

Die Bedeutung von verkürzten Spleißvarianten
des Lamin A-Gens für die Meiose
und für die Pathogenese von Laminopathien

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

vorgelegt von
Daniel Jahn

aus
Groß-Gerau

Würzburg 2012

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: PD Dr. rer. nat. Manfred Alsheimer

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Clemens R. Müller-Reible

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	7
Summary.....	9
1. Einleitung	11
1.1. Lamine und die Kernhülle.....	12
1.2. Lamine und die Gametogenese	17
1.3. Lamine und Lamin-assoziierte Krankheiten.....	22
2. Teil A: Die Rolle des verkürzten A-Typ Lamins C2 während der Oogenese der Maus.....	28
2.1. Ergebnisse	28
2.1.1. Das Expressionsmuster von A-Typ Laminen während der Oogenese.....	28
2.1.2. In Lamin C2-defizienten Oocyten ist die Synapse der homologen Chromosomen gestört	31
2.1.3. Das Fehlen von Lamin C2 in Oocyten beeinträchtigt die homologe Rekombination	35
2.1.4. Die molekulare Eigenschaften des meiosespezifischen Lamin C2 unterscheiden sich erheblich von denen somatischer Lamine	39
2.2. Diskussion	49
3. Teil B: Die Lamin A Mutante AΔ8-11 persistiert in der <i>Lmna</i>^{-/-} Mauslinie	56
3.1. Ergebnisse	56
3.1.1. Mehrere A-Typ Lamin-Antikörper reagieren mit einem Kernhüll-Antigen vermeintlich A-Typ Lamin-defizienter Zellen.....	56
3.1.2. Klonierung eines bisher unentdeckten <i>Lmna</i> Genprodukts aus <i>Lmna</i> ^{-/-} MEFs und Geweben	59
3.1.3. Lamin AΔ8-11 ist in <i>Lmna</i> ^{-/-} Zellen als stabiles Protein vorhanden.....	61
3.2. Diskussion	67
4. Material	74
4.1. Organismen	74
4.1.1. Tiere.....	74
4.1.2. Zelllinien	74
4.1.3. Bakterienstämme	74
4.2. Antikörper	74
4.3. Molekularbiologisches Material	75
4.3.1. Oligonukleotide	75
4.3.2. Vektoren.....	76
4.3.3. Rekombinante DNA-Konstrukte.....	78
4.3.4. Enzyme, Kits und Verbrauchsmaterial	79

4.4.	Chemikalien	80
4.5.	Geräte	80
4.6.	Computerprogramme	80
5.	Methoden	81
5.1.	Mikrobiologische Methoden	81
5.1.1.	Bakterien-Flüssigkultur	81
5.1.2.	Kultivierung von Bakterien auf Agar.....	81
5.1.3.	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	81
5.1.4.	Transformation von Bakterien.....	82
5.2.	Molekularbiologische Methoden	82
5.2.1.	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	82
5.2.2.	Isolation von RNA aus Kulturzellen und Gewebe	82
5.2.3.	Isolation von genomischer DNA aus Gewebe	82
5.2.4.	Amplifizierung von DNA durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	83
5.2.5.	Agarose-Gelelektrophorese.....	84
5.2.6.	Gelextraktion von DNA.....	85
5.2.7.	Herstellung rekombinanter DNA (Klonierung).....	85
5.3.	Proteinbiochemische Methoden	86
5.3.1.	SDS-PAGE.....	86
5.3.2.	Silberfärbung von Proteingelen.....	88
5.3.3.	Western blot mit Immundetektion	88
5.3.4.	Hochsalzextraktion von Proteinen aus Kulturzellen.....	89
5.3.5.	Ionenaustausch-Chromatographie.....	91
5.3.6.	Methanol/Chloroform-Fällung von Proteinen	92
5.3.7.	Massenspektrometrie	92
5.4.	Zellkultur	92
5.4.1.	Kultivieren und Passagieren von Kulturzellen (<i>Lmna</i> ^{-/-} MEFs).....	92
5.4.2.	Transfektion von Kulturzellen mit <i>MATra</i>	93
5.5.	Mikroskopische Methoden	93
5.5.1.	Anfertigung von Gefrierschnitten.....	93
5.5.2.	Anfertigung von Paraffinschnitten von embryonalem Ovar	94
5.5.3.	Oocyten-Spreitung von embryonalem Ovar	94
5.5.4.	Immunfluoreszenz-Analyse von Kulturzellen und Gefrierschnitten	95
5.5.5.	Immunfluoreszenz-Analyse von Paraffinschnitten.....	96

5.5.6. Immunfluoreszenz-Analyse von Spreitungen	96
5.5.7. FRAP	97
5.5.8. FLIP	99
6. Literaturverzeichnis	101
Abkürzungen.....	111
Erklärung	112
Lebenslauf.....	113
Danksagung.....	115

Zusammenfassung

Die Lamina ist ein dichtes Netzwerk aus Intermediär-Filamenten, den Laminen, an der nucleoplasmatischen Seite der inneren Kernmembran. Hier interagieren Lamine sowohl mit Transmembran-Proteinen der Kernhülle als auch mit dem Chromatin. Diese Wechselwirkungen mit Interaktionspartnern verschiedener zellulärer Kompartimente macht die Lamina, neben einer Gerüststruktur mit wichtigen mechanische Aufgaben, auch zu einer zentralen Schnittstelle von Signalwegen, die eine intrazelluläre Kommunikation zwischen Nucleus und Cytoplasma ermöglichen. Die Lamina ist somit ein entscheidender Regulator der funktionellen Organisation des Chromatins und der differentiellen Genexpression.

Das Expressionsmuster der Lamine während der Spermatogenese von Säugern unterscheidet erheblich von der Lamin-Expression somatischer Zellen und weist einige Besonderheiten auf. Dies schließt unter anderem die spezifische Expression der verkürzten A-Typ Lamin-Spleißvariante C2 während der meiotischen Phase der Spermatogenese ein. Diese und andere Beobachtungen deuteten bereits länger darauf hin, dass der speziellen Zusammensetzung der Lamina und vor allem dem meiosespezifischen Lamin C2 während der Gametogenese im männlichen Organismus eine entscheidende Rolle zukommen könnte. Neuere Studien im Mausmodell bekräftigen diese Hypothese und leisten darüber hinaus einen entscheidenden Betrag dazu, die Funktion der Lamina während der Meiose auf molekularer Ebene präzise zu definieren. Im deutlichen Gegensatz zu den weitreichenden Kenntnissen zur Situation in Männchen lagen zu Beginn der vorliegenden Arbeit keine Daten über die Zusammensetzung der Lamina in weiblichen Keimzellen vor. Konsequenterweise existierten auch keine funktionellen Untersuchungen zur Relevanz der Lamina für die Oogenese. In der vorliegenden Arbeit wurden diese reproduktionsbiologisch hoch interessanten Fragestellungen detailliert untersucht. Dabei zeigte sich unter anderem, dass Lamin C2 auch in weiblichen Keimzellen spezifisch während der Meiose exprimiert wird. Durch Studien an einer Lamin C2-defizienten Mauslinie wurde die Funktion von Lamin C2 in der Meiose in Weibchen genau untersucht. Dabei wurde eine erhebliche Beeinträchtigung der strukturellen Paarung der homologen Chromosomen und der homologen Rekombination in Lamin C2-defizienten Weibchen festgestellt. Da die genannten Prozesse Schlüsselereignisse für die korrekte Segregation der Homologen in späteren Stadien der Meiose sind, deuten die erzielten Ergebnisse auf eine erhebliche qualitative Beeinträchtigung der reifen Gameten in Lamin C2-defizienten Weibchen hin. Ein weiterer zentraler Aspekt der Arbeit war die Analyse der molekularen Eigenschaften des meiosespezifischen Lamin C2 *in vitro*. Diese Experimente definieren wichtige Unterschiede hinsichtlich seiner Polymerisationseigenschaften im Vergleich zu Laminen somatischer Zellen und tragen, zusammen mit anderen Studien, dadurch erheblich dazu bei, die Funktion von Lamin C2 in der Meiose im mechanistischen Sinne besser zu verstehen. Zudem deckt die vorliegende Arbeit erstmals einen funktionellen Zusammenhang zwischen der Lamina-Zusammensetzung und der Qualität der Keimzellen weiblicher Säuger auf und ermöglicht dadurch zukünftige Studien zur Rolle der Lamine in der Oogenese, die möglicherweise auch für die menschliche Fertilität sehr interessant sein könnte.

Der zweite Teil der Dissertation beschäftigt sich mit der Beschreibung einer trunkierten A-Typ Lamin-Spleißvariante in einer Mauslinie, die bislang als A-Typ Lamin-defizient angesehen wurde (*Lmna*^{-/-}). Die durchgeführten Untersuchungen besitzen vor allem dadurch hohe Relevanz, dass die untersuchte *Lmna*^{-/-} Mauslinie seit Jahren als das wichtigste Modell zur funktionellen Untersuchung der A-Typ Lamine gilt und bereits in einer Vielzahl von Publikationen eingesetzt wurde. In den hierzu durchgeführten Versuchen konnte das in der *Lmna*^{-/-} Mauslinie persistierende A-Typ Lamin mittels diverser methodischer Ansätze als C-terminale Deletionsmutante definiert werden, der die Exons 8-11 der insgesamt 12 Exons des *Lmna*-Gens fehlen. Daher wurde diese Lamin A-Mutante als Lamin A Δ 8-11 bezeichnet. Die Konsequenzen der C-terminalen Deletion für die physiologischen Eigenschaften des Lamin A Δ 8-11 sowie die Auswirkungen seiner Expression in der *Lmna*^{-/-} Mauslinie auf aktuelle Modellvorstellungen zur Funktion der A-Typ Lamine und zur Entstehung Lamin-assoziiierter, humaner Erkrankungen (Laminopathien) werden in der Arbeit ausführlich diskutiert.

Summary

The nuclear lamina is a dense meshwork of intermediate filament proteins termed lamins that lines the nucleoplasmic face of the inner nuclear membrane. By its interactions with both integral membrane proteins and chromatin the lamina constitutes a cellular hub at the nucleo-cytoplasmic interface that serves both structural and regulatory functions. With regard to this, lamins have been implicated in basic cellular processes such as transcription, signaling and chromatin organization and are therefore currently considered as major regulators of differential gene expression.

Compared to somatic cells, nuclear lamina composition of male mammalian meiocytes is remarkably different. This includes the specific temporal expression of the short A-type lamin splice variant lamin C2 at meiotic stages of male germ cell development. Several lines of evidence indicated that meiosis-specific lamin C2 could serve an essential role for meiosis in males. Recently, this hypothesis has found strong support by *in vivo* studies in lamin C2-deficient males and these studies substantially contributed to the precise definition of lamin C2 function on a molecular level. In contrast to this, nuclear lamina subtype composition in female meiocytes has never been analyzed and, consequently, its contribution to the formation of viable gametes in females remained elusive. In the present study, these issues have systematically been addressed. Here, detailed immunohistochemical analyses demonstrate that, as in the male, female germ cells (oocytes) undergoing prophase I of meiosis specifically express lamin C2. Following functional studies performed in lamin C2-deficient mice disclosed a pivotal role of lamin C2 for central meiotic processes in females. These include the requirement of lamin C2 for precise pairing of the homologous chromosomes that occurs in meiotic prophase I as well as its contribution to the timely and efficient progression of homologous recombination events in oocytes. Since accurate segregation of paternal chromosomes during first meiotic division is known to be critically dependent on both precise homologous pairing and recombination, these data point to an as yet unanticipated role of lamin C2 for the development of viable gametes in females. Moreover, detailed *in vitro* experiments were performed to analyze the molecular properties of meiosis-specific lamin C2 compared to somatic lamin variants. This revealed distinct properties of lamin C2 that are compatible with models suggesting that this short lamin variant significantly modifies the structural properties of the nuclear envelope (NE) of mammalian meiocytes. These structural modifications, in turn, are considered to facilitate dynamic repositioning of NE-attached meiotic telomeres which, besides homologous pairing and recombination, is a further most central and evolutionarily conserved hallmark of meiotic prophase I with an essential relevance for accurate genome haploidization. Thus, together with other important observations made in the lamin C2-deficient mouse model, the data presented in this thesis significantly contribute to our understanding of lamin C2 function on a molecular level.

The second part of the study is based on a rather unexpected finding in another lamin-deficient mouse model. This finding concerns the *Lmna*^{-/-} mouse line that was established in 1999 by Sullivan and others by gene targeting of the *Lmna* gene encoding A-type lamins. Since then, these mice have frequently been used in a multitude of important studies that aimed to analyze various different aspects of A-type lamin function. This thesis now provides compelling evidence that, unexpectedly and contradicting previous reports, a truncated lamin A mutant persists in the *Lmna*^{-/-} mouse line that was considered as completely devoid of A-type lamins thus far. By the use of various technical approaches, including detailed mass spectrometry, the presented data precisely define the lamin A variant present in *Lmna*^{-/-} mice (designated lamin A Δ 8-11) as a C-terminal lamin deletion mutant that lacks domains with known important functions for protein interactions and posttranslational processing. Based on these findings, implications for the interpretation of previous reports using *Lmna*^{-/-} mice as well as for our current models of A-type lamin function and the pathophysiology of lamin-associated disorders in humans (laminopathies) are considered in the discussion of the thesis.

1. Einleitung

Als der amerikanische Elektronenmikroskopie-Pionier Don Wayne Fawcett im Jahr 1966 als einer der Ersten das Auftreten einer „fibrösen Lamina“ entlang der inneren Kernhülle von Vertebraten-Zellen beschrieb, diskutierte er seine Beobachtungen folgendermaßen: „[...] It has been my purpose in this paper merely to call attention to the common occurrence of this layer in vertebrate cells in the hope of stimulating further study of its distribution among various mammalian cell types, of its time of origin during cell differentiation, of its chemical nature, and its possible variations in different physiological conditions. [...]“ (Fawcett, 1966)

Heute, 46 Jahre später, muss man feststellen, dass sich seine Hoffnung auf bemerkenswerte Weise erfüllt hat. Die „Lamina“ ist in der Tat zu einem zentralen Thema der zellbiologischen und biomedizinischen Forschung geworden, das von vielen internationalen Gruppen intensiv bearbeitet wird. Dies zeigt sich besonders eindrucksvoll in der Tatsache, dass bis heute mehr als 280 verschiedene Mutationen des für A-Typ Lamine codierenden humanen *LMNA* Gens beschrieben wurden, die ursächlich verantwortlich sind für die Entstehung von mehr als 10 verschiedenen klinischen, als „Laminopathien“ zusammengefassten, Syndromen (UMD-LMNA auf www.umd.be). Die biologischen Funktionen der Lamina einerseits grundsätzlich besser zu verstehen, und diese darüber hinaus in Beziehung zu setzen zur molekularen Pathophysiologie dieser schwerwiegenden Krankheitsbilder, ist daher von höchstem Interesse. Die vorliegende Arbeit versucht zu diesen Zielen beizutragen und gliedert sich dazu in zwei Teile.

Teil A beschäftigt sich mit der Untersuchung der keimzellspezifischen, N-terminal verkürzten A-Typ Lamin-Isoform C2. Von diesem Lamin war aus vorangegangenen Studien bereits bekannt, dass es in männlichen Keimzellen von Mäusen exprimiert wird. Dabei scheint es während der Meiose in der männlichen Keimbahn eine essentielle Rolle einzunehmen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in dieser Hinsicht zwei Fragestellungen untersucht. Dies waren, erstens, zu untersuchen ob Lamin C2 auch in weiblichen Keimzellen der Maus exprimiert wird und welche Bedeutung ihm *in vivo* für die Meiose und die Fertilität im weiblichen Geschlecht zukommt. Zweitens wurde auch intensiv daran gearbeitet, die physikalischen Eigenschaften des keimzellspezifischen Lamin C2 durch verschiedene *in vitro* Versuchsansätze zu untersuchen und mit denen somatischer Lamine zu vergleichen, um so die Funktion von Lamin C2 auf molekularer Ebene besser verstehen zu können.

Teil B der Arbeit entwickelte sich aus einem Seitenaspekt der erwähnten *in vitro* Versuche. Die für diese Experimente verwendeten Zellen (*Lmna*^{-/-} MEFs) wurden 1999 von Sullivan und Kollegen (Sullivan et al., 1999) aus einer vermeintliche A-Typ Lamin-defizienten Mauslinie isoliert und erstmals beschrieben. In der vorliegenden Arbeit geht es nun darum, einen wichtigen Aspekt, der bei der ursprünglichen Charakterisierung dieses häufig verwendeten knock out Modells offensichtlich übersehen wurde, und der bisher in der Literatur unerwähnt blieb, aufzuarbeiten. Dabei werden auch die Auswirkungen dieser neuen Erkenntnisse auf die Interpretation früherer Studien diskutiert.

In der folgenden Einleitung werden zunächst der grundsätzliche Aufbau und die einzelnen Komponenten der Lamina und der Kernhülle vorgestellt. Danach folgt jeweils eine kurze Einführung in die bisher bekannten Funktionen der Lamine während der Differenzierung von Keimzellen, sowie in die bisher beschriebenen Zusammenhänge zwischen den physiologischen Funktionen der Lamine und der Entstehung von Laminopathien.

1.1. Lamine und die Kernhülle

Die Lamina ist eine der drei Hauptkomponenten der Kernhülle

Ein Hauptcharakteristikum und das namensgebende Organell eukaryontischer Zellen ist der Zellkern (griechisch; eu=echt, karyon=Kern). Dieser Zellkern, der in seinem Inneren (Nucleoplasma) das Chromatin beherbergt, wird von dem umgebenden Cytoplasma durch die Kernhülle abgegrenzt. Die Kernhülle besteht prinzipiell aus drei Komponenten (Abbildung 1): (1) Zwei konzentrischen Membranen, der inneren (INM) und der äußeren (ONM) Kernmembran, die jeweils dem Nucleoplasma beziehungsweise dem Cytoplasma zugewandt sind. Sowohl die INM, als auch die ONM beinhalten eine Vielzahl integraler Membranproteine, die für die Funktionalität der Kernhülle von besonderer Wichtigkeit sind. (2) Beide Membranen werden von großen makromolekularen Proteinkomplexen, den Kernporenkomplexen (NPCs), durchspannt. Sie verbinden das Nucleoplasma physiologisch mit dem Cytoplasma und erlauben so eine Kommunikation und einen regulierten Transport zwischen beiden Kompartimenten. (3) Die dritte Komponente der Kernhülle ist die Lamina, ein je nach Organismus und Zelltyp etwa 20-50 nm starkes polymeres Netzwerk aus Laminen. Dieses Lamin-Netzwerk steht durch seine Interaktion mit zahlreichen Membran- und Chromatinproteinen sowohl mit der INM als auch mit dem Chromatin in direkter struktureller und funktioneller Verbindung (Burke and Stewart, 2006; Gruenbaum et al., 2005; Hutchison, 2002; Schirmer and Foisner, 2007).

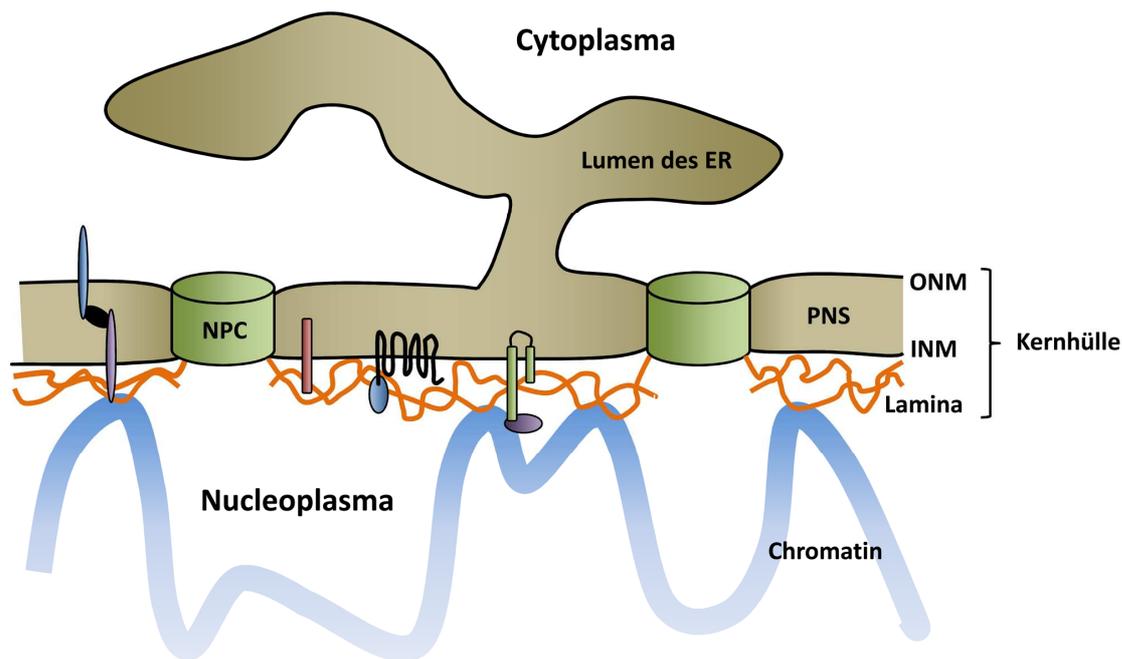
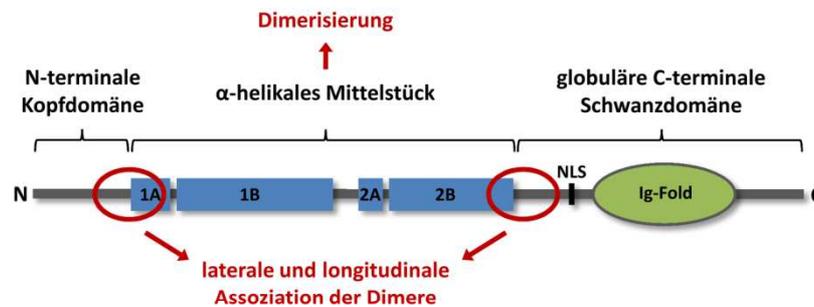


Abbildung 1. Aufbau der Kernhülle. Die Kernhülle besteht aus der inneren und äußeren Kernmembran (INM bzw. ONM) sowie der Lamina. Zwischen INM und ONM befindet sich die perinucleäre Cisterne (PNS). Diese bildet ein Kontinuum mit dem Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Kernporenkomplexe (NPC) erlauben einen regulierten Transport über die Kernhülle. Schematisch dargestellt sind außerdem einige integrale Membranproteine. Abbildung verändert nach Schirmer und Gerace (2005).

Lamine besitzen einen dreigeteilten molekularen Aufbau, der für ihre Polymerisation in Strukturen höherer Ordnung relevant ist

Lamine gehören zur Familie der Intermediärfilament-Proteinen (IFs) und werden als Typ V-IFs klassifiziert. Da sie als einzige Vertreter der IF-Familie im Kern anzutreffen sind, gleichzeitig aber im Gegensatz zu cytoplasmatischen IFs auch in basalen Metazoen gefunden wurden, geht man davon aus, dass die Lamine die evolutionär ursprünglichste Gruppe von IF-Proteinen darstellen (Doring and Stick, 1990; Peter and Stick, 2012).

Domänen der Lamine:



Lamina Assembly:



Abbildung 2. Aufbau und Polymerisation der Lamine. (oben) Lamine weisen einen dreigeteilten molekularen Aufbau auf. Dabei flankieren nicht-helikale N- und C-terminale Domänen ein α -helikales Mittelstück. Die zentrale α -helikale Domäne besteht dabei aus vier individuellen Coils (1A-2B), die jeweils von kurzen Spacern unterbrochen werden. Während das α -helikale Mittelstück die Dimerisierung zweier Lamin-Moleküle vermittelt, sind die Übergangsbereiche (rot eingekreist) zwischen diesem Bereich und den N- bzw. C-terminalen Domänen für die longitudinale und laterale Assoziation der Dimere besonders wichtig. (unten) Schematische Darstellung des Assembly einzelner Lamin-Moleküle zum polymeren Netzwerk der Lamina. Abbildung nach Herrmann und Aebi (2004).

Wie alle IF-Proteine, zeigen Lamine einen dreigeteilten molekularen Aufbau, der in engem Zusammenhang mit ihren Polymerisationseigenschaften steht (Abbildung 2). Sie setzen sich zusammen aus einem zentralen α -helikalen Mittelstück, das N- und C-terminal jeweils von einer nicht-helikalen Kopf- beziehungsweise Schwanzdomäne flankiert wird. Die Polymerisation von Laminen zu Strukturen höherer Ordnung beginnt mit der Dimerisierung zweier einzelner Lamin-Moleküle. Dabei entsteht eine „coiled-coil“ Struktur, deren Ausbildung durch die zentralen α -helikalen Domänen vermittelt wird (Herrmann and Aebi, 2004). Anschließend lagern sich die gebildeten Dimere zunächst durch „Kopf-Schwanz-Verknüpfung“ („head-to-tail“) zu individuellen, polaren Protofilamenten zusammen. Diese Protofilamente assemblieren dann in anti-paralleler Weise lateral zu komplexeren, nicht-polaren Filamenten, die schließlich das komplexe Netzwerk der Lamina aufbauen. Auf die Regulation der letzten beiden Polymerisationsschritte haben sowohl die N- und C-terminalen Enden des α -helikalen Mittelstücks als auch die nicht-helikalen Kopf- und Schwanzdomänen entscheidenden Einfluss (Heitlinger et al., 1992; Strelkov et al., 2002; Stuurman et al., 1996). Zusätzlich zum beschriebenen dreigeteilten Aufbau besitzen alle Lamine ein strukturell konserviertes Motiv in ihren C-terminalen Bereich, das als Immunglobulin-ähnliche Domäne oder „Ig-Fold“ bezeichnet wird (Dhe-Paganon et al.,

2002; Krimm et al., 2002). Diese globulär organisierte Domäne trägt entscheidend zur Interaktion der Lamine mit vielen relevanten Bindungspartnern bei (siehe auch Abschnitt 3.2). Dieser Funktion entsprechend sind mehrere Mutationen im C-terminalen Ig-Fold bestimmter Lamin-Varianten bekannt, die Lamin-Interaktionen stören und so die Entstehung Lamin-assoziiierter Krankheiten verursachen (Abschnitt 1.3).

Höhere Vertebraten besitzen üblicherweise mehrere Lamin-Isoformen, die sich aufgrund verschiedener Eigenschaften in A- und B-Typ Lamine einteilen lassen

Prinzipiell unterscheidet man zwei Gruppen von Laminen (A-Typ und B-Typ), die sich unter anderem hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften unterscheiden (Krohne, 1998; Stuurman et al., 1998). Während für *C. elegans* und *Drosophila melanogaster* jeweils nur ein beziehungsweise zwei Lamine beschrieben sind, codieren die Genome der meisten höheren Wirbeltiere für mehrere Lamin-Isoformen (Abbildung 3). Säuger besitzen zwei B-Typ Lamin Gene, *Lmnb1* und *Lmnb2*, die für die drei bekannten Varianten Lamin B1, B2 und B3 codieren (Furukawa and Hotta, 1993; Hoyer et al., 1988; Zewe et al., 1991). Alle vier für Säuger beschriebenen A-Typ Lamine (Lamin A, C, A Δ 10 und C2) sind hingegen alternative Spleißprodukte eines einzelnen *Lmna* Gens (Furukawa et al., 1994; Lin and Worman, 1993; Machiels et al., 1996; Nakajima and Abe, 1995).

A- und B-Typ Lamine unterscheiden sich darüber hinaus in ihrem Expressionsmuster. B-Typ Lamine werden scheinbar in allen Zelltypen der Maus unabhängig von deren Differenzierungszustand exprimiert (Rober et al., 1989; Stewart and Burke, 1987). Unter anderem aufgrund dieser Beobachtung wurde lange angenommen, dass B-Typ Lamine für das Überleben und die Proliferation von Säugerzellen essentiell sind. Diese Ansicht wurde jedoch kürzlich durch mindestens zwei genetische Studien erheblich in Frage gestellt (Kim et al., 2011; Yang et al., 2011). Eindeutig hingegen ist, dass die zeitliche Expression von A-Typ Laminen während der Embryonalentwicklung stark vom Zelltyp und dessen Differenzierungszustand abhängig ist. Dabei sind die Lamine A/C ab Tag 9 dpf zunächst nur im viszeralen Endoderm und im Trophoblasten des frühen Mausembryos nachweisbar (Stewart and Burke, 1987). Anschließend beginnt ihre Expression auch in anderen Geweben des sich entwickelnden Embryos in asynchroner, gewebsspezifischer Art und Weise. Bis zur frühen postnatalen Phase exprimieren schließlich, bis auf wenige Ausnahmen, alle differenzierten Zelltypen der Maus die Lamine A und C (Rober et al., 1990; Rober et al., 1989).

Die meisten Lamin-Isoformen sind von einer Serie posttranslationaler Modifikationen betroffen, die durch das C-terminale Sequenzmotiv „CaaX“ vermittelt werden und durch ihren hydrophoben Charakter für die Rekrutierung der Lamine an die innere Kernmembran (INM) essentiell sind. Diese Modifikationen bestehen aus der initialen Farnesylierung des Cysteins, der anschließenden proteolytischen Abspaltung des C-terminalen Peptids „aaX“ und der Methylierung des entstandenen Farnesyl-Cysteins (Holtz et al., 1989; Kitten and Nigg, 1991; Krohne et al., 1989; Young et al., 2005). In diesem Zusammenhang unterscheiden sich A- und B-Typ Lamine in einer weiteren Hinsicht: Während B-Typ Lamine permanent farnesyliert bleiben, wird der farnesylierte C-Terminus des Lamin A bereits kurz nach dessen Einbau in die Lamina in einem weiteren Prozessierungsschritt durch die Metalloprotease Zmpste24 enzymatisch abgespalten (Pendas et al., 2002; Weber et al., 1989). Da Fehler in diesem finalen Schritt mit dem Auftreten gravierender Krankheitsbilder assoziiert sind, wird dies später noch näher diskutiert. Auch die A-Typ Lamine C und C2 unterscheiden sich hinsichtlich ihrer posttranslationalen Modifikationen erheblich von den B-Typ Laminen. Während Lamin C keine hydrophobe Modifikation erfährt und sein Einbau in die Kernhülle daher von anderen Laminen abhängig ist (Horton et al., 1992; Pugh et al., 1997; Ye and Worman, 1995), wird die keimzellspezifische Isoform C2 am N-terminalen Hexapeptid „GNAEGR“ myristoyliert und durch diesen Mechanismus mit

ausreichender Membranaffinität ausgestattet, um zur INM rekrutiert zu werden (Alsheimer et al., 2000). Da Untersuchungen zur biologischen Funktion des keimzellspezifischen Lamin C2 einen zentralen Aspekt der vorliegenden Arbeit darstellen, wird auf weitere bisher bekannte Eigenschaften dieser besonderen Lamin-Variante in Abschnitt 1.2 noch näher eingegangen.

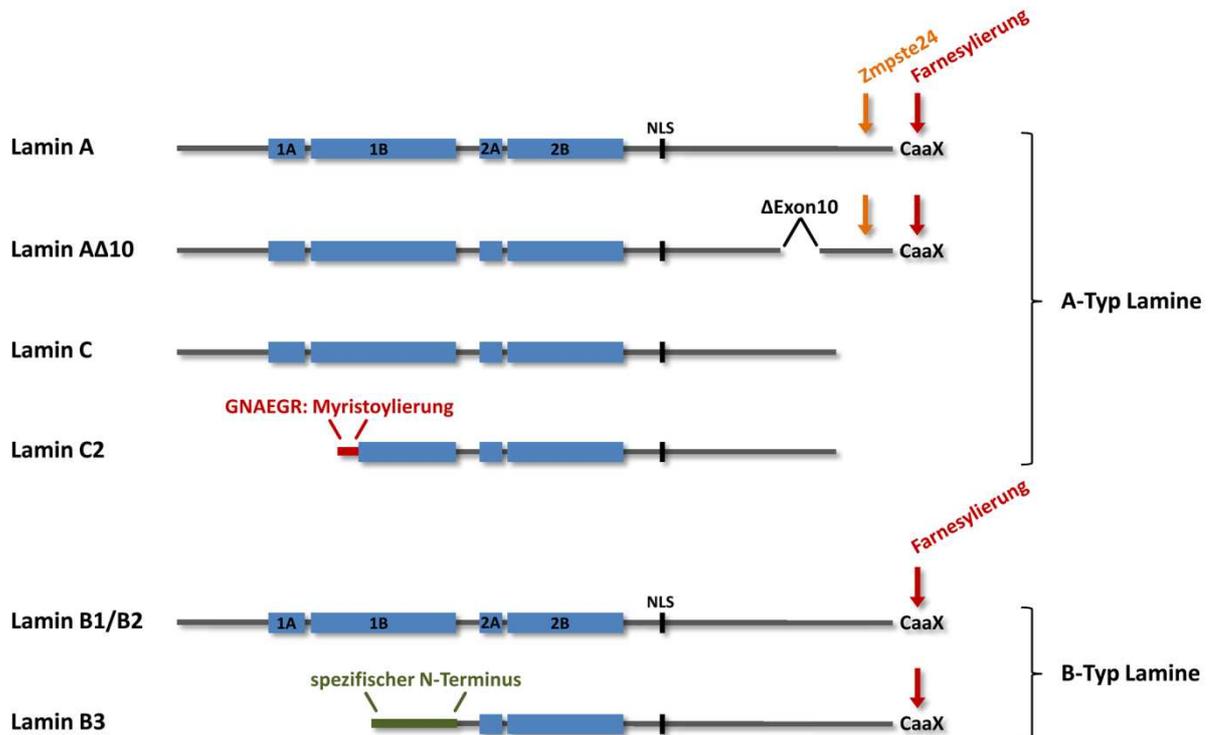


Abbildung 3. Lamin-Isoformen in Säugern. Verändert nach Krohne (1998), Erklärung siehe Text.

Lamine sind aufgrund ihrer Wechselwirkung mit zahlreichen Interaktionspartnern Teil eines strukturellen und regulatorischen Netzwerks, das basale zelluläre Funktionen kontrolliert

Eine der wichtigsten Funktionen der Lamina ist ohne Zweifel die mechanische und strukturelle Stabilisierung des Zellkerns. Zahlreiche Studien der letzten Jahre zeigen eindrucksvoll, dass die biologische Funktion der Lamina weit über die einer „trivialen“ Gerüststruktur hinausgeht. Stattdessen betrachtet man die Lamina inzwischen als dynamische und stark vernetzte Plattform, der eine wichtige Bedeutung für intrazelluläre Signalwege, die Transkription und die Organisation des Chromatins zukommt und die daher als zentraler Regulator der differentiellen Genexpression angesehen wird (Andres and Gonzalez, 2009; Dauer and Worman, 2009; Simon and Wilson, 2011). Auf molekularer Ebene werden diese Funktionen hauptsächlich durch die regulierte Interaktion der Lamine mit einer Vielzahl diverser Bindungspartner vermittelt, unter denen sich viele strukturelle Proteine der Kernhülle, aber auch Chromatin-assoziierte Proteine und Signalmoleküle befinden. Auf einige dieser Lamin-Interaktionspartner, die im Zusammenhang der vorliegenden Arbeit besonders relevant sind, soll im folgenden Abschnitt kurz eingegangen werden.

Emerin:

Emerin ist ein etwa 30 kDa großes Protein der INM. Sein Name geht zurück auf Bione und Kollegen, die Mutationen im Emerin codierenden *EMD*-Gen, das beim Menschen auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, als Ursache für das Auftreten der X-gekoppelten Variante der Emery-Dreifuss Muskeldystrophie (EDMD) identifizierten (Bione et al., 1994). Zusammen mit LAP2 und MAN1 gehört Emerin zur Familie der LEM-Domänen Proteine. Die LEM-Domäne ist ein etwa 40 Aminosäuren umfassendes, konserviertes

Sequenzmotiv aus zwei α -Helices, das die Interaktion der mit dem Chromatin-bindenden Protein BAF vermittelt (Lin et al., 2000). Durch diese und zahlreiche weitere Interaktionen nehmen LEM-Domänen Proteine, wie Emerin, Einfluss auf die Organisation des Chromatins und die Regulation der Genexpression (Wilson and Foisner, 2010). Trotz dieses offensichtlichen Mitwirkens an zentralen zellulären Prozessen und der ubiquitären Expression von Emerin, führt der Verlust von Emerin in der Maus interessanterweise zu einem relativ milden, muskelspezifischen Phänotyp (Melcon et al., 2006; Ozawa et al., 2006). Diese Tatsache deutet zusammen mit dem erwähnten Auftreten von EDMD in Patienten auf eine spezielle Funktion von Emerin im Muskel und auf eine relativ hohe funktionelle Redundanz der LEM-Domänen Proteine in anderen Geweben hin.

LAP2-Isoformen:

LAP2 (Lamina-associated polypeptides) gehören ebenfalls zur LEM-Familie und zählen zu den Lamin-bindenden Membranproteinen der INM, die bereits am längsten bekannt sind. In der Maus sind mehrere alternative Splicevarianten von LAP2 bekannt, die größtenteils eine C-terminale Transmembrandomäne und einen langen nucleoplasmatischen N-Terminus aufweisen (Dechat et al., 2000b). Die nucleoplasmatische Domäne der Isoform LAP2 β bindet dabei an B-Typ Lamine (Foisner and Gerace, 1993; Furukawa and Kondo, 1998). LAP2 α hingegen lokalisiert aufgrund der Abwesenheit einer C-terminalen Transmembrandomäne im Kernplasma und bildet dort stabile Komplexe mit nucleoplasmatischen A-Typ Laminen (Dechat et al., 1998; Dechat et al., 2000a). Diese Lamin A-LAP2 α Komplexe beeinflussen unter anderem die Funktion des Zellzyklusregulators Rb und spielen dadurch für die Kontrolle des Zellzyklus und der Zellproliferation eine entscheidende Rolle (Johnson et al., 2004; Naetar et al., 2008; Pekovic et al., 2007).

SUN-Domänen Proteine:

Die namensgebende Domäne der SUN-Proteine wurde zuerst in den Vertretern Sad1 und UNC-84 aus *S. pombe* beziehungsweise *C. elegans* beschrieben (Malone et al., 1999). Die SUN-Domäne ist ein hoch konserviertes etwa 200 AS umfassendes C-terminales Sequenzmotiv, das es den in der INM lokalisierten SUN-Domänen Proteinen ermöglicht, innerhalb der perinucleären Cisterne (PNS) an KASH-Proteine der ONM zu binden. Dadurch sind sie Teil eines die Kernmembran überbrückenden Komplexes, der eine funktionelle Verbindung zwischen nucleären und cytoplasmatischen Strukturen etabliert und als LINC-Komplex bezeichnet wird (Crisp et al., 2006; Haque et al., 2006). Dementsprechend spielen SUN-Domänen Proteine in konservierter Weise eine wichtige Rolle bei der Positionierung und Verankerung des Zellkerns (Burke and Roux, 2009; Starr, 2009; Tzur et al., 2006). In Säugern gibt es insgesamt fünf bisher bekannte SUN-Domänen Proteine (SUN1-3, SPAG4 und SPAG4L). Während SUN1 und SUN2 sowohl in somatischen Geweben, als auch in Keimzellen von Säugern exprimiert werden, sind SUN3, SPAG4 und SPAG4L hodenspezifische Proteine, die mit der postmeiotischen Umformung des Zellkerns männlicher Keimzellen in Verbindung gebracht werden (Frohnert et al., 2011; Göb et al., 2010). Während die Funktion von SUN1 und SUN2 in somatischen Geweben weitgehend redundant erscheint (Lei et al., 2009), werden sowohl SUN1 als auch SUN2 jeweils zentrale Rollen für die Anheftung der Telomere an der Kernhülle während der Meiose von Säugern zugeschrieben, auf die später noch detaillierter eingegangen wird (Ding et al., 2007; Schmitt et al., 2007).

Nesprine:

Nesprine gehören zur Gruppe der Proteine mit einer KASH-Domäne und bilden zusammen mit den SUN-Proteinen die elementaren Bausteine des LINC-Komplexes. Nesprine stellen eine relativ diverse Gruppe von Proteinen dar. In Säugern sind bisher vier verschiedene Gene bekannt, die für die Nesprine 1-4 codieren. Diese Gene sind teilweise sehr groß und bringen mitunter eine Vielzahl alternativer

Spleißvarianten hervor. Dies führt zu einer erheblichen Diversität der Nesprine hinsichtlich ihrer Bindungspartner und Funktionen in verschiedenen Zell- und Gewebetypen (Mellad et al., 2011; Starr and Fridolfsson, 2010). Die meisten Nesprine sind in der ONM lokalisiert und binden an Bestandteile des Cytoskeletts. Es existieren aber auch Varianten, die in die INM eingebaut werden und dort mit der Lamina interagieren (Libotte et al., 2005). In einigen Modellorganismen sind meiosespezifische Funktionen der KASH-Domänen Proteine beschrieben (Alsheimer, 2009). Die Expression und die Bedeutung von Nesprinen während der Meiose von Säugern wurden bislang allerdings noch nicht eindeutig nachgewiesen.

1.2. Lamine und die Gametogenese

Keimzellen unterscheiden sich hinsichtlich der Zusammensetzung ihrer Lamina erheblich von somatischen Zellen

Die meisten differenzierten Zelltypen von Säugern exprimieren die vier Lamin-Varianten B1, B2, A und C. Sämtliche dieser „somatischen“ Lamine, mit Ausnahme von Lamin B1, wurden in männlichen Keimzellen von Säugern hingegen während der gesamten Spermatogenese nicht nachgewiesen (Vester et al., 1993). Gleichzeitig werden während der Spermatogenese mit Lamin C2 und B3 zwei keimzellspezifische Spleißvarianten exprimiert, die in somatischen Geweben nicht vorhanden sind (Furukawa and Hotta, 1993; Furukawa et al., 1994; Smith and Benavente, 1992). Dies deutet bereits auf eine besondere Rolle der Lamine und auf besondere Anforderungen an die Lamina während der Spermatogenese hin.

Sowohl Lamin C2 als auch Lamin B3 weisen gegenüber Varianten somatischer Zelltypen einen erheblich abweichenden strukturellen Aufbau auf (siehe Abbildung 3). Verglichen zu ihren jeweiligen somatischen Pendanten (Lamin C bzw. B2) zeigen sie eine deutliche N-terminale Verkürzung, die in beiden Fällen zur Abwesenheit der gesamten globulären Kopfdomäne und eines erheblichen Anteils des alpha-helikalen Mittelstücks führt. Ersetzt sind diese Domänen jeweils durch spezifische, relativ kurze N-terminale Peptidsequenzen. Im Falle von Lamin C2 ist dies das Hexapeptid GNAEGR, das als Angriffspunkt für posttranslationale Myristoylierung dient und daher für die Rekrutierung von C2 zur INM essentiell ist (Alsheimer et al., 2000). Lamin B3 hingegen trägt einen 84 AS langen N-Terminus mit bislang unbekannter Funktion, der für seinen korrekten Einbau in die Lamina unerheblich ist, da es wie alle B-Typ Lamine C-terminal farnesyliert wird (Schutz et al., 2005b). Da die in Lamin C2 und B3 deletierten Domänen für die Ausbildung von Strukturen höherer Ordnung relevant sind (vgl. Abschnitt 1.1), wurde angenommen, dass beide Isoformen sich hinsichtlich ihrer Polymerisationseigenschaften erheblich von somatischen Laminen unterscheiden. Dies wurde für Lamin B3 bereits eindeutig nachgewiesen (Schutz et al., 2005b; von Moeller et al., 2010). Die genaue Analyse der Polymerisationseigenschaften von Lamin C2 ist hingegen ein zentraler Aspekt der vorliegenden Arbeit (siehe Abschnitt 2.1.4) (Jahn et al., 2010).

Im Gegensatz zu den beschriebenen strukturellen Gemeinsamkeiten, unterscheiden sich die Expressionsmuster der Lamine C2 und B3 *in vivo* deutlich voneinander. Lamin B3 wird in der postmeiotischen Phase der Spermatogenese exprimiert. Während dieses als Spermio-genese bezeichneten Prozesses wird ihm eine wichtige Bedeutung bei der strukturellen und funktionellen Umgestaltung des Zellkerns zugeschrieben (Schutz et al., 2005a; Schutz et al., 2005b). Die Expression von Lamin C2 hingegen ist auf die meiotische Phase der Spermatogenese begrenzt (Alsheimer and Benavente, 1996). Um die in der Literatur vorgeschlagene, potentielle Funktion von Lamin C2 für die Meiose zu erläutern, gibt der folgende Abschnitt einen kurzen Abriss über die elementaren Abläufe der Meiose und die Rolle der Kernhülle in diesem Zusammenhang.

An dieser Stelle sei jedoch zunächst noch darauf hingewiesen, dass die keimzellspezifische Expression und Funktion der individuellen Lamin-Varianten bislang nahezu ausschließlich in männlichen Organismen untersucht wurde. Bis auf wenige Studien, die eine mögliche Rolle der Lamina A/C während relativ später Oogenese-Stadien untersuchten (Arnault et al., 2010), wurde vor allem im Hinblick auf die Meiose der Einfluss der Lamina auf die Keimzelldifferenzierung im weiblichen Geschlecht bislang nicht untersucht. Folglich waren die entsprechenden Zusammenhänge vor Beginn der Arbeit weitestgehend unklar. Die detaillierte Analyse und Diskussion dieser Fragestellungen ist daher ein wichtiges Thema der Dissertation.

Die Meiose ist ein zentraler Abschnitt der Differenzierung von Keimzellen

Die Meiose ist eine besondere Form der Zellteilung, die ausschließlich in Keimzellen vorkommt. Ultimatives Ziel der Meiose ist es, maternale und paternale Chromosomen eines jeden Homologenpaares exakt voneinander zu trennen und auf unterschiedliche Tochterzellen aufzuteilen, um so den Chromosomensatz der sich entwickelnden Keimzellen zu halbieren. Dadurch ist es möglich, die Menge genetischen Materials trotz der Verschmelzung zweier Keimzellen bei der Befruchtung über die Generationen hinweg konstant zu halten. Somit kann die Meiose ohne Zweifel als elementarer Abschnitt der Bildung funktioneller Keimzellen betrachtet werden und stellt wohl einen der grundlegendsten biologischen Prozesse überhaupt dar.

Während der Meiose gibt es mehrere Prozesse, die funktionell eng miteinander verzahnt sind und deren fehlerfreies Funktionieren als Ganzes essentiell für die exakte Trennung der Homologen ist (siehe Abbildung 4). Diese Prozesse sind, erstens, das Auftreten charakteristischer, **telomer-gesteuerter Chromosomenbewegungen**, zweitens, die **strukturelle Paarung der Homologen** durch die Proteinstruktur des Synaptonemalen Komplexes und, drittens, die **homologe Rekombination**, die zum reziproken Austausch genetischen Materials zwischen den Homologen führt. Diese Abläufe, die allesamt in der Prophase der ersten meiotischen Teilung (Prophase I) auftreten, sollen im Folgenden kurz anhand der fünf Unterstadien dieser ersten Prophase zusammengefasst werden.

Im **Leptotän** beginnt entlang der Chromosomenachsen die Ausbildung der axialen Elemente (AEs) des Synaptonemalen Komplexes (SC), die hauptsächlich aus den Proteinen Sycp2 (Offenberg et al., 1998) und Sycp3 (Lammers et al., 1994) bestehen. Zur regulierten Assemblierung der AEs tragen neben Sycp2 und Sycp3 vor allem meiosespezifische Kohäsin-Varianten entscheidend bei (Revenkova and Jessberger, 2005). Auch die homologe Rekombination wird im Leptotän durch die aktive Einführung von DNA Doppelstrangbrüchen (DSBs) durch die Endonuclease Spo11 initiiert (Baudat et al., 2000; Keeney et al., 1997; Romanienko and Camerini-Otero, 2000). Diese DNA DSBs werden anschließend von der zellulären DNA-Reparaturmaschinerie erkannt und prozessiert. Dadurch wird die homologe Rekombination im Verlauf der Prophase I sukzessive vorangetrieben. Außerdem ist die Initiation der Rekombination im Leptotän für die Erkennung und Paarung der Homologen essentiell (Cohen et al., 2006; Page and Hawley, 2004). Ein dritter, entscheidender Aspekt des Leptotäns betrifft die Telomere der meiotischen Chromosomen. Dabei werden die Telomere, die vor dem Eintritt in die Meiose im Nucleoplasma lokalisiert sind, während des Leptotäns an die Peripherie des Kerns rekrutiert und dort strukturell in der Kernhülle verankert. Diese Verankerung scheint mechanisch sehr stabil, da sie selbst durch harsche Bedingungen nicht zerstört wird (Moses, 1956a; Moses, 1956b; Moses, 1977; Moses and Solari, 1976).

Am Übergang zum **Zygotän** (Leptotän/Zygotän-Transition) kommt es zur dynamischen Repositionierung der Telomere innerhalb der Kernhülle. Dabei versammeln sich die Telomere in einem lokal begrenzten Bereich der Kernhülle in der Nähe des Centrosoms und ziehen die Chromosomen dadurch in eine charakteristische dreidimensionale Anordnung. Aufgrund des Erscheinungsbildes dieser Formation wird sie als „Bouquet“ („Blumenstrauß“) bezeichnet (Zickler and Kleckner, 1998). Die Ausbildung des

Bouquets ist evolutionär stark konserviert und wurde in mehr oder weniger ausgeprägter Form bisher bei allen sich sexuell fortpflanzenden Organismen gefunden. Fehler bei der Anheftung der Telomere an die Kernhülle und/oder der Formation des Bouquets resultieren in schweren Defekten der Paarung der Homologen und der homologen Rekombination (Alzheimer, 2009; Bass, 2003; Scherthan, 2001). Daher geht man davon aus, dass das Bouquet die Erkennung und Paarung der Homologen durch die Schaffung räumlicher Nähe erleichtert. Andererseits wird den dynamischen Chromosomenbewegungen bei der Ausbildung und Auflösung des Bouquets auch eine wichtige Funktion für die Vermeidung von Assoziationen zwischen nicht-homologen Chromosomen (heterologer Assoziationen) zugesprochen (Kozul and Kleckner, 2009). Zusätzlich zu diesen die Telomere betreffenden Prozessen, beginnt im Zygotän die strukturelle Verknüpfung der AEs (von nun an als laterale Elemente, LEs, bezeichnet) der homologen Chromosomen, durch transversale Filamente (TFs). Dadurch kommt es zu einer direkten strukturellen Verbindung der Homologen durch den SC (Synapse). Hauptbestandteil der TFs ist in Säugern das Protein Sycp1 (Meuwissen et al., 1992). Für die vollständige und stabile Ausbildung der Synapse sind zudem weitere Strukturproteine des SC, die zusammen das sogenannte Zentralelement (CE) bilden, hoch relevant (Bolcun-Filas et al., 2007; Bolcun-Filas et al., 2009; Hamer et al., 2008; Schramm et al., 2011). Auf der Ebene der homologen Rekombination äußert sich die Prozessierung der im Leptotän eingefügten DNA DSBs im Zygotän durch die Anwesenheit der Proteine MSH4 und RPA entlang der Chromosomenachsen. Beide Proteine werden mit der Reifung von frühen Rekombinationsknoten zu sogenannten Transitionsknoten in Verbindung gebracht (Moens et al., 2002; Moens et al., 2007; Ross-Macdonald and Roeder, 1994).

Das folgende **Pachytän** stellt den längsten Abschnitt der Prophase I dar. Hier hat sich das Bouquet bereits wieder aufgelöst, die Telomere sind jedoch weiterhin an der Kernhülle verankert. Die Synapse hat sich nun zwischen allen Chromosomenpaaren (mit Ausnahme von X und Y in Männchen) vollständig ausgebildet. In diesem Zustand bezeichnet man die Homologen auch als Bivalente. Hinsichtlich der homologen Rekombination kommt es zur Rekrutierung der Proteine MLH1 und MLH3 an die chromosomalen Achsen. Diese Proteine markieren jene Stellen, an denen es in einem als cross-over bezeichneten Vorgang zum reziproken Austausch von genetischem Material zwischen zwei Nicht-Schwesterchromatiden kommt (Baker et al., 1996; Lipkin et al., 2002). Die entsprechenden Rekombinationsintermediate werden dabei als Rekombinationsknoten bezeichnet. Aufgrund zahlreicher Studien an genetisch veränderten Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die vollständige strukturelle Paarung der Homologen durch den SC in Säugern eine unabdingbare Voraussetzung für den normalen Verlauf der homologen Rekombination und die Bildung von cross-over Strukturen darstellt (Cohen et al., 2006; Page and Hawley, 2004). Zusammen mit der oben beschriebenen Notwendigkeit der Initiation der Rekombination für die erfolgreiche Homologensuche, können die Synapse und die homologe Rekombination somit als wechselseitig stark voneinander abhängige Prozesse aufgefasst werden.

Im **Diplotän** lösen sich die Telomere von der Kernhülle. Auch der SC löst sich in dieser Phase wieder auf. Die strukturelle Verbindung der Homologen wird daher von nun an nur noch an jenen Stellen gewährleistet, an denen Rekombinationsereignisse zwischen den Homologen stattgefunden haben. Diese Stellen manifestieren sich als mikroskopisch sichtbare Überkreuzungen je zweier Nicht-Schwesterchromatiden und werden als Chiasmata bezeichnet. In weiblichen Organismen kann sich das Diplotän je nach Spezies über einen sehr langen Zeitraum von wenigen Wochen oder Monaten (z.B. Maus) bis hin zu mehreren Jahrzehnten (z.B. Mensch) erstrecken. Dieser Zeitraum wird daher auch als Dictyotän-Arrest bezeichnet.

Nachdem die Keimzellen das kurze Übergangsstadium der **Diakinese** durchlaufen haben, in dem das Chromatin seinen stärksten Kondensationsgrad erreicht und sich die Kernhülle abzubauen beginnt,

treten sie schließlich in die Metaphase I ein. Im weiteren Verlauf der ersten meiotischen Teilung (Meiose I) kommt es anschließend zur Trennung der mütterlichen und väterlichen Chromosomen in unterschiedliche Tochterzellen. Dadurch wird das genetische Material halbiert (Haploidisierung). Wie bereits angesprochen, wird der strukturelle Zusammenhalt der Homologen jenseits des Pachytäns der Prophase I nur noch durch die während der homologen Rekombination gebildeten Chiasmata gewährleistet. Die Tatsache, dass diese Verbindungen für die korrekte Orientierung der Homologen in der Metaphase I und für ihre exakte Trennung durch den Spindelapparat während der Anaphase I unabdingbar sind, erklärt den essentiellen Charakter der in der Prophase I ablaufenden Prozesse für die gesamte Meiose und damit auch für die Fertilität von Organismen. Die zweite meiotische Teilung (Meiose II) ähnelt anschließend einer „normalen“ Mitose und dient der Trennung der Schwesterchromatiden.

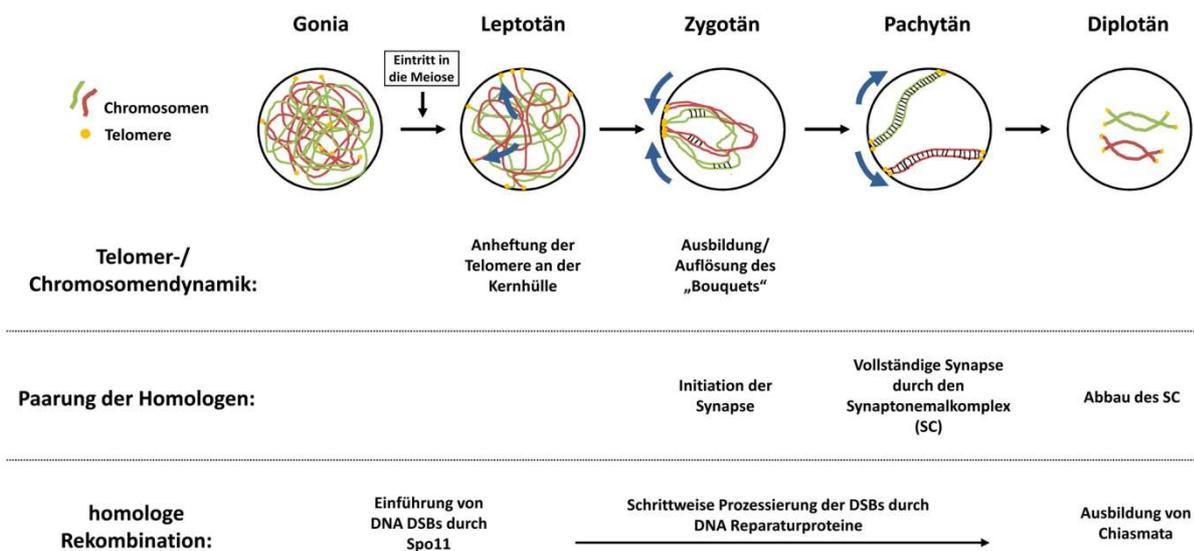


Abbildung 4. Stadien und Prozesse der Prophase I der Meiose.

Die potentielle Rolle des Lamin C2 während der Prophase I der Meiose

Der vorangegangene Abschnitt beschreibt die herausragende Bedeutung der in der Prophase I ablaufenden Prozesse für die Meiose und für die Fertilität von Individuen. Diese Prozesse betreffen unter anderem die Telomere der meiotischen Chromosomen. Früh während der meiotischen Prophase I kommt es zur strukturellen Anheftung der chromosomalen Enden an der Kernhülle. Anschließend durchlaufen die Chromosomen eine von den Telomeren angetriebene Choreographie charakteristischer Bewegungsvorgänge. Diese Choreographie ist evolutionär stark konserviert und in der großen Mehrzahl sich sexuell fortpflanzender Organismen essentiell für die exakte und fehlerfreie Paarung der Homologen und damit für das erfolgreiche Durchlaufen der Meiose insgesamt. Während in Hefen und *C. elegans* bereits einige Proteine beschrieben wurden, die für die Anheftung/dynamische Repositionierung der Telomere essentiell sind und diese Vorgänge steuern, liegen die molekularen Mechanismen dieser Prozesse in Säugern, trotz ihres hohen Stellenwerts, weitgehend im Dunkeln (Alzheimer, 2009). Die Rolle von SUN-Domänen Proteinen für die Anheftung der Telomere an der Kernhülle wurde jedoch auch für Säuger bereits beschrieben (Ding et al., 2007; Schmitt et al., 2007).

Darüber hinaus deutet sich aus mehreren Gründen eine wichtige Funktion der Lamina und speziell des meiosespezifischen A-Typ Lamins C2 für die aktive Bewegung der Telomere innerhalb der Kernhülle an (Alzheimer et al., 2011). Neben der bereits beschriebenen zeitlichen Beschränkung der Expression von Lamin C2 auf die meiotische Prophase I wurde hier vor allem die besondere Lokalisation von Lamin C2

innerhalb der Kernhülle argumentativ angeführt. Während die in somatischen Zellen vorkommenden Lamine in einem relativ homogenen, ringförmigen Muster entlang der Kernhülle lokalisieren, ist die Verteilung von Lamin C2 deutlich weniger gleichmäßig. Stattdessen ist es in diskontinuierlichen Domänen lokal angereichert. Interessanterweise findet man dabei die größte Anreicherung von Lamin C2 an jenen Stellen der Kernhülle, an denen die Telomere der meiotischen Chromosomen angeheftet sind. Mit anderen Worten scheinen die Telomere während der Prophase I der Meiose in Lamin C2-Domänen „eingebettet“ (Alzheimer et al., 1999). Auf diese Besonderheit und die oben beschriebene N-terminale Verkürzung von Lamin C2 gründet sich die Hypothese, dass Lamin C2 die Kernhülle um die Anheftungsstellen der Telomere herum in einer Weise modulieren könnte, die die aktiven Bewegungen der Telomere unterstützt oder überhaupt erst ermöglicht. Somit könnte Lamin C2 auch einen entscheidenden Einfluss auf die Paarung der Homologen und die homologen Rekombination während der Meiose ausüben. Diese Fragestellungen experimentell zu untersuchen, und die Beschaffenheit der potentiellen strukturellen Modulation der Kernhülle durch Lamin C2 genauer zu definieren, ist ein zentrales Thema dieser Arbeit. Die entsprechenden Ergebnisse werden in Teil A zusammengefasst und diskutiert.

1.3. Lamine und Lamin-assoziierte Krankheiten

Laminopathien sind schwerwiegende genetische Krankheiten, die durch Mutationen in A-Typ Laminen verursacht werden

Neben der speziellen Rolle der Lamina für die Entstehung von funktionalen Keimzellen besitzen Lamine durch ihre Bedeutung für zahlreiche grundlegende zelluläre Prozesse auch in anderem Zusammenhang hohe klinische Relevanz. Wie man heute weiß, sind Mutationen in Laminen Auslöser einer Reihe klinischer Syndrome, die kollektiv als Laminopathien zusammengefasst werden (Capell and Collins, 2006; Dauer and Worman, 2009). Diese schwerwiegenden genetischen Krankheiten verursachen massive körperliche Beeinträchtigungen und schließen eine mitunter starke Verminderung der Lebenserwartung ein. Die weitaus größte Anzahl krankheitsauslösender genetischer Veränderungen betreffen dabei das *LMNA*-Gen, das im Menschen für A-Typ Lamine codiert. Mittlerweile sind über 280 verschiedene Mutationen im *LMNA*-Gen bekannt, die mehr als 10 voneinander abgrenzbare Syndrome verursachen (www.umd.be/LMNA/). Die physiologischen und pathophysiologischen Funktionen der Lamina zu verstehen und dadurch die molekularen Mechanismen der Laminopathien zu entschlüsseln, ist daher eine große wissenschaftliche Herausforderung und eine dringende medizinische Notwendigkeit.

Der erste experimentelle Nachweis dafür, dass Veränderungen in Lamin-codierenden Genen tatsächlich Ursache von humanen Krankheiten sind, gelang Bonne und Kollegen (1999), die vier verschiedene Mutationen in *LMNA* mit der Entstehung der autosomal-dominanten Form der Emery-Dreifuss Muskeldystrophie (EDMD) in direkten Zusammenhang bringen konnten. Die Symptome der EDMD konzentrieren sich vor allem auf die Skelettmuskulatur, die von progressiver Schwäche und Muskelschwund betroffen ist, sowie auf das Herz. Nachfolgende Studien fanden weitere *LMNA*-Mutationen, die ebenfalls schwere Krankheitsbilder von Herz- und Skelettmuskulatur auslösen (dilatative Cardiomyopathie, DCM und Gliedergürtel Muskeldystrophie, LGMD) (Fatkin et al., 1999; Muchir et al., 2000). Anschließend wurden zudem Mutationen des *LMNA*-Gens beschrieben, die primär krankhafte Veränderungen von neuronalem Gewebe bzw. Fettgewebe hervorrufen. Dies betrifft einerseits den Morbus Charcot-Marie-Tooth, ein peripheres Nervenleiden, das mit erheblichen motorischen Beeinträchtigungen verbunden ist, sowie eine bestimmte Form der erblich bedingten Lipodystrophie (familiäre partielle Lipodystrophie, Typ Dunnigan), die pathologische Veränderungen des Unterhautfettgewebes und damit assoziierte schwere Stoffwechselstörungen einschließt (De Sandre-Giovannoli et al., 2002; Shackleton et al., 2000). Eine weitere und wohl zugleich eine der gravierendsten Lamin-assoziierten Störung betrifft das Hutchinson-Gilford Progeria Syndroms (HGPS). Dieses Krankheitsbild, das durch fehlerhaftes Spleißen des *LMNA*-Gens und die dadurch bedingte Expression der permanent farnesylierten Lamin A Mutante „Progerin“ verursacht wird (De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003), manifestiert sich im Auftreten von Phänomenen, die auch Kennzeichen des natürlichen Alterungsprozesses sind (u.a. Haarausfall, Fehlsichtigkeit, reduziertes Unterhautfettgewebe, erhöhtes Risiko der Arteriosklerose). Diese Merkmale treten beim HGPS allerdings in einem pathologischen Zeitrahmen auf, der gegenüber dem natürlichen Altern erheblich beschleunigt ist. Dies führt zu einer sehr kurzen mittleren Lebenserwartung der Betroffenen von etwa 12 Jahren (Hennekam, 2006). Ob es sich bei den Symptomen der HGPS tatsächlich um beschleunigtes, physiologisches Altern handelt oder ob sich die Mechanismen des Alterns durch HGPS von der natürlichen Situation grundsätzlich unterscheiden, ist momentan noch weitgehend unklar. Neben den beschriebenen Laminopathien sind weitere Syndrome bekannt, die durch Mutationen im *LMNA*-Gen ausgelöst werden und in Tabelle 1 zusammengefasst sind.

	Krankheit	LMNA Mutation	Effekt auf Proteinebene	Klinische Symptome	Refs.
„vorzeitiges Altern“	Hutchinson-Gilford Progeria Syndrom (HGPS)	meist <i>de novo</i> C→T Mutation in Codon 608 (Exon 11); Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle	Deletion von 50 AS im C-terminalen Bereich des Prä-Lamin A; dadurch Verlust der Zmpste24-Spaltstelle und Entstehung der permanent farnesylierten Lamin Mutante „Progerin“	Symptome des Alterns: Haarausfall, Verlust von Unterhautfettgewebe und Arteriosklerose; mittlere Lebenserwartung 12 Jahre; Todesursache häufig Herzinfarkt oder Schlaganfall	(De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003; Hennekam, 2006)
	Atypisches Werner Syndrom	drei dominante Mutationen bekannt (A57P, R133L, L140R)	unklar; möglicherweise veränderte Interaktion mit Bindungspartnern	Symptome des vorzeitigen Alterns im frühen Erwachsenenalter: ergrauendes Haar, Sklerodermie, Grauer Star, Arteriosklerose	(Chen et al., 2003)
Myopathien	Autosomal dominante Emery-Dreifuss Muskeldystrophie (AD-EDMD)	zahlreiche „Missense“-Mutationen, die über das gesamte LMNA-Gen verteilt sind	meist vermutlich fehlerhafte Faltung oder fehlerhaftes Lamin-Assembly; dadurch teilweiser oder vollständiger Funktionsverlust	Progressive Muskelschwäche, Muskelschwund der Skelettmuskulatur und Cardiomyopathie mit Störungen der Erregungsleitung	(Bonne et al., 1999; Brown et al., 2001; Emery, 2002)
	Dilatative Cardiomyopathie Typ 1A (DCM, autosomal dominant)	mehr als 20 bekannt; meist „Missense“-Mutationen in Exon 1 oder 3	unklar; Mutationen betreffen häufig die N-terminale Kopfdomäne oder das α -helikale Mittelstück	Vergrößerung der Herzkammern, systolische Funktionseinschränkung, Herzrhythmusstörungen	(Fatkin et al., 1999; Lu et al., 2011)
	Gliedergürtel-Muskeldystrophie Typ 1B (LGMD, autosomal dominant)	mehrere „Missense“-Mutationen; außerdem synonyme G→A Austausch in Codon 171 (c.513 G→A)	unklar für die meisten Allele; synonyme c.513G→A Mutation führt zu anormalem Spleißen und Insertion 15 zusätzlicher AS	progressive Muskelschwäche und Muskelschwund im Schulter- und Beckenbereich; spät auftretende Herzfehler	(Muchir et al., 2000; Todorova et al., 2003)
Neuropathie	Morbus Charcot-Marie-Tooth Typ 2B1 (CMT, autosomal rezessiv)	bislang nur eine Mutation bekannt (R298C)	betrifft die zentrale α -helikale Domäne; verursacht wahrscheinlich fehlerhaftes Lamin-Assembly	motorische Defekte der unteren Extremitäten, unsicherer Gang, sekundäre Deformationen der Füße und Ausfall/Reduktion von Sehnen-Reflexen	(De Sandre-Giovannoli et al., 2002; Tazir et al., 2004)

Lipodystrophie	Familiäre partielle Lipodystrophie, Typ Dunnigan (FPLD, autosomal dominant)	„Missense“-Mutationen in Exon 8/11; besonders häufig in Codon 482 (Exon 8)	Mutationen liegen im Immunglobulin-ähnlichen Bereich (Ig-Fold) und stören die Interaktion mit Bindungspartnern wie z.B. SREBP 1a/c	Verlust von Fettgewebe kopfabwärts (v.a. Extremitäten), gleichzeitig Anreicherung an Hals und Gesicht; Insulin-Resistenz; Erhöhung des Triglycerid-Spiegels im Blut, dadurch Neigung zu Arteriosklerose	(Cao and Hegele, 2000; Lloyd et al., 2002; Shackleton et al., 2000; Speckman et al., 2000)
andere Syndrome	Mandibulo-akrale Dysplasie (MAD)	<i>LMNA</i> : meist R527H (autosomal rezessiv), seltener A529V oder K542N; MAD tritt ebenfalls häufig durch Mutationen in <i>ZMPSTE24</i> auf	unklar; Mutationen clustern im C-terminalen Bereich und modulieren daher wahrscheinlich die Interaktionen mit anderen Proteinen	diverse Anomalien (postnatale Wachstumsstörungen, Anomalien der Zähne, Fehlbildung von Unterkiefer und Schlüsselbein, Akroosteolyse) häufig assoziiert mit Symptomen der Lipodystrophie und des vorzeitigen Alterns (z.B. Haarausfall, Hautveränderung)	(Agarwal et al., 2003; Novelli et al., 2002)
	Restriktive Dermopathie (RD)	<i>de novo</i> Mutationen in <i>LMNA</i> , führen zu Spleißdefekt und Verlust von Exon 11; Ursache der RD sind häufig auch rezessive Null-Mutationen in <i>ZMPSTE24</i>	Verlust des <i>LMNA</i> Exon 11 führt zur Entstehung einer verkürzten Prä-Lamin A Mutante, der die <i>Zmpste24</i> -Spaltstelle zur Entfernung des farnesylierten C-Terminus fehlt (ähnlich Progerin)	erhebliche fötale Fehlbildungen: retardiertes Wachstum im Mutterleib, Ausgeprägte Anomalien der Haut (v.a. zu „enge“ und rigide Haut), dadurch starke Einschränkung der Kindsbewegung im Mutterleib; meist perinataler Tod durch Ateminsuffizienz	(Moulson et al., 2005b; Navarro et al., 2005b; Navarro et al., 2004)

Tabelle 1. Übersicht klinisch relevanter Laminopathien, die durch Mutation in *LMNA* entstehen. Tabelle nach Capell und Collins (2006).

Die Suche nach einem mechanistischen Modell zur Entstehung der Laminopathien

Wie der vorangegangene Abschnitt verdeutlicht, betreffen die klinischen Symptome der Laminopathien eine Reihe verschiedener Gewebe – vor allem Muskel- und Fettgewebe, seltener aber auch neuronales oder anderes Gewebe wie zum Beispiel Knochen oder Haut – und schließen teilweise sogar das Phänomen des „beschleunigten Alterns“ ein. Aus dieser Beobachtung ergibt sich eine scheinbar paradoxe Situation und zugleich eine entscheidende Frage zur Pathogenese Lamin-assoziiierter Krankheiten: „Wie ist es möglich, dass Veränderungen ubiquitär exprimierter Proteine (Lamin A/C) Störungen auslösen, die sich derart mannigfaltig äußern und zugleich je nach Krankheitsbild hoch spezifisch für einzelne Gewebe- und Zelltypen sein können?“ In der Beantwortung dieser Fragestellung liegt wohl der Schlüssel zum Verständnis der Laminopathien und zur Etablierung eines einheitlichen, mechanistischen Modells zur Pathogenese dieser Krankheiten. In der Literatur wurden daher bereits zahlreiche Vorstellungen und Vorschläge in diesem Zusammenhang geäußert (Capell and Collins, 2006; Dauer and Worman, 2009; Ho and Lammerding, 2012). Trotz gewisser Abweichung bezüglich einiger

Details, ist dabei der Grundtenor der vorgeschlagenen Modelle relativ ähnlich und konzentriert sich auf etwa drei grundlegende Erklärungsmöglichkeiten, die sich gegenseitig ergänzen und im Folgenden in ihren wesentlichen Eckpunkten kurz zusammengefasst werden.

„Mechanische-Stress-Hypothese“:

Diese Hypothese stützt sich einerseits auf ein häufig beschriebenes, vereinheitlichendes Kennzeichen vieler Laminopathien: das Auftreten von deformierten Zellkernen („misshapen nuclei“). Diese unterscheiden sich durch zahlreiche lokale Ausbeulungen („blebbings“) erheblich von der runden oder ovalen Form normaler Zellkerne (Worman et al., 2009). Zudem wurde im konkreten Fall der EDMD eine erhebliche Fragilität von Zellkernen auf ultrastruktureller und biochemischer Ebene dokumentiert (Fidzianska and Hausmanowa-Petrusewicz, 2003; Fidzianska et al., 1998; Markiewicz et al., 2002). Darüber hinaus konnte im Mausmodell eine entscheidende Beteiligung der Lamina A/C an der Aufrechterhaltung der mechanischen Stabilität des Zellkerns nachgewiesen werden (Broers et al., 2004; Lammerding et al., 2004; Sullivan et al., 1999). Die Mechanische-Stress-Hypothese schlägt aufgrund dieser und weiterer Beobachtungen vor, dass ein Teil des Phänotyps der Laminopathien dadurch entsteht, dass Zellkerne durch mechanische Überbelastung „zerreißen“ oder zumindest so erheblich beschädigt werden, dass die Aufrechterhaltung lebensnotwendiger zellulärer Funktionen nicht länger möglich ist. Diese Ansicht wirkt vor allem für Gewebe und Organe sinnvoll, die tatsächlichen großen physikalischen Kräften ausgesetzt sind (wie Herz oder Skelettmuskel). Die bei Laminopathien auftretenden krankhaften Veränderungen mechanisch weniger stark belasteter Gewebe (wie zum Beispiel Fettgewebe) kann das mechanische Modell dagegen weniger gut erklären. Außerdem wurde für Zellen von HGPS-Patienten gezeigt, dass Progerin exprimierende Kerne eine mechanische Rigidität aufweisen, die sogar größer ist als die von Kernen gesunder Patienten (Dahl et al., 2006). Während die Mechanische-Stress-Hypothese somit einen Teil der Phänotypen mancher Laminopathien (wie zum Beispiel EDMD) gut erklären kann, ist sie für ein vereinheitlichendes Erklärungskonzept hingegen alleine nicht ausreichend.

„Genregulations-Hypothese“:

Die Genregulations-Hypothese postuliert, dass die durch *LMNA*-Mutationen verursachte Störung von Interaktionen der Lamina mit gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren und anderen gewebespezifischen Modulatoren der Genexpression eine zentrale Ursache des Auftretens von Laminopathien sind. Die große Bedeutung der Lamina für die Regulation der Genexpression unter physiologischen Zuständen ist durch eine Vielzahl von Studien unzweifelhaft belegt. So interagieren Lamine *in vitro* beispielsweise sowohl direkt mit DNA, als auch mit Histonen und anderen Chromatinproteinen (Glass et al., 1993; Stierle et al., 2003; Taniura et al., 1995). Zudem trägt die Lamina *in vivo* zur Organisation und Aufrechterhaltung von transkriptionell inaktiven Heterochromatin-Domänen bei (Pickersgill et al., 2006). Eine Reihe neuer Studien zeigen darüber hinaus, dass Lamine direkt an der Regulation zellulärer Signalkaskaden beteiligt sind, die die Genexpression auf transkriptioneller Ebene kontrollieren (Andres and Gonzalez, 2009). Im Einklang mit der Genregulations-Hypothese zeigen sich unter Laminopathie-assoziierten, pathologischen Bedingungen tatsächlich deutliche Veränderungen der Chromatinorganisation und der Regulation von intrazellulären Signalwegen. Dies betrifft zum einen den für HGPS und mehrere andere Laminopathien beschriebenen Verlust von peripherem Heterochromatin und dadurch verursachte Veränderungen der Genaktivität auf globaler Ebene (Capanni et al., 2003; Filesi et al., 2005; Goldman et al., 2004; Shumaker et al., 2006). Andererseits wurde auf einer spezifischeren Ebene der Genregulation beispielsweise für die EDMD auch eine verstärkte Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs nachgewiesen (Muchir et al., 2007a; Muchir et al., 2007b). Ein wesentlicher zusätzlicher Aspekt der Genregulations-Hypothese ist außerdem der durch

Veränderungen der Genaktivität ausgeübte Einfluss der Lamina auf die Differenzierung von Vorläuferzellen. Ein solcher Zusammenhang wurde beispielsweise für die in der FPLD auftretende fehlerhafte Differenzierung von Adipocyten hergestellt. Hierbei wurden Störungen von Interaktionen mutierter Lamin A-Varianten mit dem adipocyten-spezifischen Transkriptionsfaktor SREBP1 als Ursache fehlerhafter Differenzierungsprozesse beschrieben (Lloyd et al., 2002).

„DNA-Damage-Modell“:

Eine weitere plausible Möglichkeit, die Entstehung von Laminopathien zu erklären, ist die Annahme, dass eine Reihe zentraler Symptome durch die massive und andauernde Beschädigung von DNA verursacht werden könnte. Da latente und irreparable DNA-Schäden auch als eine Hauptursache physiologischer Alterungsprozesse gelten, ist das „DNA-Damage-Modell“ besonders für solche Krankheiten hoch interessant, die sich unter anderem durch beschleunigtes Altern auszeichnen (wie zum Beispiel HGPS oder MAD). Die verstärkte Aktivierung von Signalwegen zur Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden, sowie eine mit DNA-Schäden assoziierte, allgemeine genomische Instabilität konnte in einigen Laminopathie-Modellen bereits tatsächlich experimentell nachgewiesen werden (Liu et al., 2005; Pendas et al., 2002). Eine biochemische Hauptursache genomischer Schäden sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die DNA chemisch verändern und dadurch schädliche Mutation hervorrufen können. Im Einklang mit dem „DNA-Damage-Modell“ zeigen neuere Studien interessanterweise, dass bestimmte konservierte Cysteinreste im C-terminalen Bereiche von Lamin A an der Eliminierung von ROS beteiligt sind (Pekovic et al., 2011). Eine Übersicht über neueste Trends zur Bedeutung der Lamina für die Stabilität des Genoms geben beispielsweise Warren und Shanahan (2011) oder Hutchison (2012).

Das *Lmna*^{-/-} Mausmodell und sein Beitrag zum Verständnis der Laminopathien

Der vorangegangene Abschnitt beschreibt sich gegenseitig ergänzende Modellvorstellungen und Studien, die zum aktuellen Verständnis der Mechanismen der Laminopathien entscheidend beitragen. Vieler der zitierten Arbeiten stützen sich dabei auf Untersuchungen entsprechender Mausmodelle. Eines der wichtigsten und am häufigsten verwendeten Modellsysteme im Feld der Laminopathien und der Kernhülle ist wohl die *Lmna*^{-/-} Mauslinie. Diese wurde 1999 von Sullivan und Kollegen durch einen klassischen Gene-targeting Ansatz mit dem Ziel hergestellt, ein A-Typ Lamin-defizientes Mausmodell zu erzeugen. Die ursprüngliche Charakterisierung dieser Mäuse beschrieb mehrere Phänomene, die den Symptomen der menschlichen EDMD ähneln (z.B. Muskelschwäche und Muskelschwund, schwere Symptome von Cardiomyopathie, fehlerhafte Lokalisation von Emerin) und prädestinierte *Lmna*^{-/-} Mäuse daher als wichtiges Modellsystem für die autosomal-dominante Form (AD-EDMD) dieser Krankheit (Sullivan et al., 1999). Seitdem wurden *Lmna*^{-/-} Mäuse und daraus hergestellt Zelllinien (v.a. *Lmna*^{-/-} MEFs) außerdem in zahlreichen weiteren Studien verwendet, die eine Fülle wichtiger Aspekte der Funktionen von A-Typ Laminen untersuchten (siehe auch Abschnitt 3.2). Bisher wurde die Arbeit von Sullivan et al. (1999) mehr als 500mal zitiert.

Zur Herstellung der *Lmna*^{-/-} Mauslinie wurde ein Targeting-Konstrukt so in das murine *Lmna*-Gen eingebracht, dass die Exons 8 bis 11 durch eine Neomycin-Resistenzkassette ersetzt und somit deletiert wurden. Da die Exons 8-11 in allen bisher beschriebenen Spleißvarianten des *Lmna*-Gens (A, AΔ10, C und C2) enthalten sind (Nakajima and Abe, 1995), sollte dies die Expression aller A-Typ Lamine vollständig eliminieren. Das erfolgreiche Targeting des *Lmna*-Gens wurde experimentell unter anderem mittels Immunblot kontrolliert. Da hierbei weder eine Expression von „Vollelänge“ Lamin A/C noch von verkürzten *Lmna*-Genprodukten nachgewiesen werden konnte, wird die von Sullivan und Kollegen (1999) hergestellte Mauslinie seither als „Null-Modell“ angesehen und in der Literatur entsprechend als „*Lmna*^{-/-}“, „*Lmna*-knock out“ oder „*Lmna*-null“ bezeichnet.

Wie in vielen anderen Studien, sollten *Lmna*^{-/-} MEFs auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit als A-Typ Lamin-defizientes Modellsystem verwendet werden. Überraschender Weise wurden dabei einige unerwartete Beobachtungen gemacht die, entgegen der ursprünglichen Beschreibung von Sullivan et al. (1999), doch stark für die Persistenz eines verkürzten *Lmna*-Genprodukts in der *Lmna*^{-/-}-Mauslinie sprachen. Diese Beobachtungen ließen somit erste Zweifel daran aufkommen, dass es sich bei der untersuchten Zelllinie tatsächlich um eine echtes „Null-Modell“ handelte. Um diesen wichtigen Sachverhalt vollständig aufzuklären wurde daher im Rahmen der vorliegenden Dissertation eine Vielzahl detaillierter Untersuchungen an *Lmna*^{-/-} MEFs und *Lmna*^{-/-} Mäusen durchgeführt, die diverse methodische Ansätze (RT-PCR, Immunocyto-/histochemie, Immunblot, biochemische Methoden und Massenspektrometrie) einschlossen. In der Zusammenschau dokumentieren diese Versuche nun unzweifelhaft, dass in der *Lmna*^{-/-} Mauslinie, entgegen aller Erwartungen, doch eine verkürzte Lamin A Mutante exprimiert wird, die bisher trotz der häufigen Verwendung dieses Modellsystems übersehen wurde. Die präzise Charakterisierung dieser Lamin A Mutante sowie eine abschließende Einordnung der gewonnenen Erkenntnisse in den Kontext der aktuellen Modellvorstellungen zur Entstehung der Laminopathien beinhaltet Teil B der Arbeit.

2. Teil A: Die Rolle des verkürzten A-Typ Lamins C2 während der Oogenese der Maus

2.1. Ergebnisse

2.1.1. Das Expressionsmuster von A-Typ Laminen während der Oogenese

Das Expressionsmuster der verschiedenen Isoformen von A- und B-Typ Laminen und die präzise Beschreibung ihrer Funktionen während der Spermatogenese von Säugern sind bereits seit einigen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Entsprechend wurden in diesem Zusammenhang bereits viele wichtige Fragestellungen in der Literatur diskutiert (Alzheimer et al., 2011) (siehe auch Abschnitt 1.2). Im deutlichen Gegensatz dazu wurde die zeitliche Expression der Lamine während der Oogenese im Säuger bislang kaum untersucht. Demzufolge ist die Bedeutung der Lamina für die Entwicklung weiblicher Keimzellen weitestgehend unklar. Unbekannt war in diesem Zusammenhang vor allem auch, ob und wann die Lamin-Isoform C2 während der Meiose in weiblichen Säugern exprimiert wird und welche Rolle sie in diesem Prozess eventuell spielt. Diese Fragestellungen zu untersuchen, war daher ein zentraler Aspekt der vorliegenden Arbeit.

Die immunhistochemische Analyse embryonaler Ovarien zeigt, dass A-Typ Lamine während der Meiose in Weibchen Stadien-spezifisch exprimiert werden

Zunächst wurde die räumliche und zeitliche Expression der A-Typ Lamine während der weiblichen Meiose untersucht. Dazu wurde embryonales Ovar wildtypischer CD1-Mäuse zwischen 14,5 dpf und 18,5 dpf immunhistochemisch analysiert. Während dieser Zeitspanne durchlaufen die Oocyten die verschiedenen Stadien der Prophase der ersten meiotischen Teilung. Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten an 3 µm dünnen Paraffinschnitten nach 10 minütigem „Antigen-unmasking“ mit einem A-Typ Lamin-spezifischen Antikörper (pAb bs-01). Gleichzeitig wurden die Synaptonemalkomplexe (SC) der meiotischen Keimzellen mit einem anti-Sycp3 Antikörper markiert. So konnte das Stadium der Prophase I, in dem sich die untersuchten Oocyten zum jeweiligen Zeitpunkt befanden, genau definiert werden. Neben den durch anti-Sycp3 Immunfärbung markierbaren Keimzellen, besteht das Ovar außerdem aus somatischen Zellen, die kein Sycp3 exprimieren. Da die Kernhülle dieser somatischen Zellen des Ovars in allen untersuchten Stadien mit pAb bs-01 stark gefärbt wurden, konnten diese Zellen als Positivkontrolle für die Qualität und die Intensität der A-Typ Lamin-spezifischen Färbung herangezogen werden.

Mit dem beschriebenen experimentellen Set-up war in Leptotän-Oocyten (14,5 dpf, Abbildung 5A und A') keine Expression von A-Typ Laminen nachweisbar. An Tag 15,5 dpf befanden sich die meisten untersuchten Oocyten im Zygotän (Abbildung 5B und B'). Hier wurde auf einem Teil der Oocyten eine schwache, diskontinuierliche A-Typ Lamin-Färbung der Kernhülle erkennbar (Sterne in Abbildung 5B). An Tag 16,5 dpf trat diese diskontinuierliche Kernhüllenfärbung stärker hervor und war nun in praktisch allen untersuchten Oocyten, die sich zu diesem Zeitpunkt in ihrer großen Mehrzahl im frühen Pachytän befanden, deutlich sichtbar (Abbildung 5C und C'). Die A-Typ Lamin-spezifische Kernhüllenfärbung der Oocyten blieb auch im mittleren Pachytän (17,5 dpf, Abbildung 5D und D') und späten Pachytän (18,5 dpf, Abbildung 5E und E') erhalten. In einigen Pachytän-Oocyten zeigte das Fluoreszenzsignal zudem eine deutliche Polarisierung innerhalb der Kernhülle (Stern in Abbildung 5D). In Tag 18,5 dpf-Präparaten waren zusätzlich zu den späten Pachytän-Oocyten auch Keimzellen erkennbar, die sich bereits im Diplotän der Prophase I befanden. Diese Diplotän-Oocyten wiesen verglichen mit früheren Prophase I-

Stadien (Zygotän und Pachytän) eine gleichmäßigere A-Typ Lamin Fluoreszenz entlang der Kernhülle auf (Abbildung 5F und F'). Ein weiterer wichtigster Aspekt dieser Diplotän-Oocyten war zudem, dass hier das Lamin A-spezifische Fluoreszenzsignal im Vergleich zu früheren Stadien (Zygotän und Pachytän) noch deutlich stärker war.

Zusammenfassend lassen diese Beobachtungen folgende Interpretation zu. (1) Oocyten exprimieren vom Zygotän bis zum Pachytän ein A-Typ Lamin, das relativ diskontinuierlich innerhalb der Kernhülle verteilt ist. Obwohl der verwendete A-Typ Lamin-Antikörper (bs-01) neben Lamin C2 auch die somatischen Lamine A und C erkennt, spricht sowohl die Art dieser Lokalisation (diskontinuierliche Verteilung), als auch ihr zeitlicher Verlauf (Auftreten im Zygotän/Pachytän) dafür, dass die gezeigte A-Typ Lamin-spezifische Färbung die Expression von Lamin C2 (und nicht von Lamin A/C) widerspiegelt. Beide Eigenschaften sind für die Expression von Lamin C2 während der Meiose in Männchen klar belegt (Alsheimer and Benavente, 1996; Furukawa et al., 1994; Smith and Benavente, 1992). (2) Ab dem Diplotän der weiblichen Meiose wurde ein A-Typ Lamin-spezifisches Signal nachgewiesen, das homogen entlang der Kernhülle verteilt war und dessen Intensität deutlich stärker war als das früherer Prophase I-Stadien. In dieser Hinsicht unterscheiden sich Oocyten somit deutlich von männlichen Keimbahnzellen, da im Diplotän der männlichen Prophase I die Expression von Lamin C2 stark abnimmt und andere A-Typ Lamine (A und C) während der gesamten Meiose in Männchen nicht nachweisbar sind (Alsheimer and Benavente, 1996; Vester et al., 1993). Diese Ergebnisse wiesen daher bereits auf einen bisher nicht beschriebenen sexuellen Dimorphismus hinsichtlich der Expression von A-Typ Laminen in der Meiose hin. Zudem sprach vor allem die kontinuierliche Lokalisation der nachgewiesenen A-Typ Lamin-Färbung im Diplotän dafür, dass diese Färbung die Expression der somatischen Lamine A/C (und nicht C2) widerspiegelte, da beide Isoformen in allen bisher untersuchten Zellen und Geweben in einem solchen gleichmäßigen Muster lokalisieren.

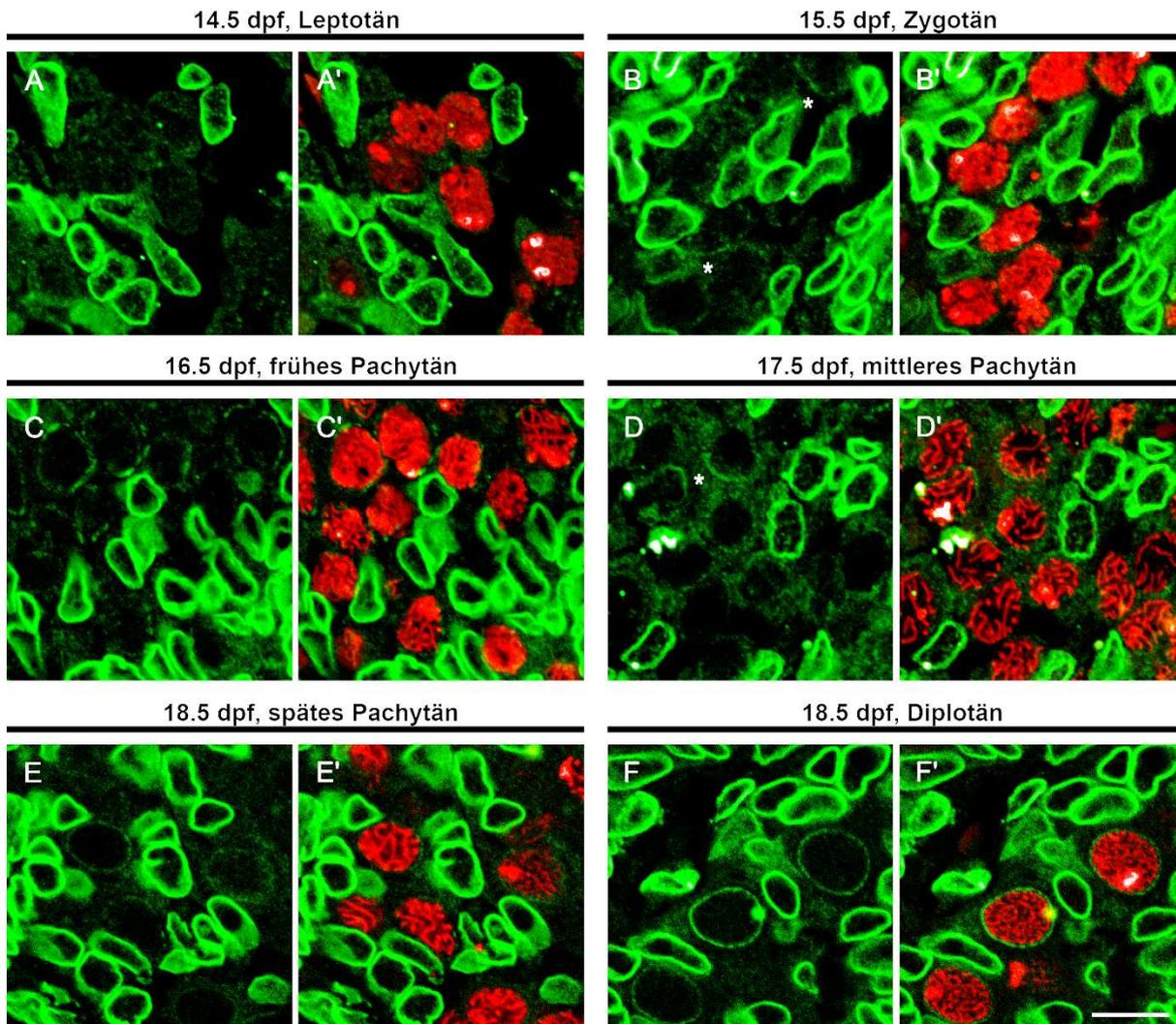


Abbildung 5. Immunhistochemische Analyse embryonaler CD1-Ovarien. 3 µm Paraffinschnitte. Doppellokalisierung mit Kaninchen anti-Lamin A/C (pAb bs-01; grün) und Meerschwein anti-Sycp3 (Serum #21, rot). Die Auswertung der Präparate erfolgte am CLSM. A-F zeigen jeweils nur den grünen Kanal, A'-F' jeweils die Überlagerung von rot und grün. Vom Zygotän bis zum späten Pachytän (B-E) wird in Oocyten eine schwache, diskontinuierliche Färbung der Kernhülle mit pAb bs-01 (grün) sichtbar. Im Diplotän wird die A-Typ Lamin-Färbung der Oocyten-Kernhülle gleichmäßiger und intensiver (F). Die Kernhüllen somatischer Zellen (Sycp3-negativ) werden in allen Präparaten deutlich von pAb bs-01 markiert. Größenbalken 10 µm.

Um auszuschließen, dass die A-Typ Lamin-spezifische Färbung in Diplotän-Oocyten doch auf die Expression von Lamin C2 in diesen Zellen zurückführen sein könnte, wurden weitere Versuche durchgeführt. Dazu wurden Ovarien von 11 Tage (post partum) alten Mäusen wie oben beschrieben immunhistochemisch untersucht. Es wurden dabei wildtypische Ovarien mit denen von Lamin C2-defizienten Mäusen (Schmitt, 2008, Dissertation; weitere Details zum Modellsystem siehe unten) verglichen. Der Vorteil gegenüber dem zuvor beschriebenen Versuch lag dabei darin, dass nun die beobachteten A-Typ Lamine spezifischen Signale nicht mehr auf die Expression von Lamin C2, sondern ausschließlich auf die der Lamine A/C (oder bisher unbekannter Isoformen) zurückzuführen sein konnten. Die Verwendung von 11 Tage (post partum) alten Mäusen hatte außerdem den Vorteil, dass sich hier alle Oocyten des Ovars bereits im Diplotän (Dictyotän-Arrest) der Meiose befanden. Im Einklang mit der oben beschriebenen Vermutung, dass Diplotän-Oocyten die Lamine A/C (und nicht Lamin C2) exprimieren, trat eine A-Typ Lamin-spezifische Färbung der Kernhülle sowohl in wildtypischen Diplotän-Oocyten als auch in Lamin C2-defizienten Diplotän-Oocyten auf (Abbildung 6).

Dabei waren die Intensitäten der auftretenden Färbungen zwischen den verschiedenen Genotypen nicht voneinander unterscheidbar. Somit belegen die hier gezeigten Daten einen bisher nicht bekannten sexuellen Dimorphismus hinsichtlich der Expression der Lamine A/C in der Meiose von Säugern. Während über mögliche Funktionen der Lamine A/C in der Oogenese im Diskussionsteil spekuliert wird, beschäftigt sich der folgende Abschnitt des Ergebnisteils mit der detaillierten *in vivo* Analyse der Bedeutung von Lamin C2 für die Meiose in Weibchen.

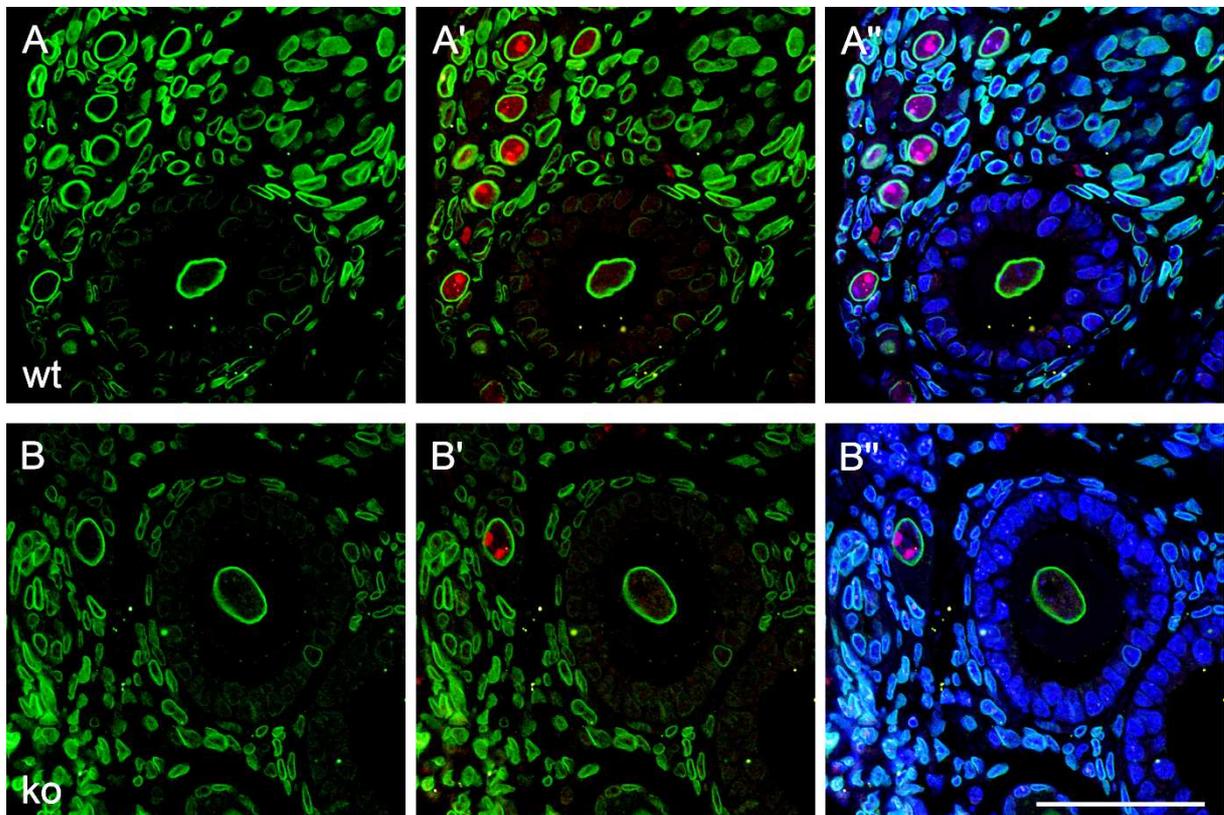


Abbildung 6. Immunhistochemische Analyse von Ovarien 11 Tage alter wildtypischer und Lamin C2-defizienter Mäuse. 3 µm Paraffinschnitte. Doppellokalisation mit Kaninchen anti-Lamin A/C (pAb bs-01; grün) und Meerschwein anti-Sycp3 (Serum #21, rot). DNA wurde mit Hoechst-33258 gefärbt (blau). Die Auswertung der Präparate erfolgte am CLSM. (A-A'') Ovar einer wildtypischen Maus. (B-B'') Ovar einer Lamin C2-defizienten Maus. Alle Oocyten befinden sich im Diplotän der Meiose (Dictyotän-Arrest). Dabei werden Oocyten in frühen Phasen des Dictyotän-Arrests noch durch anti-Sycp3-Färbung markiert (siehe rotgefärbte Aggregate in A' und B'). Späteren Phasen des Dictyotän-Arrests, in denen die Follikelreifung bereits weiter vorangeschritten ist, sind an den deutlich größeren Oocyten und den sie umgebenden somatischen Follikelzellen (schwache A-Typ Lamin-Färbung) erkennbar. In Lamin C2-defizienten Ovarien ist die A-Typ Lamin-spezifische Färbung der Oocyten-Kernhülle nicht vom Wildtyp unterscheidbar. Größenbalken 10 µm.

2.1.2. In Lamin C2-defizienten Oocyten ist die Synapse der homologen Chromosomen gestört

Während die Expression und die biologische Bedeutung der A-Typ Lamine in der Oogenese von Säugern ein vor Beginn dieser Arbeit völlig unbearbeitetes Feld darstellte, war die Untersuchung der Funktion von keimzellspezifischen Lamin-Isoformen in der männlichen Keimbahn schon relativ weit vorangeschritten. In diesem Zusammenhang wurde in der Arbeitsgruppe Alsheimer/Benavente bereits ein Lamin C2-defizientes Mausmodell hergestellt (Schmitt, 2008, Dissertation). Zudem wurde der Phänotyp der Männchen dieser Mauslinie bereits im Detail charakterisiert. Übereinstimmend mit der Auffassung, dass Lamin C2 eine keimzellspezifische Lamin-Variante ist, die in somatischen Geweben

nicht exprimiert wird, zeigten Lamin C2-KO Mäuse in diesen Studien keinen somatischen Phänotyp (Schmitt, 2008, Dissertation). Lamin C2-defiziente Männchen besaßen jedoch gegenüber dem Wildtyp signifikant verkleinerte Hoden und waren unfruchtbar (Göb, 2011, Dissertation; Schmitt, 2008, Dissertation). Männliche Lamin C2-KO Mäuse wiesen zudem schwere meiotische Defekte auf. Diese äußerten sich vor allem in gravierenden Fehlern bei der Paarung und der Synapse der homologen Chromosomen während der Prophase I. Aufgrund dieser Defekte werden meiotischen Keimzellen in Lamin C2-defizienten Männchen durch Checkpoint-Mechanismen eliminiert. Dies erklärt schließlich das vollständige Fehlen postmeiotischer Spermatogenese-Stadien und die beobachtete Unfruchtbarkeit von Lamin C2-KO Männchen (Göb, 2011, Dissertation; Link, 2010, Diplomarbeit; Link et al. *submitted*; Schmitt, 2008, Dissertation). Insgesamt zeigen die zitierten Arbeiten, dass Lamin C2 ein essentielles Protein für die Meiose in der männlichen Keimbahn darstellt. Mit der Lamin C2-KO Mauslinie stand somit ein ideales experimentelles Modell zur Verfügung, um im Rahmen der vorliegenden Dissertation die funktionelle Signifikanz von Lamin C2 für die Meiose in Weibchen detailliert zu untersuchen.

Wie in Abschnitt 1.2 der Einleitung ausführlich erläutert, ist die strukturelle Paarung der homologen Chromosomen (Synapse) durch den Synaptonemalkomplex (SC) ein zentrales Merkmal und ein essentieller Prozess der Prophase I der Meiose. Daher wurde zunächst untersucht, ob das Fehlen von Lamin C2 in Oocyten die Synapse der Homologen negativ beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden Immunfluoreszenz-Analysen auf Spreitungspräparaten von 17,5 dpf Oocyten aus wildtypischen und Lamin C2-defizienten Mäusen durchgeführt. Hierbei wurde die Lokalisation der beiden SC-Proteine Sycp1 und Sycp3 in einer Doppelfärbung untersucht. Während Sycp3 die chromosomalen Achsen unabhängig davon markiert, ob sie vollständig strukturell gepaart vorliegen oder nicht (Lammers et al., 1994), tritt eine Färbung von Sycp1 hingegen nur in Bereichen der vollständigen Synapse durch den SC auf (Meuwissen et al., 1992). Durch die gleichzeitige Verwendung dieser beiden Marker konnte daher jeweils der Anteil derjenigen Oocyten bestimmt werden, die Fehler in der Ausbildung der Synapse aufwiesen. Als „Fehler“ wurden dabei das Auftreten abschnittsweiser nicht gepaarter Chromosomenachsen (unvollständige Synapse), vollständig univalenter Chromosomen und die Assoziation von Achsen nicht-homologer Chromosomen (heterologe Assoziation) gewertet. Bei der Auswertung wurden nur Pachytän-Oocyten berücksichtigt. Der geringe Anteil an Oocyten, die sich zum Zeitpunkt 17,5 dpf im Zygotän oder Diplotän befanden, wurden nicht gewertet, da hier per Definition ohnehin keine vollständige Synapse vorliegt (auch im Wildtyp). Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 und Abbildung 8, sowie in Tabelle 2 und Tabelle 3 dargestellt.

Erwartungsgemäß zeigte die überwiegende Mehrheit von Oocyten aus wildtypischen Kontrolltieren eine vollständige Synapse aller 20 Chromosomenpaare. Quantitativ lag der Anteil an Oocyten, die mindestens einen Fehler der Synapse aufwiesen, im Wildtyp bei 9,20% (n=163). In Lamin C2-defizienten Oocyten hingegen zeigte sich die korrekte Ausbildung der Synapse deutlich beeinträchtigt. Hier war der Anteil an Oocyten mit mindestens einem Paarungsfehler signifikant größer (32,00%; n=175; $p < 0,0001$; Tabelle 2).

Die Paarungsfehler wurden zudem, wie oben beschrieben, kategorisiert und quantifiziert (Tabelle 3). Die häufigste Art des Fehlers war dabei die unvollständige Synapse. Dieser Fehler trat in Lamin C2-defizienten Weibchen mit einer Häufigkeit von 0,53 pro Zelle auf (Wildtyp: 0,20 pro Zelle; $p < 0,0001$). Zweit häufigster Fehler in Lamin C2-KO Oocyten war das Auftreten von Univalenten (KO: 0,20 pro Zelle; WT: 0,02 pro Zelle; $p < 0,0001$). Heterologe Assoziationen traten hingegen bei beiden Genotypen nur selten auf (KO: 0,07; WT: 0,00; $p = 0,0005$).

Ein weiterer interessanter Aspekt der Analyse war die Tatsache, dass in den meisten Oocyten mit synaptischen Defekten die Zahl der Fehler pro Oocyte gering war (Abbildung 8). In der deutlichen

Mehrzahl der untersuchten Oocyten (52%) zeigte sich demnach lediglich ein Homologenpaar von einem Paarungsfehler betroffen. Zwei oder drei Paarungsfehler pro Oocyte wurden bereits deutlich seltener festgestellt (18% bzw. 13%). Zusammen wiesen somit über 80% der „fehlerhaften“ Oocyten ein bis drei Paarungsfehler auf. Oocyten mit mehr als drei Fehlern wurden nur sehr selten beobachtet. Oocyten mit mehr als zehn Paarungsfehlern wurden nicht gefunden.

Insgesamt dokumentieren die beschriebenen quantitativen Analysen einen deutlichen meiotischen Phänotyp in Lamin C2-defizienten Weibchen. Dieser Phänotyp äußert sich dadurch, dass die Oogenese durch Fehler bei der strukturellen Paarung der homologen Chromosomen durch den SC signifikant gestört ist.

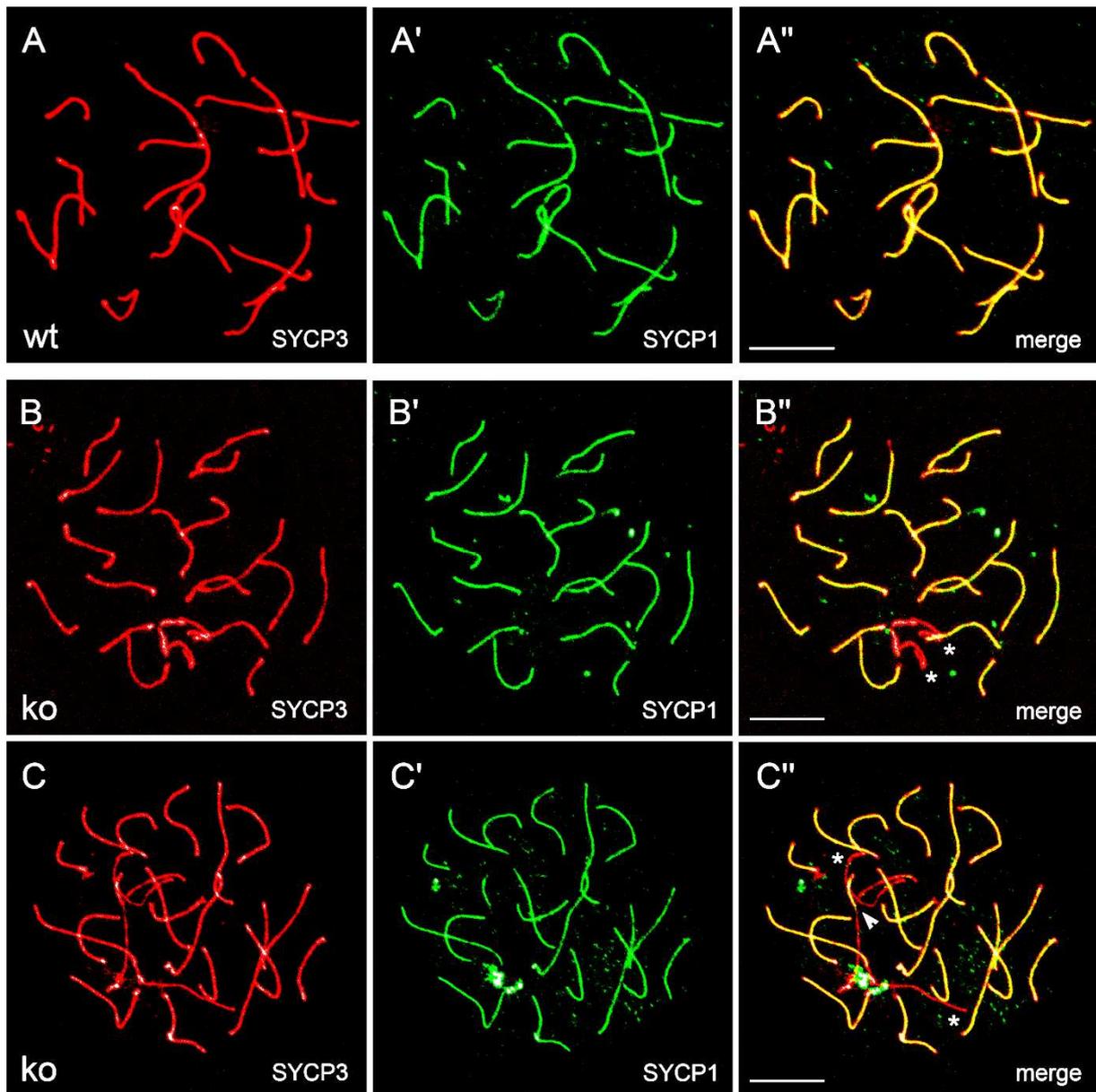


Abbildung 7. Synapse der Homologen in Lamin C2-KO Pachytän-Oocyten. Spreitungspräparate von 17,5 dpf Oocyten. Doppellokalisierung mit Kaninchen anti-Sycp3 (Novus Biologicals; rot) und Meerschwein anti-Sycp1 (N-Term; grün). Die Auswertung der Präparate erfolgte am CLSM. (A-A'') Vollständige Synapse aller 20 Homologenpaare in wildtypischen Oocyten. (B-B'', C-C'') Lamin C2-defiziente Oocyten sind häufig von Paarungsfehlern betroffen. Dabei ist die Anzahl der betroffenen Chromosomen meist gering. B-B'' zeigt eine Lamin C2-KO Zelle mit einem nicht-synapsierten Homologenpaar („Univalente“; Sternchen in B''). C-C'' zeigt eine Lamin C2-defiziente Oocyte mit jeweils einem nicht-synapsierten (Sternchen in C'') und einem teilweise synapsierten Homologenpaar (Pfeilspitze in C''). Größenbalken 10 μ m.

Genotyp	# Oocyten	davon mit Fehlern	Fisher Test
Gesamt			
wt	163	9,20%	
ko	175	32,00%	p<0,0001
Geschwister			
wt	71	8,45%	
ko	102	33,33%	p<0,0001

Tabelle 2. Häufigkeit von Oocyten mit mindestens einem Paarungsfehler nach Genotyp.

Art des Fehlers	Genotyp	relative Häufigkeit pro Oocyte	Fisher Test
unvollständige Synapse	wt	0,20	
	ko	0,53	p<0,0001
Univalente	wt	0,02	
	ko	0,20	p<0,0001
heterologe Assoziationen	wt	0,00	
	ko	0,07	p=0,0005

Tabelle 3. Kategorisierung und Quantifizierung der Paarungsfehler nach Genotyp.

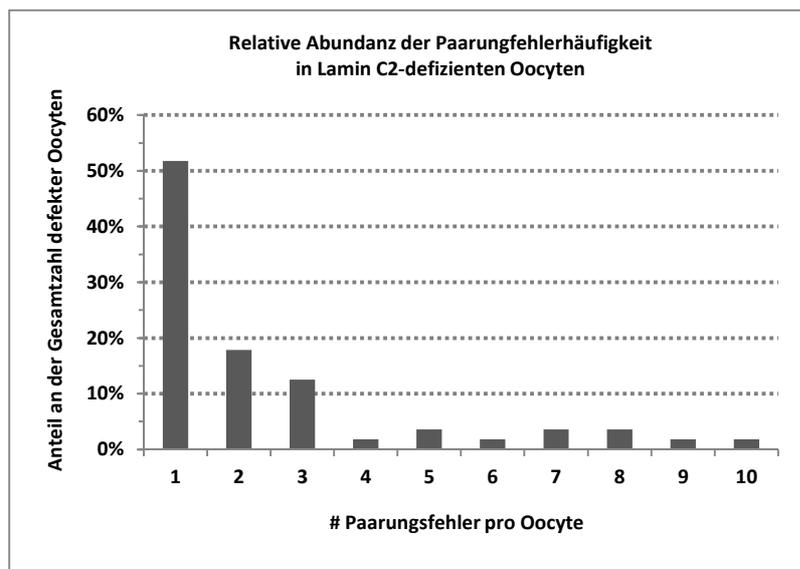


Abbildung 8. Quantifizierung der Paarungsfehlerhäufigkeit in „defekten“ Lamin C2-KO Oocyten.

2.1.3. Das Fehlen von Lamin C2 in Oocyten beeinträchtigt die homologe Rekombination

Lamin C2-defiziente Oocyten zeigen ein verändertes Lokalisationsmuster der Doppelstrangbruch-assoziierten Histonvariante γ H2AX

Der Verlust von Lamin C2 in Oocyten wirkt sich negativ auf die Synapse der Homologen während der Meiose aus. Da die Paarung/Synapse der Homologen und die homologe Rekombination stark voneinander abhängige Prozesse sind, leitet sich aus dieser Beobachtung unmittelbar die Frage ab, ob sich das Fehlen von Lamin C2 in Oocyten auch auf die homologe Rekombination auswirkt. Die Rekombination wird früh in der Prophase I durch die Spo11-vermittelte Einführung von DNA Doppelstrangbrüchen (DSBs) initiiert (Baudat et al., 2000; Keeney et al., 1997; Romanienko and Camerini-Otero, 2000). Diese aktivieren die zelluläre DNA-Reparaturmaschinerie, die in meiotischen Zellen den Prozess der homologen Rekombination vorantreibt (Cohen et al., 2006). Die phosphorylierte Form der Histonvariante H2AX (γ H2AX) assoziiert dabei spezifisch mit DNA DSBs und kann somit als Marker für unvollständig prozessierte DSBs während der Meiose verwendet werden (Mahadevaiah et al., 2001).

Um das Auftreten von DNA DSBs und deren Reparatur während der Prophase I der Meiose in Lamin C2-defizienten Weibchen zu untersuchen, wurden 17,5 dpf Pachytän Oocyten immunfluoreszenzmikroskopisch durch Dreifachlokalisierung von Sycp1, Sycp3 und γ H2AX analysiert (Abbildung 9). In wildtypischen Oocyten ohne Paarungsfehler lokalisierte γ H2AX in einem schwachen, relativ homogen verteilten Fluoreszenzmuster. Eine lokale Anreicherung von γ H2AX war in diesen Zellen nicht zu erkennen. Dieses Fluoreszenzmuster steht demnach im Einklang mit der schon vorangeschrittenen, aber noch nicht vollständig abgeschlossenen DSB-Reparatur im Pachytän der weiblichen Meiose, die in der Literatur für humane Oocyten bereits beschrieben wurde (Roig et al., 2004). In Lamin C2-defizienten 17,5 dpf Oocyten mit vollständiger Synapse war das Verteilungsmuster und die Intensität der Färbung von γ H2AX nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Folglich scheint die Einführung von DSBs ins Chromatin durch den Verlust von Lamin C2 in Oocyten nicht prinzipiell unterbunden zu sein und relativ normal stattfinden zu können. Lamin C2-defiziente Pachytän Oocyten mit einem oder mehreren Paarungsfehlern wiesen hingegen ein deutlich abweichendes γ H2AX-Verteilungsmuster auf. Dies äußerte sich im Auftreten von wolkenartigen Bereichen mit sehr intensiver γ H2AX-Färbung, die um die Paarungsfehler herum lokalisiert waren. Dieses Phänomen zeigte sich in mehr oder weniger ausgeprägter Form ausnahmslos in allen Lamin C2-defizienten Oocyten der untersuchten Zellpopulation (n=51), die von Fehlern in der Synapse betroffen waren. Ähnliche γ H2AX-Muster in Oocyten mit fehlerhafter Synapse wurden bereits in der Literatur beschrieben und mit einer verzögerten homologen Rekombination und mit der transkriptionellen Inaktivierung von nicht-synapsiertem Chromatin (MSUC) in Verbindung gebracht (Kouznetsova et al., 2009; Turner et al., 2005). Daher lassen die beschriebenen Beobachtungen die Schlussfolgerung zu, dass aus dem Verlust von Lamin C2 in Oocyten erhebliche Beeinträchtigungen der Meiose resultieren, die auch eine verlangsamte Reparatur meiotischer DSBs und somit eine zeitlich veränderte Progression der homologen Rekombination einschließen.

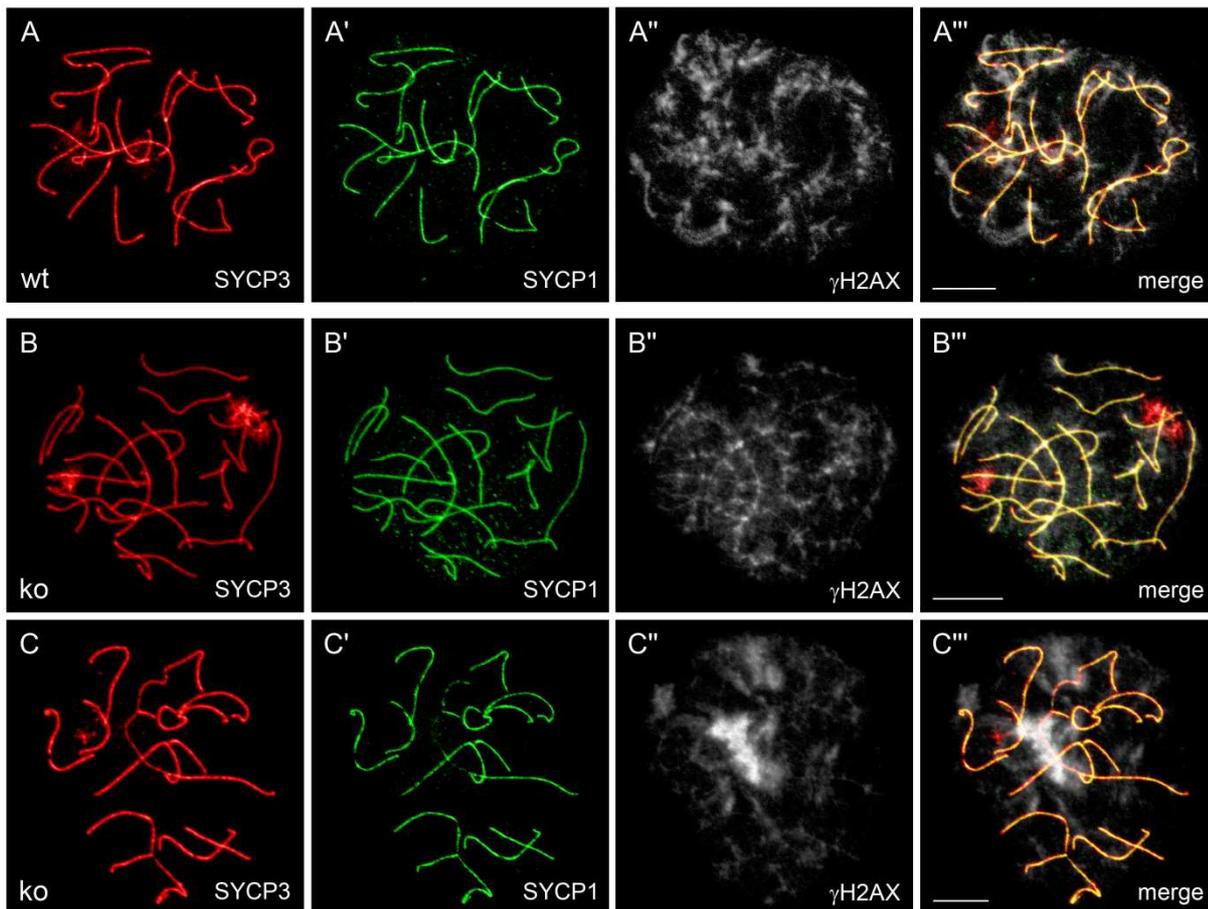


Abbildung 9. Lokalisation der DSB-assoziierten Histonvariante γ H2AX in Lamin C2-KO Oocyten. Spreitungspräparate von 17,5 dpf Oocyten. Dreifachlokalisierung mit Kaninchen anti-Sycp3 (Novus Biologicals; rot), Meerschwein anti-Sycp1 (N-Term; grün) und Maus anti- γ H2AX (Graustufen). Die Auswertung der Präparate erfolgte am CLSM. (A-A''') Wildtypische Oocyte mit vollständiger Synapse aller 20 Homologenpaare und einer schwachen, relativ homogenen γ H2AX-Färbung. (B-B''') Lamin C2-defiziente Oocyten mit vollständiger Synapse weisen eine nicht vom Wildtyp zu unterscheidende Lokalisation von γ H2AX auf. (C-C''') In Lamin C2-KO Oocyten, die von Paarungsfehlern betroffen sind, zeigt sich eine deutliche lokale Anreicherung von γ H2AX in räumlicher Assoziation zu den Paarungsfehlern. Größenbalken 10 μ m.

In Lamin C2-defizienten Oocyten ist die Anzahl an MLH1-Foci signifikant reduziert

Da es sich bei γ H2AX um einen Marker handelt, der relativ frühe Stadien der homologen Rekombination anspricht, sollten zusätzliche Versuche durchgeführt werden, die den Effekt des Verlustes von Lamin C2 auch auf spätere Stadien der meiotischen Rekombination genauer beleuchten. Im Laufe der Prophase I der Meiose werden die durch das Enzym Spo11 eingefügten DNA DSBs durch die zelluläre DNA-Reparaturmaschinerie in mehreren Schritten sukzessive verarbeitet. Das Endergebnis dieses Prozesses ist der reziproke Austausch genetischen Materials zwischen den Homologen. Die Orte, an denen ein solcher Austausch stattfindet, werden als cross-overs bezeichnet. Eine wichtige Komponente der DNA-Reparaturmaschinerie, der eine entscheidende Bedeutung für die finale Reifung von meiotischen Rekombinationsintermediaten hin zu cross-overs zugeschrieben wird, ist das Protein MLH1 (Baker et al., 1996). MLH1 kann demnach im späten Pachytän der meiotischen Prophase I als molekularer Marker für zukünftige cross-over Ereignisse herangezogen werden und die Häufigkeit seines Auftretens kann als Maß für die Messung der Rekombinationsfrequenz in meiotischen Zellen dienen (Anderson et al., 1999).

Um die Auswirkungen des Verlustes von Lamin C2 auf die Verteilung von MLH1-Foci in Oocyten zu bestimmen, wurden Spreitungspräparate von 19,5 dpf embryonalen Ovarien angefertigt und immunfluoreszenz-mikroskopisch durch Doppellokalisierung von Sycp3 und MLH1 untersucht. Dadurch war es möglich, einerseits die Anzahl und Verteilung von MLH1 entlang der chromosomalen Achsen sichtbar zu machen, andererseits konnte gleichzeitig der Zustand der Synapse der jeweils untersuchten Zellen eindeutig bestimmt werden. Erwartungsgemäß befanden sich die meisten Oocyten an 19,5 dpf im späten Pachytän oder Diplotän. Um *a priori* auszuschließen, dass eventuelle Unterschiede in der Rekombinationsfrequenz zwischen Lamin C2-defizienten Mäusen und Kontrolltieren durch unterschiedliche Dynamiken der Progression der Oocyten durch die Stadien der Prophase I zustande kommen könnten, wurde zunächst jeweils das Verhältnis zwischen Pachytän- und Diplotän-Oocyten ermittelt. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Tabelle 4). Folglich scheint das zeitliche Voranschreiten der Prophase I vom Verlust von Lamin C2 prinzipiell nicht betroffen. Wie aufgrund der oben beschriebenen, an Tag 17,5 dpf (mittleres Pachytän) durchgeführten Spreitungsanalysen zu erwarten, war jedoch auch im späten Pachytän der Anteil an Oocyten mit Fehlern der Synapse in Lamin C2-defizienten Weibchen deutlich erhöht (Kontrolle: 13,33%, n=75; KO: 27,38%, n=84; p=0,0326)

Genotyp	# Oocyten	# Pachytän	# Diplotän
het	58	29,31%	70,69%
ko	55	36,36%	63,63%
Signifikanz nach Fisher:		p=0,55	

Tabelle 4. Zeitliche Progression der Prophase I-Stadien in Lamin C2-KO Oocyten.

Anschließend wurden Anzahl und Verteilung der MLH1-Foci in späten Pachytän-Oocyten quantitativ bestimmt (Abbildung 10; Abbildung 11). Übereinstimmend mit früheren Studien (Baker et al., 1996) lokalisierten auf der deutlichen Mehrzahl der SC-Achsen in Kontroll-Oocyten (WT und HET) 1 bis 2 MLH1-Foci. Dadurch ergab sich eine mittlere Anzahl (Median) von 29 Foci pro Oocyte (n=75). Auch Lamin C2-defiziente Oocyten waren in der Lage, MLH1 auf die chromosomalen Achsen zu rekrutieren, was deutlich zeigt, dass die Rekombination durch die Abwesenheit von Lamin C2 in Weibchen nicht vollständig abbricht. Quantitativ, war die mittlere Anzahl von MLH1-Foci in diesen Zellen jedoch hoch signifikant auf 25,5 pro Zelle reduziert (n=84; p=0,00025 Mann-Whitney U-Test). In einer weiteren Auswertung wurde zudem die Anzahl von Oocyten quantifiziert, in denen auf mindestens einem Homologenpaar zum Zeitpunkt des späten Pachytäns überhaupt kein MLH1 nachgewiesen werden konnte. Dieser Anteil lag in Kontroll-Oocyten (WT und HET) bei 20% (n=75). In Lamin C2-defizienten Tieren hingegen lag dieser Wert mehr als doppelt so hoch (46%; n=84; p=0,0005 Pearson's Chi² Test). Dieses Phänomen wurde interessanterweise auch in Oocyten beobachtet, die eine vollständige Synapse aller 20 Homologenpaare aufwiesen.

Die Ausbildung mindestens eines cross-over Ereignisses pro Homologenpaar wird als essentiell für die korrekte Orientierung der Homologen in der Metaphase I und ihre exakte Trennung während der Anaphase I der Meiose angesehen („obligate cross-overs“). Tatsächlich konnte bereits in mehreren Mausmodellen ein direkter funktioneller Zusammenhang zwischen dem Fehlen obligater cross-overs im Pachytän und schwerwiegenden Fehlern bei der Homologentrennung in späteren meiotischen Stadien

hergestellt werden (Baker et al., 1996; Daniel et al., 2011; Woods et al., 1999). Daher erscheint es sehr wahrscheinlich, dass das hier dokumentierte Fehlen obligater MLH1-Foci in Lamin C2-defizienten Oocyten in ähnlicher Weise einen beträchtlichen negativen Einfluss auf die Homologentrennung hat und somit eine erhebliche Reduktion der Qualität der entstehenden Keimzellen nach sich ziehen könnte.

Wie in diesem Abschnitt gezeigt wurde, sind sowohl die mittlere Rekombinationsfrequenz, als auch die zuverlässige Rekrutierung obligater MLH1-Foci auf die chromosomalen Achsen in der Abwesenheit von Lamin C2 deutlich beeinträchtigt. Zusammenfassend übt Lamin C2 demnach, neben seiner Bedeutung für die strukturelle Paarung der Homologen, auch für das Voranschreiten der homologen Rekombination eine wichtige Funktion aus. Ein solcher Zusammenhang zwischen der Lamina und der homologen Rekombination war bislang in der Literatur noch nicht beschrieben und erscheint daher hoch interessant.

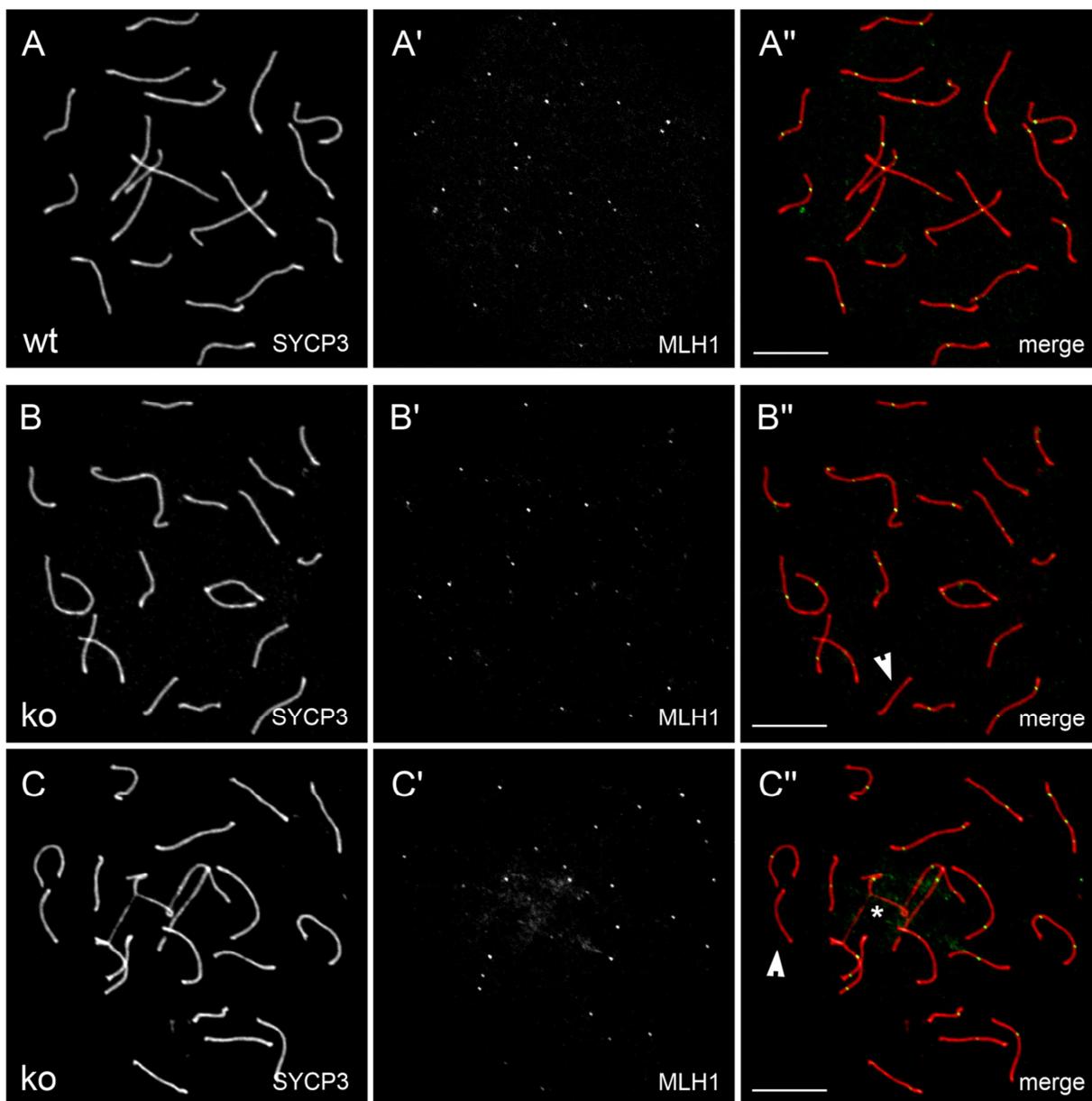


Abbildung 10. Immunlokalisation von MLH1-markierten cross-over Ereignissen in Lamin C2-KO Oocyten. Spreitungspräparate von 19,5 dpf Oocyten. Doppellokalisation mit Kaninchen anti-Sycp3 (Novus Biologicals; rot) und Maus anti-MLH1 (grün). Die Auswertung der Präparate erfolgte am CLSM. Die einzelnen Kanäle sind in Graustufen dargestellt. (A-A'') Wildtypische Oocyte mit vollständiger Synapse aller 20 Homologenpaare. Auf

jedem Homologenpaar befindet sich mindestens ein MLH1-Focus. (B-B'') Lamin C2-defiziente Oocyten mit vollständiger Synapse. Die Pfeilspitze in B'' markiert ein vollständig gepaartes Homologenpaar, auf dem kein MLH1 nachgewiesen werden kann. (C-C'') Lamin C2-KO Oocyten, die von einem Paarungsfehler betroffen ist (Stern in C''). Auf mindestens einem Homologenpaar ist kein MLH1-Focus detektierbar (Pfeilspitze in C''). Größenbalken 10 μm .

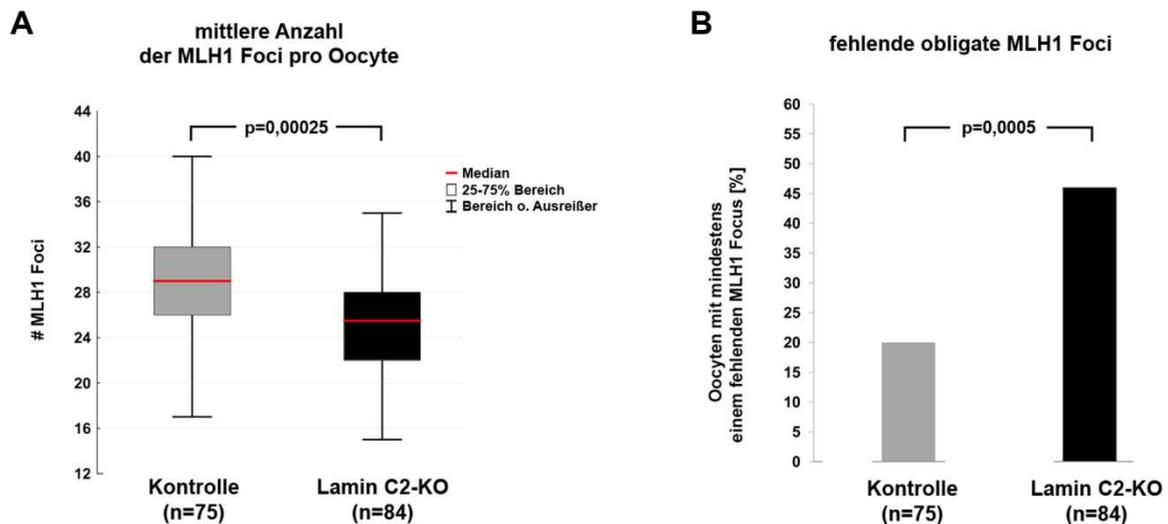


Abbildung 11. Quantitative Auswertung der in Abbildung 10 beschriebenen Phänomene. (A) Reduktion der mittleren Anzahl an MLH1-Foci pro Oocyte in Lamin C2-KO Weibchen. (B) Erhöhte Anzahl von Oocyten mit fehlenden obligaten MLH1 Foci in Lamin C2-defizienten Weibchen.

2.1.4. Die molekulare Eigenschaften des meiosespezifischen Lamin C2 unterscheiden sich erheblich von denen somatischer Lamine

Bisher konnte gezeigt werden, dass Lamin C2 während der Meiose im weiblichen Geschlecht exprimiert wird und eine wichtige Rolle für diesen Prozess einnimmt, da es die strukturelle Paarung der Homologen und den effizienten Ablauf der homologen Rekombination unterstützt. Dies wirft eine weitere hoch interessante Frage auf: Wie beeinflusst ein Protein, das Bestandteil der Kernhülle ist, also in der Peripherie des Kerns lokalisiert, im mechanistischen Sinne die meiotischen Abläufe der Synapse und der homologen Rekombination, die im Inneren des Kerns ablaufen? Dazu existierten bereits Modellvorstellungen, die postulierten, dass die Funktion von Lamin C2 während der Meiose in unmittelbarem Zusammenhang mit den charakteristischen Chromosomenbewegungen stehen könnte, die in der Prophase I der Meiose ablaufen und in Abschnitt 1.2 bereits ausführlicher beschrieben wurden. Dabei wurde vorgeschlagen, dass Lamin C2 für die Anheftung und/oder für die aktive Bewegung der Telomere entlang der Kernhülle eine wichtige Rolle spielen könnte (Alsheimer and Benavente, 1996; Alsheimer et al., 1999).

Der folgende Teil der Arbeit widmet sich der experimentellen Verifizierung dieser Hypothese. Zu diesem Zweck wurde in einer vorangegangenen Arbeit (Jahn, 2009, Diplomarbeit) bereits damit begonnen, die molekularen Eigenschaften des meiosespezifischen Lamin C2 zu untersuchen und diese mit denen von somatischen Lamin-Varianten zu vergleichen. In diesem Zusammenhang blieben jedoch einige entscheidende Fragen unbeantwortet, die in der vorliegenden Dissertation systematisch aufgearbeitet wurden.

Lamin C2 kann als „natürliche Lamin-Deletionsmutante“ aufgefasst werden, die aufgrund ihrer N-terminalen Verkürzung eine erhöhte Mobilität aufweist

Lamine somatischer Zellen besitzen einen dreigeteilten molekularen Aufbau. Sie bestehen aus einem α -helikalen Mittelstück, das von nicht-helikalen Kopf- bzw. Schwanzdomänen flankiert wird. Jede dieser Domänen hat eine definierte Funktion für die Polymerisation der Lamine zum dichten Netzwerk der Lamina (siehe Abschnitt 1.1). Nach dem Einbau in dieses Netzwerk verhalten sich die Lamin-Isoformen somatischer Zellen weitgehend immobil (Broers et al., 1999; Gilchrist et al., 2004; Moir et al., 2000). Der molekulare Aufbau des Lamin C2 weicht in zweierlei Hinsicht von der Struktur somatischer Lamine ab: Erstens weist es eine N-terminale Trunkierung auf, sodass die nicht-helikale Kopfdomäne völlig fehlt und das α -helikale Mittelstück signifikant verkürzt ist (Alsheimer and Benavente, 1996; Furukawa et al., 1994). Zweitens trägt Lamin C2 an seinem N-Terminus das Hexapeptid GNAEGR, das für seine Rekrutierung an die Kernhülle essentiell ist (Alsheimer et al., 2000). Aus diesen Beobachtungen leitete sich die Frage ab, ob sich die Polymerisationseigenschaften von Lamin C2 von denen somatischer Lamine unterscheiden, und ob dies in einer veränderten Proteinmobilität messbar ist.

Aus vorangegangenen Photobleaching-Versuchen (FRAP) war bereits bekannt, dass das keimzellenspezifische Lamin C2 im Vergleich zu seinem somatischen Pendant Lamin C tatsächlich eine deutlich gesteigerte Proteinmobilität aufweist (Jahn, 2009, Diplomarbeit). Darüber hinaus lagen präliminäre Daten vor, die daraufhin deuteten, dass der verkürzte N-Terminus des Lamin C2 die molekulare Hauptursache für diese Erhöhung der Mobilität ist. Daraus leitete sich eine weitere entscheidende Frage ab: Der Verlust welcher N-terminalen Proteindomänen (nicht-helikaler Kopf oder α -helikales Mittelstück) führt im Lamin C2 zur Steigerung seiner Mobilität? Um diese Frage genauer zu untersuchen wurden in der vorliegenden Dissertation weitere FRAP-Versuche (Fluorescence Recovery after Photobleaching) mit Lamin C-Deletionsmutanten durchgeführt. Die beiden verwendeten Lamin C-Deletionsmutanten waren so konstruiert, dass jeweils die nicht-helikale Kopfdomäne (myr-Lamin C Δ 2-27-EGFP) oder der Teil des α -helikalen Mittelstücks deletiert wurde, der auch im Lamin C2 fehlte (myr-Lamin C Δ 28-119-EGFP; Übersicht der verwendeten Konstrukte siehe Abbildung 12). So konnte der Einfluss beider Domänen getrennt voneinander untersucht werden. Um die Mutanten effizient an die Kernhülle zu rekrutieren und *a priori* auszuschließen, dass die Unterschiede in der Proteinmobilität auf unterschiedliche Modi der Membranrekrutierung zurückzuführen sein könnten, wurde an beide Lamin C-Deletionsmutanten das N-terminale Myristoylierungsmotiv des Lamin C2 (GNAEGR; in der Nomenklatur der EGFP-Fusionsproteine kurz als „myr“ bezeichnet) angefügt. Als Kontrollen dienten einerseits das „Volllänge“ Lamin C mit N-terminalem Myristoylierungsmotiv (myr-Lamin C-EGFP), andererseits wildtypischen Lamin C2 (Lamin C2-EGFP; siehe Abbildung 12). Um einen entscheidenden Schwachpunkt der bereits in der Diplomarbeit durchgeführten Versuche zu beseitigen, wurden alle hier gezeigten Experimente in *Lmna*^{-/-} MEFs durchgeführt. Diese Zellen exprimieren die Lamine A und C nicht (Sullivan et al., 1999). Somit ahmen sie die Kernhülle von meiotischen Zellen hinsichtlich der Expression dieser beiden Lamin-Isoformen nach (Vester et al. 1993). Da meiotische Zellen für *in vitro*-Manipulation prinzipiell ungeeignet sind, konnte durch die Verwendung von *Lmna*^{-/-} MEFs die größtmögliche Übertragbarkeit der erzielten Ergebnisse auf das „meiotische System“ (also die natürliche Umgebung von Lamin C2) erreicht werden.

Wie zu erwarten, und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorangegangenen Studien (Jahn, 2009, Diplomarbeit) lokalisierte das „Volllänge“ Konstrukt myr-Lamin C-EGFP in Form einer gleichmäßig verteilten Ringfluoreszenz entlang der Kernhülle (Abbildung 12). Lamin C2-EGFP hingegen lokalisierte in diskontinuierlichen, voneinander klar getrennten Domänen, sogenannten „Plaques“. Interessanterweise verteilten sich beide Lamin C-Deletionsmutanten (myr-lamin C Δ 2-27-EGFP und myr-Lamin C Δ 28-119-EGFP) in einer vom wildtypischen Lamin C2 nicht unterscheidbaren Weise (in Form

diskreter Plaques). Diese Beobachtung ließ bereits vermuten, dass beide Domänen (nicht-helikaler Kopf und N-terminaler Bereich des α -helikalen Mittelstücks) für die Polymerisationseigenschaften der untersuchten Konstrukte eine große Relevanz besitzen. Um dies quantitativ zu analysieren, wurde anschließend die Mobilität der EGFP-Fusionskonstrukte mittels FRAP untersucht. Dazu wurde im kontinuierlichen Fluoreszenzbild der „Volllänge“ Lamin C-Kontrolle (myr-Lamin C-EGFP) ein kreisförmiger Bereich mit einem Radius von 2 μm (ROI) ausgeblendet. Für die restlichen Konstrukte (Lamin C2-EGFP, myr-lamin C Δ 2-27-EGFP und myr-Lamin C Δ 28-119-EGFP) wurde ein ROI derselben Größe verwendet. Dabei wurden nur solche Plaques zur Messung ausgewählt, die mit diesem ROI vollständig geblendet werden konnten. Die Intensität der Fluoreszenz wurde anschließend über 300 s gemessen und in Relation zum Ausgangswert gesetzt. Daraus ergibt sich die sogenannte „Erholung“ der Fluoreszenz, die ein Maß für die Mobilität des untersuchten Proteins darstellt. In Übereinstimmung mit vorangegangenen Versuchen (Jahn, 2009, Diplomarbeit), war die Erholung der Fluoreszenz von myr-Lamin C-EGFP marginal und lag nach 300 s bei etwa 2% (n=22). Dies spiegelt die nahezu vollständige Immobilität des Lamin C wider. Das Fluoreszenzsignal von Lamin C2-EGFP hingegen erholte sich im Messintervall von 300 s um 15% (n=22; p<0,0001) und lag damit signifikant höher. Dies steht im Einklang mit der bereits zuvor beschriebenen erhöhten Mobilität von Lamin C2 (Jahn, 2009, Diplomarbeit). Die Untersuchung der beiden Lamin C-Deletionsmutanten (myr-lamin C Δ 2-27-EGFP und myr-Lamin C Δ 28-119-EGFP) zeigte ein hoch interessantes Ergebnis: Beide Konstrukte wiesen im Vergleich zum „Volllänge“ Lamin C eine deutlich gesteigerte Mobilität auf. Während die Erholung der Fluoreszenz für myr-lamin C Δ 2-27-EGFP bei etwa 13% (n=20; p<0,0001) lag, erreichte sie für myr-Lamin C Δ 28-119-EGFP sogar einen Wert von 32% (n=21; p<0,0001). Somit erreichte die Mobilität von myr-lamin C Δ 2-27-EGFP etwa dasselbe Niveau, das auch für wildtypisches Lamin C2 beobachtet wurde (15%). Die Mobilität von myr-Lamin C Δ 28-119-EGFP hingegen überstieg dieses Niveau sogar noch deutlich.

Auch wenn der Grund für die überraschend hohe Fluoreszenzerholung von myr-Lamin C Δ 28-119-EGFP ohne weiteres nicht vollständig aufgeklärt werden kann, zeigen die beschriebenen Versuche dennoch unzweifelhaft, dass sowohl die Deletion der nicht-helikalen Kopfdomäne *oder* eines Teils des α -helikalen Mittelstücks des Lamin C alleine hinreichend sind, um die Mobilität des resultierenden Proteins deutlich zu erhöhen. Somit stützen diese Ergebnisse stark die Ansicht, dass die N-terminale Verkürzung des keimzellspezifischen Lamin C2 (und nicht seine Myristoylierung) die entscheidende Determinante seiner besonderen Lokalisation (diskrete Plaques) und seiner dynamischen Eigenschaften ist. Lamin C2 sollte demnach als „natürliche Lamin-Deletionsmutante“ mit einer höheren Proteinmobilität im Vergleich zu Lamin-Varianten somatischer Zellen aufgefasst werden.

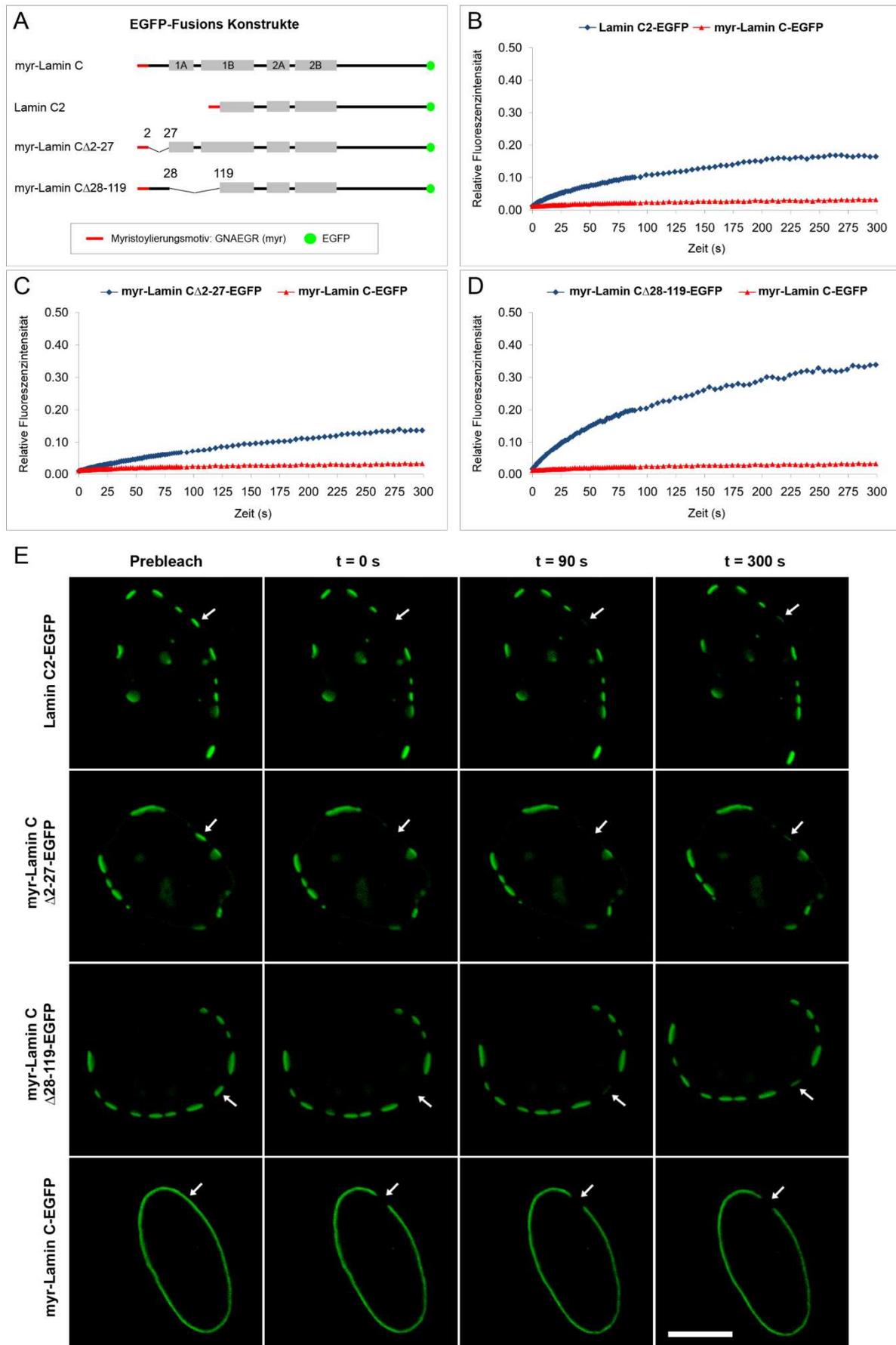


Abbildung 12. FRAP-Analyse der Mobilität verschiedener EGFP-markierter Lamin C-Deletionsmutanten. (A) Übersicht über die verwendeten EGFP-Fusionskonstrukte. (B-D) Quantitative Analyse der Proteinmobilität von Lamin C2-EGFP (B), myr-Lamin C Δ 2-27-EGFP (C) und myr-Lamin C Δ 28-119-EGFP (D) jeweils im Vergleich zur

Kontrolle myr-Lamin C-EGFP („Vollelänge“ Lamin C). (E) Beide Lamin C-Deletionsmutanten (mittlere Panels; myr-Lamin CΔ2-27-EGFP und myr-Lamin CΔ28-119-EGFP) lokalisieren in einer nicht von Lamin C2-EGFP (oberes Panel) zu unterscheidenden Weise (diskontinuierliche Plaques). „Vollelänge“ Lamin C (unteres Panel; myr-Lamin C-EGFP) lokalisiert in einem gleichmäßig ringförmigen Fluoreszenzmuster. Die Pfeile markieren jeweils die Position des 2 µm-ROI. Die Fluoreszenzintensität im jeweiligen ROI wurde vor Beginn des Bleichens gemessen (Prebleach). Anschließend wurde die Fluoreszenz im ROI vollständig ausgebleicht und ihre Erholung über die Zeit gemessen (0 s bis 300 s). Größenbalken 10 µm.

Die Mobilität von Lamin C2 ist innerhalb der diskreten Plaques enorm hoch

Die im vorangegangenen Abschnitt besprochenen FRAP-Versuche wurden so durchgeführt, dass jeweils ein ganzer Plaque des entsprechenden Proteins *vollständig* geblichen wurde. Folglich müssen die beobachteten Fluoreszenzerholungen auf einwandernde EGFP-Fusionsproteine zurückzuführen sein, die vor Beginn der Messung außerhalb dieses Plaques lokalisiert waren. Die erzielten Messwerte spiegeln demnach die Mobilität des Lamin C2 (und der untersuchten Lamin C-Deletionsmutanten) *zwischen* den einzelnen, diskreten Plaques wider. Lamin C2 ist jedoch auch in seiner natürlichen Umgebung in meiotischen Zellen in diskontinuierlichen Domänen lokalisiert, in die die an der Kernhülle angehefteten Telomere gewissermaßen eingebettet sind (siehe Abschnitt 1.2). Daher erscheint die Annahme sinnvoll, dass *in vivo* vor allem auch die Mobilität von Lamin C2 *innerhalb* der diskreten Domänen eine wichtige Determinante seiner biologischen Signifikanz sein könnte.

Um die Mobilität von Lamin C2 innerhalb der diskreten Plaques zu bestimmen, wurden in der vorangegangenen Diplomarbeit (Jahn, 2009, Diplomarbeit) ebenfalls bereits Vorarbeiten geleistet. Dabei wurde in einem modifizierten FRAP-Ansatz ein einzelner Lamin C2-Plaques nicht vollständig, sondern nur etwa zur Hälfte geblichen. Daraufhin wurde sowohl die Fluoreszenz in der geblichenen Hälfte, als auch die in der nicht geblichenen Hälfte dieses Plaques über die Zeit gemessen. Während die Erholung in der geblichenen Hälfte noch deutlich schneller und ausgeprägter verlief als im vorangegangenen Abschnitt angegeben, und die Fluoreszenz in der nicht geblichenen Hälfte desselben Plaques mit vergleichbarer Dynamik abnahm, legten die erzielten Ergebnisse den Schluss nahe, dass die Mobilität von Lamin C2 innerhalb der Plaques sogar noch deutlich größer sein musste, als dies durch die Versuche mit vollständig geblichenen Plaques anzunehmen war.

Um diese hoch relevanten Beobachtungen weiter zu vertiefen, wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation weitere Photobleaching-Versuche durchgeführt. Zur Messung der Mobilität von Molekülen innerhalb eines mehr oder weniger abgeschlossenen Kompartiments, ist FLIP (Fluorescence Loss in Photobleaching) die Methode der Wahl. Im Gegensatz zu einem FRAP-Experiment wird in einem FLIP-Versuch der untersuchte Bereich (bleach) nicht nur einmal zu Beginn der Messung geblichen, sondern konstant über das gesamte Messintervall. Gleichzeitig wird die Abnahme der Fluoreszenz in einem benachbarten Bereich (ROI) gemessen. Nimmt die Fluoreszenz im ROI ab, kann man daraus folgern, dass zwischen den beiden untersuchten Bereichen ein Austausch von Molekülen stattfindet. Die Dynamik der Fluoreszenzabnahme steht dabei in Relation zur Mobilität des untersuchten Moleküls.

Die FLIP-Versuche wurden mit den bereits beschriebenen Konstrukten Lamin C2-EGFP und myr-Lamin C-EGFP durchgeführt (Ergebnisse und Positionierung der ROIs im FLIP-Experiment siehe Abbildung 13). Dabei wurde mit einem Bleichbereich (bleach) von 1 µm Radius etwa die Hälfte eines Lamin C2-Plaques konstant über das Messintervall von 150 s geblichen. Gleichzeitig wurde die Fluoreszenzabnahme in der anderen Hälfte desselben Plaques mit einem ebenfalls 1 µm großen Messbereich (ROI) über die Zeit gemessen (oberes Panel in Abbildung 13B). Als Kontrollen wurde einerseits ein 1 µm-Bleichbereich so gewählt, dass er direkt neben einem der Lamin C2-Plaques, aber außerhalb des Bereichs der messbaren Fluoreszenz lag. Der untersuchte ROI (1 µm) lag in diesem Fall innerhalb des ausgewählten Plaques

(mittleres Panel in Abbildung 13B). Andererseits wurde auf analoge Weise ein 1 μm -Bleichbereich in der kontinuierlichen myr-Lamin C-EGFP Floreszenz ausgebleicht und die Fluoreszenz in einem benachbarten ROI (1 μm) gemessen (unteres Panel in Abbildung 13B). Um auszuschließen, dass eventuelle Unterschiede in der Fluoreszenzabnahme auf variierende Abstände zwischen Bleich- und Messbereich zurückzuführen sein könnten, wurde auch der Abstand zwischen beiden Regionen (bleach und ROI) für alle Messungen auf 1 μm standardisiert. Übereinstimmend mit der bereits im FRAP-Ansatz gemachten Beobachtung, dass das „Vollelänge“ Lamin C sich nahezu immobil verhält, war auch im FLIP-Ansatz kaum eine Abnahme der von myr-Lamin C-EGFP ausgehenden Fluoreszenz messbar (7%; n=20). In ähnlicher Weise war auch die Abnahme der Lamin C2-EGFP Fluoreszenz beim Bleichen neben dem gemessenen Plaque im Messintervall von 150 s nur sehr klein (10%; n=20). Dies deutet darauf hin, dass die Mobilität von Lamin C2 innerhalb der Kernhülle *zwischen* den einzelnen Plaques nicht besonders hoch ist. Im klaren Gegensatz zu den Kontrollen nahm die Fluoreszenz von Lamin C2-EGFP im Messbereich schnell und sehr deutlich ab, wenn innerhalb desselben Plaques geblichen wurde (63%; n=20; $p < 0,0001$ zu beiden Kontrollen). Zusammengefasst bestätigen die erzielten Daten aus den beschriebenen FRAP- und FLIP-Ansätzen somit eindeutig die Auffassung, dass Lamin C2 ein im Vergleich zu somatischen Laminen sehr mobiles Protein ist, dessen Dynamik vor allem innerhalb der von ihm ausgebildeten diskreten Domänen stark ausgeprägt ist.

Die Expression von Lamin C2 in somatischen Zellen hat einen erheblichen Einfluss auf die strukturelle Integrität der Kernhülle

Ein dritter und letzter auszuarbeitender Aspekt hinsichtlich der *in vitro*-Eigenschaften von Lamin C2 war es, seinen Einfluss auf die strukturelle Integrität der Kernhülle zu untersuchen, die über seine erhöhte Mobilität hinausgeht. Dazu sollte einerseits untersucht werden, ob Lamin C2 in der Lage ist, die Lokalisation von anderen Proteinen der Kernhülle zu modulieren, wenn es ektopisch in somatischen Zellen exprimiert wird. In diesem Zusammenhang lagen bereits Daten vor, die daraufhin deuteten, dass Lamin C2 tatsächlich die Lokalisation von mehreren integralen Membranproteinen (LAP2-Isoformen und SUN-Domänen Proteine) der Kernhülle beeinflussen kann (Jahn, 2009, Diplomarbeit). In der vorliegenden Dissertation wurden diese Versuche noch auf die Untersuchung von Lamin B1 ausgeweitet. Da Lamin B1 neben C2 die einzige Lamin-Variante ist, die während der Meiose in Säugern exprimiert wird (Vester et al., 1993), erscheinen die Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Isoformen hoch relevant für die strukturelle Integrität der Kernhülle von Keimzellen *in vivo*.

Als geeignetes Model für die Kernhülle von meiotischen Zellen wurden auch für diese Versuche *Lmna*^{-/-} MEFs (Sullivan et al., 1999), die keine Expression der Lamine A und C aufweisen, verwendet (Abbildung 14). Zur Untersuchung des Einflusses von Lamin C2 auf die Lokalisation von Lamin B1 wurden *Lmna*^{-/-} MEFs mit dem beschriebenen Lamin C2-EGFP transfiziert. Die Lokalisation von endogenem Lamin B1 wurde mit dem B1-spezifischen Antikörper mAb 119D5-F1 (Santa Cruz Biotechnology) nachgewiesen. Als Kontrollen dienten sowohl myr-Lamin C-EGFP exprimierende Zellen als auch nicht transfizierte Zellen. Wie zu erwarten, war Lamin B1 in nicht transfizierten Kontrollzellen in Form einer für somatische Lamine typischen Ringfluoreszenz entlang der Kernhülle nachweisbar. Die Überexpression von „Volllänge“ Lamin C (myr-Lamin C-EGFP) änderte an dieser Lokalisation von Lamin B1 nichts. Im Gegensatz dazu kam es in Lamin C2-EGFP exprimierenden Zellen zu einer deutlichen Umverteilung von endogenem Lamin B1. Dabei traten häufig dort lokale Maxima der Lamin B1-Fluoreszenz auf, wo auch die Lamin C2-Plaques lokalisiert waren.

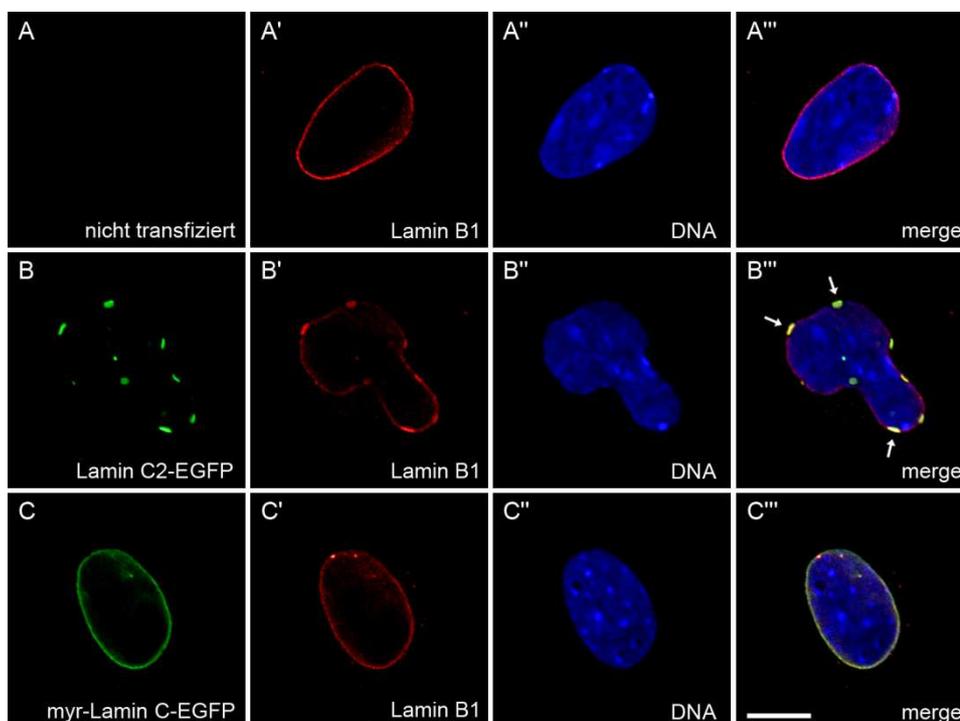


Abbildung 14. Einfluss der Expression von Lamin C2 auf die Lokalisation von Lamin B1 in *Lmna*^{-/-} MEFs. Lamin C2-EGFP und myr-Lamin C-EGFP wurden in Lamin A/C-defizienten *Lmna*^{-/-} MEFs exprimiert (B, C; grün). Endogenes Lamin B1 wurde durch mAb 119D5-F1 (Santa Cruz Biotechnology) markiert (A'-C'; rot). DNA wurde mit Hoechst-

33258 gefärbt (A''-C'', blau). In nicht transfizierten Kontrollzellen ist Lamin B1 in einem relativ homogenen, ringförmigen Muster entlang der Kernhülle verteilt (A-A'''). Die Überexpression von myr-Lamin C-EGFP hat auf die Lokalisation von Lamin B1 keinen nennenswerten Einfluss (C-C'''). Im Gegensatz dazu kommt es durch die Expression von Lamin C2-EGFP zu einer deutlichen Umverteilung von endogenem Lamin B1 (B-B'''). Dabei kolokalisieren die Maxima der Lamin B1-Färbung häufig mit Lamin C2-Plaques (Pfeile in B'''). Größenbalken 10 μm .

Die ektopische Expression von Lamin C2 in *Lmna*^{-/-} MEFs hat demnach einen signifikanten Einfluss auf die Lokalisation von Lamin B1. Zusammen aus dieser Beobachtung und der Kenntnis über den erwähnten Einfluss von Lamin C2 auf die Verteilung von anderen endogenen Membranproteinen der Kernhülle (SUN-Domänen Proteine und LAP2-Isoformen) (Jahn, 2009, Diplomarbeit) ergab sich nun die Frage, ob man den Einfluss von Lamin C2 auf die strukturelle Integrität der Kernhülle auch in einer veränderten Morphologie der Kernhülle, wie sie sich in Abbildung 14B-B'''' bereits andeutete, beschreiben kann.

Um dies zu untersuchen, wurden *Lmna*^{-/-} MEFs wiederum mit Lamin C2-EGFP transfiziert. Als Kontrollen wurden ebenfalls myr-Lamin C-EGFP exprimierende sowie nicht transfizierte Zellen herangezogen. Bestimmt wurde nun jeweils die Häufigkeit der Zellen, die abnormal geformte Kerne aufwiesen. Als „abnormal“ gewertet wurde in diesem Fall jede Abweichung von einer runden oder ovalen Form (Abbildung 15). Nicht transfizierte *Lmna*^{-/-} MEFs wiesen dabei zu 34% (n=659) morphologische Aberrationen des Zellkerns auf. Diese Zahl mag zunächst relativ hoch erscheinen, steht aber im Einklang mit früheren Studien und ist sehr wahrscheinlich auf die reduzierte mechanische Stabilität der Kerne von *Lmna*^{-/-} MEFs zurückzuführen, die aus dem Verlust der Lamine A und C resultiert (Broers et al., 2004; Lammerding et al., 2006; Sullivan et al., 1999). Die Überexpression von myr-Lamin C-EGFP hatte nur einen sehr geringen Einfluss auf die Form der Zellkerne von *Lmna*^{-/-} MEFs (41%, n=264, p=0.042 zu nicht transfizierten Zellen). Im Gegensatz dazu wies die deutliche Mehrzahl der Lamin C2-EGFP exprimierenden Zellen erhebliche Deformationen der Zellkerne auf, die sich in einer mehrfachen Krümmung der Kernhülle äußerten (82%, n=204, p<0.0001 zu beiden Kontrollen).

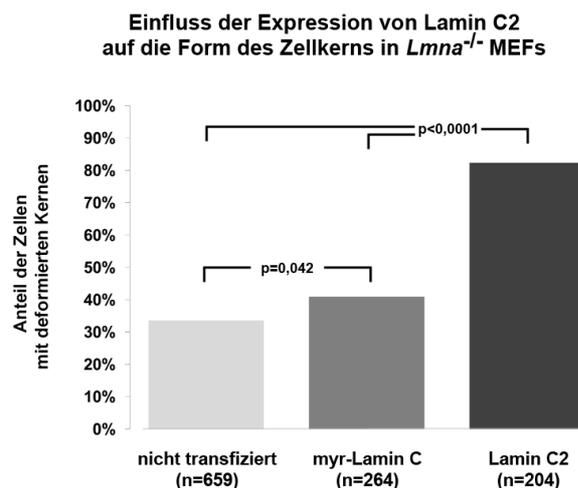


Abbildung 15. Veränderung der Morphologie des Zellkerns durch Expression von Lamin C2 in *Lmna*^{-/-} MEFs.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten aus Abschnitt 2.1.4, dass Lamin C2 einen Einfluss auf die strukturelle Integrität der Kernhülle ausübt, der scheinbar noch weit über seine erhöhte Proteinmobilität und seine lokale Anreicherung hinausgeht und die Kernhülle auf einem globalen Level beeinflusst. Wie diese Ergebnisse im Hinblick auf die möglichen Funktionen von Lamin C2 für die

Dynamik der meiotischen Telomere in Keimzellen zu sehen sind, wird nachfolgend noch ausführlich diskutiert.

2.2. Diskussion

Während der Prophase I der Meiose müssen sich die homologen Chromosomen paaren und werden durch den Synaptonemalkomplex (SC) strukturell miteinander verbunden (Synapse). Damit einhergehend kommt es im Prozess der homologen Rekombination zum reziproken Austausch genetischen Materials zwischen den Homologen. Dieser Austausch wird als cross-over Formierung bezeichnet. Sowohl die Ausbildung des SC, als auch die Ausbildung von cross-overs sind für die korrekte Segregation der Homologen während der Anaphase I der Meiose und damit für die Fertilität des betreffenden Organismus absolut essentiell (Cohen et al., 2006; Hunt and Hassold, 2002; Page and Hawley, 2004). Zusätzlich zu diesen Prozessen durchlaufen die meiotischen Chromosomen während der Prophase I eine charakteristische „Choreographie“, die evolutionär hoch konserviert ist, und in direktem funktionellen Zusammenhang mit der Ausbildung der Synapse und dem Prozess der Rekombination zu stehen scheint (Alzheimer, 2009; Scherthan, 2001; Zickler and Kleckner, 1998). Diese Choreographie betrifft die strukturelle Anheftung der Telomere an der Kernhülle und ihre anschließende dynamische Repositionierung, die zur transienten Ausbildung des „Bouquet“-Stadiums führt. Man nimmt an, dass die Ausbildung des Bouquets einerseits die Erkennung und Paarung der Homologen durch die Schaffung räumlicher Nähe erleichtert. Andererseits dienen vor allem die Bewegungsvorgänge bei der Auflösung des Bouquets offensichtlich auch der Vermeidung von Assoziationen zwischen nicht-homologen Chromosomen (Kozul and Kleckner, 2009).

Lamin C2 wird während der Meiose in der weiblichen Keimbahn exprimiert und unterstützt die korrekte Ausbildung der Synapse und den effizienten Ablauf der homologen Rekombination

Neben anderen Proteinen der Kernhülle wurde vor allem das meiosespezifische A-Typ Lamin C2 bereits als potentieller Spieler mit wichtiger funktioneller Bedeutung für die Anheftung und die dynamische Repositionierung der Telomere während der Meiose diskutiert (Alzheimer and Benavente, 1996; Alzheimer et al., 2011; Alzheimer et al., 1999). In diesem Zusammenhang konnte in neueren Studien bereits gezeigt werden, dass Lamin C2 für die Fertilität männlicher Mäuse tatsächlich essentiell ist und Lamin C2-defiziente Männchen erhebliche meiotische Defekte aufweisen (Göb, 2011, Dissertation; Schmitt, 2008, Dissertation). Im Gegensatz dazu kamen dieselben Studien zu dem Ergebnis, dass Lamin C2-defiziente Weibchen in der Lage sind, lebensfähige Nachkommen zu gebären und die Gonaden dieser Weibchen histologisch unauffällig erscheinen. Dieser offensichtliche sexuelle Dimorphismus hinsichtlich der Fertilität dieser Mäuse warf nun unmittelbar die Frage auf, ob Lamin C2 auf molekularer Ebene für die Meiose im weiblichen Geschlecht eine Rolle spielt, die bislang noch nicht näher definiert werden konnte, oder ob es für die Meiose in Weibchen schlicht entbehrlich ist.

Um diese Fragestellung sinnvoll zu bearbeiten, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst das Expressionsmuster der A-Typ Lamine während der weiblichen Meiose bestimmt, da hierzu keinerlei Vorarbeiten existierten. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass A-Typ Lamine während der Oogenese ein Stadien-spezifisches Expressionsmuster aufweisen und lassen sich folgendermaßen interpretieren: (1) Lamin C2 wird in der weiblichen Meiose offensichtlich vom Zygotän bis zum späten Pachytän exprimiert, da in wildtypischen Ovarien in diesem Zeitabschnitt eine Lamin A-spezifische, diskontinuierliche Färbung der Kernhülle nachweisbar ist (Abschnitt 2.1.1; Abbildung 5). Im Diplotän der Oogenese scheint Lamin C2 hingegen nicht mehr exprimiert zu werden, da Lamin C2-defiziente Ovarien 11 Tage alter Mäuse eine kontinuierliche A-Typ Lamin-spezifische Kernhüllenfärbung aufweisen, die sich hinsichtlich ihrer Lokalisation und ihrer Intensität nicht vom Wildtyp unterscheidet (Abschnitt 2.1.1; Abbildung 6). Demnach ähnelt die Expression von Lamin C2 während der weiblichen Meiose in ihrem

zeitlichen Verlauf sehr stark dem Expressionsmuster von Lamin C2, das für Männchen beschrieben wurde (Alzheimer and Benavente, 1996). (2) Im Diplotän der Prophase I beginnt offenbar die Expression der somatischen Lamine A/C (oder einer bisher unbekannt, für die weibliche Keimbahn-spezifischen A-Typ Lamin-Isoform) und bleibt im weiteren Verlauf der Oogenese erhalten. Dies belegen sowohl die bereits beschriebenen immunhistochemischen Färbungen an Lamin C2-defizienter Ovarien (2.1.1; Abbildung 6) als auch Experimente aus einer anderen Studie, die die Expression der Lamine A/C während verschiedener Stadien der Follikelreifung in adulten Mäusen untersuchte (Arnault et al., 2010). Die Expression der Lamine A/C weist demnach (im Gegensatz zu Lamin C2) offensichtlich erhebliche geschlechtsspezifische Unterschiede auf, da beide Lamine während der Meiose in Männchen sowie während der gesamten Spermatogenese nicht nachweisbar sind (Vester et al., 1993). Auf mögliche Funktionen der somatischen Lamine A/C während der Oogenese wird am Ende der Diskussion noch zurückgekommen.

Bezüglich der funktionellen Relevanz von Lamin C2 für die Meiose in Weibchen konnten in der vorliegenden Arbeit folgende Beobachtungen gemacht werden: (1) Lamin C2-defiziente Pachytän Oocyten zeigen mit einer deutlich erhöhten Häufigkeit Fehler in der strukturellen Paarung der Homologen durch den SC. (2) In Lamin C2-KO Weibchen wird die homologe Rekombination durch die Einführung meiotischer DNA DSBs scheinbar normal initiiert, die Reparatur dieser DSBs läuft in räumlicher Assoziation mit dem Auftreten von Paarungsfehlern aber verlangsamt bzw. unvollständig ab. (3) Die Beeinträchtigung der homologen Rekombination äußert sich in Lamin C2-defizienten Weibchen auch in einer Reduktion der Rekombinationsfrequenz und in einer erhöhten Anzahl an Chromosomenpaaren, die keine obligaten cross-over Strukturen ausbilden. Letzteres deutet auf das Auftreten von Fehlern in der Segregation der Homologen während späterer meiotischer Stadien hin, die in ähnlicher Weise bereits in anderen Mausmodellen beschrieben wurden (Baker et al., 1996; Daniel et al., 2011; Woods et al., 1999). Zusammenfassend konnte aufgrund der beschriebenen meiotischen Defekte eindeutig belegt werden, dass Lamin C2 trotz der offensichtlichen Fähigkeit von KO Weibchen lebensfähige Nachkommen zu gebären, auch während der weiblichen Meiose eine wichtige Funktion einnimmt und sein Verlust den korrekten Ablauf der Meiose in Weibchen negativ beeinflusst.

Das Schicksal der „defekten“ Oocyten und die Frage nach der Fertilität Lamin C2-defizienter Weibchen

Vor dem Hintergrund der beschriebenen meiotischen Fehler ist davon auszugehen, dass auch die Qualität bzw. die Quantität der vollständig gereiften Keimzellen Lamin C2-defizienter Weibchen im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert sein könnte. Sollte dies tatsächlich der Fall sein, wären Lamin C2-KO Weibchen trotz der Fähigkeit, lebensfähige Nachkommen hervorzubringen, nicht als vollständig fertil, sondern als „subfertil“ einzustufen. Diese Eigenschaft könnte sich phänotypisch beispielsweise in einer reduzierten Wurfgröße oder dem Auftreten von Jungen mit numerischen Chromosomenaberrationen (Aneuploidie) äußern. Ob dies tatsächlich der Fall ist, wäre in zukünftigen Studien noch detailliert zu untersuchen. Aufgrund des immer noch relativ unvollständigen Verständnisses der molekularen Kontrollmechanismen der weiblichen Meiose durch sogenannte „Checkpoints“ erscheint der mögliche Ausgang solcher Untersuchungen im Voraus jedoch nur schwer abschätzbar.

Interessanterweise konnte kürzlich allerdings in diesem Kontext ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Paarungsfehlern in Oocyten und deren aktiver Eliminierung durch Checkpoint-Mechanismen beschrieben werden (Kouznetsova et al., 2009). Hierbei wurde gezeigt, dass in Pachytän-Oocyten, die von einer geringen Anzahl (1 bis 3) von Paarungsfehlern betroffen sind, eine Signalkaskade aktiviert wird, die die Rekrutierung von BRCA1 und ATR, sowie die anschließende

Phosphorylierung von H2AX (γ H2AX) umfasst, und schließlich zum sogenannten MSUC (Meiotic silencing of unsynapsed chromatin) führt. Dieser Mechanismus scheint anschließend dafür zu sorgen, dass die von Paarungsfehlern betroffenen Oocyten kurz nach der Geburt der Mäuse (Tag 1 bis 2) eliminiert werden. Wie im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit dokumentiert, treten in Lamin C2-defizienten Mäusen in der überwiegenden Mehrheit der von Paarungsfehlern betroffenen Oocyten ebenfalls drei oder weniger Fehler pro Zelle auf (Abschnitt 2.1.2, Abbildung 8). Diese Paarungsfehler werden zudem durch eine starke lokale Anreicherung von γ H2AX markiert (Abschnitt 2.1.3, Abbildung 9), wie dies auch in den von Kouznetsova et al. (2009) durchgeführten Versuchen der Fall war. Somit erscheint es sehr wahrscheinlich, dass das MSUC sowie der zugrunde liegende Checkpoint auch in Lamin C2-KO Oocyten, die von Paarungsfehlern betroffen sind, ausgelöst werden und dass der Großteil dieser Oocyten dadurch perinatal eliminiert wird. Dies würde vermutlich zu einer signifikanten quantitativen Reduktion des Oocyten-Pools in Lamin C2-KO Weibchen führen.

In Lamin C2-defizienten Oocyten wurde jedoch zudem meiotische Defekte gefunden, die sich im Fehlen obligater MLH1-Foci in Zellen mit vollständiger Synapse aller 20 Homologenpaare äußerten (Abschnitt 2.1.3, Abbildung 10). Aufgrund der Abwesenheit von Paarungsfehlern werden solche Zellen höchst wahrscheinlich nicht durch den beschriebenen Mechanismus des MSUC erfasst. Ihre Eliminierung, falls diese überhaupt stattfinden sollte, geschieht demnach vermutlich eher durch Checkpoints, die in späteren Stadien der Meiose aktiv sind (Di Giacomo et al., 2005; Homer et al., 2005). Zudem ist nicht ohne Weiteres auszuschließen, dass sich ein Teil der defekten Oocyten trotz fehlerhafter Meiose der Eliminierung durch Checkpoints entzieht und somit durch fehlerhafte Segregation der Homologen zur Entstehung aneuploider Embryonen beitragen könnte. Dieses Phänomen wurde bereits in anderen Mausmodellen, wie beispielsweise in *Sycp3*^{-/-} Weibchen beschrieben (Yuan et al., 2002).

Der Verlust von Lamin C2 führt zu einem geschlechtsspezifischen Phänotyp

Die Tatsache, dass Lamin C2-KO Männchen infertil sind (Göb, 2011, Dissertation; Schmitt, 2008, Dissertation), Weibchen dagegen lebensfähige Nachkommen gebären können, manifestiert bereits einen relevanten geschlechtsspezifischen Dimorphismus dieser Mauslinie. Zusätzlich dazu können aufgrund der vorliegenden Daten zusammen mit Ergebnissen anderer Studien (Link, 2010, Diplomarbeit; Link et al. *submitted*) präzise Aussagen über die Beeinträchtigung der Meiose auf molekularer Ebene getroffen werden, um so die Auswirkungen des Verlustes von Lamin C2 quantitativ zwischen den Geschlechtern zu vergleichen.

Dabei wird zum einen ein erheblicher geschlechtsspezifischer Unterschied im Hinblick auf den Anteil der von Paarungsfehlern betroffenen Keimzellen deutlich. Wie in Abschnitt 2.1.2 (Abbildung 7 und Tabelle 2) gezeigt, treten in Lamin C2-defizienten Weibchen Paarungsfehler deutlich häufiger auf als in wildtypischen Kontrolltieren (32% vs. 9%). Dennoch ist hier ein erheblicher Teil des Oocyten-Pools der Lamin C2-defizienten Weibchen nicht von Paarungsfehlern betroffen (68%) und kann die Meiose in dieser Hinsicht scheinbar normal durchlaufen. In Lamin C2-KO Männchen zeigen hingegen nahezu alle Spermatozyten (98%) Paarungsfehler (Link, 2010, Diplomarbeit; Link et al., *submitted*). Zum anderen zeigt auch der quantitative Vergleich der Anzahl von Chromosomen pro Zelle, die jeweils von Paarungsfehlern betroffen sind, deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede. Während in Lamin C2-defizienten Weibchen der Großteil der defekten Zellen (ca. 80%) drei oder weniger unvollständig gepaarte Chromosomen aufweist (Abschnitt 2.1.2; Abbildung 8), sind in knock out Spermatozyten mehr als die Hälfte (53%) der Zellen von vier oder mehr Paarungsfehlern (bis zu zehn) betroffen (Link et al., *submitted*). Dieser Vergleich zeigt sehr deutlich, dass die strukturelle Paarung der homologen Chromosomen während der Meiose im männlichen Geschlecht offenbar deutlich stärker von Lamin C2 abhängig ist, als in Weibchen. Dieser Unterschied auf molekularer Ebene erklärt zugleich zwanglos die

beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschiede auf der Ebene der Fertilität im Lamin C2-defizienten Mausmodell.

Ähnliche sexuelle Dimorphismen hinsichtlich der Beeinflussung meiotischer Prozesse durch meiosespezifische Proteine und hinsichtlich der Fertilität von meiosespezifischen knock out-Mausmodellen wurden bereits in der Literatur beschrieben. Dies gilt zum Beispiel auch für das oben erwähnte *Sycp3*^{-/-}-Modell. Auch hier sind *Sycp3*-defiziente Männchen völlig steril (Yuan et al., 2000). Mutante Weibchen weisen hingegen zwar eine reduzierte Wurfgröße und eine erhöhte Anzahl aneuploider Embryonen auf (siehe oben), sind jedoch trotzdem in der Lage lebensfähige Nachkommen hervorzubringen (Yuan et al., 2002).

Lamin C2 dient als wichtiger struktureller Modulator der Kernhülle meiotischer Zellen, der die gerichtete Bewegung der Telomere unterstützt

Die bisher diskutierten Untersuchungen dienten der detaillierten Analyse der Funktion von Lamin C2 *in vivo*. Dabei zeigte sich, dass Lamin C2 auf die Paarung und die Rekombination zwischen den homologen Chromosomen während der Meiose einen entscheidenden Einfluss ausübt. Diese Beobachtung warf eine weitere hoch interessante Frage auf, die den zugrundeliegenden Mechanismus des beschriebenen Zusammenhangs anspricht: Wie kann ein Lamin, das an der Peripherie des Zellkern lokalisiert ist und einen integralen Bestandteil der Kernhülle repräsentiert, die Prozesse der Homologen-Paarung und der homologen Rekombination, die hauptsächlich im Inneren des Zellkerns ablaufen, maßgeblich beeinflussen?

Aufgrund mehrerer Fakten scheint es sinnvoll anzunehmen, dass das meiosespezifische A-Typ Lamin C2 eine wichtige Rolle für die Anheftung und/oder die dynamische Repositionierung der meiotischen Telomere während der Prophase I spielt: (1) Die zeitliche Expression von Lamin C2 ist auf die meiotische Prophase I der Meiose begrenzt, korreliert also exakt mit der dynamischen Umverteilung der Telomere (Alsheimer and Benavente, 1996; Smith and Benavente, 1992). (2) Im Gegensatz zu allen bekannten Lamin-Varianten somatischer Zellen lokalisiert Lamin C2 nicht in einer gleichmäßig verteilten Weise innerhalb der Kernhülle, sondern ist in mehreren diskontinuierlichen Domänen angereichert. Die Anheftungsstellen der meiotischen Telomere an der Kernhülle scheinen dabei in diese Lamin C2 enthaltenden Domänen eingebettet (Alsheimer et al., 1999). (3) Verglichen mit somatischen Laminen ist der N-terminale Sequenzbereich von Lamin C2 erheblich verkürzt. Diese Verkürzung resultiert im Verlust von Domänen, die für die Polymerisation von Laminen in Strukturen höherer Ordnung wichtig sind (Furukawa et al., 1994) (siehe auch Abschnitt 1.1).

Die beschriebenen Besonderheiten führten zu der konkreten Hypothese, dass Lamin C2 die Struktur der Lamina und der Kernhülle in einer Art und Weise modulieren könnte, die die Anheftung der Telomere an der Kernhülle und/oder ihre aktive Bewegung entlang der Kernhülle erlaubt oder zumindest unterstützt. Ob die Lamin C2 enthaltenden Domänen innerhalb der Kernhülle dabei als lokale strukturelle Verstärkungen oder als dynamische Plattformen aufgefasst werden sollten, blieb dabei offen (Alsheimer et al., 1999). Daher war es ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit, diese Modellvorstellungen zu konkretisieren und weiter zu verfeinern. In diesem Zusammenhang konnten durch die beschriebenen FRAP und FLIP-Versuche – in Zusammenschau mit denen der vorangegangenen Diplomarbeit (Jahn, 2009, Diplomarbeit) – folgende Beobachtungen gemacht werden: (1) Lamin C2 ist verglichen mit Lamin-Varianten ein sehr mobiles Protein. (2) Die erhöhte Mobilität ist innerhalb der diskontinuierlichen Domänen besonders ausgeprägt. (3) Der verkürzte N-Terminus (und nicht seine N-terminale Myristoylierung) ist die entscheidende Determinante seiner erhöhten Mobilität. Zusätzlich dazu konnte durch die ektopische Expression von Lamin C2 in somatischen Zellen gezeigt werden, dass es (4) in der Lage ist, andere Komponenten der Kernhülle

(Lamin B1, SUN-Domänen Proteine und LAP2-Isoformen) in ihrer Lokalisation zu beeinflussen und (5) die Integrität der Kernhülle auf einem globalen Level moduliert, da Lamin C2 exprimierende Zellen erhebliche morphologische Veränderungen ihrer Kerne aufweisen.

Diese Ergebnisse sprechen demnach stark dafür, dass die Modellvorstellung der dynamischen Plattformen der Realität deutlich besser entspricht, als die der strukturellen Verstärkungen. Bildlich gesprochen könnte man sich Lamin C2 folglich als eine natürliche, meiosespezifische „Lamin-Deletionsmutante“ vorstellen, die die Lamina um die Anheftungsstellen der meiotischen Telomere herum strukturell „aufweicht“ (siehe Modell in Abbildung 16). Hoch interessant ist in diesem Zusammenhang auch die beschriebene Beobachtung, dass Lamin C2 andere Komponenten der Kernhülle in ihrer Lokalisation beeinflussen kann. Dies deutet darauf hin, dass Lamin C2 die Kernhülle eventuell auf eine Art und Weise modifizieren könnte, die eine generelle Zunahme der Dynamik und eine strukturelle Aufweichung ihrer Bestandteile zur Folge hat. Diese Vermutung erscheint auch vor dem Hintergrund sinnvoll, dass Interaktionen von A-Typ Laminen (zu denen aus Lamin C2 zählt) mit zahlreichen anderen Komponenten der Kernhülle (darunter auch SUN-Domänen Proteine und LAP2-Isoformen) sehr gut belegt sind (Wilson and Foisner, 2010). Um die beschriebene Hypothese experimentell zu überprüfen, könnten Photobleaching-Versuche von Lamin B1, SUN-Domänen Proteinen und LAP2-Isoformen in Lamin C2 exprimierenden Zellen höchst aufschlussreich sein.

Im Hinblick auf die beschriebene Fragestellung zur konkreten Funktion von Lamin C2 *in vivo* (Unterstützung der Anheftung der Telomere an der Kernhülle und/oder der dynamischen Repositionierung der Telomere) impliziert die beschriebene Modellvorstellung der dynamischen Plattformen, dass die Funktion von Lamin C2 *in vivo* wohl eher darin liegen sollte, die aktive Bewegung der Telomere zu ermöglichen als ihre strukturelle Anheftung zu unterstützen. Diese Vermutung wurde jüngst durch aktuelle Studien im Lamin C2-defizienten Mausmodell unzweifelhaft belegt (Link, 2010, Diplomarbeit; Link et al., *submitted*). Konkret konnte in diesen Arbeiten durch die Anfärbung entsprechender Kernhüll- und Telomer-Marker mittels Immunhistochemie und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung gezeigt werden, dass sich die Lokalisation der meiotischen Telomere an der Kernhülle zwischen Lamin C2-KO Spermatozyten und wildtypischen Kontrollen quantitativ nicht unterscheidet. Dies zeigt deutlich, dass Lamin C2 für die Anheftung der Telomere an der Kernhülle *per se* nicht essentiell ist. Deutlich beeinflusst war in diesen Untersuchungen hingegen die zeitliche Dynamik, mit der sich das meiotische Telomer-Bouquet im Laufe der Prophase I auflöste. Hierbei waren die Bewegungen der Telomere in Lamin C2-defizienten Tieren im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern erheblich verlangsamt. Diese Daten stehen somit im Einklang mit den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnissen und der beschriebenen Modellvorstellung.

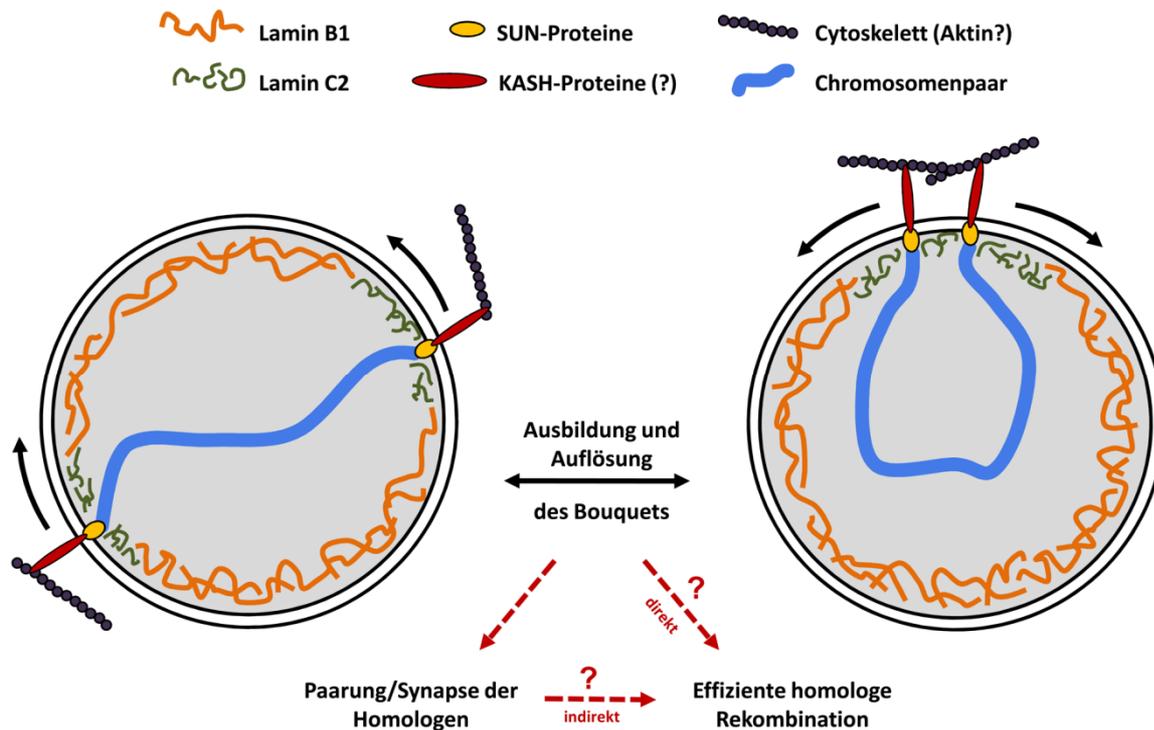


Abbildung 16. Modell zur Rolle von Lamin C2 bei der Dynamik der meiotischen Chromosomen. Während der Prophase I der Meiose sind die Telomere über SUN-Domänen Proteine strukturell an der Kernhülle verankert. Über die Interaktion von SUN-Proteinen mit Bindungspartnern in der äußeren Kernmembran (vermutlich KASH-Domänen Proteine) wird eine Verbindung zum Cytoskelett (vermutlich Aktin) und assoziierten Motorproteinen hergestellt, die es erlaubt, Telomere und Chromosomen aktiv zu bewegen. Dies führt zur Ausbildung und zur Auflösung der chromosomalen „Bouquets“. Die Funktion von Lamin C2 in diesem Szenario ist es, die Kernhülle um die Anheftungsstellen der Telomere mit einer strukturellen Flexibilität auszustatten, die die aktive Bewegung der Telomere unterstützt. Die gestrichelten roten Pfeile symbolisieren eine positive Beeinflussung. Ob der positive Einfluss der meiotischen Telomerbewegungen auf den effizienten Ablauf der homologen Rekombination direkt ist, oder indirekt über die strukturelle Paarung der Homologen vermittelt wird, ist bislang unklar. Für Referenzen siehe Alsheimer (2009).

Die mögliche Rolle der Lamine A/C in der Oogenese: Neue Funktionen und bisher unbeschriebene Zusammenhänge?

Zusätzlich zu der diskutierten Expression von Lamin C2 während der weiblichen Meiose und der Beschreibung seiner Funktion, wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals die Expression der Lamine A/C während der weiblichen Meiose untersucht. Dabei wurde in Oocyten interessanterweise ab dem Diplotän der Prophase I ein homogen entlang der Kernhülle verteiltes, A-Typ Lamin-spezifisches Signal nachgewiesen. Zusätzlich dazu wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit (Abschnitt 2.1.1; Abbildung 6) sowie in anderen Studien (Arnault et al., 2010) gezeigt, dass Oocyten adulter Mäuse, die sich überwiegend im Diplotän-Arrest bzw. in der Phase der Follikelreifung befinden, eine sehr starke Expression von Lamin A/C aufweisen. Zusammengenommen deuten die vorliegenden Daten demnach daraufhin, dass die Expression von Lamin A/C in Oocyten ab Diplotän der Meiose beginnt und daraufhin kontinuierlich über die folgenden Phasen der Oogenese erhalten bleibt. Über die Funktion der Lamine A/C in späten Stadien der Meiose bzw. in arretierten/reifenden Oocyten kann bislang nur spekuliert werden. Vorstellbar wäre neben strukturellen Aspekten vor allem eine DNA-protective Funktion, die das Genom vor schädlichen metabolischen Einflüssen schützen könnte. In Anbetracht der Tatsache, dass weibliche Keimzellen mitunter erhebliche Zeitspannen überdauern müssen, bevor sie ihre finale Reifung durchführen und schließlich befruchtet werden, erscheint diese Annahme besonders sinnvoll.

In der Tat konnten DNA-protective Funktionen von A-Typ Laminen gegenüber schädlichen oxidativen Einflüssen jüngst experimentell nachgewiesen werden und werden in der Literatur momentan intensiv diskutiert (Hutchison, 2012; Pekovic et al., 2011). In jedem Fall decken die in dieser Arbeit gezeigten Versuche an Diplotän Oocyten einen bislang in der Literatur nicht beschriebenen sexuellen Dimorphismus hinsichtlich der Expression der Lamine A/C während der Meiose auf, dessen funktionelle Relevanz zu untersuchen eine hoch interessanter Aspekt zukünftiger Studien sein könnte.

3. Teil B: Die Lamin A Mutante AΔ8-11 persistiert in der *Lmna*^{-/-} Mauslinie

3.1. Ergebnisse

Der folgende Teil B der Arbeit beschäftigt sich mit einer relativ unerwarteten Entdeckung, die sich aus der Verwendung von *Lmna*^{-/-} MEFs als Modellsystem für die in 2.1.4 beschriebenen *in vitro* Versuche ableitet. 1999 publizierten Sullivan und Kollegen erstmals eine Mauslinie, in der das für A-Typ Lamine codierende *Lmna*-Gen durch einen Gene-targeting Ansatz „zerstört“ werden sollte. In einer entsprechenden initialen Charakterisierung beschrieb man, dass es in diesen Mäusen keinerlei nachweisbare Expression von A-Typ Laminen gab (Sullivan et al., 1999). Demzufolge wurde das eingebrachte Lamin A-Genkonstrukt als Null-Allel definiert und die entsprechende Mauslinie als *Lmna*^{-/-} (oder *Lmna*-null) bezeichnet. Sie diene seitdem als wichtiges „loss-of-function“ Modell in einer großen Anzahl von Studien auf dem Forschungsgebiet der Kernhülle und der Lamine. Insgesamt wurde die Arbeit von Sullivan und Kollegen bis heute mehr als 500mal zitiert. Vor diesem Hintergrund erscheint die in Teil B dieser Arbeit dokumentierte Erkenntnis, dass *Lmna*^{-/-}-Mäuse, entgegen der ursprünglichen Beschreibung, doch eine verkürzte Lamin A Variante exprimieren, relativ überraschend. Wie es zu dieser Erkenntnis kam und die darauf folgende detaillierte Charakterisierung der in *Lmna*^{-/-}-Mäusen persistierenden Lamin A Mutante ist im Folgenden dokumentiert.

3.1.1. Mehrere A-Typ Lamin-Antikörper reagieren mit einem Kernhüll-Antigen vermeintlich A-Typ Lamin-defizienter Zellen

Drei verschiedene A-Typ Lamin-Antikörper färben die Kernhülle von *Lmna*^{-/-} MEFs

Ausgangspunkt für die folgenden Versuche war die Absicht, Zellen einer etablierten, aus *Lmna*^{-/-} Mäusen isolierten Fibroblastenzelllinie (*Lmna*^{-/-} MEFs), als negativ Kontrolle einzusetzen, um die Spezifität des im Labor neu hergestellten A-Typ Lamin-Antikörpers pAb bs-01 immunocytochemisch zu überprüfen. Entgegen der Erwartung detektierte pAb bs-01 dabei allerdings unzweifelhaft ein Antigen der Kernhülle in *Lmna*^{-/-} MEFs (Abbildung 17A-A''). Eine naheliegende Erklärung für dieses unerwartete Ergebnis war natürlich die Möglichkeit, dass die beobachtete immunocytochemische Färbung auf eine A-Typ Lamin-unspezifische Kreuzreaktion von pAb bs-01 mit einem anderen, unbekanntem Protein der Kernhülle zurückzuführen sein könnte.

Um diese Vermutung zu untersuchen, wurden im nächsten Schritt die etablierten A-Typ Lamin-Antikörper pAb H-110 (Santa Cruz Biotechnology) und mAb R27 (Hoger et al., 1991) verwendet, um in analoger Weise erneut eine Immunlokalisation in *Lmna*^{-/-} MEFs durchzuführen. Überraschenderweise reagierten auch diese beiden Antikörper sehr spezifisch mit der Kernhülle der vermeintlich A-Typ Lamin-defizienten Zellen (Abbildung 17B-B'' und C-C''). Diese Beobachtungen waren vor allem deshalb überraschend, weil die ursprüngliche Arbeit von Sullivan et al. (1999) die Expression von „Volllänge“ Lamin A/C oder verkürzter A-Typ Lamin Mutanten in *Lmna*^{-/-} Mäusen ausschloss. Andererseits waren die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper pAb H-110 und mAb R27 aber sehr gut etabliert und wurden bereits in vielen publizierten Arbeiten eingesetzt, ohne dass dabei A-Typ Lamin-unspezifische Kreuzreaktionen beschrieben wurden. Somit standen die bisher gezeigten Daten in einem offensichtlichen Widerspruch zu den ursprünglichen Analysen von Sullivan et al.

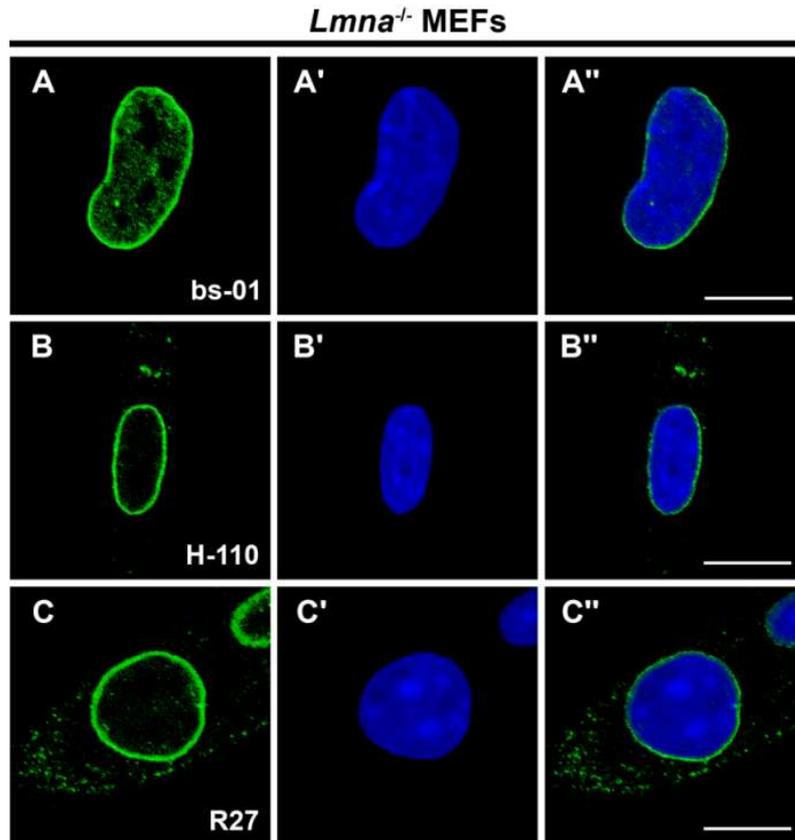


Abbildung 17. Drei verschiedene A-Typ Lamin-Antikörper färben die Kernhülle von *Lmna*^{-/-} MEFs. *Lmna*^{-/-} MEFs wurden mit je einem der drei angegebenen A-Typ Lamin-Antikörpern pAb bs-01 (A), pAb H-110 (B) oder mAb R27 (C) gefärbt. DNA wurde mit Hoechst-33258 gefärbt (A'-C'). Die Auswertung der Präparate erfolgt am CLSM. Die Overlays beider Kanäle zeigen jeweils A''-C''. Größenbalken, 10 µm.

pAbs bs-01, H-110 und mAb R27 färben die Kernhülle ebenfalls in *Lmna*^{-/-} Lebergewebe

Um die mit *Lmna*^{-/-} MEFs erzielten Ergebnisse zu verifizieren, wurden die entsprechenden immunocytochemischen Versuche mit den drei bereits oben beschriebenen Antikörpern (pAb bs-01, pAb H-110 und mAb R27) auf 5 µm Gefrierschnitten von Lebergewebe aus *Lmna*^{-/-} Mäusen und wildtypischen Kontrolltieren wiederholt (Abbildung 18). Auch hierbei wurden die Kernhüllen der *Lmna*^{-/-} Leberzellen mit allen drei verwendeten A-Typ Lamin-spezifischen Antikörpern (pAbs bs-01 und H-110 sowie mAb R27) eindeutig detektiert. Dabei war die Intensität der Färbung im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen nur leicht reduziert (vgl. Übersichtsaufnahmen in Abbildung 18A-A'' und E-E''). In Übereinstimmung mit der ursprünglichen Charakterisierung (Sullivan et al., 1999) wiesen die Zellkerne der *Lmna*^{-/-} Leberzellen dabei teilweise erhebliche Deformationen auf (siehe Abbildung 18F-F'' und G-G'').

Die immunohistochemische Untersuchung von *Lmna*^{-/-} Lebergewebe bestätigte somit die Ergebnisse des vorangegangenen Abschnitts. Dadurch verstärkte sich gleichzeitig die Diskrepanz zur ursprünglichen Charakterisierung der *Lmna*^{-/-} Mauslinie durch Sullivan und Kollegen (1999), die die Expression von stabilen *Lmna*-codierten Genprodukten auf Proteinebene experimentell ausschloss. Dies machte – nicht zuletzt aufgrund des hohen Stellenwerts, den die untersuchte Mauslinie als Modellsystem für die Forschung auf dem Gebiet der Kernhülle seit Jahren einnimmt (vergleiche Abschnitt 3.2) – weitere Versuche zur vollständigen Aufklärung der offensichtlichen Widersprüchlichkeiten unausweichlich.

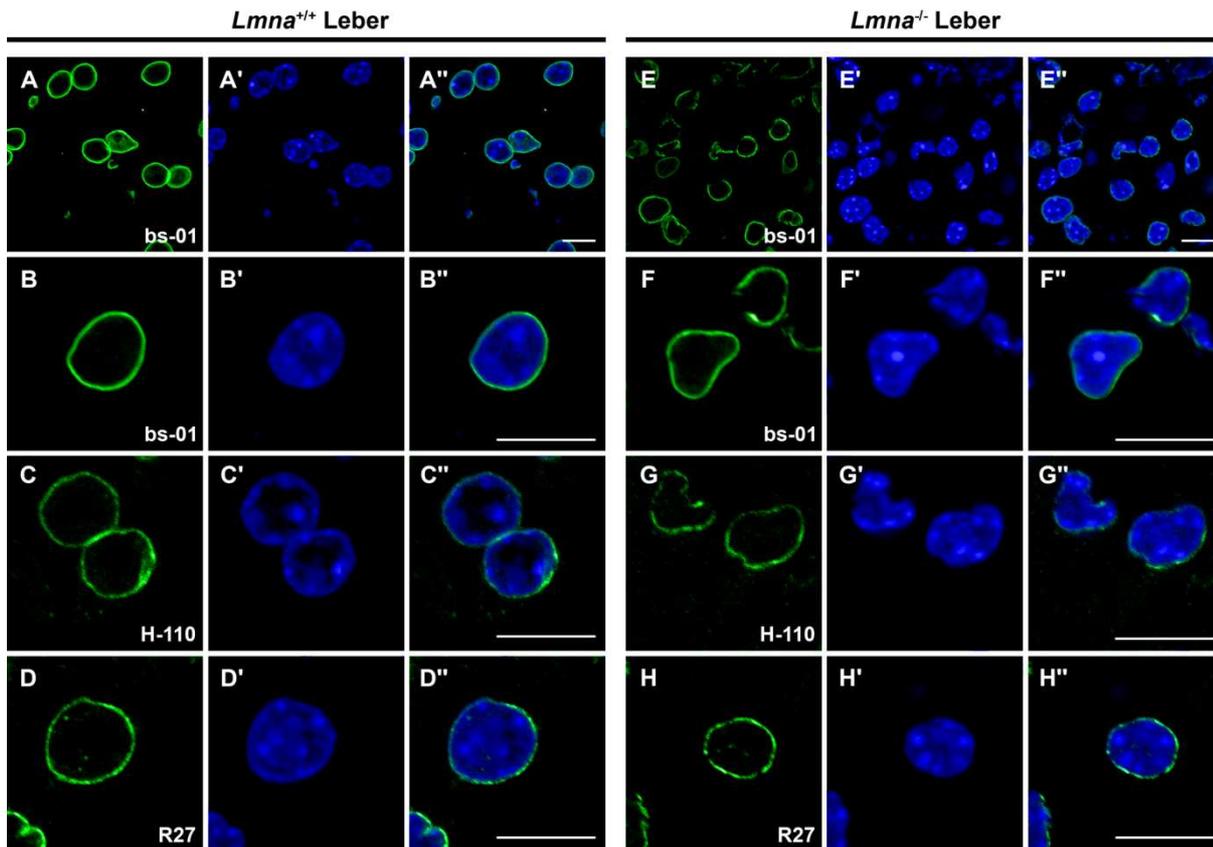


Abbildung 18. pAb bs-01, pAb H-110 und mAb R27 färben ebenfalls die Kernhülle in *Lmna*^{-/-} Leberpräparaten. 5 µm Gefrierschnitte von Lebergewebe aus *Lmna*^{-/-} Mäusen und Wildtyp-Kontrollen wurden wie angegeben mit pAb bs-01 (A-B und E-F), pAb H-110 (C und G) oder mAb R27 (D und H) gefärbt. DNA wurde mit Hoechst-33258 gefärbt (A'-H'). Die Präparate wurden am CLSM ausgewertet und die einzelnen Kanäle wurden überlagert (A''-H''). A-A'' und E-E'' zeigen Gewebsübersichten, B-D'' und F-H'' zeigen Detailaufnahmen einzelner Hepatocyten. Größenbalken, 10 µm.

Ein etwa 54 kDa großes Antigen ist mit pAbs bs-01 und H-110 in Western blots von *Lmna*^{-/-} Proben detektierbar

Die beschriebenen immuncyto- und immunhistochemischen Analysen von *Lmna*^{-/-} MEFs und Leber ließen es zunehmend unwahrscheinlich erscheinen, dass die dabei erzielten Ergebnisse lediglich aufgrund unspezifischer Kreuzreaktionen der verwendeten Antikörper mit „Nicht-Lamin Proteinen“ zustande kamen. Daher musste konsequenterweise die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die vermeintlich A-Typ Lamin-defizienten Zellen und Gewebe der *Lmna*^{-/-} Mauslinie doch ein bislang nicht beschriebenes A-Typ Lamin exprimieren könnten. Um diesem Gedanken nachzugehen und um ein eventuell in *Lmna*^{-/-} Mäusen persistierendes A-Typ Lamin molekular zu charakterisieren, wurden Western blots verschiedener *Lmna*^{-/-} Proben mit den beiden bereits verwendeten Antikörpern pAb bs-01 und pAb H-110 angefertigt (Abbildung 19). Dazu wurden Proteinproben von Herz- und Lebergewebe aus *Lmna*^{-/-} Mäusen und wildtypischen Kontrollen, sowie aus *Lmna*^{-/-} MEFs verwendet.

In den Kontrollen (*Lmna*^{+/+} Herz und Leber) detektierten sowohl pAb bs-01 als auch pAb H-110 die Lamine A (70 kDa) und C (60 kDa). Im Einklang mit der ursprünglichen Studie von Sullivan et al. (1999) waren beide Proteine in keiner der verwendeten *Lmna*^{-/-} Proben nachweisbar. Dies bestätigte die beschriebene Abwesenheit der „Volllänge“ Lamine A und C in *Lmna*^{-/-} Mäusen. Jedoch konnte mit beiden Antikörpern in allen *Lmna*^{-/-} Proben ein Antigen von etwa 54 kDa detektiert werden. In den Wildtyp-Kontrollen traten unerwarteter Weise Banden ähnlicher molekularer Masse (55 kDa) auf. Diese liefen aber etwas über dem 54 kDa Antigen der *Lmna*^{-/-} Proben. Dieser Unterschied im

Migrationsverhalten deutete bereits stark daraufhin, dass beide Proteine nicht identisch waren. Dies konnte im weiteren Verlauf der Arbeit noch unzweifelhaft belegt werden (siehe unten). Zusammenfassend deuteten die bisher gezeigten Daten aus Immuncyto-/Immunhistochemie und Western blots also zunehmend daraufhin, dass möglicherweise eine trunkierte Variante eines A-Typ Lamins mit einer Masse von etwa 54 kDa in der untersuchten *Lmna*^{-/-} Mauslinie persistiert.

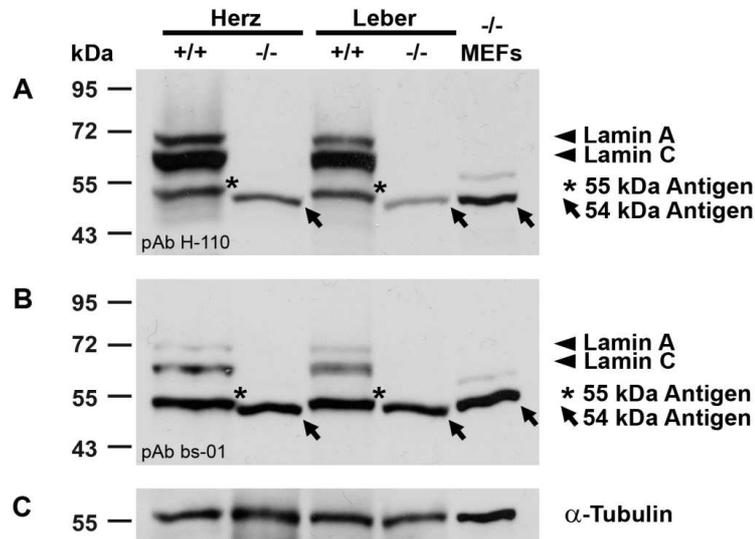


Abbildung 19. Ein 54 kDa Antigen ist in *Lmna*^{-/-} Proben mit A-Typ Lamin-Antikörpern mittels Western blot nachweisbar. Proteinproben aus *Lmna*^{-/-} Herz und Leber, den entsprechenden Wildtyp-Kontrollen, sowie aus *Lmna*^{-/-} MEFs wurden durch SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Die Detektion der A-Typ Lamine erfolgte mit den angegebenen Antikörpern (A: pAb H-110; B: pAb bs-01). Als Ladekontrolle wurde zudem α -Tubulin durch mAb T5168 gefärbt (C). In allen *Lmna*^{-/-} Proben ist sowohl mit pAb H-110 als auch mit pAb bs-01 ein Antigen bei etwa 54 kDa nachweisbar (Pfeile). Ein Antigen ähnlicher Größe (55 kDa; Sternchen) ist auch in den Wildtypkontrollen zu finden, dieses läuft im SDS-Gel aber etwas langsamer.

3.1.2. Klonierung eines bisher unentdeckten *Lmna* Genprodukts aus *Lmna*^{-/-} MEFs und Geweben

Aufgrund der verwendeten Gene-targeting Strategie ist die Expression eines stabilen 54 kDa *Lmna* Genprodukts in *Lmna*^{-/-} Zellen theoretisch möglich

Eine Möglichkeit, die offensichtliche Diskrepanz zwischen den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Daten und der in Sullivan et al. (1999) dargestellten Charakterisierung der *Lmna*^{-/-} Mauslinie zu erklären, könnte die Verwendung unterschiedlicher Antikörper sein. Daher wurde es im Folgenden als sinnvoll erachtet, weitere Versuche, die diese Diskrepanz aufklären sollten, unabhängig von der Verwendung weiterer Antikörper durchzuführen.

Sollte ein trunkiertes *Lmna* Genprodukt in *Lmna*^{-/-} Mäusen tatsächlich als stabiles Protein vorliegen, so müsste dazu auch eine entsprechende mRNA exprimiert werden und nachweisbar sein. Um Hinweise auf die mögliche Beschaffenheit einer solchen putativen mRNA zu erhalten, wurde die von Sullivan und Kollegen verwendete Gene-targeting Strategie genauer betrachtet: Das *Lmna* Gen der Maus umfasst 12 codierende Exons. Zur Herstellung der *Lmna*^{-/-} Linie wurden die Exons 8 bis 11 dieses Gens durch eine Neomycin-Resistenzkassette ersetzt. Demnach war es prinzipiell vorstellbar, dass es durch alternatives Spleißen der entsprechenden prä-mRNA zum Verlust des Sequenzbereichs der Neomycin-Resistenzkassette kommen könnte und somit eine stabile mRNA entstünde, die die Exons 1 bis 8 und 12 des *Lmna* Gens enthielte. Da dabei das ursprünglich Leseraster beibehalten würde, ergibt die *in silico*

Translation (http://expasy.org/tools/pi_tool.html) einer solchen putativen mRNA (von nun an als Lamin A Δ 8-11 bezeichnet) ein hypothetisches Proteinprodukt von etwa 53,5 kDa. Dieser Wert entsprach somit der Masse des tatsächlich in *Lmna*^{-/-} Proben detektierten 54 kDa Antigens sehr gut.

In *Lmna*^{-/-} Proben ist tatsächlich eine mRNA nachweisbar, die für das verkürzte *Lmna* Genprodukt Lamin A Δ 8-11 codiert

Um herauszufinden, ob eine Lamin A Δ 8-11 mRNA in *Lmna*^{-/-} Mäusen tatsächlich exprimiert wird, wurden *Lmna*^{-/-} Herz, Leber und MEFs mittels RT-PCR untersucht. Dazu wurden zwei verschiedene Primerpaare eingesetzt, wobei die Bindungsstellen der Forward-Primer jeweils in Exon 1, die der Reverse-Primer jeweils in Exon 12 des *Lmna* Gens lagen (Abbildung 20). Wie erwartet, waren in den Wildtyp-Kontrollen (Herz und Leber) mit beiden Primersets Amplicons von etwa 2 kbp leicht amplifizierbar. Dies entsprach der Größe der für „Volllänge“-Lamin A codierenden mRNA. Übereinstimmend mit den oben beschriebenen Western blots war ein entsprechendes „Volllänge“-Lamin A Amplicon in allen *Lmna*^{-/-} Proben nicht nachweisbar. Stattdessen lieferten beide Primerstes in allen untersuchten *Lmna*^{-/-} Proben PCR-Produkte einer Größe von etwa 1,4 kbp. Dies entsprach der Länge der putativen Lamin A Δ 8-11 cDNA. Die anschließende Sequenzierung bestätigte eindeutig, dass diese PCR-Produkte tatsächlich für Lamin A Δ 8-11 codierten. Im Einklang mit der Auffassung, dass es sich bei den im Western blot gefundenen Antigenen von 54 kDa aus *Lmna*^{-/-} Proben und von 55 kDa aus den Wildtyp-Kontrollen um *verschiedene* Proteine handelt (vgl. Abbildung 19), waren die 1,4 kbp Lamin A Δ 8-11 Amplicons in keiner der Wildtyp-Kontrollen nachweisbar. Somit konnten die beschriebenen RT-PCR Analysen eindeutig nachweisen, dass zumindest auf der Ebene der mRNA in der untersuchten *Lmna*^{-/-} Mauslinie ein verkürztes *Lmna* Genprodukt existiert.

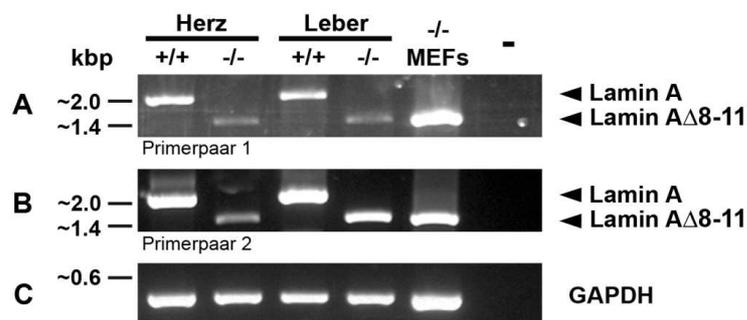


Abbildung 20. Nachweis eines 1,4 kbp Amplicons in *Lmna*^{-/-} Proben mit Lamin A-spezifischen Primern durch RT-PCR. cDNA aus *Lmna*^{-/-} Herz und Leber, den entsprechenden Wildtyp-Kontrollen, sowie aus *Lmna*^{-/-} MEFs wurde als template für die Analyse mittels RT-PCR verwendet. Dabei wurden zwei verschiedene Lamin A-spezifische Primerpaare verwendet. Die Primer des Paares 1 (A) waren so gewählt, dass ihre Bindungsstellen im Proteincodierenden Bereich des Exon 1 (forward) bzw. des Exon 12 (reverse) des *Lmna* Gens lagen. Die Bindungsstellen des Primerpaares 2 (B) hingegen lagen im 5' UTR des Exon 1 (forward) bzw. im 3' UTR des Exon 12 (reverse). Mit beiden Ansätzen konnte in allen *Lmna*^{-/-} Proben ein Amplicon von etwa 1,4 kbp produziert werden. Dieses war in den Wildtyp-Kontrollen nicht nachweisbar. Um die Qualität der verwendeten cDNA zu überprüfen, wurde eine PCR mit GAPDH-spezifischen Primern durchgeführt (C).

3.1.3. Lamin A Δ 8-11 ist in *Lmna*^{-/-} Zellen als stabiles Protein vorhanden

Der Nachweis einer mRNA ist ein guter Hinweis auf die Expression des für sie codierenden Gens, jedoch für sich alleine noch kein ausreichender Beweis dafür, dass auch das entsprechende Protein stabil exprimiert wird. Daher wurden die weiteren Versuche, die die Existenz eines trunkierten *Lmna* Genprodukts in *Lmna*^{-/-} Mäusen abschließend klären sollten, wieder auf Proteinebene durchgeführt. Ziel dieser Versuche war es, das 54 kDa Antigen (also das putative Lamin A Δ 8-11) aus *Lmna*^{-/-} MEFs zu isolieren, biochemisch aufzureinigen und schließlich massenspektrometrisch zu analysieren.

Das 54 kDa Antigen aus *Lmna*^{-/-} MEFs lässt sich aufgrund seiner geringen Löslichkeit unter Hochsalzbedingungen biochemisch gut anreichern

Von Proteinen des Karyoskeletts, zu denen vor allem auch die Lamine zu zählen sind, ist bekannt, dass sie gegenüber der Extraktion mit nicht-ionischen Detergenzien, DNase I und hohen Salzkonzentrationen weitgehend resistent sind (Dechat et al., 1998; Dwyer and Blobel, 1976; Foisner and Gerace, 1993; Senior and Gerace, 1988). Da die meisten zellulären Proteine unter diesen Bedingungen gut löslich sind, stellt diese Art der Extraktion eine relativ einfache Möglichkeit dar, Lamine biochemisch anzureichern. Unter der Annahme, dass es sich bei dem zu charakterisierenden 54 kDa Antigen aus *Lmna*^{-/-} MEFs um eine trunkierte Lamin A Variante handelt, erschien es daher sinnvoll, eine angepasste Version eines etablierten Protokolls (Alzheimer et al., 1999) anzuwenden, das sich die beschriebene Eigenschaft der Lamine zunutze macht.

Zu diesem Zweck wurden *Lmna*^{-/-} MEFs sukzessive mit 1% Triton X-100, DNase I und 1 M NaCl extrahiert. Wie erwartet, waren unter diesen Bedingungen die meisten zellulären Proteine gut löslich (Abbildung 21A). Der Großteil des zellulären Pools des 54 kDa Antigens hingegen ging erst durch die abschließende Behandlung des resultierenden Hochsalzpellets mit 8M Urea in Lösung (Abbildung 21B). Somit war es erstens möglich, das 54 kDa Antigen durch die beschriebenen Behandlungsschritte bereits relativ gut zu reinigen. Zweitens sind die in Abbildung 21 gezeigten Daten außerdem mit der Vermutung gut vereinbar, dass es sich beim 54 kDa Antigen aus *Lmna*^{-/-} MEFs tatsächlich um ein Lamin handelt, da es offensichtlich die entsprechende biochemische Eigenschaft der geringen Löslichkeit aufweist.

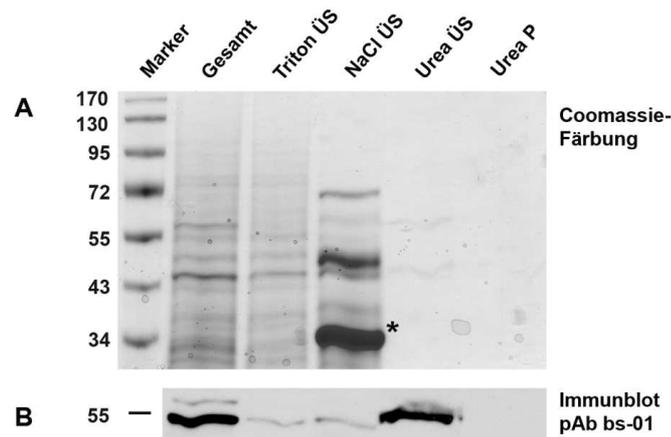


Abbildung 21. Biochemische Anreicherung des 54 kDa Antigens aus *Lmna*^{-/-} MEFs durch Hochsalz-Extraktion. *Lmna*^{-/-} MEFs wurden sukzessive mit 1% Triton X-100, DNase I und 1 M NaCl extrahiert. Die resultierenden Pellets wurden in 8M Urea solubilisiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden mit Methanol/Chloroform gefällt und in äquivalenten Mengen durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung (A) bzw. durch Western blot und anschließende Immundetektion mit pAb bs-01 analysiert (B). Während die meisten zellulären Proteine durch die Extraktion mit 1% Triton X-100 und DNase I/1M NaCl in Lösung gehen, ist der Großteil des 54 kDa Antigens aus *Lmna*^{-/-} MEFs erst in 8M Urea löslich. Die stark durch Coomassie gefärbte Bande bei 34 kDa in Spur NaCl ÜS (siehe Sternchen in A) resultiert aus der Zugabe von DNase I. Beschriftung der Spuren: Gesamt, Gesamtzellen als

Kontrolle; Triton ÜS, Überstand nach Triton X-100 Zugabe; NaCl ÜS, Überstand nach DNase I und 1M NaCl Behandlung; Urea ÜS, Überstand nach 8M Urea; Urea P, Pellet nach 8M Urea.

Die Ionenaustausch-Chromatographie erlaubt eine weitere Anreicherung des 54 kDa Antigens

Die gewonnene 8M Urea-Fraktion wurde nachfolgend eingesetzt, um das 54 kDa Antigen aus *Lmna*^{-/-} MEFs weiter zu reinigen. Dazu wurde eine für Lamine gut etablierte und durch Krohne (2004) beschriebene Form der Ionenaustausch-Chromatographie gegen eine Carboxymethyl-Sepharose Matrix (CM-Sepharose) genutzt. Zunächst wurde der isoelektrische Punkt (pI) des putativen Lamin A Δ 8-11 theoretisch ermittelt (http://expasy.org/tools/pi_tool.html). Nach diesen Berechnungen sollte dieser Wert bei pH 6,75 liegen. Da bei der durchgeführten Ionenaustausch-Chromatographie gegen die negativ geladene CM-Sepharose nur Proteine an die Matrix binden können, die beim verwendeten „Arbeits-pH-Wert“ eine positive Gesamtladung tragen, wurde dieser Wert entsprechend bei pH 6,0 gewählt. Unter den gewählten Bedingungen erfolgte die Bindung des 54 kDa Antigens an die CM-Sepharose quantitativ (Abbildung 22A). Demnach musste der tatsächliche pI des 54 kDa Antigens wie erwartet über pH 6,0 liegen. Dieses Ergebnis stand somit im Einklang mit dem theoretisch ermittelten Wert und bekräftigte folglich auch die Vermutung, dass es sich bei dem 54 kDa Antigen aus *Lmna*^{-/-} MEFs tatsächlich um Lamin A Δ 8-11 handeln könnte.

Nach der Bindung an die CM-Sepharose Matrix wurden die gebundenen Proteine durch einen diskontinuierlichen NaCl-Gradienten eluiert. Das Elutionsprofil des 54 kDa Antigens wurde nachträglich durch Western blot ermittelt. Der Großteil des gesuchten Proteins eluierte dabei in reproduzierbarer Weise bei etwa 60mM NaCl. Anschließend wurde das in den Elutionsfraktionen enthaltene Proteingemisch durch SDS-PAGE und Färbung mit Silbernitrat aufgetrennt und sichtbar gemacht (Abbildung 22B). Die dem 54 kDa Antigen der *Lmna*^{-/-} MEFs entsprechende Proteinbande wurde aufgrund des Elutionsprofils und des Laufverhaltens im SDS-Gel zugeordnet, ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert.

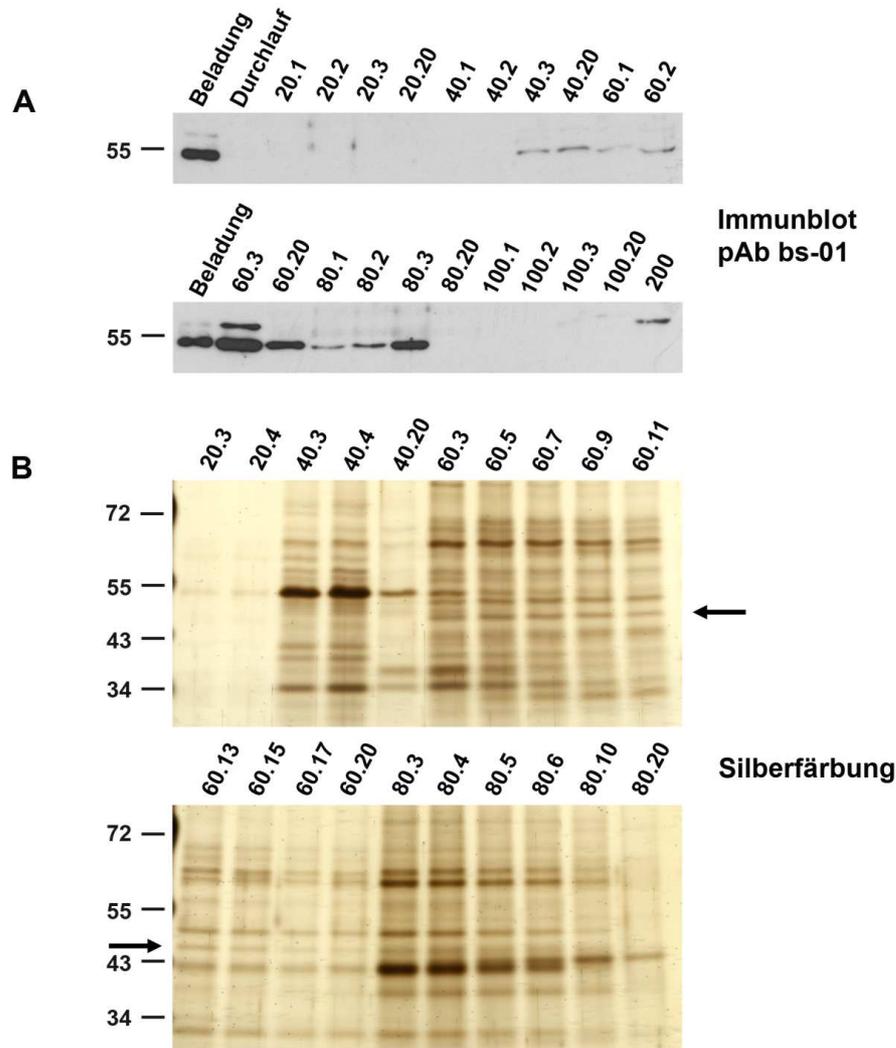


Abbildung 22. Aufreinigung des 54 kDa Antigens aus *Lmna*^{-/-} MEFs durch Ionenaustausch-Chromatographie. Die in 8M Urea solubilisierten Proteine des zuvor hergestellten Hochsalz-Pellets wurden an eine CM-Sepharose Matrix gebunden und durch einen diskontinuierlichen NaCl-Gradienten fraktioniert. Die Fraktionen wurden mit Methanol/Chloroform gefällt und durch Western blot und Immundetektion mit pAb bs-01 (A) bzw. durch SDS-PAGE und anschließende Silbernitrat-Färbung (B) analysiert. Der Großteil des 54 kDa Antigens eluierte reproduzierbar bei etwa 60 mM NaCl (siehe A). Die dem 54 kDa Antigen entsprechende Bande wurde im silbergefärbten Gel anhand des Elutionsprofils ausgewählt und ausgeschnitten (Pfeile in B).

Das 54 kDa Antigen aus *Lmna*^{-/-} MEFs ist identisch mit der Lamin Mutante AΔ8-11

Die abschließende detaillierte massenspektrometrische Analyse sollte eindeutig klären, ob es sich bei dem 54 kDa aus *Lmna*^{-/-} MEFs tatsächlich um das putative Lamin AΔ8-11 Protein handelte. Sollte dies der Fall sein, so musste man erwarten, dass die Analyse des 54 kDa Antigens aus *Lmna*^{-/-} MEFs Peptide hervorbringt, die durch Exon 1-7 und 12 des *Lmna* Gens codiert werden (AS 1-460 von Lamin A/C), während durch Exon 8-11 codierte Peptide (AS 461-657 des prä-Lamin A) abwesend sein sollten. Tatsächlich wurden in fünf unabhängigen Läufen mit Proben aus drei unabhängigen Salzextraktionen keine durch die Exons 8-11 codierten Peptide nachgewiesen (Sequenzabdeckung: 34% bis 70%). Im Gegensatz dazu erbrachte die Analyse des „Volllänge“ Lamin A, das aus wildtypischen 3T3 Zellen isoliert und als Positiv-Kontrolle eingesetzt wurde, zahlreiche Peptide, die für den C-terminalen, durch Exon 8-11 codierten Teil von Lamin A spezifisch waren (Sequenzabdeckung: 69%; Abbildung 23). In einer zusätzlichen Analyse wurde das 55 kDa Antigen aus Wildtyp-Proben massenspektrometrisch charakterisiert (Abbildung 24). Auch hier zeigte sich, dass es bei diesem Antigen um ein im Vergleich

zum „Vollelänge“ Lamin A verkürztes Protein handelt. Im klaren Gegensatz zum 54 kDa Antigen aus *Lmna*^{-/-} MEFs war hierbei allerdings eindeutig ein Peptid nachweisbar, das von Exon 8 des *Lmna* Gens codiert wird. Dies belegt, dass das 54 kDa Antigen aus *Lmna*^{-/-} MEFs und das 55 kDa Antigen aus wildtypischen 3T3-Zellen nicht identisch sind und spricht dafür, dass das 55 kDa Antigen sehr wahrscheinlich ein Lamin A/C Degradationsprodukts repräsentiert. Insgesamt zeigt die massenspektrometrische Untersuchung demnach eindeutig, dass *Lmna*^{-/-} Zellen das bisher unentdeckte *Lmna* Genprodukt Lamin AΔ8-11 exprimieren, das nicht nur auf transkriptioneller Ebene existiert, sondern sich auch in der Anwesenheit eines entsprechenden stabilen Proteins äußert.

Die genauere Analyse der Lamin AΔ8-11 Peptidsequenz und der oben beschriebenen cDNA-Sequenz von Lamin AΔ8-11 ergab eine weitere wichtige Vorhersage. Das C-terminale CaaX-Motiv des wildtypischen prä-Lamin A (CSIM) ist Angriffsstelle mehrerer posttranslationaler Prozessierungsschritte. Diese bestehen aus der Farnesylierung des Cysteins, der anschließenden proteolytischen Abspaltung des Tripeptids SIM und der Methylierung des C-terminalen Farnesyl-Cysteins. In einem letzten Prozessierungsschritt wird ein 15-mer Peptid, welches das carboxymethylierte Farnesyl-Cystein einschließt, vom C-Terminus des prozessierten prä-Lamin A abgespalten. Dieser Prozessierungsschritt, der von der Metalloprotease Zmpste24 ausgeführt wird, resultiert schließlich in „reifem“ Lamin A (Beck et al., 1990; Bergo et al., 2002; Clarke et al., 1988; Corrigan et al., 2005; Dai et al., 1998; Kilic et al., 1997; Pendas et al., 2002; Weber et al., 1989). Interessanterweise werden alle für diese Prozessierungsschritte notwendigen Aminosäuren, mit Ausnahme der finalen Spaltstelle für Zmpste24 um Tyrosin-647, von Exon 12 des *Lmna* Gens codiert. Dieses Exon ist auch in der mRNA Sequenz von Lamin AΔ8-11 enthalten. Im Gegensatz dazu ist Tyrosin-647 bzw. die entsprechende codierende Nukleotid-Sequenz weder in der Peptid-, noch in der mRNA-Sequenz von Lamin AΔ8-11 vorhanden. Dieser Umstand deutete darauf hin, dass die unvollständige Serie posttranslationaler Modifikationen von Lamin AΔ8-11 zur Persistenz eines permanent farnesylierten A-Typ Lamins in *Lmna*^{-/-} Mäusen führt. In der durchgeführten massenspektrometrischen Analyse konnte zwar kein farnesyliertes C-terminales Peptid, das durch Exon 12 von *Lmna* codiert wird, nachgewiesen werden, interessanterweise wurde ein entsprechendes nicht-farnesyliertes Peptid allerdings ebenfalls nicht gefunden. Daher ist das Fehlen eines farnesylierten C-terminalen Peptids wahrscheinlich auf die hohe Hydrophobizität, die das Peptid durch die Farnesylierung erfährt, zurückzuführen. Zudem gibt es mehrere Studien, die klar belegen, dass ein C-terminales CaaX-Motiv notwendig und hinreichend für eine posttranslationale Farnesylierung des entsprechenden Zielproteins ist (Goldstein et al., 1991; Reiss et al., 1990; Wiedlocha et al., 1995). Diese Erkenntnis zusammen mit der Tatsache, dass Zmpste24 das einzige bekannte Enzym ist, das den farnesylierten C-Terminus des prä-Lamin A abspalten kann, lässt es sehr wahrscheinlich erscheinen, dass Lamin AΔ8-11 trotz des Fehlens eines direkten experimentellen Beweises, eine permanent farnesylierte Lamin A Mutante manifestiert.

54 kDa Antigen (aus <i>Lmna</i> ^{-/-} MEFs; 5 Läufe mit Proben aus 3 unabhängigen Salzextraktionen)	Lamin A (aus <i>Lmna</i> ^{+/+} 3T3 Zellen; 1 Lauf)	Position der Aminosäuren	<i>Lmna</i> Exon
SGAQASSTPLSPTR (4x)	SGAQASSTPLSPTR	12-25	1
LQEKEDLQELNDR (5x)	LQEKEDLQELNDR	29-41	1
LAVYIDR (5x)	LAVYIDR	42-48	1
SLETENAGLR (5x)	SLETENAGLR	51-60	1
ITESEEVVSR (4x)	ITESEEVVSR	63-72	1
AAEAEALGDAR (5x)	AAEAEALGDAR	79-89	1
TLDSVAKER (1x)		91-99	1
LQLELSK (4x)	LQLELSK	102-108	1
VREEFK (1x)		109-114	1
EGDLLAAQAR (5x)	EGDLLAAQAR	124-133	2
LKDLEALLNSK (5x)	LKDLEALLNSK	134-144	2
EAALSTALSEK (5x)	EAALSTALSEK	145-155	2
TLEGELHDLR (5x)	TLEGELHDLR	157-166	2
LEAALGEAK (4x)	LEAALGEAK	172-180	3
QLQDEMLR (5x)	QLQDEMLR	182-189	3
LQTLKEELDFQK (5x)	LQTLKEELDFQK	197-208	3
NIYSEELR (4x)	NIYSEELR	209-216	3/4
LVEIDNGK (3x)	LVEIDNGK	226-233	4
LADALQELR (5x)	LADALQELR	241-249	4
AQHEDQVEQYKK (4x)	AQHEDQVEQYKK	250-261	4
NSNLVGAAHEELQQR (5x)	NSNLVGAAHEELQQR	281-296	5
IDSLSAQLSQLQK (5x)	IDSLSAQLSQLQK	299-311	5
LRDLEDSLAR (4x)	LRDLEDSLAR	320-329	6
RLLAEK (2x)		336-341	6
EMAEMR (2x)		344-349	6
MQQQQLDEYQELLDIK (4x)	MQQQQLDEYQELLDIK	352-366	6
LALDMEIHAYR (4x)	LALDMEIHAYR	367-377	6
KLLEGEER (4x)	KLLEGEER	378-386	6/7
LSPSPTSQR (4x)	LSPSPTSQR	389-397	7
SSFSQHAR (2x)	SSFSQHAR	428-435	7
VAVEEVDEEGKFVR (4x)	VAVEEVDEEGKFVR	440-453	7
	SNEDQSMGNWQIR	458-470	7/8
	RQNGDDPLMTYR	471-482	8
	AGQVVTIWASGAGATHSPPTDLVWK	491-515	8/9
	AQNTWGCSSLR	516-527	9
	TALINSTGEEVAMR	528-541	9/10
	SLTMVEDNEDDEDGEELLHHR	546-568	10
	GSHCSGSGDPAEYNLR	569-584	11
	TVLCGTGQPADK	587-599	11
	AAGGAGAQVGGSSISSASSVTVTR	600-625	11
	SVGGSGGSGFDNLVTR	629-645	11

Abbildung 23. Massenspektrometrische Analyse des 54 kDa Antigens aus *Lmna*^{-/-} MEFs. Die linke Spalte zeigt die Peptide, die bei der Analyse des 54 kDa Antigens aus *Lmna*^{-/-} MEFs detektiert wurden. Sie repräsentieren das Ergebnis aus fünf Läufen mit Proben aus drei unabhängigen Salzextraktionen. Die Zahl in Klammer gibt die Anzahl der unabhängigen Detektionen des entsprechenden Peptids an. Die zweite Spalte von links zeigt die Peptide, die bei der Analyse des Lamin A aus wildtypischen 3T3 Zellen erhalten wurden. Die beiden rechten Spalten geben die Position des jeweiligen Peptids (bezogen auf die Aminosäuresequenz des „Volllänge“ Lamin A) und das entsprechende codierende Exon an. Peptide, die durch Exons 8-11 des *Lmna* Gens codiert werden (rot markiert), waren in keiner der analysierten Proben aus *Lmna*^{-/-} MEFs nachweisbar.

55 kDa Antigen (aus <i>Lmna</i> ^{+/-} 3T3 Zellen; 2 Läufe)	Lamin A (aus <i>Lmna</i> ^{+/-} 3T3 Zellen; 1 Lauf)	Position der Aminosäuren	<i>Lmna</i> Exon
SGAQSSTPLSPTR	SGAQSSTPLSPTR	12-25	1
LQEKEDLQELNDR	LQEKEDLQELNDR	29-41	1
	LAVYIDR	42-48	1
	SLETENAGLR	51-60	1
ITSEEEVVS	ITSEEEVVS	63-72	1
AAYEAE LGDAR	AAYEAE LGDAR	79-89	1
LQLELSK	LQLELSK	102-108	1
VREEFKELK		109-117	1
KEGDLLAAQAR	EGDLLAAQAR	123/124-133	2
	LKDLEALLNSK	134-144	2
EAALSTALSEK	EAALSTALSEK	145-155	2
TLEGELHDLRGQVAK	TLEGELHDLR	157-166/171	2
GQVAKLEAALGEAKK	LEAALGEAK	167/172-180/181	3
KQLQDEMLR	QLQDEMLR	181/182-189	3
RVDAENR		190-196	3
LQTLKEELDFQK	LQTLKEELDFQK	197-208	3
NIYSEELRETK	NIYSEELR	209-216/219	3/4
	LVEIDNGK	226-233	4
	LADALQELR	241-249	4
AQHEDQVEQYKK	AQHEDQVEQYKK	250-261	4
NSNLVGA AHEELQQR	NSNLVGA AHEELQQR	281-296	5
IDSLSAQLSQLQK	IDSLSAQLSQLQK	299-311	5
LRDLEDSLAR	LRDLEDSLAR	320-329	6
RLLAEKER		336-343	6
MQQQLDEYQELLDIK	MQQQLDEYQELLDIK	352-366	6
LALDMEIHAYR	LALDMEIHAYR	367-377	6
KLLEGEERLR	KLLEGEER	378-386/388	6/7
LSPSPTSQR	LSPSPTSQR	389-397	7
ASSHSSQS QGGGSVTK		402-417	7
KLESSES		420-427	7
SSFSQHAR	SSFSQHAR	428-435	7
VAVEEVDEEGKFVR	VAVEEVDEEGKFVR	440-453	7
SNEDQSMGNWQIR	SNEDQSMGNWQIR	458-470	7/8
	RQNGDDPLMTYR	471-482	8
	AGQVVTIWASGAGATHSPPTDLVWK	491-515	8/9
	AQNTWCGGSSLR	516-527	9
	TALINSTGEEVAMR	528-541	9/10
	SLTMVEDNEDDEDEGEELLHHR	546-568	10
	GSHCSGSGDPAEYNLR	569-584	11
	TVLCGTCGQPADK	587-599	11
	AAGGAGA QVGGSSISSGSSASSVTVTR	600-625	11
	SVGGSGGSGFDNLVTR	629-645	11

Abbildung 24. Massenspektrometrische Analyse des 55 kDa Antigens aus 3T3 Zellen. Die linke Spalte zeigt die detektierten Peptide, des 55 kDa Antigens aus wildtypischen 3T3 Zellen. Die zweite Spalte von links zeigt die Peptide, die bei der Analyse des Lamin A erhalten wurden. Die beiden rechten Spalten geben die Position der Aminosäurereste des jeweiligen Peptids und das entsprechende codierende Exon an. Wie das 54 kDa Antigen aus *Lmna*^{-/-} MEFs, ist auch das 55 kDa Antigen aus 3T3 Zellen im Vergleich zum „Volllänge“ Lamin A C-terminal verkürzt. Im Gegensatz zum 54 kDa Antigen aus *Lmna*^{-/-} MEFs enthält das 55 kDa Antigen aus 3T3 Zellen jedoch ein spezifisches Peptid, das teilweise durch Exon 8 des *Lmna* Gens codiert wird. Diese Tatsache zeigt, dass beide Proteine nicht identisch sind.

3.2. Diskussion

Entgegen vorangegangener Beschreibungen ist die *Lmna*^{-/-} Mauslinie keine echte Null-Mutante

Im vorangegangenen Ergebnisteil wurde die umfassende Charakterisierung einer vermeintlich A-Typ Lamin-defizienten Mauslinie (*Lmna*^{-/-}) hinsichtlich des potentiellen Verbleibs eines trunkierten A-Typ Lamins dargestellt. Zusammenfassend können aufgrund der beschriebenen Ergebnisse folgende Aussagen getroffen werden: (1) Entgegen der ursprünglichen Beschreibung persistiert in der *Lmna*^{-/-} Mauslinie (Sullivan et al., 1999) ein trunkiertes *Lmna* Genprodukt, das mittels RT-PCR, Immunocyto/histochemie und Immunblot sowohl auf transkriptioneller Ebene als auch auf Proteinebene eindeutig nachgewiesen werden konnte. (2) Die detaillierte massenspektrometrische Analyse der Peptidsequenz dieses *Lmna* Genprodukts zeigt eindeutig, dass es sich dabei um eine Lamin A Deletionsmutante handelt, die im C-terminalen Bereich gegenüber Lamin A verkürzt ist. Aufgrund des Fehlens von Peptiden, die durch Exon 8-11 von *Lmna* codiert werden, wird diese Mutante als Lamin A Δ 8-11 bezeichnet. (3) Trotz des Fehlens eines direkten massenspektrometrischen Beweises, lässt die Nukleotidsequenz von Lamin A Δ 8-11 darauf schließen, dass die posttranslationalen Modifikationsschritte, die normalerweise zur Entstehung von „reifem“ Lamin A führen, im Fall von Lamin A Δ 8-11 wahrscheinlich unvollständig ablaufen. Dadurch wird in *Lmna*^{-/-} Mäusen vermutlich eine Lamin A Mutante erzeugt, die an ihrem C-Terminus permanent farnesyliert bleibt.

Unabhängig von der Frage nach der potentiellen Farnesylierung von Lamin A Δ 8-11, wirken die in der Literatur üblichen Bezeichnungen der untersuchten Mauslinie als „*Lmna*^{-/-}“, „*Lmna*-null“ oder „*Lmna*-knock out“ in Anbetracht der beschriebenen Daten eher unvorteilhaft. Da es sich bei dem durch Sullivan und Kollegen (1999) beschriebenen *Lmna*-Allel eindeutig nicht um eine Nullmutation handelt, erscheint die Bezeichnung *Lmna* ^{Δ 8-11} angemessener. Diese Nomenklatur könnte zudem dazu beitragen, mögliche Missverständnisse und Verwirrungen in zukünftigen Studien zu vermeiden. Sie wird daher auch in der folgenden Diskussion verwendet, die vor allem dazu dient, einige Interpretationen der bisher mit der *Lmna* ^{Δ 8-11}-Mauslinie durchgeführten Untersuchungen vor dem Hintergrund der beschriebenen Erkenntnisse kritisch zu überprüfen.

Lamin A Δ 8-11: Eine Lamin A Mutante mit eingeschränkter Funktion (loss-of-function) oder ein „giftiges“ Lamin (gain-of-function)?

Wie in Abbildung 25 zusammenfassend dargestellt, verfügt Lamin A Δ 8-11 offensichtlich über eine vollständige α -helikale Domäne und über die flankierenden N- und C-terminalen Sequenzbereiche, die für eine regulierte Polymerisation von Laminen in Strukturen höherer Ordnung besonders relevant sind (vergleiche Abschnitt 1.1). Zudem ist das Kernlokalisierungssignal (NLS) von der C-terminalen Verkürzung des Proteins nicht betroffen und nach wie vor im Molekül vorhanden. Dagegen ist die im C-terminalen Bereich der Lamine lokalisierte, charakteristische Immunglobulin-ähnliche Domäne (Ig-Fold) durch den Verlust der von Exon 8-11 codierten Peptide nahezu vollständig deletiert. Zudem scheint Lamin A Δ 8-11 von veränderten posttranslationalen Modifikationen betroffen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit zu seiner permanenten Farnesylierung führen. Allein aufgrund dieser Überlegungen sind, unabhängig von experimentellen Beobachtungen, zwei Szenarien theoretisch vorstellbar, die die Wirkungsweise von Lamin A Δ 8-11 auf molekularer Ebene erklären könnten. Dabei schließen sich beide Möglichkeiten nicht gegenseitig aus. Entsprechend des ersten möglichen Szenarios könnte es aufgrund der C-terminalen Verkürzung und dem resultierenden Verlust funktioneller Proteindomänen sein, dass Lamin A Δ 8-11 eine Lamin A Variante mit eingeschränkter Funktionalität darstellt, die in der Lage ist, einige Funktionen des „Volllänge“ Lamin A (wie beispielsweise den Import in den Zellkern und die Polymerisation in

übergeordnete Strukturen) korrekt auszuführen, andere Anforderungen (wie zum Beispiel die Interaktion mit bestimmten Bindungspartner) jedoch nicht mehr oder nur eingeschränkt erfüllen kann („loss-of-function“). In Ergänzung zu dieser Vorstellung wäre es im zweiten denkbaren Szenario ebenso gut möglich, dass Lamin A Δ 8-11 – vor allem aufgrund seiner potentiellen permanenten Farnesylierung – als toxisches Molekül mit einem entsprechenden dominant-negativen Effekt wirken könnte („gain-of-function“).

Hinsichtlich des „gain-of-function“ Szenarios ist anzuführen, dass die fehlerhafte posttranslationale Prozessierung verschiedener prä-Lamin A Derivate tatsächlich bereits mehrfach mit erheblichen pathologischen Phänotypen im Mausmodell und mit der Entstehung schwerwiegender humaner Krankheitsbilder in Verbindung gebracht wurde (Bergo et al., 2002; Davies et al., 2010; Dechat et al., 2007; Eriksson et al., 2003; Moulson et al., 2005a; Navarro et al., 2005a; Pendas et al., 2002; Yang et al., 2006)(siehe auch Abschnitt 1.3). Obwohl die permanente Farnesylierung dabei wahrscheinlich eine der Hauptursachen für das Auftreten pathologischer Erscheinungen ist, liefert die Rekapitulation früherer Studien gute Hinweise darauf, dass die Toxizität im konkreten Fall von Lamin A Δ 8-11 verglichen mit der anderer Lamin A Mutanten eher gering zu sein scheint. Diesbezüglich ist zum einen die Lamin A Mutante „Progerin“ zu nennen. Progerin ist ein verkürztes Lamin A-Derivat, das im Menschen durch die Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle im *LMNA* Gen und den dadurch verursachten Verlust eines 50 AS umfassenden Peptids im C-terminalen Bereich von prä-Lamin A entsteht (daher in der Literatur teilweise auch als Lamin A Δ 50 bezeichnet). Dadurch kommt es unter anderem zum Verlust der Zmpste24-spezifischen Spaltstelle im C-terminalen Bereich von prä-Lamin A. Da die Sequenzmotive, die für die Farnesylierung von prä-Lamin A hinreichend sind, nicht von der Deletion betroffen sind, führt dies zur Entstehung der permanent farnesylierten Lamin A Mutante Progerin. Diese ist im Menschen ursächlich für die Entstehung des schwerwiegenden Hutchinson-Gilford-Progeria Syndroms (HGPS) (De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003). Ein entsprechendes HGPS-Mausmodell (*Lmna*^{HG}) zeigt einen ähnlich drastischen Phänotyp, wie sie auch im menschlichen Krankheitsbild beobachtet werden (Yang et al., 2005; Yang et al., 2006). Dazu gehören Symptome des vorzeitigen Alterns, wie verzögertes Wachstum, der Verlust von Unterhautfettgewebe, Osteoporose und eine stark verkürzte Lebenserwartung. Entscheidend in diesem Zusammenhang ist, dass all diese Phänomene bereits in heterozygoten (*Lmna*^{HG/+}) Mäusen auftreten und Progerin daher als „gain-of-function“ Lamin A Mutante mit hoher Toxizität angesehen wird (Yang et al., 2006). Dies steht im deutlichen Gegensatz zu dem in der vorliegenden Arbeit definierten *Lmna* ^{Δ 8-11} Allel, da heterozygote *Lmna* ^{Δ 8-11/+} Mäuse (oder *Lmna*^{+/-} nach bisheriger Nomenklatur) einen relativ milden Phänotyp mit nahezu normaler Lebenserwartung und erst spät auftretender Cardiomyopathie aufweisen (Sullivan et al., 1999; Wolf et al., 2008). Dieser Unterschied im Phänotyp der entsprechenden heterozygoten Mäuse zeigt, dass die Toxizität von Progerin auf organischer Ebene erheblich größer sein muss, als die von Lamin A Δ 8-11. Ein zweites Tiermodell, in dem eine „giftige“ Lamin A Variante eine entscheidende Rolle spielt, ist die Zmpste24-KO Mauslinie (*Zmpste24*^{-/-}) (Pendas et al., 2002). In diesen Mäusen entsteht dauerhaft farnesyliertes prä-Lamin A, da der farnesylierte und carboxymethylierte C-Terminus des Proteins durch die Abwesenheit von Zmpste24 nicht abgespalten werden kann. Wie im HGPS-Mausmodell, treten auch in Zmpste24-defizienten Mäusen schwerwiegende Laminopathie-assoziierte Phänotypen auf, die Wachstumsstörungen, Dystrophien mehrere Gewebe, und eine drastische verkürzte Lebensdauer einschließen. Da all diese Störungen durch die Einkreuzung eines Lamin A Δ 8-11-Allels (*Zmpste24*^{-/-}; *Lmna* ^{Δ 8-11/+} oder nach bisheriger Bezeichnung *Zmpste24*^{-/-}; *Lmna*^{+/-}) nahezu vollständig beseitigt werden können (Fong et al., 2004), lässt sich schlussfolgern, dass auch die Giftigkeit von dauerhaft farnesyliertem prä-Lamin A *in vivo* wohl sehr viel größer ist, als die von Lamin A Δ 8-11. Trotz dieser Erwägungen lässt sich momentan natürlich nicht ohne weiteres ausschließen, dass die Lamin

Deletionsmutante AΔ8-11 auf zellulärer Ebene doch einen gewissen toxischen Effekt besitzt. Ganz im Gegensatz, würde eine geringe Giftigkeit von Lamin AΔ8-11 auf zellulärer Ebene sogar einen plausiblen Grund dafür liefern, dass die Transfektion von *Lmna*^{Δ8-11/Δ8-11} MEFs mit verschiedenen Lamin A/C Konstrukten allein offensichtlich nicht ausreichend ist, um einige Phänotypen, die bei *in vitro* Untersuchungen zur Morphologie und zur mechanischen Stabilität von *Lmna*^{Δ8-11/Δ8-11} Zellkernen beobachtet wurden, vollständig zu retten (Broers et al., 2004; Lammerding et al., 2006).

Bezüglich des anderen denkbaren Szenarios – der Vorstellung, dass Lamin AΔ8-11 eine Lamin-Mutante mit eingeschränkter Funktionalität („loss-of-function“) darstellen könnte – gibt es eine Vielzahl von experimentellen Hinweisen, die sehr gut im Einklang mit dieser Idee stehen (siehe Abbildung 25). Die folgenden Befunde beruhen dabei darauf, dass die Funktionalität einer Reihe Lamin-bindender Proteine offenbar entscheidend von ihrer korrekten Interaktion mit A-Typ Laminen abhängig ist. Da viele Interaktionspartner in Bereichen von Lamin A/C binden, die von der Verkürzung des Lamin AΔ8-11 betroffen sind, erscheint das Auftreten der folgenden Phänomene in *Lmna*^{Δ8-11/Δ8-11} Mäusen und Zellen sehr einleuchtend. Dies betrifft, erstens, das bereits in der ursprünglichen Arbeit von Sullivan und Kollegen (1999) beschriebene Auftreten von Muskeldystrophie-assoziierten Symptomen in *Lmna*^{Δ8-11/Δ8-11} Mäusen. Dabei führten die Autoren die durch den Verlust von Lamin A/C verursachte, fehlerhafte Lokalisation von Emerin als molekularer Grund für die beobachteten Krankheits-Phänotypen an. Tatsächlich liegt die Bindungsstelle von Emerin zwischen den Resten 384-566 von Lamin A/C (Sakaki et al., 2001), die in Lamin AΔ8-11 zum Großteil nicht mehr vorhanden sind. Daher erscheint die Auflösung/Abschwächung von Emerin-Lamin Interaktionen in *Lmna*^{Δ8-11/Δ8-11} Mäusen plausibel und kann die fehlerhafte Lokalisation von Emerin in diesen Tieren (und daraus isolierter MEFs) zwanglos erklären. Zweitens wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass die Interaktion zwischen Lamin A und SREBP 1a/c durch die Aminosäuren 389-664 des Lamin A vermittelt wird und dass Störungen dieser Interaktion mit dem Auftreten bestimmter Formen der Lipodystrophie in Verbindung stehen (Kim and Spiegelman, 1996; Lloyd et al., 2002). Dementsprechend könnte eine verminderte oder gänzlich fehlende Wechselwirkung zwischen SREBP 1a/c und Lamin AΔ8-11, dem die entsprechende Bindungsstelle größtenteils fehlt, für den partiellen Verlust von Körperfett, der in der *Lmna*^{Δ8-11} Mauslinie beobachtet wurde, ursächlich sein (Sullivan et al., 1999). In ähnlicher Weise ist es sinnvoll, anzunehmen, dass auch der Verlust von peripherem Heterochromatin in *Lmna*^{Δ8-11/Δ8-11} Zellen (Sullivan et al., 1999) darauf zurückzuführen sein könnte, dass die DNA-bindende Domäne in Lamin AΔ8-11 teilweise oder vollständig deletiert ist. Im Einklang mit dieser Überlegung ist bekannt, dass die Reste 411-553 der Lamine A/C (die in Lamin AΔ8-11 teilweise abwesend sind) tatsächlich für die direkte Interaktion mit Chromatin benötigt werden (Stierle et al., 2003). Zusätzlich zu den bisher genannten Phänotypen von *Lmna*^{Δ8-11/Δ8-11} Zellen und Mäusen, die allesamt bereits in der ursprünglichen Arbeit von Sullivan und Kollegen beschrieben wurden, existieren neuere Daten, die die Auffassung von Lamin AΔ8-11 als „loss-of-function“ Mutante ebenfalls unterstützen. Dies betrifft unter anderem die in mehreren Arbeiten klar belegte Tatsache, dass der C-terminale Bereich von Lamin A/C für die Interaktion mit einigen strukturell relevanten Proteinen der Kernhülle bzw. des Zellkerns, wie zum Beispiel Aktin (Sasseville and Langelier, 1998; Simon et al., 2010), SUN-Domänen Proteinen (Haque et al., 2006; Haque et al., 2010) oder Nesprin-2 (Libotte et al., 2005), benötigt wird. Im Einklang mit dem Befund, dass dieser C-terminale Bereich in Lamin AΔ8-11 nahezu vollständig fehlt, beschreiben die bereits zitierten und andere Studien in *Lmna*^{Δ8-11/Δ8-11} Zellen erhebliche Beeinträchtigungen der Integrität und Funktionalität von Komplexen, die diese Bindungspartner normalerweise mit A-Typ Laminen bilden (Crisp et al., 2006; Hale et al., 2008; Khatau et al., 2009). Ein abschließend zu erwähnender Aspekt betrifft die fehlerhafte Regulation des Zellzyklus im *Lmna*^{Δ8-11/Δ8-11} Modell. Diesbezüglich wurde gezeigt, dass die Funktion des Zellzyklus-Regulators Rb durch nucleoplasmatische Lamin A-LAP2α Proteinkomplexe entscheidend reguliert wird

(Pekovic et al., 2007). Die LAP2 α Bindungsdomäne (AS 319-566 von Lamin A/C) (Dechat et al., 2000a) ist im Lamin A Δ 8-11 ebenfalls teilweise deletiert. Somit erscheint es einleuchtend, dass die Funktionalität von Lamin A-LAP2 α Komplexen in der Lamin A Δ 8-11-Mauslinie reduziert ist und dass dies in erheblichem Maße zur fehlerhaften Regulation von Rb und zu den Aberrationen des Zellzyklus, die in *Lmna* ^{Δ 8-11/ Δ 8-11} MEFs beschrieben wurden, beiträgt (Johnson et al., 2004; Nitta et al., 2006; Rodriguez et al., 2010).

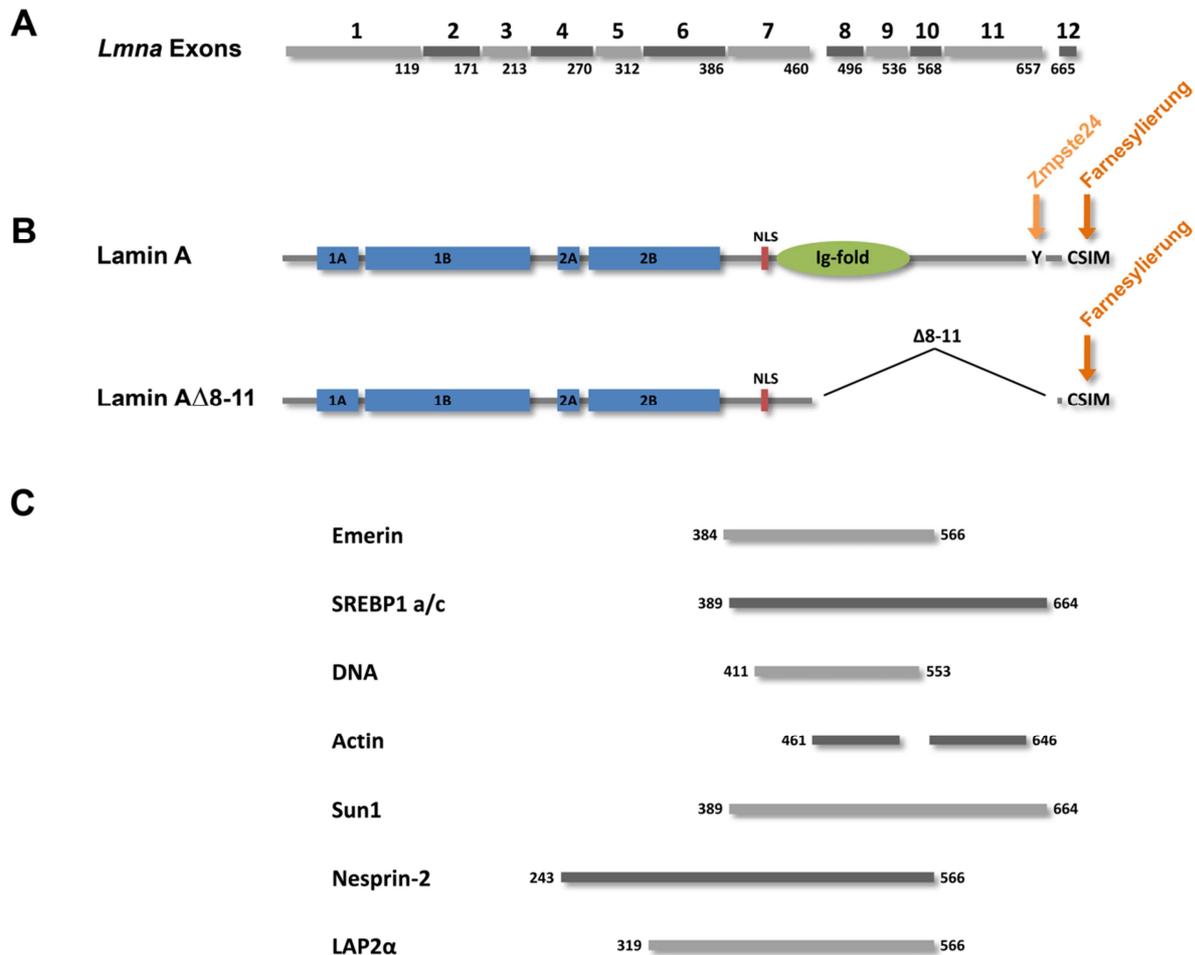


Abbildung 25. Übersicht über die Domänenstruktur von Lamin A Δ 8-11 und die möglichen Auswirkungen der Deletion von Exon 8-11 auf die Interaktion mit einigen Lamin A/C Bindungspartnern. (A) Exons des *Lmna* Gens der Maus nummeriert mit 1-12 (Zahlen oberhalb). Die Zahlen unterhalb geben den C-terminalsten Rest des prä-Lamin A an, der von dem jeweiligen Exon codiert wird. (B) Vergleich der Proteindomänen von Lamin A Δ 8-11 mit wildtypischem prä-Lamin A. Während Lamin A Δ 8-11 nach wie vor ein vollständiges α -helikales Mittelstück (bestehend aus Coil 1A-2B) und ein Kernlokalisierungssignal (NLS) besitzt, ist sein C-terminaler Bereich deutlich verkürzt. Dadurch geht die Immunglobulin-ähnliche Domäne (Ig-Fold) fast vollständig verloren. Zudem ist die Zmpste24-spezifische Spaltstelle um Y-647 deletiert. Da das zur Farnesylierung von prä-Lamin A hinreichende C-terminale Signal (CSIM) jedoch in Lamin A Δ 8-11 weiterhin vorhanden ist, bleibt sein C-Terminus höchstwahrscheinlich permanent farnesyliert. (C) Übersicht über Interaktionspartner von Lamin A/C, deren Bindungsdomäne mit dem deletierten, C-terminalen Bereich teilweise oder vollständig überlappt. Referenzen siehe Text.

Zusammenfassend ergibt sich somit ein konsistentes Bild, das verdeutlicht, wie die Expression der verkürzten Lamin Mutante A Δ 8-11 zu den in der *Lmna* ^{Δ 8-11}-Mauslinie beobachteten Phänotypen beiträgt. Demnach gibt es einige Hinweise darauf, dass eine toxische Wirkung von Lamin A Δ 8-11 zwar nicht ausgeschlossen ist, aber im Vergleich zu anderen bereits beschriebenen Lamin A Mutanten doch

eher gering scheint. Gleichzeitig sprechen Beobachtungen zahlreicher Studien dafür, dass es sich bei Lamin A Δ 8-11 in erster Linie um eine Lamin Mutante mit eingeschränkter Funktion handelt. Folglich kann die entsprechende Mauslinie wohl auch weiterhin als brauchbares „loss-of-function“ Model herangezogen werden. Für die Interpretation der Ergebnisse vergangener Studien sind die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten jedoch hoch relevant. Zudem setzen sie klare Beschränkungen für Versuchsansätze in zukünftigen Studien. Beispielsweise erscheint es im Lichte der beschriebenen Erkenntnisse nicht sehr vielversprechend, die funktionelle Untersuchung von Interaktionspartnern, deren Bindungsstelle nachweislich im N-terminalen Bereich der Lamine A/C liegt, in *Lmna* ^{Δ 8-11/ Δ 8-11} Zellen durchzuführen. Dies betrifft zum Beispiel den kürzlich beschriebenen Lamin A/C-Bindungspartner MLIP, der als interessanter Kandidat mit einer potentiellen Bedeutung für die Entstehung von Cardiomyopathie-assoziierten Krankheitsbildern gehandelt wird (Ahmady et al., 2011). Für die funktionelle Untersuchung solcher „N-terminalen“ Lamin A/C-Interaktionspartner wäre die Verwendung eines vor kurzem beschriebenen, alternativen Modellsystems ratsam, das gleichzeitig wohl ein „echtes“ *Lmna*-null Model repräsentiert und im Folgenden kurz vorgestellt werden soll (Kubben et al., 2011).

Die Expression von Lamin A Δ 8-11 in der *Lmna* ^{Δ 8-11} Mauslinie erklärt ihren relativ milden Phänotyp im Vergleich zu einem neueren Lamin A/C-defizienten Mausmodell

Im Gegensatz zur *Lmna* ^{Δ 8-11} Linie wurde das angesprochene, von Kubben und Kollegen (2011) etablierte Mausmodell (*Lmna*^{GT}) nicht durch einen konventionellen Gene-targeting Ansatz hergestellt. Stattdessen wurde in Intron 2 des *Lmna* Gens ein Promotor-trap Konstrukt integriert, das aufgrund eines starken Spleißakzeptor-Signals dafür sorgt, dass ein Fusionsprotein, bestehend aus dem ersten Exon von *Lmna* und einer in-frame β -Galactosidase, exprimiert wird. Dabei wurde die Expression trunkierter Lamin A/C Genprodukte durch detaillierte RT-PCR Analysen ausgeschlossen (Kubben et al., 2011). Nach aktuellem Kenntnisstand handelt es sich demnach bei der durch Kubben und Kollegen hergestellten Mauslinie tatsächlich um ein „echtes“ *Lmna*-null Model.

Verglichen mit dem in LaminA Δ 8-11-Mäusen beobachteten Phänotyp, zeigen sich in *Lmna*^{GT/-} Tieren ähnliche Gewebe vom Verlust der A-Typ Lamine betroffen. Diese sind mit der Herz- und Skelettmuskulatur sowie dem Fettgewebe dieselben Gewebe, die auch bei vielen Formen der Laminopathie pathologische Aberrationen aufweisen. Im Hinblick auf das zeitliche Einsetzen der Symptome und deren progressives Voranschreiten, sind die in *Lmna*^{GT/-} Mäusen beobachteten Effekte jedoch deutlich ausgeprägter. Dies betrifft vor allem den Verlust von Fettgewebe und damit assoziierte Komplikationen des gesamten Stoffwechsels in *Lmna*^{GT/-} Tieren. In diesem Zusammenhang beschreiben die Autoren deutliche Anzeichen von katabolen Prozessen und einem damit verbundenen allgemeinen physiologischen Stresszustand. Dieser wurde auch als primäre Ursache für das Eintreten des frühen Todes nach etwa zwei Wochen der postnatalen Entwicklung angeführt (Kubben et al., 2011). In dieser Hinsicht unterscheidet sich das *Lmna*^{GT} Model ebenfalls deutlich von *Lmna* ^{Δ 8-11/ Δ 8-11} Tieren, da diese eine mittlere Lebenserwartung aufweisen, die zwar stark reduziert ist, aber immerhin etwa 8 Wochen beträgt (Sullivan et al., 1999). Einen ausführlicheren Vergleich der beiden Mausmodelle zeigt Tabelle 5.

Darüber hinaus wurden die oben beschriebenen Unterschiede hinsichtlich der angewandten knock out Strategien bereits als vermeintlicher Hauptgrund für die abweichende Ausprägungen der Phänotypen beider Modellsysteme angeführt (Kubben et al., 2011). Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse und diskutierten Überlegungen unterstützen diese Vermutung stark, da die Expression der Lamin Mutante A Δ 8-11 in *Lmna* ^{Δ 8-11/ Δ 8-11} Mäusen deren im Vergleich zu *Lmna*^{GT/-} Tieren relativ milden Krankheits-Phänotyp widerspruchsfrei erklärt. Somit bekräftigt der Vergleich beider Modelle gleichzeitig die Auffassung, dass Lamin A Δ 8-11 auf molekularer Ebene primär als verkürztes Lamin A mit

eingeschränkter Funktion wirkt, das jedoch immer noch in der Lage ist, einige Aufgaben seines wildtypischen Pendant zu übernehmen und so das Auftreten noch schwerwiegenderer Laminopathie-assoziiertes Symptome unterdrückt.

Abschließend sei noch einmal daran erinnert, dass das *Lmna*^{Δ8-11} Mausmodell (bisher: *Lmna*^{-/-}) eines der am häufigsten verwendeten Modelle im Feld der Lamina-Forschung darstellt. Jüngst erschien eine weitere, richtungweisende Arbeit in einem hochrangigen Journal, die die extranucleäre Akkumulation des INM-Proteins SUN1 als vereinheitlichendes, pathologisches Charakteristikum verschiedener Laminopathie-Formen beschreibt (Chen et al., 2012). Nahezu alle zentralen Aussagen dieses Papers beruhen auf Versuchen, die die Verwendung von *Lmna*^{Δ8-11/Δ8-11} Mäusen und Zellen einschließen. Diese Umstände unterstreichen die dringende Notwendigkeit, die in der vorliegenden Dissertation gemachten Beobachtungen zur Kenntnis zu nehmen und in die wissenschaftliche Diskussion über die Mechanismen der Laminopathien einzubeziehen.

Merkmal bzw. Gewebe	<i>Lmna</i> ^{Δ8-11} Model	<i>Lmna</i> ^{GT} Model	Referenzen
gentechnische Herstellung	konventionelles Gene-targeting; Deletion der Exons 8-11 von <i>Lmna</i>	Insertion eines Gene-trap Konstrukts in Intron 2 von <i>Lmna</i>	(Kubben et al., 2011; Sullivan et al., 1999)
mittlere Lebenserwartung	etwa 8 Wochen	etwa 2 Wochen	(Kubben et al., 2011; Sullivan et al., 1999)
verzögertes Wachstum	ab 2.-3. Woche pp	ab 7. Tag pp	(Kubben et al., 2011; Sullivan et al., 1999)
Herz	schwere DCM in homozygoten Mäusen; spät auftretende DCM (ab etwa 1 Jahr) in heterozygoten Mäusen	Eingeschränktes postnatalen Herzwachstums, jedoch keine Anzeichen von DCM und keine nennenswerte Einschränkungen der Herzfunktion; auch nicht in älteren Heterozygoten (1 Jahr)	(Kubben et al., 2011; Nikolova et al., 2004; Wolf et al., 2008)
Skelettmuskel	Dystrophie der Skelettmuskulatur mit Ähnlichkeit zu Symptomen der EDMD (erhöhte Anzahl von Muskelfasern mit anormaler, zentraler Positionierung des Zellkerns; fehlerhafte Lokalisation von Emerin; keine Erhöhung der Kreatinkinase Konzentration im Serum)	Deutliche allgemeine Reduktion der Muskelmasse und -stärke (keine zentral positionierten Zellkerne; Erhöhung der Serum Kreatinkinase Konzentration als Anzeichen für Verletzung/Zerstörung der Muskulatur)	(Kubben et al., 2011; Sullivan et al., 1999)
Fettgewebe	reduziertes Unterhautfettgewebe; wahrscheinlich sekundärer Effekt der Muskeldystrophie	reduziertes Unterhautfettgewebe; wahrscheinlich primärer Effekt, da <i>ex vivo</i> Differenzierung von Adipocyten stark beeinträchtigt; allgemein erhebliche Stoffwechselkomplikationen mit deutlichen Anzeichen kataboler Prozesse	(Cutler et al., 2002; Kubben et al., 2011)

Tabelle 5. Vergleich von *Lmna*^{Δ8-11} und *Lmna*^{GT} Mäusen. pp, post partum; DCM, dilatative Cardiomyopathie; EDMD, Emery-Dreifuss Muskeldystrophie.

4. Material

4.1. Organismen

4.1.1. Tiere

Die Herstellung von Lamin C2-KO Mäusen wurde detailliert in Schmitt (2008, Dissertation) beschrieben. Die verwendete *Lmna*^{-/-}-Mauslinie wurde von Sullivan et al. (1999) generiert und charakterisiert. CD1-Mäuse wurden über den Tierstall des Biozentrums der Universität Würzburg bezogen.

4.1.2. Zelllinien

Lmna^{-/-} MEFs wurde von Sullivan et al. (1999) hergestellt und charakterisiert.

4.1.3. Bakterienstämme

Der Stamm *E. coli* XL1-blue wurde standardmäßig zur Vermehrung und Klonierung von Plasmid-DNA eingesetzt. Die zur Verwendung des StrataClone blunt PCR Cloning Kits benötigten kompetenten Bakterien (StrataClone SoloPack Competent Cells) lagen dem Kit bei.

4.2. Antikörper

Bezeichnung (mAb: Maus, monoklonal; Rb: Kaninchen, polyklonal; Gp: Meerschwein, polyklonal)	Antigen	Referenz	Verdünnung		
			IF		WB
			Zellen/ Spreitung/ Kryoschnitt	Paraffin	
Gp α-Sycp1 N-Term	AS 1-120 des Sycp1 der Ratte	(Winkel et al., 2009)	1:150	---	---
Gp α-Sycp3 Serum #21	AS 27-38 des Sycp3 der Ratte	(Alzheimer and Benavente, 1996)	---	1:100	---
mAb α-Lamin A/C R27	Lamin A/C	(Hoger et al., 1991)	1:30-1:50	---	---
mAb α-Lamin B1 119D5-F1	Lamin B1 der Ratte	Santa Cruz Biotechnology	1:100	---	---
mAb α-MLH1 551091	humanes MLH-1	BD Pharmingen	1:30		
mAb α-αTubulin T5168	C-terminaler Bereich des Seeigel-Proteins	Sigma-Aldrich	---	---	1:20.000
mAb α-γH2AX 05-636	AS 134-142 des humanen γH2AX	Millipore	1:500	---	---
Rb α-Lamin A/C bs-01	AS 402-574 des murinen Lamin C	(Jahn et al., 2012, in press)	1:100-1:200	1:100	1:10.000
Rb α-Lamin A/C H-110	AS 231-340 des humanen Lamin A/C	Santa Cruz Biotechnology	1:50-1:100	----	1:10.000

Rb α -Synp3 NB300-232	C-terminales Peptid des humanen Synp3	Novus Biologicals	1:150	---	---
------------------------------	---------------------------------------	-------------------	-------	-----	-----

Tabelle 6. Verwendete Primärantikörper

4.3. Molekularbiologisches Material

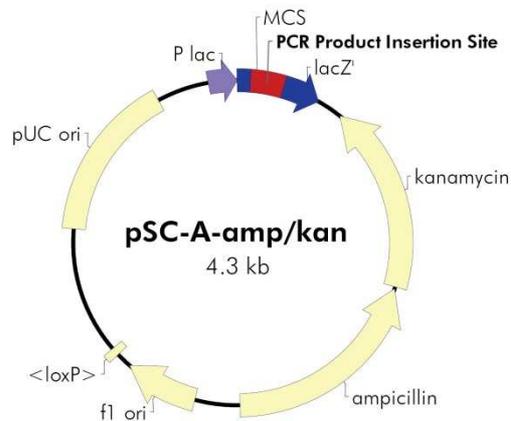
4.3.1. Oligonukleotide

Name	Sequenz	T _{anneal} (°C)
GAPDH_3'	5'-GTCAGATCCACGACGGACACATTGG-3'	58 (P)
GAPDH_5'	5'-GGGCCCACTTGAAGGGTGGAGC-3'	58 (P)
HLC_4AS_5'	5'-GCTGAGGCCCGCGAGACCCCGTCCCAGCGG-3'	60 (P)
HLC_6AS_5'	5'-GCCATGGGGAACGCTGAGGGCCGCGAG-3'	60 (P, T)
M13_forward	5'-GTA AACGACGGCCAGT-3'	50 (T)
M13_reverse	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'	50 (T)
Maus_LA_3'_nach_TAA_neu	5'-CTGCCTGGCAGGTCCCAGA-3'	72 (P)
Maus_LA_5'_vor_ATG_neu	5'-AGCACTGTCCACCTGCCGG-3'	72 (P)
mausLaminA3'_Ex12	5'-TTACATGATGCTGCAGTTCT-3'	60-63 (P)
mausLaminAC5'_Ex1	5'-ATGGAGACCCCGTCACA-3'	60-63 (P)
myr-LaminC Δ 2-27_3'	5'-CGGCTGCAGGAGAAGGAGG-3'	60 (P)
myr-LaminC Δ 2-27_5'	5'-GCGGCCCTCAGCGTTCCC-3'	60 (P)
myr-LaminC Δ 28-119_3'	5'-AATACCAAGAAGGAGGGGGATTG-3'	58 (P)
myr-LaminC Δ 28-119_5'	5'-TGTGATCCGAGTGGGCGACA-3'	58 (P)
Nde_Maus_LC2_5'	5'-CATATGGGGAACGCGGAGGGCC-3'	63 (P), 67 (T)
pEGFP-N_Seq_5'	5'-GCTGGTTTAGTGAACCGTCAGA-3'	60 (T)
R27_Eco_TAAminus_3'	5'-GCAGAATTCACGGCGGCTGCCACTCACAC-3'	60-63 (P)
r27k1	5'-TGGTCTCATGCTGGGCCCGC-3'	60 (T)

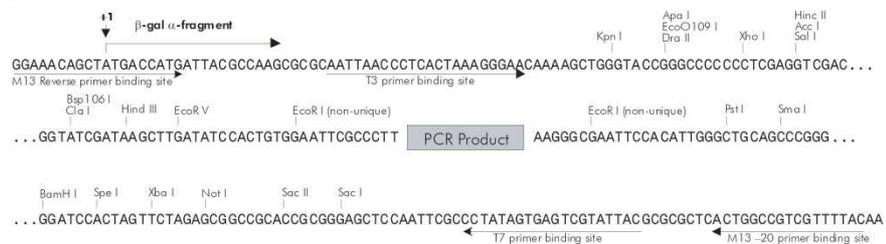
Tabelle 7. Verwendete Oligonukleotide. Hinter jeder Annealing-Temperatur ist die DNA-Polymerase angegeben, für die der jeweilige Wert gilt. T: *Taq* DNA-Polymerase; P: Phusion DNA-Polymerase.

4.3.2. Vektoren

StrataClone PCR Cloning Vektor pSC-A-amp/kan:

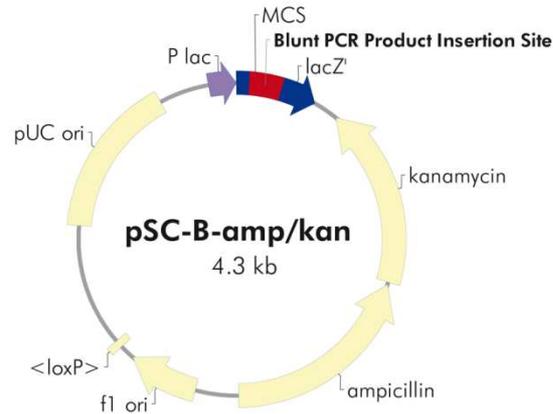


pSC-A-amp/kan PCR Cloning Vector PCR Product Insertion Site Region (sequence shown 4261–4270, 1–250)

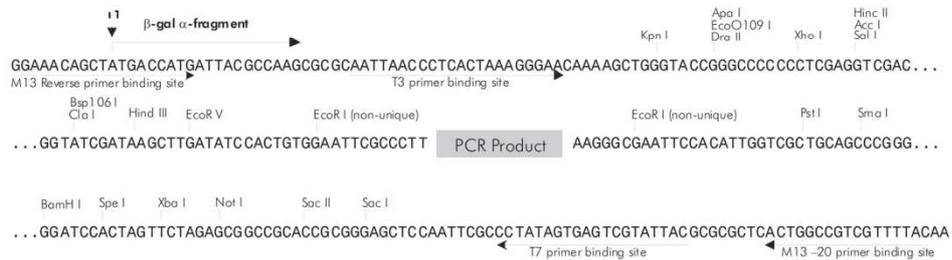


Feature	Nucleotide Position
β -galactosidase α -fragment coding sequence (lacZ')	1–352
Multiple cloning site (MCS)	57–195
PCR product insertion site	123
Kanamycin resistance ORF	463–1254
ampicillin resistance (bla) ORF	1266–2123
f1 origin of ss-DNA replication	2315–2621
<loxP> (mutant loxP-derived sequence lox66/71; nonfunctional in Cre-mediated recombination)	2688–2721
pUC origin of replication	3262–3929
lac promoter	4151–4270

StrataClone PCR blunt Cloning Vektor pSC-B-amp/kan:

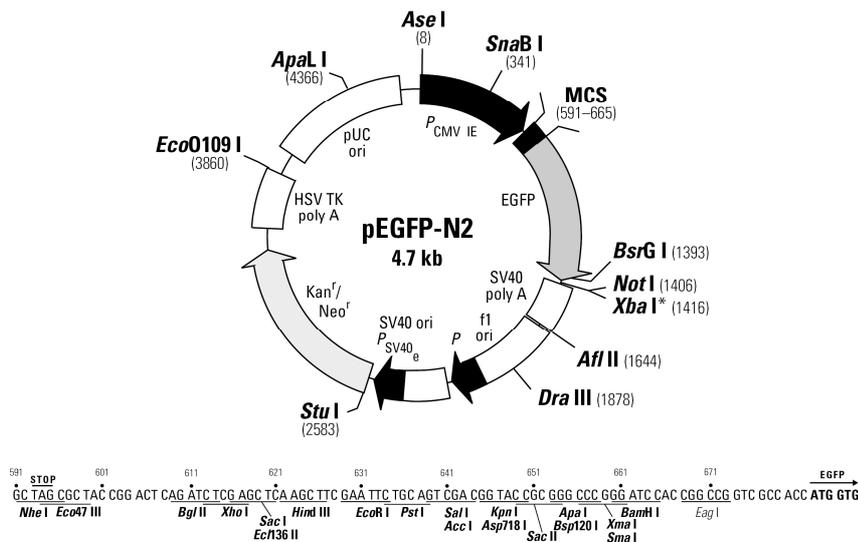


pSC-B-amp/kan Blunt PCR Cloning Vector PCR Product Insertion Site Region (sequence shown 4263–4272, 1–252)



Feature	Nucleotide Position
β -galactosidase α -fragment coding sequence (<i>lacZ'</i>)	1–354
Multiple cloning site (MCS)	57–197
PCR product insertion site	123
kanamycin resistance ORF	465–1256
ampicillin resistance (<i>bla</i>) ORF	1268–2125
f1 origin of ss-DNA replication	2317–2623
<loxP> (mutant <i>loxP</i> -derived sequence <i>lox66/71</i> ; nonfunctional in Cre-mediated recombination)	2690–2723
pUC origin of replication	3264–3931
<i>lac</i> promoter	4153–4272

pEGFP-N2 (Clontech):



Location of Features:

- Human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter: 1–589
 Enhancer region: 59–465; TATA box: 554–560
 Transcription start point: 583
- MCS: 591–665
- Enhanced green fluorescent protein gene
 Kozak consensus translation initiation site: 676–686
 Start codon (ATG): 683–685; Stop codon: 1400–1402
- SV40 early mRNA polyadenylation signal
 Polyadenylation signals: 1556–1561 & 1585–1590; mRNA 3' ends: 1594 & 1606
- Bacterial promoter for expression of Kanr gene:
 –35 region: 2170–2175; –10 region: 2193–2198
 Transcription start point: 2205
- SV40 origin of replication: 2449–2584
- SV40 early promoter
 Enhancer (72-bp tandem repeats): 2282–2353 & 2354–2425
 21-bp repeats: 2429–2449, 2450–2470 & 2472–2492
 Early promoter element: 2505–2511
 Major transcription start points: 2501, 2539, 2545 & 2550
- Kanamycin/neomycin resistance gene
 Neomycin phosphotransferase coding sequences:
 Start codon (ATG): 2633–2635; Stop codon: 3425–3427
- Herpes simplex virus (HSV) thymidine kinase (TK) polyadenylation signal
 Polyadenylation signals: 3663–3668 & 3676–3681
- pUC plasmid replication origin: 4012–4655

4.3.3. Rekombinante DNA-Konstrukte

Die Klonierung von Lamin C2-EGFP und myr-Lamin C-EGFP wurde bereits in Jahn (2009, Diplomarbeit) beschrieben. Für die zur Klonierung verwendeten Ansätze siehe 5.2.7.

Maus Lamin C2-EGFP:

Durch PCR wurde die codierende Sequenz von Lamin C2 amplifiziert. Dabei wurde das Stopcodon entfernt und eine *EcoRI*-Schnittstelle an das 3'-Ende angefügt (Primer: Nde_Maus_LC2_5'; R27_Eco_TAminus_3'). Das PCR-Produkt wurde in den StrataClone pSC-A-amp/kan kloniert, mit *EcoRI* ausgeschnitten und in den mit *EcoRI* linearisierten Zielvektor pEGFP-N2 eingebracht.

Maus myr-Lamin C-EGFP:

Durch PCR wurde die codierende Sequenz von Lamin C amplifiziert. Dabei wurde das Stopcodon entfernt und eine *EcoRI*-Schnittstelle an das 3'-Ende angefügt. Außerdem wurden 12 Nukleotide an das 5'-Ende angefügt, die für die vier letzten AS der GNAEGR-Sequenz codierten (Primer: HLC_4AS_5'; R27_Eco_TAA-_3'). Es folgte eine zweite PCR zum Anfügen der verbleibenden 6 Nukleotide an das 5'-Ende, die für die ersten beiden AS der GNAEGR-Sequenz codierten (Primer: HLC_6AS_5'; R27_Eco_TAA-_3'). Das PCR-Produkt wurde in den StrataClone pSC-A-amp/kan kloniert, anschließend mit *EcoRI* ausgeschnitten und in den mit *EcoRI* linearisierten Zielvektor pEGFP-N2 eingebracht.

Maus myr-Lamin Δ 2-27-EGFP:

Maus myr-Lamin C-EGFP wurde als Ausgangskonstrukt zur Klonierung von Maus myr-Lamin Δ 2-27-EGFP verwendet. Dazu wurde eine PCR durchgeführt bei der die Primer (myr-Lamin Δ 2-27_5' und myr-Lamin Δ 2-27_3') so gewählt waren, dass das gesamte Ausgangs-Plasmid mit Ausnahme der für die AS 2-27 codierenden Basenpaare amplifiziert wurde. Um das Template zu entfernen, wurde methylierte DNA anschließend mit DpnI verdaut (1,5h, 37°C). Das PCR-Produkt wurde phosphoryliert (Polynukleotid-Kinase, 30min, 37°C) und mit T4-Ligase (siehe 5.2.7) zu einem funktionalen, zirkulären Plasmid ligiert.

Maus myr-Lamin Δ 28-119-EGFP:

Die Klonierung von Maus myr-Lamin Δ 28-119-EGFP erfolgte analog zum Konstrukt Maus myr-Lamin Δ 2-27-EGFP durch Verwendung der Primer myr-Lamin Δ 28-119_5' und myr-Lamin Δ 28-119_3'.

4.3.4. Enzyme, Kits und Verbrauchsmaterial

Enzym/Komponenten	Hersteller
5 ml Polypropylen-Säulen	Qiagen
CM-Sepharose Fast Flow	GE Healthcare
DNaseI	Roche
dNTPs	MBI Fermentas
DpnI	MBI Fermentas
<i>EcoRI</i>	MBI Fermentas
Magnet Assisted Transfection (MATra)	IBA
NucleoSpin Plasmid Kit	MACHERY-NAGEL
Oligo(dT) Primer	MBI Fermentas
Page Ruler Prestained Protein ladder	MBI Fermentas
peqGOLD Trifast	PEQLAB
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	Biozym
Polynukleotid-Kinase (PNK)	MBI Fermentas
Proteinase K	Applichem
Reverse Transkriptase MMULV mit 5xRT-Puffer	Promega
RiboLock Ribonuclease Inhibitor	MBI Fermentas
Shrimp Alkalische Phosphatase	MBI Fermentas
StrataClone PCR Cloning Kit	Agilent Technologies
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas

Taq DNA-Polymerase	eigene Herstellung
Trypsin	Gibco Life Technologies
Unmasking-Solution	Vector Labs
Western Lightning-Plus ECL Kit	Perkin Elmer
Wizard® SV Gel and PCR Cleanup System	Promega
λ-DNA/EcoRI+HindIII, Marker 3	MBI Fermentas

Tabelle 8. Enzyme, Kits und Verbrauchsmaterial

4.4. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Applichem, Merck, Roth, Serva oder Sigma-Aldrich bezogen.

4.5. Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank, CO2-Auto.Zero	Heraeus
Drehtisch Reax 2	Heidolph, über Hartenstein (Würzburg)
Electrophoresis Power Supply	PEQLAB
Gefriermikrotom 2800 Frigocut E	Reichert-Jung
Graphitblotkammer LMS	über Hartenstein (Würzburg)
Heizblock	Liebisch, über Hartenstein (Würzburg)
Infinite M200	Tecan
Kippschüttler WS5 Laborgerätebau	Edmund Bühler, Tübingen
Konfokales Laser Scanning Mikroskop (CLSM) TCS-SP	Leica
Kühltischzentrifuge MIKRO 200R	Hettich
Laborwaage Mettler PJ 3600 DeltaRange	Mettler
Magnetrührer M35	GLW (Würzburg)
pH-Meter WTW pH 521	GLW (Würzburg)
Pipetten	Eppendorf
Proteingelkammer Mini V8	Gibco BRL
Schlittenmikrotom	Leitz
Sorvall RC 6+ Centrifuge	Thermo Scientific
Thermocycler primus 25 advanced	PEQLAB
Tischzentrifuge MIKRO 200	Hettich
Vortex L24	GLW (Würzburg)

Tabelle 9. Geräte

4.6. Computerprogramme

Adobe Photoshop CS2, Microsoft Excel2007, Microsoft PowerPoint2007, Microsoft Word2007, Thomson EndNote X4

5. Methoden

5.1. Mikrobiologische Methoden

5.1.1. Bakterien-Flüssigkultur

- **LB-Medium (1 L):**

- 10 g Bacto-Trypton
- 5 g Hefe-Extrakt
- 10 g NaCl
- pH 7,4
- vor Gebrauch autoklavieren

LB-Medium (15 ml) wurde in einem 50 ml Röhrchen mit Antibiotikum versetzt. Die Arbeitskonzentration für Kanamycin betrug 50 µg/ml, die für Ampicillin 100 µg/ml. Das Medium wurde entweder mit einer Einzelkolonie (Agarplatte) oder mit einer Dauerkultur beimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C geschüttelt. Wenn benötigt, wurde am nächsten Tag eine Dauerkultur hergestellt. Dazu wurden 800 µl der Übernachtskultur mit 200 µl sterilem Glycerin vermischt und sofort bei -70°C eingefroren.

5.1.2. Kultivierung von Bakterien auf Agar

LB-Medium (5.1.1) wurde mit 1,5% (w/v) Agar versetzt und autoklaviert. Nach Abkühlen auf etwa 50°C wurde Antibiotikum zugegeben (Kanamycin: 50 µg/ml; Ampicillin: 100µg/ml), gemischt und die Lösung zügig in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem Aushärten wurden die Agarplatten bei 4°C gelagert. Zur Kultivierung von Bakterien auf Agar wurden 100-200 µl einer Flüssigkultur mit einem sterilen Spatel auf der Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

5.1.3. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

- **TSS-Lösung:**

- LB-Medium (5.1.1)
- + 10% PEG 3350 oder 8000
- + 5% DMSO
- + 40 mM MgSO₄ oder MgCl₂
- pH 6,5
- steril filtrieren und bei -20°C lagern

Eine Flüssigkultur des gewünschten Bakterienstamms wurde bis zum Erreichen von OD₆₀₀=0,3 bis 0,4 bei 37°C geschüttelt. Die Kultur wurde dann für 10 min bei 1000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in eiskaltem TSS (1/40 des Ausgangsvolumens) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde im 4°C-Raum zügig aliquotiert (100 µl) und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die dauerhafte Lagerung erfolgte bei -70°C.

5.1.4. Transformation von Bakterien

Ein Aliquot kompetente Bakterien (5.1.3) wurde auf Eis aufgetaut und mit 50-150 ng DNA (fertige Plasmide) bzw. mit einem vollständigen Ligationsansatz (Klonierungen) gemischt. Anschließend wurde der Ansatz mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock (60 s, 42°C) wurden 900 µl steriles LB-Medium (5.1.1) zugegeben für 60 min bei 37°C geschüttelt. 100 µl der Suspension wurden auf einer Selektionsplatte (entsprechend der Resistenz des Vektors) ausgestrichen. Der verbleibende Ansatz wurde für 1 min bei 1000 g zentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 100 µl abgenommen, das Bakterienpellet darin resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Transformation von Bakterien bei Klonierungen mit dem StrataClone (blunt) PCR Cloning Kit erfolgte entsprechend der Herstellerangaben.

5.2. Molekularbiologische Methoden

5.2.1. Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien-Flüssigkulturen (5.1.1) erfolgte mit dem NucleoSpin Plasmid Kit entsprechend der Herstellerangaben. Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde der Infinite M200 verwendet.

5.2.2. Isolation von RNA aus Kulturzellen und Gewebe

Die Isolation von RNA erfolgte mit peqGOLD Trifast entsprechend der Herstellerangaben. Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde der Infinite M200 verwendet.

5.2.3. Isolation von genomischer DNA aus Gewebe

- **SDS-Mix (pH 7,5):**
 - 17 mM Tris/HCl
 - 17 mM EDTA
 - 170 mM NaCl
 - 0,85% SDS
- **Proteinase K (20 mg/ml in 10 mM CaCl₂)**
- **6M NaCl**

DNA wurde zur Genotypisierung von transgenen Mäusen aus der Schwanzspitze isoliert. Hierzu wurde das Gewebe in 500 µl SDS-Mix aufgenommen und 50 µl Proteinase K zugegeben. Proteine wurden über Nacht bei 56°C verdaut. Nach Zugabe von 250 µl 6M NaCl wurde 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden nicht löslichen Bestandteile bei 8000 g und 4°C pelletiert. 500 µl des Überstands wurden mit 1000 µl eiskaltem Ethanol versetzt. Durch Zentrifugieren bei 13000 g (10min) wurde die DNA pelletiert. Das DNA Pellet wurde zweimal mit 80% Ethanol gewaschen (dazwischen Zentrifugation bei 13000 g, 10min), 10min bei 70°C getrocknet, in 30-100 µl H₂O (je nach Pelletgröße) aufgenommen und 10 min bei 70°C gelöst. Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde der Infinite M200 verwendet. Die gelöste DNA wurde bei 4°C gelagert.

5.2.4. Amplifizierung von DNA durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Reverse Transkription (RT)

Durch reverse Transkription wird aus RNA cDNA synthetisiert. Die gewonnene cDNA wurde in der vorliegenden Arbeit anschließend zur Analyse der Genexpression auf transkriptioneller Ebene durch PCR verwendet. Dazu wurde RNA aus Gewebe oder Kulturzellen entsprechend 5.2.2 isoliert. Die reverse Transkription wurde wie folgt durchgeführt.

- **RT-Ansatz (20 µl):**

- 1 µg RNA
- 4 µl 5x RT-Puffer
- 1 µl dNTPs (je 10 mM)
- 1 µl Oligo(dT) Primer (500 µg/ml)
- 1 µl RNase Inhibitor (40 U/µl)
- 1 µl Reverse Transkriptase MMULV (200 U/µl)
- add. 20 µl H₂O

Der Ansatz wurde 60 min bei 37°C inkubiert, für 5 min bei 95°C inaktiviert und bei -20°C gelagert.

PCR mit Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase

Die Phusion DNA-Polymerase hat gegenüber der *Taq*-Polymerase die Vorteile der höheren Genauigkeit, der größeren Geschwindigkeit und der höheren Sensitivität. Daher wurde sie für „sensible“ Anwendungen wie die Klonierung rekombinanter DNA, die Genotypisierung transgener Mäuse und die Analyse der Genexpression standardmäßig eingesetzt. Aufgrund der erwähnten Eigenschaften sollte bei Verwendung der Phusion DNA-Polymerase unbedingt der vom Hersteller angebotene Rechner zur Bestimmung der Annealing-Temperatur eingesetzt werden (http://www.finnzymes.com/tm_determination.html). Die dabei ermittelten Werte können erheblich von den Werten, die andere Algorithmen ergeben, abweichen. Die Durchführung einer PCR mit Phusion DNA-Polymerase geschah wie folgt.

- **Phusion PCR-Ansatz (50 µl):**

- 4 ng Plasmid-DNA **oder**
- 500 ng genomische DNA **oder**
- 0,1-1 µl cDNA (je nach Expressionsstärke des untersuchten Gens)
- 1 µl 5'-Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl 3'-Primer (10 pmol/µl)
- 10 µl 5x Phusion-Puffer
- 1 µl dNTPs (je 10mM)
- 1,5 µl DMSO
- 0,5 µl Phusion DNA-Polymerase (2 U/µl)
- add. 50 µl H₂O

- **Programm für Thermocycler (die Schritte 2-4 wurden 25-30 mal wiederholt):**

- | | | | |
|----|-------------------------|--------------|----------------|
| 1. | Initiale Denaturierung: | 2 min | 98°C |
| 2. | Denaturierung: | 15 s | 98°C |
| 3. | Annealing: | 15 s | je nach Primer |
| 4. | Elongation: | 15 s / 1 kbp | 72°C |
| 5. | Finale Elongation: | 5 min | 72°C |
| 6. | Kühlung: | ∞ | 4°C |

Kolonie-PCR mit *Taq* DNA-Polymerase

Die *Taq* DNA-Polymerase wurde standardmäßig für die Kolonie-PCR verwendet. Im Unterschied zu einer konventionellen PCR wird bei einer Kolonie-PCR keine reine DNA als Template verwendet, sondern eine geringe Menge einer Bakterien-Kolonie aus einer Klonierung. Durch eine entsprechende Wahl der Primer können durch Kolonie-PCR die Bakterienklone aufgespürt werden, die das zu klonierende DNA-Konstrukte in korrekter Weise enthalten. Folgender Ansatz wurde verwendet.

- ***Taq* Kolonie-PCR-Ansatz (25 µl):**

0,5 µl	5'-Primer (10 pmol/µl)
0,5 µl	3'-Primer (10 pmol/µl)
0,5 µl	dNTPs (je 10mM)
2,5 µl	<i>Taq</i> -10x Reaktionspuffer
1,5 µl	MgCl ₂ (25 mM)
0,5 µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)
add.	25 µl H ₂ O

mit steriler Pipettenspitze zu untersuchenden Kolonie aufnehmen, Replika-Platte beimpfen und bakterielles Material in PCR-Ansatz resuspendieren

- **Programm für Thermocycler (die Schritte 2-4 wurden 25 mal wiederholt):**

7.	Initiale Denaturierung:	2 min	95°C
8.	Denaturierung:	30 s	95°C
9.	Annealing:	30 s	je nach Primer
10.	Elongation:	60 s / 1 kbp	72°C
11.	Finale Elongation:	10 min	72°C
12.	Kühlung:	∞	4°C

5.2.5. Agarose-Gelelektrophorese

- **20x SB-Puffer (pH 8):**

200 mM NaOH
pH mit Borat einstellen

- **6x DNA-Beladungspuffer:**

60% Glycerin
30% 200 mM EDTA
10% ddH₂O
+ 4% Orange G und 2% Xylencyanol

- **Ethidiumbromid (10 mg/ml)**

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe. Für die Herstellung eines Agarose-Gels wurde 1x SB-Puffer mit 0,5% bis 2% (w/v) Agarose (je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente) versetzt und gekocht bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Abkühlen auf etwa 50°C, wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,2 µg/ml) zugegeben. Die Lösung wurde in einen Gelschlitten mit eingesetztem Kamm gegossen. Nach dem vollständigen Aushärten wurde das Gel mit den zu analysierenden DNA-Proben (in 1x DNA-Beladungspuffer) beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 200-300 V in 1x SB-Puffer. Anschließend wurde das Gel auf dem UV-Transilluminator fotografiert. Für eine eventuelle Klonierung wurde die DNA ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert.

5.2.6. Gelextraktion von DNA

Die Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem Wizard SV Gel and PCR Cleanup System nach Angaben des Herstellerprotokolls.

5.2.7. Herstellung rekombinanter DNA (Klonierung)

Klonierung von PCR-Produkten mit dem StrataClone blunt PCR Cloning Kit

Eine praktische Möglichkeit, PCR-Produkte in einen „Zwischenvektor“ zu klonieren, stellt das StrataClone blunt PCR Cloning Kit dar. Dieses System nutzt die enzymatischen Aktivitäten von DNA-Topoisomerasen und DNA-Rekombinasen, um ein lineares PCR-Produkt mit glatten Enden direkt in einen speziellen Plasmid-Vektor einzufügen. Das rekombinante Plasmid kann anschließend in Bakterien beliebig vermehrt werden und somit hervorragend als Zwischenprodukt für weitere Klonierungsschritte dienen. Zur Klonierung mit dem StrataClone blunt PCR Cloning Kit wurde entsprechend der Angaben des Herstellers verfahren. Positive Klone wurden durch Kolonie-PCR ermittelt und durch GATC BIOTECH sequenziert.

Klonierung von DNA-Fragmenten mit Restriktionsenzymen

Für manche Anwendungen (z.B. Expression rekombinanter Proteine in eukaryontischen Zellen) ist es notwendig, das „zwischenklonierte“ Produkt anschließend in einen geeigneten Zielvektor einzubringen. Dazu wird das zu klonierende DNA-Fragment („Insert“) durch ein geeignetes Restriktionsenzym/geeignete Restriktionsenzyme aus dem Zwischenvektor ausgeschnitten. Der Zielvektor wird gleichzeitig mit *demselben/denselben* Restriktionsenzym(en) linearisiert. Beide DNA-Fragmente werden schließlich durch die enzymatische Aktivität einer Ligase so miteinander verbunden, dass das gewünschte Endprodukt erzeugt wird.

Als Zielvektor wurde in dieser Arbeit ausschließlich der eukaryontische Expressionsvektor pEGFP-N2 verwendet. Dabei wurde stets ungerichtet (d.h. mit *einem* Restriktionsenzym) und mit kohäsiven Enden kloniert.

- **Restriktionsverdau (20 µl):**

1 µg	DNA
1 µl	Restriktionsenzym
2 µl	10x Reaktions-Puffer (je nach Enzym)
add.	20µl ddH ₂ O

Der Ansatz wurde für 1-2 h bei der entsprechenden Temperatur (37°C für die meisten Enzyme) inkubiert. Anschließend wurde das Enzym inaktiviert (15 min, 80°C). Nach Agarose-Gelelektrophorese wurden die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert (5.2.6).

Um die Effizienz der anschließenden Ligation zu erhöhen, wurde der verdaute Zielvektor (nicht das Insert!) dephosphoryliert.

- **Dephosphorylierungsansatz (5 µl):**

120-150 ng	linearisierter Vektor
0,5 µl	10x SAP-Puffer
1 µl	SAP (Shrimp alkalische Phosphatase, 1 U/µl)
add.	5 µl ddH ₂ O

Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Hitzeinaktivierung von 15 min bei 65°C.

Durch die enzymatische Aktivität der T4 DNA-Ligase war es schließlich möglich, das geschnittene Insert in den linearisierten und dephosphorylierten Zielvektor einzubringen.

- **Ligationsansatz (20 µl):**

120-150 ng	linearisierter Vektor (= ein Dephosphorylierungsansatz)
x ng	Insert (3-10fache Menge des Vektors; molares Verhältnis!)
2 µl	10x T4 DNA-Ligase-Puffer
0,5 µl	rATP (100mM)
1 µl	T4-DNA-Ligase (5 U/µl)
add.	20 µl ddH ₂ O

Der Ansatz wurde auf Eis pipettiert und bei 16-21°C für 60min inkubiert. Anschließend wurde der vollständige Ansatz in kompetente *E. coli* XL1-blue transformiert (5.1.4). Positive Klone wurden durch Kolonie-PCR selektioniert (5.2.4).

5.3. Proteinbiochemische Methoden

5.3.1. SDS-PAGE

Für die meistens Anwendungen der Arbeit, wie SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung oder anschließendem Western blot, wurden Mini-Gele nach Laemmli verwendet. Für spezielle Anwendungen, vor allem für die Analyse von Proteingemischen nach Ionenaustausch-Chromatographie, wurden große Gele nach einem kombinierten Protokoll von Laemmli und Kornberg benutzt.

SDS-PAGE nach Laemmli

- **2x Probenpuffer (pH 6,8):**
 - 120 mM Tris/HCl
 - 10% (w/v) SDS
 - 20% (v/v) Glycerin
 - 20% (v/v) β-Mercaptoethanol
- **Lösung A:**
 - 29,22% (w/v) Acrylamid
 - 0,80% (w/v) Bisacrylamid
- **Lösung B (Trenngelpuffer):**
 - 1 M Tris/HCl, pH 8,7
- **Lösung C (Sammelgelpuffer):**
 - 1 M Tris/HCl, pH 6,8
- **20% (w/v) SDS**
- **10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)**
- **TEMED**
- **Laufpuffer (pH 8,5):**
 - 25 mM Tris/HCl
 - 112 mM Glycin
 - 0,1% (w/v) SDS

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

Die Proteinproben wurden in 2x Probenpuffer aufgenommen und 10-15 min bei 95°C denaturiert. Zwei Glasplatten (für Mini-Gele) wurden, getrennt durch entsprechende seitliche Spacer, zusammengeklammert. Die untere Öffnung zwischen den Platten wurde mit Klebeband und 0,5%iger Agarose abgedichtet. Für zwei 10%ige Trenngele wurden 5 ml Lösung A, 5,6 ml Lösung B, 4,215 ml H₂O und 75 µl 20% SDS gemischt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 100 µl 10% APS und 10 µl TEMED gestartet und die Mischung zügig zwischen die Glasplatten gegossen. Das Trenngel wurde mit H₂O überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Wasser abgegossen, das Sammelgel gemischt (für zwei Gele: 1,67 ml Lösung A, 1,25 ml Lösung C, 6,925 ml H₂O, 50 µl 20% SDS, 150 µl 10% APS, 10 µl TEMED), über das Trenngel geschichtet und ein Kamm in das noch flüssige Sammelgel gesteckt. Nach dem Aushärten wurden der Kamm und das Klebeband entfernt und das Gel in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Proben wurden auf das Gel geladen und die Elektrophorese bei 60 V so lange gefahren bis die Proteine das Sammelgel passiert hatten. Danach wurde die Spannung bis zum Ende der Elektrophorese auf 100 V erhöht. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel mit Coomassie gefärbt (mindestens 2 h färben; Entfärben über Nacht; Lösungen siehe oben) oder für Western blot (5.3.3) verwendet.

SDS-PAGE nach Laemmli/Kornberg

- **Lösung A (Trenngelacrylamid):**
 - 29,22% (w/v) Acrylamid
 - 0,15% (w/v) Bisacrylamid
- **Lösung A' (Sammelgelacrylamid):**
 - 29,22% (w/v) Acrylamid
 - 0,80% (w/v) Bisacrylamid
- **Lösung B (Trenngelpuffer):**
 - 3 M Tris/HCl, pH 8,8
 - 0,4% (w/v) SDS
- **Lösung B' (Sammelgelpuffer):**
 - 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
 - 0,4% (w/v) SDS
- **10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)**
- **TEMED**
- **Laufpuffer (pH 8,8):**
 - 50 mM Tris/HCl
 - 380 mM Glycin
 - 0,1% (w/v) SDS

Die Vorbereitung der Proben und des Gels entsprach im Wesentlichen der oben beschriebenen Gel-Elektrophorese nach Laemmli. Abweichend davon wurden jedoch andere Puffer zur Herstellung des Gels und für die Elektrophorese verwendet. Außerdem wurden zur besseren Auftrennung der Proteingemische größere Gel-Platten verwendet. Die Elektrophorese lief nach Beladung der Proben über Nacht bei 16 mA pro Gel. Anschließend wurden die Gele mit Silbernitrat gefärbt (5.3.2).

5.3.2. Silberfärbung von Proteingelen

- **Fixierer:**
 - 40% (v/v) Ethanol
 - 10% (v/v) Essigsäure
- **Sensitizer:**
 - 30% (v/v) Ethanol
 - 500 mM Natriumacetat
 - 8 mM Natriumthiosulfat
- **Silbernitrat, 30 mM**
- **Entwickler:**
 - 235 mM Natriumcarbonat
 - + 1/2000 Vol. 37% Formaldehyd
 - + 1/4000 Vol. 10% Natriumthiosulfat
- **Stopplösung:**
 - 0,5% (w/v) Glycin

Das zu färbende Gel wurde aus den Glasplatten ausgebaut und das Sammelgel wurde entfernt. Das Trenngel wurde für mindestens 30 min fixiert. Danach wurde 30 min im Sensitizer inkubiert und anschließend 3 mal 5 min in Wasser gewaschen. Es folgte eine 30 min Inkubation in 30 mM Silbernitrat und ein anschließender 5 min Waschschrift in Wasser. Nun wurde das Gel so lange im Entwickler inkubiert, bis sich die gewünschte Intensität der Färbung einstellte. Anschließend wurde die Färbereaktion mindestens 10 min in 0,5% (w/v) Glycin abgestoppt. Dabei war zu beachten, dass das Gel nach dem Transfer in Stopplösung noch etwas nachfärbt. Alle Schritte wurden unter leichtem Schütteln durchgeführt. Das Gel sollte aufgrund der hohen Sensitivität der Silberfärbung niemals ohne Handschuhe angefasst werden. Das gefärbte Gel wurde in Wasser bei 4°C gelagert.

5.3.3. Western blot mit Immundetektion

- **CAPS-Puffer (pH 10):**
 - 50 mM CAPS
 - 10 % (v/v) Methanol
 - 1 mM Mercaptopropionsäure
- **Ponceau S (0,2 % Ponceau-S in 3 % TCA)**
- **TBST (pH 7,4):**
 - 150 mM NaCl
 - 10 mM Tris/HCl
 - 0,1 % (v/v) Tween
- **10 % (w/v) Milch in TBST (pH 7,4)**

Durch einen Western blot mit Immundetektion werden Proteine aus einem SDS-Gel auf eine Membran (hier: Nitrocellulose) transferiert („geblottet“). Anschließend wird das zu untersuchende Protein mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Zum Transfer auf die Nitrocellulose wurde das Gel für 10 min in CAPS-Puffer äquilibriert. Die Nitrocellulose und Whatman-Papiere wurden der Größe des Gels angepasst und ebenfalls kurz in CAPS Puffer äquilibriert. Anschließend wurde der Blot in einer Graphitkammer aufgebaut. Dazu wurden, erstens, dreimal drei Whatman-Papiere auf die untere Graphitplatte gelegt. Darauf wurden, zweitens, zunächst die Nitrocellulose und dann das Gel (in dieser Reihenfolge!) gelegt. Dann wurde der Aufbau, drittens, mit dreimal drei Whatman-Papieren abgeschlossen. Um Luftblasen zwischen den Schichten zu vermeiden, wurde nach jedem der drei angegebene Schritte vorsichtig mit einem Glas-Röhrchen über die einzelnen Schichten gerollt. Das Blotten erfolgte bei 1 mA/cm^2 für 45 min. Danach wurde der Blot abgebaut und die Membran zur Kontrolle des vollständigen Transfers mit Ponceau S gefärbt (3-5 min, dann überschüssige Lösung mit H_2O abwaschen). Die Membran wurde darauf mit TBST entfärbt und über Nacht bei 4°C in TBST-Milch geblockt. Die geblockte Membran wurde in TBST-Milch auf Raumtemperatur (RT) gebracht. Dann wurde der Primärantikörper in TBST-Milch verdünnt und für 1h bei RT auf der Membran unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Waschen mit TBST (3x 15 min) wurde ein entsprechender Peroxidasegekoppelter Sekundärantikörper (Dianova) in der Verdünnung 1:10.000 unter gleichen Bedingungen mit der Nitrocellulose inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBST (3x 15 min) erfolgte die Detektion der markierten Proteine auf Röntgenfilm in der Dunkelkammer mit dem Western Lightning-Plus ECL Kit nach den Angaben des Herstellers.

5.3.4. Hochsalzextraktion von Proteinen aus Kulturzellen

- **PBS (pH 7,4):**

- 140 mM NaCl
- 2,6 mM KCl
- 6,4 mM Na_2HPO_4
- 1,4 mM KH_2PO_4

- **Lyse-Puffer (pH 7,5, 4°C):**

- 10 mM Tris/HCl
- 4 mM EDTA
- 1 mM PMSF (erst kurz vor Gebrauch zugeben!)
- 0,5 mM DTT (erst kurz vor Gebrauch zugeben!)
- 1/100 Vol. 100x Proteinase-Inhibitor-Mix (erst kurz vor Gebrauch zugeben!)
- 1% (v/v) Triton X-100 (erst nach Resuspendieren der Zellen zugeben!)

- **DNaseI-Puffer (pH 7,8, RT):**

- 10 mM Tris/HCl
- 10 mM CaCl_2
- 10 mM MgCl_2
- 1 mM PMSF (erst kurz vor Gebrauch zugeben!)
- 0,5 mM DTT (erst kurz vor Gebrauch zugeben!)
- 1/100 Vol. 100x Proteinase-Inhibitor-Mix (erst kurz vor Gebrauch zugeben!)
- + 1 Spatelspitze DNaseI (erst kurz vor Gebrauch zugeben!)

- **1M NaCl-Puffer (pH 7,5, 4°C):**

10 mM Tris/HCl
 1 M NaCl
 1 mM PMSF (erst kurz vor Gebrauch zugeben!)
 0,5 mM DTT (erst kurz vor Gebrauch zugeben!)
 1/100 Vol. 100x Proteinase-Inhibitor-Mix (erst kurz vor Gebrauch zugeben!)

- **10mM Tris/HCl (pH 7,5, 4°C)**
- **8M Urea-Puffer (pH 6,0, RT):**

8 M Harnstoff (Urea)
 50 mM Natriumacetat
 pH mit Essigsäure einstellen
 2 mM DTT (erst kurz vor Gebrauch zugeben!)

Für eine Hochsalzextraktion wurden jeweils ca. 4×10^8 Zellen verwendet. Dies entspricht 8 großen (150mm) Kulturschalen. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber in PBS geerntet und in Ansätzen von jeweils 2×10^8 Zellen für 5 min bei 450 g zentrifugiert. Die Zellpellets wurden vorsichtig in kaltem Lyse-Puffer (50 ml Endvolumen pro 2×10^8 Zellen) resuspendiert. Triton X-100 (Endkonzentration 1%) wurde aus einer entsprechenden Stammlösung erst nach dem Resuspendieren zugegeben. Es folgte eine 20 min Inkubation auf Eis unter gelegentlichem, leichtem Schwenken. 500 µl wurden als Probe (=Gesamtzellen) abgenommen und auf Eis aufbewahrt. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden bei 1600 g für 15 min (4°C) pelletiert. Vom Überstand wurden 500 µl als Probe (=Triton X-100 Überstand) abgenommen und auf Eis aufbewahrt. Der Rest des Überstands wurde verworfen und das Pellet wurde vorsichtig in DNaseI-Puffer (25 ml pro 2×10^8 Zellen) aufgenommen (KEIN Resuspendieren mit der Pipette!). Der Verdau durch DNaseI erfolgte 30 min bei RT unter gelegentlichem, leichtem Schwenken. Anschließend wurde dasselbe Volumen an kaltem 1 M NaCl-Puffer (25 ml pro 2×10^8 Zellen) zugegeben. Die Endkonzentration an Natriumchlorid zur Extraktion unter Hochsalzbedingungen löslicher Proteine betrug demnach 500 mM. Es folgte eine 15 min Inkubation auf Eis unter gelegentlichem, leichtem Schwenken. Danach wurden unlösliche Bestandteile für 20 min bei 13000 g (4°C) pelletiert. Vom Überstand wurden 500 µl Probe (=DNaseI-500 Überstand) abgenommen und auf Eis aufbewahrt; der Rest des Überstands wurde verworfen. Das salzresistente Pellet wurde einmal mit kaltem 10 mM Tris/HCl gewaschen, anschließend in 8M Urea-Puffer (5 ml pro 2×10^8 Zellen) resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde erneut für 20 min bei 13000 g (RT) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 2x Proteinprobenpuffer aufgenommen (=8M Urea Pellet). Vom Überstand wurde eine 100 µl Probe (=8M Urea Überstand) abgenommen, der Rest wurde zur weiteren Verwendung durch Ionenaustausch-Chromatographie (5.3.4) bei 4°C aufbewahrt. Abschließend wurden alle Proben (Gesamtzellen, Triton X-100 Überstand, DNaseI-500 Überstand) mit Ausnahme des 8M Urea Überstands durch Methanol/Chloroform (5.3.6) gefällt und die Proteinpellets in 50 µl 2x Proteinprobenpuffer aufgenommen (dadurch 10fache Konzentrierung!). Die Fraktionen wurden in äquivalenten Mengen auf ein SDS-Gel geladen (5.3.1) und durch Western blot (5.3.3) auf die Anwesenheit des entsprechenden Antigens untersucht. Der Großteil der Lamine befand sich dabei erwartungsgemäß im 8M Urea Überstand.

5.3.5. Ionenaustausch-Chromatographie

- **8M Urea-Puffer (pH 6,0, RT):**
 - 8 M Harnstoff (Urea)
 - 50 mM Natriumacetat
 - pH mit Essigsäure einstellen
 - 2 mM DTT (erst kurz vor Gebrauch zugeben!)
- **8M Urea-Puffer mit 200 mM NaCl(pH 6,0, RT):**
 - 8 M Harnstoff (Urea)
 - 200 mM NaCl
 - 50 mM Natriumacetat
 - pH mit Essigsäure einstellen
 - 2 mM DTT (erst kurz vor Gebrauch zugeben!)
- **CM-Sepharose Matrix**
- **5 ml Polypropylen-Säulen**

Das Prinzip der verwendeten Ionenaustausch-Chromatographie beruht darauf, geladene Polypeptide zunächst an eine entgegengesetzt geladene Matrix zu koppeln. Dabei bestimmen der festgelegte „Arbeits-pH“ und der Isoelektrische Punkt (pI) des jeweiligen Proteins, ob und wie stark es an die Matrix bindet. Anschließend erfolgt die selektive Elution der gebundenen Proteine durch eine schrittweise Erhöhung der ionischen Stärke des Mediums bei konstantem pH. Dabei eluieren gebundene Proteine, deren pI sich relativ stark vom gewählten Arbeits-pH unterscheidet, aufgrund ihrer größeren Ladung, später als solche Proteine, deren pI sich weniger stark vom Arbeits-pH unterscheidet. Im konkreten Fall wurde in der vorliegenden Arbeit eine negativ geladene CM-Sepharose Matrix verwendet. Da für die reinigenden A-Typ Lamine Isoelektrische Punkte um pH 7 erwartet wurden (aus der Literatur bzw. aus bioinformatischen Abschätzungen), wurde der Arbeits-pH bei 6,0 gewählt. Somit waren die zu reinigenden Lamine schwach positiv geladen und konnten daher an die negative CM-Sepharose Matrix binden. Die praktische Durchführung der Chromatographie erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Krohne (2004). Dazu wurden 10 ml des 8M Urea Überstands von 4×10^8 Zellen aus der unter 5.3.4 beschriebenen Hochsalzextraktion verwendet. Zunächst wurden 3 ml der in Ethanol resuspendieren CM-Sepharose Matrix in die Säule gegeben und gewartet, bis die Sepharose vollständig sedimentiert war. Anschließend wurde der Ethanol mit 10 ml H₂O ausgewaschen. Dabei und in allen folgenden Schritten war stets darauf zu achten, Lösungen vorsichtig auf die Sepharose zu pipettieren, um ein Aufwirbeln der Matrix zu vermeiden. Außerdem durfte die Matrix keines Falls austrocknen. Nach dem Waschen mit H₂O wurde die Säule mit 20 ml 8M Urea-Puffer äquilibriert. Danach erfolgte die Bindung der Proteine an die Matrix. Dazu wurde der 8M Urea Überstand aus 5.3.4 zweimal über die Matrix gegeben. Nach einem Waschschrift mit 15 ml 8M Urea-Puffer erfolgte die Elution der gebundenen Proteine. Dazu wurden durch Mischen der beiden oben angegebenen 8M Urea-Puffer (ohne und mit 300 mM NaCl) im entsprechenden Verhältnis Puffer mit je 20, 40, 60, 80 und 100 mM NaCl hergestellt. Die Elution erfolgte nach dem unten angegebenen Schema. Die Fraktionen wurden anschließend durch Methanol/Chloroform-Fällung gefällt und durch anschließende Aufnahme in 1/10 des Ausgangsvolumens 2x Proteinprobenpuffer 10fach aufkonzentriert. Das Elutionsprofil des zu reinigenden Antigens wurde durch Western blot der Elutionsfraktionen ermittelt. Die A-Typ Lamine eluierten in reproduzierbarer Weise bei etwa 60 mM NaCl. Die entsprechenden Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung aufgetrennt. Die gewünschten Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und standen nun für eine massenspektrometrische Analyse zur Verfügung.

Urea-Puffer mit NaCl	Volumen der Elutionsfraktionen
20 mM	20 x 1,5 ml und 2 x 10 ml
40 mM	20 x 1,5 ml und 2 x 10 ml
60 mM	20 x 1,5 ml und 2 x 10 ml
80 mM	20 x 1,5 ml und 2 x 10 ml
100 mM	20 x 1,5 ml
200 mM	10 ml

5.3.6. Methanol/Chloroform-Fällung von Proteinen

- Methanol, eiskalt
- Chloroform
- H₂O, eiskalt

Zu 500 µl Proteinlösung wurden 600 µl eiskaltes Methanol, sowie 150 µl Chloroform gegeben. Nach kräftigem Schütteln (mind. 10 s) wurden 100 µl eiskaltes H₂O zugegeben und erneut kräftig geschüttelt. Der Ansatz wurde bei 10000 g 5 min zentrifugiert. Es bildeten sich zwei Phasen. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Zum verbliebenen Ansatz, der sich aus der chloroformhaltigen unteren Phase und der proteinhaltigen Interphase zusammensetzte, wurden 600 µl eiskaltes Methanol gegeben. Nach kurzem Vortexen wurde 5 min bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet und in 2x Probenpuffer gelöst.

5.3.7. Massenspektrometrie

Die in dieser Arbeit beschriebenen massenspektrometrischen Analysen wurden in Kollaborationen mit Martina Schnölzer (DKFZ, Heidelberg, Deutschland) und Clemens J. Heilmann (Swammerdam Institute for Life Sciences, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt. Details zur Methodik sind in Jahn et al. (2012, in press) nachzulesen.

5.4. Zellkultur

5.4.1. Kultivieren und Passagieren von Kulturzellen (*Lmna*^{-/-} MEFs)

- Kulturmedium für MEFs:
 - DMEM Glutamax (4500 mg/l D-Glucose, ohne Natriumpyruvat)
 - + 10 % FCS
 - + 1 % Pen/Strep
 - + 1 % L-Glutamin
 - vorgewärmt (37°C)
- PBS (pH 7,4):
 - 140 mM NaCl
 - 2,6 mM KCl
 - 6,4 mM Na₂HPO₄

1,4 mM KH₂PO₄
autoklaviert und vorgewärmt (37°C)

- **Trypsin-EDTA:**

PBS
+ 0,06% Trypsin
+ 0,53 mM EDTA
steril filtriert und vorgewärmt (37°C)

Die Arbeiten mit Kulturzellen erfolgten unter der sterilen Werkbank. Das Zellwachstum wurde mit einem Inversmikroskop (Phasenkontrast) überprüft. Für die Aufrechterhaltung der Kultur wurden die Zellen in TC 25-Flaschen (2,5 ml Kulturmedium) gezüchtet. Die Zellen wurden bei einer Dichte von 70-80% gesplittet. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 2 bis 3mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch die Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA und sanftes Schütteln vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Dieser Vorgang wurde unter dem Inversmikroskop verfolgt. Die vollständig abgelösten Zellen wurden in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Von der entstandenen Zellsuspension wurden (je nach Zelldichte und Proliferationsverhalten) 0,2 bis 0,5 ml zum Beimpfen einer frischen Kultur verwendet. Zur späteren Durchführung von Immunfluoreszenz- bzw. Photobleaching-Experimenten wurden die Zellen zwei Tage vorher auf Deckgläschen in 35 mm-Kunststoffschalen bzw. ohne Deckgläschen in 35 mm-Glasbodenschalen (jeweils 2,5 ml Kulturmedium) ausgesät. Die Kultivierung der *Lmna*^{-/-} MEFs erfolgte bei 37°C und 5% CO₂.

5.4.2. Transfektion von Kulturzellen mit *MATra*

Die Transfektion mit *MATra* ist eine rein physikalische Methode zum Einbringen von DNA in Kulturzellen. Dabei wird die DNA zunächst an inerte, magnetische Partikeln gebunden. Anschließend werden diese Partikel mit der anhaftenden DNA durch magnetische Kräfte in die Zellen „gezogen“. Die mit *MATra* erzielten Transfektionsraten waren für die Zwecke dieser Arbeit völlig ausreichend. Im Vorteil gegenüber einigen chemischen Transfektionsreagenzien, die teilweise höhere Transfektionsraten erzielen, war bei der Transfektion mit *MATra* nahezu kein toxischer Effekt feststellbar. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion wie beschrieben ausgesät (5.4.1) und entsprechend des Herstellerprotokolls 12-16 h vor der Durchführung des nachfolgenden Versuchs (Immunfluoreszenz-Analyse oder Photobleaching) transfiziert.

5.5. Mikroskopische Methoden

5.5.1. Anfertigung von Gefrierschnitten

- **Methylbutan (-140°C)**

Die Mäuse wurden durch CO₂ getötet und das zu untersuchende Gewebe (hier: Leber) präpariert. Das Gewebe wurde für ca. 3 min in -140°C kaltem Methylbutan schockgefroren und anschließend in Methylbutan bei -70°C gelagert. Gefrierschnitte (5 µm) wurden mit dem Gefriermikrotom 2800 FRIGOCUT E hergestellt und auf SuperFrost Plus Objektträger überführt. Sie konnten nach kurzem Trocknen (ca. 30 min) direkt für Immunfluoreszenz-Analysen eingesetzt werden (5.5.4).

5.5.2. Anfertigung von Paraffinschnitten von embryonalem Ovar

- **PBS (pH 7,4):**
 - 140 mM NaCl
 - 2,6 mM KCl
 - 6,4 mM Na₂HPO₄
 - 1,4 mM KH₂PO₄
- **1% Formaldehyd in PBS**
- **Ethanol (50 % bis 100% in 10% Schritten)**
- **Tertiäres Butanol**
- **Paraffin**

Eine trächtige Maus wurde getötet (CO₂). Der Uterus samt Embryonen wurde heraus präpariert und in PBS überführt. Die Embryonen wurde in PBS aus dem Uterus präpariert und dekaptiert. Die Ovarien der Embryonen wurden entfernt und zur Fixierung für 3 h in 1% Formaldehyd (in PBS) inkubiert. Es folgte ein Waschschrift in PBS (1 h) zur Entfernung des Formaldehyds. Das Gewebe wurde durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe (je 50%, 60%, 70%, 80%, 90% bis 100% für 1 h) sukzessive entwässert und anschließend für 1 h in tertiärem Butanol inkubiert. Nun wurden die Ovarien einzeln in Schälchen mit flüssigem Paraffin transferiert (am Abend vorher in den 60°C warmen Heizofen stellen!). Um die vollständige Infiltration des Gewebes sicherzustellen, wurden die Ovarien über Nacht bei 60°C in Paraffin inkubiert. Am folgenden Tag nahm man das Gewebe aus dem Heizofen und ließ das Paraffin bei RT aushärten. Das in Paraffin eingebettete Ovar kann bei 4°C praktisch unbegrenzt gelagert werden. Zur Herstellung von Paraffinschnitten wurde ein Schlittenmikrotom verwendet. Dazu wurde eine Heizplatte auf 58°C erhitzt, das eingebettete Gewebe durch leichtes Anschmelzen mit einem erhitzten Spatel auf ein Holzblöckchen geklebt und in das Mikrotom eingespannt. Die Dicke der Ovarien-Schnitte betrug 3 µm. Die Schnitte wurden mit einem Pinsel in einen Tropfen Wasser, der zuvor auf einem Objektträger (SuperFrost Plus) platziert wurde, transferiert und durch die Wärme der Heizplatte gestreckt. Das Wasser wurde grob mit einem Tuch entfernt. Restliches Wasser wurde durch kräftiges Schleudern des Objektträgers abgeschüttelt. Vor der Immunhistochemischen-Färbung (5.5.5) wurden die Schnitte über Nacht getrocknet.

5.5.3. Oocyten-Spreitung von embryonalem Ovar

- **PBS (pH 7,4):**
 - 140 mM NaCl
 - 2,6 mM KCl
 - 6,4 mM Na₂HPO₄
 - 1,4 mM KH₂PO₄
- **Hypotonischer Puffer (pH 8,2):**
 - 30 mM Tris/HCl
 - 17 mM Natriumcitrat
 - 5 mM EDTA 50 mM Sucrose
 - pH einstellen
 - +5 mM DTT (Endkonzentration!)
- **100 mM Sucrose, steril filtriert**

- **Feuchtekammer**
- **2% Paraformaldehyd (PFA, pH 9,0):**
 - 2 g PFA in 80 ml ddH₂O
 - +5-10 µl 1 M NaOH
 - auf 60°C erhitzen und lösen
 - auf 20°C abkühlen (Eis!), pH einstellen
 - add. 100 ml ddH₂O, steril filtrieren
 - +0,15 % Triton X-100

Die Spreitung von Oocyten erfolgte in leicht modifizierter Form entsprechend de Boer et al. (2009). Die trächtige Maus wurde getötet (CO₂), der Uterus samt Embryonen herauspräpariert und in PBS überführt. Alle weiteren Präparationsschritte wurden in PBS durchgeführt. Jeder Embryo wurde einzeln aus dem Uterus präpariert, dekaptiert und die Schwanzspitze wurde zur späteren Genotypisierung entfernt. Die Ovarien wurden entnommen und in PBS so lange gelagert bis alle Embryonen präpariert waren (30-60 min, je nach Anzahl der Embryonen). Die Ovarien wurden für 15 min in hypotonischem Puffer inkubiert und anschließend einzeln in einen Tropfen (ca. 50 µl) 100 mM Sucrose überführt, der auf einem Objektträger (Super Frost) platziert war (ein Ovar pro Objektträger!). Unter dem Mikroskop wurde das Ovar mit Uhrmacherpinzetten in wenige große Teile (3-5) gerissen und 5 min vorsichtig bewegt, um die Oocyten aus dem Gewebe zu schwämmen. Danach wurden Gewebereste, soweit möglich, aus der Sucrose entfernt. Der Objektträger wurde 5 min in einer Feuchtekammer inkubiert, bevor anschließend das dem Sucrose-Tropfen entsprechende Volumen (ca. 50 µl) 2% PFA zugegeben wurde. Die Präparate wurde erst 1 h in der geschlossenen und dann 30 min in der geöffneten Feuchtekammer aufbewahrt. Anschließend wurden die Präparate bei 37°C inkubiert, bis das Sucrose/PFA-Gemisch vollständig eingetrocknet war (ca. 1-2 h). Die Objektträger wurden in Alufolie verpackt und bei -70°C gelagert.

5.5.4. Immunfluoreszenz-Analyse von Kulturzellen und Gefrierschnitten

- **PBS (pH 7,4):**
 - 140 mM NaCl
 - 2,6 mM KCl
 - 6,4 mM Na₂HPO₄
 - 1,4 mM KH₂PO₄
- **1% Formaldehyd in PBS**
- **0,1% Triton X-100 in PBS**
- **PBT (pH 7,4):**
 - PBS
 - +1,5% BSA
 - +0,1% Tween-20
- **Hoechst 33258 (5mg/ml)**
- **Glycerin in PBS (1:1)**
- **Feuchtekammer**

Die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen wurden zunächst in PBS gesammelt. Gefrierschnitte wurden vor der Verwendung für etwa 30 min getrocknet. Die nachfolgenden Schritte waren für beide Arten von

Proben dieselben. Zunächst wurden die Proben für 3 min in 1% Formaldehyd fixiert und anschließend für 5 min in 0,1% Triton X-100 permeabilisiert. Nach Waschen mit PBS (2x5 min) wurden die Proben in eine Feuchtekammer gelegt und 1 h mit PBT abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern (30-60 min, Verdünnungen entsprechend Tabelle 6 in PBS, Feuchtekammer). Nach Waschen mit PBS (3x5 min) folgte die Inkubation mit den entsprechenden sekundären Antikörpern (20-30 min, 1:50 in PBS, Feuchtekammer). 10 min vor Ablauf der Inkubationszeit wurden 1-2 Tropfen Hoechst 33258 in der Verdünnung 1:333 in PBS zugegeben. Die Präparate wurden anschließend in PBS gewaschen (3x5 min) und in Glycerin-PBS eingebettet. Die Aufnahmen erfolgten am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (TCS-SP, Leica) und wurden mit Adobe Photoshop CS2 bearbeitet.

5.5.5. Immunfluoreszenz-Analyse von Paraffinschnitten

siehe 5.5.4, zusätzlich dazu:

- **Rotihistol (Xylol-Ersatz)**
- **Ethanol (50% bis 100% in 10% Schritten)**
- **Unmasking-Solution**

Die über Nacht getrockneten Paraffinschnitte (5.5.2) wurden zunächst entparaffinisiert und rehydratisiert. Dies geschah durch zweimalige Inkubation in Rotihistol (je 10min) und eine anschließende, absteigende Ethanol-Reihe (100% bis 60% Ethanol für je 2 min; 50% Ethanol für 10 min; dann in H₂O bis Autoklav einsatzbereit). Während der Rehydratisierung der Schnitte wurde der Autoklav vorgeheizt (125°C, 1,5bar). Die Schnitte wurden anschließend für 20 min (3 µm Schnitte) mit Unmasking-Lösung bei 125°C und 1,5 bar im Autoklaven behandelt. Dadurch wurden die durch die Formaldehyd-Fixierung des Gewebes teilweise „maskierten“ Epitope wieder besser für die Antikörper zugänglich. Nach langsamem Ablassen des Drucks und Abkühlen des Autoklavs auf unter 100°C (das Wasser im Autoklav darf keinesfalls kochen!) wurden die Schnitte in PBS überführt und anschließend für 10 min in 0,1% Triton-X 100 permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (je 5 min) erfolgten alle weiteren Schritte wie unter Punkt 5.5.4 beschrieben. Um die Effizienz der Färbung zu verbessern, wurden die Primär-Antikörper hierbei jedoch über Nacht auf den Schnitten inkubiert.

5.5.6. Immunfluoreszenz-Analyse von Spreitungen

- **PBS (pH 7,4):**
 - 140 mM NaCl
 - 2,6 mM KCl
 - 6,4 mM Na₂HPO₄
 - 1,4 mM KH₂PO₄
- **Blockinglösung (pH 7,4):**
 - PBS
 - +5 % Milch
 - +5 % Kälberserum (FCS)
 - bei -20°C lagern
 - + 1 mM PMSF (direkt vor Gebrauch)
- **Hoechst 33258 (5mg/ml)**
- **Glycerin in PBS (1:1)**

- **Feuchtekammer**

Die Immunfluoreszenz-Analyse von Spreitungen erfolgte nach de Boer et al. (2009). Die bei -70°C gelagerten Spreitungspräparate (5.5.3) wurden auf Raumtemperatur gebracht. Erst danach wurden sie aus der Alufolie ausgepackt, um die Bildung von Eiskristallen zu vermeiden. Die Präparate wurden dreimal 5 min in PBS gewaschen. Danach folgte eine halbstündige Inkubation mit Blockinglösung in der Feuchtekammer. Die Blockinglösung wurde vorher 30 min bei 16000 g (4°C) zentrifugiert, um unlösliche Partikel zu pelletieren. Dieser Zentrifugationsschritt wurde auch vor allen weiteren Inkubationsschritten mit Blockinglösung und darin verdünnten Antikörpern durchgeführt. Nach dem Blocken wurden $100\text{ }\mu\text{l}$ des (in Blockinglösung verdünnten und zentrifugierten) Primärantikörpers auf die Präparate gegeben und 30 min in der Feuchtekammer inkubiert. Auf den Objektträger wurde dabei vorsichtig ein Deckglas gelegt, damit sich die Antikörperlösung auf der gesamte Fläche verteilt. Nach 30 min wurde das Deckglas vorsichtig abgespült. Es folgten drei Waschschrte in PBS (je 5 min). Nach einer erneuten Absättigung (30 min mit zentrifugierter Blockinglösung) wurde der Sekundärantikörper ($100\text{ }\mu\text{l}$; zuvor in Blockinglösung verdünnt und zentrifugiert) für 30 min auf dem Präparat inkubiert. Auch diese Inkubation erfolgte mit aufgelegtem Deckglas in der Feuchtekammer. 10 min vor Ende der Inkubationszeit wurden einige Tropfen Hoechst 33258 (1:333 in PBS) auf die Präparate gegeben. Schließlich wurden die Präparate dreimal 5 min in PBS gewaschen und in Glycerin-PBS eingedeckelt. Bei Doppel- oder Dreifachlokalisationen erfolgte zunächst in beschriebener Art und Weise die Inkubation eines Primärantikörpers und des entsprechenden Sekundärantikörpers. Danach wurden in weiteren Inkubationsrunden jeweils der zweite bzw. dritte Primärantikörper und die entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert. Diese Maßnahme erhöhte die Spezifität der einzelnen Immunreaktionen deutlich.

5.5.7. FRAP

Experimentelles Prinzip

FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching) und andere Varianten des Photobleaching sind heute Standardmethoden zur Messung der Mobilität von Proteinen und beruhen in ihrem experimentellen Prinzip auf einer von Axelrod et al. (1976) entwickelten Technik. Für die Durchführung von FRAP wird das zu untersuchende Protein als EGFP-Fusionsprotein (oder als Fusionsprotein mit einem anderen GFP-Derivat) in Kulturzellen exprimiert. Durch einen starken Laserimpuls wird die Fluoreszenzmarkierung zu Beginn des Experiments innerhalb eines lokal begrenzten Messbereichs (ROI, region of interest) irreversibel ausgebleicht. Dadurch wird das untersuchte Protein selbst nicht beschädigt. Anschließend wird die Erholung der Fluoreszenz im Messbereich in Anhängigkeit der Zeit gemessen. Aufgrund der zeitlichen Dynamik dieser Fluoreszenz-Erholung lassen sich schließlich quantitative Aussagen über die Mobilität des untersuchten Proteins treffen.

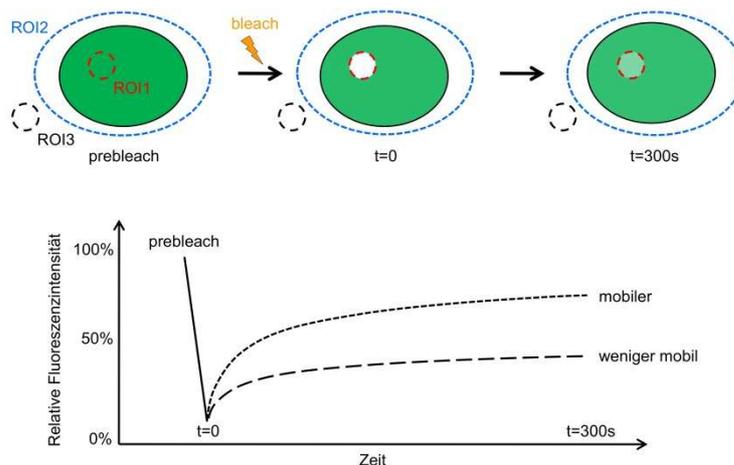
Durchführung

Vor dem FRAP-Experiment wurden *Lmna*^{-/-} MEFs wie beschrieben in Glasbodenschälchen ausgesät und transfiziert (5.4.1 und 5.4.2). Die Analysen wurden am CLSM TCS-SP (Leica) mit dem FRAP-Tool der Mikroskop-Software durchgeführt. Während der Messung befanden sich die Zellen in einer Klimakammer, die auf dem Objektisch des Mikroskops aufgebaut war. Dadurch konnten stets optimale Kulturbedingungen eingehalten werden (37°C , 5% CO_2). Es wurde folgendes experimentelles Set-up verwendet:

- **Objektiv:** 63fach, Ölimmersion
- **Zoom:** 8fach
- **Format:** 512x512
- **Mode:** xyt
- **Expander:** 1
- **Scan:** bidirektional, 800Hz
- **Pinhole:** 1,60 P AU, Airy 1
- **Average:** 2 (doppelte Akkumulation)
- **Laserintensität:** Bleichen: 458 nm, 476 nm, 488 nm, 496 nm, 514 nm jeweils 100%
Messen: 488 nm, 7% der Bleichintensität

Vor dem Bleichen wurden 2 Scans im Abstand von 0,837 s gemacht, anschließend wurde 8mal im Abstand von 0,837 s gebleicht. Nach dem Bleichen wurden 30 Scans im Abstand von 1 s, dann 30 Scans im Abstand von 2 s und schließlich 42 Scans im Abstand von 5 s aufgenommen. Nach der Messung wurden, zusätzlich zum ausgebleichten ROI (ROI₁; 2 µm), zwei weitere Messbereiche gewählt (siehe Skizze). Einer davon deckte den gesamten fluoreszierenden Bereich der beobachteten Zellen ab (ROI₂). Der andere schloss einen möglichst fluoreszenzfreien Bereich im Hintergrund ein (ROI₃; 2 µm). Durch die unten stehende Rechnung (Phair and Misteli, 2000) wurden alle im ROI₁ gemessenen Werte vom Hintergrund-Rauschen, sowie von Bleicheffekten, die durch den Scanvorgang bedingt waren, bereinigt und schließlich als Bruchteil der ursprünglichen Fluoreszenz vor dem Bleichen (prebleach) angegeben. Der zeitliche Verlauf der so ermittelten relativen Fluoreszenzintensität dient als Maß für die Mobilität des untersuchten Proteins.

FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching)



$$I_{\text{rel}}(t) = \frac{I_1(t) - I_3(t)}{I_2(t) - I_3(t)} \times \frac{I_2(\text{pre}) - I_3(\text{pre})}{I_1(\text{pre}) - I_3(\text{pre})}$$

$I_{\text{rel}}(t)$: relative Fluoreszenz im ROI₁ zum Zeitpunkt t

$I_x(t)$: Fluoreszenzintensität im ROI_x zum Zeitpunkt t

$I_x(\text{pre})$: Fluoreszenzintensität im ROI_x vor dem Bleichen

Anschließend wurden die Rohdaten aus der Mikroskop-Software in Microsoft Excel importiert und über alle untersuchten Zellen gemittelt. Die Durchschnittswerte wurden graphisch in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde durch einen ungepaarten Student'schen T-Test geprüft (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>). Die im Ergebnisteil gezeigten Bilder wurden mit Adobe Photoshop CS2 bearbeitet.

5.5.8. FLIP

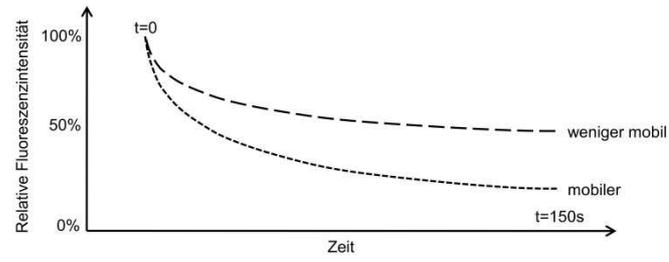
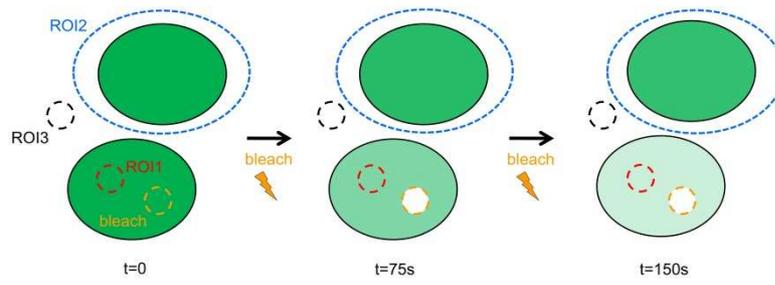
Experimentelles Prinzip

FLIP (Fluoreszenz Loss in Photobleaching) ähnelt hinsichtlich seiner theoretischen Grundlage im Wesentlichen dem FRAP. Im Unterschied zu FRAP wird jedoch bei FLIP ein Bereich innerhalb der Fluoreszenz des zu untersuchenden EGFP-Fusionskonstrukts nicht nur einmal zu Beginn des Experiments geblichen, sondern konstant in kurz aufeinanderfolgenden, definierten Zeitintervallen während des gesamten Versuchs (bleach; siehe Skizze). Gleichzeitig wird der dadurch verursachte Verlust der Fluoreszenzintensität in einer anderen Region derselben Zelle gemessen (ROI₁; siehe Skizze). Ob dabei ein Rückgang der Fluoreszenzintensität feststellbar ist, und wie ausgeprägt dieser Rückgang in Abhängigkeit von der Zeit stattfindet, gibt schließlich Auskunft darüber, ob es einen mobilen Austausch des markierten Proteins zwischen den untersuchten Bereichen der Zelle gibt und wie hoch die Dynamik dieses Austausches ist.

Durchführung

Die Transfektion der Zellen und ihre Kultivierung während des Experiments erfolgten wie bereits für FRAP beschrieben. Auch die Einstellungen der Mikroskop-Software entsprachen den oben beschriebenen. Der einzige Unterschied bestand darin, dass für FLIP die Intensität des 488 nm Lasers zum Scannen auf 5% (statt auf 7% bei FRAP) reduziert wurde. Zur Durchführung eines FLIP-Experiments wurden insgesamt 91 Mess-/Bleich-Zyklen im Abstand von 0,837 s verwendet. Ein Zyklus umfasste dabei einen Scanvorgang mit doppelter Akkumulation (5 % Laserpower) und das sofort darauf folgende Bleichen (100 % Laserpower, siehe FRAP). Sowohl der Bleichbereich (bleach) als auch der Messbereich (ROI₁) waren in ihrem Durchmesser stets auf 1 µm festgelegt. Um die gemessenen FLIP-Werte quantitativ zwischen verschiedenen Versuchsansätzen miteinander vergleichen zu können, wurde auch der Abstand zwischen bleach-Region und ROI₁ für alle beschriebenen Versuche auf 1 µm normiert. Zusätzlich zu ROI₁ wurden weitere Regionen gewählt (siehe Skizze). ROI₂ schloss dabei den gesamten fluoreszierenden Bereich einer Zelle ein, die sich in direkter Nachbarschaft der untersuchten Zellen befand. Dies diente dazu, das durch das Scannen auftretende Bleichen mathematisch zu eliminieren. Zur zusätzlichen Eliminierung des Hintergrundrauschens schloss die dritte Region (ROI₃; 1 µm) einen möglichst fluoreszenzfreien Bereich außerhalb der Zelle ein. Die Berechnung der relativen Fluoreszenzintensität erfolgte analog zu FRAP mit der oben angegebenen Formel. Die weiteren Schritte zur Auswertung und Aufbereitung der Daten erfolgte ebenfalls wie oben für FRAP beschrieben.

FLIP (Fluorescence Loss in Photobleaching)



6. Literaturverzeichnis

- Agarwal, A.K., J.P. Fryns, R.J. Auchus, and A. Garg. 2003. Zinc metalloproteinase, ZMPSTE24, is mutated in mandibuloacral dysplasia. *Hum Mol Genet.* 12:1995-2001.
- Ahmady, E., S.A. Deeke, S. Rabaa, L. Kouri, L. Kenney, A.F. Stewart, and P.G. Burgon. 2011. Identification of a novel muscle A-type lamin-interacting protein (MLIP). *J Biol Chem.* 286:19702-19713.
- Alsheimer, M. 2009. The dance floor of meiosis: evolutionary conservation of nuclear envelope attachment and dynamics of meiotic telomeres. *Genome Dyn.* 5:81-93.
- Alsheimer, M., and R. Benavente. 1996. Change of karyoskeleton during mammalian spermatogenesis: expression pattern of nuclear lamin C2 and its regulation. *Exp Cell Res.* 228:181-188.
- Alsheimer, M., D. Jahn, S. Schramm, and R. Benavente. 2011. Nuclear Lamins in Mammalian Spermatogenesis. In *Epigenetics and Human Reproduction*. S. Rousseaux and S. Khochbin, editors. Springer, 233 Spring Street, New York, Ny 10013, United States. 279-288.
- Alsheimer, M., E. von Glasenapp, R. Hock, and R. Benavente. 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.
- Alsheimer, M., E. von Glasenapp, M. Schnolzer, H. Heid, and R. Benavente. 2000. Meiotic lamin C2: the unique amino-terminal hexapeptide GNAEGR is essential for nuclear envelope association. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:13120-13125.
- Anderson, L.K., A. Reeves, L.M. Webb, and T. Ashley. 1999. Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics.* 151:1569-1579.
- Andres, V., and J.M. Gonzalez. 2009. Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization. *J Cell Biol.* 187:945-957.
- Arnault, E., M. Doussau, A. Pesty, B. Lefevre, and A.M. Courtot. 2010. Review: Lamin A/C, caspase-6, and chromatin configuration during meiosis resumption in the mouse oocyte. *Reprod Sci.* 17:102-115.
- Axelrod, D., D.E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, and W.W. Webb. 1976. Mobility Measurement by Analysis of Fluorescence Photobleaching Recovery Kinetics. *Biophys J.* 16:1055-1069.
- Baker, S.M., A.W. Plug, T.A. Prolla, C.E. Bronner, A.C. Harris, X. Yao, D.M. Christie, C. Monell, N. Arnheim, A. Bradley, T. Ashley, and R.M. Liskay. 1996. Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nature genetics.* 13:336-342.
- Bass, H.W. 2003. Telomere dynamics unique to meiotic prophase: formation and significance of the bouquet. *Cell Mol Life Sci.* 60:2319-2324.
- Baudat, F., K. Manova, J.P. Yuen, M. Jasin, and S. Keeney. 2000. Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Mol Cell.* 6:989-998.
- Beck, L.A., T.J. Hosick, and M. Sinensky. 1990. Isoprenylation is required for the processing of the lamin A precursor. *J Cell Biol.* 110:1489-1499.
- Bergo, M.O., B. Gavino, J. Ross, W.K. Schmidt, C. Hong, L.V. Kendall, A. Mohr, M. Meta, H. Genant, Y. Jiang, E.R. Wisner, N. Van Bruggen, R.A. Carano, S. Michaelis, S.M. Griffey, and S.G. Young. 2002. Zmpste24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:13049-13054.
- Bione, S., E. Maestrini, S. Rivella, M. Mancini, S. Regis, G. Romeo, and D. Toniolo. 1994. Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.* 8:323-327.
- Bolcun-Filas, E., Y. Costa, R. Speed, M. Taggart, R. Benavente, D.G. De Rooij, and H.J. Cooke. 2007. SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. *Journal of Cell Biology.* 176:741-747.
- Bolcun-Filas, E., E. Hall, R. Speed, M. Taggart, C. Grey, B. de Massy, R. Benavente, and H.J. Cooke. 2009. Mutation of the mouse Syce1 gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair. *PLoS Genet.* 5:e1000393.
- Bonne, G., M.R. Di Barletta, S. Varnous, H.M. Becane, E.H. Hammouda, L. Merlini, F. Muntoni, C.R. Greenberg, F. Gary, J.A. Urtizberea, D. Duboc, M. Fardeau, D. Toniolo, and K. Schwartz. 1999. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.* 21:285-288.

- Broers, J.L., E.A. Peeters, H.J. Kuijpers, J. Endert, C.V. Bouten, C.W. Oomens, F.P. Baaijens, and F.C. Ramaekers. 2004. Decreased mechanical stiffness in LMNA-/- cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies. *Hum Mol Genet.* 13:2567-2580.
- Broers, J.L.V., B.M. Machiels, G.J.J.M. van Eys, H.J.H. Kuijpers, E.M.M. Manders, R. van Driel, and F.C.S. Ramaekers. 1999. Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. *J Cell Sci.* 112:3463-3475.
- Brown, C.A., R.W. Lanning, K.Q. McKinney, A.R. Salvino, E. Cherniske, C.A. Crowe, B.T. Darras, S. Gominak, C.R. Greenberg, C. Grosmann, P. Heydemann, J.R. Mendell, B.R. Pober, T. Sasaki, F. Shapiro, D.A. Simpson, O. Suchowersky, and J.E. Spence. 2001. Novel and recurrent mutations in lamin A/C in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am J Med Genet.* 102:359-367.
- Burke, B., and K.J. Roux. 2009. Nuclei take a position: managing nuclear location. *Dev Cell.* 17:587-597.
- Burke, B., and C.L. Stewart. 2006. The laminopathies: The functional architecture of the nucleus and its contribution to disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 7:369-405.
- Cao, H., and R.A. Hegele. 2000. Nuclear lamin A/C R482Q mutation in Canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet.* 9:109-112.
- Capanni, C., V. Cenni, E. Mattioli, P. Sabatelli, A. Ognibene, M. Columbaro, V.K. Parnaik, M. Wehnert, N.M. Maraldi, S. Squarzone, and G. Lattanzi. 2003. Failure of lamin A/C to functionally assemble in R482L mutated familial partial lipodystrophy fibroblasts: altered intermolecular interaction with emerin and implications for gene transcription. *Exp Cell Res.* 291:122-134.
- Capell, B.C., and F.S. Collins. 2006. Human laminopathies: nuclei gone genetically awry. *Nat Rev Genet.* 7:940-952.
- Chen, C.Y., Y.H. Chi, R.A. Mitalif, M.F. Starost, T.G. Myers, S.A. Anderson, C.L. Stewart, and K.T. Jeang. 2012. Accumulation of the inner nuclear envelope protein sun1 is pathogenic in progeric and dystrophic laminopathies. *Cell.* 149:565-577.
- Chen, L., L. Lee, B.A. Kudlow, H.G. Dos Santos, O. Sletvold, Y. Shafeghati, E.G. Botha, A. Garg, N.B. Hanson, G.M. Martin, I.S. Mian, B.K. Kennedy, and J. Oshima. 2003. LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. *Lancet.* 362:440-445.
- Clarke, S., J.P. Vogel, R.J. Deschenes, and J. Stock. 1988. Posttranslational modification of the Ha-ras oncogene protein: evidence for a third class of protein carboxyl methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:4643-4647.
- Cohen, P.E., S.E. Pollack, and J.W. Pollard. 2006. Genetic analysis of chromosome pairing, recombination, and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. *Endocr Rev.* 27:398-426.
- Corrigan, D.P., D. Kuszczak, A.E. Rusinol, D.P. Thewke, C.A. Hrycyna, S. Michaelis, and M.S. Sinensky. 2005. Prelamin A endoproteolytic processing in vitro by recombinant Zmpste24. *Biochem J.* 387:129-138.
- Crisp, M., Q. Liu, K. Roux, J.B. Rattner, C. Shanahan, B. Burke, P.D. Stahl, and D. Hodzic. 2006. Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol.* 172:41-53.
- Cutler, D.A., T. Sullivan, B. Marcus-Samuels, C.L. Stewart, and M.L. Reitman. 2002. Characterization of adiposity and metabolism in Lmna-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 291:522-527.
- Dahl, K.N., P. Scaffidi, M.F. Islam, A.G. Yodh, K.L. Wilson, and T. Misteli. 2006. Distinct structural and mechanical properties of the nuclear lamina in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:10271-10276.
- Dai, Q., E. Choy, V. Chiu, J. Romano, S.R. Slivka, S.A. Steitz, S. Michaelis, and M.R. Philips. 1998. Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry.* 273:15030-15034.
- Daniel, K., J. Lange, K. Hached, J. Fu, K. Anastassiadis, I. Roig, H.J. Cooke, A.F. Stewart, K. Wassmann, M. Jasin, S. Keeney, and A. Toth. 2011. Meiotic homologue alignment and its quality surveillance are controlled by mouse *HORMAD1*. *Nat Cell Biol.* 13:599-U232.
- Dauer, W.T., and H.J. Worman. 2009. The nuclear envelope as a signaling node in development and disease. *Dev Cell.* 17:626-638.
- Davies, B.S., R.H. Barnes, 2nd, Y. Tu, S. Ren, D.A. Andres, H.P. Spielmann, J. Lammerding, Y. Wang, S.G. Young, and L.G. Fong. 2010. An accumulation of non-farnesylated prelamin A causes cardiomyopathy but not progeria. *Hum Mol Genet.* 19:2682-2694.
- de Boer, E., F.G. Lhuissier, and C. Heyting. 2009. Cytological analysis of interference in mouse meiosis. *Methods Mol Biol.* 558:355-382.

- De Sandre-Giovannoli, A., R. Bernard, P. Cau, C. Navarro, J. Amiel, I. Boccaccio, S. Lyonnet, C.L. Stewart, A. Munnich, M. Le Merrer, and N. Levy. 2003. Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science*. 300:2055.
- De Sandre-Giovannoli, A., M. Chaouch, S. Kozlov, J.M. Vallat, M. Tazir, N. Kassouri, P. Szeppetowski, T. Hammadouche, A. Vandenberghe, C.L. Stewart, D. Grid, and N. Levy. 2002. Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet*. 70:726-736.
- Dechat, T., J. Gotzmann, A. Stockinger, C.A. Harris, M.A. Talle, J.J. Siekierka, and R. Foisner. 1998. Detergent-salt resistance of LAP2alpha 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., B. Korbei, O.A. Vaughan, S. Vlcek, C.J. Hutchison, and R. Foisner. 2000a. Lamina-associated polypeptide 2alpha binds intranuclear A-type lamins. *J Cell Sci*. 113 Pt 19:3473-3484.
- Dechat, T., T. Shimi, S.A. Adam, A.E. Rusinol, D.A. Andres, H.P. Spielmann, M.S. Sinensky, and R.D. Goldman. 2007. Alterations in mitosis and cell cycle progression caused by a mutant lamin A known to accelerate human aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:4955-4960.
- Dechat, T., S. Vlcek, and R. Foisner. 2000b. Lamina-associated polypeptide 2 isoforms and related proteins in cell cycle-dependent nuclear structure dynamics. *J Struct Biol*. 129:335-345.
- Dhe-Paganon, S., E.D. Werner, Y.I. Chi, and S.E. Shoelson. 2002. Structure of the globular tail of nuclear lamin. *Journal of Biological Chemistry*. 277:17381-17384.
- Di Giacomo, M., M. Barchi, F. Baudat, W. Edelmann, S. Keeney, and M. Jasin. 2005. Distinct DNA-damage-dependent and -independent responses drive the loss of oocytes in recombination-defective mouse mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:737-742.
- Ding, X., R. Xu, J. Yu, T. Xu, Y. Zhuang, and M. Han. 2007. SUN1 is required for telomere attachment to nuclear envelope and gametogenesis in mice. *Dev Cell*. 12:863-872.
- Doring, V., and R. Stick. 1990. Gene structure of nuclear lamin LIII of *Xenopus laevis*; a model for the evolution of IF proteins from a lamin-like ancestor. *Embo J*. 9:4073-4081.
- Dwyer, N., and G. Blobel. 1976. A modified procedure for the isolation of a pore complex-lamina fraction from rat liver nuclei. *J Cell Biol*. 70:581-591.
- Emery, A.E. 2002. The muscular dystrophies. *Lancet*. 359:687-695.
- Eriksson, M., W.T. Brown, L.B. Gordon, M.W. Glynn, J. Singer, L. Scott, M.R. Erdos, C.M. Robbins, T.Y. Moses, P. Berglund, A. Dutra, E. Pak, S. Durkin, A.B. Csoka, M. Boehnke, T.W. Glover, and F.S. Collins. 2003. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*. 423:293-298.
- Fatkin, D., C. MacRae, T. Sasaki, M.R. Wolff, M. Porcu, M. Frenneaux, J. Atherton, H.J. Vidaillet, S. Spudich, U. De Girolami, J.G. Seidman, C.E. Seidman, F. Muntoni, G. Muehle, W. Johnson, and B. McDonough. 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.
- Fawcett, D.W. 1966. On the occurrence of a fibrous lamina on the inner aspect of the nuclear envelope in certain cells of vertebrates. *The American journal of anatomy*. 119:129-145.
- Fidzianska, A., and I. Hausmanowa-Petrusewicz. 2003. Architectural abnormalities in muscle nuclei. Ultrastructural differences between X-linked and autosomal dominant forms of EDMD. *J Neurol Sci*. 210:47-51.
- Fidzianska, A., D. Toniolo, and I. Hausmanowa-Petrusewicz. 1998. Ultrastructural abnormality of sarcolemmal nuclei in Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD). *J Neurol Sci*. 159:88-93.
- Filesi, I., F. Gullotta, G. Lattanzi, M.R. D'Apice, C. Capanni, A.M. Nardone, M. Columbaro, G. Scarano, E. Mattioli, P. Sabatelli, N.M. Maraldi, S. Biocca, and G. Novelli. 2005. Alterations of nuclear envelope and chromatin organization in mandibuloacral dysplasia, a rare form of laminopathy. *Physiol Genomics*. 23:150-158.
- Foisner, R., and L. Gerace. 1993. Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell*. 73:1267-1279.
- Fong, L.G., J.K. Ng, M. Meta, N. Cote, S.H. Yang, C.L. Stewart, T. Sullivan, A. Burghardt, S. Majumdar, K. Reue, M.O. Bergo, and S.G. Young. 2004. Heterozygosity for *Lmna* deficiency eliminates the progeria-like phenotypes in *Zmpste24*-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:18111-18116.

- Frohnert, C., S. Schweizer, and S. Hoyer-Fender. 2011. SPAG4L/SPAG4L-2 are testis-specific SUN domain proteins restricted to the apical nuclear envelope of round spermatids facing the acrosome. *Mol Hum Reprod.* 17:207-218.
- Furukawa, K., and Y. Hotta. 1993. cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *Embo J.* 12:97-106.
- Furukawa, K., H. Inagaki, and Y. Hotta. 1994. Identification and cloning of an mRNA coding for a germ cell-specific A-type lamin in mice. *Exp Cell Res.* 212:426-430.
- Furukawa, K., and T. Kondo. 1998. Identification of the lamina-associated-polypeptide-2-binding domain of B-type lamin. *Eur J Biochem.* 251:729-733.
- Gilchrist, S., N. Gilbert, P. Perry, C. Ostlund, H.J. Worman, and W.A. Bickmore. 2004. Altered protein dynamics of disease-associated lamin A mutants. *Bmc Cell Biol.* 5.
- Glass, C.A., J.R. Glass, H. Taniura, K.W. Hasel, J.M. Blevitt, and L. Gerace. 1993. The alpha-helical rod domain of human lamins A and C contains a chromatin binding site. *Embo J.* 12:4413-4424.
- Göb, E. 2011, Dissertation.
- Göb, E., J. Schmitt, R. Benavente, and M. Alsheimer. 2010. Mammalian sperm head formation involves different polarization of two novel LINC complexes. *PLoS One.* 5:e12072.
- Goldman, R.D., D.K. Shumaker, M.R. Erdos, M. Eriksson, A.E. Goldman, L.B. Gordon, Y. Gruenbaum, S. Khuon, M. Mendez, R. Varga, and F.S. Collins. 2004. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:8963-8968.
- Goldstein, J.L., M.S. Brown, S.J. Stradley, Y. Reiss, and L.M. Gierasch. 1991. Nonfarnesylated tetrapeptide inhibitors of protein farnesyltransferase. *J Biol Chem.* 266:15575-15578.
- Gruenbaum, Y., A. Margalit, R.D. Goldman, D.K. Shumaker, and K.L. Wilson. 2005. The nuclear lamina comes of age. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 6:21-31.
- Hale, C.M., A.L. Shrestha, S.B. Khatau, P.J. Stewart-Hutchinson, L. Hernandez, C.L. Stewart, D. Hodzic, and D. Wirtz. 2008. Dysfunctional connections between the nucleus and the actin and microtubule networks in laminopathic models. *Biophys J.* 95:5462-5475.
- Hamer, G., H. Wang, E. Bolcun-Filas, H.J. Cooke, R. Benavente, and C. Hoog. 2008. Progression of meiotic recombination requires structural maturation of the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci.* 121:2445-2451.
- Haque, F., D.J. Lloyd, D.T. Smallwood, C.L. Dent, C.M. Shanahan, A.M. Fry, R.C. Trembath, and S. Shackleton. 2006. SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. *Mol Cell Biol.* 26:3738-3751.
- Haque, F., D. Mazzeo, J.T. Patel, D.T. Smallwood, J.A. Ellis, C.M. Shanahan, and S. Shackleton. 2010. Mammalian SUN protein interaction networks at the inner nuclear membrane and their role in laminopathy disease processes. *J Biol Chem.* 285:3487-3498.
- Heitlinger, E., M. Peter, A. Lustig, W. Villiger, E.A. Nigg, and U. Aebi. 1992. The role of the head and tail domain in lamin structure and assembly: analysis of bacterially expressed chicken lamin A and truncated B2 lamins. *Journal of structural biology.* 108:74-89.
- Hennekam, R.C. 2006. Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *Am J Med Genet A.* 140:2603-2624.
- Herrmann, H., and U. Aebi. 2004. Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annual review of biochemistry.* 73:749-789.
- Ho, C.Y., and J. Lammerding. 2012. Lamins at a glance. *J Cell Sci.* 125:2087-2093.
- Hoger, T.H., C. Grund, W.W. Franke, and G. Krohne. 1991. Immunolocalization of lamins in the thick nuclear lamina of human synovial cells. *Eur J Cell Biol.* 54:150-156.
- Hoger, T.H., G. Krohne, and W.W. Franke. 1988. Amino acid sequence and molecular characterization of murine lamin B as deduced from cDNA clones. *Eur J Cell Biol.* 47:283-290.
- Holtz, D., R.A. Tanaka, J. Hartwig, and F. McKeon. 1989. The CaaX motif of lamin A functions in conjunction with the nuclear localization signal to target assembly to the nuclear envelope. *Cell.* 59:969-977.
- Homer, H.A., A. McDougall, M. Levasseur, K. Yallop, A.P. Murdoch, and M. Herbert. 2005. Mad2 prevents aneuploidy and premature proteolysis of cyclin B and securin during meiosis I in mouse oocytes. *Genes Dev.* 19:202-207.
- Horton, H., I. McMorrow, and B. Burke. 1992. Independent expression and assembly properties of heterologous lamins A and C in murine embryonal carcinomas. *Eur J Cell Biol.* 57:172-183.

- Hunt, P.A., and T.J. Hassold. 2002. Sex matters in meiosis. *Science*. 296:2181-2183.
- Hutchison, C.J. 2002. Lamins: building blocks or regulators of gene expression? *Nature reviews. Molecular cell biology*. 3:848-858.
- Hutchison, C.J. 2012. B-type lamins and their elusive roles in metazoan cell proliferation and senescence. *Embo Journal*. 31:1058-1059.
- Jahn, D. 2009, Diplomarbeit.
- Jahn, D., S. Schramm, R. Benavente, and M. Alsheimer. 2010. Dynamic properties of meiosis-specific lamin C2 and its impact on nuclear envelope integrity. *Nucleus*. 1:273-283.
- Jahn, D., S. Schramm, M. Schnölzer, C.J. Heilmann, C.G. de Koster, W. Schütz, R. Benavente, and M. Alsheimer. 2012. A truncated lamin A in the *Lmna*^{-/-} mouse line: Implications for the understanding of laminopathies. *In press*.
- Johnson, B.R., R.T. Nitta, R.L. Frock, L. Mounkes, D.A. Barbie, C.L. Stewart, E. Harlow, and B.K. Kennedy. 2004. A-type lamins regulate retinoblastoma protein function by promoting subnuclear localization and preventing proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:9677-9682.
- Keeney, S., C.N. Giroux, and N. Kleckner. 1997. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell*. 88:375-384.
- Khatau, S.B., C.M. Hale, P.J. Stewart-Hutchinson, M.S. Patel, C.L. Stewart, P.C. Searson, D. Hodzic, and D. Wirtz. 2009. A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:19017-19022.
- Kilic, F., M.B. Dalton, S.K. Burrell, J.P. Mayer, S.D. Patterson, and M. Sinensky. 1997. In vitro assay and characterization of the farnesylation-dependent prelamin A endoprotease. *J Biol Chem*. 272:5298-5304.
- Kim, J.B., and B.M. Spiegelman. 1996. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev*. 10:1096-1107.
- Kim, Y., A.A. Sharov, K. McDole, M. Cheng, H. Hao, C.M. Fan, N. Gaiano, M.S. Ko, and Y. Zheng. 2011. Mouse B-type lamins are required for proper organogenesis but not by embryonic stem cells. *Science*. 334:1706-1710.
- Kitten, G.T., and E.A. Nigg. 1991. The Caax Motif Is Required for Isoprenylation, Carboxyl Methylation, and Nuclear-Membrane Association of Lamin-B2. *Journal of Cell Biology*. 113:13-23.
- Kozul, R., and N. Kleckner. 2009. Dynamic chromosome movements during meiosis: a way to eliminate unwanted connections? *Trends in Cell Biology*. 19:716-724.
- Kouznetsova, A., H. Wang, M. Bellani, R.D. Camerini-Otero, R. Jessberger, and C. Hoog. 2009. BRCA1-mediated chromatin silencing is limited to oocytes with a small number of asynapsed chromosomes. *J Cell Sci*. 122:2446-2452.
- Krimm, I., C. Ostlund, B. Gilquin, J. Couprie, P. Hossenlopp, J.P. Mornon, G. Bonne, J.C. Courvalin, H.J. Worman, and S. Zinn-Justin. 2002. The Ig-like structure of the c-terminal domain of lamin A/C, mutated in muscular dystrophies, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy. *Structure*. 10:811-823.
- Krohne, G. 1998. Lamin assembly in vivo. *Subcell Biochem*. 31:563-586.
- Krohne, G. 2004. Lamins. *Methods Cell Biol*. 78:573-596.
- Krohne, G., I. Waizenegger, and T.H. Hoger. 1989. The conserved carboxy-terminal cysteine of nuclear lamins is essential for lamin association with the nuclear envelope. *J Cell Biol*. 109:2003-2011.
- Kubben, N., J.W. Voncken, G. Konings, M. van Weeghel, M.M. van den Hoogenhof, M. Gijbels, A. van Erk, K. Schoonderwoerd, B. van den Bosch, V. Dahlmans, C. Calis, S.M. Houten, T. Misteli, and Y.M. Pinto. 2011. Post-natal myogenic and adipogenic developmental: defects and metabolic impairment upon loss of A-type lamins. *Nucleus*. 2:195-207.
- Lammerding, J., L.G. Fong, J.Y. Ji, K. Reue, C.L. Stewart, S.G. Young, and R.T. Lee. 2006. Lamins A and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics. *J Biol Chem*. 281:25768-25780.
- Lammerding, J., P.C. Schulze, T. Takahashi, S. Kozlov, T. Sullivan, R.D. Kamm, C.L. Stewart, and R.T. Lee. 2004. Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J Clin Invest*. 113:370-378.
- Lammers, J.H., H.H. Offenberg, M. van Aalderen, A.C. Vink, A.J. Dietrich, and C. Heyting. 1994. The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol*. 14:1137-1146.
- Lei, K., X.C. Zhang, X. Ding, X. Guo, M.Y. Chen, B.G. Zhu, T. Xu, Y. Zhuang, R. Xu, and M. Han. 2009. SUN1 and SUN2 play critical but partially redundant roles in anchoring nuclei in skeletal muscle cells in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:10207-10212.

- Libotte, T., H. Zaim, S. Abraham, V.C. Padmakumar, M. Schneider, W. Lu, M. Munck, C. Hutchison, M. Wehnert, B. Fahrenkrog, U. Sauder, U. Aebi, A.A. Noegel, and I. Karakesisoglou. 2005. Lamin A/C-dependent localization of Nesprin-2, a giant scaffold at the nuclear envelope. *Mol Biol Cell*. 16:3411-3424.
- Lin, F., D.L. Blake, I. Callebaut, I.S. Skerjanc, L. Holmer, M.W. McBurney, M. Paulin-Levasseur, and H.J. Worman. 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.
- Lin, F., and H.J. Worman. 1993. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem*. 268:16321-16326.
- Link, J. 2010, Diplomarbeit.
- Link, J., D. Jahn, J. Schmitt, E. Göb, J. Baar, S. Ortega, R. Benavente, and M. Alsheimer. The nuclear lamina regulates chromosome dynamics and promotes efficient homologous recombination during mouse meiosis. *Submitted*.
- Lipkin, S.M., P.B. Moens, V. Wang, M. Lenzi, D. Shanmugarajah, A. Gilgeous, J. Thomas, J. Cheng, J.W. Touchman, E.D. Green, P. Schwartzberg, F.S. Collins, and P.E. Cohen. 2002. Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nat Genet*. 31:385-390.
- Liu, B.H., J.M. Wang, K.M. Chan, W.M. Tjia, W. Deng, X.Y. Guan, J.D. Huang, K.M. Li, P.Y. Chau, D.J. Chen, D.Q. Pei, A.M. Pendas, J. Cadinanos, C. Lopez-Otin, H.F. Tse, C. Hutchison, J.J. Chen, Y.H. Cao, K.S.E. Cheah, K. Tryggvason, and Z.J. Zhou. 2005. Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat Med*. 11:780-785.
- Lloyd, D.J., R.C. Trembath, and S. Shackleton. 2002. A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum Mol Genet*. 11:769-777.
- Lu, J.T., A. Muchir, P.L. Nagy, and H.J. Worman. 2011. LMNA cardiomyopathy: cell biology and genetics meet clinical medicine. *Dis Model Mech*. 4:562-568.
- Machiels, B.M., A.H. Zorenc, J.M. Endert, H.J. Kuijpers, G.J. van Eys, F.C. Ramaekers, and J.L. Broers. 1996. An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10. *J Biol Chem*. 271:9249-9253.
- Mahadevaiah, S.K., J.M.A. Turner, F. Baudat, E.P. Rogakou, P. de Boer, J. Blanco-Rodriguez, M. Jasin, S. Keeney, W.M. Bonner, and P.S. Burgoyne. 2001. Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet*. 27:271-276.
- Malone, C.J., W.D. Fixsen, H.R. Horvitz, and M. Han. 1999. UNC-84 localizes to the nuclear envelope and is required for nuclear migration and anchoring during C-elegans development. *Development*. 126:3171-3181.
- Markiewicz, E., R. Venables, M.A. Reyes, R. Quinlan, M. Dorobek, I. Hausmanowa-Petruciewicz, and C. Hutchison. 2002. Increased solubility of lamins and redistribution of lamin C in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy fibroblasts. *J Struct Biol*. 140:241-253.
- Melcon, G., S. Kozlov, D.A. Cutler, T. Sullivan, L. Hernandez, P. Zhao, S. Mitchell, G. Nader, M. Bakay, J.N. Rottman, E.P. Hoffman, and C.L. Stewart. 2006. Loss of emerin at the nuclear envelope disrupts the Rb1/E2F and MyoD pathways during muscle regeneration. *Hum Mol Genet*. 15:637-651.
- Mellad, J.A., D.T. Warren, and C.M. Shanahan. 2011. Nesprins LINC the nucleus and cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 23:47-54.
- Meuwissen, R.L., H.H. Offenberger, A.J. Dietrich, A. Riesewijk, M. van Iersel, and C. Heyting. 1992. A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *Embo J*. 11:5091-5100.
- Moens, P.B., N.K. Kolas, M. Tarsounas, E. Marcon, P.E. Cohen, and B. Spyropoulos. 2002. The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA-DNA interactions without reciprocal recombination. *J Cell Sci*. 115:1611-1622.
- Moens, P.B., E. Marcon, J.S. Shore, N. Kochakpour, and B. Spyropoulos. 2007. Initiation and resolution of interhomolog connections: crossover and non-crossover sites along mouse synaptonemal complexes. *J Cell Sci*. 120:1017-1027.
- Moir, R.D., M. Yoon, S. Khuon, and R.D. Goldman. 2000. Nuclear lamins A and B1: Different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells. *Journal of Cell Biology*. 151:1155-1168.
- Moses, M.J. 1956a. Chromosomal Structures in Crayfish Spermatozoa. *J Biophys Biochem Cy*. 2:215-&.
- Moses, M.J. 1956b. Studies on nuclei using correlated cytochemical, light, and electron microscope techniques. *J Biophys Biochem Cytol*. 2:397-406.

- Moses, M.J. 1977. Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). I. Morphology of the autosomal complement in spread preparations. *Chromosoma*. 60:99-125.
- Moses, M.J., and A.J. Solari. 1976. Positive contrast staining and protected drying of surface spreads: electron microscopy of the synaptonemal complex by a new method. *J Ultrastruct Res*. 54:109-114.
- Moulson, C.L., G. Go, J.M. Gardner, A.C. van der Wal, J.H. Smitt, J.M. van Hagen, and J.H. Miner. 2005a. Homozygous and compound heterozygous mutations in ZMPSTE24 cause the laminopathy restrictive dermopathy. *J Invest Dermatol*. 125:913-919.
- Moulson, C.L., G. Go, J.M. Gardner, A.C. van der Wal, J.H.S. Smitt, J.M. van Hagen, and J.H. Miner. 2005b. Homozygous and compound heterozygous mutations in ZMPSTE24 cause the laminopathy restrictive dermopathy. *Journal of Investigative Dermatology*. 125:913-919.
- Muchir, A., G. Bonne, A.J. van der Kool, M. van Meegen, F. Baas, P.A. Bolhuis, M. de Visser, and K. Schwartz. 2000. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet*. 9:1453-1459.
- Muchir, A., P. Pavlidis, G. Bonne, Y.K. Hayashi, and H.J. Worman. 2007a. Activation of MAPK in hearts of EMD null mice: similarities between mouse models of X-linked and autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 16:1884-1895.
- Muchir, A., P. Pavlidis, V. Decostre, A.J. Herron, T. Arimura, G. Bonne, and H.J. Worman. 2007b. Activation of MAPK pathways links LMNA mutations to cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Journal of Clinical Investigation*. 117:1282-1293.
- Naetar, N., B. Korbei, S. Kozlov, M.A. Kerenyi, D. Dorner, R. Kral, I. Gotic, P. Fuchs, T.V. Cohen, R. Bittner, C.L. Stewart, and R. Foisner. 2008. Loss of nucleoplasmic LAP2 alpha-lamin A complexes causes erythroid and epidermal progenitor hyperproliferation. *Nat Cell Biol*. 10:1341-U1213.
- Nakajima, N., and K. Abe. 1995. Genomic structure of the mouse A-type lamin gene locus encoding somatic and germ cell-specific lamins. *FEBS Lett*. 365:108-114.
- Navarro, C.L., J. Cadinanos, A. De Sandre-Giovannoli, R. Bernard, S. Courrier, I. Boccaccio, A. Boyer, W.J. Kleijer, A. Wagner, F. Giuliano, F.A. Beemer, J.M. Freije, P. Cau, R.C. Hennekam, C. Lopez-Otin, C. Badens, and N. Levy. 2005a. Loss of ZMPSTE24 (FACE-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and accumulation of Lamin A precursors. *Hum Mol Genet*. 14:1503-1513.
- Navarro, C.L., J. Cadinanos, A.D. Sandre-Giovannoli, R. Bernard, S. Courrier, I. Boccaccio, A. Boyer, W.J. Kleijer, A. Wagner, F. Giuliano, F.A. Beemer, J.M. Freije, P. Cau, R.C.M. Hennekam, C. Lopez-Otin, C. Badens, and N. Levy. 2005b. Loss of ZMPSTE24 (FACE-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and accumulation of Lamin A precursors. *Hum Mol Genet*. 14:1503-1513.
- Navarro, C.L., A. De Sandre-Giovannoli, R. Bernard, I. Boccaccio, A. Boyer, D. Genevieve, S. Hadj-Rabia, C. Gaudy-Marqueste, H.S. Smitt, P. Vabres, L. Faivre, A. Verloes, T. Van Essen, E. Flori, R. Hennekam, F.A. Beemer, N. Laurent, M. Le Merrer, P. Cau, and N. Levy. 2004. Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) defects cause nuclear disorganization and identify restrictive dermopathy as a lethal neonatal laminopathy. *Hum Mol Genet*. 13:2493-2503.
- Nikolova, V., C. Leimena, A.C. McMahon, J.C. Tan, S. Chandar, D. Jogia, S.H. Kesteven, J. Michalicek, R. Otway, F. Verheyen, S. Rainer, C.L. Stewart, D. Martin, M.P. Feneley, and D. Fatkin. 2004. Defects in nuclear structure and function promote dilated cardiomyopathy in lamin A/C-deficient mice. *J Clin Invest*. 113:357-369.
- Nitta, R.T., S.A. Jameson, B.A. Kudlow, L.A. Conlan, and B.K. Kennedy. 2006. Stabilization of the retinoblastoma protein by A-type nuclear lamins is required for INK4A-mediated cell cycle arrest. *Mol Cell Biol*. 26:5360-5372.
- Novelli, G., A. Muchir, F. Sangiuolo, A. Helbling-Leclerc, M.R. D'Apice, C. Massart, F. Capon, P. Sbraccia, M. Federici, R. Lauro, C. Tudisco, R. Pallotta, G. Scarano, B. Dallapiccola, L. Merlini, and G. Bonne. 2002. Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C. *Am J Hum Genet*. 71:426-431.
- Offenberg, H.H., J.A.C. Schalk, R.L.J. Meuwissen, M. van Aalderen, H.A. Kester, A.J.J. Dietrich, and C. Heyting. 1998. SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Res*. 26:2572-2579.
- Ozawa, R., Y.K. Hayashi, M. Ogawa, R. Kurokawa, H. Matsumoto, S. Noguchi, I. Nonaka, and I. Nishino. 2006. Emerin-lacking mice show minimal motor and cardiac dysfunctions with nuclear-associated vacuoles. *Am J Pathol*. 168:907-917.

- Page, S.L., and R.S. Hawley. 2004. The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 20:525-558.
- Phair, R.D., and T. Misteli. 2000. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*. 404:604-609.
- Pekovic, V., I. Gibbs-Seymour, E. Markiewicz, F. Alzoghbi, A.M. Benham, R. Edwards, M. Wenhert, T. von Zglinicki, and C.J. Hutchison. 2011. Conserved cysteine residues in the mammalian lamin A tail are essential for cellular responses to ROS generation. *Aging Cell*. 10:1067-1079.
- Pekovic, V., J. Harborth, J.L. Broers, F.C. Ramaekers, B. van Engelen, M. Lammens, T. von Zglinicki, R. Foisner, C. Hutchison, and E. Markiewicz. 2007. Nucleoplasmic LAP2alpha-lamin A complexes are required to maintain a proliferative state in human fibroblasts. *J Cell Biol*. 176:163-172.
- Pendas, A.M., Z. Zhou, J. Cadinanos, J.M. Freije, J. Wang, K. Hultenby, A. Astudillo, A. Wernerson, F. Rodriguez, K. Tryggvason, and C. Lopez-Otin. 2002. Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet*. 31:94-99.
- Peter, A., and R. Stick. 2012. Evolution of the lamin protein family: What introns can tell. *Nucleus*. 3.
- Pickersgill, H., B. Kalverda, E. de Wit, W. Talhout, M. Fornerod, and B. van Steensel. 2006. Characterization of the *Drosophila melanogaster* genome at the nuclear lamina. *Nat Genet*. 38:1005-1014.
- Pugh, G.E., P.J. Coates, E.B. Lane, Y. Raymond, and R.A. Quinlan. 1997. Distinct nuclear assembly pathways for lamins A and C lead to their increase during quiescence in Swiss 3T3 cells. *J Cell Sci*. 110 (Pt 19):2483-2493.
- Reiss, Y., J.L. Goldstein, M.C. Seabra, P.J. Casey, and M.S. Brown. 1990. Inhibition of purified p21ras farnesyl:protein transferase by Cys-AAX tetrapeptides. *Cell*. 62:81-88.
- Revenkova, E., and R. Jessberger. 2005. Keeping sister chromatids together: cohesins in meiosis. *Reproduction*. 130:783-790.
- Rober, R.A., H. Sauter, K. Weber, and M. Osborn. 1990. Cells of the cellular immune and hemopoietic system of the mouse lack lamins A/C: distinction versus other somatic cells. *J Cell Sci*. 95 (Pt 4):587-598.
- Rober, R.A., K. Weber, and M. Osborn. 1989. Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study. *Development*. 105:365-378.
- Rodriguez, J., F. Calvo, J.M. Gonzalez, B. Casar, V. Andres, and P. Crespo. 2010. ERK1/2 MAP kinases promote cell cycle entry by rapid, kinase-independent disruption of retinoblastoma-lamin A complexes. *J Cell Biol*. 191:967-979.
- Roig, I., B. Liebe, J. Egozcue, L. Cabero, M. Garcia, and H. Scherthan. 2004. Female-specific features of recombinational double-stranded DNA repair in relation to synapsis and telomere dynamics in human oocytes. *Chromosoma*. 113:22-33.
- Romanienko, P.J., and R.D. Camerini-Otero. 2000. The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell*. 6:975-987.
- Ross-Macdonald, P., and G.S. Roeder. 1994. Mutation of a meiosis-specific MutS homolog decreases crossing over but not mismatch correction. *Cell*. 79:1069-1080.
- Sakaki, M., H. Koike, N. Takahashi, N. Sasagawa, S. Tomioka, K. Arahata, and S. Ishiura. 2001. Interaction between emerlin and nuclear lamins. *J Biochem*. 129:321-327.
- Sasseville, A.M., and Y. Langelier. 1998. In vitro interaction of the carboxy-terminal domain of lamin A with actin. *FEBS Lett*. 425:485-489.
- Scherthan, H. 2001. A bouquet makes ends meet. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:621-627.
- Schirmer, E.C., and R. Foisner. 2007. Proteins that associate with lamins: many faces, many functions. *Exp Cell Res*. 313:2167-2179.
- Schirmer, E.C., and L. Gerace. 2005. The nuclear membrane proteome: extending the envelope. *Trends Biochem Sci*. 30:551-558.
- Schmitt, J. 2008, Dissertation.
- Schmitt, J., R. Benavente, D. Hodzic, C. Hoog, C.L. Stewart, and M. Alsheimer. 2007. Transmembrane protein Sun2 is involved in tethering mammalian meiotic telomeres to the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:7426-7431.
- Schramm, S., J. Fraune, R. Naumann, A. Hernandez-Hernandez, C. Hoog, H.J. Cooke, M. Alsheimer, and R. Benavente. 2011. A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination, and fertility. *PLoS Genet*. 7:e1002088.

- Schutz, W., M. Alsheimer, R. Ollinger, and R. Benavente. 2005a. Nuclear envelope remodeling during mouse spermiogenesis: postmeiotic expression and redistribution of germline lamin B3. *Exp Cell Res.* 307:285-291.
- Schutz, W., R. Benavente, and M. Alsheimer. 2005b. Dynamic properties of germ line-specific lamin B3: the role of the shortened rod domain. *Eur J Cell Biol.* 84:649-662.
- Senior, A., and L. Gerace. 1988. Integral membrane proteins specific to the inner nuclear membrane and associated with the nuclear lamina. *J Cell Biol.* 107:2029-2036.
- Shackleton, S., D.J. Lloyd, S.N. Jackson, R. Evans, M.F. Niermeijer, B.M. Singh, H. Schmidt, G. Brabant, S. Kumar, P.N. Durrington, S. Gregory, S. O'Rahilly, and R.C. Trembath. 2000. LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet.* 24:153-156.
- Shumaker, D.K., T. Dechat, A. Kohlmaier, S.A. Adam, M.R. Bozovsky, M.R. Erdos, M. Eriksson, A.E. Goldman, S. Khuon, F.S. Collins, T. Jenuwein, and R.D. Goldman. 2006. Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:8703-8708.
- Simon, D.N., and K.L. Wilson. 2011. The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic 'network of networks'. *Nat Rev Mol Cell Bio.* 12:695-708.
- Simon, D.N., M.S. Zastrow, and K.L. Wilson. 2010. Direct actin binding to A- and B-type lamin tails and actin filament bundling by the lamin A tail. *Nucleus.* 1:264-272.
- Smith, A., and R. Benavente. 1992. Identification of a short nuclear lamin protein selectively expressed during meiotic stages of rat spermatogenesis. *Differentiation.* 52:55-60.
- Speckman, R.A., A. Garg, F.H. Du, L. Bennett, R. Veile, E. Arioglu, S.I. Taylor, M. Lovett, and A.M. Bowcock. 2000. Mutational and haplotype analyses of families with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) reveal recurrent missense mutations in the globular C-terminal domain of lamin A/C. *Am J Hum Genet.* 66:1192-1198.
- Starr, D.A. 2009. A nuclear-envelope bridge positions nuclei and moves chromosomes. *J Cell Sci.* 122:577-586.
- Starr, D.A., and H.N. Fridolfsson. 2010. Interactions Between Nuclei and the Cytoskeleton Are Mediated by SUN-KASH Nuclear-Envelope Bridges. *Annu Rev Cell Dev Bi.* 26:421-444.
- Stewart, C., and B. Burke. 1987. Teratocarcinoma stem cells and early mouse embryos contain only a single major lamin polypeptide closely resembling lamin B. *Cell.* 51:383-392.
- Stierle, V., J. Couprie, C. Ostlund, I. Krimm, S. Zinn-Justin, P. Hossenlopp, H.J. Worman, J.C. Courvalin, and I. Duband-Goulet. 2003. The carboxyl-terminal region common to lamins A and C contains a DNA binding domain. *Biochemistry.* 42:4819-4828.
- Strelkov, S.V., H. Herrmann, N. Geisler, T. Wedig, R. Zimbelmann, U. Aebi, and P. Burkhard. 2002. Conserved segments 1A and 2B of the intermediate filament dimer: their atomic structures and role in filament assembly. *Embo J.* 21:1255-1266.
- Stuurman, N., S. Heins, and U. Aebi. 1998. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol.* 122:42-66.
- Stuurman, N., B. Sasse, and P.A. Fisher. 1996. Intermediate filament protein polymerization: molecular analysis of Drosophila nuclear lamin head-to-tail binding. *Journal of structural biology.* 117:1-15.
- Sullivan, T., D. Escalante-Alcalde, H. Bhatt, M. Anver, N. Bhat, K. Nagashima, C.L. Stewart, and B. Burke. 1999. Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol.* 147:913-920.
- Taniura, H., C. Glass, and L. Gerace. 1995. A Chromatin Binding-Site in the Tail Domain of Nuclear Lamins That Interacts with Core Histones. *Journal of Cell Biology.* 131:33-44.
- Tazir, M., H. Azzedine, S. Assami, P. Sindou, S. Nouioua, R. Zemmouri, T. Hamadouche, M. Chaouch, J. Feingold, J.M. Vallat, E. Leguern, and D. Grid. 2004. Phenotypic variability in autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease due to the R298C mutation in lamin A/C. *Brain.* 127:154-163.
- Todorova, A., B. Halliger-Keller, M.C. Walter, M.C. Dabauvalle, H. Lochmuller, and C.R. Muller. 2003. A synonymous codon change in the LMNA gene alters mRNA splicing and causes limb girdle muscular dystrophy type 1B. *J Med Genet.* 40:e115.
- Turner, J.M.A., S.K. Mahadevaiah, O. Fernandez-Capetillo, A. Nussenzweig, X.L. Xu, C.X. Deng, and P.S. Burgoyne. 2005. Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nature genetics.* 37:41-47.
- Tzur, Y.B., K.L. Wilson, and Y. Gruenbaum. 2006. SUN-domain proteins: 'Velcro' that links the nucleoskeleton to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:782-788.

- Vester, B., A. Smith, G. Krohne, and R. Benavente. 1993. Presence of a nuclear lamina in pachytene spermatocytes of the rat. *J Cell Sci.* 104 (Pt 2):557-563.
- von Moeller, F., T. Barendziak, K. Apte, M.W. Goldberg, and R. Stick. 2010. Molecular characterization of *Xenopus* lamin LIV reveals differences in the lamin composition of sperms in amphibians and mammals. *Nucleus.* 1:85-95.
- Warren, D.T., and C.M. Shanahan. 2011. Defective DNA-damage repair induced by nuclear lamina dysfunction is a key mediator of smooth muscle cell aging. *Biochem Soc Trans.* 39:1780-1785.
- Weber, K., U. Plessmann, and P. Traub. 1989. Maturation of nuclear lamin A involves a specific carboxy-terminal trimming, which removes the polyisoprenylation site from the precursor; implications for the structure of the nuclear lamina. *FEBS Lett.* 257:411-414.
- Wiedlocha, A., P.O. Falnes, A. Rapak, O. Klingenberg, R. Munoz, and S. Olsnes. 1995. Translocation of cytosol of exogenous, CAAX-tagged acidic fibroblast growth factor. *J Biol Chem.* 270:30680-30685.
- Wilson, K.L., and R. Foisner. 2010. Lamin-binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a000554.
- Winkel, K., M. Alsheimer, R. Ollinger, and R. Benavente. 2009. Protein SYCP2 provides a link between transverse filaments and lateral elements of mammalian synaptonemal complexes. *Chromosoma.* 118:259-267.
- Wolf, C.M., L. Wang, R. Alcalai, A. Pizard, P.G. Burgon, F. Ahmad, M. Sherwood, D.M. Branco, H. Wakimoto, G.I. Fishman, V. See, C.L. Stewart, D.A. Conner, C.I. Berul, C.E. Seidman, and J.G. Seidman. 2008. Lamin A/C haploinsufficiency causes dilated cardiomyopathy and apoptosis-triggered cardiac conduction system disease. *J Mol Cell Cardiol.* 44:293-303.
- Woods, L.M., C.A. Hodges, E. Baart, S.M. Baker, M. Liskay, and P.A. Hunt. 1999. Chromosomal influence on meiotic spindle assembly: Abnormal meiosis I in female *Mlh1* mutant mice. *Journal of Cell Biology.* 145:1395-1406.
- Worman, H.J., L.G. Fong, A. Muchir, and S.G. Young. 2009. Laminopathies and the long strange trip from basic cell biology to therapy. *J Clin Invest.* 119:1825-1836.
- Yang, S.H., M.O. Bergo, J.I. Toth, X. Qiao, Y. Hu, S. Sandoval, M. Meta, P. Bendale, M.H. Gelb, S.G. Young, and L.G. Fong. 2005. Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear blebbing in mouse fibroblasts with a targeted Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:10291-10296.
- Yang, S.H., S.Y. Chang, L.Y. Yin, Y.P. Tu, Y. Hu, Y. Yoshinaga, P.J. de Jong, L.G. Fong, and S.G. Young. 2011. An absence of both lamin B1 and lamin B2 in keratinocytes has no effect on cell proliferation or the development of skin and hair. *Hum Mol Genet.* 20:3537-3544.
- Yang, S.H., M. Meta, X. Qiao, D. Frost, J. Bauch, C. Coffinier, S. Majumdar, M.O. Bergo, S.G. Young, and L.G. Fong. 2006. A farnesyltransferase inhibitor improves disease phenotypes in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *J Clin Invest.* 116:2115-2121.
- Ye, Q.A., and H.J. Worman. 1995. Protein-Protein Interactions between Human Nuclear Lamins Expressed in Yeast. *Exp Cell Res.* 219:292-298.
- Young, S.G., L.G. Fong, and S. Michaelis. 2005. Prelamin A, *Zmpste24*, misshapen cell nuclei, and progeria--new evidence suggesting that protein farnesylation could be important for disease pathogenesis. *J Lipid Res.* 46:2531-2558.
- Yuan, L., J.G. Liu, J. Zhao, E. Brundell, B. Daneholt, and C. Hoog. 2000. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell.* 5:73-83.
- Yuan, L., J.G. Liu, M.R. Hoja, J. Wilbertz, K. Nordqvist, and C. Hoog. 2002. Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science.* 296:1115-1118.
- Zewe, M., T.H. Hoger, T. Fink, P. Lichter, G. Krohne, and W.W. Franke. 1991. Gene structure and chromosomal localization of the murine lamin B2 gene. *Eur J Cell Biol.* 56:342-350.
- Zickler, D., and N. Kleckner. 1998. The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu Rev Genet.* 32:619-697.

Abkürzungen

AE	Axialelement	MCS	Multiple Cloning Site
AS	Aminosäure	MEF	muriner embryonaler Fibroblast
cDNA	komplementäre DNA	MSUC	Meiotic silencing of unsynapsed chromatin
CE	Zentralelement	myr	Myristoylierungsmotiv
CLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop	NE	Kernhülle
CM	Carboxymethyl	NLS	Kernlokalisierungssignal
CMV	Cytomegalievirus	NPC	Kernporenkomplex
DCM	dilatative Cardiomyopathie	NTP	Nukleotidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid	ONM	äußere Kernmembran
DNA	Desoxyribonukleinsäure	P	Pellet
DNA-DSB	DNA-Doppelstrangbruch	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
dpf	Tage nach der Befruchtung	PEG	Polyethylenglykol
EDMD	Emery-Dreifuss Muskeldystrophie	pl	isoelektrischer Punkt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PNS	Perinucleäre Cisterne
EGFP	Enhanced green fluorescent protein	pp	post partum
ER	Endoplasmatisches Reticulum	Rb	Kaninchen
FCS	Fötale Kälberserum	ROI	Region of interest
FLIP	Fluorescence Loss in Photobleaching	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
FPLD	Familiäre partielle Lipodystrophie	rpm	Umdrehungen pro Minute
FRAP	Fluorescence Recovery after Photobleaching	RT	Raumtemperatur
GAPDH	Glycerinaldehyd-3- phosphatdehydrogenase	RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
Gp	Meerschwein	SC	Synaptonemalkomplex
GT	Gene trap	SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
HET	heterozygot	TF	Transversalfilament
HGPS	Hutchinson-Gilford-Progeria Syndrom	Tm	Schmelztemperatur
IF	Intermediär-Filament	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Ig-Fold	Immunglobulin-ähnlicher Bereich	TSS	Transformation and storage solution
INM	innere Kernmembran	ÜS	Überstand
KO	knock out	UTR	nicht translatierter Bereich
LE	Lateralelement	WB	Western blot
LMNA	Lamin A-Gen des Menschen	WT	Wildtyp
Lmna	Lamin A-Gen der Maus	X-Gal	Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D- Galactopyranosid
Lmnb1	Lamin B1-Gen der Maus		
Lmnb2	Lamin B2-Gen der Maus		
MAD	Mandibulo-akrale Dysplasie		

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich

- (1) die vorliegende Arbeit unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen selbstständig angefertigt habe,
- (2) diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt habe,
- (3) und noch keine akademischen Grade erworben habe, und früher auch noch nicht versucht habe, einen akademischen Grad zu erwerben.

Würzburg, den

.....

Daniel Jahn

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Daniel Jahn
 Anschrift: Wilhelm-Dahl-Str. 3, 97082 Würzburg
 Geburtsdatum: 14.09.1983 in Groß-Gerau
 Familienstand: ledig

Studium:

seit 02/2009 Promotion am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie der Universität Würzburg bei PD Dr. Manfred Alsheimer: „Die Bedeutung von verkürzten Spleißvarianten des Lamin A-Gens für die Meiose und für die Pathogenese von Laminopathien“

04/2008 – 01/2009 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie der Universität Würzburg bei Prof. Dr. Ricardo Benavente zum Thema: „Dynamische Eigenschaften des meiotischen Lamin C2 und sein Einfluss auf die Organisation der Kernhülle“ (Note: 1,0)

02/2008 Diplomprüfung an der Universität Würzburg in den Fächern:
 Hauptfach: Zell- und Entwicklungsbiologie (Note: 1,0)
 Nebenfächer: Biochemie (Note: 1,0), Genetik (Note: 1,0)

04/2007 – 06/2007 Fortgeschrittenen Praktikum und Spezialpraktikum am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie zum Thema: „Identifizierung von meiosespezifischen Bindungspartnern von Sun-Domänen Proteinen“

08/2006 – 09/2006 Fortgeschrittenen Praktikum am Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie des Universitätsklinikums Würzburg zum Thema: „P2Y12-Rezeptor vermitteltes Ca²⁺-Signaling in humanen Thrombocyten“

09/2005 Diplom-Vorprüfung (Gesamtnote: gut)

10/2003 Beginn des Diplomstudiengangs Biologie an der Universität Würzburg

Schulbildung:

bis 06/2003 Abitur am Wolfgang-Borchert-Gymnasium, Langenzenn (Note: 1,4)

Publikationen:

Jahn D, Schramm S, Benavente R and Alsheimer M (2010). Dynamic properties of meiosis-specific lamin C2 and its impact on nuclear envelope integrity. *Nucleus*, 1, 273–283.

Alsheimer M, Jahn D, Schramm S and Benavente R. Nuclear lamins in mammalian spermatogenesis. In: *Epigenetics and Human Reproduction*. Edited by S. Rousseaux and S. Khochbin. Book series: *Epigenetics and Human Health*. ISBN: 978-3-642-14772-2, p. 279-288. Springer Verlag, Heidelberg (2011).

Jahn D, Schramm S, Schnölzer M, Heilmann CJ, de Koster CG, Schütz W, Benavente R and Alsheimer M (2012). A truncated lamin A in the *Lmna*^{-/-} mouse line: Implications for the understanding of laminopathies. *Nucleus*, in press.

Link J*, Jahn D*, Schmitt J, Göb E, Baar J, Ortega S, Benavente R, and Alsheimer M. The nuclear lamina regulates chromosome dynamics and promotes efficient homologous recombination during mouse meiosis. *Manuscript submitted*. *equal contribution

Posterpräsentationen und Vorträge auf internationalen Kongressen:

Göb E, Schmitt J, Schramm S, Jahn D, Baar J, Ortega S, Benavente R, and Alsheimer M. Lamin C2, a short meiosis-specific A-type lamin isoform, is required for telomere driven meiotic chromosome pairing. “2nd Symposium of the research training group 1048: molecular basis of organ development in vertebrates”, in Würzburg, Deutschland, 5. Oktober 2009. **(Poster)**

Jahn D, Schramm S, Benavente R and Alsheimer M. Dynamic properties of meiosis-specific lamin C2 and its impact on nuclear envelope integrity. “1st Annual meeting: mechanisms of genome haploidization. Priority program of the German research foundation (DFG)“ in Heidelberg, Deutschland, 22.-24. März 2010. **(Poster)**

Jahn D, Link J, Göb E, Schmitt J, Ortega S, Benavente R, and Alsheimer M. Loss of lamin C2 causes defective meiotic chromosome dynamics and male infertility. “2st Annual meeting: mechanisms of genome haploidization. Priority program of the German research foundation (DFG)“ in Halle, Deutschland, 28.-30. März 2011. **(Vortrag und Poster)**

Jahn D, Link J, Göb E, Schmitt J, Ortega S, Benavente R, and Alsheimer M. Loss of the meiosis-specific A-type lamin C2 causes defective meiotic chromosome dynamics and male infertility. “Nuclear envelope disease and chromatin organization“ in Cambridge, UK, 13.-15. Juli 2011. **(Poster)**

Link J, Jahn D, Göb E, Schmitt J, Ortega S, Benavente R, and Alsheimer M. Loss of lamin C2 causes defective meiotic chromosome dynamics and male infertility. “Annual Conference of the German Genetics Society“ in Würzburg, Deutschland, 14.-16. September 2011. **(Poster)**

Danksagung

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich zunächst bei Herrn PD Dr. Manfred Alsheimer für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Vielen Dank, Manfred, für Deine engagierte Unterstützung, Deine hilfreichen Kommentare, und nicht zuletzt für Deine unkomplizierte und freundschaftliche Art. Ich konnte in den letzten Jahren sehr viel lernen und die Arbeit bei Dir im Labor hat mir darüber hinaus großen Spaß gemacht.

Vielen Dank an dieser Stelle auch an Herrn Prof. Clemens R. Müller-Reible, der sich freundlicherweise dazu bereit erklärt hat, das Zweitgutachten der Arbeit zu übernehmen.

Ein spezieller Dank für die große Unterstützung während meiner Arbeit geht auch an Herrn Prof. Ricardo Benavente. Dies betrifft natürlich zum einen den äußerst fundierten und hilfreichen wissenschaftlichen Input zu vielen verschiedenen Fragestellungen. Nicht zuletzt, Ricardo, aber auch vielen Dank für Deine (verbale und literarische) Unterstützung und Bestärkung des männlichen Geschlechts in einem Labor voller Frauen (sehr netter Frauen, natürlich!).

Ein ganz besonders großes Dankeschön geht selbstverständlich an alle ehemaligen und aktuellen Mitglieder des Labors Alsheimer/Benavente. Dies sind (alphabetisch) vor allem: Baary, Biene, meine Lieblings-Labor-Mutti Elisabeth, Eva, Hanna, Hannes, Jana, Karoline, Miriam, Moni und Silke. Ich erinnere mich sehr gerne an viele schöne und lustige Situationen mit Euch im Labor, aber auch an diverse Dinge, die wir außerhalb des Labors zusammen erlebt haben, wie z.B. Zelt-Ausflüge, Geburtstagsfeiern, Weinfeste, Kneipenbesuche oder andere Veranstaltungen mit guter Laune und dem ein oder anderen erfrischenden Getränk. Es hat wirklich sehr viel Spaß gemacht mit Euch zusammenzuarbeiten und ich würde es jederzeit sofort wieder tun! Vielen Dank an dieser Stelle auch an meinen Lieblings-„Wahlholländer“ Clemens J. Heilmann. Unsere Zusammenarbeit, lieber Clemens, hat mir ausgezeichnet gefallen, weil sie, wie ich fand, nicht nur äußerst produktiv war, sondern auch großen Spaß gemacht hat. Ich freue mich schon sehr auf Deinen nächsten Besuch! Nicht vergessen möchte ich natürlich auch die vielen weiteren, hier nicht namentlich genannten Mitarbeiter des Lehrstuhls für Zell- und Entwicklungsbiologie (die ja unter anderem auch maßgeblich zum Gelingen der oben erwähnten Freizeitgestaltungen beigetragen haben). Vielen Dank für Eure Kollegialität, Eure Hilfsbereitschaft, das wirklich sehr angenehme Arbeitsklima und Eure sympathische und humorvolle Art.

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken. Vielen Dank liebe Mama, lieber Papa, lieber Christoph, liebe Hanne und liebe Oma dafür, dass ihr immer für mich da seid! Ohne Eure finanzielle, organisatorische und moralische Unterstützung hätte ich sicherlich kein abgeschlossenes Studium, und hätte daher bestimmt auch niemals diese Arbeit angefertigt! Das letzte Dankschön gilt natürlich meinen zwei Prinzessinnen, Sabine und Pauline: Danke dafür, dass es Euch gibt. Ihr seid das Beste, was mir passieren konnte. Euch zu haben, macht mich glücklich und stolz! <3