
961	gtattggggt	tgccctctac	tatggacaag	tcagtgaatg	gtttaaaata	gcagaggaga	gcagaggaga
1021	<b>gatttatttta</b>	aatattggct	tttttttcgg	agttggacag	cccagggtag	atccctgtgt	atccctgtgt
1081	gagtgttgta	gtgctcagtt	gtgcagatat	ggaatatgaa	tgggataaga	tcccattttt	tcccattttt
1141	aatttagttt	aatggaaata	ccccccagtg	acttcaagtt	aacttctctc	ttaaacagtg	ttaaacagtg
1201	cagagatcct	aatggctctt	cactgcctct	tattactagt	gatgggttaa	tctgtc <b>aatt</b>	tctgtc <b>aatt</b>
1261	<b>ttga</b> cgcggg	tgacaatttt	tatacgtgcg	actattttgt	ccaaatgcat	taaagtcaat	taaagtcaat
1321	gggcgtccga	ata <b>aattttga</b>	cgcgtgacaa	tttttttatt	gtgaattttt	gccgcagttt	gccgcagttt
1381	cacaaaaaca	ttagtggccg	gcgaaaagtg	gaaattcgca	gcaaatccat	ggctgcttaa	ggctgcttaa
1441	taaatttgcc	tcatcacaaa	aaattgggtt	ttttaatgga	aacacggtoa	gattagtctc	gattagtctc
1501	ccggcaacaa	atcttcttcg	gggtgactaa	tctccccgaa	ctgccttccc	gccggcttga	gccggcttga
1561	atgaaatcgc	cattatztat	atgtgctcgc	gcctttctgg	ggcaaatgt	tacttttaaa	tacttttaaa
1621	taagactacc	acaggaatgc	gctttacagt	gaatgatata	agtttttata	ctgtgtttta	ctgtgtttta
1681	gtgatccgc	tcggcttcgc	tcctttctga	attacagcta	aatgacaaac	acaca <b>ataa</b>	acaca <b>ataa</b>
1741	<b>aa</b> atacactt	tccctgtacc	tactgacat	tttaacaggc	ctattgtgta	acgaagttaa	acgaagttaa
1801	gtggcatctt	agaacataat	cacattttaa	tttaaatagg	gcaccctgtg	ttgtcagttg	ttgtcagttg
1861	ccaagtatag	ttatatctat	tctttacata	gactataaag	tgcaggggct	gagtgtattg	gagtgtattg
1921	tgtgtctatg	actgcacaat	gacattttca	catgttgggg	gggggaatag	tctgttagta	tctgttagta
1981	tcagggctg	ggcaaaatat	aacatgctta	ggtagttgga	tgtattgcag	ggccatcttg	ggccatcttg
2041	aattgcaatt	gtcagggcct	ggtcactctt	cggaaaccaa	aaaaaaaaaa	aaagg	aaagg

**Abbildung 5-2:** Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des *Xenopus laevis* Emerin2 (AY766060). Der kodierende Bereich ist in Großbuchstaben, der 3'- bzw. 5'-UTR (nicht translatierte Bereich) ist in Kleinbuchstaben dargestellt. Das Start- bzw. Stopp-Codon ist fett gedruckt und unterstrichen. Die LEM-Domäne ist rot, das Transmembran-Segment blau gefärbt. Die snRNP-Bindungsmotive sowie das Polyadenylierungssignal sind hellgrau markiert.

### 5.1.2 Sequenzanalysen der Nukleotid- sowie der Aminosäuresequenzen

Durch Auswertung der Sequenzen der beiden EST-Klone konnte sowohl die komplette kodierende Sequenz (CDS) als auch die vorhandenen 5'- und 3'-untranslatierten Bereiche (UTR) ermittelt werden. Die Länge der inserierten cDNA betrug für Xemerin1 3.280 nt (Abbildung 5-1) und für Xemerin2 2.093 nt (Abbildung 5-2). Die kodierenden Sequenzbereiche (CDS) umfassten die Nukleotide 96-638 für Xemerin1 bzw. 84-626 für Xemerin2. Mit Hilfe der RNA-Analyse-Software des Instituts für Bioinformatik (<http://rnaanalyzer.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>) wurden die UTRs nach

auffälligen Motiven durchsucht. Dabei konnten in der 3'-UTR von Xemerin1 11 putative snRNP-Bindungsmotive sowie ein Polyadenylierungssignal (AATAAA) identifiziert werden. Xemerin2 weist hingegen nur drei snRNP-Bindungsstellen auf, die 3'-UTR enthielt jedoch ebenfalls ein Polyadenylierungssignal. Weitere mögliche regulative RNA-Sequenzen konnten nicht aufgefunden gemacht werden.

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind in der Abbildung 5-1 und Abbildung 5-2 gezeigt, die Polypeptide mit einer Länge von jeweils 180 Resten und einer theoretischen molekularen Masse von 21.662 Da bzw. 21.723 Da und einem isoelektrischen Punkt von 8.41 bzw. 5.53 ([http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)) voraussagten. Mit Hilfe von Scan-Programmen ([http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) und [http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/cgi-bin/sosui.cgi?/sosui\\_submit.html](http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/cgi-bin/sosui.cgi?/sosui_submit.html)) konnte in den Aminosäuresequenzen zwei Motivbereiche identifiziert werden, die charakteristisch für Emerin sind: eine LEM-Domäne und ein einzelnes Transmembran-Segment (Laguri et al., 2001). Das LEM-Motiv ist am Aminoterminus lokalisiert (Abbildung 5-3) und stellt einen evolutionär konservierten Bereich dar, der dem Lamina-assoziierten Protein 2 (LAP2), Emerin und MAN1 gemeinsam ist. Von den Mitgliedern der LEM-Proteinfamilie ist bekannt, dass sie an das Chromatin-assoziierte Protein 'Barrier-to-Autointegration Factor' (BAF) binden können (Shumaker et al., 2001). In der Tabelle 5-1 werden die Übereinstimmungen der LEM-Domänen in den entsprechenden Proteinen von *Xenopus laevis* verglichen. Die LEM-Bereiche der beiden *Xenopus* Emerin-Proteine wiesen eine fast vollständige Übereinstimmung von 95 Prozent auf. Xemerin1 stimmte mit der LEM-Domäne von XLAP2 zu 23% (ebenfalls 23% für Xemerin2) und mit der von XMAN1 zu 33% (30% für Xemerin2) überein. Allerdings sind auch XLAP2 und XMAN1 in diesem charakteristischen Bereich lediglich zu 23% identisch. Im Vergleich mit den humanen orthologen LEM-Proteinen konnten ebenfalls nur relative geringe Übereinstimmungen im konservierten LEM-Bereich mit Identitäten von 36 bis 45 % festgestellt werden.

**Tabelle 5-1:** Vergleich der übereinstimmenden Aminosäuren in der konservierten Domäne von LEM-Proteinen bei *Xenopus laevis*. Angaben in Prozent.

LEM-Domäne	% Identität mit:			
	XLAP2	Xemerin1	Xemerin2	XMAN1
XLAP2		23	23	23
Xemerin1	23		95	33
Xemerin2	23	95		30
XMAN1	23	33	30	

Neben der LEM-Domäne konnten die Analyseprogramme für die *Xenopus* Emerin-Proteine auch einen stark hydrophoben Bereich am Carboxyterminus (N145-C168) sowie acht (Xemerin1) bzw. sieben (Xemerin2) potentielle Phosphorylierungsstellen ermitteln.

### 5.1.2.1 Identifikation putativer Phosphorylierungsstellen in den Sequenzen des *Xenopus laevis* Xemerins1 bzw. -2 und Vergleich mit dem humanen Emerin

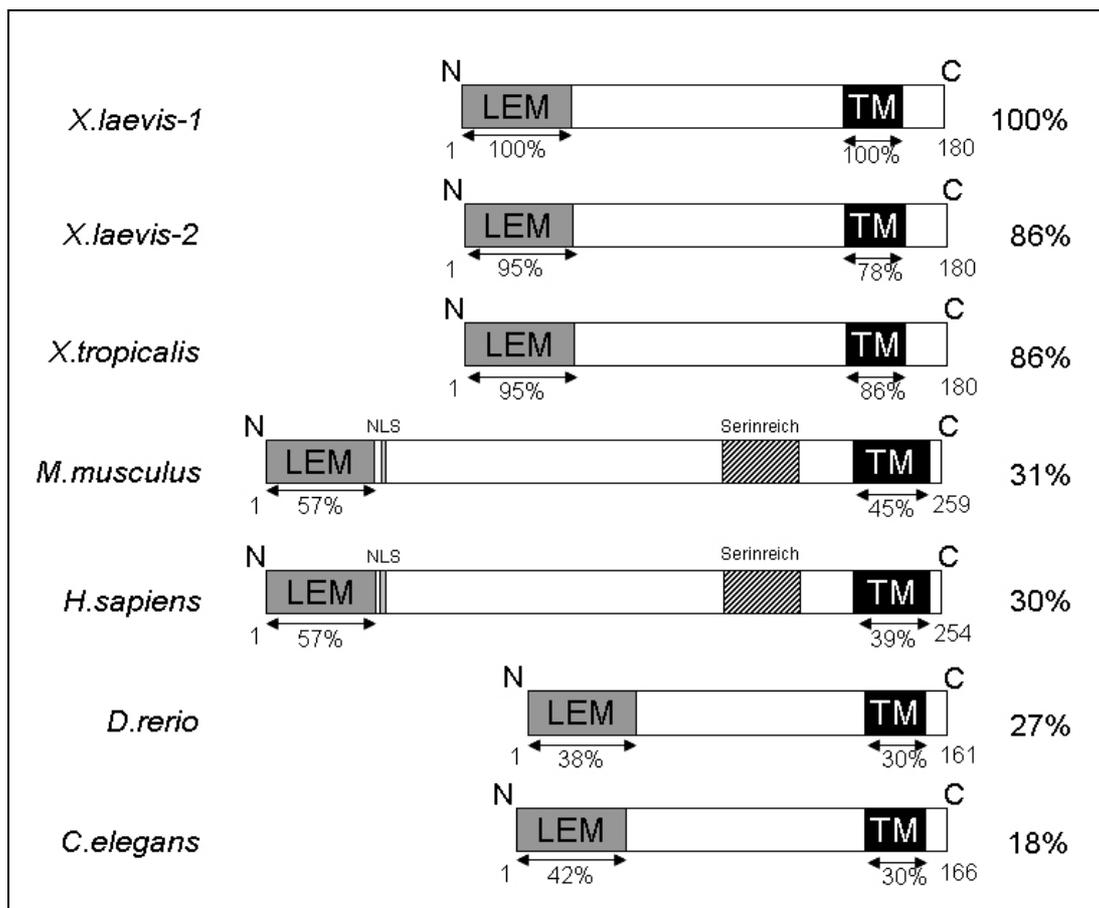
Von Lamina-Proteinen ist bekannt, dass sie während der Mitose unterschiedliche Phosphorylierungszustände aufweisen, wodurch der Abbau und die Neubildung der Kernhülle sowie die Affinität zu den jeweiligen Interaktionspartnern gesteuert werden. Daher konnten in verschiedenen Kernproteinen - einschließlich der Lamine - putative Phosphorylierungsstellen der MAP Kinase, der Proteinkinase A, der Proteinkinase C und der Caseinkinase II identifiziert werden (Gruenbaum et al., 2003). Auch frühere Untersuchungen des humanen Emerins konnten in der nukleoplasmatischen Domäne des Proteins Phosphorylierungsstellen der Tyrosinkinase, der Proteinkinase C und der Caseinkinase II nachweisen (Ellis et al., 1998; Schlosser et al., 2006).

Für Xemerin1 wurden von der Motif-Scan-Software des Schweizer Instituts für Bioinformatik (SIB; [http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)) folgende Phosphorylierungsstellen (siehe Abbildung 5-3 für die Nummerierung der Aminosäuren) vorausgesagt: (a) Tyrosinkinase (RTLYEKKLY) Reste 31-39, RLEREPLY Reste 98-105; (b) Proteinkinase C, TTR Reste 32-35, TTFD Reste 94-97, SRLE Reste 175-178. Im Vergleich mit dem humanen Emerin (NM\_000117) mit 17 potentiellen Phosphorylierungsstellen (Ellis et al., 1998) weist Xemerin1 die gemeinsamen Stellen der Tyrosinphosphatase Y-110 (human: Y-161) (Schlosser et al., 2006), der Proteinkinase C, TTR (human: STR) Reste 29-31 und für die Caseinkinase II, TDDE (human: SDTE) Reste 8-11 (Abbildung 5-3) auf. Xemerin2 weist 7 potentielle Phosphorylierungsstellen auf: (a) cAMP und cGMP abhängige Proteinkinase, KRMS Reste 5-8; (b) Caseinkinase II, SDDE Reste 8-11, TLYE Reste 32-35; (c) Proteinkinase C, TTR Reste 29-31, TQR Reste 122-124, SKR Reste 141-143; (d) Tyrosinkinase-Phosphorylierungsstelle RTLYEKKLY Reste 31-39 und Y-110. Im Vergleich zu Xemerin1 unterscheiden sich die Phosphorylierungsstellen von Xemerin2 in der Stelle für die cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinase Reste 5-8 und für die Proteinkinase C Reste 141-143.

### 5.1.2.2 Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von Xemerin1 und -2 mit dem Homologen Protein von *Xenopus tropicalis*

Durch Sequenz-Alignments der CDS von Xemerin1 und -2 wurden 50 Unterschiede in der Nukleotidabfolge identifiziert, die in der abgeleiteten Polypeptidsequenz einen Austausch von 24 Resten zur Folge hatten. Die 24 Abweichungspunkte waren über die gesamte Aminosäuresequenz verteilt (siehe Abbildung 5-3; eingerahmte Buchstaben), was darauf





**Abbildung 5-4:** Schematische Darstellung der Emerin-Proteine verschiedener Spezies: Die Aminosäuresequenz der *Xenopus laevis* Emerinform1 *X.laevis-1* [AY425621] ist mit der zweiten Emerinform *X.laevis-2* [AY766060] und den entsprechenden Homologen von *Xenopus tropicalis* [BX732490], der gemeinen Maus *Mus musculus* [NM\_007927], des Menschen *Homo sapiens* [NM\_000117], des Zebrafischs *Danio rerio* [CN022234] und des Nematoden *Caenorhabditis elegans* [NM\_058506] verglichen. Die Übereinstimmungen in den jeweiligen Sequenzen sind in Prozent angegeben. Die evolutionär konservierte LEM-Domäne ist grau, das Transmembran-(TM)-Segment schwarz hinterlegt. In der Emerin-Sequenz der Maus und des Menschen konnte ein Kernlokalisations-Signal (NLS) sowie eine serinreiche Region (längs gestreift) identifiziert werden.

**Tabelle 5-2:** Vergleich der identischen Aminosäuren in der Emerin-Gesamtsequenz verschiedener Spezies. Übereinstimmungen sind in Prozent angegeben.

Emerin	% Identität mit:						
	<i>X.laevis-1</i>	<i>X.laevis-2</i>	<i>X.tropicalis</i>	<i>M.musculus</i>	<i>H.sapiens</i>	<i>D.erio</i>	<i>C.elegans</i>
<i>X.laevis-1</i>		86	86	31	30	27	18
<i>X.laevis-2</i>	86		88	32	28	25	20
<i>X.tropicalis</i>	86	88		34	30	23	22
<i>M.musculus</i>	31	32	34		75	26	21
<i>H.sapiens</i>	30	28	30	75		21	21
<i>D.erio</i>	27	25	23	26	22		18
<i>C.elegans</i>	18	20	22	21	21	18	

Xemerin2 zeigt Identitäten von 25%, 20%, 28% und 32% zu *D.rerio*, *C.elegans*, *H.sapiens* und *M.musculus* (vgl. Tabelle 5-2). Innerhalb der LEM-Domäne sind die Identitäten 40% zum Zebrafisch, 41% zum Nematoden und 59% zur murinen und der humanen LEM-Domäne (vgl. Tabelle 5-3). In der C-terminalen Transmembrandomäne stimmen 31% (Maus), jeweils 30% (Mensch und Zebrafisch) und 34% (*C.elegans*) mit der Aminosäuresequenz von Xemerin2 überein.

**Tabelle 5-3:** Vergleich der übereinstimmenden Aminosäuren in der konservierten Domäne von LEM-Proteinen bei verschiedenen Spezies. Angaben in Prozent.

LEM-Domäne	% Identität mit:						
	<i>X.laevis-1</i>	<i>X.laevis-2</i>	<i>X.tropicalis</i>	<i>M.musculus</i>	<i>H.sapiens</i>	<i>D.rerio</i>	<i>C.elegans</i>
<i>X.laevis-1</i>		95	95	57	57	38	42
<i>X.laevis-2</i>	95		95	59	59	40	40
<i>X.tropicalis</i>	95	95		59	59	38	42
<i>M.musculus</i>	57	59	59		80	38	42
<i>H.sapiens</i>	57	59	59	80		45	35
<i>D.rerio</i>	38	40	38	38	45		35
<i>C.elegans</i>	42	40	42	42	35	35	

### 5.2 Untersuchung der zellulären Lokalisation von Xemerin1 und -2 mit EGFP- und Myc-Fusionskonstrukten

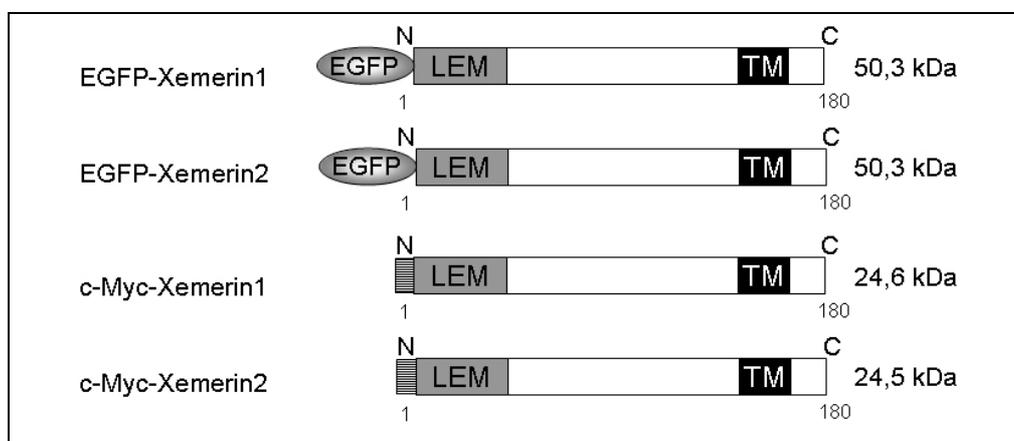
1996 wurde das humane Emerin erstmals als ein ubiquitär exprimiertes Kernhüllenprotein beschrieben (Manilal et al., 1996). Homologe Proteine konnten bei der Maus, Ratte und dem Nematoden *C.elegans* identifiziert und beschrieben werden (Ellis et al., 1998; Lee et al., 2000; Small et al., 1997). Emerin zeichnet sich durch einen langen nukleoplasmatischen Bereich, der Interaktionen mit verschiedenen Interaktionspartnern vermittelt, und ein einzelnes Transmembransegment aus, das für die Verankerung in die innere Kernmembran verantwortlich ist (Bione et al., 1994). Durch Sequenzanalysen der Aminosäureabfolge konnte in den Emerin-Proteinen von *Xenopus laevis* ebenfalls eine Membran-durchspannende Domäne identifiziert werden.

Da bislang kein spezifischer *Xenopus*-Emerinantikörper existierte, mit dessen Hilfe Informationen über die zelluläre Verteilung von Xemerin zu erhalten war, sollte die Lokalisation von Xemerin1 und -2 als lumineszierende Fusionskonstrukte untersucht werden. Dazu wurde die komplette Länge der kodierenden Xemerin1- bzw. Xemerin2-cDNA (-13 bis 543 relativ vom Startcodon) mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und in den eukaryontischen Expressionsvektor pEGFP-C1 über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* / *BamHI* in die multiple Klonierungsstelle kloniert (siehe 3.3.1.5). Vor der multiplen Klonierungsstelle ist auf dem pEGFP-C1 Vektor die genetische Information für das verstärkt

grün fluoreszierende Protein (GFP), das ursprünglich aus der Salzwasserqualle *Aequorea victoria* isoliert wurde, codiert. Nach der Transfektion des Expressionsvektors in eukaryontische Kulturzellen wurde das GFP an den Aminoterminus des Xemerin bei der Translation angehängt (siehe Abbildung 5-5). Nach Fixierung der transfizierten Kulturzellen konnte anschließend die zelluläre Lokalisation von Xemerin durch direkte Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden, da die exprimierten Proteine nach Anregung mit UV-Licht grünes Licht emittierten.

Da darüber hinaus untersucht werden sollte, ob sich die zellulären Verteilungsmuster von Xemerin1 und -2 unterscheiden, musste ein alternatives Vektorsystem angewendet werden, um die Xemerin-Formen verschiedenartig zu markieren. Diesmal sollte kein fluoreszierendes Fusionsprotein hergestellt, sondern ein stark immunreaktives cMyc-Epitop an Xemerin1 bzw. -2 angehängt werden. Der bestehende Vorteil dieses Systems ist, dass die chimären c-Myc-Fusionsproteine von kommerziell erhältlichen anti-c-Myc-Antikörpern spezifisch erkannt und durch indirekte Immunfluoreszenz-Techniken nachzuweisen sind. Dadurch war es möglich, beide *Xenopus* Emerinfusionsproteine mit der indirekten Fluoreszenzmikroskopie immunologisch zu untersuchen.

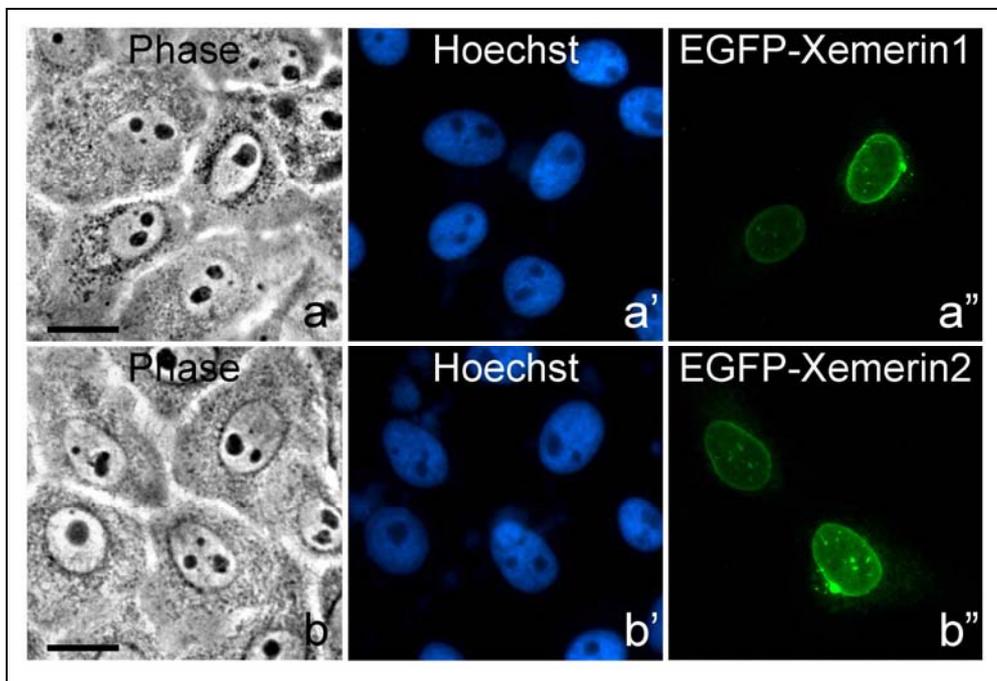
Dafür wurden in einem parallelen Klonierungsansatz die vollständige CDS von Xemerin1 bzw. -2 (-11 bis 543 relativ vom Startcodon) ebenfalls mit einer PCR zyklisch vermehrt, eine *EcoRI*-(5')- sowie eine *XhoI*-(3')-Schnittstelle an das Produkt angehängt und in die MCS des eukaryontischen Expressionsvektors pCMV-Myc inseriert (siehe 3.3.1.2). Dieses Plasmidkonstrukt enthält die kodierende Sequenz des 13 Aminosäuren umfassenden (Molekularmasse = 1.495 Da) und stark immunreaktiven c-Myc-Epitops, das – nach Transfektion in eukaryontische Kulturzellen – aminoterminal angehängt wird (siehe Abbildung 5-5).



**Abbildung 5-5:** Schematische Darstellung der Xemerin1 bzw. -2 Fusionskonstrukte. Die vollständige Proteinlänge wurde aminoterminal entweder mit dem verstärkt grün-fluoreszierenden Protein (EGFP) oder dem stark immunreaktiven cMyc-Epitop (gestreift) fusioniert. Die berechneten Molekularmassen sind in Kilodalton (kDa) angegeben.

### 5.2.1 Lichtmikroskopische Lokalisation der EGFP -Xemerin1- bzw. -2- Fusionsproteine

Für die Expression der EGFP-Xemerin1- bzw. -2-Proteine wurden XIKE-A6 (siehe 3.1.3) Zellen transfiziert, nach 24 Stunden mit Paraformaldehyd/Triton fixiert und mit dem spezifischen DNA-Farbstoff Hoechst 33258 für die Fluoreszenz-Mikroskopie angefärbt (siehe 4.4.2.1). Nach Untersuchung der Zellen am Fluoreszenzmikroskop konnte in den Kernen eine typische prominente Kernperipherie-Anfärbung von Interphasezellen beobachtet werden. Die EGFP-Fusionsproteine von Xemerin1 und Xemerin2 lokalisierten überwiegend im Randbereich des Kerns, wohingegen auch ein geringer Teil aufgrund der Überexpression im Zytoplasma beobachtet werden konnte (Abbildung 5-6, a'' und b'').

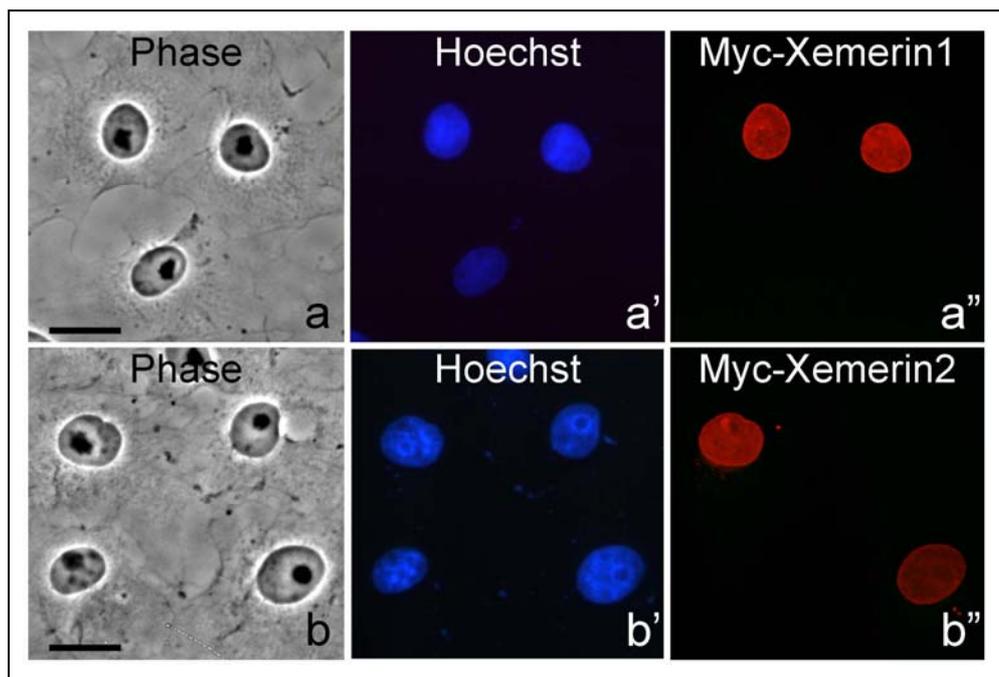


**Abbildung 5-6:** Transfektion von *Xenopus* XIKE-A6-Zellen mit EGFP-Xemerin1 bzw. EGFP-Xemerin2 Fusionskonstrukten. 24 Stunden nach der Transfektion konnte durch direkte Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass die chimären grün-fluoreszierenden Proteine überwiegend an der Kernhülle lokalisierten (a'', b''). a und b zeigen die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen der Zellen, a' und b' die Hoechst 33258-Anfärbung des Chromatins. Referenzstrich: 20 µm.

### 5.2.2 Lichtmikroskopische Lokalisation der c-Myc-Xemerin1- bzw. -2- Fusionsproteine

Das grün fluoreszierende Protein weist – isoliert betrachtet – im Vergleich zu den Xemerin-Proteinen (21,7 kDa) eine relativ hohe molekulare Masse von 26.650 Da auf. Um auszuschließen, dass dieser große Anhang von 237 Aminosäuren einen Einfluss auf die

Lokalisation der Fusionsproteine ausübte, wurde in einem parallelen Ansatz *Xenopus* XIKE-A6-Zellen mit c-Myc—Xemerin1 bzw. -2-Konstrukten transfiziert (siehe 4.6.6.1). 24 Stunden nach der Transfektion wurden die *Xenopus* Kulturzellen mit Paraformaldehyd/Triton-X-100 fixiert und permeabilisiert und mit anti-c-Myc-Antikörpern, die spezifisch an die Fusionsproteine binden, inkubiert. Durch Zugabe von sekundären Antikörpern, die kovalent an den roten Fluoreszenzfarbstoff Carbocyanin 3 (Cy3) gekoppelt sind und ihrerseits die aus der Maus stammenden anti-c-Myc-Antikörpern erkennen (siehe 3.1.4.2), konnten die Bereiche einer Zelle, an denen sich das Fusionsprotein befindet, spezifisch sichtbar gemacht werden. Diese indirekte Immunfluoreszenz zeigt im Vergleich zu der direkten Fluoreszenz der EGFP-Fusionsproteine das gleiche Verteilungsmuster. Die c-Myc-Xemerin1 bzw. -2 Proteine lokalisierten in Interphasezellen wie erwartet an der Kernhülle (Abbildung 5-7), lediglich eine sehr geringe Fraktion der überexprimierten Fusionsproteine konnte wiederum im Zytoplasma beobachtet werden (Abbildung 5-7, b'').

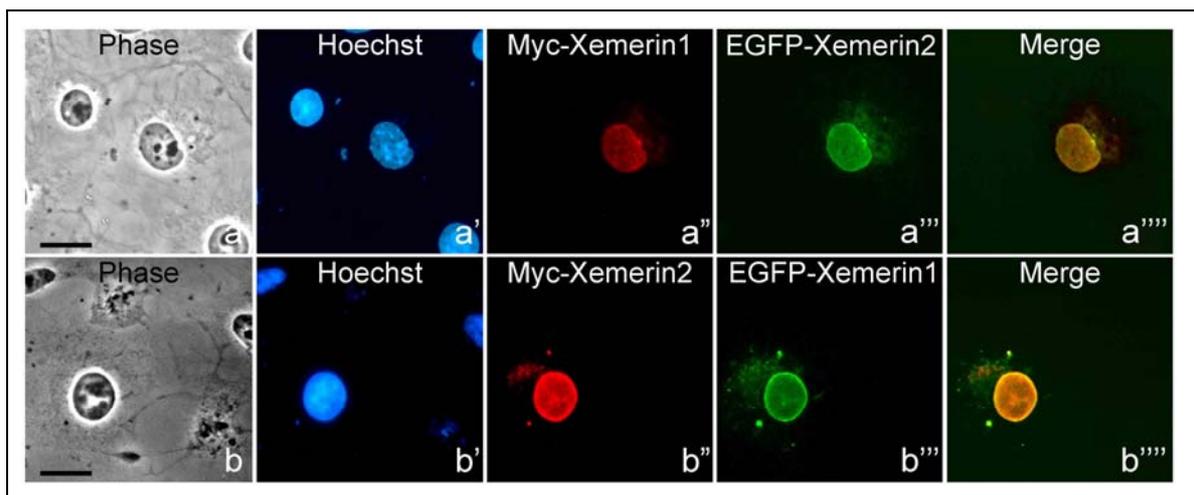


**Abbildung 5-7:** Transfektion von *Xenopus* XIKE-A6-Zellen mit c-Myc-Xemerin1 bzw. c-Myc-Xemerin2 Fusionskonstrukten. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen fixiert und mit spezifischen anti-c-Myc-Antikörpern inkubiert. Durch indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnten die an der Kernhülle angereicherten c-Myc-Fusionsproteine sichtbar gemacht werden (a'', b''); die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen der Zellen sind in (a und b), die Hoechst 33258-Anfärbung der DNA in (a' und b') dargestellt. Referenzstrich: 20  $\mu$ m.

### 5.2.3 Kolokalisation der EGFP- bzw. c-Myc-Xemerin1- bzw. -2

#### Fusionsproteine

Um analysieren zu können, ob sich die beiden Xemerin1 und -2 nach ihrer Expression in unterschiedlichen Kernbereichen aufhalten, wurden *Xenopus* XIKE-A6-Zellen sowohl mit Myc-Xemerin1- als auch mit EGFP-Xemerin2-Fusionskonstrukten und *vice versa* kotransfiziert (siehe 4.6.6.2). 24 Stunden nach der Kotransfektion wurden die *Xenopus* Kulturzellen wiederum mit Paraformaldehyd/Triton-X-100 fixiert und permeabilisiert und mit spezifischen anti-c-Myc-Antikörpern inkubiert (siehe 4.4.2.1). Durch Fluoreszenzmikroskopie konnten in den transfizierten Zellen eine deutliche Lokalisation der einzelnen Xemerin1 bzw. -2-Fusionsproteine im Bereich der Kernhülle beobachtet werden (Abbildung 5-8, a'' und a''' bzw. b'' und b'''). Die Übereinanderlagerung der Einzellokalisation zeigte keinen signifikanten Unterschied im Verteilungsmuster der jeweiligen Proteine (Abbildung 5-8, a'''' und b'''''). Die gelben Bereiche zeigen an, dass die beiden Xemerin1 und -2 kolokalisieren.



**Abbildung 5-8:** Kotransfektion von XIKE-A6-Kulturzellen mit c-Myc- und EGFP-Xemerin1 bzw. -2-Fusionskonstrukten. Die Zellfixierung erfolgte 24 Stunden nach dem Transfektionszeitpunkt. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigt die Koexpression der Xemerin-Proteine durch indirekte Immunfluoreszenz- (a''+b'') sowie durch direkte (a'''+ b''') Fluoreszenz-Technik. Die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen (a+b), DNA-Anfärbung mit Hoechst 33258 (a'+b') sowie Überlagerung der Abbildungen (a''+a''' sowie b''+b''') sind in (a''''+b''''') gezeigt. Referenzstrich entspricht 20  $\mu$ m.

### 5.3 Herstellung spezifischer *Xenopus* Emerin-Antikörper

Da bis dato keine spezifischen Antikörper gegen das endogene *Xenopus* Emerin (Xemerin) existierten, um die intrazelluläre Verteilung dieses Kernhüllenproteins in Oozyten, Embryonen und somatischen Zellen zu beobachten, wurden spezifische Immunkörper generiert. Diese wurden in Zusammenarbeit mit Prof. H. Zentgraf am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg hergestellt. Als Antigen wurde der nukleoplasmatische Bereich (N1-C136, siehe Abbildung 5-9) von Xemerin1 ausgewählt, da dieser zum einen eine hohe

Homologie zur Xemerin2-Form aufweist und sich zum anderen stark vom Emerin-Protein der Säuger unterscheidet. Dadurch kann eine Kreuzreaktion in der Maus ausgeschlossen werden. Das Antigen wurde bakteriell exprimiert (siehe 4.3.2.1) und aufgereinigt (siehe 4.3.2.2) und für die Immunisierung der Mäuse eingesetzt.

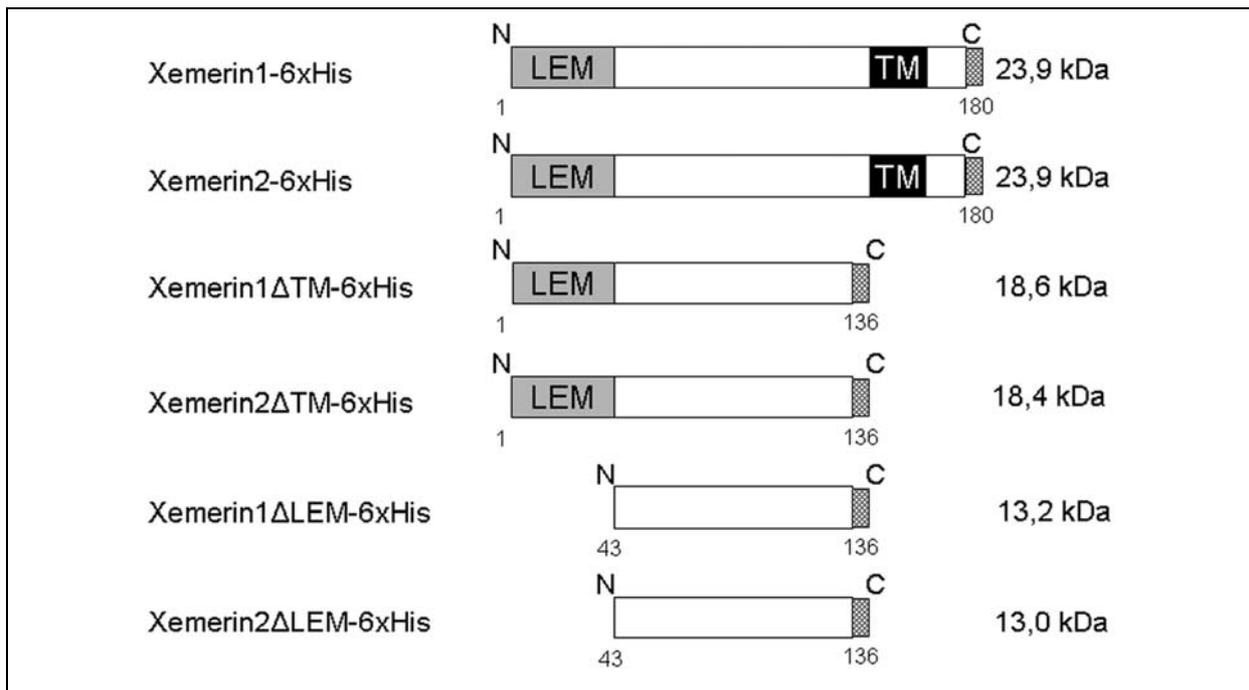
### **5.3.1 Bakterielle Expression und Aufreinigung des rekombinanten Antigens für die Immunisierung**

Für die Immunisierung wurde ein rekombinantes Polypeptid konstruiert, das C-terminal mit sechs Histidinen fusioniert war. Dies war notwendig, da das rekombinante Protein für die Immunisierung aufgereinigt sein musste und sich ein carboxyterminales Hexahistidin-Tag dafür besonders gut eignete. Um das rekombinante Xemerin-Antigen herstellen zu können, wurde mit Hilfe der PCR ein Abschnitt der CDS (Basen -10 bis 426, relativ vom Transkriptionsstart) von Xemerin1 amplifiziert und *Bam*HI-Restriktionsstellen angehängt und in den Expressionsvektor pQC-6xHis kloniert (siehe 3.3.1.6). Durch Zugabe von IPTG wurde die Expression des Fusionproteins in *E.coli* XL1blue Zellen induziert (siehe 4.3.2.1). Die Bakterien wurden 4 Stunden nach dem Induktionszeitpunkt geerntet und die exprimierten Proteine durch Zellaufschluss aus den Bakterien lysiert (siehe 4.3.2.2.2). Anschließend wurde ein Teil des Bakterienlysats mit einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, um die Expression des rekombinanten Polypeptids nachzuweisen (siehe 4.3.7). Nach Anfärbung des Gels mit Coomassie Blue konnte eine deutliche Bande bei etwa 20 kDa nachgewiesen werden. Die Aufreinigung des Peptids erfolgte über das Hexahistidin-Tag unter denaturierenden Bedingungen mit einer Nickel-NTA-Agarosesäule (siehe 4.3.2.2). Nach Immunisierung der Tiere mit einer Antigenmenge von insgesamt 200 µg wurde eine Milzhybridoma-Zelllinie generiert, und die Antikörper-produzierenden Zellklone durch Elisa-Analysen vorselektiert. Durch immunologische Testreihen, in denen die Antikörper im Immunblot spezifisch eine Bande von 24 kD erkennen und in der Immunfluoreszenz die Kernhülle von *Xenopus* Kulturzellen anfärben mussten, konnte der Zellklon #59/7 identifiziert werden, welcher Antikörper mit der höchsten Affinität zu Xemerin herstellte.

#### **5.3.1.1 Weitere Xemerin-Fusionsproteine für die bakterielle Expression und Aufreinigung**

Neben dem Antigen wurden weitere rekombinante Xemerin-Konstrukte mit einem C-terminalen Hexahistidin-Tag hergestellt, um zum einen rekombinante Xemerin1 und -2-Proteinen mit der kompletten Länge für Bindungsstudien oder Injektionsexperimente zur Verfügung zu haben, und zum anderen um festzustellen, ob sich das Epitop des *Xenopus* Emerin Antikörpers #59/7 in konservierten LEM-Domäne befindet. Dazu wurde mit Hilfe von

PCR-Klonierungstechniken ausgehend von der cDNA der Xemerin1- bzw. -2 EST-Klonen Abschnitte der CDS mit einer DNA-Polymerase, die eine Korrekturlese- („Proofreading“)-Eigenschaft besitzt, amplifiziert (N1-C180, N1-C136 und N43-C136, siehe Abbildung 5-9) und über *Bam*HI / *Hind*III-Restriktionsstellen in den pQC-6xHis Expressionsvektor inkloniert. Anschließend wurde das Plasmid durch chemische Transformation in kompetente *E.coli*-Zellen eingeschleust. Durch die Sequenzierung des Vektors wurde sichergestellt, dass der DNA-Abschnitt im korrekten Leseraster in die MCS integriert wurde und keine Punktmutationen oder Deletionen aufwies.

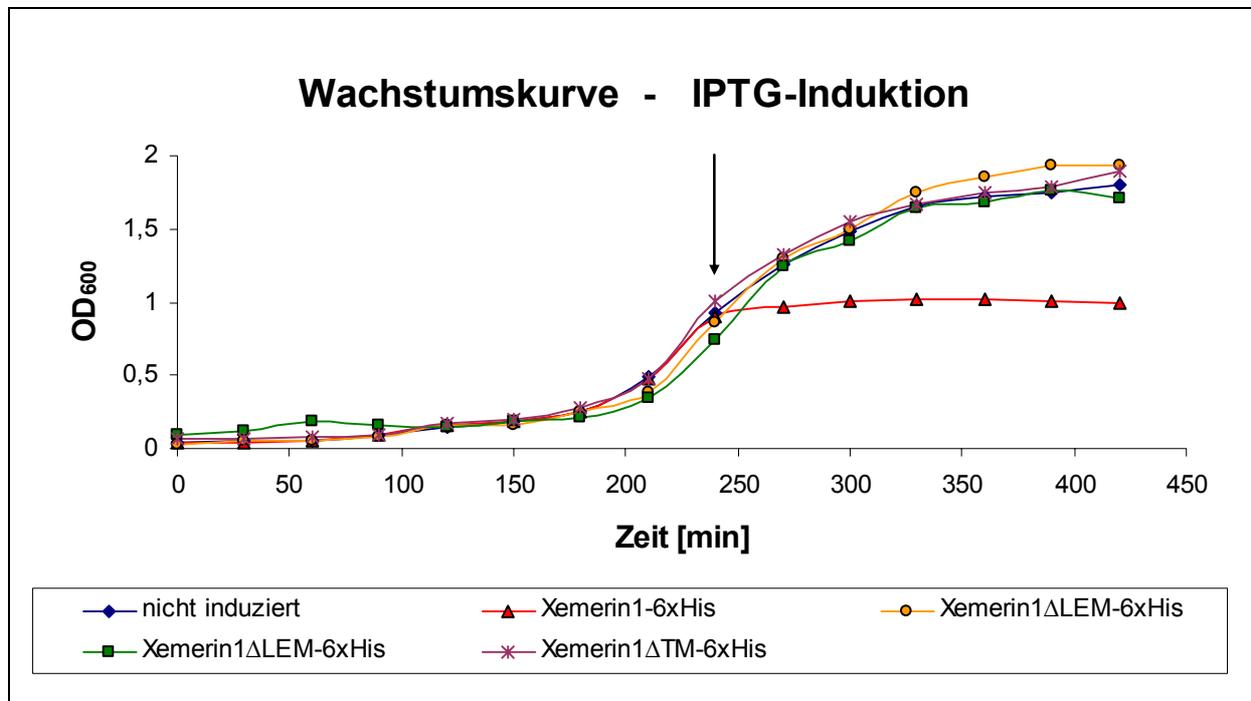


**Abbildung 5-9:** Schematische Darstellung von Xemerin1 bzw. -2 Fusionskonstrukten für die Immunisierung. Das carboxyterminale Hexahistidin-Tag (schraffiert) wurde entweder mit der vollständigen Proteinlänge oder mit Xemerin-Konstrukten, denen das Transmembran-Segment (TM, schwarz hinterlegt) bzw. die LEM-Domäne (grau) fehlte, fusioniert. Die berechneten molekularen Massen sind in Kilodalton (kDa) angegeben.

### 5.3.1.2 Expression der Fusionsproteine in induzierten Bakterienkulturen

Bei der Expression der Xemerin-Konstrukte in induzierten Bakterienkulturen, konnte festgestellt werden, dass die Expression der Fusionsproteine Xemerin1-6xHis und Xemerin2-6xHis, welche die vollständige Länge des *Xenopus* Emerin umfassten, die Bakterienzellen absterben ließ. Dies äußerte sich durch eine konstant bleibende Trübung der Kultur und eine gleich bleibende Zellzahl. Interessanterweise konnten diese zelltötenden Auswirkungen bei den verkürzten Xemerin-Konstrukten nicht beobachtet (siehe Abbildung 5-10). Aus diesem Grund ließen sich ausschließlich die verkürzten *Xenopus* Emerin-Konstrukte Xemerin1/2-ΔTM-6xHis und Xemerin1/2-ΔLEM-6xHis aufreinigen.

Zur objektiven Bestimmung der zytotoxischen Effekte, wurde - nach Inokulation des Wachstumsmediums mit den transformierten Bakterienstämmen - jede halbe Stunde die relative Bakterienanzahl ( $OD_{600}$ ) gemessen (siehe 4.3.2.1).

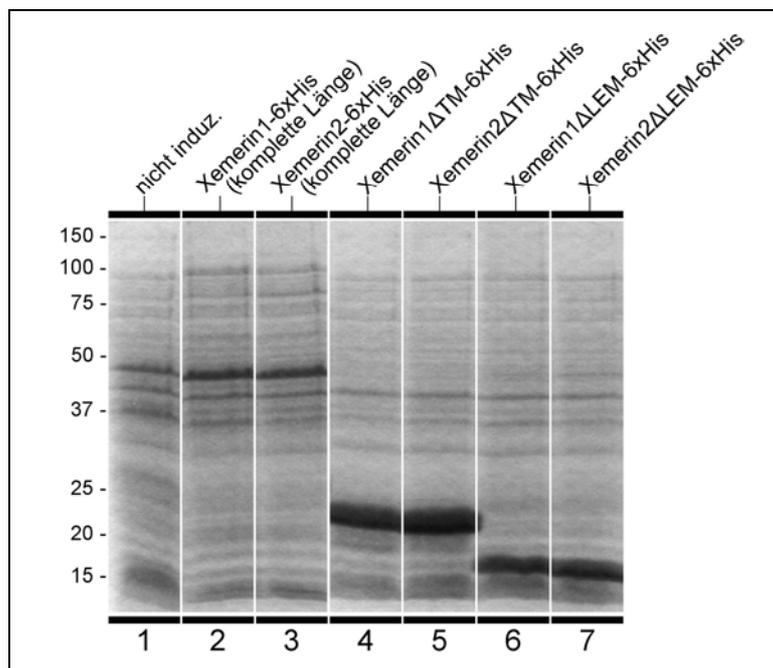


**Abbildung 5-10:** Wachstumskurve der Bakterienkulturen, die mit Xemerin1-Konstrukten transformiert wurden. In dem Diagramm ist die relative Zellzahl, die bei einer optischen Dichte von 600 nm ( $OD_{600}$ ) gemessen wurde, gegen die Inkubationszeit in Minuten aufgetragen. Der Zeitpunkt der IPTG-Induktion (Endkonzentration = 1 mM) erfolgte in der logarithmischen Wachstumsphase zum Zeitpunkt  $t = 240$  min (siehe Pfeil). Die Expression des Xemerin1-Fusionproteins (rotes Dreieck) führte bei den Bakterienzellen zu zytotoxischen Effekten.

Im Vergleich zur nicht-induzierten Bakterienkultur (siehe Abbildung 5-10) wuchsen diejenigen Bakterienstämme, welche die Emerin-Konstrukte ohne die LEM-Domäne und/oder Transmembrandomäne exprimierten, mit der gleichen Teilungsrate ( $OD_{600} = 1,8$ ). Die Expression des Gesamtproteins jedoch führte zum Absterben der Bakterienzellen, was sich durch eine annähernd konstant bleibende relative Zellzahl äußerte ( $OD_{600} = 1,0$ ). Die gleichen Effekte wurden auch bei der Expression der Xemerin2-Konstrukte beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Um festzustellen, ob die Bakterienzellen trotz der zytotoxischen Effekte des Gesamtprotein-Konstrukts, dennoch die rekombinanten Proteine exprimieren, wurden die Bakterienzellen drei Stunden nach der Induktion durch Sedimentation geerntet und durch Lyse aufgeschlossen (siehe 4.3.2.2.2). Nachdem die in den Bakterienzellen vorhandenen Proteine, in Lösung gebracht waren, wurde  $1/500$ stel des Volumens, welches der ursprünglichen Bakterienexpressionskultur entsprach (siehe 4.3.2.3.2), mit einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 4.3.8), und das Acrylamidgel anschließend mit Coomassie Blau anfärbt (siehe Abbildung 5-11). Zur Kontrolle wurden Proteine einer nicht induzierten

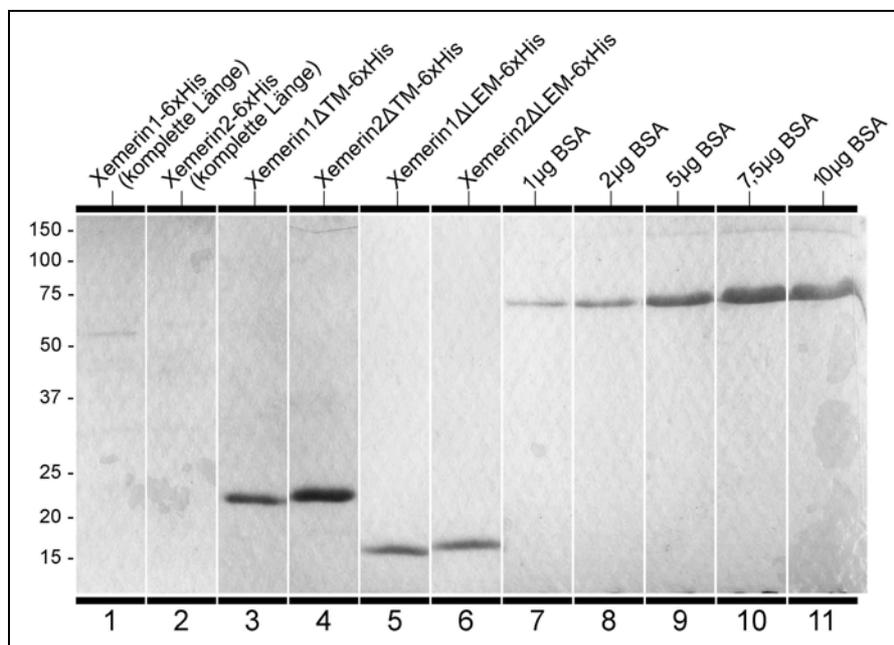
Bakterienkultur auf das Gel geladen (Abbildung 5-11, Spur 1). Die Überexpression der Fusionsproteine durch die Bakterienzellen äußerte sich durch eine prominente Polypeptidbande im Lysat (Abbildung 5-11, Spur 4-7). Allerdings konnte für die Xemerin-Konstrukte, welche die komplette Länge umfassten, keine Überexpression beobachtet werden (Abbildung 5-11, Spur 2+3). Damit konnte gezeigt werden, dass die zytotoxischen Effekte, die nach der Induktion der Expression auftraten, auch die Translation dieser rekombinanten Xemerin-Konstrukte beeinträchtigten. Die Gründe für diese beobachteten Effekte bleiben bislang ungeklärt (siehe dazu auch die Expression der XMAN1-Konstrukte; Überschrift 5.19).



**Abbildung 5-11:** Expression der rekombinanten Fusionsproteine von Xemerin in Bakterienkulturen. Drei Stunden nach Induktion wurde  $\frac{1}{500}$  des Volumens der ursprünglichen Bakterienexpressionskultur durch eine 18%ige SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blau angefärbt. In Spur 1 sind die bakteriellen Proteine einer nicht induzierten Bakterienkultur zu sehen. Die Expression der kompletten Längen von Xemerin1 oder -2 (Spur 2+3) konnte nicht festgestellt werden. Dagegen war die Überexpression der verkürzten Xemerin-Konstrukte Xemerin1/2 $\Delta$ TM-6xHis (N1-C136) (Spur 4+5) sowie Xemerin1/2 $\Delta$ LEM-6xHis (N43-C136) (Spur 6+7) eindeutig zu beobachten. Referenzpolypeptide unterschiedlicher molekularer Masse sind in kDa angegeben.

Nachdem eindeutig gezeigt werden konnte, dass die Bakterien nur die verkürzten Xemerin-Fusionsproteine exprimierten, wurden diese mit einer Nickel-Agarosematrix unter denaturierenden Bedingungen von den übrigen Bakterienproteinen aufgereinigt (siehe 4.3.2.3). Diese Aufreinigung war für nachfolgende immunologische Tests notwendig (siehe 5.3.2). Nach der Elution wurde durch eine 18%ige SDS-PAGE die Reinheit und die Ausbeute der aufgereinigten Proteine bestimmt (siehe Abbildung 5-12). Wie bereits durch

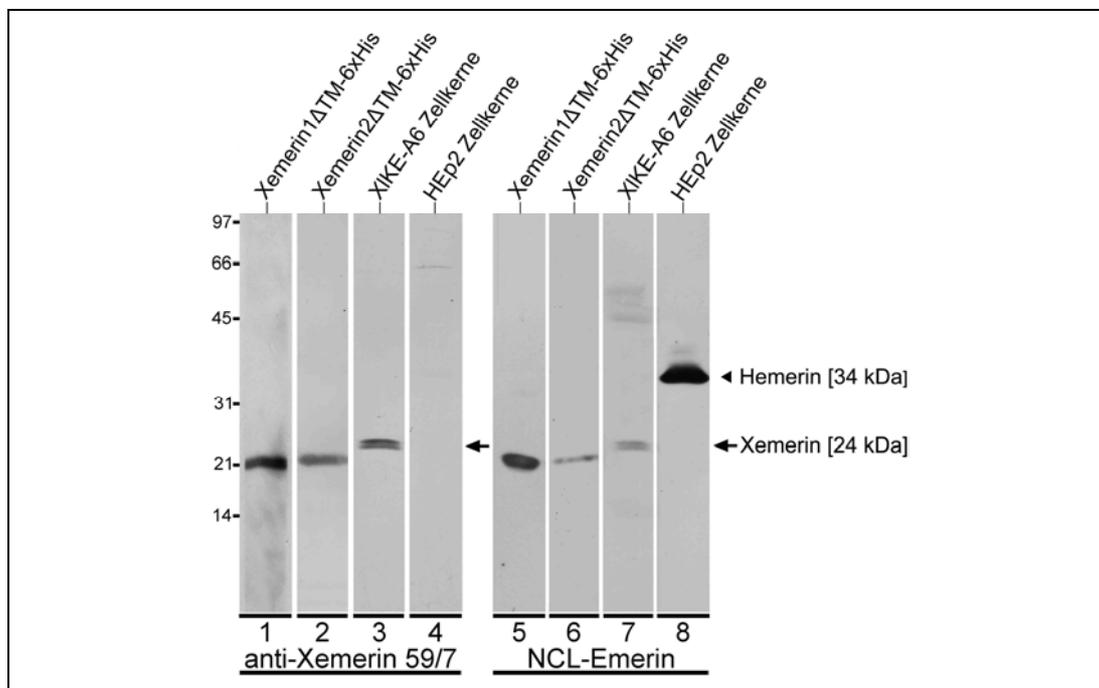
das Fehlen prominenter Polypeptidbanden in aufgetrennten Bakterienlysatproteinen erwartet, konnten die Fusionsproteine Xemerin1-6xHis und Xemerin2-6xHis, welche die vollständige Länge des *Xenopus* Emerin umfassten, nicht aufgereinigt werden (Abbildung 5-12, Spur 1+2). Aus diesem Grund konnten keine Bindungsstudien oder Mikroinjektionsexperimente mit bakteriell exprimierten und aufgereinigten *Xenopus* Emerin-Konstrukten, welche die vollständige Länge des Kernhüllenproteins umfassten, durchgeführt werden. Allerdings konnten die verkürzten Xemerin-Konstrukte Xemerin1/2- $\Delta$ TM-6xHis (Abbildung 5-12, Spur 3+4) und Xemerin1/2- $\Delta$ LEM-6xHis (Abbildung 5-12, Spur 5+6) sauber von bakteriellen Proteinen getrennt, und die Menge der aufgereinigten rekombinanten Proteine durch Mitführen einer Konzentrationsreihe von bovinem Serumalbumin (BSA; Abbildung 5-12, Spur 7-11) bestimmt werden.



**Abbildung 5-12:** Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine unter denaturierenden Bedingungen. Nach der Überexpression der Fusionsproteine wurden die carboxyterminal Histidin-markierten Proteine unter denaturierenden Bedingungen über eine Nickel-Agarosesäule aufgereinigt und der Reinheitsgrad sowie die Menge der die Proteine enthaltenden Elutionsfraktionen mit einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Blau angefärbt. Die vollständige Polypeptidlänge von Xemerin1 sowie -2 konnte nicht aufgereinigt werden (Spur 1+2). Die verkürzten Xemerin-Konstrukte Xemerin1/2 $\Delta$ TM-6xHis (N1-C136) (Spur 3+4) sowie Xemerin1/2 $\Delta$ TM-6xHis (N43-C136) (Spur 5+6) konnten dagegen einwandfrei isoliert werden. Zur Bestimmung der aufgereinigten Proteinmengen wurde eine Reihe definierte Konzentrationen bovinem Serumalbumins (BSA) aufgetragen. Die molekularen Massen der Referenzpolypeptide sind in Kilodalton (kDa) angegeben.

### 5.3.2 Überprüfung der Spezifität des monoklonalen Xemerin-Antikörpers durch Immunblot

Um die Spezifität des monoklonalen Xemerin-Antikörpers 59/7 zu zeigen, wurde ein kommerzieller Antikörper, der spezifisch an das humane Emerin bindet (NCL-Emerin, Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, UK) für vergleichende Studien herangezogen. Vom Antikörper NCL-Emerin ist bekannt, dass er im Immunblot eine Proteinbande von 34 kDa erkennt. Neben dem humanen Protein, erkennt dieser Antikörper Emerin auch in Geweben und Zelllinien, die von anderen Vertebraten stammen (Dabauvalle et al., 1999; Manilal et al., 1996; Nagano et al., 1996). Allerdings weist der NCL-Antikörper im Immunblot eine sehr schwache Affinität zum *Xenopus* Emerin auf (Abbildung 5-13, vergleiche Spur 7 + 8).

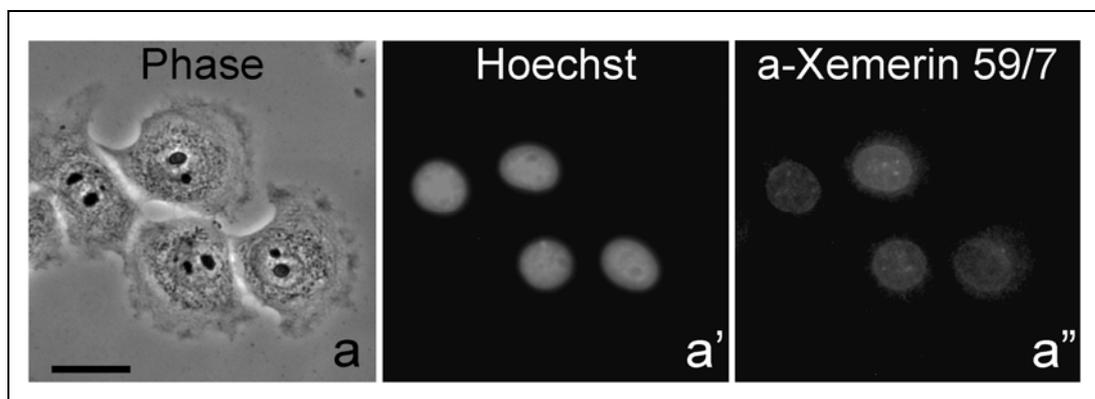


**Abbildung 5-13:** Überprüfung der Spezifität des monoklonalen anti-*Xenopus* Emerin (Xemerin) Antikörpers 59/7 durch Vergleich mit einem kommerziellen Antikörper NCL-Emerin (anti-human). In einer 18%igen SDS-PAGE wurden jeweils 100 ng des Xemerin1ΔTM-6xHis (Spur 1, 5), des Xemerin2ΔTM-6xHis (Spur 2, 6), Proteine aus  $1 \times 10^6$  XIKE-A6-Zellkernen (Spur 3, 7) und HEp2-Zellkernen (Spur 4, 8) aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem Xemerin-Antikörper 59/7 (Spur 1-4) oder mit dem kommerziellen Antikörper NCL-Emerin, der spezifisch das humane Emerin erkennt (Spur 5-8) inkubiert. In den *Xenopus* A6-Zellproben wurde ein Polypeptid-Dublett mit einer molekularen Masse von 24.000 Da erkannt, das dem Xemerin1 und -2 entspricht (Spur 3, 7; Pfeil), das humane Emerin (Hemerin) erscheint bei 34 kDa (Spur 8; Pfeilkopf). Obwohl beide Antikörper das rekombinante Xemerin1ΔTM-6xHis (Spur 1, 5) und Xemerin2ΔTM-6xHis (Spur 2, 6) erkennen, reagiert der NCL-Emerin Antikörper nur sehr schwach mit endogenem *Xenopus* Emerin (vergleiche Spur 3 und 7) wohingegen der Antikörper 59/7 spezifisch die *Xenopus* Emerin-Proteine erkennt (vergleiche Spur 1-3 mit 4). Molekularen Massen sind in kDa angegeben.

Es wurden zwei Immunblots hergestellt, in denen die aufgereinigten Fusionsproteine Xemerin1ΔTM-6xHis und Xemerin2ΔTM-6xHis, sowie Zellkerne aus *Xenopus* und humanen Kulturzellen (XIKE-A6, HEp2) aufgetragen wurden. Das Erkennungsmuster des Xemerin-

Antikörpers 59/7 (siehe Abbildung 5-13, Spur 1-4) wurde mit dem Immunblot, der mit dem NCL-Emerin Antikörper inkubiert wurde (siehe Abbildung 5-13, Spur 5-8), gegenüber gestellt. Der Xemerin Antikörper 59/7 reagiert spezifisch mit den rekombinanten Fusionsproteinen und mit einer Doppelbande von 24.000 Da in XIKE-A6 Zellkernen (Abbildung 5-13, Spur 1-3). Der Xemerin Antikörper bindet nur kaum wahrnehmbar an das humane Emerin mit einer molekularen Masse von  $M_r = 34.000$  Da, darüber hinaus wurde eine unspezifische Bande bei etwa 64 kDa erkannt (Abbildung 5-13, Spur 4). Der NCL-Emerin Antikörper erkennt selektiv in aufgetrennten Proteinen aus HEp2-Zellkernen die Polypeptidbande des humanen Emerins mit einer Masse von 34 kDa (Abbildung 5-13, Spur 8). Auch die Xemerin-Fusionsproteine (Abbildung 5-13, Spur 5+6) und das endogene *Xenopus* Emerin (Doppelbande) von 24 kDa in XIKE-A6-Zellkernen werden – jedoch mit einer schwächeren Affinität – von dem Antikörper erkannt.

Nachdem gezeigt wurde, dass der neu hergestellte Xemerin Antikörper 59/7 im Immunblot spezifisch eine distinkte Polypeptidbande von 24 kDa erkannte, wurde der Antikörper auch auf somatischen Kulturzellen durch indirekte Immunfluoreszenz analysiert (siehe 4.4.1). Nach der Fixierung von somatischen *Xenopus* XIKE-A6 Zellen mit Methanol/Aceton (siehe 4.4.2.2) färbte der monoklonale Antikörper Xemerin 59/7 in der indirekten Immunfluoreszenz deutlich die Kernperipherie in der Interphase an (Abbildung 5-14, a''), was auf eine Lokalisation des Xemerins in der Kernmembran schließen lässt. In Zellen, die sich in der Ana- bzw. Metaphase befinden, konnte eine diffuse Verteilung des Proteins im Zytoplasma beobachtet werden. Erst zu Beginn der Telophase war wieder ein stärkeres Farbsignal um die kondensierten Chromosomen festzustellen (Daten nicht gezeigt), wodurch zu sehen war, dass Xemerin beim Kernassembly in die neu entstehende Kernhülle wieder eingelagert wird.



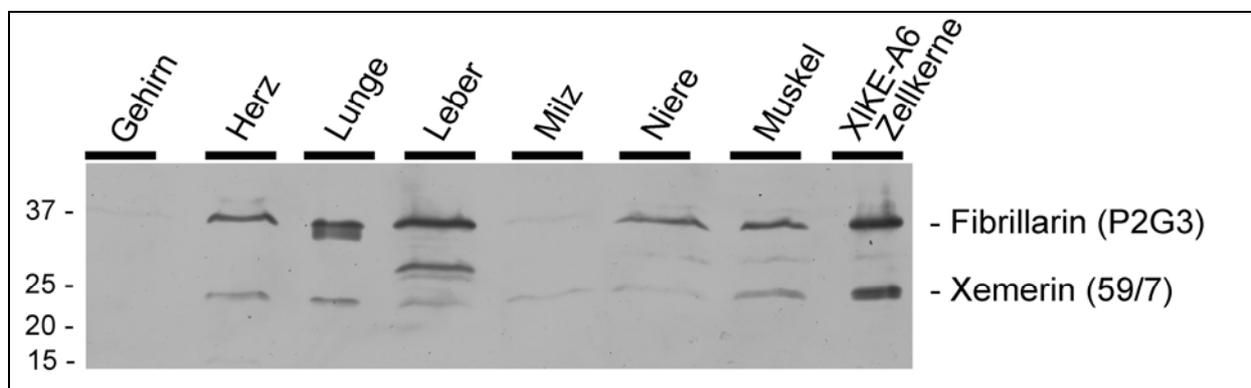
**Abbildung 5-14:** Überprüfung der Spezifität des monoklonalen anti-Xemerin-Antikörpers 59/7 in *X. laevis* Kulturzellen (XIKE-A6) nach Fixierung mit Methanol/Aceton durch indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Die somatischen Interphase-Kerne zeigen eine prominente Randfärbung der Kernhülle (a''). Zusätzlich sind die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen (a) und die Hoechst-Anfärbung (a') dargestellt. Referenzstrich: 20  $\mu\text{m}$ .

## 5.4 Verteilungsmuster von Xemerin in Organen und Geweben adulter Tiere

Die bisherigen Ergebnisse konnten nachweisen, dass der Xemerin Antikörper 59/7 sowohl im Immunblot als auch in der indirekten Immunfluoreszenz das Kernhüllenprotein *Xenopus* Emerin (Xemerin) spezifisch erkennt. Aus diesem Grund sollte die Verteilung von Xemerin in Organen und Geweben untersucht werden. Untersuchungen von Säuger-Geweben haben gezeigt, dass Emerin ubiquitär exprimiert wird (Dabauvalle et al., 1999; Manilal et al., 1996). Durch immunologische Analysen sollte untersucht werden, ob dies auch für den afrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* zutrifft.

### 5.4.1 Analyse durch Immunblot

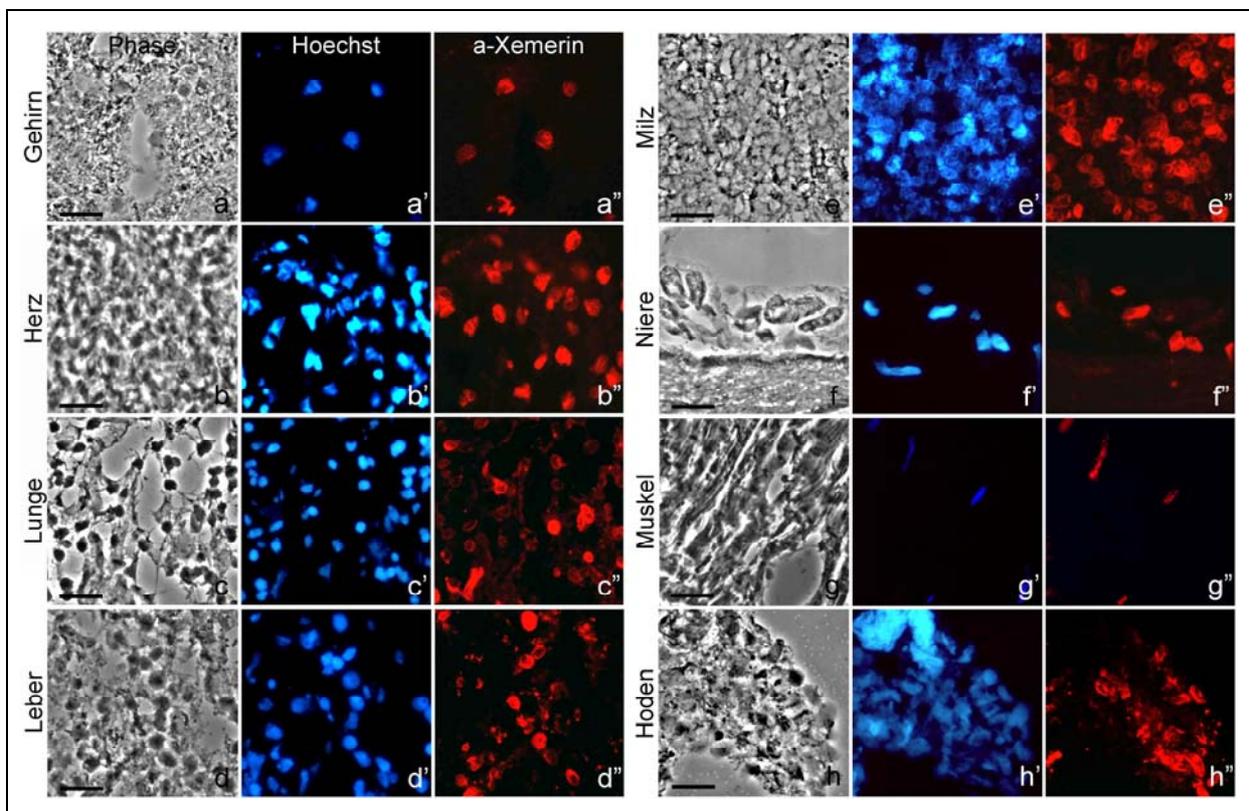
Um die Verteilung von *Xenopus* Emerin (Xemerin) in Organen und Geweben zu analysieren, wurden die Proteine nach einem Protokoll von John Newport (Newport and Dunphy, 1992) aus den Zellen entnommener Organe eines adulten Krallenfroschs extrahiert (siehe 4.3.6), mit einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (siehe 4.3.8). Anschließend wurde die Membran nacheinander mit den monoklonalen Antikörpern 59/7 und P2G3 inkubiert. Der spezifische Antikörper Xemerin 59/7 erkennt in allen untersuchten Geweben – mit Ausnahme des Gehirns – ein Polypeptid mit einer Masse von 24 kDa. Als interne Kontrolle für die Ladung wurde der monoklonale Antikörper P2G3 eingesetzt (Lopez-Iglesias et al., 1988), welcher spezifisch an *Xenopus* Fibrillarin, einem charakteristischen nukleolären Protein mit einer theoretischen molekularen Masse von  $M_r = 34.332$  Da, bindet. Dieses Nukleolusprotein konnte in allen untersuchten Proben mit einer molekularen Masse von etwa 35 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 5-15). In den Spuren von Leber, Niere, Muskel und XIKE-A6 Zellkernen wurde eine unspezifische Bande bei 30 kDa erkannt.



**Abbildung 5-15:** Immunblot verschiedener Organe und Gewebe eines adulten afrikanischen Krallenfroschs. Die extrahierten Proteine wurden elektrophoretisch durch eine SDS-PAGE (18% Polyacrylamid) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und nacheinander mit dem monoklonalen Antikörper 59/7, der Xemerin erkennt und P2G3, welcher an Fibrillarin bindet, inkubiert. Die Molekularmassen der Referenzproteine sind in kDa angegeben.

### 5.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz-Untersuchungen

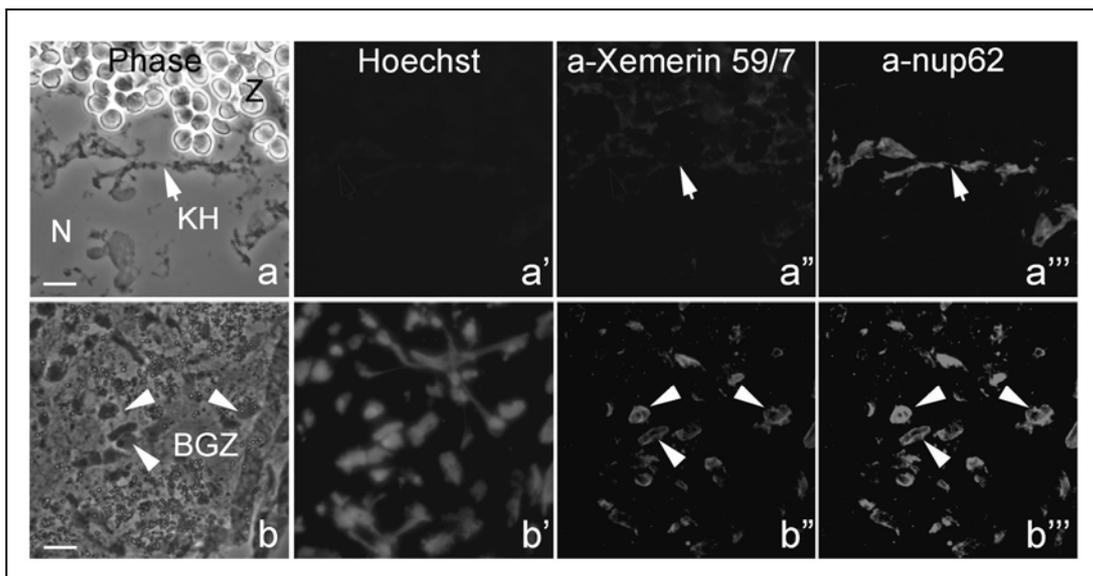
Die Ergebnisse der Immunblot-Untersuchungen konnten durch indirekte Immunfluoreszenz-Analyse bestätigt werden. Einem adulten Krallenfrosch wurden Organe und Gewebe entnommen und diese in Methylbutan schock-gefroren (siehe 4.4.4.3). Anschließend wurden mit einem Gefriermikrotom Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt. Nach Formaldehyd/Triton-Fixierung wurden die Präparate mit dem monoklonalen Antikörper anti-Xemerin 59/7 inkubiert und die Lokalisation mit sekundären, an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern, nachgewiesen. Die Fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen zeigen bei allen untersuchten Gewebezellen eine deutliche Anfärbung der Kernhülle (Abbildung 5-16, a''-h''). Im Unterschied zum Immunblot ist Xemerin auch in Dünnschnitten des Gehirns (Abbildung 5-16, a'') nachweisbar. Weil Xemerin konzentriert in den Zellkernen vorliegt, muss davon ausgegangen werden, dass aus diesem Grund die indirekte Immunfluoreszenz die sensitivere Nachweismethode darstellt. Explizit muss an dieser Stelle auf die Aufnahmen der Hodengefrierschnitte hingewiesen werden (Abbildung 5-16, h''): Die zu beobachtende Anfärbung stammt von Kernen des Bindegewebes und der Nährzellen (Sertoli'sche Zellen). Xemerin konnte weder in den heranreifenden Spermatozyten, noch in den Spermien nachgewiesen werden.



**Abbildung 5-16:** Indirekte Immunfluoreszenz-Aufnahmen verschiedener Organe und Gewebe eines adulten Krallenfroschs. Nach Anfertigung von Gefrierschnitten und anschließender Fixierung wurden die Schnitte mit dem monoklonalen anti-Xemerin-Antikörper 59/7 inkubiert. Die Kerne aller untersuchten Gewebetypen zeigen eine deutliche Anfärbung der Kernhülle (a''-h''). Die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen (a-h) sowie die Hoechst-Anfärbung (a'-h') sind zusätzlich dargestellt. Referenzstriche entsprechen 20 µm.

### 5.5 Verteilungsmuster von Xemerin im Ovar

Da Xemerin nicht in männlichen Keimzellen nachweisbar war, sollte überprüft werden, ob dieser Sachverhalt auch für weibliche Geschlechtszellen zutrifft. Dazu wurde einem weiblichen afrikanischen Krallenfrosch nach Anästhesierung ein Teil des Ovars operativ entnommen und das Gewebe für die Anfertigung von Gefrierschnitten vorbereitet. Die Präparate (Schnittdicke 5  $\mu\text{m}$ ) wurden nach der Fixierung mit Methanol nacheinander mit dem monoklonale Antikörper 59/7, der spezifisch an *Xenopus* Emerin bindet, und dem polyklonalen Antikörper Xgp62 inkubiert, welcher eine Protein-Komponente des Kernporenkomplexes (Nukleoporin Nup62) erkennt (Lourim and Krohne, 1993). Der Antikörper Xgp62 wurde als interne Kontrolle eingesetzt, um die Kernhülle von Oozyten spezifisch anzufärben. Die mikroskopische Phasenkontrast-Aufnahmen des *Xenopus* Ovar zeigte, wie die Kernhülle (NE) der Oozyte das Zytoplasma (C), welches mit Dotterschollen angereichert war, vom Kernbereich (N) abtrennte (Abbildung 5-17; a). Wurden diese Schnitte mit Antikörpern gegen Xemerin 59/7 inkubiert, konnte Xemerin nicht in der Kern-



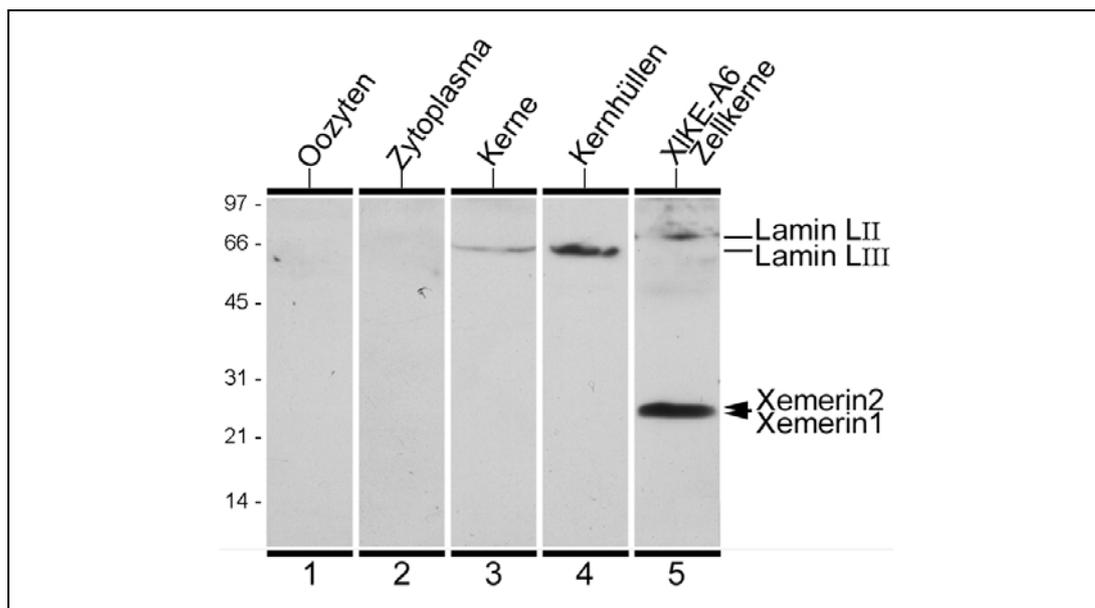
**Abbildung 5-17:** Indirekte Immunfluoreszenz mit dem Xemerin Antikörper auf Gefrierschnitten von *Xenopus* Ovar Nach Inkubation mit dem anti-Xemerin Antikörper (59/7) und mit anti-Nup62 Antikörper (Xgp62) war eine deutliche Fluoreszenz der Kernhülle (KH) der Oozyte (a''') und der Bindegewebszellen (BGZ; b''') mit anti-Nup62 Antikörper zu beobachten. Emerin ist zwar in Kernen der Bindegewebszellen (b'') jedoch nicht in der Kernhülle der Oozyte (a'') nachweisbar. Gezeigt sind außerdem die entsprechenden Phasenkontrast-Aufnahmen (a, b) sowie die Hoechst-Färbungen (a', b'). Z = Zytoplasma; N = Nukleoplasma. Die Referenzstrichlänge entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

hülle der Oozyten nachgewiesen werden (Abbildung 5-17; Pfeile a-a'''). Im Gegensatz dazu färbten die anti-Nup62 Antikörper wie erwartet deutlich die Kernhülle der Oozyte. Außerdem konnte die Kernperipherie der Bindegewebszellen (BGZ) angefärbt werden, welche zwischen den heranreifenden Oozyten lagen (Abbildung 5-17; Pfeilköpfe a''', b'''). Auch der Xemerin Antikörper konnte diese Zellen anfärben (Abbildung 5-17; Pfeilköpfe b-b'''). Es sei angemerkt, dass Xemerin darüber hinaus auch in Kernen von Follikelzellen beobachtet wurde, welche die

Oberfläche der Oozyte umgeben und die Keimzelle beim Reifungsprozess versorgen (Daten nicht gezeigt).

Um zu zeigen, dass das fehlende Xemerin-Signal nicht durch mangelnde Zugänglichkeit der anti-Xemerin Antikörper verursacht wurde, sondern Xemerin in Oozyten tatsächlich nicht vorhanden ist, wurde ein Immunblot durchgeführt. Dazu wurden Proteine aus manuell defollikulierten Oozyten, manuell isolierten Kernen sowie Kernhüllen und Zytoplasma von Stadium IV Oozyten, wie unter 4.5.6 beschrieben, gewonnen und in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Immunblot-Analyse der *Xenopus* Oozyten und XIKE-A6-Zellkerne konnte die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz bestätigen (Abbildung 5-18). Aus dem Ovar eines weiblichen *Xenopus laevis* wurden Oozyten getrennt und mechanisch von den Follikelzellen abgelöst. Die defollikulierten Oozyten wurden anschließend in Zytoplasmata und Kerne subfraktioniert und zuletzt die Kernhüllen manuell isoliert. Diese Proteinproben wurden zusammen mit Zellkernen aus somatischen XIKE-A6 *Xenopus* Kulturzellen mit einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend wurde der Blot nacheinander mit dem spezifischen Xemerin Antikörper 59/7 und dem monoklonalen Antikörper S49H2 (Lourim et al., 1996) inkubiert, der spezifisch *Xenopus* B-Typ Lamine erkennt.

Xemerin1 und Xemerin2 sind in XIKE-A6-Zellkernen nachweisbar (Abbildung 5-18, Spur 5), fehlen aber in den defollikulierten Oozyten sowie in den handisolierten Zytoplasma und Kernen (Abbildung 5-18, Spur 1-3). Selbst in 50 handisolierten Kernhüllen (Abbildung 5-18, Spur 4) war der Antikörper 59/7 nicht in der Lage, *Xenopus* Emerin zu detektieren. Im Gegensatz dazu konnte der monoklonale Antikörper S49H2 in den Oozyten-Kernen und -Kernhüllen das maternale Lamin LIII nachweisen (Abbildung 5-18, Spur 3 + 4). In den Kernen der somatischen Kulturzellen bindet der anti-B-Typ Lamin Antikörper an Lamin LII, das eine Mobilität von etwa 70 kDa aufweist (Abbildung 5-18, Spur 5). Das *Xenopus* B-Typ Lamin LIII wird als maternaler Faktor in der Oozyte angelegt und seine Konzentration nimmt im Laufe der frühen Embryonalentwicklung ab, bis es in Tadpole-Stadien nicht mehr nachweisbar ist (Lourim et al., 1996). Das *Xenopus* Lamin LII dagegen kommt spezifisch in somatischen Zellen vor und wird erst im Laufe der späteren Entwicklung exprimiert (Benavente and KrohneG, 1985). Der Antikörper S49H2 wurde als interne Nachweiskontrolle verwendet, um zu zeigen, dass erstens, eine ausreichende Menge an Protein geladen wurde, um im Immunblot ein Signal zu erhalten (Abbildung 5-18, vergleiche Spur 1 mit Spur2 + 3) und zweitens, eine saubere Arbeitsweise des Experimentators zu belegen, da im Zytoplasma kein Kernlamine nachzuweisen waren (Abbildung 5-18, Spur 2).



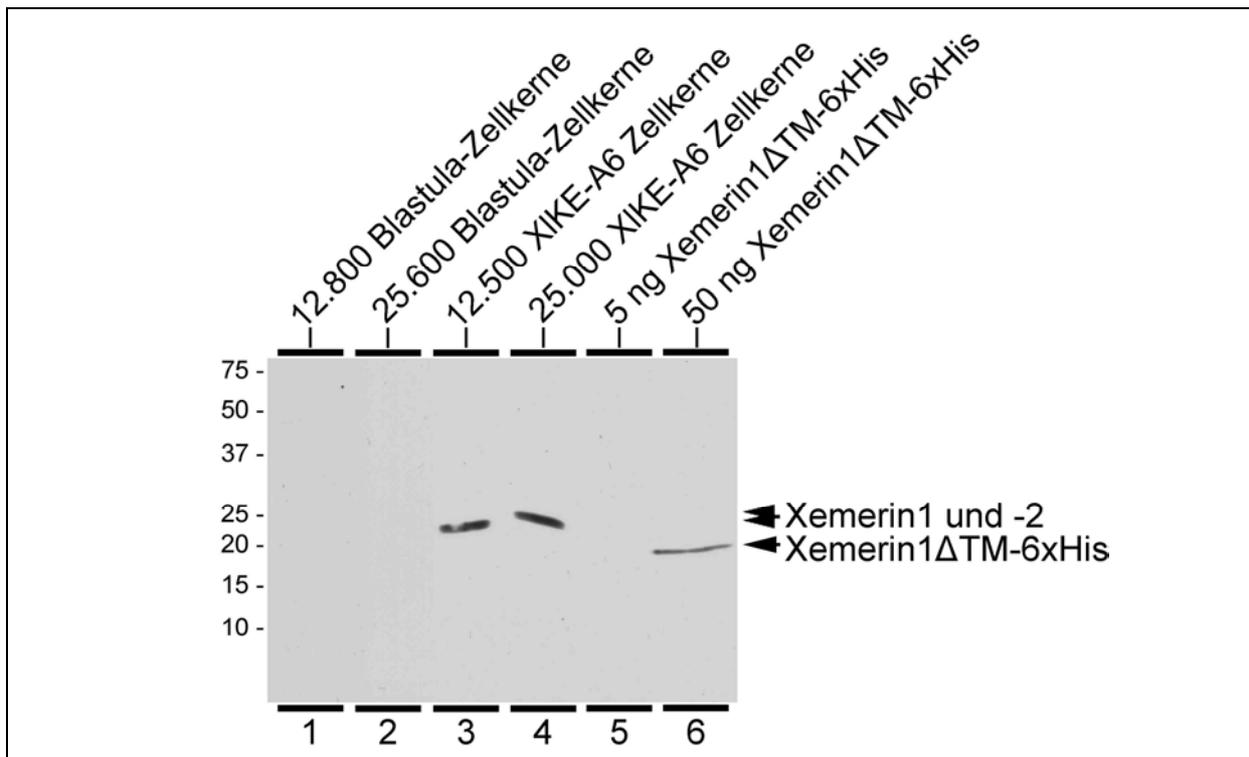
**Abbildung 5-18:** Xemerin ist in *Xenopus* Oozyten auch nicht im Immunblot nachzuweisen. Um die Polypeptide von Xemerin in *Xenopus* Oozyten nachzuweisen, wurden 5 defollikulierten Oozyten (Spur 1), 15 handisolierte Zytoplasma (Spur 2), 15 Kerne (Spur 3) und 50 Kernhüllen (Spur 4) von *Xenopus laevis* Oozyten, sowie  $5 \times 10^5$  Kerne von somatischen XIKE-A6-Kulturzellen (Spur 6) durch SDS-PAGE (18% Polyacrylamid) aufgetrennt und mit dem monoklonalen Antikörper S49H2, der spezifisch die *Xenopus* B-Typ Lamine LII und LIII erkennt, sowie mit dem Xemerin-Antikörper 59/7 inkubiert. Beide Lamin-Formen LII und LIII wurden von dem Antikörper S49H2 in allen Kernen und Kernhüllen detektiert (Spuren 3-5); Xemerin war hingegen nur in den Kernen von somatischen XIKE-A6-Kulturzellen nachweisbar (Spur 5, Pfeile). Die molekularen Massen der Referenzproteine sind in kDa angegeben.

### 5.6 Nachweisgrenze des Antikörpers 59/7 im Immunblot

Um ausschließen zu können, dass die geladene Proteinmenge oder der Proteintypus im Immunblot unter der Nachweisgrenze des monoklonalen *Xenopus* Emerin Antikörpers 59/7 liegt, wurden verschiedene Proteinmengen, die aus unterschiedlichen Quellen (embryonale, somatische und bakteriell aufgereinigte Proteine) stammten, getestet. Isolierte Zellkerne aus späten embryonalen *Blastula*-Stadien (Stadium 8) (siehe 4.3.6) und aus somatischen XIKE-A6 Zellkernen (siehe 4.2.28) sowie das aufgereinigte Fusionsprotein Xemerin1 $\Delta$ TM-6xHis (siehe 4.3.2) wurden in unterschiedlichen Konzentrationen auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (siehe 4.3.13). Das späte *Blastula*-Stadium wurde ausgewählt, da ab diesem Entwicklungszeitpunkt zum ersten Mal die eigenen Gene des Embryos transkribiert und translatiert werden, und der sich entwickelnde Keim nicht mehr auf maternal angelegte Faktoren angewiesen ist.

In isolierten Kernen aus 100 bzw. 200 *Blastula*-Embryonen (Abbildung 5-19, Spur 1 + 2), konnte kein Signal beobachtet werden. Ein Embryo dieses Stadiums hat 7 Zellteilungszyklen vollzogen und besteht aus 128 Zellen, wodurch sich eine geladene Menge von 12.800 bzw. 25.600 Kernen berechnen lässt. Diese aufgetragene Zellkernmenge kann jedoch nicht der

limitierende Faktor sein, da der Antikörper 59/7 in 12.500 und 25.000 somatischen XIKE-A6 Zellkernen (Abbildung 5-19; Spur 3+4) ein Polypeptid mit einer Mobilität von 24 kDa detektierte, welches dem Xemerin entsprach. Es konnten eindeutige Rückschlüsse auf die limitierende Nachweisgrenze des Antikörpers 59/7 gezogen werden, da die Menge von 5 ng des Fusionsprotein Xemerin1 $\Delta$ TM-6xHis nicht für ein Signal im Immunblot ausreichend war (Abbildung 5-19; Spur 5). Erst die zehnfache Menge (50 ng) des rekombinanten Proteins war für die Bindung des Antikörper hinreichend, da nun eine Bande beobachtet werden konnte (Abbildung 5-19; Spur 6).



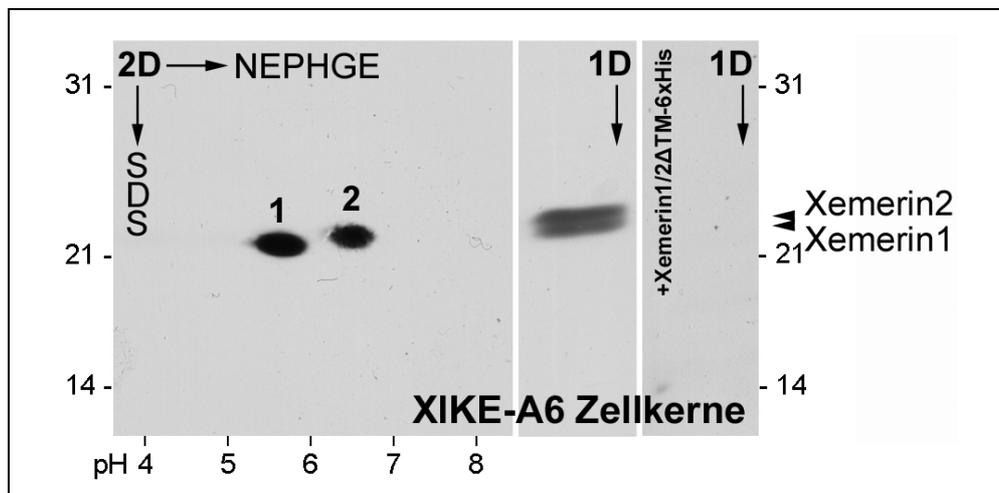
**Abbildung 5-19:** Überprüfung der Nachweisgrenze des monoklonalen Antikörpers 59/7 im Immunblot. Proteine aus 12.800 bzw. 25.600 *Blastula*-Zellkernen, 12.500 bzw. 25.000 aus somatischen XIKE-A6 Kernen sowie 5 bzw. 50 ng des aufgereinigten Fusionsproteins Xemerin1 $\Delta$ TM-6xHis wurden in einem 18%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit dem monoklonale Antikörper 59/7 inkubiert. In den Spuren 3 und 4 war Xemerin mit einer molekularen Masse von 24.000 Da sichtbar, 50 ng des aufgereinigten Xemerin-Konstrukts Xemerin1 $\Delta$ TM-6xHis wurden mit einer Mobilität von 21.000 Da erkannt (Spur 6). Die molekularen Massen der Referenzproteine sind in kDa angegeben.

### 5.7 Identifikation der *Xenopus Emerin*-Formen 1 und 2 durch zweidimensionale Gelelektrophorese NEPHGE

Da nach SDS-PAGE und Immunblot in Zellkernen von somatischen XIKE-A6 Kulturzellen immer ein Polypeptid-Dublett von 24 kDa (Abbildung 5-20, Mitte) beobachtet wurde, haben wir diese Polypeptide durch eine zweidimensionale Nichtgleichgewichts-pH-Gradienten Gelelektrophorese (NEPHGE) in der ersten Dimension nach der Methode von O'Farrell und

Ivarie (O'Farrell and Ivarie, 1979) weiter aufgelöst (siehe 4.3.9). Bei dieser Technik werden die extrahierten Proteine in einem ersten Arbeitsschritt nach ihrer Netto-Eigenladung entlang eines pH-Gradienten in einem Gel aufgetrennt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass Proteine, die annähernd die selbe molekulare Masse aufweisen, in der danach folgenden zweiten Elektrophorese (SDS-PAGE) dennoch klar voneinander getrennt werden.

Zwei eindeutig unterscheidbare Polypeptide aus somatischen XIKE-A6 Zellkernen wurden identifiziert (Abbildung 5-20, linke Seite). Die beiden Polypeptide entsprechen Xemerin1 bzw. Xemerin2. Xemerin1 weist im Vergleich zu Xemerin2 bei der zweidimensionalen Auftrennung einen saueren Charakter und eine mobilere Laufeigenschaft auf. Die Spezifität des Antikörpers 59/7 konnte erneut durch eine Vorinkubation mit jeweils 500 ng der rekombinanten Fusionsproteinen Xemerin1-bzw. - $\Delta$ TM-6xHis belegt werden. Dazu wurden die aufgereinigten Proteine kovalent an CNBr-Sepharose gekoppelt (siehe 4.3.15.2) und mit dem Antikörper 59/7 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Sepharosekügelchen, an denen nun die Antikörper immobilisiert waren sedimentiert, und der Überstand für den Immunblot eingesetzt (Abbildung 5-20, rechte Seite). Diese Vorinkubation blockierte die Bindung an die sich auf der Nitrozellulosemembran befindenden Proteine.

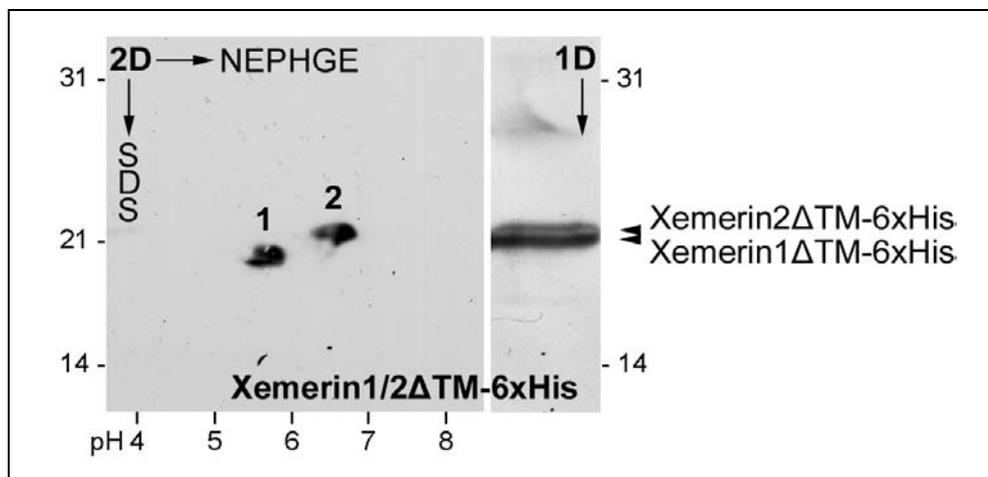


**Abbildung 5-20:** Polypeptide aus  $5 \times 10^6$  Kernen somatischer XIKE-A6 Kulturzellen wurden durch 2D-NEPHGE aufgetrennt auf Nitrozellulose transferiert und mit dem monoklonale Antikörper 59/7 inkubiert (linker Abschnitt). Zwei unterschiedliche Polypeptide (1 und 2) sind zu beobachten. Das Polypeptid 1 ist im Vergleich zum Polypeptid 2 mobiler und saurer. Des Weiteren wurden  $5 \times 10^6$  A6-Zellkerne durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Antikörper 59/7 immungeblottet (Mitte). Ein Polypeptid-Dublett von 24 kDa ist sichtbar (Pfeilspitzen). Nach einer Vorinkubation des 59/7 Antikörpers mit aufgereinigten Fusionsproteinen Xemerin1-bzw. - $\Delta$ TM-6xHis wurde die immunologische Bindung blockiert (rechter Abschnitt).

Um zeigen zu können, dass es sich bei den beiden Polypeptide tatsächlich um Xemerin1 bzw. -2 handelte und um eindeutig definieren zu können, welcher der beiden Spots welcher Xemerinform entsprach, wurden die rekombinanten Proteine Xemerin1-bzw. - $\Delta$ TM-6xHis,

denen das Transmembran-Segment fehlt, ebenfalls mit dem zweidimensionalen NEPHGE-Verfahren analysiert.

Nach der Expression in Bakterienkulturen wurden die Konstrukte mit Hilfe des C-terminal fusionierten Hexahistidin-Peptids aufgereinigt, eine Menge von jeweils 0,1 µg vereint und aufgetrennt (siehe 4.3.2). Im Immunblot konnte jede einzelne Xemerinform sowohl durch zweidimensionale Auftrennung (Abbildung 5-21, linke Seite), als auch durch eindimensionale SDS-PAGE (Abbildung 5-21, rechts), eindeutig voneinander unterschieden werden. Die getrennte Analyse jedes separaten Konstrukts ergab die selben elektrophoretischen Laufeigenschaften (Daten nicht gezeigt). Der isoelektrische Punkt der Fusionsproteine entsprach einem pI-Wert von 5.7 für Xemerin1ΔTM-6xHis bzw. 6.6 für Xemerin2ΔTM-6xHis.



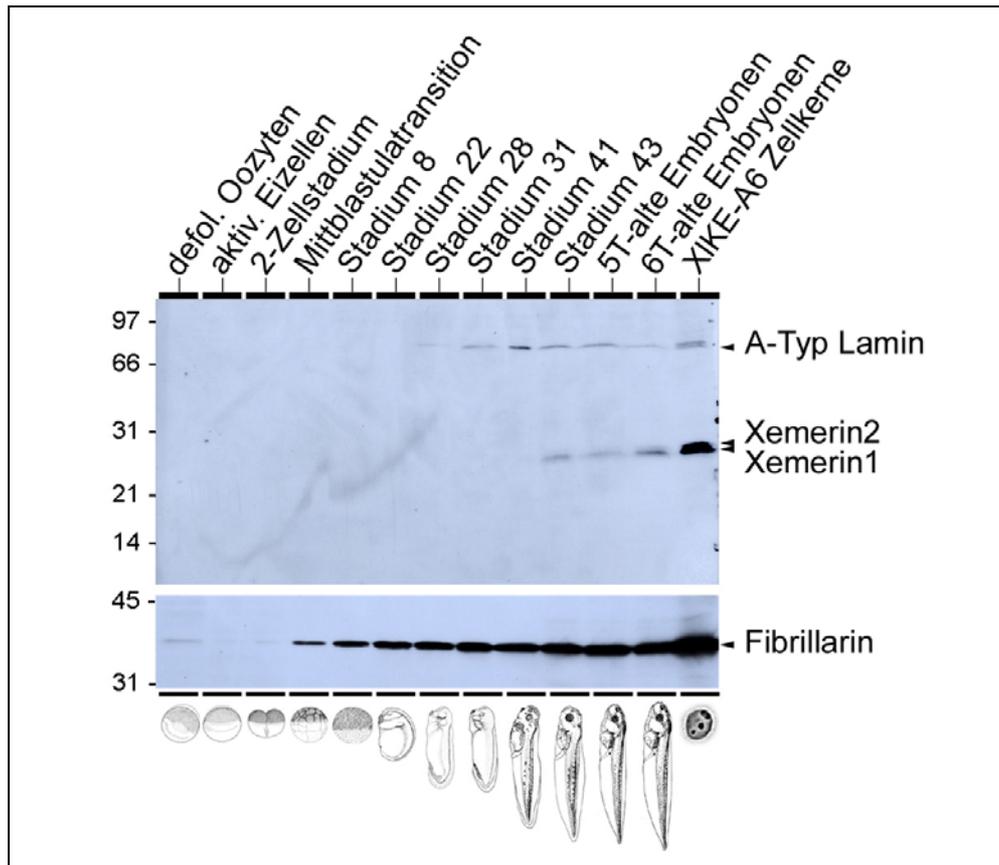
**Abbildung 5-21:** 2D-NEPHGE eines Gemischs der aufgereinigten rekombinanten Fusionsproteine Xemerin1- und Xemerin2ΔTM-6xHis (links) und eindimensionale Auftrennung durch SDS-PAGE (rechts). Nach Inkubation mit dem Antikörper 59/7 ist ein Polypeptid-Dublett mit einer molekularen Masse von  $M_r = 21.000$  Da zu beobachten (Pfeilspitzen). Die Molekularmassen der Referenzproteine sind in kDa angegeben.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass das kleinere Polypeptid mit Xemerin1 mit einem errechneten Molekularmasse von 21.662 Da übereinstimmt. Das zweite Polypeptid entspricht Xemerin2 und hat eine geringfügig höhere molekulare Masse von 21.723 Da.

### 5.8 Expression von *Xenopus Emerin* während der frühen Embryogenese

Da durch Immunblot und in der Immunfluoreszenz-Analysen gezeigt werden konnte, dass Xemerin1 und Xemerin2 in Oozyten (Abbildung 5-18) und in Blastulastadien (Abbildung 5-19) fehlt, allerdings in somatischen XIKE-A6 Kulturzellen, die aus Nierengewebe adulter Frösche abgeleitet sind, nachweisbar waren (Abbildung 5-20), sollte herausgefunden werden, wann das integrale Kernprotein zum ersten Mal während der Entwicklung exprimiert wird. Um diese wichtige Erkenntnis zu erlangen, wurde das Expressionsmuster von Emerin während der frühen Embryogenese von *Xenopus laevis* untersucht. Dazu wurden mit einer

Einphasen-Flüssigphasen-Separation mit (peqGOLD TriFast™) nach Angaben des Herstellers (Fa. Peqlab GmbH, Erlangen) vollständige Proteinhomogenisate aus Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien hergestellt und in einem 18%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Nach anschließender Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper 59/7 konnte im Immunblot ein Polypeptid-Dublett mit der elektrophoretischen Mobilität von Xemerin zum ersten Mal im Stadium 43 (nach Normentafel von (Nieuwkoop and Faber, 1975) beobachtet werden (Abbildung 5-22).



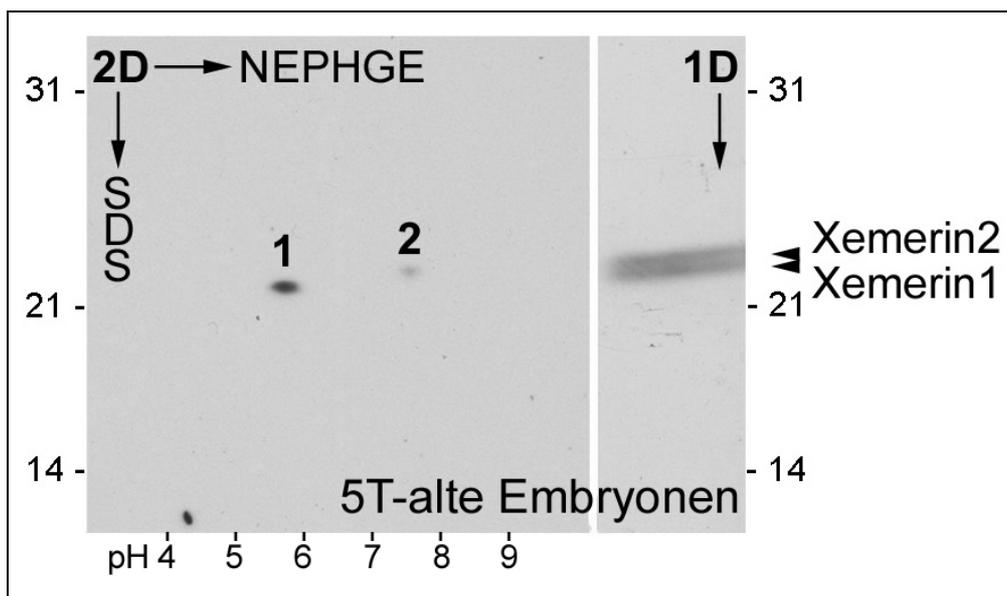
**Abbildung 5-22:** Expressionsmuster von *Xenopus* Emerin während der Embryogenese. Extrahierte Proteine von 5 defollikulierten Oozyten (Spur 1), 5 aktivierten Eizellen (Spur 2), 5 Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien (Spur 3-12) und  $1 \times 10^6$  XIKE-A6-Zellkerne wurden durch SDS-PAGE (18%iges Polyacrylamidgel) aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der Immunblot wurde mit dem monoklonalen Antikörper X94-7, der A-Typ Lamine erkennt, mit dem monoklonalen Antikörper 59/7, welcher an Xemerin bindet und mit dem monoklonalen Antikörper P2G3, der spezifisch mit Fibrillarin reagiert, inkubiert. Das nukleoläre Protein Fibrillarin ist in allen Entwicklungsstadien der Embryogenese zu beobachten. A-Typ Lamine sind vom Stadium 28 an nachweisbar und Xemerin ist zum ersten Mal ab dem Stadium 43 detektierbar. Die Referenzmarker sind in kDa angegeben.

Die Intensität des Bindungssignals nahm mit fortschreitender Entwicklungsstufe zu. Interessant war auch, das Expressionsprofil von A-Typ Lamine während der Embryogenese zu untersuchen, da in vorausgegangenen Studien (Lang et al., 1999; Wolin et al., 1987) gezeigt werden konnte, dass Xlamin A zum ersten Mal in freischwimmenden Larven, die das Entwicklungsstadium 40 erreicht hatten, durch den monoklonalen Antikörper X94-7 erkannt wurde. Im Gegensatz dazu detektierte dieser Antikörper im vorliegenden Immunblot Lamin A

bereits im Stadium 28, da mehr Protein pro Spur aufgetragen wurde. Als interne Kontrolle wurde die Nitrozellulose-Membran nach Entfernen der ersten Immunglobuline mit dem monoklonalen Antikörper P2G3, der spezifisch Fibrillarin erkennt, inkubiert. Es zeigte sich, dass dieses nukleoläre Protein konstitutiv in jedem Entwicklungsstadium exprimiert wird (Abbildung 5-22, unten), wobei die Intensität ab dem *Mittblastulatransition* (Stadium 6.5) deutlich zunimmt.

### 5.9 Analyse der embryonalen Xemerin-Formen 1 und 2 durch zweidimensionale Gelelektrophorese NEPHGE

Die zweidimensionale Auftrennung von Kernproteinen somatischer *Xenopus* Kulturzellen und von aufgereinigten Xemerin-Konstrukten hat gezeigt, dass der Antikörper 59/7 im Immunblot zwei distinkte Polypeptide erkennt. Deswegen sollte in einem Folgeversuch geklärt werden, ob bereits in *Xenopus* Kaulquappen die beiden Protein-Formen Xemerin1 und Xemerin2 nachzuweisen sind.



**Abbildung 5-23:** Zweidimensionale NEPHGE von Proteinen, die aus 5-Tage alten Embryonen extrahiert wurden. Im Immunblot (linke Seite) erkennt der monoklonale Antikörper 59/7 zwei Polypeptide (Spot 1 und 2), die Xemerin1 bzw. -2 entsprechen. In einem parallelen Ansatz wurden die isolierten Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Antikörper 59/7 inkubiert (rechte Seite). Es ist eine Doppelbande mit einer molekularen Masse von 24.000 Da zu sehen (Pfeilspitzen). Die Molekularmassen der Referenzproteine sind (in kDa) angegeben.

Aus fünf 5-Tage alten *Xenopus* Embryonen wurden die gesamten Proteine extrahiert, mit dem zweidimensionalen NEPHGE-Verfahren unter den selben Bedingungen (wie bei der Separation der somatischen Zellkernproben) aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Nach Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper 59/7, konnten im Immunblot ebenfalls zwei distinkte Polypeptide beobachtet werden. Die Spots wurden Xemerin1 und Xemerin2 zugeordnet, wobei das embryonale Xemerin2 – im Gegensatz zum

Xemerin1 – eine basische Mobilität aufweist, die einem pI-Wert von 7.6 (statt 6.6 bei XIKE-A6 Proteinen) entspricht (Abbildung 5-20). Die embryonale Proteinform des Xemerin1 zeigte dagegen dasselbe elektrophoretische Laufverhalten (pI-Wert 5.7) wie bei der Auftrennung von Kernproteinen somatischer Kulturzellen. Die Ursachen, weshalb das embryonale Xemerin2 nicht die gleichen Eigenschaften wie das somatische Xemerin2 aufweist, sind unbekannt und werden noch nachfolgend diskutiert.

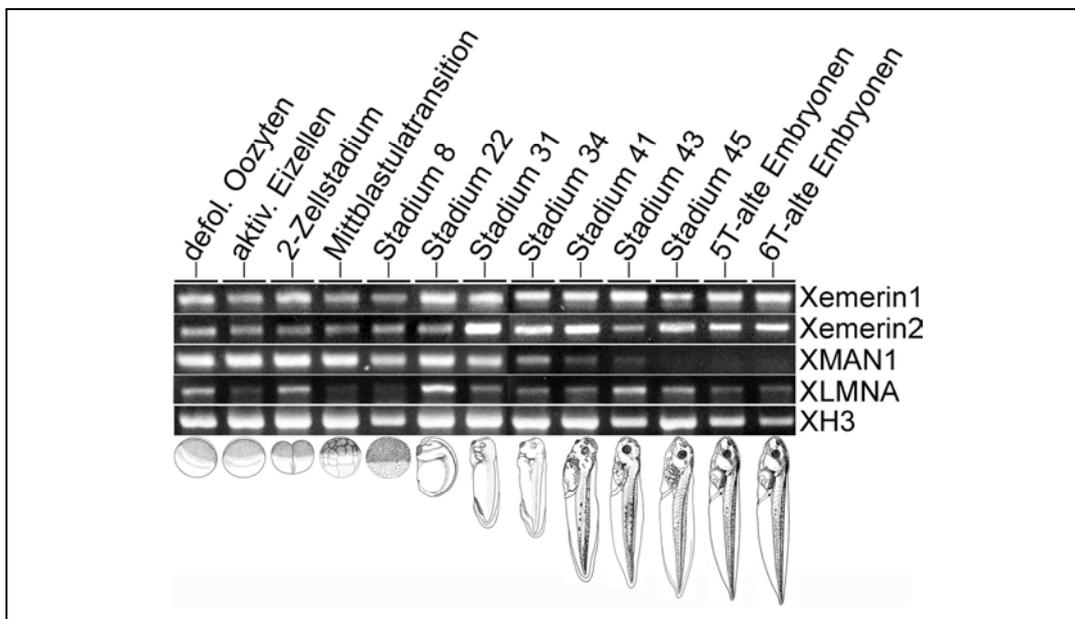
### **5.10 RT-PCR-Analysen weisen Aktivierung der Gentranskription nach**

Auch wenn die Expression von Xemerin1 und -2 nur ab dem Stadium 43 zu beobachten ist, bedeutet dies nicht zwangsläufig, dass die Xemerin-Gene nicht schon in früheren Stadien transkribiert werden. Deswegen wurde ein Northernblot durchgeführt, um die Anwesenheit und die Eigenschaften der Xemerin-mRNA nachzuweisen. Dazu wurden 10 µg Gesamt-RNA, die aus XIKE-A6 Kulturzellen mit peqGOLD TriFast™ extrahiert wurde (siehe 4.2.23), in einem RNA-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 4.2.24) und auf eine Nylonmembran transferiert (siehe 4.2.27). Die Blottingmembran wurde anschließend mit antisense-RNA-Sonden hybridisiert. Die Sonden waren so hergestellt (siehe 4.2.26), dass der Bindungsbereich außerhalb der konservierten LEM-Domäne lag (Nukleotide 129-335 relativ vom Startcodon). Nach der NBT/BCIP-Detektion (siehe 4.2.27.2) der antisense-RNA-Sonde konnte auf dem Blot ein Hybridisierungssignal sowohl für die Xemerin1-mRNA als auch für die Xemerin2-mRNA mit einer Größe von etwa 4.000 Nukleotiden beobachtet werden. Die Northernblot-Analysen wurden mit Gesamt-RNA aus Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien durchgeführt. Es konnte ein recht undeutliches Hybridisierungssignal ab dem Stadium 34 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Da die Ergebnisse der Xemerin-Genaktivierung während der Embryogenese mit den Northernblot-Analysen nicht aussagekräftig waren, wurde die sensitivere Untersuchungsmethode der Reversen Transkriptions-(RT)-PCR angewendet (siehe 4.2.5). Dazu wurde die Gesamt-RNA aus 10 Embryonen durch die peqGOLD TriFast™ Einphasen-Flüssigphasen-Separation isoliert (siehe 4.2.23), mit DNase behandelt und auf Kontamination mit genomischer DNA untersucht. Anschließend wurde der mRNA-Pool mit Hilfe der reversen Transkriptase (RT) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Mit Hilfe der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) wurden anschließend durch Oligonukleotide, welche spezifisch an die CDS der untersuchten Genprodukte binden, Bereiche der cDNA amplifiziert und durch Sequenzierung validiert. Zur Unterscheidung der Genprodukte von Xemerin1 bzw. -2 wurden die Oligonukleotide so gewählt, dass die letzten beiden 3'-Primerbasen an einen DNA-Bereich binden, der sich vom jeweils anderen cDNA-Bereich durch Basenaustausche

unterscheidet. Dadurch resultiert, dass die DNA-Polymerase nur denjenigen Primer elongieren kann, der zu 100% homolog mit der entsprechenden cDNA ist, was durch Überprüfung in vorausgegangenen Test mit der Plasmid-DNA beider Xemerin-EST-Klone bestätigt werden konnte.

Unerwarteterweise wurden die Gene, welche für Xemerin1 bzw. -2 und Xlamin A (XLMNA) kodieren, während der Embryogenese kontinuierlich transkribiert (Abbildung 5-24, Reihe 1,2 + 4), wohingegen die Genaktivität von XMAN1 ab dem Stadium 34 kontinuierlich abnimmt (Abbildung 5-24, Reihe 3). Als Ausgangsprodukt für die Reverse Transkription wurde jedes Mal 1 µg der Gesamt-RNA eingesetzt, wie dies durch den Kontrollansatz mit dem konstitutiv exprimierten Haushaltsgen *Xenopus* Histon 3 (XH3) ersichtlich ist: jedes untersuchte Entwicklungsstadium weist eine gleich bleibende Produktmenge von XH3 auf (Abbildung 5-24, Reihe 5). Es konnte festgestellt werden, dass die Bandenstärken der Xemerin1- und Xemerin2-mRNA ab dem Stadium 22 (Xemerin1) und Stadium 31 (Xemerin2) im Vergleich zu XMAN1 reziprok zunehmen. Dieses Ergebnis konnte auch mit der weniger sensitiven Northernblot-Technik reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).



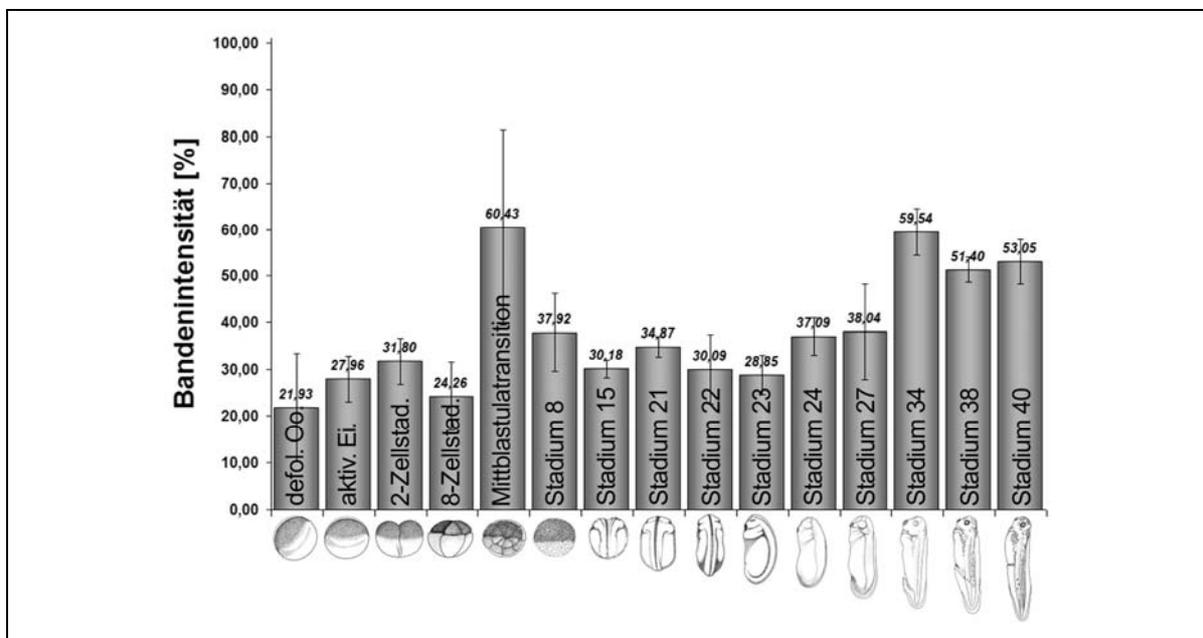
**Abbildung 5-24:** Untersuchung der Transkriptionsaktivität verschiedener Gene während der frühen Embryonalentwicklung von *X. laevis*. Die Transkriptionsprodukte der Xemerin1- und Xemerin2-Gene sind in allen untersuchten Entwicklungsstadien vorhanden. Aus 5 defollikulierten Oozyten (Spur1), aktivierten Eiern (Spur 2) und Embryonen verschiedener Entwicklungsstufen (Spur 3-13) wurde die Gesamt-RNA isoliert und klassische RT-PCR-Analysen durchgeführt. Xemerin1, Xemerin2, A-Typ Lamine (XLMNA) und Histon 3 (XH3) werden konstitutiv transkribiert. Während der Embryogenese wird die Transkription von XMAN1 vom Stadium 34 an herunterreguliert.

### 5.11 Quantifizierung der Bandenintensität der RT-PCR Produkte

Subjektiv wurde wahrgenommen, dass die Signale der RT-PCR-Produkte von Xemerin1 und -2 ab dem Entwicklungsstadium 34 (für Xemerin1) und 31 (für Xemerin2) stärker werden. Um diese Zunahme der Genaktivität objektiv beurteilen zu können, wurde die Bandenintensität der RT-PCR-Reaktionen mit Hilfe einer Scan-Software optisch erfasst und ausgewertet (siehe 4.2.3).

Die RT-PCR-Produkte von drei unabhängig durchgeführten Amplifikationsreaktionen wurden auf verschiedene DNA-Agarosegele aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 4.2.15). Anschließend wurden die DNA-Banden in diesen Gelen mit einem Scanner elektronisch eingelesen und ihre Intensität errechnet. Als Referenzwert diente das PCR-Produkt, das aus der cDNA-Menge somatischer XIKE-A6-Zellen amplifiziert wurde. Die Intensität dieser Bande entsprach 100 Prozent.

Die Auswertung der Xemerin1-Genprodukte ergab, dass die Intensität der DNA-Banden ab dem Stadium 34 um bis zu 36% (vgl. Stadium 27 mit 34) zunahm (Abbildung 5-25). Die Bandenintensität der *Mittblastulatransition* (Stadium 6.5) zeigte ebenfalls eine hohe Intensität, die jedoch starken Schwankungen unterlag. Die Intensität der Xemerin2 RT-PCR-Produkte ergab ebenfalls einen Anstieg ab dem Stadium 34 (Daten nicht gezeigt).

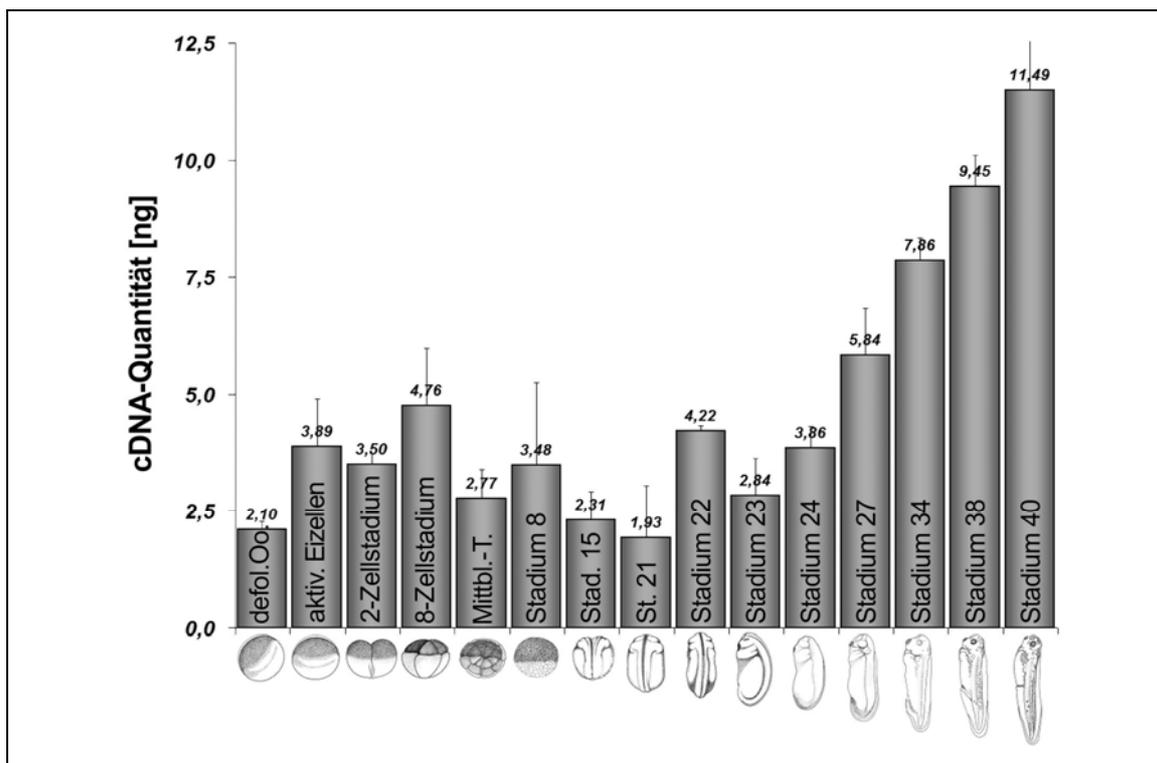


**Abbildung 5-25:** Ermittlung der Signal-Intensität der Xemerin1-RT-PCR-Produkte von drei unabhängigen Amplifikationsreaktionen. Nach der zyklischen Vermehrung wurden die DNA-Abschnitte mit einem DNA-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit einer Scan-Software ausgewertet. Die Bandenintensität der Xemerin1-RT-PCR-Produkte nimmt ab dem Stadium 34 deutlich zu. Auch im *Mittblastulatransition*-(MBT)-Stadium ist eine Zunahme der Signalstärke zu beobachten. Als Referenzwert diente das PCR-Produkt, das aus der cDNA von XIKE-A6-Zellen amplifiziert wurde (Wert entspricht 100%).

## 5.12 Quantifizierung der vorhandenen cDNA-Menge durch quantitative Realtime RT-PCR

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aktivität der Xemerin1- bzw. -2-Gene ab dem Stadium 34 deutlich zunimmt. Mit Hilfe der semiquantitativen Realtime-PCR sollte die Menge der cDNA, welche für die Amplifikationsreaktion eingesetzt wurde, präzisiert werden.

In drei voneinander unabhängigen Ansätzen wurde aus 10 Embryonen verschiedener Entwicklungsstufen RNA isoliert und mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben (siehe 4.2.5). Für die cDNA-Synthese wurden jeweils 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt und die Transkriptionsmenge mit Hilfe der Realtime-RT-PCR quantifiziert (siehe 4.2.4). Die Realtime-RT-PCR-Technik ermöglicht eine exakte Quantifizierung der cDNA-Transkriptmengen, die in die Amplifikationsreaktion eingesetzt wurden, durch die Messung eines in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs (SybrGreenI™). Als Standardgen wurde wiederum das konstitutiv transkribierte *Xenopus* Histon 3 (XH3) verwendet, das als Berechnungsgrundlage der ermittelten Transkriptmengen diente.



**Abbildung 5-26:** Realtime-RT-PCR-Analyse zur Quantifizierung der vorhandenen *Xenopus* Emerin Transkriptmenge. Nach der Reversen Transkription der mRNA wurde die vorhandene cDNA-Menge durch ein in die DNA interkalierendes Fluoreszenzfarbstoff ermittelt. Die Transkriptmenge nimmt ab dem Stadium 27 deutlich zu. Als Berechnungsgrundlage diente das konstitutiv exprimierte *Xenopus* Histon 3 (XH3)-Gen.

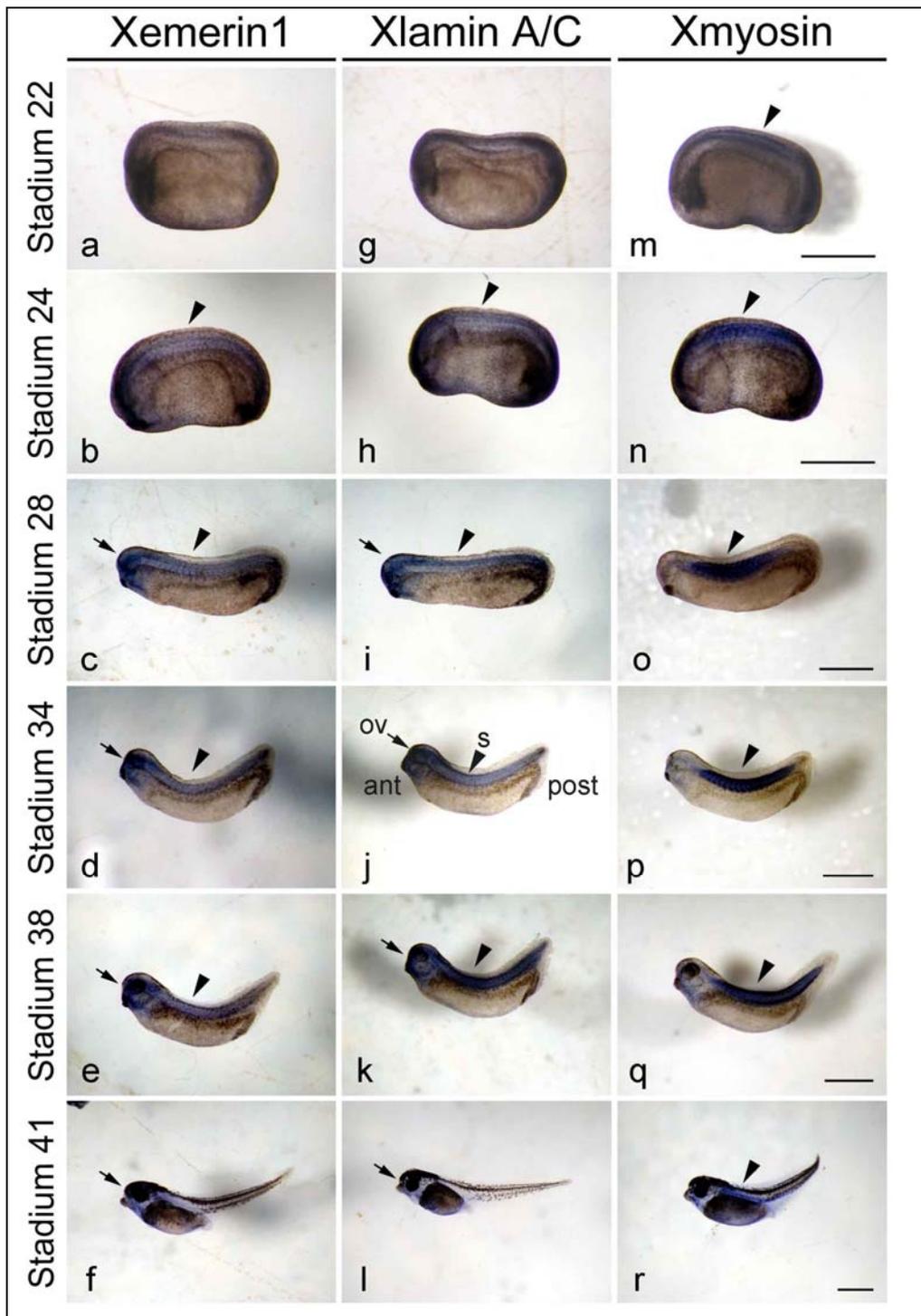
In allen untersuchten Entwicklungsstadien konnten Transkriptionsmengen der *Xenopus* Emerin-cDNA nachgewiesen werden (in Abbildung 5-26 für Xemerin1 gezeigt). Während der

frühen Entwicklungsphase variieren die cDNA-Mengen von 1.93 bis 4.76 ng. Ab dem Stadium 27 war eine signifikante Zunahme der Quantität festzustellen, die sich bis zum Stadium 40 verdoppelte (11.49 ng). Die Transkriptmengen von Xemerin2 nahmen ebenfalls ab dem Stadium 27 eindeutig zu (Daten nicht gezeigt).

### **5.13 Untersuchung der gewebespezifische Expression von Xemerin durch Whole-mount in situ Hybridisierung**

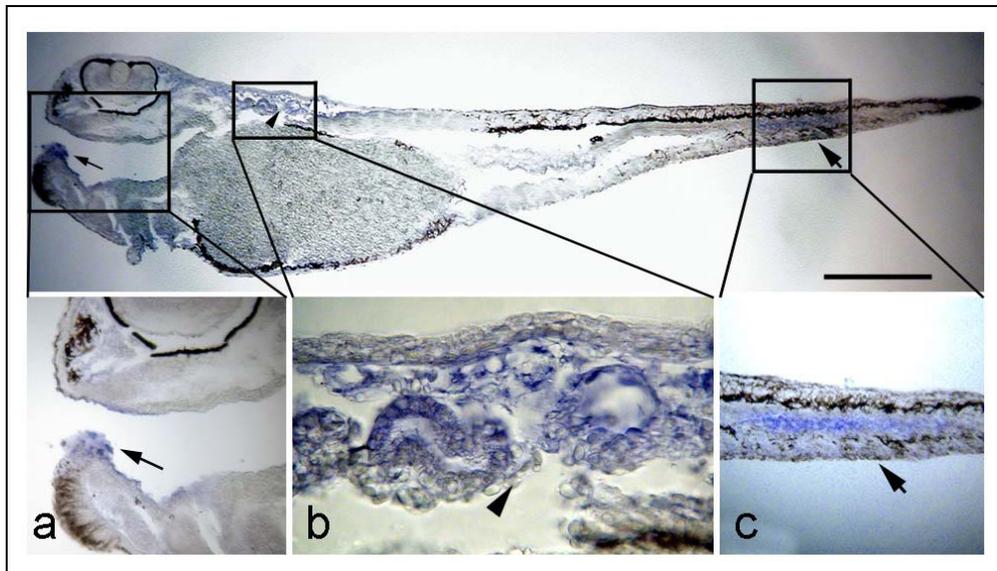
Nachdem bekannt war, dass Xemerin-Transkripte zu jeder Zeit der Embryonalentwicklung nachweisbar sind, sollte gezeigt werden, in welchen Bereichen und Geweben der Embryonen die Aktivierung der Xemerin-Gene stattfindet. Hier bietet die Whole-mount *in situ* Hybridisierung die einzigartige Möglichkeit, die Transkriptionsorte der Xemerin-Gene am intakten Embryo zu untersuchen. Die Whole-mount *in situ* Hybridisierungs-Technik wurde nach einer modifizierten Methode von Harland (Harland, 1991) mit Digoxigenin-markierten Antisense-RNA-Sonden durchgeführt (siehe 4.5.5). Formaldehyd-fixierte *Xenopus* Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien wurden für zwei Stunden bei 55°C mit Xemerin1 und -2, Xlamin A/C und Xmyosin—Antisense-RNA-Sonden hybridisiert. Nach einem Waschschrift wurden die Sonden mit einem Antikörper, der an einer alkalischen Phosphatase gekoppelt war, in den Embryonen durch NBT/BCIP-Farbniederschlag nachgewiesen. Die Embryonen wurden nach der Färbung in Benzylalkohol/Benzylbenzoat (3:1) aufgehellt und unter einem Binokular im Durchlicht mit einer Digitalkamera aufgenommen (siehe 4.5.5.3).

In Entwicklungsstadien, die jünger als Stadium 24 waren, konnte kein Xemerin-Hybridisierungssignal beobachtet werden (Abbildung 5-27, a). Nach diesem Entwicklungszeitpunkt werden die Gene für Xemerin1 (Abbildung 5-27, b-f) und Xemerin2 (Daten nicht gezeigt) vorwiegend in neuralen Bereichen und in Kopfregionen des Embryos exprimiert. Interessanterweise wurde ein ähnliches Expressionsmuster auch für Xlamin A/C (Abbildung 5-27, g-l) beobachtet. Zusätzlich zu der erwarteten Expression von Xmyosin-mRNA in den Somiten konnte im Stadium 41 eine gewisse Menge von mRNA auch im ventralen Mesodermbereich gefunden werden (Abbildung 5-27, r) die vermutlich der Anwesenheit von glatter Muskulatur entspricht.



**Abbildung 5-27:** Whole-mount *in situ* Hybridisierung von *Xenopus* Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien. Die blau-gefärbten Bereiche entsprechen den Hybridisierungssignalen von Xemerin1 (a-f), Xlamin A/C (g-l) und Xmyosin (m-r) –Transkripten in Neurula- (Stadium 22+24) Schwanzknospen-Stadien (28-38) und Tailbud-Stadien (41). Das Xemerin-Gen wird vorwiegend in neuro-ektodermalen und mesodermalen Bereichen des Embryos transkribiert. Abkürzungen: ant, anterior; post, posterior; ov, opt. Vesikel; s, Somiten. Referenzstrich entspricht 1 mm.

### 5.14 Paraffin-Dünnschnitte von Embryonen nach Whole-mount *in situ* Hybridisierung



**Abbildung 5-28:** Longitudinaler Paraffinschnitt eines Embryos im Entwicklungsstadium 38 nach einer Whole-mount *in situ* Hybridisierung mit einer Xemerin1-RNA-Sonde. In den unteren Bildausschnitten sind die blauen Hybridisierungssignale mit einer höheren Vergrößerung in Kopfstrukturen (a), dorsalen Bereichen (b) und im posterioren Notochord (c) zu sehen. Die Referenzstrichlänge entspricht 1,5 Millimetern.

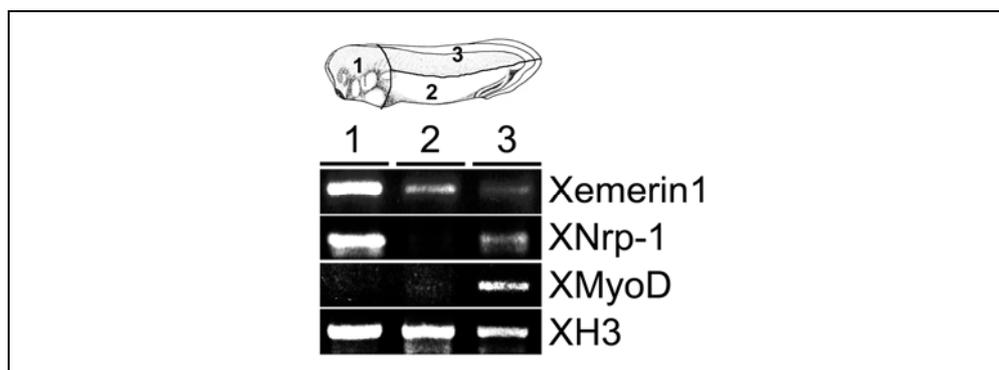
Zur genaueren Lokalisierung des Transkriptionsortes aktiver Xemerin-Gene wurden Paraffindünnschnitte von Embryonen hergestellt, mit denen eine Whole-mount *in situ* Hybridisierung durchgeführt wurde. Nachdem die Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien mit einer Antisense-Xemerin1-RNA-Sonde inkubiert waren und sich die Hybridisierungssignale zeigten, wurden die Formaldehyd-fixierten Embryonen anschließend in flüssiges Paraffin eingebettet. Um die Stellen mit blauem Farbniederschlag in den embryonalen Gewebestrukturen genauer zu lokalisieren, wurden auf einem Schlittenmikrotom longitudinale Semidünnschnitte mit einer Dicke von 15  $\mu\text{m}$  angefertigt. Nach dem Entfernen der Wachsreste wurden die Präparate unter einem inversen Durchlichtmikroskop betrachtet und mit einer Digitalkamera dokumentiert.

Es konnten identische Whole-mount *in situ* Hybridisierungs-Ergebnisse mit Xemerin1- (Abbildung 5-29) oder Xemerin2 (nicht gezeigt)-antisense-RNA-Sonden an longitudinalen Paraffinschnitten von Stadium 38 Embryonen beobachtet werden. Wie bereits gezeigt, werden Xemerin- und Xlamin A/C-mRNAs in Kopfstrukturen und neuro-ektodermalen Geweben des Stadiums 38 Embryos exprimiert (siehe Abbildung 5-27, d+i). Auch nach der Whole-mount *in situ* Hybridisierung und Paraffineinbettung zeigten die Detailaufnahmen der Semidünnschnitte klar definierte Bereiche von starker Expression des Xemerin Gens (Abbildung 5-29, a-c). Wie aus dem Bildausschnitt (a) der Abbildung 5-29 hervorgeht,

konnte im Mandibel ein prominenter Transkriptionsspot beobachtet werden. Ebenso war entlang der gesamten *Chorda dorsalis* eine verstärkte Expression sichtbar, die sowohl in anterioren (Abbildung 5-29; b) als auch in posterioren (Abbildung 5-29; c) Strukturen des spinalen Notochords deutlich zu beobachten war.

### 5.15 Untersuchung der gewebespezifische Expression von Xemerin durch RT-PCR-Analysen

Um die gewebespezifische Aktivierung der Xemerin-Gene, die mit dem Whole-mount *in situ* Hybridisierungsverfahren bestgestellt wurden, mit einer alternativen Versuchsanordnung zu bestätigen, wurden RT-PCR-Experimente durchgeführt. Als Grundlage dieser Reaktionen wurde RNA verwendet, die aus drei unterschiedlichen Bereichen von seziierten Embryonen des Stadiums 28 isoliert wurden (Abbildung 5-29). Wie aus der Schemazeichnung zu entnehmen ist, wurden aus zehn Embryonen Kopf-/Gehirnbereiche, mesodermale Strukturen und das Abdominalsegment präpariert. Anschließend wurde die mRNA aus den jeweiligen Gewebeabschnitten isoliert, durch eine Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und die Aktivität bestimmter Gene durch Verwendung genspezifischer Oligonukleotide nachgewiesen. Die Akkuranz der Gewebepräparation wurde durch die Expression gewebespezifischer Markergene validiert. In neuro-ektodermalen Geweben (Kopf-/Gehirnstrukturen) wurde das pan-neurale exprimierte *NRP1*-Gen verwendet und für den Somiten-Bereich diente der mesodermale Transkriptionsfaktor *Xenopus* MyoD als spezifischer Nachweis. Das konstitutiv exprimierte Haushaltsgen XH3 stellte die Kontrolle der Reversen Transkription dar.



**Abbildung 5-29:** Analyse der gewebespezifischen Expression des *Xenopus* Emerin-Gens durch RT-PCR. Embryonen des Entwicklungsstadiums 28 wurden - wie aus der Skizze zu entnehmen ist - präpariert: Aus Kopf/Gehirn-Strukturen (1; Neuroektoderm), Abdomen (2; Endoderm) und Somiten (3; Mesoderm) wurde die Gesamt-RNA isoliert und für die Analyse der Xemerin1-Expression eingesetzt. Die Expression des pan-neuralen Markers XNrp-1 und des Mesoderm-spezifischen Markers XMyoD wurde verwendet, um die Anreicherung der entsprechenden Gewebe in den embryonalen Fraktionen nachzuweisen. Als Kontrolle ist die Expression des konstitutiv exprimierten Histons 3 (XH3) dargestellt. Im neuro-ektodermalen Bereich (1) ist ein starkes Xemerin1-Signal zu beobachten.

Die höchsten Expressionslevel des *Xenopus* Emerin1-Gens wurden in neuro-ektodermalen Sektionen beobachtet (1; Abbildung 5-29) (korrelierend mit dem Xemerin2-Gen, Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu den Whole-mount *in situ* Hybridisierungs-Ergebnissen, scheint die Transkriptionsaktivität des Xemerin1-Gens in endodermalen Strukturen (2) allerdings höher als im Mesoderm (3) zu sein. Da die RT-PCR eine wesentlich sensitivere Nachweismethode spezifischer mRNA ist, könnte dies eine möglicher Erklärung sein. Eine weitere Ursache dieser Beobachtung könnte auch eine ungenügende Zugänglichkeit der antisense-Sonden in das endodermale Gewebe (2) sein, da dort große Dottermengen eingelagert sind, welche das Hybridisierungssignal unterdrückt haben könnten. Außerdem sei noch angemerkt, dass das entsprechende Signal des Histon 3-Gens (Abbildung 5-29, Spur 3) schwächer ist als in Spur 1 und 2, was darauf hindeutet, dass in der Reversen Transkription eine geringere Menge an cDNA umgeschrieben wurde.

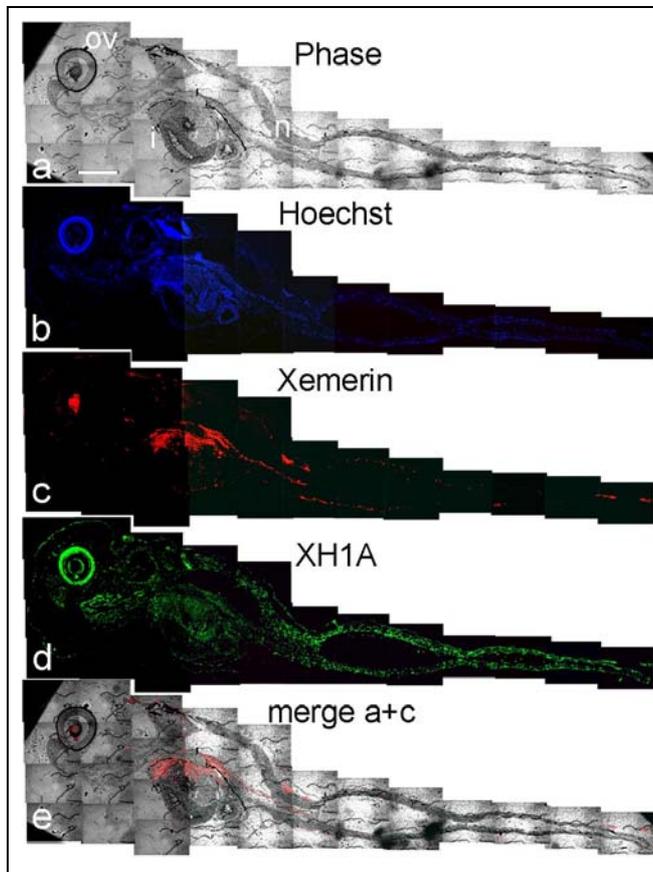
### **5.16 Indirekte Immunfluoreszenz von Paraffin-Dünnschnitten**

Die Ergebnisse der Whole-mount *in situ* Hybridisierungen und der gewebe-spezifischen RT-PCR haben gezeigt, dass Xemerin-Gene vorwiegend in neuro-ektodermalen und zu einem geringeren Teil in mesodermalen Gewebebereichen von Embryonen transkribiert werden. Da durch Whole-mount Immunlokalisations-Versuche leider keine aussagekräftigen Resultate erzielt werden konnten, sollte daher mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz-Mikroskopie von embryonalen Gewebedünnschnitten eruiert werden, ob das *Xenopus* Emerin auch in den korrelierenden Regionen translatiert wird.

Es wurden verschiedene Fixierungs- sowie Einbettungs-Methoden getestet, darunter die Paraformaldehyd-Fixierung sowie die Polyethylenglykol-Einbettung, welche jedoch nicht zum Ziel führten. Erst die alkoholische Gefriersubstitutions-Technik und Paraffineinbettung ließ den monoklonale Antikörper 59/7 in den Gewebedünnschnitten an Xemerin binden. Die ersten Bindungssignale waren in Embryonen ab dem Entwicklungsstadium 41 in einem kleinen distinkten neuro-ektodermalen Bereich zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

Aussagekräftigere Signale wurden erst in den nachfolgenden Entwicklungsstadien beobachtet. Aus diesem Grund werden die Ergebnisse älterer Embryonen präsentiert. In einem 5- $\mu$ m Longitudinalschnitt eines Embryos, welcher das Entwicklungsstadium 43 erreicht hatte, konnte durch Aneinanderfügen von 35 Einzelbildern beobachtet werden, dass der Xemerin Antikörper 59/7 die Region des optischen Vesikels, neuro-ektodermale Bereiche einschließlich des Notochords und den intestinalen Eingeweidesacks anfärben konnte

(Abbildung 5-30; c). Als interne Kontrolle wurde der polyklonale Antikörper rH1A verwendet (Hock et al., 1993), der spezifisch an das ubiquitär exprimierte *Xenopus* Histon 1A bindet (Abbildung 5-30; d).



**Abbildung 5-30:**

Paraffinschnitte eines 5 Tage alten Embryos (Stadium 45), der einer Gefriersubstitution unterzogen wurde. Nach der Deparaffinierung wurde der Dünnschnitt mit dem monoklonalen Antikörper 59/7, um Xemerin (c) oder mit dem polyklonalen Antikörper rH1A, der spezifisch Histon 1A erkennt (d), inkubiert. Die Gegenfärbung mit Hoechst 33258 ist in (b) abgebildet. Die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen sind in (a) dargestellt. (e) zeigt die Übereinanderlagerung von (a+c).

Abkürzungen: ov, optischer Vesikel; i, intestinaler Eingeweidsack; n, Notochord.

Der Referenzstrich entspricht 150 µm.

Darüber hinaus wurden auch indirekte Immunfluoreszenzanalysen an Längs- und Querschnitten von 5- und 6-Tage alten Embryonen (Stadiums 45+48) nach Gefriersubstitution und Paraffineinbettung durchgeführt. Auch in den älteren Stadien färbte der Antikörper 59/7 den optischen Vesikel, Neuroektoderm und Notochord sowie intestinales Gewebe an, wobei die Signalintensität und die Signalfäche größer wurde (Daten nicht gezeigt). Dies steht mit den Ergebnissen des Immunblots im Einklang (siehe Abbildung 5-22), wo auch die Bindungsintensität mit fortschreitender Entwicklung zunahm. Es darf sicherlich angenommen werden, dass diese Beobachtung der steigenden Xemerin-Proteinmenge beim Fortschreiten der Embryogenese von *Xenopus laevis* widerspiegelt.

### **5.17 Untersuchung von *Xenopus laevis* MAN1 (XMAN1)**

Die integralen Membranproteine Emerin und MAN1 weisen gemeinsame Funktionen auf: Beide Proteine gehören zur Familie der LEM-Proteine, welche als gemeinsames Charakteristikum das etwa 40 Aminosäurereste umfassende aminoternale Sequenzmotiv aufweisen wodurch die Affinität an ein kleines Chromatin-assoziiertes Protein, den so genannten ‚Barrier-to-Autointegration Faktor‘ (BAF), vermittelt wird (Shimi et al., 2004; Shumaker et al., 2001). Des Weiteren sind sowohl Emerin (Jacque and Stevenson, 2006) als auch MAN1 (Caputo et al., 2006) vermutlich in der Lage, direkt an DNA zu binden. Neben diesen gemeinsamen Fähigkeiten konnten Liu und Mitarbeiter (Liu et al., 2003) zeigen, dass Ce-Emerin und Ce-MAN1 in der Embryonalentwicklung des Nematoden *C.elegans* überlappende Funktionen ausüben. In dieser Arbeit (Gareiss et al., 2005) und durch eine japanische Arbeitsgruppe (Osada et al., 2003) konnte durch Whole-mount *in situ* Hybridisierungen gezeigt werden, dass sich auch die Transkriptionsmuster des Xemerin- bzw. XMAN1-Gens während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* decken, indem überlappende Hybridisierungssignale in neuro-ektodermale Bereichen beobachtet wurden. Interessanterweise konnten Mansharamani und Wilson (Mansharamani and Wilson, 2005) durch drei unabhängige Versuchsanordnungen nachweisen, dass die humane Form von Emerin *in vitro* direkt an den Aminoterminus von MAN1 bindet. Diese frappierenden funktionalen Ähnlichkeiten sowie die Tatsache, dass sich die Aktivität der Xemerin-Gene reziprok zum Expressionsprofil des XMAN1-Gens verhält, führten dazu, dass auch das integrale Protein der inneren Kernmembran XMAN1 in dieser Arbeit im Modellsystem *Xenopus laevis* näher untersucht werden sollte.

#### **5.17.1 Suche nach dem homologen Protein durch BLAST-Suche in der EST-Datenbank**

Ausgehend von der Sequenz des murinen (XM\_354566) und humanen MAN1 (NM\_014319) wurde eine EST-(,Expressed Sequence Tags‘)-Datenbank von *Xenopus laevis* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) nach homologen Proteinen durchsucht. Es konnte eine EST-Sequenzen identifiziert werden, die eine deutliche Übereinstimmung mit den humanen und murinen MAN1-Formen Emerins aufwies (Accession-Nummer: BG810685). Da diese Sequenzen lediglich einen Teil des offenen Leserasters repräsentierten und nicht die volle Länge des kodierenden Bereichs umfassten, wurde der entsprechende EST-Klon (IMAGp998K189335q3) ausgesucht und für eine umfassende Sequenzierung über das RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Heidelberg) bezogen. Die cDNA wurde aus gepoolten Embryonen des afrikanischen Krallenfroschs, die das Entwicklungs-

stadium 19-26 erreicht hatten, generiert und war in den Expressionsvektor pCS2+ (Turner and Weintraub, 1994) inseriert.

### 5.17.2 Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von *Xenopus* MAN1

1	ggatcccatc gattcgaatt caaggcctct cgagcctcta gaactatagt
51	gagtcgtatt acgtagatcc agacatgata agatacattg atgagtttgg
101	acaaaccaca actagaatgc agtgaaaaaa tgagaggatc gcatcaccat
	M A A A Q L T D .
151	caccatcaca cggatctagt ggtcaaaaATG GCGGCCGCTC AGTTAACGGA
	. E E L F S E L K R S G I M P G P V .
201	TGAGGAGCTC TTTTCCGAGT TAAAGCGCTC GGGGATAATG CCCGGCCCTG
	. . T D S T R P V Y L K K L K K L R
251	TTACAGACAG CACACGGCCG GTTTACCTAA AGAAACTGAA GAAGTTGAGG
	E E Q R L R H G K V R V I T N N N .
301	GAAGAGCAAA GACTTCGGCA CGGGAAAAGT CCGGTAATTA CGAACAACAA
	. T V A A P S E S E G I L K S G G D .
351	CACAGTGGCG GCGCCTTCAG AAAGTGAGGG AATTCTCAAG AGCGGTGGGG
	. . V T H K R Y S R Q S L A R E A G
401	ACGTGACGCA TAAGAGATAC AGCCGCCAGA GCCTAGCGAG GGAAGCAGGG
	K P S P I L G F S S D E S D V D A .
451	AAACCTCCC CGATCCTTGG CTTCAGCTCC GATGAGTCAG ATGTAGACGC
	. G L G A H G S R R S R T N T P Q P .
501	AGGGCTGGGA GCGCACGGGA GTCGCAGGAG CAGAATAAC ACACCCACG
	. . E R K S P V Q H Q P G T A D A N
551	CCGAGAGGAA ATCGCCGGTG CAGCATCAGC CGGGTACTGC AGACGCCAAT
	A D R R K V P G W W E M R R P R G .
601	GCTGATAGGC GGAAGTGCC GGGTTGGTGG GAAATGCGAA GGCCGCGGGG
	. D S E E D D D D E E E G T E E A S .
651	GGACAGTGAA GAAGACGACG ATGATGAAGA GGAAGGAACG GAAGAGGCGT
	. . N C R T M N G S R H S Y C R D Y
701	CTAATTGTCG GACTATGAAT GGCAGCCGGC ACTCTTACTG CAGGGATTAC
	S D T D E E E Q L G Q D E Q A S R .
751	TCGGACACTG ATGAGGAGGA GCAGTTGGGG CAGGACGAGC AAGCGAGCCG
	. R S R R G S S K Q A K E Q S L D R .
801	CCGGAGTAGG CGGGGTCTGA GCAAACAGGC CAAGGAGCAG AGTCTGGACA
	. . D E L A A W P G W S R E V A G V
851	GGGATGAGTT GGCCGCTTGG CCAGGCTGGT CGAGGGAGGT GGCTGGTGTG
	S H R H R G A A R K S H T A A D T .
901	TCTCATCGAC ATCGCGGAGC CGCCAGGAAG TCGCACACTG CGGCAGACAC
	. D G A G N L K R K S N N H L E S G .
951	TGACGGGGCG GGAATTTGA AACGCAAAAG CAACAATCAC CTGGAGAGCG
	. . Y N K D P P R V Y F P S N S L P
1001	GCTACAACAA GGATCCCCC AGGGTCTATT TTCCCTCCAA CAGCCTCCCC
	P R M P Q S N H T A A P N H T K Y .
1051	CCACGGATGC CTCAGTCCAA CCACACAGCA GCCCCCAACC ACACGAAATA
	. S H Y H Y P D S K R Q H H K V A E .
1101	CTCGCACTAT CACTACCCGG ACTCCAAGAG GCAACATCAT AAGTCCGAG
	. . P E E A L L Q Q F K R D E V S A
1151	AGCCCGAGGA GGCGCTCCTC CAGCAATTCA AGAGGGACGA GGTGTCTGCT
	A G R F S A H Y L S M F L L T A A .
1201	GCAGGGAGAT TCAGTGCCCA TTACCTCTCC ATGTTCTCTC TCACAGCTGC
	. C L F F L L L G L T Y L R M R G T .
1251	CTGCCTCTTT TTCTTGCTGC TAGGGCTCAC CTACCTGAGG ATGAGAGGCA
	. . S L P A N E N L T S T E D L N V
1301	CCAGTCTTCC TGCCAATGAA AACTTAACAA GTACTGAGGA CCTTAATGTT
	D S K K N L M N T L Q K L H E K L .
1351	GATAGTAAGA AAAACCTGAT GAATACGTTA CAGAACTGC ACGAGAAACT
	. S K T A G D Y I C G N T D H R N I .
1401	ATCAAAAACA GCAGGTGATT ACATATGTGG GAACACTGAT CACCGTAATA
	. . S V Q E A K Q Y L R T L G Q E Y
1451	TATCTGTCCA AGAAGCAAAG CAGTATTTAA GGACATTAGG TCAGGAATAC
	E N E F N N T L A W I L E H S A T .
1501	GAAAATGAAT TTAATAACAC ATTGGCATGG ATTTTAGAAC ACTCTGCCAC
	. R D I G I K C V S D P G S I L N I .
1551	AAGAGATATT GGTATCAAGT GCGTTTCTGA TCCTGGTTCC ATTTAAACA
	. . T S V K Y L E S T L P K M S F M
1601	TAACCAAGTGT GAAATACCTA GAGTCGACTC TGCCCAAGAT GTCATTTATG
	C R I K R A V I T V A H R S S I L .
1651	TGCCGAATCA AACGTGCCGT TACTACTGTA GCACACAGGT CATCCATTCT
	. L V G V G V L F G V W R Y I K Y R .
1701	GCTTGTGGA GTTGGTGTGC TCTTCGGTGT ATGGCGATAC ATAAAATATC

1751	.. W A K E E E E T K Q M Y D M V V GTTGGGCAAA GGAAGAGGAA GAAACAAAGC AAATGTATGA CATGGTTGTA
1801	K I I D V L K S H N E A C Q E N K . AAAATTATAG ATGTCTTAAA AAGTCACAAT GAGGCTTGTC AAGAAAATAA
1851	. G L E P Y T P I P H V R D S L I L . AGGCTTGAG CCTTATACAC CAATCCCTCA TGTGCGTGAT TCTTTAATAC
1901	.. P Q D R K K M K K V W D R A V E TGCCTCAAGA CAGGAAGAAA ATGAAGAAAG TTTGGGACCG GGCAGTGGAA
1951	F L D A N E S R V R T E T Q K I G . TTTCTGGATG CCAATGAATC TAGAGTACGC ACAGAAACTC AGAAAATAGG
2001	. G A D F Q V W K W I Q P S S T C D . TGGAGCAGAC TTCCAGGTGT GGAAATGGAT TCAGCCATCT TCAACATGTG
2051	.. K I S V M P S K V W Q G Q A F H ATAAAATTC AGTCATGCCT TCTAAAGTTT GGCAAGGACA AGCTTTTCAT
2101	L D R R N S P P N S L T P C L K I . TTGGATAGAA GAAATTCTCC TCCAAATAGT CTGACTCCCT GTTTAAAAAT
2151	. R N M F D P V M E I G D H W D L A . ACGTAACATG TTTGATCCAG TTATGGAAAT TGGAGATCAT TGGGACTTGG
2201	.. I Q E A I L E K C S D N E G I V CAATTCAAGA AGCAATATTA GAGAAATGTA GTGATAATGA GGGGATTGTT
2251	H I A V D K N S R E G C V Y V K C . CACATTGCTG TTGATAAGAA TTCACGTGAG GGTTCGCTAT ATGTGAAATG
2301	. L S P E F A I W K A F K A L H G S W . TTTATCTCCA GAATTGTCAG GAAAGGCATT TAAAGCTCTG CACGGCTCAT
2351	.. F D G K L V T V K Y L R L D R Y GGTTTGATGG AAAGCTGGTG ACTGTGAAAT ACCTGCGATT AGATCGATAT
2401	H H R F P Q A L T C S T P L K P S . CATCATCGCT TCCCTCAGGC CCTTACATGC AGCACTCCTT TAAAGCCTTC
2451	. N T H M N S L L H L N L R T G T S . AAACACACAC ATGAACTCAC TGTTACACTT AAATCTTCGG ACTGGCACTT
2501	.. N S Q S C C * CAAATCTCA GTCATGCTGT <u>TGA</u> aatgctt tatttgtgaa <u>atttgtgatg</u>
2551	ctattgcttt atttgaacc attataagct gcaataaaca agttaacaac
2601	aacaattgca ttcattttat gtttcaggtt cagggggagg tgtgggagg
2651	<u>tttttaattc</u> gcggccgcgg cgccaatgca ttgggccggtg tattc

**Abbildung 5-31:** Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des *Xenopus laevis* MAN1 (BG810685). Der kodierende Bereich ist in Großbuchstaben, der 3'- bzw. 5'-UTR (nicht translatierte Bereiche) ist in Kleinbuchstaben dargestellt. Das Start- bzw. Stopp-Codon ist fett gedruckt und unterstrichen. Die LEM-Domäne ist rot, die Transmembran-Segmente sind blau gefärbt. Violett ist das RNA-Erkennungsmotiv (RRM) gekennzeichnet. Das Polyadenylierungssignal ist hellgrau, die snRNP-Bindungsstellen sind dunkelgrau markiert.

### 5.17.3 Sequenzanalysen der Nukleotid- sowie der Aminosäuresequenzen

Durch Auswertung der Sequenzen der beiden EST-Klone konnte sowohl die komplette kodierende Sequenz (CDS) als auch die vorhandenen 5'- und 3'-untranslatierten Bereiche (UTR) ermittelt werden. Die Länge der inserierten XMAN1-cDNA beträgt 2.695 nt (Abbildung 5-31). Der kodierende Sequenzbereich (CDS) umfasst die Nukleotide 178-2.523.

Mit Hilfe der RNA-Analyse-Software des Instituts für Bioinformatik (<http://rnaanalyzer.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>) wurden die UTRs nach auffälligen Motiven durchsucht. Dabei konnten in der 3'-UTR von XMAN1 zwei putative snRNP-Bindungsstellen sowie ein Polyadenylierungssignal (AATAAA) identifiziert werden. Weitere mögliche regulative RNA-Sequenzen konnten nicht auffindig gemacht werden.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist in der Abbildung 5-31 gezeigt, die ein Polypeptid mit einer Länge von 781 Resten und einer theoretischen molekularen Masse von 88.466 Da und einem isoelektrischen Punkt von 8.84 ([http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)) vorausagt. Mit Hilfe von Scan-Programmen ([http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) und [http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/cgi-bin/sosui.cgi?/sosui\\_submit.html](http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/cgi-bin/sosui.cgi?/sosui_submit.html)) konnte in den Aminosäuresequenzen vier Motivbereiche identifiziert werden, die charakteristisch für MAN1 sind (Lin et al., 2000): eine LEM-Domäne, zwei Transmembran-Segmente und ein RNA-Erkennungsmotiv (RRM). Das LEM-Motiv ist am Aminoterminus lokalisiert (Abbildung 5-32) und stellt –wie bereits erwähnt– einen evolutionär konservierten Bereich dar, der dem Lamina-assoziierten Protein 2 (LAP2), Emerin und MAN1 gemeinsam ist. Von den Mitgliedern der LEM-Proteinfamilie ist bekannt, dass sie an das Chromatin-assoziierte Protein ‚Barrier-to-Autointegration Factor‘ (BAF) binden können (Shumaker et al., 2001).

In der Tabelle 5-4 werden die Übereinstimmungen der LEM-Domänen in MAN1-Proteinen verschiedener Spezies miteinander verglichen. Die LEM-Bereiche des *X.laevis*-MAN1 (XMAN1) und des *X.tropicalis*-MAN1 weisen eine fast vollständige Übereinstimmung von 95 Prozent auf. XMAN1 stimmt mit der LEM-Domäne des menschlichen MAN1 zu 76%, mit der murinen MAN1-LEM-Domäne zu 37%, und mit dem konservierten Bereich im MAN1-Protein der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zu 37% überein. Besonders interessant ist die hohe Übereinstimmung von 86% mit dem LEM-Motiv des Zebrafischs-MAN1, *Danio rerio*.

**Tabelle 5-4:** Vergleich der übereinstimmenden Aminosäuren in der konservierten LEM-Domäne in MAN1 bei verschiedenen Spezies. Angaben in Prozent.

LEM-Domäne	% Identität mit:					
	<i>X.laevis</i>	<i>X.tropicalis</i>	<i>H.sapiens</i>	<i>M.musculus</i>	<i>D.rerio</i>	<i>D.melanogaster</i>
<i>X.laevis</i>		95	76	37	86	37
<i>X.tropicalis</i>	95		76	37	86	37
<i>H.sapiens</i>	76	76		53	75	38
<i>M.musculus</i>	37	37	53		40	28
<i>D.rerio</i>	86	86	75	40		38
<i>D.melanogaster</i>	37	37	38	28	38	

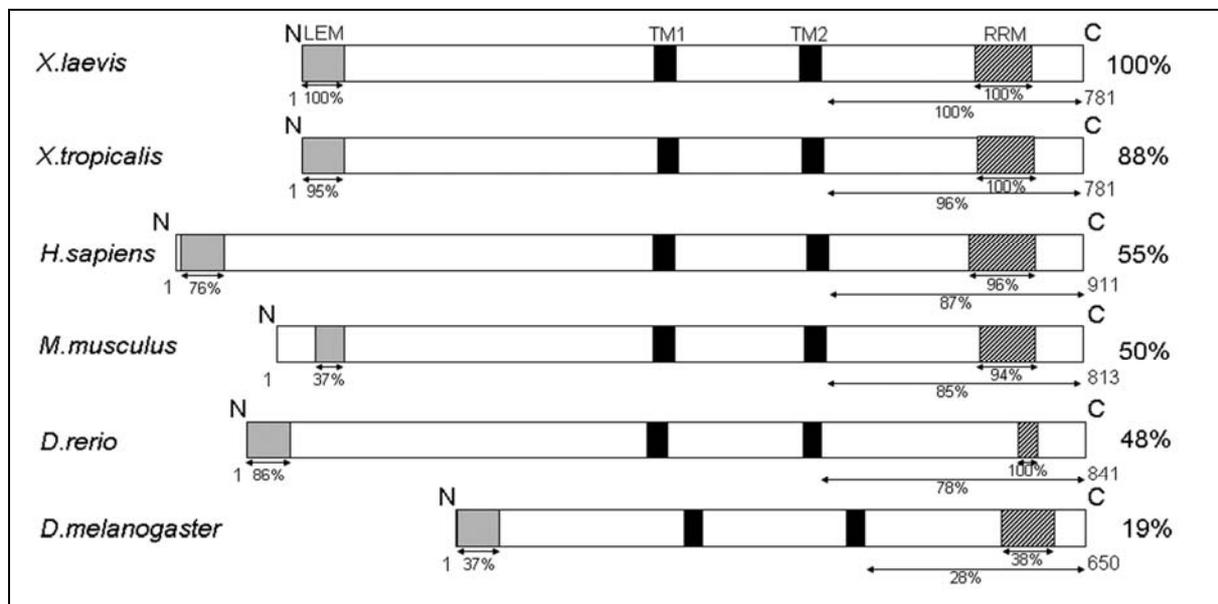
Neben der LEM-Domäne konnten die Analyseprogramme für das *Xenopus* MAN1-Protein auch zwei stark hydrophobe Bereiche am Carboxyterminus (TM1: N348-C369 und TM2: N498-C520) sowie ein RNA-Erkennungsmotiv ‚RNA-Recognition-Motif‘ (RRM) identifizieren (N677-C733). Der RRM-Bereich von XMAN1 ist besonders stark konserviert, da eine Identität von 100% (*X.tropicalis* und *D.rerio*) sowie 96% (*H.sapiens*) und 94% (*M.musculus*) festgestellt werden konnte. *D.melanogaster* weist immerhin noch eine 38%ige Übereinstimmung in diesem Proteinabschnitt auf.

### 5.17.3.1 Vergleichende Untersuchungen von MAN1-Proteinen verschiedener Spezies

Weiterführende BLAST-Vergleiche zeigten, dass die volle Länge von *Xenopus* MAN1 zu 88%, 55%, 50%, 48% und 19% identisch mit MAN1-Homologen des nahe amphibischen Verwandten *Xenopus tropicalis*, des Menschen *Homo sapiens*, der Maus *Mus musculus*, des Zebrafischs *Danio rerio* und der Fruchtfliege *Caenorhabditis elegans* ist (vgl. Tabelle 5-5). Im carboxyterminalen Bereich konnte ab dem zweiten Transmembran-Segment (TM2) eine Identität von 96% (*X.tropicalis*), 87% (Mensch), 85% (Maus), 78% (Zebrafisch) und 19% bei der wirbellosen Fruchtfliege festgestellt werden (Abbildung 5-32).

**Tabelle 5-5:** Vergleich der identischen Aminosäuren in der MAN1-Gesamtsequenz verschiedener Spezies. Übereinstimmungen sind in Prozent angegeben.

MAN1	% Identität mit:					
	<i>X.laevis</i>	<i>X.tropicalis</i>	<i>H.sapiens</i>	<i>M.musculus</i>	<i>D.rerio</i>	<i>D.melanogaster</i>
<i>X.laevis</i>		88	55	50	48	19
<i>X.tropicalis</i>	88		55	49	49	18
<i>H.sapiens</i>	55	55		81	49	20
<i>M.musculus</i>	50	49			47	20
<i>D.rerio</i>	48	49	49	47		18
<i>D.melanogaster</i>	19	18	20	20	18	



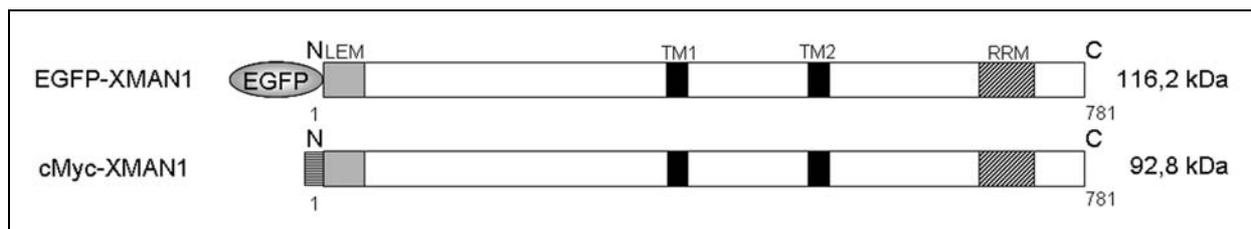
**Abbildung 5-32:** Schematische Darstellung der MAN1-Proteine verschiedener Spezies: Die Aminosäuresequenz des *Xenopus laevis* MAN1 *X.laevis*-1 [AB100267] ist mit den entsprechenden Homologen von *Xenopus tropicalis* [CT010552], der gemeinen Maus *Mus musculus* [XM\_354566], des Menschen *Homo sapiens* [NM\_014319], des Zebrafischs *Danio rerio* [XM\_681690] und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* [CG3167] verglichen. Die Übereinstimmungen in den jeweiligen Sequenzen sind in Prozent angegeben. Die evolutionär konservierte LEM-Domäne ist grau, die Transmembran-Segmente (TM1 und -2) schwarz, und das RNA-Erkennungsmotiv (RRM) schraffiert hinterlegt.

### 5.18 Untersuchung der zellulären Lokalisation von XMAN1 durch EGFP- und Myc-Fusionskonstrukten

Vor sechs Jahren wurde das humane MAN1 zum ersten Mal als integrales Membranprotein der inneren Kernmembran, das ubiquitär exprimiert wird, durch Autoimmun-Antikörper eines Patienten mit Kollagen-Gefäßerkrankung identifiziert (Lin et al., 2000). Homologe Proteine konnten sowohl in Vertebraten als auch bei den Wirbellosen *C.elegans* und *Drosophila melanogaster* identifiziert werden (Lee et al., 2000; Osada et al., 2003; Raju et al., 2003; Wagner et al., 2006). MAN1 weist zwei Transmembran-Segmente auf, wodurch sowohl der Aminoterminus als auch der carboxyterminale Abschnitt des Proteins ins Nukleoplasma ragt. Durch Sequenzanalysen der Aminosäureabfolge konnte im MAN1-Protein von *Xenopus laevis* ebenfalls zwei Membran-durchspannende Domäne identifiziert werden.

Um die Verteilung von *Xenopus* MAN1 (XMAN1) in der Zelle zu charakterisieren, wurde die komplette Länge der kodierenden XMAN1-cDNA (-10 bis 2.355 relativ vom Startcodon) mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und in den eukaryontischen Expressionsvektor pEGFP-C1 über die Restriktionsschnittstellen *BglII* / *BglII* in die multiple Klonierungsstelle kloniert (siehe Abbildung 5-33). Durch dieses pEGFP-Vektorsystem wird an den Aminoterminus des zu untersuchenden Proteins ein verstärkt grün-fluoreszierendes Polypeptid („enhanced“-GFP) angehängt und nach der Transfektion in Zellkulturzellen als Fusionsprotein exprimiert wird.

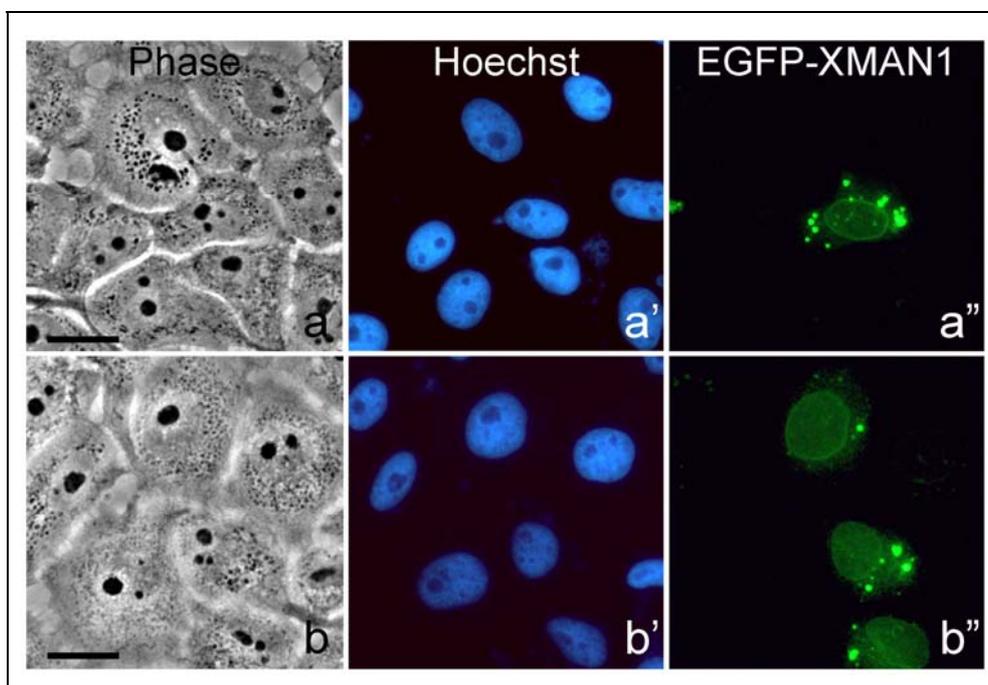
In einem parallelen Klonierungsansatz wurden die vollständige CDS von XMAN1 (-9 bis 2.355 relativ vom Startcodon) ebenfalls mit einer PCR zyklisch vermehrt, jeweils eine *BglII*-Schnittstelle an das 3'- und 5'-Ende des Produkt angehängt und in die MCS des eukaryontischen Expressionsvektors pCMV-Myc inseriert (siehe Abbildung 5-33). Dieses Plasmidkonstrukt enthält die kodierende Sequenz des und stark immunreaktiven c-Myc-Epitops, das – nach Transfektion in eukaryontische Kulturzellen – aminoterminal angehängt wird. Der bestehende Vorteil dieses Systems ist, dass die chimären c-Myc-Fusionsproteine von kommerziellen anti-c-Myc-Antikörpern spezifisch erkannt und durch indirekte Immunfluoreszenz-Techniken nachgewiesen werden können.



**Abbildung 5-33:** Schematische Darstellung der XMAN1 Fusionskonstrukte. Die vollständige Proteinlänge wurde aminoterminal entweder mit dem verstärkt grün-fluoreszierenden Protein (EGFP) oder dem stark immunreaktiven cMyc-Epitop (gestreift) fusioniert. Die berechneten Molekularmassen sind in Kilodalton (kDa) angegeben.

### 5.18.1 Lichtmikroskopische Lokalisation des EGFP-XMAN1-Fusionsproteins

Für die Expression der EGFP-XMAN1-Proteine wurden somatische XIKE-A6- und embryonale XTC-Kulturzellen (siehe 3.1.3) transfiziert, nach 24 Stunden mit Paraformaldehyd/Triton-X-100 fixiert (siehe 4.4.2.1) und mit dem spezifischen DNA-Farbstoff Hoechst 33258 für die Fluoreszenz-Mikroskopie angefärbt. Nach Untersuchung der Zellen am Fluoreszenzmikroskop konnte eine prominente Kernperipherie-Anfärbung von Interphasezellen beobachtet werden. Die EGFP-Fusionsproteine von XMAN1 lokalisierten - wie erwartet - hauptsächlich im Randbereich des Kerns, ein geringer Teil konnte aufgrund der Überexpression im Zytoplasma beobachtet werden (Abbildung 5-34, a'' und b'').

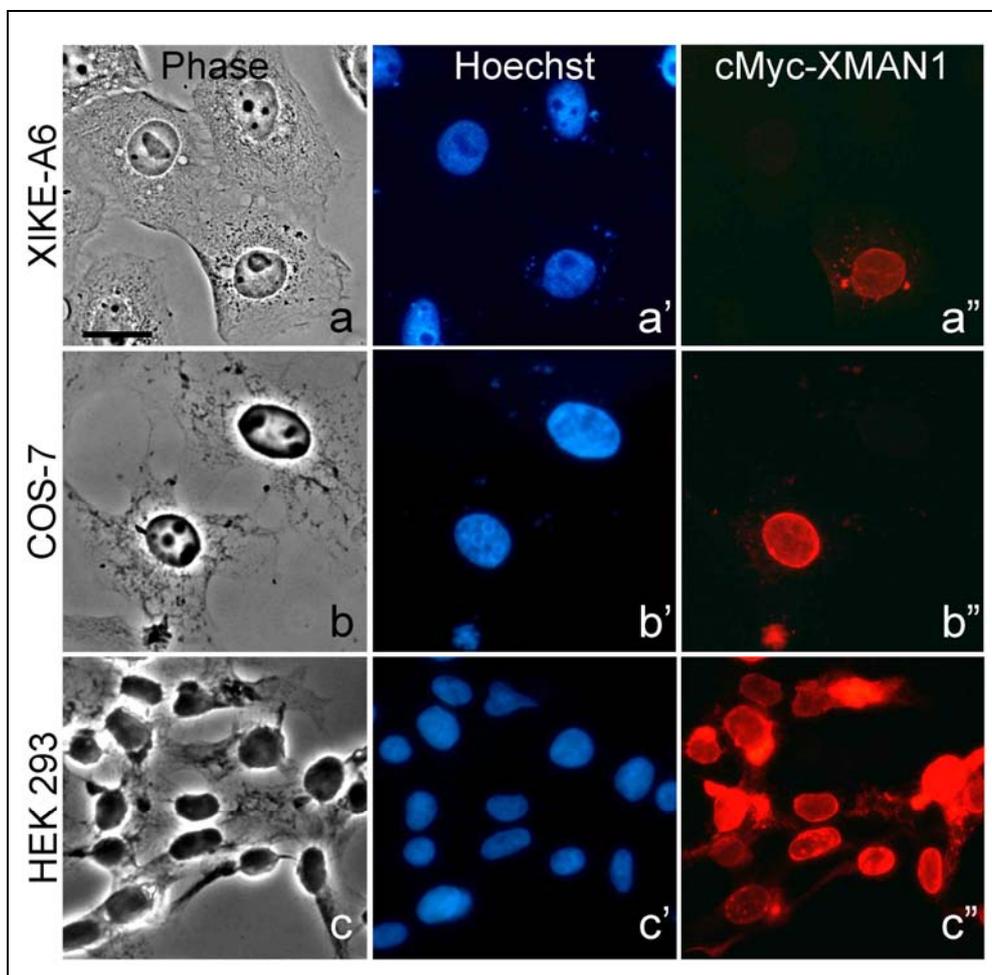


**Abbildung 5-34:** Transfektion von *Xenopus* XIKE-A6 (a-a'') und XTC (b-b'')-Zellen mit EGFP-XMAN1 Fusionskonstrukten. 24 Stunden nach der Transfektion konnte durch direkte Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass die chimären grün-fluoreszierenden Proteine überwiegend an der Kernhülle lokalisierten (a'', b''). a und b zeigen die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen der Zellen, a' und b' die Hoechst 33258-Anfärbung des Chromatins. Referenzstrich: 20  $\mu$ m.

### 5.18.2 Lichtmikroskopische Lokalisation des c-Myc-XMAN1-Fusionproteins

Weil der EGFP-Anhang eine vergleichsweise hohe molekulare Masse von 26.7 kDa aufweist und um auszuschließen, dass dieser große Anhang einen Einfluss auf die Lokalisation der Fusionsproteine ausübt, wurden in einem parallelen Ansatz *Xenopus* XIKE-A6, COS-7 (aus Primaten stammend) und humane HEK293-Zellen (siehe 3.1.3) mit c-Myc-XMAN1-Konstrukten transfiziert (siehe 4.6.6.2). 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Kulturzellen mit Paraformaldehyd/Triton-X-100 fixiert und permeabilisiert (siehe 4.4.2.1) und

mit spezifisch an die Fusionsproteine bindenden anti-c-Myc-Antikörpern inkubiert (siehe 4.4.3). Durch Zugabe von sekundären Antikörpern, die kovalent an den roten Fluoreszenzfarbstoff Carbocyanin 3 (Cy3) gekoppelt sind und ihrerseits die aus der Maus stammenden anti-c-Myc-Antikörper erkennen (siehe 3.1.4.2), können die Bereiche einer Zelle, an denen sich das Fusionsprotein befindet, sichtbar gemacht werden. Die Auswertung dieser indirekten Immunfluoreszenz ergab im Vergleich zu der direkten Fluoreszenz der EGFP-Fusionsproteine keine Abweichung im Verteilungsmuster. Die c-Myc-XMAN1 Proteine lokalisierten in Interphasezellen ausschließlich an der Kernhülle (Abbildung 5-35), lediglich ein geringe Fraktion der überexprimierten Fusionsproteinen konnte wiederum im Zytoplasma beobachtet werden (Abbildung 5-35; a''-c'').



**Abbildung 5-35:** Transfektion von *Xenopus* XIKE-A6 (a-a''), Primaten COS-7 (b-b'') und humanen HEK293 (c-c'')-Zellen mit c-Myc-XMAN1 Fusionskonstrukten. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen fixiert und mit spezifischen anti-c-Myc-Antikörpern inkubiert. Durch indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnten die c-Myc-Fusionsproteine an der Kernhülle sichtbar gemacht werden (a''- c''); korrespondierende Phasenkontrastaufnahmen der Zellen sind in (a - c), die Hoechst 33258-Anfärbung der DNA in (a'- c') dargestellt. Referenzstrich: 20 µm.

### 5.19 Herstellung spezifischer *Xenopus* MAN1-Antikörper

Um die intrazelluläre Verteilung von endogenem *Xenopus* MAN1 (XMAN1) in Oozyten, Embryonen und somatischen Zellen zu untersuchen, wurden spezifische Antikörper generiert, da bislang keine funktionellen Antikörper gegen MAN1 in Vertebraten hergestellt werden konnte. Die polyklonalen Meerschweinchen-Antikörper wurden in Zusammenarbeit mit der Firma SeqLab in Göttingen hergestellt. Als Antigen wurde der carboxyterminale nukleoplasmatische Bereich (N525-C781) von XMAN1 ausgewählt, da dieser eine starke evolutionäre Konservierung in Wirbeltieren aufweist (Tabelle 5-1). Das Antigen wurde bakteriell exprimiert und aufgereinigt und für die Immunisierung von zwei Meerschweinchen eingesetzt.

**Tabelle 5-6:** Vergleich der übereinstimmenden Aminosäuren in des C-terminalen Bereichs von MAN1 bei verschiedenen Spezies. Angaben in Prozent.

Carboxy-terminus	% Identität mit:					
	<i>X.laevis</i>	<i>X.tropicalis</i>	<i>H.sapiens</i>	<i>M.musculus</i>	<i>D.rerio</i>	<i>D.melanogaster</i>
<i>X.laevis</i>		96	87	85	78	28
<i>X.tropicalis</i>	96		87	85	78	27
<i>H.sapiens</i>	87	87		95	81	28
<i>M.musculus</i>	85	85	95		78	28
<i>D.rerio</i>	78	78	81	78		26
<i>D.melanogaster</i>	28	27	28	28	26	

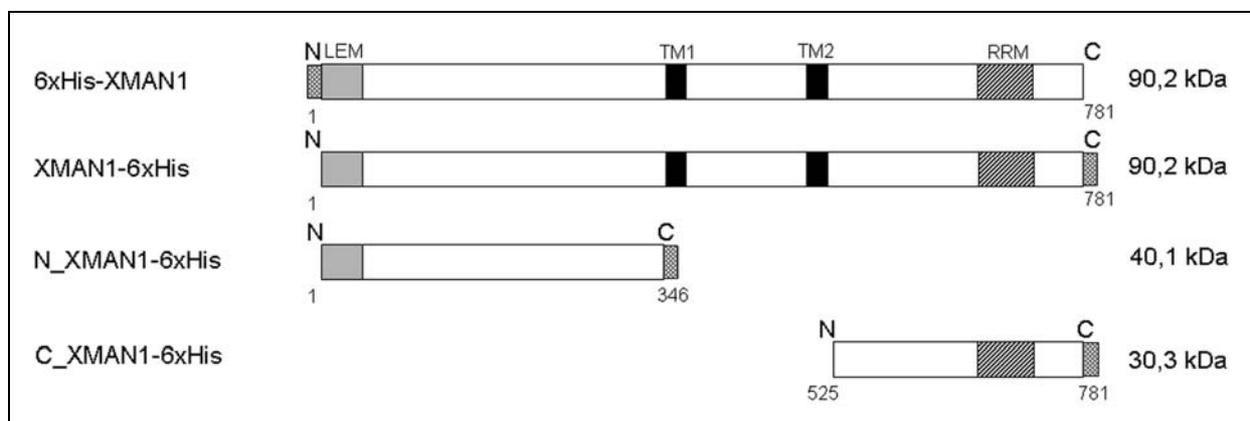
#### 5.19.1 Bakterielle Expression und Aufreinigung des rekombinanten Antigens für die Immunisierung

Für die Immunisierung wurde ein rekombinantes Polypeptid konstruiert, das C-terminal mit sechs Histidinen fusioniert war. Mit Hilfe der PCR wurde ein Abschnitt der CDS (Basen 1.579 bis 2.331, relativ vom Transkriptionsstart) von XMAN1 amplifiziert und *Bam*HI-(5') bzw. *Hind*III-(3')-Restriktionsstellen angehängt und in den Expressionsvektor pQC-6xHis kloniert. Durch Zugabe von IPTG wurde die Expression des Fusionproteins in *E.coli* XL1blue Zellen induziert. Die Bakterien wurden 4 Stunden nach dem Induktionszeitpunkt geerntet und die exprimierten Proteine isoliert. Anschließend wurden die Bakterien-Proteine mit einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, um die Expression des rekombinanten Proteins nachzuweisen. Nach Anfärbung des Gels mit Coomassie Blue konnte eine deutliche Bande bei etwa 30 kDa nachgewiesen werden. Die Aufreinigung des Peptids erfolgte über das Hexahistidin-Tag mit einer Nickel-NTA-Agarosesäule (siehe 4.3.2.3). Nach Immunisierung der beiden Tiere mit einer Antigenmenge von jeweils 100 µg wurden die Blutseren im Immunblot und in der indirekten Immunfluoreszenz getestet. Die immunologischen Analysen ergaben,

dass im Serum des zweiten Meerschweinchens (gp2) Antikörper mit der höchsten Affinität zu XMAN1 vorhanden waren.

### 5.19.1.1 Weitere XMAN1-Fusionsproteine für die bakterielle Expression und Aufreinigung

Neben dem Antigen wurden weitere rekombinante XMAN1-Konstrukte hergestellt, die mit dem Hexahistidin-Tag fusioniert waren, um zum einen rekombinantes XMAN1 mit der kompletten Länge für Bindungsstudien oder Injektionsexperimente zur Verfügung zu haben, und zum anderen um die Spezifität des *Xenopus* MAN1 Antikörpers gp2 zu überprüfen. Mit Hilfe von PCR-Klonierungstechniken wurde ausgehend von der cDNA des XMAN1-EST-Klons (IMAGp998K189335q3) Abschnitte der CDS mit einer DNA-Polymerase, die eine Korrekturlese- („Proofreading“)-Eigenschaft besitzt, amplifiziert (N1-C781, N1-C346 und N525-C781, siehe Abbildung 5-36) und über *Bam*HI / *Hind*III-Restriktionsstellen in den pQE-30 (N-terminales 6xHis-Tag) bzw. pQC-6xHis Expressionsvektor einkloniert. Anschließend wurde das Plasmid durch chemische Transformation in kompetente *E.coli*-Zellen eingeschleust. Durch die Sequenzierung des Vektors wurde sichergestellt, dass der DNA-Abschnitt im korrekten Leseraster in die MCS integriert wurde und keine Punktmutationen oder Deletionen aufwies.

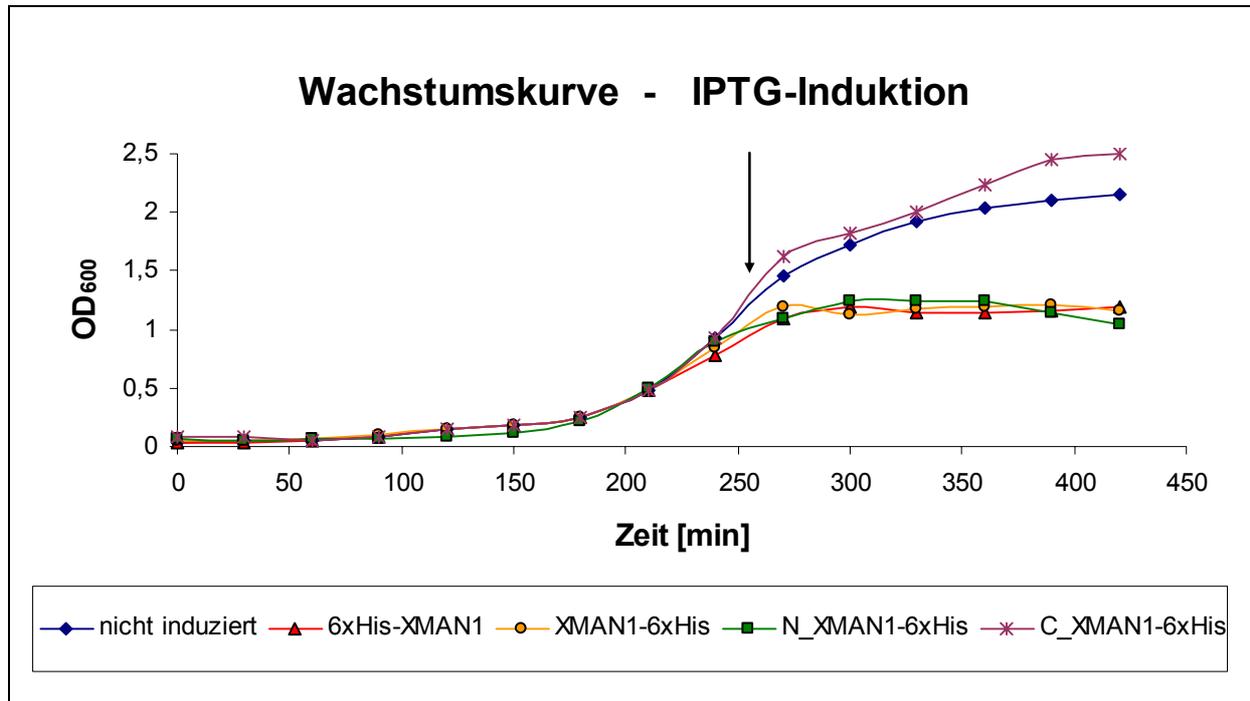


**Abbildung 5-36:** Schematische Darstellung der XMAN1 Fusionskonstrukte. Das Hexahistidin-Tag (schraffiert) wurde mit der vollständigen Proteinlänge entweder aminoterminal oder carboxyterminal angehängt. Außerdem wurden ein N-terminales (N\_XMAN1) sowie ein C-terminales (C\_XMAN1) MAN1-Konstrukt hergestellt, das am C-Terminus ein 6xHis-Tag besitzt. Die berechneten Molekularmassen sind in Kilodalton (kDa) angegeben.

### 5.19.1.2 Expression der Fusionsproteine in induzierten Bakterienkulturen

Bei der Expression der XMAN1-Konstrukte in induzierten Bakterienkulturen, konnte festgestellt werden, dass die Expression der Fusionsproteine 6xHis-XMAN1 und XMAN1-6xHis, welche die vollständige Länge des *Xenopus* MAN1 umfassen, sowie der aminoterminalen Bereich von XMAN1 (N\_XMAN1-6xHis) einen zytotoxischen Effekt auf die

Bakterienzellen ausüben. Diese Bakterien-lysierenden Auswirkungen konnten bei der Expression des C-Terminus von XMAN1 (C\_XMAN1-6xHis) jedoch nicht beobachtet werden.



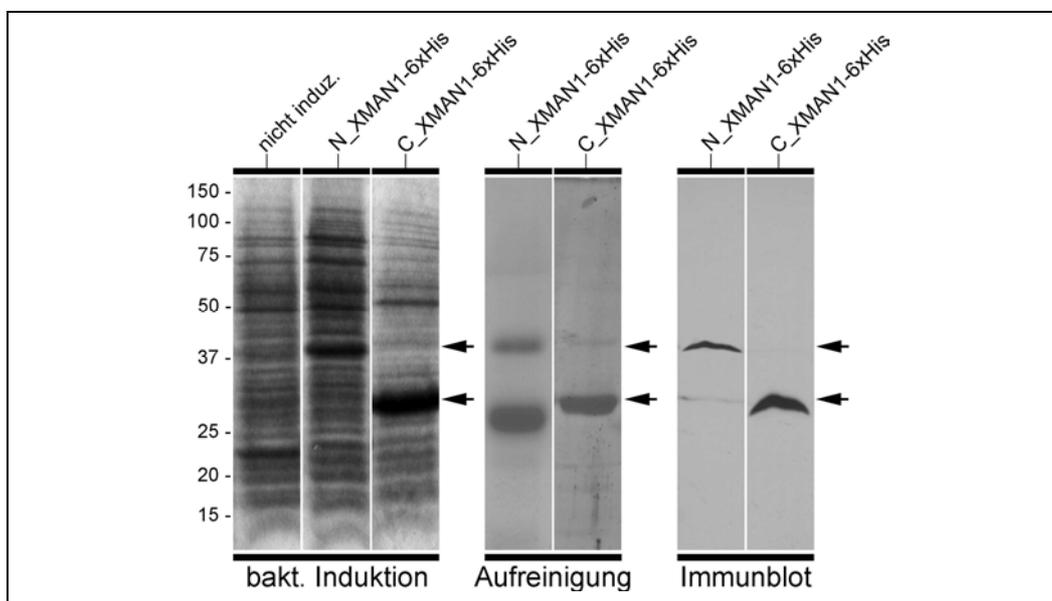
**Abbildung 5-37:** Wachstumskurve der Bakterienkulturen, die mit XMAN1-Konstrukten transformiert wurden. In dem Diagramm ist die relative Zellzahl, die bei einer optischen Dichte von 600 nm ( $OD_{600}$ ) gemessen wurde, gegen die Inkubationszeit in Minuten aufgetragen. Der Zeitpunkt der IPTG-Induktion (Endkonzentration = 1 mM) erfolgte in der logarithmischen Wachstumsphase zum Zeitpunkt  $t = 240$  min (siehe Pfeil). Lediglich die Expression des XMAN1-C-Terminus (violetter Stern) führte bei den Bakterienzellen nicht zu zytotoxischen Effekten.

Nach Inokulation des Wachstumsmediums mit den transformierten Bakterienstämmen, wurde jede halbe Stunde die relative Bakterienanzahl ( $OD_{600}$ ) gemessen. Im Vergleich zur nicht induzierten Bakterienkultur (siehe Abbildung 5-37) wuchsen diejenigen Bakterienstämme, welche das C-Terminale MAN1-Konstrukt ohne die LEM-Domäne und den Transmembran-Segmenten exprimierten, mit der gleichen Teilungsrate. Die Expression des Gesamtproteins jedoch führte zum Absterben der Bakterienzellen, was sich durch eine annähernd konstant bleibende relative Zellzahl äußerte. Die Position des Hexahistidin-Tags am XMAN1-Konstrukt –entweder aminoterminal oder carboxyterminal– hatte keinen Einfluss auf die Zytotoxizität (vergleiche 6xHis-XMAN1 mit XMAN1-6xHis).

Um zu überprüfen, ob die Bakterienzellen trotz der zytotoxischen Effekte des Aminoterminus von XMAN1 (N\_XMAN1) dennoch in der Lage waren, die rekombinanten Proteine zu exprimieren, wurden die Bakterienzellen drei Stunden nach der Induktion durch Sedimentation geerntet und durch Lyse aufgeschlossen (siehe 4.3.2.2.2). Ein Aliquot, das dem 500stel Volumen des ursprünglichen Baktereinexpressionskultur entsprach (siehe 4.3.2.3.2), wurde anschließend auf ein 18%iges Acrylamidgel geladen und in einer SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 4.3.8). Nach Coomassie-Anfärbung des Gels waren prominente

Proteinbanden in den Bakterienlysaten zu beobachten, welche auf die Überexpression der rekombinanten Proteine zurückzuführen waren (Abbildung 5-38, links).

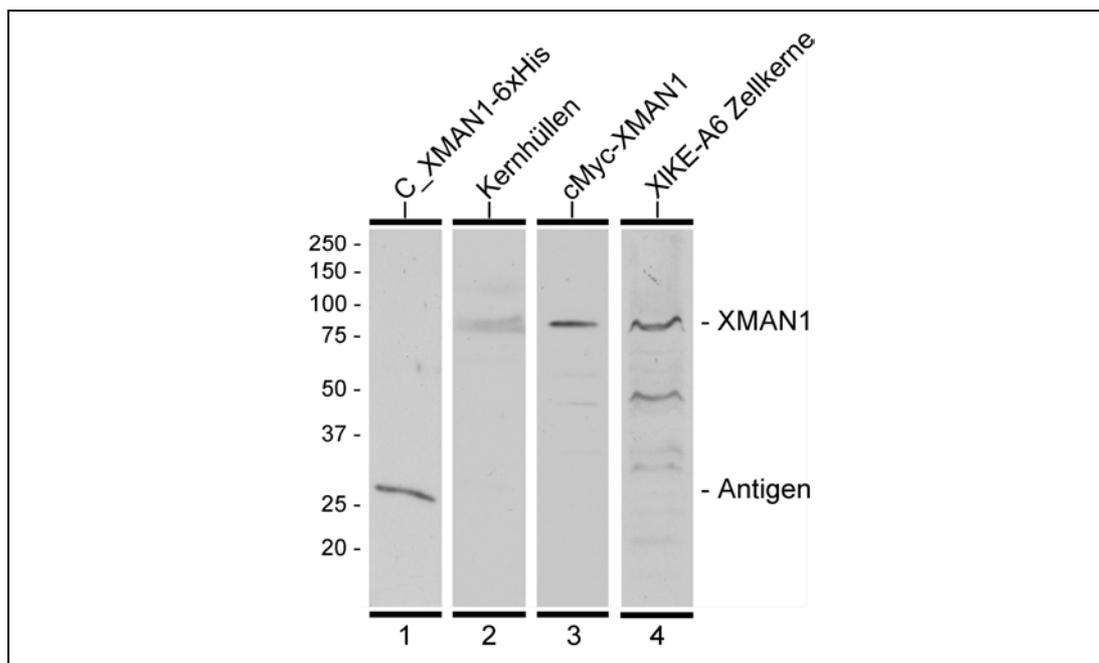
Nachdem eindeutig gezeigt werden konnte, dass die Bakterienzellen nach der Induktion die XMAN-Konstrukte mit Hexahistidin-Anhang herstellen, wurden die Fusionsproteine über eine Nickel-Agarosematrix unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt (siehe 4.3.2.3). Allerdings bereitete die Aufreinigung des Aminoterminus N\_XMAN1 Schwierigkeiten, da im Gegensatz zum C-Terminus kein sauberes Polypeptid isoliert werden konnte (Abbildung 5-38, Mitte). Im Coomassie-gefärbten Acrylamidgel konnte nach der Auftrennung eine Verunreinigung bei etwa 27 kDa beobachtet werden. Um zu überprüfen, ob es sich bei dieser Verunreinigung um ein Degradationsprodukt von N\_XMAN1 handelte, wurden die aufgereinigten Proteine nach der SDS-PAGE auf Nitrozellulose transferiert (siehe 4.3.10.2), und mit dem Primärantikörper Anti-His, der spezifisch das C-terminal angehängte Hexahistidin-Tag erkennt, inkubiert (Abbildung 5-38, linke Seite). Interessanterweise erkannte der Antikörper im Immunblot jedoch nicht die verunreinigte Bande, wodurch ausgeschlossen werden konnte, dass es sich bei dem Polypeptid um ein Abbauprodukt von N\_XMAN1 handelte. Ähnlich wie bei *Xenopus* Emerin wurde das XMAN1-Fusionsprotein, welches die komplette Länge umfasste, nicht von den Bakterienzellen exprimiert. Daher konnte dieses Konstrukt nicht aufgereinigt werden, und stand nicht für Bindungsstudien oder Mikroinjektionsexperimente zur Verfügung.



**Abbildung 5-38:** Expression der rekombinanten XMAN1-Konstrukte N\_XMAN1-6xHis (N1-C346) und C\_XMAN1-6xHis (N525-C781). Die bakteriell exprimierten Proteine (links) sowie die über eine Nickel-Agarosematrix aufgereinigten Proteine (Mitte) wurden durch 18%ige SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie Blau angefärbt und auf Nitrozellulose transferiert (rechts). Der Nachweis der exprimierten Polypeptide erfolgte durch Inkubation mit dem Anti-His-Antikörper, der spezifisch den carboxyterminal angehängten Hexahistidin-Tag erkennt. Die Pfeile markieren die synthetisierte Polypeptide: Die Mobilität des Aminoterminus von XMAN1 (N\_XMAN1) betrug 40 kDa und der Carboxyterminus von XMAN1 (C\_XMAN1) entsprach 30 kDa. Die Referenzpolypeptide mit unterschiedlichen molekularen Massen sind in kDa angegeben.

### 5.19.2 Überprüfung der Spezifität des polyklonalen XMAN1-Antikörpers

Um die Spezifität des polyklonalen XMAN1-Antikörpers gp2 zu bewerten, wurde er sowohl im Immunblot als auch in der indirekte Immunfluoreszenz somatischer Zellen und Oozyten-Gefrierschnitte getestet. Vom Autoimmunserum, welches spezifisch an das humane MAN1 bindet, ist bekannt, dass es ein Proteinbande von 82.3 kDa erkennt, wobei für das humane MAN1 eine theoretische Molekularmasse von 99.997 Da berechnet wurde (Lin et al., 2000). Es wurde ein Immunblot hergestellt, in dem das aufgereinigte Fusionsprotein C\_XMAN1-6xHis, handisolierte Kernhüllen aus *Xenopus* Oozyten, Proteinextrakte aus c-Myc-MAN1 exprimierende HEK 293-Kulturzellen, sowie Zellkerne aus *Xenopus* Kulturzellen (XIKE-A6) aufgetragen wurden. Das Erkennungsmuster des XMAN1-Antikörper gp2 ist in Abbildung 5-39 dargestellt.

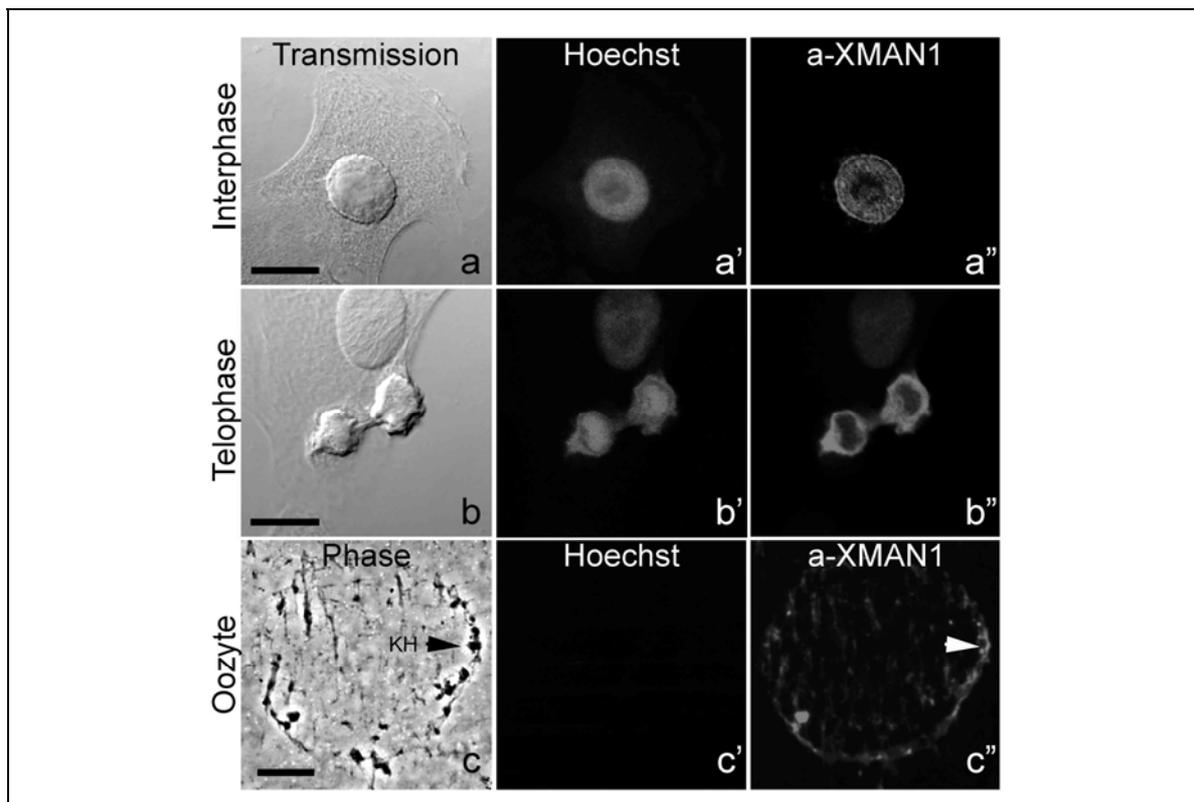


**Abbildung 5-39:** Überprüfung der Spezifität des monoklonalen anti-*Xenopus* MAN1 (XMAN1) Antikörpers gp2 im Immunblot. In einer 18%igen SDS-PAGE wurden 100 ng des Fusionsproteins C\_XMAN1-6xHis (Spur 1), Proteine aus 150 manuell isolierten Oozytenkernhüllen (Spur 2) und HEK293 Zellen, die mit cMyc-XMAN1-Konstrukte exprimierten (Spur 3), sowie  $1 \times 10^6$  XIKE-A6-Zellkernen aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem XMAN1-Serum gp2 inkubiert. In den *Xenopus* A6-Zellproben wird ein Polypeptid mit einer molekularen Masse von 90.000 Da erkannt, das dem XMAN1 entspricht (Spur 4). Obwohl das Serum das rekombinante N\_XMAN1-6xHis (Spur 1) und c-Myc-XMAN1 (Spur 3) erkennt, reagiert der XMAN1 Antikörper nur schwach mit *Xenopus* Oozytenkernhüllen (vergleiche Spur 2). Molekularmassenangaben in kDa.

Der XMAN1 Antikörper gp2 reagiert spezifisch mit dem rekombinanten Fusionsprotein (30 kDa; Spur 1) sowie in Zellen, die das c-Myc-XMAN1-Konstrukt exprimieren (90 kDa; Spur 3). In isolierten Kernhüllen von *Xenopus* Oozyten (Spur 2) sowie in XIKE-A6-Zellkernen (Spur 4) erkennt der polyklonale Antikörper ein Polypeptid mit einer Mobilität von etwa

85 kDa. Darüber hinaus wurde in der Spur 4 eine weitere Bande bei 45 kDa erkannt, die auf ein Degradationsprodukt von XMAN1 oder eine unspezifische Bindung des polyklonalen Antikörpers gp2 zurückzuführen war. In vorausgegangen Untersuchungen des Präimmunerums zeigte sich, dass das rekombinante Fusionsprotein im Immunblot nicht erkannt wurde und dass in aufgetrennten Kernproteinen keine spezifische Affinität zu Polypeptiden mit einer höheren Mobilität als 25 kDa vorlag (Daten nicht gezeigt).

Neben der Überprüfung im Immunblot wurden auch Kulturzellen und Gefrierschnitte von *Xenopus* Oozyten durch indirekte Immunfluoreszenz-Analysen nach der Inkubation mit dem XMAN1 Antikörper gp2 untersucht. Nach der Fixierung der somatischen *Xenopus* XIKE-A6 Zellen mit Paraformaldehyd/Triton-X-100 färbt der polyklonale Antikörper XMAN1 gp2 in der indirekten Immunfluoreszenz deutlich die Kernperipherie in der Interphase an (Abbildung 5-40; a''), was auf eine Lokalisation von XMAN1 in der Kernhülle schließen lässt. In sich teilenden Zellen konnte in der Telophase eine prominente Färbung um die kondensierten Chromosomen beobachtet werden (Abbildung 5-40; b''), was darauf hindeutet, dass XMAN1 beim Kernassembly wieder in die neu entstehende Kernhülle eingelagert wird.



**Abbildung 5-40:** Überprüfung der Spezifität des monoklonalen anti-XMAN1-Antikörpers gp2 in *X.laevis* Kulturzellen (XIKE-A6) nach Fixierung mit Paraformaldehyd/Triton-X-100 und *Xenopus* Ovar-Gefrierschnitten durch indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Die somatischen Interphase-Kerne zeigen eine prominente Randfärbung der Kernhülle (a''). In Telophase-Kernen ist ein starkes Signal um die dekondensierenden Chromosomen zu sehen (b''). Die Kernhülle von jungen *Xenopus* Oozyten kann eindeutig angefärbt werden (c''). Zusätzlich sind die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen (a-c) und die Hoechst-Anfärbung (a'-c') dargestellt. Referenzstrich: 20 µm.

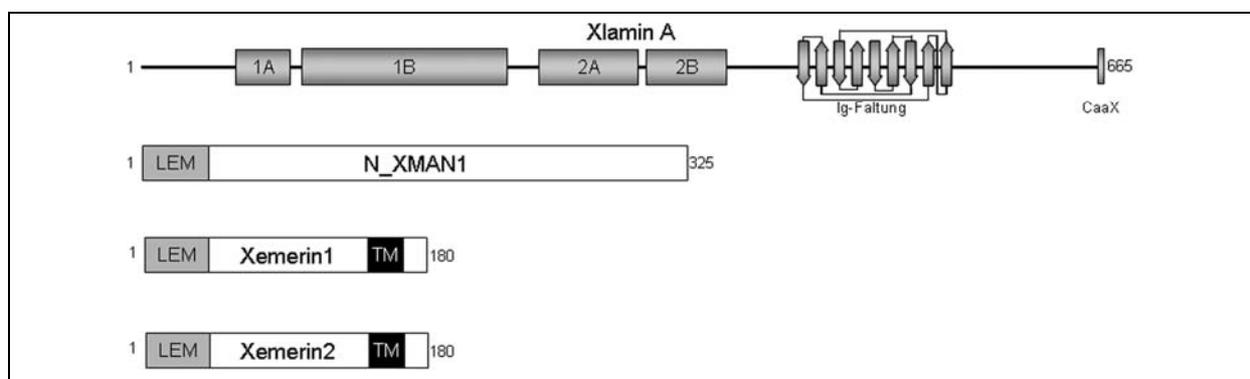
Auch durch indirekte Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Oozyten-Gefrierschnitten konnten die Ergebnisse des Immunblots bestätigt werden. Die mikroskopische Phasenkontrast-Aufnahme der *Xenopus* Oozyte des Stadiums II zeigt die kontraststarke Kernhülle (NE) (Abbildung 5-40; c). Werden diese Schnitte mit Antikörpern gegen XMAN1 gp2 inkubiert, kann XMAN1 eindeutig in der Kernhülle der Oozyte nachgewiesen werden (Abbildung 5-40; Pfeil c''). XMAN1 konnte darüber hinaus auch in Kernen von Bindegewebs- und Follikelzellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

## 5.20 Untersuchung von *Xenopus laevis* Emerin-MAN1-Interaktionen

Mansharamani und Wilson (Mansharamani and Wilson, 2005) konnten durch drei unabhängige Versuchsaufbauten zeigen, dass die integralen Kernproteine Emerin und MAN1 beim Menschen direkt miteinander *in vitro* interagieren. Insbesondere der Aminoterminus von MAN1 scheint die Proteinwechselwirkungen der funktional ähnlichen LEM-Proteine zu vermitteln. Emerin und MAN1 weisen eine ähnliche Funktion auf, da beide *via* ihrer aminoterminalen LEM-Domäne an das Chromatin-Protein BAF binden können. Es konnte darüber hinaus auch gezeigt werden, dass beide Proteine eine Bindungsdomäne für A-Typ Lamine aufweisen. Durch Co-Immunpräzipitationen sollte überprüft werden, ob dies auch für die *Xenopus* Polypeptide zutrifft.

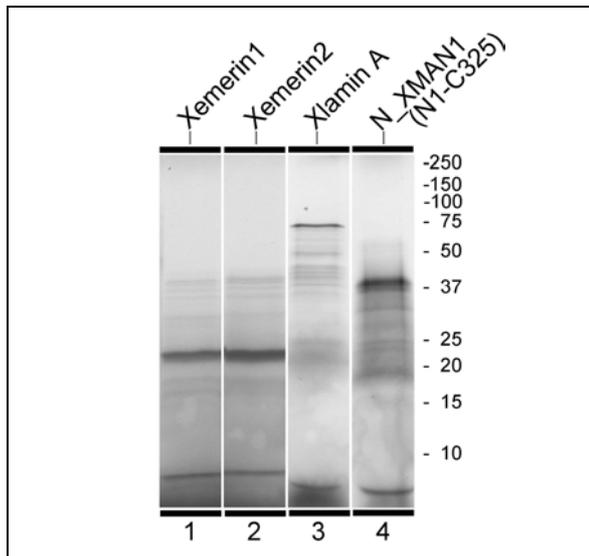
### 5.20.1 *In vitro* Synthese von *Xenopus* Lamin A, Emerin und MAN1

Da es nicht möglich war, die bakteriell exprimierten Fusionsproteine, welche die gesamte Länge von Xemerin und XMAN1 umfassten, zu erhalten, mussten die Proteine *in vitro* synthetisiert werden. Dazu wurden die vollständige kodierende Sequenzen von *Xenopus* Lamin A, Xemerin1 und -2 sowie der N-terminale Bereich (Nukleotide 1-975, relativ vom Startcodon) von XMAN1 mit Hilfe einer Proofreading-Polymerase in einer PCR amplifiziert und an das 5'-Ende ein T7-RNA-Promotor (5'-CTT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG ACC ACC-3') angefügt (Abbildung 5-41).



**Abbildung 5-41:** Schematische Darstellung der verwendeten *in vitro* Transkriptions-/Translations-Konstrukte. Im Retikulozytenlysate wurden die komplette Länge von Xlamin A, Xemerin1 bzw. -2 und der aminoternale Bereich von XMAN1 (N\_XMAN1) mit <sup>35</sup>S-Methionin markiert.

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden in einem *in vitro* Transkriptions-/ Translations-System eingesetzt. Nach der Synthese in dem Retikulozytenlysat (siehe 4.3.1) wurden die <sup>35</sup>S-Methionin-markierten Protein-Konstrukte durch eine SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 4.3.8) und die Reaktion in einer nachfolgenden Autoradiographie ausgewertet. Die Analyse der *in vitro* Transkription-/Translations-Reaktion zeigte markierte Polypeptide, welche die erwarteten Molekularmassen aufwiesen (siehe Abbildung 5-42).



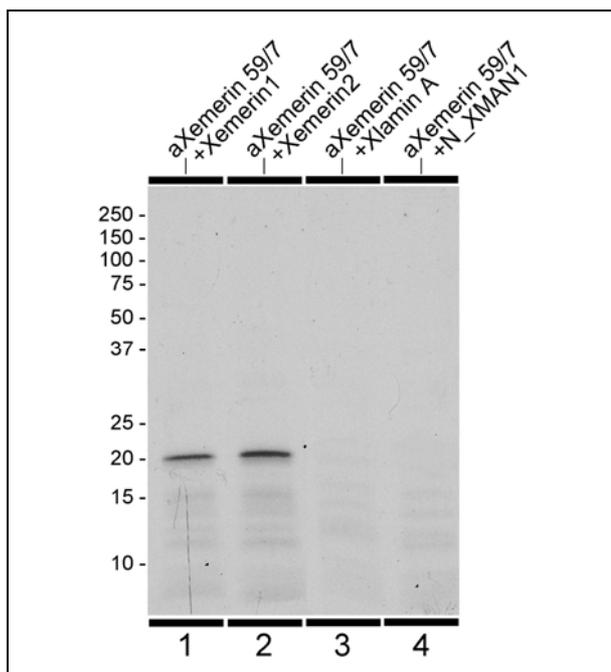
**Abbildung 5-42:** Autoradiogramm der *in vitro* synthetisierten und <sup>35</sup>S-markierten Proteine: Xemerin1, Xemerin2, Xlamin A und der Aminoterminus von XMAN1 (N1-C325). Nach der Synthese im „TNT® Quick Coupled Transkriptions-/Translations-System“ wurden die Retikulozytenlysat-Ansätze in einem 18%igen SDS-Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, das Gel getrocknet und die synthetisierten Proteine mit einem Röntgenfilm nachgewiesen: Xemerin1 bzw. -2, 24 kDa (Spur 1+2), Xlamin A 75 kDa (Spur 3) und N\_XMAN1 38 kDa (Spur 4). Die molekularen Massen der Referenzmarker sind in kDa angegeben.

### 5.20.1.1 Co-Immunpräzipitations-Analysen

Um mit einer Co-Immunpräzipitation eindeutig zeigen zu können, dass Xemerin1 bzw. -2 *in vitro* an Xlamin A sowie an den Aminoterminus von XMAN1 – wie bereits von den orthologen Proteine beim Menschen gezeigt werden konnte (Mansharamani and Wilson, 2005) – wurde zunächst ein Präimmuntest durchgeführt. Dieser Versuch sollte überprüfen, dass (a) der Antikörper 59/7 spezifisch die <sup>35</sup>S-markierten Xemerin1 bzw. -2-Proteinen erkennt, und dass (b) das immobilisierte Protein-A nicht an die <sup>35</sup>S-markierten Proteine bindet. Dazu wurden zu jedem der vier überprüften *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktionen der monoklonale Antikörper Xemerin 59/7 zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurde jedem Präzipitationsansatz separat Protein-A beigefügt, welches kovalent an Sepharosekügelchen gekoppelt war. Das immobilisierte Protein-A besitzt die Fähigkeit, spezifisch mit Immunglobulinen zu assoziieren und diese mit eventuell gebundenen Proteinkomponenten aus einer wässrigen Lösung zu entfernen. Zu diesem Zweck wurden die Sepharosekügelchen mit den daran immobilisierten Protein-A mit dem Immunglobulinen und den markierten Proteinen erneut für eine Stunde inkubiert, anschließend sedimentiert und gewaschen. Um die Proteinwechselwirkungen der Präzipitate wieder aufzulösen, wurden die Sepharoseperlen danach unter Hitzezufuhr denaturiert, sedimentiert und der lösliche Proteinüberstand über eine SDS-PAGE elektrophoretisch

aufgetrennt. Im Autoradiogramm des entsprechenden Gels konnten anschließend diejenigen  $^{35}\text{S}$ -markierte Polypeptide nachgewiesen werden, die von dem monoklonale Antikörper 59/7 erkannt wurden bzw. welche an das immobilisierte Protein-A gebunden hatte. Wie die Abbildung 5-43 zeigt, konnte mit diesem Präimmuntest eindeutig belegt werden, dass der Antikörper 59/7 die  $^{35}\text{S}$ -markierten Xemerin1 und -2 mit einer Größe von 24.000 Da erkannte, wobei das synthetisch hergestellte Xemerin2 – wie bereits bei der endogenen Proteinform beobachtet werden konnte – eine geringfügig höhere Mobilität aufwies (Abbildung 5-43, Spur 1 + 2).

In den Präimmunpräzipitationsansätzen, in denen der monoklonale Antikörper 59/7 mit dem  $^{35}\text{S}$ -markierten Xlamin A oder dem Aminoterminus von XMAN1 (N\_XMAN1) inkubiert wurde, konnte im Autoradiogramm keine Bande beobachtet werden (Abbildung 5-43, Spur 3 + 4). Dies beweist eindeutig, dass weder der Antikörper 59/7 noch das immobilisierte Protein-A eine Affinität zu den  $^{35}\text{S}$ -markierten Xlamin A und N-XMAN1 hatten.

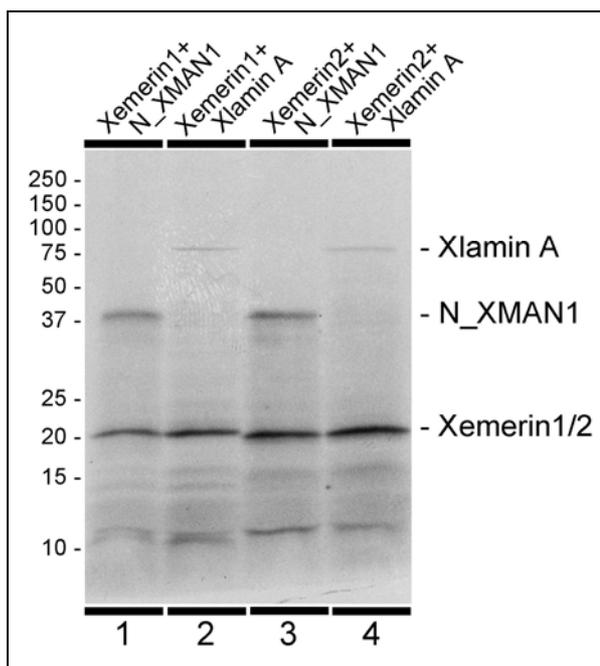


**Abbildung 5-43:** Autoradiogramm des Präimmuntests. Die *in vitro* synthetisierten und  $^{35}\text{S}$ -markierten Proteine Xemerin1, -2, Xlamin A und N\_XMAN1 wurden mit dem monoklonalen Antikörper 59/7 und anschließend mit an Sepharosekügelchen immobilisierten Protein-A inkubiert, sedimentiert und gewaschen. Nach Denaturierung der Immunpräzipitate wurden die Proteinüberstände in einem 18%igen SDS-Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Erwartungsgemäß erkannte der Antikörper 59/7 sowie Protein A in diesem Präimmuntest die markierten Polypeptide Xemerin1 und -2 (Spur 1+2). Die Molekularmassen der Referenzproteine sind (in kDa) angegeben.

Nach diesem Präimmuntest wurde ein neuer Versuch durchgeführt, mit dem gezeigt werden sollte, dass die *Xenopus* Emerin-Formen 1 und 2 *in vitro* an *Xenopus* A-Typ Lamine sowie an XMAN1 binden. Dafür wurden in vier Ansätzen jeweils zwei der überprüften *in vitro* Transkriptions-/ Translationsreaktionen kombiniert: die  $^{35}\text{S}$ -markierten Xemerin1- bzw. -2-Proteine wurden entweder mit Xlamin A oder mit dem Aminoterminus von XMAN1 für eine Stunde inkubiert. Danach wurde jedem der vier Ansätze der Antikörper 59/7 zugegeben, der – wie gezeigt wurde – spezifisch an die markierten Xemerin-Proteine bindet. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurde jedem Ansatz Sepharosekügelchen mit immobilisiertem

Protein-A beigefügt, um nun wiederum die Immunglobuline mit den jeweils gebundenen Proteinkomplexen aus der wässrigen Lösung zu entfernen. Dazu wurden die Sepharoseperlen mit den daran immobilisierten Bestandteilen wie im Präimmuntest für eine Stunde inkubiert, anschließend sedimentiert und gewaschen.

Die Interaktionen der sedimentierten Immunpräzipitate wurden ebenfalls wieder durch Denaturierung aufgelöst, abzentrifugiert und die löslichen Proteine im Überstand mit einer SDS-PAGE in einem 18%igen Acrylamidgel aufgetrennt. Nach Trocknung des Acrylamidgels und Exposition des Röntgenfilms zeigte das Autoradiogramm in jedem der vier Co-Immunpräzitationsansätze zwei deutliche Banden (Abbildung 5-44, Spur 1-4). Wenn Xemerin1 entweder mit N\_XMAN1 (Spur 1) oder mit Xlamin A (Spur 2) inkubiert wird, können diese Proteine mit der *Xenopus* Emerinform co-immunopräzipitiert werden. Auch im Immunpräzitations-Ansatz bindet Xemerin2 entweder an N\_XMAN1 (Spur3) oder an Xlamin A (Spur 4). Mit dieser Affinitätsstudie konnte daher eindeutig nachgewiesen werden, dass beide Xemerin-Formen *in vitro* an Xlamin A und an XMAN1 binden.



**Abbildung 5-44:** Autoradiogramm der Co-Immunpräzitation. Beide *Xenopus* Emerinformen binden an Xlamin A und den Aminoterminus von XMAN1 (N\_XMAN1). Nach Inkubation der *in vitro* synthetisierten und  $^{35}\text{S}$ -markierten Proteine Xemerin1 bzw. -2 wurden entweder mit Xlamin A oder N\_XMAN1, wurde der monoklonale Antikörper 59/7 zugegeben und die an die Immunglobuline gebundenen Proteinkomplexe anschließend mit Protein-A-Sepharosekugeln immunpräzipitiert. Die präzipitierten  $^{35}\text{S}$ -markierten Proteine wurden dann in einem 18%igen Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Die Molekularmassen der Referenzproteine sind (in kDa) angegeben

## 6 Diskussion

Durch intensive Forschungsarbeiten der letzten Jahre wurde zunehmend klar, dass Kernhüllenproteine grundlegende und spezifische Aufgaben erfüllen (Gruenbaum et al., 2005; Hetzer et al., 2004). Erstaunlicherweise tragen sie nicht nur – wie lange Zeit angenommen – zur mechanischen Stabilität, Chromatinorganisation und Integrität des Kerns bei (Foisner, 2001; Goldberg et al., 1999; Moir and Spann, 2001; Stuurman et al., 1998), sondern sind auch an einer Vielzahl regulatorischer Prozesse beteiligt, die u. a. die Transkription, Replikation und DNA-Reparatur steuern (Manju et al., 2006; Maraldi and Lattanzi, 2005; Moir et al., 2000). Von besonderer Bedeutung sind die Lamina, welche ein filamentöses Proteinnetzwerk (Lamina) unterhalb der inneren Kernmembran ausbilden (Aebi et al., 1986; Stuurman et al., 1998), sowie Lamina-assoziierte Proteine und integrale Membranproteine der inneren Kernmembran spielen bei diesen Prozessen eine maßgebliche Rolle (Maraldi et al., 2006; Schirmer et al., 2003; Worman and Courvalin, 2005). Ausdrücklich sei an dieser Stelle angemerkt, dass auch Emerin und MAN1 zu diesen integralen Membranproteinen gehören (Bione et al., 1994; Lin et al., 2000). Interessanterweise verursachen Mutationen im *EMD*-Gen, das für Emerin codiert, die X-gebundene Form der Emery-Dreifuss–Muskeldystrophie, eine angeborene Schwäche der Skelett- und Herzmuskulatur, welche sich in der zweiten und dritten Lebensdekade manifestiert (Emery, 2002). Auch Mutationen im *LEMD3*-Gen, das für MAN1 codiert, haben einen pathologischen Phänotyp, der sich durch Hautveränderungen und Defekte in der Knochendichte – die als Osteopoikilose und Buschke–Ollendorff-Syndrom bekannt sind – äußert (Hellemans et al., 2004). Bedauerlicherweise sind die Mechanismen, welche diese klinischen Symptome verursachen, bis heute noch weitestgehend unverstanden. Ziel dieser Arbeit war es daher, Erkenntnisse über die erstmalige Aktivierung des Emerin-Gens und über die Translation des Proteins bei Vertebraten zu erlangen. Die Aufklärung des spatio-temporären Transkriptions- und Expressionsmuster des integralen Membranproteins Emerin während der frühen Embryonalentwicklung des Vertebratenmodells *Xenopus laevis* sollte entscheidend dazu beitragen, die molekularen Mechanismen dieser angeborenen Muskeldystrophie beim Menschen besser zu verstehen.

### 6.1 Identifizierung und Charakterisierung von Emerin des afrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis*

Um das Ziel dieser Arbeit realisieren zu können, war es notwendig, das Emerin-Gen in *Xenopus laevis* zu finden. Da bis heute das Genom von *Xenopus laevis* noch nicht vollständig sequenziert ist, musste auf eine EST-(Expressed Sequence Tags)-Datenbank zurückgegriffen werden. EST-Datenbanken umfassen zwar einen Großteil der aktivierten

Gene eines Organismus, allerdings sind in diesen mRNA-Sammlungen keine Informationen zu nicht-codierenden Bereichen, wie beispielsweise Introns oder regulatorische Promoter-Elementen, enthalten.

Durch computergestützte Recherchen konnten in der *Xenopus* EST-Datenbank zwei mRNA-Sequenzen gefunden werden, die eine deutliche Ähnlichkeit zum humanen Emerin aufwiesen. Allerdings umfassten die Sequenzen zum Teil nicht den vollständigen codierenden Bereich, und wiesen im direkten Vergleich 37 Abweichungen in der Nukleotidsequenz und 17 Unterschiede in der entsprechend abgeleiteten Aminosäuresequenz auf. Um auszuschließen, dass Sequenzierungsfehler die Ursache dieser Abweichungen waren, wurden die beiden entsprechenden EST-Klone beim Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD) bestellt und sequenziert.

### **6.2 *Xenopus laevis* codiert für zwei Emerin-Formen**

Die Auswertung der Sequenzanalysen ergab, dass beide EST-Klone die kompletten codierenden Bereiche und darüber hinaus auch große untranslatierte Abschnitte (UTR) aufwiesen. Die Bedeutung der UTR-Bereiche wird noch nachfolgend erörtert (siehe 6.5). Die beiden ermittelten cDNA-Sequenzen wurden als Xemerin1 (GenBank-Accession-Nummer: AY425621) und Xemerin2 (AY766060) bezeichnet. Wie durch Sequenzvergleiche gezeigt werden konnte, wiesen beide Xemerin-Formen eine niedrige Ähnlichkeit zu den entsprechenden komplementären DNA-Sequenzen der Maus *Mus musculus*, des Menschen *Homo sapiens*, des Zebrafischs *Danio rerio* und des Nematoden *Caenorhabditis elegans* auf (vgl. Abbildung 5-4, S. 106). In den Emerin-Formen aller Spezies, einschließlich Xemerin1 und -2, konnten allerdings charakteristische Eigenschaften des integralen Membranproteins des Typs II identifiziert werden: eine aminoterminal konservierte LEM-Domäne, mit einer Größe von ~40 Aminosäuren (Laguri et al., 2001; Wolff et al., 2001), ein einzelnes Transmembran-Segment im carboxyterminalen Abschnitt des Polypeptids (Manilal et al., 1996; Small et al., 1997), die Anwesenheit verschiedener Phosphorylierungsstellen (Ellis et al., 1998; Schlosser et al., 2006) sowie die Lokalisation von Emerin an der Kernmembran (Bione et al., 1994; Dabauvalle et al., 1999). Im Vergleich zu humanen und murinen Orthologen konnte jedoch keine Kernlokalisations-Sequenz und keine serinreichen Abschnitte beim entsprechenden Protein des Krallenfroschs identifiziert werden.

Interessanterweise belegten die Sequenzanalysen, dass die beiden *Xenopus* Emerin-Formen nicht die alternativen Spleißprodukte eines einzelnen Gens sind, wie dies für das Lamina-assoziierte Protein 2 (LAP2) bei verschiedenen Spezies gezeigt wurde (Harris et al., 1994; Lang et al., 1999; Prufert et al., 2004; Schoft et al., 2003). In der Tat sind die 50 punktuellen Unterschiede zwischen Xemerin1 und -2 über die gesamten codierenden

Nukleotidbereiche und der entsprechend abgeleiteten Aminosäuresequenzen (24 Unterschiede) verteilt, was darauf hindeutet, dass die *Xenopus* Emerin-Formen Produkte zweier verschiedener Gene sind.

In Anbetracht der Tatsache, dass *Xenopus laevis* einer Amphibiengruppe angehört, deren Mitglieder ein polyploides Genom aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass die meisten Gene funktionale oder potentiell funktionale Paraloge haben (de Sa and Hillis, 1990; Kobel and DuPasquier, 1986). Es gibt bereits seit längerer Zeit Hinweise darauf, dass fast alle Gen-Loci in *X.laevis* dupliziert vorliegen (Hughes and Hughes, 1993). Tatsächlich wurden bei *Xenopus laevis* 18 Chromosomenpaare und eine Genomgröße von etwa  $3.1 \times 10^9$  bp beobachtet, während sein nächster Verwandter *Xenopus tropicalis*, eine diploide Spezies mit nur einem Emerin-Gen, lediglich 10 Chromosomenpaare und nur ungefähr die halbe Genomgröße von  $1.7 \times 10^9$  bp aufweist (Hirsch et al., 2002). Weil beide *Xenopodinae* einen sehr engen Verwandtschaftsgrad aufweisen, könnte *X.tropicalis* den ursprünglichen diploiden Genus-Zustand eines gemeinsamen Vorfahren repräsentieren, der vor etwa 30 Millionen Jahren existierte (Hughes and Hughes, 1993; Tymowska and Fischberg, 1982). Die Aminosäuresequenz von Xemerin2 zeigt eine größere Identität zu der Polypeptid-Sequenz von *Xenopus tropicalis* (88%) als Xemerin1 (86%). Dies könnte darauf hinweisen, dass die Sequenz von Xemerin2 mit dem Emerin-Gen eines möglichen gemeinsamen Vorfahren noch die größten Übereinstimmungen hat. Wenn die Sequenz der kompletten *Pipidae*-Genome vorliegen, würde eine vergleichende Genomanalyse genauere Aufschlüsse über die Evolution des Emerin-Gens geben können. Mit diesem Ergebnis ist jedoch erst in ein paar Jahren zu rechnen, da das *X.tropicalis*-Genomprojekt bis heute noch nicht vollendet wurde (voraussichtliche Fertigstellung Anfang 2007).

Die *X.laevis* Emerin-Formen sind um ~30% kürzer als das Emerin von Säugetieren, wie dies durch das geringere Laufverhalten in SDS-Polyacrylamid-Gelen gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 5-13, S. 117). Die molekularen Massen reichen dabei in verschiedenen Vertebraten von 24.000 Da (*Xenopus laevis*) (Gareiss et al., 2005) bis 34.000 Da (*Homo sapiens*) (Dabauvalle et al., 1999). Sequenzanalysen der cDNA-Sequenzen zeigten einige Lücken zwischen der *Xenopus* und der humanen Emerin-Nukleotidsequenz. Es scheint so zu sein, dass nur die erste Lücke, die in der cDNA von Xemerin1 und/oder -2 beobachtet wurde mit dem Exon3 des humanen Emerin-Gens übereinstimmt.

Es kann spekuliert werden, dass die beiden Xemerin-Formen unterschiedlich im Zellkern lokalisiert sind und damit unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Um diese Theorie zu überprüfen wurden von beiden Proteinen rekombinante Fusionsproteine hergestellt, die sich jeweils auf unterschiedliche Weise nachweisen ließen. Durch die Kotransfektion somatischer *Xenopus*-Kulturzellen konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, dass das Verteilungsmuster

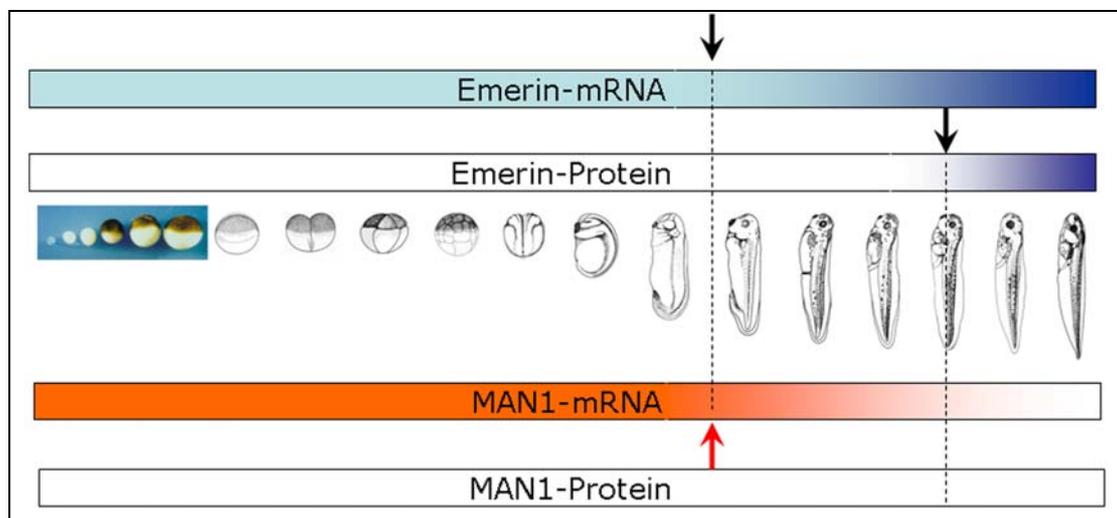
beider Xemerine vollkommen übereinstimmte (Abbildung 5-8, S. 111). Aufgrund des übereinstimmenden Verteilungsmusters muss daher davon ausgegangen werden, dass die beiden Xemerin-Formen – zumindest in somatischen Zellen adulter Tiere – dieselben Funktionen erfüllen. Wie nachfolgend diskutiert, scheint es allerdings während der Embryogenese Abweichungen in dieser Beobachtung zu geben.

### **6.3 Xemerin-Expressionsmuster während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis***

Die Ergebnisse dieser Arbeit, die durch Immunblot- und Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit spezifischen *Xenopus* Emerin Antikörpern erbracht wurden, konnten zweifellos zeigen, dass Emerin bei der Ontogenese von Wirbeltieren erst relativ spät nachzuweisen ist. Beim afrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis*, dem bekanntesten Modellorganismus für die frühe Embryogenese von Wirbeltieren, konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass Xemerin erstmals in Embryonen ab dem Entwicklungsstadium 43 (Nieuwkoop and Faber, 1975) nachzuweisen ist. Embryonen dieses Entwicklungsstadiums, das vier Tage nach der Befruchtung erreicht wird, haben sich bereits zu frei schwimmenden Kaulquappen entwickelt, die alle essentiellen Organanlagen aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass Emerin während der Oogenese und der frühen Embryonalentwicklung keine essenziellen Funktionen übernimmt. Auch bei Säugetieren konnte diese Hypothese belegt werden: Bei der Maus beispielsweise, kann Emerin während der Embryonalentwicklung keine essenziellen Aufgaben erfüllen, da das Ausschalten des *Emd*-Gens, keine offensichtlichen Phänotypen bei den Föten, Embryonen und neugeborenen Mäusen verursacht (Lammerding et al., 2005; Melcon et al., 2006; Ozawa et al., 2006). Allerdings zeigen *Emd*<sup>-/-</sup>-Mäuse lokomotorische Störungen sowie eine Beeinträchtigung der Herzfunktion, die aufgrund von Vakuolen in der Skelett- und Herzmuskulatur verursacht werden könnten. Dies scheint nicht nur für Emerin so zu sein, sondern trifft auch auf A-Typ Lamine zu, die nur in differenzierten Zellen exprimiert werden. Außerdem scheinen diese Kernintermediärfilamente nicht für die frühe Embryonalentwicklung essentiell zu sein, wie durch Stewart und Mitarbeiter durch ein Knockout-Mausmodell gezeigt wurde (Sullivan et al., 1999). Homozygote *Lmna*-null Mäuse, denen Lamin A und C fehlt, haben zur Geburt einen normalen Phänotyp, entwickeln allerdings in den nachfolgenden vier Wochen eine begrenzte Muskeldystrophie und eine Kardiomyopathie – klinische Merkmale, die denen von EDMD-Patienten sehr stark ähneln.

Als integrales Membranprotein der inneren Kernhülle scheint Emerin die strukturelle und funktionelle Organisation des Kerns durch seine Fähigkeit Lamine (Clements et al., 2000; Dreger et al., 2002; Fairley et al., 1999; Sakaki et al., 2001), MAN1 (Mansharamani and Wilson, 2005), BAF (Lee et al., 2001), DNA (Jacque and Stevenson, 2006), GCL (Holaska et al., 2003) und Bcl-2-assoziierten Transkriptionsfaktor Btf (Haraguchi et al., 2004)

Spleißfaktor YT512-B (Wilkinson et al., 2003), riesige Aktin-bindende Nesprin-Proteine (Mislow et al., 2002; Zhang et al., 2005) und Kernaktin (Holaska et al., 2004) zu binden und den Neuaufbau der Kernhülle während der Mitose (Dabauvalle et al., 1999) zu beeinflussen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein anderes Kernhüllenprotein diese spezifischen Funktionen, die auch in der Oozyte und in frühen Embryonen benötigt werden, übernehmen könnte. Dafür könnten andere LEM-Domänenproteine in Frage kommen, von denen – neben LAP2, Emerin und MAN1 – im humanen Genom mindestens vier weitere Gene existieren (vorläufig als Lem2, -3, -4 und -5 bezeichnet) (Lee and Wilson, 2004) oder andere, bislang nicht näher beschriebene putative 67 Kandidaten für integrale Proteine der inneren Kernmembran, die durch eine subtraktive Proteom-Analyse identifiziert wurden (Schirmer et al., 2003). In diesem Zusammenhang ist es interessant darauf hinzuweisen, dass bei der Embryonalentwicklung von *X.laevis* die Menge der XMAN1-mRNA genau zu dem Zeitpunkt abnahm, als die mRNA-Transkriptmenge von Xemerin erhöht wurde und die Synthese des Proteins begann (siehe Abbildung 5-24, S. 130). Es kann daher spekuliert werden, dass Emerin im Laufe der frühen Embryonalentwicklung den Staffelstab von MAN1 übernimmt, wobei der Wechselraum der Übergabe im Bereich zwischen dem Entwicklungsstadium 30 und 43 liegen dürfte (siehe Abbildung 6-1).



**Abbildung 6-1:** Zusammenfassende Übersicht der Emerin- und MAN1 Expression auf mRNA- und Proteinebene während der Oogenese und Embryogenese von *Xenopus laevis*. Während der Oogenese ist sowohl die Emerin- als auch MAN1-mRNA in den Oozytenstadien I-VI vorhanden. Im späteren Verlauf der Embryonalentwicklung nimmt die Genaktivität von Xemerin1 und -2 ab dem Stadium 30 zu. Genau zu diesem Zeitpunkt wird die Transkription von XMAN1 herunter reguliert. Das Xemerin-Protein war erstmals ab dem Stadium 43 nachweisbar. Die spatio-temporäre Verteilung des XMAN1-Proteins bleibt vorerst unbekannt.

Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit und von Transkriptionsanalysen von Osada und Mitarbeitern bekräftigt, die zeigen konnten, dass die Transkriptionsorte der Xemerin-Gene (Gareiss et al., 2005) und die des XMAN-Gens (Osada et al., 2003)

übereinstimmen. Zwar wird das XMAN1-Gen bereits maternal und während der frühen Embryogenese transkribiert, jedoch fällt beim Vergleich des Transkriptionsmusters in späteren Embryonalstadien (siehe Abbildung 5-27, S. 134; Stadium 28-38) auf, dass die mRNA-Moleküle von Xemerin und XMAN1 in denselben anatomischen Bereichen der *Xenopus* Embryonen nachzuweisen sind. Durch die Whole-mount *in situ* Hybridisierung konnten jeweils deutliche Signale in Kopf- und neuro-ektodermalen Strukturen nachgewiesen werden. Es ist daher anzunehmen, dass nach der Aktivierung die Verteilung der Genprodukte von Xemerin1/2 und XMAN1 räumlich korreliert.

Es war daher wichtig herauszufinden, ob das Auftreten der Proteine mit dem Transkriptionsmuster übereinstimmt. Wie erwartet konnte Xemerin in neuro-ektodermalen Strukturen und dem Notochord durch indirekte Immunfluoreszenz auf embryonalen Gewebedünnschnitten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5-30, S. 138). Darüber hinaus konnten auch Signale im optischen Vesikel sowie im intestinalen Gewebe beobachtet werden. Es ist denkbar, dass es sich bei dem Signal aus dem optischen Vesikel um ein Artefakt handelte, da Immunglobuline vorzugsweise unspezifisch an pigmentreiche Bereiche binden. Der Nachweis von Xemerin im Verdauungstrakt war hingegen überraschend, kann jedoch eventuell damit erklärt werden, dass auch der Magen des Embryos stark pigmentiert ist.

Ein weiteres interessantes Ergebnis im Zusammenhang mit der embryonalen Expression des Proteins konnte durch die zweidimensionale SDS-PAGE beobachtet werden (siehe Abbildung 5-23, S. 128). Im Vergleich zu Xemerin2, das in adulten somatischen XIKE-A6 Kulturzellen exprimiert wurde (siehe Abbildung 5-20, S. 125), wies die embryonale Proteinform einen abweichenden isoelektrischen Punkt (pI) auf: embryonales Xemerin2 war mit einem pI von 7.6 deutlich saurer als somatisches Xemerin2 (pI = 6.6). Ein möglicher Erklärungsgrund für diese Beobachtung ist, dass Xemerin2 während der Embryogenese einen anderen Phosphorylierungszustand als in somatischen Zellen aufweist. Die Phosphorylierung oder das Dephosphorylieren von Aminosäureresten durch spezifische Enzyme ist ein häufig verwendetes Mittel, um die Funktion eines Proteins zu verändern. Interessanterweise weist Xemerin2 im Vergleich zu Xemerin1 unterschiedliche putative Phosphorylierungsstellen für die cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase (N5-C8) und für die Proteinkinase C (N141-C143) auf (vergleiche dazu auch 5.1.2.1). Bemerkenswerterweise konnte auch vom humanen Emerin durch zwei neuere Studien gezeigt werden, dass das Protein in unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen auftritt (Ellis et al., 1998) und tatsächlich spezifische Aminosäurereste für die Tyrosinkinase aufweist (Schlosser et al., 2006). Es ist daher möglich, dass die Funktion des ubiquitär exprimierten Emerin in verschiedenen Geweben (siehe Abbildungen 5-15+16, S. 119+120), sei es in embryonalen oder auch

adulten, durch unterschiedliche Phosphorylierungszustände reguliert wird. Allerdings müsste für die *Xenopus* Emerinform2 diese Spekulation noch überprüft werden. Und obwohl für Xemerin1 lediglich ein isoelektrischer Punkt beobachtet wurde, ist es dennoch denkbar, dass auch dieses Protein in früheren Entwicklungsstadien, die jünger als die untersuchten 5-Tage alten Embryonen sind, phosphoryliert vorliegen könnte. Es ist eine verlockende Vorstellung, dass auf diesem Wege die Funktion von Xemerin während der Embryogenese reguliert wird.

### **6.4 Überlappende Funktionen von Xemerin und XMAN1 während der frühen Embryogenese**

Interessanterweise konnten – neben der übereinstimmenden Lokalisation – durch RNAi-Experimente bei *C.elegans* Hinweise darauf gefunden werden, dass Ce-Emerin signifikante überlappende Funktionen mit Ce-MAN1 (auch als Ce-Lem-2 bezeichnet) aufweist (Liu et al., 2003). Durch die Herunterregulierung der Expression beider Proteine, zeigten 90% der Embryonen im ~100-Zellstadium einen letalen Phänotyp, was darauf hinweist, dass das Vorhandensein beider Proteine für die Überlebensfähigkeit der Embryonen essentiell sein muss. Dagegen hatte erstaunlicherweise der Verlust von Ce-Emerin alleine auf die Überlebensfähigkeit der Embryonen keinerlei Einfluss und auch wenn nur Ce-MAN1 durch RNAi herunterreguliert wurde, hatte dies nur auf 15% der sich entwickelnden Embryonen letale Auswirkung. Durch diese Untersuchungen konnte eindeutig eine überschneidende Funktion von Emerin und MAN1 *in vivo* aufgezeigt werden. Wie lässt sich dieser Phänotyp erklären? Wie bereits erwähnt, gehören das humane Emerin und MAN1 zur Familie der LEM-Domänen-Proteine (Lin et al., 2000). Auch bei *X.laevis* haben DNA-Sequenzanalysen gezeigt, dass Xemerin1 und -2, XLAP2 und XMAN1 (Gareiss et al., 2005; Lang and Krohne, 2003; Osada et al., 2003) das N-terminale LEM-Motiv als gemeinsame konservierte Domäne aufweisen (siehe dazu auch Tabelle 5-3, S. 107). Es ist bekannt, dass diese Proteinfamilie ein kleines Chromatin-assoziiertes Protein, BAF, via ihres gemeinsamen LEM-Motivs binden (Segura-Totten and Wilson, 2004). Mit Ausnahme von Hefen und Pflanzen ist BAF bei allen bislang untersuchten Metazoen konserviert, und bildet Homodimere aus (Cai et al., 1998). Daher ist es denkbar, dass (1) Emerin die BAF-Bindungsfunktion von MAN1 übernimmt oder (2) ein trimerer Emerin—BAF—MAN1-Komplex existiert. An dieser Stelle ist es deswegen erwähnenswert, dass auch der Knockout von BAF bei *C.elegans* einen letalen Phänotyp bei Embryonen im ~100-Zellstadium verursacht (Margalit et al., 2005).

Für die Theorie eines BAF-Komplex mit mehreren Bindungspartnern würde auch die Arbeit von Mansharamani und Wilson (Mansharamani and Wilson, 2005) sprechen, in der Co-Immunpräzipitationen und Blot-Overlay-Assays verwendet wurden. Sie konnten zeigen, dass humanes BAF mit MAN1 noch auf eine weitere Art interagiert: Distinkte und physikalisch voneinander getrennte BAF-bindende Bereiche konnten sowohl im N-Terminus (LEM-

Domäne) als auch im C-Terminus (konserviertes SRV-Motiv) von humanen MAN1 identifiziert werden. Überraschenderweise konnte die BAF-bindungsspezifische Konsensus-Sequenz S(R/K)Vx(t/v)x(t/f)(R/K) auch im C-Terminus von XMAN1 identifiziert werden (Reste N598-C604). Deswegen kann davon ausgegangen werden, dass auch bei *Xenopus* MAN1 zwei unterschiedliche Bindungsbereiche existieren, mit denen ein BAF-Dimer (1) entweder gleichzeitig intramolekular verknüpft ist oder (2) mit denen zwei BAF-Dimere gleichzeitig mit Emerin und BAF intermolekular assoziiert sind.

Viel wichtiger für die überlappende Funktion von Emerin und MAN1 ist – neben dem gemeinsamen Bindungspartner BAF – allerdings die Erkenntnis, dass die beiden Proteine *in vitro* auch direkt aneinander binden (Mansharamani and Wilson, 2005). In der Arbeit konnte durch drei voneinander unabhängigen Untersuchungsmethoden nachgewiesen werden, dass humanes MAN1 im N-terminalen Abschnitt außerhalb der LEM-Domäne des Emerins bindet. Um zu überprüfen, ob diese Eigenschaft der humanen Proteine auch auf das Modellsystem *Xenopus laevis* übertragbar ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit durch ein *in vitro*-Bindungsassay ebenfalls gezeigt werden, dass auch die beiden *Xenopus* Emerin-Formen direkt an MAN1 binden können (siehe Abbildung 5-44, S. 156). Die eindeutig nachweisbare Wechselwirkung unterstützt maßgeblich die Annahme, dass Emerin und MAN1 überschneidende Aufgaben erfüllen. Die Übertragbarkeit dieses Systems wird durch die Erkenntnis unterstützt, dass MAN1 während der Embryonalentwicklung von *Xenopus* an rezeptorvermittelte SMAD-Proteine bindet und dadurch nachgeschaltet die Weitergabe des BMP-Signals antagonisiert. Durch diese interferierende Wirkung mit SMAD1, -5 und -8 in sich entwickelnden Individuen wird die dorso-ventrale Achsendetermination reguliert (Osada et al., 2003; Raju et al., 2003). Interessanterweise konnte für das humane Protein eine ähnliche Funktion identifiziert werden, bei der MAN1 diverse SMAD-Proteine bindet und dadurch die nachgeschaltete Signalweitergabe von BMPs und anderen Mitgliedern der TGF $\beta$ -Superfamilie durch eine Veränderung in der Genexpression reguliert (Hellemans et al., 2004; Lin et al., 2005).

### **6.5 Gemeinsame Aufgaben von Xemerin und XMAN1 bei der Genregulation**

In diesem Zusammenhang ist es interessant zu erwähnen, dass auch Emerin genregulierende Aufgaben zugesprochen werden (Holaska and Wilson, 2006). Durch die Bindung an die Transkriptionsrepressoren GCL (Holaska et al., 2003) und Btf (Haraguchi et al., 2004), sowie einem Spleißfaktor YT521-B (Wilkinson et al., 2003) könnte Emerin die Genexpression *in vivo* verändern. Diese Vermutung wurde durch Ergebnisse unterstützt, die von cDNA-Microarray-Untersuchungen von Fibroblasten aus X-EDMD-Patienten stammten. Der vollständige Funktionsverlust des Proteins verursachte in diesen Patientenzellen eine

Veränderung in der Expression von etwa 60 Genen (von 2.400 untersuchten), von denen 28 durch Zugabe von wildtypischen Emerin wieder normalisiert werden konnten (Tsukahara et al., 2002). Diese Ergebnisse zeigen, dass Emerin vermutlich die Genexpression durch die Bindung an Genregulatoren beeinflusst.

Interessant ist an dieser Stelle auch zu erwähnen, dass auch MAN1 – wie LAP2 $\beta$ , das zu Emerin eine Identität von 41% aufweist – an GCL bindet (Mansharamani and Wilson, 2005; Nili et al., 2001). Der Transkriptionsfaktor GCL reprimiert die Transkription durch die Bindung an die DP3-Untereinheit von E2F-DP3 Heterodimeren, welche transkriptionelle Aktivatoren darstellen (de la Luna et al., 1999). Ähnlich wie bei LAP2 $\beta$  führt der RNAi-Knockout von Emerin in humanen Kulturzellen zu einer Fehllokalisierung von GCL und gleichzeitig zu einer erhöhten E2F-DP-vermittelten Genexpression (Holaska and Wilson, 2006). Dadurch konnte gezeigt werden, dass GCL für seine reprimierende Funktion auf Emerin angewiesen ist.

Eine viel interessantere genregulatorische Aufgabe von Emerin – insbesondere im Zusammenhang mit der Emery-Dreifuss Muskeldystrophie – konnte durch die Einflussnahme auf einen weiteren Transkriptionsrepressor beschrieben werden, dem Retinoblastoma Protein Rb. Wie GCL inhibiert Rb die E2F-vermittelte Genaktivierung. In Muskelzellen, die aus Emerin-Knockout Mäusen stammten – die, wie bereits erwähnt, keinen offensichtlichen Phänotyp haben – konnten Melcon und Mitarbeiter (Melcon et al., 2006) zeigen, dass der Verlust von Emerin, die Rb/E2F- und MyoD-Signalwege während der Muskelregeneration unterbricht. Interessanterweise zeigten auch cDNA-Microarray-Studien mit Muskelmaterial aus EDMD-Patienten, dass der Funktionsverlust von Emerin eine verzögerte myogene Differenzierung verursacht, die mit Störungen der transkriptionellen Signalwege, welche durch das Retinoblastoma (Rb)- und das MyoD-Gen reguliert werden, verbunden waren (Bakay et al., 2006). Damit konnte sowohl im Tiermodell als auch bei EDMD-Patienten gezeigt werden, dass Emerin maßgeblichen Einfluss auf die Expression bestimmter Gene nimmt, die für die Muskelregeneration notwendig sind.

Inwiefern lassen sich diese Erkenntnisse mit den Ergebnissen dieser Arbeit in einen Zusammenhang bringen? Durch das Wissen, dass Emerin und MAN1 überlappende Aufgaben erfüllen, kann nun spekuliert werden, ob Emerin wie MAN1 an rezeptorvermittelte SMAD-Proteine bindet, oder umgekehrt MAN1 wie Emerin auch den Rb-/MyoD-Signalweg beeinflusst. Prinzipiell sind diese Überlegungen denkbar, allerdings kann durch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse am Tiermodell *Xenopus laevis* eine Emerin-Beteiligung am SMAD-Signalweg weitestgehend ausgeschlossen werden, da die Emerin-Proteine erst nach der Vollendung der Achsendetermination des Embryos nachweisbar ist. In Anbetracht der Tatsache, dass Emerin-mRNA-Transkripte zu allen Zeitpunkten während der Entwicklung nachweisbar waren, ist hingegen die Überlegung wesentlich interessanter, ob nicht eine

Regulation auf der mRNA-Ebene vorliegen könnte. Diese Spekulationen wurden in den bislang veröffentlichten Publikationen außer Acht gelassen. Das *in silico* Screening der außergewöhnlich langen untranslatierten mRNA-Bereiche von Xemerin1 und -2 ergab nur wenige Anhaltspunkte, da bis auf eine oder zwei Polyadenylierungssignale lediglich snRNP-Bindungsmotive identifiziert wurden (siehe Abbildung 5-1+2, S. 101+102). Es wäre sicherlich auch interessant, die UTRs von MAN1 und insbesondere von Xlamin A zu untersuchen, da auch die Xlamin A-mRNA bemerkenswerterweise in allen untersuchten Entwicklungsstadien nachweisbar war (siehe Abbildung 5-24, S. 130). Abgesehen davon, dass die erforderlichen Sequenzbereiche nicht in der EST-Datenbank zur Verfügung stehen, konnten den snRNP-Bindungsmotiven bis heute keine genregulatorischen Funktionen zugeordnet werden. Ein weiterer Nachteil ist, dass die verwendete Software nur UTR-Motive von Säugern berücksichtigt und es daher nicht auszuschließen ist, dass putative regulative Bereiche in *Xenopus* mRNA schlichtweg nicht erkannt wurden.

### **6.6 Abschließende Anmerkungen und Ausblick**

Ein interessanter Versuchsansatz zur Überprüfung der regulierenden Funktion der mRNA, wäre, Knockout-Versuche mit modifizierten Antisense-RNA Morpholino-Oligonukleotiden (MO) durchzuführen. Beim MO-Knockout wird die Genaktivität posttranslational inhibiert, indem stabilisierte RNA-Oligonukleotide sequenzspezifisch im Bereich des Startcodons oder im 5'-UTR binden. Durch diese Assoziation wird in der Regel die Translation der entsprechenden mRNA inhibiert. Die MOs werden normalerweise in Konzentrationsbereichen von 5 bis 40 ng in das Zytoplasma eines ein- oder zweizelligen Embryo mikroinjiziert. In den nachfolgenden Zellteilungen, werden die MOs auf die entstehenden Tochterzellen aufgeteilt. Auf den ersten Blick erscheint diese Technik schwierig, da zum einen zwei Xemerin-mRNAs ausgeschaltet werden müssen und zum anderen die Translation der Xemerin-mRNAs erst spät beginnt. Je weiter die Entwicklung fortschreitet, umso mehr Zellteilungen finden statt und die MO-Konzentration in einer einzelnen Zelle nimmt deutlich ab. Allerdings ist es in einer Arbeit gelungen, MOs noch mindestens im Entwicklungsstadium 43 nachzuweisen und eine Reduktion der Translation zu beobachten (Nutt et al., 2001). Um die regulierende Funktion der mRNA von Xemerin1 und -2 oder auch Xlamin A während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* mit spezifischen MOs trotzdem überprüfen zu können, sollten zwei Oligonukleotide verwendet werden, von denen ein MO im 5'-UTR und der andere MO im 3'-UTR binden sollte. Durch diesen Ansatz könnte die Frage geklärt werden, ob die mRNA von *Xenopus* Emerin, Lamin A und eventuell MAN1 regulative Bereiche beinhalten. Darüber hinaus bleibt eine weitere interessante Frage zu beantworten: Wie oben berichtet, wird das XMAN1 etwa ab dem Stadium 30 soweit herunter reguliert, dass selbst mit der

sensitiven RT-PCR-Technik keine Transkripte nachzuweisen sind (siehe Abbildung 5-24, S. 130). Da MAN1 allerdings im adulten Gewebe ubiquitär exprimiert wird, bleibt abzuklären, wann die XMAN1-Transkripte wieder auftreten. Ein möglicher Zeitpunkt könnte die Metamorphose von *Xenopus laevis* sein, in deren Verlauf sich die Kiemen-atmenden Larven in adulte Lungenatmer umwandeln. Dieser komplexe Prozess, der auch die Umstellung der vegetarischen auf karnivore Ernährungsumstellung einschließt, ist bis heute noch weitestgehend unverstanden. Insbesondere wäre es in Bezug auf EDMD interessant zu untersuchen, ob Emerin während der sekundären Muskeldifferenzierung ebenfalls überlappende Funktionen mit MAN1 aufweist.

Leider ist es in dieser Arbeit trotz größter Bemühungen nicht gelungen, adäquate Antikörper gegen XMAN1 zu regenerieren. In Zukunft werden daher besondere Anstrengungen notwendig sein, um XMAN1-spezifische Antikörper zu erhalten, die eine Analyse des Proteinexpressionsmusters von MAN1 im Verlauf der Embryonalentwicklung zulassen. Erst wenn auch gezeigt werden kann, dass das MAN1-Protein zu dem Entwicklungszeitpunkt verschwindet, zu dem das Emerin-Protein erstmals nachweisbar ist, wären erstmals *in vivo* Hinweise für eine überlappende Funktion der beiden Proteine erbracht.

Trotzdem haben die erbrachten Ergebnisse maßgeblich zur Zielsetzung dieser Arbeit beigetragen, die molekularen Mechanismen der angeborenen Emery—Dreifuss Muskelschwäche mit dem Vertebratenmodell *Xenopus laevis* aufzuklären. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist – trotz geringer Übereinstimmung in der DNA- und Proteinsequenz – Mechanismen humaner Erkrankungen zu untersuchen. Aufgrund dessen stellt *Xenopus laevis* neben der Maus ein effizientes Tiermodell dar, das zur Untersuchung der physiologische(n) Funktion(en) von Emerin beitragen kann. Wie bereits erwähnt, bietet *Xenopus* einzigartige Möglichkeiten bei der Manipulation von Oozyten, Eiern und frühen Embryonen, z.B. durch die Injektion von Antisense-Morpholinos in Eiern und die Untersuchung der Embryoentwicklung. Außerdem ist es möglich, die Lokalisation und Expression anderer Kernproteine nach Mikroinjektion von Emerin in Oozyten *in vivo* zu untersuchen. Insbesondere Eiextrakte erlauben die Untersuchung der Proteinwechselwirkungen von Kernhüllenproteinen in *in vitro* Systemen (Newport and Spann, 1987). Mit der Charakterisierung des Expressionsmusters von *Xenopus* Emerin während der Embryogenese sind nun die Grundlagen geschaffen, um dieses System für weitere Untersuchungen zu verwenden.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aebi, U., Cohn, J., Buhle, L. and Gerace, L.** (1986). The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* **323**, 560-4.
- Agarwal, A. K. and Garg, A.** (2006). Genetic basis of lipodystrophies and management of metabolic complications. *Annu Rev Med* **57**, 297-311.
- Apel, E. D., Lewis, R. M., Grady, R. M. and Sanes, J. R.** (2000). Syne-1, a dystrophin- and Klarsicht-related protein associated with synaptic nuclei at the neuromuscular junction. *J Biol Chem* **275**, 31986-95.
- Bakay, M., Wang, Z., Melcon, G., Schiltz, L., Xuan, J., Zhao, P., Sartorelli, V., Seo, J., Pegoraro, E., Angelini, C. et al.** (2006). Nuclear envelope dystrophies show a transcriptional fingerprint suggesting disruption of Rb-MyoD pathways in muscle regeneration. *Brain*.
- 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.
- Belmont, A. S., Bignone, F. and Ts'o, P. O.** (1986). The relative intranuclear positions of Barr bodies in XXX non-transformed human fibroblasts. *Exp Cell Res* **165**, 165-79.
- Ben Yaou, R., Muchir, A., Arimura, T., Massart, C., Demay, L., Richard, P. and Bonne, G.** (2005). Genetics of laminopathies. *Novartis Found Symp* **264**, 81-90; discussion 90-97, 227-30.
- 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.
- 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 thymopoiectin/lamina-associated polypeptide 2 gene and its alternatively spliced products. *Genome Res* **6**, 361-70.
- 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.
- 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.
- Boyle, S., Gilchrist, S., Bridger, J. M., Mahy, N. L., Ellis, J. A. and Bickmore, W. A.** (2001). The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet* **10**, 211-9.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Buendia, B., Courvalin, J. C. and Collas, P.** (2001). Dynamics of the nuclear envelope at mitosis and during apoptosis. *Cell Mol Life Sci* **58**, 1781-9.
- Burke, B. and Stewart, C. L.** (2002). Life at the edge: the nuclear envelope and human disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 575-85.
- Cai, M., Huang, Y., Ghirlando, R., Wilson, K. L., Craigie, R. and Clore, G. M.** (2001). Solution structure of the constant region of nuclear envelope protein LAP2 reveals two LEM-domain structures: one binds BAF and the other binds DNA. *Embo J* **20**, 4399-407.
- 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.
- Caputo, S., Couprie, J., Duband-Goulet, I., Konde, E., Lin, F., Braud, S., Gondry, M., Gilquin, B., Worman, H. J. and Zinn-Justin, S.** (2006). The carboxyl-terminal nucleoplasmic region of MAN1 exhibits a DNA binding winged helix domain. *J Biol Chem*.
- 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.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9.
- 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.
- Clements, L., Manilal, S., Love, D. R. and Morris, G. E.** (2000). Direct interaction between emerin and lamin A. *Biochem Biophys Res Commun* **267**, 709-14.
- Courvalin, J. C., Lassoued, K., Worman, H. J. and Blobel, G.** (1990). Identification and characterization of autoantibodies against the nuclear envelope lamin B receptor from patients with primary biliary cirrhosis. *J Exp Med* **172**, 961-7.
- Crisp, M., Liu, Q., Roux, K., Rattner, J. B., Shanahan, C., Burke, B., Stahl, P. D. and Hodzic, D.** (2006). Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol* **172**, 41-53.
- 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., Muller, E., Ewald, A., Kress, W., Krohne, G. and Muller, C. R.** (1999). Distribution of emerin during the cell cycle. *Eur J Cell Biol* **78**, 749-56.

- Dabauvalle, M. C. and Scheer, U.** (1991). Assembly of nuclear pore complexes in *Xenopus* egg extract. *Biol Cell* **72**, 25-9.
- 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 Robertis, E. M. and Sasai, Y.** (1996). A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature* **380**, 37-40.
- de Sa, R. O. and Hillis, D. M.** (1990). Phylogenetic relationships of the pipid frogs *Xenopus* and *Silurana*: an integration of ribosomal DNA and morphology. *Mol Biol Evol* **7**, 365-76.
- Debeer, P., Pykels, E., Lammens, J., Devriendt, K. and Fryns, J. P.** (2003). Melorheostosis in a family with autosomal dominant osteopoikilosis: report of a third family. *Am J Med Genet A* **119**, 188-93.
- Dechat, T., Gajewski, A., Korbei, B., Gerlich, D., Daigle, N., Haraguchi, T., Furukawa, K., Ellenberg, J. and Foisner, R.** (2004). LAP2alpha and BAF transiently localize to telomeres and specific regions on chromatin during nuclear assembly. *J Cell Sci* **117**, 6117-28.
- Dechat, T., Korbei, B., Vaughan, O. A., Vlcek, S., Hutchison, C. J. and Foisner, R.** (2000a). Lamina-associated polypeptide 2alpha binds intranuclear A-type lamins. *J Cell Sci* **113 Pt 19**, 3473-84.
- Dechat, T., Vlcek, S. and Foisner, R.** (2000b). Review: lamina-associated polypeptide 2 isoforms and related proteins in cell cycle-dependent nuclear structure dynamics. *J Struct Biol* **129**, 335-45.
- Decostre, V., Ben Yaou, R. and Bonne, G.** (2005). Laminopathies affecting skeletal and cardiac muscles: clinical and pathophysiological aspects. *Acta Myol* **24**, 104-9.
- Denecke, J., Brune, T., Feldhaus, T., Robenek, H., Kranz, C., Auchus, R. J., Agarwal, A. K. and Marquardt, T.** (2006). A homozygous ZMPSTE24 null mutation in combination with a heterozygous mutation in the LMNA gene causes Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS): insights into the pathophysiology of HGPS. *Hum Mutat* **27**, 524-531.
- Di Blasi, C., Morandi, L., Raffaele di Barletta, M., Bione, S., Bernasconi, P., Cerletti, M., Bono, R., Blasevich, F., Toniolo, D. and Mora, M.** (2000). Unusual expression of emerin in a patient with X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* **10**, 567-71.
- Dorner, D., Vlcek, S., Foeger, N., Gajewski, A., Makolm, C., Gotzmann, J., Hutchison, C. J. and Foisner, R.** (2006). Lamina-associated polypeptide 2{alpha} regulates cell cycle progression and differentiation via the retinoblastoma-E2F pathway. *J Cell Biol* **173**, 83-93.
- Dreger, C. K., Konig, A. R., Spring, H., Lichter, P. and Herrmann, H.** (2002). Investigation of nuclear architecture with a domain-presenting expression system. *J Struct Biol* **140**, 100-15.
- 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.
- Duband-Goulet, I. and Courvalin, J. C.** (2000). Inner nuclear membrane protein LBR preferentially interacts with DNA secondary structures and nucleosomal linker. *Biochemistry* **39**, 6483-8.
- Earnshaw, W. C.** (1995). Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 337-43.
- Ellis, D. J., Jenkins, H., Whitfield, W. G. and Hutchison, C. J.** (1997). GST-lamin fusion proteins act as dominant negative mutants in *Xenopus* egg extract and reveal the function of the lamina in DNA replication. *J Cell Sci* **110 ( Pt 20)**, 2507-18.
- Ellis, J. A., Craxton, M., Yates, J. R. and Kendrick-Jones, J.** (1998). Aberrant intracellular targeting and cell cycle-dependent phosphorylation of emerin contribute to the Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype. *J Cell Sci* **111 ( Pt 6)**, 781-92.
- Ellis, J. A., Yates, J. R., Kendrick-Jones, J. and Brown, C. A.** (1999). Changes at P183 of emerin weaken its protein-protein interactions resulting in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Hum Genet* **104**, 262-8.
- Emery, A. E.** (1989). Emery-Dreifuss syndrome. *J Med Genet* **26**, 637-41.
- Emery, A. E.** (2000). Emery-Dreifuss muscular dystrophy - a 40 year retrospective. *Neuromuscul Disord* **10**, 228-32.
- Emery, A. E.** (2002). The muscular dystrophies. *Lancet* **359**, 687-95.
- 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., Dubosclard, E., Ostlund, C., Vigouroux, C., Capeau, J., Wehnert, M., Higuete, D., Worman, H. J., Courvalin, J. C. and Buendia, B.** (2003). Expression of lamin A mutated in the carboxyl-terminal tail generates an aberrant nuclear phenotype similar to that observed in cells from patients with Dunnigan-type partial lipodystrophy and Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Exp Cell Res* **282**, 14-23.
- Favreau, C., Higuete, D., Courvalin, J. C. and Buendia, B.** (2004). Expression of a Mutant Lamin A That Causes Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy Inhibits In Vitro Differentiation of C2C12 Myoblasts. *Mol Cell Biol* **24**, 1481-92.
- Foisner, R.** (2001). Inner nuclear membrane proteins and the nuclear lamina. *J Cell Sci* **114**, 3791-2.
- 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.
- 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.

- Gareiss, M., Eberhardt, K., Kruger, E., Kandert, S., Bohm, C., Zentgraf, H., Muller, C. R. and Dabauvalle, M. C.** (2005). Emerin expression in early development of *Xenopus laevis*. *Eur J Cell Biol* **84**, 295-309.
- Gayathri, N., Taly, A. B., Sinha, S., Suresh, T. G. and Gorai, D.** (2006). Emery dreifuss muscular dystrophy: A clinico-pathological study. *Neurol India* **54**, 197-9.
- Georgatos, S. D.** (2001). The inner nuclear membrane: simple, or very complex? *Embo J* **20**, 2989-94.
- Goldberg, M., Harel, A. and Gruenbaum, Y.** (1999). The nuclear lamina: molecular organization and interaction with chromatin. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **9**, 285-93.
- 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, R. D., Shumaker, D. K., Erdos, M. R., Eriksson, M., Goldman, A. E., Gordon, L. B., Gruenbaum, Y., Khuon, S., Mendez, M., Varga, R. et al.** (2004). Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Gotzmann, J. and Foisner, R.** (2005). A-type lamin complexes and regenerative potential: a step towards understanding laminopathic diseases? *Histochem Cell Biol*, 1-9.
- Gruenbaum, Y., Goldman, R. D., Meyuhass, 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.
- Haque, F., Lloyd, D. J., Smallwood, D. T., Dent, C. L., Shanahan, C. M., Fry, A. M., Trembath, R. C. and Shackleton, S.** (2006). SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* **26**, 3738-51.
- Haraguchi, T., Holaska, J. M., Yamane, M., Koujin, T., Hashiguchi, N., Mori, C., Wilson, K. L. and Hiraoka, Y.** (2004). Emerin binding to Btf, a death-promoting transcriptional repressor, is disrupted by a missense mutation that causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Eur J Biochem* **271**, 1035-45.
- Haraguchi, T., Koujin, T., Segura-Totten, M., Lee, K. K., Matsuoka, Y., Yoneda, Y., Wilson, K. L. and Hiraoka, Y.** (2001). BAF is required for emerin assembly into the reforming nuclear envelope. *J Cell Sci* **114**, 4575-85.
- 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.
- Harland, R. M.** (1991). In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol* **36**, 685-95.
- 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.
- Hediger, F. and Gasser, S. M.** (2002). Nuclear organization and silencing: putting things in their place. *Nat Cell Biol* **4**, E53-5.
- Hellemans, J., Preobrazhenska, O., Willaert, A., Debeer, P., Verdonk, P. C., Costa, T., Janssens, K., Menten, B., Van Roy, N., Vermeulen, S. J. et al.** (2004). Loss-of-function mutations in LEMD3 result in osteopikilosis, Buschke-Ollendorff syndrome and melorheostosis. *Nat Genet* **36**, 1213-8.
- Hetzer, M., Walther, T. C. and Mattaj, I. W.** (2004). Pushing the Envelope: Structure, Function, and Dynamics of the Nuclear Periphery. *Annu Rev Cell Dev Biol*.
- Heun, P., Laroche, T., Shimada, K., Furrer, P. and Gasser, S. M.** (2001). Chromosome dynamics in the yeast interphase nucleus. *Science* **294**, 2181-6.
- Hirano, Y., Segawa, M., Ouchi, F. S., Yamakawa, Y., Furukawa, K., Takeyasu, K. and Horigome, T.** (2005). Dissociation of emerin from barrier-to-autointegration factor is regulated through mitotic phosphorylation of emerin in a *Xenopus* egg cell-free system. *J Biol Chem*.
- Hirsch, N., Zimmerman, L. B. and Grainger, R. M.** (2002). *Xenopus*, the next generation: X. tropicalis genetics and genomics. *Dev Dyn* **225**, 422-33.
- Hock, R., Moorman, A., Fischer, D. and Scheer, U.** (1993). Absence of somatic histone H1 in oocytes and preblastula embryos of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* **158**, 510-22.
- 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.
- Holaska, J. M., Kowalski, A. K. and Wilson, K. L.** (2004). Emerin Caps the Pointed End of Actin Filaments: Evidence for an Actin Cortical Network at the Nuclear Inner Membrane. *PLoS Biol* **2**, E231.
- Holaska, J. M., Lee, K. K., Kowalski, A. K. and Wilson, K. L.** (2003). Transcriptional repressor germ cell-less (GCL) and barrier to autointegration factor (BAF) compete for binding to emerin in vitro. *J Biol Chem* **278**, 6969-75.

- Holaska, J. M. and Wilson, K. L.** (2006). Multiple roles for emerin: Implications for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*.
- Horn, P. J. and Peterson, C. L.** (2002). Molecular biology. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription. *Science* **297**, 1824-7.
- Hughes, M. K. and Hughes, A. L.** (1993). Evolution of duplicate genes in a tetraploid animal, *Xenopus laevis*. *Mol Biol Evol* **10**, 1360-9.
- Imai, S., Nishibayashi, S., Takao, K., Tomifuji, M., Fujino, T., Hasegawa, M. and Takano, T.** (1997). Dissociation of Oct-1 from the nuclear peripheral structure induces the cellular aging-associated collagenase gene expression. *Mol Biol Cell* **8**, 2407-19.
- Jacque, J. M. and Stevenson, M.** (2006). The inner-nuclear-envelope protein emerin regulates HIV-1 infectivity. *Nature*.
- Jenkins, H., Holman, T., Lyon, C., Lane, B., Stick, R. and Hutchison, C.** (1993). Nuclei that lack a lamina accumulate karyophilic proteins and assemble a nuclear matrix. *J Cell Sci* **106 ( Pt 1)**, 275-85.
- Johnson, B. R., Nitta, R. T., Frock, R. L., Mounkes, L., Barbie, D. A., Stewart, C. L., Harlow, E. and Kennedy, B. K.** (2004). A-type lamins regulate retinoblastoma protein function by promoting subnuclear localization and preventing proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9677-82.
- Jongens, T. A., Ackerman, L. D., Swedlow, J. R., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1994). Germ cell-less encodes a cell type-specific nuclear pore-associated protein and functions early in the germ-cell specification pathway of *Drosophila*. *Genes Dev* **8**, 2123-36.
- Kasof, G. M., Goyal, L. and White, E.** (1999). Btf, a novel death-promoting transcriptional repressor that interacts with Bcl-2-related proteins. *Mol Cell Biol* **19**, 4390-404.
- Kielkopf, C. L., Lucke, S. and Green, M. R.** (2004). U2AF homology motifs: protein recognition in the RRM world. *Genes Dev* **18**, 1513-26.
- Kim, G. H., Dy, L. C., Caldemeyer, K. S. and Mirowski, G. W.** (2003). Buschke-Ollendorff syndrome. *J Am Acad Dermatol* **48**, 600-1.
- Kobel, H. and DuPasquier, L.** (1986). Genetics of polyploid *Xenopus*. *Trends Genet* **2**, 310-315.
- Krohne, G.** (1998). Lamin assembly in vivo. *Subcell Biochem* **31**, 563-86.
- Krohne, G. and Franke, W. W.** (1983). Proteins of pore complex--lamina structures from nuclei and nuclear membranes. *Methods Enzymol* **96**, 597-608.
- Laguri, C., Gilquin, B., Wolff, N., Romi-Lebrun, R., Courchay, K., Callebaut, I., Worman, H. J. and Zinn-Justin, S.** (2001). Structural characterization of the LEM motif common to three human inner nuclear membrane proteins. *Structure (Camb)* **9**, 503-11.
- Lammerding, J., Hsiao, J., Schulze, P. C., Kozlov, S., Stewart, C. L. and Lee, R. T.** (2005). Abnormal nuclear shape and impaired mechanotransduction in emerin-deficient cells. *J Cell Biol* **170**, 781-91.
- Lammerding, J., Schulze, P. C., Takahashi, T., Kozlov, S., Sullivan, T., Kamm, R. D., Stewart, C. L. and Lee, R. T.** (2004). Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J Clin Invest* **113**, 370-8.
- Lang, C. and Krohne, G.** (2003). Lamina-associated polypeptide 2beta (LAP2beta) is contained in a protein complex together with A- and B-type lamins. *Eur J Cell Biol* **82**, 143-53.
- Lang, C., Paulin-Levasseur, M., Gajewski, A., Alsheimer, M., Benavente, R. and Krohne, G.** (1999). Molecular characterization and developmentally regulated expression of *Xenopus* lamina-associated polypeptide 2 (XLAP2). *J Cell Sci* **112 ( Pt 5)**, 749-59.
- Lattanzi, G., Cenni, V., Marmioli, S., Capanni, C., Mattioli, E., Merlini, L., Squarzone, S. and Maraldi, N. M.** (2003). Association of emerin with nuclear and cytoplasmic actin is regulated in differentiating myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 764-70.
- Leatherman, J. L., Kaestner, K. H. and Jongens, T. A.** (2000). Identification of a mouse germ cell-less homologue with conserved activity in *Drosophila*. *Mech Dev* **92**, 145-53.
- Lee, K. K., Gruenbaum, Y., Spann, P., Liu, J. and Wilson, K. L.** (2000). *C. elegans* nuclear envelope proteins emerin, MAN1, lamin, and nucleoporins reveal unique timing of nuclear envelope breakdown during mitosis. *Mol Biol Cell* **11**, 3089-99.
- 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). Lamin-dependent localization of UNC-84, a protein required for nuclear migration in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* **13**, 892-901.
- Lee, K. K. and Wilson, K. L.** (2004). All in the family: evidence for four new LEM-domain proteins Lem2 (NET-25), Lem3, Lem4 and Lem5 in the human genome. *Symp Soc Exp Biol*, 329-39.
- Lee, M. S. and Craigie, R.** (1994). Protection of retroviral DNA from autointegration: involvement of a cellular factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9823-7.
- Lehner, C. F., Stick, R., Eppenberger, H. M. and Nigg, E. A.** (1987). Differential expression of nuclear lamin proteins during chicken development. *J Cell Biol* **105**, 577-87.
- Lenz-Bohme, 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.

- 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.
- Li, M. and Craigie, R.** (2006). Virology: HIV goes nuclear. *Nature* **441**, 581-2.
- Libotte, T., Zaim, H., Abraham, S., Padmakumar, V. C., Schneider, M., Lu, W., Munck, M., Hutchison, C., Wehnert, M., Fahrenkrog, B. et al.** (2005). Lamin A/C Dependent Localization of Nesprin-2, a Giant Scaffold at the Nuclear Envelope. *Mol Biol Cell*.
- 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.
- Lin, F., Morrison, J. M., Wu, W. and Worman, H. J.** (2004). MAN1, an integral protein of the inner nuclear membrane, binds Smad2 and Smad3 and antagonizes transforming growth factor- $\beta$  signaling. *Hum Mol Genet*.
- Lin, F., Morrison, J. M., Wu, W. and Worman, H. J.** (2005). MAN1, an integral protein of the inner nuclear membrane, binds Smad2 and Smad3 and antagonizes transforming growth factor- $\beta$  signaling. *Hum Mol Genet* **14**, 437-45.
- Liu, J., Lee, K. K., Segura-Totten, M., Neufeld, E., Wilson, K. L. and Gruenbaum, Y.** (2003). MAN1 and emerin have overlapping function(s) essential for chromosome segregation and cell division in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4598-603.
- 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.
- Lloyd, D. J., Trembath, R. C. and Shackleton, S.** (2002). A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum Mol Genet* **11**, 769-77.
- Lopez-Iglesias, C., Puvion-Dutilleul, F., Cebrian, J. and Christensen, M. E.** (1988). Herpes simplex virus type 1-induced modifications in the distribution of nucleolar B-36 protein. *Eur J Cell Biol* **46**, 259-69.
- Lopez-Soler, R. I., Moir, R. D., Spann, T. P., Stick, R. and Goldman, R. D.** (2001). A role for nuclear lamins in nuclear envelope assembly. *J Cell Biol* **154**, 61-70.
- Lourim, D., Kempf, A. and Krohne, G.** (1996). Characterization and quantitation of three B-type lamins in *Xenopus* oocytes and eggs: increase of lamin LI protein synthesis during meiotic maturation. *J Cell Sci* **109** (Pt 7), 1775-85.
- Lourim, D. and Krohne, G.** (1993). Membrane-associated lamins in *Xenopus* egg extracts: identification of two vesicle populations. *J Cell Biol* **123**, 501-12.
- 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.
- Mancini, M. A., Shan, B., Nickerson, J. A., Penman, S. and Lee, W. H.** (1994). The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 418-22.
- 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.
- Manju, K., Muralikrishna, B. and Parnaik, V. K.** (2006). Expression of disease-causing lamin A mutants impairs the formation of DNA repair foci. *J Cell Sci* **119**, 2704-14.
- Mansharamani, M. and Wilson, K. L.** (2005). Nuclear membrane protein MAN1: Direct binding to emerin in vitro and two modes of binding to BAF. *J Biol Chem*.
- Maraldi, N. M. and Lattanzi, G.** (2005). Linkage of lamins to fidelity of gene transcription. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **15**, 277-94.
- Maraldi, N. M., Lattanzi, G., Capanni, C., Columbaro, M., Merlini, L., Mattioli, E., Sabatelli, P., Squarzone, S. and Manzoli, F. A.** (2006). Nuclear envelope proteins and chromatin arrangement: a pathogenic mechanism for laminopathies. *Eur J Histochem* **50**, 1-8.
- Maraldi, N. M., Lattanzi, G., Marmiroli, S., Squarzone, S. and Manzoli, F. A.** (2004). New roles for lamins, nuclear envelope proteins and actin in the nucleus. *Adv Enzyme Regul* **44**, 155-72.
- Margalit, A., Segura-Totten, M., Gruenbaum, Y. and Wilson, K. L.** (2005). Barrier-to-autointegration factor is required to segregate and enclose chromosomes within the nuclear envelope and assemble the nuclear lamina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3290-5.
- Mariappan, I. and Parnaik, V. K.** (2005). Sequestration of pRb by Cyclin D3 Causes Intranuclear Reorganization of Lamin A/C during Muscle Cell Differentiation. *Mol Biol Cell*.
- Markiewicz, E., Dechat, T., Foisner, R., Quinlan, R. A. and Hutchison, C. J.** (2002a). Lamin A/C binding protein LAP2 $\alpha$  is required for nuclear anchorage of retinoblastoma protein. *Mol Biol Cell* **13**, 4401-13.
- Markiewicz, E., Ledran, M. and Hutchison, C. J.** (2005). Remodelling of the nuclear lamina and nucleoskeleton is required for skeletal muscle differentiation in vitro. *J Cell Sci* **118**, 409-20.
- Markiewicz, E., Venables, R., Mauricio Alvarez, R., Quinlan, R., Dorobek, M., Hausmanowa-Petruciewicz, I. and Hutchison, C.** (2002b). Increased solubility of lamins and redistribution of lamin C in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy fibroblasts. *J Struct Biol* **140**, 241-53.
- Marshall, W. F. and Sedat, J. W.** (1999). Nuclear architecture. *Results Probl Cell Differ* **25**, 283-301.
- Martin, L., Crimando, 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.

- Martins, S. B., Eide, T., Steen, R. L., Jahnsen, T., Skalhegg, B. S. and Collas, P.** (2000). HA95 is a protein of the chromatin and nuclear matrix regulating nuclear envelope dynamics. *J Cell Sci* **113 Pt 21**, 3703-13.
- Mattout, A., Dechat, T., Adam, S. A., Goldman, R. D. and Gruenbaum, Y.** (2006). Nuclear lamins, diseases and aging. *Curr Opin Cell Biol*.
- Melcon, G., Kozlov, S., Cutler, D. A., Sullivan, T., Hernandez, L., Zhao, P., Mitchell, S., Nader, G., Bakay, M., Rottman, J. N. et al.** (2006). Loss of emerin at the nuclear envelope disrupts the Rb1/E2F and MyoD pathways during muscle regeneration. *Hum Mol Genet*.
- Mislow, J. M., Holaska, J. M., Kim, M. S., Lee, K. K., Segura-Totten, M., Wilson, K. L. and McNally, E. M.** (2002). Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro. *FEBS Lett* **525**, 135-40.
- Moir, R. D. and Spann, T. P.** (2001). The structure and function of nuclear lamins: implications for disease. *Cell Mol Life Sci* **58**, 1748-57.
- Moir, R. D., Spann, T. P., Herrmann, H. and Goldman, R. D.** (2000a). Disruption of nuclear lamin organization blocks the elongation phase of DNA replication. *J Cell Biol* **149**, 1179-92.
- Moir, R. D., Spann, T. P., Lopez-Soler, R. I., Yoon, M., Goldman, A. E., Khuon, S. and Goldman, R. D.** (2000b). Review: the dynamics of the nuclear lamins during the cell cycle-- relationship between structure and function. *J Struct Biol* **129**, 324-34.
- Moir, R. D., Yoon, M., Khuon, S. and Goldman, R. D.** (2000c). Nuclear lamins A and B1: different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells. *J Cell Biol* **151**, 1155-68.
- Montes de Oca, R., Lee, K. K. and Wilson, K. L.** (2005). Binding of barrier-to-autointegration factor (BAF) to histone H3 and selected linker histones including H1.1. *J Biol Chem*.
- Muchir, A., van Engelen, B. G., Lammens, M., Mislow, J. M., McNally, E., Schwartz, K. and Bonne, G.** (2003). Nuclear envelope alterations in fibroblasts from LGMD1B patients carrying nonsense Y259X heterozygous or homozygous mutation in lamin A/C gene. *Exp Cell Res* **291**, 352-62.
- Muchir, A. and Worman, H. J.** (2004). The nuclear envelope and human disease. *Physiology (Bethesda)* **19**, 309-14.
- Nagano, A., Koga, R., Ogawa, M., Kurano, Y., Kawada, J., Okada, R., Hayashi, Y. K., Tsukahara, T. and Arahata, K.** (1996). Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* **12**, 254-9.
- Navarro, C. L., De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Boccaccio, I., Boyer, A., Genevieve, D., Hadj-Rabia, S., Gaudy-Marqueste, C., Smitt, H. S., Vabres, P. et al.** (2004). Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) defects cause nuclear disorganization and identify restrictive dermopathy as a lethal neonatal laminopathy. *Hum Mol Genet* **13**, 2493-503.
- Newport, J. and Dunphy, W.** (1992). Characterization of the membrane binding and fusion events during nuclear envelope assembly using purified components. *J Cell Biol* **116**, 295-306.
- Newport, J. and Spann, T.** (1987). Disassembly of the nucleus in mitotic extracts: membrane vesicularization, lamin disassembly, and chromosome condensation are independent processes. *Cell* **48**, 219-30.
- 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.
- Nichols, R. J., Wiebe, M. S. and Traktman, P.** (2006). The Vaccinia-related Kinases Phosphorylate the N Terminus of BAF, Regulating Its Interaction with DNA and Its Retention in the Nucleus. *Mol Biol Cell*.
- Nieuwkoop, P. D. and Faber, J.** (1975). Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). *North-Holland Publ. Comp., Amsterdam*.
- Nigg, E. A.** (1997). Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* **386**, 779-87.
- 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.
- Nutt, S. L., Bronchain, O. J., Hartley, K. O. and Amaya, E.** (2001). Comparison of morpholino based translational inhibition during the development of *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Genesis* **30**, 110-3.
- O'Farrell, P. H. and Ivarie, R. D.** (1979). The glucocorticoid domain of response: measurement of pleiotropic cellular responses by two-dimensional gel electrophoresis. *Monogr Endocrinol* **12**, 189-201.
- Ohba, T., Schirmer, E. C., Nishimoto, T. and Gerace, L.** (2004). Energy- and temperature-dependent transport of integral proteins to the inner nuclear membrane via the nuclear pore. *J Cell Biol* **167**, 1051-62.
- Olmo, E. and Morescalchi, A.** (1978). Genome and cell sizes in frogs: A comparison with salamanders. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **34**, 44 - 46.
- 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.
- Ostlund, C., Sullivan, T., Stewart, C. L. and Worman, H. J.** (2006). Dependence of Diffusional Mobility of Integral Inner Nuclear Membrane Proteins on A-Type Lamins. *Biochemistry* **45**, 1374-1382.
- Ozawa, R., Hayashi, Y. K., Ogawa, M., Kurokawa, R., Matsumoto, H., Noguchi, S., Nonaka, I. and Nishino, I.** (2006). Emerin-lacking mice show minimal motor and cardiac dysfunctions with nuclear-associated vacuoles. *Am J Pathol* **168**, 907-17.
- Padmakumar, V. C., Libotte, T., Lu, W., Zaim, H., Abraham, S., Noegel, A. A., Gotzmann, J., Foisner, R. and Karakesisoglou, I.** (2005). The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J Cell Sci* **118**, 3419-30.

- Pan, D., Estevez-Salmeron, L. D., Stroschein, S. L., Zhu, X., He, J., Zhou, S. and Luo, K.** (2005). The integral inner nuclear membrane protein MAN1 physically interacts with the R-Smad proteins to repress signaling by the transforming growth factor- $\beta$  superfamily of cytokines. *J Biol Chem* **280**, 15992-6001.
- Parise, P., Finocchiaro, G., Masciadri, B., Quarto, M., Francois, S., Mancuso, F. and Muller, H.** (2006). Lap2alpha Expression is Controlled by E2F and Deregulated in Various Human Tumors. *Cell Cycle* **5**.
- 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.
- Prufert, K., Winkler, C., Paulin-Levasseur, M. and Krohne, G.** (2004). The lamina-associated polypeptide 2 (LAP2) genes of zebrafish and chicken: no LAP2alpha isoform is synthesised by non-mammalian vertebrates. *Eur J Cell Biol* **83**, 403-11.
- Raju, G. P., Dimova, N., Klein, P. S. and Huang, H. C.** (2003). SANE, a novel LEM domain protein, regulates bone morphogenetic protein signaling through interaction with Smad1. *J Biol Chem* **278**, 428-37.
- Reichart, B. s., Klafke, R. s., Dreger, C., 2nd, Krueger, E. s., Motsch, I. s., Ewald, A. s., Schaefer, J., 3rd, Reichmann, H., 3rd, Mueller, C. R. t. and Dabauvalle, M. C. s.** (2004). Expression and localization of nuclear proteins in autosomal-dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy with LMNA R377H mutation. *BMC Cell Biol* **5**, 12.
- Riemer, D., Stuurman, N., Berrios, M., Hunter, C., Fisher, P. A. and Weber, K.** (1995). Expression of Drosophila lamin C is developmentally regulated: analogies with vertebrate A-type lamins. *J Cell Sci* **108 ( Pt 10)**, 3189-98.
- Roux, K. J. and Burke, B.** (2006). Nuclear envelope defects in muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta*.
- Ruchaud, S., Korfali, N., Villa, P., Kottke, T. J., Dingwall, C., Kaufmann, S. H. and Earnshaw, W. C.** (2002). Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. *Embo J* **21**, 1967-77.
- Sabbatini, P., Chiou, S. K., Rao, L. and White, E.** (1995). Modulation of p53-mediated transcriptional repression and apoptosis by the adenovirus E1B 19K protein. *Mol Cell Biol* **15**, 1060-70.
- Sakaki, M., Koike, H., Takahashi, N., Sasagawa, N., Tomioka, S., Arahata, K. and Ishiura, S.** (2001). Interaction between emerin and nuclear lamins. *J Biochem (Tokyo)* **129**, 321-7.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- Scaffidi, P. and Misteli, T.** (2005). Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med*.
- Scaffidi, P. and Misteli, T.** (2006). Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* **312**, 1059-63.
- Schild-Prufert, K., Giegerich, M., Schafer, M., Winkler, C. and Krohne, G.** (2006). Structural and functional characterization of the zebrafish lamin B receptor. *Eur J Cell Biol*.
- 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*.
- Schlosser, A., Amanchy, R. and Otto, H.** (2006). Identification of tyrosine-phosphorylation sites in the nuclear membrane protein emerin. *Febs J* **273**, 3204-15.
- Schoft, V. K., Beauvais, A. J., Lang, C., Gajewski, A., Prufert, K., Winkler, C., Akimenko, M. A., Paulin-Levasseur, M. and Krohne, G.** (2003). The lamina-associated polypeptide 2 (LAP2) isoforms beta, gamma and omega of zebrafish: developmental expression and behavior during the cell cycle. *J Cell Sci* **116**, 2505-17.
- Schutz, W., Alsheimer, M., Ollinger, R. and Benavente, R.** (2005). Nuclear envelope remodeling during mouse spermiogenesis: Postmeiotic expression and redistribution of germline lamin B3. *Exp Cell Res* **307**, 285-91.
- Segura-Totten, M. and Wilson, K. L.** (2004). BAF: roles in chromatin, nuclear structure and retrovirus integration. *Trends Cell Biol* **14**, 261-6.
- 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.
- Shain, D. H., Neuman, T. and Zuber, M. X.** (1997). Embryonic expression and evolution of duplicated E-protein genes in *Xenopus laevis*: parallels with ancestral E-protein genes. *Genetics* **146**, 345-53.
- Shimi, T., Koujin, T., Segura-Totten, M., Wilson, K. L., Haraguchi, T. and Hiraoka, Y.** (2004). Dynamic interaction between BAF and emerin revealed by FRAP, FLIP, and FRET analyses in living HeLa cells. *J Struct Biol* **147**, 31-41.
- 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 C14-reductase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1392**, 233-44.
- Small, K., Wagener, M. and Warren, S. T.** (1997). Isolation and characterization of the complete mouse emerin gene. *Mamm Genome* **8**, 337-41.

- Smith, D. E., Gruenbaum, Y., Berrios, M. and Fisher, P. A.** (1987). Biosynthesis and interconversion of Drosophila nuclear lamin isoforms during normal growth and in response to heat shock. *J Cell Biol* **105**, 771-90.
- Smythe, C., Jenkins, H. E. and Hutchison, C. J.** (2000). Incorporation of the nuclear pore basket protein nup153 into nuclear pore structures is dependent upon lamina assembly: evidence from cell-free extracts of Xenopus eggs. *Embo J* **19**, 3918-31.
- Somech, R., Shaklai, S., Amariglio, N., Rechavi, G. and Simon, A. J.** (2005a). Nuclear Envelopathies--Raising the Nuclear Veil. *Pediatr Res.*
- Somech, R., Shaklai, S., Geller, O., Amariglio, N., Simon, A. J., Rechavi, G. and Gal-Yam, E. N.** (2005b). The nuclear-envelope protein and transcriptional repressor LAP2beta interacts with HDAC3 at the nuclear periphery, and induces histone H4 deacetylation. *J Cell Sci* **118**, 4017-25.
- Soullam, B. and Worman, H. J.** (1995). Signals and structural features involved in integral membrane protein targeting to the inner nuclear membrane. *J Cell Biol* **130**, 15-27.
- Spann, T. P., 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.
- Spann, T. P., Moir, R. D., Goldman, A. E., Stick, R. and Goldman, R. D.** (1997). Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *J Cell Biol* **136**, 1201-12.
- Squarzone, S., Sabatelli, P., Ognibene, A., Toniolo, D., Cartegni, L., Cobianchi, F., Petrini, S., Merlini, L. and Maraldi, N. M.** (1998). Immunocytochemical detection of emerin within the nuclear matrix. *Neuromuscul Disord* **8**, 338-44.
- Starr, D. A. and Han, M.** (2002). Role of ANC-1 in tethering nuclei to the actin cytoskeleton. *Science* **298**, 406-9.
- 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.
- 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.
- 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.
- Taylor, M. R., Slavov, D., Gajewski, A., Vlcek, S., Ku, L., Fain, P. R., Carniel, E., Di Lenarda, A., Sinagra, G., Boucek, M. M. et al.** (2005). Thymopoietin (lamina-associated polypeptide 2) gene mutation associated with dilated cardiomyopathy. *Hum Mutat.*
- 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.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4.
- Tsukahara, T., Tsujino, S. and Arahata, K.** (2002). CDNA microarray analysis of gene expression in fibroblasts of patients with X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Muscle Nerve* **25**, 898-901.
- Turner, D. L. and Weintraub, H.** (1994). Expression of achaete-scute homolog 3 in Xenopus embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev* **8**, 1434-47.
- Tymowska, J. and Fischberg, M.** (1982). A comparison of the karyotype, constitutive heterochromatin, and nucleolar organizer regions of the new tetraploid species *Xenopus epitropicalis* Fischberg and Picard with those of *Xenopus tropicalis* Gray (Anura, Pipidae). *Cytogenet Cell Genet* **34**, 149-57.
- Tzur, Y. B., Wilson, K. L. and Gruenbaum, Y.** (2006). SUN-domain proteins: 'Velcro' that links the nucleoskeleton to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol.*
- Wagner, N., Kagermeier, B., Loserth, S. and Krohne, G.** (2006). The Drosophila melanogaster LEM-domain protein MAN1. *Eur J Cell Biol* **85**, 91-105.
- Wagner, N., Weber, D., Seitz, S. and Krohne, G.** (2004). The lamin B receptor of Drosophila melanogaster. *J Cell Sci Pt.*
- Wang, X., Xu, S., Rivolta, C., Li, L. Y., Peng, G. H., Swain, P. K., Sung, C. H., Swaroop, A., Berson, E. L., Dryja, T. P. et al.** (2002). Barrier to autointegration factor interacts with the cone-rod homeobox and represses its transactivation function. *J Biol Chem* **277**, 43288-300.
- Warren, D. T., Zhang, Q., Weissberg, P. L. and Shanahan, C. M.** (2005). Nesprins: intracellular scaffolds that maintain cell architecture and coordinate cell function? *Expert Rev Mol Med* **7**, 1-15.
- Waterham, H. R., Koster, J., Mooyer, P., Noort Gv, G., Kelley, R. I., Wilcox, W. R., Wanders, R. J., Hennekam, R. C. and Oosterwijk, J. C.** (2003). Autosomal recessive HEM/Greenberg skeletal dysplasia is caused by 3 beta-hydroxysterol delta 14-reductase deficiency due to mutations in the lamin B receptor gene. *Am J Hum Genet* **72**, 1013-7.

- Wilhelmsen, K., Litjens, S. H., Kuikman, I., Tshimbalanga, N., Janssen, H., van den Bout, I., Raymond, K. and Sonnenberg, A.** (2005). Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J Cell Biol* **171**, 799-810.
- Wilkinson, F. L., Holaska, J. M., Zhang, Z., Sharma, A., Manilal, S., Holt, I., Stamm, S., Wilson, K. L. and Morris, G. E.** (2003). Emerin interacts in vitro with the splicing-associated factor, YT521-B. *Eur J Biochem* **270**, 2459-66.
- Wolff, N., Gilquin, B., Courchay, K., Callebaut, I., Worman, H. J. and Zinn-Justin, S.** (2001). Structural analysis of emerin, an inner nuclear membrane protein mutated in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *FEBS Lett* **501**, 171-6.
- Wolin, S. L., Krohne, G. and Kirschner, M. W.** (1987). A new lamin in *Xenopus* somatic tissues displays strong homology to human lamin A. *Embo J* **6**, 3809-18.
- Woodrow, S. L., Pope, F. M. and Handfield-Jones, S. E.** (2001). The Buschke-Ollendorff syndrome presenting as familial elastic tissue naevi. *Br J Dermatol* **144**, 890-3.
- 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.** (2005). Nuclear envelope, nuclear lamina, and inherited disease. *Int Rev Cytol* **246**, 231-79.
- 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 Gundersen, G. G.** (2006). Here come the SUNs: a nucleocytoskeletal missing link. *Trends Cell Biol* **16**, 67-9.
- 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.
- Wu, W., Lin, F. and Worman, H. J.** (2002). Intracellular trafficking of MAN1, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *J Cell Sci* **115**, 1361-71.
- Yates, J. R., Bagshaw, J., Aksmanovic, V. M., Coomber, E., McMahon, R., Whittaker, J. L., Morrison, P. J., Kendrick-Jones, J. and Ellis, J. A.** (1999). Genotype-phenotype analysis in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy and identification of a missense mutation associated with a milder phenotype. *Neuromuscul Disord* **9**, 159-65.
- 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.
- 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.
- 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*.
- 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.
- Zhen, Y. Y., Libotte, T., Munck, M., Noegel, A. A. and Korenbaum, E.** (2002). NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **115**, 3207-22.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungen

%	Prozent
®	Registered
°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
A	Ampère
Å	Angström
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BAF	Barrier-to-autointegration factor
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines (Rinder-) Serum-Albumin
bzw.	Beziehungsweise
C-(terminal,-Terminus)	Carboxy-(terminal,-Terminus)
Ca.	Circa
CAPS	Cyclohexylamino-1-Propansulfonsäure
cDNA	complementary DNA
cfu	colony forming unit
CLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
Cy	Cyanin
d.h.	das heißt
Da	Dalton
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosin-Triphosphat
ddNTP	Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxy-Guanosin-Triphosphat
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
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
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	Fetales Kälberserum

## Anhang

FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm Erdbeschleunigung ( $\sim 9,81 \text{ m s}^{-2}$ )
GCL	germ cell-less
GFP	green fluorescent protein
GTE	Glucose-Tris-EDTA
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	Doppelt destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
HCG	Humanes Choriongonadotropin
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazin-1-Ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase [= „horse radish peroxidase“]
IEP	isoelektrischer Punkt
IF	Immunfluoreszenz bzw. Intermediärfilament
IgG(M)	Immunglobulin Klasse G(M)
INM	innere Kernmembran
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktosid
Kan	Kanamycin
kb, kbp	Kilobasenpaar
kDa, kD	Kilodalton
L	Liter
LAP	Lamin-assoziiertes Protein
LB	Luria Bertami
LBR	Lamin B-Rezeptor
LiCl	Lithiumchlorid
M	Molar [= Mol pro Liter]
m	Meter
mA	Milliampère
mAk	monoklonaler Antikörper
MCS	multiple cloning site
MetOH	Methanol
mg	Milligramm
MG	Relative Molekularmasse
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MMR	Marc's modified Ringer Lösung
mol	Stoffmenge [1 Mol = $6,022 \cdot 10^{23}$ Teilchen]
mRNA	messenger RNA
mV	Millivolt
N-(-terminal,-Terminus)	Amino-(-terminal, -Terminus)
N.A.	numerische Apertur
NaCl	Kochsalz
NBT	p-Nitrotetrazoliumblau
NF	Embryonalstadium-Einteilung nach Nieuwkoop & Faber (1975)
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisations-Signal
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NPC	Kernporenkomplex
OD	optische Dichte
ONM	äußere Kernmembran
p.a.	per analysem (für die Analyse)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBT	Blocking-Puffer: PBS + BSA + Tween® 20

## Anhang

---

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
pH	potentia hydrogenii
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minuten
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkription / Reverse Trranskriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
S	Svedberg-Einheit (Sedimentations-Konstante)
s, sek	Sekunde
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	Stammlösung
sog.	so genannt
ss	single stranded, einzelsträngig
Tab.	Tabelle
TBE	Puffer mit Tris, Borsäure und EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	TBS + Tween® 20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetracyclin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
tRNA	transfer RNA
TSR	Template suppression reagent
TSS	Transformation and storage solution
™	Trademark
U	Unit
u.a.	unter anderem
ÜNK	Übernacht-Kultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
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-Indol-β-D-Galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## 8.2 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Zielgen
Egfp <sub>c</sub> _seq3'	5'- TGT TTC AGG TTC AGG GGG -3'	pEGFP-C1,2,3
Egfp <sub>c</sub> _seq5'	5'- GGT CCT GCT GGA GTT CGT -3'	pEGFP-C1,2,3
Egfp <sub>n</sub> _seq3'	5'- CCG TTT ACG TCG CCG T -3'	pEGFP-N1,2,3
Topo_m13f	5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG A -3'	pCR2.1-TOPO
Topo_m13r	5'- GGT TTT CCC AGT CAC GAC GTT G -3'	pCR2.1-TOPO
R377H_F	5'- GGA GAT CCA CGC CTA CCA CAA GCT CTT GGA GGG CG -3'	hLMNA
R377H_R	5'- CGC CCT CCA AGA GCT TGT GGT AGG CGT GGA TCT CC -3'	hLMNA
XenEme_F1	5'- GTA CCC TGA GGA CTG CAC AAA A -3'	Xemerin
XenEme_R1	5'- AGA TGG ACA GCC CTG CCT TAA A -3'	Xemerin
XenFib_F	5'- GCG GCC CAT GAG ACC AGG ATT C -3'	Xfibrillarin
XenFib_R	5'- TCA TTT CTT CTG TTT GGG CGG C -3'	Xfibrillarin
hLMNA_seq5'	5'- TGG ACA TCA AGC TGG CCC TGG A-3'	hLMNA
XenEme_F2Eco	5'- C GCG AAT TCT GGA CTG CAC AAA ATG GAA AAT -3'	Xemerin1
XenEme_R2Bam	5'- CGC GGA TCC TTA GTT ACT TTC CAG CCT GGA -3'	Xemerin1
XenFib_F2Eco	5'- A TTG AAT TCG CCC ATG AGA CCA GGA TTC AG -3'	Xfibrillarin
XenFib_R2Bam	5'- ATT GGA TCC TCA TTT CTT CTG TTT GGG CGG -3'	Xfibrillarin
pBl_seq5'	5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT GAG -3'	pBluescript SK+
pBl_seq3'	5'- ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC -3'	pBluescript SK+
Dsredc_seq5'	5'- CTG GAC ATC ACC TCC CAC AAC -3'	pDsRed1-C1
Dsredc_seq3'	5'- GGG AGG TGT GGG AGG TTT TTT -3'	pDsRed1-C1
XenEme_pqe5'Bam	5'- ACT GGA TCC CGC AGC AAG ACT AGG AAT -3'	Xemerin1
XenEme_pqe3'Hind	5'- CCG AAG CTT ATT TTG CTT CAC ACG GAT -3'	Xemerin1
M13F	5'- GTA AAA CGA CGG CCA GTG -3'	M13-Region div. Vektoren
M13R	5'- GG AAA CAG CTA TGA CCA TGA -3'	M13-Region div. Vektoren
pQC6His_5'	5'- GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC -3'	pQC-6xHis
pQC6His_3'	5'- AAT CCA GAT GGA GTT CTG AGG -3'	pQC-6xHis
XenEme_R3Eco	5'- CGC GAA TTC TTA GTT ACT TTC CAG CCT GGA -3'	Xemerin
XenEme_F4	5'- CGC AGC AAG ACT AGG AAT CCG -3'	Xemerin

Bezeichnung	Sequenz	Zielgen
XenEme_R4	5'- TCT GGG ATA TGG GCT GGT ACG -3'	Xemerin
XenEme_F5Eco	5'- ACA GAA TTC CAG CAA GAC TAG GAA TCC GTA -3'	Xemerin
XenEme_R5Eco	5'- AAT GAA TTC GGC TGG TAC GTG TTT TCT TTA -3'	Xemerin
XenLMNA_F1	5'- GAG AGG CCA AAC TTC GGG ATC -3'	Xlamin A
XenLMNA_R1	5'- TCT TCT GGG TGT TGG GAC TGG -3'	Xlamin A
XenMAN1_F1	5'- TGG GCA AAG GAA GAG GAA GAA -3'	XMAN1
XenMAN1_R1	5'- GGC TGA ATC CAT TTC CAC ACC -3'	XMAN1
XenLMNA_F2Eco	5'- ACA GAA TTC TCA CCC TTA CTC GGA CCT ACC -3'	Xlamin A
XenLMNA_R2Eco	5'- ACT GAA TTC AAA ATT CTC TTT AGC TTG GGC -3'	Xlamin A
M13R_pSPORT6	5'- GGA AAC AGC TAT GAC CAT TAG G -3'	pSPORT6
M13F ABI Sequencer	5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT -3'	M13-Region div. Vektoren
EMDest_F1UTR	5'- CCA CTT GCT ATC GTT CTC TCA -3'	Xemerin1
EMDest_R1UTR	5'- ACA CAG TGC CTC CCT TGG -3'	Xemerin1
EMDpsd_F1UTR	5'- AAC CCG ACG ACA ATC CAT -3'	Xemerin2
EMDpsd_R1UTR	5'- ACT GAC AAC AAC GGG TGC -3'	Xemerin2
EMDest_F2UTR	5'- GTG ATC AGT TAC ACC GAT TTG TTA -3'	Xemerin1
EMDest_R2UTR	5'- CCT ATT CCC CAC AAC ATG TAA -3'	Xemerin1
EMDpsd_F2UTR	5'- TTT CGG AGT TGG ACA GCC -3'	Xemerin2
EMDpsd_R2UTR	5'- GGC AGT TCG GGG AGA TTA -3'	Xemerin2
EMDest_F3UTR	5'- AGC ACA GTC AGC CTT GGT T -3'	Xemerin1
EMDest_R3UTR	5'- CCA AGG GAA CAC ATT AAA ACC -3'	Xemerin1
EMDpsd_F3UTR	5'- TAA TCT CCC CGA CTG CCT -3'	Xemerin2
EMDpsd_R3UTR	5'- GGA TCT ACC CTG GGC TGT C -3'	Xemerin2
EMDpsd_F1Eco	5'- ATT GAA TTC GAG CTG AAA ATG TAG TCT GCC -3'	Xemerin2
EMDpsd_R1Eco	5'- AAT GAA TTC ATT GTT CCA CAT GAG GCC -3'	Xemerin2
EMDpsd_F2Eco	5'- CGA GAA TTC AAT CAA TTG GCA AAA CAT ATG -3'	Xemerin2
EMDpsd_R2Eco	5'- GCT GAA TTC TCT ACC CTG GGC TGT CC -3'	Xemerin2
S143F_F	5'- GGA GGC TCT GCT GAA CTT CAA GGA GGC CGC ACT GA -3'	hLMNA
S143F_R	5'- TCA GTG CGG CCT CCT TGA AGT TCA GCA GAG CCT CC -3'	hLMNA
S143F_seq5'	5'- CGC AAT ACC AAG AAG GAG G -3'	hLMNA
hLMNA_F1Eco	5'- ATT GAA TTC ATG GAG ACC CCG TCC CAG -3'	hLMNA

Bezeichnung	Sequenz	Zielgen
hLMNA_R1Sal	5'- AAT GTC GAC ATT ACA TGA TGC TGC AGT TCT GG -3'	hLMNA
pGEX_seq5'	5'- GCG ACC ATC CTC CAA AAT -3'	pGEX-1,2,3
pGEX_seq3'	5'- TTT CAC CGT CAT CAC CGA -3'	pGEX-1,2,3
XEMD1_F	5'- caa gca cga cca cga ac -3'	Xemerin1
XEMD1_R	5'- GAA ACC AAC GAA CAG GAG A -3'	Xemerin1
XEMD2_F	5'- CCA AGC ACG ATC ACG AGT -3'	Xemerin2
XEMD2_R	5'- GAA ACC AAC GAA CAG GAA C -3'	Xemerin2
XEMD1/2_PQC5'Bam	5'- ACT GGA TCC ctg cac aaa atg gaa aat -3'	Xemerin1/2
XEMD2_PQC3'Hind	5'- CGT AAG CTT CTC TTC GTT CTG CTT CAC -3'	Xemerin1/2
XEMD1/2_PQC3'Hind	5'- GCG AAG CTT ATT TGA TAA GTT ACT TTC CAG -3'	Xemerin1/2
XEMD2_F2Eco	5'- C GCG AAT TCA GGA CTG CCC AAA ATG GAA AAT -3'	Xemerin2
XEMD2_R2Bam	5'- CGC GGA TCC TCA GTT ACT CTC CAG CAT GGA -3'	Xemerin2
pCS2plus_seq5'	5'- GTC GGA GCA AGC TTG ATT T -3'	pCS2+
pCS2plus_seq3	5'- ATG ACC ATG ATT ACG CCA AG -3'	pCS2+
pCMV-Myc_seq5'	5'- AGC TGC GGA ATT GTA CCC -3'	pCMV-Myc
pCMV-Myc_seq3'	5'- TGG TTT GTC CAA ACT CAT CAA -3'	pCMV-Myc
XEMD1_Myc5'Eco	5'- ATC GA ATT CGA ctg cac aaa atg gaa a -3'	Xemerin1
XEMD1_Myc3'Xho	5'- GG CGG CTC GAG TTA GTT ACT TTC CAG -3'	Xemerin1
XEMD2_Myc5'Eco	5'- ACC GA ATT CTG ccc aaa ATG GAA AA -3'	Xemerin2
XEMD2_Myc3'Xho	5'- CAG CTC GAG TCA GTT ACT CTC CAG CAT G -3'	Xemerin2
XMAN1_F1Bgl	5'- TGG AGA TCT AGT GGT CAA AAT GGC GG -3'	XMAN1
XMAN1_R1Bgl	5'- CGG AGA TCT GCA ATA TCT TCA ACA GCA T -3'	XMAN1
XMAN1_F2Bgl	5'- ACC AGA TCT GAT GTA GAC GCA GGG C -3'	XMAN1
XMAN1_R2Bgl	5'- GCC AGA TCT CTC TTC CGT TCC TTC C -3'	XMAN1
XMAN1_F3Bgl	5'- CGG AGA TCT AAT CAC CTG GAG AGC G -3'	XMAN1
XMAN1_R3Bgl	5'- GCG AGA TCT CTC TGC GAC CTT ATG ATG -3'	XMAN1
XMAN1_F	5'- CCG AGT GGT CAA AAT GGC -3'	XMAN1
XMAN1_R	5'- AAC GAA TGC AAT ATC TTC AAC AG -3'	XMAN1
XMAN1_F4	5'- CCA AGA AGC AAA GCA GTA TTT AA -3'	XMAN1
XMAN1_R4	5'- CTG GTT ATG TTT AAA ATG GAA CC -3'	XMAN1
XMAN2_F1Bgl	5'- TGG AGA TCT CGA AAA TGG CGG CC -3'	XMAN1

Bezeichnung	Sequenz	Zielgen
XMAN2_R1Bgl	5'- GCC AGA TCT TTT CCC CCA CAA GTA GAT TT -3'	XMAN1
XMAN2_F2	5'- GCC TCC AAG AGG CAA CTC -3'	XMAN1
XMAN2_R2	5'- AAC GAT ATT TCA TGT ATC GCA G -3'	XMAN1
XMAN2_F3	5'- CGC ACA GGT CAT CAA TTT TTT -3'	XMAN1
XMAN2_R3	5'- ATT GGT GTA TAC GGC TCC AAA T -3'	XMAN1
XMAN1_Myc5'Bgl	5'- GTC AGA TCT TGG TCA AAA TGG CGG -3'	XMAN1
XMAN1_Myc3'Xho	5'- CAA CTC GAG GCA ATA TCT TCA ACA GCA T -3'	XMAN1
XMAN1_F5Bgl	5'- GGA AGA TCT GCG GCC GCT CAG TTA -3'	XMAN1
XMAN1_R5Hind	5'- GAC AAG CTT GAA TCT CCC TGC AGC AGA -3'	XMAN1
XMAN1_F6Bam	5'- CAA GGA TCC TGG GCA AAG GAA GAG GA -3'	XMAN1
XMAN1_R6Bam	5'- TAA GGA TCC ATT TGA AGT GCC AGT CCG -3'	XMAN1
XMAN1_R6Hind	5'- ACG AAG CTT ATT TGA AGT GCC AGT CCG -3'	XMAN1
PMXMAN1_F	5'- AGT TTG GCA AGG ACA gGC gTT TCA TTT GGA TAG A -3'	XMAN1
PMXMAN1_R	5'- TCT ATC CAA ATG AAA cGC cTG TCC TTG CCA AAC T -3'	XMAN1
XMAN1_F7Hind	5'- CAG AAG CTT CCC ACC ATG GCA TCA A -3'	XMAN1
XMAN1_R7Hind	5'- ATA AAG CTT GCA ATA TCT TCA ACA GCA TGA CTG A -3'	XMAN1
XMAN1_F8Bgl	5'- GGC AGA TCT TAT GAG AGG ATC TCA CCA TCA C -3'	XMAN1
XMAN1_R8Apa	5'- AAT GGG CCC TCT TCA ACA GCA TGA CTG AGA -3'	XMAN1
Egfpn_seq5'	5'- TAG GCG TGT ACG GTG GG -3'	pEGFP-N1,2,3
pCEP4_seq5'	5'- TGT ACG GTG GGA GGT CTA TAT AA -3'	pCEP4
pCEP4_seq3'	5'- TGT CCA AAC TCA TCA ATG TAT CTT -3'	pCEP4
PMXMAN1_F2	5'- CGA GAT CTT GGT CAA AgT GGC GGC CGC TCA G -3'	XMAN1
PMXMAN1_R2	5'- CTG AGC GGC CGC CAc TTT GAC CAA GAT CTC G -3'	XMAN1
XMAN1_R7XhoI	5'- ATA CTC GAG GCA ATA TCT TCA ACA GCA TGA CTG A -3'	XMAN1
XMAN1_FT7	5'- CTT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG ACC ACC ATG GCG GCC GCT CAG TTA ACG -3'	XMAN1
XEMD1_FT7	5'- CTT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG ACC ACC ATG GAA AAT TAT AAA CAC ATG -3'	Xemerin1
XEMD2_FT7	5'- CTT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG ACC ACC ATG GAA AAT TAT AAA CGC ATG -3'	Xemerin2
XLaminA_FT7	5'- CTT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG ACC ACC ATG GAG ACC CCA GGT CAG AAG -3'	Xlamin A
XMLNA_Myc5'Bgl	5'- GTC AGA TCT TAC CAC TCT CCC CCA CC -3'	Xlamin A
XMLNA_Myc3'Kpn	5'- TAA GGT ACC GGG CCC CCC CTC -3'	Xlamin A
XMLNA_F2Hind = XMAN1_F7Hind	5'- CAG AAG CTT CCC ACC ATG GCA TCA A -3'	Xlamin A

Bezeichnung	Sequenz	Zielgen
XMLNA_R2XhoI	5'- GCT CTC GAG TTA GCT TGG GCA CTT GGT -3'	Xlamin A
PMXMLNA_F	5'- CTG CAG GAG AAG GAA GAC CTG CAG GGG CTC AAT G -3'	Xlamin A
PMXMLNA_R	5'- CAT TGA GCC CCT GCA GgT CTT CCT TCT CCT GCA G -3'	Xlamin A
iXEMD174_F	5'- GCT GGG CCC CACACTACAGAAACAGATC TTCAAGAGA TCTGTTTCTGTAGTGTGTT GAG CTC TAA -3'	Xemerin1
iXEMD174_R	5'- TTA GAG CTC AACACACTACAGAAACAGA TCTCTTGAA GATCTGTTTCTGTAGTGTG GGG CCC AGC -3'	Xemerin1
iXEMD317_F	5'- GCT GGG CCC GAAAACACGTACCAGCCTT TTCAAGAGA GGCTGGTACGTGTTTTTCCT GAG CTC TAA -3'	Xemerin1
iXEMD317_R	5'- TTA GAG CTC AGGAAAACACGTACCAGCC TCTCTTGAA AAGGCTGGTACGTGTTTTC GGG CCC AGC -3'	Xemerin1
pcDNA3.1_seq5'	5'- ATG GAC TAT CAT ATG CTT ACC GTA -3'	pcDNA3.1
pcDNA3.1_seq3'	5'- GGA GGG GCA AAC AAC AGA -3'	pcDNA3.1
iXMAN1255_F	5'- GCT GGG CCC CACTGATCACCGTAATATC TTCAAGAGA TATTACGGTGATCAGTGTT GAG CTC TAA -3'	XMAN1
iXMAN1255_R	5'- TTA GAG CTC AACACTGATCACCGTAATA TCTCTTGAA GATATTACGGTGATCAGTG GGG CCC AGC -3'	XMAN1
iXMAN1846_F	5'- GCT GGG CCC AAATGGATTCAGCCATCTT TTCAAGAGA GATGGCTGAATCCATTTCT GAG CTC TAA -3'	XMAN1
iXMAN1846_R	5'- TTA GAG CTC AGAAATGGATTCAGCCATC TCTCTTGAA AAGATGGCTGAATCCATTT GGG CCC AGC -3'	XMAN1
PMXMLNA_F2	5'- TCG GTC GAC CGA GAT CTt ACC ACT CTC CCC CAC C -3'	Xlamin A
PMXMLNA_R2	5'- GGT GGG GGA GAG TGG TaA GAT CTC GGT CGA CCG A -3'	Xlamin A

## Lebenslauf

### **Persönliche Angaben**

---

Martin Alexander Gareiß  
geboren am 2. April 1976 in Marktheidenfeld  
Familienstand: verheiratet

### **Promotion**

---

09/2002 – 10/2006 am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie:  
„Molekulare Charakterisierung und entwicklungsspezifische  
Expression der Kernmembranproteine Emerin und XMAN1  
im Tiermodell *Xenopus laevis*“

### **Wissenschaftlicher Angestellter**

---

01/2002 – 08/2002 am Institut für Humangenetik:  
Aneignung molekularbiologischer Klonierungstechniken

04/2001 – 12/2001 am Lehrstuhl für Biotechnologie:  
Weiterführende Forschungsarbeiten am Diplomarbeitsthema

### **Hochschulausbildung**

---

06/2000 – 03/2001 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biotechnologie:  
„Nachweis der Biokompatibilität von Alginaten“

10/1996 – 03/2001 Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-  
Universität Würzburg mit den Studienschwerpunkten  
Biotechnologie, Biochemie und Zell- und  
Entwicklungsbiologie

### **Wehrdienst**

---

01/1996 – 10/1996 in Hammelburg

### **Schulbildung**

---

1995 Allgemeine Hochschulreife

1986 – 1995 am Balthasar-Neumann-Gymnasium in Marktheidenfeld

### **Lehrveranstaltung**

---

01-02/2006 Organisation und Durchführung eines Praktikums für  
Lehramtsstudenten

## Publikationsliste

**Gareiß, M., Eberhardt, K., Krüger, E., Kandert, S., Böhm, C., Zentgraf, H., Müller-Reible, C. R. and Dabauvalle, M. C.** (2005). Emerin expression in early development of *Xenopus laevis*. Eur J Cell Biol **84**, 295-309.