

**Molekulare Charakterisierung, Expressionsmuster und
Interaktionen der Lamina-assoziierten Polypeptide 2
(LAP2) in *Xenopus laevis***

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

vorgelegt von

Carmen Lang

aus

Karlsruhe

Würzburg 2002

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. G. Krohne

Gutachter: Prof. Dr. C. R. Müller-Reible

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung	1
<i>I.1. Zusammenfassung</i>	1
<i>I.2. Summary</i>	3
II. Einleitung	5
<i>II.1. Aufbau der Kernhülle</i>	5
<i>II.2. Lamine</i>	7
II.2.1. Molekulare Struktur der Laminmoleküle	7
II.2.2. Laminisotypen	8
II.2.3. Funktion der Lamine	9
<i>II.3. Integrale Membranproteine der inneren Kernmembran</i>	10
II.3.1. Der Lamin B Rezeptor	11
II.3.2. Lamina-assoziierte Polypeptide 1	12
II.3.3. Lamina-assoziierte Polypeptide 2	13
II.3.4. Emerin	17
II.3.5. MAN1	17
II.3.6. Nurim, Unc-84, Otefin und Young Arrest (YA)	18
<i>II.4. Genetisch bedingte Erkrankungen</i>	18
<i>II.5. Zielsetzung</i>	21
III. Ergebnisse	23
<i>III.1. Molekulare Charakterisierung des XLAP2</i>	23
III.1.1. Isolierung einer cDNA, die für ein Xenopus LAP2 codiert	23
III.1.2. Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der LAP2 cDNA	23
III.1.3. Analyse der Zusammensetzung und Eigenschaften des Proteins	26
III.1.4. Vergleich der Xenopus LAP2 Sequenz mit Datenbanksequenzen	27
III.1.5. In vitro Transkription und Translation der XLAP2 cDNA	29

III.1.6. Immunpräzipitation des XLAP2 mit MAN-Antikörper	31
III.1.7. Nachweis des XLAP2 in somatischen Zellen von <i>Xenopus laevis</i>	32
III.1.7.1. Nachweis der LAP2 Proteine in <i>Xenopus laevis</i>	32
III.1.7.2. Immunfluoreszenz auf <i>Xenopus</i> Kulturzellen	33
III.2. Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen XLAP2	33
III.2.1. Gewinnung des rekombinanten Proteins zur Immunisierung von Meerschweinchen	34
III.2.2. Test des polyklonalen XLAP2 Antikörpers	35
III.2.3. Test des Antikörpers auf Kreuzreaktionen	36
III.2.4. Test des Antikörpers auf verschiedenen <i>Xenopus</i> Geweben	37
III.3. Expressionsmuster des XLAP2	39
III.3.1. Unterschiedliche Isoformen des XLAP2	39
III.3.2. Expressionsmuster in verschiedenen <i>Xenopus</i> Geweben	43
III.3.3. Expressionsmuster in frühen Entwicklungsstadien	45
III.3.4. In vitro Transkription und Translation zweier Isoformen des XLAP2	46
III.4. Extraktionsverhalten der XLAP2 Proteine	48
III.5. Charakterisierung der XLAP2 Proteine in Zebrafisch <i>Danio rerio</i>	51
III.5.1. Sequenzvergleich der LAP2 Proteine in <i>Xenopus laevis</i> und Zebrafisch	52
III.5.2. Lokalisation der Zebrafisch LAP2 Proteine in Kulturzellen	55
III.5.2.1. Expression von Gesamt ZLAP2-GFP Fusionsproteinen	55
III.5.2.2. Expression von verkürzten ZLAP2-GFP Fusionsproteinen	57
III.6. Interaktionen und Bindungseigenschaften des XLAP2β	59
III.6.1. Biochemische Charakterisierung der Zellextrakte	60
III.6.1.1. Löslichkeit der Kernmembranproteine unter physiologischen Bedingungen	60
III.6.1.2. Fraktionierung der löslichen Proteine durch Saccharosegradienten-zentrifugation	61
III.6.1.3. Fraktionierung der Proteine durch Gelfiltrationschromatographie	62
III.6.2. Interaktionen des XLAP2-Proteins mit nukleären Proteinen	63
III.6.2.1. In vitro Bindungsstudien	64
III.6.2.2. In vivo Bindungsstudien	66
III.6.2.3. In vivo Bindungsstudien mit GFP-XLAP2 Konstrukten	67

III.7. Studien der carboxyterminalen Domäne des LAP2β in <i>Xenopus</i>, <i>Zebrafisch</i> und <i>Ratte</i>	76
III.7.1. In vivo Bindungsstudien	77
III.7.2. Verteilung des endogenen LAP2 β in transient transfizierten Zellen	79
IV: Diskussion	82
IV.1. Molekulare Identifizierung und Charakterisierung der LAP2 Proteine in <i>Xenopus laevis</i>	82
IV:1.1. Vergleich der LAP2 Isoformen in <i>Xenopus</i> und Zebrafisch	84
IV.2. Expressionsmuster der LAP2 Proteine in <i>Xenopus</i> im Vergleich zu anderen Spezies	86
IV.3. Bedeutung des LAP2ω in der Entwicklung	88
IV.4. Bindungseigenschaften des XLAP2β	90
IV.5. Bedeutung des XLAP2β für den Zellkern	93
IV.6. Perspektiven	93
V. Material und Methoden	95
V.1. Material	95
V.1.1. Geräte	95
V.1.2. Verbrauchsmaterial und Kits	96
V.1.3. Chemikalien und Zellkulturmedien	96
V.1.4. Häufig verwendete Puffersysteme und Medien	97
V.1.5. Kulturzellen	99
V.1.6. Enzyme	99
V.1.7. Antikörper	100
V.1.8. Bakterienstämme, Phagen und Vektoren	101
V.2. Methoden	102
V.2.1. Molekularbiologische Methoden	102
V.2.1.1. Isolierung von cDNA-Klonen aus einer Uni-ZAP cDNA Bibliothek	102
V.2.1.1.1. Vorbereitung und Infektion der Bakterien	102
V.2.1.1.2. Bestimmung des Phagentiters, Ausplattierung der Genbibliothek	

und Transfer der Phagen auf Nylonfilter	102
V.2.1.1.3. Radioaktive Markierung von DNA-Molekülen mit Hexanukleotiden als Primer („Random Prime“)	104
V.2.1.1.4. Absättigung der Nylonfilter, Hybridisierung und Exposition	104
V.2.1.1.5. Test radioaktiver Sonden im Slotblot	105
V.2.1.1.6. Auswertung der Autoradiogramme und Plaque-Isolierung	105
V.2.1.2. Amplifikation und Umklonierung der rekombinanten cDNA	106
V.2.1.3. DNA-Sequenzierung nach Sanger	107
V.2.1.4. DNA-Amplifikation mit Hilfe der PCR	109
V.2.1.5. DNA-Amplifikation mit Hilfe der RT-PCR	111
V.2.1.6. Präparation von Plasmid DNA	113
V.2.1.7. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA	114
V.2.1.8. Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese	115
V.2.1.9. Elution von DNA Molekülen aus Agarosegelen	116
V.2.1.10. DNA-Modifizierung durch Enzyme	117
V.2.1.10.1. Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	117
V.2.1.10.2. Ligation von DNA Molekülen	118
V.2.1.11. Klonierung	119
V.2.1.12. Herstellung kompetenter E. coli Zellen	121
V.2.1.13. Herstellung von Agarplatten	121
V.2.1.14. Transformation von Bakterien mit Plasmidvektoren und Ausplattierung	121
V.2.2. <i>Proteinbiochemische Methoden</i>	122
V.2.2.1. Expression rekombinanter Proteine in E. coli	122
V.2.2.2. Reinigung des rekombinanten Proteins	124
V.2.2.3. Proteinfällung	126
V.2.2.4. Gelelektrophoretische Proteinauftrennung	127
V.2.2.4.1. Eindimensionale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	127
V.2.2.5. Übertragung von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose- Membranen (Western Blot)	129
V.2.2.5.1. Immunologisches Proteinnachweisverfahren durch ECL	130
V.2.2.6. Entfernen von spezifisch gebundenen Antikörpern von der Nitrocellulose	131
V.2.2.7. Herstellung eines polyklonalen Antikörpers	132
V.2.2.8. Gewinnung eines Gesamtproteinextraktes aus Kulturzellen	132
V.2.2.9. Proteinauftrennung durch Saccharosegradientenzentrifugation und Gelchromatographie	133
V.2.2.10. Extraktion von Proteinen	134

V.2.2.11. In vitro Translation und Transkription	135
V.2.2.12. Immunpräzipitation	136
V.2.2.13. In vitro Bindungsexperimente mit GST-Fusionsproteinen	137
<i>V.2.3. Zellkulturmethoden</i>	138
V.2.3.1. Kultur von Xenopus XLKE-A6 Zellen bzw. Ceropithecus aethiops COS-7 Zellen	138
V.2.3.2. Transfektion der Kulturzellen	140
V.2.3.3. Gewinnung einer permanent-transfizierten Zelllinie	141
V.2.3.4. Vorbereitung transfizierter Zellen für die SDS-PAGE	142
V.2.3.5. Radioaktive Markierung von COS-7 Zellen	142
<i>V.2.4. Lichtmikroskopische Methoden</i>	143
V.2.4.1. Herstellung der Präparate für die Immunfluoreszenz	143
V.2.4.1.1. Fixierung von Zellen	143
V.2.4.1.2. Antikörperinkubation	144
V.2.4.2. Analyse von Zellen am konfokalen Laser Scanning Mikroskop	145
VI. Literaturverzeichnis	146
VII. Anhang	156
VII.1. Abkürzungen	156
VII.2. Verwendete Primer	158
Lebenslauf	161
Publikationsliste	163
Danksagung	164
Ehrenwörtliche Erklärung	165

I. Zusammenfassung

I.1. Zusammenfassung

Lamina-assoziierte Polypeptide 2 (LAP2) in Vertebraten sind bis auf zwei Ausnahmen integrale Membranproteine der inneren Kernmembran, die durch unterschiedliches Spleißen eines einzigen Gens entstehen. Während die aminoterminalen Domäne, die allen LAP2 Isoformen gemeinsam ist, in Interphasezellen mit Chromatin und dem DNA-Bindungsprotein BAF interagiert, beinhaltet der carboxyterminale Bereich die Lamin Bindungsdomäne und eine Transmembrandomäne. Diese beiden carboxyterminalen Domänen bewirken die Lokalisation der Proteine an die Kernhülle. In dieser Arbeit konnten drei LAP2 Isoformen von *Xenopus laevis* molekular charakterisiert werden, die alle integrale Membranproteine sind. In somatischen Zellen werden vorwiegend die beiden Isoformen LAP2 γ und LAP2 β exprimiert, in frühen Entwicklungsstadien dagegen die größte Isoform, das LAP2 ω .

In allen bekannten funktionellen Domänen weisen die LAP2 Proteine von *Xenopus* eine hohe Sequenzübereinstimmung mit den LAP2 Proteinen in Säugern auf. Allerdings finden sich in *Xenopus* zusätzliche Isoform-spezifische Proteindomänen, die zwischen der aminoterminalen Domäne und der Lamin Bindungsdomäne eingeschoben sind.

Eine dem *Xenopus* LAP2 ω im Aufbau und in der Expression vergleichbare Isoform wurde bisher nur beim Zebrafisch nachgewiesen. Auch die somatisch exprimierten LAP2 Isoformen des Zebrafisch (ZLAP2 β und ZLAP2 γ) entsprechen den beiden somatischen *Xenopus* Isoformen. Um Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den drei LAP2 Isoformen feststellen zu können, wurden die Proteine des Zebrafischs als GFP Fusionsproteine in *Xenopus* A6 Zellen exprimiert. ZLAP2 ω und LAP2 β wurden vorwiegend an mitotische Chromosomen gebunden, dagegen war der größte Teil des ZLAP2 γ im Cytoplasma verteilt. Mutanten der drei Proteine, denen jeweils die Lamin Bindungsdomäne einschließlich der Transmembrandomäne fehlte, zeigten dasselbe Verhalten. Somit scheinen diese β - und ω -spezifischen Domänen Chromatin-Bindungseigenschaften zu besitzen.

In Amphibien liegt das XLAP2 β in der Interphase in einem Proteinkomplex mit A- und B-Typ Laminen vor. Diese Proteinkomplexe konnten durch Immunpräzipitationen von GFP-XLAP2 β Fusionsproteinen mit GFP Antikörpern nachgewiesen werden. Die Extrakte für die Immunpräzipitationen wurden aus stabil transfizierten *Xenopus* A6 Zelllinien gewonnen. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit in vitro Bindungsstudien mit GST- XLAP2 β Fusionsproteinen. Für die Bildung des Lamin-LAP2 β Proteinkomplexes und auch für die korrekte Lokalisation des Proteins an die Kernhülle reicht ein in Vertebraten hochkonservierter Bereich von 36 Aminosäuren in Kombination mit der

Transmembrandomäne aus. Zudem scheint diese kurze carboxyterminale LAP2 β Sequenz in *Xenopus*, Zebrafisch und Ratte mit dem endogenen LAP2 β um Bindungsstellen in der Kernlamina zu konkurrieren. Sowohl in Amphibien- wie auch in Säugerzellen konnte in transient transfizierten Zellen eine beträchtliche Verminderung des endogenen LAP2 β beobachtet werden, ohne dass dabei die Kernmorphologie und die Verteilung anderer Kernmembranproteine beeinträchtigt wurde. Somit scheint die Lamin-Bindungsdomäne des LAP2 β in Vertebraten stark konserviert zu sein.

I.2. Summary

Lamina-associated polypeptides 2 (LAP2) in vertebrates are, except for two mammalian isoforms, integral membrane proteins of the inner nuclear membrane which are generated by alternative splicing from a single gene. Whereas the aminoterminal domain, which is common for all LAP2 isoforms, interacts with chromatin and the DNA-binding protein BAF in interphase cells, the carboxyterminal region contains the lamin binding domain and a transmembrane domain. Both carboxyterminal domains are responsible for the localisation of the proteins in the nuclear envelope. In this work three LAP2 isoforms of *Xenopus laevis* were molecularly characterised, all of them being integral membrane proteins. In somatic cells the two predominant isoforms are LAP2 γ and LAP2 β , whereas in early developmental stages only the largest isoform LAP2 ω can be found.

In all known functional domains, the LAP2 proteins of *Xenopus* show a high sequence homology to the LAP2 proteins of mammals. But in *Xenopus*, additional isoform-specific domains can be found which are inserted between the aminoterminal domain and the lamin binding domain.

Only in zebrafish, an isoform comparable in structure and expression pattern to the *Xenopus* LAP2 ω can be found. Also the LAP2 isoforms characteristic for somatic cells of zebrafish (LAP2 β and LAP2 γ) correspond to the two somatic *Xenopus* isoforms. To enable the investigation of differences and similarities between the three LAP2 isoforms, the zebrafish proteins were expressed as GFP fusion proteins in *Xenopus* A6 cells. ZLAP2 ω and ZLAP2 β were mainly bound to mitotic chromosomes, whereas ZLAP2 γ was mostly distributed in the cytoplasm. Mutants of the three proteins which were lacking the lamin binding region and the transmembrane domain, showed the same behaviour. It seems therefore that the ω - and β -specific domains mediate chromatin binding.

In interphase cells of amphibian XLAP2 β is part of a protein complex also containing A- and B-type lamins. The existence of these protein complexes could be demonstrated by immunoprecipitations of GFP-LAP2 β fusion proteins with GFP antibodies. The extracts used for these immunoprecipitations were prepared from stably transfected *Xenopus* A6 cell lines. These results correspond to the results obtained by in vitro binding studies with GST-XLAP2 β fusion proteins. In vertebrates a short, highly conserved region of 36 amino acids in combination with the transmembrane domain, is sufficient for the formation of the lamin-LAP2 β protein complex as well as for the correct localisation of the proteins to the nuclear envelope. Moreover, it seems that this short carboxyterminal sequence of LAP2 β in *Xenopus*, zebrafish and rat competes with endogenous LAP2 β for the same binding sites in the nuclear lamina. In amphibian as well as in mammalian cells a significant reduction of the

endogenous LAP2 β can be seen in transiently transfected cells. The nuclear morphology and the distribution of other nuclear components seems to be unchanged. Therefore it can be concluded that the lamin binding domain of LAP2 β is highly conserved in vertebrates.

II. Einleitung

II.1. Aufbau der Kernhülle

Im Gegensatz zur prokaryotischen Zelle besitzen eukaryotische Zellen einen Zellkern, der ca. 10 % des Zellvolumens ausmacht und das Nukleoplasma räumlich vom Cytoplasma trennt. Der Nukleus als wichtiges Zellkompartiment beinhaltet das Hauptgenom der Zelle und ist u.a. Ort der DNA- und RNA-Synthese, der RNA-Prozessierung und der Ribosomenbildung. Diese räumliche Trennung, die durch die den Kern umgebende Kernhülle gewährleistet ist, bietet der langen und fragilen DNA Schutz und verhindert eine vorzeitige Translation der RNA.

Die Kernhülle lässt sich in drei Kompartimente einteilen:

I) Die äußere Kernmembran, die mit dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) in Verbindung steht und mit Ribosomen besetzt ist;

II) Die Porenmembran, die die äußere mit der inneren Kernmembran verbindet und dem Stoffaustausch zwischen Cyto- und Nukleoplasma dient. Der ungefähr 15 nm lange Porenkanal besitzt einen Durchmesser von ca. 9 nm und erlaubt so die freie Diffusion kleinerer Moleküle. Größere Moleküle werden durch einen aktiven Transportmechanismus in und aus dem Kern transportiert. Eine typische Säugerzelle besitzt etwa 3000 – 4000 Porenkomplexe, die die gesamte Oberfläche der Kernhülle überziehen.

III) Die innere Kernmembran ist zwar durch ihre Phospholipidmobilität sowie der Lipidzusammensetzung der äußeren Kernmembran sehr ähnlich (Schindler et al., 1985), strukturell und funktionell unterscheidet sie sich jedoch von den anderen Membransystemen. Zum einen ist sie mit einer netzartigen Proteinschicht, der nukleären Lamina, überzogen, zum anderen besitzt sie spezifische integrale Membranproteine, welche die Kernmembran mit der Lamina und dem Chromatin verbinden (Abb.2-1; Übersichten in Gruenbaum et al., 2000; Dechat et al., 2000a; Ye et al., 1998; Collas and Courvalin, 2000; Cohen et al., 2001).

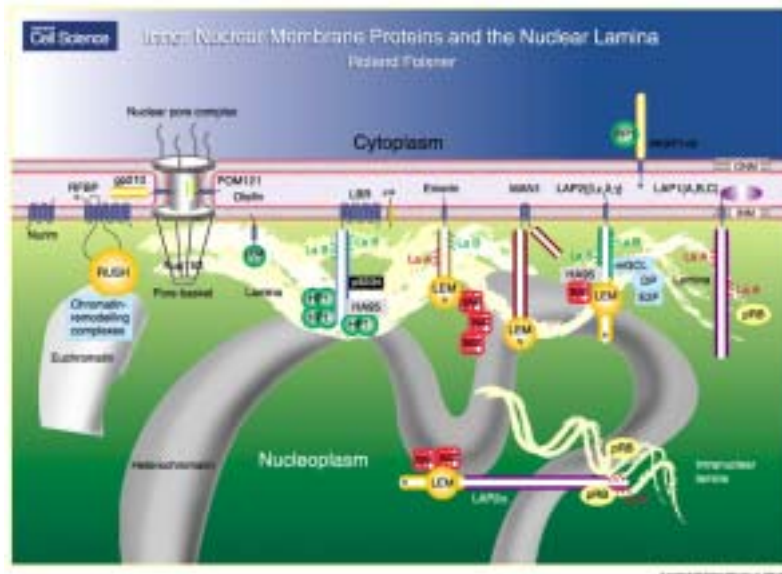


Abb. 2-1: Übersicht der Kernhülle nach R. Foisner, 2001.

Eine Besonderheit der Kernhülle höherer Eukaryoten ist ihre Fähigkeit, sich während der Mitose aufzulösen und sich danach um die Tochterchromosomen wieder neu zu bilden (Übersichten in Buendia et al., 2001; Moir et al., 2000;). Eingeleitet durch Mitose-spezifische Phosphorylierung der Lamina-bildenden Lamine sowie der Lamin-bindenden Proteine zerfällt der Nucleus beim Einsetzen der Mitose. Video-mikroskopische Untersuchungen von GFP-markierten Proteinen wie auch konfokale Immunfluoreszenz und immunelektronenmikroskopische Untersuchungen haben ergeben, dass die Kernhülle dabei ihre Identität als eigenständiges Membransystem innerhalb des ER verliert und integrale Membranproteine der inneren Kernmembran, inkl. LAP2 β , LAP1 und Lamin B Rezeptor (LBR) vollständig in den ER-Membranen verteilt vorliegen (Yang et al., 1997; Ellenberg et al., 1997). Allerdings gibt es auch kontroverse Studien, nach denen die integralen Membranproteine während der Mitose in distinkten Vesikelpopulationen vorliegen sollen (Buendia und Courvalin, 1997; Chaudhary und Courvalin, 1993; Maison et al., 1997). Am Ende der Mitose bilden sich Membranvesikel an der Chromosomenoberfläche, die durch darauf folgende Fusion wieder zu einer vollständig geschlossenen Kernhülle führen. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass sich die integralen Membranproteine LAP1 und LAP2 (Foisner und Gerace, 1993; Maison et al., 1997) sowie LBR (Chaudhary und Courvalin, 1993; Ellenberg et al., 1997) in diesen frühen Stadien der Neubildung der Kernhülle an den Chromosomen befinden und somit die Kernhüllenreubildung am Ende der Mitose verstärken (Übersicht in Georgatus und Theodoropoulos, 1999). Ein Teil der Lamina bindet zu einem späteren Zeitpunkt an die Chromosomen, während der Großteil der Lamina erst nach Wiederherstellung der Kernhülle in die Lamina eingebaut wird.

II.2. Lamine

Die Lamine gehören zur Familie der Intermediärfilamente und besitzen eine molekulare Masse von 60 – 80 kD. Sie bilden das Hauptstrukturelement der nukleären Lamina, einem aus Proteinfibrillen bestehenden Netzwerk (Übersichten in: Krohne, 1998; Gant und Wilson, 1997; Gruenbaum et al., 2000; Wilson et al., 2001). Die Lamina erstreckt sich auf der nukleoplasmatischen Seite der Kernhülle im Bereich zwischen den Kernporen, wobei sie durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der nukleoplasmatischen Seite des Porenkomplexes verbunden ist. Ein Teil der Lamine befindet sich allerdings im Kerninneren, wo sie in stabilen Strukturen angeordnet sind und dynamische Loci bilden (Moir et al., 1994; Broers et al., 1999; Dechat et al., 2000b). Die Lamine verleihen der Kernhülle mechanische Stabilität (Newport et al., 1990; Lenz-Böhme et al., 1997; Übersicht in Krohne, 1998) und sind an mehreren funktionellen Aufgaben des Kerns beteiligt, wie z.B. postmitotische Reorganisation des Kerns, einschließlich Chromatidekondensation und DNA-Replikation (Stuurman et al., 1998; Hutchinson et al., 1994; Moir et al., 2000; Lopez-Soler et al., 2001; Übersicht in Benavente, 1991) sowie an apoptotischen Vorgängen (Übersicht in: Cohen et al., 2001; Goldman et al., 2002).

II.2.1. Molekulare Struktur der Laminmoleküle

Die Lamine setzen sich aus drei strukturellen Domänen zusammen (Abb. 2-2): der zentralen helikalen Stabdomäne (354 Aminosäuren), einer kurzen, nichthelikalen aminoterminalen Domäne (Kopfdomäne; 26-55 Aminosäuren) und einer langen carboxyterminalen Schwanzdomäne (160 – 260 Aminosäuren). Die helikale Stabdomäne besteht aus Heptadwiederholungen mit hydrophoben Aminosäuren an erster und vierter Stelle, wodurch die typische coiled-coil Struktur entsteht (Übersicht in McKeon, 1987). Diese Domäne (unterteilt in 1A, 1B, 2) ist wichtig für die Dimerisierung und longitudinale Zusammenlagerung der Homodimere und ist flankiert von Phosphorylierungsstellen, die während der Mitose von der p34/cdc2 Kinase phosphoryliert werden und somit zur Depolymerisation der Lamine und zur Auflösung der Lamina führt. Die carboxyterminale Domäne ist globulär aufgebaut (Krimm et al., 2002; Dhe-Paganon et al., 2002) und beinhaltet ein Kernlokalisierungssignal (NL) sowie ein für die Interaktion mit der Kernmembran wichtiges Tetrapeptid (CxxM; C = Cystein, x = beliebige Aminosäure, M = Methionin). Während oder unmittelbar nach der Translation bilden die Lamine Homodimere (Krohne et al., 1987) und das CxxM Motiv wird farnesyliert. Als Dimere gelangen die Lamine in den Kern, wo die farnesylierten Cysteine die Bindung an die innere Kernhülle vermitteln (Kitten and Nigg, 1991; Krohne et al., 1989; Holtz et al., 1989).

Dort bilden die Lamine Polymere durch „head-to-tail“- Anlagerung und anschließender antiparalleler Anordnung (Übersicht in Krohne, 1998).

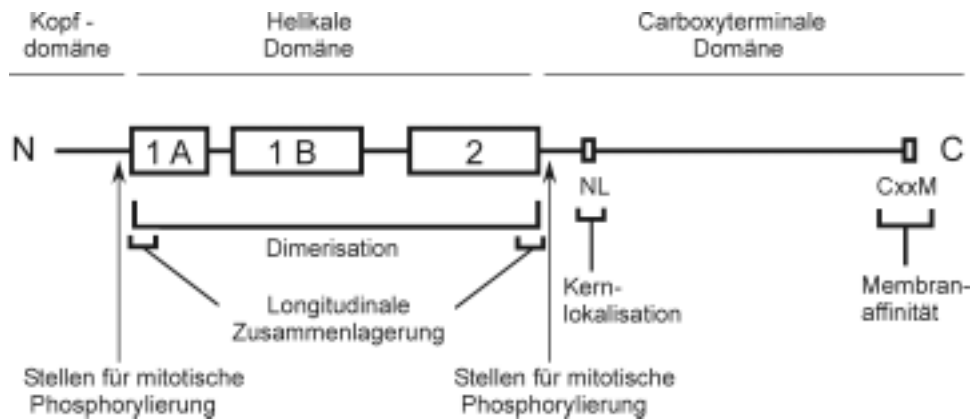


Abb. 2-2: Funktionelle Domänen des Laminmoleküls; nach Krohne, 1998.

Kernlokalisierung (NL), Interaktion mit der inneren Kernmembran (CxxM Motiv; Membranaffinität), Schritte der Polymerbildung (Dimerisation, longitudinale Zusammenlagerung), Zerfall der Polymere (Mitotische Phosphorylierungsstellen sind durch Pfeile markiert).

N, Aminoterminus; C, Carboxyterminus.

II.2.2. Laminisotypen

Es werden zwei Hauptisotypen bezüglich ihres Verhaltens während des Zellzyklus unterschieden (Gerace and Blobel, 1980): Die B-Typ Lamine bleiben während der Mitose mit Membranen assoziiert, während die A-Typ Lamine lösliche Oligomere bilden. Die Membranbindung der B-Typ Lamine erfolgt dabei über das farnesylierte und carboxymethylierte Cystein des CxxM Motivs, welches bei den A-Typ Laminen entweder während der Reifung proteolytisch entfernt wird (Lamin A) bzw. von Anfang an fehlt (Lamin C).

In Vertebraten sind drei Lamingene bekannt (LMNA, LMNB1, LMNB2), die für 7 alternativ gespleißten Isoformen codieren. Die A-Typ Lamine A, A Δ 10, C und C2 stammen vom LMNA Gen ab (Fisher et al., 1986; McKeon et al., 1986; Furukawa et al., 1994; Machiels et al., 1996; Übersicht in Goldman et al., 2002), während das LMNB1 Gen für das Lamin B1 und das LMNB2 Gen für die Lamine B2 und B3 codieren (Pollard et al., 1990; Biamonti et al., 1992; Furukawa und Hotta, 1993; Stuurman et al., 1996). Alle Vertebratenzellen exprimieren mindestens ein B-Typ Lamin, wohingegen die A-Typ Lamine A, A Δ 10 und C entwicklungspezifisch reguliert und zuerst in differenzierten Zellen exprimiert werden (Rober

et al., 1989; Machiels et al., 1996). Die Lamine C2 und B3 sind nur Keimbahn-spezifisch (Furukawa und Hotta, 1993; Furukawa et al., 1994; Alsheimer et al., 1999).

II.2.3. Funktion der Lamine

Durch ihre netzartige Anordnung an der inneren Kernmembran tragen die Lamine wesentlich zur Struktur und Stabilität des Zellkerns bei. Die Immundepletion von Laminen aus *Xenopus* Kernrekonstitutionsextrakten führt zur Bildung von kleinen Kernen (Meier et al., 1991; Newport et al., 1990) und die Expression von Spermien-spezifischem Lamin in somatischen Zellen bewirkt eine gebogene Verformung dieser Kerne (Furukawa und Hotta, 1993). In *Drosophila* verursacht eine reduzierte Expression des Lamins Dmo (= B-Typ Lamin bei Vertebraten) eine Einschränkung der Bewegung sowie neuromuskuläre Defekte mit defekten Kernhüllen, abnorme Ansammlung von Kernporenkomplexen (NPC) sowie Akkumulation von Annulate Lamellae (Lenz-Böhme et al., 1997).

Während der Mitose sorgen die Lamine für die ordnungsgemäße Auflösung wie auch spätere Neubildung der Kernlamina. Durch die Phosphorylierung der Lamine in der Prophase (Lamin A/C) bzw. Prometaphase (Lamin B) durch p34/cdc2-Kinase wird ihre Stabilität aufgehoben und die Kernlamina zerfällt, was eine Auflösung der Kernhülle zur Folge hat (Dessev et al., 1991; Gerace und Blobel, 1980; Newport und Spann, 1987; Ottaviano und Gerace, 1985; Peter et al., 1990; Übersicht in: Moir et al., 2000). Bei der Kerneubildung nach Abschluss der Mitose ist allerdings nur ein kleiner Teil der Lamine beteiligt, der größte Teil wird erst nach Bildung der Kernhülle und nach richtiger Anordnung der NPC in die Kernlamina eingebaut. Erst durch eine vollständige und intakte Kernlamina kann die Zelle ihren Zellzyklus fortsetzen (Benavente und Krohne, 1986; Übersicht in Gant und Wilson, 1997). Die Lamine sind auch an der postmitotischen Reorganisation des Kerns beteiligt, wie z.B. der Chromatindekondensation sowie der DNA-Replikation. Durch spezifische Interaktionen mit Chromatin sowie mit Histonen und HP1 (Heterochromatin Protein 1) wirken Lamine auf die räumliche Anordnung sowie Funktion des Chromatins ein (Goldberg et al., 1999; Taniura et al., 1995).

Eine wachsende Zahl von Transkriptionsfaktoren ist an der Kernhülle lokalisiert. So kolokalisiert der Transkriptionsfaktor Oct-1, dessen POU-Domäne das Kollagenase-Gen reprimiert, mit Lamin B (Imai et al., 1997), wie auch das transkriptionshemmende Retinoblastoma Protein mit Lamin A/C. Durch Translokation von der Kernperipherie ins Kerninnere werden diese Transkriptionsfaktoren aktiviert und aktivieren dadurch wiederum die Transkription bestimmter Gene. Somit scheinen die Transkriptionsfaktoren durch Interaktionen mit den Laminen in ihrer Aktivität gehemmt zu werden. Interessant ist dabei auch die Lokalisation des Heterochromatins an der Kernhülle. Dieses Chromatin ist stark

kondensiert, spät replizierend und transkriptionell inaktiv. Zytologische Studien zeigen, dass große Mengen an kondensiertem Chromatin, einschließlich Centromere und Telomere, an der inneren Kernmembran zu finden sind (Qumsiyeh, 1999). Auch das in weiblichen Säugerzellen inaktivierte X-Chromosom befindet sich an der Kernhülle, während das aktive X-Chromosome sich in das Kerninnere erstreckt (Kay und Johnston, 1973). Dadurch scheint die Lokalisation an der Kernhülle nicht nur für gewisse Proteine, sondern auch auf das Chromatin hemmend zu wirken.

Eine intakte Lamina ist auch für die DNA-Replikation notwendig. Dies konnte u.a. durch Versuche mit *Xenopus* Eiextrakten und dominant negativen Laminmutanten gezeigt werden (Spann et al., 1997). Die Zugabe der mutierten Lamine zum Eiextrakt verhinderte die Polymerisation der endogenen Lamine an der inneren Kernmembran, während die Neubildung der Kernmembran sowie der Kernporenkomplexe unbeeinflusst blieb. Die Störung der Laminabildung führte zum Stillstand der DNA-Replikation. Zusätzlich konnten zwei Faktoren, die für die Elongationsphase der DNA-Replikation benötigt werden, PCNA und RFC, in Aggregaten mit den Laminen gefunden werden. Somit scheinen die Lamine einen signifikanten Einfluss auf die DNA-Replikation, insbesondere auf die Elongationsphase, zu haben.

Lamine spielen auch bei der Apoptose (=programmierter Zelltod) eine wichtige Rolle. Bei der Apoptose wird die Zelle sowohl im Kern wie auch im Cytoplasma dramatisch verändert. Kaspasen (=substrat-spezifische Cystein-Proteasen) schneiden spezifische Proteine und bewirken so ihre Degradation. Lamine werden recht früh im apoptotischen Prozess degradiert, noch vor bestimmten integralen Membranproteinen wie LBR und LAP2 (Buendia et al., 1999; Duband-Goulet et al., 1998). Die Degradation der Lamine bewirkt die anschließende Loslösung des Chromatins von der Kernhülle und leitet so deren Degradierung ein. Zellen, die Lamine A und B exprimierten, die nicht von Kaspasen geschnitten werden konnten, verzögerten die Apoptose um 12-16 Stunden, das Chromatin konnte sich allerdings auch dann nicht von der Kernhülle lösen (Rao et al, 1996). Somit scheint die Degradation der Lamine ein wichtiger Schritt im apoptotischen Prozess zu sein. Zusätzlich spielen die Lamine in verschiedenen menschlichen Krankheiten eine wichtige Rolle, auf die ich in II-4 näher eingehen werde.

II.3. Integrale Membranproteine der inneren Kernmembran

Die integralen Membranproteine der inneren Kernmembran tragen durch ihre Vielfältigkeit und Interaktionen mit den Laminen, mit Chromatin und mit anderen Kernkomponenten entscheidend zur Struktur, Organisation und Funktion der Kernhülle, der Kernmatrix sowie

des Chromatins mit bei. Die Komplexität der Lamina und der mit ihr assoziierten Proteine nimmt in höheren Organismen zu, so sind z.B. in Hefe weder Lamine noch integrale Membranproteine der inneren Kernmembran bekannt (Cohen et al., 2001). Je höher entwickelt ein Organismus ist, desto vielfältiger und komplexer ist der Aufbau der Kernhülle und insbesondere der inneren Kernmembran. Bisher sind eine Reihe integraler Membranproteine bekannt wie der Lamin B Rezeptor (LBR), Lamina-assoziierte Proteine 1 und 2, Emerin, MAN1, Nurim, Otefin, Young Arrest (YA) und UNC-84 (Übersicht in Holmer und Worman, 2001; Georgatus, 2001; Vlcek et al., 2001). Diese Proteine werden an Ribosomen synthetisiert, die an das Endoplasmatische Reticulum gebunden sind und gelangen durch laterale Diffusion in die innere Kernmembran, wo sie durch Interaktionen mit anderen Kernhüllenkomponenten dort verankert werden (Blobel, 1980; Furukawa et al., 1995; Soullam und Worman, 1993 und 1995; Ellenberg et al., 1997; Smith und Blobel, 1993; Östlund et al., 1999; Tsuchiya et al., 1999). Allen gemeinsam ist ein ins Kernlumen ragendes aminotermiales Ende, Modifikationen durch verschiedene Kinasen, häufige Assoziation mit der Kernlamina und / oder Chromatin sowie hydrophile Enddomänen zur Rekrutierung spezifischer Proteine an die Kernhülle. Einige dieser Membranproteine (LAP1, LAP2, MAN1, Emerin) besitzen zusätzlich eine kurze, α -helikale Domäne (Martin et al., 1995).

II.3.1. Der Lamin B Rezeptor

Dieses bisher am besten charakterisierte Protein der inneren Kernmembran besteht aus einem hydrophilen, ins Kernlumen ragenden Aminoterminus und einem hydrophoben Carboxyterminus mit vermutlich 8 membrandurchspannenden Domänen (Worman et al., 1990; Ye and Worman, 1994). Der stark basische aminotermiale Bereich besitzt mehrere Serin / Arginin Motive (SR Motive), die für spezifische Phosphorylierungen sowie für Protein-Protein Interaktionen wichtig sind. Dabei scheinen beim menschlichen **Lamin B Rezeptor** (LBR) die ersten 60 Aminosäuren kritisch für die Interaktion mit B-Typ Laminen zu sein (Lin et al., 1996), während die Aminosäuren 70 -100 mit DNA interagieren (Ye und Worman, 1994), bevorzugt mit linker-DNA, wobei diese Interaktion durch die kondensierte Struktur dieser DNA gefördert wird (Duband-Goulet und Courvalin, 2000). Außerdem interagiert LBR über die Aminosäuren 97-174 mit dem menschlichen Chromodomänen-Protein Hp1 (=Heterochromatin Protein 1; Ye und Worman, 1996; Ye et al., 1997). Wie der Name schon sagt, ist dieses Chromodomänen-Protein mit transkriptionell inaktivem Chromatin assoziiert. Durch diese Interaktion könnte das sich an der Kernperipherie befindende Heterochromatin an die Kernhülle verankert werden. Während der Mitose wird der Lamin B Rezeptor durch Proteinkinasen phosphoryliert und verliert somit seine Interaktionen mit Lamin B, Chromatin und HP1 (Courvalin et al., 1992). Er bleibt aber mit Membranvesikeln assoziiert und

akkumuliert am Ende der Mitose an den Chromosomen, wodurch er am Transport von Membranen zur Chromatinoberfläche beteiligt ist.

Durch eine auffällige Homologie des LBRs mit Sterol C14 Reduktase SR1 und SR2 in Vertebraten, Hefe und Pflanzen (Holmer et al., 1998) wird über eine Beteiligung des LBR an der Cholesterin Synthese in Säugern spekuliert, welche z.T. an der inneren Kernhülle stattfindet. Allerdings könnte der Lamin B Rezeptor auch als Rezeptor für Sterol Signalmoleküle des Zellzyklus dienen und somit an deren Inaktivierung beteiligt sein (Silve et al., 1998).

Der Lamin B Rezeptor ist Teil eines großen Proteinkomplexes (Simos und Georgatos, 1992, 1994). Dieser Komplex, der aus kernhaltigen Vogelerythrocyten isoliert wurde, besteht aus A- und B-Typ Laminen, einer spezifischen Kinase (LBR Kinase) und zwei weiteren Polypeptiden mit einem Molekulargewicht von 34 kD (p34) und 18 kD (p18). Ob dieser Komplex in anderen Zellen vorkommt und wie er sich während der Mitose verhält, ist noch nicht geklärt.

II.3.2. Lamina-assoziierte Polypeptide 1

Lamina-assoziierte Polypeptide 1 (LAP1A, B und C) sind Typ II Membranproteine, bestehend aus einer nukleoplasmatischen aminoterminalen Domäne, einer transmembrandurch-spannenden Domäne sowie einer kurzen carboxyterminalen Region, welche in den perinukleären Raum ragt. Bei diesen drei Proteinen, die eine molekulare Masse von 55 – 75 kD besitzen, handelt es sich wahrscheinlich um differentiell gespleißte Produkte eines Gens (Senior und Gerace, 1988; Foisner und Gerace, 1993), wobei bisher nur die cDNA für das LAP1C kloniert werden konnte (Martin et al., 1995). Alle Proteine interagieren mit einer spezifischen, Calcium-abhängigen Kinase sowie mit A- und B-Typ Laminen, dies allerdings mit unterschiedlicher Affinität (Maison et al, 1997). Außerdem besitzen LAP1A und LAP1B ein 27-Aminosäuren langes coiled-coil Motiv, welches zu LAP1-LAP1 Interaktionen führen könnte (Martin et al., 1995). Immunelektronische Mikroskopie zeigt LAP1 Ansammlungen, welche sich in regelmäßiger Anordnung an der Kernhülle entlang ziehen (Maison et al., 1997). Während der Mitose werden die Proteine phosphoryliert und die Assoziation mit der Kernlamina wird dadurch unterbrochen, allerdings bleiben sie mit Membranvesikeln assoziiert (Foisner und Gerace, 1993).

Die Expression der LAP1 Proteine ist entwicklungspezifisch. Zusammen mit der Isoform-spezifischen Affinität an A und B-Typ Lamine könnten LAP1 A, B und C an entwicklungspezifischen Regulationen der Kernstruktur beteiligt sein.

II.3.3. Lamina-assoziierte Polypeptide 2

Die Lamina-assoziierten Polypeptide 2 (LAP2) sind polymorphe Proteine, die beim Menschen aus mindestens drei, bei der Maus aus mindestens sieben und bei *Xenopus* aus mindestens drei Isoformen bestehen. Sie alle sind Spleißprodukte eines Gens (Harris et al., 1994; Berger et al., 1996; Lang et al., 1999; Gant et al., 1999; Übersicht in Dechat et al., 2000a). Entdeckt wurden diese Proteine 1989 durch einen monoklonalen Antikörper, der gegen Kernhüllenfraktionen von Rattenleberkernen gerichtet war (Senior und Gerace, 1989; Foisner und Gerace, 1993). Das ca. 55 kD große Protein war in den Triton / Salz resistenten Lamina-Fraktionen stark angereichert, was ihm den Namen Lamina-assoziiertes Protein 2 (LAP2) einbrachte. Klonierung des Proteins sowie Sequenzvergleiche mit der cDNA des LAP2 des Menschen und der Ratte zeigten, dass es sich hierbei um die β -Isoform der drei häufig vorkommenden menschlichen LAP2 Isoformen LAP2 α , β und γ handelte (Furukawa et al., 1995; Harris et al., 1994, 1995). LAP2 β ist ein Typ II integrales Protein der inneren Kernmembran und besitzt eine lange, aminoternale Domäne, die ins Kernlumen ragt, eine kurze, hydrophobe transmembrandurchspannende Region sowie ein kurzes carboxyterminales Segment, das in den perinukleären Raum ragt. Die kleineren Isoformen γ , δ und ϵ sind dem LAP2 β strukturell sehr ähnlich, bis auf eine Verkürzung der aminoternalen Domäne um 109, 72 bzw. 40 Aminosäuren. LAP2 ξ ist die kleinste Isoform, der nicht nur ca. 190 Aminosäuren der aminoternalen Domäne, sondern auch die Transmembran- und carboxyterminale Domäne fehlen. LAP2 α unterscheidet sich strukturell und funktionell sehr von allen übrigen LAP2 Proteinen. Zwar ist es in den ersten 187 Aminosäuren mit den anderen LAP2 Isoformen identisch, danach aber schließt sich eine α -spezifische Sequenz von 506 Aminosäuren ohne Transmembrandomäne an. Dadurch findet sich LAP2 α im Kern verteilt vor, unter Aussparung des Nukleolus (Dechat et al., 1998). In *Xenopus* konnte bisher keine α -spezifische Isoform nachgewiesen werden. Alle drei bis jetzt bekannten *Xenopus* LAP2 Proteine besitzen eine Transmembrandomäne und sind somit an der inneren Kernmembran lokalisiert.

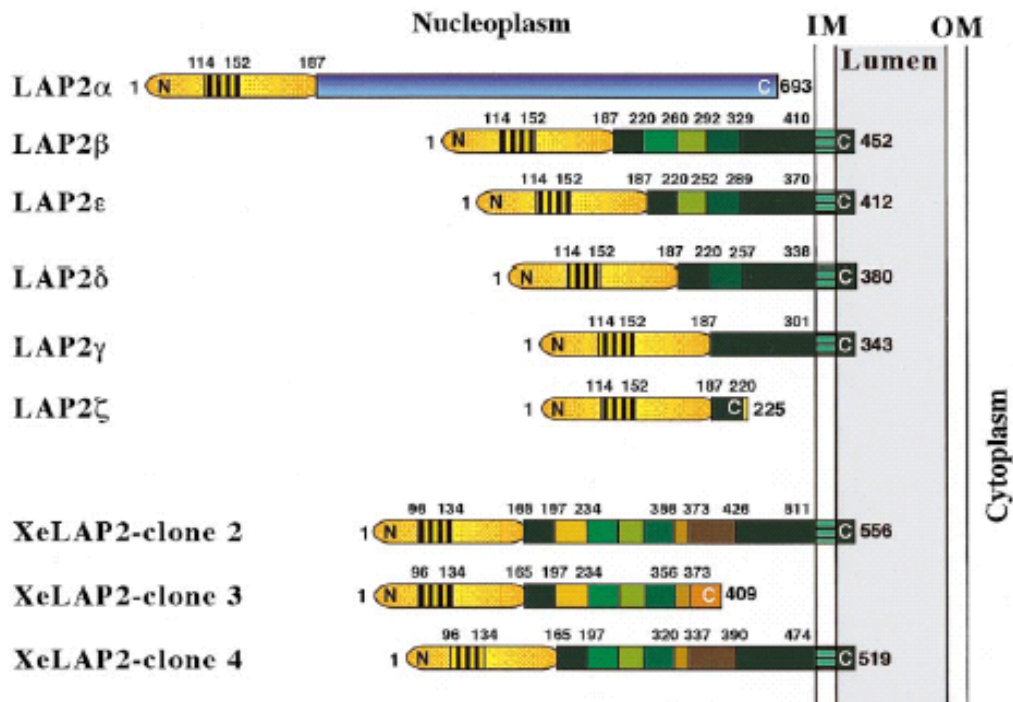


Abb.2-3: Strukturelle Organisation und funktionelle Domänen der LAP2 Isoformen in Mensch und Xenopus (nach Dechat et al., 2000a). Sechs alternativ gespleißte LAP2-Isoformen wurden in Säugerzellen identifiziert, drei in Xenopus. Die meisten Isoformen sind strukturell verwandt und unterscheiden sich nur durch kleinere Insertionen in der nukleoplasmatischen Domäne (grün markiert). Die konservierte LEM-Domäne ist schraffiert dargestellt.

Allen Isoformen gemeinsam ist eine hochkonservierte aminoternale Domäne, die auch in einigen anderen integralen Membranproteinen der inneren Kernmembran zu finden ist, die sog. LEM-Domäne (benannt nach den Proteinen, in denen sie zuerst entdeckt wurde: LAP2 – Emerin – MAN1; Lin et al., 2000). Diese Domäne aus ca. 43 Aminosäuren (AS 111-152 in Mensch) besteht aus einer Helixstruktur, die sich aus drei Aminosäuren, gefolgt von zwei, durch einen langen Loop miteinander verbundenen α -Helices, zusammensetzt (Lin et al., 2000; Cai et al., 2001). Zusätzlich zur LEM-Domäne befindet sich am Aminoterminus eine zwar strukturell und funktionell unabhängige, aber der LEM-Domäne doch sehr ähnliche Domäne, die LEM-like Domäne (AS 1-50 in Mensch). Auch sie weist eine Helixstruktur auf und ist durch einen hochflexiblen, 60 Aminosäuren langen Linker mit der LEM-Domäne verbunden.

Die hochkonservierte aminoternale Domäne, die in allen LAP2-Isoformen zu finden ist, zeigt direkte oder indirekte Bindung an das periphere Chromatin (Furukawa et al., 1998; Gant et al., 1999; Furukawa et al., 1997; Cai et al., 2001). Dabei spielen diese beiden Domänen eine wichtige Rolle: Während die LEM-like-Domäne direkt mit dem peripheren Chromatin interagiert (Furukawa, 1997; Cai et al., 2001), interagiert die LEM-Domäne über das kleine, hochkonservierte BAF-Protein indirekt mit der DNA (Furukawa, 1999; Cai et al.,

2001). Dabei ist die Bindungsaffinität in den einzelnen Isoformen unterschiedlich stark ausgeprägt (Shumaker et al., 2001). BAF (= barrier to autointegration factor) ist ein DNA-vernetzendes Protein mit einer Helix-Hairpin-Helix-Struktur, welches direkt und unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet und diese vernetzt. Während der Interphase ist es diffus im Nukleoplasma verteilt und in der Mitose findet eine Akkumulation an den Chromosomen statt. Ursprünglich in Viren entdeckt, verhindert BAF dort die Rekombination der viralen DNA mit sich selbst, bevor diese in das Wirtsgenom eingebaut werden kann (Umland et al., Zheng et al., 2000).

Die LAP2 Proteine werden, wie andere Proteine der inneren Kernmembran auch, während der Mitose phosphoryliert, wodurch sie ihre Verankerung an der Kernhülle verlieren und an Membranen gebunden im Cytoplasma verteilt sind (Ausnahme: LAP2 α , welches sich während der Metaphase in einem löslichen, cytoplasmatischen Pool befindet; Dechat et al., 1998). Nach der Mitose akkumuliert zuerst LAP2 α am Chromatin, danach folgen die membrangebundenen LAP2 Isoformen zeitgleich mit LBR und führen so Membranvesikel an die Chromatinoberfläche. In Versuchen mit *Xenopus* Eiextrakten konnte nachgewiesen werden, dass die konstante nukleoplasmatische Region (LAP2-c; AS 1-187 in Mensch) wichtig für die Kernneubildung nach der Mitose ist (Shumaker et al., 2001). Mutationen insbesondere an den Regionen der LEM und LEM-like Domäne bewirkten eine Arretierung dieses Prozesses. Zugabe von rekombinanten verkürzten LAP2 β Proteinen zu *Xenopus* Eiextrakt bewirkte a) die Bildung von kleinen, gelappten Kernen mit unvollständig geschlossener Kernhülle (Aminosäure 1-187 bei menschlichem LAP2 β , Aminosäure 1-164 bei *Xenopus* LAP2 β), und b) verhinderte Chromatinexpansion (Aminosäure 1-408 bei menschlichem LAP2 β). Der Einbau der Kernporenkomplexe blieb dabei bei beiden Fragmenten unbeeinflusst, (Gant et al., 1999).

In mehreren unabhängigen Versuchen konnte eine Bindung der LAP2 Proteine an Lamine gezeigt werden (Foisner und Gerace, 1993; Furukawa et al., 1998, 1995; Dechat et al., 2000b). Dabei binden die membrangebundenen LAP2-Isoformen β und γ an B-Typ Lamine über die Lamin-Bindungsregion (AS298-370 in Ratte), während die α -Isoform an A-Typ Lamine über die α -spezifische Domäne bindet. Somit scheinen die LAP2 Proteine an der strukturellen Organisation und Stabilität der Kernperipherie wie auch des Kerninneren beteiligt zu sein.

Neben den schon erwähnten Interaktionen mit Chromatin, BAF und den Laminen wurden in letzter Zeit neue LAP2-Interaktionspartner bekannt: Das Kernprotein HA95 (auch HAP95 oder NAKA95), das germ cell less Protein der Maus (mGCL) sowie das Heterochromatin HP1, welches schon als Bindungspartner des LBR bekannt ist.

HA95 weist eine Homologie zum nukleären A-Kinase Protein AKAP95 auf. Wie die Kinase besitzt auch HA95 zwei Zinkfinger-Domänen, nicht aber die Kinase-Bindungsdomäne

(Orstavik et al., 2000; Seki et al., 2000; Westberg et al., 2000; Eide et al., 1998). HA95 assoziiert mit Interphasechromatin und Metaphasechromosomen, interagiert während der Interphase mit Lamin B und BAF und bildet Multiproteinkomplexe mit sich selbst und anderen Proteinen wie z.B. mit RNA-Helikase A (Westberg et al., 2000). In Protein-Vernetzungsexperimenten wurden feste Assoziationen mit LBR und LAP2 gefunden (Martins et al., 2000). Versuche mit Antikörpern, die gegen HA95 gerichtet waren, bewirkten eine Verhinderung der Chromatinkondensation und des Kernzerfalls während der Mitose, die Lamina-Dynamik wie auch die Kernneubildung und die damit verbundene Chromosomendekondensation nach der Mitose blieben jedoch unbeeinflusst.

Germ Cell Less (GCL) ist ein strukturell und funktionell hoch konserviertes Protein der Kernhülle, welches in Drosophila für die Keimzellbildung verantwortlich ist (Albagli et al., 1995). GCL in Drosophila wie auch in Maus (mGCL) besitzt eine BTB / POZ-Domäne (= Protein-Protein Interaktionsdomäne), die an vielen Aktin- bzw. DNA-bindenden Proteinen zu finden ist. Fast alle Säugerproteine mit einer BTB / POZ Domäne sind Zinkfinger-Proteine und an der transkriptionellen Regulation beteiligt. In einer anderen Studie wurde mGCL als DP-interagierendes Protein (DIP) isoliert (de La Luna et al., 1999). DP-Proteine sind als obligatorische Bindungspartner des Transkriptionsfaktors E2F bekannt und fördern durch diese Komplexbildung die Fortführung des Zellzykluses. GCL schien in menschlichen Osteosarcoma Zellen die Translokation des E2F-DP Heterodimers an die Kernhülle zu bewirken, was eine Reduktion der Transkriptionsaktivität sowie eine Akkumulation der Zellen in der G1-Phase zur Folge hatte.

Durch „Yeast-Two-Hybrid“-Experimenten und in vitro Bindungsstudien konnte eine Interaktion des mGCL mit LAP2 β der Maus (AS 219-328) nachgewiesen werden (Nili et al., 2001). Zusätzlich interagiert mGCL mit der DP3 α -Untereinheit des Transkriptionsfaktors E2F. Diese Interaktion reduzierte die Transkriptionsaktivität des E2F-DP-Heterodimers, wahrscheinlich durch die Verankerung an die Kernhülle. Überraschenderweise reduzierte auch LAP2 β durch Bindung an den E2F-Komplex diese Transkriptionsaktivität, sogar noch stärker als mGCL. Liegt LAP2 β mit mGCL als Komplex vor, so entsprach die Transkriptionshemmung sogar der des Retinoblastoma Proteins, welches als Inhibitor des E2F-Komplexes bekannt ist (Nili et al., 2001). Die Beteiligung des LAP2 β an Transkriptionsvorgängen wird noch durch eine weitere Studie bestärkt, in der Interaktionen des LAP2 β mit dem Heterochromatinprotein HP1 postuliert wird (Kourmouli et al., 2000).

Somit gehen die Funktionen und Aufgaben der LAP2 Proteine weit über die strukturelle Organisation der Kernlamina hinaus und schließen direkte oder indirekte Beteiligung an Chromatinorganisation und Transkriptionsvorgängen nicht aus.

II.3.4. Emerin

Als integrales Protein der inneren Kernhülle besteht Emerin aus einer nukleoplasmatischen, Serin-reichen aminoterminalen Domäne, einer membrandurchspannenden Domäne und einer sehr kurzen carboxyterminalen Domäne im perinukleären Bereich. Als Mitglied der LEM-Familie besitzt es am aminoterminalen Bereich (Aminosäure 6 – 44 in Säugern; siehe Abb. 2-3) ein LEM-Motiv, über das es mit BAF interagiert (nachgewiesen über in vitro Studien; Lee et al., 2001; Wilson et al., 2001). Durch Co-Immünpräzipitationen und Blot Overlay Experimenten konnte eine direkte Bindung des Emerins an Lamine nachgewiesen werden, wobei die Bindung an Lamin B1 weniger stark ist als die Bindung an Lamin A und C (Fairley et al., 1999; Clements et al., 2000). In Lamin A / C „knock-out“ Mäusen wurde eine Fehllokalisierung des Emerins im ER beobachtet (Sullivan et al., 1999), was eine Abhängigkeit des Emerins von Lamin A bezüglich seiner Verankerung in der Kernhülle vermuten lässt. Am bekanntesten wurde das Protein durch die Muskelerkrankung Emery Dreyfuss Muskeldystrophie (EDMD), die durch Mutationen am Emerin-Gen ausgelöst wird (siehe II.4).

II.3.5. MAN 1

Durch menschliche Antikörper (MAN-Antikörper) entdeckt, ist MAN 1 ein ca. 82 kD großes Protein der inneren Kernmembran, bestehend aus einer aminoterminalen Domäne, gefolgt von zwei hydrophoben Segmenten und einem carboxyterminalen Schwanz (Lin et al., 2000). Zellextraktionen zeigten, dass es sich hier um ein integrales Membranprotein handelt, welches nach Expression in transfizierten Zellen ausschließlich in der inneren Kernmembran lokalisiert ist. Protein Sequenz Analysen zeigten das Vorhandensein der LEM-Domäne im aminoterminalen Bereich des Proteins (Aminosäure 6-49 in Mensch). Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Zellen, die verkürzte Formen des MAN1 exprimierten, zeigten, dass der aminoterminal Bereich mit dem ersten hydrophoben Segment ausreichend ist für die Lokalisation an die innere Kernmembran (Wu et al., 2002). Obwohl bisher noch keine Interaktionen mit anderen Komponenten der Kernhülle nachgewiesen werden konnte, zeigten FRAP-Experimente eine recht starke Immobilität des MAN 1 in der Kernhülle, verglichen mit der Mobilität im ER von Interphasezellen, was eine Verankerung des Proteins durch Bindungen an andere Proteine des Kerns vermuten lässt.

II.3.6. Nurim, Unc-84, Otefin und Young Arrest (YA)

Nurim wurde als immobilisiertes Protein der inneren Kernmembran identifiziert und besteht aus 262 Aminosäuren mit einem apparenten Molekulargewicht von 29 kD (Rolls et al., 1999). Es besitzt fünf membrandurchspannende Domänen aus kurzen, aufeinander folgenden Loops, was einzigartig unter den Kernmembranproteinen ist. Zusätzlich besitzt es keinen signifikanten hydrophilen Bereich. FRAP Experimente lassen wie bei MAN 1 starke Interaktion mit anderen Kernkomponenten vermuten, allerdings ist auch hier noch nichts Näheres darüber bekannt.

Unc-84 (unc = uncoordinated movement) wurde als häufig vorkommendes Protein der inneren Kernmembran bei *C. elegans* identifiziert, wo es für die Kernpositionierung der Zellkerne in sich differenzierten Zellen während der Entwicklung notwendig ist (Malone et al., 1999). Proteine mit Homologien zu Unc-84 wurden bisher auch in *Drosophila* und Mensch gefunden, allerdings konnte bisher noch keine nähere Charakterisierung zur genaueren Lokalisation und Funktion gemacht werden.

Otefin wurde in *Drosophila* identifiziert und besitzt wie LAP2, Emerin und MAN 1 eine LEM-Domäne am aminoterminalen Ende, welches ins Kernlumen hineinragt (Goldman et al., 2002; Wilson 2000). Außer der Interaktion mit B-Typ Laminen ist noch nicht viel über die genaue Lokalisation sowie Funktion bekannt.

Young Arrest (YA) wurde ebenfalls in *Drosophila* identifiziert, wo es entwicklungspezifisch exprimiert wird und an der Transition von der Meiose zur Mitose beteiligt ist (Goldberg et al., 1998). Als Protein der Kernhülle bindet es an Lamin B und Chromatin.

II.4. Genetisch bedingte Erkrankungen

Mutationen in Emerin und den Laminen sind mit verschiedenen genetisch bedingten Erkrankungen wie Muskel- und Lipodystrophien assoziiert. Mutationen im Lamin A Gen LMNA verursachen eine Reihe seltener, aber dominanter Erkrankungen wie Emery Dryfuss Muskeldystrophie (EDMD), Dilatierte Cardiomyopathie (DCM), „Limb girdle“ Muskeldystrophie (LGMD) sowie familiäre partielle Lipodystrophie (FPLD) Typ Dunnigan (Bonne et al., 1999; Raffaella di Barletta et al., 2000; Fatkin et al., 1999; Cao und Hegele, 2000; Shackleton et al., 2000). Bisher sind ca. 50 Mutationen des LMNA Gens bekannt, die Laminopathien hervorrufen (Goldman et al., 2002). Mutationen, die Cardiomyopathien verursachen, sind meistens an der Stabdomäne im Bereich der Helix 1A und 1B zu finden (Brodsky et al., 2000; Fatkin et al., 1999), während bei Lipodystrophien nur einzelne Aminosäuren im carboxyterminalen Schwanz des Lamin A ausgetauscht wurden. Bemerkenswert ist hier die Struktur der carboxyterminalen Domäne des Lamins A / C: Im

Gegensatz zur α -helikalen Stabdomäne besteht der Carboxyterminus aus einer globulären, Ig-ähnlichen Domäne, die aus 9 β -Faltblättern zusammengesetzt ist (Krimm et al., 2002; Dhe-Paganon et al., 2002). Interessanterweise betreffen die Mutationen, die zu muskelspezifischen Erkrankungen führen, solche Aminosäuren, die zur Struktur und Stabilität der Proteine mit beitragen, während die Mutationen, die zu Lipodystrophien führen, an spezifischen Regionen der globulären Domäne zu finden sind, die für intermolekulare Interaktionen verantwortlich sind.

EDMD ist eine seltene Erkrankung der Muskulatur, die durch Mutationen in zwei verschiedenen Genen entsteht: Die autosomal-dominant vererbte Form wird durch Mutationen im Lamin A / C Gen verursacht (Bonne et al., 1999; Raffaella di Barletta et al., 2000), während die X-chromosomale, rezessive Form durch Mutationen am Emerin Gen den Verlust bzw. Defekt des Emerin Proteins zur Folge hat (Manilal et al., 1996). Das Auftreten von autosomal-dominanter EDMD in Patienten mit normalen Lamin A / C Genen lässt zusätzlich eine Beteiligung anderer Gene an der Entstehung dieser Krankheit vermuten. EDMD ist charakterisiert durch fortschreitende Muskelschwäche, frühe Kontrakturen von Knöchel, Ellbogen und Nacken, langsame Degeneration von Herz- und Skelettmuskulatur sowie Defekte der ventrikulären Erregungsleitung des Herzens, welche schon in früher Kindheit zum plötzlichen Tod führen kann (Morris und Manilal, 1999). Dabei können die Symptome unterschiedlich stark ausgeprägt sein (Hoeltzenbein et al., 1999; Hegele et al., 2000; Brown et al., 2001).

Die Dunnigan-typische familiäre Partielle Lipodystrophie (FPLD) beginnt in der Pubertät mit selektivem Verlust des subkutanen Fettgewebes in den Extremitäten, Rumpf und Gluteusregion, einhergehend mit Akkumulation von weißem Fettgewebe in Gesicht, Nacken, Rücken und Leiste (Garg, 2000). Diese Erkrankung ist sehr selten (1:15 Millionen), zeigt aber eine starke Dominanz, einhergehend mit schweren Begleiterscheinungen wie Typ II Diabetes und Insulin Resistenz.

Interessanterweise findet man bei knock-out Mäusen des Lamin A / C Gens eine ähnliche Symptomatik wie bei den oben beschriebenen Erkrankungen (Sullivan et al., 1999): Normal bei Geburt, leiden die Mäuse mit zunehmendem Alter unter Skelett- und Herzmuskelschwund wie an einem Verlust des weißen Fettgewebes. Kultivierte Fibroblasten dieser Lamin A $-/-$ Mäuse zeigen abnormale Nukleusausbuchtungen mit leicht reduzierten Mengen der Kernporenkomponente Nup153 sowie eine Verminderung bis Verlust des an der Kernhülle anliegenden Heterochromatins in diesen Bereichen. Auch die Verteilung des Emerins ist verändert, es findet sich jetzt im ER verteilt vor. Somit scheint intaktes Lamin A für die Verankerung des Emerins an der Kernhülle sehr wichtig zu sein.

Aufgrund der Vielfalt der Mutationen, der daraus resultierenden Krankheiten und der Spezifität der betroffenen Gewebetypen (Fett- und Muskelgewebe) lassen sich einige Vermutungen über die Ursachen der Symptome anstellen:

Möglich ist, dass durch Mutationen von Lamin A und Emerin eine Schwächung der Laminpolymere und Lamina einhergeht, was einen fragilen Nukleus zur Folge hat (Vigouroux et al., 2001). Durch den mechanischen Stress, dem die Muskelzellen ausgesetzt sind, kann es zu Deformierung und Zerstörung dieses zerbrechlichen Nukleus kommen und somit zu Zelltod und Muskelschwund durch induzierte Apoptose (Sullivan et al., 1999). Bemerkenswert ist hierzu auch, dass in Muskelzellen nur ein B-Typ Lamin exprimiert wird und so der Verlust des A-Typ Lamins gravierendere Folgen hat als in Zellen, in denen mehrere B-Typ Lamine vorhanden sind. Der fragile Nukleus kann natürlich auch zu einer Unterbrechung der Interaktionen der Lamine mit integralen Membranproteinen sowie des Chromatins führen, was wiederum Prozesse wie DNA Replikation und Transkription beeinflussen kann.

Eine andere Möglichkeit könnte sein, dass durch die veränderten Lamine und des Emerins die Affinität zu zell-typisch spezifischen Bindungspartnern moduliert wird und somit spezifische Signalwege oder eine zell-typische Genexpression verändert oder behindert werden (Wilson, 2000; Wilson et al., 2001; Goldman et al., 2002; Hegele, 2000). Diese Theorie wird dadurch erhärtet, dass sowohl Muskel- wie auch Fettgewebe aus einem gemeinsamen Vorläufer, der mesenchymalen Stammzelle, stammen (Brehm et al., 1998; Pittenger et al., 1999). Somit könnten Mutationen in Lamin A / C und Emerin einen selektiven Effekt auf die Differenzierung, Erhaltung, Reparatur und Regulation der mesenchymalen Stammzelllinien haben, indem sie die zelltypische Genexpression dieser Zelllinie beeinflussen (Wilson, 2000).

Wahrscheinlich ist, dass die zellulären Pathologien durch eine Kombination einer Schwächung der Lamine, einhergehend mit reduzierter mechanischer Stabilität, und einer veränderten Genexpression hervorgerufen werden.

Die Beteiligung eines anderen Kernmembranproteins an genetischen Erkrankungen zeigen erst kürzlich publizierte Ergebnisse (Hoffmann et al., 2002): Mutationen im Lamin B Rezeptor codierenden Gen korrelieren mit der Erkrankung der Pelger-Huët Anomalie (Hoffmann et al., 2002). Diese autosomal dominante Krankheit ist charakterisiert durch abnormale Kernform und Chromatinorganisation in neutrophilen Granulocyten, einhergehend mit verzögerter Entwicklung, Epilepsie und Skelettabnormalien des Betroffenen. Zytologisch zeigen die Granulocyten einen wesentlich weniger gelappten Kern als in normalen Zellen, einhergehend mit grobkörnigem Chromatin. Dabei ist die Expression des LBR unterschiedlich stark reduziert (bei homozygoten Individuen ist eine Expression des LBR kaum nachweisbar).

Dieser Verlust bewirkt die oben beschriebene, kernspezifische Veränderung und führt somit zum Krankheitsbild der Pelger-Huët Anomalie.

Zwar keine genetische Erkrankung, aber doch mit gesundheitlichen Folgen verbunden ist die Infektion eines Organismus mit Viren. Parasitär lebend, hängt ihre eigene Replikation von der Maschinerie der befallenen Wirtszelle ab. Dabei müssen größere Virenpartikel nach ihrem Zusammenbau im Kernplasma die Kernhülle passieren. Da ein Transport über die Kernporen aufgrund der Größe der Partikel nicht möglich ist, werden diese über die Kernmembran ausgeschleust. Dabei kann man eine Aufweichung der Kernhülle mit Umstrukturierung der Lamine A / C, B1, B2 sowie des LBR beobachten, die zu einer kurzfristigen und reversiblen Öffnung der Kernhülle führt (Scott und O'Hare, 2001). Studien am Cytomegalie-Virus (CMV) zeigen dabei einen raffinierten Mechanismus (Muranyi et al., 2002): Ein Typ II Membranprotein des β -CMV, welches eine strukturelle Homologie zu den LEM-Proteinen LAP2 β und Emerin aufweist, rekrutiert mit Hilfe eines zweiten Virus Proteins eine Calcium abhängige Protein Kinase C an die Kernhülle, welche durch Phosphorylierung der Lamine dessen Struktur auflockert und somit den Austritt der Virenpartikel in das Cytoplasma ermöglicht. Der Grad der Phosphorylierung der Lamine ist dabei wesentlich niedriger als bei Eintritt der Mitose (2,5 – 4 fache Phosphorylierung im Gegensatz zur 10-fachen während der Mitose), was daran liegen mag, dass der Zellzyklus, ausgelöst durch die Virusinfektion, in der späten G2-Phase arretiert wird und somit die Mitose-spezifische Kinase p34 / cdc2 nicht an die Kernhülle befördert werden kann.

II.5. Zielsetzung

Durch die stetig wachsende Zahl von neu entdeckten Proteinen der inneren Kernmembran sowie deren Interaktionspartner konnten einige bisher nicht bekannte Zusammenhänge der Organisation und Funktion der Kernhülle und des Chromatins erkannt werden. Interaktionen zwischen strukturellen Proteinen wie den Laminen und Lamin-assoziierten Proteinen und Proteinen, die an der DNA-Replikation und der Regulation der Genexpression beteiligt sind, wurden erst vor kurzem gefunden. Vor allem die Entdeckung von menschlichen Erkrankungen, die sich auf Mutationen bestimmter Kernmembranproteine zurückführen lassen, haben das Interesse an diesen Kernkomponenten stark erhöht.

So wurde zwar schon einiges über Lamine und Lamin-assoziierte Proteine und deren Interaktionen mit anderen Kernkomponenten in Säugern berichtet, in *Xenopus laevis* dagegen ist bisher noch recht wenig über die Lamin-assoziierten Proteine bekannt. Gerade da dieser südafrikanische Krallenfrosch ein Modellorganismus in der Entwicklungsbiologie ist, wären Untersuchungen im Bereich der entwicklungspezifischen Proteinexpressionen

interessant. Wie man weiß, werden bestimmte Lamine in *Xenopus* entwicklungspezifisch exprimiert (Benavente et al., 1985; Stick und Hausen, 1985). Zu Beginn meiner Arbeit war in *Xenopus* als einziges Protein der inneren Kernmembran der LBR bekannt (Gajewski und Krohne, 1999).

In dieser Arbeit sollten evtl. vorhandene Isoformen der Lamina-assoziierten Polypeptide 2 (LAP2) in *Xenopus laevis* identifiziert und anschließend molekularbiologisch, biochemisch und immunocytoologisch charakterisiert sowie ihr Expressionsmuster bestimmt werden. Die Herstellung eines *Xenopus* spezifischen LAP2-Antikörper sollte zur besseren fluoreszenzmikroskopischen sowie biochemischen Untersuchung beitragen. Zusätzlich sollten durch Bindungsstudien mit verschiedenen LAP2-Fragmenten *in vitro* und *in vivo* die Interaktionen mit den Laminen näher untersucht werden.

III. Ergebnisse

III.1. Molekulare Charakterisierung des XLAP2

III.1.1. Isolierung einer cDNA, die für ein *Xenopus* LAP2 codiert

Für die Isolierung einer cDNA, die für *Xenopus* LAP2 codiert, wurde unter niedrig stringenten Bedingungen mit einem cDNA Fragment des Ratten LAP2 β (Nukleotide 1-956) eine Uni-ZAP cDNA Genbank aus *Xenopus* Ovar hybridisiert. Die für die Sondenherstellung benötigte cDNA wurde freundlicherweise von Dr. Manfred Alsheimer zur Verfügung gestellt. Die Analyse von 10^6 pfu (Plaque forming units) führte zur Isolierung mehrerer Klone, die eine deutliche Hybridisierung mit der Sonde zeigten. Mit Hilfe der *in vivo* Excision wurden die entsprechenden cDNAs in den Bluescript SK Vektor umkloniert und ein Doppelverdau mit EcoRI / KpnI bzw. EcoRI / XhoI zur Ermittlung der Insertgröße durchgeführt. Neben Klonen, deren Inserts interne Restriktionsschnittstellen aufwiesen, wurde auch ein Insert gefunden, das bei beiden Restriktionen ca. 1800 Nukleotide umfasste (Abb.3-1; Klon o).

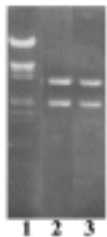


Abb. 3-1: Bestimmung der Länge der XLAP2-cDNA: Nach *in vivo* Excision wurde das gereinigte Plasmid mit EcoRI / KpnI (Spur 2) bzw. EcoRI / XhoI (Spur 3) verdaut und die DNA in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Die obere Bande entspricht dem Bluescript Vektor mit 2160 bp. Als Längenmarker wurde λ -DNA nach EcoRI/HindIII-Verdau aufgetragen (Spur 1).

III.1.2. Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der LAP2 cDNA

Sequenzanalysen ergaben, dass der Klon ohne interne EcoRI-, KpnI- und XhoI-Restriktionsschnittstellen (Klon o) eine Länge von 1812 Nukleotiden besitzt, mit einem durchgängigen, offenen Leseraster von 1554 Nukleotiden. Der 5'-nicht-translatierte Bereich setzt sich aus 87 Nukleotiden zusammen, das 3'-nicht-translatierte Ende besteht aus 168 Nukleotiden mit einer typischen Polyadenylierungssequenz.

```

1   ATG CCG GAG TTT CTG CAA GAC CCG TCG GTT CTC ACT AAG GAA AAG CTC AAG
1   Met Pro Glu Phe Leu Gln Asp Pro Ser Val Leu Thr Lys Glu Lys Leu Lys

```

54 AGC GAG TTG GTT GCG AAC AAC GTG ACT TTG CCG AGT GGG GAG CAG CGG AAA
18 Ser Glu Leu Val Ala Asn Asn Val Thr Leu Pro Ser Gly Glu Gln Arg Lys

105 GAT GTA TAC GTG CAA CTG TAC CTC CAG CAC CTC ACC TCC CAG AAC AGC
35 Asp Val Tyr Val Gln Leu Tyr Leu Gln His Leu Thr Ser Gln Asn Ser

153 GGC ACC CCT GAC TTC TCC AGC GAC GAG GAG AGA GAG GCC ACC CCT ATG
51 Gly Thr Pro Asp Phe Ser Ser Asp Glu Glu Arg Glu Ala Thr Pro Met

201 AGG GGC AGA GGC CGC CCG CCG GGA AGG AAA GCA ACA AAG AAG ACT GAC
67 Arg Gly Arg Gly Arg Pro Pro Gly Arg Lys Ala Thr Lys Lys Thr Asp

249 AAA CCT AAA GCT GAA GAA AAA GAT GAC CCA GAT GTT ACA GAA CTC AGC
83 Lys Pro Lys Ala Glu Glu Lys Asp Asp Pro Asp Val Thr Glu Leu Ser

297 AAT GAG GCT CTT AAA GAA GAG CTC CTT AAA TAT GGA ATG AAA CCA GGC
99 Asn Glu Ala Leu Lys Glu Glu Leu Leu Lys Tyr Gly Met Lys Pro Gly

345 CCT ATT TTA AGT AAT ACC AGG AAA TTG TAT GAG CAA AGA CTT TTT AAA
115 Pro Ile Leu Ser Asn Thr Arg Lys Leu Tyr Glu Gln Arg Leu Phe Lys

393 CTA AAG GAA CAA GGT CTG GCA TCT TCT GCT CTT CCA GCT GAT ACT TCA
131 Leu Lys Glu Gln Gly Leu Ala Ser Ser Ala Leu Pro Ala Asp Thr Ser

441 AAA GCA GAC AAC AAG CAA AAT GGA AAC ACA GAT TCT GAG CAA TAC AGT
147 Lys Ala Asp Asn Lys Gln Asn Gly Asn Thr Asp Ser Glu Gln Tyr Ser

489 GAT AAT GAA GAA GAG GCT AAA GTA GAG TTG ACT TTT GAA AAG AGA GAA
163 Asp Asn Glu Glu Glu Ala Lys Val Glu Leu Thr Phe Glu Lys Arg Glu

537 CCA CTG AGG GGA AAC CCA AAG CCA CAA GTA ACA ATG CGT AAC AGA CGG
179 Pro Leu Arg Gly Asn Pro Lys Pro Gln Val Thr Met Arg Asn Arg Arg

585 ACT GAA AAA ACT GAG ACT GTA TCT GAA GAT GTG GTT ACT GAG GCA GCA
195 Thr Glu Lys Thr Glu Thr Val Ser Glu Asp Val Val Thr Glu Ala Ala

633 TGG ACA TCT GGA CCT GTG AAA AGT GGA CCT GTG CAG ACT GTT TAT AAG
211 Trp Thr Ser Gly Pro Val Lys Ser Gly Pro Val Gln Thr Val Tyr Lys

681 AG TCA ACT AAA ATA TCC AGA CGA ACC CCA AGG AAA AAG GTG GTA GCT

227 Glu Ser Thr Lys Ile Ser Arg Arg Thr Pro Arg Lys Lys Val Val Ala
729 CCA GAT CCA GTC CTT TTT GAT GAT GCA GAC ATT TCA GAG GTC CCT CCT
243 Pro Asp Pro Val Leu Phe Asp Asp Ala Asp Ile Ser Glu Val Pro Pro
777 ATA TCT GAA TTG GTA GTA CCT GCA AGC AAT CAA ATT TTT GCT TAT GCT
259 Ile Ser Glu Leu Val Val Pro Ala Ser Asn Gln Ile Phe Ala Tyr Ala
825 GAA AAT GAG CAT TTT GAA TCT AGT AAG GTT GTT AAT CGG GTG CCT GGA
275 Glu Asn Glu His Phe Glu Ser Ser Lys Val Val Asn Arg Val Pro Gly
873 AGT TTG AAG CAT GCA GAG ACA TTA CTG TCA GTC GGC GAA ATC TCA GAA
291 Ser Leu Lys His Ala Glu Thr Leu Leu Ser Val Gly Glu Ile Ser Glu
921 CTG ACG AGA AGG ACC CCA AAG AAA CAG CTG ATC AGT GAA AAA CAT TTG
307 Leu Thr Arg Arg Thr Pro Lys Lys Gln Leu Ile Ser Glu Lys His Leu
969 AAC GTA ACA CGT GAA ACG GAA TCA GGT TCT TCT CAA ATC AGG TTG ATT
323 Asn Val Thr Arg Glu Thr Glu Ser Gly Ser Ser Gln Ile Arg Leu Ile
1017 GAT AGT ATT GGT TTT TCA AAC CCC ACT GAT CTT CTA AAC ACA GCT CTA
339 Asp Ser Ile Gly Phe Ser Asn Pro Thr Asp Leu Leu Asn Thr Ala Leu
1065 ATA GAG GAA ACA AAA CAA ATC ATT GAA GAC TCT TTG GAA ACA CCC AAA
355 Ile Glu Glu Thr Lys Gln Ile Ile Glu Asp Ser Leu Glu Thr Pro Lys
1113 AAG ACA AAG CAG TTG AAA ATA ACG AAG TTT GTA ACA CCT GTA AAA AAG
371 Lys Thr Lys Gln Leu Lys Ile Thr Lys Phe Val Thr Pro Val Lys Lys
1161 CAG ATT GTA GAA AAG AAT TTT GAG GAG AGA AGA ACT GAA AGA GAT ATT
387 Gln Ile Val Glu Lys Asn Phe Glu Glu Arg Arg Thr Glu Arg Asp Ile
1209 CTT AAA GAA ATG TTT CCA AAA GAA TTT TTA ACT CCA ACT GGA ATC AGT
403 Leu Lys Glu Met Phe Pro Lys Glu Phe Leu Thr Pro Thr Gly Ile Ser
1257 GCC AGC TGT CGC AGG CCA ATA AGA GGA GCC GCT GGG CGA CCA TTA AAT
419 Ala Ser Cys Arg Arg Pro Ile Arg Gly Ala Ala Gly Arg Pro Leu Asn
1302 GCC ACA GAT TTT AAA ACA GAT GAA ACC TAT ACT TCA AAA TAT GTT TCA
434 Ala Thr Asp Phe Lys Thr Asp Glu Thr Tyr Thr Ser Lys Tyr Val Ser

1353 AAT GTT TCA AAG TAC ACT CCA GCG GTG GAG GCG AAG TCT GCA AAA GTG
 451 Asn Val Ser Lys Tyr Thr Pro Ala Val Glu Ala Lys Ser Ala Lys Val

1401 AAA CCT GGA CGA TCG TTA CCT GCA TGG ATA AAG ATT TTA CTG TGT ATC
 467 Lys Pro Gly Arg Ser Leu Pro Ala Trp Ile Lys Ile Leu Leu Cys Ile

1449 ATC TTG GTT GTC TTT TGC TTT TTA GTC TAT CAA GCT ATG GAA ACA AAT
 483 Ile Leu Val Val Phe Cys Phe Leu Val Tyr Gln Ala Met Glu Thr Asn

1497 GAT GGA ATA GCA TTT TCT AAA TTG TTT CTC GGC ATC ACA GAA TCA AAC
 499 Asp Gly Ile Ala Phe Ser Lys Leu Phe Leu Gly Ile Thr Glu Ser Asn

1545 AAG ACT GAA AAC TGA
 515 Lys Thr Glu Asn *

1560 ttt tta att ttt tga ggg ggg ggg tta aat tac agt tta tat ttt taa caa ctc aag gat taa gaa aaa act tcc cat
 ttg tcc aat act gtc tga aaa tat cac cgc act tca aac ttt tgt aca tta ata aag atg gta cgt ttg gaa aaa
 aaa aaa aaa aaa

Abb. 3-2: Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von *Xenopus laevis* LAP2 (EMBL Nucleotide Sequence Database, Accessionnummer: Y17861). Codierende Nukleotide sind in Großbuchstaben, nicht codierende in Kleinbuchstaben dargestellt. Das Polyadenylierungssignal ist unterstrichen.

III.1.3. Analyse der Zusammensetzung und Eigenschaften des Proteins

Das offene Leseraster der *Xenopus* LAP2-cDNA codiert für ein Protein von 518 Aminosäuren und besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 58.141 Dalton. Der berechnete Isoelektrische Punkt des Gesamtmoleküls liegt bei 8,95. Das Hydrophobizitätsprofil zeigt eine putative Transmembrandomäne am Carboxyterminus des Proteins.

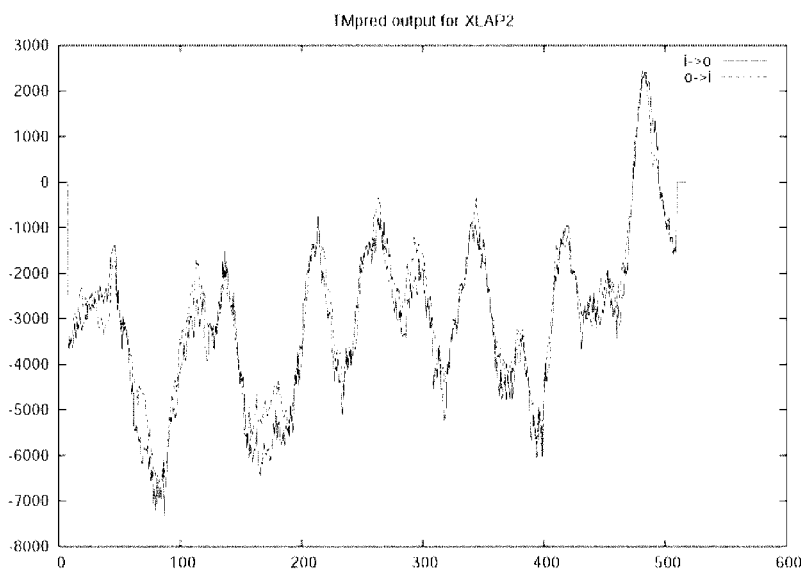


Abb.3-3: Hydrophobizitätsplot für LAP2 aus *Xenopus laevis* (nach Kyte-Andersen, 1984). Die Transmembranhelix wurde auf 17-33 Aminosäuren nahe dem Carboxyterminus geschätzt.

III.1.4. Vergleich der *Xenopus* LAP2 Sequenz mit Datenbanksequenzen

Mit Hilfe des Softwarepakets GCG (Genetic Computer Group, Madison, WI, USA) wurde in den Genbanken nach Sequenzen gesucht, die Ähnlichkeiten zu XLAP2 auf Nukleinsäure- und / oder auf Proteinebene aufweisen. Dabei zeigte sich, dass der isolierte Klon auffallende Ähnlichkeit mit der Sequenz des Ratten LAP2 β aufweist, insbesondere in Regionen, von denen man weiß, dass sie bei der Chromatin- und Chromosomenbindung beteiligt sind (Furukawa et al., 1997, 1998), mit der Lamina und mit den Laminen B1 und B2 interagieren (Yang et al., 1997; Furukawa et al., 1998; Furukawa und Kondo, 1998), sowie der Transmembrandomäne. Durch zwei Insertionen in der Nukleoplasmatischen Domäne ist das *Xenopus* LAP2 um 66 Aminosäuren länger als das Rattenprotein.

```
X  MPEFLQDPSVLTKEKLSSELVANNVTLPSGEQRKDVYVQLYLQHLTSQN.....S
R  MPEFLEDPSVLTKEKLSSELVANNVTLPAGEQRKDVYVQLYLQHLTARNRPPPLAAGANSK

X  GTPDFSSDEEREATPMR.....GRGR.PPGRKATKKTDKPKAEKDDPDVTELSNEALK
R  GPPDFSSDEEREPTPVLGSGASVGRGRGAVGRKATKKTDKPRPEDKDDLDVTELSNEELL

X  EELLKYGMKPGPILSNTRKLYEQRLFKLKEQGL...ASSALPADTSKADN.KQNGNTDSE
R  EQLVRYGVNPGPIVGTTRKLYEKKLLKLEQGAESRSSTPLPTVSSSAENTRQNGSNDSD

X  QYSDNEEEAKVELTFEKREPLRGNPQPVTMRNRRTEKTETVSEDEVVTEAAWTSQPVKSG
R  RYSDNDEDSKIELKLEKREPLKGRAKTPVTLKQRRIEHNQSYSEAGVTETETWTSQSSKGG
```

```

X  PVQTVYKEESTKISRRTPRKKVVAPDPVLFDDADISEVPPISELVVPASNQIFAYAENEHF
R  PLQALTRESTRGSSRRTPRRRVEPSQHFRVDGAVISESTPIAETIKASSN.....

X  ESSKVVNRVPGSLKHAETLLSVGEISELTRRTPKKQLISEKHLNVTRETESGSSQIRLID
R  .DSLVANRLTGNFKHASSILPITEFSDITRRTPKK.....

X  SIGFSNPTDLLNTALIEETKQIIEDSLETPKTKQLKITKFVTPVKKQIVEKNFEERRTE
R  .....PLTRAEVGEKTEERRVE

X  RDILKEMFPKEFLTPTGISASCRRPIRGAAGRPLNATDFKTDETYTSKYVSNVSKYTPAV
R  RDILKEMFPYEASTPTGISASCRRPIKGAAGRPLELSDFRMEESFSKY...VPKYVPLA

X  EAKSAKVKPGRSLPAWIKILLCIILVVFCFLVYQAMETNDGIAFSKLFLGITESNKTEN
R  DVKSEKTKKGRSVPWIKMLLFALVAGFLFLVYQAMETNQGNPFTN.FLQDT...KISN

```

Abb. 3-4: Sequenzvergleich des *Xenopus laevis* LAP2 mit LAP2 β von *Rattus norvegicus*. Vergleich der Aminosäuresequenzen; Die Transmembrandomäne bei der Rattensequenz ist unterstrichen, identische Aminosäuren sind fett gedruckt. Die *Xenopus*-spezifischen Einschübe sind als Lücken in der Rattensequenz dargestellt. Die Proteine bestehen aus 518 (*Xenopus*) bzw. 452 (Ratte) Aminosäuren.

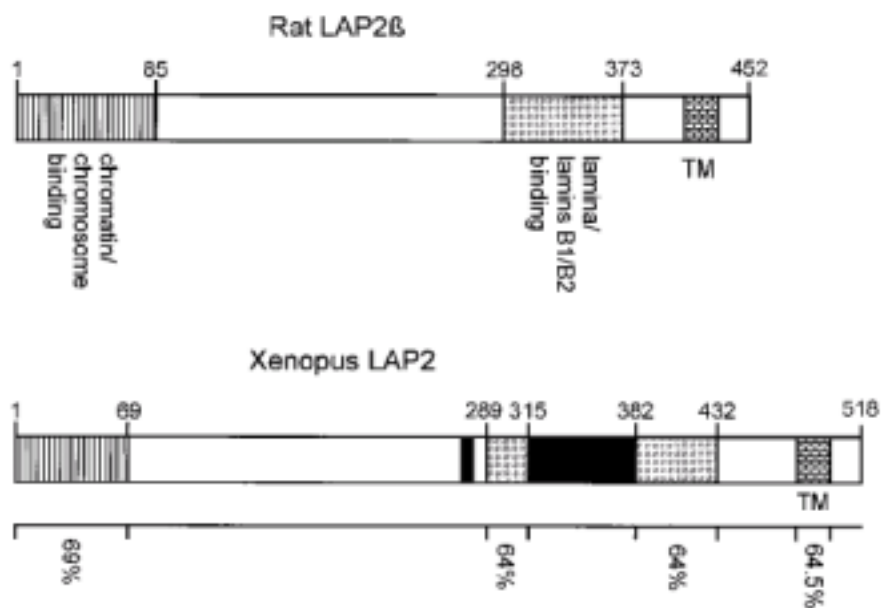


Abb. 3-5: Schematische Darstellung des Ratten LAP2 β und *Xenopus* LAP2; Domänen des XLAP2, die eine starke Übereinstimmung mit der Chromatin/Chromosomenbindungsdomäne, der Lamina/Lamin B1/B2-Bindungsdomäne sowie der Transmembrandomäne des Ratten LAP2 β besitzen,

sind identisch gekennzeichnet. Der Grad der Übereinstimmung der beiden Proteine in diesen Regionen ist als Prozentangabe vermerkt. Die zwei Xenopus-spezifischen Domänen, die nicht im Rattenprotein vorhanden sind, sind schwarz markiert. Die Positionen der einzelnen Aminosäuren befinden sich über dem jeweiligen Molekül.

Zusätzlich wurden Homologien zu den menschlichen Thymopoietinen (Harris et al., 1994; 1995) gefunden, vor allem mit der Splicevariante Thymopoietin β . Thymopoietine sind nukleäre Proteine, die ihren Namen von einem 5 kD-Polypeptid erhalten haben, das aus Thymuszellen von Rind isoliert wurde (Goldstein, 1974; Schlesinger und Goldstein, 1975). Dieses 5 kD-Polypeptid wurde ursprünglich als vollständiges funktionales Protein beschrieben, mittlerweile gilt es jedoch als sicher, dass es sich hierbei nur um ein Abbauprodukt anderer Thymopoietine handelt (Harris et al., 1995). Bei diesen Thymopoietinen, von denen es mehrere Spleißvarianten gibt, handelt es sich um die menschlichen homologen Proteine der LAP2-Proteinfamilie.

Aufgrund dieser Homologien können wir davon ausgehen, dass es sich bei dem isolierten cDNA-Klon um das Xenopus Homolog des LAP2 β bei Säugern handelt.

III.1.5. In vitro Transkription und Translation der XLAP2 cDNA

Um herauszufinden, ob die XLAP2 cDNA die vollständige codierende Region enthält, wurde sie mit Hilfe des TNT Systems gekoppelt in vitro transkribiert und translatiert. Als Positivkontrolle diente ein Parallelansatz mit Xenopus p58 (LBR) sowie als Negativkontrolle ein weiterer Parallelansatz ohne DNA. In der SDS-PAGE wurde ein Translationsprodukt von ca. 66.000 Dalton gefunden. Die scheinbare Diskrepanz zwischen dem berechneten Molekulargewicht des Proteins und dessen Mobilität im Gel beruht höchstwahrscheinlich auf dem hohen Gehalt von basischen Aminosäuren, die das XLAP2 aufweist. Das kleinere Translationsprodukt bei 42.000 Dalton stammt vermutlich von einem internen Startcodon bei Aminosäure 190.

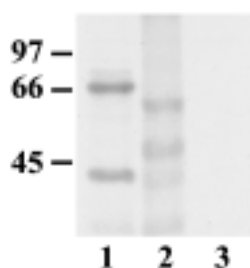
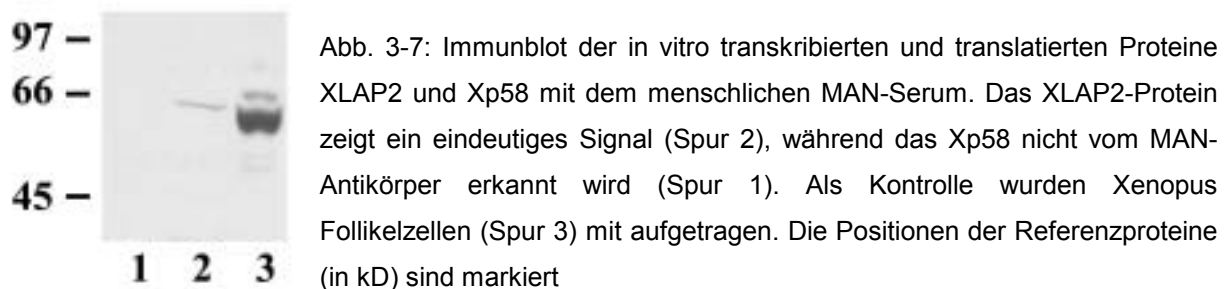


Abb. 3-6: Elektrophoretische Mobilität (12 % Acrylamid) der durch gekoppelte in vitro Transkription und Translation synthetisierten Polypeptide XLAP2 (Spur 1) und Xp58 (Spur 2). Die mit ^{35}S -Methionin markierten Polypeptide sind durch Schwärzung des Röntgenfilmes nachweisbar. Spur 3 zeigt eine Negativkontrolle ohne DNA im Ansatz. Die Positionen der Referenzproteine (in kD) sind angegeben.

Um das translatierte Protein XLAP2 näher zu identifizieren, wurde das Protein auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit einem menschlichen Serum, genannt MAN, inkubiert. Dieses Serum reagiert in Säugerzellen mit drei Polypeptiden mit einem Molekulargewicht von 78.000, 58.000 und 40.000 D, die zwar alle in der Kernlamina lokalisiert sind, aber andere Eigenschaften als die Lamine aufweisen (MAN-Antikörper; Paulin-Levasseur et al., 1996). Diese drei Polypeptide weisen in ihrer elektrophoretischen Mobilität in SDS-PAGE sehr große Ähnlichkeit mit den LAP2-Proteinen auf (Alzheimer et al., 1998) und reagieren mit dem vollständigen LAP2 β der Ratte sowie mit den ersten 187 Aminosäuren dieses Proteins (Lang et al.; 1999). Zusätzlich werden auch Kernhüllenproteine in Zellen von Nicht-Säugetieren erkannt.

Diese Antikörper wurden auf einem Immunblot mit dem translatierten XLAP2-Protein getestet und es zeigte sich, dass das 66.000 D Protein klar von den Antikörpern erkannt wird, während das ebenfalls translatierte Kernmembranprotein p58 nicht vom Serum erkannt wurde.



III.1.6. Immunpräzipitation des XLAP2 mit MAN-Antikörper

Um dieses Ergebnis zu bestätigen und um zu klären, ob es sich bei dem 42 kDa-Protein wirklich nur um ein in vitro Produkt handelt, das durch einen internen Start an Methionin 190 in vitro transkribiert und translatiert wird, wurde das XLAP2-Protein mit dem MAN-Antikörper immunpräzipitiert. Da durch Immunblots mit dem vollständigem Ratten LAP2 β sowie der ersten 187 AS des Rattenproteins nachgewiesen wurde, dass das Epitop des MAN-Antikörpers die aminoternale Domäne des LAP2s erkennt, sollte das 42 kDa-Protein nicht mit diesem Antikörper immunpräzipitierbar sein, da hier die ersten 190 Aminosäuren nicht vorhanden wären.

Wie erwartet, konnte nur das größere Polypeptid von 66 kD immunpräzipitiert werden, während das kleinere Translationsprodukt von 42 kD nicht gewonnen wurde. Somit kann

davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem kleineren Polypeptid tatsächlich um ein Protein handelt, das in vitro durch ein internes Startcodon exprimiert wird.

Die Immunpräzipitation bestätigt auch, dass das erkannte Epitop des MAN-Antikörpers in der aminoterminalen Domäne der LAP2-Proteine zu finden ist. Das zur Kontrolle translatierte Kernmembranprotein Xp58 konnte mit diesem Antikörper nicht immunpräzipitiert werden.

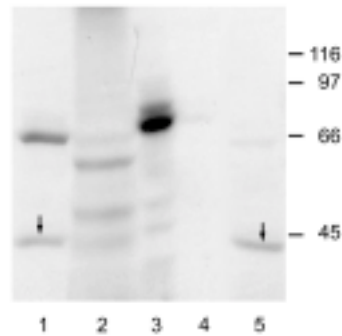


Abb. 3-8: Immunpräzipitation der in vitro transkribierten und translatierten Proteine XLAP2 (Spur 3) und Xp58 (Spur 4) mit dem MAN-Antikörper, gekoppelt an Protein A-Sepharose. Spur 1 zeigt zum Vergleich das in vitro transkribierte und translatierte XLAP2, Spur 2 Xp58, markiert mit 35 S-Methionin. In Spur 5 wurde der nicht gebundene Überstand des XLAP2 in vitro-Translationsprodukt nach der Immunpräzipitation aufgetragen. Das in vitro-Translationsprodukt von 42 kD ist mit Pfeilen markiert (Spur 1 und 5). Die Positionen der Referenzproteine (in kD) sind gekennzeichnet.

III.1.7. Nachweis des XLAP2 in somatischen Zellen von *Xenopus laevis*

III.1.7.1. Nachweis der LAP2 Proteine in *Xenopus laevis*

Wie schon erwähnt, werden in Säugerzellen drei unterschiedlich große Polypeptide von 78.000, 58.000 und 40.000 D vom MAN-Serum erkannt. Die Mobilitäten dieser Polypeptide in der SDS-PAGE entsprechen denen der LAP2-Isoformen α , β und γ . Da der MAN-Antikörper auch das in vitro transkribierte und translatierte XLAP2 erkennt, sollte dieses Protein auch in *Xenopus* Gewebe durch den MAN-Antikörper nachweisbar sein. Außerdem wäre es möglich, dass auch bei *Xenopus* mehrere XLAP2-Isoformen vorhanden sind, sodass neben dem bisher charakterisierten Klon noch andere Spleißvarianten eines LAP2-Gens vorhanden wären (siehe Harris et al., 1994; Berger et al., 1996). Um den MAN-Antikörper auf *Xenopus* Gewebe zu testen, und auch evtl. vorhandene XLAP2-Isoformen zu finden, wurden Kulturzellen aus *Xenopus* Nierenepithel (A6) sowie Zellen aus *Xenopus* Gewebe (Milz, Leber und Ovarfollikelzellen) in SDS-Probenpuffer aufgenommen und über SDS-PAGE

aufgetrennt. Zur Kontrolle wurden menschliche Epithel-Carcinoma-Zellen (HeLa) mit aufgetragen. Nach Übertragung der Proteine auf Nitrocellulose und anschließendem Immunblot mit dem MAN-Antikörper konnten in HeLa-Zellen die schon bekannten drei Polypeptide von 78.000, 58.000 und 40.000 D nachgewiesen werden. Dagegen wurde in allen somatischen Zellen von *Xenopus laevis* nur ein einziges Hauptprotein erkannt. Das detektierte Polypeptid war eindeutig größer als das LAP2 β der Säugerzellen (66.000 D *Xenopus*, 58.000 D HeLa), wies aber die gleiche elektrophoretische Mobilität wie das *in vitro* transkribierte und translatierte XLAP2 (Abb. 3-9 B; Spur 1) auf. LAP2-Proteine, die der α bzw. γ -Isoform entsprechen würden, konnten in *Xenopus* nicht nachgewiesen werden.

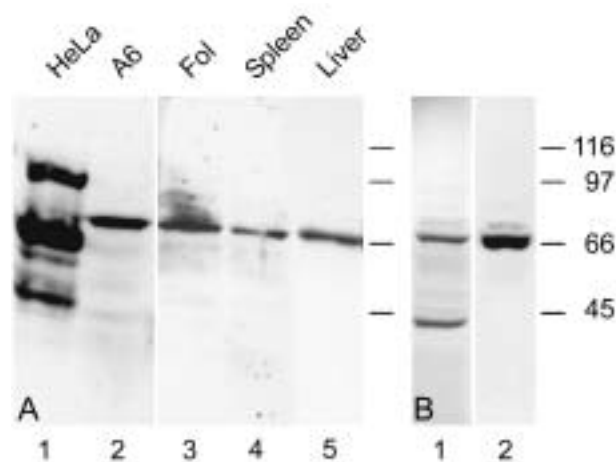


Abb. 3-9: Immunblot mit dem MAN-Serum;

A) Gesamte zelluläre Proteine aus HeLa-Zellen (Spur 1), *Xenopus* A6 Zellen (Spur 2) und *Xenopus* Gewebe (Spur 3: Follikelzellen, Spur 4: Milz, Spur 5: Leber) nach Auftrennung durch SDS-PAGE (12% Acrylamid) und Immunblot mit dem MAN-Serum

B) Vergleich der elektrophoretischen Mobilität des *in vitro* translatierten XLAP2 (Spur 1) mit dem Hauptprotein, das in *Xenopus* Gewebe (Follikelzellen) mit dem MAN-Antikörper nachgewiesen wurde. Die Polypeptide der beiden Proben wurden auf einem gemeinsamen Acrylamidgel (12%) aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose übertragen. Der Teil der Nitrocellulose, der Spur 1 enthielt, wurde direkt zur Autoradiographie weiterverwendet, der Teil der Nitrocellulose mit Spur 2 wurde mit dem MAN-Serum inkubiert.

Die Positionen der Referenzproteine (in kD) wurden in A) und B) markiert.

III.1.7.2. Immunfluoreszenz auf *Xenopus* Kulturzellen

Zur Lokalisation der vom MAN-Serum erkannten Proteine in *Xenopus laevis* wurden *Xenopus* A6-Zellen mit Methanol/Aceton fixiert und anschließend mit dem MAN-Serum inkubiert. Dabei reagierten die Antikörper mit der Kernperipherie und es konnte eine

gleichmäßige Randfärbung der Kernhülle beobachtet werden (Abb. 3-10A), die charakteristisch für Lamine und Proteine der inneren Kernmembran ist.

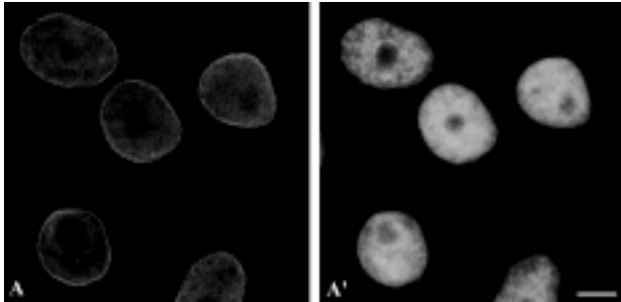


Abb. 3-10: Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

A) auf Xenopus A6 Zellen mit dem MAN-Serum

B) DNA-Färbung mit Hoechst 33258

Eichstrich: 10 μ m

III.2. Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen XLAP2

Da die LAP2 Proteine in Xenopus bisher nur mit dem menschlichen MAN-Serum nachweisbar waren und in unserem Labor noch keine spezifischen Antikörper gegen das Xenopus LAP2 zur Verfügung standen, sollten nun Antikörper hergestellt werden, die speziell gegen das Xenopus LAP2 gerichtet sind. Da das XLAP2 eine Xenopus-spezifische Sequenz von 67 AS (AS 315-382) aufweist, die nicht im Ratten LAP2 β zu finden ist, eignet sich diese Sequenz besonders gut zur Herstellung eines Xenopus-spezifischen Antikörpers. Allerdings würde diese kurze Sequenz von 67 AS (ca. 7,4 kD) nicht ausreichen, um in Tieren eine adäquate Immunreaktion auszulösen (nur Proteine größer als 15 kD werden vom Immunsystem erkannt und lösen somit eine Immunantwort aus), daher wurde zur Antikörperproduktion die Aminosäuresequenz AS 254-429 bakteriell exprimiert und zur Immunisierung verwendet.

III.2.1. Gewinnung des rekombinanten Proteins zur Immunisierung von Meerschweinchen

Um die Synthese eines bakteriell exprimierten Teilproteins des XLAP2 zu ermöglichen, wurde mit Hilfe der PCR ein Teil der cDNA (Nukleotide 762-1287) amplifiziert, der für die *Xenopus* spezifische Domäne des XLAP2's codiert, das PCR-Produkt über den TOPO-Vektor in den pQE-30 Expressionsvektor eincloniert und in *E. coli* SG13009 exprimiert. Nach Induktion mit IPTG konnte eine Expression (Abb. 3-11A, Spur 2) des rekombinanten Polypeptids nachgewiesen werden, jedoch nicht in nicht induzierten Zellen (Spur 1). Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE und Übertragung auf Nitrocellulose wurde das rekombinante Protein durch einen Antikörper nachgewiesen, der gegen die 6 Histidine gerichtet ist, die sich am aminoterminalen Ende des rekombinanten Proteins befinden (Abb. 3-11B). Das Protein konnte nur in der Fraktion nach IPTG-Zugabe nachgewiesen werden.

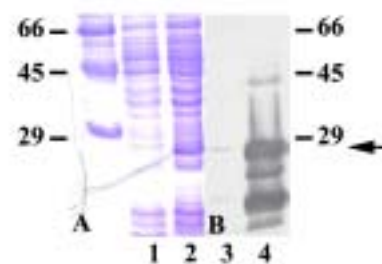


Abb. 3-11: Expression des rekombinanten Proteins (AS 254-429 des XLAP2) im pQE30-Vektor; Vergleich der SG13009 Zellen vor der Induktion mit IPTG (Spur 1 und 3) und 3h nach IPTG Zugabe (Spur 2 und 4). Die gesamten bakteriellen Proteine wurden durch 10% SDS-PAGE aufgetrennt und A) mit Coomassie Blue gefärbt. Der Pfeilkopf markiert das synthetisierte rekombinante Polypeptid. B) auf Nitrocellulose übertragen. Der Nachweis des exprimierten rekombinanten Proteins erfolgte mittels His-Tag-Antikörper.

Die Positionen der Referenzproteine sind markiert (in kD).

Das so hergestellte rekombinante Polypeptid, das am Aminoterminus sechs Histidine besaß, wurde mit Hilfe einer Nickel-Chelat Säule gereinigt und damit ein Meerschweinchen je dreimal mit 100 µg des gereinigten Polypeptids immunisiert.

III.2.2. Test des polyklonalen XLAP2 Antikörpers

Das erhaltene Antiserum wurde sowohl im Proteinblot (Abb. 3-12) mit Gesamtproteinen aus *Xenopus* Nierenepithelzellen (A6) und *Xenopus* Embryonalzellen (XTC) sowie in der Immunfluoreszenz (Abb. 3-13) getestet. Dabei konnte gesehen werden, dass der XLAP2-Antikörper im Immunblot mit *Xenopus* Kulturzellen deutlich ein Hauptprotein mit einer molekularen Masse von Mr 64.000 D reagiert. Die Größendifferenz des mit dem spezifischen XLAP2-Antikörper erkannten Polypeptid und dem mit dem MAN-Serum erkannten (66 kD vs. 64 kD) bzw. *in vitro* Translationsprodukt des XLAP2 kann am Gelsystem liegen, könnte aber auch auf das Vorhandensein eines geringfügig kleineren Proteins hinweisen. Bei der indirekten Immunfluoreszenz ist während der Interphase eine Kernrandfärbung zu erkennen, das typisch ist für Lamine und Kernmembranproteine. In der Mitose ist das Antigen in der Zelle verteilt, dabei bleiben die Chromosomen ausgespart. Dekondensieren sich die Chromosomen wieder, so sieht man eine kurzfristige Co-Lokalisation des XLAP2 mit dem Chromatin, bevor es wieder in die Kernmembran eingebaut wird.

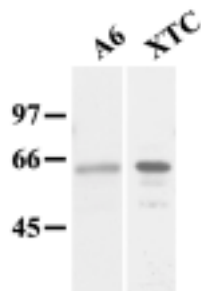


Abb. 3-12: Test des polyklonalen Antikörpers XLAP2 im Immunblot auf den gesamten Proteinen von *Xenopus* A6 und XTC Zellen.

Das Antiserum zeigt im Immunblot auf den Proteinen der *Xenopus* Zelllinien A6 und XTC eine starke Reaktion mit einem Antigen bei ca. 64.000 D. Die Positionen der Referenzproteine (in kD) sind angegeben.

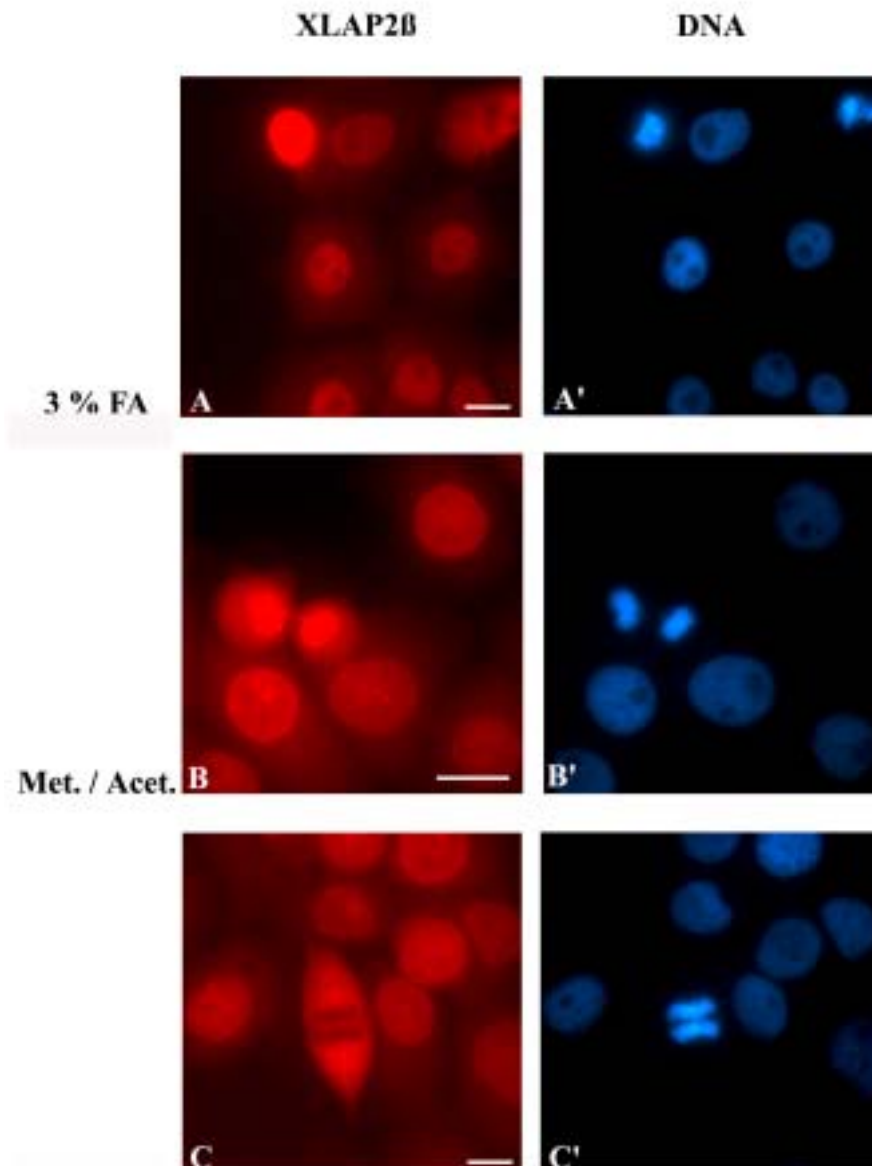


Abb. 3-13: Test des polyklonalen Antikörpers XLAP2 auf Xenopus A6 Zellen nach verschiedenen Fixierungsmethoden. Die erste Zeile zeigt Xenopus A6 Kulturzellen nach Fixierung mit 3% Paraformaldehyd und Permeabilisierung mit Triton X-100 (3 % FA). Die zweite und dritte Zeile zeigt Xenopus A6 Kulturzellen nach der Methanol/Aceton Fixierung in verschiedenen Zellstadien (Met. / Acet.). Die DNA-Färbung mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 ist in der rechten Spalte (A'-C') dargestellt.

Eichstrich: 10 μm

III.2.3. Test des Antikörpers auf Kreuzreaktionen

Um festzustellen, ob der Antikörper auch die LAP2-Proteine anderer Amphibien erkennt, wurde der Antikörper auf Gewebe unterschiedlicher Amphibien getestet, deren

Gewebeproben freundlicherweise von Dr. Eugenia del Pino, Quito, Ecuador, zur Verfügung gestellt wurden.

Wie hier deutlich zu erkennen ist, reagiert der XLAP2-Antikörper mit keinem der getesteten Gewebeproben (Abb. 3-14A), im Gegensatz zum MAN-Antikörper, der auch Proteine in unterschiedlichen Amphibiengeweben erkennt (Abb. 3-14B). Dies zeigt, dass der von uns gewonnene Antikörper spezifisch LAP2-Proteine von *Xenopus* erkennt und keine Kreuzreaktionen mit anderen Organismen, insbesondere Amphibien eingeht.

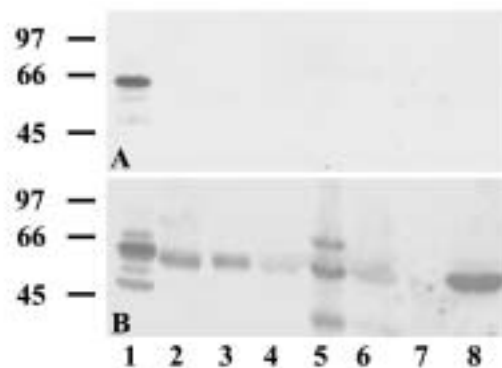


Abb. 3-14: Immunblot mit Gesamtproteinen von Zellen und Geweben verschiedener Organismen: *Xenopus* XTC Zellen (Spur 1), *Colostethus machalilla* Leber- und Nierengewebe Stadium 25 (Spur 2) und Stadium 20 (Spur 3), *Scinax quinefasciata* Leber (Spur 4) und Ovar (Spur 5), *Eleutherodactylus achatinus* Leber (Spur 6) und Ovar (Spur 7), *Eleutherodactylus unistrigatus* Leber (Spur 8)

A) Test des polyklonalen Antikörpers XLAP2: Der Antikörper zeigt im Immunblot nur auf den Proteinen der *Xenopus* Zelllinie XTC (Spur 1) eine starke Reaktion. Die Proteine der übrigen Organismen zeigen auch nach längerer Exposition keine nennenswerten Signale.

B) Immunblot mit MAN-Serum: Die Antikörper des MAN-Serums reagieren in allen Organismen mit einem Antigen. Die Auftragungsmengen entsprechen Abb. 3-14A.

Die Positionen der Referenzproteine (in kD) sind angegeben.

III.2.4. Test des Antikörpers auf verschiedenen *Xenopus* Geweben

Um eine evtl. Gewebe-spezifische Expression des XLAP2s zu untersuchen, wurde einem *Xenopus laevis* Frosch frisches Gewebe entnommen, sofort in Aceton fixiert, in SDS-Probenpuffer homogenisiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Wie im Immunblot in Abb. 3-15A zu erkennen ist, wird nicht nur das schon bekannte 66.000 D Protein vom XLAP2-Antikörper erkannt, sondern auch Polypeptide, die eine geringfügig höhere bzw. niedrigere Mobilität im Gel aufweisen. Im Ovar scheinen drei LAP2 Proteine in einem ausgeglichenen

Verhältnis vorhanden zu sein, während bei allen anderen Geweben sowie bei den Xenopus A6 Zellen ein Polypeptid bevorzugt exprimiert wird.

Um diese Ergebnisse mit anderen Antikörpern zu überprüfen, wurden nochmals die gleichen Mengen der Gewebeproben gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und zum einem mit dem MAN-Serum, und zum anderen mit einem anderen Xenopus-spezifischen Antikörper inkubiert, der uns freundlicherweise von Dr. Katherine Wilson zur Verfügung gestellt wurde. Dieser zweite XLAP2-Antikörper (XLAP2-Wilson) erkennt Epitope in den aminoterminalen 170 Aminosäuren der Xenopus LAP2-Proteine, im Gegensatz zu dem von mir hergestellten.

Beide Antikörper erkennen in allen Proteinproben ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 64 kD sowie 66 kD, wobei das kleinere der beiden Proteine ein stärkeres Signal ergibt. Die drei Proteinbanden, die man mit dem XLAP2-Antikörper im Ovargewebe findet (Abb. 3-15A, Spur 6), sind mit dem MAN-Serum auch in Herz (Abb.3-15B, Spur 4) sowie schwächer in Lebergewebe (Abb.3-15B, Spur 2) und Gehirn (Spur 5) zu erkennen.

Die häufig zu erkennende Proteinbande bei ca. 45.000 D stellt wahrscheinlich ein Degradationsprodukt dar, das recht stabil ist und deshalb in den meisten Gewebeproben zu finden ist. Dies ist u.a. auch bei Laminen bekannt, bei denen die aminoternale Domäne oft abgespalten wird und somit in SDS-PAGE eine typische Bande zu erkennen ist, die kein eigenes Protein darstellt, sondern nur von einem Degradationsprodukt herrührt.

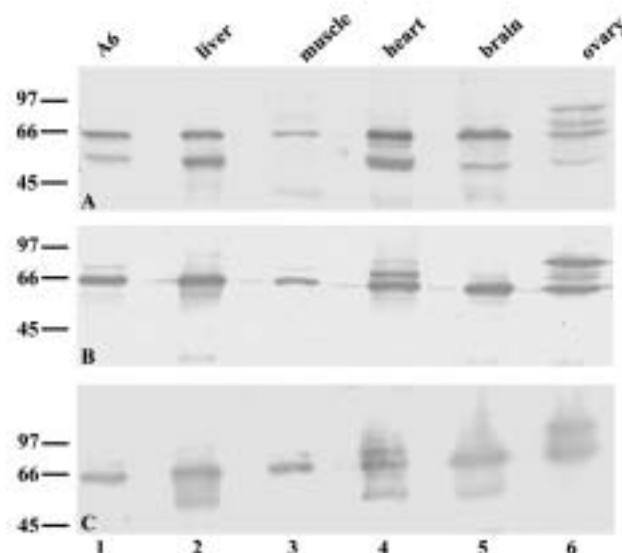


Abb. 3-15: Expression der Xenopus LAP2 Proteine in verschiedenen Geweben mittels Western Blot Analyse (11% Acrylamid): Aufgetragen wurden homogenisierte Gewebeproben von *Xenopus laevis*

aus Leber (Spur 2), Skelettmuskulatur (Spur 3), Herz (Spur 4), Gehirn (Spur 5) und Ovar (Spur 6) sowie Gesamtproteine aus *Xenopus* A6 Zellen (Spur 1). Die Auftragungsmengen wurden angeglichen.

A) Immunblot mit dem *Xenopus*-spezifischen Antikörper XLAP2

B) Immunblot mit dem menschlichen Antiserum MAN

C) Immunblot mit dem *Xenopus* LAP2 Antikörper von K. Wilson, gerichtet gegen Epitope in der aminoterminalen Domäne des XLAP2

Die Position der Referenzproteine (in kD) sind angegeben.

III.3. Expressionsmuster des XLAP2

III.3.1. Unterschiedliche Isoformen des XLAP2

Aufgrund der so gewonnenen Erkenntnisse, dass es unterschiedliche Isoformen des XLAP2 bei *Xenopus laevis* zu geben scheint, wurden nochmals die Klone näher betrachtet, die bei der Hybridisierung der *Xenopus* Ovar cDNA-Genbank ein positives Signal ergaben (siehe III.1), jedoch nicht weiter untersucht wurden, da nach einem Restriktionsverdau mit EcoRI / XhoI bzw. EcoRI / KpnI mehrere DNA-Banden zu sehen waren. Durch eine vollständige Sequenzierung dieser beiden Klone a und h konnte festgestellt werden, dass deren Nukleotidsequenzen weitgehend mit der bisher bekannten Sequenz des XLAP2 β 's übereinstimmen, allerdings durch Insertion bzw. Deletion 123 Nukleotide länger bzw. 154 Nukleotide kürzer waren. Der größte der Klone (Klon h) besitzt ein offenes Leseraster von 1674 Nukleotiden und codiert somit für ein Protein von 558 Aminosäuren. Zusätzlich zur XLAP2 β -Sequenz besitzt er eine Insertion von 37 Aminosäuren an Glutaminsäure¹⁹⁹ des XLAP2 β . Der kleinste der drei Klone (Klon a) ist bis auf eine Deletion von 155 Nukleotiden zwischen den Nukleotiden 1112 und 1267 des XLAP2 β mit diesem identisch. Allerdings bewirkt ein fehlendes Guanosin an Nukleotid 1113 des Klones a eine Leserasterverschiebung. Dies könnte an einem nicht korrekt gespleißten Intron liegen, vergleicht man diese Sequenz mit einer veröffentlichten XLAP2 cDNA (Gant et al., 1999; accession number AF048816), die auch eine Leserasterverschiebung an derselben Stelle aufweist. Fügt man das fehlende Nukleotid in die Sequenz ein, ergäbe dies ein vollständiges Leseraster, welches für ein Protein mit 466 Aminosäuren codieren würde. Die Sequenz entspräche einem um 52 Aminosäuren verkürzten XLAP2 β , dem die Aminosäuren 337-388 fehlen (siehe Abb. 3-16).

Klona	MPEFLQDPSVLTKEKLNKSELVANNVTLPSTGEQRKDVYVQLYQLHLTSQNSGTPDFSSDEE	60
XLAP2 β	MPEFLQDPSVLTKEKLNKSELVANNVTLPSTGEQRKDVYVQLYQLHLTSQNSGTPDFSSDEE	60
Klonh	MPEFLQDPSVLTKEKLNKSELVANNVTLPSTGEQRKDVYVQLYQLHLTSQNRATPDFSSDEE	60

```

*****
Klona REATPMRGRGRPPGRKATKKTDPKPAEEKDDPDVTELSNEALKEELLKYGMKPGPILSNT 120
XLAP2ß REATPMRGRGRPPGRKATKKTDPKPAEEKDDPDVTELSNEALKEELLKYGMKPGPILSNT 120
Klonh REATPMRGRGRPPGRKATKKTDPRAEEKDDPDVTELSNEALKEELLKYGMKPGPILSNT 120
*****:*****

Klona RKLIEQRLFKLKEQGLASSALPADTSKADNKQNGNTDSEQYSDNEEEAKVELTFEKREPL 180
XLAP2ß RKLIEQRLFKLKEQGLASSALPADTSKADNKQNGNTDSEEYSDNEEEAKVELTFEKREPL 180
Klonh RKLIEQRLFKLKEQGLASSALPADTSKADNKQNGNTDSEQYSDNEEEAKVELTFEKREPL 180
*****

Klona RGNPKPQVTMRNRTEKTE-----TVSE 203
XLAP2ß RGNPKPQVTMRNRTEKTE-----TVSE 203
Klonh RGNPKPQVTMRNRTEKTEAEEDTDLIPELVKRSNRSPKGFLLDDVEDLSTDHVTVSE 240
*****

Klona DVVTEAAWTSGPVKSGPVQTVYKESTKISRRTPRKKVVAPDPVLFDDADISEVPPISELV 263
XLAP2ß DVVTEAAWTSGPVKSGPVQTVYKESTKISRRTPRKKVVAPDPVLFDDADISEVPPISELV 263
Klonh DVVTEAAWTSGPAKSGPVQTVYKELAKVSRRTPRKKVVAPDPVPFDDADIAEVPPISESV 300
***** *

Klona VP-ASNQIFAYAENEHFESSKVVNRVPGSLKHAETLLSVGEISELTRRTPKKQLISEKHL 322
XLAP2ß VP-ASNQIFAYAENEHFESSKVVNRVPGSLKHAETLLSVGEISELTRRTPKKQLISEKHL 322
Klonh VEPASNQILTYAENEHFESRKVVNQVPESLKHAETLLSVSEFSELTRRTQKKQLISEKHL 360
* *****

Klona NVTRETESGSSQIRL----- 337
XLAP2ß NVTRETESGSSQIRLIDSI--GFSNPTDLLNTALIEETKQIIEDSLETPKKTQKLIKITKF 380
Klonh NLTRETDSGSSQIRLIDVHSIGFTNPTDLLNTALIEETKHIIEDSLETPKKTQKLIKITKF 420
* *****

Klona -----VEKNFEARRTERDILKEMFPKEFLTPTGISASCRRPIRGAAGRPLNATDFKT 389
XLAP2ß VTPVKKQIVEKNFEERRTERDILKEMFPKEFLTPTGISASCRRPIRGAAGRPLNATDFKT 440
Klonh VTPVKKQIVEKTFEERRTERDILKEMFPTEFSTPTGISASCRRPIRGAAGRPLNATDLKI 480
*** ** *****

Klona DETYTSKYVSNVSKYTPAVEAKSAKVKPGRSLPAWIKILLCIILVVFCLVYQAMETNDG 449
XLAP2ß DETYTSKYVSNVSKYTPAVEAKSAKVKPGRSLPAWIKILLCIILVVFCLVYQAMETNDG 500
Klonh NETYTSKYVSNVSKYTPAVEVKSEKVKPGRSLPVWIKILMFLILVVFCLLVYQAMETNEG 540
*****:*****

```

```

Klona   IAFSKLFG-ITESNKTEN 466
XLAP2β  IAFSKLFLGITESNKTEN 518
Klonh   MSFSKLLLLGITESNKTEN 558
        ****      *

```

Abb. 3-16: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Xenopus LAP2-Klone. Die Proteine bestehen aus 466 (Klon a), 518 (XLAP2β) bzw. 558 (Klon h) Aminosäuren. Identische Aminosäuren sind mit * gekennzeichnet.

Bei einem Vergleich aller meiner drei isolierten XLAP2 Klone mit publizierten Sequenzen der XLAP2-Proteine (Gant et al. 1999) stellte ich fest, dass der größte der drei Klone (Klon h) der publizierten Sequenz AF048815 (GenBank) zu 97% entspricht, die Sequenz des XLAP2β zu 89% der Sequenz AFO48817 und die cDNA-Sequenz des Klons a zu 68% der publizierten Sequenz AF048816. Alle drei von T. Gant publizierten cDNA Sequenzen wurden durch Hybridisierung einer Stadium IV Xenopus Oocyten cDNA-Genbank mit einer radioaktiven Sonde gewonnen, die das Gesamt-LAP2β des Menschen enthielt. Alle drei Klone besitzen am Carboxy- wie auch am Aminoterminal eine hohe Homologie zur Sequenz des menschlichen LAP2β. Zusätzlich besitzen sie 3 bisher unbekannte Exons, die z.T. in allen drei Klonen vorhanden (Exon B: AS 357-373), bzw. alternative Spleißvarianten sind (Exon A: AS198-234 bzw. Exon C: 374-426) und nicht in allen drei Klonen vorkommen (Klon AF048816 besitzt nur Exon A und B, Klon AFO48817 besitzt nur Exon B und C, während Klon AFO48815 alle drei Exons beinhaltet). Alle drei Exons befinden sich an Exon-Grenzen der genomischen Sequenz der Maus DNA (Berger et al., 1996). Betrachtet man die von mir isolierten Klone, so findet man in Klon h alle drei Exons A, B und C, in XLAP2β die Exons B und C und in Klon a nur Exon B. Dadurch erklärt sich auch die geringe Homologie des Klons a mit AF048816, welches zusätzlich noch Exon A enthält. Ausserdem wird AFO48817 als Protein ohne Transmembrandomäne beschrieben, während die Sequenz des Klons a eine Transmembrandomäne vermuten lässt. Daher wurde diese Sequenz bei dem untenstehenden Sequenzvergleich nicht berücksichtigt. Die Bereiche, die die Exons A, B und C umfassen, sind farbig markiert und unterstrichen.

```

AF048817      MPEFLQDPSVLTKEKLNKSELVANNVTLPSTGEQRKDVYVQLYLQHLTSQNRATPDFSSDEE 60
AF048815      MPEFLQDPSVLTKEKLNKSELVANNVTLPSTGEQRKDVYVQLYLQHLTSQNRATPDFSSDEE 60
XLAP2Klonh    MPEFLQDPSVLTKEKLNKSELVANNVTLPSTGEQRKDVYVQLYLQHLTSQNRATPDFSSDEE 60
XLAP2β        MPEFLQDPSVLTKEKLNKSELVANNVTLPSTGEQRKDVYVQLYLQHLTSQNSGTPDFSSDEE 60
XLAP2Klona    MPEFLQDPSVLTKEKLNKSELVANNVTLPSTGEQRKDVYVQLYLQHLTSQNSGTPDFSSDEE 60
        *****

```


AF0488817 REATPMRGRGRPPGRKATKKTKDPRAEEKDDPDVTELSNEALKEELLKYGMKPGPILSNT 120
 AF0488815 REATPMRGRGRPPGRKATKKTKDPRAEEKDDPDVTELSNEALKEELLKYGMKPGPILSNT 120
 XLAP2Klonh REATPMRGRGRPPGRKATKKTKDPRAEEKDDPDVTELSNEALKEELLKYGMKPGPILSNT 120
 XLAP2ß REATPMRGRGRPPGRKATKKTKDKPAEEKDDPDVTELSNEALKEELLKYGMKPGPILSNT 120
 XLAP2Klona REATPMRGRGRPPGRKATKKTKDKPAEEKDDPDVTELSNEALKEELLKYGMKPGPILSNT 120

AF0488817 RKLIEQRLKLEQGLESSAPPADSSKADNKQNGNTDSEHYSDKEEEAKIELTFEKREPL 180
 AF0488815 RKLIEQRLKLEQGLESSAPPADSSKADNKQNGNTDSEHYSDKEEEAKIELTFEKREPL 180
 XLAP2Klonh RKLIEQRLFKLKEQGLASSALPADTSKADNKQNGNTDSEQYSDNEEEAKVELTFEKREPL 180
 XLAP2ß RKLIEQRLFKLKEQGLASSALPADTSKADNKQNGNTDSEYSDNEEEAKVELTFEKREPL 180
 XLAP2Klona RKLIEQRLFKLKEQGLASSALPADTSKADNKQNGNTDSEQYSDNEEEAKVELTFEKREPL 180
 ***** ** **** ** ** ***** ** *****

AF0488817 RGKSKTQV-MRNRREKTE-----TVSE 202
 AF0488815 RGKSKTQV-MRNRREKTEAEEDTDLIPELNVKRSNRSPPKGF*TLDDVEDLSTDHVTVSE 239
 XLAP2Klonh RGNPKPQVTMRNRREKTEAEEDTDLIPELNVKRSNRSPPKGF*TLDDVEDLSTDHVTVSE 240
 XLAP2ß RGNPKPQVTMRNRREKTE-----TVSE 203
 XLAP2Klona RGNPKPQVTMRNRREKTE-----TVSE 203
 ** * * * ***** ****

Exon A

AF0488817 DVVTEAAWTSGBPAGSGPVQTVYKELAKVTRRTPRKKVVAPDPVPFDDADIAEVPPISESV 262
 AF0488815 DVVTEAAWTSGBPAGSGPVQTVYKELAKVTRRTPRKKVVAPDPVPFDDADIAEVPPISESV 299
 XLAP2Klonh DVVTEAAWTSGBPAGSGPVQTVYKELAKVSRRTPRKKVVAPDPVPFDDADIAEVPPISESV 300
 XLAP2ß DVVTEAAWTSGPVKSGPVQTVYKESTKISRRTPRKKVVAPDPVLFDDADISEVPPISELV 263
 XLAP2Klona DVVTEAAWTSGPVKSGPVQTVYKESTKISRRTPRKKVVAPDPVLFDDADISEVPPISELV 263
 ***** ***** * ***** ***** *

AF0488817 VEPASNQILTYAENEHFESRKVVNQVPESLKAETLLSVSEFSELTRRTSKKPLISEKHL 322
 AF0488815 VEPASNQILTYAENEHFESRKVVNQVPESLKAETLLSVSEFSELTRRTSKKPLISEKHL 359
 XLAP2Klonh VEPASNQILTYAENEHFESRKVVNQVPESLKAETLLSVSEFSELTRRTQKKQLISEKHL 360
 XLAP2ß VP-ASNQIFAYAENEHFESSKVVNRVPGSLKAETLLSVGEISELTRRTPKKQLISEKHL 322
 XLAP2Klona VP-ASNQIFAYAENEHFESSKVVNRVPGSLKAETLLSVGEISELTRRTPKKQLISEKHL 322
 * ***** ***** ** ** ***** * ***** ** ***** *

AF0488817 NLTRETDSGSSQIRLIDVHSIGFTNPTDLLNTALIEETKHIIEDSLETPKKTQQLKITKF 382
 AF0488815 NLTRETDSGSSQIRLIDVHSIGFTNPTDLLNTALIEETKHIIEDSLETPKKTQQLKITKF 419
 XLAP2Klonh NLTRETDSGSSQIRLIDVHSIGFTNPTDLLNTALIEETKHIIEDSLETPKKTQQLKITKF 420
 XLAP2ß NVTRETESGSSQIRLID--SIGFSNPTDLLNTALIEETKQIIEDSLETPKKTQQLKITKF 380
 XLAP2Klona NVTRETESGSSQIRL----- 337
 * **** *****

Exon B

Exon C

AF0488817 VTPVKKQIVEKTFEERRTERDILKEMFPTEFSTPTGISASCRRPIRGAAGRPLNATDLKI 442
 AF0488815 VTPVKKQIVEKTFEERRTERDILKEMFPTEFSTPTGISASCRRPIRGAAGRPLNATDLKI 479
 XLAP2Klonh VTPVKKQIVEKTFEERRTERDILKEMFPTEFSTPTGISASCRRPIRGAAGRPLNATDLKI 480

```

XLAP2β      VTPVKKQIVEKNFEERRTERDILKEMFPKEFLTPTGISASCRRPIRGAAGRPLNATDFKT 440
XLAP2Klona  -----VEKNFEARRTERDILKEMFPKEFLTPTGISASCRRPIRGAAGRPLNATDFKT 389
                *** ** ***** ** ***** *
                Exon C

AF0488817   NETYTSKYVSNVSKYTPAVEVKSEKVKPGRSLPVWIKILMFLILVVFCLLVYQAMETNEG 502
AF0488815   NETYTSKYVSNVSKYTPAVEVKSEKVKPGRSLPVWIKILMFLILVVFCLLVYQAMETNEG 539
XLAP2Klonh  NETYTSKYVSNVSKYTPAVEVKSEKVKPGRSLPVWIKILMFLILVVFCLLVYQAMETNEG 540
XLAP2β      DETYTSKYVSNVSKYTPAVEAKSAKVKPGRSLPAWIKILLCIILVVFCLLVYQAMETNDG 500
XLAP2Klona  DETYTSKYVSNVSKYTPAVEAKSAKVKPGRSLPAWIKILLCIILVVFCLLVYQAMETNDG 449
                ***** ** ***** ***** ***** ***** *

AF0488817   MSFSKLLLGITESNKTEN 520
AF0488815   MSFSKLLLGITESNKTEN 557
XLAP2Klonh  MSFSKLLLGITESNKTEN 558
XLAP2β      IAFSKLFLGITESNKTEN 518
XLAP2Klona  IAFSKLFG-ITESNKTEN 466
                ****      *****

```

Abb. 3-17: Sequenzvergleich der unter T. Gant (1999) veröffentlichten Sequenzen AFO488815 und AFO488817 mit Klon a, XLAP2β und Klon h. Identische Aminosäuren sind mit * gekennzeichnet. Die Exons A, B und C sind farbig markiert und unterstrichen.

III.3.2. Expressionsmuster in verschiedenen Xenopus Geweben

Nachdem in verschiedenen Gewebetypen von *Xenopus laevis* LAP2-Proteine unterschiedlicher Mobilität nachgewiesen wurden, sollten diese Isoformen auch als mRNA verschiedener Größe vorhanden sein. Um dies zu überprüfen, wurde aus unterschiedlichem *Xenopus* Gewebe bzw. A6 Kulturzellen RNA isoliert, mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA transkribiert und mittels PCR mit spezifischen XLAP2-Primern amplifiziert. Das verwendete Gewebe stammte aus Leber, Skelettmuskulatur, Herz, Gehirn und Ovar. Es wurden unterschiedliche Primer benutzt, um einerseits die gesamte XLAP2-Sequenz von Start- bis Stopcodon, und andererseits die XLAP2-Sequenz von Nukleotid 434-1176 (beinhaltet den *Xenopus*-spezifischen Einschub) zu erhalten. Nach der Amplifikationsreaktion wurden die DNA-Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels in die DNA eingelagertem Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Als Kontrolle und zum Größenvergleich der PCR-Produkte wurde parallel dazu eine PCR mit der cDNA der drei XLAP2 Klone a, o (=XLAP2β) und h durchgeführt und das jeweilige PCR-Produkt auf das Gel mit aufgetragen (Abb. 3-18, Spur 1-3). Wie erwartet, besitzen alle drei Klone ein unterschiedliches Laufverhalten mit Fragmentgrößen von ca. 1670 bp, 1550 bp und 1400 bp (A) bzw. ca. 850 bp, 740 bp und 580 bp (B). Dabei entspricht die Mobilität des

kleinsten Klones (a) der Mobilität des DNA-Fragmentes, das bei den meisten RT-PCR-Produkten aus Gewebe- und Zellmaterial am stärksten amplifiziert worden ist. Die größeren Fragmente, die bei den RT-PCR-Produkten aus Ovar, Leber und Herzgewebe amplifiziert wurden, entsprechen ihrer Größe nach der Längen der cDNA des XLAP2 β sowie des größeren Klons h. Somit scheinen alle drei Isoformen des XLAP2 in somatischem Gewebe vorhanden zu sein, wobei das Expressionsmuster gewebespezifisch ist.

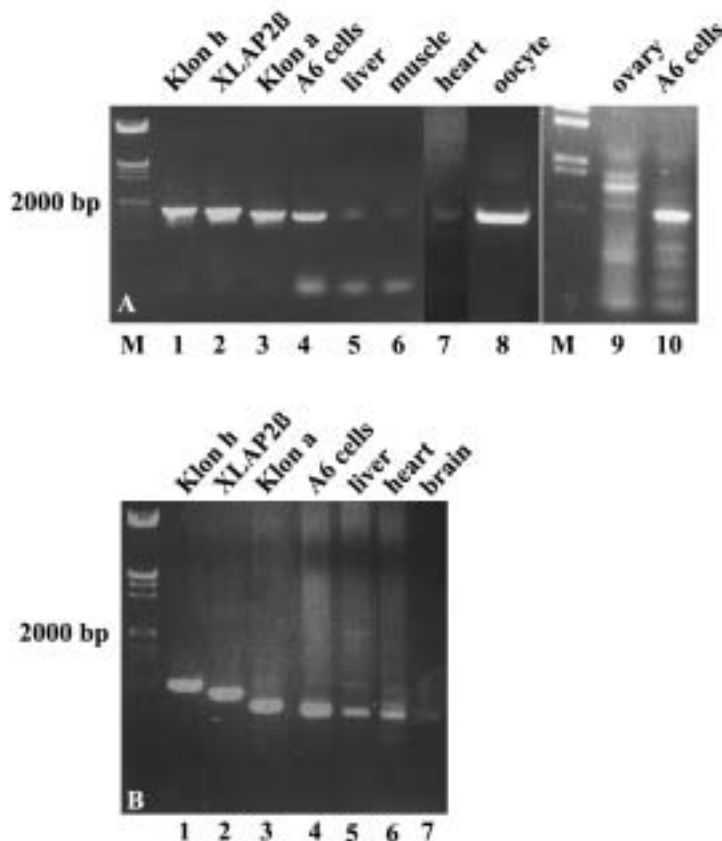


Abb. 3-18: Vergleich der PCR-Fragmente der XLAP2-Klone a, o (=XLAP2 β) und h mit den RT-PCR-Produkten aus unterschiedlichen RNA-Präparationen.

A) Die PCR wurden mit der Primer-Kombination XLAP2-START / STOP durchgeführt. Es wurde RNA aus *Xenopus* A6 Zellen (Spur 4,10), Leber (Spur 5), Skelettmuskulatur (Spur 6), Herz (Spur 7), Oocyte (Spur 8), und Ovar (Spur 9) gewonnen. Zur Kontrolle wurde die cDNA der XLAP2 Klone a, o (=XLAP2 β) und h (Spur 1-3) verwendet.

B) Die PCR wurde mit der Primer-Kombination XLAP2 434-1176 durchgeführt. Die RNA stammte aus A6 Zellen (Spur 4), Leber (Spur 5), Herz (Spur 6) und Gehirn (Spur 7). Als Kontrolle diente die Amplifikation der cDNA der XLAP2 Klone a, o (=XLAP2 β) und h (Spur 1-3).

Die Auftrennung erfolgte im 1% (A) bzw. 0,75% (B) Agarosegel, als Längenmarker wurde λ -DNA nach EcoRI/HindIII-Verdau aufgetragen.

III.3.3. Expressionsmuster in frühen Entwicklungsstadien

Um die drei unterschiedlichen Isoformen des XLAP2 bzw. deren mRNA im Ovar näher zu untersuchen und ihre zeitliche Expression besser zu verstehen, wurden dem Ovar Gewebeprobe unterschiedlicher Entwicklungsstadien entnommen, wie z.B. Oocyten im Stadium 5, Oocyten im Zwischenstadium sowie prävitelogene Oocyten. Nach der RT-PCR konnten bei allen drei Oocytentypen nur zwei unterschiedliche Banden nachgewiesen werden, im Gegensatz zum Gesamt-Ovargewebe, in dem auf Proteinebene wie auch auf RNA-Ebene immer drei Banden zu sehen sind. Allerdings besteht das Ovar aus Gewebe unterschiedlicher Entwicklungsstufen, u.a. enthält es auch somatisches Gewebe. Dies könnte bedeuten, dass es sich bei diesen zwei DNA-Fragmenten, die in den Oocyten zu finden sind, um Isoformen handelt, die hauptsächlich in frühen Entwicklungsstadien exprimiert werden, in somatischen Zellen allerdings ihre Bedeutung verlieren und deshalb weniger oder gar nicht mehr exprimiert werden. Dies würde auch erklären, weshalb in somatischem Gewebe die unterste Bande immer stärker zu sehen ist (auf Protein- wie auch auf RNA-Ebene).

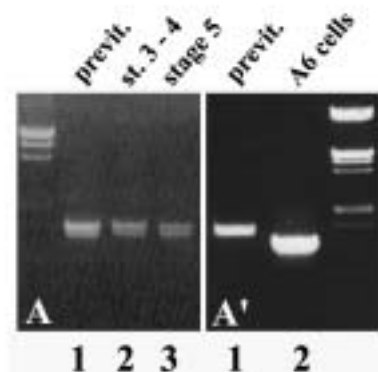


Abb. 3-19: RT-PCR-Fragmente aus RNA-Präparationen unterschiedlichen Ovargewebes von *Xenopus laevis*. Die PCR wurden mit der Primer-Kombination XLAP2-START / STOP durchgeführt. Aufgetragen wurden PCR-Produkte aus Oocyten RNA verschiedener Stadien: Oocyten im prävitelogenem Stadium (Spur 1, previt.), Oocyten im Zwischenstadium (Spur 2, St. 3-4) und Oocyten im Stadium 5 (Spur 3, stage 5). Zum Vergleich wurde das PCR-Produkt aus RNA der A6 Zellen (A', Spur 2, A6 cells) verwendet, im Vergleich zu Oocyten im prävitelogenem Stadium (A', Spur 1, previt.). Die Auftrennung erfolgte im 1% Agarosegel, als Längenmarker wurde λ -DNA nach EcoRI/HindIII-Verdau aufgetragen

Zur Überprüfung, ob es sich hierbei auch wirklich um Oocyten-spezifische RNA handelte, wurde mittels spezifischer Primer die cDNA vom *Xenopus* Lamin L_{III} und Lamin L_I amplifiziert. Das *Xenopus* Lamin L_{III} zeichnet sich dadurch aus, dass es nur Oocyten-spezifisch exprimiert wird und somit als Nachweis für das Vorhandensein von Oocyten-RNA

hervorragend geeignet ist. Das Xenopus Lamin L_I wiederum wird in somatischen Zellen wie auch schwach in Oocyten exprimiert und dient als Kontrolle. Als Primer wurden Oligonukleotide gewählt, die den gesamten Bereich des offenen Leserasters der Lamine L_{III} und L_I umfassen.

Wie in Abb. 3-20 zu erkennen ist, wurde die DNA beider Lamine amplifiziert, was darauf schließen lässt, dass es sich bei der verwendeten RNA um Oocyten-RNA handelt, und nicht etwa nur um Follikelzell-RNA, d.h. aus somatischem Gewebe, die häufig im Ovargewebe vorhanden ist.

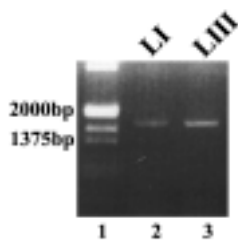


Abb. 3-20: RT-PCR-Fragmente aus Xenopus Oocyten-RNA. Die PCR wurden mit den jeweiligen upstream / downstream Primer von Lamin L_I: 1-1788 und Lamin L_{III}: 1-1739 durchgeführt.

Die Auftrennung erfolgte im 1 % Agarosegel, als Längenmarker wurde λ -DNA nach EcoRI/HindIII-Verdau aufgetragen.

III.3.4. In vitro Transkription und Translation zweier Isoformen des XLAP2

Um die Charakterisierung der unterschiedlichen Isoformen abzuschließen, sollte noch eine in vitro Transkription mit anschließender Translation in Gegenwart von ³⁵S-markiertem Methionin durchgeführt werden, um auch auf Proteinebene die Größe der unterschiedlichen XLAP2-Isoformen miteinander vergleichen zu können. Die zuerst bekannte und auch schon näher charakterisierte Isoform des XLAP2 β , bestehend aus 518 Aminosäuren, wurde schon zu Beginn der Arbeit in vitro transkribiert und translatiert und zeigte bei der gelelektrophoretischen Auftrennung ein Polypeptid mit einem apparenten Molekulargewicht von 66 kD (Abb. 3-6, Spur 1). Aufgrund einer Fusion der DNA des kleinsten Klonen a mit der DNA-Sequenz eines ribosomalen Proteins am 5'-Ende sowie einer Unterbrechung des Leserasters durch ein fehlendes Nukleotid konnte dieser nicht in vitro transkribiert und translatiert werden (Abb.3-21, Spur 1). Dadurch konnte auch nicht auf Proteinebene bestätigt werden, dass es sich hierbei um das kleinste der XLAP2-Proteine handelt, welches vorwiegend in somatischem Gewebe exprimiert wird. Somit wurden nur die cDNA des XLAP2 β 's und des Proteins, welches aus 558 Aminosäuren besteht, in vitro transkribiert und translatiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Abb. 3-21A zeigt die beiden Translationsprodukte nach Schwärzung des Röntgenfilms durch Autoradiographie. In Spur 2 ist das schon bekannte Protein des XLAP2 β mit einem apparenten Molekulargewicht von 68 kD zu erkennen. Das translatierte Produkt des Klonen h zeigt in Spur 3 ein apparentes

Molekulargewicht von 84 kD. Wie auch bei XLAP2 β scheint auch bei Klon h bei der Translation ein internes Startcodon als in-vitro-Translationsbeginn zu fungieren (vgl. Abb. 3-6, Translationsprodukt des XLAP2 β). Um einen direkten Größenvergleich mit den in Gewebe vorkommenden XLAP2-Isoformen zu haben, und um die Spezifität des größeren Proteins als Mitglied der XLAP2-Familie zu bestätigen, wurden die Translationsprodukte zusammen mit Gesamtproteinen aus *Xenopus* A6 Zellen, Fraktionen aus Eimembrane (Protokoll siehe Gajewski und Krohne, 1999) und verschiedener Gewebe nach Auftrennung durch SDS-PAGE auf Nitrocellulose übertragen und mit dem XLAP2 β -spezifischen Antikörper geblottet (Abb.3-21B). Wie man erkennen kann, entspricht die Größe des translatierten Klons h des Proteins, welches in Eimembranen und Ovar exprimiert wird (Spur 3 und 9). Die kräftige Bande bei den Gesamtproteinen der A6 Zellen (Spur 3) könnte der des hier nicht translatierten Klons a entsprechen, allerdings kann man auch schwach eine Proteinbande bei 68 kD erkennen, die dieselbe Mobilität wie das XLAP2 β (Spur 1) besitzt.

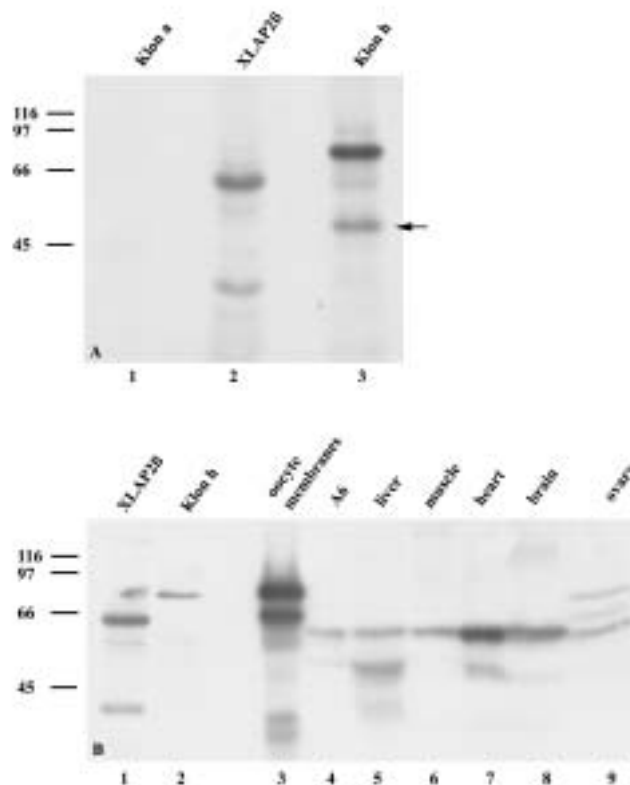


Abb.3-21: Elektrophoretische Mobilität (10 % Acrylamid) der durch gekoppelte in vitro Transkription und Translation synthetisierten Polypeptide XLAP2 der Klone a (Spur 1), XLAP2 β (Spur 2) und Klon h (Spur 3).

A) Die mit 35 S-Methionin markierten Polypeptide sind durch Schwärzung des Röntgenfilmes nachweisbar. Das interne Translationsprodukte des Klons h ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

B) Westernblot-Analyse und Immunblot mit XLAP2 β -Antikörper. Zum Größenvergleich wurden Membranproteine aus unbefruchteten Eiern (Spur 3, oocyte membranes), Gesamtproteine aus A6 Zellen (Spur 4, A6) sowie Xenopus Gewebeproben aus Leber (Spur 5, liver), Skelettmuskulatur (Spur 6, muscle), Herz (Spur 7, heart), Gehirn (Spur 8, brain) und Ovar (Spur 9, ovary) aufgetragen. Die Positionen der Referenzproteine (in kD) sind angegeben.

Somit konnte auf RNA- wie auch auf Proteinebene nachgewiesen werden, dass bei *Xenopus laevis* mindestens drei Isoformen des XLAP2 vorkommen, die sich durch verschieden lange Sequenzeinschübe unterscheiden, ansonsten aber identisch sind. Vergleiche mit den Aminosäuresequenzen der LAP2-Isoformen in Säugern zeigt, dass sich die Säuger-LAP2-Isoformen in ihrer Größe stärker voneinander unterscheiden, während bei *Xenopus* nur geringfügige Größenunterschiede zu finden sind.

III.4. Extraktionsverhalten der XLAP2 Proteine

Das Rattenprotein LAP2 β wurde als Transmembranprotein beschrieben, das in somatischen Interphasezellen mit der Kernlamina und / oder Chromatin interagiert (Furukawa et al., 1995; Übersicht in: Gerace und Foisner, 1994). Aufgrund der Sequenzdaten scheinen alle von mir identifizierten Isoformen des XLAP2 ebenfalls integrale Membranproteine zu sein. Durch Extraktionsstudien sollten nun diese Proteine biochemisch näher in Bezug auf das Bindungsverhältnis zur Kernhülle untersucht werden.

Biologische Membranen sind in Anwesenheit von hohen Harnstoffkonzentrationen stabil. Integrale Membranproteine bleiben bei dieser Behandlung mit den Membranen assoziiert. Periphere Membranproteine, die keine Transmembrandomäne (wie z.B. Lamine) besitzen und über nicht-kovalente Bindungen mit der Membran assoziiert sind, werden durch hohe Harnstoffkonzentrationen von den Membranen abgelöst. Trennt man anschließend die gelösten Proteine durch Ultrazentrifugation ab, so sedimentieren integrale Membranproteine zusammen mit den Membranen (Foisner und Gerace, 1993). Die Bindung der LAP2 Isoformen an Komponenten des Karyoskeletts wird durch Salzextraktion getestet. Die Karyoskelettproteine (bestehend aus Kern-Proteinen, die in Anwesenheit von Puffern hoher Ionenstärke und nichtionischen Detergenzien unlöslich sind, siehe Kaufmann et al., 1981) sind in Anwesenheit von Triton X-100 und erhöhter Salzkonzentration (im Vergleich zu physiologischen Verhältnissen) unlöslich. Werden Zellen auf diese Weise extrahiert und durch Zentrifugation fraktioniert, so befinden sich Proteine, die mit Karyoskelettproteinen

assoziiert sind, in der unlöslichen Fraktion im Sediment, während alle anderen Proteine sich ablösen und im Überstand zu finden sind.

Das Extraktionsverhalten der XLAP2-Proteine wurde in somatischen XLKE-A6 Zellen sowie Eimembranfraktionen von *Xenopus* (P200) getestet. Zum einen wurden ganze Kulturzellen bzw. Eimembranfraktionen mit 1% Triton X-100 und 250 mM NaCl extrahiert und mit DNase verdaut, um auszuschließen, dass DNA und deren assoziierte lösliche Proteine ebenfalls sedimentieren. Zum anderen wurden die Zellen bzw. Eimembranen in 8M Harnstoff aufgenommen und durch Ultrazentrifugation die Membranen mit den integralen Membranproteinen sedimentiert. Die Extraktionsüberstände und –sedimente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und die Antigene mit Hilfe des MAN-Serums detektiert. Als Kontrolle wurde die Nitrocellulose nach Entfernen des MAN-Antikörpers mit dem Lamin Antikörper X155 inkubiert, der die *Xenopus* Lamin B-Proteine L_{II} und L_{III} erkennt.

Wie in Abb. 3-22 zu sehen ist, befinden sich die XLAP2 Isoformen, die in A6 Zellen exprimiert werden, nach Harnstoffextraktion wie auch nach Extraktion mit Triton und Salz im Sediment (A, Spur 2 + 4), d.h. bei diesen Proteinen handelt es sich um integrale Membranproteine. Die zur Kontrolle nachgewiesenen B-Typ-Lamine (A') befanden sich nach der Harnstoffextraktion fast vollständig im Überstand, d.h. sie werden von der Membran abgelöst, da sie zwar mit der Kernmembran assoziiert, aber keine integralen Membranproteine sind. Auch die Isoformen, die in Eimembranen zu finden sind, besitzen charakteristische Eigenschaften von integralen Membranproteinen. Nach Extraktion mit 1 M KCl bzw. 2 und 4 M Harnstoff befinden sie sich im Sediment (C, Spur 3, 5 und 7), während nach Extraktion mit 6 bzw. 8 M Harnstoff sowie 1% Triton / 250 mM NaCl die Proteine im Überstand zu finden sind (B, Spur 4 und 6; C, Spur 8). Ein ähnliches Verhalten wurde schon bei dem integralen Membranprotein LBR (Lamin B Rezeptor) von *Xenopus* beobachtet (Gajewski und Krohne, 1999). Wahrscheinlich entsteht während der Extraktion von meiotischen Eivesikeln eine große Zahl sehr kleiner Membranfragmente, die sich nicht mehr sedimentieren lassen. Die geringen Mengen an XLAP2 sowie B-Typ-Lamine, die bei der Triton X-100 + Salz Extraktion im Überstand zu finden sind, stammen wahrscheinlich von mitotischen Zellen.

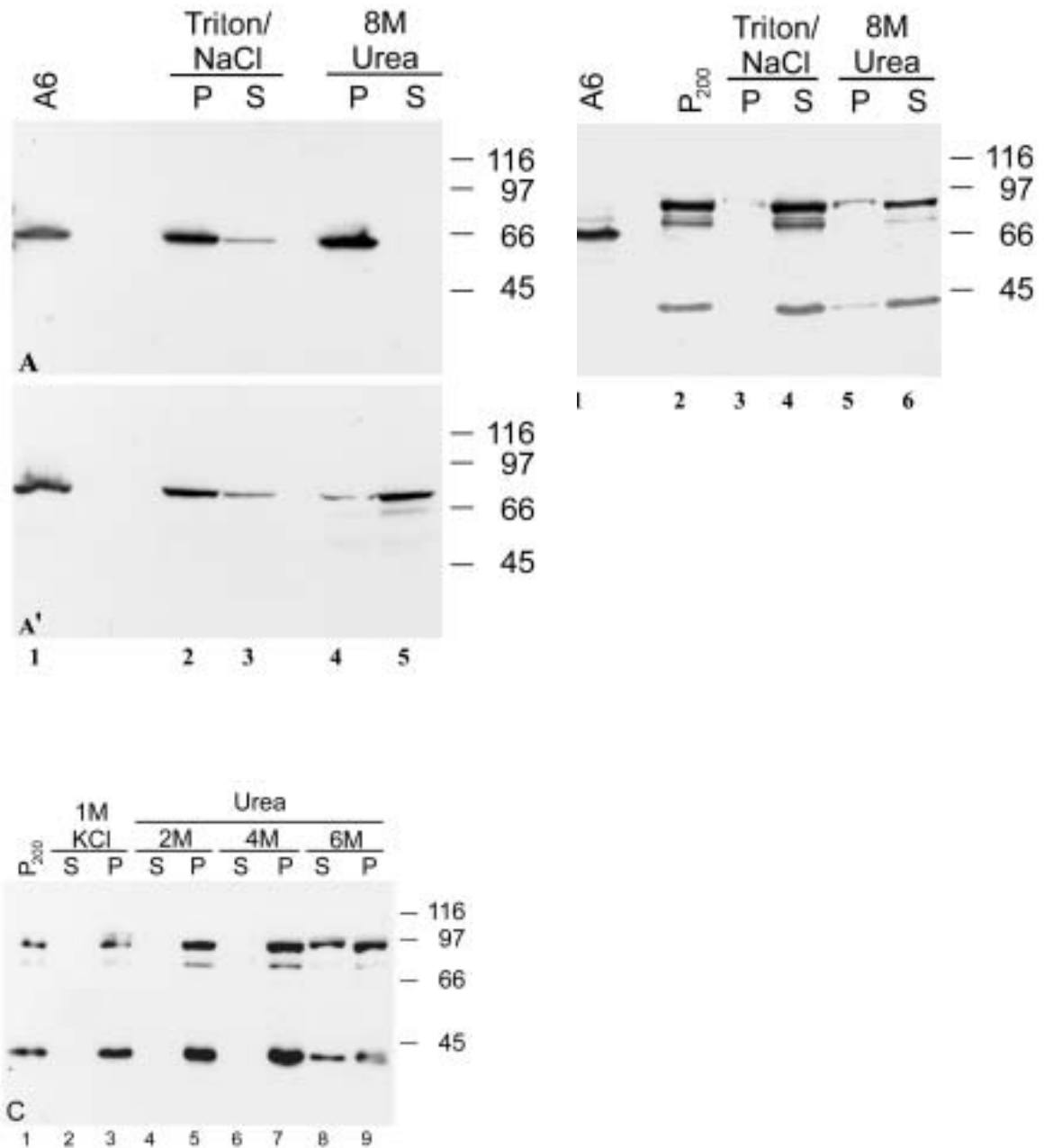


Abb. 3-22: Extraktionsverhalten der XLAP2 Proteine.

A) *Xenopus* A6 Zellen (je 2×10^7 Zellen) wurden entweder mit 1% Triton X-100, DNase und 250 mM NaCl (Spur 2 und 3) bzw. mit 8 M Harnstoff (Spur 4 und 5) extrahiert und durch Zentrifugation in Überstand (supernatant S) und Sediment (pellet P) fraktioniert. Zum Vergleich wurden nicht-extrahierte Gesamtproteine von A6-Zellen aufgetragen (Spur 1). Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit dem MAN-Serum geblottet.

A') Inkubation derselben Nitrocellulose mit dem Lamin B Antikörper X155 nach Entfernen des MAN-Antikörpers mittels Glycinpuffer.

B) *Xenopus* Eimembranfraktionen (P₂₀₀) wurden entweder mit 1% Triton X-100, DNase und 250 mM NaCl (Spur 3 und 4) bzw. mit 8 M Harnstoff (Spur 5 und 6) extrahiert und durch Zentrifugation in Überstand (supernatant S) und Sediment (pellet P) fraktioniert. Zum Vergleich wurden nicht-

extrahierte Gesamtproteine von A6 Zellen und Eimembranen aufgetragen (Spur 1 und 2). Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit dem MAN-Serum geblottet.

C) *Xenopus* Eimembranfraktionen (P200) wurden entweder mit 1 M KCl (Spur 2 und 3) bzw. mit 2, 4 und 6 M Harnstoff (Spur 4-9) und durch Zentrifugation in Überstand (supernatant S) und Sediment (pellet P) fraktioniert. Zum Vergleich wurden nicht-extrahierte Gesamtproteine von Eimembranen aufgetragen (Spur 1). Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit dem MAN-Serum geblottet.

Die Referenzproteine sind markiert (in kD).

III.5. Charakterisierung der LAP2-Proteine in Zebrafisch *Danio rerio*

Eines der am besten untersuchten Modelle der Vertebraten-Entwicklung stellt der Zebrafisch (*Danio rerio*) dar. Dieser eierablegende Teleost eignet sich besonders gut zur Erforschung entwicklungsabhängiger genetischer Studien in Vertebraten.

In der Zusammenarbeit mit Vera Schoft ist es uns gelungen, drei verschiedene Isoformen des LAP2s in Zebrafisch zu identifizieren. Durch Hybridisierung einer Zebrafisch Nieren cDNA-Bank (library no. 575 des Resource Center of the German Human Genome Project) mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde, die die gesamte LAP2 β -Sequenz von *Xenopus laevis* enthielt, konnte ein positiver Klon gefunden werden, der eine Länge von 2477 Nukleotiden besitzt (Klon B4, gene bank accession no. AJ320189). DNA Sequenzierung und virtuelle Translation zeigte eine hohe Homologie des 5'-Endes mit der Sequenz des *Xenopus* LAP2 β . Das 3'-Ende codierte für eine mutmaßliche Transmembrandomäne und zeigte Ähnlichkeiten mit dem carboxyterminalen Ende des XLAP2 β . Die zentrale Region zeigte wenig Homologie zu anderen LAP2 Isoformen und beinhaltet ein STOP-Codon. Um zu bestätigen, dass es sich bei den zwei codierenden Regionen um ein zusammenhängendes Gen handelt, wurde von Vera Schoft Polymerase Ketten Reaktionen (PCR) mit zwei verschiedenen cDNA Populationen von *Danio rerio* (Zebrafisch Ovar und Zebrafisch Embryo im prim-5 Stadium) durchgeführt. Mit Hilfe derselben Primer-Kombination konnten drei DNA-Fragmente amplifiziert werden, die jeweils eine Länge von 1114, 1554 und 1980 Nukleotiden aufweisen. Alle drei besitzen ein durchgängiges offenes Leseraster mit START und STOP-Codon. Ein Vergleich der translatierten Sequenzen zeigt, dass es sich hierbei um drei Isoformen des LAP2 in Zebrafisch handelt, die jeweils eine Länge von 369, 515 und 657 Aminosäuren haben. Alle drei Proteine besitzen die gleiche aminoterminal Domäne

(AS 1-214) mit einer LEM-Struktur, die gleiche carboxyterminale Domäne (155 AS) mit einer vermutlichen Transmembrandomäne und einem Bereich, der hohe Homologien zu der Lamina-Bindungsdomäne des Ratten LAP2 β aufweist (siehe Yang et al., 1997). Aufgrund der Homologien mit den Sequenzen der Säuger LAP2, insbesondere der der Maus, wurden die beiden kleineren Isoformen als β (515 AS) und γ (369 AS), das größte Protein (657 AS) mit ω bezeichnet. Extraktionsstudien bewiesen, dass es sich bei allen drei Isoformen um Transmembranproteine handelt (Schoft et al., 2002). Neben der Sequenz des ZLAP2 γ , die allen drei Isoformen gemeinsam ist, besitzt ZLAP2 β eine zusätzliche Insertion von 146 AS an Position AS 214. Die ω -Isoform besitzt zusätzlich zum β -spezifischen Einschub noch zwei weitere Insertionen: eine Insertion von 101 AS an Position 215 sowie eine Insertion von 42 AS an Position 464. Die β - und ω -spezifischen Einschübe besitzen kaum (β) bzw. gar keine Homologie zu allen bekannten LAP2 Isoformen, inkl. des LAP2 α in Säugern.

III.5.1. Sequenzvergleich der LAP2-Proteine in Xenopus laevis und Zebrafisch Danio rerio

Aufgrund der Tatsache, dass sowohl in *Xenopus laevis* wie auch in Zebrafisch *Danio rerio* drei verschiedene Isoformen der LAP2 Proteine zu finden sind, stellt sich natürlich die Frage, ob es sich bei den drei Isoformen des *Xenopus* LAP2s nicht nur um Varianten des XLAP2 β s, sondern generell um drei verschiedene Isoformen der LAP2-Proteinfamilie überhaupt handelt, wie dies auch in Zebrafisch der Fall ist. Dafür würde sprechen:

- 1) In Zebrafisch wie auch in *Xenopus* besitzen alle drei Isoformen die gleiche aminoternale und carboxyterminale „Grundsequenz“ und werden nur durch verschiedene Sequenzeinschübe verändert.
- 2) Die ZLAP2 γ -Isoform ist die am häufigsten exprimierte Isoform in somatischen Zellen in Zebrafisch (Schoft et al., 2002), wie auch die kleinste XLAP2-Isoform die am häufigsten exprimierte Isoform in somatischen Gewebe in *Xenopus* ist.
- 3) Es findet eine entwicklungsspezifische Expression statt, wobei die größte Isoform sowohl in Zebrafisch wie auch in *Xenopus* in frühen Entwicklungsstadien vorwiegend anzutreffen ist.

Ein Vergleich der Sequenzen des ZALP2 γ , β und ω mit den korrespondierenden Sequenzen der XLAP2-Isoformen zeigt, dass der ω -spezifische Einschub bei Aminosäure-Position 215 auch in der *Xenopus* Isoform h zu finden ist, allerdings in verkürzter Version (101 versus 31 Aminosäuren). Der zweite ω -spezifische Einschub bei AS-Position 461 ist sowohl in XLAP2 β wie auch in XLAP2-Klon h zu finden, nicht aber in XLAP2-Klon a. Der ZLAP2 β -spezifische

Einschub von 145AS an Aminosäure-Position 215 findet sich zum größten Teil in allen drei XLAP2-Isoformen.

Eine hohe Homologie der LAP2-Sequenzen von Zebrafisch und Xenopus findet sich vor allem in der aminoterminalen Domäne (AS 1-167) sowie in der vermuteten Lamin-Bindungsdomäne und der Transmembrandomäne. Ansonsten weisen diese Proteine eher eine geringe Gesamt-Identität auf: ZLAP2 γ mit XLAP2 Klon a 45%; ZLAP2 β mit XLAP2 β 36% und ZLAP2 ω mit XLAP2 Klon h 35%.

XLAP2a	MPEFLQDPSVLTKEKLNKSELVANNVTLPSTGEQRKDVYVQLYLQHLTSQN---SGTPD-FS	56
XLAP2 β	MPEFLQDPSVLTKEKLNKSELVANNVTLPSTGEQRKDVYVQLYLQHLTSQN---SGTPD-FS	56
XLAP2h	MPEFLQDPSVLTKEKLNKSELVANNVTLPSTGEQRKDVYVQLYLQHLTSQN---RATPD-FS	56
ZLAP2 γ	MLEFLEDPSVLTQKDKLKSALLANNVALPNGDQRKDVYVQLYLKNTLVQNKSSGSPDVFS	60
ZLAP2 β	MLEFLEDPSVLTQKDKLKSALLANNVALPNGDQRKDVYVQLYLKNTLVQNKSSGSPDVFS	60
ZLAP2 ω	MLEFLEDPSVLTQKDKLKSALLANNVALPNGDQRKDVYVQLYLKNTLVQNKSSGSPDVFS	60
	* * * * *	
XLAP2a	SDEEREATPMRGRGRPPGRKATKKTDKPKAEKDDDPVTELSNEALKEELLKYGMKPGPI	116
XLAP2 β	SDEEREATPMRGRGRPPGRKATKKTDKPKAEKDDDPVTELSNEALKEELLKYGMKPGPI	116
XLAP2h	SDEEREATPMRGRGRPPGRKATKKTDKPKAEKDDDPVTELSNEALKEELLKYGMKPGPI	116
ZLAP2 γ	SDEELPPAPVVSNRSRSGRKATRKTDKVRP---DDVDVTELSNEGLKDLLLKYGLNAGPI	117
ZLAP2 β	SDEELPPAPVVSNRSRSGRKATRKTDKVRP---DDVDVTELSNEGLKDLLLKYGLNAGPI	117
ZLAP2 ω	SDEELPPAPVVSNRSRSGRKATRKTDKVRP---DDVDVTELSNEGLKDLLLKYGLNAGPI	117
	* * * * *	
XLAP2a	LSNTRKLYEQRLFKLKEQG-LASSALPADTSKADNKQNGNTDSEQYSDNEEE-----	167
XLAP2 β	LSNTRKLYEQRLFKLKEQG-LASSALPADTSKADNKQNGNTDSEYSDNEEE-----	166
XLAP2h	LSNTRKLYEQRLFKLKEQG-LASSALPADTSKADNKQNGNTDSEQYSDNEEE-----	167
ZLAP2 γ	VASTRKVYEKRLQKLLDQGPPVAVALPSETSQTGDNQNGNNSDQYSDREEEPVAPAPVT	177
ZLAP2 β	VASTRKVYEKRLQKLLDQGPPVAVALPSETSQTGDNQNGNNSDQYSDREEEPVAPAPVT	177
ZLAP2 ω	VASTRKVYEKRLQKLLDQGPPVAVALPSETSQTGDNQNGNNSDQYSDREEEPVAPAPVT	177
	* * * * *	
XLAP2a	-----AKVELTFEKREPLRGNPKPQVTMRNRRTEKTE-----	199
XLAP2 β	-----AKVELTFEKREPLRGNPKPQVTMRNRRTEKTE-----	198
XLAP2h	-----AKVELTFEKREPLRGNPKPQVTMRNRRTEKTEAEEDTDLIPELNVKRSNRSPPKG	222
ZLAP2 γ	VPEPEVEAELIPVVERPVRSRGKTPVTSRTRSGQHTR-----	214
ZLAP2 β	VPEPEVEAELIPVVERPVRSRGKTPVTSRTRSGQHT-----	213
ZLAP2 ω	VPEPEVEAELIPVVERPVRSRGKTPVTSRTRSGQHTRVEDVEEDWPVLNVKRLKRSSH	237
	* * * * *	
XLAP2a	-----	
XLAP2 β	-----	
XLAP2h	-----	

ZLAP2gamma	VPEPEVEAEELIPVVERPVRSRGKTPVTSRTRSGQHTR-----	214
ZLAP2beta	-----	
ZLAP2omega	PDQMVPASDDTENSELSSAECFAVSEDRRRTGPGAGRRETRPLLSDRTSKLSKSESLRR	297
XLAP2a	-----TVSEDEVVTEAAWTSGPVKSGPVQTVYKESTKISRRTPR	237
XLAP2β	-----TVSEDEVVTEAAWTSGPVKSGPVQTVYKESTKISRRTPR	236
XLAP2h	-----FTLDDVEDLSTDHVTVSEDEVVTEAAWTSGPAKSGPVQTVYKELAKVSRRTPR	274
ZLAP2gamma	-----	
ZLAP2beta	-----RDFSEPSIVKEVSVSLMRMKVQPLTVPKDPKPSKRYSMSATEST	257
ZLAP2omega	RSAPVRSVLNEASSPKDFSEPSIVKEVSVSLMRMKVQPLTVPKDPKPSKRYSMSATEST	357
XLAP2a	KKVVAPDPVLFDD--ADISEVPPISELVVP-ASNQIFAYAENEHFESSKVVNRVPGSLKH	294
XLAP2β	KKVVAPDPVLFDD--ADISEVPPISELVVP-ASNQIFAYAENEHFESSKVVNRVPGSLKH	293
XLAP2h	KKVVAPDPVPFDD--ADIAEVPPISESVVEPASNQILTYAENEHFESRKVVNQVPESLKH	332
ZLAP2gamma	-----	
ZLAP2beta	KRPVSSLNKHEDENTADIPSPPHRQSSREPLVSLINTACVEVDDQGMQDVLSCRSANGGL	317
ZLAP2omega	KRPVSSLNKHEDENTADIPSPPHRQSSREPLVSLINTACVEVDDQGMQDVLSCRSANGGL	417
XLAP2a	AETLLSVGEISELTRRTPKKQLISEKHLNVTRETESGSSQIRL-----	337
XLAP2β	AETLLSVGEISELTRRTPKKQLISEKHLNVTRETESGSSQIRLI--DSIGFSNPTDLLNT	351
XLAP2h	AETLLSVSEFSELTRRTQKKQLISEKHLNLTRETDSGSSQIRLIDVHSIGFTNPTDLLNT	392
ZLAP2gamma	-----	
ZLAP2beta	LAQGVRSAAVSKLSKPVLSQSKPSKPLVDMCCLSPSSDRQKE-----	360
ZLAP2omega	LAQGVRSAAVSKLSKPVLSQSKPSKPLVDMCCLSPSSDRQKE-----SCGSPQTHP	470
XLAP2a	-----VEKNFEARRTERDILKEMFPKEFL	361
XLAP2β	ALIEETKQIIEDSLETPKKTQKLIKTKFVTPVKKQIVEKNFEERRTERDILKEMFPKEFL	411
XLAP2h	ALIEETKHIIEDSLETPKKTQKLIKTKFVTPVKKQIVEKTFEERRTERDILKEMFPTEFS	452
ZLAP2gamma	-----VEKVSAIDQTPRAVERDVLKEIFPTENL	242
ZLAP2beta	-----VEKVSAIDQTPRAVERDVLKEIFPTENL	388
ZLAP2omega	KSRHSKITPFLSQITPVRGLDNKLMKMETMMVEKVSAIDQTPRAVERDVLKEIFPTENL	530
	* * * * *	
XLAP2a	-TPTGISASCRRPIRGAAGRPLNATDFKTD-----ETYTSKYVSNVSKYT-----	405
XLAP2β	-TPTGISASCRRPIRGAAGRPLNATDFKTD-----ETYTSKYVSNVSKYT-----	455
XLAP2h	-TPTGISASCRRPIRGAAGRPLNATDLKIN-----ETYTSKYVSNVSKYT-----	496
ZLAP2gamma	NTPTGISATCRRPIRGAAGRPLIDTWLNEQRQLSDLKQTTSSSSFSSTSSYTESRSVPR	302
ZLAP2beta	NTPTGISATCRRPIRGAAGRPLIDTWLNEQRQLSDLKQTTSSSSFSSTSSYTESRSVPR	448
ZLAP2omega	NTPTGISATCRRPIRGAAGRPLIDTWLNEQRQLSDLKQTTSSSSFSSTSSYTESRSVPR	590
	***** * * * * *	
XLAP2a	----PAVEAKS----AKVKPGRSLPAWIKILLCIILVVFCFLVYQAMETNDGIAFSKLF	456
XLAP2β	----PAVEAKS----AKVKPGRSLPAWIKILLCIILVVFCFLVYQAMETNDGIAFSKLF	506
XLAP2h	----PAVEKS----EKVKPGRSLPVWIKILMFLILVVFCFLVYQAMETNEGMSFSKLL	547
ZLAP2gamma	VSSIPLSASKSTAPPTVKSRRRSLPVWQVLVLLSAVAGFLFFIYQAMETND---VGLF	358
ZLAP2beta	VSSIPLSASKSTAPPTVKSRRRSLPVWQVLVLLSAVAGFLFFIYQAMETND---VGLF	504
ZLAP2omega	VSSIPLSASKSTAPPTVKSRRRSLPVWQVLVLLSAVAGFLFFIYQAMETND---AGLF	646

		*	**	*	**** *	*	*****	*: :
XLAP2a	G-ITESNKTEN	466						
XLAP2β	LGITESNKTEN	517						
XLAP2h	LGITESNKTEN	558						
ZLAP2gamma	KQSGTDDSTSK	369						
ZLAP2beta	KQSGTDDSTSK	515						
ZLAP2omega	KQSGTDDSTSK	657						
			*					

Abb.3-23: Sequenzvergleich der LAP2-Proteine von *Xenopus laevis* und Zebrafisch *Danio rerio*. Identische Aminosäuren sind mit * gekennzeichnet.

Aufgrund dieser Übereinstimmungen in Sequenz, Spleiß- und Expressionsmusters der LAP2 Proteine in *Xenopus laevis* und Zebrafisch *Danio rerio* kann man annehmen, dass es sich bei den *Xenopus* LAP2 Proteinen nicht nur um drei Isoformen des XLAP2β handelt, sondern um die korrespondierenden LAP2-Isoformen γ, β und ω der Zebrafisch LAP2-Proteinfamilie.

III.5.2. Lokalisation der Zebrafisch-LAP2-Proteine in Kulturzellen

Die unterschiedlich starke Expression des ZLAP2β und ZLAP2γ in somatischen Zellen sowie die entwicklungspezifische Expression des ZLAP2ω in frühen Entwicklungsphasen könnte ein Hinweis darauf sein, dass die verschiedenen LAP2 Isoformen auch verschiedene Aufgaben in der Zelle übernehmen. Um dem nachzugehen, wurde die Lokalisation der einzelnen Isoformen der ZLAP2 Proteine in *Xenopus* A6 Kulturzellen mittels Expression von GFP-Fusionsproteinen untersucht.

III.5.2.1. Expression von Gesamt-ZLAP2-GFP Fusionsproteinen

Die Gesamt-cDNA Sequenzen des ZLAP2γ, ZLAP2β und ZLAP2ω wurden mittels PCR amplifiziert und über den TOPO-Vektor in den Expressionsvektor EGFP-N1 einkloniert. Nach Transfektion in A6 Zellen konnte in der Interphase bei allen drei Konstrukten eine Lokalisation in der Kernperipherie gesehen werden, welche typisch ist für Proteine der inneren Kernmembran. Betrachtet man jedoch die Zellen, die sich in der Mitose befanden, so konnte man hauptsächlich bei GFP-ZLAP2ω, aber auch bei GFP-ZLAP2β eine vermehrte Lokalisation an den Chromosomen finden. In vielen Zellen konnte sogar eine Kolo­kalisation mit dem angefärbten Chromatin beobachtet werden (Abb.3-24). Auf elektronenmikroskopischen Präparaten sah man, dass sich das GFP-ZLAP2ω in Vesikeln

befand, die an mitotischen Chromosomen gebunden waren (Schoft et al., 2002). Das GFP-ZLAP2 γ -Konstrukt war während der Mitose frei im Cytoplasma verteilt und kolokalisierte nicht mit Chromatin.

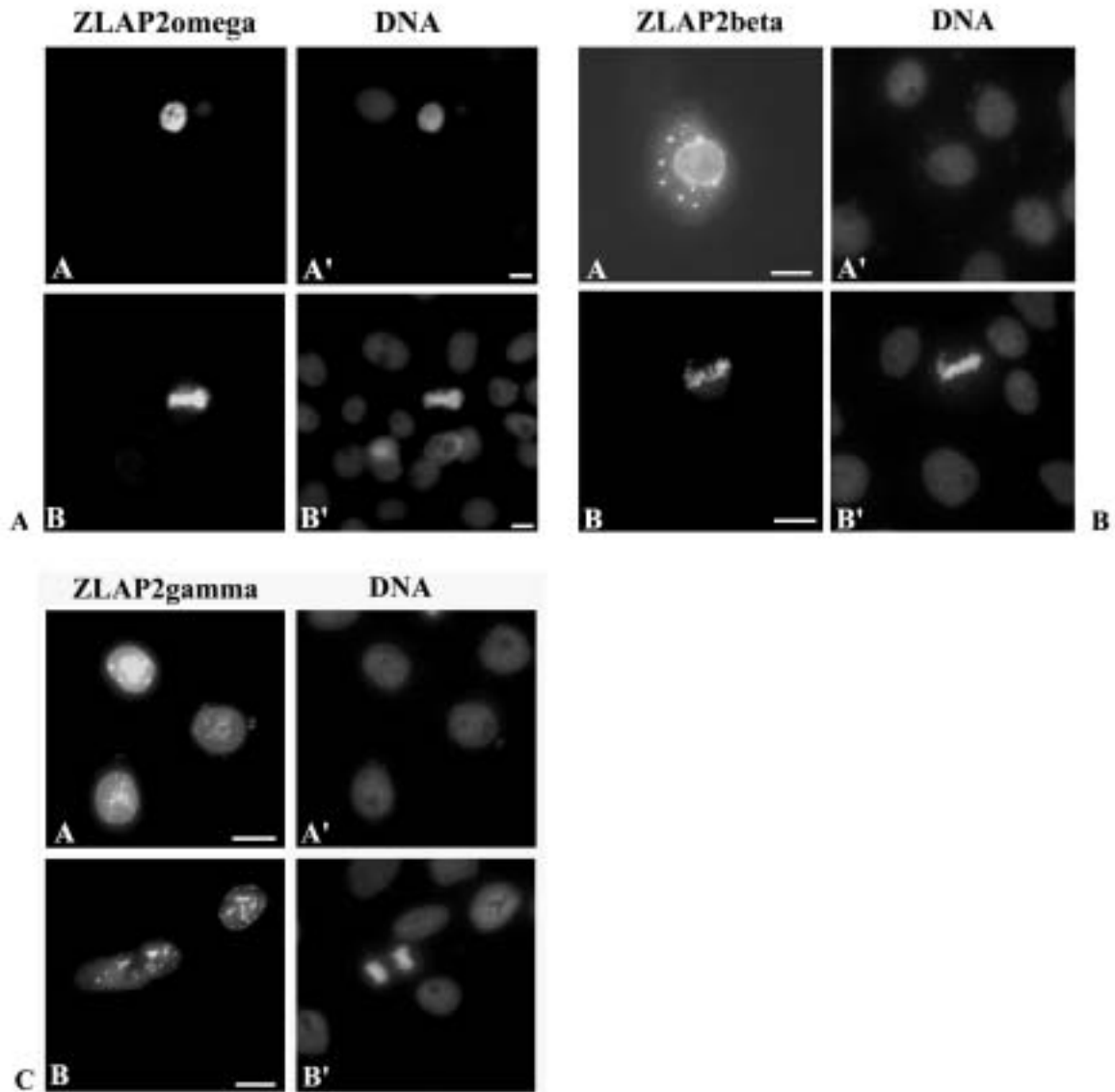


Abb.3-24: Expression der ZLAP2-GFP-Fusionsproteine in transfizierten Xenopus A6 Zellen.

A) Lokalisation des ZLAP2 ω -GFP

B) Lokalisation des ZLAP2 β -GFP

C) Lokalisation des ZLAP2 γ -GFP

A'-C') DNA-Färbung mit dem Fluorochromfarbstoff Hoechst 33258

Eichstrich: 10 μ m

III.5.2.2. Expression von verkürzten ZLAP2-GFP Fusionsproteinen

Da alle drei ZLAP2-Isoformen das gleiche „Grundgerüst“, d.h. die Sequenz des ZLAP2 γ , besitzen, muss die Spezifität des ZLAP2 β und ZLAP2 ω in den ihnen eigenen Sequenzen liegen. Um darüber mehr Aufschluss zu erhalten, wurden verkürzte ZLAP2-cDNA-Sequenzen über PCR amplifiziert und in den EGFP-N1-Vektor einkloniert. Dabei wurden GFP-Fusionskonstrukte hergestellt, die die γ -spezifische Sequenz bis zum β -Einschub enthält (Aminosäuren 1-214), das ZLAP2 β -Protein bis zum zweiten ω -spezifischen Einschub (Aminosäuren 1-360 des ZLAP2 β) sowie das ZLAP2 ω -Protein bis zum Ende der ω -spezifischen Sequenz (Aminosäuren 1-502 des ZLAP2 ω). Nach Expression in *Xenopus* A6 Zellen zeigte sich eine unterschiedliche Verteilung der exprimierten Fusionsproteine. Betrachtet man das verkürzte GFP-ZLAP2 γ Protein in Interphasezellen, so erkennt man eine gleichmäßige Färbung des Cyto- wie auch des Nukleoplasmas, wobei oft der Kern stärker leuchtete als das im Cytoplasma verteilte Protein (Abb.3-25A). Während der Mitose konnte allerdings hier eine verstärkte Lokalisation an den mitotischen Chromosomen der Zelle gefunden werden, im Gegensatz zur Lokalisation des Gesamtproteins während der Mitose (vergleiche Abb.3-24 C und Abb.3-25 C).

Betrachtet man die Verteilung der GFP-Fusionsproteine GFP-ZLAP2 β 1-360 sowie GFP-ZLAP2 ω 1-502, so sieht man in Interphasezellen eine eindeutige Cytoplasma-Färbung, wobei jedoch der Kern ausgespart ist. Gehen Zellen allerdings in eine Mitose über, so findet sich sehr häufig (in mehr als 70% der mitotischen Zellen) eine Konzentrierung des Fusionsproteins im Kern, wo es mit den Chromosomen kolokalisiert. Dekondensiert sich nach Abschluss der Mitose jedoch das Chromatin wieder, dann ist das GFP-Fusionsprotein nur noch in geringen Konzentrationen im Kern nachweisbar und scheint hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert zu sein (Abb.3-25 B+C).

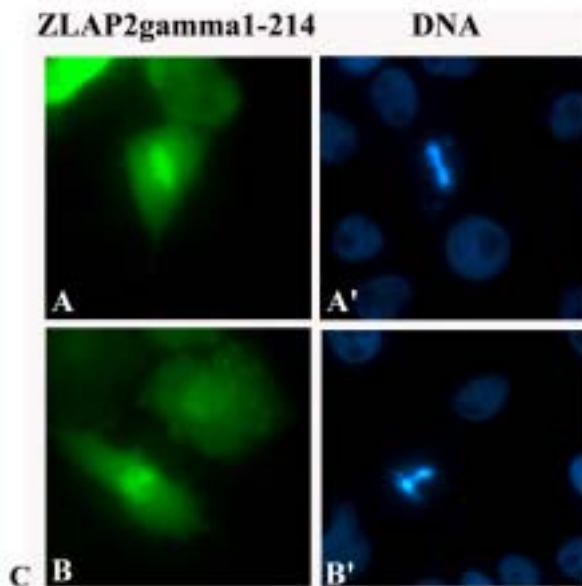
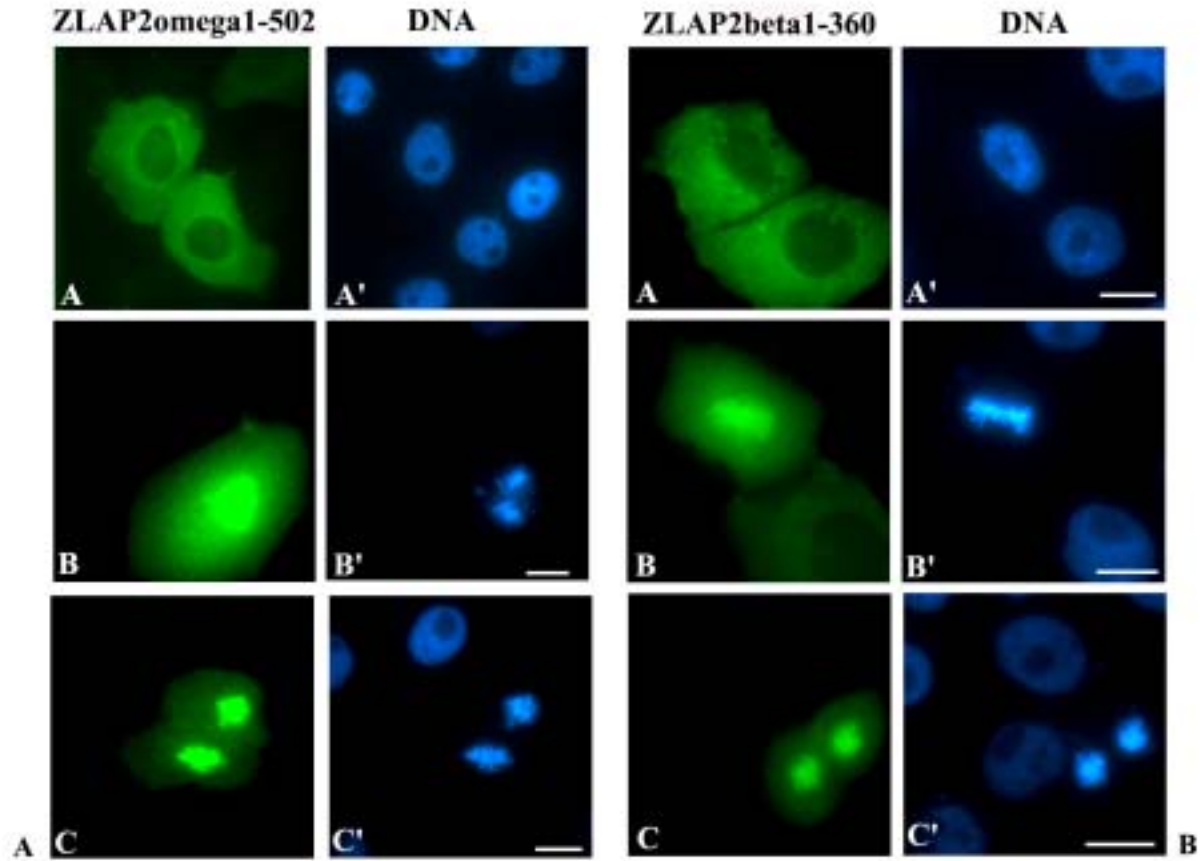


Abb.3-25: Expression der verkürzten ZLAP2-GFP-Fusionsproteine in transfizierten Xenopus A6 Zellen.

A) Lokalisation des ZLAP2-GFP Fusionsproteins ZLAP2 ω 1-502

B) Lokalisation des ZLAP2- GFP Fusionsproteins ZLAP2 β 1-360

C) Lokalisation des ZLAP2- GFP Fusionsproteins ZLAP2 γ 1-214

A'-C': DNA-Färbung mit dem Fluorochromfarbstoff Hoechst 33258

Eichstrich 10 μ m

III.6. Interaktionen und Bindungseigenschaften des XLAP2 β

Bisherige Bindungsstudien haben gezeigt, dass die LAP2-Proteine mit unterschiedlichen Komponenten des Nukleus interagieren. Die hochkonservierte aminoterminal Domäne, die in allen LAP2-Isoformen zu finden ist, zeigt direkte oder indirekte Bindung an das periphere Chromatin (siehe Cai et al., 2001). Dabei spielen zwei strukturell unabhängige, nicht interagierende Domänen eine wichtige Rolle: die ca. 40 Aminosäuren lange so genannte LEM-Domäne (AS 111-152 in Mensch), sowie die etwas längere LEM-like-Domäne (AS 1-50). Diese Domänen, die in verschiedenen Kernmembranproteinen vorkommen, wie z.B. in LAP2, Emerin und MAN (Lin et al., 2000), sind durch einen hochflexiblen, 60 AS-langen Linker miteinander verbunden. Sie bestehen aus einer Helixstruktur, die sich aus drei Aminosäuren, gefolgt von zwei, durch einen langen Loop miteinander verbundenen α -Helices, zusammensetzt (Lin et al., 2000; Cai et al., 2001). Während die LEM-like-Domäne direkt mit dem peripheren Chromatin interagiert (Furukawa 1997; Cai et al., 2001), interagiert die LEM-Domäne über das kleine, hochkonservierte BAF-Protein indirekt mit der DNA (Cai et al., 2001). Neben Bindungen an andere Kernkomponenten, wie HA95 (Seki; Orstavik), mGCL (Nili) und HP1 (Kourmouli), die erst seit kurzem bekannt sind, wurde schon viel über Interaktionen der LAP2-Proteine mit der nukleären Lamina publiziert. Die Bindung des LAP2 β an Lamin B1 (Foisner und Gerace, 1993) erfolgt an der Stabdomäne des Lamin B1 und die dazugehörige LAP2 β -Bindungsdomäne wurde durch yeast-2-hybrid-Studien auf Aminosäuren 298-373 des Ratten-LAP2 β lokalisiert (Furukawa et al., 1995). Die Isoformen, die durch eine Transmembrandomäne in der inneren Kernmembran verankert sind (β , γ) binden an B-Typ-Lamine, wohingegen das im Nukleoplasma vorkommende LAP2 α mit den A-Typ-Laminen (Dechat et al., 1998) interagiert. Während A- und B-Typ-Lamine in den meisten somatischen Zellen von Säugern, Vögeln, Amphibien und Fischen zu finden sind, variiert die Expression der LAP2-Isoformen stark zwischen Säugern und niedrigen Vertebraten. Wie schon im ersten Teil meiner Arbeit berichtet, findet man in somatischen wie auch Kulturzellen von *Xenopus laevis* nur eine Haupt-Isoform, die dem LAP2 β der Säuger bzw. dem LAP2 γ des Zebrafischs entspricht. Eine nicht-membrangebundene α -Form konnte in keinem der untersuchten Gewebe- und Zelltypen nachgewiesen werden. Somit stellt sich die interessante Frage, ob dieses XLAP2 β beide Bindungskapazitäten, d.h. an A- und B-Typ-Lamine, besitzt, um das Fehlen einer α -Isoform zu kompensieren. Um dies zu untersuchen, wurden Bindungsstudien in vitro und in vivo durchgeführt, die eindeutig unsere Vermutung bestätigten, dass XLAP2 β sowohl mit B-Typ- wie auch mit A-Typ-Lamine interagiert. Obwohl die Haupt-Isoform der LAP2 Proteine in somatischen Zellen das XLAP2 γ (=Klon a) zu sein scheint, wurden alle weiteren Versuche mit der zuerst bekannten und publizierten XLAP2 β

Sequenz durchgeführt. Dieses Protein wird zwar in geringeren Mengen, aber doch in fast allem somatischen Gewebe exprimiert (siehe Abb. 3-15). Außerdem erhöht sich durch die zusätzliche Insertion von 52 AS die Wahrscheinlichkeit, LAP2-Bindungspartner zu charakterisieren, die evtl. nicht mit einer verkürzten XLAP2-Sequenz interagieren. Zusätzlich lassen sich diese Ergebnisse leichter mit vorhergehenden Bindungsstudien des Säuger LAP2 β (Furukawa et al., 1995) vergleichen.

III.6.1. Biochemische Charakterisierung der Zellextrakte

III.6.1.1. Löslichkeit der Kernmembranproteine unter physiologischen Bedingungen

Um die geplanten Versuche durchführen zu können, mussten zuerst Bedingungen geschaffen werden, um möglichst viele Proteine einer Zelle, insbesondere des Nukleus, unter annähernd physiologischen Bedingungen zu extrahieren, ohne dass ihre Bindungseigenschaften dabei verloren gehen. Dazu wurden *Xenopus* A6 Zellen mit einem Lysispuffer (1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 50 mM Tris, pH7,4) inkubiert und die löslichen Proteine durch Zentrifugation bei 11.000 g gewonnen. Die Proteinkonzentration des Überstandes betrug zwischen 30 – 35 mg/ml. Nach Auftrennung des Extraktes durch SDS-PAGE und anschließendem Western Blot konnte mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden, dass durch dieses Verfahren ca. 90% des XLAP2 β sowie ca. 50% der Lamine B2, A und B1 extrahiert werden konnten und dadurch im Überstand vorhanden waren. Somit waren die Bedingungen für alle weiteren Versuche geschaffen.

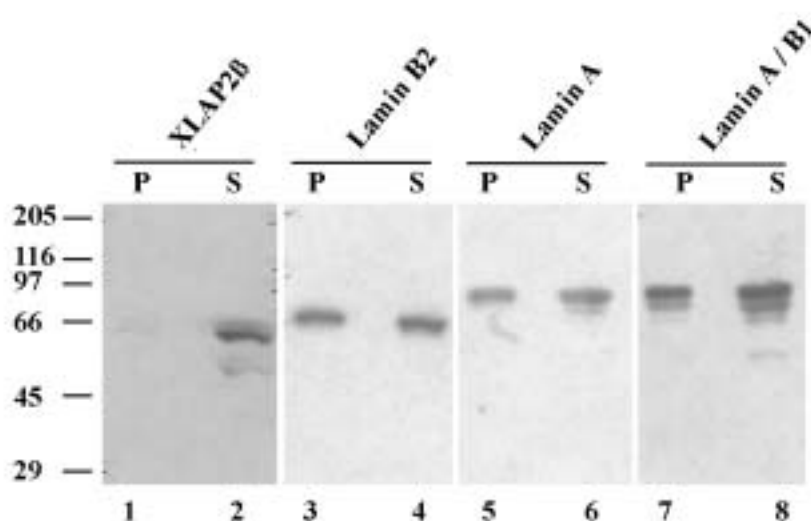


Abb.3-26: Biochemische Charakterisierung des Proteinextraktes aus *Xenopus* A6 Zellen. Gesamtproteine wurden mit 1% Triton X-100 und 150 mM NaCl aus *Xenopus* A6 Zellen extrahiert und bei 11.000 g fraktioniert. Proportionale Mengen des Sedimentes sowie des Überstandes wurden über SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und mit Antikörpern gegen XLAP2 (Spur 1 und 2), Lamin B2 (Spur 3 und 4), Lamin A (Spur 5 und 6) sowie Lamin B1 / A (Spur 7 und 8) geblottet. Dabei zeigt sich, dass ca. 90% des XLAP2 sowie ca. 50% der Lamine in Lösung sind. Die Positionen der Referenzproteine (in kD) sind markiert.

III.6.1.2. Fraktionierung der löslichen Proteine durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation

Sollten die Lamine mit den XLAP2 β -Proteinen in der Zelle interagieren, müssten diese Proteine in einem Saccharose-Gradienten nach Auftrennung durch Zentrifugation in ähnlichen Fraktionen zu finden sein. Diese Fraktionierung durch einen kontinuierlichen Zuckergradienten trennt Proteine nach ihrer Form und Größe auf. Liegen Proteine als Monomere vor, so sind sie in den ersten d.h. in den obersten Fraktionen zu finden, während Oligomere und Proteinkomplexe sich in den mittleren und unteren Fraktionen befinden. Zur Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten als Richtwert werden Immunglobuline G (Sedimentationskoeffizient von IgG: 6,5S) parallel dazu im Zuckergradienten zentrifugiert. Zur Fraktionierung wurden 1,5 ml des Gesamtproteinextraktes von *Xenopus* A6 Zellen auf einen kontinuierlichen Saccharosegradienten gegeben (5-30% wt/vol) und für 18 h bei 100.00 g (Beckmann Zentrifuge, Rotor SW41) zentrifugiert. Nach Fraktionierung in 0,5 ml Aliquots wurden die Proben mit TCA gefällt, über SDS-PAGE aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern geblottet.

Wie in Abb. 3-27 zu sehen ist, sind alle untersuchten Proteine in mehreren Fraktionen nachweisbar, d.h. sie haben sehr unterschiedliche Sedimentationskoeffizienten. A- und B-Typ-Lamine sind in allen Fraktionen zu finden, in denen sich auch die XLAP2 β -Proteine befinden. Lamin B2 konnte auch in Fraktionen mit einem Sedimentationskoeffizienten größer als 6,5 nachgewiesen werden, während XLAP2 β sowie A-Typ-Lamine in den Fraktionen mit einem Sedimentationskoeffizienten von 6,5 oder niedriger zu finden sind. Somit kann eine Oligomerbildung der Lamine wie auch des XLAP2 als sicher angenommen werden, da sie sich als Monomere in den obersten Fraktionen befinden würden.

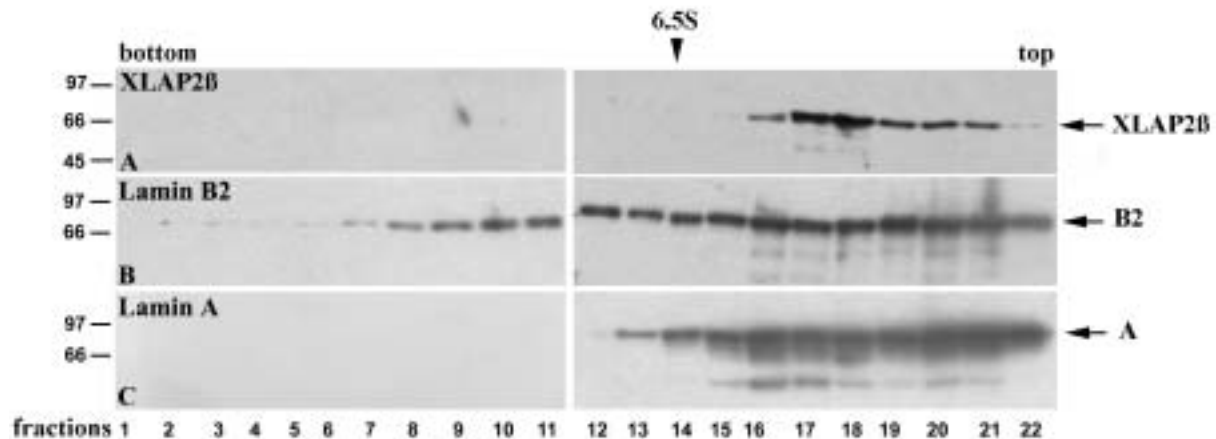


Abb. 3-27: Saccharosegradientenzentrifugation (5-30%) des Gesamtproteinextraktes des 11.000 g Überstandes von *Xenopus* A6 Zellen, extrahiert mit 1% Triton X-100 und 150 mM NaCl. Die Proteine der 22 Fraktionen wurden durch SDS-PAGE (11 % Acrylamid) aufgetrennt und mit Antikörpern gegen XLAP2 β (A), Lamin B2 (B) und Lamin A (C) im Immunblot analysiert. Markiert wurden die oberen (top) wie unteren (bottom) Fraktionen des Gradienten sowie die Position und S-Wert des Immunglobulins G (6.5S), welches in einem parallelen Saccharosegradienten zentrifugiert wurde. Die Positionen der Referenzproteine (in kD) sind markiert.

III.6.1.3. Fraktionierung der Proteine durch Gelfiltrationschromatographie

Durch eine Saccharosegradientenzentrifugation werden die Proteine nur dann ihrer Größe entsprechend aufgetrennt, wenn sie in Kugelform vorliegen. Asymmetrische Proteinkomplexe mit einem hohen Molekulargewicht können aber trotzdem kleine S-Werte besitzen. Um dies zu berücksichtigen und um das Ergebnis des Saccharosestufengradienten evtl. zu korrigieren, wurde unter gleichen Puffer-Bedingungen eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt. Hierbei ist die Form der Proteine für die Auftrennung unbedeutend, da nur ihre Größe entscheidet, ob sie sich im Durchlauf befinden, d.h. in den ersten Fraktionen zu finden sind, oder ob sie durch ihre geringere Größe mit dem Säulenmaterial in Wechselwirkung treten, wodurch sich ihre Laufgeschwindigkeit verzögert und diese Proteine in den späteren Fraktionen (=obere Fraktionen) nachgewiesen werden. Die Menge der aufgetragenen Proteine bzw. des IgGs entsprechen denen des Saccharosestufengradienten. Die Fraktionen wurden mit TCA gefällt und über SDS-PAGE aufgetrennt und über Western- und Immunblot nachgewiesen.

Wie in Abb.3-28 zu sehen ist, sind alle detektierten Proteine in gleichen Fraktionen nachweisbar, wobei hier alle drei Proteine XLAP2, Lamin A sowie Lamin B2 in Fraktionen mit höherem Molekulargewicht als IgG (150.000) zu finden sind. Dieser Verteilung zufolge

scheint es sich hier um Proteinkomplexe zu handeln, die aus mehreren Polypeptiden bestehen.

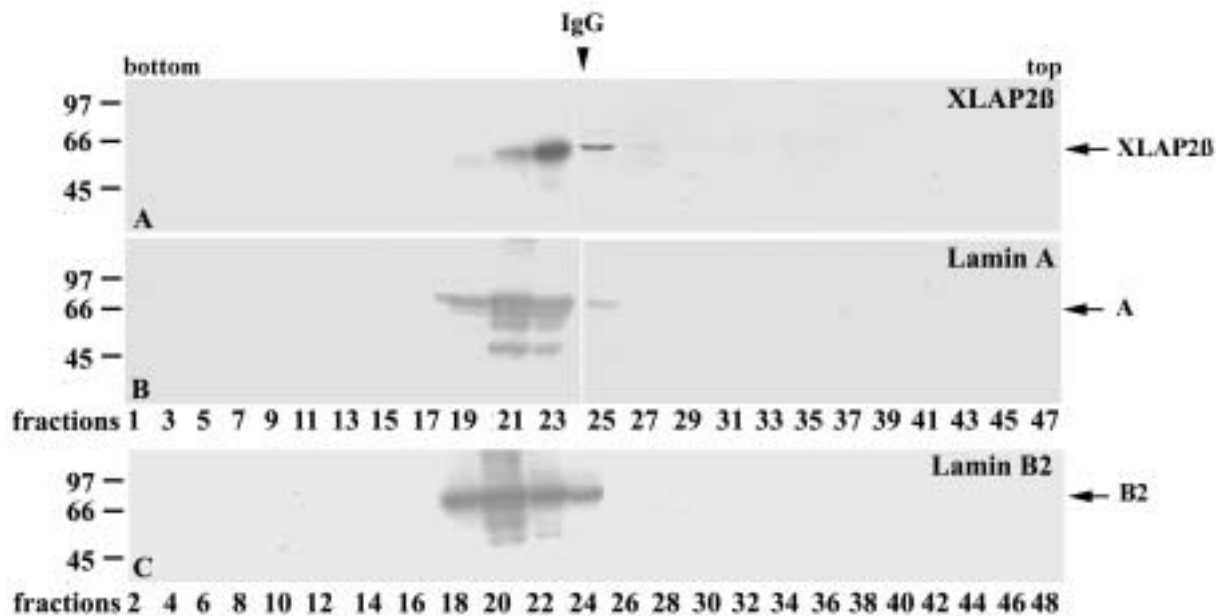


Abb.3-28: Gelfiltrationschromatographie des Gesamtproteinextraktes des 11.000 g Überstandes von *Xenopus* A6 Zellen, extrahiert mit 1% Triton X-100 und 150 mM NaCl. Die Proteine der 48 Fraktionen wurden durch SDS-PAGE (11 % Acrylamid) aufgetrennt und mit Antikörpern gegen XLAP2 β (A), Lamin A (B) und Lamin B2 (C) immungeblottet. Markiert wurden die oberen (top) wie unteren (bottom) Fraktionen des Gradienten sowie die Position des Immunglobulins G (IgG). Die Positionen der Referenzproteine (in kD) sind markiert.

III.6.2. Interaktionen des XLAP2-Proteins mit nukleären Proteinen

Um die Bindungseigenschaften des XLAP2 β *in vitro* und *in vivo* untersuchen zu können, sowie die dafür verantwortliche Region einzugrenzen, wurden verschiedene Segmente des XLAP2 β als Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase (GST) und / oder Green Fluorescence Protein (GFP) exprimiert, um unterschiedliche Bindungspartner entweder *in vitro* durch pull-down-Experimente oder *in vivo* durch Co-Immunpräzipitationen nachweisen zu können.

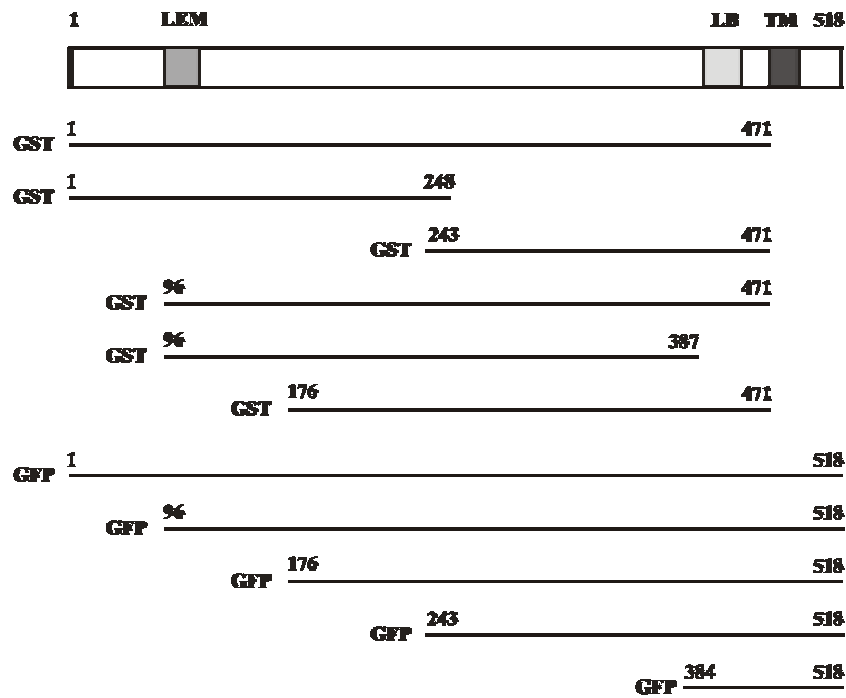


Abb.3-29: Schematische Zeichnung des XLAP2 β sowie der Fusionsproteine. Die Position des LEM-Motives (LEM), eine sehr konservierte Sequenz in der Lamina-Bindungsregion (LB) sowie die Transmembrandomäne (TM) sind gekennzeichnet. Die erste sowie letzte Aminosäure der XLAP2 β -Sequenz sind angegeben, ebenso die erste sowie letzte Aminosäure jeder XLAP2 β -Sequenz, die mit einem GST- bzw. GFP-Protein fusioniert ist. Die Position des GST- bzw. GFP-Proteins im Fusionsprotein ist markiert.

III.6.2.1. In vitro Bindungsstudien

Mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen können so genannte „pull-down“-Experimente durchgeführt werden, um Interaktionen zwischen Proteinen in vitro nachzuweisen. Dazu wurden die GST-XLAP2 β -Fusionsproteine (s. Abb. 3-29) an Glutathion-Agarose Beads gekoppelt und mit dem Proteinextrakt aus A6 Zellen inkubiert (Proteinkonzentration: 30 – 35 mg/ml). Proteine, die normalerweise mit XLAP2 β interagieren, binden unter nahezu physiologischen Bedingungen (150 mM NaCl) an die entsprechenden XLAP2 β -Segmente. Durch mehrmaliges Waschen werden unspezifische Bindungspartner entfernt, die Glutathion-Agarose mit den daran gebundenen GST-Fusionsproteinen sowie dessen Interaktionspartner in SDS-Probenpuffer denaturiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Durch Immunblots mit spezifischen Antikörpern gegen Lamin B2, Lamin A sowie Lamin A/B1 konnte nachgewiesen werden, dass die nukleoplasmatische Domäne des XLAP2 β (AS 1-471) sowohl an Lamin B2 wie auch an Lamin A bindet (Abb.3-30). Eine Interaktion mit dem GST alleine konnte für keines der Lamine nachgewiesen werden. Eine Verkürzung der XLAP2 β -Sequenz reduzierte drastisch die Bindung der Lamine an die GST-Fusionsproteine,

wobei es dabei unerheblich war, ob die Verkürzung am aminoterminalen Ende (GSTX243-471, GSTX96-471, GSTX176-471), am carboxyterminalen Ende (GSTX1-248) oder gar an beiden Enden (GSTX96-387) zu finden war. Unerwarteterweise zeigte auch das Fusionsprotein mit der Lamina-Bindungsdomäne (GSTX243-471) eine sehr schwache Bindungsaffinität zu den B-Typ-Laminen, ebenso wie das Fusionsprotein, bei dem nur die ersten 95 AS des Aminoterminus fehlen (GSTX96-471). Interessanterweise zeigte das Konstrukt mit der fehlenden Lamina-Bindungsdomäne (GSTX1-248) eine ähnlich starke bzw. schwache Bindung an Lamin B2 wie das Konstrukt, welches diese Bindungsdomäne beinhaltet (GSTX243-471). Lamin A wurde bevorzugt an die GST-Fusionsproteine gebunden, welche aus dem mittleren Teil der nukleoplasmatischen Domäne des XLAP2 β bestanden (GSTX1-471, GSTX96-471, GSTX96-387). In diesen drei Konstrukten befindet sich auch das LEM-Motiv (Aminosäuren 96-134). Zusätzlich zu einem Antikörper, der spezifisch nur Lamin A erkennt (X94, Abb. 3-30C) wurde auch mit einem Antikörper geblottet, der zum Lamin A auch Lamin B1 erkennt (X67, Abb. 3-30D); die Ergebnisse der beiden Antikörper waren identisch.

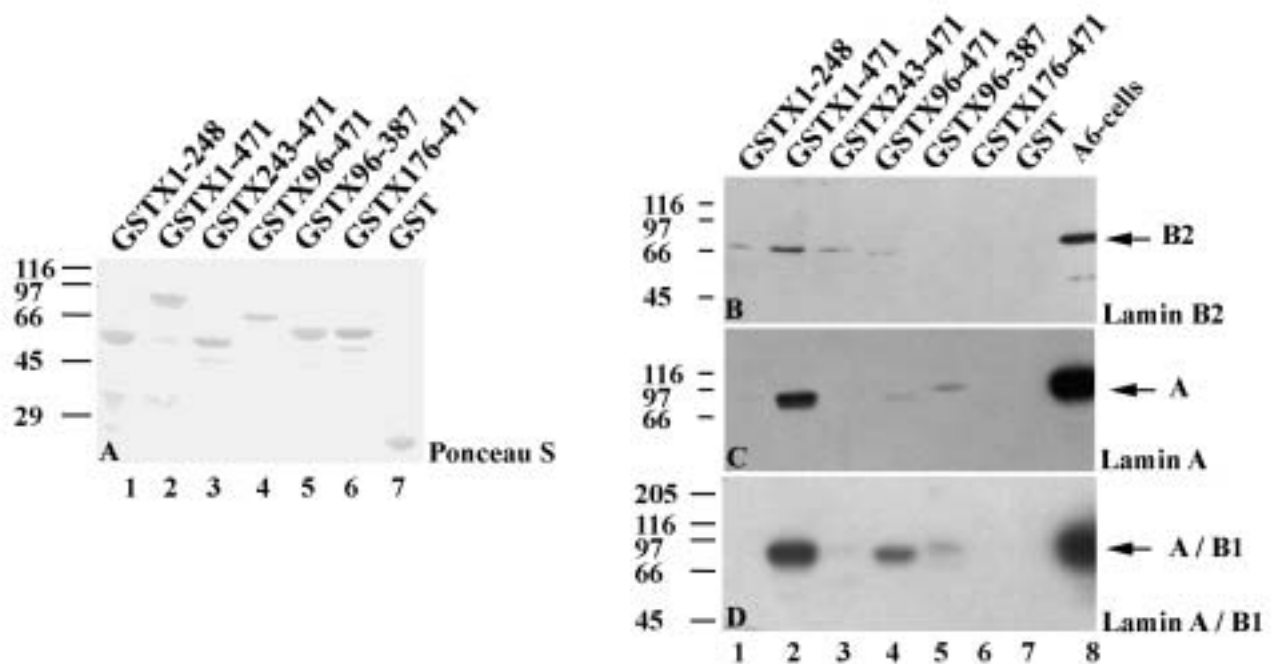


Abb. 3-30: Identifizierung der Bindung der Lamine an GST-XLAP2 β -Fusionsproteine in vitro.

Proteine des 11.000 g Überstandes des *Xenopus* A6 Zellextraktes wurden mit 6 verschiedenen GST-XLAP2 β -Fusionsproteinen (Spur 1-6) sowie mit GST alleine (Spur 7) inkubiert. Ähnliche Mengen der jeweiligen GST-Fusionsproteine sowie des GST wurden nach der Inkubation über SDS-PAGE aufgetrennt (10 % Acrylamid), auf Nitrocellulose übertragen (A, Ponceau S Färbung) und mit Antikörpern gegen Lamin B2 (B), Lamin A (C) sowie Lamin A / B1 (D) inkubiert. Die Positionen der Referenzproteine (in kD) sind markiert.

III.6.2.2. In vivo Bindungsstudien

Unter der Annahme, dass es sich bei den in vitro Bindungen um Situationen handelt, die auch in einer lebenden, intakten Zelle zu finden sind, könnte man erwarten, dass sich diese Lamin / XLAP2 β -Interaktionen auch in vivo finden lassen und somit schon im Zellextrakt vorhanden sind. Durch die Saccharosegradientenzentrifugation sowie der Gelfiltrationschromatographie konnte man auch sehen, dass sich die XLAP2 β -Proteine in Fraktionen befanden, die zu groß für monomere Proteine sind (siehe Abb.3-27, 3-28). Somit sollte zumindest ein Teil der XLAP2 β -Proteine in Komplexen vorliegen.

Um dies zu überprüfen, wurde eine Immunpräzipitation mit dem Xenopus-spezifischen Antikörper durchgeführt, der die nicht konservierte Region in XLAP2 β erkennt (Aminosäuren 255-429, siehe III.2). Der an Protein A-Sepharose gekoppelte Antikörper wurde mit Zellextrakt (11.000 g Überstand) der Xenopus A6 Zellen inkubiert und dadurch das daran bindende XLAP2 β mit dessen Bindungspartnern co-immunpräzipitiert. Nach Auftrennung durch SDS-PAGE, Übertragung auf Nitrocellulose und Inkubation mit spezifischen Antikörpern gegen Lamin B2 (Antikörper X223), Lamin A (Antikörper X94) und Lamin A/B1 (Antikörper X67) kann man sehen, dass Lamin A mit XLAP2 β co-immunpräzipitiert wurde (Abb. 3-31, B und C, Spur 4). Die überraschende Abwesenheit von co-immunpräzipitierten Lamin B2 könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Bereich, der für die Interaktion von XLAP2 β mit Lamin B2 verantwortlich ist, durch den Antikörper verdeckt oder blockiert wird. Wurden die Immunpräzipitate unter stringenteren Bedingungen gewaschen (300 mM NaCl anstatt 150 mM NaCl), so konnten kaum bis gar keine Lamine im Präzipitat nachgewiesen werden (B, Spur 8). Daher wurden alle weiteren Immunpräzipitationen mit Puffer A (150 mM NaCl, 1% Triton) durchgeführt.

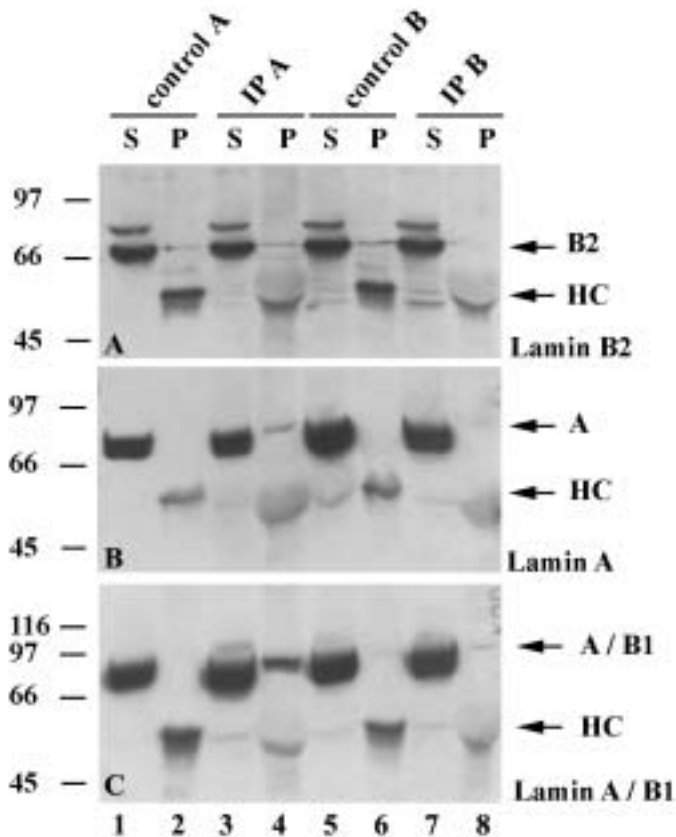


Abb. 3-31: Co-Immunpräzipitation der Lamine mit XLAP2 β aus *Xenopus* A6 Zellextrakt. Die Extrakte wurden mit an Protein A-Sepharose gekoppelte Antikörper inkubiert, die spezifisch XLAP2 β erkennen. Die Immunpräzipitate (P) der Kontrollen (ohne XLAP2 β Antikörper, control) sowie der Experimente (IP) wurden entweder mit Puffer A (1% Triton X-100 /150 mM NaCl) oder Puffer B (1% Triton X-100 /300 mM NaCl) gewaschen. Immunpräzipitierte Proteine (P) sowie Proteine des nicht gebundenen Überstandes (S) wurden durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit Antikörpern gegen Lamin B2 (A), Lamin A (B) und Lamin A/B1(C) inkubiert. Die Höhe der Lamine sowie der schweren Ketten der Antikörper (HC) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Positionen der molekularen Massen der Referenzproteine (in kD) sind markiert.

III.6.2.3. In vivo Bindungsstudien mit GFP-XLAP2 β Konstrukten

Da der XLAP2 β -spezifische Antikörper durch Bindung an XLAP2 β dessen Bindungseigenschaften beeinträchtigen kann, wurden, um diesem Problem zu entgehen, verschiedene GFP-XLAP2 β -Konstrukte hergestellt. Diese umfassten die gesamte Sequenz des Wildtyps wie auch am Aminoterminus verkürzte Sequenzen des XLAP2 β Proteins (siehe Abb. 3-29). Somit konnte nicht nur das Problem der verdeckten Lamina-Bindungsdomäne umgangen, sondern auch die Regionen, die für die Interaktionen verantwortlich sind, näher eingeschränkt werden.

Xenopus A6 Zellen wurden mit den GFP-Expressionsvektoren transfiziert und die transfizierten Zellen mit Hilfe des Antibiotikums Geneticin (siehe Material und Methoden) selektioniert und angereichert. Nach mehreren Wochen wiesen 50 – 70% der A6 Zellen das exprimierte GFP-Fusionsprotein auf. Zur Überprüfung der exprimierten GFP-Konstrukte wurden die Gesamtproteine der Zellen durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit Antikörper gegen GFP sowie XLAP2 β inkubiert. Die Konstrukte wurden von beiden Antikörpern erkannt und wiesen die erwartete Größe auf (Abb.3-32A). In allen Proben konnte eine ähnliche Menge des endogenen XLAP2 β nachgewiesen werden (B).

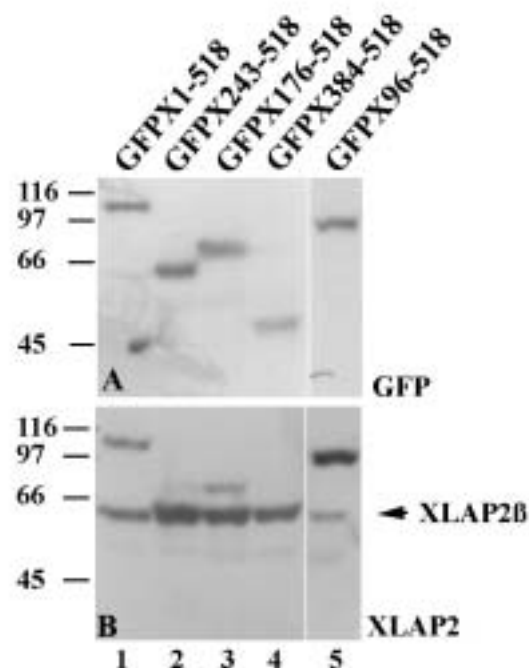


Abb. 3-32: Permanent transfizierte Xenopus A6 Zellen mit unterschiedlichen GFP-XLAP2 β -Fusionsproteinen. Gesamtprotein von 5 verschiedenen Zelllinien, die die GFP-XLAP2 β Fusionsproteine GFPX1-518 (Spur 1), GFPX243-518 (Spur 2), GFPX176-518 (Spur 3), GFPX384-518 (Spur 4) und GFPX96-518 Spur 5) exprimieren, wurden durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und die GFP-Fusionsproteine nach Transfer auf Nitrocellulose mit Hilfe von Antikörpern gegen GFP (A) bzw. XLAP2 β (B) detektiert. Die Position des endogenen XLAP2 β ist in (B) mit einem Pfeil gekennzeichnet. Alle außer dem GFP-Fusionsprotein GFPX384-518 reagieren mit dem XLAP2 β -spezifischen Antikörper. Da GFPX243-518 die gleiche gelelektrophoretische Mobilität wie das endogene XLAP2 β besitzt, können die beiden Banden nicht voneinander unterschieden werden. Die Positionen der Referenzproteine sind markiert (in kD).

Die mikroskopische Betrachtung der permanent transfizierten Zelllinien zeigt eine Transfektionsrate mit den GFP-XLAP2 β -Fusionsproteinen von 50-70% (Abb. 3-33 E und E').

Das GFP-Fusionsprotein, das die Gesamtlänge des XLAP2 β (GFPX1-518) umfasst, zeigt eine fast ausschließliche Lokalisation in der Kernhülle. Einige der GFP-XLAP2 β -Fusionsproteine assoziieren zusätzlich mit cytoplasmatischen Membranen. Mutanten, denen die hoch-konservierte aminoternale Domäne mit dem LEM-Motiv ganz (GFPX176-518, Abb.3-33 C) bzw. teilweise (GFPX96-518, B) fehlt, sind zwar auch in der Kernhülle lokalisiert, der größte Teil des Fusionsproteins befindet sich jedoch im Cytoplasma. Das Fusionsprotein, dem zusätzlich die wenig konservierte, Xenopus-spezifische Region fehlt (GFPX243-518), zeigt ein annähernd gleiches Verhalten wie das dieser beiden Mutanten. Die Mutante mit der kürzesten XLAP2 β -Sequenz (GFPX384-518) ist hauptsächlich in der Kernhülle zu finden, konnte aber auch in einigen Zellen als Aggregate gefunden werden, die mit cytoplasmatischen Membranen assoziieren (Abb. 3-33 E). Um auszuschließen, dass das an den Aminoterminus der XLAP2 β -Sequenz gebundene GFP-Protein eine korrekte Lokalisation an die Kernhülle verhindert, wie man es bei den Konstrukten GFPX96-518, GFPX176-518 und GFPX243-518 sehen kann, wurde die XLAP2 β -Sequenz der Aminosäuren 96-518 zusätzlich so kloniert, dass sich das GFP-Protein am Carboxyterminus der Sequenz befand (X96-518GFP). Nach einer Transfektion in Xenopus A6 Zellen konnte jedoch keine Veränderung in der Verteilung des Fusionsproteins festgestellt werden (vgl. Abb. 3-33 F und B). Auch hier war nur ein Teil des GFP-Fusionsproteins in der Kernhülle zu sehen, während im Cytoplasma einige Aggregate zu sehen waren. Somit kann man davon ausgehen, dass die Position des GFP im Fusionsprotein die Verteilung und Lokalisation des XLAP2 β in der Zelle nicht beeinträchtigt. Die Ursache für die unterschiedliche Lokalisation könnte vielleicht durch eine veränderte Konformation der Bindungsdomänen im verkürzten Protein verursacht werden.

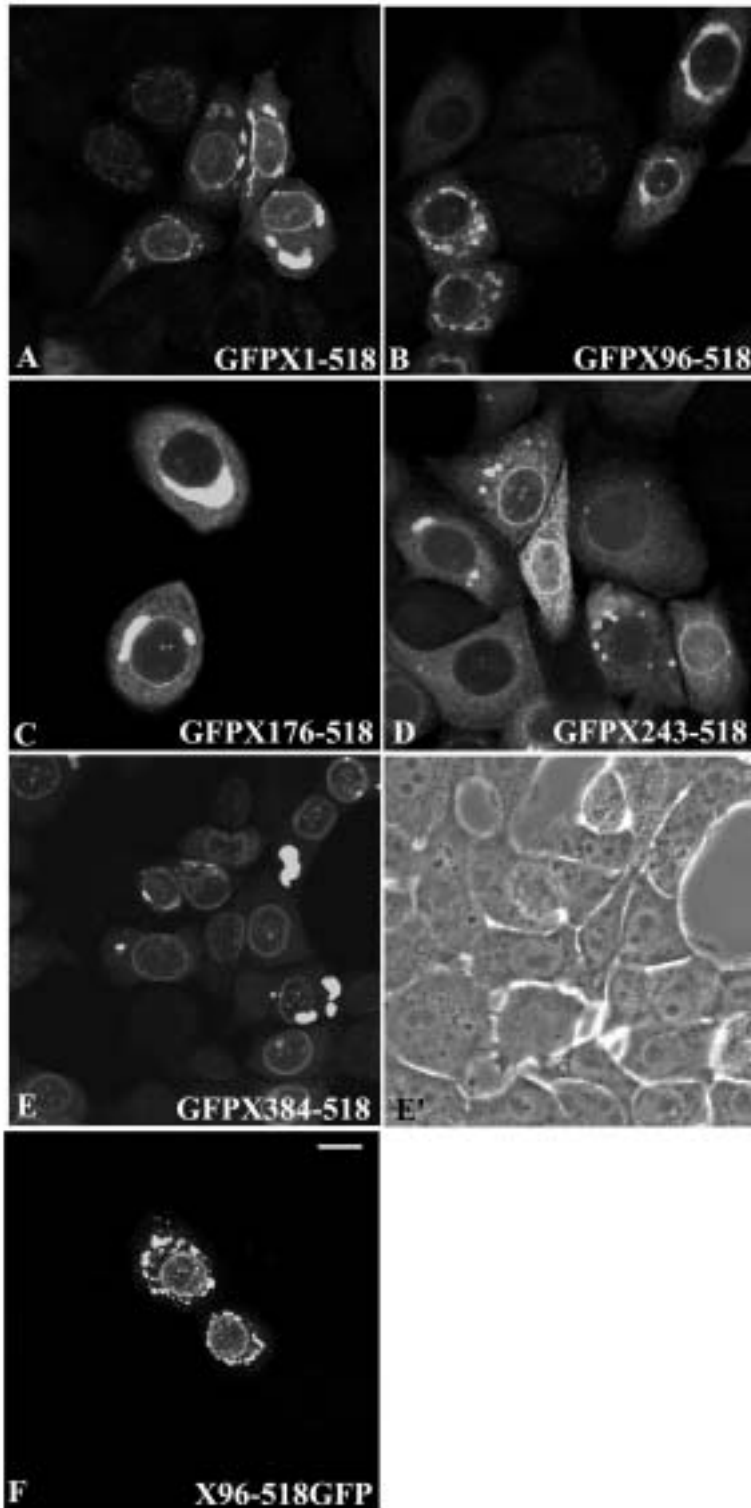


Abb. 3-33: Xenopus A6 Zelllinien nach Transfektion mit Xenopus GFP-XLAP2 β Konstrukten. Visualisierung der GFP-Fusionsproteine GFPX1-518 (A), GFPX96-518 (B), GFPX176-518 (C), GFPX243-518 (D) und GFPX384-518 (E; E' Phasenkontrastaufnahme) im Expressionsvektor EGFP-C3 sowie des GFP-Fusionsproteins X96-518GFP (F) im Expressionsvektor EGFP-N1 durch Confocal Laser Scanning Microscopy.

Eichstrich 10 μ m.

Um nun Einblicke in die *in vivo* Interaktionen von XLAP2 β mit Laminen zu bekommen, wurden aus den verschiedenen permanent transfizierten Zelllinien Proteinextrakte hergestellt. Dazu wurden die Kernhüllenproteine mit Extraktionspuffer A (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,4) extrahiert und immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden ebenfalls mit Puffer A gewaschen. Um die Effizienz der Immunpräzipitation abschätzen zu können, sollte zuerst getestet werden, wie viel von dem GFP-Fusionsprotein überhaupt an den an Protein-A Sepharose gekoppelten Antikörper bindet. Dazu wurden die gleichen Mengen an Zellextrakten vor und nach der Immunpräzipitation auf ein Gel aufgetragen, zusammen mit der Immunpräzipitation mit und ohne anti-GFP Antikörper (=Kontrolle). Dabei konnte man sehen (Abb. 3-34, Spur 3 + 4), dass gut $\frac{2}{3}$ bis $\frac{3}{4}$ des GFP-Fusionsproteins (in diesem Falle GFPX384-518) über den anti-GFP- und Kaninchen-anti-Maus Antikörper an Protein-A Sepharose bindet. Zusätzlich konnte ausgeschlossen werden, dass eine unspezifische Bindung des GFP-Fusionsproteins an die Sepharose stattfindet (Spur 1, Kontrolle). Somit waren die Voraussetzungen geschaffen, um über Immunpräzipitation die *in-vivo*-Bindungen des XLAP2s zu untersuchen.

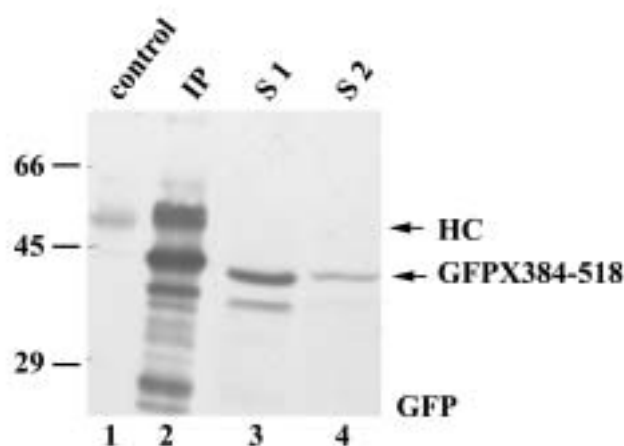


Abb.3-34: Immunpräzipitation des GFPX384-518 Fusionsproteins.

Der 11.000 g Überstand (Triton/NaCl-Extraktion) der *Xenopus* A6 Zelllinie mit permanent transfizierten GFPX384-518 Fusionsprotein wurde mit Antikörper gegen GFP inkubiert. Proteine des Immunpräzipitats (IP; Spur 2) wurden mit dem Immunpräzipitat verglichen, das ohne Antikörper gegen GFP durchgeführt wurde (control; Spur 1). Die immunpräzipitierten Proteine sowie die Proteine des A6 Zellextraktes vor (S1) und nach (S2) der Immunpräzipitation (Spur 3+4) wurden durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und anschließend Immunblots mit Antikörper gegen GFP durchgeführt. Die Position der schweren Ketten (HC) der Antikörper ist durch Pfeile gekennzeichnet. Die Positionen der Referenzproteine (in kD) sind markiert.

Da nun die Voraussetzungen für die in-vivo Bindungsstudien gegeben waren, wurden Immunpräzipitationen mit Zellextrakten, die die verschiedenen GFP-XLAP2 β -Fusionsproteine enthalten, durchgeführt und auf Co-Immunpräzipitate untersucht.

Mit dem Zellextrakt, der das GFP-Fusionsprotein mit der Gesamt-XLAP2 β -Sequenz enthält, konnte sowohl Lamin A wie auch Lamin B2 und B1 immunpräzipitiert werden (Abb. 3-35). Die Co-Immunpräzipitation des Lamin B2 mit dem GFP-XLAP2 β Fusionsprotein bestätigt unsere Vermutung, dass der gegen XLAP2 β gerichtete Antikörper entweder die Lamin B2 Bindungsstelle des XLAP2 β Proteins blockiert bzw. maskiert, oder dass der Antikörper nicht an das mit Lamin B2 komplexierte XLAP2 β binden kann (siehe Abb. 3-31).

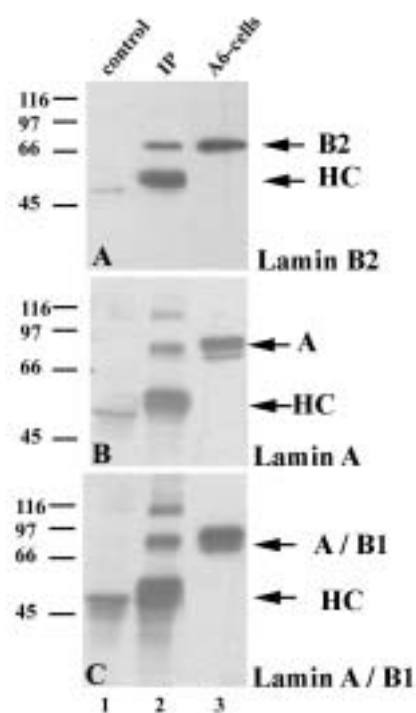


Abb. 3-35: Co-Immunpräzipitation der Lamine mit GFP-XLAP2 β Fusionsproteinen.

Der 11.000 g Überstand (Triton/NaCl-Extraktion) der *Xenopus* A6 Zelllinie mit permanent exprimiertem GFPX1-518 Fusionsprotein wurde mit Antikörper gegen GFP inkubiert. Proteine der Immunpräzipitate (IP; Spur 2) wurden mit dem Immunpräzipitat verglichen, das ohne Antikörper gegen GFP durchgeführt wurden (control; Spur 1). Die immunpräzipitierten Proteine sowie die Proteine des A6 Zellextraktes (Spur 3, A6 cells) wurden durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und anschließend Immunblots mit Antikörper gegen Lamin B2 (A), Lamin A (B) und Lamin A/B1 (C) durchgeführt. Die Positionen der Lamine sind durch Pfeile gekennzeichnet, ebenso die schweren Ketten (HC) der Antikörper. Die Polypeptidbande bei 116 kD (B,C Spur 2) stammt aus nicht-dissoziierten Antikörpermolekülen. Die Positionen der Referenzproteine (in kD) sind markiert.

Wurden Co-Immunpräzitationen mit den Extrakten der anderen permanent transfizierten A6 Zelllinien durchgeführt, so konnte nur mit dem GFPX384-518 Fusionsprotein Lamin B2 und Lamin A co-immunpräzipitiert werden (Abb. 3-36), während bei den A6 Zelllinien mit den exprimierten Fusionsproteinen GFPX96-518, GFPX176-518 und GFPX243-518 weder Lamin A noch Lamin B2 co-immunpräzipitiert werden konnte. Dieses Ergebnis überrascht nicht sonderlich, bedenkt man die geringen Mengen dieser GFP-XLAP2 β Fusionsproteine, die sich jeweils in der Kernhülle befinden (siehe Abb. 3-33, B, C, D). Um auszuschließen, dass es sich bei der Interaktion des verkürzten XLAP2-Proteins GFPX384-518 mit A- und B-Typ Laminen nicht um indirekte Bindungen über eine Dimerbildung des GFP Fusionsproteins mit dem endogenen XLAP2 handelt, wurde folgender Versuch gemacht: Die Immunpräzipitate aus Zellextrakten der mit GFPX384-518 transfizierten Zellen sowie Aliquots des Zellextraktes vor (S1) und nach (S2) der Immunpräzipitation wurden nach SDS-PAGE und Westernblot mit dem XLAP2 β -spezifischen Antikörper getestet. Wie in Abb. 3-36 D zu sehen ist, konnte keine Co-Immunpräzipitation des GFP-XLAP2 β 384-518 Fusionsproteins mit endogenem XLAP2 β nachgewiesen werden. Auch entsprach die Menge des endogenen LAP2 vor der Immunpräzipitation derjenigen danach. Somit scheint der kurze carboxyterminale Bereich des XLAP2 β (Aminosäuren 384-518) zwar mit Laminen, nicht aber mit dem endogenen LAP2 β zu interagieren. Dadurch kann man auch sicher sein, dass die Aminosäuren 384-518 ausreichen, um Bindungen mit A- und B-Typ Laminen einzugehen und die Lamine nicht indirekt über LAP2-LAP2-Interaktionen an das verkürzte Protein binden. Da die Ergebnisse bei den drei Fusionsproteinen GFPX96-518, GFPX176-518 und GFPX243-518 gleich waren, ist hier nur die Immunpräzipitation mit dem GFPX96-518-Fusionsprotein gezeigt (Abb. 3-37). Bei keinem der mit diesen Fusionsproteinen durchgeführten Experimenten konnten co-präzipitierte Lamine nachgewiesen werden. Meine Versuchsergebnisse können aber nicht ausschließen, dass Lamin A als Komplex mit Lamin B2 vorliegt und über B2 an das LAP2 Fusionsprotein GFPX384-518 gebunden wird.

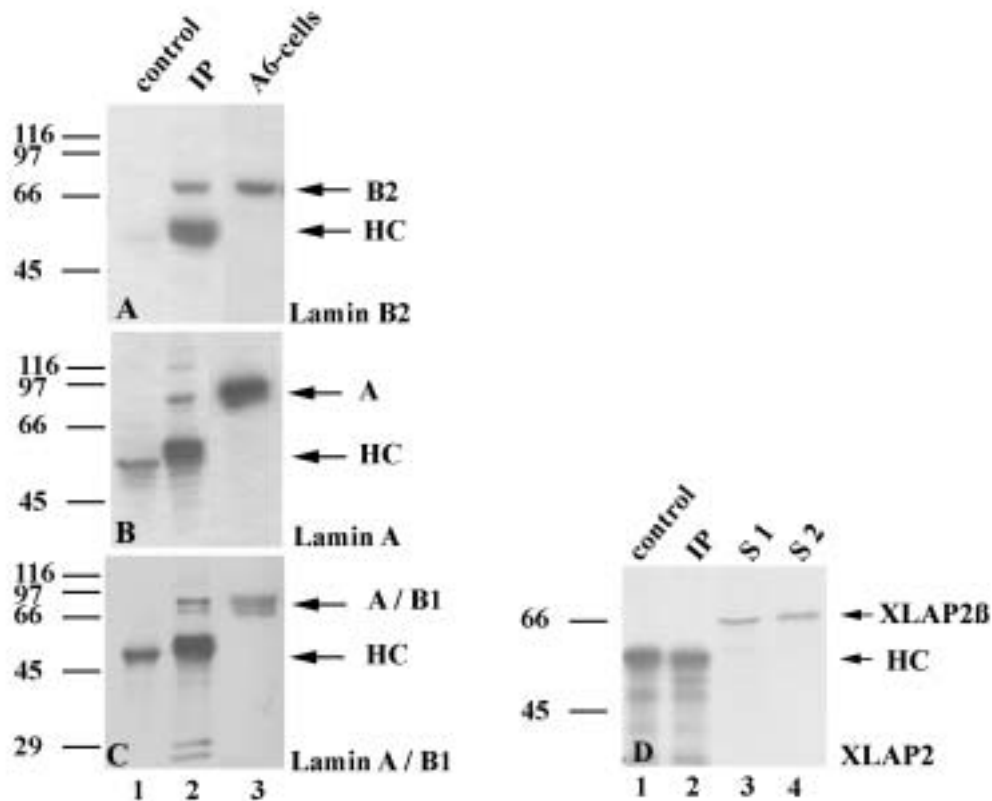


Abb. 3-36: Co-Immunpräzipitation der Lamine sowie des XLAP2 β mit GFP-XLAP2 β Fusionsproteinen. Der 11.000 g Überstand (Triton/NaCl-Extraktion) der *Xenopus* A6 Zelllinie mit permanent exprimiertem GFPX384-518 Fusionsprotein wurde mit Antikörper gegen GFP inkubiert. Proteine der Immunpräzipitate (IP; Spur 2) wurden mit Immunpräzipitaten verglichen, die ohne Antikörper gegen GFP durchgeführt wurden (control; Spur 1). Die immunpräzipitierten Proteine, die nicht-gebundenen Proteine im Überstand vor (S1) und nach (S2) der Immunpräzipitation sowie die Proteine des A6 Zellextraktes wurden durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und anschließend Immunblots mit Antikörpern gegen Lamin B2 (A), Lamin A (B), Lamin A/B1 (C) und XLAP2 β (D) durchgeführt. Die Position der Lamine sind durch Pfeile gekennzeichnet, ebenso die schweren Ketten (HC) der Antikörper. Die Positionen der Referenzproteine (in kD) sind markiert.

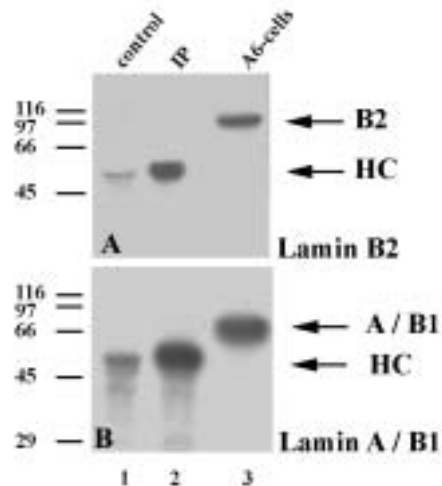


Abb.3-37: Co-Immunpräzipitation der Lamine mit GFP-XLAP2 β Fusionsproteinen.

Der 11.000 g Überstand (Triton/NaCl-Extraktion) der *Xenopus* A6 Zelllinie mit permanent exprimiertem GFPX96-518 Fusionsprotein wurde mit Antikörper gegen GFP inkubiert. Proteine der Immunpräzipitate (IP; Spur 2) wurden mit Immunpräzipitaten verglichen, die ohne Antikörper gegen GFP durchgeführt wurden (control; Spur 1). Die immunpräzipitierten Proteine sowie die Proteine des A6 Zellextraktes (Spur 3) wurden durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und anschließend Immunblots mit Antikörper gegen Lamin B2 (A), und Lamin A/B1 (B) durchgeführt. Die Position der Lamine sind durch Pfeile gekennzeichnet, ebenso die schweren Ketten (HC) der Antikörper. Die Positionen der Referenzproteine (in kD) sind markiert.

Durch diese Experimente konnte klar gezeigt werden, dass XLAP2 β sowie mit B- wie auch mit A-Typ-Laminen interagiert. Zusätzlich konnte gesehen werden, dass eine kurze Sequenz von 134 Aminosäuren nahe dem Carboxyterminus für diese Interaktion ausreicht.

III.7. Studien der Carboxyterminalen Domäne des LAP2 β in Xenopus, Zebrafisch und Ratte

Durch Immunpräzipitationen mit den GFP-XLAP2 β -Fusionsproteinen konnte gezeigt werden, dass eine kleine Sequenz von 134 Aminosäuren ausreicht, um mit den Laminen zu interagieren (Abb.3-36). Ein Vergleich der korrespondierenden Sequenzen des LAP2 β in Xenopus, Zebrafisch und Ratte zeigt, dass eine kurze Sequenz am Carboxyterminus des Proteins in Fischen, Amphibien und Säugern (Abb. 3-38, unterstrichene Sequenz) hoch konserviert ist und auch einen Teilbereich der Lamin-Bindungsdomäne in Ratte beinhaltet (AS298-373, Furukawa et al., 1995). Ausgenommen von der Transmembrandomäne (unterbrochene Linie) finden sich keine weiteren größeren Übereinstimmungen der Sequenzen.

```

X   384   VKKQIVEKNFEERTERDILKEMFPKEFL-TPTGISASCRRPIRGAAGRPLN--- 434
Z   361   VEKVSAIDQTPRAVERDVLKEIFPTENLNTPTGISATCRRPIRGAAGRPLIDTW 414
R   326   TRAEVGEKTEERRVERDILKEMFPYEAS-TPTGISASCRRPIKGAAGRPLE--- 375

X   -----ATDFKTDETYTSKYVSNVSKYTPAVEAK-----SAKVKPGRS 469
Z   LNESRQRLSDLKQTTSSSSFSSTSSYTESRSVPRVSSIPLSASKSTAPPTVKSRSRRS 472
R   -----LSDFRMEESFSSKYVP---KYVPLADVK-----SEKTKKGRS 409

X   LPAWIKILLCIILVVFCFLVYQAMETNDGIAFSKLFLGITESNKTEN 518
Z   LPVVVQLVLLSAVAGFLFFIYQAMETNDVGLFKQSGTDDSTS-K--- 515
R   VPMWIKMLLFALVAGFLFLVYQAMETNQGNPTNFLQD-T---KISN 452
-----

```

Abb. 3-38: Vergleich der carboxyterminalen Sequenz des LAP2 β von Xenopus (X), Zebrafisch (Z) und Ratte (R). Identische Aminosäuren sind fett gedruckt, die Transmembrandomäne ist mit einer unterbrochenen Linie, die konservierte Sequenz der Lamina Bindungsregion mit einer durchgehenden Linie unterstrichen (siehe Lamina Bindungsregion in Abb. 3-5).

Unter der Annahme, dass diese kurze Sequenz von 36 Aminosäuren in Kombination mit der Transmembrandomäne ausreicht, um das LAP2 β Protein an die Kernmembran zu führen (siehe Abb. 3-33 E) sowie mit den Laminen zu interagieren, wurden die entsprechenden LAP2 β -Sequenzen von Zebrafisch (AS 361-515) und Ratte (AS 326-452) in den GFP-Expressionsvektor EGFP-N1 bzw. C3 kloniert und in Xenopus A6 Zellen und COS-7 Zellen exprimiert. Dabei konnte bei allen drei Konstrukten eine Lokalisation des GFP-Fusionsproteins in der Kernhülle nachgewiesen werden (Abb. 3-39). Somit ist diese hochkonservierte, kurze Sequenz am carboxyterminalen Ende des LAP2 β in Kombination mit der Transmembrandomäne ausreichend, um diese verkürzten Proteine in der Kernhülle zu lokalisieren.

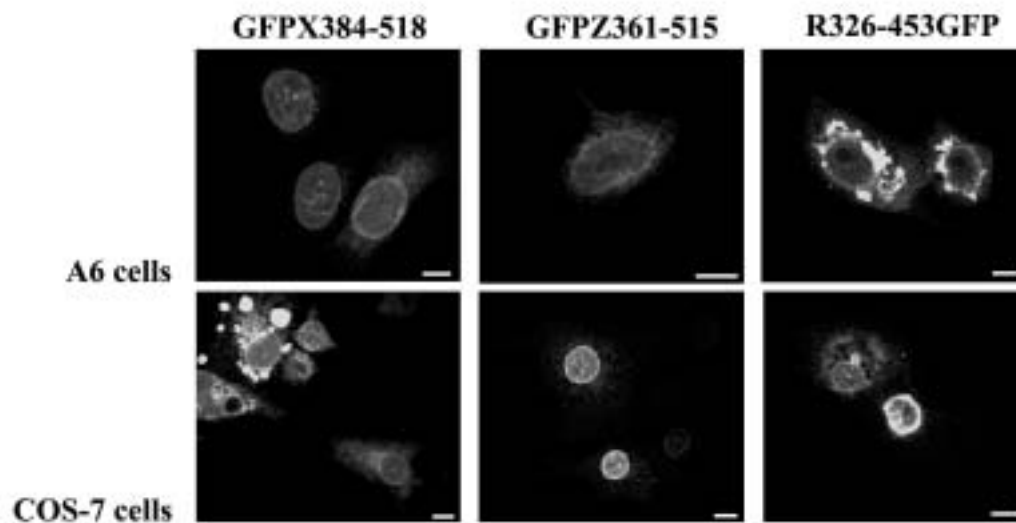


Abb.3-39: : Expression der GFP-Fusionsproteine GFPX384-518, GFPZ361-515 und R326-452GFP in *Xenopus* A6 und COS-7 Zellen. Visualisierung durch Confocal Laser Scanning Microscopy.

Eichstrich 15 μ m.

III.7.1. In vivo Bindungsstudien

Bei einer Immunpräzipitation mit GFP-Antikörpern und einem A6 Zellextrakt, der das exprimierte Fusionsprotein GFPZ361-515 von Zebrafisch enthielt, konnte nachgewiesen werden, dass auch diese kurze, der XLAP2 β 384-518 korrespondierende Sequenz von Zebrafisch ausreicht, um mit B-Typ-Laminen und direkt oder indirekt mit A-Typ Laminen zu interagieren (Abb. 3-40). Zwar konnte eine größere Menge an co-immunpräzipitiertem Lamin B2 im Vergleich zu Lamin A nachgewiesen werden, allerdings ist auch die co-immunpräzipitierte Menge der A-Typ Lamine ausreichend, um eine direkte oder indirekte Interaktion mit GFPZ361-515 zu beweisen. Die schwächeren Bindungen der Lamine an das Zebrafisch LAP2 β -GFP Fusionsprotein im Vergleich zum korrespondierenden *Xenopus* Protein kann die Ursache darin haben, dass es sich in diesem Fall um ein heterologes System handelt (Zebrafisch LAP2 β in *Xenopus* Kulturzellen), während sich die *Xenopus* Fusionsproteine in einem homologen System befinden.

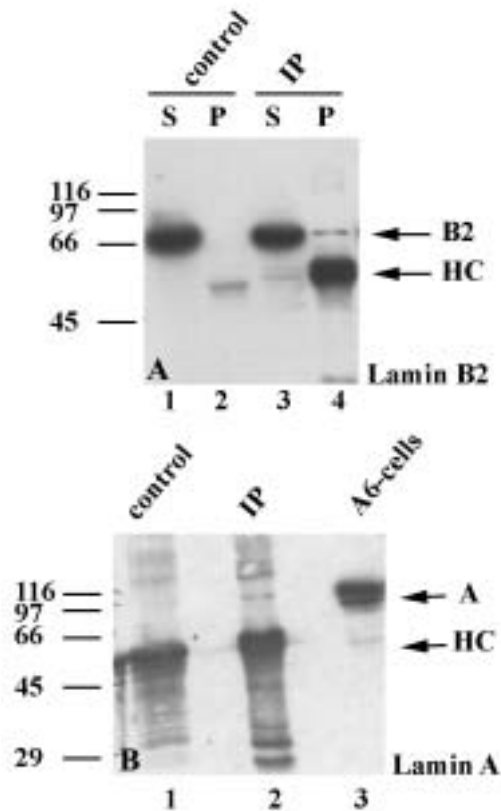


Abb. 3-40: Co-Immunpräzipitation der Lamine mit GFP-ZLAP2 β Fusionsproteinen.

Der 11.000 g Überstand (Triton/NaCl-Extraktion) der permanenten *Xenopus* A6 Zelllinie, die GFPZ361-515 Fusionsprotein exprimiert, wurde mit Antikörper gegen GFP inkubiert. Proteine der Immunpräzipitate (IP; Spur 4 in A und 2 in B) sowie Proteine des ungebundenen Überstandes (S, Spur 1 + 3 A) wurden mit Immunpräzipitaten verglichen, die ohne Antikörper gegen GFP durchgeführt wurden (control; Spuren 2 in A und 1 in B). Die immunpräzipitierten Proteine sowie die Proteine des A6 Zellextraktes (Spur 3 in B) wurden durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und anschließend Immunblots mit Antikörper gegen Lamin B2 (A), und Lamin A (B) durchgeführt. Die Position der Lamine sind durch Pfeile gekennzeichnet, ebenso die schweren Ketten (HC) der Antikörper. Die Positionen der Referenzproteine (in kD) sind markiert.

Wie schon beschrieben, werden in Säugern mehrere Isoformen der LAP2-Familie exprimiert, wobei die β -Isoform an B-Typ-Lamine (Furukawa et al., 1995) und die nicht-membrangebundene α -Isoform an A-Typ Lamine bindet (Dechat et al., 2000b). Um zu zeigen, dass die hochkonservierte carboxyterminale Domäne des Ratten-LAP2 β (AS 326-452), die auch einen Teil der Lamina-Bindungsdomäne umfasst, ausreicht, um an Lamine zu binden, wurden COS-7 Zellen mit einem Expressionsvektor, der für das GFP-Fusionsprotein R326-452GFP codiert, transfiziert. Leider gelang es mir jedoch nicht, eine permanent-transfizierte COS-7 Zelllinie zu etablieren, die dieses Fusionsprotein exprimiert. Da die Anzahl der transfizierten Zellen bei einer transienten Transfektion zu gering war, um eine Immunpräzipitation nach dem bisherigen Standardprotokoll durchzuführen (Abb.3-41A), wurden die transient transfizierten Zellen radioaktiv mit ^{35}S -Methionin / Cystin markiert, nach Standardprotokoll extrahiert und mit den GFP-Antikörpern immunpräzipitiert. Trotz stringenterer Waschbedingungen und stärkerer Präabsorption der Protein-A Sepharose waren auch in der Kontrollpräzipitation Polypeptidbanden zu erkennen (Abb. 3-41B). Die zu sehenden Proteinbanden befanden sich sowohl im Immunpräzipitat (IP) wie auch in der Kontrolle (control). Somit konnte über diese Methode keine Aussage über die Bindungseigenschaften des R326-452-GFP Fusionsproteins gemacht werden.

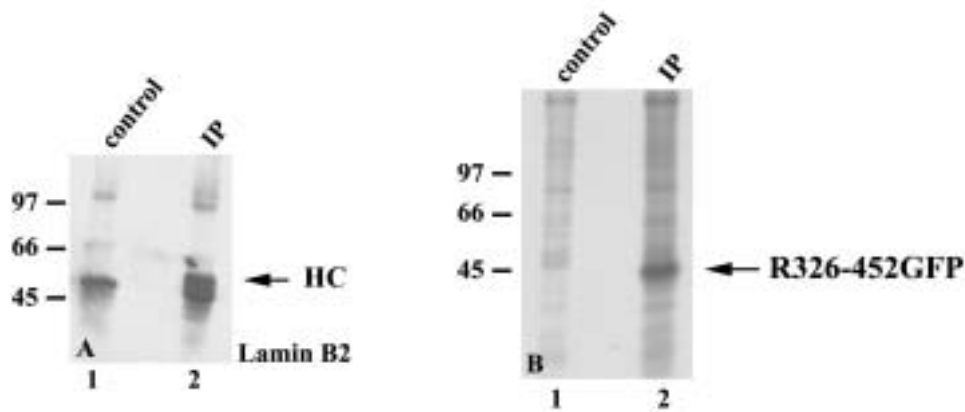


Abb. 3-41: Co-Immunpräzipitation der Lamine mit RLAP2 β -GFP Fusionsproteine.

A) Der 11.000 g Überstand (Triton/NaCl-Extraktion) der Säuger COS-7 Zelllinie mit transient exprimierten R326-452GFP Fusionsprotein wurde mit Antikörpern gegen GFP inkubiert. Proteine der Immunpräzipitate (IP; Spur 2) wurden mit Immunpräzipitaten verglichen, die ohne Antikörper gegen GFP durchgeführt wurden (control; Spur 1). Die immunpräzipitierten Proteine wurden durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und anschließend Immunblots mit Antikörper gegen Lamin B2 (A) durchgeführt. Die Position der schweren Ketten (HC) der Antikörper ist durch Pfeile gekennzeichnet. Die Positionen der Referenzproteine (in kD) sind markiert.

B) Der 11.000 g Überstand (Triton/NaCl-Extraktion) der mit 35 S-Methionin / Cystin radioaktiv markierten COS-7 Zelllinie mit transient transfizierten R326-452GFP Fusionsprotein wurde mit Antikörper gegen GFP inkubiert. Proteine der Immunpräzipitate (IP; Spur 2) wurden mit Immunpräzipitaten verglichen, die ohne Antikörper gegen GFP durchgeführt wurden (control; Spur 1). Die immunpräzipitierten Proteine wurden durch SDS-PAGE (11 % Acrylamid) aufgetrennt und mit Coomassie R angefärbt. Die Expositionszeit des Röntgenfilmes auf dem getrockneten Gel betrug 3 Tage. Die Positionen der Referenzproteine (in kD) und des immunpräzipitierten RLAP2-GFP sind markiert.

III.7.2. Verteilung des endogenen LAP2 β in transient transfizierten Zellen

Betrachtet man die intrazelluläre Verteilung des endogenen LAP2 β in transient transfizierten Zellen, die die GFP-Fusionsproteine GFPX384-518, GFPZ361-515 sowie R324-452GFP exprimieren, so konnte eine Verdrängung des endogenen LAP2 β beobachtet werden (nachgewiesen durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie, Abb. 3-42). In ca. 14% der A6 Zellen und in 56% der COS-7 Zellen konnte das endogene LAP2 β kaum nachgewiesen werden, während die GFP-Fusionsproteine eine klare Kernhüllenfärbung aufweisen. Der gleiche Effekt konnte gesehen werden, wenn COS-7 Zellen das Fusionsprotein GFPX1-518 exprimierten (nicht gezeigt). Die Morphologie des Nukleus sowie die Verteilung anderer Kernmembranproteine, wie Lamin B2, Lamin A sowie Proteine des Kernporenkomplexes

scheinen unverändert zu sein (Abb. 3-43). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die drei Deletionsmutanten GFPX384-518, GFPZ361-515 und R324-452GFP mit dem endogenen LAP2 um die Bindungsstellen in der nukleären Lamina konkurrieren und dass die Lamin-Bindungsdomäne in Vertebraten sehr konserviert zu sein scheint. Außerdem hat es den Anschein, dass die Chromatin-Bindungsdomäne in der nukleoplasmatischen Region, die ja in allen LAP2 Isoformen vorhanden ist, nicht ausreicht, um die Proteine in der Kernhülle zu halten, wenn die Bindung zur Lamina gestört ist. Die sehr schwache Antikörperfärbung des endogenen LAP2 lässt eine Degradation des Proteins vermuten. Wäre es nur eine Verdrängung, so müsste eine vermehrte Lokalisation des endogenen LAP2 im ER zu sehen sein. Diese Verminderung des endogenen XLAP2 β in der Kernhülle kann allerdings nur in transient transfizierten Zellen beobachtet werden. In permanent transfizierten *Xenopus* A6 Zellen, die die Fusionsproteine GFPX384-518 sowie GFPZ361-515 exprimierten, war die endogene Verteilung des XLAP2 β unverändert im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen. Somit scheint eine Verminderung des endogenen LAP2 β in der Kernhülle letal für die Zelle zu sein, sodass auf Dauer nur transfizierte Zellen überleben, in denen geringe Mengen des LAP2-GFP Fusionsproteins exprimiert werden, sodass die Konzentration und Verteilung des endogenen LAP2 β der normalen, nicht-transfizierten Zelle entspricht.

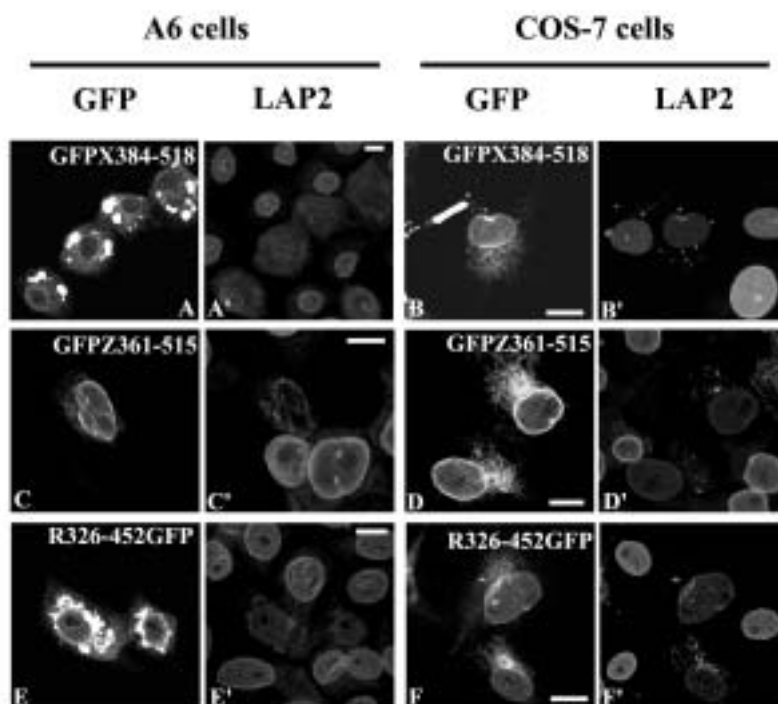


Abb. 3-42: Expression von *Xenopus*, Zebrafisch und Ratte GFP-LAP2 β Fusionsproteine in *Xenopus* A6- und in COS-7 Zellen. Die Verteilung der GFP-Fusionsproteine in transfizierten Zellen (GFP, A-F) sowie die Markierung des endogenen LAP2 durch indirekte Immunfluoreszenz (LAP2-Antikörper) sind

zu sehen (A'-F'). Die digitalen Aufnahmen wurden mit Hilfe des Confocal Laser Scanning Microscopy durchgeführt. Eichstrich 10 μm .

Aufgrund der Verminderung des endogenen LAP2 β durch die kurze carboxyterminale Sequenz der GFP-LAP2 β Fusionsproteine von *Xenopus*, Zebrafisch und Ratte in Kulturzellen sollte nun noch untersucht werden, inwieweit diese veränderte Situation sich auf die Verteilung anderer Kernmembranproteine auswirkt. Dazu wurden A6 bzw. COS-7 Zellen transient mit den GFP Konstrukten GFPX384-518 bzw. R326-452GFP transfiziert, mit Methanol / Aceton fixiert und mit verschiedenen Antikörpern inkubiert. Dabei konnte man in COS-7 Zellen nach Expression des RLAP2 β -GFP Fusionsproteins R326-452GFP teilweise eine Verringerung des endogenen Lamins A und B erkennen, während Porenkomplexproteine dabei unbeeinflusst bleiben (Abb. 3-43 A). Bei einer Expression des GFP-XLAP2 β Konstruktes GFPX384-518 in A6 Zellen (Abb. 3-43 B) konnte diese Beobachtung allerdings nicht bestätigt werden. Hier konnte weder bei den Laminen noch bei den NPC-Proteinen eine Verminderung der endogenen Proteine beobachtet werden.

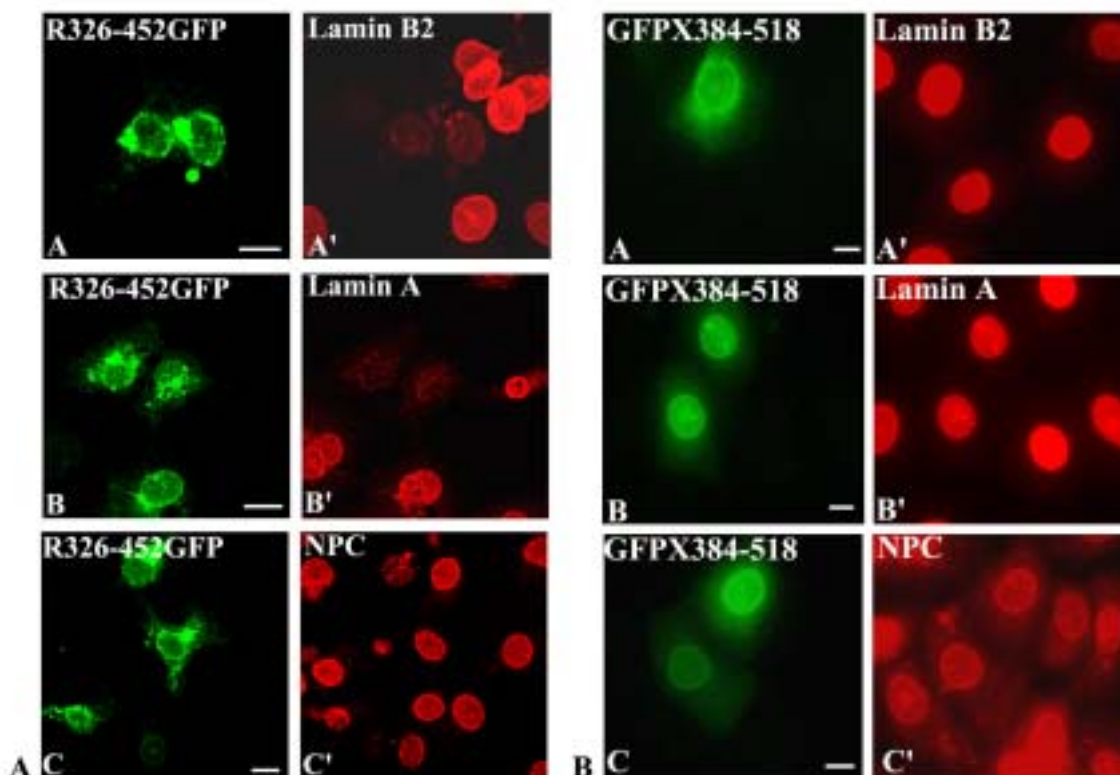


Abb.3-43: Expression von Ratte (A) und *Xenopus* (B) GFP-LAP2 β Fusionsproteinen in *Xenopus* A6- (B) bzw. in COS-7 (A) Zellen. Die Verteilung der GFP-Fusionsproteine in transfizierten Zellen (GFP, A-C) sowie die Markierung der endogenen Lamin B2, Lamin A und Nukleoporeine (A'-C') sind durch indirekte Immunfluoreszenz zu sehen. Die digitalen Aufnahmen wurden mit Hilfe des Confocal Laser Scanning Microscopy durchgeführt.

Eichstrich 10 μm .

IV. Diskussion

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, ist die Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen der inneren Kernmembran von großer Bedeutung. Die Erkenntnis, dass genetisch verursachte Erkrankungen wie Muskel- und Lipodystrophien in Zusammenhang mit Mutationen von Kernmembranproteinen stehen (Bonne et al., 1999; Raffaella di Barletta et al., 2000; Fatkin et al., 1999; Cao und Hegele, 2000; Shackleton et al., 2000), zeigt die Wichtigkeit der Erforschung dieser Kernkomponenten. Da Interaktionen der Proteine an der Kernperipherie nicht nur Auswirkungen auf Struktur und Stabilität des Kerns haben, sondern auch an Kernwachstum, Chromosomendekondensation und -organisation sowie Genexpression beteiligt sind (Übersicht in Holmer und Worman, 2001; Georgatus, 2001; Vlcek et al., 2001), ist die Identifizierung dieser Bindungspartner sehr wichtig. Ziel meiner Arbeit war es, die verschiedenen Isoformen des Lamina-assoziierten Polypeptides 2 (LAP2) in *Xenopus laevis* zu identifizieren und ihre biochemischen Charakteristiken, ihr Expressionsmuster sowie ihre Bindungseigenschaften in Bezug auf die Lamina zu untersuchen.

IV.1. Molekulare Identifizierung und Charakterisierung der LAP2 Proteine in *Xenopus laevis*

Mit Hilfe einer cDNA-Sonde, die der Nukleotidsequenz 1-956 des Ratten LAP2 β entsprach, konnten durch die Hybridisierung einer cDNA Genbank aus *Xenopus* Ovar drei unterschiedlich große cDNAs isoliert werden. Die Identifizierung dieser Klone zeigte, dass es sich bei allen drei um Isoformen des LAP2 in *Xenopus laevis* handelt, deren Sequenzen weitgehend identisch sind (Abb.4-1). Unterschiede zeigen sie lediglich in zwei Insertionen von 53 bzw. 38 Aminosäuren. Der kürzeste der Klone (Klon a) besitzt ein offenes Leseraster von 1395 Nukleotiden und codiert für ein Protein von 466 Aminosäuren, vorausgesetzt, man fügt das fehlende Nukleotid Guanosin an Position 1113 hinzu, welches wahrscheinlich durch inkorrektes Spleißen entstand, da genau an dieser Stelle die Exongrenze der von Berger publizierten Genomsequenz des LAP2 in Maus liegt (Berger et al., 1996). Der mittlere der Klone, der eine hohe Homologie zu LAP2 β von Säugern aufweist (siehe Abb.3-4, 5) und dadurch von uns XLAP2 β benannt wurde (Lang et al., 1999), ist durch einen Einschub an Aminosäure 336 um 53 Aminosäuren länger und codiert somit für ein Protein von 518 Aminosäuren. Der größte der drei Klone (Klon h) besitzt zusätzlich zum ersten Einschub noch einen zweiten an Aminosäure 199 und codiert für ein Protein mit 558 Aminosäuren. Die

ersten 69 Aminosäuren des aminoterminalen Bereiches weisen 69% Übereinstimmung mit der Chromatinbindungsdomäne des Ratten LAP2 β auf (Furukawa, 1997; Cai et al., 2001). Zusätzlich befindet sich im nukleoplasmatischen Bereich in allen drei Isoformen die LEM-Domäne (Aminosäuren 96-134), die auch in den integralen Kernmembranproteinen Emerin und MAN1 vorhanden ist und in allen LAP2 Isoformen in allen bisher bekannten Organismen zu finden ist. Durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem Antikörper, der entweder Epitope in der nukleoplasmatischen Domäne aller LAP2 Isoformen bzw. Epitope in der Xenopus LAP2 β -spezifischen Sequenz erkennt, konnten die XLAP2-Proteine in der Kernperipherie von Interphasezellen lokalisiert werden (Abb.3-10,13). In der Mitose weisen sie eine diffuse Verteilung im Cytoplasma auf. Durch Extraktionsstudien (siehe Abb.3-22) konnte gezeigt werden, dass es sich bei allen drei XLAP2-Isotypen um integrale Membranproteine handelt. Die Laminbindungsdomäne wurde durch Sequenzvergleiche mit dem Ratten LAP2 β sowie den LAP2 Proteinen in Zebrafisch auf die Aminosäuren 337-381 eingengt.

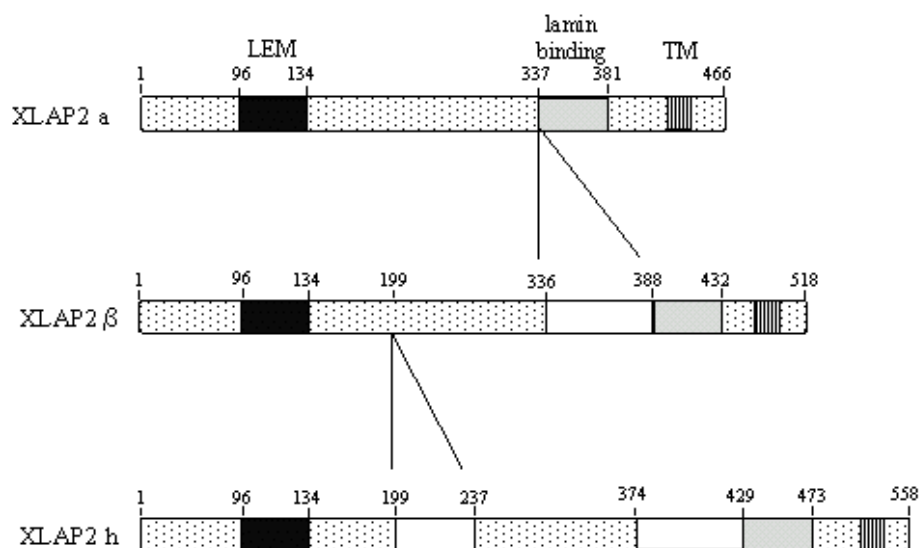


Abb.4-1: Schema der LAP2 Isoformen von *Xenopus laevis*. Die LEM-Domäne ist schwarz, die Lamin Bindungsdomäne hellgrau und die Transmembrandomäne schraffiert markiert. Die jeweiligen Isoform-spezifischen Einschübe sind weiß, die in jeder Isoform vorherrschende Sequenz punktiert dargestellt. Die Positionen der Aminosäuren sind gekennzeichnet.

Überraschenderweise zeigt das von der cDNA des Klons h kodierte Protein nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel ein ungewöhnliches Laufverhalten: Trotz des geringen Größenunterschiedes von nur 40 Aminosäuren im Bezug auf XLAP2 β zeigt es eine niedrigere Laufgeschwindigkeit als erwartet (berechnetes Molekulargewicht: 62,938 kD, tatsächliche Größe im Gel: ca. 84 kD, siehe Abb.3-21). Betrachtet man jedoch den berechneten Isoelektrischen Punkt (IP) des Proteins, so stellt man fest, dass dieser im

Verhältnis zu XLAP2 β wesentlich saurer ist (Klon h: 6.16; XLAP2 β : 8.56). Dies könnte der Grund für das recht langsame Laufverhalten des Polypeptids im SDS Gel sein.

IV.1.1. Vergleich der LAP2 Isoformen in *Xenopus* und Zebrafisch

Vergleicht man die LAP2 Proteine in *Xenopus* mit denen in Zebrafisch, so stellt man verblüffende Ähnlichkeiten fest (vergl. Abb.4-1 und 4-2). Auch in Zebrafisch werden drei Isotypen des LAP2 exprimiert, welche als ZLAP2 γ , ZLAP2 β und ZLAP2 ω bezeichnet werden (Schoft et al., 2002). Alle drei Isoformen besitzen einen gemeinsamen aminoterminalen Bereich (Aminosäure 1 – 214) mit einer LEM-Domäne, sowie einen gemeinsamen carboxyterminalen Bereich (155 Aminosäuren) mit einer Transmembrandomäne, welcher eine hohe Homologie zur Laminbindungsdomäne des LAP2 β in Ratte ausweist. Wie auch in *Xenopus*, so unterscheiden sie sich in ihrer Größe lediglich durch Isoform-spezifische Einschübe. Dabei besitzt ZLAP2 β zusätzlich zur ZLAP2 γ Sequenz einen β -spezifischen Einschub von 146 Aminosäuren an Aminosäure 214 und ZLAP2 ω zwei ω -spezifische Einschübe von 101 bzw. 42 Aminosäuren an Aminosäure 215 bzw. 360, die den β -spezifischen Einschub flankieren (Abb.4-2).

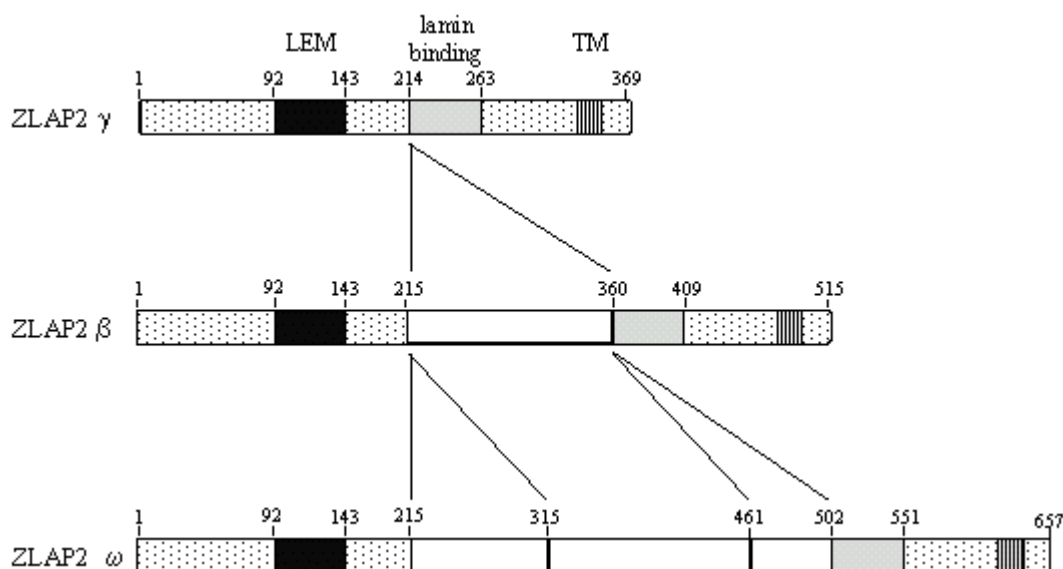


Abb.4-2: Schema der LAP2 Isoformen von Zebrafisch *Danio rerio*. Die LEM-Domäne ist schwarz, die Lamin Bindungsdomäne hellgrau und die Transmembrandomäne schraffiert markiert. Die jeweiligen Isoform-spezifischen Einschübe sind weiß, die in jeder Isoform vorherrschende Sequenz punktiert dargestellt. Die Positionen der Aminosäuren sind gekennzeichnet.

Obwohl sich die Größe der Insertionen in *Xenopus* und Zebrafisch doch beträchtlich unterscheiden, ist die Position der jeweiligen Einschübe doch bemerkenswert. Vergleicht

man alleine die größten der jeweiligen LAP2 Isoformen (Abb.4-3), so kann man eine klare Übereinstimmung zwischen Xenopus LAP2 Klon h und Zebrafisch LAP2 ω erkennen: Der erste ω -spezifische Einschub des ZLAP2 ω beginnt an derselben Position wie der Klon h-spezifische Einschub des Xenopus LAP2 Proteins, von einem Sequenzvergleich aufgrund der Homologie ausgehend (Xenopus LAP2: Aminosäure 199; Zebrafisch LAP2 ω : Aminosäure 215). Der β -spezifische Einschub bei Xenopus befindet sich unmittelbar vor der Laminbindungsdomäne, genauso wie die zweite ω -spezifische Domäne bei Zebrafisch (Xenopus LAP2 Klon h: Aminosäure 374; Zebrafisch LAP2 ω : Aminosäure 461). Somit scheint das Spleißmuster in Amphibien und Fischen sehr konserviert zu sein. Aufgrund dieser sehr ähnlichen Anordnung von Proteindomänen wie auch das fast identische Expressionsmuster der beiden Organismen während der Embryonalentwicklung (siehe IV.2.) kann man die bisher als Klon a und Klon h bezeichneten Isoformen des Xenopus der Nomenklatur des Zebrafisches anpassen und sie fortan als XLAP2 γ (Klon a) und XLAP2 ω (Klon h) bezeichnen.

```

Zomega      MLEFLEDPVLTCKDKLKSALLANNVALPNGDQRKDVYVQLYLKNLTVQNKSSGSPDVFS 60
Xomega      MPEFLQDPVLTKEKDKSELVANNVTLPSGEQRKDVYVQLYLQHLTSQNRATPD----FS 56
          *  **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Zomega      SDEELPPAPVVSNR.SRSGRKATRKTDKVRP---DDVDVTELSNEGLKDLLLKYGLNAGPI 117
Xomega      SDEEREATPMRGRGRPPGRKATKKTDKPRAEEKDDPDVTELSNEALKEELLKYGMKPGPI 116
          ****          *          *****  *****  *          **  *****  **  *****  ****

Zomega      VASTRKVYEQRLQKLLDQGPVAVALPSETSQTGDNQNGNNDSDQYSDREEEPVAPAPVT 177
Xomega      LSNTRKLYEQRLFKLKEQG-LASSALPADTSKADNKQNGNTDSEQYSDNEEE----- 167
          ***  **  *  *  *  *  **          ***  **  *  *****  **  *****  ***

Zomega      VPEPEVEAELIPVVERPVRSRGTPTVTSRTRSGQHTREDVEEDWPVLNVKRLKRSSHR 237
Xomega      -----AKVELTFEKREPLRGNPKPQVTMRNRRTEAEDTDLIPELVNK-----RSNRS 218
          **          *  *  *  *  *  *  *          *          *  *****  **

Zomega      PDQMPASDDTENSELSSAECFAVSEDRRRTGPGAGRRETRPLSDRTSKLSSKSESLRR 297
Xomega      P-----PKGFTLDDVEDLSTDHVTVSEDEVVTEAAWTSG-----PAKSGPVQTVYKELAKVSR 270
          *          *          *  *          *****          *  *          *

Zomega      RSAPVRSVLNEASSPKDFSEPSIVKEVSVSLMRMKVQPLTVPKDPKPSKRYMSSATEST 357
Xomega      R-TPRKVVAPDPVP---FDDADIAEVPPISES--VVEP-----AS 305
          *  *  *          *  *  *          *          *  *  *

Zomega      KRPVSSLNKHDENTADIPSPPHRQSSREPLVSLINTACVEVDDQGMQDVLSCRSANGGL 417
Xomega      NQILTYAENEHFESRKVVNQVPESLKHAETLLSVSEFSELTRRTQ-KKQLISEKHLN--- 361
          *  *  *          *          *  *  *          *          *  *

```

```

Zomega      LAQGVRSAAVSKLSKPVLSQSKPSKPLVDMCCLSPSSDRQKEESCGSPQTHPKSRHSKI 477
Xomega      LTRETDSGSSQIRLIDVHSIG-FTNPTDLLNTALIEETKHIIEDSLETP--KTKQLKI 417
           *      *          * *      *          *          * *      *      *      **

Zomega      TPFLSQITPVRGLDNKLMDMKETMMVEKVSAIDQTPRAVERDVLKEIFPTENLNTPTGIS 537
Xomega      TKFVTPVK-----KQIVEKT----FEERRTERDILKEMFPTE-FSTPTGIS 458
           * *          ***          *      *** ** * ** * ** * ** * **

Zomega      ATCRRPIRGAAGRPLIDTWLNESRQLSDLKQTTSSSSFSSTSSYTESRSVPRVSSIPLS 597
Xomega      ASCRRPIRGAAGRPLNATDLK-----INETYTSKYVSNVSKYTPAVEVK----- 502
           * * ** * ** * ** * * * * * * * * * *

Zomega      ASKSTAPPTVKSRSRRSLPVWVQLVLLSAVAGFLFFIYQAMETNDAGLFKQS--GTDDST 655
Xomega      -----SEKVKPGRSLPVWIKILMFLILVVFCLLVYQAMETNEGMSFSKLLLGITESN 554
           *      * ** * * * * * * * * * * * * * *

Zomega      SK-- 657
Xomega      KTEN 558

```

Abb.4-3: Sequenzvergleich des ZLAP2 ω mit XLAP2 ω .

Die ω -spezifischen Sequenzen sind grün, die β -spezifischen Sequenzen blau gekennzeichnet. Sequenzen, die in allen drei Isoformen enthalten sind, sind nicht markiert. Identische Aminosäuren sind mit * gekennzeichnet.

IV.2. Expressionsmuster der LAP2 Proteine in *Xenopus* im Vergleich zu anderen Spezies

Je höher entwickelt ein Organismus ist, desto komplexer sind auch Struktur und Erscheinungsformen der Kernmembranproteine (Cohen et al., 2001). Während z.B. in *C. elegans* nur ein Lamin Gen bekannt ist, so sind es bei *Drosophila* schon zwei und in Vertebraten drei. Homologe der LEM-Proteinfamilie finden sich in *C. elegans* wie auch in *Drosophila*, allerdings konnten die LAP2 Proteine bisher nur in Vertebraten identifiziert werden, Emerin und MAN1 als Vertreter dieser LEM-Familie werden hingegen auch in Invertebraten exprimiert. Somit scheinen die LAP2 Proteine erst später in der Entwicklung aufzutreten, wo durch die zunehmende Komplexität des Zellkerns zusätzliche Proteine mit spezifischen Aufgaben erforderlich sind.

In Amphibien und Fischen sind bisher drei LAP2 Isoformen bekannt (Lang et al., 1999; del Pino et al., 2002; Schoft et al., 2002). Alle drei Isoformen sind Typ II-integrale Membranproteine der inneren Kernmembran und entstehen durch differenziertes Spleißen.

Während in somatischen Zellen wie auch in der männlichen Keimbahn die kleineren Isoformen LAP2 β und LAP2 γ exprimiert werden, wird in früher Embryonalentwicklung sowie in der weiblichen Keimbahn das größere LAP2 ω exprimiert (siehe Abb.3-15,18,19, ebenso Lang et al., 1999). Diese Expression wird während der Gastrulation in allen untersuchten Spezies gedrosselt und mehr und mehr durch die somatischen Isoformen LAP2 β und LAP2 γ ersetzt, wobei die γ -Isoform in *Xenopus* wie in den meisten anderen untersuchten Organismen (Schoft et al., 2002; del Pino et al., 2002) vorwiegend exprimiert wird. In *Xenopus* ist das LAP2 ω im adulten Organismus nur noch in speziellen Gewebetypen wie Ovar, Herz und Gehirn nachweisbar (siehe Abb.3-15). Dies deckt sich mit dem Expressionsmuster des B-Typ Lamins L_{III} in *Xenopus* (Benavente et al., 1985; Benavente und Krohne, 1985; Stick, 1988): Dieses Lamin wird entwicklungspezifisch exprimiert und ist hauptsächlich in Oocyten, aber auch schwach in Gehirn und Herz des adulten Organismus zu finden. Somit scheint das LAP2 ω wie auch das Lamin L_{III} eine entwicklungspezifische Rolle zu übernehmen (siehe auch IV.3.), die mit zunehmender Entwicklung nur noch in spezifischen Zellen und Gewebetypen benötigt wird. Die Expression des XLAP2 ω in Herz und Gehirn weist auf eine besondere Rolle des Proteins in diesem differenzierten Gewebe hin, worüber aber bis jetzt noch nichts bekannt ist. Es ist nicht auszuschließen, dass auch das ZLAP2 ω in speziellen Zellen exprimiert wird, aber dies konnte aus Mangel eines ω -spezifischen Antikörpers bis jetzt noch nicht näher untersucht werden.

Im Unterschied zu Fischen und Amphibien sind in Säugern bisher mindestens 6 verschiedene Isoformen der LAP2 Familie bekannt (Übersicht in Dechat et al., 2000), die ebenso durch unterschiedliches Spleißen entstehen (Harris et al., 1994; Berger et al., 1996). In somatischem Gewebe werden hauptsächlich drei Formen exprimiert: das LAP2 α , LAP2 β und in variablen Mengen das LAP2 γ (Harris et al., 1994; Alsheimer et al., 1998; Goldberg et al., 1999). Interessanterweise weisen nur LAP2 β und LAP2 γ eine Transmembrandomäne auf und sind somit an die innere Kernmembran gebunden. Auch sind sie bis auf einen β -spezifischen Einschub von 109 Aminosäuren an Aminosäure 220 identisch. Das LAP2 α hingegen besitzt nach den gemeinsamen 187 aminoterminalen Aminosäuren eine α -spezifische Sequenz, die keine Ähnlichkeit mit den anderen Isoformen aufweist, nicht membrangebunden ist und somit im gesamten Kern (unter Aussparung des Nukleolus) verteilt vorliegt (Dechat et al., 1998). Das Expressionsmuster der LAP2 Proteine in der weiblichen Keimbahn von Säugern scheint dem der somatischen Zellen zu entsprechen (del Pino et al., 2002). Allerdings wurden nicht speziell Oocyten, sondern Gesamtgewebe aus Maus-Ovar getestet. Somit könnte eine evtl. Oocyten-spezifische LAP2 Isoform durch die Menge des in Ovar vorhandenen somatischen Gewebes nicht detektierbar gewesen sein. In der männlichen Keimbahn von Säugern hingegen wird vorwiegend LAP2 α exprimiert (Alsheimer et al., 1998). Sind in der frühen Spermiogenese noch alle drei LAP2 Isoformen

vorhanden und gleichmäßig an der Kernperipherie verteilt, so konzentrieren sie sich zunehmend auf einer Seite des Nukleus und die Expression des LAP2 β und LAP2 γ nimmt mit fortschreitender Spermienentwicklung ab, bis im späten Spermatogenesestadium nur noch LAP2 α exprimiert wird. Da sich der Spermienkern strukturell sehr von normalen somatischen Zellen unterscheidet, z.B. durch sein dicht gepacktes Chromatin, ist es nicht gerade verwunderlich, dass gerade hier die LAP2 Isoform exprimiert wird, die sich in Struktur, Lokalisation und Bindungseigenschaften stark von den anderen LAP2 Proteinen unterscheidet. Durch die Lokalisation des LAP2 α im Nukleus sowie durch die zwei unterschiedlichen Chromatinbindungsregionen des Proteins (Vlcek et al., 1999) könnte das LAP2 α in Säugern an der Organisation des Chromatins in Spermien beteiligt sein und somit eine besondere Aufgabe in der männlichen Keimbahn wahrnehmen.

In allen untersuchten Amphibien und Fischen konnte bisher keine α -Isoform nachgewiesen werden. In Testis wie auch in Spermien wurden nur die somatischen Isoformen LAP2 β und LAP2 γ , bzw. ein niedrig-molekulares Protein von ca. 30 kD exprimiert (del Pino et al., 2002). Somit könnte das LAP2 γ als älteste LAP2-Isoform fungieren, woraus mit zunehmender Komplexität des Organismus und insbesondere des Nukleus durch Insertionen neue Isoformen entstanden sind. Dafür spricht, dass in *Xenopus* und Zebrafisch wie auch in verschiedenen anderen Amphibien und Fischen das LAP2 γ als Hauptisoform exprimiert wird, während das LAP2 α , das am wenigsten homologe Protein der LAP2-Familie, nur in Säugern zu finden ist. Zusätzlich könnte die LAP2 Expression von spezifischen Charakteristiken von differenzierten Zellen abhängen, wie z.B. von der Expression unterschiedlicher Lamine oder unterschiedlicher Chromatinstruktur.

IV.3. Bedeutung des LAP2 ω in der Entwicklung

Da in *Xenopus* und Zebrafisch das LAP2 ω als einzige Isoform in frühen Entwicklungsstadien exprimiert wird, scheint diesem Protein im Embryo eine spezifische Rolle zuteil zu werden. Betrachtet man den Zellzyklus von frühen embryonalen Zellen in *Xenopus* und Zebrafisch, so findet man neben dem Fehlen einer G1 und G2 Phase auch eine Mitose, die durch Karyomerbildung charakterisiert ist. Diese Erscheinung ist während der frühen Embryonalentwicklung in verschiedenen Organismen bekannt (Montag et al., 1988; Lemaitre et al., 1998). Während der Anaphase binden Membranvesikel an einzelne Chromosomen, was zur Bildung einer Kernhülle um diese Chromosomen führt (= Karyomerbildung). Dadurch kann schon mit der DNA-Replikation dieser Chromosomen begonnen werden, bevor die Bildung einer gemeinsamen Kernhülle durch Fusion der einzelnen Karyomere in der

Interphase erfolgt. Somit wird die Teilungsgeschwindigkeit in diesen embryonalen Zellen erhöht.

Beobachtungen aus unserem Labor zeigen, dass das ZLAP2 ω während dieser Zeit sehr früh an Chromosomen gebunden ist (Schoft et al., 2002). Betrachtet man Blastomere von 2 – 4 Stunden alten Zebrafisch Embryonen im Elektronenmikroskop, so kann man unterschiedlich viele Vesikel erkennen, die in der Anaphase mit mitotischen Chromosomen assoziiert sind. Während in der Metaphase noch viele Vesikel im Chromosomen-nahen Cytoplasma zu finden sind und relativ wenige Vesikel mit dem Chromatin assoziiert vorliegen, nimmt die Anzahl der Chromatin-assoziierten Vesikel im Laufe der Mitose stetig zu. In der Telophase kann man eine Kernhüllenbildung um einzelne oder wenige Chromosomen beobachten („Karyomerbildung“). In älteren Embryonen (11-13 Stunden; = Somitenstadium 5-8) hingegen konnten kaum Assoziationen von Vesikeln mit den Anaphasechromosomen sowie Karyomerbildung in der Telophase gesehen werden.

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von frühen embryonalen Zellen zeigen eine Co-Lokalisation des ZLAP2 ω mit den Chromosomen in der Anaphase. Diese Co-Lokalisation nimmt jedoch im Laufe der Entwicklung immer mehr ab und ist im 12 Stunden alten Embryo kaum mehr zu sehen. In diesen Stadien wird die Expression des LAP2 ω mehr und mehr von den somatischen Isoformen LAP2 β und LAP2 γ verdrängt. Somit scheint das LAP2 ω an der Karyomerbildung in frühen Entwicklungsstadien beteiligt zu sein.

Um diese Hypothese zu untersuchen und zu erhärten, betrachtete ich mittels Expression von GFP-Fusionsproteinen die Verteilung der ZLAP2 Proteine in Kulturzellen. Nach Transfektion und Expression in *Xenopus* A6 Zellen konnte man bei allen drei ZLAP2 Proteinen während der Interphase eine für Proteine der inneren Kernmembran typische Kernrandfärbung sehen. Betrachtet man jedoch die Verteilung während der Mitose, so kann man ab der Meta- / Anaphase eine zunehmende Co-Lokalisation der Fusionsproteine ZLAP2 ω -GFP und ZLAP2 β -GFP mit dem Chromatin beobachten. In der Anaphase ist eine klare Chromatinfärbung mit beiden GFP-Konstrukten zu sehen (Abb.3-24A; 25A). Diese Beobachtung findet sich auch nach Expression der beiden verkürzten Fusionsproteine ZLAP2 ω 1-502-GFP und ZLAP2 β 1-360-GFP. Dass diese Beobachtungen nicht auf das GFP im Fusionsprotein zurückzuführen sind, zeigt die Lokalisation des exprimierten ZLAP2 γ -GFP und des verkürzten Konstruktes ZLAP2 γ 1-214-GFP: Beide Konstrukte co-lokalisieren nicht mit Chromatin (siehe Abb.3-24C, 25C).

Betrachtet man die Verteilung des endogenen ZLAP2 in Kulturzellen von Zebrafisch, so findet man keine Co-Lokalisation des in somatischen Zellen exprimierten endogenen ZLAP2 β und ZLAP2 γ mit Meta- und Anaphasenchromosomen (Schoft et al., 2002). Erst bei der Bildung der Kernhülle in der späten Anaphase wird eine Co-Lokalisation beobachtet. Dies entspricht früheren Beobachtungen, bei denen LAP2 β und LAP2 γ nach Ablauf der

Chromosomensegregation an das Chromatin binden und somit am Aufbau der Kernhülle mit beteiligt sind (Foisner und Gerace, 1993; Maison et al., 1997). Diese Beobachtung scheint zwar der Lokalisation des exprimierten ZLAP2 β -GFP an Metaphase-Chromosomen zu widersprechen, allerdings wird das endogene ZLAP2 β in somatischen Zellen nur in ganz geringen Mengen exprimiert, im Gegensatz zu ZLAP2 γ , sodass bei einer indirekten Immunfluoreszenz mit einem ZLAP2-spezifischen Antikörper fast nur ZLAP2 γ zu sehen ist. Und für das ZLAP2 γ -GFP Protein konnte keine Co-Lokalisation mit Metaphasechromosomen gezeigt werden, weder als Wildtyp noch als verkürztes Konstrukt mit der γ -spezifischen Sequenz 1-214.

Somit scheint eine spezifische Aufgabe des LAP2 ω zu sein, in früher Embryonalentwicklung den raschen Aufbau der Kernhülle durch Karyomerbildung zu fördern. Da in späteren Entwicklungsstadien eine rasche Kernteilung nicht mehr notwendig ist, wird die Expression des LAP2 ω runter reguliert, und mehr und mehr von den somatischen Isoformen LAP2 β und LAP2 γ ersetzt. Ob das LAP2 β weiterhin diese Funktion in somatischen Zellen ausübt, ist noch nicht geklärt.

IV. 4. Bindungseigenschaften des XLAP2 β

Trotz der geringeren Komplexität der LAP2-Proteine in *Xenopus* und Zebrafisch im Vergleich zu Säugern scheinen diese jedoch alle Bindungseigenschaften, die auch in Säugern vorhanden sind, zu besitzen. Ein Sequenzvergleich des Säuger und des *Xenopus* LAP2 β weist auf ähnliche Bindungsdomänen hin. Da alle LAP2 Isoformen von *Xenopus* wie auch vom Zebrafisch Domänen besitzen, die hohe Sequenzhomologien zur LEM Domäne wie auch zur LEM-ähnlichen Domäne aufweisen (Lin et al., 2000; Cai et al., 2001), könnten sie auch über diese Domänen mit BAF und mit Chromatin interagieren (Furukawa 1998; Gant et al., 1999; Furukawa, 1997; Cai et al., 2001). Für diese beiden Domänen des Säuger und des *Xenopus* LAP2 β wurde gezeigt, dass sie wichtig sind für die postmitotische Kernneubildung, den Kernwachstum sowie für die Chromosomendekondensation (Gant et al., 1999; Shumaker et al., 2001; Segura-Totten et al., 2002).

Die Bindung an die Lamina erfolgt bei allen LAP2 Isoformen durch den carboxyterminalen Bereich. Im Ratten LAP2 β wurde die Laminbindungsdomäne auf die Aminosäuren 298-373 festgelegt (Furukawa et al., 1995, 1998). Dieser Bereich, der für die Bindung an die Lamina B1 und B2 verantwortlich ist, ist auch essentiell, um das Protein an die Kernmembran zu führen. Wird durch Injektion eines Peptides die Interaktion des endogenen LAP2 mit der Lamina kompetiert, so findet kein Kernwachstum statt und die Zelle bleibt im G1-Stadium blockiert (Yang et al., 1997). Der Grad der Übereinstimmung in der Lamin-bindenden Region

des Ratten LAP2 β mit der korrespondierenden Sequenz in *Xenopus* LAP2 β unter Aussparung des β -spezifischen Einschubs in XLAP2 β liegt bei 64% (siehe Abb.3-5).

Während LAP2 β an B-Typ-Lamine bindet (Furukawa et al., 1995, 1998), interagiert LAP2 α mit den Laminen A / C (Dechat et al., 2000b). Da in Amphibien und Fischen bisher keine α -Isoform gefunden wurde, liegt die Vermutung nahe, ob nicht das LAP2 β diese Bindungseigenschaft des LAP2 α ausüben könnte.

Durch Bindungsstudien *in vitro* und *in vivo* konnte ich nachweisen, dass in Interphasezellen XLAP2 β Teil eines Proteinkomplexes ist, welcher A- und B-Typ Lamine enthält. Voraussetzung für die *in vivo* Bindungsstudien war die Expression von GFP-XLAP2 β Fusionsproteinen, die den gesamten sowie aminoterminal verkürzten XLAP2 β Sequenzen entsprachen. Da eine Expression in *Xenopus* A6 Zellen keine toxischen Nebeneffekte zeigte, konnten stabil transfizierte Zelllinien gewonnen werden. Wichtig war auch die korrekte Lokalisation der Mehrheit der exprimierten GFP-XLAP2 β Fusionsproteine an der inneren Kernmembran, ohne dass die Verteilung der endogenen Kernmembranproteine dabei beeinträchtigt wurde.

Die Bindung des Lamin B2 an die aminoterminal verkürzten GST-XLAP2 β Fusionsproteine GSTX243-471 und GSTX96-471 sowie die Co-Immunpräzipitation des Lamin B2 mit dem verkürzten GFP-XLAP2 β Fusionsprotein GFPX384-518 sind ein Hinweis darauf, dass die carboxyterminale Region des XLAP2 β direkt mit Lamin B2 interagiert. Sequenzvergleiche zeigen eine hoch konservierte Region von 36 Aminosäuren, die in allen untersuchten Vertebraten vorhanden ist und einen Teil der von Furukawa publizierten Lamin Bindungsdomäne des Ratten LAP2 β beinhaltet (Furukawa et al., 1995, 1998). Dabei scheinen die wenig homologen, Spezies-spezifischen Domänen, die diesen konservierten Bereich umgeben, verstärkend auf diese Interaktion zu wirken. Vergleicht man die Bindung des Zebrafisch Konstruktes GFPZ361-5151 mit dem von *Xenopus*, so findet man eine schwächere Interaktion des GFPZ361-515 an die Lamine als bei GFPX384-518. Dies kann daher kommen, dass die Bindungskapazität der hochkonservierten Sequenz zwar für die LAP2 β -Lamin-Interaktionen ausreicht, die sie umgebenden Aminosäuren aber verstärkend auf die Spezies-spezifische Bindungsaffinität einwirken.

Obwohl durch *in vitro* Bindungsexperimente und Co-Immunpräzipitationen eine Interaktion des LAP2 β mit Lamin A gefunden wurde, ist diese Bindung doch eher indirekt. Dafür sprechen mehrere Gründe: Erstens konnte kein Lamin A in den *in vitro* Studien mit dem GSTX243-471 Fusionsprotein, welches die Lamin Bindungsdomäne beinhaltet, detektiert werden (Abb.3-30 C, D). Zweitens konnten bei früheren Experimenten keine Interaktion nach Inkubation des gereinigten Lamin A mit dem Säuger LAP2 β nachgewiesen werden (Foisner und Gerace, 1993). Da *in vitro* eine Bindung des Lamin A an das Fusionsprotein GSTX96-387 nachgewiesen wurde, könnte dies ein Hinweis auf eine zweite Lamin Bindungsdomäne

in der Mitte des XLAP2 β sein. Allerdings war die Menge des co-immunpräzipitierten Lamin A sowohl bei dem verkürzten XLAP2 β (Konstrukt: GFPX384-518) als auch bei dem Wildtyp Protein (Konstrukt: GFPX1-518) annähernd gleich. Somit scheint diese evtl. vorhandene zweite Lamin Bindungsdomäne keine Haupt-Interaktionsdomäne zu sein und nicht wesentlich zur Laminbindung in vivo mit beizutragen.

Der direkte Vergleich der Bindungseigenschaften aller GST-XLAP2 β Konstrukte zeigt, dass das Protein, welches den gesamten nukleoplasmatischen Bereich beinhaltet, wesentlich effektiver an Lamine bindet als die verkürzten Deletionsmutanten. Vergleichbare Effekte konnten bei der Expression und Lokalisation der GFP-XLAP2 β Fusionsproteine gesehen werden (siehe Abb.3-33). Während der Großteil des Wildtyp Moleküls an der Kernperipherie lokalisiert war, konnte nur eine geringe Menge der exprimierten Deletionsmutanten GFPX96-518, GFPX176-518, GFPX243-518 an der Kernhülle nachgewiesen werden. Diese beiden Beobachtungen lassen darauf schließen, dass einige der Deletionsmutanten Sekundärstrukturen annehmen, die die Lamin Bindungsdomänen zumindest zum Teil maskieren und somit zu einer schwachen Lamin Bindung führen, sowie eine vorwiegend cytoplasmatische Lokalisation der Deletionsmutanten in transfizierten Zellen bewirken. Die vorwiegende Lokalisation des GFP-XLAP2 β Fusionsproteins GFPX384-518 an der Kernperipherie beruht wahrscheinlich darauf, dass durch das Fehlen des größten Teils der nukleoplasmatischen Domäne des Proteins sich keine störende Sekundärstruktur ausbilden kann. Zudem kann man daran erkennen, dass diese Sequenz, in Kombination mit der Transmembrandomäne, in allen untersuchten Organismen ausreicht, um das LAP2 β an die Kernmembran zu führen (siehe Abb.3-39).

Wie kann nun die direkte und indirekte Bindung des LAP2 β an die Lamine aussehen? Wie in der Einleitung beschrieben, sind die Lamine Intermediärfilamente, die durch homotypische Interaktionen polymere Strukturen ausbilden. In vitro Versuche zeigten, dass A- und B-Typ Lamine heterotypische Bindungen eingehen (Krohne et al., 1987; Georgatus et al., 1988). Über die Interaktionen in der Kernlamina einer lebenden Zelle können bis jetzt allerdings noch kaum Aussagen gemacht werden. Meine Ergebnisse, die einen Proteinkomplex der A- und B-Typ Lamine mit dem LAP2 β zeigen, könnten darauf hinweisen, dass das LAP2 β die Interaktion zwischen den unterschiedlichen Lamin Typen erleichtert. Die Hypothese wäre, dass in einem ersten Schritt die α -helikale Domäne des B-Typ Lamins mit der Lamin B Bindungsdomäne des LAP2 β interagiert (Furukawa und Kondo, 1998). Diese Interaktion könnte nun die Affinität der B-Typ Lamine mit den A-Typ Laminen erhöhen. Dass diese LAP2 β -Lamin Interaktionen in diesem Proteinkomplex nicht sehr stark sind, zeigen zwei unterschiedliche Beobachtungen: Zum einen werden bei Extraktionen unter fast physiologischen Bedingungen ca. 90 % des LAP2 β und ca. 50 % der Lamine extrahiert (siehe Abb.3-26), zum anderen konnten die Interaktionen zwischen LAP2 β und co-

immunpräzipitierten Laminen mit 300 mM NaCl dissoziiert werden, im Vergleich zur Bindung des LAP2 α mit Lamin A /C, welche auch bei 0,5% SDS noch bestehen bleibt (Dechat et al., 2000b).

IV.5. Bedeutung des LAP2 β für den Zellkern

Die Tatsache, dass ich nur Xenopus A6 Zelllinien selektionieren konnte, die neben dem GFP-LAP2 β Fusionsprotein noch die normale Menge an endogenem LAP2 β exprimierten, zeigt die Wichtigkeit dieses Proteins für die Zelle. In transient transfizierten Zellen hingegen konnte häufig eine Reduktion des endogenen LAP2 β gesehen werden (Abb.3-42). Diese Zellen scheinen aber aufgrund des fehlenden endogenen LAP2 β abzusterben. Somit scheint LAP2 β essentiell für das Überleben der Zelle zu sein. Unterstützt wird diese Behauptung durch in vitro Kernrekonstruktionsexperimente in Xenopus Eiextrakten, bei denen die Beteiligung und Wichtigkeit des LAP2 β an der Kernhüllen- und Lamina-Neubildung gezeigt wurde (Gant et al., 1999; Shumaker et al., 2001). Da einige der Proteine, mit denen LAP2 β interagiert, wie z.B. BAF und Lamine, essentiell für die Zelle sind (Segura-Totten et al., 2002; Harborth et al., 2001; Übersicht in Wilson et al., 2001), könnte dies auch für LAP2 β und die anderen LAP2 Isoformen zutreffen. Experimente mit „small interfering RNAs“ (RNAi), bei denen durch Abbau einer spezifischen mRNA das korrespondierende Protein reduziert wird, zeigten allerdings, dass Kulturzellen von Säugern auch nicht in ihrem Zellwachstum beeinflusst werden, wenn nur noch geringe Mengen der LAP2 Isoformen vorhanden sind (Harborth et al., 2001). Allerdings konnten die Autoren nicht ausschließen, dass die kleine Menge des noch vorhandenen LAP2 ausreichte, um eine normale Zell- und Kernfunktion aufrecht zu erhalten.

IV.6. Perspektiven

Durch die Identifizierung und nähere Charakterisierung dreier LAP2 Isoformen in Xenopus und Zebrafisch konnten neue Erkenntnisse über das Expressionsmuster und die Bindungseigenschaften von integralen Proteinen der inneren Kernmembran sowie über Komplexität und Interaktionen in der Kernlamina gewonnen werden. Das Expressionsmuster und die Lokalisation des LAP2 ω weisen auf eine besondere entwicklungspezifische Rolle dieses Proteins hin. Durch die Herstellung eines ω -spezifischen Antikörpers könnten weitere Untersuchungen, wie z.B. Kompetitionsstudien durch Injektion des Antikörpers in Embryonen, durchgeführt werden. Auch zur Detektion des ZLAP2 ω in differenzierten Zellen

wäre dieser Antikörper nützlich. Zugabe von rekombinantem LAP2 ω zu Xenopus Eiextrakt könnte Aufschluss darüber geben, ob sich diese LAP2 Isoform bezüglich der Kernrekonstitution anders verhält als das LAP2 β (Gant et al., 1999).

Informationen über die Wichtigkeit aller LAP2 Isoformen könnte man durch die völlige Depletierung dieser Proteine bekommen. Da durch die RNAi doch noch ein Restbestand des endogenen Proteins vorhanden bleibt (Harborth et al., 2001), würden sich Studien mit „knock-out“ Mäusen anbieten. Dabei könnte man spezifisch die einzelnen Isoformen mutieren und somit die Auswirkungen auf einzelne Zellen, Gesamtgewebe oder des ganzen Organismus beobachten. Zur Untersuchung evtl. ω -spezifischer Bindungspartner würde sich das „yeast-two-hybrid“ System eignen. Durch diese Versuchsanordnung konnte auch die Interaktion des LAP2 β mit den B-Typ Laminen gezeigt werden (Furukawa und Kondo, 1998) sowie das BAF als Interaktionspartner für LAP2 β identifiziert werden (Furukawa, 1999).

V. Material und Methoden

V.1. Material

V.1.1. Geräte

Brutschrank CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus-Holding, Hanau
Feinwaage Sartorius handy	Satorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Axiophot Stereo HB050 Quecksilberlampe Umkehrmikroskop IM 35	Zeiss, Oberkochen Zeiss, Oberkochen
Gewebekulturschalen	Greiner Labortechnik
Graphitblotkammer	LMS; bezogen über Hartenstein, Würzburg
Heizplatte mit Magnetrührer IKA-Combimac RCT	Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Konfokales Laser Scanning Mikroskop TCS, SP	Leica, München
Kühlbare Laborzentrifuge Minifuge RF	Heraeus-Holding, Hanau
Laborwaage PJ 3600 Delta Range	Mettler, Gießen
Lichtmikroskop (Zellkultur)	Leitz, Wetzlar
Netzgeräte CONSORT E 455 CONSORT E 734	Bezogen über Hartenstein, Würzburg
pH- Meter	Typ: pH 523, WTW
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg
Sequenzierer	ABI PRISM ^{TR} 310 Genetic Analyser Perkin Elmer, Applied Biotems GmbH, Weiterstadt
Sterile Bank	Steril GARD Hood Class III Müller Labortechnik, Windhagen
Temperierter Schüttler	SM 25; Bühler, Tübingen
Thermocycler	Thermodux; Progene, Wertheim
Tiefkühltruhe -86°C Freezer	Forma Scientific, Labotect, Göttingen
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 D; Eppendorf
Ultrazentrifugen LB-70	Beckman Instr. Inc., Fullerton USA Deutsche Vertretung in München

UV-Crosslinker	Stratalinker, Stratagene
Vortex Genie 2	Bender und Hohbein AG, Zürich
Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q UF Plus	Millipore, Witten

V.1.2. Verbrauchsmaterial und Kits

Glutathion Agarose	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Nitrocellulose	Firma Schleicher und Schuell, Dassel
Nylonfilter, ungeladen	Qiagen, Hilden
Protein A-Sepharose CL-4B	Pharmacia Biotech
Röntgenfilme, Kodak X-Omat AR	Sigma, Deisenhofen
Seakem LE Agarose	Biozym, BIOzym Diagnostik Oldendorf
Whatman-Papier	Firma Schleicher & Schuell, Dassel
E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit II	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
QIAquick Gel Extraktion Kit	QIAgen, Düsseldorf
QIAgen Plasmid Miniprep/Midiprep-Kit	QIAgen, Düsseldorf
QIAquick Nucleotide Removal Kit	QIAgen, Düsseldorf
Random Priming DNA-labelling kit ver.1.1	MBI Fermentas, St Leon-Roth
SMARTTMcDNA Synthese construction kit	CLONTECH laboratories, Inc
Taq DyeDeoxy Terminator cycle sequencing kit / DNA labelling kit	MBI, Fermentas, St Leon-Roth
TNT-system; coupled in vitro translation and transcription kit	Promega, Madison, WI, USA
TOPO TA cloning®Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande

V.1.3. Chemikalien und Zellkulturmedien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von AppliChem (bezogen von der Firma Hartenstein), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) in Analysequalität bezogen und verwendet. Lösungsmittel stammten überwiegend von Roth und wurden, wenn nötig, in Analysenqualität verwendet. Technisches Methanol wurde für Blotpuffer, Färbe- und Entfärbelösungen verwendet. Zum Waschen und

Spülen in Alkohol wurden ebenfalls technische Lösungen verwendet. Die in der Zellkultur eingesetzten Medien und Chemikalien wurden von GIBCO/BRL (Eggenstein) geliefert.

V.1.4. Häufig verwendete Puffersysteme und Medien

Blot-Puffer 1	25 mM Tris/HCl, pH 10,4 in 20 % Methanol (technisch)
Blot-Puffer 2	300 mM Tris/HCl, pH 10,4 in 20 % Methanol (technisch)
Blot-Puffer 3	40 mM Norleucin 25 mM Tris/HCl, pH 9,6 7,0 mM Na ₂ HPO ₄
Färbelösung für Polyacrylamidgele	0,2 % Coomassie R 40 % Methanol (technisch) 8 % Essigsäure
LB-Medium (1 l)	10 g NaCl 5 g Hefeextrakt 10 g Bactotrypton; pH 7,4
LB-Agar	Wie LB-Medium, zusätzlich 1,5% Bacto-Agar; Antibiotika werden dem LB-Medium oder dem LB-Agar gegebenenfalls in folgenden Endkonzentrationen zugegeben: Ampicillin (100 µg/ml) Kanamycin (25 µg/ml)
NZY-Medium (1 l)	5 g NaCl 2 g MgSO ₄ ·7H ₂ O 5 g Hefeextrakt 137,7 mM NaCl 2,7 mM KCl
PBS	7,0 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
Probenpuffer (Lämmli 1970)	60 mM Tris/HCl, pH 6,8 2 % SDS 10 % Glycerin (10 % β-Mercaptoethanol bzw. DDT) 0,1 % Bromphenolblau
RNA-Probenpuffer	80 % Formamid 1 mM EDTA, pH8 0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylenecyanol
Schwacher Entfärber (für Coomassie-Gele)	2 l Methanol (technisch) 7,3 l H ₂ O 0,7 l Essigsäure
SDS-Laufpuffer	2,8 g Tris

	14,3 g Glycin 2.8 g SDS; ad 1 l H ₂ O
SDS-PAGE Lösung A	60 g Acrylamid 1,6 g N,N'-Bisacrylamid ad 200 ml H ₂ O
SDS-PAGE Lösung B	18,17 g Tris/HCl, pH 6,8 0,4 g SDS; ad 100 ml H ₂ O
SDS-PAGE Lösung C	6,06 g Tris/HCL, pH 6,8 0,4 g SDS; ad 100 ml H ₂ O
SDS-Probenpuffer	10 mM Phosphat, pH 7,0-7,2 5% SDS 10% Mercaptoethanol 10% Glycerin
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0
TBST	140 mM KCl 0,3 % Tween 20 10 mM Tris/HCl; pH 8,0
Top Agar (1 l)	5 g NaCl 2 g MgSO ₄ •7H ₂ O 5 g Hefeextrakt 10 g NZ Amine (Casein Hydrolysat) 7 g Agarose; pH 7,5

Zellkulturmedien

Komplettmedium für Xenopus- XLKE A6-Zellen:

37 ml	ddH ₂ O
250 ml	DMEM (Dulbecco´s modified eagle´s medium; Eurobio, Biotechnology)
1 % (v/v)	Penicillin/Streptomycin: Stammlösung: 10000 U/ml; Endkonzentration: 100 U/ml
1 % (v/v)	L-Glutamin: Stammlösung: 200mM; Endkonzentration: 2mM
10 %	FCS (Fötales Kälberserum)

Komplettmedium für Ceropithecus aethiops COS-7 Zellen:

1 % (v/v)	Penicillin / Streptomycin; Endkonzentration 100 U/ml
1 (v/v)	L-Glutamin; Endkonzentration: 2mM
10 %	FCS

in DMEM

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

V.1.5. Kulturzellen

Die Zellen wurden in Gewebekulturschalen im Brutschrank unter konstanten Temperatur- und CO₂-Bedingungen kultiviert.

COS-7 Zellen Nierenzellen von *Ceropithecus aethiops*
 kultiviert bei 37°C, 5% CO₂,

XLKE-A6 Nierenepithelzelllinie von *Xenopus laevis*
 kultiviert bei 27°C, 5% CO₂

V.1.6. Enzyme

Restriktionsenzyme

Restriktions- enzym	Restriktions- puffer	Erkennungssequenz und Schnittstelle	Ursprungs- organismus
BamHI	Bam HI ⁺ (10x) Puffer	5'...G/G A T C C...3' 3'...C C T A G/G 5'	<i>Bacillus amylo- liquefaciens</i>
EcoRI	Puffer 0 ⁺ (10x)	5'...G/A A T T C...3' 3'...C T T A A / G 5'	<i>Eschericia coli</i> RY 13
HindIII	Puffer R ⁺ (10x)	5'...A/A G C T T...3' 3'...T T C G A / A 5'	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>
KpnI	Puffer Kpn ⁺ (10x)	5'...G G T A C / C...3' 3'...C / C A T G G...5'	<i>Klepsiella Pneumoniae</i>
NotI	Puffer 0 ⁺ (10x)	5'...GC/GGCCGC...3' 3'...CGCCGG/CG...3'	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>
PstI	Puffer 0 ⁺ (10x)	5'...C T G C A/G...3' 3'...G / A C G T C...5'	<i>Providenci stuartii</i>
SalI	Puffer 0 ⁺ (10x)	5'...G/T C G A C...3' 3'...C A G C T / G...5'	<i>Streptomyces albus</i>
XhoI	Puffer R ⁺ (10x)	5'...C/T C G A G...3' 3'...G A G C T / C...5'	<i>Xanthomonas holcicola</i>

Sonstige Enzyme

Expand High Fidelity PCR System	Boehringer, Mannheim
M-MuLV Reverse Transcriptase	MBI-Fermentas
Ribonuclease Inhibitor	MBI-Fermentas

SUPERSCRIPT™II Transcriptase	RNase	Reverse	GIBCO BRL Life Technologies
Taq DNA Polymerase			MBI-Fermentas
T4 DNA Ligase			MBI-Fermentas

V.1.7. Antikörper

Primäre Antikörper

Anti-GFP	Antigen: Herkunft: Verdünnung:	Green Fluorescence Protein Maus, monoklonal (Mischung zweier mAK) IF: 1:200 Blot: 1:2000
	Bezogen:	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MAN-AK	Antigen: Herkunft: Verdünnung:	LAP2 Mensch, polyklonal (Serumüberstand) IF: 1:500 Blot: 1:10.000
	Literatur:	Paulin-Levasseur et al., 1996
X67a5	Antigen: Herkunft: Verdünnung:	<i>Xenopus laevis</i> Lamine A und schwach LI Maus, monoklonal (Ascites) IF: 1:300 Blot: 1:1000
	Literatur:	Höger et al., 1991
X94	Antigen: Herkunft: Verdünnungen:	<i>Xenopus laevis</i> Lamin A Maus, monoklonal IF: 1:300 Blot: 1:500
	Literatur:	Höger et al., 1991
X223	Antigen: Herkunft: Verdünnungen:	<i>Xenopus laevis</i> Lamin LII Maus, monoklonal IF: 1:300 Blot: 1:1000
	Literatur:	Höger et al., 1990
XLAP2β	Antigen: Herkunft: Verdünnungen:	<i>Xenopus laevis</i> LAP2β Meerschweinchen IF: 1:500 Blot: 1:5000
ZLAP2-Serum 2	Antigen: Herkunft: Verdünnungen:	<i>Danio rerio</i> LAP2 Meerschweinchen IF: 1:300 Blot: 1:5000
	Literatur:	Schoft et al., 2002
13d4	Antigen: Herkunft: Verdünnungen:	Ratte LAP2β Maus, monoklonal IF: unverdünnt

414-NPC	Literatur:	Blot: 1:10 Alsheimer et al., 1998
	Antigen:	Nukleoporin
	Herkunft:	Maus, monoklonal
	Verdünnung:	IF: 1:1000 Blot: 1:5000

Sekundäre Antikörper

Ziege IgG anti-Maus IgG gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase
 Ziege IgG anti-Meerschwein IgG gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase
 Ziege IgG anti-Mensch IgG gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase
 Ziege IgG anti-Maus IgG gekoppelt mit Texas Red
 Ziege IgG anti-Meerschwein IgG gekoppelt mit Texas Red
 Ziege IgG anti-Mensch IgG gekoppelt mit Texas Red
 Kaninchen IgG anti-Maus

V.1.8. Bakterienstämme, Phagen und Vektoren

Bakterien: XL 1-Blue (Stratagene)
 SG13009 (Stratagene)
 TG-1 (Stratagene)
 Top 10 One Shot (Invitrogen)
 BL21-codon-plus

Phagen: Uni ZAP-XR cDNA *Xenopus* Ovarbank (Stratagene, Heidelberg)

Vektoren: Bluescript (SK) (Stratagene)
 pCR 2.1-TOPO (Invitrogen)
 pGE 30 (Qiagen)
 pGEX-5X-2 (Pharmacia Biotech)
 pEGFP-N1 (Clontech)
 pEGFP-C3 (Clontech)

V.2. Methoden

V.2.1. Molekularbiologische Methoden

V.2.1.1. Isolierung von cDNA-Klonen aus einer Uni-ZAP cDNA Bibliothek

Eine repräsentative cDNA-Bibliothek sollte Kopien der originalen mRNA-Population in ihrer vollen Länge enthalten. Die von der mRNA codierte Information wird in eine stabile DNA-Doppelhelix (cDNA) überschrieben und in einen selbstreplizierenden Vektor eingebracht, da RNA-Moleküle außergewöhnlich labil und in ihrer natürlichen Form schwer zu amplifizieren sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Uni-ZAP cDNA-Bibliothek aus *Xenopus laevis* Ovar (Stratagene, Heidelberg) gescreent.

V.2.1.1.1. Vorbereitung und Infektion der Bakterien

Die eingesetzten Phagen benutzen als Anheftungsrezeptoren die sogenannten F'-Pili. Deshalb wird als Wirtszelle der *E. coli* Bakterienstamm XL 1-Blue (Stratagene) verwendet. Dieser Stamm enthält das F'-Episom, auf dem sich das zur Ausbildung der Pili benötigte Gen befindet. Die Expression dieses spezifischen Gens (λ MB) wird durch Maltose induziert (Sambrook et al., 1989). Zur Gewinnung der Bakterien wird eine Übernachtskultur (50 ml LB-Medium mit 10 mM MgSO_4 und 0,2 % Maltose) des XL1-Blue Bakterienstammes angelegt und bei 37°C inkubiert. Die Bakterien werden 10 min bei 1000 g sedimentiert und in 25 ml 10 mM MgSO_4 (in H_2O) resuspendiert. Die Lagerung erfolgt höchstens 2 Wochen bei 4°C.

Da die Maltose nicht autoklaviert werden kann, wird sie aus einer steril filtrierten 20 % Stammlösung nach dem Autoklavieren des Mediums zugegeben.

Um die Bakterien zu infizieren, werden 100 μl der vorbereiteten Wirtszellen mit der geeigneten Anzahl an PFUs (plaque-forming-units) in einem sterilen Röhrchen gemischt und 30 min lang bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend werden die Ansätze mit ca. 7 ml geschmolzenem Top-Agar (abgekühlt auf ca. 45°C) gemischt und auf vorher erwärmten NZY-Agarplatten der Größe \varnothing 150 mm x 15 mm ausplattiert. Nachdem sich der Agar verfestigt hat, werden die Bakterien bei 37°C über Nacht inkubiert.

V.2.1.1.2. Bestimmung des Phagentiters, Ausplattierung der Genbibliothek und Transfer der Phagen auf Nylonfilter

Da der Phagentiter bzw. die Transfektionsrate in *E. coli* im Laufe der Zeit abnehmen kann, ist es nötig, vor Versuchsbeginn den aktuellen Phagentiter zu bestimmen. Dazu wird eine

Stammlösung hergestellt und von dieser eine Verdünnungsreihe gemacht, die anschließend ausplattiert wird. Die entstandenen Plaques werden ausgezählt und mit Hilfe des Verdünnungsfaktors der Phagentiter der Stammlösung berechnet.

Beim Ausplattieren der Genbibliothek ist darauf zu achten, dass die Zahl der eingesetzten Phagen höher ist als die Komplexität der jeweiligen Bibliothek. Geht man von 100.000 verschiedenen Genen bei höheren Wirbeltieren aus, so können deren Transkriptionsprodukte theoretisch in 10^5 Phagen jeweils einmal vorhanden sein. Diese Rechnung würde aber nicht berücksichtigen, dass mRNAs in unterschiedlicher Kopienzahl auftreten können. Die Tatsache, dass gewisse mRNAs in sehr hoher Kopienzahl vorliegen, kann dafür verantwortlich sein, dass die cDNA einer seltenen mRNA bei zu niedriger Phagenzahl nicht mit ausplattiert wird. Aus diesem Grund werden insgesamt ca. 10^6 Phagen ausplattiert. Bei einer Phagendichte von 4×10^4 Plaques pro Platte werden folglich 25 Platten benötigt. Ausplattiert wird wie unter V-.2.1.1.4 beschrieben.

Der Abklatsch der Phagen erfolgt auf eine ungeladene Nylonmembran (Qiagen). Bevor die Membran aufgelegt werden kann, müssen die Platten mindestens 1 h bei 4°C gelagert werden, um zu verhindern, dass sich der Top-Agar beim Abklatsch mit ablöst. Die Nylonmembranen werden trocken für 1-2 min (beim ersten Abklatsch, bei allen weiteren 4-5 min) auf die Agarplatte gelegt und mit Hilfe von Tinte und einer sterilen Injektionskanüle durch einige asymmetrische Einstiche in ihrer Position markiert. Die Einstichstellen werden, wenn nötig, auf dem Boden der Agarplatte mit Filzstift nachgezeichnet. Durch diese Art der Markierung kann ein später detektierter Plaque sehr einfach auf den Platten relokalisiert werden, indem der Röntgenfilm bei Beleuchtung von unten unter die Agarplatte gelegt wird. Der durchscheinende Hybridisierungsfleck gibt die Stelle der positiven Plaques an. Zur Denaturierung der transferierten DNA wird die Membran mit einer Pinzette mit der „Plaquesseite“ nach oben für 15 min auf ein Blatt mit basischem Denaturierungspuffer getränktes Whatmanpapier gelegt. Der Puffer wird kurz abgetropft und die Membran für weitere 15 min auf zwei Blatt mit Neutralisierungspuffer getränktes Whatmanpapier gelegt. Der Puffer wird anschließend abgetropft und die Membran für 10 min auf zwei Blatt mit Äquilibrierungspuffer getränktes Whatmanpapier gelegt. Danach wird die DNA durch UV-Licht mit Hilfe des Stratalinkers (Stratagen) auf der Membran fixiert.

Lösungen:	Denaturierungspuffer	0,5 N NaOH 1,5 M NaCl
	Neutralisierungspuffer	0,5 M Tris / HCl pH 8,0 1,5 M NaCl
	Äquilibrierungspuffer (2 x SSC)	0,3 M NaCl 0,03 M Natriumcitrat

V.2.1.1.3. Radioaktive Markierung von DNA-Molekülen mit Hexanukleotiden als Primer („Random Prime“)

Alle Arbeiten mit Radionukleotiden müssen in einem geeigneten Isotopenlabor durchgeführt werden. Die „random priming“ DNA-Markierungsmethode gestattet eine wirksame Markierung von sowohl kleinen (10 ng) als auch großen (bis zu 3 µg) DNA-Mengen. Die Template-DNA muss vor der „random priming“ - Markierung linearisiert und hitzedenaturiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Markierung der DNA Labelling Kit, Ver. 1.1 von MBI Fermentas (St. Leon Rot) verwendet.

Durchführung:

In einem Eppendorfgefäß werden 100 ng Template DNA, 10 µl 5 x „random priming“ Reaktionspuffer gemischt und mit H₂O auf 41 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird 10 min lang auf 97°C erhitzt und schnell auf Eis abgekühlt. Dann werden 3 µl Mix C und 50 µCi [α-³²P]-dCTP bzw. Mix A und 50 µCi [α-³²P]-dATP und 1 µl Klenow Fragment (3 units) zugegeben. Der Ansatz wird gemischt, kurz zentrifugiert und 50 min lang bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 4 µl nicht radioaktive dNTP zugegeben und der Ansatz erneut für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird mit 1 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 abgestoppt. Die Entfernung nicht eingebauter Nukleotide erfolgt mittels QIAGEN Nukleotide Removal Kit (Qiagen, Düsseldorf).

V.2.1.1.4. Absättigung der Nylonfilter, Hybridisierung und Exposition

Um zu verhindern, dass sich die radioaktive Sonde unspezifisch an die Nylonmembran bindet, müssen alle unspezifischen Bindungsstellen auf dieser Membran vor der eigentlichen Hybridisierung abgesättigt werden. Ansonsten könnte sich die Sonde an solchen freien Bindungsstellen anlagern und die Hybridisierung an die komplementäre cDNA wäre nicht detektierbar. Die Membranen werden deshalb vor der Hybridisierung 4 - 6 Stunden im nukleinsäurehaltigen Hybridisierungspuffer unter leichtem Schütteln bei 40°C inkubiert. Danach wird der Puffer ausgetauscht und die frisch aufgekochte [³²P] markierte DNA-Sonde zugegeben. Die Membranen werden so 48 h unter Schütteln inkubiert. Nicht gebundene oder unspezifisch gebundene Sonde wird dann durch fünf Waschschrte von je 10 min bei 40°C mit 4 x SSC und 0,1 % SDS unter Schütteln entfernt. Die Membranen werden feucht in Haushaltsfolie eingeschlagen und bei -70°C mit einem X-OMAT AR-Röntgenfilm (Kodak, Stuttgart) für 5 Tage exponiert.

Lösungen: Hybridisierungsmix: 5 x Denhardts
 50 mM Tris / HCl pH 7,6
 1 % SDS
 5 x SSC

	35 % Formamid
	10 mg/ml Kalbsthymus - DNA in H ₂ O
50 x Denhards:	1 g Ficoll 400
	1 g Polyvinylpyrrolidon
	1 g BSA
	mit H ₂ O auf 100 ml auffüllen

V.2.1.1.5. Test radioaktiver Sonden im Slotblot

Um die Qualität der Sonde zu überprüfen, kann man eine Verdünnungsreihe der Template-DNA, die für die Herstellung der radioaktiv markierten DNA eingesetzt wurde, auf einen definierten Bereich einer Nylonmembran auftragen. Dies geschieht mit Hilfe einer Slotblotapparatur. Auf dieser Membran sollte die Sonde nach Inkubation in jedem Fall reagieren. Als Kontrolle sollte ferner in separaten Bereichen nichtkomplementäre DNA aufgetragen werden.

Durchführung:

Die entsprechenden DNA-Mengen (im ng Bereich) werden in 400 µl 6 x SSC-Puffer (H₂O und 20 x SSC; 7:3 verdünnt) aufgenommen und vor dem Auftragen 10 min lang auf 97°C erhitzt und kurz (5 sec) zentrifugiert. Parallel dazu wird ein passend zugeschnittenes Whatmanpapier und eine Nylonmembran gleicher Größe 10 min lang mit 6 x SSC-Puffer getränkt und in die Slotblot Apparatur eingesetzt. Diese wird an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen. In jede Öffnung werden zunächst 500 µl 6 x SSC und anschließend die DNA-Lösung gegeben. Die sich auf der Nylonmembran befindende DNA wird daraufhin, wie unter V.2.1.1.2. beschrieben, denaturiert, neutralisiert und fixiert.

V.2.1.1.6. Auswertung der Autoradiogramme und Plaque-Isolierung

Aufgrund der asymmetrischen Markierungen auf den Membranen können positive Signale auf den Autoradiogrammen ihren entsprechenden Regionen auf den Agarplatten zugeordnet werden. Die durch die Tinte verursachten Markierungen auf den Membranen werden auf den Autoradiogrammen nachgezeichnet und diese dann mit den entsprechenden Markierungen auf den Platten zur Deckung gebracht. Der entsprechende positive Bereich des Agars wird mit einer aufgeschnittenen sterilen blauen Pipettenspitze ausgestochen und in 990 µl SM-Puffer + 10 µl Chloroform übertragen. Die ausgestochenen Agarstücke mit den Phagen werden 8 h bei 4°C geschwenkt. Danach werden 6 µl dieser Phagensuspension in einer 1:1000 Verdünnung in SM-Puffer für die Ausplattierung der zweiten Runde eingesetzt. Bei diesem Richtwert sollte man in der zweiten Runde pro Platte zwischen 500-2000 Phagenplaques erhalten. Von diesen Platten werden erneut Filter gezogen und wie oben

beschrieben weiterbehandelt. Wenngleich positive Signale nach dieser Runde manchmal schon Einzelplaques zuzuordnen sind, schließt sich üblicherweise dennoch eine dritte Ausplattierungsrunde an. Bei Beibehaltung der oben genannten Verdünnung erhält man jetzt ca. 50 Plaques. Wird nach der zweiten Runde ein einzelner positiver Plaque gestochen, so sollte in der dritte Runde jeder Plaque einem positiven Signal entsprechen.

Die isolierten Plaques werden in 500 µl SM-Puffer + 10 µl Chloroform aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

SM-Puffer: 100 mM NaCl
 10 mM MgSO₄ · 7 H₂O
 50 mM Tris HCl; pH 7,5
 0,01 % Gelatine

V.2.1.2. Amplifikation und Umklonierung des rekombinanten cDNA

Fragments aus den Phagen in Plasmidvektoren

Da die isolierte cDNA im Phagengenom schwer handhabbar ist, ist es nötig, sie mit Hilfe der in vivo Excision in einen Plasmidvektor umzuklonieren.

Phagenamplifikation

Um eine in vivo Excision durchzuführen, muss der entsprechende Klon amplifiziert werden. Hierzu werden 200 µl XL 1-Blue Bakterien mit 10⁶ PFUs des positiven Klons infiziert und ausplattiert. Die Agarplatte wird bei 37°C über Nacht inkubiert und anschließend mit 10 ml SM-Puffer überschichtet. Die so gewonnene Phagensuspension wird in ein geeignetes steriles Gefäß überführt, die Platte nochmals mit 2 ml SM-Puffer abgespült und der Titer bestimmt.

In vivo Excision

Für eine in vivo Excision wurde folgender Ansatz vorbereitet:

200 µl XL 1-Blue Bakterien	(OD ₆₀₀ = 1,0)
200 µl Phagenlösung	(>1 x 10 ⁵ PFUs)
1 µl Helferphagen (R408)	(>1 x 10 ⁶ PFUs / ml)

Nach 30 min bei 37°C werden 5 ml 2 x YT Medium zugegeben und der Ansatz 3 h unter leichtem Schütteln ebenfalls bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Bakterien durch 20-minütiges Erhitzen auf 70°C abgetötet, 5 min lang bei 4000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. 200 µl des so gewonnenen pB1 Phagemids werden dann zusammen mit frisch angesetzten XL1-Blue Zellen (200 µl) 30 min bei 37°C inkubiert, um die Infektion zu ermöglichen. Danach werden 100 µl dieses Gemisches auf Ampicillin behandelte LB-Platten ausplattiert. Um Einzelklone zu erhalten wird zusätzlich eine 1:1000 Verdünnung des Ansatzes ausplattiert. Die Kolonien, die sich nach einer Inkubationszeit von mindestens 36 h bei 37°C zeigen, sollten nun das Plasmid Bluescript zusammen mit einem klonierten Insert enthalten. Dieses wird durch Plasmidisolierung und Restriktionsanalyse der Klone überprüft. Als Negativ-Kontrolle wird mit einem Parallelansatz in genau der gleichen Weise verfahren, wobei jedoch kein „positiver“ Phagenklon eingesetzt wird. Hierdurch kann eine Verunreinigung der Helferphagen oder der eingesetzten Bakterien ausgeschlossen werden.

2 x YT: 1 g Hefeextrakt
 1 g NaCl
 1,6 g Bacto -Tryptone
 mit H₂O auf 100 ml auffüllen

V.2.1.3. DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al., 1977) beruht auf dem Prinzip, dass die DNA-Polymerase I unter geeigneten Bedingungen anstelle natürlicher Desoxynukleotide 2',3'-Didesoxynukleotide in einen zu synthetisierenden DNA-Strang einbaut. Diese veränderten Nukleotide blockieren jedoch die weitere Verlängerung des DNA-Fragments, da das 3'-Hydroxylende, mit dem die Phospho-diesterbindung geknüpft wird, in diesen dNTP-Analoga fehlt. Im hier verwendeten System (Taq Dye deoxyTM Terminator Sequenzing-Kit; Applied Biosystems, Weiterstadt) sind die ddNTPs (A, C, G, T) mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so dass sie spezifisch über ihre Fluoreszenzstrahlung nachgewiesen werden können. Somit werden in einem in vitro Replikationssystem mit dNTPs und markierten ddNTPs einzelsträngige DNA-Stücke unterschiedlicher Länge erzeugt, deren Enden markiert sind. Diese Fragmente werden gelelektrophoretisch aufgetrennt, mittels eines Lasers nachgewiesen und die Signale mit Hilfe eines Computers ausgewertet.

Auswahl der Primer für die Sequenzierung

Die meisten für die Sequenzierung eingesetzten DNA-Fragmente befanden sich im pBluescript bzw. pCR[®]2.1-Topo -Vektor. Zu beiden Seiten der „multiple cloning site“ befinden sich jeweils spezifische Primer-Bindungsstellen. Diese Primer können entweder käuflich erworben werden (MBI, Fermentas) oder sind schon im pCR[®]2.1-Topo-Cloning Kit enthalten.

Primer für pBluescript-Vektor:

T3 Primer: 5'- AATTAACCCTCACTAAAAGGGG-3'

T7 Primer: 5'- GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

Primer für pCR[®]2.1-Topo –Vektor:

M13 Forward(-20): 5'- GTAAAACGACGGCCAG –3'

M13 Reverse: 5'- CAGGAAACAGCTATGAC –3'

Alle anderen Primer, die hier verwendet werden, wurden von Roth (Karlsruhe) speziell angefertigt.

Sequenzierreaktion

In dem Sequenzier-Kit sind bereits alle wesentlichen Komponenten in einer optimalen Zusammensetzung enthalten (dNTPs, markierte ddNTPs, Taq-Polymerase, Mg²⁺-haltiger 10 x PCR Puffer), es müssen lediglich noch die spezifischen Komponenten (DNA, Primer) zugefügt werden.

Reaktionsansatz: 400 ng DNA
 3 µl Reaktionslösung
 100 nM spezifischer Primer
 mit ddH₂O auf 10 µl auffüllen

Dieses Gemisch wird in einen Thermocycler gestellt und durchläuft 25 der unten dargestellten Zyklen:

1. Schritt	Denaturierung der DNA	30 sec bei 96°C
2. Schritt	Primer Annealing	15 sec bei 50°C
3. Schritt	Elongation	4 min bei 60°C

Am Ende der Reaktion werden die entstandenen DNA-Fragmente durch Zugabe von 10 % 3 M Natriumacetat, pH 4,9 und 2,5-faches Volumen absoluten Ethanol präzipitiert,

zentrifugiert und dreimal mit 70% Ethanol gewaschen. Bei diesem Schritt werden eventuell noch vorhandene dNTPs und ddNTPs, die bei der Fragmentanalyse stören würden, abgetrennt. Das DNA Sediment wird luftgetrocknet, in 30 µl TSR-Medium aufgenommen, für 3 min auf 95°C erhitzt und anschließend bei 4°C bis zur Sequenzierung im Dunkeln aufbewahrt.

Sequenzauswertung

Die Sequenzauswertung erfolgt durch eines von Genetic Computer Group (GCG, Madison, USA) entwickelten Softwarepaketes. Nach Überprüfung der Sequenzen auf Sequenzierfehler und Zusammensetzung der Sequenzfragmente werden diese einer umfangreichen Analyse unterzogen (Ähnlichkeiten zu Sequenzen aus Datenbanken, Sequenzmotive, Translationsprodukte, usw.).

V.2.1.4. DNA Amplifikation mit Hilfe der PCR

Die PCR (polymerase chain reaction) dient zum gezielten Amplifizieren von DNA Fragmenten. Sie basiert auf dem Prinzip, dass zwei spezifische Primer (= Oligonukleotide) in mehreren Zyklen den Bereich eines DNA Moleküls, der zwischen den Primern liegt, stark amplifizieren. Temperaturstabile DNA-Polymerasen (z.B. die Taq-Polymerase, isoliert aus dem Bakterium „*Thermus aquaticus*“) gestatten auf einfache Weise die Durchführung wiederholter DNA-Synthese- und Denaturierungszyklen der neusynthetisierten DNA-Doppelstränge.

Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten:

1. In jedem Reaktionszyklus wird durch kurze Hitzebehandlung die DNA-Doppelhelix denaturiert.
2. Während des Abkühlens hybridisieren die im Überschuss vorliegenden beiden Primer spezifisch mit ihren komplementären Sequenzen der zu amplifizierenden DNA. Diese Primer bilden das 5'-Ende der neu zu synthetisierenden Komplementärstränge.
3. Während der anschließenden Elongationsphase synthetisiert die DNA-Polymerase vom Primer aus den komplementären Strang durch spezifisches Anfügen der Desoxyribonucleosid-Triphosphate.

Nach einem wiederholten Denaturierungsschritt (1) dienen nun die beiden neu synthetisierten Fragmente ihrerseits als Matrize. Durch die Verdoppelung der DNA nach jedem Reaktionsdurchlauf kommt es so zu einer exponentiellen Anreicherung des gewünschten DNA-Fragmentes (2^n). Es werden in der Regel 20-30 Zyklen durchlaufen.

Eine abgewandelte Anwendung stellt die bereits vorgestellte Sequenzierreaktion dar, in der nur ein Primer verwendet wird und somit einzelsträngige DNA-Moleküle erzeugt werden.

Auswahl der PCR – Primer

Bei der Auswahl der Primer sind folgende Dinge zu beachten:

Die Schmelztemperatur sollte für beide Primer ähnlich sein und möglichst über 50°C liegen. Eine zu niedrige Schmelztemperatur kann zu unspezifischer Bindung der Primer und somit zu unspezifischen PCR - Produkten führen. Für die Berechnung der Schmelztemperatur gilt folgende Regel:

$$T_M = 4 \times \sum GC + 2 \times \sum AT - 5$$

Ferner ist darauf zu achten, dass die Primer möglichst nicht mit sich selbst hybridisieren können, da sich diese dann während der PCR Reaktion selbst amplifizieren würden.

Um das Einklonieren in einen spezifischen Vektor zu ermöglichen, werden die Primer so gewählt, dass das entstehende PCR-Produkt an beiden Seiten geeignete Schnittstellen für spezifische Restriktionsenzyme aufweist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Sequenzen des XLAP2 β , RLAP2 β , ZLAP2 β , ZLAP2 γ und ZLAP2 ω amplifiziert und über den pCR[®]2.1-Topo –Vektor in verschiedene Expressionsvektoren inkloniert. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind im Anhang aufgelistet.

Amplifikationsreaktion

Da die Reaktion für jede Template-DNA und jeden verwendeten Primer unterschiedlich ist, müssen die Reaktionsbedingungen für jeden Versuchsansatz optimiert werden (Mg²⁺-Konzentration, Annealing-Temperatur, Zeiten der einzelnen Reaktionsschritte). Im Rahmen dieser Arbeit wurde folgendes Protokoll verwendet:

1 μ l	Primer I (100 pmol/ μ l)
1 μ l	Primer II (100 pmol/ μ l)
1 μ l	dNTP (10 mM)
1 μ l	DNA (Plasmid 0,1 μ g/ μ l)
5 μ l	10 x Puffer ohne MgCl ₂
3 μ l	MgCl ₂ (25 mM)
37 μ l	ddH ₂ O
1 μ l	Taq-Polymerase (5U/ μ l) bzw. High Fidelity Polymerase (3,5U/ μ l)

50 µl

Die Reaktionslösung wird gut gemischt und in ein PCR-Gerät gegeben (Progene-Thermocycler, Thermodux, Wertheim).

Die Lösungen werden mit der Taq-Polymerase mitgeliefert und daher hier nicht getrennt aufgeführt.

Folgendes Amplifikationsprogramm wird durchlaufen:

96°C - 2 min	(Denaturierung)	
96°C - 45 sec	(Denaturierung)	} 25 Zyklen
≥50°C - 45 sec	(Annealing)	
72°C - ±1 min	(Elongation)	
72°C - 10 min	(verlängerte Elongation)	

Nach Beendigung der PCR wird die DNA in Probenpuffer aufgenommen und über ein präparatives Gel gereinigt.

V.2.1.5. DNA-Amplifikation mit Hilfe der RT-PCR

Bei der RT-PCR (= Reverse Transkriptase-PCR) geht der eigentlichen PCR-Reaktion eine Reaktion voraus, die RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (deshalb: RT-PCR) in einzelsträngige cDNA transkribiert. Das Ausgangsprodukt ist somit keine dsDNA, wie bei der einfachen PCR, sondern gesamt RNA, (polyA)⁺mRNA oder spezifische RNA. Das für die erste Reaktion zuständige Enzym „Reverse Transkriptase“ wird aus einem E.Coli-Stamm gewonnen, der das Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV) Reverse Transkriptase überproduzierende Plasmid trägt. Dieses Enzym stellt in der sog. Erststrangsynthese mit Hilfe eines Oligo(dT)₁₈-Primers, der an das 3'-Poly-A-Ende der mRNA bindet, bzw. eines spezifischen Primers, einzelsträngige cDNA her, die dann zur Amplifizierung eines bestimmten DNA-Abschnittes (PCR), als Hybridisierungs-sonde oder zur Herstellung einer cDNA-Bibliothek verwendet werden kann.

Extraktion von RNA

Die Extraktion von RNA aus Kulturzellen und Gewebe erfolgt über die optimierte Guanidinisothiocyanat / Phenol-Methode, die bei peqGOLD TriFast™ als gebrauchsfertiges Reagenz in einphasiger Lösung vorliegt. Die Methode basiert auf einer Einschnitt-Flüssigphasen-Separation. Mit ihrer Hilfe erhält man nicht-degradierte RNAs sowohl aus kleinen als auch aus großen Probenmengen, die frei von DNA und Proteinen ist. Das Verfahren besteht aus folgenden Schritten:

1. Homogenisieren: 1,0 ml peqGOLD TriFast™ + 50 – 100 mg Probe (= 3,5 ml Zellkulturschale)
2. Phasentrennung: Homogenat + 0,2 ml Chloroform
3. RNA-Präzipitation: wässrige Phase + 0,5 ml Isopropanol
4. Waschen der RNA: 1 ml 75%-iges Ethanol
5. Lösen der RNA: in DEPC-H₂O + 40U RNase-Inhibitor

Die so gewonnene RNA kann für Verfahren wie cDNA-Synthesen, RT-PCR-Reaktionen, Northern-Analysen, Dot-Blot-Hybridisierungen, Poly(A)⁺-Selektionen, in-vitro-Translationen, Klonierungen und RNase-Assays weiterverwendet werden.

cDNA-Synthese (= Erststrangsynthese)

Die Komponenten der Erststrang-cDNA-Synthese werden (auf Eis) in einem sterilen Eppendorfgefäß zusammengefügt.

- Reaktionsansatz: 1 – 5 µg gesamt RNA
 0,5 µg Oligo(dT)₁₈-Primer (500 µg/ml; Promega)
 bzw. 15 – 20 pmol sequenzspezifischer Primer
 mit ddH₂O auf 12 µl auffüllen

Die Komponenten werden vorsichtig gemischt und für 10 min bei 70°C erhitzt und danach auf Eis abgekühlt. Folgende Komponenten werden nun hinzugefügt:

- 4,0 µl 5x First-Strand-Reaktionspuffer
- 2,0 µl 4 dNTP-Mix (10mM)
- 1 µl Ribonuklease-Inhibitor (40 U; MBI, Fermentas)

Der Ansatz wird für 5 min bei 37°C inkubiert, danach erfolgt die Zugabe von

- 1,0 µl M-MuLV-Reverse Transkriptase (20 U/µl)

und eine weitere Inkubation für 60 min bei 37°C. Durch 10-minütiges Erhitzen auf 70°C wird die Reaktion gestoppt. Der Ansatz wird zur direkten Weiterverwendung auf Eis gestellt oder bei -20°C gelagert und kann jetzt weiter verwendet werden. In dieser Arbeit wurde die so gewonnene cDNA zur Amplifizierung eines bestimmten DNA-Abschnittes (PCR) verwendet

PCR

Diese Reaktion erfolgt mit 2 spezifischen Primern als Starttemplates. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer zur Amplifizierung verschiedener XLAP2-DNA-Segmente sind im Anhang aufgelistet.

Analyse im Agarosegel

Das PCR-Produkt wird, wie unten beschrieben, auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch nach Größe aufgetrennt. Die aus dem Gel extrahierte DNA wird in den TOPO-Vektor inkloniert und sequenziert.

V.2.1.6. Präparation von Plasmid DNA

Das Prinzip der Plasmidisolierung basiert auf der Lyse der Bakterien in alkalischem Medium und der nachfolgenden Trennung der DNA von den übrigen Zellbestandteilen durch Adsorption der DNA an einer Kieselgelmembran unter hohen Salzbedingungen.

Die Isolation erfolgt im Wesentlichen in 3 Schritten:

Abzentrifugieren der Bakterien und Resuspension; Lyse der Bakterien; Separation der gelösten DNA von den anderen Zellbestandteilen durch Zentrifugation

Adsorption der DNA an die Kieselgelmembran

Waschen und Eluieren der Plasmid-DNA

Bei der Präparation der Plasmid-DNA wird im Rahmen dieser Arbeit die säulen-chromatographische Methode von Qiagen bzw. PeqLab angewendet. Die im Handbuch der Firma Qiagen, Düsseldorf (deutsche Niederlassung von Qiagen Inc., USA) bzw. PeqLab beschriebenen Protokolle wurden nicht abgeändert und werden an dieser Stelle nicht weiter erläutert.

Die ALDI-Methode (Alkaline Lysis DNA Isolation) dient ebenfalls der Isolation von Plasmid-Vektoren aus Bakterienzellen durch alkalische Lyse mittels SDS/NaOH. Der Unterschied zur QIAGEN- und PeqLab-Methode besteht lediglich darin, dass deren Durchführung keine gekaufte Membran zum Binden der DNA benötigt. Die Plasmid-DNA wird stattdessen direkt aus dem Reaktionsansatz gefällt. Alle benötigten Puffer können selbst hergestellt werden. Die ALDI-Methode wird im Rahmen der Arbeit bevorzugt verwendet, wenn nach einer Ligation eine große Menge an unterschiedlichen Klonen getestet werden muss.

Durchführung:

Ausgangsvolumen

2 ml Übernachtkultur mit Antibiotikum

Zentrifugation	30 sec, 10.000 g (Eppendorf)
Resuspension des Zellsediments	100 µl Lösung 1 (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, pH 8,0; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0), Vortexen
Lyse	200 µl Lösung 2 (0,2N NaOH, 1 % SDS), vorsichtiges Mischen
Neutralisation	150 µl Lösung 3 (60 ml 5M KAc, 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml ddH ₂ O), vorsichtiges Mischen
Zentrifugation	30 sec, 10.000 g

Der Überstand (DNA) wird in ein frisches Eppendorf-Gefäß und die DNA anschließend mit eiskalten 100 % Ethanol gefällt. Nach Trocknung des Sediments und Resuspendierung in 25 – 30 µl ddH₂O befindet sich die isolierte Plasmid-DNA nun gelöst in sterilem Wasser und kann nach Erhitzen bei 65°C für 10 min. zur Inaktivierung restlicher DNasen für einen Restriktionsverdau weiterverwendet werden.

V.2.1.7. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA

Die Mengenbestimmung ist nötig, wenn z.B. nach Isolierung von Nukleinsäuren eine bestimmte Konzentration eingesetzt werden soll z.B. zur Herstellung radioaktiv markierter Sonden, zur PCR, zum Sequenzieren usw.. Es stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung, die photometrische- und die gelelektrophoretische Konzentrationsbestimmung. Die photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA ist nur sinnvoll, wenn diese nicht durch RNA oder andere DNA, z.B. Vektor DNA verunreinigt ist.

Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Nukleinsäuren haben ein Absorptionsmaximum im ultravioletten Bereich bei 260nm (Proteine bei 280nm). Hierbei entspricht ein OD₂₆₀ Wert von 1,0 in etwa folgenden Nukleinsäuremengen:

- 50 µg/ml für doppelsträngige DNA
- 40 µg/ml für einzelsträngige DNA oder RNA
- 20 µg/ml für Oligonukleotide

Bei der Messung verdünnt man eine wässrige DNA-bzw.RNA-Lösung normalerweise 1:100 bis 1:50. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades misst man ferner die Absorption bei 280nm und bildet den Quotienten aus OD_{260} und OD_{280} . Dieser Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Falls das Ergebnis einen Wert kleiner als 1,8 hat, sollte gegebenenfalls nochmals eine Reinigung der Nukleinsäuren vorgenommen werden.

Gelelektrophoretische Konzentrationsbestimmung

Bei dieser Methode wird die DNA-Menge lediglich geschätzt. Das DNA-Fragment wird parallel zu einem DNA-Fragment bekannter Menge (Hier: 100 ng linearisierter Bluescript Vektor) im Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Intensität der jeweiligen Banden kann dann unter UV-Licht verglichen werden.

V.2.1.8. Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese macht von der Eigenschaft geladener Substanzen Gebrauch, in einem elektrischen Feld zum ihrer Ladung entgegengesetzten Pol zu wandern. Größenunterschiede zwischen DNA-Molekülen sind leicht feststellbar, da man ihre Restriktionsfragmente durch Gelelektrophorese trennen und sichtbar machen kann. Die Agarose fungiert hierbei als „Molekularsieb“, indem sie, je nach Konzentration, in einem Gel eine gewisse Porengröße erzeugt. Bei DNA-Fragmenten im Bereich von 0,5 -7 kb wird normalerweise ein 1% Gel verwendet.

Wird ein elektrischer Strom durch das Gel geschickt, wandert jedes negativ geladene DNA-Fragment in Richtung der Anode, mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus seines Molargewichts ist. (Einheit: 1 kb → Längeneinheit, die 1000 Basen(paare) eines einzel(doppel)strängigen Nucleinsäuremoleküls entspricht; 1 Kb \approx 0,34 μ m Länge und einer Masse von ca.660 Kd). Um die DNA sichtbar zu machen, wird dem Gel Ethidiumbromid zugesetzt, das nach seiner Bindung an die DNA intensiv unter UV-Licht fluoresziert.

Agarosegel 1 %: 0,4 g Agarose
 40 ml 1xTE-Puffer
 1 μ l Ethidiumbromid

Das Agarose-Puffergemisch wird aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Nach Abkühlung der Agarose wird Ethidiumbromid hinzugefügt und die Flüssigkeit in den vorbereiteten Gelschritten gegossen. Nach 15-30 min ist das Gel fest und kann in der

Gelkammer mit den vorbereiteten Proben beladen werden. Die Gelelektrophorese erfolgt ca. 1 h bei 100 Volt.

Referenz DNA

Um die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente abschätzen zu können, wird auf einer separaten Spur ein Größenstandard aufgetragen. In der Regel handelte es sich dabei um λ -DNA, die mit den Restriktionsenzymen EcoRI / HindIII verdaut wurde, dabei entsprechen die Fragmente folgenden Größen:

λ - DNA EcoRI und Hind III geschnitten	
21226	bp
5148 / 4973	bp
4277	bp
3530	bp
2027 / 1904	bp
1584	bp
1330	bp
983	bp
831	bp
564	bp
125	bp

V.2.1.9. Elution von DNA Molekülen aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wird mit dem „Qiaquick Gel Extraktions Kit“ durchgeführt. Dazu wird die DNA mit einem sauberen Skalpell nach der gelelektrophoretischen Auftrennung aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die DNA wird in diesem Verfahren zunächst aus dem Gel gelöst und an eine Kieselgel-Membran gebunden. Da die Adsorption stark pH abhängig ist, enthält der Puffer QG eine hohe Salzkonzentration und einen pH-Wert $\leq 7,5$, um eine effiziente Adsorption (95%) der DNA an die Membran zu erreichen.

Nachdem die DNA an die Membran gebunden hat, werden in einem Waschschriff mit dem Ethanolhaltigen Puffer PE unerwünschte Primer und Verunreinigungen wie Salze, Enzyme, ungebundene Nukleotide, Agarose, Ethidiumbromid und andere Detergenzien ausgewaschen, da diese nicht an die Kieselgelmembran binden und nach der Zentrifugation durch die Säule laufen und verworfen werden können.

Nach dieser Reinigung kann die DNA aus der Säule eluiert werden. Da die Effizienz wie die Adsorption stark salzkonzentrations- und pH-abhängig ist, enthält der Elutionspuffer EB, im Gegensatz zur Adsorption, eine niedrige Salzkonzentration und einen basischen pH-Wert (pH 8,5). Die Elution erfolgt mit EB-Puffer oder Wasser.

Die detaillierte Durchführung entspricht dem zum Kit gehörigen Protokoll und wird hier nicht näher erläutert. Sämtliche benötigten Lösungen und Materialien sind im Lieferumfang enthalten.

V.2.1.10. DNA-Modifizierung durch Enzyme

V.2.1.10.1. Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische, meist um die sechs Basenpaare lange Sequenzen in einem doppelsträngigen DNA-Molekül. Die biologische Aufgabe der aus Prokaryoten isolierten Restriktionsenzyme besteht im Abbau fremder DNA-Moleküle. Die zelleigene DNA wird nicht abgebaut, da die jeweiligen Erkennungsstellen durch Methylierung vor den Restriktionsenzymen geschützt sind.

Während eine Gruppe von Restriktionsendonukleasen die DNA außerhalb von dieser Erkennungssequenz schneidet, findet bei einer anderen Gruppe dieser Enzymklasse das Schneiden der DNA in genau dieser Erkennungssequenz statt. Letztere werden bei in-vitro-Rekombinationen eingesetzt. Viele Restriktionsenzyme erkennen spezifische Sequenzen von 4-8 Basenpaaren und spalten in dieser Region in jedem Strang eine Phosphodiesterbindung. Eine Eigenschaft der meisten dieser Schnittstellen ist die zweifache Rotationssymmetrie (erkannte Sequenzen: Palindrome). Beim Schneiden der DNA entstehen abhängig vom jeweiligen Enzym entweder stumpfe Enden („blunt ends“), d.h. die Schnittstellen liegen in beiden Strängen der DNA an der gleichen Stelle oder aber man erhält überstehende, einzelsträngige Enden („sticky ends“), die ein bis fünf Nukleotide lang und zueinander komplementär sind.

Die für die einzelnen Restriktionsenzyme zu wählenden Puffer- und Temperaturbedingungen können sich voneinander unterscheiden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Enzyme und Puffersysteme von MBI Fermentas (St. Leon Roth) verwendet. Die jeweils einzusetzenden Puffer sowie die entsprechende Restriktions- sowie Denaturierungstemperatur werden in diesem System angegeben. Bei einem Doppolverdau der DNA ist zu berücksichtigen, dass sich die Restriktionsbedingungen für die beiden gewählten Enzyme unterscheiden können. In einem solchen Fall ist zuerst die Restriktion mit einem der beiden Enzyme durchzuführen. Ein kleines Aliquot der DNA wird daraufhin gelelektrophoretisch aufgetrennt, um die Vollständigkeit der Restriktion zu kontrollieren. Das Enzym wird dann durch dem Enzym entsprechenden Erhitzen inaktiviert, mit 3M NaAc, pH 4,9 und Ethanol gefällt, um so die

Salze zu entfernen, und anschließend mit dem zweiten Enzym verdaut. Im Rahmen dieser Arbeit wurde entweder ein Doppelverdau mit 2 verschiedenen Enzymen durchgeführt oder der zweite Verdau der Fällung der ersten Reaktion angeschlossen. Bei der Restriktion werden in der Regel 0,2 - 0,5 µg DNA für analytische Untersuchungen, bzw. 0,5 – 5 µg DNA für präparative Arbeiten eingesetzt. Die Enzyme werden dabei in Konzentrationen von 4 Einheiten (units) pro µg DNA eingesetzt. Bei der für das jeweilige Restriktionsenzym optimalen Temperatur schneidet dabei 1 Einheit des Enzyms in einer Stunde 1 µg DNA. Das Enzym wird also in einem 4 - 6 fachen Überschuss zugegeben, bei einer Inkubationsdauer von 1 - 2 h.

Durchführung:

2- 5 µg DNA
2 µl 10 fach konzentrierter Restriktionspuffer
10 – 20 Einheiten des entsprechenden Restriktionsenzym

mit H₂O auf 20 µl auffüllen

Bei den meisten Enzymen findet die Reaktion bei 37°C statt.

Die erzeugten klebrigen Enden ermöglichen nun die glatte Verbindung von 2 doppelsträngigen DNA-Fragmenten, sofern beide Fragmente mit der gleichen Restriktionsendonuklease erzeugt wurden. Eine andere Gruppe von Restriktionsenzymen schneidet die Doppelhelix vollständig, wodurch stumpfe Enden (Blunt Ends) entstehen.

Bei niedrig konzentrierten Enzymen kann die Restriktion auch über Nacht bei 37°C durchgeführt werden. Bei einigen Enzymen (u.a. BamHI, EcoRI, KpnI) ist die so genannte „Star-Aktivität“ zu berücksichtigen. Unter verschiedenen Bedingungen schneiden diese Enzyme auch an DNA-Sequenzen, die der eigentlichen Erkennungssequenz ähneln, aber nicht mit ihr identisch sind. Dies kann z. B. dann eintreten, wenn der pH des Restriktionsansatzes höher als 8 ist, oder wenn eine zu hohe Konzentration des Enzyms (normalerweise > 100 units/µg DNA) eingesetzt wird. Einen Überblick über die Star-Aktivität findet man z.B. in den Verkaufskatalogen der Firma MBI Fermentas (St Leon-Roth).

V.2.1.10.2. Ligation von DNA-Molekülen

Durch die Methode der Ligation können DNA-Fragmente kovalent verbunden werden, wenn die Fragmente überlappende Enden mit jeweils komplementären Sequenzen, wie sie im

Restriktionsverdau erzeugt wurden, besitzen. So lässt sich ein gewünschtes DNA-Fragment mit einem linearisierten Vektor verbinden, sofern beide mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten wurden.

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor sollte das Verhältnis zwischen der Zahl der eingesetzten Fragmentmoleküle und des linearisierten Vektors mindestens 3:1 betragen.

Ligationsansatz:

x	µl	Fragment-DNA
y	µl	Vektor-DNA
1	µl	DNA-T4-Ligase (1 unit/µl)
2	µl	10 x Ligationspuffer (im Lieferumfang)

mit ddH₂O auf 20 µl auffüllen.

Die Ligation erfolgt für 1-2 h bei Raumtemperatur. Nach anschließender Hitzeinaktivierung bei 65°C für 10 min wird der Ligationsansatz direkt zu den kompetenten Zellen pipettiert und in die Bakterien transformiert (siehe Kapitel „Transformation“).

V.2.1.11. Klonierung

Allgemeine Klonierung in Vektoren

Bei der Klonierung wird ein DNA-Fragment, das ein gewünschtes Gen enthält, in das gereinigte DNA-Genom eines sich selbst replizierenden genetischen Elements, meist ein Plasmid oder Virus, integriert. Ein Virus oder Plasmid, das in dieser Weise eingesetzt wird, bezeichnet man als Klonierungsvektor. Jeder Vektor zeichnet sich durch eine Reihe spezifischer Eigenschaften aus, so dass die Wahl des Vektors von der Anwendung der Klonierung abhängt. Klonierungsvektoren besitzen eine Reihe von spezifischen DNA-Sequenzelementen, die die Klonierung ermöglichen:

- Polylinkerregion (MCS = multiple cloning site) mit verschiedenen Restriktionsschnittstellen, die das Einfügen fremder DNA-Inserts ermöglichen.
- Primerbindungsstellen zur direkten Sequenzanalyse der klonierten DNA-Sequenzen.
- Promoterregionen, die eine Initiation einer RNA-Synthese an definierten Promoterregionen mit spezifischen RNA-Polymerasen gestatten.
- Antibiotikaresistenzgene zur Identifizierung einer erfolgreichen Transformation, bzw. andere

Möglichkeiten zur Identifizierung.

Die Klonierungsvektoren werden zunächst mit einem Restriktionenzym geschnitten, so dass linearisierte DNA Moleküle entstehen. Die zelluläre DNA wird mit dem gleichen Enzym geschnitten und die dabei entstehenden Restriktionsfragmente werden mit den linearisierten Plasmiden gemischt, mit denen sie über ihre komplementären Enden zu rekombinanten DNA-Ringen verschmelzen. Diese rekombinanten Moleküle, in denen die Abschnitte der Fremd-DNA eingebaut sind, werden dann mit dem Enzym DNA-Ligase kovalent ringförmig geschlossen. Die Plasmide werden in kompetente Bakterienzellen eingeschleust, d.h. die Zelle wird mit dem Plasmid transfiziert. Wenn diese Zellen wachsen und sich teilen (Verdopplung der Zellzahl = logarithmisches Wachstum), replizieren sie auch die rekombinanten Plasmide, und es entstehen in riesiger Zahl Kopien der Plasmide.

Um transfizierte Zellen von nicht transfizierten zu unterscheiden, tragen die Vektoren Gene für Antibiotikaresistenzen (z.B. Ampicillin oder Kanamycin). Lässt man die Bakterien in antibiotikahaltigem Medium wachsen, überleben nur die Bakterien, die ein Plasmid aufgenommen haben, da nur die resistent gegen das Antibiotikum sind. Die Kolonien werden mit sterilen Zahnstochern aufgenommen und zu größeren Kulturen herangezüchtet.

TOPO®TA-Klonierung

Das TOPO TA cloning®Kit (Invitrogen, Groningen, Niederlande) bietet die Möglichkeit der direkten Insertion eines Taq-Polymerase-amplifizierten PCR-Produktes in einen Plasmidvektor.

Der Plasmidvektor (pCR®II-TOPO® bzw. pCR®2.1-TOPO®) liegt linearisiert vor, mit einem einzelnen 3'-Thymidin (T)-Überhang und kovalent gebundener Topoisomerase I. Die Taq-Polymerase addiert ein einzelnes Deoxy-Adenosin (A) an die 3'-Enden des PCR-Produktes, wodurch eine effiziente Ligation in den Vektor möglich ist. Die kovalent am Vektor gebundene Topoisomerase I (isoliert aus dem Vaccinia-Virus) bindet im Reaktionsablauf an die Duplex-DNA an spezifischen Regionen und schneidet die Phosphodiesterbindung nach der Basenabfolge: 5'-CCCTT an einem Strang. Die dabei frei werdende Bindungsenergie wird für die kovalente Verknüpfung des 3'-Phosphat des geschnittenen Strangs mit dem Tyrosyl-Überhang (Tyr-274) der Topoisomerase I genutzt. Die Phospho-Tyrosyl-Verknüpfung zwischen DNA und dem Enzym wird darauf durch die 5'-Hydroxy-Gruppe des originalgeschnittenen Strangs angegriffen; dies hat die Umkehrung der Reaktion und die Freisetzung der Topoisomerase I zur Folge (Shuman, 1994).

Da die Vorgehensweise der Klonierung detailliert im beiliegenden Protokoll erläutert wird, werde ich hier nicht weiter darauf eingehen.

V.2.1.12. Herstellung kompetenter E. coli-Zellen

(nach der Methode von Chung, Niemela und Muller, 1989)

Bei kompetenten E. coli-Zellen wird die Bakterienzellwand so verändert, dass die Bakterienzellen unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind, Fremd-DNA aus dem umgebenden Medium aufzunehmen.

LB-Medium und 2 x TSS (20 % PEG 4000, 10 % DMSO, 70 mM MgSO₄ oder MgCl₂) werden im Verhältnis 1:1 gemischt und der pH wird auf 6,5 eingestellt. Diese Lösung wird steril filtriert und in Fraktionen von 5 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert. 100 ml LB-Medium werden mit 2 ml einer Übernachtskultur der XL-1Blue Bakterien angeimpft. Wenn die Bakterien die logarithmische Wachstumsphase erreicht haben (zu messende OD bei 600 nm: 0,3-0,4), wird die Kultur in einem sterilen Zentrifugengefäß bei 2000 rpm (Christ-Zentrifuge) für 10 min sedimentiert. Das Sediment wird in 1/40 Volumen (≈ 2,5 ml) eiskaltem LB/TSS resuspendiert. Die Bakterien können nun in 100 µl Fraktionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt werden. Sie sind nun für mindestens sechs Monate kompetent.

V.2.1.13. Herstellung von Agarplatten

Zur Herstellung von Agarplatten wird LB-Agar (siehe V.1.4.) autoklaviert und in sterile Plastikpetrischalen (Durchmesser: 10 cm) gegossen und zum Trocknen für zwei Tage bei Raumtemperatur belassen, danach bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Bei Bedarf wird der Agarlösung vor dem Gießen der Platten ein Antibiotikum zugegeben (die Agarlösung sollte hierbei auf ca. 50°C abgekühlt sein). Im Rahmen dieser Arbeit wurde Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (25 µg/ml) dazugegeben, je nach Antibiotikaresistenz des jeweiligen Vektors. Sollen die Agarplatten zum „screenen“ verwendet werden, so wird statt LB-Agar NZY-Agar (siehe V.1.4.) verwendet. Hierfür werden auch Petrischalen mit einem Durchmesser von 15 cm verwendet. Diesen Platten wird kein Antibiotikum zugesetzt.

V.2.1.14. Transformation von Bakterien mit Plasmidvektoren und Ausplattierung

Die Aufnahme von Fremd-DNA in ein Bakterium wird als Transformation bezeichnet. Damit die Fremd-DNA bei der Transformation in eine Bakterienzelle nicht abgebaut wird, muss sie ringförmig vorliegen (Plasmid-DNA) und benötigt einen Replikationsstartpunkt, der von der Bakterienzelle erkannt werden kann. Zusätzlich trägt die Plasmid-DNA meistens eine

Antibiotikaresistenz, um eine Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien zu ermöglichen.

Zur Transformation benötigt man kompetente Zellen. In Rahmen dieser Arbeit wurden E. coli Bakterien der Stämme TG1, XL1-Blue, SG13009, ONE-SHOT sowie BL21-codonplus verwendet. Zu einer Suspension von 100 µl kompetenter Zellen werden ca. 50 ng aufgereinigte Plasmid DNA (aus Minipräparation) oder die DNA-Menge eines Ligationsansatzes gegeben. Der Ansatz wird vorsichtig gemischt und 30 min lang auf Eis inkubiert. Nach einem kurzen Hitzeschock von 40 sec bei 41°C werden die Bakterien sedimentiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 100 µl LB Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum (abhängig von den vorhandenen Resistenzfaktoren) resuspendiert. Die Bakterien können auf einer Agarplatte, die wiederum mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt wurde, ausplattiert werden. Dazu wird die Bakterienlösung auf die Agarplatte pipettiert und mit einem abgeflamten Drigalski-Spatel gleichmäßig verteilt. Nach einer Transformation mit einem Ligationsansatz werden die Bakterien vor dem Ausplattieren zuerst noch in 1 ml LB- Medium ohne Antibiotikum resuspendiert und für 30 – 60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation und Aufnahme des Sediments in 100 µl LB-Medium + Antibiotikum erfolgt das Ausplattieren wie beschrieben. Die Agarplatte wird dann mit der Unterseite nach oben über Nacht bei 37°C mit der Bakterien suspension inkubiert. Am nächsten Tag sollten sich deutliche Bakterienkolonien gebildet haben. Einzelkolonien können mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und zum Animpfen von Übernachtkulturen z.B. für Plasmidpräparationen verwendet werden.

V.2.2. Proteinbiochemische Methoden

V.2.2.1. Expression rekombinanter Proteine in E.coli

Mit Hilfe eines bakteriellen Expressionssystems können Proteine in Bakterien synthetisiert und anschließend aufgereinigt werden. Dazu können verschiedene Expressionssysteme verwendet werden. Das Prinzip der Proteinexpression ist aber bei allen ähnlich. Die DNA des zu exprimierenden Proteins wird in die Multiple Cloning Site (MCS) des Expressionsvektors inkloniert. Vor der Klonierungsstelle des Zielgens befindet sich immer ein starker Promoter, der im nicht induzierten Zustand nicht in der Lage ist, vom Zielgen das gewünschte Protein zu exprimieren, da der codierende Genabschnitt unter der Kontrolle eines anderen Promoters steht, welcher durch einen ebenfalls vorhandenen Repressor reprimiert wird. Durch den Transfer des Plasmids in eine Wirtszelle, z.B. Sg13009 oder BL21 kann die Expression des gewünschten Proteins durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-β-D-

thiogalactopyranosid) gestartet werden. Das IPTG inaktiviert den Repressor und der Promoter wird freigegeben; das gewünschte Protein wird exprimiert.

Expression rekombinanter Proteine im pQE-Expressionssystem

Mit Hilfe des pQE-Expressionssystems (QIAGEN, Hilden) können Proteine exprimiert werden, die an ihrem aminoterminalen Ende zusätzlich 6 Histidine besitzen, mit deren Hilfe das exprimierte Protein gereinigt werden kann, d.h. vor der Klonierungsstelle befindet sich ein Startcodon mit einer kurzen, für 6 Histidine codierende, Sequenz. Für die Expression wird ein spezieller Bakterienstamm, SG 13009, verwendet. Dieser besitzt zusätzlich das Plasmid pREP4, das für einen Repressor codiert, der in nicht durch IPTG induzierten Bakterien die Expression reprimiert. Selektioniert wird mit Ampicillin.

Expression rekombinanter Proteine im pGEX-Expressionssystem

Mit Hilfe des pGEX-Expressionssystems (Pharmacia Biotech) können Glutathion S-Transferase (GST)-Fusionsproteine exprimiert werden, die mit Hilfe des GSTs über Affinitätschromatographie gereinigt werden können. Die codierende DNA-Sequenz für das aus *Schistosoma japonicum* gewonnene Protein befindet sich vor der MCS des Vektors, sodass sich die Glutathion S-Transferase am Aminoterminus der inklonierten DNA und des exprimierten Proteins befindet. Alle GST-Fusionsvektoren besitzen einen *tac*-Promotor für die chemisch-induzierte starke Proteinexpression und ein internes *lacI^q* Gen für die Verwendung in *E. coli*-Zellen. Ein *lac*-Repressor, d.h. das Produkt des im Vektor enthaltenen *lacI^q* Gens, bindet an den p_{tac} -Promotor, wodurch die Proteinexpression reprimiert wird. Durch IPTG-Zugabe wird diese Reprimierung aufgehoben und das GST-Fusionsprotein wird exprimiert. Für die Expression wird der Bakterienstamm BL21-codonplus verwendet, der eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerase Gens enthält, wodurch eine höhere Expressionsrate durch zusätzlich vorhandene menschliche tRNAs erfolgt.

Allgemeine Durchführung:

Mit einem sterilen Zahnstocher werden Klone der transformierten Bakterien in eine 50 ml LB-Kultur (+Antibiotikum) übertragen. Die Kultur wird bei 37°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wird eine frische 200 ml Kultur (LB-Medium + Antibiotikum) mit 10–20 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert, bis die Bakterien die logarithmische Wachstumsphase erreicht haben (zu messende OD bei 600 nm: 0,5–0,7). Als nicht induzierte Kontrolle wird 1 ml der Kultur abgenommen, abzentrifugiert und in 40 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Der Bakterienkultur wird nun IPTG (Endkonzentration: 1mM; IPTG-Stammlösung: 1000mM) hinzugefügt. Dieses inaktiviert den Repressor und gibt so den Promoter frei, wodurch die Proteinexpression induziert wird. Die

Bakterien werden erneut für 4-5 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert, danach wieder 1 ml der Kultur abgenommen, abzentrifugiert und in 40 µl Probenpuffer für die SDS-PAGE aufgenommen; Diese Probe stellt die induzierte Kontrolle dar. Um die Proteinexpression zu überprüfen, werden jeweils 10 µl der Kontroll-Probe und der IPTG-induzierten Probe gelelektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE). Die Bakterienkultur wird für 15 min in der LB-70 Ultrazentrifuge bei 5000 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

V.2.2.2. Reinigung des rekombinanten Proteins

Reinigung der rekombinanten Proteine im pQE-Expressionssystem

Die Reinigung des rekombinanten Fusionsproteins erfolgt mit Hilfe des histidinreichen carboxyterminalen Endes (His-Tag) durch Nickel-Chelat Affinitätschromatographie. Durch die aminoterminalen Gruppe von sechs Histidinen wird dem Protein die Bindung an immobilisierte Ni²⁺ Kationen ermöglicht. Diese sind über NTA (Nitrilotriessigsäure), einem Chelatbildner, an das Säulenmaterial, das aus Agarose besteht, gekoppelt. Durch diese Verfahren lässt sich das Fusionsprotein selektiv von den übrigen bakteriellen Proteinen isolieren und durch die nachfolgenden Waschschriffe reinigen. Nach der Reinigung lässt sich das Protein durch Zugabe von Puffern verschiedener pH-Werte eluieren.

Durchführung:

Auf eine Säule wird ca. 2 ml Säulenmaterial (Ni-NTA-Resin; Qiagen) gegeben und mit reichlich Puffer A gewaschen. Es ist darauf zu achten, dass die Säule nicht austrocknet. Das Fusionsprotein befindet sich nach der Expression mit allen übrigen bakteriellen Proteinen im Bakteriensediment. Das Bakteriensediment wird in 20 ml Puffer A resuspendiert und die Suspension bei Raumtemperatur für 1h gerührt. Die Proteine lösen sich während dieser Zeit von den übrigen bakteriellen Bestandteilen, die beim anschließenden Zentrifugieren (15 min; 10.000rpm; 4°C) sedimentiert werden. Der proteinhaltige Überstand wird auf die vorbereitete Nickelsäule aufgetragen. Die bakteriell exprimierten Fusionsproteine binden über ihre Histidine an das Nickelchelate und können so von den übrigen bakteriellen Proteinen isoliert werden. Da der pH-Wert, bei dem das Fusionsprotein eluiert wird, unbekannt ist, werden auf die Säule nacheinander Puffer, deren Zusammensetzung zwar identisch ist, sich jedoch in ihrem pH-Wert unterscheiden, aufgetragen und die eluierten Fraktionen in Eppendorfgefäßen aufgefangen. Die gebundenen Proteine werden folgendermaßen eluiert:

10 ml Puffer B

12 ml Puffer C
20 ml Puffer D
10 ml Puffer E

Die eluierten Fraktionen können bei -20°C aufbewahrt werden. Die Konzentration und Reinheit der Aliquots wird mit Hilfe der SDS-PAGE ermittelt.

Puffer A: 6 M Guanidin Hydrochlorid
0,1 M NaH_2PO_4
0,01 M Tris / NaOH; pH 8,0

Puffer B: 8 M Harnstoff
0,1 M NaH_2PO_4
0,01 M Tris / NaOH; pH 8,0

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

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

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

Puffer F: 6 M Guanidin Hydrochlorid
0,2 M Essigsäure p.A.

Reinigung der rekombinanten Proteine im pGEX-Expressionssystem

Bei diesen rekombinanten Fusionsproteinen erfolgt die Reinigung über Affinitätschromatographie durch direkte Bindung der Glutathion S-Transferase an Glutathion Agarose (Molecular Probes, Leiden, Niederlande). Die anschließende Elution durch 10 mM Glutathion, welches eine höhere Affinität zu der Glutathion Agarose aufweist als das GST-Fusionsprotein, bewirkt eine milde Freisetzung des GST-Fusionsprotein, ohne Beeinträchtigung der Antigenität und Funktion des eluierten Proteins.

Durchführung (batch-Verfahren):

Die Lyse der Bakterien und somit die Freisetzung der Proteine erfolgt mit Hilfe von Ultraschall. Dabei wird das zuvor abzentrifugierte Bakteriensediment in TPE-Lysispuffer (1 % Triton X100, 100 mM EDTA in 1 x PBS; pH 7,5; 50 μl /ml Kulturmedium) resuspendiert und 3 x für je 1min im Ultraschallbad beschallt; zwischen jeder Beschallung werden die Bakterien für 5 min auf Eis gestellt. Die anschließende Zentrifugation erfolgt für 30 min bei 5000rpm und 4°C (Haereaus-Zentrifuge). Der Überstand wird abgenommen, das Sediment nochmals mit TPE-Lysispuffer resuspendiert und die Beschallung und Zentrifugation wiederholt. Die vereinigten Überstände werden nun zu der Glutathion Agarose (50%-ige Suspension in 1 x PBS) gegeben (1ml Überstand / 30 μl 50%-ige Glutathion Agarose) und über Nacht bei 4°C

unter Rotieren inkubiert. Um die Agarose von nicht gebundenen Proteinen zu reinigen, wird der Ansatz für 5 min bei 500 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das sedimentierte Gel insgesamt 3 x mit Waschpuffer (50 mM Tris, 100 mM Na₂EDTA, 0,1 % Tween 20; pH 7,5) gewaschen. Die Elution erfolgt durch Zugabe von Glutathionpuffer (10 mM reduz. Glutathion, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 ml/ ml 50%-ige Suspension). Nach 5 min Inkubation bei 4°C unter Rotieren wird der Überstand nach Zentrifugation (500 g für 5 min) abgenommen, erneut Glutathionpuffer zum Gelsediment dazugegeben und 1 h inkubiert. Insgesamt wird der Elutionsschritt 4 x durchgeführt (Elution 1: 5 min; Elution 2 + 3: je 1 h; Elution 4: 5 min). Die Reinheit und Konzentration der eluierten Proteine wird über SDS-PAGE bestimmt.

V.2.2.3. Proteinfällung

Liegen Proteine in nur geringen Konzentrationen in Lösung vor, sodass sie weder im SDS-PAGE nachgewiesen noch für Immunisierung eingesetzt werden können, werden diese oft durch Fällung konzentriert.

Chloroform-Methanol-Fällung

Zu den Aliquots der zu fällenden Proteine wird das vierfache Volumen Methanol, ein einfaches Volumen Chloroform sowie das dreifache Volumen H₂O gegeben, kräftig geschüttelt und für 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Es bilden sich zwei Phasen, an deren Grenze (Interphase) sich das denaturierte Protein befindet. Die obere Phase wird vorsichtig abgenommen und verworfen. Dem verbliebenen Ansatz, der sich aus der chloroformhaltigen unteren Phase und der proteinhaltigen Interphase zusammensetzt, wird das dreifache Volumen Methanol (bezogen auf die Ausgangslösung) hinzugefügt, wodurch sich das Methanol mit dem Chloroform vermischt und keine Phasengrenzen mehr entstehen. Die Lösung wird für ca. 10 min bei 11.000 g zentrifugiert, wodurch die Proteine sedimentiert werden. Der Überstand wird verworfen, das Sediment luftgetrocknet und je nach weiterer Verfahrensweise (SDS-PAGE; Immunisierung) weiterbearbeitet.

Fällung mit Trichloressigsäure

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

V.2.2.4. Gelelektrophoretische Proteinauftrennung

V.2.2.4.1. Eindimensionale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit dieser Methode werden Proteine in denaturierter Form in einem diskontinuierlichen Gelsystem aufgetrennt. Das SDS-Polyacrylamidgel setzt sich aus dem Sammelgel und dem Trenngel zusammen. Sie unterscheiden sich in ihrer Acrylamidkonzentration und in ihrem pH-Wert. Während im Sammelgel im angelegten elektrischen Feld eine lokale, starke Konzentration der Proteine bewirkt wird, werden die Proteine im sich anschließenden Trenngel gemäß ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgt mit Hilfe des Detergenz SDS, das durch seine eingebrachte sehr stark negative Ladung die Eigenladung der Proteine überdeckt, so dass alle Proteine zum positiven Pol des elektrischen Feldes wandern. Zusätzlich dient das SDS dazu, die Proteine in ihrer gestreckten Konformation zu bewahren, die üblicherweise durch das Aufkochen in Anwesenheit von DDT eingenommen wird.

Vorbereitung der Proben

Die Proben werden in Eppendorfgefäßen in SDS-Probenpuffer (nach Laemmli, 1970) resuspendiert und für 5 min bei 97°C erhitzt, wodurch die Proteine denaturiert werden. Anschließend werden die Proben kurz zentrifugiert, um eventuell noch vorhandene unlösliche Bestandteile zu sedimentieren.

Zusammensetzung der Gele

Die Angaben sind jeweils in ml und ausreichend für fünf Minigele:

Zusammensetzung der Trenngele:

Acrylamidkonzentration	6 %	8 %	10 %	12 %
Lösung A	6,0	8,0	10,0	12,0
Lösung B	7,5	7,5	7,5	7,5
H ₂ O	16,4	14,4	12,4	10,4
TEMED	0,01	0,01	0,01	0,01
10 % APS	0,4	0,4	0,4	0,4

Zusammensetzung des Sammelgels:

Lösung A: 1,3 ml

Lösung B: 2,5 ml

H ₂ O:	6,2	ml
TEMED:	0,01	ml
10 % APS:	0,4	ml

Aufbau der Gelapparatur und Gießen des Gels

Die 2 gründlich gereinigten Glasplatten werden aufeinander gelegt, wobei sie an den beiden seitlichen Rändern durch 2 Abstandshalter getrennt sind. Die Unterseite wird mit Klebeband und frisch aufgekochter 0,5 % Agaroselösung abgedichtet. Nach dem Erstarren werden die Komponenten des Trenngels zusammengefügt, APS zum Schluss zugegeben (löst die Polymerisation aus) und bis zu einer Höhe von ca. 5 cm gegossen. Das Trenngel wird sofort mit H₂O überschichtet, um einer ungleichmäßigen Polymerisation am oberen Rand vorzubeugen. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert ist, wird das H₂O entfernt und ein Kamm mit 12 Taschen in den oberen, leeren Bereich der Glasplatten eingefügt. Mit einer Pipette wird das frisch hergestellte Sammelgel eingefüllt. Nach dessen Polymerisation werden das Klebeband sowie der Kamm vorsichtig entfernt, die Taschen mit Hilfe einer Spritze mit Elektrodenpuffer (=Laufpuffer) ausgespült und das Gelsystem in die Gelkammer eingespannt. Die vorbereiteten Proben werden in die Taschen pipettiert. Durch Anschließen der oberen Kammer an die Kathode, der unteren an die Anode und Anlegen einer konstanten Stromstärke von 20 mA / Gel wird die Elektrophorese gestartet. Nach ca. 1,5 h, wenn die Bromphenolblaubande die Agaroseschicht erreicht hat, wird die Elektrophorese gestoppt und das Gel aus den Glasplatten genommen. Das Sammelgel wird verworfen und das Trenngel entweder mit Coomassie-Blau gefärbt oder für einen Westernblot weiterverwendet.

Referenzproteine

Zur Bestimmung der Molekulargewichte der aufgetragenen Proteine werden in einer Spur Proteine bekannter Masse als Referenzproteine aufgetragen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Referenzproteine verwendet:

Referenzproteine:	Myosine	205 kD
	β-Galactosidase	116 kD
	Phosphorylase b	97 kD
	Albumin, (Rinderserum)	66 kD
	Albumin, (Hühnerei)	45 kD
	Carboanhydrase	29 kD

Coomassiefärbung und Trocknen des Gels

Die Färbung des Gels erfolgt für ca. 20 min unter ständigem Schütteln in der Coomassie-Färbelösung. Danach wird das Gel in der Entfärbelösung, die mehrere Male gewechselt werden muss, entfärbt. Dabei bleibt das Gel so lange in der Entfärbelösung, bis nur noch die Proteinbanden zu sehen sind. Zur Aufbewahrung wird das Gel zwischen Whatman-Papier und Haushaltsfolie auf dem Geltrockner getrocknet.

V.2.2.5. Übertragung von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembranen (Western-Blot)

Bei diesem Verfahren werden die Proteine, die in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Proteine, die durch die SDS-Anlagerung eine stark negative Ladung erhalten haben, wandern durch das Anlegen einer entsprechend gepolten Spannung aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran. Durch dieses Verfahren ist es möglich, mit Hilfe von entsprechenden Antikörpern einzelne, an die Nitrocellulose gebundene Proteine zu identifizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Semitrockenblot verwendet.

Aufbau:

Es werden achtzehn gleich große Blatt Whatmanpapier zurechtgeschnitten, die an den Rändern ca. 1 cm größer sind als das zu blottende Gel selbst. Die Nitrocellulosemembran sollte eine dem Gel entsprechende Größe haben. Auf die Graphitplatte werden neun Blätter Whatmanpapier, die in Puffer drei getränkt wurden, gelegt. Darauf werden das in Puffer drei getränkte Gel und die in Puffer eins getränkte Nitrocellulose gelegt. Damit sich zwischen den einzelnen Lagen keine Luftblasen bilden, wird zwischendurch vorsichtig mit einem Glasstab über den Blotaufbau gerollt. Über die Nitrocellulose werden drei in Puffer eins getränkte sowie sechs in Puffer zwei getränkte Blätter Whatmanpapier gelegt. Zum Schluss wird die obere Graphitplatte aufgelegt und die Apparatur eventuell mit einem Gewicht beschwert, um einen gleichmäßigen Transfer der Proteine zu gewährleisten.

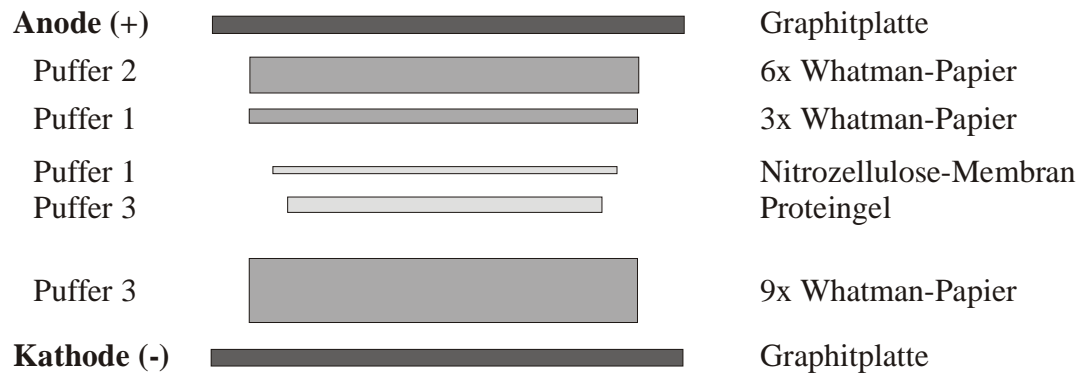


Abb.5-1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Semitrockenblots

Färben der transferierten Proteine mit Ponceau S

Um die Transfereffizienz beurteilen und eventuell vorhandene Störungen (z.B. durch Luftblasen) und Unregelmäßigkeiten im Laufverhalten der Proteine erkennen zu können, werden die Proteine nach dem Transfer mit Ponceau S angefärbt. Die zu erkennenden Referenzbanden werden mit einem Stift nachgezogen, um beim späteren Entwickeln des Blots die ungefähre apparente molekulare Masse des Proteins abschätzen zu können. Die Nitrocellulosemembran wird für ca. 1 min in der Färbelösung geschwenkt und danach mit dH₂O entfärbt. Die Nitrocellulose kann nun für das immunologische Nachweisverfahren weiterverwendet werden.

V.2.2.5.1. Immunologisches Proteinnachweisverfahren durch ECL

Spezifische Antikörper können als biochemische Sonden verwendet werden, um bestimmte Proteine nach ihrer Fraktionierung durch SDS-PAGE zu identifizieren. Diese Methode der „indirekten Immuncytochemie“ ist sehr empfindlich, da der primäre Antikörper in der Regel auch auf der Nitrocellulose immobilisierte Proteine erkennt. Der spezifische primäre Antikörper erkennt bestimmte Epitope des gesuchten Proteins. Der sekundäre Antikörper, der gegen konstante Regionen des primären Antikörpers gerichtet ist, die nicht für die Antigenerkennung verantwortlich sind, ist kovalent mit einem Markermolekül verbunden, das leicht nachweisbar ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sekundäre Antikörper verwendet, die an das Enzym Peroxidase (isoliert aus Meerrettich) gekoppelt wurden.

Um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern, werden die unspezifischen Bindungsstellen vor der Antikörperinkubation abgesättigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierfür eine Lösung aus 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST verwendet. Die Absättigung erfolgt bei 4°C über Nacht. Am darauf folgenden Tag erfolgen die Antikörperinkubationen. Zunächst erfolgt die Inkubation (1h) mit dem spezifischen Primärantikörper (spezifische

Verdünnung in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST) auf dem Schüttler. Um nicht gebundene bzw. schwach unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wird die Nitrocellulose dreimal mit TBST gewaschen. Der an Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper wird ebenfalls 1h lang inkubiert (Verdünnung: 1:10000 in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST). Danach erfolgen wieder drei Waschschriffe mit TBST. Die weiteren Arbeiten erfolgen in der Dunkelkammer bei Rotlicht. Zur Detektion des gebundenen Antikörpers wird das „enhanced chemiluminescence-System“ (ECL) von Amersham verwendet. Die beiden Komponenten des Systems werden in einer frischen 1:1-Lösung zusammengefügt, dies hat eine chemische Reaktion der Substanz „Luminol“ mit der Substanz „Perhydrol“ zur Folge, die durch das anwesende Enzym Peroxidase katalysiert wird. Die Reaktion führt zur Emission von Licht, dessen Intensität zur Schwärzung eines aufgelegten Röntgenfilms ausreicht. Die Chemilumineszenz erreicht ihr Maximum nach zehn Minuten und dauert ca. eine Stunde an.

Durchführung:

Herstellung einer frischen 1:1 Mischung der beiden Komponenten, in der die Nitrocellulose 1 min lang inkubiert wird. Anschließend wird die Nitrocellulose faltenfrei in Haushaltsfolie eingewickelt und auf die proteintragende Seite ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Exposition beträgt in der Regel 1-10 min, abhängig von der Signalstärke. Der Röntgenfilm wird sofort entwickelt, fixiert und nach Wässerung im Trockenschrank getrocknet.

V.2.2.6. Entfernen von spezifisch gebundenen Antikörpern von der Nitrocellulose

Soll eine bereits mit ECL entwickelte Nitrocellulosemembran mit einem weiteren Antikörper getestet werden, so müssen die bereits gebundenen Antikörper entfernt werden. Da die Affinität eines Antikörpers zu seinen Epitop im sauren Milieu sehr schwach wird, kann er durch niedrigen pH abgewaschen werden. Zur Durchführung wird die Nitrocellulose zunächst angefeuchtet, indem sie 10 min lang in TBST gelegt wird. Anschließend werden für zweimal je 30 min die gebundenen Antikörper im Glycinpuffer abgewaschen. Danach wird die Nitrocellulose nochmals 10 min lang in TBST gelegt. Die weitere Behandlung erfolgt wie bei einer frisch geblotteten Nitrocellulose.

Glycinpuffer: 200 mM Glycin
200 mM NaCl
mit HCl auf pH 2,3 einstellen

V.2.2.7. Herstellung eines polyklonalen Antikörpers

Zur Antikörperproduktion wird einem Meerschweinchen (oder einem anderen Tier) das entsprechende Antigen mehrere Male in bestimmten Zeitabschnitten injiziert und später das antikörperreiche Serum gesammelt. Dieses Antiserum enthält eine heterogene Mischung von Antikörpern, jeder von einem anderen B-Lymphozyten (antikörperproduzierende Zelle) hergestellt. Dieses Serum wird als polyklonales Antikörperserum bezeichnet. Die unterschiedlichen Antikörper erkennen verschiedene Epitope des spezifischen Antigens und können zur Identifizierung des Antigens nach seiner Auftrennung durch Gelelektrophorese in den Polyacrylamidgelen sowie in der Immunfluoreszenz verwendet werden.

Immunisierung von Meerschweinchen

Es werden drei Immunisierungen durchgeführt, deren Abstand zwischen der ersten und zweiten Immunisierung drei Wochen und zwischen der zweiten und dritten Immunisierung zwei Wochen beträgt. Die Gewinnung des Serums erfolgt acht Tage nach der dritten Immunisierung.

Für die Immunisierungen werden jeweils 100 µg des Proteins in 600 µl frisch destilliertem H₂O gelöst, 600 µl Freud'sches Adjuvant hinzugefügt und gründlich gemischt, bis eine stabile Emulsion entstanden ist. Für die erste Immunisierung wird komplettes Adjuvants, für alle weiteren Immunisierungen inkomplettes Adjuvants verwendet. Die Injektion der Tiere erfolgt unter Betäubung mit Ether subcutan in den Nackenbereich.

Gewinnung des Serums

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

V.2.2.8. Gewinnung eines Gesamtproteinextraktes aus Kulturzellen

Um die Gesamtproteine einer Zelle unter annähernd physiologischen Bedingungen zu erhalten, werden die dafür auf Zellkulturschalen herangezüchteten Zellen zuerst 2 x mit 1 x PBS gewaschen, danach vorsichtig mit einem Zellschaber von der Oberfläche abgelöst, in

ein steriles Falconröhrchen überführt und bei 500 g für 5 min sedimentiert. Das Sediment wird nochmals 2 x mit 1 x PBS gewaschen, bevor es in Lysispuffer + TI/PMSF resuspendiert und für 20 min bei 4°C unter Rotation inkubiert wird. Um die nun im Lysispuffer enthaltenen Proteine von den restlichen Zellbestandteilen zu trennen, wird der Ansatz für 20 min bei 11.000 g und 4°C zentrifugiert und der sich im Überstand befindlichen Proteinextrakt abgenommen und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Der Gesamtproteinextrakt kann nun bei -70°C für längere Zeit aufbewahrt werden.

Lysispuffer:	1 %	Triton X100
	50 mM	Tris HCl, pH 7,4
	150 mM	150 mM NaCl
Zugabe von	10mg/ml	Trypsininhibitor (TI) (Endkonzentration 10 µg/ml)
	0,2 M	PMSF in Methanol (Endkonzentration 0,2 mM)

V.2.2.9. Proteinauftrennung durch Saccharosegradientenzentrifugation und Gelfiltrationschromatographie

Die vielfältigen Proteine, die in einer Zelle vorkommen, unterscheiden sich u.a. durch ihre Form, Größe und Konfiguration. Manche liegen als Monomere vor, während andere wiederum Komplexe mit sich oder anderen Proteinen bilden. Um darüber mehr Einblick zu bekommen, kann man die Gesamtproteine einer Zelle durch kontinuierlichen Saccharosegradienten bzw. eine Gelfiltration auftrennen und durch SDS-PAGE nachweisen.

Saccharosegradientenzentrifugation

Bei dieser Zentrifugation, bei der Proteine nach Form und Größe bzw. Radius aufgetrennt werden, wird ein kontinuierlicher Saccharosegradient mit Hilfe zweier miteinander verbundener Kammern hergestellt. Dazu werden zwei verschieden konzentrierte Saccharoselösungen (5 bzw. 30% in Lysispuffer mit 0,5% Triton X-100) in jeweils 2 miteinander verbundene Kammern gefüllt, der ableitende Schlauch in ein Beckman-Zentrifugenröhrchen gelegt und die Lösungen langsam unter ständigem Rühren in das Röhrchen gefüllt. Durch die Verbindung der zwei Kammern werden die zwei verschiedenen Saccharosekonzentrationen gemischt und man erhält einen kontinuierlichen Saccharosegradienten von 30-13% (im Refraktometer gemessen). Auf die oberste Schicht des Zentrifugenröhrchens (=13% Saccharose) wird vorsichtig 1 – 1,5 ml des Gesamtproteinextraktes bzw. 100 µg Immunglobulin zur Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten gegeben und für 18 h bei 100.00 g (Beckmann Zentrifuge, Rotor SW41) zentrifugiert. Die anschließende Fraktionierung erfolgt mittels einer Pumpe in 500 µl Aliquots, die Proteinproben werden mit TCA gefällt, luftgetrocknet, in SDS-Probenpuffer

aufgenommen, über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und die fraktionierten Proteine durch verschiedene Antikörper nachgewiesen.

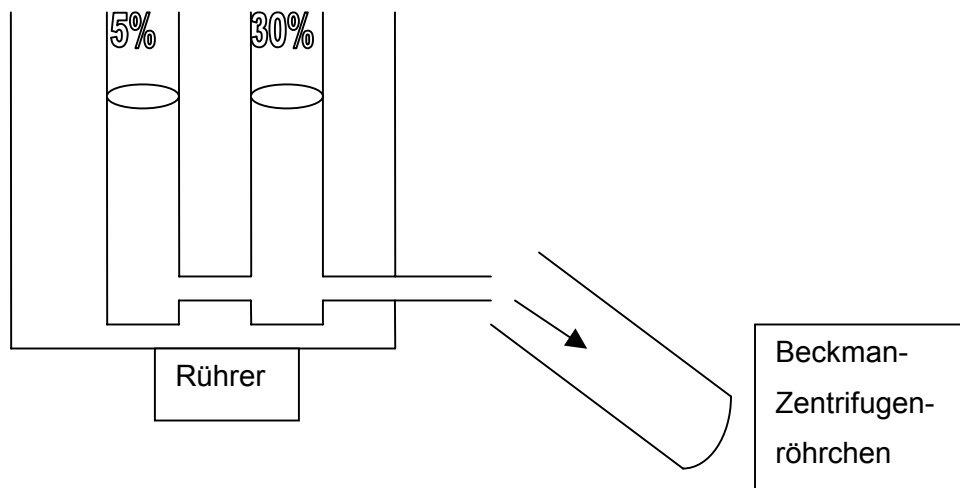


Abb.5-2: Versuchsanordnung zur Herstellung eines kontinuierlichen Zuckergradienten

Gelfiltrationschromatographie

Bei dieser Chromatographie werden Proteine auf eine Matrix aufgetragen, die kleine, poröse Kügelchen („beads“) enthält. Moleküle, die klein genug für die Poren der beads sind, dringen auf ihren Weg entlang der Matrix immer wieder in diese ein und verweilen eine gewisse Zeit darin, was ihre Durchflusszeit verlangsamt. Größere Moleküle, die zu groß für die Poren sind, fließen direkt durch die Matrix durch und werden somit in den ersten Durchlauf-Fractionen aufgefangen. Die kleineren Moleküle folgen, sodass hier eine Größenauftrennung der Moleküle erfolgt, mit den größten Molekülen in den ersten und den kleinsten Molekülen in den letzten aufgefangenen Fractionen. Der hier verwendete Equilibrierungs- und Laufpuffer entspricht dem der Saccharosegradientenzentrifugation, ebenso die aufgetragenen Proteine bzw. des IgG's. Die Fractionen wurden auch mit TCA gefällt und über SDS-PAGE und Westernblot aufgetrennt und nachgewiesen.

V.2.2.10. Extraktion von Proteinen

Durch Extraktionen kann die Löslichkeit von Proteinen näher bestimmt werden. Dadurch kann man unterscheiden, ob es sich um ein Transmembranprotein, an Membrane oder Cyto-/ Karyoskelett assoziiertes oder sich frei im Cyto-/Karyoplasma befindliches Protein handelt.

Proteinextraktion durch Harnstoff

Die Proteinproben werden mit einer hochmolaren Harnstofflösung versetzt und für 1 h bei 4°C und 100.000 g (Beckman TL-100 Ultrazentrifuge, TL-100 Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wird mit Methanol/Chloroform gefällt und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Das Sediment der Zentrifugation wird einmal in PBS gewaschen und ebenfalls in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Beide Fraktionen werden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mittels Antikörper nachgewiesen.

Proteinextraktion durch Triton X-100 und Salz

Hierzu werden die Proteinproben nach dem Waschen mit PBS in Triton-Puffer (1% Triton X-100, 4 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,1 mg/ml Trypsin Inhibitor, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) für 10 min inkubiert und anschließend für erneute 10 min bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wird bei -20°C aufbewahrt und das Sediment in DNase-Puffer (4 mM MgCl₂, 4 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,1 mg/ml Trypsin Inhibitor, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 500 U DNase I; Boehringer, Mannheim) aufgenommen, für 30 min bei 22-24°C inkubiert und danach auf 4°C abgekühlt. Anschließend wird die Probe 1:1 mit Salzpuffer (500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH7,4) versetzt, für 30 min inkubiert und danach bei 3000 g für 10 min fraktioniert. Das Sediment wird einmal in PBS gewaschen und anschließend in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Der Überstand wird mit Methanol/Chloroform gefällt und ebenfalls in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

V.2.2.11. In vitro Transkription und Translation

Um zu überprüfen, ob eine DNA vollständig und funktionsfähig ist, kann sie mit einem kombinierten in vitro-System transkribiert und translatiert werden. Für die zellfreie Transkription und Translation steht das TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega, Madison, WI, USA) zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um cytoplasmatische Zellextrakte, aus denen die endogene RNA sowie die endogenen Aminosäuren entfernt wurden, die aber ansonsten sämtliche, für die Proteinsynthese notwendigen Komponenten enthalten. Für die Translation und Transkription kann nun die zu transkribierende DNA und ein Aminosäuremix zugegeben werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dabei Methionin als ³⁵S-Methionin zugegeben. Die DNA befand sich im pBluescript-Vektor mit dem Startcodon auf der Seite des T3 Promotors.

Sämtliche Arbeiten mit radioaktiven Isotopen müssen in einem geeigneten Isotopenlabor durchgeführt werden.

Ansatz:

12,5 µl	TNT® Reticulocyten Lysat
1,0 µl	TNT® Reaktionspuffer
0,5 µl	TNT® RNA Polymerase (SP 6, T3 oder T7)
0,5 µl	Aminosäuremix ohne Methionin (1 mM)
2,0 µl	³⁵ S-Methionin (1000 Ci/mmol und 10 mCi/ml)
0,5 µl	RNasin® Ribonuklease Inhibitor (40 units/µl)
0,5 µg	Template DNA

mit H₂O auf 25 µl auffüllen.

Der Ansatz wird 1,5 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 5 µl des Ansatzes in 15 µl 4 x SDS -Probenpuffer aufgenommen.

V.2.2.12. Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation (IP) handelt es sich um eine Affinitätschromatographie, bei der ein spezifischer Ligand, z.B. ein Antikörper, kovalent an eine Gelmatrix gebunden wird. Dieser Ligand bindet nun an ein spezifisches Protein, das durch bestimmte Wasch- und Elutionsbedingungen gereinigt werden kann. Eine Sonderform der Immunpräzipitation ist die Co-Immunpräzipitation, bei der nicht nur das an den spezifischen Liganden gebundene Protein, sondern auch dessen Bindungspartner nachgewiesen werden können.

Immunpräzipitation mit Primärantikörpern

Bei dieser IP wurde Protein-A-Sepharose^R CL-4B (Pharmacia Biotech) als Gelmatrix verwendet. Dabei wurde Protein A über die CNBr-Methode an die Sepharose gebunden, welches wiederum an die F_c-Region von Immunglobuline, insbesondere an IgG, aber auch an IgM und IgA, bindet. Da nur die F_c-Region der Immunglobuline an der Protein-A-Bindung beteiligt ist, ist die F_{ab}-Region frei für Bindungen an andere Antigene. Somit ist die Protein-A-Sepharose ein nützliches Mittel zur Isolierung von Immunkomplexen.

Vorbereitung der Protein-A-Sepharose und Kopplung des Primärantikörpers:

Pro IP werden 10 mg Sepharose und 1,25 µg IgG eingesetzt. Die Sepharose wird zuerst in 1 x PBS vorgequollen, danach 5 min bei 500 g zentrifugiert und insgesamt 3 x in 1 x PBS gewaschen und in 75 µl 1 x PBS resuspendiert. 1,25 µg der Primärantikörper (in dieser Arbeit: MAN-Serum; XLAP2β-spezifischer Antikörper) werden zur Protein-A-Sepharose

zugegeben und für 2 h auf Eis inkubiert, dabei wird die sich absetzende Sepharose immer wieder durch vorsichtiges Pipettieren resuspendiert. Nach Bindung des Antikörpers wird die Sepharose 3 x mit 1 x PBS und anschließend 2 x mit IP-Puffer (=Lysispuffer; 1 % Triton X-100, 50 mM Tris, pH 7,4; 150 mM NaCl) gewaschen. Nun erfolgt die Zugabe von 1 ml Proteinextrakt (Proteinkonzentration 30 – 35 mg/ml), gefolgt von einer zweistündigen Inkubation bei 4°C unter Rotieren. Um unspezifische Proteine von der Sepharose zu entfernen, wird der Ansatz danach bei 500 g für 5 min zentrifugiert und 4 x mit IP-Puffer und 1 x mit 1 x PBS gewaschen. Der Überstand wird bis auf 20 µl entfernt und das Sediment bei 1.500 g zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig abgenommen und das Sepharosesediment in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Zur Kontrolle dient ein Ansatz ohne Antikörper.

Immunpräzipitation mit GFP-Fusionsproteine

Da der hier zur IP verwendete GFP-Antikörper nicht direkt an Protein-A-Sepharose gebunden werden kann, wird als „Verbindungsstück“ zwischen der Sepharose und des GFP-Antikörpers Immunglobuline G in Form von Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (RAM) an die Sepharose gebunden.

Vorbereitung des Zellextraktes und Immunpräzipitation:

Für diese Immunpräzipitation wurden entweder XLKE-A6 Zellen, die LAP2-GFP-Fusionsproteine permanent exprimierten bzw. radioaktiv markierte transient transfizierte COS-7 Zellen verwendet.

Der wie unter V.2.2.8 beschrieben hergestellte Zellextrakt mit einer Konzentration von 30-35 mg Proteine / ml wird nach vorheriger Absättigung mit Protein-A-Sepharose (15 min bei 4°C) mit 1,6 µg GFP-Antikörper (Roche Diagnostics) bei 4°C unter Rotation inkubiert. Nach 2 h wird der Proteinextrakt zu der gewaschenen Protein-A-Sepharose, gekoppelt an RAM IgG, dazugegeben und weitere 2 h bei 4°C unter Rotation inkubiert.

Zur Kontrolle wird zwar IgG an die Sepharose gebunden, jedoch kein GFP-Antikörper zum Zellextrakt dazugegeben.

V.2.2.13. In vitro Bindungsexperimente mit GST-Fusionsproteine

Auch hier handelt es sich um eine Affinitätschromatographie, allerdings wird hier als Gelmatrix die Glutathion-Agarose (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) verwendet, an die kein Antikörper gebunden wird, sondern bei der Glutathion über Sulfidbrücken an die Agarose gebunden ist. Diese Agarose wird speziell zur Bindung und Reinigung von GST-Fusionsproteinen eingesetzt. Durch die Bindung der GST-Fusionsproteine an die Glutathion-

Agarose können auch verschiedene Bindungspartner der mit GST-fusionierten Proteinen nachgewiesen werden.

Die Bindung der GST-Fusionsproteine an die Agarose erfolgt über Nacht bei 4°C unter Rotation. Pro Ansatz werden 1 ml des durch Ultraschall freigesetzten Proteinextraktes und 150 µl einer 50%-igen Agarose-Suspension verwendet und inkubiert. Die Agarose wird am nächsten Tag bei 500 g abzentrifugiert und insgesamt 3 x mit Lysispuffer (1 % Triton X-100, 50 mM Tris, pH 7,4; 150 mM NaCl) gewaschen. Danach gibt man 1,5 ml des zuvor abgesättigten Gesamtzellextrakts (= Proteinextrakt) hinzu. Die Inkubation der an die Agarose gekoppelten GST-Fusionsproteine mit dem Zellextrakt erfolgt bei 4°C für 4 h unter Rotation. Zur schonenden Sedimentierung der Agarose und ihrer Bindungspartner wird der gesamte Ansatz vorsichtig auf ein 30%- Saccharosekissen (in IP-Puffer) gegeben und bei 500 g für 3 min abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, das Sediment insgesamt 4 x mit Lysispuffer gewaschen und in 50 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen.

V.2.3. Zellkulturmethoden

V.2.3.1. Kultur von Xenopus XLKE-A6 Zellen und Ceropithecus aethiops COS-7 Zellen

Kultivierung von Xenopus A6 Zellen

Die Zellen werden in 50 ml Kulturflaschen oder in 35mm-Schälchen zur Transfektion im Brutschrank unter konstanter Temperatur (27°C) und einer CO₂-Konzentration von 5 % gehalten. Um eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten, wird das verbrauchte Kulturmedium alle 2 Tage durch frisches Medium ersetzt, dabei wird das alte Medium abgesaugt und durch 5 ml frisches Medium ersetzt.

Teilen von Xenopus A6 Zellen und Anlegen einer neuen Flasche

Die Zellen werden, wenn sie eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht haben, geteilt. Das Medium der zu teilenden Flasche wird abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit 2 ml 1 x PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wird 1 ml Trypsinlösung auf die Zellen gegeben und die Kulturflasche etwas geschwenkt, um das Ablösen der Zellen zu erleichtern. Nach ca. 2 min haben sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst. Um die Zellen zu vereinzeln, werden 5 ml Kompletmedium zu den Zellen gegeben und die Zellen durch vorsichtiges Pipettieren resuspendiert. Zum Anlegen einer neuen Kulturflasche werden 1-2 ml dieser Zellsuspension (je nach Dichte der alten Flasche) in eine neue Flasche überführt und mit 4 bzw. 3 ml Kompletmedium aufgefüllt. Das Medium wird am nächsten Tag durch 5 ml

frisches Kompletmedium ersetzt, um eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten.

Kultivierung von COS-7 Zellen

Die Kultivierung und Teilung der COS-7-Zellen erfolgt wie bei den A6 Zellen, allerdings werden die Säugerzellen bei einer konstanten Temperatur von 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen

Werden Zellen für eine bestimmte Zeit nicht verwendet, kann man sie bei -70°C bzw. in flüssigem Stickstoff für längere Zeit lagern. Dazu werden die Zellen nach dem Waschen mit PBS mit Trypsinlösung abgelöst, in Kompletmedium aufgenommen und in ein steriles Falconröhrchen überführt. Durch Zentrifugation werden die Zellen schonend zentrifugiert (5 min bei 1000 rpm; Hettich Universal/K2S), der Überstand abgesaugt und die Zellen in Einfriermedium (7 ml Kompletmedium, 2 ml FCS, 1 ml DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. DMSO verhindert bei langsamer Abkühlung eine Auskristallisierung des in den Zellen vorhandenen Wassers. Es beugt somit der Zerstörung der Zellen vor, wirkt aber auch als starkes Zellgift. Deshalb müssen die gefüllten 1,5 ml Röhrchen sofort in eine Einfrierbox (Nalgene™ Cryo1C Freezing Container) überführt und diese gesamte Box bei -70°C eingefroren werden. Die Einfrierbox ist mit Isopropanol gefüllt; der Alkohol bewirkt das langsame gleichmäßige Abkühlen der Zellen, so dass keine Eiskristalle entstehen. Längere Aufbewahrung der Zellen erfolgt in flüssigem Stickstoff.

Möchte man die Zellen wieder auftauen, so wärmt man sie schnellstmöglich (z.B. im Wasserbad) auf und versetzt sie mit frischem Kompletmedium, um einer DMSO-Vergiftung vorzubeugen. Um ein Zerspringen der Kryoröhrchen durch zu starke Temperaturänderung zu verhindern, werden die Zellen mehrere Stunden vor dem Auftauen aus dem flüssigen Stickstoff genommen und bei -70°C gelagert. Die eingefrorene Zellsuspension wird sofort nach dem Auftauen unter der Sterilbank in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 5 ml Kompletmedium überführt und vorsichtig gemischt. Die Lösung wird mit 1000 rpm (Hettich Universal/K2S) 5 min zentrifugiert und der Überstand mit dem giftigen DMSO abgesaugt. Das Zellsediment wird in 5 ml Kompletmedium vorsichtig resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt. Die Zellen benötigen ca. zwei Stunden um sich auf dem Untergrund festzusetzen. Haften sie, so kann das Nährmedium abgesaugt und durch frisches ersetzt werden. Befinden sich im Überstand noch viele Zellen, so wird dieser nicht verworfen, sondern in eine eigene Kulturflasche überführt. Durch den Medienwechsel werden letzte Rückstände des DMSO entfernt.

V.2.3.2. Transfektion der Kulturzellen

Unter Transfektion versteht man das Einschleusen von Fremd-DNA in Eukaryotenzellen. Die eingeschleusten Plasmid-Vektoren besitzen neben dem prokaryotischen Replikationsstart auch einen eukaryotischen. Dies ermöglicht das Ablesen von DNA-Fragmenten in diesen Zellen. Eine weitere enthaltene Sequenz codiert u.a. für das grün-fluoreszierende Protein GFP (**g**reen **f**luorescent **p**rotein) aus der Qualle *Aequorea victoria*. Dieses gehört zu den Chromoproteinen. Es absorbiert Licht der Wellenlänge 488 nm und emittiert es bei 507 nm. Das GFP-Gen und das für eine bestimmte Aminosäuresequenz codierende klonierte DNA-Fragment werden als GFP-Fusionsprotein exprimiert. Dieses GFP-Fusionsprotein kann somit im Fluoreszenzmikroskop auf Anwesenheit, Expressionsintensität und Verhalten in der Zelle untersucht werden.

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

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

Zur Transfektion werden die Zellen in kleinen 35 mm Schälchen mit oder ohne frisch autoklavierte Deckgläschen, deren Durchmesser 12 mm beträgt, angesetzt. Die Zellen werden 12-24 h im Brutschrank kultiviert und das alte Medium am nächsten Tag vorsichtig durch neues Medium ersetzt. Haben die Zellen eine Konfluenz von 50-80 % erreicht, kann die Transfektion durchgeführt werden.

Zur Transfektion wird eine Konzentration der zu transfizierenden DNA von 5 µg eingesetzt. Die DNA sollte in 10-15 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 bzw. ddH₂O gelöst sein. Die für die Transfektion benötigte DNA wird 10 min bei 70°C erhitzt, um eventuell vorhandene Bakterien abzutöten, vorsichtig wieder abgekühlt und in 60 µl Medium (ohne Serum und Antibiotika) aufgenommen. Eine Mischung von 10 µl Rotifect und 60 µl Medium (ohne FCS und Antibiotika) wird vorbereitet und die beiden Ansätze werden gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 0,8 ml Medium (ohne FCS und Antibiotika) der DNA/Rotifect-Mischung hinzugefügt, so dass das Gesamtvolumen ca. 940 µl beträgt. Das Kulturmedium der für die Transfektion vorbereiteten Zellen wird abgesaugt und die Zellen werden 2 x vorsichtig mit je 1 ml PBS gewaschen. Zur Transfektion wird die DNA/Rotifect/Medium-Mischung vorsichtig hinzugefügt und die Zellen werden für 4-5 h bei 27°C (A6) bzw. 37°C (COS-7) im Brutschrank inkubiert. Danach werden 2 ml Komplet-Medium hinzugefügt und die Zellen werden über Nacht im Brutschrank kultiviert. Am

nächsten Morgen wird das alte Kulturmedium durch 2,5 - 3 ml frisches Kulturmedium ersetzt, um eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten.

Analyse der Expression

Die Analyse der Transfektionsrate erfolgt am 1. Tag nach der Transfektion unter dem Umkehrfluoreszenzmikroskop. Bei den COS-7 Zellen ist schon am 1.Tag eine deutlich Expressionsrate der Fusionsproteine zusehen, während bei den A6 Zellen die Expression erst am 2. Tag schön zu sehen ist. Die Zellen können nun zur weiteren Analyse (Mikroskopie, SDS-PAGE) fixiert werden oder durch Zugabe von Antibiotikum zu einer permanent-transfizierte Zelllinie herangezogen werden.

V.2.3.3. Gewinnung einer permanent-transfizierten Zelllinie

Für weitere Versuche, wie die Co-Immunpräzipitation mit GFP-Antikörper, wird eine große Menge transfizierter Zellen benötigt. Eine solche Konzentration kann mittels einer Transfektion alleine nicht erhalten werden. Hält man eine transfizierte Kultur unter selektionierenden Bedingungen, so kann sich über mehrere Wochen hinweg eine relativ stabile Zelllinie entwickeln, die das eingeschleuste Plasmid an ihre Nachkommen weitergibt und nicht mehr verliert. Zur Selektion wird das Antibiotikum Geneticin verwendet. Transfizierte Zellen sind auf Grund des verwendeten Klonierungsvektors resistent. Sie verdrängen langsam, über einen Zeitraum von mehreren Wochen, die nicht transfizierten Zellen der Kultur. Die Selektion erfolgt schon am 1.Tag nach der Transfektion durch Zugabe von 200 µg Geneticin / ml Kulturmedium (Stammlösung Geneticin: 50 mg/ml). Diese Konzentration wird nun bei den A6 Zellen täglich um 100 µg/ml erhöht, bis eine Endkonzentration von 800 µg/ml erreicht ist. Bei dieser Konzentration sterben langsam die Zellen ab, die nicht das im transfizierten Plasmid enthaltene Resistenzgen haben, während die transfizierten Zellen sich weiterhin vermehren. Die Effizienz der Selektion wird regelmäßig unter dem umgekehrten Immunfluoreszenzmikroskop (Leica; München) kontrolliert. Die Zellen können hier direkt in ihrer Flasche untersucht werden. Fluoreszenzlicht der Wellenlänge 488 nm regt das GFP-Fusionsprotein zu grünem Leuchten an. Man kann dadurch die transfizierten Zellen von den nicht transfizierten gut unterscheiden. Die nicht transfizierten Zellen sprechen oft erst nach ca. zwei Wochen auf das Antibiotikum an und sterben langsam ab. Nach mehreren Wochen können allerdings auch Mutationen oder Deletionen des GFP-Fusionsproteins auftreten, wobei die Resistenz gegen das Antibiotikum erhalten bleibt; die nicht fluoreszierenden Zellen nehmen überhand und verdrängen die das GFP-Fusionsprotein exprimierenden Zellen. Um dies zu verhindern, werden in regelmäßigen Abständen unter dem inversen Fluoreszenzmikroskop große

Regionen an transfizierten Zellen gesucht, auf der Kulturflasche markiert und die nicht leuchtenden Zellen mit einem Zellschaber unter der Sterilbank entfernt. Dadurch konnte bei einigen EGFP-Konstrukten eine Transfektionsrate von ca. 90% erreicht werden.

Da die COS-7 Zellen empfindlicher auf das Geneticin reagieren, wurde die Konzentration wesentlich langsamer erhöht (immer erst nach 5 – 6 Tagen) und die Höchstdosis überschritt nicht 400 µg/ml. Eine gewisse Transfektionsrate konnte zwar so erhalten bleiben, aber sie betrug nie mehr als ca. 5% und nahm mit zunehmenden Zellteilungen ab.

Der Erfolg dieser Subkultivierung hängt auch stark von der Bedeutung des eingeführten Gens auf die Zelle ab. Meist kommt es zu einer Überexpression des Proteins. Ist dies nicht tolerierbar, so sterben die Zellen relativ schnell ab.

V.2.3.4. Vorbereitung transfizierter Zellen für die SDS-PAGE

Das Zellkulturmedium der transfizierten Zellen wird vorsichtig abgesaugt und die Zellen werden 2 x mit PBS+EDTA, pH 7,0 (135 mM NaCl, 7,7 mM Na₂HPO₄, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA) und 1 x mit ½ konzentriertem PBS + EDTA gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wird 1 ml Ethanol (100%) dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min werden die Zellen mit einem Gummischaber abgelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen werden 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und dem Sediment 1 ml Aceton (100%) zur Dehydrierung hinzugefügt und nochmals 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das getrocknete Sediment bei –70°C eingefroren oder in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

V.2.3.5. Radioaktive Markierung von COS-7 Zellen

Da es in COS-7 Zellen nicht möglich war, permanent transfizierte Zelllinien herzustellen und bei einer transienten Transfektion zu wenig Zellen mit dem GFP-Fusionsprotein transfiziert waren, um bei einer Co-Immunpräzipitation ein klares Signal im Immunblot zu zeigen, wurden diese Zellen radioaktiv mit ³⁵S-Methionin / Cystin markiert und die IP über Autoradiographie nachgewiesen. Diese Methode ist im Allgemeinen sensitiver als der Nachweis über ECL.

Durchführung:

Die Zellen werden lt. Protokoll in 35 mm Schälchen herangezogen und mit der entsprechenden DNA transfiziert: Am nächsten Morgen wird das alte Medium nochmals durch neues Komplettmedium ersetzt, um ein optimales Wachsen der Zellen zu gewährleisten. Nach ca. 5 h wird dieses Medium wieder abgesaugt, die Zellen einmal mit -/- DMEM (=DMEM ohne Methionin und Cystein) gewaschen und 1 – 2 ml -/- DMEM-Medium +

1% Pen/Strep + 1% Glutamin zugegeben. Nach einer Hungerperiode von 1 ½ h werden die Zellen nochmals mit dem -/- DMEM-Medium gewaschen und mit 1 ml des radioaktiven „Labeling-Mixes“ versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h, in der die radioaktiv-markierten Aminosäuren Methionin und Cystein in die frisch translatierten Proteine eingebaut werden, wird 1,5 ml Kompletmedium dazugegeben und die Zellen über Nacht unter den normalen Bedingungen im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Morgen erfolgt die Extraktion der Zellen wie unter beschrieben.

Labeling Mix: DMEM-/-
 + 0,5 mCi/ml Redivue Promix ³⁵S (Amersham Bioscience, UK)

V.2.4. Lichtmikroskopische Methoden

V.2.4.1. Herstellung der Präparate für die Immunfluoreszenz

V.2.4.1.1. Fixierung von Zellen

Um Zellen unter dem Mikroskop besser zu beobachten und Proteine mittels spezifischer Antikörper nachweisen zu können, werden die Zellen, die auf Deckgläschen gewachsen sind, mit verschiedenen Methoden fixiert.

Fixierung mit Methanol/Aceton

Die Zellplättchen werden aus der Petrischale genommen und in 1 x PBS gewaschen, um Medienreste zu entfernen. Die Fixierung erfolgt für 5 min in Methanol und 1 min zur Dehydrierung in Aceton bei jeweils –20 °C. Nach der Fixierung werden sie an der Luft mit der zellenbeschichteten Seite nach oben getrocknet.

Fixierung mit 3% Paraformaldehyd

Nach dem Waschen der Plättchen mit 1 x PBS erfolgt die Fixierung in 3 % Paraformaldehyd in PBS für 20 min. Zur Permeabilisierung der Membranen folgt eine Inkubation mit 0,1% Triton X-100 in PBS/ 0,3 % BSA für 5 min. und anschließend eine Waschung in PBS.

Fixierung mit Glutaraldehyd

In den vorangegangenen Fixierungen werden die Zellen jeweils dehydriert. Im Gegensatz dazu kann bei einer Glutaraldehydfixierung die Zelle in ihrem ursprünglichen, nicht entwässerten Zustand betrachtet werden. Diese Methode lässt allerdings keine

Antikörperinkubation zu. Das vom eingeschleusten Vektor exprimierte GFP-Fusionsprotein emittiert im Fluoreszenzmikroskop ohne weitere Antikörperbehandlung grünes Licht. Eine Glutaraldehydfixierung stellt somit eine geeignete Methode dar, um die Auswirkungen des GFP-Fusionsproteins auf die Zellmorphologie unter optimalen Fixierungsbedingungen zu untersuchen. Artefakte, die durch eine Antikörperinkubation möglicherweise auftreten, können bei dieser einfach ausführbaren Methode ausgeschlossen werden.

Die Zellen werden dazu wieder mit 1 x PBS gewaschen und 15 min mit einer Glutaraldehydmischung inkubiert. Dazu stellte man eine Lösung im Verhältnis 1:1 aus 1 x PBS und 2,5% Glutaraldehyd mit Ionen (2,5 % Glutaraldehyd; 50 mM Cacodylat pH 7,2; 50 mM KCl; 2,5 mM MgCl₂) her. Wiederum wird mit 1 x PBS gewaschen. Die Lagerung erfolgt bei 4°C in 1 x PBS.

Kurz vor der Betrachtung der Zellen unter dem Mikroskop werden die Zellplättchen aus dem 1 x PBS genommen und mit 50% Glycerin in 1 x PBS eingebettet.

V.2.4.1.2. Antikörperinkubation:

Nach der Fixierung mit Methanol / Aceton kann man eine Antikörperinkubation anschließen. Alle Schritte finden in einer feuchten Kammer statt, um eine Austrocknung der Zellen zu verhindern. Pro Deckgläschen benötigt man ca. 100 µl verdünnten Antikörper.

Durchführung:

5 min Inkubation mit 1 x PBS + 0,3% BSA zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen

20 min Inkubation mit dem Primärantikörper; Verdünnung: individuell in 1 x PBS + 0,3 BSA

2 x 5 min Waschen in 1 x PBS

20 min Inkubation mit dem Sekundärantikörper, gekoppelt an Texas-Red; Verdünnung: 1:100 in 1 x PBS / 0,3% BSA; + gleichzeitige Inkubation mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33258 (Hoechst, Frankfurt), Verdünnung 1:1000

2 x 5 min Waschen in 1 x PBS

1 min Fixierung in Rotisol (96% technisches EtOH)

Lufttrocknung

Präparate in Mowiol (Hoechst, Frankfurt) auf Objektträger einbetten

Die Auswertung der immunlokalisierten Zellen erfolgt am Fluoreszenzmikroskop sowie am CLSM (**C**onfocal **L**aser **S**canning **M**icroscope).

V.2.4.2. Analyse von Zellen am konfokalen Laser Scanning Mikroskop

Für Aufnahmen von Zellpräparaten eignet sich am besten ein CLSM (**C**onfocal **L**aser **S**canning **M**icroscope, Typ TCS SP; Leica, München). Moleküle unterschiedlicher Ebenen der Zelle erzeugen häufig mehrere übereinander liegende Bilder. Dies führt zu einer Unschärfe, die im Immunfluoreszenzmikroskop schwer zu umgehen ist. Mit einem CLSM ist es möglich, eine einzelne Schicht des Präparates aufzunehmen; dabei werden die oberhalb und unterhalb der Focusebene liegenden Fluoreszenzsignale unterdrückt. Es wird nicht, wie in einem Fluoreszenzmikroskop, die ganze Probe beleuchtet; stattdessen fokussiert der Laser nur einen einzelnen Punkt einer definierten Ebene. Die vom Präparat emittierte Fluoreszenz wird gesammelt und zu einem Gesamtbild verarbeitet. Das Mikroskop-System erstellt daraus eine Aufnahme und speist sie direkt in ein Computersystem ein. Im Rahmen dieser Arbeit wurden GFP-Fusionsproteine sowie Texas-Red-markierte Strukturen untersucht. Die Anregungswellenlänge für die Detektion von GFP liegt bei 488 nm, das Maximum des emittierten Lichts liegt im Wellenlängenbereich von 520 nm. Die Anregungswellenlänge für die Detektion von Texas Red-markierten Strukturen liegt bei 568 nm, das Maximum des emittierten Lichts liegt im Wellenlängenbereich von 570-580 nm. Die Bearbeitung der gescannten Bilder erfolgt über das Software Programm Leica TCS NT 1.6.587 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH), sowie mit dem Computergraphikprogramm Adobe Photoshop.

VI. Literaturverzeichnis

- Albagli, O., Dhordain, P., Deweindt, C., Lecocq, G., Leprince, D.** (1995): The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell Growth Differ.* **6**, 1193-1198
- Alsheimer, M., Fecher, E. und Benavente, R.** (1998): Nuclear envelope remodelling during rat spermiogenesis: distribution and expression pattern of LAP2/thymopoietins. *J. Cell Sci.* **111**, 2227-2234.
- Alsheimer, M., von Glasenapp, E., Hock, R., Benavente, R.** (1999): Architecture of the nuclear periphery of rat pachytene spermatocytes: distribution of nuclear envelope proteins in relation to synaptonemal complex attachment sites. *Mol. Biol. Cell* **10**,1235-1245
- Benavente, R. and Krohne, G.** (1986). Involvement of nuclear lamins in postmitotic reorganization of chromatin as demonstrated by microinjection of lamin antibodies. *J. Cell Biol.* **103**, 1847-1854.
- Benavente, R., Krohne, G. and Franke, W. W.** (1985) Cell type-specific expression of nuclear lamina proteins during development of *Xenopus laevis*. *Cell* **41**, 177-190.
- Benavente, R.** (1991). Postmitotic nuclear reorganization events analyzed in living cells. *Chromosoma* **100**, 215-220.
- Berger, R., Theodor, L., Shoham J., Gokkel, E., Brok-Simoni, F., Avraham, K.B., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Rechavi, G., Simon, A.J.** (1996): The characterization and localization of the mouse thymopoietin/lamina-associated polypeptide 2 gene and its alternatively spliced products. *Genome Research* **6**, 361-370.
- Biamonti, G., Giacca, M., Perini, G., Contreas, G., Zentilin, L., Weighardt, F., Guerra, M., Della Valle, G., Saccone, S., Riva, S. et al.** (1992): The gene for a novel hman lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. *Mol. Cell Biol.* **12**, 3499-3506
- Blobel, G.** (1980): Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77(3)**,1496-1500
- Bonne, G., Di Barletta, M.R., Varnous, S., Becane, H.M., Hamouda, E.H., Merlini, L., Muntono, F., Greenberg, C.R., Gary, F., Urtizberea, J.A. et al.** (1999): Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat. Genet.* **21**, 285-288
- Brehm, A., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J., Kouzarides, T.** (1998): Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* **391(6667)**, 597-601.
- Brodsky, G.L., Muntoni, F., Miocic, S., Sinagra, G., Sewry, C., Mestroni, L.** (2000): Lamin A/C gene mutation associated with dilated cardiomyopathy with variable skeletal muscle involvement. *Circulation* **101**, 473-476
- Broers, J.L., Machiels, B.M., van Eys, G.J., Kuijpers, H.J., Manders, E.M., van Driel, R. et al.** (1999): Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. *J. Cell Sci.* **112**, 3463-3475
- Brown, C.A., Lanning, R.W., McKinney, K.Q., Salvino, A.R., Cherniske, E., Crowe, C.A., Darras, B.T., Gominak, S., Greenberg, C.R., Grosman, C. et al.** (2001): Novel and recurrent mutations in lamin A/C in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am. J. Med. Genet.* **102**, 359-546
- Buendia, B., Santa-Maria, A., Courvalin, J.-C.** (1999): Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complexes during apoptosis. *J. Cell Sci.* **112**, 1743-1753

- Buendia, B., Courvalin, J.-C., Collas, P.** (2001): Dynamics of the nuclear envelope at mitosis and during apoptosis. *Cell Mol. Life Sci.* **58**, 1781-1789
- Buendia, B. and Courvalin, J. C.** (1997). Domain specific disassembly and reassembly of nuclear membranes during mitosis. *Exp. Cell Res.* **230**, 133-144.
- Cai, M., Huang, Y., Ghirlando, R., Wilson, K.L., Craigie, R., Clore, G.M.** (2001): Solution structure of the constant region of nuclear envelope protein LAP2 reveals two LEM-domain structures: one binds BAF and the other binds DNA. *The EMBO Journal*, **20**, 4399-4407.
- Cao, H. and Hegele, R.A.** (2000): Nuclear lamin A/C R482Q mutation in Canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **9**,109-112
- Chaudhary, N. and Courvalin, J.C.** (1993): Stepwise reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *J Cell Biol.* **122(2)**, 295-306
- Chung, C.T., Niemela, S.L., Miller, R.H.** (1989): One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacreril cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2172-2175
- Clements, L., Manilal, S., Love, D.R., Morris, G.E.** (2000): Direct interaction between emerin and lamin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 709-714
- Cohen, M., Lee, K.K, Wilson, K.L., Gruenbaum, Y.** (2001): Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional evolution of the nuclear lamina. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 41-47.
- Collas, P. and Courvalin, J.-C.** (2000): Sorting nuclear membrane proteins at mitosis. *Trends Cell Biol.* **10**, 5-8.
- Courvalin, J. C., Segil, N., Blobel, G., Worman H. J** (1992): The lamin B receptor of the inner nuclear membrane undergoes mitosis-specific phosphorylation and is a substrate for p34cdc2-type protein kinase. *J Biol Chem* ;**267(27)**, 19035-19038
- De La Luna, S., Allen, K.E., Mason, S.L., 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 (1)**, 212-228
- Dechat, T., Gotzmann, J., Stockinger, A., Harris, C.A., Talle, M.A., Siekierka, J.J, Foisner R.** (1998): Detergent-salt resistance of LAP2a in interphase nuclei and phosphorylation-dependent association with chromosomes early in nuclear assembly implies functions in nuclear structure dynamics. *EMBO J.* **17**, 4887-4902.
- Dechat, T., Vıcek, S., Foisner, R.** (2000a): Lamina-associated polypeptide 2 isoforms and related proteins in cell cycle-dependent nuclear structure dynamics. *J. Struct. Biol.* **129**, 335-345.
- Dechat, T., Korbei, B., Vaughan, O.A., Vıcek, S., Hutchison, C.J., Foisner, R.** (2000b): Lamina-associated polypeptide 2 α binds intranuclear A-type lamins. *J. Cell Sci.* **113**, 3473-3484.
- Del Pino, E.M., Sáenz, F.E., Pérez, O.D., Brown, F.D., Ávila, M.-E., Barragán, V.A., Haddad, N., Paulin-Levasseur, M., Krohne G.** (2002). The LAP2 (lamina-associated polypeptide 2) expression in fish and amphibians. *Int. J. Dev. Biol.* **46**, 227-234.
- Dessev, G., Iovcheva-Dessev, C., Bischoff, J.R., Beach, D., Goldman, R.** (1991): A complex containing p34cdc2 and cyclin B phosphorylates the nuclear lamin and disassembles nuclei of clam oocytes in vitro. *J. Cell Biol.* **112**, 523-533
- Dhe-Paganon, S., Werner, E.D, Chi, Y.-I., Shoelson, S.E.** (2002): Structure of the globular tail of nuclear lamins. *J. Biol. Chem.* **277 (20)**, 17381-17384
- Duband-Goulet, I., Courvalin, J. C., Buendia, B.** (1998): LBR, a chromatin and lamin binding protein from the inner nuclear membrane, is proteolyzed at late stages of apoptosis. *J Cell Sci.*; **111**, 1441-1451

- Duband-Goulet, I. and Courvalin, J.-C.** (2000): Inner nuclear membrane protein LBR preferentially interacts with DNA secondary structures and nucleosomal linker. *Biochem.* **39**, 6483-6488
- Eide, T., Coghlan, V., Orstavik, S., Holsve, C., Solberg, R., Skalhegg, B.S., Lamb, N.J., Langeberg, L., Fernandez, A., Scott, J.D., Jahnsen, T., Tasken, K.** (1998): Molecular cloning, chromosomal localization, and cell cycl dependent subcellular distribution of the A-kinase anchoring protein AKAP95. *Exp. Cell Res.* **238**, 305-316
- Ellenberg, J., Siggia, E.D., Moreira, J.E., Smith, C.L., Presley, J.F., Worman, H.J., Lippincott-Schwartz, J.** (1997): Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J Cell Biol* **138(6)**, 1193-206
- Fairley; E.A.L., Kendrick-Jones, J., Ellis, J.A.** (1999): The Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype arises from aberrant targeting and binding of emerin at the inner nuclear membrane. *J. Cell Sci.* **112**, 2571-2582.
- Fatkin, D., MacRae, C., Sasaki, T., Wolff, M.R., Porcu, M., Frenneaux, M., Atherton, J., Vidaillet, H.J., Jr. Spudich, S., De Girolami, U. et al.** (1999) : Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *New Engl. J. Med.* **341**, 1715-1724
- Fisher, D.Z., Chaudhary, N., Blobel, G.** (1986): cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**,6450-6454
- Foisner, R., Gerace. L.** (1993): Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell* **73**, 1267-1279.
- Foisner, R.** (2001): Inner nuclear membrane proteins and the nuclear lamina. *J. Cell Sci.* **114**, 3791-3792
- Furukawa, K., Inagaki, H., Hotta, Y.** (1994) : Identification and cloning of an mRNA coding for a sperm-specific A-type lamin in mice. *Exp. Cell Res.* **212**, 426-430
- Furukawa, K., Panté, N. Aebi, U., Gerace , L.** (1995): Cloning and cDNA for lamina-associated polypeptide 2 (LAP2) and identification of regions that specify targeting to nuclear envelope. *EMBO J.* **14**, 1626-1636
- Furukawa, K., Glass, C. and Kondo, T.** (1997). Characterization of the chromatin binding activity of lamina-associated polypeptide (LAP) 2. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **238**, 240-246.
- Furukawa, K., Fritze, C.E., Gerace, L.** (1998): The major nuclear envelope targeting domain of LAP2 coincides with its lamin binding region but is distinct from its chromatin interaction domain. *J. Biol. Chem.* **273**, 4213-4219.
- Furukawa , K. 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 somitic cells. *EMBO J.* **12**, 97-106
- Furukawa, K. and Kondo, T.** (1998): Identification of the lamina-associated-polypeptide-2-binding domain of B-type lamin. *Eur. J. Biochem.* **251**, 729-733.
- Furukawa, K.** (1999): LAP2 binding protein 1 (L2BP1/BAF) is a candidate mediator of LAP2-chromatin interaction. *J. Cell Sci.* **112**, 2485-2492.
- Gajewski, A. and Krohne G.** (1999): Subcellular distribution of the *Xenopus* p58/lamin B receptor in oocytes and eggs. *J. Cell Sci.* **112**, 2583-2596.
- Gant, T.M., Harris, C.A., Wilson, K.L.** (1999): Roles of LAP2 proteins in nuclear assembly, envelope formation, nuclear size and DNA replication efficiency in *Xenopus laevis* extracts. *J. Cell Biol.* **144**, 1083-1096
- Gant, T. M. and Wilson, K. L.** (1997): Nuclear assembly. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 669-695.

- Garg, A.** (2000): Lipodystrophies. *Am. J. Med.* **108**, 143-152
- Georgatus, S.D. and Theodoropoulos, P.A.** (1999): Rules to remodel by: what drives nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis? *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **9**, 373-381
- Georgatus, S.D.** (2001): The inner nuclear membrane: simple, or very complex? *EMBO J.* **20(12)**, 2989-2994
- Gerace, L. and Blobel, G.** (1980): the nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* **19**, 277-287
- Gerace, L. and Foisner, R.** (1994). Integral membrane proteins and dynamic organization of the nuclear envelope. *Trends Cell Biol.* **4**, 127-130.
- Goldberg, M., Lu, H., Stuurman, N., Ashery-Padan, R., Weiss, A.M., Yu, J., Bhattacharyya, D., Fisher, P.A., Gruenbaum, Y., Wolfner, M.F.** (1998): Interactions among Drosophila nuclear envelope proteins lamin, otefin and YA. *Mol. Cell Biol.* **18**, 4315-4223
- Goldberg, M., Harel, A., Gruenbaum, Y.** (1999): The nuclear lamina: molecular organization and interaction with chromatin. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expression* **9**, 285-293
- Goldman, R.D., Chou, Y.H., Prahlad, V., Yoon, M.** (2002): Intermediate filaments: dynamic processes regulating their assembly, motility, and interactions with other cytoskeletal systems. *FASEB J. Suppl* **2**, S261-265.
- Goldman, R. D., Gruenbaum, Y., Moir, R.D., Shumaker, D.K., Spann T.P.** (2002): Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *GENES & DEVELOPMENT* **16**:533–547.
- Goldstein, G.** (1974): Isolation of bovine thymim: A polypeptide hormone of the thymus. *Nature* **247**, 11-47
- Gruenbaum, Y., Wilson, K.L., Harel, A., Goldberg, M., Cohen M.** (2000): Nuclear lamins - structural proteins with fundamental functions. *J. Struct. Biol.* **129**, 313-323
- Harborth, J., Elbashir S.M., Bechert K., Tuschl, T., Weber, K.** (2001): Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J. Cell Sci.* **114**, 4557-4565
- Harris, C. A., Andryuk, P. J., Cline, S. C., Natarajan, A., Siekierka, J. J., Goldstein, G.** (1994): Three distinct human thymopoietins are derived from alternatively spliced mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6283-6287.
- Harris, C. A., Andryuk, P. J., Cline, S. C., Mathew, S., Siekierka, J. J. and Goldstein, G.** (1995): Structure and mapping of the human thymopoietin (TMPO) gene and relationship of human TMPO to rat lamin-associated polypeptide 2. *Genomics* **28**, 198-205.
- Hegele, R.A., Cao, H., Anderson, C.M., Hramiak, I.M.** (2000) : Heterogeneity of nuclear lamin A mutations in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 3431-3435
- Hoeltzenbein, M., Karow, T., Zeller, J.A., Warzok, R., Wulff, K., Zschiesche, M., Herrmann, F.H., Grosse-Heitmeyer, W., Wehnert, M.S.** (1999): Severe clinical expression in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Neuromuscular Disord.* **9**, 166-170
- Hoffmann, K., Dreger, C.K., Olins, A.L., Olins, D.E., Shultz, L.D., Lucke, B., Karl, H., Kaps, R., Müller, D., Vaya, A., Aznar, J., Ware, R.E., Sotelo Cruz, N., Lindner, T.H., Herrmann, H., Reis, A., Sperling, K.** (2002): Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huët anomaly). *Nature Genetics* **31**, 410-414
- Holmer, L., Pezhman, A., Worman, H.J.** (1998): The human lamin B receptor / sterol reductase multigene family. *Genomics* **54**, 469-476
- Holmer, L. and Worman, H.J.** (2001): Inner nuclear membrane proteins: functions and targeting. *Cell*

Mol. Life Sci. **58**, 1741-1747

Holtz, D., Tanaka, R.A., Hartwig, J., McKeon, F. (1989): The CaaX motif of lamin A functions in conjunction with the nuclear localisation signal to target assembly to the nuclear envelope. *Cell* **59**, 969-977

Hutchison, C. J., Bridger, J. M., Cox, L. S. and Kill, I. R. (1994). Weaving a pattern from disparate threads: lamin function in nuclear assembly and DNA replication. *J. Cell Sci.* **107**, 3259-3269.

Imai, S., Nishibayashi, S., Takao, K., Tomifuji, M., Fujino, T., Hasegawa, M., Takano, T. (1997) : Dissociation of Oct-1 from the nuclear periphery structure induces the cellular aging-associated collagenase gene expression. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2407-2419

Kaufmann, S.H., Coffey, D.S., Shaper, J.H. (1981): Considerations in the isolation of rat liver nuclear matrix, nuclear envelope, and pore complex lamina. *Exp Cell Res* **132(1)**, 105-23

Kay, R.R. und Johnston, I.R. (1973): The nuclear envelope: current problems of structure and of function. *Subcell Biochem.* **2(2)**, 127-67.

Kitten, G.T. and Nigg, E.A. (1991) : The CaaX motif is required for isoprenylation, carboxymethylation and nuclear membrane association of lamin B2. *J. Cell Biol.* **113**, 13-23

Kourmouli, N., Theodoropoulos, P.A., Dialynas, G., Bakou, A., Politou, A.S., Cowell, I.G., Georgatos, S.D. (2000) : Dynamic associations of heterochromatin protein 1 with the nuclear envelope. *EMBO J.* **19**, 6558-6568

Kourmouli, N., Panayiotis, A., Theodoropoulos, G.D., Bakou, A., Politou, A.S., Cowell, I.G., Singh, P.B., Georgatos, S.D. (2000) : Dynamic associations of heterochromatin protein 1 with the nuclear envelope. *EMBO J.* **19(23)**, 6558-6568

Krimm, I., Östlund, C., Gilquin, B., Couprie, J., Hossenlopp, P., Mornon, J.-P., Bonne, G., Courvalin, J.-C., Worman, H.J., Zinn-Justin, S. (2002): The Ig-like structure of the C-terminal domain of lamin A/C, mutated in muscular dystrophies, cardiomyopathy, and partial lipodystrophie. *Structure* **10**, 811-823

Krohne, G., Wolin, S.L., McKeon, F.D., Franke, W.W., Kirschner, M.W. (1987): Nuclear lamin L₁ of *Xenopus laevis*: cDNA cloning, amino acid sequence and binding specificity of a member of the lamin B subfamily. *EMBO J.* **6(12)**, 3801-3808

Krohne, G., Waizenegger, I, Höger, T.H. (1989): The conserved carboxy-terminal cysteine of nuclear lamins is essential for lamin association with the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* **109**, 2003-2011.

Krohne, G. (1998): Lamin assembly in vivo. In *Subcellular Biochemistry: Intermediate filaments.* (ed. H. Herrmann and J. Robin Harris), pp. 563-586. Plenum Publishing/London, UK.

Kyhse-Andersen, J. (1984): Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-210.

Laemmli, U. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**, 680-685.

Lang, C., Paulin-Levasseur, M., Gajewski, A., Alsheimer, M., Benavente, R., Krohne, G. (1999): Molecular characterization and developmentally regulated expression of *Xenopus* lamina-associated polypeptide 2 (XLAP2). *J. Cell Sci.* **112**, 749-759

Lee, K.K., Haraguchi, T., Lee, R.S., Koujin, T., Hiraoka, Y., Wilson, K.L. (2001): Distinct functional domains in emerin bind lamin A and DNA-bridging protein BAF. *J. Cell Sci.* **114**, 4567-4573.

Lemaitre, J.M., Geraud, G., Mechali, M. (1998) : Dynamics of the genome during early *Xenopus laevis* development : Karyomeres as independent units of replication. *J. Cell Biol.* **142**, 1159-1166

Lenz-Böhme, B., Wismar, J., Fuchs, S., Reifegerste, R., Buchner, E., Betz, H. and Schmitt, B.

(1997). Insertional mutation of the *Drosophila* nuclear lamin Dm0 gene results in defective NEs, clustering of nuclear pore complexes, and accumulation of annulate lamellae. *J. Cell Biol.* **137**, 1001-1016.

Lin, F., Noyer, C.M., Ye, Q., Courvalin, J.-C., Worman, H.J. (1996): Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis recognize a region within the nucleoplasmic domain of inner nuclear membrane protein LBR. *Hepatology* **23**, 57-61

Lin, F., Blake, D.L., Callebaut, I., Skejanc, I.S., Holmer, L., McBurney M.W. et al. (2000): MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated peptide 2 and emerin. *J. Biol. Chem.* **275**, 4840-4847

Lin, F., Blake, D.L., Callebaut, I., Skerjanc, I.S., Holmer, L., McBurney, M.W., Paulin-Levasseur, M., Worman, H.J. (2000): MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated polypeptide 2 and Emerin. *J. Biol. Chem.* **275**, 4840-4847.

Lopez-Soler R.I., Moir, R.D., Spann, T.P., Stick R., Goldman R.D. (2001): A role for nuclear lamins in nuclear envelope assembly. *J. Cell Biol.* **154**, 61-70.

Machiels, B.M., Zorenc, A.H., Endert, J.M., Kuijpers, H.J., van Eys, G.J., Ramaekers, F.C., Broers, J.L. (1996) : An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10. *J. Biol. Chem.* **271**, 9249-9253

Maison, C., Pyrpasopoulou, A., Theodoropoulos, P. A., Georgatos, S. D. (1997): The inner nuclear membrane protein LAP1 forms a native complex with B-type lamins and partitions with spindle-associated mitotic vesicles. *EMBO J.* **16**, 4839-4850.

Malone, C.J.; Fixsen, W.D., Horvitz, H.R. und Han, M. (1999): UNC-84 localizes to the nuclear envelope and is essential for nuclear migration and anchoring during *C. elegans* development. *Development* **126**

Manilal, S., Nguyen, T.M., Sewry, C.A., Morris, G.E. (1996): The Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein, Emerin, is a nuclear membrane protein. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 801-808

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**, 8822-8828.

Martins S.B., Eide T., Steen R.L., Jahnsen T., Skålhegg, B.S., Collas P. (2000): HA95 is a protein of the chromatin and nuclear matrix regulating nuclear envelope dynamics. *Journal of Cell Science* **113**, 3703-3713.

McKeon, F.D., Kirschner, M.W., Caput, D. (1986): Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* **319**, 463-468

McKeon, F. (1987): Nuclear lamin proteins and the structure of the nuclear envelope: Where is the function? *BioEssays* **7**, 169-173

Meier, J., Campbel, K.H., Ford, C.C., Stick, R., Hutchison, C.J. (1991): The role of lamin L_{III} in nuclear assembly and DNA replication, in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *J. Cell Sci.* **98**, 271-279

Moir, R.D., Spann, T. P. and Goldman, R. D. (1995). The dynamic properties and possible functions of nuclear lamins. *Int. Rev. Cytol.* **162B**, 141-182.

Moir, R.D., Spann, T.P., Lopez-Soler, R.I., Yoon, M., Goldman, A.E., Khuon, S., Goldman, R.D. (2000): The dynamics of the nuclear lamins during the cell cycle – relationship between structure and function. *J. Struct. Biol.* **129**, 324-334

Montag, M., Spring, H., Trendelenburg, M.F. (1988): Structural analysis of the mitotic cycle in pre-gastrula *Xenopus* embryos. *Chromosoma.* **96(3)**, 187-96.

Morris, G.E. und Manilal, S. (1999) : Heart to heart :from nuclear proteins to Emery-Dreifuss muscular

dystrophie. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1847-1851

Muranyi, W., Haas, J., Wagner, M., Krohne, G., Koszinowski, U.H. (2002): Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science* **297**, 854-857

Newport, J., Wilson, K. and Dunphy, W. (1990). A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly. *J. Cell Biol.* **111**, 2247-2259.

Newport, J. and Spann, T. (1987): Disassembly of the nucleus in mitotic extracts: membrane vesicularization, lamin disassembly, and chromosome condensation are independent processes. *Cell* **48**, 219-230

Nili, E., Cojocaru, G.S., Kalma, Y., Ginsberg D., Copeland N.G., Gilbert, D.J., Jenkins N.A., Berger R., Shakrai S., Amariglio N., Brok-Simoni F., Simon A.J., Rechavi G. (2001): Nuclear membrane protein LAP2 β mediates transcriptional repression alone and together with its binding partner GCL (germ-cell-less). *J. Cell Sci.* **114**, 3297-3307.

Orstavik, S., Eide, T., Collas, P., Han, I.O., Tasken, K., Kieff, E., Jahnsen, T., Skalhegg, B.S. (2000) : Identification, cloning and characterization of a novel nuclear protein, HA95, homologous to A-kinase anchoring protein 95. *Biol. Cell*, **92**, 27-37

Östlund, C., Ellenberg, J., Hallberg, E., Lippincott-Schwartz, J., Worman, H.J. (1999) : Intracellular trafficking of emerin, the Emery-Dreifuss muscular dystrophie protein. *J. Cell Science* **112**, 1709-1719

Ottaviano, Y. and Gerace, L. (1985): Phosphorylation of the nuclear lamins during interphase and mitosis. *J. Biol. Chem.* **260**, 624-632

Paulin-Levasseur, M., Blake, D. L., Julien, M., Rouleau, L. (1996): The MAN antigens are non-lamin constituents of the nuclear lamina in vertebrate cells. *Chromosoma* **104**, 367-379.

Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J.C., Nigg, E.A. (1990): In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase specific phosphorylation of lamins by cd2 kinase. *Cell* **61**, 591-602

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R. (1999) : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147

Pollard, K.M., Chan, E.K., Grant, B.J., Sullivan, K.F., Tan, E.M., Glass, C.A. (1990): In vitro posttranslational modification of lamin B cloned from a human T-cell line. *Mol. Cell Biol.* **10**, 2164-2175

Qumsiyeh, M.B. (1999): Structure and function of the nucleus: anatomy and physiology of chromatin. *Cell Mol. Life Sci.* **55**, 1129-1140

Di Barletta, M.R., Ricci, E., Galluzzi, G., Tonali, P., Mora, M., Moranti, L., Rumorini, A., Voit, T., Orstavik, K.H., Merlini, L. et al. (2000): Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **66**, 1407-1412

Rao, L., Perez, D., White, E. (1996): Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J. Cell Biol.* **135**, 1441-1455

Rober, R.A., Weber, K., Osborn, M. (1989): Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal. *Development* **105**, 365-378

Rolls, M.M., Stein, P.A., Taylor, S.S., Ha, E., McKeon, F., Rapaport, T.A. (1999): A visual screen of a GFP-fusion library identifies a new type of nuclear envelope protein. *J. Cell Biol.* **146**, 29-44

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA-sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467

- Schindler, M., Holland, J.F., Hogan, M.** (1985): Lateral diffusion in nuclear membranes. *J. Cell Biol.* **100**, 1408-1414
- Schlesinger, D.H. and Goldstein, G.** (1975): The amino acid sequence of thymopoietin II. *Cell* **5**, 361-365
- Schoft, V.K., Beauvais, A.J., Lang, C., Gajewski, A., Winkler, C., Akimenko, M.-A., Paulin-Levasseur, M., Krohne, G.** (2002): The lamina-associated polypeptide 2 (LAP2) isoforms β , γ and ω of zebrafish: developmental expression and behavior during the cell cycle.
- Scott, E.S. und O'Hare** (2001): Fate of the inner nuclear membrane protein Lamin B Receptor and nuclear lamins in herpes simplex virus 1 infection. *J. Virol.* **75(18)**, 8818-8830
- Segura-Totten, M., Kowalski, A.K., Craigie, R., Wilson, K.L.** (2002): Barrier-to-autointegration factor: major roles in chromatin decondensation and nuclear assembly. *J. Cell Biol.* **158**, 475-485.
- Seki, N., Ueki, N., Yano, K., Saito, T., Masuho, Y., Muramatsu, M.** (2000): cDNA cloning of a novel human gene NAKAP95, neighbor of A-kinase anchoring protein 95 (AKAP95) on chromosome 19p13.11-p13.12 region. *J. Hum. Genet.* **45**, 31-37
- Senior, A. and Gerace, L.** (1988). Integral membrane proteins specific to the inner nuclear membrane and associated with the nuclear lamina. *J. Cell Biol.* **107**, 2029-2036.
- Shackleton, S., Lloyd, D.J., Jackson, S.N., Evans, R., Niermeijer, M.F., Singh, B.M., Schmidt, H., Brabant, G., Kumar, S., Durrington, P.N., et al.** (2000): LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophie. *Nat. Genet.* **24**, 153-156
- Shumaker, D.K., Lee, K.K., Tanhehco, Y.C., Craigie, R., Wilson, K.L.** (2001): LAP2 binds to BAF-DNA complexes: requirement for the LEM domain and modulation by variable regions. *EMBO J.* **20**, 1754-1764.
- Shuman, S.** (1994): Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* **269**, 32678-32684
- Silve, S., Dupuy, P.H., Ferrara, P., Loison, G.** (1998): Human lamin B receptor exhibits sterol C14-reductase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1392(2-3)**, 233-244
- Simos, G. and Georgatos S.D.** (1992): The inner nuclear membrane protein p58 associates in vivo with a p58 kinase and the nuclear lamins. *EMBO J* **11**, 4027-4036
- Simos, G. and Georgatos, S.D.** (1994): The lamin B receptor-associated protein p34 shares sequence homology and antigenic determinants with the splicing factor 2-associated protein p32. *FEBS Lett* **346(2-3)**, 225-228
- Smith, S. and Blobel G.** (1993): The first membrane spanning region of the lamin B receptor is sufficient for sorting to the inner nuclear membrane. *J Cell Biol* **120(3)**, 631-7
- 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(1)**, 15-27
- Soullam, B. and Worman, H.J.** (1993): The amino-terminal domain of the lamin B receptor is a nuclear envelope targeting signal. *J Cell Biol* **120(5)**, 1093-100
- Spann, T. P., Moir, R. D., Goldman, A. E., Stick, R. und Goldman, R. D.** (1997). Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *J. Cell Biol.* **136**, 1201-1212.
- Stick, R. and Hausen, P.** (1985). Changes in the nuclear lamina composition during early development of *Xenopus laevis*. *Cell* **41**, 191-200.
- Stick, R.** (1988). cDNA cloning of developmentally regulated lamin L_{III} of *Xenopus laevis*. *EMBO J.* **7**,

3189-3197.

Stuurman, N., Sasse, B., Fisher, P.A. (1996): Intermediate filament protein polyperization: Molecular analysis of *Drosophila* nuclear lamin head-to-tail binding. *J. Struct. Biol.* **117**, 1-15

Stuurman, N., Heins, S., Aebi, U. (1998): Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J. Struct. Biol.* **122**,42-66

Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Bhatt, H., Anver, M., Naryan, B., Nagashimi, K., Stewart, C.L., Burke, B. (1999) : Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophie. *J. Cell Biol.* **147**, 913-920

Taniura, H., Glass, C., Gerace, L. (1995) : A chromtin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones. *J. Cell Biol.* **131**, 33-44

Tsuchiya, Y., Hase, A., Ogawa, M., Yorifuji, H., Arahata, K. (1999) : Distinct regions specify the nuclear membrane targeting of emerin, the responsible protein for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Eur. J. Biochem.* **259**, 859-865

Umland, T.C., Shui-Qing, W., Craigie, R., Davies, D.R. (2000): Structural basis of DNA bridging by Barrier-to-Aotointegration Factor. *Biochem.* **39**, 9130-9138

Vigouroux, C., Auclair, M., Dubosclard, E., Pouchelet, M., Capeau, J., Courvalin, J.C., Buendia, B. (2001) : Nuclear envelope disorganization in fibroblasts from lipodystrophic patients with heterozygous R482Q/W mutations in the lamin A/C gene. *J. Cell Sci.* **114**, 4459-4468

Vlcek, S., Just, H., Dechat, T., Foisner R. (1999): Functional diversity of LAP2 α and LAP2 β in postmitotic chromosome association is caused by an α -specific nuclear targeting domain. *EMBO J.* **18**, 6370-6384.

Vlcek, S., Korbei, B., Foisner, R. (2002): Distinct functions of the unique C terminus of LAP2 α in cell proliferation and nuclear assembly. *J. Biol. Chem.* **277**, 18898-18907.

Westberg, C., Yang, J.-P., Tang, H., Reddy, T.R., Wong-Staal, F. (2000) : A novel shuttle protein binds to RNA helicase A and activates the retroviral constitutive transport element. *J. Biol. Chem.* **275**, 21396-21401.

Wilson, K.L. (2000): The nuclear envelope, muscular dystrophy and gene expression. *Trends Cell Biol.* **10**, 125-129

Wilson, Katherine L., Zastrow M.S., Lee, K.K. (2001): Lamins and Disease: Insights into nuclear infrastructure. *Cell* **104**: 647-650

Worman, H. J., Evans, C. D. and Blobel, G. (1990). The lamin B receptor of the nuclear envelope inner membrane: a polytopic protein with eight potential transmembrane domains. *J. Cell Biol.* **117**, 245-258.

Wu, W., Lin, F., Worman, H.J. (2002): Intracellular trafficking of MAN1, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *J. Cell Sci.* **115**, 1361-1372

Yang, L., Guan, T., Gerace, L. (1997): Lamin-binding fragment of LAP2 inhibits increase in nuclear volume during the cell cycle and progression into S phase. *J. cell Biol.* **139**, 1077-1087.

Ye, Q., Callebaut, I., Pezhman, A., Courvalin, J.C., Worman, H.J. (1997): Domain-specific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR. *J Biol Chem* **272(23)**, 14983-14989

Ye, Q., Barton, R.M., Worman, H.J. (1998):Nuclear lamin binding proteins. In *Subcellular Biochemistry: Intermediate filaments* (ed. H. Hermann and J Robin Harris), pp. 587-610. Plenum Publishing/London, UK

Ye, Q. and Worman, H.J. (1994): Primary structure analysis and lamin B and DNA binding of human LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *J Biol Chem* **269(15)**, 11306-11

Ye, Q. and Worman, H.J. (1996): Interaction between an integral protein of the nuclear envelope inner membrane and human chromodomain proteins homologous to *Drosophila* HP1. *J Biol Chem* **271(25)**, 14653-14656

Zheng, R., Ghirlando, R., Lee, M.S., Mizuuchi, K., Krause, M., Craigie, R. (2000): Barrier-to-autointegration factor (BAF) bridges DNA in a discrete, higher-order nucleoprotein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8997-9002

VII. Anhang

VII.1. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium; Eurobio, Biotechnology
DMSO	Dimethylsulfoxid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiotreitol
DNA	Desoxiribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FCS	Fötales Kälberserum
g	Gramm bzw. Standardwert der Erdbeschleunigung
GFP	Green Fluorescent Protein
GST	Glutathion S Transferase
h	Stunde
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LAP	Lamin assoziiertes Polypeptid
LBR; p58	Lamin B-Rezeptor
kD	Kilodalton
m	Meter
mA	Milli-Ampere
mAk	monoklonaler Antikörper
MCS	multiple cloning site
mg	Milligramm
MG	relative Molekularmasse
min	Minute
ml	Milliliter

mM	Millimolar
μ	Mikro
NPC	Nuclear pore complex (Kernporenkomplex)
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pfu	plaque forming units
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAM	Rabbit-anti-mouse (Antikörper)
RT	Raumtemperatur
PI	Proteaseinhibitoren
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TI	Trypsin Inhibitor
Tris	Tris-(hydrothymethyl)-aminoethan
TSR	Transmissionssuppressionsreagenz
U	Unit
V	Volt
Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

VII.2. Verwendete Primer

XLAP2 β 255-429 in pQE30:

Upstream-Primer: 5'-AAT ATA GGA TCC GAG GTC CCT CCT ATA TCT GAA TTG-3'

Downstream-Primer: 5'-GTC TTT AAG CTT CAG CGG CTC CTC TTA TTG GCC TGC-3'

XLAP2 β 1-471 in pGEX-5X-2:

Upstream-Primer: 5'-TA TGG ATC CCG GAG TTT CTG CAA GAC CC-3'

Downstream-Primer: 5'-TT TGC GGC CGC CGA TCG TCC AGG TTT CAC TT-3'

XLAP2 β 1-248 in pGEX-5X-2:

Upstream-Primer: 5'-TA TGG ATC CCG GAG TTT CTG CAA GAC CC-3'

Downstream-Primer: 5'-TT TGC GGC CGC AAA AAG GAC TGG ATC TGG AGC-3'

XLAP2 β 243-471 in pGEX-5X-2:

Upstream-Primer: 5'-AA TGG ATC CCT CCA GAT CCA GTC CTT TTT GA-3'

Downstream-Primer: 5'-TT TGC GGC CGC CGA TCG TCC AGG TTT CAC TT-3'

XLAP2 β 96-471 in pGEX-5X-2:

Upstream-Primer: 5'-TG TGG ATC CCA GAA CTC AGC AAT GAG GCT C-3'

Downstream-Primer: 5'-TT TGC GGC CGC CGA TCG TCC AGG TTT CAC TT-3'

XLAP2 β 96-387 in pGEX-5X-2:

Upstream-Primer: 5'-TG TGG ATC CCA GAA CTC AGC AAT GAG GCT C-3'

Downstream-Primer: 5'-AA AGC GGC CGC CTG CTT TTT TAC AGG TGT TAC AAA-3'

XLAP2 β 176-471 in pGEX-5X-2:

Upstream-Primer: 5'-CC CGG ATC CAG AGA GAA CCA CTG AGG GGA AA-3'

Downstream-Primer: 5'-TT TGC GGC CGC CGA TCG TCC AGG TTT CAC TT-3'

XLAP2 β 1-518 in pEGFP-C3:

Upstream-Primer: 5'-A ATT CTC GAG CCG GAG TTT CTG CAA GAC CC-3'

Downstream-Primer: 5'-G TGT GGA TCC TAA CCC CCC CCC TCA AAA AAT-3'

XLAP2 β 96-518 in pEGFP-C3:

Upstream-Primer: 5'-ATT CTC GAG GAA CTC AGC AAT GAG GCT CTT-3'

Downstream-Primer: 5'-G TGT GGA TCC TAA CCC CCC CCC TCA AAA AAT-3'

XLAP2 β 176-518 in pEGFP-C3:

Upstream-Primer: 5'-TTT CTC GAG AAG AGA GAA CCA CTG AGG GGA AA-3'

Downstream-Primer: 5'-G TGT GGA TCC TAA CCC CCC CCC TCA AAA AAT-3'

XLAP2 β 243-518 in pEGFP-C3:

Upstream-Primer: 5'-AAA CTC GAG GCT CCA GAT CCA GTC CTT TTT GA-3'

Downstream-Primer: 5'-G TGT GGA TCC TAA CCC CCC CCC TCA AAA AAT-3'

XLAP2 β 384-518 in pEGFP-C3:

Upstream-Primer: 5'-CCC CTC GAG GTA AAA AAG CAG ATT GTA GAA AAG A-3'

Downstream-Primer: 5'-G TGT GGA TCC TAA CCC CCC CCC TCA AAA AAT-3'

XLAP2 β 96-518 in EGFP-N1:

Upstream-Primer: 5'-TGT CTC GAG CTC ATG GAA CTC AGC AAT GAG GCT-3'

Downstream-Primer: 5'-CAA GGT ACC TTT TCA GTC TTG TTT GAT TCT GTG ATG-3'

ZLAP2 β / γ / ω in EGFP-N1:

Upstream-Primer: 5'- TTC TCG AGG ACA TGT TGG AAT TTC TGG AAG A-3'

Downstream-Primer: 5'-AAT GGT ACC TTG CTG GTA CTG TCA TCT GTG CCG-3'

ZLAP2 γ 1-215 in EGFP-N1:

Upstream-Primer: 5'- TTC TCG AGG ACA TGT TGG AAT TTC TGG AAG A-3'

Downstream-Primer: 5'-AAG GAT CCC TAG TGT GTT GCC CAC TGC GT-3'

ZLAP2 β 1-361 in EGFP-N1:

Upstream-Primer: : 5'- TTC TCG AGG ACA TGT TGG AAT TTC TGG AAG A-3'

Downstream-Primer: 5'-AAG GAT CCT TTT GTC GAT CAC TGG AAG GC-3'

ZLAP2 ω 1-502 in EGFP-N1:

Upstream-Primer: 5'- TTC TCG AGG ACA TGT TGG AAT TTC TGG AAG A-3'

Downstream-Primer: 5'-CAT TGG TAC CAT CAT TGT CTC CTT CAT ATC CAT-3'

RLAP2 β 326-452 in EGFP-N1:

Upstream-Primer: 5'-CCT AAG CTT ATG ACA AGA GCT GAA GTG GGA GAA AAA-3'

Downstream-Primer: 5'-CGC GGT ACC TTG GAT ATT TTA GTA TCT TGA AGA AAA TTA-3'

ZLAP2 β 361-515 in EGFP-C2:

Upstream-Primer: 5'- AGA CAG AAT TCG TTG AAA AGG TGT CAG CCA T-3'

Downstream-Primer: 5'- TAT TAG GAT CCT TAT TTG CTG GTA CTG TCA TC-3'

XLAP2 β , START/STOP:

upstream: 5'- AC ACC ATG CCG GAG TTT CTG CAA GAC CCG TCG GT-3'

downstream: 5'- AAA TCA GTT TTC AGT CTT GTT TGA TTC TGT GA-3'

XLAP2, 435-1197:

upstream: 5'-TTC AAA AGC AGA CAA CAA GCA-3'

downstream: 5'- TTC AGT TCT TCT CGC TCT AAA A-3'

Zur Amplifizierung von Lamin III sowie Lamin I wurden folgende Primer verwendet:

Lamin L III, 1-1739 (=open-reading frame):

upstream-primer: 5'- CT ATG GCC ACA TCT ACC CCC AG-3'

downstream-primer: 5'-TAA TTA CAT GAT GGA ACA GCT GGG A-3'

Lamin L I, 1-1788:

upstream-primer: 5'- GT CTT GGT TTT ATG CAC ATT GC-3'

downstream-primer: 5'-GAG AAT TCT TCA GTG TGG CCT T-3'

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Carmen Lang
Geburtsdatum: 21.11.1967
Geburtsort: Karlsruhe
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1974-1978 Grundschule Russheim
1978-1987 Copernicus-Gymnasium Philippsburg
Mai 1987 Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung und Studium

Oktober 1987-April 1991 Ausbildung zur Krankenschwester am
Diakonissenkrankenhaus Karlsruhe / Rüppurr

1992-1998 Biologiestudium an der Bayerischen Julius Maximilians
Universität Würzburg
Studienschwerpunkte:
Zell- und Entwicklungsbiologie
Biotechnologie
Humangenetik

1997-1998 Diplomarbeit in der Abteilung für Elektronenmikroskopie am
Biozentrum der Bayerischen Julius Maximilians Universität
Würzburg bei Prof. Dr. G. Krohne.
Thema: Charakterisierung eines vesikulären Antigens von
Xenopus laevis

Okt. 1998 - Dez. 1998 Forschungsaufenthalt an der Pontificia Universidad Catolica del
Ecuador in Quito, Ecuador, im Labor von Prof. Dr. Eugenia del
Pino

1999-2002

Promotionsstudium in der Abteilung für Elektronenmikroskopie
am Biozentrum der Bayerischen Julius Maximilians
Universität Würzburg bei Prof. Dr. G. Krohne.
Thema: Molekulare Charakterisierung, Expressionsmuster und
Interaktionen der Lamina-assoziierten Polypeptide 2 (LAP2) in
Xenopus laevis

Publikationsliste

Lang, C., Paulin-Levasseur, M., Gajewski, A., Alsheimer, M., Benavente, R., Krohne, G.

(1999): Molecular characterization and developmentally regulated expression of Xenopus lamina-associated polypeptide 2 (XLAP2). J. Cell Sci. **112**, 749-759

Lang, C. and Krohne, G. (2002): Lamina-associated polypeptide 2 β (LAP2 β) is contained in a protein complex together with A- and B-type lamins. Zur Publikation eingereicht.

Schoft, K.V., Beauvais, A.J., Lang, C., Gajewski, A., Winkler, C., Akimenko, M.-A., Paulin-Levasseur, M., Krohne, G. (2002):): The lamina-associated polypeptide 2 (LAP2) isoforms β , γ and ω of zebrafish: developmental expression and behavior during the cell cycle. Wird in 2 Wochen eingereicht.

Veröffentlichter Abstract:

Lang, C., Schoft, V., Krohne, G. (2001): In vivo interactions of lamina-associated polypeptides 2 β (LAP2 β) with lamins. Biology of the Cell **93 (3/4)**, 188

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Elektronenmikroskopie der Universität Würzburg angefertigt.

Bei allen, die am Entstehen dieser Arbeit direkt oder indirekt beteiligt waren, möchte ich mich hier bedanken:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Georg Krohne für die Überlassung des interessanten Themas. Außerdem möchte ich ihm an dieser Stelle für seine engagierte Betreuung, Unterstützung und Motivation sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft und das sehr angenehme Arbeitsklima danken.

Herrn Prof. Dr. C. R. Müller-Reible danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Dr. Andreas Gajewski bedanke ich mich für viele technische und inhaltliche Hilfen, insbesondere am Anfang meiner Promotion.

Dr. Manfred Alsheimer danke ich für viele seiner Tipps und Hilfen in Bezug auf nicht funktionierende Experimente und Computerprobleme.

Bei Michael Sachs bedanke ich mich für die Herstellung der ersten GST-Konstrukte und für seinen tagelangen Einsatz im 4°C Raum.

Vera Schoft danke ich für die Zusammenarbeit bezüglich der LAP2 Proteine in Zebrafisch.

Bei Ellen Fecher bedanke ich mich für die zahlreichen Sequenzierungen, die sie für mich durchgeführt hat.

Ein großer Dank geht auch an alle Mitarbeiter der Zoologie I und der EM-Abteilung, besonders an Claudia Gehrig und an alle Doktoranden, Diplomanden, Zulassungskandidaten und Praktikanten, die zum sehr guten Arbeitsklima in dieser Abteilung mit beigetragen haben.

Gott ist's, der das Vermögen schafft, was Gutes zu vollbringen, er gibt uns Segen, Mut und Kraft und lässt das Werk gelingen.

S. Liscow

Darum danke ich meinem Gott für das Gelingen meiner Arbeit und für alle Menschen, die mich dabei unterstützt haben.

Ehrenwörtliche Erklärung

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

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

Würzburg, den 12.11.2002

Carmen Lang