

**Essentielle Rollen des LEM-Domänen Proteins MAN1
während der Organentwicklung von *Xenopus laevis*
und überlappende Funktionen von Emerin**



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

Vorgelegt von

Michael Reil
aus
Altdorf bei Nürnberg

Würzburg 2013

Eingereicht am

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Erstgutachter: Prof. Dr. Marie-Christine Dabauvalle

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

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

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

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

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

Würzburg, den.....

.....
Michael Reil

Für meine Liebsten:

Natalia

Leon & Louis

Danksagung

Zunächst einmal möchte jedem danken, der mich die vergangenen Jahre während meiner Promotion begleitet hat und an der Entstehung und Verwirklichung dieser Arbeit mitgewirkt hat.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Marie-Christine Dabauvalle, die mich als Doktorand wieder offenherzig in ihrer Arbeitsgruppe aufgenommen hat. Ebenso danke ich dir, dass ich dieses höchst interessante Thema weiter behandeln durfte und du meine Ideen und Vorschläge unterstützt hast. Auch bin ich dir sehr dankbar, dass du mir, auch über die Doktorarbeit hinaus, jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden bist.

Ich möchte auch Prof. Dr. Clemens Müller-Reible und Prof. Dr. Albrecht Müller dafür danken, dass sie sich bereit erklärt haben als Gutachter zu fungieren und mir bei unseren Treffen mit Ratschlägen und neuen Ideen geholfen haben.

Ich danke vor allem auch der Universität Bayern e.V. und der Bayerischen Elite-Förderung, die meine Promotion mit finanziellen Mitteln unterstützt haben.

Ich danke dem Graduiertenkolleg GK1048 sowie der GSLS, die mich durch zahlreiche Veranstaltungen und Fortbildungen Neues gelehrt und meinen Horizont erweitert haben.

Den Herren Dr. Martin Gareiß und Prof. Dr. Georg Krohne möchte ich für die Bereitstellung der, für diese Arbeit essentiellen, Antikörper danken. Ebenso danke ich Herrn Krohne sowie auch Prof. Dr. Christian Stigloher für anregende Diskussionen und Ratschläge zu meiner Dissertation.

Ich möchte allen Mitgliedern der AG Dabauvalle danken, die mich immer hilfsbereit unterstützt haben, die für ein perfektes Arbeitsklima gesorgt haben, sodass es jeden Morgen eine Freude war motiviert ins Labor zu kommen. Ganz besonders hervorheben möchte Daniela, die wesentlich dafür gesorgt hat, dass die histologische Schnitte dieser Arbeit verwirklicht werden konnten. Ich danke dir, dass du die Motivation beim Schneiden meiner unzähligen Proben nicht verloren und so manchen wichtigen Schnitt noch gerettet hast.

Ich danke auch den Mitgliedern der Abteilung für Elektronenmikroskopie und des Lehrstuhls für Zell- und Entwicklungsbiologie für die Hilfe bei so manchen Fragen und die freundschaftliche Atmosphäre, nicht nur im Labor.

Ich möchte auch allen Freunden, insbesondere Frank, meinen Geschwistern und Eltern danken, die mich während der Promotion immer aufgemuntert und meine Arbeit mit Interesse verfolgt haben. Auch wenn man sich leider immer viel zu selten trifft, bin ich dafür dankbar, dass ich stets auf eure Unterstützung zählen darf und ihr es immer wieder schafft mich aus der Arbeit rauszureißen, um zu zeigen, dass Arbeit nicht alles ist.

Zum Schluss möchte ich die mit Abstand wichtigste Person hervorheben und danken, meinem Schatz Natalia. Ich kann nicht in Worte fassen, welche Bedeutung du in meinem Leben einnimmst und wie sehr du mir bei der Verwirklichung der Dissertation zur Seite gestanden bist. Du allein hast es bereits geschafft mir die Kraft und den Halt zu geben, auch in schwierigen Situationen weiter zu machen. Dieser Halt ist schließlich durch Leon und Louis noch inniger geworden. Auch wenn ich euch aufgrund meiner Promotion nicht immer zur Seite stehen konnte, seid ihr stets hinter mir gestanden und habt mich weiter motiviert. Ihr seid die Stützpfeiler meines Lebens und dem Erfolg meiner Arbeit...

Sofern nicht ausdrücklich im Text vermerkt, wurden alle in dieser Arbeit enthaltenen Abbildung und Grafiken selbst entworfen und unterliegen somit dem Urheberrecht (Copyright). Das Urheberrecht liegt bei Michael Reil. Ohne ausdrückliche Einwilligung dürfen entsprechende Inhalte weder für wirtschaftliche oder private noch für akademische Zwecke weiterverwendet oder vervielfältigt werden. Die Einwilligung kann erfragt werden unter: michael_reil@gmx.net

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	13
1. Summary.....	16
2. Einleitung.....	18
2.1. Der Zellkern.....	18
2.2. Die Kernhülle.....	18
2.2.1. Die äußere Kernmembran.....	19
2.2.2. Die innere Kernmembran.....	21
2.2.2.1. Die Kernlamina.....	22
2.2.2.2. Integrale Membranproteine der inneren Kernmembran.....	25
2.2.2.3. LEM-Domänen Proteine.....	27
2.2.2.3.1. Lamina-assoziierte Polypeptide 2.....	29
2.2.2.3.2. Emerin.....	31
2.2.2.3.3. MAN1.....	34
2.3. Barrier-to-Autointegration Factor (BAF).....	37
2.4. Mutationen in Kernhüllproteinen.....	41
2.4.1. Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD).....	43
2.4.2. Buschke-Ollendorf-Syndrom, Osteopoikilose und Melorheostose.....	45
2.5. Modellorganismus <i>Xenopus laevis</i>.....	47
2.5.1. Embryonalentwicklung und Patterning.....	48
2.5.1.1. Befruchtung.....	49
2.5.1.2. Furchungsteilungen.....	49
2.5.1.3. Gastrulation.....	51
2.5.1.4. Neurulation.....	53
2.5.1.5. Organogenese.....	53
2.6. Zielsetzung der Arbeit.....	54
3. Material.....	55
3.1. Biologisches Material.....	55
3.1.1. Versuchstiere.....	55
3.1.2. Bakterienstämme.....	55
3.1.3. Zelllinien.....	55
3.1.4. Antikörper.....	56
3.1.4.1. Primärantikörper.....	56
3.1.4.2. Sekundärantikörper.....	57
3.2. Molekularbiologisches Material.....	57
3.2.1. Plasmidvektoren.....	57
3.2.1.1. pQC-6xHis.....	57
3.2.1.2. pCMV-Sport6.....	58
3.2.1.3. pCS111.....	59
3.2.2. EST-Klone.....	59
3.2.3. Oligonukleotide.....	60
3.2.3.1. Primer.....	60
3.2.3.2. Morpholino-Oligonukleotide.....	60
3.2.4. Enzyme.....	60
3.2.5. Größenstandards.....	60

3.2.6. Reaktions-Kits.....	61
3.3. Zellkultur-Material.....	61
3.4. Chemikalien.....	61
3.5. Sonstiges Material.....	61
3.6. Geräte.....	62
4. Methoden.....	64
4.1. Mikrobiologische Methoden.....	64
4.1.1. Flüssigkultur von Bakterien.....	64
4.1.2. Glycerinkultur.....	64
4.1.3. Bestimmung der Bakteriendichte einer Flüssigkultur durch Photometrische Messung.....	65
4.1.4. Herstellung von LB-Agar-Selektionsplatten.....	65
4.1.5. Herstellung chemisch kompetenter Baktierienzellen.....	65
4.1.6. Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien.....	66
4.2. Molekularbiologische Methoden.....	66
4.2.1. Isolierung von RNA aus Embryonen mittel RNeasy Mini-Kit.....	66
4.2.2. Plasmid-DNA Isolierung via NucleoSpin® Plasmid-Miniprep-Kit.....	67
4.2.3. Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren.....	68
4.2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	68
4.2.5. RT-PCR.....	71
4.2.6. Primer und Primer-Design.....	72
4.2.7. Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese.....	73
4.2.8. Nukleinsäure-Isolierung aus Agarose-Gelen.....	75
4.2.9. Fällung von Nukleinsäuren.....	75
4.2.10. Sequenzierung von Nukleinsäuren.....	76
4.2.11. Klonierung von DNA-Fragmenten.....	76
4.2.11.1. Gewinnung des Inserts und des Plasmid-Vektors.....	76
4.2.11.2. Dephosphorylierung des Vektors.....	76
4.2.11.3. Ligation.....	77
4.2.11.4. Test der erhaltenen Klone.....	77
4.2.12. Restriktionsverdau.....	78
4.2.13. Herstellung von in vitro synthetisierter mRNA.....	78
4.2.13.1. Linearisierung der Plasmid-DNA.....	79
4.2.13.2. Synthese von „capped“-mRNA.....	79
4.2.13.3. Polyadenylierung der mRNA.....	80

4.2.13.4. Aufreinigung der mRNA.....	81
4.2.13.5. RNA-Gelelektrophorese.....	81
4.2.14. Design von Morpholino-Oligonukleotiden.....	81
4.3. Proteinbiochemische Methoden.....	83
4.3.1. Herstellung und Aufreinigung von Fusionsproteinen.....	83
4.3.1.1. Expression von C-terminalen Hexa-Histidin-Fusionsproteinen in Bakterienzellen.....	84
4.3.1.2. Aufreinigung von Hexa-Histidin-Fusionsproteinen unter denaturierenden Bedingungen.....	84
4.3.1.2.1. Säulenvorbereitung.....	85
4.3.1.2.2. Aufschluss der Bakterien.....	85
4.3.1.2.3. Aufreinigung über die Ni-NTA-Agarose-Säule.....	85
4.3.1.2.4. Aufbereitung der Säulenmatrix.....	86
4.3.2. Renaturierung von Proteinen durch Dialyse.....	86
4.3.3. Bestimmung der Harnstoffkonzentration in wässrigen Proteinproben.....	87
4.3.4. Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	87
4.3.4.1. Bestimmung durch Extinktionsmessung (E_{280}).....	87
4.3.4.2. Bestimmung durch eine BSA-Konzentrationsreihe.....	88
4.3.5. Affinitätsaufreinigung eines Antikörperserums.....	88
4.3.6. Extraktion von Proteinen aus Zellen von Embryonen und Organen.....	90
4.3.6.1. Mit SDS-Probenpuffer / Acetonfällung.....	90
4.3.7. Fällung von Proteinen.....	91
4.3.8. Isolierung von Zellkernen aus Kulturzellen.....	91
4.3.9. Isolierung von Kernhüllen aus Kulturzellen.....	92
4.3.10. Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Thomas und Kornberg (1975).....	93
4.3.11. Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	96
4.3.11.1 Erste Dimension der isoelektischen Fokussierung (IEF).....	97
4.3.11.1.1. Silikonisierung der Glasröhrchen.....	97
4.3.11.1.2. Rundgele.....	98
4.3.11.1.3. Vorelektrophorese.....	98
4.3.11.1.4. Vorbereitung der Proben.....	99
4.3.11.1.5. Bestimmung des pH-Gradienten der Rundgele.....	99
4.3.11.2. Zweite Dimension: SDS-PAGE.....	99
4.3.12. Western-Blot (Semidry-Elektroblot).....	100
4.3.12.1. Semidry-Verfahren nach Towbin.....	100

4.3.12.2. Spezifischer Proteinnachweis mit Antikörpern.....	101
4.3.12.3. Detektion über Peroxidase-konjugierte Antikörper und ECL.....	102
4.3.12.4. Entfernen gebundener Antikörper (Strippen).....	102
4.3.13. Färbung von SDS-Gelen.....	103
4.3.13.1. Modifizierte Coomassie-Färbung.....	103
4.3.13.2. PageBlue™-Färbung.....	103
4.3.13.3. Trocknen von Polyacrylamidgelen.....	103
4.4. Zellbiologische Methoden.....	104
4.4.1. Zellkultur.....	104
4.4.1.1. Kultivierung von Zellen.....	104
4.4.1.2. Passagieren adhärenter Zellen.....	104
4.4.1.3. Einfrieren von Zellen.....	105
4.4.1.4. Auftauen von Zellen.....	105
4.4.2. Fixierung von Zellen und Geweben.....	106
4.4.2.1. Fixierung mit Formaldehyd-Triton.....	106
4.4.2.2. Fixierung mit Aceton-Methanol.....	106
4.4.3. Indirekte Immunfluoreszenzlokalisierung in Zellen und Geweben.....	107
4.4.3.1. Indirekte Immunfluoreszenzlokalisierung bei Kulturzellen.....	107
4.4.3.2. Indirekte Immunfluoreszenzlokalisierung bei in-vitro Kernen.....	108
4.4.4. Proximity-Ligation-Assay.....	109
4.4.4.1. Vorbereitung der Antikörper (PLA-Probes)/PLA-Probemaker.....	110
4.4.4.2. Detektion von Protein-Protein-Interaktionen.....	111
4.5. Zellfreies System aus <i>Xenopus laevis</i> Eiern.....	113
4.5.1. Herstellung eines aktivierten Eiextraktes (Interphase-Extrakt).....	113
4.5.2. Isolierung von Spermienchromatin aus <i>Xenopus laevis</i> -Hoden.....	115
4.5.3. Bildung von In-vitro Kernen.....	116
4.5.4. EM-Einbettung von in vitro Kernen.....	116
4.5.4.1. Fixierung der Proben.....	117
4.5.4.2. Entwässerung und Einbettung der Proben.....	118
4.5.4.3. Anfertigung von Ultradünnschnitten.....	119
4.5.4.4. Kontrastierung der Ultradünnschnitte.....	119
4.6. Arbeiten mit <i>Xenopus laevis</i>.....	120
4.6.1. Stimulierung der Eireifung.....	120
4.6.2. Isolierung von <i>Xenopus</i> -Organen.....	120
4.6.2.1. Isolierung von Ovar.....	120
4.6.2.2. Isolierung von Hoden.....	121

4.6.3. In-vitro-Fertilisation.....	121
4.6.4. Embryonenhaltung.....	122
4.7. Arbeiten mit <i>Xenopus laevis</i> Embryonen.....	122
4.7.1. EM-Einbettung von <i>Xenopus</i> -Embryonen.....	122
4.7.1.1. Fixierung der Proben.....	123
4.7.1.2. Entwässerung und Einbettung der Proben.....	123
4.7.2. Herstellung von Quetschpräparaten.....	124
4.7.3. Whole-mount Immunlokalisation (WMIL).....	124
4.7.3.1. Fixierung / Bleichen der Embryonen.....	125
4.7.3.2. Antikörperinkubation.....	125
4.7.3.3. Nachweis der gebundenen Antikörper durch Peroxidase-Reaktion.....	126
4.7.4. Whole-mount Immunfluoreszenzlokalisation (WMIF) „Heating Methode“.....	126
4.7.4.1. Fixierung der Embryonen.....	127
4.7.4.2. Rehydrierung und Vorbereitung der Embryonen für die Antikörperinkubation.....	127
4.7.4.3. Antikörperinkubation.....	128
4.7.5. Bildgebung mittels NMR-Spektroskopie.....	128
4.7.6. Mikroinjektion in befruchtete <i>Xenopus</i> -Eier.....	132
4.7.6.1. Herstellung der Mikroinjektionsnadel.....	132
4.7.6.2. Mikroinjektion in befruchtete Eizellen.....	133
4.8. Mikroskopie.....	134
4.8.1. Mikroskopie von Fluoreszenzpräparaten.....	134
4.8.2. Mikroskopie von PLA-Präparaten.....	134
4.8.3. Mikroskopie und statistische Auswertung von <i>Xenopus</i> Embryonen.....	134
4.8.4. Dreidimensionale Darstellung embryonaler Herzen.....	135
<u>5. Ergebnisse.....</u>	<u>136</u>
5.1. Die Rolle von XMAN1 während der Kernhüllbildung.....	136
5.2. Die Rolle von XMAN1 während der Organentwicklung.....	138
5.2.1. Knockdown von XMAN1 mittels Mikroinjektion spezifischer Oligonukleotid-Morpholinos.....	139
5.2.2. Der Knockdown von XMAN1 führt zu einer Störung der Augenentwicklung.....	141

5.2.3. Der Knockdown von XMAN1 führt zu einer anormalen Muskelbildung.....	145
5.2.4. Der Knockdown von XMAN1 führt zu Herz-spezifischen Fehlern.....	148
5.2.5. Untersuchung der veränderten Herzanatomie.....	151
5.2.5.1. Bildgebung mittels NMR-Spektroskopie.....	151
5.2.5.2. Bildgebung mittels Immunfluoreszenzlokalisierung.....	153
5.2.6. Veränderte Expression gewebe-spezifischer Gene als Resultat des XMAN1-Knockdowns.....	155
5.3. Überlappende Funktionen von XMAN1 und Xemerin während der Organentwicklung.....	158
5.3.1. Ektopische Expression von Xemerin mittels Mikroinjektion von Xemerin-mRNA.....	158
5.3.2. Die ektopische Expression von Xemerin führt zu einem Rescue der Augen-Entwicklung.....	161
5.3.3. Xemerin ermöglicht eine partielle Bildung der Somiten.....	162
5.3.4. Die ektopische Expression von Xemerin führt zu einem Rescue der Herz-Entwicklung.....	164
5.4. Protein-Protein-Interaktionen von Kernhüllproteinen in somatischen Zellen.....	166
5.4.1. Interaktionen von XMAN1 und Xemerin in Interphasekernen.....	166
5.4.2. Interaktionen zwischen XLAP2 und XlaminA/B1 während der Mitose.....	172
5.4.3. Interaktionen zwischen XMAN1 und Xemerin während der Mitose.....	173
5.5. Die Rolle des Barrier-to-Autointegration Factor (BAF) während der Organentwicklung.....	175
5.5.1. Knockdown von BAF mittels Mikroinjektion spezifischer Oligonukleotid-Morpholinos.....	175
5.5.2. Der Knockdown von BAF führt zu einem Ausbleiben der Augenentwicklung.....	177
5.5.3. Der Knockdown von BAF verhindert die korrekte Bildung von Somiten.....	178
5.5.4. Analysen der Herzanatomie und -physiologie nach Knockdown von BAF.....	181

6. Diskussion.....	184
6.1. Funktionen von MAN1 in <i>Xenopus laevis</i>.....	185
6.1.1. Die Rolle von XMAN1 während der Kernhüllbildung.....	185
6.1.2. XMAN1 ist ein essentieller Faktor während der Organentwicklung.....	187
6.2. XMAN1 und Xemerin besitzen überlappende Funktionen während der Organentwicklung.....	192
6.2.1. Interaktionen von XMAN1 und Xemerin.....	192
6.2.2. Xemerin kompensiert den Verlust von XMAN1 während der Organentwicklung.....	193
6.3. Beteiligung von XMAN1 und Xemerin an der Regulation der Genexpression.....	194
6.4. BAF besitzt essentielle Rollen während der Organentwicklung.....	197
6.5. Abschließende Anmerkungen und Ausblick.....	199
7. Literaturverzeichnis.....	202
8. Anhang.....	213
8.1. Spezielle Programme und Programmparameter.....	213
8.1.1. Proximity-Ligation-Assay (PLA) / 3D-Rekonstruktion embryonaler Herzen.....	213
8.1.2. Molekularbiologische Methoden.....	216
8.1.3. NMR-Spektroskopie / Amira.....	216
8.1.4. Statistische Methoden.....	216
8.2. Abkürzungen.....	218
8.3. Einheiten.....	221
8.4. Primer.....	222
8.5. Inhaltsverzeichnis DVD.....	224
Lebenslauf.....	225
Publikationsliste.....	227

1. Zusammenfassung

Mutationen in Genen, die für Kernhüllproteine codieren sind mit einer stetig zunehmenden Anzahl menschlicher Erkrankungen verbunden, die als Envelopathien bezeichnet werden. Erstaunlicherweise betrifft die Pathologie dieser Krankheiten spezifische Gewebe und Organe, obwohl entsprechende Proteine meist ubiquitär exprimiert werden. So führen beispielsweise Defekte in Emerin, einem Protein der inneren Kernhülle, zur X-chromosomalen Emery-Dreifuss Muskeldystrophie (EDMD). Diese Krankheit ist durch Muskelschwäche oder –schwund gekennzeichnet. Defekte im Kernhüllprotein MAN1 sind dagegen mit Krankheiten verbunden, die Knochen- und Hautgewebe betreffen. Interessanterweise besitzen beide Proteine eine evolutionär hoch konservierte Domäne, die sog. LEM-Domäne. LEM-Domänen Proteine können mit der Kernlamina interagieren, ebenso mit dem sog. Barrier-to-Autointegration Factor (BAF) sowie mit zahlreichen Transkriptionsfaktoren. Dennoch ist die funktionelle Rolle der LEM-Domänen Proteine bis dato nicht vollständig aufgeklärt. In der vorliegenden Studie sollten daher die Funktionen von MAN1 und Emerin während der Frühentwicklung von *Xenopus laevis* untersucht werden.

Vorangehende Untersuchungen zeigten, dass Mikroinjektionen von XMAN1-Antikörpern in Zwei-Zell-Stadien befruchteter Eizellen zu einem Arrest der Zellteilung in der injizierten Blastomere führten. Da dabei eine Störung der Kernhüllbildung spekuliert wurde, sollte durch Antikörper-vermittelter Inhibition von XMAN1 die Bildung von in vitro Kernen im *Xenopus* Eiextrakt untersucht werden. Dabei wurden Kerne beobachtet, die dekondensiertes Chromatin zeigten, bei denen jedoch eine Fusion von Membranvesikeln zu einer durchgehenden Kernhülle nicht stattgefunden hatte.

Frühere Charakterisierungen von MAN1 und Emerin zeigten unterschiedliche Expressionsmuster während der Entwicklung von *X. laevis*. Da XMAN1 ubiquitär exprimiert und Xemerin jedoch erstmals ab Stadium 41 nachweisbar ist, war es mittels Mikroinjektion von Xemerin möglich zu zeigen, dass es in der Lage ist den Arrest der Zellteilung zu verhindern. Es wurde daher die These aufgestellt, dass MAN1 und Emerin während der Frühentwicklung von *Xenopus* überlappende Funktionen besitzen. Um diese These zu prüfen, wurde zunächst unter Verwendung des *Proximity Ligation Assays* untersucht, ob beide Proteine miteinander interagieren können. Mit Hilfe dieser Methode konnte gezeigt werden, dass Interaktionen beider Proteine innerhalb der Kernhülle lokalisieren. Die Interaktionen blieben während der Mitose bestehen und waren erst wieder zum Ende der Mitose in der Kernhülle nachweisbar. Diese Resultate deuten daher darauf hin, dass XMAN1/Xemerin-Interaktionen während der

Kernbildung entbehrlich sind, jedoch vermutlich für funktionelle Prozesse in Interphasekernen benötigt werden.

Mittels Mikroinjektion spezifischer Morpholinos sollten daher die Effekte eines Knockdowns von XMAN1 während der Embryonalentwicklung untersucht werden. Es konnte folglich demonstriert werden, dass XMAN1 für die Bildung der Augen und der Skelett- sowie Herzmuskulatur essentiell ist. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Retina der Knockdown-Embryonen schwerwiegende Defekte während der Photorezeptorbildung und der Retinaorganisation aufwies. Darüber hinaus erschienen die Knockdown Embryonen weniger pigmentiert, was auf eine fehlerhafte Auswanderung der Neuralleistenzellen hindeutet. Zusätzlich zeigten Zellen der Skelettmuskulatur eine signifikant reduzierte Anzahl von Sarkomeren. Diese Sarkomere waren zudem deutlich desorganisiert. Ein dritter Phänotyp, welcher das Herz betraf, war durch eine veränderte Herzmorphologie und Herzrhythmusstörungen charakterisiert. Die Muskelzellen dieser Herzen besaßen ebenfalls desorganisierte Sarkomere. Zudem wiesen die Zellkerne starke Deformierungen auf, die durch Ausstülpungen der Kernhülle gekennzeichnet waren. Interessanterweise wurde dieser Phänotyp bereits anhand von EDMD-Patienten beobachtet. Da die Phänotypen während der Embryonalentwicklung in Korrelation mit der Pathologie bekannter Envelopathien stehen, kann spekuliert werden, dass ein Verlust von MAN1 möglicherweise auch zu genetischen Krankheiten im Menschen führt, welche die Skelett- und Herzmuskeln oder die Retina betreffen.

Zahlreiche Envelopathien gehen mit einer Fehlregulation der Genexpression einher. Es wurde daher vermutet, dass veränderte Expressionsniveaus von XMAN1 die Expression gewebespezifischer Gene beeinträchtigen. In der Tat zeigten RT-PCR-Analysen, dass der Knockdown von XMAN1 eine anormale Expression der Augen-spezifischen Gene *pax6*, *crx* und *otx2* sowie der Muskel- und Herz-spezifischen Gene *myocardin* und *myoD* verursacht. Dies deutet darauf hin, dass MAN1 unmittelbar an der Genregulation involviert ist.

Um die Hypothese der überlappenden / gemeinsamen Funktionen von XMAN1 und Xemerin zu überprüfen, wurden Rescue-Experimente durchgeführt. Dabei zeigten Mikroinjektionen von Xemerin-mRNA, dass die ektopische Expression von Xemerin den Verlust von XMAN1 kompensieren kann. Dies führte zu einer weitgehend wildtypischen Entwicklung der injizierten Embryonen. Xemerin besitzt vermutlich Funktionen, welche mit denen von XMAN1 überlappen und daher eine normale Entwicklung der Organe während der frühen Embryogenese gewährleisten. Diese Studie zeigt erstmals die Möglichkeit auf, dass

LEM-Domänen Proteine an Signalwegen beteiligt sind, welche für die Organentwicklung in *Xenopus* essentiell sind.

Dennoch stellte sich die Frage durch welche Mechanismen diese Signalwege ablaufen oder wie überlappende Funktionen von MAN1 und Emerin ermöglicht werden. Auf der Suche nach gemeinsamen Interaktionspartnern, erschien daher BAF als potentieller Kandidat. In der Tat führte der Knockdown von BAF selbst zu weitgehend identischen Phänotypen, welche bereits in XMAN1-Knockdown Embryonen beobachtet wurden. Diese Ergebnisse geben daher einen Hinweis darauf, dass BAF den essentieller Faktor während der Organentwicklung darstellt und in spezifischen Signalwegen downstream von XMAN1 agiert.

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass die LEM-Domänen Proteine XMAN1 und Xemerin grundlegende Funktionen während der Bildung zahlreicher Organe und Gewebe besitzen. Zudem konnten erste Hinweise darauf erbracht werden, dass BAF für Signalwege während der Organentwicklung unentbehrlich ist. Es lässt sich daher folgern, dass MAN1, wie auch Emerin, im Bereich der Kernhülle regulatorische Komplexe ausbildet. Dies geschieht entweder direkt zusammen mit spezifischen Transkriptionsfaktoren oder indirekt mittels BAF und ermöglicht so die korrekte Expression gewebespezifischer Gene. Interessanterweise sind alle hier berichteten Phänotypen mit der Pathologie bekannter Krankheiten im Menschen vergleichbar. Daher zeigt diese Arbeit auch, dass *Xenopus laevis* einen exzellenten Modellorganismus darstellt um den Einfluss der LEM-Domänen Proteine in Envelopathien zu untersuchen.

1. Summary

Mutations in genes encoding for nuclear envelope proteins are linked to an increasing number of human diseases, called envelopopathies. Interestingly, pathology of these diseases affects specific tissues and organs, even though the related proteins are expressed ubiquitous. Defects in the inner nuclear membrane protein emerin for example, are leading to X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD), characterized by muscle weakness or wasting. Conversely, defects in the nuclear envelope protein MAN1 are linked to bone and skin disorders. Both proteins share a highly conserved domain, called LEM-domain. LEM proteins are known to interact with the nuclear lamina, the so called Barrier-to-Autointegration Factor (BAF) and several transcription factors. Nevertheless, knowledge of the functional roles of LEM proteins is still unclear. For this reason, this study aimed to investigate the roles of MAN1 and emerin during early *Xenopus laevis* development and nuclear envelope assembly.

Prior investigations showed, that microinjections of XMAN1-antibodies into one blastomere of stage-2-embryos, resulted in an arrest of cell division. Because these results implied an impaired assembly of the nuclear envelope, we decided to analyse the antibody-mediated inhibition of XMAN1 during formation of in vitro nuclei in *Xenopus* egg extracts. Nuclei thereby showed decondensed chromatin, but attached membrane vesicles failed to fuse to a continuous nuclear envelope. Former characterization of MAN1 and emerin showed different expression patterns during early development of *X. laevis*. Since XMAN1 is expressed ubiquitous and Xemerin is first detectable at stage 41, microinjections of Xemerin revealed that it is able to prevent the described arrest during cell division. This gave reason to speculate that MAN1 and emerin share overlapping functions during early development of *Xenopus laevis*. In order to prove this hypothesis, we used the so called *Proximity ligation assay* to investigate interactions between XMAN1 and Xemerin. This method revealed, that interactions of both proteins are located at the nuclear envelope. Interactions persisted throughout mitosis, but were detected once again at the nuclear envelope at the end of mitosis. These observations suppose that XMAN1/Xemerin-interactions are dispensable for formation of nuclei but might be important for functional processes in nuclei during interphase.

By microinjecting specific morpholinos, we investigated the effects of XMAN1-knockdown during embryogenesis. This revealed that XMAN1 is essential for the formation of eyes, skeletal and cardiac muscle tissues. In addition, we were able to show for the first time, that retinal ultrastructure of the XMAN1 morphants revealed severe defects during photoreceptor development and retina organization. Knockdown embryos appeared also less pigmented indicating an impaired emigration of neural crest cells. Adding to this, skeletal

muscle cells showed reduced amounts of sarcomeres, which were severely disorganized. A third phenotype related to the heart, was characterized by aberrant heart morphologies and cardiac arrhythmias. Muscle cells of these hearts also showed disordered sarcomeres. Most interestingly, nuclei of these cells exhibited deformations, visualized by several lobulations of the nuclear envelope. This phenotype has also been reported in patients suffering from EDMD. Because reported phenotypes of the XMAN1 morphants are correlated to the pathology of known envelopathies, it is tempting to speculate that loss of MAN1 might also lead to human diseases affecting the retina and striated muscles.

Since several envelopathies are linked to misregulations in gene expression, we postulated, that altered levels of XMAN1 are leading to defects during expression of tissue-specific genes. In fact, RT-PCR analysis showed, that knockdown of XMAN1 caused an altered expression of eye-specific genes *pax6*, *crx* and *otx2* as well as of muscle- and heart-specific genes *myocardin* and *moyD*. This indicates that MAN1 is directly involved in regulation of gene expression.

Rescue-experiments, performed by ectopic expression of Xemerin within XMAN1 morphants, aimed to investigate overlapping roles of these proteins during development. Xemerin was subsequently able to compensate the loss of XMAN1, thereby allowing the normal development of injected embryos. This indicates that Xemerin has functions similar to XMAN1, enabling proper development of organs during early embryogenesis. Thereby this study demonstrates for the first time that LEM proteins might be involved in signaling, essential for organ development in *Xenopus laevis*.

Nevertheless, mechanisms underlying these signal pathways or explaining overlapping functions between MAN1 and emerin remained unclear. Searching for a binding partner of both proteins, BAF appeared to be a potential candidate. Indeed, knockdown of BAF alone lead to same defects during embryogenesis as seen for XMAN1, indicating that BAF appears to be the essential factor during signaling in organ development.

This study demonstrates for the first time, that LEM proteins MAN1 and emerin share fundamental roles during formation of several tissues and organs. Because knockdown of BAF is leading to phenotypes, as seen from XMAN1 knockdown, it can be presumed that MAN1, like emerin, may form regulatory complexes at the NE. This happens either directly together with specific transcription factors or indirectly via BAF, enabling correct expression of tissue-specific genes. Interestingly the reported phenotypes could be correlated to the pathology of popular human diseases. This study therefore demonstrates that *Xenopus* represent an excellent model organism for studying the impact of nuclear envelope proteins on envelopathies.

2. Einleitung

2.1. Der Zellkern

Als wichtigstes Organell der eukaryotischen Zelle, nimmt der Zellkern etwa 10% des Zellvolumens ein. Somit stellt er das größte Organell der Zelle dar und beinhaltet den größten Teiler der, in Chromatin verpackten DNA. Strukturell ist der Zellkern in unterschiedliche Suborganellen bzw. -bereiche eingeteilt. Hierzu zählen **(i)** die Kernhülle, **(ii)** das Chromatin, welches in transkriptionell inaktives Hetero- und aktives Euchromatin untergliedert wird, **(iii)** dem Nukleolus, welcher als Syntheseort der ribosomalen RNA sowie der Bildung der Ribosomenuntereinheiten dient und **(iv)** diversen kleineren Partikeln wie den sog. *Nuclear Speckles* (SC35-Domänen), den *Cajal-* (CB) und *Histone Locus Bodies* (HLB), den *promyelocytic leukaemia (PML) nuclear bodies* und den Proteasomen, welche an verschiedenen nukleären Prozessen beteiligt sind (zur Übersicht siehe jeweils Spector und Lamond, 2011; Nizami et al., 2011; Lallemand-Breitenbach und de Thé, 2011). Dazu zählen Vorgänge wie die Transkription / das Spleißen, der Zusammenbau der Spleißmaschinerie, die Prozessierung der Histon-prä-mRNAs und die Proteinfaltung, -modifizierung oder -degradation).

Folglich wird eine Genregulation ermöglicht, indem die Transkription und die Translation, welche im Zytoplasma stattfindet, räumlich und zeitlich voneinander getrennt sind. Das dadurch entstehende Kompartiment ist durch die Kernhülle vom Zytoplasma getrennt. Diese wird durch die äußere und die innere Kernmembran gebildet, wobei letztere mit der sog. Kernlamina assoziiert ist. Beide Kernmembranen fusionieren zu Poren, die mit den Kernporenkomplexe (NPCs) besetzt sind und dadurch den aktiven und passiven nukleozytoplasmatischen Transport von Makromolekülen gewährleisten (Gruenbaum et al., 2005).

2.2. Die Kernhülle

Als besonderes Kennzeichen der eukaryotischen Zelle, stellt die Kernhülle eine Doppelmembran dar, welche das Genom vom Zytoplasma abgrenzt (siehe Abb. 1-1). Sie setzt sich dabei aus strukturell und biochemisch unterschiedlichen Komponenten zusammen: **(i)** Die äußere Kernmembran, welche dem Zytoplasma zugewandt ist, **(ii)** die innere Kernmembran, welche an das Nukleoplasma angrenzt und mit der **(iii)** Kernlamina, einem Netzwerk aus Intermediärfilamenten, verbunden ist, und **(iv)** die Kernporenkomplexe, welche den nukleozytoplasmatischen Transport von Proteinen und RNP-Partikeln regulieren.

Beide Kernmembranen bestehen aus einer Phospholipid-Doppelschicht, in die unterschiedliche integrale Membranproteine eingelagert sind. Kleinere Partikel und Proteine, mit einer molekularen Masse von max. 40 kDa, können die Membranen mittels Diffusion über die Kernporenkomplexe passieren, größere Partikel/Proteine müssen jedoch aktiv über die Kernporenkomplexe importiert bzw. exportiert werden (Rout et al., 2000).

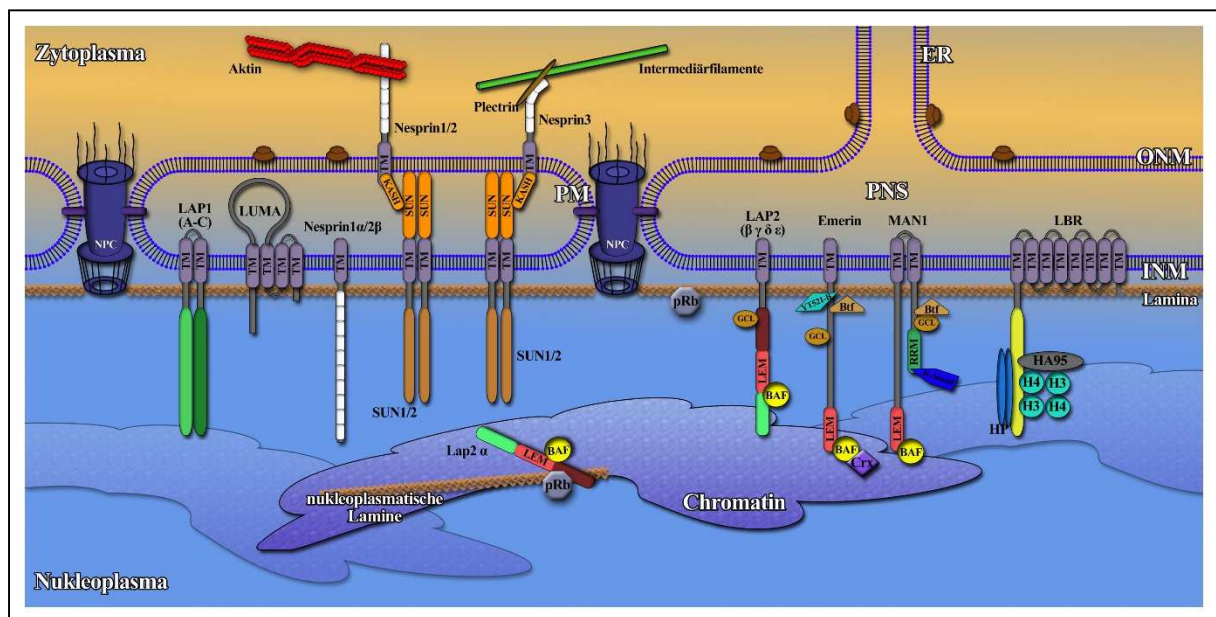


Abbildung 1-1: Schematische Übersicht der Kernhüll-Organisation. Die äußere Kernmembran (ONM) geht direkt in das endoplasmatische Retikulum (ER) über und ist mit zahlreichen Ribosomen besetzt (braun). Ebenso steht der perinukleäre Raum (PNS) mit dem Lumen des ER in Verbindung. Über die Porenmembran (PM), an der auch die Kernporenkomplexe (NPC) lokalisiert sind, ist die innere Kernmembran (INM) mit der ONM verbunden. Eine Assoziation der Kernlamina erfolgt durch zahlreiche integrale Membranproteine der INM. Die Darstellung zeigt eine Auswahl der Kernhüllproteine, wie die Lamina-assoziierten Polypeptide 1 und 2 (LAP1 und LAP2), LUMA, die Nesprine 1-3, SUN1/2, Emerin, MAN1, und den Lamin B Rezeptor (LBR). Die Nesprine können auch in der ONM lokalisieren und sind im PNS mittels der KASH-Domäne mit SUN-Proteinen der INM verbunden. Über die Nesprine der ONM kann eine Verbindung zum Zytoskelett (Aktin, Intermediärfilamente) hergestellt werden. Die Assoziation des Chromatins mit den INM-Proteinen und somit auch mit der Kernhülle wird über Faktoren wie den Barrier-to-Autointegration Factor (BAF), dem Heterochromatinprotein 1 (HP) oder über die Histone H3/H4 ermöglicht. Weitere Proteine, welche mit der Lamina oder mit INM-Proteinen in Verbindung stehen können sind das Retinoblastoma Protein (pRb), der Spleißfaktor YT521-B, der Bcl2-assoziierte Transkriptionsfaktor (Btf), *germ cell-less* (GCL), der Homöobox Transkriptionsfaktor Crx (cone-rod-homeobox), R-Smad (Rezeptor-vermitteltes Smad) und HA95 (Homolog zu AKAP95 [A-Kinase Ankerprotein 95]). TM: Transmembrandomäne. (zur Übersicht der Proteine, siehe auch Foisner, 2001; Roux und Burke, 2007).

2.2.1. Die äußere Kernmembran

Die äußere Kernmembran (ONM; outer nuclear membrane) ist dem Zytosplasma zugewandt und steht dadurch mit dem Zytoskelett der Zelle in Kontakt. Darüber hinaus setzt sie sich in den Membranen des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER) fort und ist mit zahlreichen Ribosomen besetzt. Daher ist die äußere Kernmembran in ihrer grundlegenden

Zusammensetzung mit der ER-Membran identisch. Dennoch besitzt die ONM spezifische integrale Proteine, die für die Positionierung und Wanderung des Zellkerns innerhalb der Zelle bedeutsam sind.

Beispielsweise ist das A-Kinase-Ankerprotein AKAP149 sowohl ein Protein des ER als auch der äußeren Kernmembran. Durch Assoziation mit der Protein-Phosphatase 1 (PP1), nimmt es eine wichtige Rolle während dem Aufbau der Lamina nach der Mitose ein (Foisner, 2001). Die äußere und innere Kernmembran werden durch einen ~50 nm breiten Raum getrennt, den sog. perinukleären Raum (PNS, perinuclear space). Wie auch die ONM, geht der PNS direkt in das Lumen des ER über, wodurch integrale Membranproteine zu ihrem Bestimmungsort diffundieren können.

Weitere ONM-spezifische Proteine bei Vertebraten sind die Nesprine, welche eine konservierte KASH- (**K**larsicht, **A**NC-1 und **S**yne-**H**omologie) Domäne mit einer Länge von etwa 60 Aminosäuren und einer Transmembrandomäne besitzen (siehe. Abb. 1-2; Roux und Burke, 2007). Durch alternatives Spleißen der *Nesprin1*- und *Nesprin2*-Gene, können verschiedene Nesprin-Isoformen gebildet werden (Zhang et al., 2001). Mittels der aminoterminalen Aktin-Bindungsdomäne in Nesprin 1 und 2, wird eine Assoziation zum Aktinfilamentnetzwerk des Zytoplasmas ermöglicht (vgl. Abb. 1-2). Zudem besitzt Nesprin 3 eine Plectrin-Bindungsstelle, über die mittels dem Linker-Protein Plectrin eine Verbindung zum Intermediärfilamentnetzwerk des Zytoplasmas hergestellt werden kann (siehe Abb. 1-2; Wilhelmssen et al., 2005).

Die Besonderheit der KASH-Domäne der Nesprine liegt in ihrer Position im PNS, wodurch eine Bindung an integrale Membranproteine der inneren Kernhülle vermittelt wird. Zu diesen Proteinen zählen vor allem diejenigen der SUN-Domänen-Familie (SUN = *Sad1p and UNC-84 homology*), die bei Säugern bisher vier Mitglieder beinhaltet (zur Übersicht siehe Starr, 2009). Zwei dieser Proteine, Sun1 und Sun2, binden die Nesprine im PNS und können zudem mit ihrer nukleoplasmatischen Domäne mit A-Typ-Laminen interagieren (Crisp et al., 2006; Stewart et al., 2007). SUN-KASH-Proteinkomplexe haben eine besondere Bedeutung bei der Anheftung des Zentrosoms an die Kernperipherie sowie dem Alignment, der Paarung und der Rekombination homologer Chromosomen während der Meiose (Fridkin et al., 2009). Mittels Interaktionen zwischen den SUN- und KASH-Domänen Proteinen (Nesprine) wird zudem eine Verbindung zwischen dem Nukleoskelett der Kernhülle und dem Zytoskelett hergestellt. Diese strukturelle Verbindung wird als LINC-Komplex bezeichnet (*linker of nucleoskeleton and cytoskeleton*; Crisp et al., 2006; siehe Abb. 1-2).

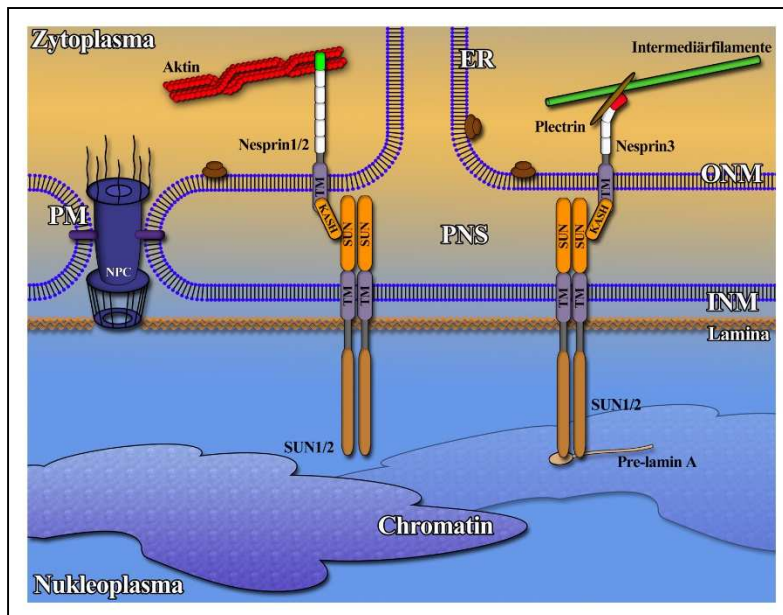


Abbildung 1-2: Der LINC-Komplex verbindet das Nukleoskelett mit dem Zytoskelett. SUN-Dimere der INM bilden zusammen mit den Nesprinen der ONM den sog. LINC-Komplex (*linker of nucleoskeleton and cytoskeleton*). Die Bindung findet dabei im perinukleären Raum (PNS) über die KASH-Domäne statt. Über die Aktinbindungsdomäne der Nesprine 1 und 2 (grün) wird eine Verbindung zum Aktinnetzwerk des Zytoplasmas hergestellt. Nesprin 3 besitzt eine Plectrinbindungsstelle (rot) und ist somit mittels Plectrin mit den Intermediärfilamenten assoziiert. Die nukleoplasmatische

Domäne von SUN1 ist zudem in der Lage an farnesyliertes Pre-lamin A zu binden. Obwohl die SUN-Domänen Proteine drei Transmembrandomänen (TM) besitzen, wurde deren Darstellung hier aus Gründen der Übersichtlichkeit auf eine TM begrenzt. Erläuterung weiterer Abkürzungen siehe Abb. 1-1.

Da der LINC-Komplex als strukturelle nukleozytoplasmatische „Brücke“ angesehen werden kann, kommen ihm auch entsprechende Funktionen zu. Es wird beispielsweise vermutet, dass mit Hilfe des LINC-Komplexes die beiden Kernmembranen voneinander getrennt werden und in einem konstanten Abstand von ~50 nm zueinander gehalten werden. (Voeltz et al., 2007). Zu den weiteren Funktionen zählen die Positionierung des gesamten Zellkerns innerhalb der Zelle, die Bewegung Kernhüll-assoziiierter Chromosomen entlang der Kernhülle, sowie einer Signalgebung ausgehend von der Plasmamembran bis hin zur Kernhülle mittels Mechanotransduktion und dem damit verbundenen Potential der Genregulation (Crisp et al., 2006). Zu erwähnen ist auch, dass zwei der KASH-Domänen Proteine (nesprin-1 α und nesprin-2 β) integrale Proteine der INM sind und direkt an Lamine und Emerin binden können (Mislow et al., 2002a; Mislow et al., 2002b; Zhang et al., 2005; siehe auch Abb. 1-1).

2.2.2. Die innere Kernmembran

Die innere Kernmembran (INM; *inner nuclear membrane*), welche wie die ONM aus einer Phospholipid-Doppelschicht besteht, ist dem Nukleoplasma zugewandt. An der inneren Kernmembran bilden Intermediärfilamente die flächig ausgebreitete nukleäre Lamina (Kernlamina). Durch spezifische integrale Membranproteine ist die INM mit der Lamina und dem Chromatin verbunden und unterscheidet sich in ihrer Zusammensetzung deutlich von der ONM (siehe Abb. 1-1).

2.2.2.1. Die Kernlamina

Die Kernlamina ist in unmittelbarer Nähe zur inneren Kernmembran lokalisiert und steht dort über die integralen Membranproteine mit der Kernhülle in Verbindung. Sie ist jedoch auch mit dem peripheren Heterochromatin und den Kernporenkomplexen assoziiert (Aaronson und Blobel, 1975). Die Lamina setzt sich aus verschiedenen Lamin-Typen, den sogenannten Laminen zusammen, welche untereinander ein 10-20 nm dickes Flechtwerk bilden.

Die Lamine stellen eine besondere Klasse der Intermediärfilamente dar, die für gewöhnlich im Zytoplasma lokalisiert sind. Die Lamine werden in zwei Klassen eingeteilt, die A- und B-Typ Lamine. Säugerzellen besitzen drei Lamingene (*LMNA*, *LMNB1*, *LMNB2*), die für sieben alternativ gespleißte Isoformen codieren. Das *LMNA*-Gen codiert die A-Typ-Lamine wie Lamin A, AΔ10, C und C2 (Furukawa und Hotta, 1993; Machiels et al., 1996). Zu den B-Typ Laminen zählen das, durch *LMNB1* codierte Lamin B1 und die Lamine B2 und B3, welche durch das *LMNB2*-Gen codiert werden (Biamonti et al., 1992; Furukawa und Hotta, 1993). Obwohl die Lamine vorwiegend im Bereich der Kernhülle lokalisiert sind, konnten auch Lamine im Nukleoplasma nachgewiesen werden. Dabei scheinen sie an Prozessen wie der DNA-Replikation und der Transkription beteiligt zu sein (Dechat et al., 2008b). Wohingegen nukleoplasmatische A-Typ Lamine dynamisch erscheinen, zeigen die B-Typ Lamine ein eher statisches Verhalten, vergleichbar der B-Typ Lamine der Kernlamina (Shimi et al., 2008).

Lamine wurden in allen bisher untersuchten Metazoen nachgewiesen, wobei die verschiedenen Lamin-Typen unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen. Beispielsweise werden die B-Typ Lamine in jeder Vertebratenzelle exprimiert, wohingegen die A-Typ Lamine nur in differenzierten Zellen synthetisiert werden (Rober et al., 1989; Machiels et al., 1996). Die Expression der Lamine C2 und B3 findet dagegen in keimbahn-spezifischen Zellen statt (Furukawa und Hotta, 1993; Alsheimer et al., 1999).

In *Drosophila* wurden bislang nur zwei Lamine nachgewiesen: das B-Typ Lamin Dm0 sowie Lamin C, das ein A-Typ Lamin repräsentiert. Das *C.elegans*-Genom enthält nur ein einziges B-Typ Lamin-Gen *lmn-1*, welches das Protein Ce-lamin codiert (Bossie und Sanders, 1993; Riemer et al., 1995; Smith et al., 1987).

In *Xenopus laevis* Oozyten existieren drei maternale B-Typ Lamine: Lamin LI, Lamin LII und Lamin LIII (Melcer et al., 2007). Den überwiegenden Anteil nimmt dabei das Lamin LIII ein, das jedoch in Schwanzknospenstadien nicht mehr nachweisbar ist. Ebenso besitzt *Xenopus* A-Typ Lamine, die erst ab dem Embryonalstadium 28 nachgewiesen werden konnten (Gareiss et al., 2005) und in fast allen somatischen Zellen exprimiert wird (Wolin et

al., 1987). Schließlich findet man zusätzlich das Keimbahn-spezifische Lamin LIV (Benavente und Krohne, 1985).

Ein Laminmolekül lässt sich in drei strukturelle und funktionelle Bereiche einteilen (siehe Abb. 1-3): (i) eine N-terminale Kopfregion, (ii) eine α -helikale Stabdomäne mit tandemartig wiederholten Abfolgen und (iii) eine globuläre carboxyterminale Schwanzdomäne. Letztere enthält im Gegensatz zu den zytoplasmatischen Intermediärfilamenten ein sog. Kernlokalisierungssignal (NLS; *nuclear localization signal*). Dieses ist nach Translation der Lamine für deren Import in den Kern erforderlich. Ebenso beinhaltet die Schwanzdomäne das sogenannte CxxM-Motiv (Cystein – zwei x-beliebige Aminosäuren – Methionin), wodurch die Membranaffinität der Lamine an die INM über Farnesylierung gesteuert wird (Beck et al., 1990).

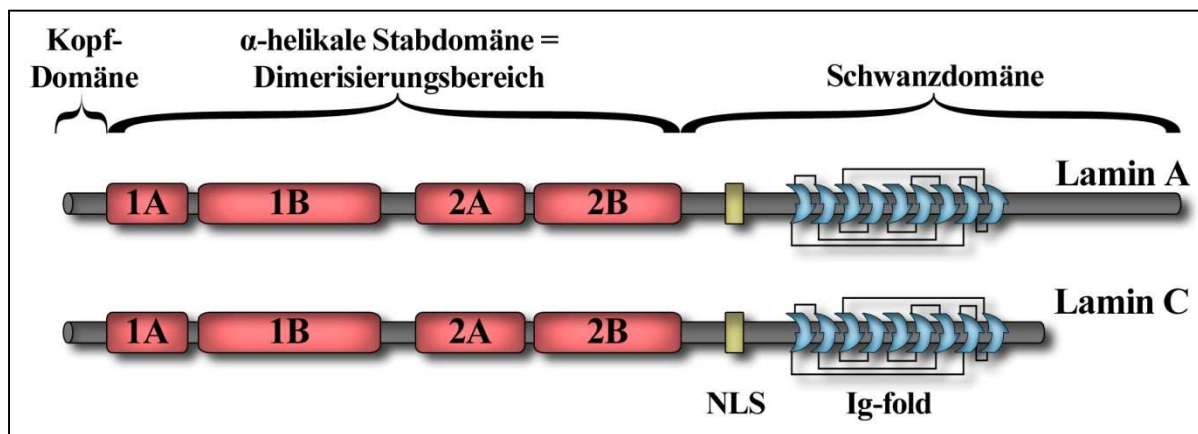


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Proteine Lamin A und C. NLS: Kernlokalisierungssignal (adaptiert nach Dechat et al., 2010).

Die α -helikale Stabdomäne setzt sich aus vier Helices (1A, 1B, 2A, 2B; siehe Abb. 1-3) zusammen und ist für die Polymerisierung der Laminfilamente von Bedeutung. Sie wird beidseitig von je einer Phosphorylierungsstelle, den sog. SP/TP-Motiven (Serin, Prolin / Threonin, Prolin) flankiert, welche während der Mitose durch die p34^{cdc2}-Kinase phosphoryliert werden.

Die Lamine A, B1 und B2 werden zunächst als sog. Pre-Lamine exprimiert und unterlaufen anschließend zahlreiche posttranslationale Modifikationen (Rusinol und Sinensky, 2006; Davies et al., 2009). Dabei wird das Cystein des CxxM-Motivs farnesyliert und das xxM-Motiv mittels einer CxxM-Prenyl-Protease (z.B. Zmpste24) abgespalten (Farnsworth et al., 1990). Schließlich kommt es zur Carboxymethylierung des C-Terminus (Winter-Vann und Casey, 2005). B-Typ Lamine bleiben hingegen während ihrer Prozessierung farnesyliert/carboxymethyliert.

Bei den A-Typ Laminen werden zudem 15 weitere Aminosäuren vom C-Terminus des farnesylierten/carboxymethylierten Pre-Lamin A abgespalten, wodurch das reife Lamin A gebildet wird (Corrigan et al., 2005). Da Lamin C um 74 Aminosäuren verkürzt ist und somit kein CxxM-Motiv besitzt, unterliegt es keiner weiteren Modifikation.

Nach der Translation und Modifikation bilden zwei Laminmoleküle Homodimere, welche sich anschließend longitudinal durch „Kopf-zu-Schwanz“-Anordnung aneinander lagern. Schließlich wird aus dieser Anordnung ein filamentöses Netzwerk gebildet (Stuurman et al., 1998). Neuere Studien weisen darauf hin, dass A- und B-Typ Lamine separate Netzwerke innerhalb der Kernlamina ausbilden (Shimi et al., 2008). Dennoch besitzen diese Netzwerke die Fähigkeit miteinander zu interagieren oder zu einem gewissen Grad zu überlappen.

Die Kernlamina übernimmt zahlreiche unterschiedliche Aufgaben, wie beispielsweise die Formgebung und Aufrechterhaltung der Stabilität des Zellkerns. Jedoch sind die Lamine auch an Prozessen des Kernhülllauf- und -abbaus während der Mitose beteiligt (Dabauvalle und Scheer, 1991; Gruenbaum et al., 2003; Lopez-Soler et al., 2001; Newport et al., 1990). Durch Phosphorylierung der Lamine während der Mitose depolymerisieren diese und die Kernlamina wird destabilisiert. Dadurch zerfällt die Kernhülle zum Ende der Prophase in Form von Membranvesikeln (Moir et al., 2000). Während der Mitose bilden die Lamine A und C lösliche Oligomere im Zytoplasma, da das CxxM-Motiv während ihrer Reifung proteolytisch abgespalten wurde. Die B-Typ Lamine behalten dieses CxxM-Motiv auch während der Reifung und bleiben daher in der Mitose an Membranen assoziiert. Ebenso sind die Lamine für eine korrekte postmitotische Reorganisation der Kernporenkomplexe essentiell, da beispielsweise das Nukleoporin Nup153 nur in Anwesenheit einer intakten Lamina in die NPCs integriert werden kann (Smythe et al., 2000). Auch an der Organisation des Chromatins ist die Lamina maßgeblich beteiligt. So findet man kondensiertes Chromatin, wie das Heterochromatin oder Zentromer- und Telomerbereiche von Chromosomen und auch das inaktive X-Chromosom weiblicher Säugerzellen in unmittelbarer Nähe zur Lamina (Marshall und Sedat, 1999; Belmont et al., 1986). Lamine sind auch an der DNA-Replikation und -Reparatur, an Differenzierungsprozessen und der Kernwanderung / -positionierung beteiligt. In Transkriptionsprozessen nehmen die Lamine eine ebenso wichtige Position ein, da sie mit Transkriptionsfaktoren interagieren und eine intakte Lamina unerlässlich für die Transkription durch die RNA-Polymerase II ist. Jedoch scheint die Lamina auf die RNA-Polymerasen I und III selbst keinen Einfluss zu haben (Spann et al., 2002).

Die Lamine A und C fungieren bei Vertebratenzellen als Substrate der Caspase 6. Durch einen Caspase-vermittelten Abbau der Lamina kommt es zum Ablösen des Chromatins von der Kernhülle und der Fragmentierung der DNA-Moleküle im Zellkern (Ruchaud et al., 2002). Daher tragen die Lamine ebenso beim programmierten Zelltod – der Apoptose – eine wichtige Rolle.

Besonders deutlich zeigt sich die Wichtigkeit der Lamine und ihren assoziierten Proteinen anhand genetischer Krankheiten, den sogenannten Envelopathien / Laminopathien, die zu schwerwiegenden Symptomen führen (siehe 2.4.).

2.2.2.2. Integrale Membranproteine der inneren Kernmembran

Bis heute wurden annähernd 80 integrale Membranproteine der inneren Kernhülle identifiziert, wobei davon jedoch nur ein kleiner Teil vollständig charakterisiert wurde (siehe Tabelle 1-1; Burke und Stewart, 2002; Lusk et al., 2007; Schirmer und Gerace, 2005). Da der Großteil der INM-Proteine in der Lage ist direkt oder indirekt an Lamine zu binden, wurden sie in die Gruppe der sog. Lamina-assoziierten-Polypeptide aufgenommen. Diese besitzen eine oder mehrere Transmembrandomänen, worüber sie in die INM integriert sind. Daher kommt den INM-Proteinen eine zunehmende Bedeutung zu, da eine fehlerhafte Funktion oder Lokalisation mit einer stetig steigenden Anzahl an menschlichen Erkrankungen verbunden ist (Vlcek und Foisner, 2007; Worman und Bonne 2007; Neilan 2009). Obwohl die meisten Lamina-assoziierten Polypeptide an Lamine binden können, wurden viele der putativen Mitglieder bisher jedoch nicht auf eine Interaktion mit Laminen untersucht oder sind bisher noch nicht charakterisiert (Schirmer et al., 2005; Schirmer und Foisner, 2007). Die Gruppe der Lamina-assoziierten Polypeptide muss darüber hinaus in ihrer Definition erweitert werden, da es Mitglieder gibt, welche ausschließlich im Nukleoplasma vorliegen und an nukleoplasmatische Lamine binden. Hierzu zählen die Protein LAP2 α , Narf und Lco1 (Barton und Worman, 1999a, 1999b; Naetar et al., 2008).

Einige der integralen Membranproteine weisen Gemeinsamkeiten auf. So besitzen beispielsweise das Lamina-assoziierte-Polypeptid 2 (LAP2), MAN1, Emerin, LEM2 und Otefin bei *Drosophila* die sogenannte LEM-Domäne (Padan et al., 1990; Brachner et al., 2005; Lin et al., 2000). Diese Domäne ragt in den nukleoplasmatischen Raum und vermittelt die Bindung an das Chromatin.

Protein	Besondere Domäne	Interaktionspartner	Organismus	Referenz / Erstbeschreibung
LAP1 A-C	1 TM	Lamine A, B1 und C	Vertebraten	Senior und Gerace, 1988 Foisner und Gerace, 1993 Martin et al., 1995
LAP2 α	LEM-Domäne "LEM-like"-Domäne	Nukleoplasmatische A-Typ Lamine, BAF, Rb	Vertebraten	Naetar et al., 2008
LAP2 β - ϵ	LEM-Domäne 1 TM	Lamine A, B1, C; BAF, GCL, HA95, DNA, HDAC3	Vertebraten	Foisner und Gerace, 1993 Harris et al., 1994 Berger et al., 1996
Emerin	LEM-Domäne 1 TM	BAF, GCL, Btf, MAN1, Lamine A und B, Aktin, LUMA, Nesprin-1 α , Nesprin-2 β , Tubulin, Kern-Myosin 1c, YT521-B, β -catenin, Lmo7	Vertebraten <i>Drosophila</i> <i>C.elegans</i>	Bione et al., 1994
MAN1	LEM-Domäne 2 TM RRM	BAF, GCL, Btf, Emerin, Lamine A und B1, R-Smads, Sad1, RNA, DNA	Vertebraten <i>Drosophila</i> <i>C.elegans</i> <i>S.pombe</i>	Lin et al., 2000 Wagner et al., 2006 Hiraoka et al., 2011
LEM2 / NET25	LEM-Domäne 2 TM	Lamine A/C, Emerin, MAN1, BAF, DNA, Sad1	Vertebraten <i>Drosophila</i> <i>C.elegans</i> <i>S.pombe</i>	Brachner et al., 2005 Hiraoka et al., 2011
ANKLE-1 / LEM3	LEM-Domäne (C-Term.) 3 <i>Ankyrin repeats</i> GIY-YIG-Endonuklease- Domäne	BAF, DNA	Metazoen	Brachner et al., 2012
Ankle-2 / LEM4	LEM-Domäne, 2 <i>Ankyrin repeats</i> 1 TM (N-Term.)	?	Mensch Maus	Lee und Wilson, 2004
Nemp1	BAF-Bindungs-Stelle 5 TM	BAF	<i>X.laevis</i>	Mamada et al., 2009
LBR	8 TM	Lamin B, HP1, HA95, Histone (H3/H4-Tetramer), DNA	Vertebraten <i>Drosophila</i> Seeigel	Worman et al., 1988 Schild-Prüfert et al., 2006
LUMA / TMEM43	4 TM	A- und B-Typ Lamine, Emerin	Vertebraten <i>Drosophila</i>	Dreger et al., 2001 Bengtsson und Otto, 2008
Nurim	6 TM	?	Vertebraten <i>Drosophila</i>	Rolls et al., 1999
RFBP	ATP-Bindungs-Domäne 8-9 TM	RUSH	Säuger	Mansharamani et al., 2001
Lco1	?	Lamin A, C und B1	Vertebraten	Vlcek et al., 2004
Samp1 NET5 Ima1	?	Sad1	Mensch Ratte <i>S. pombe</i>	Buch et al., 2009 King et al., 2008 Hiraoka et al., 2011

Nesprin-1 (α , β) (Syne-1)	<i>Spectrin repeats</i> TM / KASH-Domäne	Lamin A, Emerin, Unc-84, Aktin, SUN1/2	Vertebraten <i>Drosophila</i> <i>C.elegans</i>	Apel et al., 2000 Mislow et al., 2002 Zhang et al., 2001
Nesprin-2 (α - γ) (Syne-2)	<i>Spectrin repeats</i> TM / KASH-Domäne	Lamin A, Emerin, Unc-84, Aktin, SUN1/2	Vertebraten <i>Drosophila</i> <i>C.elegans</i>	Padmakumar et al., 2004 Zhang et al., 2002 Zhen et al., 2002
Nesprin-3 (α , β)	<i>Spectrin repeats</i> TM / KASH-Domäne	SUN 1/2, Plectrin, Intermediärfilamente	Säuger	Wilhelmsen et al., 2005
SUN1 / Matefin	SUN-Domäne 3 TM	A- und B-Typ Lamine, Pre-Lamin A, Nesprine	Vertebraten <i>C.elegans</i>	Fridkin et al., 2004 Tzur et al., 2006
SUN2	SUN-Domäne 3 TM	Lamin A/C	Vertebraten	Schirmer et al., 2007 Hodzic et al., 2004

Tabelle 1-1: Übersicht bisher charakterisierter integraler Membranproteine der inneren Kernmembran. BAF: Barrier-to-Autointegration Factor, Btf: Bcl2-verwandter Transkriptionsfaktor, GCL: *germ cell-less*, HA95: Homolog zu AKAP95 (A-Kinase Ankerprotein 95), HP1: Heterochromatinprotein 1, HDAC3: Histone-Deacetylase 3, LAP: Lamina-assoziiertes Polypeptid, LBR: Lamin-B-Rezeptor, Lmo7: Lim-only 7, Lco1: Lamin companion 1, Rb: Retinoblastomprotein, RFBP: *ring finger binding protein*, RRM: *RNA-recognition motif*, R-Smads: Rezeptor-vermittelte Smads, SUN: Sad1/Unc-84-Homologie-Domäne.

Durch ihre Interaktion mit der Lamina, dem Chromatin sowie Komponenten der äußeren Kernmembran (siehe 2.2.1.), tragen die integralen Membranproteine der INM entscheidend zur Struktur und Organisation der Kernhülle, der Kernmatrix sowie des Chromatins bei. Ebenso beteiligen sie sich, wie in 2.2.1. beschrieben, an der Lokalisation und Mobilität des Zellkerns im Zytoplasma. Darüber hinaus kommt ihnen eine zunehmend besondere Bedeutung bei der Regulation der Genexpression zu und wie im Fall von LBR, LAP2, Emerin und MAN1 auch bei der Signaltransduktion (Gruenbaum et al., 2005).

2.2.2.3. LEM-Domänen Proteine

Die LEM-Domäne ist eine konservierte Domäne aus etwa 40 Aminosäuren und wurde erstmals von H. J. Worman beschrieben (Lin et al., 2000). Ihren Namen verdankt sie den Proteinen LAP2, Emerin und MAN1, in denen sie erstmals identifiziert wurde (Lin et al., 2000). Homologe Proteine konnten zudem in *Drosophila* anhand von Otefin und Bocksbeutel nachgewiesen werden (Ashery-Padan et al., 1997; Wagner et al., 2004). Die räumliche Struktur der LEM-Domäne besteht aus zwei parallelen α -Helices, welche durch eine Schleife miteinander verbunden sind (Cai et al., 2001; Laguri et al., 2001). Das Protein LAP2 α besitzt zudem noch eine sog. „LEM-like“-Domäne, die jedoch einen identischen Aufbau wie die LEM-Domäne aufweist.

Die LEM-Domäne besitzt eine große Affinität zu einem kleinen Chromatin-bindenden Protein, dem sog. Barrier-to-Autointegration Factor (BAF) (Bengtsson und Wilson, 2004; Cai et al., 2001; Mansharamani und Wilson, 2005). Durch die Bindung von BAF an Histon- und

Linker-Proteine, ist es sehr wahrscheinlich, dass BAF an der Organisation des Chromatins beteiligt ist. Zudem zeigten Berichte, dass BAF auch in der Lage ist an spezifische Transkriptionsfaktoren zu binden und so die Expression gewebespezifischer Gene reguliert (Wang et al., 2002).

Der Großteil der LEM-Domänen Proteine besitzt mindestens eine Transmembrandomäne. Darüber hinaus besitzen sie die Fähigkeit an A- und/oder B-Typ Lamine zu binden, wobei die LEM-Domäne selbst dabei nicht mitwirkt. Die Affinität zur Lamina wird zudem für die korrekte Lokalisation der LEM-Domänen Proteine in der Kernhülle benötigt (Sullivan et al., 1999; Vaughan et al., 2001; Brachner et al., 2005). Obwohl man bisher der Ansicht war, dass LEM-Domänen-Proteine membrangebunden vorliegen, wurden zunehmend mehr Mitglieder dieser Familie identifiziert, die vorwiegend im Nukleoplasma lokalisiert sind. Hierzu zählen LAP2 α sowie das kürzlich charakterisierte LEM3/Ankle-1 (Brachner et al., 2012). Letzteres ist zudem in der Lage zwischen dem Nukleo- und Zytoplasma zu wechseln.

Die Funktionen der LEM-Domänen-Proteine reichen von der Aufrechterhaltung der Integrität der Kernhülle mittels zahlreicher Interaktionen weiterer Kernhüllproteine und der Lamina, über die Anheftung des Chromatins an die Kernhülle bis hin zu Beteiligungen an spezifischen Signalwegen (vgl. Tabelle 1-1). Dabei weisen vor allem die Proteine LEM2, LEM3 und LEM4 spezifische Besonderheiten auf, die vom klassischen Modell der LEM-Domänen-Proteine zum Teil stark abweichen. LEM2 (auch als NET25 bezeichnet) ist beispielsweise eine Homolog zu MAN1, besitzt jedoch dessen C-Terminus nicht (Lee und Wilson, 2004). Es wird vermutet, dass LEM2 an der Anheftung des Heterochromatins und der Anreicherung von Telomeren an der Kernhülle beteiligt ist. Ebenso konnte für dieses Protein eine Involvierung während der Muskelentwicklung in *C. elegans* aufgezeigt werden (Barkan et al., 2012). Charakterisierungen von Ankle-1 (=LEM3) haben ergeben, dass es zahlreiche Besonderheiten aufweist, welche bei anderen Mitgliedern der Familie der LEM-Domänen-Proteine bis dato nicht nachgewiesen werden konnte (Lee et al., 2000; Brachner et al., 2012).

(i) Die Expression von Ankle-1 ist auf hämatopoetische Gewebe und Zellen beschränkt. **(ii)** Statt einer N-Terminalen Lokalisation der LEM-Domäne, befindet sich diese in Ankle-1 carboxyterminal gelegen. **(iii)** Ankle-1 besitzt sog. *Ankyrin repeats*. Diese Motive bestehen aus 33 Aminosäuren und dienen vermutlich Protein-Protein-Interaktionen. **(iv)** Ankle-1 liegt nicht membrangebunden vor und wurde sowohl im Nukleoplasma als auch im Zytoplasma detektiert. **(v)** Ankle-1 besitzt als einziges LEM-Domänen Protein eine enzymatische GIY-YIG-Endonuklease-Domäne, mit deren Hilfe DNA in vitro und in vivo gespalten werden

kann. Ebenso besitzt das Protein Ankle-2 (=LEM4) 2 *Ankyrin repeats*. Es wurde daher spekuliert, dass Ankle-1 und Ankle-2 aufgrund dieser Motive einen bis dato unbekanntes, gemeinsamen Partner besitzen (Lee und Wilson, 2004). In *C. elegans* konnte zudem gezeigt werden, dass LEM4 an der Koordination der raschen Phosphorylierung und Dephosphorylierung von BAF während der Mitose beteiligt ist (Asencio et al., 2012). Es wird daher vermutet, dass es auf diese Weise auch an der Anheftung der Kernhülle an das Chromatin zum Ende der Mitose sowie im Gegensatz dazu an der Ablösung der Kernhülle vom Chromatin mit Beginn der Mitose beteiligt ist. Das Gen *LEMD1* codiert Voraussagen zufolge für LEM5, welches eine Länge von 181 Aminosäuren (errechnetes MW: 20 kDA), eine aminoterminal LEM-Domäne und eine C-terminale Transmembrandomäne besitzt. Weiterführende Charakterisierungen in Bezug auf die subzelluläre Lokalisation von LEM5 liegen bis dato jedoch nicht vor (Lee und Wilson, 2004).

Nachfolgend sollen drei Mitglieder der LEM-Domänen-Proteine näher beschrieben werden, welche im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht wurden.

2.2.2.3.1. Lamina-assoziierte Polypeptide 2

Die Gruppe der Lamina-assoziierten Polypeptide 2 (LAP2) besteht aus bis zu sieben Isoformen, die mittels alternativen Spleißens eines einzelnen Gens entstehen. LAP2-Proteine, welche auch Thymopoietine genannt werden, werden dabei durch das *TMPO*-Gen (12q22) codiert. Während im Menschen drei LAP2-Isoformen nachgewiesen wurden (LAP2 α , β , γ ; Harris et al., 1994) konnten in der Maus sieben Isoformen beschrieben werden (LAP2 α , β , β' , γ , δ , ϵ , ζ ; Berger et al., 1996). Bis auf LAP2 α und ζ , sind alle LAP2-Isoformen integrale Membranproteine der INM und weisen einen hoch konservierten Aufbau auf:

Die sogenannte „LAP2-constant region“ aller Isoformen befindet sich aminoterminal und besteht aus zwei globulären Domänen welche die Affinität zum Chromatin vermitteln, der LEM- und der „LEM-like“-Domäne (Wagner und Krohne, 2007). Während die Interaktion mit dem Chromatin durch die LEM-Domäne bekanntermaßen mittels BAF vermittelt wird, kann die „LEM-like“-Domäne direkt an DNA binden (Cai et al., 2001; Furukawa, 1999). Der C-Terminus der LAP2-Isoformen ist für die Bindung der Lamine von Bedeutung. Darüber hinaus treten Unterschiede zwischen den membrangebundenen LAP2-Isoformen vor allem in der Länge ihres C-Terminus auf.

Die Lamina-assoziierten Polypeptide 2 zeigen, je nach Organismus, verschiedene Expressionsmuster. Während LAP2 γ in differenzierten Zellen verstärkt exprimiert wird, werden LAP2 α und β vorwiegend in proliferierenden Zellen synthetisiert (Taylor et al., 2005).

In *X. laevis* ist die Expression der LAP2-Isoformen ω und β zudem entwicklungsbiologisch reguliert. Diese sind zudem neben einer zusätzlichen, hypothetischen Isoform die einzigen, in *Xenopus* identifizierten LAP2-Isoformen. So ist LAP2 ω bereits maternal exprimiert. Die Expression von LAP2 ω nimmt jedoch zum selben Zeitpunkt wieder ab, zu dem LAP2 β hochreguliert wird (Lang et al., 1999). Dies lässt darauf schließen, dass beide LAP2-Isoformen während der Entwicklung spezifische Funktionen besitzen.

Eine Besonderheit unter den Lamina-assoziierten Polypeptiden 2 bildet vor allem LAP2 α , welches bisher nur in Säugern nachgewiesen werden konnte (Prüfert et al., 2004). Neben der bereits bekannten N-terminalen Region, besitzt LAP2 α jedoch einen eigenen C-terminalen Bereich, der keine Transmembrandomäne enthält. Daher ist dieses Protein ausschließlich im Nukleoplasma nachweisbar (Dechat et al., 1998; Vlcek et al., 1999). Mittels des C-Terminus ist LAP2 α in der Lage an nukleoplasmatische A-Typ Lamine zu binden. LAP2 α besitzt zudem eine Bindungsaffinität zum Retinoblastoma Protein (pRb), wodurch es an der pRb-vermittelten Repression E2F/pRb-abhängiger Gene beteiligt ist (siehe Abb. 1-4; Markiewicz et al., 2002). Eine Repression spezifischer Gene durch LAP2 α und β ist zudem mittels Bindung an E2F-Transkriptionsfaktoren beschrieben worden (Parise et al., 2006; Somech et al., 2005b). Beide Proteine scheinen zudem maßgeblich an der Organisation des Chromatins beteiligt zu sein (Dechat et al., 2004).

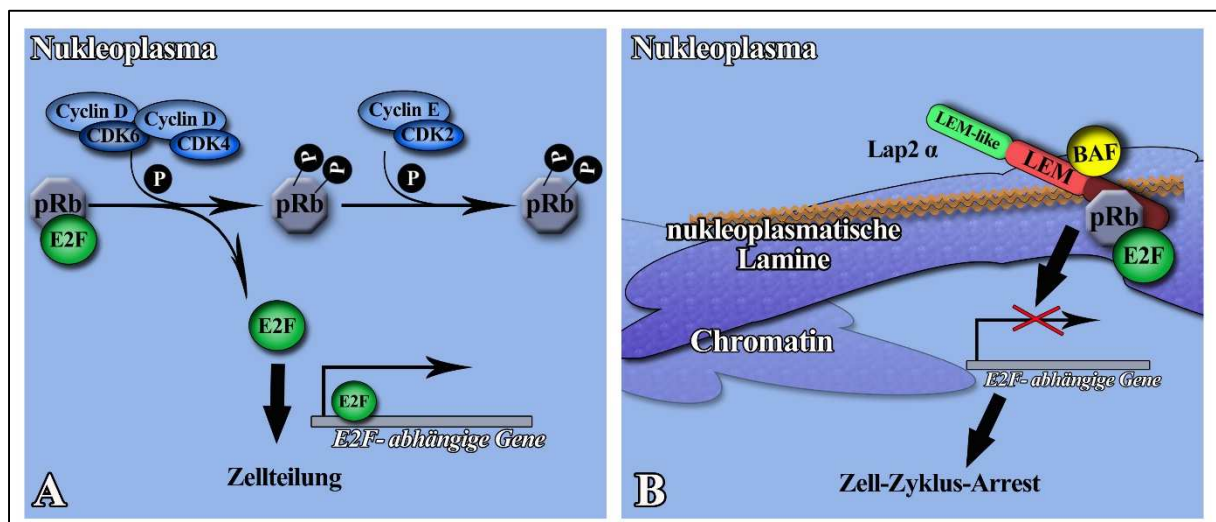


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der pRb/E2F-regulierten Genexpression (A) und der Interaktionen von LAP2 α mit nukleoplasmatischen Laminen und pRb (B). (A) Die Aktivität von E2F wird normalerweise durch das Retinoblastomprotein (pRb) inhibiert. Während dem Zellzyklus gebildete CDK4/CDK6/Cyclin-D-Komplexe phosphorylieren pRb, wodurch dieses die Affinität zu E2F verliert. E2F dissoziiert von pRb und kann folglich E2F-abhängige Gene aktivieren. Ein Komplex aus CyclinE und CDK2 bewirkt, dass pRb weiterhin phosphoryliert bleibt. Dadurch werden die Expression und die Aktivität der E2F-Transkriptionsfaktoren erhöht. (B) In ruhenden oder G₀-arrestierten Zellen ist E2F mittels pRb in einem Komplex zusammen mit nukleoplasmatischen Laminen und LAP2 α gebunden. Dies führt zu einer Repression E2F-abhängiger Gene. (adaptiert nach Wagner und Krohne, 2007)

Ein gesteigertes Interesse kam vor allem der Isoform LAP2 α zu, da Mutationen im *TMPO*-Gen, die den C-terminalen Schwanz von LAP2 α beeinträchtigen, zu einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM 1T) führen können (Taylor et al., 2005). Interessanterweise kann die dilatative Kardiomyopathie ebenfalls durch Mutationen im *LMNA*-Gen verursacht werden, welches für A-Typ Lamine codiert (Decostre et al., 2005).

2.2.2.3.2. Emerin

Emerin ist ein integrales Membranprotein, welches hauptsächlich in der inneren Kernmembran lokalisiert ist (Nagano et. al., 1996). Das Protein wird durch das *EMD*-Gen kodiert, das sich auf dem X-Chromosom befindet (Emery, 2000). Emerin wird in den meisten Zellen exprimiert, wobei jedoch Mutationen, die zu einem Verlust von Emerin und folglich zur autosomal-dominanten Form von Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD) führen, lediglich auf spezifische Gewebe negative Auswirkungen haben (Bione et. al., 1994). Emerin besitzt eine Molekulare Masse von annähernd 34 kDA (Dabauvalle et. al., 1999; Manilal et. al., 1996). Orthologe Emerin-Gene konnten sowohl in *C. elegans* (Ce-Emerin; Lee et. al., 2000b) als auch in *X. laevis* (Xemerin) nachgewiesen werden, wobei Xemerin in den zwei Isoformen Xemerin 1 und 2 auftritt (Gareiss et. al., 2005). Beide Xemerin-Isoformen stellen jedoch keine Spleißvarianten eines Gens dar, sondern stammen vermutlich von separaten Genen und unterscheiden sich in 24 Aminosäuren (AS) über die gesamte AS-Sequenz (Gareiss et. al., 2005). Emerin gehört, ebenso wie LAP2 und MAN1, zu der Familie der LEM-Domänenproteine (Laguri et. al., 2001), wobei es eine carboxyterminale Transmembrandomäne und eine aminoternale LEM-Domäne besitzt.

In *Xenopus* zeigt Emerin eine Expression, die sich im jeweiligen Entwicklungsstadium unterscheidet und somit vermutlich entwicklungsbiologisch reguliert wird. So können Xemerin-Transkripte während der gesamten Embryonalentwicklung nachgewiesen werden. (Gareiss et al., 2005). Ab Stadium 34 zeigt sich zudem eine stark erhöhte Transkription von Xemerin. Dennoch ist Xemerin nicht in *Xenopus laevis*-Oozyten und –Eiern identifizierbar, sondern erstmals während der Embryonalentwicklung ab Stadium 41.

In Bezug auf die Funktionen von Emerin existieren verschiedene Modelle, da es in vitro zahlreiche Interaktions- und Bindungspartner besitzt (vgl. Abb. 1-5 und Tab. 1-1):

(i) Einerseits ist Emerin an der Stabilisierung von Kern- und Kernhüllstrukturen beteiligt. Dies bestätigt sich dadurch, da Emerin vor allem mit A- und B-Typ-Laminen in vivo kolokalisiert (Manilal et. al., 1998) und durch diese in der INM verankert wird.

Ebenso bilden Emerin und Lamin A *in vitro* stabile ternäre Komplexe mit anderen Bindungspartnern (Holaska et. al., 2003). In *LMNA*-Knockout-Zellen kommt es zudem zu einer Fehllokalisierung von Emerin im Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Sullivan et. al., 1999; Muchir et. al., 2003). Dies verdeutlicht, dass Emerin für seine korrekte Lokalisation in der INM auf Interaktionen mit A-Typ Laminen angewiesen ist.

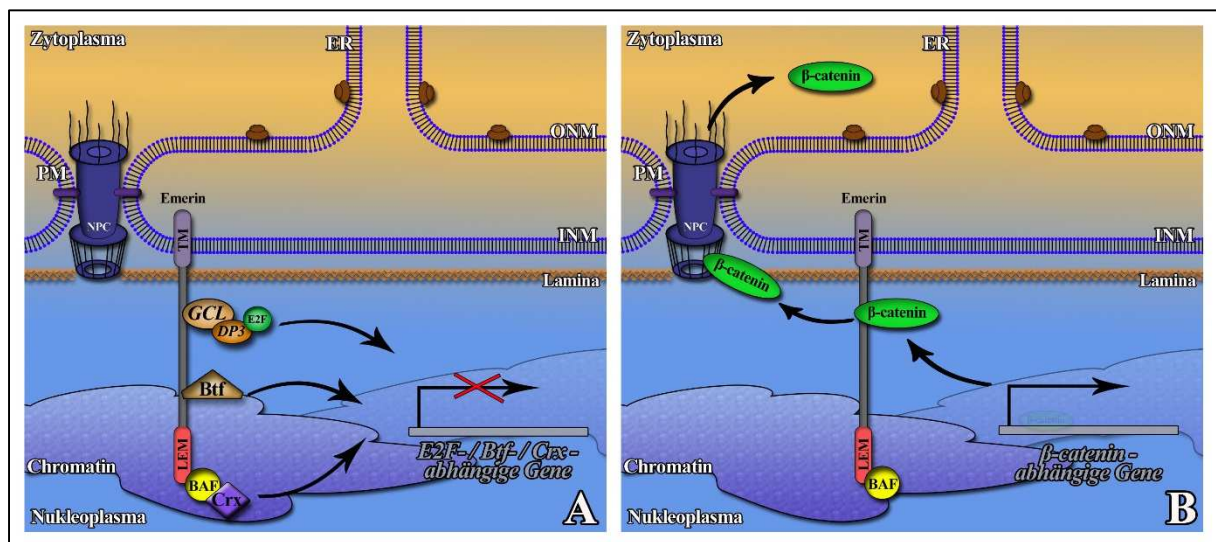


Abbildung 1-5: Schematischer Überblick der Interaktionsmöglichkeiten von Emerin und dessen Rolle bei der Genregulation. (A) Durch Bindung von Transkriptionsregulatoren wie GCL (*germ cell-less*) kann die E2F/DP3-vermittelte Genexpression reprimiert werden. Ebenso ist eine Repression entsprechender Gene durch Bindung von Btf (Bcl2-abhängiger Transkriptionsfaktor) oder dem Barrier-to-Autointegration Factor (BAF) und folglich Crx (*cone-rod homeobox*) möglich. (B) Emerin kann die Aktivität von β -catenin regulieren, indem es dieses bindet und dessen Export aus dem Kern induziert. Abkürzungen, siehe Abb. 1-1.

Des Weiteren kann Emerin an Nesprine binden. Nesprine sind integrale Membranproteine mit zahlreichen Spleißvarianten und sind sowohl in der INM als auch in der ONM lokalisiert. Es konnte eine Kolokalisation von Nesprin-1 α und Emerin in der inneren Kernmembran (Zhang et. al., 2001) sowie eine schwache Bindung zwischen beiden Proteinen nachgewiesen werden (Mislow et. al., 2002). Ebenso wie Lamin A, scheint auch Nesprin-2 für die korrekte Lokalisation von Emerin in der Kernhülle verantwortlich zu sein, da es in Nesprin-2 defizienten Zellen zu einer Fehllokalisierung von Emerin ins ER kommt (Libotte et. al., 2005). Als weiterer Bindungspartner in Bezug auf die Aufrechterhaltung der Kernhüllarchitektur findet sich nukleäres Aktin (Pederson und Aebi, 2002). Emerin kann direkt an globuläres (G-) Aktin (Fairley et. al., 1999; Lattanzi et. al., 2003) und filamentöses (F-) Aktin binden und stabilisiert F-Aktin durch Bindung an das „pointed“-Ende der Filamente (Holaska et. al., 2004). Folglich könnte Emerin als Anker für das Aktin-Spectrin-Netzwerk der INM fungieren (Holaska et. al., 2004). Ebenso kommt es durch die Assoziation der Lamine an Emerin und

Aktin zur Bildung eines Emerin-Aktin-Spectrin-Netzwerks, welches das Lamina-Netzwerk stabilisiert (Lattanzi et. al., 2003). Die strukturelle Funktion von Emerin konnte auch anhand von Muskelzellen aus Emerin-Null-Patienten gezeigt werden, da eine abnormale Kernhüllarchitektur und Organisation des Heterochromatins beobachtet wurde (Fidzianska und Hausmanowa-Petrusewicz, 2003).

(ii) Neben den strukturellen Aufgaben gibt es ebenso Modelle, die beschreiben, dass Emerin eine wichtige Rolle bei der gewebespezifischen Genregulation und Signaltransduktion einnimmt (vgl. Abbildung 1-5; Cohen et. al., 2001; Ostlund und Worman, 2003). Ein definierter Beweis dieser These steht bis dato jedoch noch aus. Dennoch wird diese These durch Untersuchungen gestützt, die zeigen dass Emerin in vitro an die Transkriptions-Repressoren GCL (*germ cell-less*; Holaska et. al., 2003) und Btf (**B**CL-2 verwandter Transkriptionsfaktor; Haraguchi et. al., 2004), an BAF (**B**arrier-to-**a**uto**i**ntegration **f**actor; Lee et. al., 2001) sowie an den Spleißfaktor YT521-B bindet (Wilkinson et. al., 2003). Weiterhin kann Emerin mittels Bindung an Transkriptionsrepressoren die Aktivierung spezifischer Gene regulieren. Durch Bindung von β -catenin mittels einer APC-ähnliche Domäne, wird dessen Aktivität inhibiert indem die Akkumulation von β -Catenin im Kern verhindert und der Export von β -catenin aus dem Kern begünstigt wird. (Markiewicz et. al. 2006; siehe Abb. 1-5, B). Ein ähnlicher Mechanismus wurde für Lmo7 postuliert (LIM-only 7; Holaska et al., 2006). Es ist daher anzunehmen, dass diese Regulationsmechanismen während der Muskel- und Adipozyten-Differenzierung von Bedeutung sind. Überdies ist Emerin in der Lage direkt an MAN1 zu binden, das ebenso an der Signaltransduktion (siehe nächster Abschnitt) beteiligt ist. Interessanterweise zeigten Untersuchungen an *C. elegans*, dass beiden Proteine überlappende Funktionen besitzen, da eine 90%ige Reduktion der Ce-MAN1-Expression lediglich zu einer Sterberate der Embryonen von 15% führte, jedoch der vollständige Verlust von Ce-Emerin keinen phänotypischen Effekt hatte. Bei einem Knockdown beider Proteine konnte interessanterweise der Tod der Embryonen spätestens zum 100-Zell-Stadium festgestellt werden (Liu et. al., 2003).

(iii) Aktuelle Studien zeigten, dass Emerin eine entscheidende Rolle bei der korrekten Lokalisation des Zentrosoms an der ONM einnimmt (Salpingidou et. al., 2007). Dabei konnte die Lokalisation kleiner Emerin-Fraktionen in Bereichen der äußeren Kernmembran sowie im peripheren ER nachgewiesen werden. Durch die Bindungsaffinität von Emerin zu β -Tubulin ist Emerin vermutlich mit Hilfe der Mikrotubuli an der Positionierung des Zentrosoms an der ONM beteiligt. Diese These wurde dadurch gestützt, da sich das Zentrosom in humanen Emerin-Null Fibroblasten um mehr als $3\mu\text{l}$ vom Kern entfernt hatte (Salpingidou et. al.,

2007). Die Lokalisation von Emerin an der ONM wird jedoch nicht durch Nesprin-2 selbst gesteuert, da eine Verminderung von Nesprin-2 zu keiner veränderten Lokalisation führte (Salpingidou et al., 2007).

(iv) Zuletzt gibt es Hinweise darauf, dass Emerin in Zell-Zyklus- und Mitosevorgängen eine Bedeutung hat. Darauf deutet einerseits die Anreicherung von Emerin während der Kernhüllbildung an den Kinetochoren nahe den Spindelpolen hin (Haraguchi et al., 2001). Andererseits wird Emerin zu Beginn der Mitose von der INM in das ER transportiert und während der Telophase unterstützt die Bindung an BAF die Relokalisation von Emerin an die Oberfläche des Chromatins (Bengtsson und Wilson, 2004). Emerin besitzt zudem zahlreiche Phosphorylierungsstellen, welche weitgehend mit den Bindungsstellen seiner Interaktionspartner übereinstimmen. Während dem Zell-Zyklus kann Emerin daher verschiedene Phosphorylierungszustände aufweisen, wodurch die Bindung von BAF und ebenso des Chromatins reguliert werden kann (Hirano et al., 2005).

2.2.2.3.3. MAN1

MAN1 ist ein ubiquitär exprimiertes, integrales Membranprotein der INM und wurde erstmals durch die Anwesenheit von Autoimmunantikörpern bei Patienten entdeckt, die an einer Kollagen-Gefäßerkrankung litten (Lin et al., 2000). MAN1 wird beim Menschen durch das *LEMD3*-Gen codiert und besitzt eine molekulare Masse von etwa 83 kDa. Durch zwei C-terminale Transmembransegmente ist das Protein in der inneren Kernhülle verankert und besitzt eine N-terminale, in das Nukleoplasma ragende LEM-Domäne. Darüber hinaus besitzt MAN1 am nukleoplasmatischen C-Terminus ein RNA-Erkennungs-Motiv (RRM, *RNA recognition motif*; Birney et al., 1993). Das RRM besteht dabei aus den zwei konservierten Regionen RNP2 und RNP1. Da bereits gezeigt wurde, dass dieses Motiv auch an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt ist (Dye und Patton, 2001), liegt es nahe, dass dies bei MAN1 die Hauptfunktion des Motivs darstellt (siehe unten). Das menschliche Genom codiert neben MAN1 noch ein strukturell ähnliches Protein, welches LEM2 genannt wird, dem jedoch das RRM-Motiv fehlt (Brachner et al., 2005).

Wie auch Emerin, besitzt MAN1 zahlreiche Bindungspartner wie Lamine, GCL, Btf, BAF, Smad2 und 3 (Lin et al., 2005) sowie die Smad-Proteine 1, 2, 3 und 5 (Pan et al., 2005), wodurch ihm zahlreiche Aufgaben in der Genregulation und vor allem bei der Signaltransduktion zukommen (Übersicht der Bindungspartner, vgl. Tab. 1-1):

(i) Wie bereits für Emerin beschrieben, kann die Affinität zu den Laminen für eine stabilisierende Funktion in der Kernhüllstruktur sprechen.

(ii) Ebenso gibt es Hinweise darauf, dass MAN1 an der Genregulation und der Chromatinorganisation beteiligt ist, da es zur Familie der LEM-Domänen-Proteine gehört und mittels seiner LEM-Domäne an BAF und somit auch an Chromatin binden kann. Erstaunlicherweise kann aber auch der C-Terminus, ohne die genannte Domäne, direkt an BAF binden, da in diesem Bereich das sogenannte SRV-Motiv (S[R/K]Vx[t/v]x[t/f][R/K]) identifiziert wurde, welches für die Bindung von BAF zuständig ist (Mansharamani und Wilson, 2005). Der C-Terminus kann ebenso die Transkriptionsregulatoren GCL und Btf binden.

(iii) Es wurde bereits postuliert, dass einige LEM-Domänen-Proteine wie LAP2 β , Emerin und MAN1 überlappende / gemeinsame Funktionen besitzen könnten (Liu et. al., 2003; Mansharamani und Wilson, 2005). Hinweise auf gemeinsame Funktionen gibt es dadurch, da der N-Terminus von MAN1 in vitro direkt an Emerin bindet und daher die Existenz eines Emerin-MAN1-Komplexes postuliert wurde (Mansharamani und Wilson, 2005). Ebenso wurde gezeigt, dass MAN1 und Emerin in *C. elegans* überlappende Funktionen besitzen (siehe oben; vgl. Liu et. al., 2003). Dies bestätigte sich ebenfalls anhand von Untersuchungen an C2C12-Myoblasten der Maus. Entsprechende Studien demonstrierten, dass Emerin in der Lage ist die Funktionen anderer LEM-Domänen Proteine, wie LEM2, zu kompensieren (Huber et al., 2009). Dabei konnte gezeigt werden, dass Emerin Aufgaben während der Myogenese übernimmt und die korrekte Fusion der Myoblasten zu Myotuben ermöglicht.

(iv) Eine besondere Rolle als Repressor / Modulator nimmt MAN1 bei der Signaltransduktion im TGF- β / BMP-Signalweg ein (*Transforming growth factor / Bone morphogenic protein*), der eine essentielle Rolle bei der Embryonalentwicklung und der Zelldifferenzierung spielt (siehe Abbildung 1-5; Ten Dijke und Hill, 2004).

Bei diesem Signalweg bilden nach Bindung von BMP-Dimeren, BMP-TypII- und – TypI-Rezeptoren Hetero-Oligomere. Durch die Aktivierung der TypII-Rezeptoren, phosphorylieren und aktivieren diese die TypI-Rezeptoren, welche wiederum Smad1, Smad5 oder Smad8 (sog. R-Smads) phosphorylieren. Die phosphorylierten R-Smads bilden daraufhin mit Co-Smads einen Komplex, der sich in den Kern bewegt und dort mit weiteren Transkriptionsfaktoren an definierte Zielgene bindet. Als Zielgene des Signalwegs während der frühen *Xenopus*-Embryogenese wurden bisher die Gene *Xvent1*, *Xvent2*, *Msx1* und *Xhox3* identifiziert (Hata et. al., 2000).

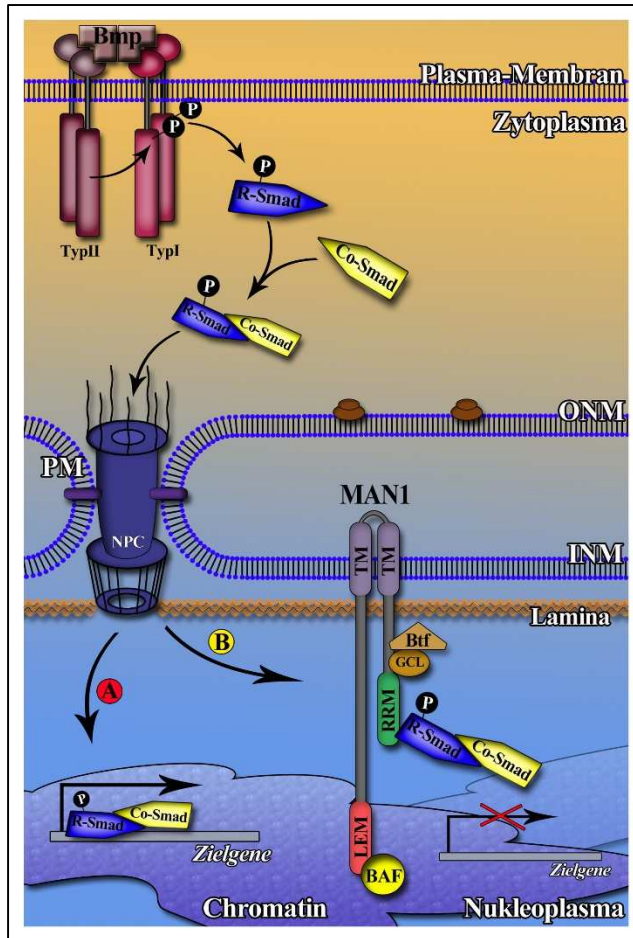


Abbildung 1-6: Schematische Darstellung der inhibitorischen Rolle von MAN1 im TGF- β / BMP-Signalweg. Mitglieder der TGF- β -Superfamilie wie BMPs (*Bone morphogenic proteins*) binden als Dimere an TYPII-Rezeptoren, welche mit TypI-Rezeptoren Hetero-Oligomere bilden. Nach Phosphorylierung der TypI-Rezeptoren, aktivieren diese verschiedene R-Smads (Phosphorylierung von Smad1, 5 oder 8). Anschließend bildet sich ein Komplex mit Co-Smads (bsp. Smad4) welcher in den Kern wandert und dort zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren Zielgene aktiviert (A). Dies führt zur Ventralisierung des Gewebes während der Entwicklung. Durch Bindung der R-Smads an MAN1 kommt es zur Repression entsprechender Gene (B). Eine an MAN1 rekrutierte Phosphatase kann die R-Smads dephosphorylieren, wodurch es zu einer Verstärkung der Repression kommt. Diese Blockierung des Signalweges führt schließlich zur Dorsalisierung des Gewebes. Abkürzungen, siehe Abb. 1-1. (adaptiert nach Gruenbaum et. al., 2005).

Untersuchungen anhand der *Xenopus*-spezifischen Proteine XMAN1 und SANE (*Smad1 antagonistic effector*) zeigten, dass sie einen inhibitorischen Einfluss auf den beschriebenen Signalweg haben, da sie durch Bindung der R-Smads die Determination der Dorsoventralachse in *Xenopus*-Embryonen regulieren und dem BMP-Signal entgegenwirken (Osada et. al., 2003; Raju et. al., 2003). Ebenso blockiert XMAN1 die BMP-vermittelte Induktion von ventralem Mesoderm und führt zur Bildung einer sekundären dorsalen Achse, welche Muskeln aber kein Notochord enthält, sobald es in ventralen Zellen exprimiert wird (Osada et. al., 2003). Zudem ist in Folge einer RNAi-vermittelten Reduktion von MAN1 das TGF- β -Signal erhöht. Entgegengesetzt führt die Überexpression von MAN1 zu einer Abnahme der Rezeptor-vermittelten Phosphorylierung und Oligomerisierung der R-Smads, ebenso wie die Unterdrückung der Activin- und Nodal-Signale in *Xenopus* (Ishimura et. al., 2006; Lin et. al., 2005; Pan et. al., 2005). Interessanterweise scheint der BMP-Signalweg auch während der Entwicklung des Herzens eine besondere Stellung einzunehmen, da BMP4 vermutlich am *Herz-Looping* beteiligt ist (Breckenridge et al., 2001). Erstaunlich ist, dass möglicherweise auch MAN1 an der Herzentwicklung beteiligt und somit im BMP-Signalweg

involviert ist. So wiesen MAN1-Knockout-Mäuse in einer aktuelleren Studie Defekte während des *Herz-Loopings* auf (Ishimura et al., 2008).

Es stellt sich daher die Frage wie MAN1 an der Blockierung der Signaltransduktion beteiligt ist. In diesem Kontext konnte nachgewiesen werden, dass das C-terminale RNA-Erkennungsmotiv von MAN1 alle R-Smads (jedoch nicht die Co-Smads) binden kann und es so zu einer Akkumulation der R-Smad/Co-Smad-Komplexe nahe der INM kommt (vgl. Abbildung 1-6; Lin et. al., 2005; Pan et. al., 2005). Ebenso wurde ein weiteres Modell postuliert, welches besagt, dass MAN1 die Phosphorylierung der R-Smads regulieren könnte. Spekulationen gehen davon aus, dass MAN1 eine bisher uncharakterisierte Serin/Threonin-Phosphatase zur Kernhülle rekrutieren könnte, welche schließlich die R-Smads dephosphoryliert (Pan et. al., 2005). Dafür sprechen aktuelle Berichte, die besagen, dass LEM-Domänen Proteine, wie für LEM4 bereits gezeigt, die Eigenschaft besitzen Proteinkinasen oder auch -phosphatasen zur Kernhülle zu rekrutieren um dadurch die Aktivität von BAF oder anderen Transkriptionsfaktoren zu regulieren (Ascencio et al., 2012; Gorjanacz, 2013).

(v) In Bezug auf die Rolle/Verteilung von MAN1 während der *Xenopus*-Entwicklung konnte demonstriert werden, dass der C-Terminus von XMAN1 eine neuralisierende Aktivität besitzt, welche möglicherweise für die Entwicklung der Augen notwendig ist (Osada et al., 2003). Interessanterweise ist diese Region von MAN1 beim Menschen und *Xenopus* hoch konserviert (87% identisch) und deutet auf eine frühe Etablierung in der Evolution hin. Weiterhin ergaben RT-PCR-Analysen, dass die Transkription der XMAN1-mRNA während der *Xenopus*-Embryogenese ab dem Stadium 34 abnimmt (Gareiss et. al., 2005). Da die Transkription von Xemerin hingegen zum selben Zeitpunkt erhöht wird, liegt die Vermutung nahe, dass beide Proteine auch in *X. laevis* überlappende Funktionen besitzen.

2.3. Barrier-to-Autointegration Factor (BAF)

BAF ist ein evolutionär hoch konserviertes Protein mit einer molekularen Masse von ~10 kDa. Erstmals wurde BAF als Faktor identifiziert, der in der Lage war die Autointegration von retroviraler cDNA des „Moloney Leukemia Virus“ (MoMLV) ins Wirtsgenom zu unterbinden (Lee und Craigie, 1998). Daher wurde dieser Faktor „Barrier-to-Autointegration Factor“ genannt. Da BAF in der Lage ist DNA quer zu vernetzen, besagt das aktuelle Modell, dass die Quervernetzung und dichte Verpackung der DNA durch BAF, die Autointegration der viralen cDNA durch seine Integrase in das Wirtsgenom verhindert, da die DNA unzugänglich ist.

Im Säuger-Genom wurden bisher sechs homologe BAF-Gene für BAF, *BAF-like* (BAF-L) und vier BAF-verwandte Proteine nachgewiesen (Wang et al., 2002).

Während der Interphase ist BAF im Nukleoplasma lokalisiert, wobei es vorwiegend im Bereich der Kernhülle angereichert ist (Furukawa et al., 2003; Margalit et al., 2005). BAF besitzt bis dato zwei grundlegende Funktionen, welche für die Organisation des Chromatins, die Kernhülldynamiken während der Mitose und die gewebespezifische Genexpression von Bedeutung sind:

(i) BAF ist in der Lage durch Dimerisierung an DNA zu binden (Cai et al., 1998). Dies geschieht jedoch unabhängig von spezifischen Sequenz-Motiven. Interessanterweise ist diese Bindung von der Länge der DNA abhängig. So konnte beobachtet werden, dass BAF bei 7-bp dsDNA als einzelnes BAF-Dimer zwei DNA-Stränge bindet (Bradley et al., 2005), bei 21-bp dsDNA jedoch ein Komplex gebildet wird, der sechs BAF-Dimere sowie sechs DNA-Stränge beinhaltet (Zheng et al., 2000). Dadurch erreicht BAF, mittels Quervernetzung entfernter DNA-Bereiche, ein weitaus höheres Potential zur DNA-Kondensation. Sobald BAF an DNA bindet, unterliegt es dabei einer Konformationsänderung (Forne et al., 2003). Neben einer direkten Bindung von DNA, besitzt BAF zudem eine hohe Affinität zum Histon H3 sowie dem Linkerhiston H1.1 (Mansharamani und Wilson, 2005; Montes de Oca et al., 2005). Daher ist BAF vermutlich mittels direkter DNA-Bindung und indirekt auch durch Bindung von Histon H3, an der Bildung von Heterochromatin beteiligt.

(ii) BAF besitzt neben seiner Affinität zum Chromatin, die Fähigkeit Protein-Protein-Interaktionen auszubilden. Als wichtigster Interaktionspartner gelten dabei die LEM-Domäne, sowie die BAF-Bindungsstelle des MAN1-C-Terminus. Die Interaktion mit LEM-Domänen Proteinen dient dabei einem weitreichenden Funktionsumfang: Dadurch kann die retrovirale Infektion reguliert werden, ebenso die Neubildung der Kernhülle, der Ablauf des Zell-Zyklus, entwicklungsbiologische Prozesse und die Expression spezifischer Gene (Zur Übersicht siehe Margalit et al., 2007). Eine besondere Bedeutung kommt der LEM-Protein – BAF-Interaktion während der Mitose zu. So konnte gezeigt werden, dass BAF während der Kernhüllbildung bereits mit Emerin assoziiert sein muss, damit Emerin an das Chromatin binden kann (Lee et al., 2001). Ebenfalls führt die Bindung der DNA zusammen mit LAP2 β dazu, dass das Chromatin an die Kernlamina und die INM dirigiert wird (Segura-Totten und Wilson, 2004). Dies verdeutlicht, dass BAF die Kernhüllbildung und -organisation reguliert. Während der Anaphase befindet sich BAF in relativ stabilen Komplexen mit LAP2 α , die an den Telomeren der Chromosomen lokalisiert sind (Margalit et al., 2007). Während der Kernhüllbildung zum Ende der Mitose verteilen sich diese LAP2 α -BAF-Komplexe auf sog. „core-regions“ an der

Oberfläche der dekondensierenden Chromosomen. Diese „core-regions“ dienen vermutlich auch als Initiationsbereiche der Kernhüllbildung, indem Kernhüll-gebundene LEM-Domänen Proteine rekrutiert werden. Eine Bindung der LEM-Domänen Proteine scheint während diesem Vorgang essentiell zu sein, da RNAi-Experimente bei *C.elegans* zeigten, dass der Knockdown von Ce-Lamin, Ce-MAN1 und Ce-Emerin dazu führt, dass BAF nach der Mitose nicht mehr an der Kernhülle lokalisiert ist (Liu et al., 2003). Die Depletion von BAF selbst führte dagegen zu schwerwiegenden Defekten während der Mitose und einem letalen oder sterilen Phänotyp der Embryonen (Margalit et al., 2005). Die Kerne zeigten dabei einen Arrest der Chromatinorganisation während der Anaphase sowie eine Fehllokalisation der Lamine und der LEM-Domänen Proteine LEM2 und Emerin zum Ende der Mitose. Daher scheint die Komplexbildung von BAF, LEM-Domänen Proteinen und Laminen im Bereich der Chromosomen während der Zellteilung essentiell zu sein.

(iii) BAF ist vermutlich indirekt an der Regulation gewebespezifischer Gene beteiligt. Dies geht aus Studien hervor, die zeigten, dass Proteine mit einer sog. BAF-Bindungsstelle, Interaktionen mit BAF eingehen. Dazu zählen beispielsweise der C-Terminus von MAN1, das INM-Protein Nemp1 aber auch Homöobox-Transkriptionsfaktoren wie Crx (*cone-rod-homeobox*) und Otx2 (*orthodenticle homeobox 2*). Die Bindung dieser Transkriptionsfaktoren führt zu einer inhibierten Bindung an Promoter-Regionen und somit zur Repression spezifischer Zielgene (Wang et al., 2002), wodurch eine Regulation der Genexpression erreicht wird. Ein weiteres Modell besagt, dass BAF an der Genregulation beteiligt ist, indem es mit spezifischen Transkriptionsfaktoren um die Bindung an LEM-Domänen Proteine konkurriert. Dies bestätigt sich darin, da BAF mit GCL um die Bindung an Emerin konkurriert (Holaska et al., 2003). Eine Regulation gewebespezifischer Gene kann darüber hinaus vermutet werden, da BAF vor allem in den Augen, in Skelett- und Herzmuskelzellen exprimiert wird (Wang et al., 2002; Mansharamani et al., 2003). Es kann daher spekuliert werden, dass BAF an der Entwicklung und/oder Differenzierung bestimmter Gewebe, wie den Augen und Muskeln beteiligt ist und dass Mutationen in BAF ebenfalls zu gewebespezifischen Erkrankungen aufgrund einer gestörten Bindung von LEM-Domänen Proteinen und Laminen führt.

Da BAF gleichermaßen DNA und Proteine binden kann, stellt sich die Frage wie die Ausbildung dieser Interaktionen während verschiedener zellulärer Prozesse reguliert wird.

(i) Die Dimerisierung mit *BAF-like* (BAF-L) führt zu einer Regulation der DNA-Bindung (Tiffet et al., 2006). Im Gegensatz zu BAF-Dimeren, ist BAF-L nicht in der Lage DNA zu binden. BAF-L kann jedoch Homodimere oder zusammen mit BAF Heterodimere

bilden. Ebenso besitzen nur BAF – BAF-L Heterodimere, jedoch nicht BAF-L Homodimere die Fähigkeit an LEM-Domänen Proteine zu binden. Daher kann folgendes Modell angenommen werden: BAF – BAF-L Heterodimere, welche nur eine DNA-Bindungsstelle aufweisen, sind nicht in der Lage DNA quer zu vernetzen. Daher dient BAF-L vermutlich als Gegenspieler der BAF-Homodimer-vermittelten DNA-Kondensation. Wie bereits erwähnt, ist BAF vor allem im Auge, und der Skelett- sowie Herzmuskulatur exprimiert. Da BAF-L eine spezifische Expression im Pankreas und den Hoden und die Abwesenheit im Herzen, der Skelettmuskulatur und der Niere zeigt, ist eine gewebespezifische Regulation der Genexpression mittels BAF – BAF-L Dimerisierung höchst wahrscheinlich.

(ii) Abgesehen von der Heterodimerisierung mit BAF-L, wird die Aktivität von BAF während dem Zellzyklus vor allem durch Phosphorylierung von Ser4, Thr2 und thr3 reguliert (Nichols et al., 2006; Bengtsson und Wilson, 2006). Ebenso führt die Phosphorylierung der LEM-Domänen Proteine selbst zu einer verminderten Bindungsaffinität zu BAF (Hirano et al., 2005). Während der Mitose führt die Phosphorylierung von BAF durch die *Vaccinia-related kinase 1* (VRK-1) zu einem Verlust der DNA-Bindung und einer verminderten Affinität zu Emerin. Erst kürzlich zeigten Studien, dass das LEM-Domänen Protein LEM-4 (Ankle-2) die schnelle Dephosphorylierung von BAF während der Mitose unterstützt (siehe Abb. 1-7).

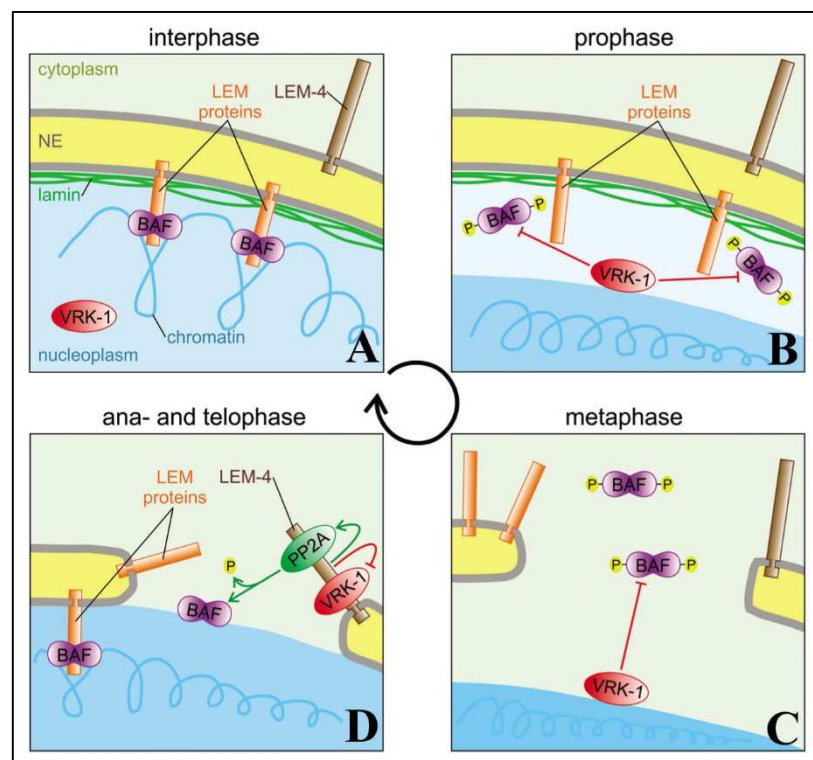


Abbildung 1-7: Schematische Darstellung der Phosphorylierung von BAF (Barrier-to Autointegration Factor) durch VRK-1 (vaccinia-related kinase 1) zu Beginn der Mitose (B und C) und Dephosphorylierung durch eine, an LEM-4 gebundene Proteinphosphatase (PP2A) zum Ende der Mitose (D). (Abbildung aus Gorjánác, 20013).

Das Modell (Gorjánácz, 2013) besagt dabei, dass BAF während der Interphase in Form von Dimeren and LEM-Domänen Proteine bindet und es dadurch zu einer Anheftung der DNA an die Kernhülle kommt (Abb. 1-7A). Während der Mitose (Pro- und Metaphase) und dem Abbau der Kernhülle, wird BAF durch VRK-1 phosphoryliert und verliert somit die Bindungsaffinität zur DNA und den LEM-Domänen Proteinen (Abb. 1-7B, C). Zum Ende der Mitose (Ana- und Telophase) beginnt die Neubildung der Kernhülle im Bereich des dekondensierenden Chromatins. Währenddessen bindet LEM-4 an VRK-1 und inhibiert dessen enzymatische Aktivität (Abb. 1-7D). Ebenso wird eine Proteinphosphatase (PP2A) an LEM-4 rekrutiert, welche die Dephosphorylierung von BAF einleitet (Abb. 1-7D). Dementsprechend kann BAF erneut an Chromatin und die LEM-Domänen Proteine binden und ermöglicht so die korrekte Kernhüllbildung.

2.4. Mutationen in Kernhüllproteinen

Mutationen in Genen, welche für Lamine oder Kernhüllproteine codieren, führen zu zahlreichen unterschiedlichen Erbkrankheiten, den sogenannten Envelopathien (zur Übersicht, siehe Tab. 1-2). Die phänotypischen Auswirkungen der verschiedenen Mutationen treten jedoch gewebespezifisch auf (vgl. *LMNA*, Tab. 1-2). So betreffen die klinischen Symptome vor allem Herz- und Skelettmuskeln, Fettgewebe, Knochenstrukturen, Haut- und Nervengewebe oder eine Kombination dieser Gewebe. Vor allem Mutationen im *LMNA*-Gen führen beim Menschen zu schweren Erbkrankheiten wie beispielsweise der autosomal dominanten (EDMD2) und der autosomal rezessiven (EDMD3) Form der Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie, der Charcot-Marie-Tooth Typ-2 Erkrankung, dem Hutchinson-Gilford Progerie-Syndrom und einigen anderen (zur Übersicht siehe Worman et al., 2009; Tab. 1-2). Mutationen im *EMD*-Gen führen zur rezessiven X-chromosomalen Form der Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD1; Bione et. al., 1994; Manilal et. al., 1996; Nagano et. al., 1996). Funktionsverlust-Mutationen im *LEMD3*-Gen, welches für *MAN1* codiert, führen beim Menschen zum Buschke-Ollendorff-Syndrom, Osteopoikilose und Melorheostose (Hellemans et. al., 2004).

Zur Erklärung der diversen pathologischen Merkmale der Envelopathien gibt es verschiedene Modelle:

	Gen	Protein	Erkrankung	Pathologie	Vererbung
Lamina	LMNA	Lamin A / C	Emery-Dreifuss Muskeldystrophie (EDMD)	Muskelschwäche oder -schwund der Skelettmuskulatur, Gelenkkontrakturen, Dilatative Kardiomyopathie	AD
			Emery-Dreifuss Muskeldystrophie (EDMD)	Muskelschwäche oder -schwund der Skelettmuskulatur, Gelenkkontrakturen, Dilatative Kardiomyopathie	AR
			Gliedergürtel Muskeldystrophie Typ 1B	Muskelschwäche oder -schwund der Knochengürtelmuskulatur, Dilatative Kardiomyopathie	AD
			Familial Partial Lipodystrophie Typ 2 (FPLD2)	Verlust von subkutanem Fett der Extremitäten, Erhöhte Fetteinlagerung in Gesicht und Nacken, Insulin-Resistenz, Diabetes Mellitus, Leberverfettung	AD
			Mandibuloacral Dysplasie	Vergrößerter Kiefer mit engständigen Zähnen, Gelenksteifheit, Atrophien der Haut bei Händen und Füßen, Schädel- und Gesichtsanomalien	AD
			Charcot-Marie-Tooth Typ 2B1	Muskelschwäche oder -schwund im Bereich von Unterschenkel/Unterarm; Fehlende Eigenreflexe	AR
			Huchinson-Gilford Progerie Syndrom (HGPS)	Kinder erscheinen vorzeitig gealtert, Kleinwuchs, Reduziertes subkutanes Fettgewebe, Haarausfall, Hautflecken, Osteoporose, frühzeitiger Tod durch Arteriosklerose und Herzgefäßerkrankung	de novo Mutation
	ZMPSTE24	ZMPSTE24 (FACE-1)	Restriktive Dermopathie	Perinataler Tod, Hautversteifung, Fettverlust, Gelenkkontrakturen, Lungenhypoplasie	AR
	LMNB1	Lamin B1	Leukodystrophie (Erwachsenenalter)	Myelinverlust im ZNS, Vergleichbarer Phänotyp wie bei Multipler Sklerose	AD
LMNB2	Lamin B2	Erworbene partielle Lipodystrophie	Voranschreitende, unregelmäßige Lipodystrophie, vergleichbar zu FPLD2	AD	
Kernhüllproteine	TMPO	LAP2	Dilatative Kardiomyopathie 1T	Vergrößerte Ventrikel, Verringerte Auswurfleistung, Errungsleitungsstörungen	AD
	LBR	Lamin B Rezeptor	Pelger-Huet Anomalie	Hyposegmentierte Neutrophilen-Kerne, Entwicklungsverzögerung, Epilepsie, Skelett-Abnormalitäten	AD
			HEM-Greenberg Skelett-Dysplasie	Vorgeburtlicher oder perinataler Tod, Verkürzte Extremitäten, anormale Knorpel-/Knochen-Kalzifizierung	AR
	LMD3	MAN1	Osteopikilosis, Buschke-Ollendorff Syndrom, Melorheostose	Knochenverdichtungen der Knochenrinde (Kortikalis), Dermatofibröse Hautveränderungen	AD
	EMD	Emerin	Emery-Dreifuss Muskeldystrophie (EDMD)	Muskelschwäche oder -schwund der Skelettmuskulatur, Gelenkkontrakturen, Dilatative Kardiomyopathie	X-chromosomal
	SYNE1	Nesprin-1	Zerebellum (Kleinhirn)-Ataxie	Artikulationsstörungen, Bewegungsstörungen (Ataxie, Dysmetrie),	AR
Kernporenkomplex	NUP155	Nup155	/	Vorhofflimmern	AR
	NUP62	Nup62	/	kindliche Nekrose des Striatums (ZNS)	AD
	RANBP2	RanBP2	/	akute nekrotisierende Enzephalopathie	AD

Tabelle 1-2: Bekannte Envelopathien und Laminopathien und die entsprechend betroffenen Gene und Proteine verschiedener Kernhüllkomponenten. AD: Autosomal-dominanter Erbgang, AR: autosomal-rezessiver Erbgang. (zur Übersicht siehe Worman et al., 2009; Dauer und Worman, 2009).

(i) Das *Strukturmodell* beschreibt den Umstand, dass Mutationen im *LMNA*-Gen, die strukturelle Stabilität der Lamina und folglich die Integrität des Zellkerns schwächen. So konnte beispielsweise bei HGPS-Patienten (Hutchinson-Gilford Progerie-Syndrom) gezeigt werden, dass deren Zellen morphologische Veränderungen aufwiesen, wie einer Verdickung der Lamina, Blasenbildung in der Kernhülle, Aggregation der Kernporenkomplexe und einer veränderten Verteilung des Heterochromatins (Bridger und Kill, 2004; Goldman et. al., 2004). Ebenso zeigten Fibroblasten von Laminopathie-Patienten eine reduzierte Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischen Stress (Broers et. al., 2004). Wie bereits erwähnt wurde, besteht über den LINC-Komplex eine Verbindung zwischen dem Nukleoskelett und dem Zytoskelett. Daher liegt es nahe, dass eine Schwächung der Lamina und eine veränderte Verteilung von LEM-Domänen-Proteinen ebenso zu einem negativen Einfluss auf das Zytoskelett führen können.

(ii) Das *Genexpressionsmodell* besagt, dass Mutationen im *LMNA*-Gen oder in Genen der LEM-Domänen-Proteine die Regulation von Transkriptionsfaktoren beeinflussen können. Wie bereits für Emerin und MAN1 erläutert wurde, sind beide Proteine an verschiedenen Signaltransduktionswegen und durch Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren an der Genregulation beteiligt. So können schließlich Mutationen in deren Genen zu einer Veränderung der Genexpression führen.

(iii) Das *Differentiations- / Zellzyklusmodell* wird dadurch gestützt, da Lamin A/C, Emerin und LAP2 α mit dem Retinoblastoma-Protein (Rb) assoziieren. Rb steuert die Differentiation und den Ablauf des Zellzyklus durch die Regulation der E2F-Transkriptionsfaktoren. Daher wird vermutet, dass Defekte in Lamin A/C, Emerin und LAP2 α zu einer Beeinträchtigung des Rb-gesteuerten Signalweges führen. Dies geschieht möglicherweise durch eine negative Beeinflussung von spezifischen Protein/Protein-Wechselwirkungen (Dorner et. al., 2006; Johnson et. al., 2004; Markiewicz et. al., 2002).

Nachfolgend soll eine Auswahl von Erbkrankheiten, welche durch Mutationen in Kernhüllproteinen entstehen näher betrachtet werden.

2.4.1. Emery-Dreifuss Muskeldystrophie (EDMD)

Mutationen im *EMD*-Gen, welches für das LEM-Domänen Protein Emerin codiert, führen zur rezessiven, X-chromosomalen Form der Emery-Dreifuss Muskeldystrophie (EDMD). Diese Krankheit wurde erstmals von Emery und Dreifuss im Jahre 1966 beschrieben (Emery und Dreifuss, 1966), nach denen sie benannt wurde. Die klinischen Symptome der EDMD, welche in der späten Kindheit oder der Pubertät auftreten, zeigen sich vor allem in einer Kontraktion

der Ellbogen- und Achillessehnen sowie zu Muskelschwund in den Oberarmen und Unterschenkeln (vgl. Abb. 1-8). Begleitet wird die EDMD durch eine Kardiomyopathie und Herzreizleitungsstörungen, welche unbehandelt zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr zum plötzlichen Herzstillstand führen können. Die Lebenserwartung kann jedoch durch die Behandlung mit einem Herzschrittmacher deutlich erhöht werden (Emery, 1989; Gayathri et. al., 2006).

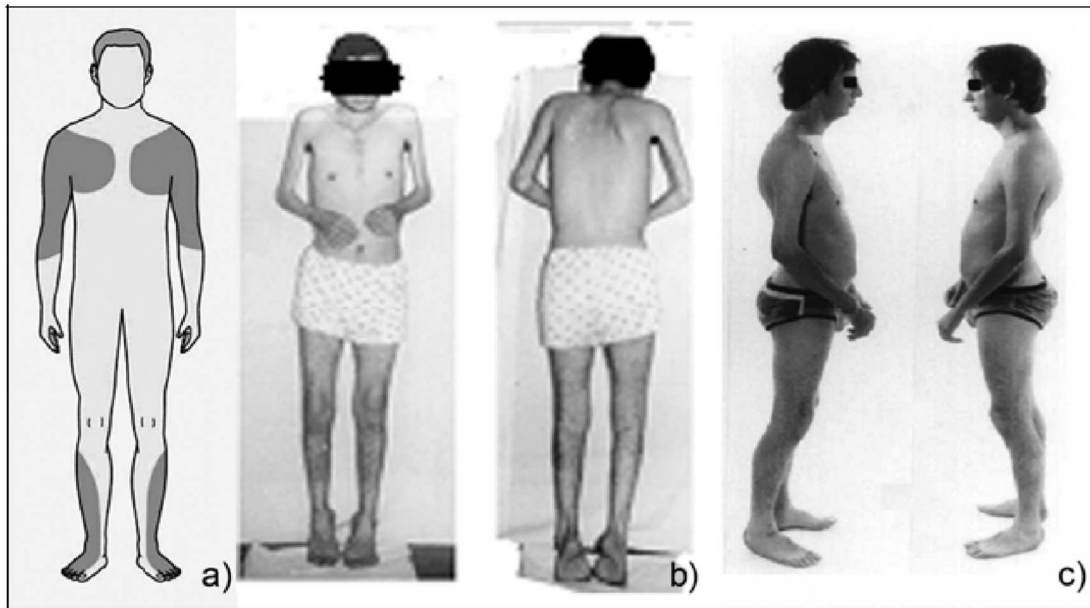


Abbildung 1-8: Klinische Symptome der Emery-Dreifuss Muskeldystrophie. (a) Vor allem die Muskelpartien der Oberarme, des Oberkörpers und der Unterschenkel sind betroffen. (b und c) Ein 25- (b) und 18-jähriger (c) EDMD-Patient mit verkürzten Achilles- und Ellbogensehnen sowie Muskelschwund an Oberarmen und Unterschenkeln.

Bis heute wurden annähernd 100 Mutationen (vor allem Nonsense- oder Frameshiftmutationen) im *EMD*-Gen nachgewiesen, welche zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation und im Allgemeinen zu einem Null-Phänotyp führen. Die Pathologie der LMNA-assoziierten EDMD-Formen (EDMD2 und EDMD3), ist mit der X-chromosomalen Form vergleichbar. Zudem zeigten aktuellere Untersuchungen, dass auch Mutationen in KASH-Domänen Proteinen zu Phänotypen ähnlich der EDMD führen können (Fridkin et al., 2009). Zudem wurde gezeigt, dass Komponenten des Rb-Signalwegs bei Patienten mit der X-chromosomalen und autosomal-dominanten oder -rezessiven Form der EDMD verändert sind (Bakay et. al., 2006). Daher liegt die Vermutung nahe, dass während der Muskelregeneration von EDMD-Patienten zu einer anormalen Myogenese kommt, da die Proteine des Rb-Gens eine entscheidende Rolle bei der E2F-vermittelten Regulation des Zellzyklus und der MyoD-gesteuerten Induktion der Myogenese spielen.

2.4.2. Buschke-Ollendorff-Syndrom, Osteopoikilose und Melorheostose

Heterozygote Funktionsverlust-Mutationen im *LEMD3*-Gen, welches für das LEM-Domänen Protein MAN1 codiert, führen zu einigen sklerosidierenden Knochendysplasien, die sich durch Knochenverdichtungen oder Hautveränderungen auszeichnen (siehe Abbildung 1-8). Diese Defekte treten meist zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr auf und sind mit Gelenkschmerzen und -versteifungen verbunden.



Abbildung 1-9: Klinische Symptome des Buschke-Ollendorff-Syndroms. Die Röntgenaufnahmen zeigen typischen Knochenverdichtungen und -defekte. (a) Punktförmige Knochenverdichtungen in der Hand zeigen sich vor allem in den Fingergliedern, den Mittelhandknochen und den Handwurzelknochen (geschlossene Pfeile). Lineare Verdichtungen zeigen sich in der distalen Speiche und der Elle (offener Pfeil). (b) Die Aufnahme des Beckens zeigt einige kleine Verdichtungen (Pfeile). (Abbildung aus Kim et. al., 2003)

Zu diesen Erkrankungen zählen vor allem das Buschke-Ollendorff-Syndrom, die Osteopoikilose und die Melorheostose (Hellemans et. al., 2004). Das Buschke-Ollendorff-Syndrom (BOS) ist im Grunde genommen eine Osteopoikilose der Knochen, das bedeutet in radiologischen Aufnahmen können punktförmige Flecken mit erhöhter Knochendichte vor allem in Bereichen nahe der Gelenke beobachtet werden (vgl. Abb. 1-9). Zusätzlich zeigen Patienten, die an BOS leiden, Hautläsionen, sog. bindegewebige Naevi, die als verstreute, hautfarbene oder gelbe Plaques vor allem im Bereich des Rumpfes und/oder den proximalen Extremitäten auftreten. Diese Hautabnormalitäten werden durch Veränderungen des Bindegewebs-Naevus verursacht, da es zu einer erhöhten Ansammlung extrazellulärer Matrixproteine, wie Elastin oder Kollagen kommt (Woodrow et al., 2001). Ebenso zeigen entsprechende Fasern Veränderungen. So können Kollagenbündel verdickt und verbreitert erscheinen, wohingegen die Anzahl elastischer Fasern erhöht ist oder diese unregelmäßig und fragmentiert vorliegen. Die BOS zeigt jedoch starke phänotypische Variationen.

So können innerhalb einer Familie Personen mit Knochen- und Hautläsionen oder aber nur mit einer dieser Veränderungen beobachtet werden.

Bei der Melorheostose handelt es sich um Entwicklungsdefekte der Knochen der Gliedmaßen mit Verteilung nach dem sog. Sklerotom (Greenspan und Azouz, 1999). In den meisten Fällen ist nur eine Extremität betroffen. Die Patienten können symptomfrei sein und Veränderungen der Knochen werden beiläufig während einer Routineuntersuchung festgestellt. Ebenso können Patienten über Schmerzen oder steife Gliedmaßen mit einer eingeschränkten Beweglichkeit klagen. In manchen Fällen, können zudem Längenunterschiede oder gar Deformierungen der Gliedmaßen auftreten, welche durch operative Eingriffe korrigiert werden können. Die Melorheostose wird anhand besonderer Auffälligkeiten im Röntgenbild diagnostiziert.



Abbildung 1-10: Klinische Symptome der Melorheostose. Die Röntgenaufnahmen zeigen die Knochen der Zehen. Abnormale, hyperostotische Bereiche, die an eine fließende Kerze erinnern, sind rot hervorgehoben. (Abbildung: Dr. Jochen Lengerke)

Diese sind durch eine kortikale Hyperostose (vermehrte Knochenbildung) mit einer Verdickung gekennzeichnet, die einer fließenden Wachskerze gleichen (siehe Abb. 1-10). Wegen dieses Erscheinungsbildes der Knochen, wird die Melorheostose auch als Wachsknochen- oder Kerzenwachskrankheit bezeichnet. In seltenen Fällen wurden auch Weichteilverkalkungen sowie Weichteilverknöcherungen berichtet.

Die grundlegenden Mutationen der genannten Erkrankungen und damit verbundenen Phänotypen führen zu einem Fehlen des C-Terminus von MAN1, eingeschlossen dem RRM-Motiv, wodurch die Affinität zu den R-Smads gestört wird. Dies resultiert vermutlich in einem Anstieg des TGF- β - und BMP-Signals, welches zu der erhöhten Knochendichte und den Hautläsionen der Patienten führen kann (Hellemans et. al., 2004).

2.5. Modellsystem *Xenopus laevis*

Der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* stellt einen hervorragenden Modellorganismus in der Entwicklungsbiologie dar und eignet sich vor allem für Untersuchungen in der frühen Embryogenese. Er ist eine aus 18 Arten der Gattung der Krallenfrösche (*Xenopus*) innerhalb der zungenlosen Frösche (Familie *Pipidae*). Das ursprüngliche Verbreitungsgebiet beschränkt sich hauptsächlich auf Afrika südlich der Sahara (Angola, Namibia, Malawi, Simbabwe), wo er ausschließlich aquatisch lebt. Besondere Merkmale dieser Art sind die glatte Haut, der deutlich abgeflachte Kopf sowie die namensgebenden schwarzen Krallen an den drei inneren Zehen. Die Weibchen erreichen eine Körpergröße von 10-13 cm (Abbildung 1-11) und sind unter Laborbedingungen bei einer Wassertemperatur von 16-22°C leicht zu halten.

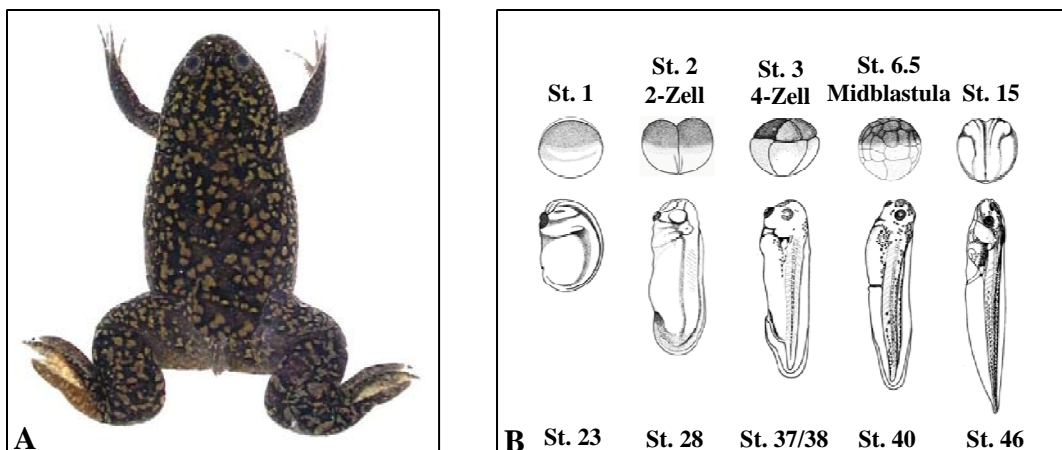


Abbildung 1-11: Adulter weiblicher Krallenfrosch (A; www.Xenbase.org) und chronologische Übersicht der frühen Embryonalentwicklung (B; nach Nieuwkoop und Faber, 1975). St. = Entwicklungsstadium

Diese Tiere sind besonders vorteilhaft für entwicklungsbiologische Experimente, da sie durch Injektion des humanen Schwangerschaftshormons Choriogonadotropin in den dorsalen Lymphsack zur Paarung und Eiablage stimuliert werden können. Die Eier können schließlich *in vitro* mit Spermien eines isolierten *Xenopus*-Hoden befruchtet werden und Untersuchungen an der synchron und rasch voranschreitenden Embryogenese vorgenommen werden. Bei einer Eiablage werden durchschnittlich 1000 Eier mit einem Durchmesser von 1,0-1,3 mm abgelaicht. Diese außergewöhnliche Größe für eine Eizelle gestaltet die Durchführung von Manipulationsexperimenten, wie der Injektion von Proteinen oder RNA einfacher. Der weitere Vorteil des Modell-Organismus liegt in der schnellen Embryogenese, da die Embryonen unter optimalen Bedingungen bereits nach etwa 72 Stunde das Kaulquappenstadium erreicht haben und aus der durchsichtigen Gallerthülle schlüpfen. Der genaue morphologische Ablauf der Embryogenese wurde von Nieuwkoop und Faber vor ca.

30 Jahren untersucht und dokumentiert (siehe Abbildung 1-11; Nieuwkoop und Faber, 1975). Da grundlegende Abläufe während der Entwicklung bei *X. laevis* evolutionär konserviert sind, können molekulare Mechanismen und Signalwege auch auf den Menschen übertragen werden (De Robertis und Sasai, 1996). Jedoch sind die genetischen Informationen des Krallenfrosches nur zu etwa einem Drittel mit dem Menschen identisch. Das *X. laevis*-Genom umfasst ca. $3,1 \times 10^9$ bp, besteht aus 18 Chromosomen und weist eine Pseudotetraploidie auf (Olmo und Morescalchi, 1978; Hughes und Hughes, 1993).

2.5.1. Embryonalentwicklung und Musterbildung

Die Embryonalentwicklung von *Xenopus* ist weitgehend evolutionär konserviert und gliedert sich in verschiedene Entwicklungsabschnitte (siehe 2.5.1.1. – 2.5.1.5.). Die Festlegung des Körperbauplans und die Differenzierung verschiedener Gewebe während der Embryonalentwicklung werden durch die sogenannte Musterbildung (Patterning) ermöglicht. Das reife *Xenopus*-Ei zeichnet sich durch einen dunkel pigmentierten animalen Pol und einen hellen, dotterreichen vegetativen Pol aus. Das Ei ist vor der Befruchtung von der schützenden Vitellinmembran und der Gallerthülle umgeben. Im Inneren besitzt das Ei jedoch bereits vor der Befruchtung eine Polarität, welche durch die spezifische Verteilung von sog. Morphogenen bestimmt wird und somit bereits eine Möglichkeit der Musterbildung aufzeigt:

(i) Musterbildung kann durch Positionsinformationen in Zellen erreicht werden. Dies lässt sich mit dem sog. French-Flag-Modell erklären. Betrachtet man die französische Flagge, so ist diese gleichmäßig in die Farben Blau, Weiß und Rot aufgeteilt. Ebenso können einzelne Zellen entlang einer Linie, bestimmte „Markierung“ erhalten, wodurch sie sich von Nachbarzellen unterscheiden und eine Positionsinformation innerhalb der Linie erhalten. Diese Markierungen sind die Morphogene, die einen Konzentrationsgradienten aufbauen können und für die Musterbildung wichtig sind. Zu den Morphogenen zählen beispielsweise Proteine aus spezifischen Signalwegen, Transkriptionsfaktoren oder maternale mRNAs. Die einzelnen Zellen können auf bestimmte Schwellwerte der Morphogenkonzentration reagieren, d.h. bei einer hohen Konzentration kann eine Zelle das Schicksal „A“ verfolgen, während eine andere Zelle bei einer niedrigen Konzentration das Schicksal „B“ verfolgt.

(ii) Die Musterbildung kann durch sog. laterale Inhibition erreicht werden. Dies wird im Embryo dadurch erreicht, dass eine Zelle spezifische Inhibitoren sezerniert, die im nahen Umfeld der Zelle dasselbe Entwicklungsschicksal der benachbarten Zellen blockieren. Dadurch können aneinander angrenzend unterschiedliche Zelltypen entstehen.

(iii) Musterbildung kann durch eine inhomogene Verteilung von Morphogenen und einer asymmetrischen Zellteilung ermöglicht werden. Dementsprechend können aus einer Zelle zwei unterschiedliche Tochterzellen entstehen.

2.5.1.1. Befruchtung

Während der Befruchtung findet bereits eine weitere Musterbildung innerhalb der Eizelle statt. Nach Eintritt eines Spermiums am animalen Pol der Eizelle, verlässt diese daraufhin den Meiose-Arrest und vollendet die Meiose. Dabei wird auch das zweite Polkörperchen gebildet. Der Ei-Kern und der Spermien-Kern fusionieren daraufhin zum sog. diploiden Kern der Zygote. Nach etwa einer Stunde, findet eine Rotation des Ei-Cortex statt. Dies ist eine gelartige, 5 μm dicke Schicht aus Aktinfilamenten, die direkt unter der Plasmamembran lokalisiert ist. Die sog. Cortical-Rotation entsteht durch Bewegung des Cortex um 30° entgegen des starren Zytoplasmas. Diese Bewegung wird durch Mikrotubuli angetrieben und bestimmt schließlich die zukünftige dorsale Seite des Embryos, welche sich gegenüber der Spermien-Eintrittsstelle befindet. In diesem Bereich ist nun auch das sog. Nieuwkoop-Zentrum lokalisiert, das sich durch eine spezifische Zusammensetzung von Morphogenen auszeichnet (siehe Abb. 1-12). In diesem Bereich kommt es schließlich zu einer Akkumulation von β -catenin. Die Rolle des Nieuwkoop-Zentrums liegt in der Spezifizierung des zukünftigen sog. Spemann-Organisators, der ein dorsales Signal-Zentrum darstellt.

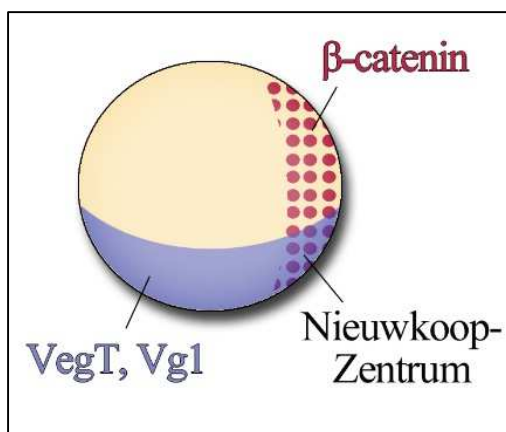


Abbildung 1-12: Morphogenverteilung nach Befruchtung und Cortical-Rotation in einem *Xenopus*-Ei. Am vegetativen Pol sind vor allem VegT und Vg1 lokalisiert. Nach Cortical-Rotation kommt es zu einer Anreicherung von β -catenin im Nieuwkoop-Zentrum.

2.5.1.2. Furchungsteilungen

Etwa 90 Minuten nach der Befruchtung findet die erste Furchungsteilung statt, welche symmetrisch und parallel zur animal-vegetativen Achse erfolgt. Im Gegensatz zur mitotischen Zellteilung findet während den Furchungsteilungen keine Synthesephase statt, wodurch die Zellen nicht wachsen und somit bei jeder weiteren Teilung immer kleiner werden.

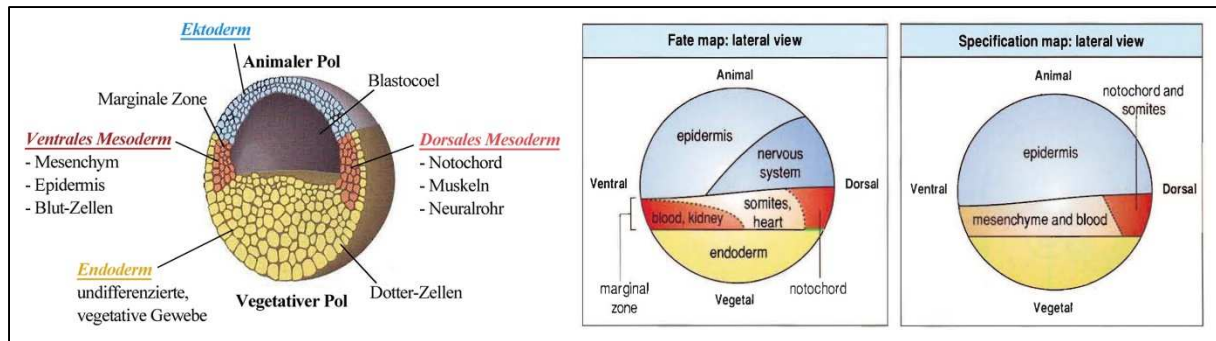


Abbildung 1-13: Zelluläre Organisation der Blastula. Schematische Darstellung des zellulären Aufbaus einer Blastula in zukünftiges Ektoderm, Mesoderm und Endoderm sowie die daraus abgeleiteten Entwicklungsschicksale. (modifizierte Abbildungen aus Wolpert, 2002).

Während die zweite Teilung anschließend den ventralen und dorsalen Teil des Embryos bestimmt, segmentiert die dritte Teilung den Embryo wiederum in eine animale und eine vegetative Hälfte. Alle Furchungsteilungen erfolgen aufeinander in einem Abstand von etwa 20 Minuten. Die dabei entstehenden Zellen werden Blastomere genannt. Nach 12 Furchungsteilungen ist die sog. Blastula entstanden (Stadium 10), welche aus mehreren Tausend Zellen und einem flüssigkeitsgefülltem Hohlraum, dem Blastocoel besteht (siehe Abb. 1-13). Während die Transkription von Genen bis zur Midblastulatransition (MBT) inhibiert ist, bleibt die Translation maternaler mRNA jedoch während der Entwicklung unberührt (Newport and Kirschner, 1982a, 1982b). Die Blastula kann nun in die drei Bereiche der zukünftigen Keimblätter Endoderm, Mesoderm und Ektoderm eingeteilt werden. Zudem können durch spezifische Verteilungen von Morphogenen (siehe Tab. 1-3), zu diesem Zeitpunkt bereits Zellpopulationen und deren Entwicklungsschicksale bestimmt werden (siehe Abb. 1-13).

Gen	Art des Proteins	Expressionslocus	Maternal (M) / Zygotisch (Z)	Funktion
<i>activin</i>	TGF- β Familie	unbekannt	Z	Induktion von Mesoderm
<i>BMP-4</i>	Transkriptionsfaktor	späte Blastula	Z	Ventralisierung von Mesoderm
<i>Brachyury</i>	Transkriptionsfaktor	frühes Mesoderm	Z	Entwicklung von Mesoderm
<i>β-catenin</i>	Gen-regulatorisches Protein	Ei	M	Dorsalisierendes Signal
<i>cerberus</i>	sekretorisch	Ei, vegetativ	Z	Inhibition von Mesoderm
<i>chordin</i>	sekretorisches Signalpeptid	Organisator	Z	Dorsalisierung von Mesoderm

<i>derriere</i>	TGF- β -Proteinfamilie	Ei, vegetativ	Z	Induktion von Mesoderm
<i>fibroblast growth factor</i>	sekretorisches Signalpeptid	Blastula	Z	Induktion von ventralem Mesoderm
<i>goosecoid</i>	Transkriptionsfaktor	Organisator	Z	Organisator-Funktion
<i>GSK-3</i>	Proteinkinase	Ei	M	Unterdrückung dorsalisierender Signale
<i>HNF-3β</i>	Transkriptionsfaktor	Organisator	Z	Organisator-Entwicklung
<i>noggin</i>	sekretorisch	Organisator	M / Z	Dorsalisierung von Mesoderm
<i>Pintallavis</i>	Transkriptionsfaktor	Organisator	Z	unbekannt
<i>siamois</i>	Transkriptionsfaktor	Blastula, dorsal	Z	Dorsalisierendes Signal
<i>VegT</i>	Transkriptionsfaktor	Ei, vegetativ	M	Induktion von Mesoderm und Mesoderm-Signalen
<i>Vg-1</i>	TGF- β Familie	Ei, vegetativ	M	Induktion von Mesoderm
<i>Xlim-1</i>	Transkriptionsfaktor	Organisator	Z	unbekannt
<i>Xnot</i>	Transkriptionsfaktor	Organisator	Z	Spezifizierung des Notochord
<i>Xnr-1</i>	sekretorisch	Ei, vegetativ	Z	Induktion von Mesoderm
<i>Xnr-2</i>	sekretorisch	Ei, vegetativ	Z	Induktion von Mesoderm
<i>Xnr-4</i>	sekretorisch	Ei, vegetativ	Z	Induktion von Mesoderm
<i>Xwnt-11</i>	Wnt-Proteinfamilie	Ei, vegetativ	M	Induktion von Mesoderm
<i>Xwnt-8</i>	Wnt-Proteinfamilie	zukünftiges Mesoderm	Z	Ventralisierung von Mesoderm

Tabelle 1-3: Übersicht der Morphogene während der *Xenopus*-Entwicklung. (zur Übersicht siehe Wolpert, 2002).

2.5.1.3. Gastrulation

Die Gastrulation beschreibt eine Reihe von Zellbewegungen, und der Ausbildung der Keimblätter. Dieser Vorgang dient der Determinierung und Positionierung zukünftiger Zellen und Gewebe und erstellt somit den Körperbauplan. Sobald die Gastrulation beginnt, wird der Embryo als Gastrula bezeichnet. Der Vorgang beginnt mit der Ausbildung Flaschen-förmiger Zellen auf der dorsalen Seite der Blastula. Dabei entsteht einerseits eine kleine Furche, welche als Blastoporus bezeichnet wird sowie andererseits animal davon gelegen, die dorsale Lippe. Letztere bestimmt später den Bereich des sog. Spemann-Organisators. Homologe des Spemann-Organisators sind der *Shield* im Zebrafisch-Embryo oder der Hensen´ Knoten während der Entwicklung des Huhns. Jede dieser Strukturen ist in der Lage eine komplett neue Körperachse zu induzieren. Daher kommt dem Spemann-Organisator eine essentielle

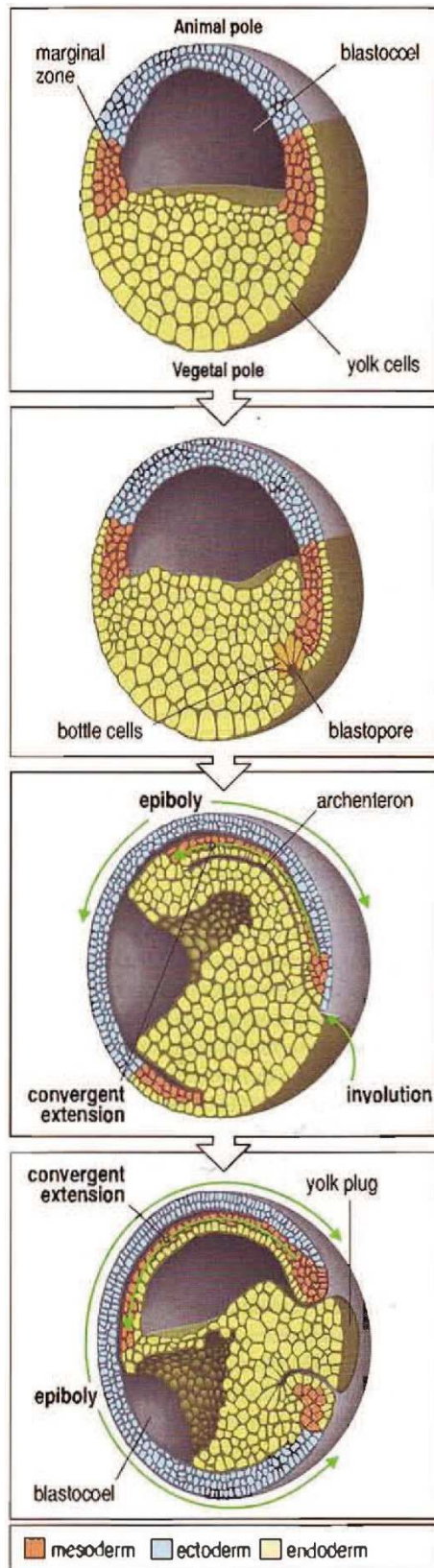


Abbildung 1-14: Schematischer Ablauf der Gastrulation und der damit verbundenen Zellbewegungen.

Erläuterungen siehe laufender Text. (Abbildung aus Wolpert, 2002).

Aufgabe bei der Koordination/Organisation der Dorso/Ventral- und Anterio/Posterior-Achse zu. Ebenso besitzt der Spemann-Organisator Funktionen zur Dorsalisierung des umliegenden Mesoderms, der Dorsalisierung des Ektoderms in neurales Ektoderms und der Bildung von Neuralplatte und Neuralrohr, die eigenständige Bildung dorsal-mesodermaler Strukturen (z.B. Chorda) sowie der Initiation der Gastrulationsbewegung selbst. Gene, die im Spemann-Organisator lokalisieren, codieren für die Transkriptionsfaktoren Brachury, Goosecoid, Pintallavis, Xlim-1 oder auch für sekretorische Proteine wie XNr-3, chordin, Xnot2, noggin, Shh und Cerberus (vgl. Tab. 1-3). Zusätzlich zum Spemann-Organisator enthält die Gastrula noch ein ventrales Signalzentrum, welches zudem Moleküle sezerniert, die dem dorsalen Organisator entgegenwirken. Dadurch wird mittels Morphogene die dorso-ventral-Achse determiniert. Während der Gastrulation bewegen sich die Lagen des zukünftigen Endoderms und Mesoderms entlang der dorsalen Lippe des Blastoporus in das Innere der Gastrula und wandern unterhalb des Ektoderms weiter entlang der anterio-posterioren Achse (siehe Abb. 1-14). Dieser Vorgang wird als Involution bezeichnet. Dagegen breitet sich das Ektoderm mittels Epibolie in Richtung des vegetativen Pols aus und umgibt schließlich fast den gesamten Embryo (vgl. Abb. 1-14). Während der Gastrulation entwickelt sich das dorsale Mesoderm zudem in zwei Strukturen weiter, dem Notochord und den Somiten. Während das Notochord

eine steife, stabförmige Struktur darstellt, werden die Somiten durch paarige anterio-posteriore Segmentierung des Mesoderms beidseitig des Notochords gebildet.

2.5.1.4. Neurulation

Während der Neurulation wird ausgehend vom Ektoderm der Neuralplatte das sog. Neuralrohr gebildet, das den embryonalen Vorläufer des Zentralen Nervensystems darstellt. Der Embryo wird zu diesem Zeitpunkt als Neurula bezeichnet.

Zur Musterbildung des Ektoderms und zur Induktion des Zentralen Nervensystems sind zwei Mechanismen und Signalwege von Bedeutung, der BMP- und der Wnt/ β -catenin-Signalweg. Dabei erfordert die Bildung neuraler Gewebe die Blockierung des BMP-Signalwegs durch Inhibitoren (bsp. Chordin, Noggin, Follistatin) aus dem, unter dem Ektoderm gelegenen Mesoderm (vgl. auch Abb. 1-14, unten). Die Differenzierung zu neuralen Geweben ist dabei der Standard-Weg (*Neural-Induction Default-Model*). Eine Induktion von Vorläuferstrukturen des Gehirns benötigt zusätzlich noch die Blockierung des Wnt-Signalwegs durch Wnt-Inhibitoren, welche aus dem Mesoderm sezerniert werden (z.B. Cerberus, Frzb, Dickkopf).

Zu Beginn der Neurulation, bilden sich sog. Neuralfalten an den Rändern der Neuralplatte. Diese erheben sich anschließend, während sich die Neuralplatte gleichzeitig absenkt. Schließlich falten sich die Neuralfalten zusammen und fusionieren zum Neuralrohr, welches nachfolgend unter die Epidermis absinkt. Der anteriore Bereich des Neuralrohrs entwickelt sich dann während der Organogenese zum Gehirn des Embryos.

2.5.1.5. Organogenese

Nach der Gastrulation und der Neurulation ist die Ausrichtung und Positionierung aller Keimblätter abgeschlossen und es beginnt die Entwicklung definierter Gewebe und Organe. Die Somiten werden nun in zwei Regionen unterschieden: die dorsale Region, des sog. Dermatome entwickelt sich dabei weiter zur Dermis. Der Rest der Somiten entwickelt sich zur Wirbelsäule und den Muskeln des Rumpfes. Das unsegmentierte Platten-Mesoderm, welches lateral und ventral zu den Somiten liegt, entwickelt sich zu Herz, Niere, Gonaden und der Darmmuskulatur. Das ventral lokalisierte Mesoderm entwickelt sich dagegen zu den Blutzellen. Das Endoderm entlang des Darms bildet nun die Leber und Lungen. Weitere interne Strukturen entwickeln sich aus den sog. Neuralleistenzellen. Diese sind während der Bildung des Neuralrohrs an der Spitze der Neuralfalten entstanden und wanderten als einzelne Zellen zwischen die mesodermalen Gewebe. Aus den Neuralleistenzellen entstehen während der Organogenese das sensorische und autonome Nervensystem sowie Schädelknochen und Pigmentzellen (Melanozyten).

Nach Ende der Organogenese schlüpft die sog. Kaulquappe aus der Gallerthülle und beginnt zu schwimmen. Nun findet und vor allem Größenwachstum statt. Im späteren Verlauf der *Xenopus*-Entwicklung vollzieht die Kaulquappe die Metamorphose zum adulten Frosch, während dieser der Schwanz zurück- und die Extremitäten ausgebildet werden.

2.6. Zielsetzung der Arbeit

Mutationen in Genen, welche für integrale Proteine der inneren Kernhülle codieren, sind mit einer zunehmenden Anzahl genetischer Erkrankungen verbunden, welche Envelopathien genannt werden. Dies zeigt sich anhand von Mutationen in Genen, welche für Mitglieder der LEM-Domänen Proteine codieren. Der Großteil der Envelopathien zeigt eine gewebespezifische Pathologie, jedoch ist die funktionelle Rolle der betroffenen Proteine bis dato kaum verstanden. In diesem Sinne sollten in der vorliegenden Arbeit die Funktionen der LEM-Domänen Proteine MAN1 und Emerin während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* untersucht werden. In diesem Zusammenhang wurde ein Knockdown von MAN1 mittels Mikroinjektion spezifischer Morpholinos zu Beginn der Embryonalentwicklung durchgeführt. Anschließend wurden die Effekte des MAN1-Knockdowns auf die weitere Entwicklung untersucht.

Zur weiteren Analyse der Funktionen der LEM-Domänen Proteine, wurden zudem Rescue-Experimente durchgeführt, die das Ziel hatten mögliche Effekte des MAN1-Knockdowns durch Expression anderer LEM-Domänen Proteine aufzuheben. Hierzu wurde das Protein Emerin gewählt, da es (i) während der frühen *Xenopus*-Entwicklung nicht synthetisiert wird und dessen Translation erst ab der späten Organogenese (Stadium 41) beginnt. (ii) Ebenso wurden überlappende / gemeinsame Funktionen zwischen MAN1 und Emerin vermutet wurden. In diesem Kontext war es auch erforderlich, potentielle Interaktionen beider Proteine zu untersuchen.

Da vorangegangenen Experimente zeigten, dass MAN1 vermutlich essentielle Aufgaben für die korrekte Zellteilung besitzt, sollte die Funktion von MAN1 während der in vitro Bildung von Kernen untersucht werden. In diesem Sinne wurde die Bildung der Kernhülle nach Antikörper-vermittelter Inhibierung der MAN1-Funktionen, näher untersucht. Ebenso sollten weitergehende Analysen einen Einblick in die intrazelluläre Lokalisation der XMAN1/Xemerin-Interaktionen in Interphase-Kernen sowie während der Mitose ermöglichen.

Entsprechende Resultate können einerseits die physiologische Funktion der LEM-Domänen Proteine aufzeigen und andererseits dadurch ein besseres Verständnis der Pathologie von Envelopathien geben.

3. Material

3.1. Biologisches Material

3.1.1. Versuchstiere

Die südafrikanischen Krallenfrösche *Xenopus laevis* wurden von einer französischen Zuchtfarm erworben (Xenopus Express France, F43270 Vernassal, www.xenopus.com). Dabei wurden vorwiegend aus Südafrika importierte Wild-Typen geordert (Weibchen: IMP XL FM; Männchen: IMP XL M). Alternativ stammten kleiner Exemplare zur Ovarentnahme aus der institutseigenen Nachzucht.

3.1.2. Bakterienstämme

Zur Transformation von Plasmid-DNA kam ausschließlich der Bakterienstamm *E.coli* XL 1-Blue zur Verwendung.

3.1.3. Zelllinien

XLKE-A6: (*Xenopus laevis* kidney epithelium, line A6, American Type Culture Collection)

Diese Zelllinie stammt aus Nierenepithelgewebe von *Xenopus laevis*. Die Kultivierung der Zellen erfolgte mit DMEM-Komplettmedium (4.4.1.2.) bei 27°C und 5% Kohlendioxid.

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

3.1.4. Antikörper

3.1.4.1. Primärantikörper

Primärantikörper				
Antigen	Antikörper	Typ	Verdünnung	Quelle
<i>Xenopus laevis</i> MAN1	gp#2, Serum	polyklonal, Meerschwein	<u>IF / WB</u> : 1:100	Prof. Dr. Georg Krohne
<i>Xenopus laevis</i> MAN1	gp#1, Serum	polyklonal, Meerschwein	<u>IF</u> : 1:100	Prof. Dr. Georg Krohne
<i>Xenopus laevis</i> MAN1	gp#1, affinitätsgereinigt	polyklonal, Meerschwein	<u>IF</u> : 1:25, <u>PLA</u> : 1:7	
<i>Xenopus laevis</i> Xemerin	59/7, Serum	polyklonal, Maus	<u>WB</u> : 1:10, <u>IF</u> : unverdünnt	Prof. Dr. Hanswalter Zentgraf
<i>Xenopus laevis</i> Xemerin	59/9, Serum	polyklonal, Maus	<u>IF</u> : 1:5 (Quetschpräparate)	Prof. Dr. Hanswalter Zentgraf
<i>Xenopus laevis</i> Xemerin	59/9, gereinigt / konzentriert	polyklonal, Maus	<u>IF</u> : 1:25, <u>PLA</u> : 1:7	
Penta-His-Taq	anti-His	monoklonal, Maus	<u>WB</u> : 1:500	Qiagen
Nukleoporin gp 62	anti-gp62	polyklonal , Meerschwein	<u>IF</u> : 1:1.000	Ewald et al., 1997
α -Tubulin	anti- α -Tubulin	monoklonal, Maus	<u>WB</u> : 1:10.000, <u>IF/PLA</u> : 1:1.000	Sigma
γ -Tubulin	anti- γ -Tubulin	monoklonal, Maus	<u>IF/PLA</u> : 1:50 (Final 1:5.000)	Sigma
Barrier-to-autointegration- factor (BAF)	anti-BAF 3273	polyklonal, Kaninchen	<u>WB</u> : 1:1.000, <u>IF/PLA</u> : 1:100	Merck
<i>Xenopus laevis</i> LAP2 (Lamin- assoziiertes Polypeptid 2)	anti-XLAP2	Kaninchen	<u>IF</u> : 1:100, <u>PLA</u> : 1:500	Prof. Dr. Georg Krohne
<i>Xenopus laevis</i> Lamin A/B1	X167	monoklonal, Maus	<u>IF</u> : 1:100, <u>PLA</u> : 1:200	Prof. Dr. Georg Krohne
<i>Xenopus laevis</i> Lamin A/C	X94/7	monoklonal, Maus	<u>PLA</u> : 1:500	Prof. Dr. Georg Krohne
<i>Xenopus laevis</i> Lamin LII	X223	monoklonal, Maus	<u>PLA</u> : 1:500	Lourim at al., 1996
<i>Xenopus laevis</i> Lamin-B- Rezeptor	anti-XLBR (AK I +II)	polyklonal, Meerschwein	<u>IF</u> : 1:500, <u>PLA</u> : 1:400	Dreger et al., 2002
Desmin	anti-Desmin	monoklonal, Maus	<u>WMIL</u> : 1:13, <u>WMIF</u> : 1:20	Sigma
Cardiac Troponin T	CT3	polyklonal , Maus	<u>WMIF</u> : 1:10	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)
Typ-VI-Collagen	MF20	polyklonal , Maus	<u>WMIF</u> : 1:20	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)

Tabelle 3-1: Verwendete Primärantikörper; WB = Westernblot, IF = Immunfluoreszenz, WMIL = Whole mount Immunlokalisation, WMIF = Whole mount Immunfluoreszenz, PLA = Proximity-Ligation-Assay

3.1.4.2. Sekundärantikörper

Sekundärantikörper		
Antikörper	Verdünnung	Quelle
anti-Maus-Peroxidase	<u>WB</u> : 1:5.000, <u>WMIL</u> : 1:3.750	Dianova
anti-Meerschwein-Peroxidas	<u>WB</u> : 1:13.000	Dianova
anti-Kaninchen-Peroxidase	<u>WB</u> : 1:7.500	Promega
anti-Kaninchen-DTAF	<u>IF</u> : 1:50	Dianova
DyLight-Antikörper (DL488, DL549, DL594)	<u>IF</u> : 1:100, <u>WMIF</u> : 1:200	Dianova
Alexa-Fluor-Antikörper (Alexa Fluor 488, 549, 594)	<u>IF</u> : 1:100, <u>WMIF</u> : 1:200-1:1.000	Dianova
Cy2-gekoppelte Antikörper	<u>IF</u> : 1:50	Dianova
Texas-Red-gekoppelte Antikörper	<u>IF</u> : 1:50	Dianova

Tabelle 3-2: Verwendete Sekundärantikörper; WB = Westernblot, IF = Immunfluoreszenz, WMIL = Whole mount Immunlokalisation, WMIF = Whole mount Immunfluoreszenz

3.2. Molekularbiologisches Material

3.2.1. Plasmidvektoren

3.2.1.1. pQC-6xHis, Prof. Dr. Zentgraf, Heidelberg

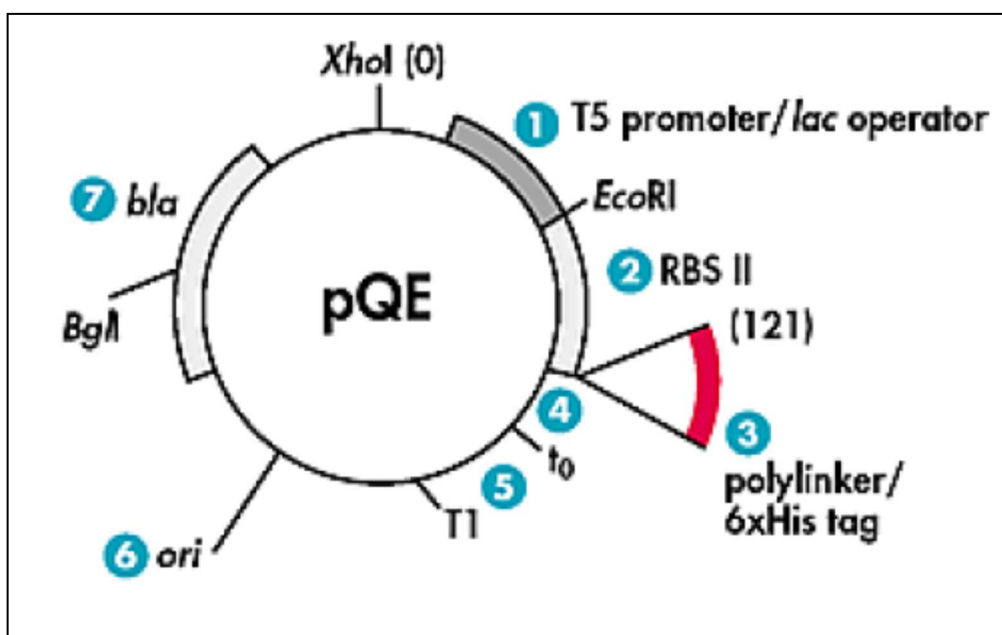


Abbildung 3-1: Karte des Plasmid-Vektors pQE, dessen Derivat pQC-6xHis zur Anwendung kam.

Der Expressionsvektor pQC-6xHis ist ein Derivat des kommerziell erhältlichen Vektors pQE-8 der Firma Qiagen GmbH (Hilden). Der Vektor wurde im Labor von Prof. Dr. Hanswalter Zentgraf so verändert, dass am C-Terminus des exprimierten Proteins ein Histidin-Tag angefügt wird, das aus sechs aufeinander folgenden Histidinresten besteht. Der Vektor wurde ausschließlich für die bakterielle Expression von Hexahistidin-Fusionsproteinen verwendet, da die Expression durch Zugabe des Allolaktose-Analogons IPTG gezielt induziert werden kann. Zur Selektion besitzt der Vektor eine Ampicillin-Kassette.

3.2.1.2. pCMV-Sport6

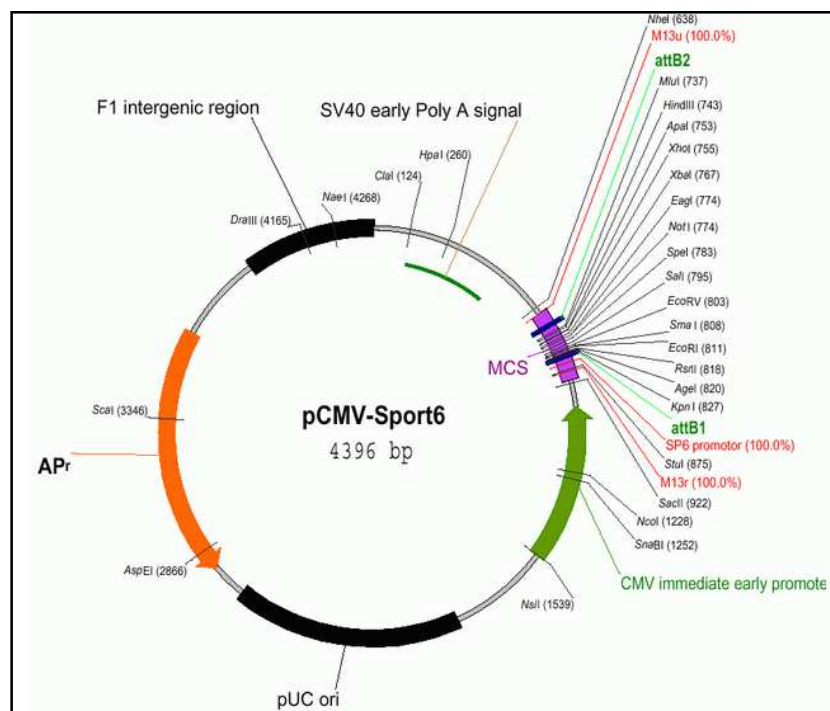


Abbildung 3-2: Karte des Plasmid-Vektors pCMV-Sport6

Dieses Plasmid fungierte zunächst als Ausgangs-Vektor, in welchen die cDNA-Sequenz für Xemerin1 kloniert war. Der Vektor wurde über die Firma Source Bioscience Lifesciences (Nottingham, Großbritannien) im Rahmen des EST-Klons für Xemerin1 bezogen.

Dieser Vektor wurde zudem dazu verwendet um verschiedene Xemerin1-Konstrukte zu inserieren. Da der Vektor eine T7-Polymerase-Promotorsequenz besitzt, wurden die Vektor-Konstrukte anschließend zur *in vitro* Synthese der entsprechenden mRNAs verwendet. Zur Selektion positiver Klone besitzt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz-Kassette.

3.2.1.3. pCS111

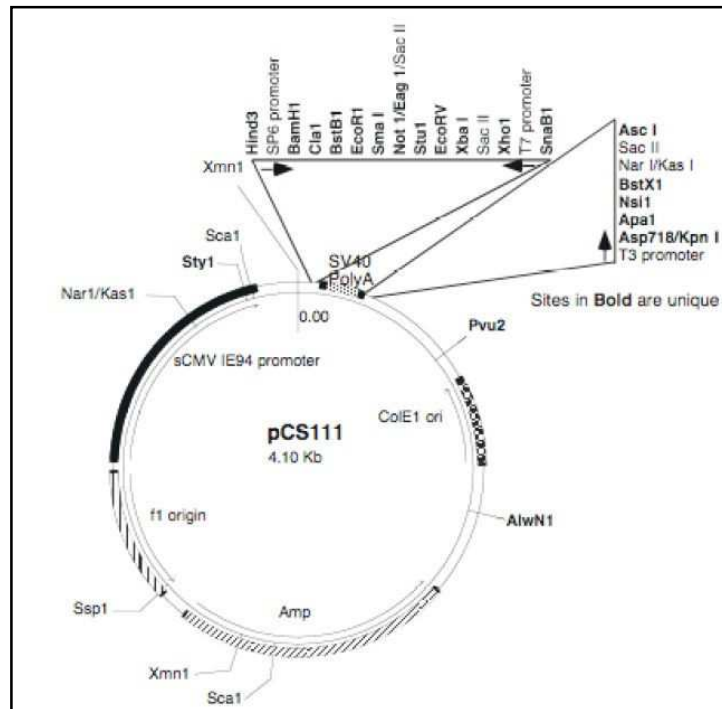


Abbildung 3-3: Karte des Plasmid-Vektors pCS111

Dieser Vektor fungierte als Ausgangs-Plasmid, in das die vollständige cDNA-Sequenz für XMAN1 kloniert war. Der Vektor wurde ebenfalls im Rahmen des EST-Klons für XMAN1 über die Firma Source Bioscience Lifesciences (Nottingham, Großbritannien) bezogen. Zur Selektion besitzt dieser Vektor eine Ampicillin-Resistenz-Kassette.

3.2.2. EST-Klone

Alle EST-Klone wurden über die Firma Source Bioscience Lifesciences (Nottingham, Großbritannien) bezogen.

Xemerin1:

ID: IMAGp998F069476Q; IMAGE ID: 4174469/LLAM9476F6

Vektor: pCMV-Sport6

Restriktionsenzyme (kloniert): 5s: SalII, 3s: NotI

XMAN1:

ID: IRAKp961B08324Q; IMAGE ID: 8534370/AK324B8

Vektor: pCS111

Restriktionsenzyme (kloniert): 5s: SmaI, 3s: NotI

3.2.3. Oligonukleotide

3.2.3.1. Primer

Die Nukleotidsequenzen der, in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden entweder selbst entworfen oder über Operon.com ermittelt. Bezogen wurden die Primer schließlich von der Firma biomers.net GmbH (Ulm) in Kartuschen-gereinigter Qualität. Eine Übersicht aller verwendeten Primer ist im Anhang (siehe 8.4.) einsehbar.

3.2.3.2. Morpholino-Oligonukleotide

Alle Morpholino-Oligonukleotide wurden über die Firma Gene Tools, LLC (Philomath, USA) bezogen.

Name	Target	Sequenz	Funktion
MAN1-MO	<i>Xenopus laevis</i> MAN1	GGCCGCCATTTTGACCACTCGGTAG	Translations-Block
MO-XMAN1	<i>Xenopus laevis</i> MAN1	GCCGCCATTTTGACCACTCGGT	Translations-Block
MO-5mm-XMAN1	<i>Xenopus laevis</i> MAN1	GaCGCaATTTTaACCAaTCaGT	Spezifische Negativ-Kontrolle
MO-BAF	<i>Xenopus laevis</i> Barrier-to-autointegration factor (BAF)	TTCCCGCCAAGTCCCGAACA	Translations-Block
MO-5mm-BAF	<i>Xenopus laevis</i> Barrier-to-autointegration factor (BAF)	TTaCCGCaAACTaCCaCCGAAaA	Spezifische Negativ-Kontrolle
MO-Co	Humane beta-Globin Intron-Mutation	CCTCTTACCTCAGTTACAATTATA	Unspezifische Negativ-Kontrolle

Tabelle 3-3: Zur Mikroinjektion verwendete Morpholino-Oligonukleotide.

3.2.4. Enzyme

AmpliTaq® 360 DNA-Polymerase	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Diverse Restriktionsenzyme	Fermentas
DNase, rekombinant, RNase-frei	Roche, Mannheim
Phusion™ - High-Fidelity-DNA-Polymerase	Fermentas
RNase A	Serva, Heidelberg
T4-DNA-Ligase	Fermentas
Taq-DNA-Polymerase	Institutseigene Herstellung
Trypsin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe

3.2.5. Größenstandards

FastRuler Middle Range	Fermentas
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas
Precision Plus Protein™ Standard, Dual Color	Bio-Rad, München

3.2.6. Reaktions-Kits

Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
NucleoSpin® Plasmid-Miniprep-Kit	Macherey-Nagel, Düren
Duolink® II In Situ PLA™ - Kit	Olink Bioscience, Uppsala, Schweden
Duolink® II In Situ Probemaker - Kit	Olink Bioscience, Uppsala, Schweden
Merckognost (Harnstoff-Teststreifen)	DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim
NucleoSpin® Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
RNeasy Mini-Kit	Qiagen, Hilden
mMESSAGE mMACHINE®-T7-Kit	Ambion/Life Technologies GmbH, Darmstadt
Poly(A)-Tailing-Kit	Ambion/Life Technologies GmbH, Darmstadt
RevertAid First Strand cDNA-Synthesis Kit	Fermentas
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Protein-A-Sepharose	Amersham, Braunschweig

3.3. Zellkultur-Material

Alle Zellkulturmedien wie DMEM- oder RPMI-Medium sowie Fötale Kälberserum (FCS, fetal calf serum), PenStrep (10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin), 0,05% Trypsin-EDTA wurden über die Firma GIBCO (Invitrogen, Karlsruhe) bezogen.

Kulturflaschen und –schalen sowie andere Plastikwaren wurden über die Firmen TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz), Sarstedt (Nümbrecht) oder Greiner Labortechnik (Frickenhausen) geordert.

3.4. Chemikalien

Chemikalien und Lösungen wurden, falls nicht anders im Text vermerkt, von den Firmen Applichem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) oder Fermentas / Thermo Scientific (Schwerte) bezogen.

3.5. Sonstiges Material

Für Westernblots verwendete Whatman Filterpapiere sowie Nitrocellulose Whatman® (Porengröße 0,45 µm) stammten von der Firma Schleicher und Schuell Protran® und wurden über die Firma Hartenstein (Würzburg) bezogen. Zur Entwicklung von Westernblots wurden Röntgenfilme der Firma Agfa (Agfa Cronex 5) verwendet.

3.6. Geräte

Apparatur zur Herstellung von Mikroinjektionsnadeln	Bachofer, Reutlingen
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
„BlackBeauty“ (Mikroskop-Bundle)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Bruker WB750, 17,5T Wide-bore Magnet	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten
Bruker AVANCE™ Spektrometer	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten
Brutschrank 37°C/Schüttler TH25	Bühler, Tübingen
Cytospin 2-Zentrifuge	Shandon, Frankfurt
Digitalkamera Leica EC3	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Drehtisch REAX 2	Heidolph, über Hartenstein, Würzburg
Eismaschine AF10	Scotsman, über Hartenstein, Würzburg
Elektrophorese-System	Bio-Rad, München
Elektrophorese-System für Minigele (Modell 45-1010-i)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektrophorese-System für Großgele	Cti, über Hartenstein, Würzburg
Elektrophorese-System für 2D-Gele (Modell 175, Tube Cell)	Bio-Rad, München
Elektronenmikroskop Zeiss EM10	Zeiss, Oberkochen
Feinwaage AC100	Mettler, Gießen
Flachbrettscanner, V700 PHOTO	Epson Deutschland GmbH, Meerbusch
Fluoreszenzmikroskop Axiophot HB050 mit Quecksilberlampe	Zeiss, Oberkochen
Gefriermikrotom 2800 Figocut E	Reichert-Jung
Graphit-Blotkammer	LMS, über Hartenstein, Würzburg
Heizblock	Liebisch, über Hartenstein, Würzburg
iMIC-Mikroskop	TILL Photonics, Gräfelfingen
Konfokales Laserscanning Mikroskop (CLSM)	Leica Lasertechnik GmbH, Heidelberg
Kühlschrank 4-8°C	Liebherr, Biebrach
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge Megafuge 16R	Haraeus-Christ, Osterode
Kühlzentrifuge Minifuge RF und T	Haraeus-Christ, Osterode
Laborwaage PM4600 Delta Range®	Mettler, Gießen
Lichtmikroskop (Zellkultur)	Leitz, Wetzlar
Magnetrührer M35	GLW, Würzburg
Mikroinjektionsapparatur	Brinkmann Instrumentalbau, Mannheim
Mikroskop Olympus CX41RF	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg

Material

Mikrowelle „Classic Collection“	Samsung, über Hartenstein, Würzburg
Netzgerät, stabilisiert	Fischer, über Hartenstein, Würzburg
pH-Meter pH 523	WTW, über Hartenstein, Würzburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Power-Supply EV215	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Kolbenpumpe MS-Reglo	Ismatec SA, Glattbrugg, Schweiz
Rolltisch RM5	Hecht KG, über Hartenstein, Würzburg
Rotor RW20	Janke & Kunkel, IKA-Werk GmbH, Staufen
Schüttler Certomat R und S	B. Braun Biotech international, über Hartenstein, Würzburg
Schwenktisch WS-10	Bühler, über Hartenstein, Würzburg
Sonifier B12	Branson Sonic Power Company, über Gerhard Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Stereomikroskop Wild M8	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Stereomikroskop MZ 16 FA	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Stereolampe KL1500	Schott AG, Mainz
Thermocycler Cyclone 25	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Tierkühlschrank (-20°C)	Privileg, Quelle
Tiefkühltruhe (-70°C) C585	New Brunswick Scientific
Tischzentrifuge	Hettich, über Hartenstein, Würzburg
Tischzentrifuge Spectrafuge Mini	Labnet International Inc., Woodridge
Ultra-Thurax®	Bachhofer, Reutlingen
Ultramikrotom EM UC7	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Ultramikrotom RMC MT-7000	Köttermann GmbH, Uetze/Hänigsen
UV-Transilluminator Typ IL-350.M	Bachhofer, Reutlingen
Vortexer Vortex Genie 2™	Bender&Hobein AG, über Hartenstein, Würzburg
Wasserbad WNE 14	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Zellkultur Sterilbank ESCO ClassII BSC	Bezogen über Dietmar Müller Labortechnik, Windhagen
Zellkultur Inkubator (A6-Zellen)	Nalge Nunc, Wiesbaden-Biebrich
Zellkultur Inkubator (Hela-Zellen)	Binder, Tuttlingen
Zellkultur Wasserbad	GFL (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel)

4. Methoden

4.1. Mikrobiologische Methoden

Die Kultivierung von Bakterien dient einerseits zur Vermehrung der Bakterien selbst, wie auch der Amplifikation von Plasmid-Vektoren, welche in Bakterien transformiert wurden. Dabei müssen die Bakterien bei Flüssigkulturen (Übernacht-/Glycerinkulturen) in LB-Medium (lysogeny broth medium) kultiviert werden um ihnen alle notwendigen Nährstoffe bereitzustellen. Ebenso müssen dem Medium zur Selektion von Fremdbakterien oder von Bakterien ohne erfolgreich transformiertem Plasmid-Vektor, Antibiotika zugegeben werden.

Um Bakterien dauerhaft zur Verfügung zu stellen, werden Glycerinkulturen hergestellt, welche dann bei -70°C aufbewahrt werden können. Bei allen nachfolgend beschriebenen Methoden ist auf eine durchgehend sterile und keimfreie Umgebung sowie Arbeitsweise zu achten.

4.1.1. Flüssigkultur von Bakterien

Lösungen:

LB-Medium:

10 g NaCl
10 g Bacto™ Trypton
5 g Hefe-Extrakt
→ add 1 L $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$; pH 7,5 (NaOH)
→ autoklavieren

Antibiotika-Stammlösungen:

100 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ Ampicillin
50 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ Kanamycin
15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ Tetracyclin

Durchführung:

Für eine Übernachtskultur wurden 10-15 ml LB-Medium in ein 50 ml-Falconröhrchen überführt und zur Selektion der Bakterien das Antibiotikum Ampicillin oder Kanamycin (je nach Resistenzkassette des transformierten Plasmid-Vektors) in einer entsprechenden Endkonzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zugegeben. Zur Animpfung des Mediums wurden die entsprechenden Bakterienklone einer Selektionsplatte bzw. einer Glycerinkultur mit einer keimfreien Pipettenspitze aufgenommen und diese in das Röhrchen geworfen. Um ein optimales Wachstum der Bakterien zu gewährleisten, wurden diese bei 37°C und 200 Umdrehungen pro Minute (rpm) für etwa 15 Stunden inkubiert.

4.1.2. Glycerinkultur

Glycerinkulturen wurden zum Aufbewahren von transformierten Bakterienzellen über einen längeren Zeitraum verwendet. Hierfür wurden 700 μl einer Übernachtskultur sowie 300 μl des Frostschutzmittels Glycerin in ein Eppendorfgefäß gegeben. Die Glycerinkultur wurde anschließend durch Invertieren gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

4.1.3. Bestimmung der Bakteriendichte einer Flüssigkultur durch Photometrische

Messung

Zur Bestimmung der Zelldichte wurde der Extinktionskoeffizient einer Bakterienlösung bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Dabei entspricht eine optische Dichte (OD) von 1, bei einer Messküvette mit einer Dicke von einem Zentimeter, annähernd 8×10^8 Zellen pro Milliliter. Als Referenzwert wurde steriles LB-Medium eingesetzt.

4.1.4. Herstellung von LB-Agar-Selektionsplatten

Für die Herstellung von LB-Agar-Selektionsplatten wurde 1% (w/v) Agar-Agar in unsteriles LB-Medium eingewogen und diese Suspension autoklaviert. Nachdem die Lösung auf etwa 50°C abgekühlt war, wurde das entsprechende Antibiotikum zugegeben, wobei die Endkonzentration bei Ampicillin 100 µg/ml und bei Kanamycin 50 µg/ml entsprach (Tetracyclin: 15 µg/ml). Anschließend wurde die Lösung in sterile Petrischalen gegossen und die Lösung bei Raumtemperatur vollständig polymerisiert. Nach Festwerden der Lösung wurden die Schalen um 180° gewendet um ein mögliches Herabtropfen von Kondenswasser auf das Medium zu vermeiden. Die Selektionsplatten konnten für mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden.

Um das Bakterienwachstum auf den Selektionsplatten zu ermöglichen, wurden etwa 100 µl einer Flüssigkultur auf die Platte pipettiert und mit einem abgeflamten Drygalski-Spatel ausplattiert. Alternativ zu dieser Methode können Bakterien ebenso mit einer ausgeglühten Impföse auf einer Selektionsplatte ausgestrichen werden.

4.1.5. Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen

Die Zellmembran von Bakterien stellt eine Barriere zu ihrer Umwelt dar. Daher muss diese, als Lipiddoppelschicht aufgebaute Membran dahingehend modifiziert werden, sodass es ermöglicht wird Fremd-DNA wie z.B. Plasmide aus der Umgebung aufzunehmen. Dies geschieht durch chemische Modifikation (Chung et al, 1989).

Lösungen:

LB-Medium: (siehe 4.1.1.)

TSS (Transformation and Storage Solution): LB-Medium
+ 10% (w/v) PEG 3350
+ 5% (v/v) DMSO
+ 50 mg Mg²⁺ (MgSO₄ oder MgCl₂)
→pH 6,5
→sterilfiltrieren und Lagerung bei -20°C

Durchführung:

Der gewünschte Bakterienstamm (hier *E.coli* XL1-blue) wurde zunächst mit einer sterilen Impföse aus einer Glycerinkultur auf einer Selektionsplatte ausgestrichen (z.B. bei XL1-blue: 15 µg/ml Tetracyclin). Nach einer Inkubation der Selektionsplatte für etwa 12 Stunden bei 37°C, wurde eine Einzelkolonie gepickt und eine Übernachtskultur (4.1.1.) angeimpft. Am Folgetag erfolgte die Animpfung von Selektionsmedium mit der Übernachtskultur. Dabei wurden pro 250 ml Medium 25 ml der Übernachtskultur verwendet. Die Bakterien wurden dann für etwa vier Stunden bei 37°C und 200rpm kultiviert bis eine OD₆₀₀ von 0,7 bis 0,8 erreicht war. Die Zellen wurden dann für 10 Minuten bei 1000 x g und 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 2,5 ml eiskaltem TSS resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde schließlich á 100 µl in vorgekühlte Eppendorfcaps aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -70°C.

4.1.6. Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Zunächst wurden 100 µl chemisch kompetente Bakterien (*E.coli* XL 1-Blue) auf Eis aufgetaut und mit Plasmid-DNA aus einem Ligationsansatz (siehe 4.2.11.3.) vermischt. Dieses Gemisch wurde nun für 60 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dann für 75 Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen und anschließend erneut für 2 min auf Eis gestellt. Zu diesem Ansatz wurden nachfolgend 900 µl LB-Medium ohne Antibiotika-Zusätze pipettiert und für 60 min bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. 100 µl dieses Gemisches wurden dann auf einer LB-Agar-Selektionsplatte mit einem Drygalski-Spatel ausplattiert (≡ 1:10-Platte). Die Selektionsplatten enthielten dabei nun das entsprechende Antibiotikum, welches gegen das jeweilige Antibiotika-Resistenzgen des Plasmid-Vektors gerichtet war. Der restliche Ansatz wurde eine Minute bei 1000 x g zentrifugiert und der Überstand bis auf 100 µl abgenommen. Das Bakterienpellet wurde schließlich in den verbleibenden 100 µl Überstand resuspendiert und ebenfalls auf einer Selektionsplatte ausplattiert (≡ 9:10-Platte). Die Kultivierung der Bakterienzellen erfolgte bei 37°C für 12 Stunden.

4.2. Molekularbiologische Methoden

4.2.1. Isolierung von RNA aus Embryonen mittel RNeasy Mini-Kit

Die Isolierung von RNA mittels dem RNeasy Mini-Kit der Firma Qiagen (Qiagen N.V., Hilden) ermöglicht es, RNA aus einer geringen Menge von Ausgangsmaterial wie Zellen, tierischen Geweben oder Bakterien effektiv zu extrahieren. Es können dabei Ausbeuten von bis zu 100 µg Gesamt-RNA erzielt werden. Darüber hinaus eignet sich dieses Reaktionskit vor allem für die Aufreinigung von in vitro synthetisierter RNA. Die so erhaltene RNA kann nachfolgend für weiterführende Experimente wie der RT-PCR (siehe 4.2.5.) oder der cDNA-Synthese (siehe 4.2.5.) eingesetzt werden. Voraussetzung für eine erfolgreiche Isolierung ist die Konservierung der RNA in den entsprechenden Proben. Hierfür wurde das Reagenz „RNA-later“ herangezogen, welches zum einen für die Stabilisierung der RNA in

den Proben sorgt und zum anderen den Zustand bestimmter RNA-abhängiger Prozesse konserviert um sichere Genexpressions-Analysen zu gewährleisten. *RNA-later* wurde hier vor allem zur Stabilisierung von RNA in Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien verwendet, wobei jeweils 5 Embryonen in 300 µl des Reagenz inkubiert wurden. Bis zur weiteren Prozessierung konnten die Proben etwa eine Woche bei Raumtemperatur, 4 Wochen bei 4°C oder auch für längere Zeit bei -20°C gelagert werden.

Vor einer RNA-Isolierung wurden alle Arbeitsmittel mit RNaseZAP™ (Sigma-Aldrich, München) behandelt um eine Kontamination mit RNasen auf Glass- oder Plastikoberflächen zu vermeiden. Bei der Isolierung von RNA mit Hilfe des RNeasy Mini-Kits wurden die Zellen und Gewebe zunächst durch Guanidine-Thiocyanat-haltige Reagenzien lysiert und homogenisiert. Dabei kommt es auch zu einer Inaktivierung von RNasen, welche andernfalls zu einem Abbau der RNA führen würden. Durch Zugabe von Ethanol werden optimale Bedingungen geschaffen um RNA mit einer Mindestgröße von 200 Basen an eine Silica-Membran zu binden. Dies führt zu einer Anreicherung von mRNA (Messenger-RNA), da RNAs kleiner als 200 Basen (z.B. rRNA, 5S-rRNA und tRNAs) herausselektiert werden. Zahlreiche nachfolgende Waschschrte dienen der Entfernung unerwünschter Kontaminationen wie Proteine oder DNA. Abschließend kann die RNA mittels RNase-freiem Wasser und Zentrifugation von der Membran eluiert werden. Die Isolierung von RNA aus Embryonen wurde strikt nach Herstellerprotokoll durchgeführt, wobei die RNA in der Regel in 35 µl RNase-freiem Wasser eluiert wurde.

4.2.2. Plasmid-DNA Isolierung via NucleoSpin® Plasmid-Miniprep-Kit

Diese Methode besteht aus einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen mittels NaOH und SDS (Puffer A2) sowie der Neutralisation des Lysats mittels Guanidin-Hydrochlorid (Puffer A3). Endogene DNA und Proteine werden dabei präzipitiert und können pelletiert werden. Ebenso werden wie bei der RNA-Isolierung Hochsalz-Bedingungen geschaffen, welche eine Absorption der DNA an eine Silikagel-Matrix ermöglichen. Dabei kommt es zu keiner Fällung der DNA, sondern zu einer Bindung an die Matrix. Kontaminationen wie Salze, Metabolite oder Makromoleküle können durch Zentrifugation mit Ethanol-haltigen Lösungen (Puffer A4) herausgewaschen werden. Abschließend wird die DNA mit H₂O_{steril} eluiert.

Alle Lösungen (Puffer A1/RNase A, Puffer A2, A3, AW sowie DNA-Waschpuffer A4) waren bereits in dem Miniprep-Kit der Firma Macherey-Nagel enthalten (NucleoSpin® Plasmid, Macherey-Nagel, Düren), wobei der DNA-Waschpuffer zusätzlich mit 100 % Ethanol komplettiert werden musste. Ausgehend von 10 ml Übernachtskultur wurde die Isolation nach dem Herstellerprotokoll für Low-Copy-Plasmide durchgeführt und die Plasmid-DNA in 35 µl H₂O_{steril} eluiert. Die Plasmid-DNA wurde schließlich direkt weiter verwendet oder bei -20°C gelagert.

4.2.3. Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren (dsDNA oder RNA) bzw. deren Ausbeute nach einer Plasmid-DNA-Minipreparation wurde durch Absorptionsmessung photometrisch ermittelt. Um die Konzentration der Nukleinsäure-Lösung zu bestimmen wurde diese zunächst 1:50 in H₂O_{steril} verdünnt (RNA 1:50 in 10 mM Tris-HCl pH 7,4) und in einer Messküvette die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Eine A₂₆₀-Einheit von 1,0 entspricht dabei einer Menge von 50 µg DNA/ml (RNA: 40µg/ml).

Das A₂₆₀/280-Verhältnis gibt Auskunft über die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren. Ein A₂₆₀/280-Verhältnis von 1,8 bis 2,0 entspricht dabei einer Reinheit von 90% bis 100%. Ein Verhältnis geringer als 1,8 zeigt eine Verunreinigung mit Proteinen oder im Fall von RNA-Proben eine Verunreinigung mit DNA an. Der A₂₆₀/230-Quotient sollte etwa dem Wert des A₂₆₀/280-Verhältnisses entsprechen, wobei geringere Werte eine Kontamination mit Phenol, Proteinen oder Anderem anzeigen.

4.2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) dient der Amplifikation definierter DNA-Sequenzen *in vitro*, also ohne die Zuhilfenahme lebender Organismen. Dabei wird das Enzym DNA-Polymerase zu Hilfe genommen, welches in allen Lebewesen vorkommt. Häufig wird in diesem Zusammenhang die thermostabile Taq-Polymerase verwendet, welche anfänglich aus dem thermophilen Archaeobakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde und heute mittels der Proteinexpression in großen Mengen hergestellt werden kann. Da der Nachteil der Taq-Polymerase darin besteht, dass sie gelegentlich Fehler bei der DNA-Replikation produziert, wird beispielsweise als Alternative bei der DNA-Klonierung die sog. Pfu-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*) verwendet, welche einen Kontroll-Mechanismus (3'-5'-Exonuklease-Aktivität / Proof-Reading) besitzt und somit die Mutationsrate erheblich senkt. Zur Vermeidung von unspezifischen PCR-Amplifikaten, beispielsweise hervorgerufen durch Fehlbindung der Polymerase an das DNA-Template oder durch fehlgebundene Primer vor Beginn des ersten Temperaturzyklus, kann die Verwendung von sog. *Hot-Start-Polymerasen* in Erwägung gezogen werden. Diese speziellen Polymerasen bleiben bis zur Denaturierung der DNA gehemmt und werden erst bei Erreichen von 95°C aktiv.

Als Vorlage (Template) in der PCR dient eine doppelsträngige DNA, mit der zu amplifizierenden Sequenz. Ebenfalls werden sog. Oligonukleotid-Primer benötigt, welche die Startpunkte der DNA-Synthese flankieren. Dem PCR-Ansatz müssen ebenso die Nukleotide (Desoxyribonukleosid-Triphosphate; dATP, dCTP, dGTP, dTTP) zugegeben werden, die als Bausteine des synthetisierten Stranges dienen. Die entsprechende DNA-Polymerase katalysiert die Synthese des neuen Stranges, wobei sie nur unter Zugabe von Mg²⁺-Ionen und einer Pufferlösung effektiv arbeiten kann. Die PCR ist in drei Abschnitte gegliedert, welche in 25-50 Zyklen wiederholt werden:

- 1) **Denaturierung:** Zunächst wird die DNA auf ca. 95°C erhitzt, wodurch sich die beiden DNA-Stränge voneinander trennen.
- 2) **Annealing:** Anschließend wird die Temperatur wieder gesenkt und die Primer können mit den Einzelsträngen hybridisieren. Die Annealing-Temperatur liegt dabei normalerweise 5-7°C unterhalb des Schmelzpunktes der Primer.
- 3) **Elongation:** Im letzten Schritt beginnt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit den Nucleotiden aufzufüllen. Dabei beginnt sie am 3'-Ende der angelagerten Primer und folgt dem DNA-Strang in Richtung des 5'-Endes. Die Temperatur sowie die Dauer dieses Vorgangs hängen von der verwendeten Polymerase sowie der Länge des DNA-Stranges ab. In der Regel wird die Elongation jedoch bei 72°C durchgeführt.

Da diese drei Abschnitte in 25-35 Zyklen wiederholt werden, und die amplifizierte DNA ihrerseits wieder als Template dient, nimmt die synthetisierte DNA während des gesamten PCR-Vorgangs exponentiell zu (2^n ; n=Anzahl der Zyklen).

Durchführung:

Für die Amplifikation von DNA-Abschnitten wurden entweder die Taq-Polymerase (einfache Kontrollansätze) oder die Phusion-Polymerase (Klonierungen, RT-PCR) verwendet. Die Taq-Polymerase (hier AmpliTaq[®]360, Life Technologies GmbH, Darmstadt) besitzt die Eigenschaft am 3'-Ende der PCR-Amplifikate Adenosin-Überhänge anzuhängen. Sie besitzt dabei eine Syntheseleistung von etwa 1000 Basen pro Minute, besitzt jedoch keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (Fehlkorrektur).

Wurde für Klonierungen oder RT-PCR-Ansätze eine DNA-Polymerase mit Korrekturfunktion (Proofreading) benötigt, so wurde die sog. Phusion-Polymerase verwendet (Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase, Thermo Scientific, Schwerte). Im Gegensatz zur ebenfalls häufig verwendeten Pfu-Polymerase besitzt diese eine 6-fach niedrigere Fehlerrate und eine 8-fach schnellere Syntheseleistung. Die Syntheseleistung der verwendeten DNA-Polymerase musste bei der Ermittlung der Elongationszeit einer PCR berücksichtigt werden. Die jeweiligen PCR-Ansätze (siehe Tabelle 4-1) wurden in 0,5 ml-PCR-Caps vermischt.

Pipettierschema einer PCR mit Taq-DNA-Polymerase (25 µl)		
Menge	Reagenz	Stammlösung; Hersteller
100ng -1µg	Template-DNA	
2 µl	MgCl ₂	25 mM
2,5 µl	10x-Puffer	Life Technologies GmbH
0,5 µl	dNTP-Mix	10mM SL; Fermentas
0,5 µl	5'-Primer	10pmol/µl; biomers.net GmbH
0,5 µl	3'-Primer	10pmol/µl; biomers.net GmbH
0,125 µl	AmpliTaq®360 DNA-Polymerase	5U/µl; Life Technologies GmbH
auf 50 µl	mit H ₂ O _{bidest.} auffüllen	
Pipettierschema einer PCR mit Phusion-DNA-Polymerase (25 µl)		
Menge	Reagenz	Stammlösung; Hersteller
100ng -1µg	Template-DNA	
5 µl	5x-HF-Puffer	Fermentas
0,5 µl	dNTP-Mix	10mM SL; Fermentas
0,5 µl	5'-Primer	10pmol/µl; biomers.net GmbH
0,5 µl	3'-Primer	10pmol/µl; biomers.net GmbH
0,2 µl	Phusion HF DNA-Polymerase	2U/µl; Life Technologies GmbH
auf 50 µl	mit H ₂ O _{bidest.} auffüllen	

Tabelle 4-1: Pipettierschemata für PCR-Ansätze in Abhängigkeit von der verwendeten DNA-Polymerase

Die Ansätze wurden durch Vortexen gemischt, abzentrifugiert und in einem PCR-Cycler mit vordefiniertem Programm (siehe Tabelle 4-2) inkubiert.

Cycler-Programm für einer PCR mit Taq-DNA-Polymerase		
Zyklen	Vorgang	Bedingungen
1	Initiale Denaturierung	2 min, 96 °C
25-35	Denaturierung	30 sek, 96 °C
	Primer-Annealing	30 sek, x °C
	Elongation	1 min/1kb, 72 °C
1	Finale Elongation	5 min, 72 °C
1	Lagerung	∞, 4°C
Cycler-Programm für einer PCR mit Phusion-DNA-Polymerase		
Zyklen	Vorgang	Bedingungen
1	Initiale Denaturierung	2 min, 98 °C
25-35	Denaturierung	10 sek, 98 °C
	Primer-Annealing	20 sek, x °C
	Elongation	30 sek/kb, 72 °C
1	Finale Elongation	7 min, 72°C
1	Lagerung	∞, 4°C

Tabelle 4-2: PCR-Cycler Programme in Abhängigkeit der verwendeten DNA-Polymerase

Nach Ende der PCR wurden die Ansätze mit je 5 µl DNA-Ladepuffer (6x MassRuler DNA Loading Dye; Fermentas) versetzt und in der Regel auf ein 1%iges-Agarose-Gel aufgetragen (siehe 4.2.7.).

4.2.5. RT-PCR

Die RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion) gliedert sich in zwei Arbeitsschritte. Nach Isolation der mRNA aus Zellen oder Geweben (siehe 4.2.1.) wird diese mit Hilfe der Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Die Bezeichnung cDNA rührt daher, da eukaryotische mRNA ausschließlich aus Exons besteht und die, mittels der Reversen Transkriptase synthetisierte DNA sich von genomischer DNA dahingehend unterscheidet, dass Letztere zusätzlich nicht-kodierende DNA-Abschnitte (Introns) enthält. Die so hergestellte cDNA kann dazu verwendet werden um Gene nachzuweisen, die zu einem bestimmten Zeitpunkt aktiviert sind. Dabei wird die entsprechende cDNA (und somit auch die jeweils vorliegende mRNA) im zweiten Arbeitsschritt mit Hilfe von spezifischen Primern in einer PCR nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Synthese von cDNA das Kit „RevertAid First Strand cDNA-Synthesis Kit“ der Firma Fermentas (Fermentas / Thermo Scientific, Schwerte) verwendet, wobei strikt nach Herstellerangaben gearbeitet wurde (siehe Tabelle 4-3). Bei diesem Kit wird nur ein einzelner DNA-Strang synthetisiert, welcher in einer PCR als Template dient.

Reaktionsansatz einer cDNA-Synthese (20 µl)		
Menge	Reagenz	Stammlösung; Hersteller
500ng - 1 µg	Gesamt-RNA	
1 µl	Oligo(dt) ₁₈ -Primer	100 µM; Fermentas
auf 12 µl	mit H ₂ O _{bidest.} auffüllen	
Ansatz für 5 min bei 65°C inkubieren		
Ansatz mind. 1 min auf Eis inkubieren		
4 µl	5x Reaktions-Puffer	Fermentas
1 µl	RiboLock Rnase Inhibitor	20 U/µl; Fermentas
2 µl	dNTP-Mix	10 mM; Fermentas
1 µl	Revert-Aid M-MuLV Reverse Transkriptase	200 U/µl; Fermentas
Ansatz für 60 min bei 42°C inkubieren		
Reaktion für 5 min bei 72°C terminieren		

Tabelle 4-3: Pipettierschema und Reaktionsansatz einer cDNA-Synthese

Nach Beendigung der cDNA-Synthese wurde die cDNA direkt als Template in eine PCR mit spezifischen Primern eingesetzt (je 1 µl; siehe 4.2.4.) oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2.6. Primer und Primer-Design

Um einen bestimmten DNA-Abschnitt mittels PCR erfolgreich und spezifisch amplifizieren zu können, ist das Design und die Wahl der entsprechenden Primer von entscheidender Bedeutung. Die Primer müssen dabei einige Anforderungen erfüllen: Zunächst dürfen beide Primer nicht mit sich selbst hybridisieren oder an andere Primer binden. Darüber hinaus sollten sie keine Haarnadelstrukturen bilden und die komplementäre Sequenz darf in der Target-DNA nur einmal vorhanden sein. Beide Primer sollten in einem Bereich von 50-60°C etwa die gleiche Schmelztemperatur aufweisen und einen G/C-Gehalt von 40-60% beinhalten. Zur Berechnung der Schmelztemperatur kann folgende empirische Formel herangezogen werden:

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

Bei der dabei errechneten Schmelztemperatur haben etwa 50% der Primer die entsprechende Zielsequenz gebunden. Eine Erhöhung dieser Temperatur führt einerseits zu einer Erhöhung der Primer-Spezifität, kann andererseits jedoch auch zu geringen Ausbeuten durch eine verminderte Primerbindung führen.

Bei Verwendung der Taq-DNA-Polymerase wurde die tatsächliche Annealingtemperatur ausgehend von dem Primer mit der geringsten T_m , etwa 5-7°C unter der errechneten Schmelztemperatur gewählt. Zu gering gewählte Annealingtemperaturen würden zu unspezifischen Primer-Bindungen und demzufolge zu einer Amplifikation unspezifischer Sequenzabschnitte führen.

Bei Verwendung der Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Fermentas) mussten jedoch abweichende Reaktionsbedingungen gewählt werden. Aufgrund der Natur der Phusion-Polymerase sowie der hohen Salzkonzentration im verwendeten Reaktionspuffer, arbeitet diese DNA-Polymerase effektiver bei einer erhöhten Denaturierungs-Temperatur (98°C). Ebenso sollten höhere Annealingtemperaturen gewählt werden. Bei Primern mit einer Länge von > 20 Nukleotiden wurde die Annealingtemperatur ausgehend von der errechneten Schmelztemperatur um 3°C erhöht. Bei Primern einer Länge von ≤ 20 Nukleotiden wurde die Annealingtemperatur der Schmelztemperatur gleich gesetzt. Die jeweilige Schmelztemperatur der Primer wurde stets mit dem Rechen-Tool der Firma Thermo Scientific bestimmt (www.thermoscientific.com/pcrwebtools).

Im Rahmen einer Klonierung wurden zur Insertion eines PCR-Produktes in einen Plasmid-Vektor, geeignete Restriktionsschnittstellen an die 5' Enden der Primer angehängt. Des Weiteren müssen etwa 5-6 weitere Basen angehängt werden, um ein einwandfreies Schneiden der Restriktionsenzyme zu gewährleisten (= stille Sequenz). Der Aufbau der Primer sollte schließlich folgendem Schema entsprechen.



Die in dieser Arbeit verwendeten Primer-Sequenzen wurden entweder selbst entworfen oder über Operon.com ermittelt. Bezogen wurden die Primer schließlich von der Firma biomers.net GmbH (Ulm) in Kartuschen-gereinigter Qualität.

4.2.7. Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuresträngen (RNA oder DNA) in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe. Dabei werden Agarosepolymere zu einem Netzwerk polymerisiert. Agarose ist ein Polysaccharid, das aus den Rotalgen *Gelidium* und *Gracillaria* gewonnen wird. Dabei besteht ein Agarosemonomer aus D-Galactose, welches mit 3,6-Anhydro L-Galactose glykosidisch verbunden ist. Je höher die Agarosekonzentration ist, desto engmaschiger ist das Gel. Wie bei der SDS-PAGE wandern größere Nukleinsäurestränge langsamer durch das Gel und kleine Fragmente schneller, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit wiederum von der Agarosekonzentration abhängt. Eine Verwendung von negativen Reagenzien ist hierbei jedoch nicht erforderlich, da die Nukleinsäure-Moleküle aufgrund ihres Ribosephosphat-Rückgrates bereits eine negative Nettoladung aufweisen. Als Größenvergleich dient hier ebenfalls ein Marker. Zur Detektion der aufgetrennten Fragmente dient Ethidiumbromid. Dabei handelt es sich um einen roten Phenantridin-Farbstoff, welcher sein Absorptionsspektrum in Wasser im UV-Bereich (ca. 250 nm) hat. Ethidiumbromid besitzt die Eigenschaft mit Nukleinsäuren zu interkalieren. Bei diesem Vorgang verändert es sein Absorptionsspektrum, wobei das Emissionsspektrum allerdings gleich bleibt, aber die Intensität der Emission (ca. 590 nm; orange-rot) um den Faktor 50-100 zunimmt. Da Ethidiumbromid hochgradig mutagen wirkt, wurde aus arbeitsschutztechnischen Gründen auch der DNA-Farbstoff NonTox (Appllichem) verwendet, welcher nicht mutagen und nur schwach toxisch ist. NonTox kann mit UV- (300 nm) und Blau-Licht (470 nm) angeregt werden und besitzt sein Emissionsspektrum bei etwa 537 nm (grün). Um eine möglichst große Trennschärfe bei der Auftrennung der Nukleinsäuren zu erhalten, sollte zum einen eine geeignete Agarosekonzentration (siehe Tabelle 4-4) und zum anderen ein geeigneter Laufpuffer (Tabelle 4-4) gewählt werden.

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

Elektrophoresepuffer	Optimaler Trennbereich	Laufdauer	Max. Spannung
TBE	0,1-5 kb	30 min	10 V/cm
TAE	5-60 kb	40 min	7 V/cm
SB	0,1-10 kb	5 min	40 V/cm

Tabelle 4-4: Verschiedene Agarosekonzentrationen und Puffersysteme

Lösungen:

5x TBE-Puffer (1L): 445 mM Tris-HCl
445 mM Borsäure
10 mM 20 mL 0,5 M EDTA pH 8,0

50x TAE-Puffer (1L): 2 M Tris-HCl
1 M Eisessig
50 mM EDTA

20x SB-Puffer (1L): 200 mM NaOH
(Brody and Kern, 2004) 650 mM Borsäure
⇒ pH einstelle auf 8,5

6x DNA-Ladepuffer: (FastRuler Middle Range DNA-Ladder; Fermentas)

Laufpuffer: (jeweiliger Puffer verdünnt auf 1-fache Konzentration)

Ethidiumbromid-Stammlösung: (1%; Applichem GmbH, Darmstadt)

Durchführung:

Für die Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurden zunächst 0,5 g Agarose (peqGOLD™ Universal-Agarose, PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) in 50 ml Laufpuffer aufgeköcht. Nachdem die Lösung auf etwa 50°C abgekühlt war, wurden 5 µl der Ethidiumbromid-Stammlösung zugegeben und die Gel-Lösung in einen gereinigten Gelschlitten mit eingesetztem Taschenkamm gegossen. Im Gel entstandene Luftblasen wurden entfernt um eine Beeinflussung der Laufeigenschaft auszuschließen. Die Auspolymerisierung des Gels war nach etwa 25 min abgeschlossen. Anschließend wurde das Gel zusammen mit dem Gelschlitten in eine Elektrophoresekammer gesetzt und mit Laufpuffer überschichtet. Schließlich konnte der Kamm vorsichtig herausgezogen und die Proben in die Gel-Taschen gefüllt werden. Hierzu wurden die entsprechenden Proben zunächst mit 5 µl 6-fach DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Bestimmung der Länge der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde in einer Spur des Gels 7 µl des Markers „Fast Ruler Middle Range“ aufgetragen,

der sich aus fünf chromatographie-gereinigten DNA-Molekülen bekannter Größe zusammensetzt (100 – 5000 bp; vgl. Abbildung 4-1). Dieser Marker enthält bereits Ladepuffer und kann somit direkt auf das Agarosegel aufgetragen werden.

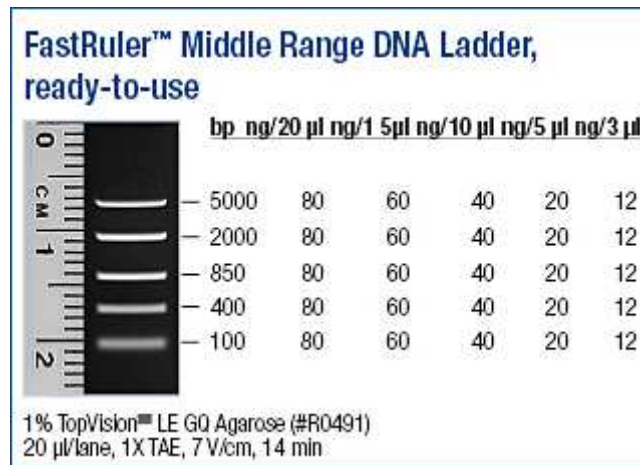


Abbildung 4-1: Verwendeter DNA-Marker FastRuler Middle Range (Fermentas).

Die Auftrennung des Markers erfolgte standardmäßig in einem 1%-Agarosegel

Nach Beladung des Gels wurde die Elektrophoresekammer geschlossen, an ein Netzgerät angeschlossen und je nach verwendetem Gel-/Laufpuffer-System (vgl. Tabelle 4-4) bei maximaler Spannung laufen gelassen. Die Dokumentation des Gels erfolgte auf einem UV-Transilluminator mit angeschlossener Videokamera.

4.2.8. Nukleinsäure-Isolierung aus Agarose-Gelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde nach Anleitung des Herstellers mit dem NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren) durchgeführt. Hierzu wurde die entsprechende Bande mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und anschließend aus dem Gel isoliert. Die DNA wurde abschließend, je nach Verwendungszweck, in 25-40 µl H₂O_{bidest.} eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2.9. Fällung von Nukleinsäuren

Die Fällung von DNA wurde mit Natriumacetat und Ethanol durchgeführt. Da generell DNA in 100µl-Ansätzen gefällt wurde, mussten geringere Mengen aus Verdaus zunächst mit H₂O_{bidest.} auf 100 µl aufgefüllt werden. Anschließend wurden 1/10 Volumen 3 M Na-Acetate (pH 5,2) und 2,5 Volumina Ethanol (100%, p.A.) zugegeben. Nach sorgfältigem Mischen, wurde der Ansatz für 30 min bei 16.000 x g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand konnte vorsichtig verworfen und das DNA-Pellet mit 70% Ethanol (p.A.) gewaschen werden. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 16.000 x g (4°C) wurde der Überstand wieder verworfen. Das Pellet wurde anschließend für 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich in einem geeigneten Volumen H₂O_{bidest.} gelöst.

4.2.10. Sequenzierung von Nukleinsäuren

Die Sequenzierung von Plasmiden erfolgte ausgehend von Plasmid-DNA, welche durch eine Miniprep isoliert wurde (siehe 4.2.2). Die Sequenzierungen (Single Read Sequencing) wurden ausschließlich durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Dabei mussten die eingesendeten Proben bestimmte Voraussetzungen erfüllen. So sollten DNA-Plasmide in einem Volumen von mindestens 20 µl H₂O (in 1,5ml Reaktionsgefäßen) und einer Konzentration von 30-100 ng/µl (PCR-Produkte: 10-50 ng/µl) vorliegen. Darüber hinaus durfte die Lösung kein EDTA enthalten. Entsprechende Sequenzierungsprimer wurden entweder vom Dienstleister gestellt oder selbst mitgeschickt. Die Auswertung und Editierung der Sequenzierungen erfolgte schließlich mit der Software Chromas Pro (Version 1.5) sowie mit Vector NTI® Advance der Firma Invitrogen (Version 10.3.0).

4.2.11. Klonierung von DNA-Fragmenten

4.2.11.1. Gewinnung des Inserts und des Plasmid-Vektors

Für die Klonierung eines bestimmten Gen-Abschnitts in einen Vektor wie z.B. einen Expressionsvektor, wurde das DNA-Fragment zunächst mit entsprechenden Restriktionsenzymen mittels Restriktionsverdau (siehe 4.2.12.) aus dem Ausgangsvektor geschnitten. Konnten keine übereinstimmenden Restriktionsschnitten für Insert und Vektor gefunden werden, musste das Insert mittels PCR und geeigneter Primer (siehe 4.2.4.) amplifiziert werden. Ebenso wurde der Zielvektor mit denselben Enzymen linearisiert um das Insert zielgerichtet in diesen einfügen zu können. Der verdaute Ausgangs- sowie Zielvektor bzw. das amplifizierte Insert wurden nun in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 4.2.7.) die entsprechenden Banden ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel isoliert (siehe 4.2.8.)

4.2.11.2. Dephosphorylierung des Vektors

Erfolgte die Linearisierung des Plasmid-Vektors mit nur einem Restriktionsenzym, so war eine Dephosphorylierung des Vektors notwendig, um die Autoligationsrate des Vektors zu minimieren. Hintergrund ist dabei der Umstand, dass eine DNA-Ligase zur Verbindung zweier DNA-Moleküle phosphorylierte Enden benötigt. Durch Entfernen der Phosphatgruppe am 5'-Ende der verdauten DNA-Stränge kommt es zu keinem Ligase-vermittelten Schluss des Vektors. Dadurch kann die Anzahl der falschpositiven Bakterienklone (durch Autoligation) im Rahmen der Transformation verringert werden. Bei Verwendung von zwei verschiedenen Restriktionsenzymen kann eine Autoligation generell ausgeschlossen werden.

Durchführung:

Nachdem der Vektor durch einen Restriktionsverdau (siehe 4.2.12.) linearisiert wurde, erfolgte die Inaktivierung der Reaktion durch eine 10-minütige Inkubation bei 85°C. Anschließend konnte die DNA gefällt werden (siehe 4.2.9.). Bei Aufnahme des Pellets in H₂O_{bidest.} wurde eine Konzentration von 100 ng/μl angestrebt.

Für die Dephosphorylierung wurden 1,5 μl des linearisierten Vektors (150 ng) mit 0,5 μl 10x SAP-Puffer (Fermentas) und 1 μl Shrimp Alkaline Phosphatase (1U/μl, Fermentas) vermischt und der Ansatz mit H₂O_{bidest.} auf 20 μl aufgefüllt. Der Ansatz wurde anschließend für 90 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte bei 70°C für 20 Minuten. Der Ansatz wurde dann entweder direkt für eine Ligation verwendet oder bei -20°C gelagert.

4.2.11.3. Ligation

Die Ligation dient der kovalenten Verknüpfung von DNA-Fragmenten (beispielsweise des Inserts in einen geöffneten Vektor), wenn die zu verbindenden Stränge überlappende Enden mit der jeweils komplementären Sequenz besitzen und in engen Kontakt miteinander treten. Bei der Ligation ist darauf zu achten, dass das Verhältnis zwischen Insert und Vektor mindestens 3:1 beträgt.

Pipettierschema einer Ligationsansatzes (20 μl)		
Menge	Reagenz	Stammlösung; Hersteller
150 ng	linearisierter/gereinigter Vektor	
600 ng	verdautes/gereinigtes Insert	
2 μl	10x T4-DNA-Ligase-Puffer	Fermentas
1 μl	T4-DNA-Ligase	5U/μl; Fermentas
auf 20 μl	mit H ₂ O _{bidest.} auffüllen	

Tabelle 4-5: Standardansatz einer Ligation

Neben dem eigentlichen Ligations-Ansatz wurde zusätzlich noch ein Kontrollansatz (≡Autoligation) durchgeführt, in dem statt des Inserts H₂O_{bidest.} eingesetzt wurde. Dieser diente zur Kontrolle, ob Teile des Ausgangsvektors verschleppt wurden und ob die Bakterien ihre Resistenz durch eine Autoligation des Vektors zurückerhalten haben. Die Ansätze wurden nach dem Schema aus Tabelle 4-5 angesetzt, gründlich vermischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Konstrukte wie in 4.1.6. beschrieben in Bakterienzellen transformiert

4.2.11.4. Test der erhaltenen Klone

Zur Kontrolle der gerichteten Ligation wurden am Tag nach der Transformation, Bakterienklone der Ligationsplatte gepickt und nach einer Übernachtskultur und anschließender Isolation des Konstruktes ein Restriktionsverdau (siehe 4.2.12.) durchgeführt. Nach Identifikation der positiven Klone wurde das entsprechende DNA-Konstrukt zusätzlich sequenziert (siehe 4.2.10.) um mögliche Fehler durch die Polymerase oder eine unerwünschte reverse Ligation des Inserts auszuschließen.

4.2.12. Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind Enzyme, welche die DNA an spezifischen Basensequenzen, den Erkennungssequenzen schneiden. Dabei unterscheidet man zwischen drei Typen von Restriktionsenzymen:

Typ I schneidet die DNA an einer zufälligen Stelle, die von der Erkennungssequenz weit entfernt ist.

Typ II schneidet die DNA innerhalb der Erkennungssequenz und

Typ III schneidet die DNA etwa 20-25 Basenpaare von der Erkennungssequenz entfernt.

Zur Verwendung kommen hierbei jedoch fast ausschließlich die Restriktionsenzyme vom Typ II. Die Erkennungssequenzen der Typ-II-Restriktionsenzyme bestehen aus palindromischen Sequenzen aus vier bis sechs Basenpaaren, wobei der Schnitt versetzt (sticky ends) oder gerade (blunt ends) erfolgen kann. Restriktionsenzyme wurden zur Klonierung von DNA-Fragmenten und zur Linearisierung von Vektoren verwendet.

Wurde ein Doppelverdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen durchgeführt, so wurde zur Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen zunächst das Onlinetool der Firma Thermo Scientific zu Rate gezogen (www.thermoscientific.com/pcrwebtools). Der Ansatz konnte dann entsprechend dem Schema aus Tabelle 4-6 pipettiert werden.

Pipettierschema eines Restriktionsverdaus (50 µl)		
Menge	Reagenz	Stammlösung; Hersteller
3 µg	Plasmid-DNA / PCR-Amplifikat	
5 / 10 µl	10x Restriktionspuffer	5/10 µl je nach Herstellerangaben für einen optimalen Doppelverdau; Fermentas
1-2 µl	je Restriktionsenzym	Fermentas
auf 50 µl	mit H ₂ O _{bidest.} auffüllen	

Tabelle 4-6: Standardansatz eines Restriktionsverdaus

Der Ansatz wurde dann für 90 Minuten bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Restriktionsenzyme für 10 min bei 80°C. Der Verdau wurde dann mit 8µl 6-fach DNA-Ladepuffer versetzt und in einem 1%igen Agarosegel analysiert. Wurde die verdaute DNA für Folgeversuche benötigt, konnte sie mittels einer DNA-Gelextraktion aus dem Gel isoliert werden.

4.2.13. Herstellung von in vitro synthetisierter mRNA

In der vorliegenden Arbeit wurde mRNA in befruchtete Eizellen von *Xenopus laevis* injiziert. Dabei kam es im Anschluss zu einer Translation der mRNA im, sich entwickelnden Embryo. Der Vektor (in den die Sequenz des gewünschten Proteins kloniert wurde) musste vor allem eine T7-Polymerase-Promotorsequenz aufweisen. Dieses Kriterium erfüllt der Vektor pBluescript II SK+ (Stratagene). Kam es nach Injektion der mRNA zur Translation, so konnte das Protein mittels SDS-PAGE und Westernblot

in den verschiedenen embryonalen Entwicklungsstadien nachgewiesen werden. Diese Herangehensweise wurde gewählt, da eine klassische Transfektion von DNA, wie es bei somatischen Zellen gängig ist, in Embryonen nicht realisierbar ist. Da die *in vitro* synthetisierte mRNA sehr instabil ist, musste während der Durchführung der Synthese sowie der Injektion darauf geachtet werden möglichst schnell und steril zu arbeiten. Die mRNA konnte schließlich in nukleasefreiem Wasser bei -70°C gelagert werden.

4.2.13.1. Linearisierung der Plasmid-DNA

Im ersten Schritt musste das entsprechende DNA-Konstrukt für die *in vitro* Synthese der mRNA linearisiert werden. Hierzu wurden $1\ \mu\text{g}$ des Vektors mit einem geeigneten Restriktionsenzym verdaut (siehe 4.2.12.), die DNA gefällt (siehe 4.2.9.) und schließlich in $6\ \mu\text{l}$ nukleasefreiem Wasser aufgenommen.

4.2.13.2. Synthese von „capped“-mRNA

Abgesehen von der reinen Synthese der mRNA ist es von großer Bedeutung, dass die mRNA an ihrem 5'-Ende eine sogenannte Cap-Struktur erhält. Diese stellt eine Veränderung der mRNA dar, welche in Eukaryoten vorkommt und die Stabilität der RNA signifikant erhöht. Darüber hinaus wird diese Struktur für den effektiven Transport der mRNA aus dem Kern in das Zytoplasma und die Translation durch Ribosomen benötigt.

Die Synthese von „capped“-mRNA wurde mit Hilfe des mMESSAGING mMACHINE®-T7-Kits (Ambion) durchgeführt. Die Arbeitsschritte erfolgten dabei nach dem Herstellerprotokoll. Dieses Kit eignet sich für die Synthese großer Mengen von mRNA mit Hilfe der T7-DNA-Polymerase. Das Kit enthält dabei alle vier Ribonukleotide sowie das Cap-Analogon $[\text{m}^7\text{G}(5')\text{ppp}(5')\text{G}]$, welche dem linearisierten Plasmid-Vektor in einem vordefiniertem Gemisch zugegeben werden können. Eine mögliche Degradation der synthetisierten mRNA wird durch den RNase-Inhibitor SUPERase•In™ verhindert. Ausgehend von einer Plasmidkonzentration von $1\ \mu\text{g}$ erreicht das Kit eine Ausbeute von etwa $20\text{-}30\ \mu\text{g}$ mRNA. Das linearisierte DNA-Plasmid wird nach erfolgter Synthese durch die Zugabe von TURBO-DNase abgebaut. Die synthetisierte mRNA konnte schließlich für die Polyadenylierungsreaktion verwendet werden.

Reaktionsansatz einer mRNA-Synthese (20 µl)		
Menge	Reagenz	Stammlösung; Hersteller
1 µg	linearisierte Plasmid-DNA (hier 6µl)	
10 µl	2x NTP/CAP	Ambion
2 µl	Reaktionspuffer	Ambion
2 µl	Enzym-Mix (T7-Polymerase/SUPERase-In)	Ambion
auf 20 µl	mit H ₂ O _{bidest.} auffüllen	
Ansatz für 60-120 min bei 37°C inkubieren		
1 µl	TURBO Dnase	Ambion
Ansatz für 15 min bei 37°C inkubieren		

Tabelle 4-7: Standardansatz einer mRNA-Synthese (mMESSAGE mMACHINE®-T7-Kit)

4.2.13.3. Polyadenylierung der mRNA

Die Polyadenylierung stellt ein Anhängen von ≥ 150 Adenin-Nukleotiden, den sog. Poly(A)-Schwanz an das 3'-Ende eukaryotischer mRNA mittels der Poly(A)-Polymerase dar. Es handelt sich dabei wie die 5'-Cap-Struktur um eine posttranskriptionale Modifikation der prä-mRNA. Die Polyadenylierung führt ebenfalls zu einer Erhöhung der mRNA-Stabilität. Ebenso wird dadurch die Effizienz der Translation erhöht. In der vorliegenden Arbeit wurde *in vitro* synthetisierte „capped“-mRNA mit Hilfe des Poly(A)-Tailing-Kits (Ambion) polyadenyliert. Dieses Kit verwendet dabei die *E. coli* Poly(A)-Polymerase (E-PAP).

Pipettierschema einer Polyadenylierungsreaktion (100µl)		
Menge	Reagenz	Stammlösung; Hersteller
20 µl	mMESSAGE mMACHINE-Reaktion	
36 µl	nukleasefreies Wasser	Ambion
20 µl	5x E-PAP-Puffer	Ambion
10 µl	MnCl ₂	25mM; Ambion
10 µl	ATP	10mM; Ambion
4 µl	E-PAP	Ambion

Tabelle 4-8: Standardansatz einer Polyadenylierung (Poly(A)-Tailing-Kit)

Der Reaktionsansatz wurde entsprechend der Tabelle 4-8 zusammenpipettiert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die fertige mRNA wurde schließlich bei -20°C gelagert oder sofort mittels des RNeasy-Mini-Kits (siehe 4.2.1.) aufgereinigt.

4.2.13.4. Aufreinigung der mRNA

Die in vitro synthetisierte mRNA (mit 5'-Cap und Poly(A)-Schwanz) wurde mittels dem RNeasy-Mini-Kits der Firma Qiagen aufgereinigt. Dies ist notwendig um unerwünschte Reaktionsbestandteile der Synthesereaktion (z.B. Enzyme, Pufferbestandteile) vor der Injektion der mRNA zu entfernen. Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll, wobei die mRNA in 50 µl nukleasefreiem Wasser eluiert wurde (siehe auch 4.2.1.)

4.2.13.5. RNA-Gelelektrophorese

RNA-Moleküle können analog der Auftrennung von DNA-Molekülen nach ihrer Größe durch eine Gelelektrophorese separiert werden. Dabei wird jedoch ein abweichendes Puffersystem verwendet. Der wichtigste Unterschied besteht dabei in der Verwendung von Formamid, welches die RNA stabilisiert und vor Degradation schützt.

Lösungen:

Elektrophoresepuffer:	20 mM Tris-HCl, pH 8,0 20 mM NaCl 2 mM EDTA
Probenpuffer:	Elektrophoresepuffer 1:2 verdünnt in H ₂ O 50% Formamid (Applichem)
Ethidiumbromid-Stammlösung:	(1%; Applichem GmbH, Darmstadt)

Durchführung:

Die Herstellung des Agarosegels sowie die allgemeine Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte analog zur DNA-Gelelektrophorese (siehe 4.2.7.) wobei jedoch 1,5% Agarose (w/v) in 50 ml des hier beschriebenen Elektrophoresepuffers gelöst wurden.

Zur Vorbereitung der Proben, wurden 2 µl RNA in 13 µl Probenpuffer gemischt. Ebenso wurden 7 µl des Markers (Fast Ruler Middle Range, Fermentas) mit 13 µl Probenpuffer vermischt. Da der verwendete Probenpuffer farblos ist, musste die Lauffront markiert werden. Dies erfolgte durch Beladen einer Geltasche mit Bromphenolblau (gelöst in Glycerin und H₂O).

Die RNA wurde schließlich bei 50 V konstanter Spannung (maximale Stromstärke) für 2-3 Stunden aufgetrennt. Die Dokumentation des Gels erfolgte auf einem UV-Transilluminator mit angeschlossener Videokamera.

4.2.14. Design von Morpholino-Oligonukleotiden

Morpholino-Oligonukleotide (kurz Morpholinos) sind synthetische Moleküle, welche RNA binden und so die Translation bestimmter Proteine und dadurch entsprechende zelluläre Prozesse spezifisch inhibieren. Es handelt sich daher um einen Knockdown, also einer Herunterregulierung der Translation der Zielproteine. Im Gegensatz dazu wird bei Knockout-Methoden bereits die Transkription der RNA verhindert. Morpholinos können einerseits eingesetzt werden um die Translation direkt zu blockieren.

Dies geschieht durch die spezifische Hybridisierung der Morpholinos an das Start-ATG und die nachfolgende Blockierung des Translationsinitiationskomplexes. Im Gegensatz zu anderen Knockdown-Methoden wird die gebundene RNA dabei nicht degradiert. Daher ist der Nachweis des erfolgreichen Knockdowns des entsprechenden Proteins nicht mittels RT-PCR realisierbar. Neben der Inhibierung der Translation können Morpholinos auch eingesetzt werden um das Spleißen der prä-mRNA zu inhibieren. Dabei werden spezifische Spleißstellen durch die gebundenen Morpholinos blockiert.

Wie bei anderen Knockdown-Methoden auch, müssen Morpholinos in die Zielzellen eingebracht werden. Dies kann einerseits über spezielle Transfektionsreagenzien oder Elektroporation der Zellen geschehen. Andererseits ist dies bei Eizellen jedoch nicht anwendbar und die Morpholinos müssen daher mittels Mikroinjektion eingebracht werden. Da sich Morpholinos in ihrer Chemie deutlich von natürlichen Nukleinsäuren unterscheiden, sind sie im injizierten Organismus besonders langlebig, da sie nicht degradiert werden und kaum an Aktivität verlieren.

Ähnlich der Wahl der korrekten Primer bei der PCR, müssen auch Morpholinos bestimmte Kriterien erfüllen um den gewünschten spezifischen Effekt zu erzielen.

- 1) Die homologe Sequenz der Morpholinos sollte etwa 25 Nukleotide (nt) downstream von der 5'-Kappe liegen, das Start-ATG enthalten und die ersten 21-25 nt der kodierenden Sequenz beinhalten. Als Ausgangssequenz sollte die gespleißte mRNA-Sequenz dienen.



- 2) Morpholinos besitzen eine höhere Affinität zu RNA und sind in der Lage auch innerhalb von RNA-Sekundärstrukturen zu binden. Daher kann die homologe Sequenz auch -80 nt upstream bis hin zu 20 nt downstream vom Start-ATG liegen.
- 3) Die Länge des Oligonukleotids sollte zwischen 21 und 25 nt betragen. Kürzere Morpholinos führen zu einem drastischen Effektivitätsverlust (bis zu -40%).
- 4) Der G/C-Gehalt der homologen Sequenz sollte 40-60% betragen
- 5) Die Morpholino-Sequenz darf nicht mehr als vier aufeinanderfolgende oder mehr als neun (>36%) Guanin-Nukleotide besitzen. Andernfalls ist mit einem Verlust der Löslichkeit zu rechnen.
- 6) Analog zu PCR-Primern darf die homologe Sequenz nur einmal vorhanden sein, die Morpholinos nicht mit sich selbst hybridisieren oder Sekundärstrukturen ausbilden.

Zur Kontrolle der Spezifität der injizierten Morpholinos, ist es ratsam zusätzlich Kontroll-Morpholinos zu entwerfen und zu injizieren, die eine 5-Basen-Fehlpaarung (5mm; 5 Basen mismatch) aufweisen. Die 5mm-Morpholinos wurden stets über die Homepage des Herstellers entworfen (<https://oligodesign.gene-tools.com>). Alle Morpholino-Oligonukleotide wurden über die Firma Gene Tools, LLC (Philomath, USA) bezogen.

4.3. Proteinbiochemische Methoden

4.3.1. Herstellung und Aufreinigung von Fusionsproteinen

Um ein gewünschtes Protein aus einer vorliegenden DNA-Sequenz zu erhalten, muss dessen Sequenz vorerst in einen Expressionsvektor (hier pQC-6xHis) kloniert und dieser in Bakterien (XL1-Blue) transformiert werden. Die Bakterien übernehmen dabei die Expression des Proteins. Um die Expression in den Bakterien initiieren zu können, muss der Expressionsvektor ein Lac-Operon enthalten, dem nachfolgend die DNA-Sequenz des Proteins inseriert wurde.

Ein typisches Lac-Operon in *E.coli* besteht aus einem Regulatorgen, welches für einen Repressor codiert, einer Promotorregion, an welche die RNA-Polymerase bindet und einem Operator, der die Translation der nachfolgenden Strukturgene reguliert. Ist Laktose im Nährmedium von *E.coli* abwesend, so ist das Operon inaktiv, da der Repressor im aktiven Zustand an den Operator bindet und so die Transkription durch die RNA-Polymerase inhibiert. Ist jedoch Laktose anwesend, so bindet Allolaktose (ein Isomer der Laktose) als Induktor an den Repressor, der daraufhin seine Konformation in einen inaktiven Zustand ändert und nicht mehr an den Operator binden kann. Folglich ist das Operon aktiv und die Transkription kann ungehindert stattfinden. Im vorliegenden Fall wird IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) als Induktor verwendet, da es ein Allolaktose-Analogon ist. Dadurch kann die Expression durch Zugabe von IPTG gezielt induziert werden.

Der zu exprimierenden Proteinsequenz folgt im Expressionsvektor zusätzlich eine Sequenz, welche für ein His-Tag (hier: ein Anhang von sechs Histidinen) codiert. Folglich wird ein Fusionsprotein mit einem C-terminalen His-Tag exprimiert und kann durch Aufbrechen der Bakterien isoliert werden. Über dessen Histidin-Anteil ist schließlich eine Aufreinigung des Fusionsproteins mittels einer Nickel-Säule möglich. Dem liegt die IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) zugrunde: Dabei werden divalente Kationen, wie hier Nickel (Ni^{2+}), über einen Chelatliganden an eine Matrix immobilisiert und interagieren mit den negativen Seitenketten der Histidine. Während das Fusionsprotein an die Nickelsäule gebunden ist laufen alle anderen Proteine ohne His-Tag durch die Säule hindurch. Durch stufenweise Absenkung des pH-Wertes wird die Affinität zwischen den Histidinresten und den Nickelatomen herabgesetzt, wodurch sich das Protein schließlich ab einem bestimmten pH-Wert von den Agarosekügelchen löst und aufgefangen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fusionsproteine exprimiert und aufgereinigt:

- Xemerin1 Δ TM-6His: Xemerin1 ohne Transmembrandomäne; Aminosäuren 1-136; MG: 18,6 kDa
- Xemerin1 Δ TM Δ LEM-6His: Xemerin1 ohne Transmembran- / LEM-Domäne; Aminosäuren 43-136; MG: 13,2 kDa
- C-XMAN1-6His: C-Terminaler Bereich von XMAN1; Aminosäuren 525-781; MG: 30,3 kDa

4.3.1.1. Expression von C-terminalen Hexa-Histidin-Fusionsproteinen in Bakterienzellen

Lösungen:

LB-Medium: (siehe 4.1.1.)

IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid; 1 M SL in H₂O_{bidest.})

Durchführung:

Zunächst wurde der Expressionsvektor in XL1-Blue-Zellen transformiert und 10 ml-Übernachtskulturen (3x) der Bakterienkolonie angeimpft. Am nächsten Tag wurden je 200 ml LB-Medium mit den Übernachtskulturen versetzt und die Kultur bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,9 wachsen gelassen (optimal 0,6). Die Expression des Proteins wurde durch die Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die Kultur wurde dann für weitere 3,5 Stunden bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Zur Kontrolle der Induktion wurde unmittelbar vor der Induktion sowie nach den 3,5 Stunden Inkubationszeit je 1 ml der Kultur abgenommen, 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 40 μ l SDS-Probenpuffer aufgenommen und in einer SDS-PAGE mit anschließendem Immunblot analysiert. Ebenso konnte durch parallele Messungen der Zelldichte eine mögliche zytotoxische Wirkung des exprimierten Proteins ermittelt werden.

Die Kulturen wurden schließlich für 10 min bei 5000 rpm in 50ml-Falkonröhrchen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Bis zur Aufreinigung des Proteins konnten die Bakterien-Pellets bei -20°C gelagert werden.

4.3.1.2. Aufreinigung von Hexa-Histidin-Fusionsproteinen unter denaturierenden Bedingungen

Lösungen:

Ni-NTA-Agarose: (Qiagen)

Waschpuffer A: 8 M Harnstoff
0,1 M NaH₂PO₄ x 2H₂O
0,01 M Tris
→ pH einstellen auf 8,0

Elutionspuffer B: Zusammensetzung wie Waschpuffer (pH 8,0)
→ pH einstellen auf 6,3

Elutionspuffer C: Zusammensetzung wie Waschpuffer (pH 8,0)
→ pH einstellen auf 5,9

Elutionspuffer D: Zusammensetzung wie Waschpuffer (pH 8,0)
→ pH einstellen auf 4,5

Neutralisationspuffer: 1 M Tris-HCL
→ pH einstellen auf 9,5

4.3.1.2.1. Säulenvorbereitung

Für die Aufreinigung eines Fusionsproteins mit His-Tag wurden 2 ml einer Ni-NTA-Agarose-Suspension (\equiv 1 ml Matrix-Volumen) in eine entsprechende Säule (BD Biosciences) pipettiert. Nach Absetzen der Agarose wurde der überschüssige Ethanol vorsichtig abgenommen und verworfen. Anschließend wurden etwa 10 ml des Waschpuffers A hinzugefügt und lies die Agarose-Kügelchen auf dem Säulenfilter absetzen. Nachdem die Matrix mit insgesamt 20 ml Waschpuffer A äquilibriert wurde, konnte die entsprechende Proteinlösung aufgetragen werden. Bei jedem Pufferwechsel musste stets darauf geachtet werden die Matrix nicht aufzuwirbeln und ein Trockenlaufen zu vermeiden.

4.3.1.2.2. Aufschluss der Bakterien

Das Bakterienpellet wurde zunächst auf Eis aufgetaut und in 10 ml Waschpuffer A (pro 200 ml-Kultur) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend für 3 x 10 sek auf Eis sonifiziert. Die Lyse der Bakterien erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung. Schließlich wurde die Lösung für 15 min bei 9.500 x g (4°C) abzentrifugiert und der Überstand für die Aufreinigung verwendet.

4.3.1.2.3. Aufreinigung über die Ni-NTA-Agarose-Säule

Die Proteinlösung wurde auf die Säulenmatrix pipettiert und der Durchlauf aufgefangen. Nachfolgend wurde die Säule mit 30 ml Waschpuffer A gereinigt. Die Elution des Proteins erfolgte durch kontinuierliche Absenkung des pH-Wertes nach folgendem Protokoll:

12 ml Elutionspuffer B	(pH 6,3)
12 ml Elutionspuffer C	(pH 5,9)
10 ml Elutionspuffer D	(pH 4,5)
20 ml Waschpuffer A	(pH 8,0; Reinigung der Säule)

→ Aufbereitung der Säule

Ab einem pH-Wert von 6,3 wurden die Fraktionen in Aliquots á 1 ml aufgefangen, wobei 1/10 Volumen Neutralisationspuffer vorgelegt wurden. Die Fraktionen konnten bis zur weiteren Analyse ohne Degradationserscheinungen bei 4°C gelagert werden.

4.3.1.2.4. Aufbereitung der Säulenmatrix

Die Ni-NTA-Agarose-Säule konnte für die Aufreinigung desselben Proteins mehrmals verwendet werden, solange keine Verfärbungen der Matrix aufgetreten sind. Vor einer weiteren Aufreinigung musste die Matrix zunächst wieder aufbereitet werden. Hierzu wurden nach dem finalen Waschschrift (20 ml Waschpuffer A), 3 ml 0,5 M NaOH auf die Säule pipettiert und diese für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit einer 30%igen Ethanol-Lösung gespült und konnte darin für mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden.

4.3.1.2.5. Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE

Von den Fraktionen mit pH 6,3 bis pH 4,5 wurden je 7,5 µl abgenommen und mit 7,5 µl 2x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden anschließend in einem entsprechenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, die Proteine mit PAGE-Blue gefärbt und diejenigen Fraktionen ermittelt, die das Fusionsprotein enthielten.

4.3.2. Renaturierung von Proteinen durch Dialyse

Erfolgt die Aufreinigung eines Proteins unter denaturierenden Bedingungen, so muss das Protein durch eine Dialyse wieder in seine aktive Konformation gebracht (Renaturierung) werden. Dies geschieht dadurch, dass der Harnstoff sukzessive aus dem Puffer entfernt wird, in dem das Protein gelöst ist. Da die aufgereinigten Proteine ebenfalls in Embryonen injiziert wurden, ist ein Entfernen des Harnstoffs von besonderer Bedeutung, da bereits geringe Harnstoffkonzentrationen für Embryonen toxisch sind. Der bei der Dialyse verwendete Dialyseschlauch stellt eine semipermeable Membran mit einer Ausschlussgrenze von 6-8 kDa dar. Dies bedeutet, dass während der Dialyse das Protein innerhalb des Schlauches verbleibt, wohingegen die Harnstoffmoleküle aufgrund des osmotischen Konzentrationsgradienten in den umliegenden Puffer diffundieren. So wird durch kontinuierliche Herabsetzung der Harnstoffkonzentration des Dialysepuffers, der Harnstoff komplett aus dem Dialyseschlauch entfernt und das Protein renaturiert.

Durchführung:

Zunächst ließ man den Dialyseschlauch für 30 min bei Raumtemperatur in H₂O_{bidest.} äquilibrieren und versiegelte ein Ende mit einer Klammer. Die Länge des Dialyseschlauches variierte dabei mit der zu dialysierenden Probenmenge (0,32 ml/cm). Anschließend wurde die Probe eingefüllt und wiederum das offene Ende wiederum verschlossen. Dabei musste darauf geachtet werden, zusätzlich Platz im Dialyseschlauch für einströmenden Puffer zu lassen. Der Dialyseschlauch wurde zudem an einen Schaumstoffschwimmer befestigt um ein Herabsinken und das versehentliche Öffnen des Schlauches durch den Rührfisch zu vermeiden. Schließlich erfolgte die renaturierende Dialyse unter ständigem Rühren nach folgendem Standardprotokoll:

Standardprotokoll einer renaturierenden Dialyse		
Puffer	Dialysebedingungen	
6 M Harnstoff in 1x PBS	1h bei Raumtemperatur	1 L
4 M Harnstoff in 1x PBS	1h bei Raumtemperatur	Zugabe von 0,5 L 1xPBS
3 M Harnstoff in 1x PBS	1h bei 4°C	Zugabe von 0,5 L 1xPBS
2 M Harnstoff in 1x PBS	1h bei 4°C	Zugabe von 1 L 1xPBS
1 M Harnstoff in 1x PBS	1h bei 4°C	frisch angesetzt
1x PBS	1h bei 4°C	
1x PBS	über Nacht bei 4°C	

Tabelle 4-9: Standardprotokoll einer renaturierenden Dialyse

Nach Abschluss der Dialyse wurde die Proteinlösung aus dem Dialyseschlauch in entsprechende Gefäße überführt und bei -20°C gelagert.

Alternativ wurden zur Dialyse von geringeren Volumina der Proteinlösung (0,5 – 2 ml) die „Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Devices“ bzw. für größere Volumina (etwa 20 ml) die „Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassettes“ mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa verwendet. Diese Dialyseeinheiten wurden von der Firma Thermo Scientific verwendet und entsprechend dem jeweiligen Herstellerprotokoll verwendet, wobei für den eigentlichen Dialysevorgang das in Tabelle 4-9 aufgeführte Standardprotokoll zur Anwendung kam, mit dem Unterschied, dass hierbei immer gegen reines PBS dialysiert wurde.

4.3.3. Bestimmung der Harnstoffkonzentration in wässrigen Proteinproben

Zur Bestimmung der Harnstoffkonzentration in wässrigen Proteinlösungen (z.B. um den Erfolg der Dialyse zu testen) wurden Teststreifen (Merckognost) der Firma DiaSys Diagnostic Systems GmbH (Holzheim) verwendet. Die Teststreifen bestehen dabei aus einer Reaktionszone, auf die eine verdünnte Proteinlösung aufgetragen wird. Dabei kommt es zur Urease-vermittelten Spaltung von Harnstoff zu Kohlendioxid und Ammoniak. Letzterer wandert gasförmig entlang einer, auf dem Teststreifen befindlichen pH-Indikatorzone und färbt diese blau. Anhand der Länge der Blauzone kann in Verbindung mit einer eingezeichneten Skala die Harnstoffkonzentration näherungsweise bestimmt werden. Alle Arbeitsschritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.3.4. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

4.3.4.1. Bestimmung durch Extinktionsmessung (E_{280})

Mittels Extinktionsmessungen von Proteinlösungen durch Licht einer Wellenlänge von 280 nm, können Proteinkonzentrationen näherungsweise ermittelt werden. Dabei entspricht eine Extinktionseinheit ($E_{280} = 1$) einer Proteinkonzentration von 500 µg/ml.

4.3.4.2. Bestimmung durch eine BSA-Konzentrationsreihe

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinen über eine BSA-Reihe, wurde neben dem zu analysierenden Protein auch Rinderserumalbumin (bovine serum albumin; BSA) in verschiedenen Konzentrationen in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Anfärben der Proteine, konnte die Menge eines aufgereinigten und dialysierten Proteins näherungsweise anhand der Bandengröße und -intensität bestimmt werden.

4.3.5. Affinitätsaufreinigung eines Antikörperserums

Die Affinitätsreinigung von Antikörperseren wurde je nach Antikörper mittels aktivierter CNBr-Sepharose (anti-MAN1, gp#1) oder mittels Ni-NTA-Agarose (anti-Xemerin, 59/9) als Matrix durchgeführt. Bei dieser Methode wird zunächst das jeweilige Antigen (beispielsweise direkt nach einer Aufreinigung des Antigens als Fusionsprotein, siehe 4.3.1.) an die Matrix gebunden. Nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen und mehrmaliger Reinigung der Matrix, wird diese mit dem entsprechenden Antikörperserum inkubiert. Dabei bindet der, im Serum enthaltene Antikörper an das Antigen und kann schließlich nach mehreren Waschschritten über einen Elutionspuffer mit saurem pH eluiert und aufgefangen werden.

Lösungen:

Aktivierte CNBr-Sepharose (Amersham): 100 mg Pulver ergeben etwa 350 µl Säulenvolumen mit einer Bindungskapazität von 25-60 mg Protein/ml Säulenvolumen

Ni-NTA-Agarose (Qiagen): Bindungskapazität von bis zu 50mg Protein/ml Säulenvolumen

Quellungspuffer: 10 mM HCl

Bindepuffer (pH 8,8): 200 mM NaHCO₃
500 mM NaCl
→ pH einstellen mit 1 M Na₂CO₃

Absättigungspuffer: Bindepuffer + 200 mM Glycin

Waschpuffer 1 (pH 4,0): 100 mM Na-Acetat
500 mM NaCl
→ pH einstellen mit Essigsäure

Waschpuffer 2 (pH 6,8): 100 mM Glycin

PBS (pH 7,4): 140 mM NaCl
6,4 mM Na₂HPO₄
2,6 mM KCl
1,4 mM KH₂PO₄

PBS + 0,1% Triton-X-100

PBS + 300 mM NaCl

Elutionspuffer (pH 2,5): 100 mM Glycin

Neutralisationspuffer (pH 9,5): 1 M Tris-HCl

Herstellung der Säule:

Bei Verwendung von aktivierter CNBr-Sepharose wurden davon 500 mg in ein 15 ml-Röhrchen überführt und für etwa 30 Minuten in 5 ml Quellungspuffer aufgequollen. Wurde Ni-NTA-Agarose als Säulenmatrix verwendet, so wurden zunächst 2ml der Suspension in ein 15 ml-Röhrchen überführt und lies diese bei Raumtemperatur stehen, bis sich die Agarose abgesetzt hatte. Nachfolgend wurde der überschüssige Ethanol verworfen und die Matrix mit 5ml PBS gewaschen. Zur Vorbereitung des Antigens wurden 800 µl des entsprechenden Fusionsproteins mit 800 µl Bindepuffer gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rolltisch inkubiert. Alternativ kann das Antigen zuvor auch gegen den Bindepuffer dialysiert werden.

Alle nachfolgenden Schritte wurden für die CNBr-Sepharose und die Ni-NTA-Agarose gleichermaßen durchgeführt. Die Zentrifugationen wurden für 1 Minute bei 600 x g und 4°C durchgeführt. Nach Zentrifugation der Matrix wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Dabei musste darauf geachtet werden eine Pipettenspitze mit möglichst kleiner Öffnung zu verwenden, da die Säulenmatrix sehr leicht abgesaugt werden kann.

Nun wurde das zu bindende Antigen (in Bindepuffer) mit der Matrix vermischt und für 3 Stunden bei Raumtemperatur (bzw. über Nacht bei 4°C) auf einem Rolltisch inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurde die Matrix für 3 Stunden bei Raumtemperatur und Rotation mit dem Absättigungspuffer inkubiert. Anschließend wurde die Matrix wieder zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Matrix wurde nun zunächst mit Waschpuffer 1 und danach mit Bindepuffer gewaschen. Dieser Schritt wurde insgesamt fünf Mal wiederholt wobei die Matrix zwischen den einzelnen Waschschritten abzentrifugiert wurde. Schließlich wurde die Säulenmatrix zweimal mit PBS gewaschen und konnte für einige Wochen bei 4°C in PBS gelagert werden. Zur Stabilisierung der gebunden Proteine kann die Zugabe von Natriumazid (NaN_3) in einer Endkonzentration von 0,01% förderlich sein.

Affinitätsreinigung:

Das überständige PBS wurde abgenommen und die Matrix mit gebundenem Antigen für 3 Stunden bei Raumtemperatur unter Rotation mit dem entsprechenden Antikörperserum inkubiert. Zur Stabilisierung empfindlicher Antikörper sollte BSA in einer Endkonzentration von 0,5% zugegeben werden.

Nach Zentrifugation der Säule wurde der Überstand abgenommen und die Säule je zweimal mit PBS, PBS/0,1% Triton-X-100, PBS/300 mM NaCl, sowie nochmals mit PBS und abschließend mit Waschpuffer 2 gewaschen. Die Säule wurde zwischen den einzelnen Waschschritten für 1 Minute bei 600 x g und 4°C zentrifugiert.

Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgte mit 300-500 µl Elutionspuffer durch Resuspendierung der Matrix für 30 Sekunden. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand mit dem gereinigten Antikörper abgenommen und in Eppendorf-Caps (auf Eis) überführt. Zur Neutralisation des sauren pH-Wertes wurde jeder Elutionsfraktion jeweils 1/10 Volumen des

Neutralisationspuffers vorgelegt. Die Elution der Antikörper wurde insgesamt sechs Mal wiederholt und die Fraktionen miteinander vereinigt. Zur Stabilisierung der Antikörper wurde Natriumazid (Endkonz. 0,01%) zugegeben. Direkt im Anschluss an die Affinitätsreinigung wurde der Antikörper mit entsprechenden Zentrifugenfiltern (Amicon® Ultra – 0,5 ml; 10K; Millipore/Merck, Darmstadt) auf etwa 70-80 µl eingengt und schließlich bei -20°C gelagert. Die affinitätsgereinigten Antikörper wurden mittels Immunfluoreszenz auf fixierten Zellen getestet und die geeigneten Verdünnungen empirisch ermittelt.

Zur Aufbereitung der Säulenmatrix wurde diese für 10 Minuten in Elutionspuffer inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Matrix konnte mehrfach für Affinitätsreinigungen desselben Antikörperserums verwendet und in PBS/0,01% NaN₃ für 4-6 Wochen bei 4°C gelagert werden.

4.3.6. Extraktion von Proteinen aus Zellen von Embryonen und Organen

4.3.6.1. Mit SDS-Probenpuffer / Acetonfällung

Zunächst wurden 5 Embryonen des gewünschten Embryonalstadiums in ein 1,5 ml-Eppendorfcap überführt, mit 200 µl 1x SDS-Probenpuffer überschichtet und mit einer Pipette grob homogenisiert. Anschließend erfolgte die Zerkleinerung mit einem Eppendorf-Homogenisator bis eine homogene Suspension entstand. Diese Suspension wurde dann für 5 Minuten bei maximaler Umdrehung und 4°C zentrifugiert um größere / ungelöste Zellbestandteile zu sedimentieren. Der Überstand wurde schließlich in Aceton (siehe 4.3.7.) gefällt und das getrocknete Pellet in 50-100 µl 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert.

Sollte die Proteinausbeute aufgrund der Acetonfällung für nachfolgende Experimente zu gering sein, wurde eine alternative Methode angewandt: Zunächst wurden 5 Embryonen mit 50 µl 1x SDS-Probenpuffer überschichtet. Die Embryonen wurden darin für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Dieser Schritt erleichtert die nachfolgende Homogenisierung mit einer Pipette durch Resuspendieren. Nach einem weiteren Aufkochen für 3 Minuten bei 95°C, wurden die Proben für 5 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert. Im Pellet befanden sich schließlich unlösliche Zellbestandteile und Pigmente, wobei die obere Phase Dotterproteine enthielt. Die mittlere, wässrige Phase wurde abgenommen und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden dann bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert. Die embryonalen Proteine konnten schließlich in einer SDS-PAGE aufgetrennt und weiter analysiert werden.

4.3.7. Fällung von Proteinen

Die Fällung von Proteinen wurde in dieser Arbeit stets mit Aceton durchgeführt. Hierzu wurde eine wässrige Proteinlösung mit 6,5-8 Volumina Aceton (100%, p.a., -20°C) versetzt und die Proteine über Nacht bei -20°C oder für zwei Stunden bei -70°C präzipitiert. Anschließend wurden die gefällten Proteine für 10 Minuten bei 5000 x g und 4°C zentrifugiert, das Pellet nach Abnahme des Überstandes 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in einem geeigneten Volumen 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Die Methode der Acetonfällung eignet sich vor allem bei stark verdünnten Proteinlösungen oder größeren Volumina. Die Acetonfällung ist jedoch bei stark verdünnten Proteinlösungen nicht quantitativ. Nachteilig ist zudem, dass stark hydrophobe Proteine, vor allem bei Anwesenheit von Lipiden und Detergentien, schlechter präzipitiert werden. Da dieser Fall vor allem bei Proteinhomogenaten aus Embryonen auftrat, wurden die embryonalen Proteine in der Regel nicht mit Aceton gefällt.

4.3.8. Isolierung von Zellkernen aus Kulturzellen

Lösungen:

TKM-Puffer: 70 mM KCl
3 mM MgCl₂
10 mM Tris-HCl
→ pH einstellen auf 7,2

Lyse-Puffer: 10 mM Tris-HCl
0,5 mM PMSF (SL: 100 mM)
→ pH einstellen auf 7,2

Durchführung:

In dieser Arbeit kamen ausschließlich A6-Zellen zur Verwendung, die auf 150mm-Kulturschalen herangezogen wurden. Das nachfolgende Protokoll entspricht dabei einer Isolation von Zellkernen aus A6-Zellen von 5-6 Kulturschalen.

Zunächst wurde das Kulturmedium vollständig abgesaugt und die Zellen mit 5 ml TKM-Puffer gewaschen. Anschließend konnten sie in 5 ml TKM-Puffer mit einem Zell-Schaber vom Boden der Kulturschale gelöst und in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt werden. Die Schale wurde nochmals mit 5 ml TKM-Puffer gespült um annähernd alle Zellen zu erhalten. Die Zellsuspension wurde sorgfältig resuspendiert und für 5 Minuten bei 1000 rpm und 4°C sedimentiert. Der überständige Puffer wurde verworfen und das Zellsediment in 10 ml Lyse-Puffer aufgenommen. Die Lösung wurde nachfolgend für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Mittels eines Glas-Teflon-Homogenisators wurden die Zellen dann durch 25 Hübe aufgebrochen. Etwa 100 µl des Homogenisats wurde schließlich für die Bestimmung der Kernzahl mit einer Neubauer-Zählkammer sowie zur Kontrolle des erfolgreichen Aufbruchs der Zellen verwendet.

Dazu wurden die Kerne in einem Großquadrat der Zähl-Kammer (= 16 Kleinquadrate) ausgezählt und die Anzahl der Kerne nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Kernanzahl eines Großquadrates} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Kernzahl} / \text{ml}$$

Nach Bestimmung der Anzahl der Kerne wurden diese für 10 Minuten bei 3000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand entfernt und die Kerne in PBS, bzw. für eine SDS-PAGE in 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Dabei wurde ein entsprechendes Volumen des Probenpuffers verwendet um eine Konzentration von 5×10^6 Kerne / 20 µl zu erreichen. Die isolierten Kernproteine wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.3.9. Isolierung von Kernhüllen aus Kulturzellen

Lösungen:

- PBS:** (siehe 4.3.5.)
- Swelling-buffer:** 10 mM Tris-HCl; pH 7,5
- DNaseI-Puffer:** 500 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
5 mM CaCl₂
→ pH einstellen auf 7,5
- Kochsalzpuffer:** 500 mM NaCl
10 mM Tris-HCl
1 mM DTT (SL: 1M)
→ pH einstellen auf 7,5

DNaseI (SL: 50 µg/µl) / **RNaseA** (SL: 10 µg/µl)

Durchführung:

Falls nicht anders im Text erwähnt, wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Wie bei der Kernisolation, wurden auch hierfür ausschließlich A6-Zellen verwendet, welche auf 150mm-Kulturschalen (5-6x) kultiviert wurden.

Zunächst wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 3 ml PBS überschichtet, mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und in ein 50ml-Falconröhrchen überführt. Die Kulturschale wurde anschließend nochmals mit 2 ml PBS gespült und die restlichen Zellen ebenfalls in das Falconröhrchen gegeben. Danach erfolgte eine 10minütige Sedimentation der Zellen bei 1000 x g und 4°C. Schließlich wurde das Zellsediment in 20 ml Swelling-buffer durch 40 Hübe mit einem Glas-Teflon-Homogenisator homogenisiert und die Zellen aufgebrochen. Nach einer Inkubation für 10 Minuten wurde die Konzentration der Kerne bestimmt (siehe 4.3.8.), welche schließlich annähernd der Kernhüllkonzentration entsprach. Die Kerne wurden dann für 10 Minuten bei 3000 x g und 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 5 ml DNaseI-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 50 µg DNaseI und 100 µg RNaseA erfolgte der Verdau der

Nukleinsäuren für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einer weiteren 10minütigen Zentrifugation bei 3000 x g und 4°C wurde das Pellet in 20 ml Swelling-buffer homogenisiert und die Kerne mit einem Glas-Teflon-Homogenisator aufgebrochen. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten auf Eis wurden die Kernhüllen für 10 min bei 3000 x g und 4°C sedimentiert. Darauf folgte ein erneuter Verdau der Nukleinsäuren und ein Zentrifugationsschritt (siehe oben). Das Kernhüllpellet wurde in 3 ml Kochsalzpuffer resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorf-Caps überführt. Darin wurden die Kernhüllen für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei 10.000 x g und 4°C wurden die Kernhüllen mit 1 ml Swelling-buffer gewaschen und nochmals abzentrifugiert. Die Kernhüllen wurden abschließend in PBS, bzw. für eine SDS-PAGE in 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen, wobei wiederum eine Konzentration von 5×10^6 Kernhüllen / 20 μ l eingestellt wurde. Die Lagerung der Kernhüllen erfolgte bei -20°C.

4.3.10. Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Thomas und Kornberg (1975)

Die SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) dient als analytische Methode der Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse. Als Trennmedium dient dabei ein Gel, welches auf Polyacrylamid basiert und sich während des Vorgangs in einem Laufpuffer befindet. Dem Gel sowie dem Laufpuffer wird Natriumdodecylsulfat (SDS) zugegeben, welches die Tertiärstruktur von Proteinen zerstört und daher denaturierend wirkt. Ebenso überdeckt SDS die Eigenladung von Proteinen, sodass diese nur in Abhängigkeit ihrer molekularen Masse aufgetrennt werden. Dabei binden pro Gramm Protein etwa 1,4 g SDS. Zur Spaltung der Disulfidbrücken der Proteine wird dem Probenpuffer, in dem die Proben gelöst werden, β -Mercaptoethanol zugegeben. Ebenso werden die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine durch Erhitzen bei 95°C zerstört, sodass die Proteine letztendlich vollständig gestreckt vorliegen.

Die denaturierten Proteine werden anschließend in einem diskontinuierlichen Gelsystem aufgetrennt, welches aus einem Sammel- und Trenngel besteht. Die beiden Gele unterscheiden sich dabei in ihrer Acrylamidkonzentration und ihrem pH-Wert. Das Sammelgel dient der zentralen Fokussierung der Proteine, wohingegen sich die Proteine im Trenngel nach ihrer molekularen Masse auftrennen.

Das Anlegen einer elektrischen Spannung hat die Migration der negativ geladenen Proteine durch das Gel zur Folge. Nach Abschluss des Vorgangs können die Proteine durch Färbemethoden (Coomassie-, PAGE-Blue-, oder Silberfärbung) sichtbar gemacht werden oder spezifische Proteine über die Western-Blot-Methode nachgewiesen werden.

Zur Verwendung kam das Gel- und Puffersystem nach Thomas und Kornberg (Thomas and Kornberg, 1975) mit Acrylamidkonzentrationen von 12%, 15% oder 18%.

Lösungen:

Trenngel-Lösung A:	100 ml 30% Acrylamid-Bis-Lösung + 0,15 g Bis [N,N'-methylendiacylamid]
Trenngel-Lösung B:	3 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4% SDS
Sammelgel-Lösung A':	100 ml 30% Acrylamid-Bis-Lösung + 0,8 g Bis [N,N'-methylendiacylamid]
Sammelgel-Lösung C:	0,75 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4% SDS
TEMED:	(N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)
APS:	10% Ammoniumperoxodisulfat-Lösung in H ₂ O _{bidest.}
1%ige Agarose-Lösung	
Elektrophoresepuffer:	50 mM Tris-HCl; pH 8,8 380 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
1x SDS-Probenpuffer nach Laemmli (1970):	100 mM Tris-HCl; pH 6,8 10% (v/v) Glycerin 1% (w/v) SDS 10% (v/v) β-Mercaptoethanol

Durchführung:

Generell wurden Groß- oder Minigele mit Gelapparaturen verwendet, welche über die Firma Hartenstein (Würzburg) bezogen wurden. Zunächst wurden zwei Glasplatten, die Abstandhalter (Spacer) und der Taschenkamm mit 70%igem Ethanol gereinigt um vorhandene Protein- und Fettreste zu entfernen. Die Glasplatten wurden zusammen mit den eingesetzten Spacern durch Klammer fixiert und die untere Kante mit Tesafilm abgeklebt. Anschließend wurde der Taschenkamm eingesetzt und die Gießhöhe des Trenngels markiert, wobei zu den Taschen bei Großgelen ein Abstand von 1,5 cm und bei Minigelen ein Abstand von 1 cm eingehalten wurde. Nachdem man den Taschenkamm wieder entfernte, wurde die untere Kante (ca. 5 mm hoch) sowie die Seiten der Glasplatten mit 1%iger Agarose abgedichtet. Während der Polymerisation der Agarose konnte die Trenngellösung nach dem Pipettierschema aus Tabelle 4-10 vorbereitet werden. Das verwendete Ammoniumpersulfat und TEMED lösten dabei die Polymerisation des Gels aus. Die Trenngellösung wurde sorgfältig vermischt und anschließend ohne Luftblasen zu erzeugen zwischen die abgedichteten Glasplatten bis zur Markierung gegossen. Das Trenngel wurde dann umgehend mit H₂O_{bidest.} überschichtet um eine schnellere Polymerisation unter Luftausschluss sowie eine gleichmäßige Polymerisationsgrenze zu erzielen.

Lösung	Minigel			Großgel		
	12%	15%	18%	12%	15%	18%
A	2 ml	2,5 ml	3 ml	8 ml	10 ml	12 ml
B	1,25 ml			5 ml		
H ₂ O	1,7 ml	1,2 ml	0,7 ml	6,85 ml	4,85 ml	2,85 ml
TEMED	3,33 µl			13,4 µl		
APS	100 µl			400 µl		

Tabelle 4-10: Pipettierschema des Trenngels nach Thomas und Kornberg (je 1 Gel):

Nachdem die Polymerisation des Trenngels vollständig abgeschlossen war (ca. 20 min), wurde das Wasser abgegossen, die Sammelgel-Lösung nach dem Schema aus Tabelle 4-11 hergestellt, gründlich vermischt und auf das Trenngel gegossen. Schließlich wurde der Taschenkamm vorsichtig eingesetzt, wobei darauf zu achten war, dass sich keine Luftblasen bildeten. Das Sammelgel war nach etwa 15 Minuten komplett auspolymerisiert.

Lösung	Minigel	Großgel
A'	325 µl	1,3 ml
C	625 µl	2,5 ml
H ₂ O	1,55 ml	6,2 ml
TEMED	2,5 µl	10 µl
APS	75 µl	300 µl

Tabelle 4-11: Pipettierschema des Sammelgels (je 1 Gel):

Nun konnte der Tesafilm an der unteren Kante des Gels entfernt und das Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingesetzt werden. Die untere Kammer wurde mit dem Elektrophoresepuffer befüllt. Wurde nur ein Gel verwendet, so wurden in die andere Seite der Kammer zwei Glasplatten ohne Spacer eingespannt. Nun befüllte man die obere Kammer ebenfalls mit Elektrophoresepuffer und entfernte den Taschenkamm aus dem Gel. Möglicherweise verbogene Taschen wurden mit einem feinen Spatel zurechtgerückt und die Taschen mit Elektrophoresepuffer gespült.

Im nächsten Schritt wurden die zu beladenden Proben, falls noch nicht geschehen, in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Nach einer Zentrifugation für 10 Sekunden bei 10.000 x g, konnten die Proben vorsichtig in die Taschen pipettiert werden, wobei die Taschen von Minigelen mit einem maximalen Probenvolumen von 25 µl (50 µl bei Großgelen) befüllt wurden. In die erste Tasche wurde dabei ein Größenstandard (Marker; PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder [Fermentas] oder Precision Plus Protein™ Standard Dual Color [Biorad], vgl. Abb. 4-2) aufgetragen, welcher aus einem Proteingemisch mit bekannten molekularen Massen besteht. Für Minigele wurde ein Volumen von 5 µl (10 µl bei Großgelen) des Markers verwendet.

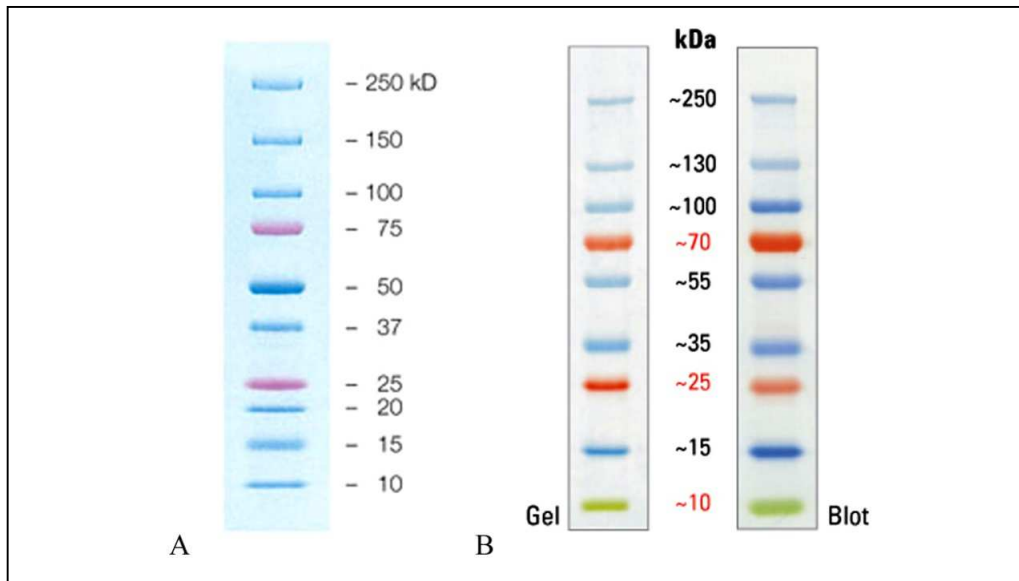


Abbildung 4-2: Verwendete Protein-Größenstandards: (A) Precision Plus Protein™ Standard, Dual Color (Biorad), (B) PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas).

Um die Lauffront zu markieren und so den Lauffortschritt beobachten zu können wurden die leeren Taschen mit je 10 μ l Bromphenolblau (in Probenpuffer) befüllt bzw. die Proben in diesem aufgenommen. Anschließend wurde der Kammerdeckel mit den Elektroden aufgesetzt und die Apparatur an ein Netzgerät angeschlossen.

Als Laufparameter bei Minigelen wurden eine maximale Spannung und 40 mA pro Gel (15 mA bei Großgelen) sowie eine Laufdauer von ca. einer Stunde (etwa 14-16 Stunden bei Großgelen) eingestellt. Sobald die Lauffront die untere Agaroseschicht erreicht hatte wurde der Lauf beendet, die Glasplatten entfernt und das Gel links unten markiert, indem eine Ecke abgeschnitten wurde. Ebenso wurde das Sammelgel mit einem aufgelegten Papiertuch entfernt und verworfen. Das Trenngel wurde schließlich für die Western-Blot-Methode weiterverwendet bzw. die Proteine mit Coomassie® Brilliant Blue (Roth) oder PageBlue™ (Fermentas) angefärbt.

4.3.11. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Wie bei der eindimensionalen Gelelektrophorese handelt sich hierbei ebenfalls um eine analytische Methode, welche erstmals von O'Farrell und Klose unabhängig voneinander beschrieben wurde (Zitate). In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode nach O'Farrell und Ivarie (O'Farrell und Ivarie, 1979) angewendet. Sie besteht dabei aus zwei Schritten, der Isoelektrischen Fokussierung (IEF) und einer klassischen SDS-PAGE. Die Kombination beider Schritte führt dabei zu einer deutlichen Erhöhung des Auflösungsvermögens der aufgetrennten Proteine und gibt zudem Auskunft über die Zusammensetzung unterschiedlicher Proteinpopulationen.

In der ersten Dimension (IEF) wird ein Proteinextrakt in einem pH-Gradienten-Gel und angelegtem elektrischen Feld aufgetrennt. Der pH-Gradient wird zuvor durch Trägerampholyten (synthetische Aminosäuren) aufgebaut, welche bei Anlegen eines elektrischen Feldes den pH-

Gradienten formen. Die Proteine eines Proteinextraktes durchlaufen dabei diesen pH-Gradienten, wobei sich am sog. Isoelektrischen Punkt (pI) positive und negative Ladungen der Proteine aufheben. Somit entspricht der pI demjenigen pH-Wert, bei dem das jeweilige Protein eine Nettoladung von 0 aufweist. Es wirkt daher ab diesem Punkt durch das elektrische Feld keine Kraft mehr auf die Proteine. Folglich werden die Proteine in diesem pH-Bereich immobilisiert. Aus diesem Grund eignet sich die IEF besonders zur Untersuchung unterschiedlicher Phosphorylierungszustände von Proteinen.

In der zweiten Dimension (SDS-PAGE) wird das Gelfeld der ersten Dimension auf ein klassisches Polyacrylamidgel aufgelegt. Dabei werden die Proteine schließlich senkrecht zur ersten Dimension und entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

4.3.11.1 Erste Dimension der isoelektrischen Fokussierung (IEF)

Lösungen:

Lysispuffer:	9,5M Harnstoff 2 % Nonidet P40 5 % β -Mercaptoethanol 0,8% Ampholine pH 4-6 0,8% Ampholine pH 5-7 0,4% Ampholine pH 2-11
Überschichtungspuffer:	6 M Harnstoff 0,4% Ampholine pH 4-6 0,4% Ampholine pH 5-7 0,2% Ampholine pH 2-11
30%-Acrylamid-Bis-Lösung:	28,38 g Acrylamid 1,62 g Bis (N,N'-Methylendiacylamid) → auf 100 ml mit H ₂ O _{bidest.} auffüllen
10% Nonidet P40:	10 g Nonidet P40 → auf 100 ml mit H ₂ O _{bidest.} auffüllen
Kathodenpuffer:	10 mM H ₃ PO ₄
Anodenpuffer:	20 mM NaOH
SDS-Probenpuffer (für 2. Dimension):	60 mM Tris-HCl, pH 6,8 10 % Glycerin 5 % β -Mercaptoethanol 2 % SDS

4.3.11.1.1. Silikonisierung der Glasröhrchen

Zur Herstellung der Rundgele wurden Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von 2mm in einem Messzylinder mit Silikonisierungslösung (Serva) überschichtet. Dieser Schritt diente einem besseren Herausgleiten der Gele nach erfolgter Elektrophorese. Der Zylinder wurde dann mit Parafilm abgedichtet und die Glasröhrchen darin mehrmals invertiert um ein gleichmäßiges Verteilen der Lösung zu erzielen. Die Lösung wurde danach wieder zurückgegossen und die Röhrchen in einem Heizschrank für mind. eine Stunde bei 80°C getrocknet. Nachdem die Glasröhrchen abgekühlt waren, wurden sie am unteren Ende mit Parafilm abgedichtet und es konnten die Rundgele gegossen werden.

4.3.11.1.2. Rundgele

Zunächst musste sichergestellt werden, dass der in der Gellösung enthaltene Harnstoff vollständig gelöst war. Im Anschluss daran konnten die Ampholine, APS und TEMED zugegeben werden (siehe Tabelle 4-12). Die Gellösung wurde dann mit einer langen Pasteur-Pipette bis zu einer Höhe von 12cm in die Glasröhrchen pipettiert. Dabei musste besonders darauf geachtet werden keinerlei Luftblasen zu erzeugen. Die Gellösung wurde anschließend mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ überschichtet um eine gleichmäßige Polymerisation des Gels zu gewährleisten. Wurden die Rundgele am selben Tag benötigt, so erfolgte die Polymerisation für etwa 2 Stunden bei Raumtemperatur (alternativ über Nacht bei 4°C). Die Geloberfläche wurde danach mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gespült und der Parafilm entfernt. Um ein Herausgleiten der Rundgele zu vermeiden, wurde das untere Ende der Glasröhrchen mit Gaze-Stoff überzogen.

Pipettierschema für Rundgele der ersten Dimension (ca. 10 Gele)	
Menge	Reagenz
5,5 g	Harnstoff
1,33 ml	30%ige Acrylamid-Bis-Lösung
2 ml	10%ige Nonidet NP40-Lösung
2 ml	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
200 μl	Ampholine pH 4-6
200 μl	Ampholine pH 5-7

Tabelle 4-12: Pipettierschema zur Herstellung der Rundgele

Nach Polymerisation der Gele, wurden die Glasröhrchen in eine Elektrophoresekammer eingesetzt. Anschließend wurde die untere Kammer mit 10 mM H_3PO_4 und die obere Kammer mit 20 mM NaOH gefüllt ohne die Glasröhrchen zu überschichten.

4.3.11.1.3. Vorelektrophorese

Die Vorelektrophorese diente dem Aufbau des pH-Gradienten in den Rundgelen. Hierzu wurden die Gele zunächst mit 20 μl Lysispuffer und danach mit 20 μl Überschichtungspuffer überschichtet. Nun wurden auch die Glasröhrchen sowie die Elektrophoresekammer mit 20 mM NaOH aufgefüllt. Die Vorelektrophorese wurde dann nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Obere Kammer: Kathode (-)
Untere Kammer: Anode (+)
30 Minuten bei 200 V
30 Minuten bei 300 V
60 Minuten bei 400 V

Schließlich wurde der Kathodenpuffer abgenommen, die Pufferlösung von den Rundgelen abpipettiert und die Geloberfläche mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gespült.

4.3.11.1.4. Vorbereitung der Proben

Zunächst mussten die Proteinproben mittels Acetonfällung gefällt werden (siehe 4.3.7.). Die getrockneten Proteinpellets wurden dann in einem entsprechenden Volumen Lysispuffer (Einstellen auf etwa 5 mg Proteinmischung pro Rundgel) aufgenommen und auf das Rundgel pipettiert. Die Proben wurden schließlich mit 20 µl Überschichtungspuffer überschichtet.

Zur Ermittlung des pH-Wertes in den Rundgelen wurde ein Gel ohne Probe und nur mit Lysispuffer bzw. Überschichtungspuffer beladen. Die Elektrophoresekammer und die Röhren wurden daraufhin wieder mit 20 mM NaOH befüllt und die Elektrophorese nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Obere Kammer: Kathode (-)

Untere Kammer: Anode (+)

16-18 Stunden bei 400 V

Die Gele wurden danach mit einer Wasser-gefüllten Spritze und aufgesteckten Silikonschlauch aus den Glasröhren gedrückt. Zur Äquilibration der Gele für die zweite Dimension wurden die Rundgele in Petrischälchen überführt, das NaOH- bzw. H₃PO₄-Ende markiert und für 20 Minuten in SDS-Probenpuffer (für 2. Dimension) inkubiert. Der Probenpuffer konnte danach abgesaugt und die Rundgele bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert oder sofort für die zweite Dimension verwendet werden.

4.3.11.1.5. Bestimmung des pH-Gradienten der Rundgele

Das Rundgel zur Bestimmung des pH-Gradienten wurde mit einem Skalpell zunächst in 5 mm lange Stücke geschnitten. Diese wurden dann in 15 ml-Falconröhren überführt mit 3 ml H₂O_{bidest.} überschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Röhren geschüttelt, auf Raumtemperatur gebracht und der pH-Wert der einzelnen Proben ermittelt.

4.3.11.2. Zweite Dimension: SDS-PAGE

Zunächst wurden Großgele hergestellt (siehe 4.3.10.) wobei jedoch kein Kamm eingesetzt und eine Glasplatte mit abgeschrägter Kante verwendet wurde. In diese wurde im Anschluss das Rundgel ausgestreckt dem Sammelgel aufgelegt. Zudem wurden 10 µl des Größenstandards (siehe 4.3.10.) in einen Tropfen flüssiger Agarose (1% Agarose in SDS-Probenpuffer) gegeben und nach Polymerisation der Agarose ebenfalls auf das Sammelgel gelegt. Rundgel und Agarosetropfen wurden dann mit einer flüssigen Agaroselösung (1% Agarose in SDS-Probenpuffer) luftblasenfrei überschichtet um eine durchgehende Verbindung zum Sammelgel zu erreichen. Die Elektrophorese der zweiten Dimension erfolgte unter Standardbedingungen (siehe 4.3.10.). Die separierten Proteine des Großgels wurden danach direkt gefärbt oder geblottet und mittels Antikörper nachgewiesen.

4.3.12. Western-Blot (Semidry-Elektroblot)

Die Western-Blot-, oder auch Immunblot-Methode, dient der Identifikation und Quantifikation spezifischer Proteine in komplexen Proteingemischen. Die Proteine, welche zuvor mittels SDS-PAGE oder einer 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, werden dabei durch Elektroblotting in einem elektrischen Feld auf eine Trägermatrix (hier eine Nitrocellulosemembran) transferiert. Im Anschluss daran können bestimmte Proteinbanden durch spezifische Antikörper detektiert werden. An diese Antikörper binden wiederum Sekundärantikörper, an die Enzyme gekoppelt sind. Das dabei am häufigsten verwendete Enzym ist eine Peroxidase, die sogenannte HRP (horseradish peroxidase). Zur Visualisierung der detektierten Proteinbanden dient die ECL-Methode (enhanced chemiluminescence), wobei die HRP die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form katalysiert. Dadurch kommt es zu einer Lumineszenz, welche auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann.

Der Name Western-Blot basiert auf dem Erfinder, Edwin Southern, der diese Technik im Jahre 1975 für die Auftrennung von DNA-Fragmenten und der anschließenden Hybridisierung als Southern-Blot eingeführt hatte (Southern, 1975). Danach wurden weitere Blot-Methoden in Bezug auf RNA-Moleküle als Northern-Blot und in Bezug auf Proteine als Western-Blot benannt. Das in dieser Arbeit verwendete Semidry-Verfahren beruht auf einer von Towbin (Towbin et al., 1979) beschriebenen Methode.

Lösungen:

Blotpuffer 1:	25 mM Tris-HCl 20% (v/v) Methanol → pH einstellen auf 10,4
Blotpuffer 2:	300 mM Tris-HCl 20% (v/v) Methanol → pH einstellen auf 10,4
Blotpuffer 3:	25 mM Tris-HCl 40 mM DL-Norleucin 20% (v/v) Methanol → pH einstellen auf 9,4
TBST:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 0,05% (w/v) Tween® 20
Absättigungslösung:	10% (w/v) Magermilchpulver in TBST; pH 7,4
Ponceau-S:	Gebrauchsfertige 0,2%ige Lösung (Serva)
ECL-Lösungen A und B:	(GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg)

4.3.12.1. Semidry-Verfahren nach Towbin

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurde das Gel wie in 4.3.10. beschrieben isoliert und markiert. Anschließend ließ man das Gel etwa 10 min in Blotpuffer 3 äquilibrieren. Danach musste das Gel ausgemessen werden um die Laufparameter des Westernblots zu ermitteln, welche von der Größe des

der sek. Antikörper, siehe 3.1.4.2.). Die Antikörperbindung erfolgte unter denselben Bedingungen wie für den Primärantikörper beschrieben. Vor der Detektion der spezifisch gebundenen Antikörper mit ECL wurde der Blot nochmals einem dreimaligen Waschschrift mit TBST unterzogen.

4.3.12.3. Detektion über Peroxidase-konjugierte Antikörper und ECL

Zur Detektion der gebundenen Antikörper wird die „Enhanced Chemiluminescence“-Methode (ECL) durchgeführt, wobei der verwendete Sekundärantikörper mit dem Enzym Peroxidase (isoliert aus Meerrettich) konjugiert sein muss. Nach dem finalen Waschschrift (siehe 4.3.12.2.) wurde das TBST abgetropft und die ECL-Lösung (A:B = 1:1) etwa drei Minuten auf die Membran pipettiert. Anschließend ließ man den Blot abtropfen und wickelte ihn luftblasenfrei in Frischhaltefolie. Die durch die chemische Reaktion erzeugte Lumineszenz konnte nun mit einem Röntgenfilm detektiert werden. Dazu wurde der eingeschlagene Blot in eine Filmkassette gelegt und der Röntgenfilm (Cronex-5, AGFA) unter striktem Lichtausschluss (Dunkelkammer) aufgelegt. Die Belichtungszeiten variierten je nach Proteinmenge und den verwendeten Antikörperverdünnungen, wobei jedoch Zeiten zwischen einer und 30 Minuten eingehalten wurden. Anschließend wurde der Röntgenfilm in einer Entwicklerlösung inkubiert bis definierte Banden erschienen sind. Diese Reaktion wurde zunächst in einer Essigsäure-Lösung abgestoppt und der Röntgenfilm nachfolgend für eine Minute in eine Fixierungslösung gehalten. Schließlich wurde der Film mit Wasser gespült und konnte nach dem Trocknen zur Dokumentation eingescannt und mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop editiert werden.

4.3.12.4. Entfernen gebundener Antikörper (*Strippen*)

Für den Nachweis weiterer Proteine bzw. für eine erneute Inkubation mit spezifischen Antikörpern mussten die gebundenen Antikörper zunächst von der Nitrocellulosemembran entfernt werden. Dabei wird die Antikörper-Antigen-Bindung durch reduzierende oder saure Reagenzien bei mittlerer Hitze gelöst.

Lösungen:

Stripping-Lösung : 100 mM Tris-HCl; pH 6,7
2% SDS (20%-Stammlösung)
0,78% β -Mercaptoethanol

TBST: (siehe 4.3.12.)

Durchführung:

Die Nitrocellulosemembran wurde zunächst drei Mal für jeweils 5 min in TBST unter Schwenken gewaschen. Anschließend wurde der Blot für 30 min bei 50°C (Wasserbad) unter leichter Bewegung in der Stripping-Lösung inkubiert. Nach drei Waschschriften für je 10 min in TBST wurde die Membran in 10% Magermilch/TBST (pH 7,4) für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur abgesättigt. Schließlich konnte der Blot erneut mit den gewünschten Antikörpern inkubiert werden (siehe ab 4.3.12.2.).

4.3.13. Färbung von SDS-Gelen

4.3.13.1. Modifizierte Coomassie-Färbung

Lösungen:

Modifiziertes Coomassie: 5% (w/v) Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat
→ in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ lösen
10% (v/v) Ethanol (p.a.)
0,02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250
→ Coomassie vollständig lösen
2% (w/v) Ortho-Phosphorsäure (100%-SL)
→ mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ Auffüllen auf 1 L

Durchführung:

Nach erfolgter gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine oder standardmäßig nach dem Western-Blot wurden die Gele über Nacht bei Raumtemperatur in modifiziertem Coomassie auf einem Schwenktisch inkubiert. Der Farbstoff lagert sich dabei an die basischen Seitenketten der Aminosäuren, wodurch es zu einer unspezifischen Färbung der Proteine kommt. Am nächsten Tag wurden die Gele in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ überführt und darin für 10 Minuten entfärbt. Nach einem erneuten Wechsel des Wassers wurden die Gele darin so lange inkubiert bis die Banden klar zu erkennen und der Hintergrund reduziert war.

4.3.13.2. PageBlueTM-Färbung

Als Alternative zur Coomassie-Färbung wurden Polyacrylamidgele mit der gebrauchsfertigen Färbelösung PageBlueTM (Fermentas) gefärbt. Der Vorteil liegt dabei in der hohen Sensitivität von bis zu 5 ng Protein und einem geringen Zeitaufwand. Nach einer SDS-PAGE wurden die Gele drei Mal in je 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ für 60 Sekunden in einer Mikrowelle (hohe Stufe) erhitzt und nach jedem Waschschritt für weitere vier Minuten auf einem Schwenktisch inkubiert. Das Wasser wurde nach jedem Waschvorgang gewechselt. Nachfolgend wurden die Gele mit der PageBlue-Färbelösung leicht überschichtet und für 30 Sekunden in eine Mikrowelle gestellt. Anschließend erfolgte einer 20minütige Inkubation bei Raumtemperatur in der erhitzten Färbelösung (auf einem Schwenktisch). Schließlich wurde die Färbelösung für weitere Verwendungen zurückgegossen und die Gele in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ bis zum Erscheinen klar definierter Proteinbanden etwa 10 Minuten entfärbt. Das gefärbte Gel konnte dann eingescannt und mittels der Software Adobe Photoshop editiert werden.

4.3.13.3. Trocknen von Polyacrylamidgelen

Um Polyacrylamidgele nach Färbung der Proteine für einen längeren Zeitraum haltbar zu machen wurden diese getrocknet. Dafür wurden die Gele luftblasenfrei zwischen zwei, mit Wasser befeuchtete Zellophan-Folien gelegt und in einen Plexiglasrahmen eingespannt. Nach etwa 12 Stunden bei Raumtemperatur waren die Gele vollständig getrocknet, konnten aus dem Rahmen entnommen und überschüssige Folie abgeschnitten werden.

4.4. Zellbiologische Methoden

4.4.1. Zellkultur

4.4.1.1. Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien (siehe 3.1.3.) wurde unter einer Sterilbank und nach Anweisung der geltenden Sicherheitsbestimmungen durchgeführt. Das kontinuierliche Wachstum der Zellen wurde stets mit einem Inversmikroskop mit Phasenkontrast überprüft.

4.4.1.2. Passagieren adhärenter Zellen

Lösungen:

PBS: (siehe 4.3.5., autoklaviert, auf 37°C vorgewärmt)

Trypsin-EDTA: PBS
+ 0,06% Trypsin
+ 0,53 mM EDTA
→sterilfiltrieren

Komplettmedium: DMEM-Medium
+ 15% H₂O_{bidest} (sterilfiltriert)
+ 10% FCS (Fetal calf serum)
+ 1% Penicillin/Streptomycin
+ 1% L-Glutamin

Durchführung:

Adhärente Zellen wurden stets in T75-Flaschen (75 cm², TPP Techno Plastic Products AG) oder in Schalen mit einem Durchmesser von 100 mm (Sarstedt) bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert. Vor Beginn der Arbeiten mussten die verwendeten Lösungen (Komplettmedium, PBS und Trypsin) in einem Wasserbad auf 37°C vorgewärmt werden.

Das Kulturmedium wurde zunächst abgesaugt und die Zellen zweimal mit jeweils 1 ml PBS gewaschen. Dieser Waschschritt diente einerseits dazu um möglicherweise bereits abgestorbene Zellen sowie das Kulturmedium selbst zu entfernen. Letzteres würde zudem die Wirkung der Trypsin-Lösung inhibieren. Die Zellen wurden dann mit 1 ml der Trypsin-Lösung komplett bedeckt und die Kulturschale für etwa 5 Minuten bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Trypsin ist ein Enzymgemisch aus verschiedenen Peptidasen, welche der Vereinzelung der Zellen dienen. Anschließend wurden neue Kulturschalen mit Namen der Zelllinie, Passagennummer und Datum beschriftet und mit 5 ml Komplettmedium befüllt. Die Trypsin-Lösung wurde anschließend durch Zugabe von 5ml Komplettmedium inaktiviert und die Zellen darin resuspendiert. Abhängig von der aktuellen Zellzahl und der gewünschten Zelldichte für Folgeversuche wurde ein entsprechendes Volumen der Zellsuspension entnommen und in die neue Kulturschale (bzw. Kulturflasche) überführt.

Bei einer Konfluenz der Zellen von etwa 80% und einer erneuten Passagierung der Zellen nach etwa drei Tagen wurden im Allgemeinen 250 µl der Zellsuspension verwendet. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank kultiviert.

4.4.1.3. Einfrieren von Zellen

Lösungen:

Einfriermedium: Kompletmedium (siehe 4.4.1.2.)
+ 20% FCS
+10% DMSO

Durchführung:

Zunächst wurden die Zellen wie unter 4.4.1.2. beschrieben gewaschen, trypsinisiert und mit 4ml Kompletmedium versetzt. Die resuspendierte Zellsuspension wurde dann in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und darin für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert (30%, Hettich Universal / K2S). Während dieser Zeit wurde das Einfriermedium vorbereitet. Nach der Zentrifugation wurde das Medium vollständig von den Zellen abgezogen und diese in 1,5 – 2 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in Cryoröhrchen überführt und diese anschließend in eine, mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox (Nalgene™ Cryo1C Freezing Container) gestellt und bei -70°C eingefroren (ca. 24 Stunden). Dabei dient das, im Einfriermedium enthaltene DMSO (Dimethylsulfoxid) dazu, das Auskristallisieren des zytoplasmatischen Wassers während dem Einfrierprozess zu verhindern. Am Folgetag wurden die Cryoröhrchen aus der Box entnommen und in flüssigen Stickstoff überführt.

4.4.1.4. Auftauen von Zellen

In Cryoröhrchen eingefrorene Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und mehrere Stunden bei -70°C gelagert. Das Auftauen der Zellen erfolgte dann in einem Wasserbad bei 37°C. Die Zellen wurden dann in ein 15ml Falconröhrchen überführt und in 8 ml vorgewärmten (37°C) Kompletmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann für 5 Minuten bei 1000 rpm (30%, Hettich Universal / K2S) abzentrifugiert und das überständige Medium anschließend abgesaugt. Die Zellen wurden erneut in frischem Kompletmedium (5 ml) resuspendiert und in eine neue Kulturschale überführt. Das Kompletmedium wurde nach frühestens zwei Stunden erneuert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte schließlich in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

4.4.2. Fixierung von Zellen und Geweben

Vor der Analyse der intrazellulären Lokalisation von Proteinen müssen die zu untersuchenden Zellen zunächst in ihrer Struktur fixiert und permeabilisiert werden um die Zugänglichkeit der Antikörper für die indirekte Immunfluoreszenzlokalisierung zu verbessern. Hierzu wurden vor allem die Formaldehyd-Triton- und die Aceton-Methanol-Fixierung durchgeführt.

4.4.2.1. Fixierung mit Formaldehyd-Triton

Diese Methode wurde vorwiegend für Kulturzellen verwendet. Das verwendete Formaldehyd dient dabei der Vernetzung und Immobilisierung von löslichen und freien funktionellen Gruppen zellulärer Proteine. Das Detergenz Triton sorgt für eine Permeabilisierung von Lipidmembranen und somit für eine verbesserte Zugänglichkeit der verwendeten Antikörper.

Lösungen:

3% Formaldehydlösung: 37%ige Formaldehyd-Stammlösung verdünnt in PBS

0,3% Triton-Lösung: 0,3% (v/v) Triton™ X-100 in PBS

PBS (pH 7,4): (siehe 4.3.5.)

Durchführung:

Auf Deckgläschen herangezogene Kulturzellen (A6 und XTC) wurden zunächst kurz in PBS gespült und sofort in eine Feuchtkammer gelegt um ein Austrocknen zu vermeiden. Anschließend wurden 80 µl der 3%igen Formaldehydlösung auf die Zellen pipettiert und darin für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach einer weiteren Spülung in PBS erfolgte die Inkubation der Zellen mit der 0,3%igen Triton-Lösung (je 80 µl) für weitere 10 Minuten. Die Zellen wurden dann drei Mal für je fünf Minuten in einem Deckglasständer in PBS gewaschen und konnten schließlich für die indirekte Immunfluoreszenzlokalisierung verwendet werden.

4.4.2.2. Fixierung mit Aceton-Methanol

Diese Fixierungsmethode wurde vor allem bei Gefrierschnitten und Quetschpräparaten durchgeführt. Da die Schritte bei -20°C durchgeführt wurden, konnten zelluläre Strukturen besonders geschont werden. Aceton sorgte dabei für die Dehydrierung und Fixierung der Gewebe und Methanol für die Permeabilisierung der Zellstrukturen. Der Methanol-Schritt kann bei Gefrierschnitten jedoch vernachlässigt werden.

Lösungen:

Aceton: 100% (p.a.; -20°C)

Methanol: 100% (p.a.; -20°C)

PBS: (siehe 4.3.5.)

Durchführung:

Zunächst wurden die Präparate in einen entsprechenden Ständer in -20°C kaltes Methanol gestellt und darin für 7 Minuten inkubiert. Anschließend wurden sie in -20°C kaltes Aceton überführt und darin ebenfalls für 7 Minuten stehen gelassen. Nach dieser Zeit wurden die Proben für 10 Minuten luftgetrocknet, in eine Feuchtkammer überführt und konnten schließlich für die indirekte Immunfluoreszenzlokalisierung verwendet werden.

4.4.3. Indirekte Immunfluoreszenzlokalisierung in Zellen und Geweben

Mit Hilfe der indirekten Immunlokalisierung kann die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Dabei erkennt ein spezifischer Primärantikörper das zu lokalisierende Protein. Der Primärantikörper wird wiederum durch einen sekundären Antikörper gebunden. Dieser kann einerseits bei der Immunfluoreszenzlokalisierung mit Fluoreszenzfarbstoffen (sog. Fluorochromen) oder bei der Immungoldlokalisierung mit Goldpartikeln markiert sein. Die Fluorochrome werden bei einer Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt und erzeugen so ein spezifisches Signalmuster welches mit dem Lokalisationsmuster des Antigens übereinstimmt. Zur Untersuchung des Verteilungsmusters der DNA wird Bisbenzimid (=Hoechst) als DNA-Farbstoff verwendet. Dieser lagert sich vor allem in Adenin/Thymin-reiche Regionen und bevorzugt in die kleine Furche der doppelsträngigen DNA. Daher kommt es im Gegensatz zu Ethidiumbromid zu keiner Interkalation mit der DNA. Das hier verwendete Hoechst 33258 besitzt sein Absorptionsspektrum im UV-Bereich (ca. 350 nm) und emittiert Licht im Bereich von 460 nm (Blau).

4.4.3.1. Indirekte Immunfluoreszenzlokalisierung bei Kulturzellen

Lösungen:

PBS:	(siehe 4.3.5.)
PBT (Blockpuffer):	PBS + 0,1% (w/v) Tween 20 + 0,15% (w/v) BSA (Sigma)
Primär- und Sekundärantikörper:	(Verdünnung in PBS; siehe 3.1.4.1 und 3.1.4.2.)
Hoechst 33258:	(SL 5 mg/ml; Serva)
Mowiol:	10 g Mowiol → in 40 ml KH_2PO_4 -freiem PBS (pH 8,0) für 16 h rühren → 20 ml Glycerin zugeben und nochmals 16 h rühren → ungelöste Partikel abzentrifugieren und Überstand aliquotieren; Lagerung bei -20°C

Durchführung:

Nachdem die Kulturzellen fixiert und permeabilisiert wurden (siehe 4.4.2.), erfolgte zunächst die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Dazu wurden die Deckgläschen in eine Feuchtkammer überführt und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit je 100 µl PBT inkubiert. Bei der Absättigung ist jedoch darauf zu achten, dass dieser Schritt vom verwendeten Antikörper abhängig ist. So kann es vorkommen, dass bei Verwendung eines Antikörpers mit schwacher Epitopbindung, es zu einer Verschlechterung der Signale kommen kann und daher eine Absättigung nicht ratsam ist. Anschließend wurden die Zellen drei Mal für jeweils 5 Minuten in PBS gewaschen. Nun wurden die Zellen mit dem Primärantikörper inkubiert, wobei 50 µl der jeweiligen Antikörperverdünnung (siehe 3.1.4.1.) pro Deckglas verwendet wurden. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten, an welche ein weiterer dreimaliger Waschschritt angeschlossen wurde. Nun erfolgte die Inkubation mit dem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper (70 µl der jeweiligen Verdünnung pro Deckglas, siehe 3.1.4.2.) für 20 Minuten. Wurde eine Doppelimmunfluoreszenz mit zwei unterschiedlichen Primärantikörpern durchgeführt, so wurde die Inkubationszeit des ersten Sekundärantikörpers auf 30 Minuten verlängert. Direkt im Anschluss erfolgte nach erneutem Waschen in PBS die Inkubation mit dem zweiten Primär- sowie Sekundärantikörper. Um unspezifische Färbungen zu verhindern sollten beide Sekundärantikörper unterschiedliche Spezies-Spezifitäten aufweisen. Zum Färben der DNA wurden pro Ansatz 40 µl Hoechst zu der bereits auf dem Deckglas befindlichen Antikörperlösung pipettiert (Hoechst-SL 1:333 in PBS). Abschließend wurden die Zellen nochmals wie beschrieben in PBS gewaschen und kurz in 100% Ethanol (p.a.) inkubiert um mögliche Salzkristalle zu entfernen, welche durch PBS entstanden sein können.

Schließlich wurden die Deckgläschen auf einen gereinigten (mit 100% Ethanol) Objektträger mit einem Tropfen Mowiol eingebettet und konnten mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

4.4.3.2. Indirekte Immunfluoreszenzlokalisierung bei in-vitro Kernen

Nach der Bildung von in-vitro Kernen (siehe 4.5.3.) konnte die Anwesenheit sowie die Lokalisation der zu untersuchenden Proteine mittels der Immunfluoreszenzlokalisierung nachgewiesen werden.

Zur Fixierung der Kerne, wurden diese für zehn Minuten bei Raumtemperatur in vier Volumina einer 2%igen Formaldehyd-Lösung (37% Formaldehyd in PBS verdünnt) inkubiert. Die Suspension wurde anschließend in die Trichter einer Cytospin-Zentrifuge überführt und die darin vorhandenen Strukturen zehn Minuten bei 1000 rpm und 4°C auf gereinigte Objektträger zentrifugiert. Die Proben wurden sofort in Aceton (10 min, -20°C) fixiert und luftgetrocknet. Alle weiteren Schritte wurden wie bei der Immunfluoreszenzlokalisierung auf Kulturzellen durchgeführt (siehe 4.4.3.1.).

4.4.4. Proximity-Ligation-Assay

Der Proximity-Ligation-Assay (in situ PLA) kombiniert klassische immunhistochemische Methoden (z.B. Indirekte Immunfluoreszenz) zur Detektion einzelner Antigene oder Antigen-Antigen-Wechselwirkungen mit molekularbiologischen Methoden (PCR). Der PLA erreicht dadurch eine hohe Sensitivität zur Detektion einzelner Moleküle wie beispielsweise von Proteinen. Die Methode des PLA wurde erstmals von Ola Söderberg (Söderberg et al, 2008) beschrieben und wird heute kommerziell unter dem Namen Duolink® II von der Firma Olink (Olink Bioscience, Uppsala, Schweden) vertrieben. Anwendungsbeispiele des PLA sind die Detektion und Quantifizierung einzelner Proteine, von Protein-Interaktionen, von Protein-Modifikationen (bsp. Phosphorylierung) oder der Proteinexpression.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Proximity-Ligation-Assay-Kit Duolink® II der Firma Olink Bioscience verwendet. Bezugnehmend auf die Detektion von Protein-Interaktionen gliedert sich der Proximity-Ligation-Assay in fünf wichtige Abschnitte (siehe Abbildung 4-4):

- 1. Fixierung der Proben:** Zunächst müssen die zu analysierenden Proben (adhärente Zellen, histologische Gewebeschnitte, Cytospin-Proben) auf ein Deckglas oder einen Objektträger gebracht werden. Die Proben müssen anschließend fixiert und die Zugänglichkeit der Antikörper durch Permeabilisierung ermöglicht werden. Die Fixierungs-/ Permeabilisierungsmethode muss dabei abhängig von der jeweiligen Probe gewählt werden.
- 2. Detektion der Antigene:** Die Proben werden mit Primärantikörpern inkubiert, welche die zu untersuchenden Antigene detektieren. Für den Nachweis von Protein-Interaktionen, müssen diese Antikörper bestimmte Voraussetzungen erfüllen: Dabei ist es wichtig, dass (i) beide Primärantikörper in verschiedenen Spezies hergestellt wurden und dass sie (ii) das Antigen unter denselben Bedingungen (Fixierung, Puffer, etc.) detektieren. (iii) Die Primärantikörper sollten der IgG-Klasse angehören, (iv) für ihr Zielprotein spezifisch sein und (v) vorzugsweise affinitätsgereinigt vorliegen.
- 3. Detektion der Primärantikörper:** Im nächsten Schritt werden die Proben mit Oligonukleotid-gekoppelten Sekundärantikörpern (PLA probe MINUS und PLUS) inkubiert. Diese binden dabei an die beiden Primärantikörper des vorangegangenen Schrittes.
- 4. Ligation:** Ein Reaktionsgemisch bestehend aus zwei Oligonukleotid-Strängen und einer DNA-Ligase wird mit der Probe inkubiert. Die Oligonukleotide hybridisieren dabei mit den Oligonukleotid-Armen der Sekundärantikörper und werden mit Hilfe der DNA-Ligase zu einem ringförmigen DNA-Template verbunden. Dieser Schritt geschieht nur dann, wenn sich die Oligonukleotid-Arme (und somit auch die Antigene) in unmittelbarer Nähe zueinander befinden (close proximity). Zur Erzeugung spezifischer Signale, darf die maximale Entfernung der beiden Antigene 30-40 nm nicht überschreiten. Dies gilt vor allem für die Verwendung von Primär- und Sekundärantikörpern (durchschnittlicher Antikörperdurchmesser: 7 nm). Bei Verwendung von direkt Oligonukleotid-gekoppelten Primärantikörpern reduziert sich der genannte Abstand entsprechend.

5. **Amplifikation:** Die Proben werden mit einem Amplifikationsgemisch, bestehend aus Nukleotiden, Fluorochrom-gekoppelten Oligonukleotiden und einer DNA-Polymerase inkubiert. Die Oligonukleotid-Arme der Sekundärantikörper dienen dabei als Primer für eine „rolling-circle amplification“, bei der das ringförmige DNA-Template tausendfach amplifiziert wird. Produkt dieser Reaktion ist ein DNA-Strang aus sich kontinuierlich wiederholenden Sequenzen. Diese Sequenzen hybridisieren mit den Fluorochrom-gekoppelten Oligonukleotiden und generieren schließlich das spezifische punktförmige PLA-Signal (Durchmesser etwa 500 nm). Dabei spiegelt jedes einzelne PLA-Signal eine einzelne Protein-Interaktion wieder, wodurch die Interaktionen innerhalb einer Zelle quantifiziert werden können.

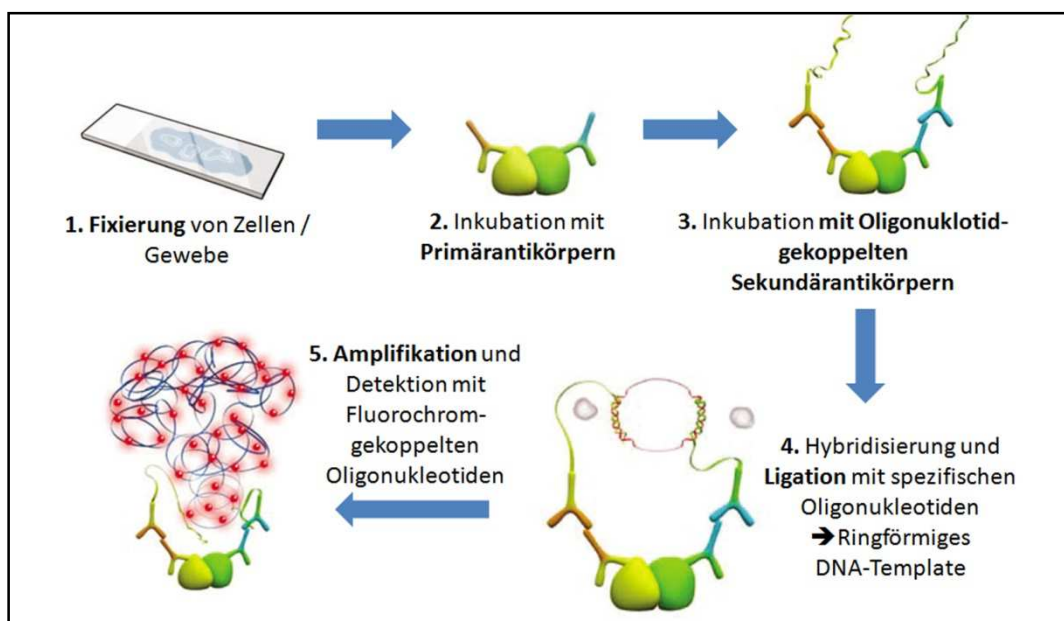


Abbildung 4-4: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte des Proximity-Ligation-Assays (PLA; Abbildungen modifiziert nach www.olink.com)

4.4.4.1. Vorbereitung der Antikörper (PLA-Probes)/PLA-Probemacher

Das verwendete Assay-Kit unterstützt die Detektion von Primärantikörpern, welche in der Ziege, dem Kaninchen oder der Maus generiert wurden. Daher konnten zur Detektion der Interaktionen des Kernhüllproteins LAP2 und den Laminaproteinen LaminA/B1 die bereitgestellten Sekundärantikörper (PLA-Probe MINUS anti-rabbit und PLA-Probe PLUS anti-mouse) verwendet werden. Da das Kit jedoch die Detektion von Meerschwein-spezifischen Primärantikörpern nicht unterstützt, mussten die entsprechenden Antikörper (hier anti-XMAN1 gp#1 oder anti-Xemerin 59/9) direkt mit Oligonukleotiden gekoppelt werden. Hierzu wurde das Duolink® II Probemacher-Kit (Olink Bioscience) verwendet.

Im Vorfeld der Kopplung des Primärantikörpers musste dieser zunächst affinitätsgereinigt und in einer minimalen Konzentration von 1 mg/ml vorliegen. Des Weiteren sollte der Antikörper möglichst in PBS (als Antikörperpuffer) gelöst sein. Der Antikörperpuffer sollte dabei frei von Konservierungsstoffen sein, darf aber bis zu 0,1% BSA und/oder 0,02% Natrium-Azid enthalten. Alle Schritte der Oligonukleotid-Kopplung wurden nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

4.4.4.2. Detektion von Protein-Protein-Interaktionen

Lösungen:

PBS:	(siehe 4.3.5.)
Duolink® II-Kit:	(Absättigungspuffer, 20x Assay-Reagenz, Antikörper-Verdünnungs-Puffer, 5x Ligation-Stock, DNA-Ligase, 5x Amplification-Stock, DNA-Polymerase, PLA-Probe MINUS/PLUS, Einbettmedium/DAPI)
Waschpuffer A:	dem Kit beiliegend oder selbst hergestellt: 0,15 M NaCl 0,01 M Tris base 0,05% (w/v) Tween-20 →pH 7,4
Waschpuffer B:	dem Kit beiliegend oder selbst hergestellt: 0,1 M NaCl 0,2 M Tris-HCl →pH 7,5

Der Proximity-Ligation-Assay zur Detektion von Protein-Interaktionen wurde auf XIKE-A6-Zellen durchgeführt. Alle Schritte wurden, falls nicht anders angegeben, in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei einem Pufferwechsel wurde der Puffer von den Deckgläschen auf ein Zellstofftuch abgetropft und sofort mit dem nachfolgenden Puffer inkubiert. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Zellen keinesfalls austrocknen dürfen.

Zunächst wurden die Zellen auf Deckgläschen bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Die Zellen wurden dann mittels PFA/Triton fixiert und permeabilisiert (siehe 4.4.2.1). Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal für jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen. Je nach verwendetem Primärantikörper war es zu empfehlen unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Hierzu wurden die Deckgläschen für 30 Minuten bei 37°C mit 40 µl des Absättigungspuffers inkubiert. Abhängig davon, ob die Interaktionen zwischen XLAP2 und Xlamin A/B1 (siehe Tabelle 4-13) oder zwischen XMAN1 und Xemerin (siehe Tabelle 4-14) untersucht werden sollte, wurden verschiedene Protokolle für die Antikörperinkubation durchgeführt.

PLA-Antikörperinkubationen zur Detektion von XLAP2/XLaminA,B1			
Schritt	Reagenz	Zeit	Temp.
1. Inkubation mit Primärantikörper 1 (XLAP2)	40 µl rabbit anti-XLAP2 (1:500 in PBS)	35 min	RT
2. Waschung	3x mit PBS	je 5 min	RT
3. Inkubation mit Primärantikörper 2 (XLamin A/B1)	40 µl mouse anti-XLaminA/B1 (X167, 1:200 in PBS)	35 min	RT
4. Waschung	3x mit PBS	je 5 min	RT
5. Inkubation mit PLA-Probes	PLA-Probe MINUS (anti-mouse) und PLA-Probe PLUS (anti-rabbit) jeweils 1:5 verdünnt in Antikörper-Verdünnungspuffer	70 min	37 °C

Tabelle 4-13: PLA-Antikörperinkubation zur Detektion von XLAP2 und Xlamin A/B1.

PLA-Antikörperinkubationen zur Detektion von XMAN1/Xemerin			
Schritt	Reagenz	Zeit	Temp.
1. Vorbereitung der Antikörperlösung (Xemerin)	Assay-Reagenz 1:20 in Antikörper-Verdünnungspuffer verdünnen; + PLA-Probe MINUS (anti-Xemerin 59/9; 1:7)	20 min	RT
2. Inkubation mit PLA-Probe MINUS	40 µl der Lösung aus 1.	35 min	RT
3. Waschung	2x mit Waschpuffer A	je 6 min	RT
4. Vorbereitung der Antikörperlösung (XMAN1)	Assay-Reagenz 1:20 in Antikörper-Verdünnungspuffer verdünnen; + PLA-Probe PLUS (anti-XMAN1 gp#1; 1:7)	20 min	RT
5. Inkubation mit PLA-Probe PLUS	40 µl der Lösung aus 4.	35 min	RT

Tabelle 4-14: PLA-Antikörperinkubation zur Detektion von XMAN1 und Xemerin.

Alle nachfolgenden Schritte wurden für beide Ansätze gleichermaßen durchgeführt. Im Anschluss an die Antikörperinkubationen wurden die Deckgläschen zweimal für je fünf Minuten in Waschpuffer A gewaschen, gefolgt von der Ligations-Reaktion. Hierzu wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37°C mit jeweils 40 µl der Ligations-Lösung inkubiert (5x Ligation-Stock 1:40 in H₂O_{bidest.}; + 1 µl DNA-Ligase). Nach einem erneuten Waschschrift für zwei Mal je 5 Minuten in Waschpuffer A, erfolgte die Amplifikation des ringförmigen DNA-Templates. Dazu wurden die Deckgläschen für 100 Minuten bei 37°C mit je 40 µl der Amplifikations-Lösung inkubiert (5x Amplifikation-Stock 1:80 in H₂O_{bidest.}; + 0,5 µl DNA-Polymerase). Dieser Inkubationsschritt sowie alle weiteren Arbeitsschritte wurden im Dunkeln durchgeführt um ein Ausbleichen der PLA-Signale zu verhindern. Die Deckgläschen wurden zweimal für jeweils 10 Minuten in Waschpuffer B und einmal für eine Minute in verdünntem Waschpuffer B (1:100 in H₂O_{bidest.}) gewaschen.

War eine Gegenfärbung der Kernhülle erwünscht so wurde zusätzlich zwischen den beiden genannten Waschschriften eine indirekte Immunfluoreszenzlokalisierung (siehe 4.4.3.) eingeschoben.

Dabei wurde ein Primärantikörper für XLBR (*Xenopus* Lamin B Rezeptor) zur Markierung der Kernhülle verwendet.

Abschließend wurden die Zellen, wie in 4.4.3.1. beschrieben, kurz in 100% Ethanol (p.a.) inkubiert. Die Deckgläschen wurden dann auf einen gereinigten (mit 100% Ethanol) Objektträger mit einem Tropfen Einbettmedium/DAPI eingebettet und mit farblosem Nagellack luftdicht abgeschlossen. Die Proben konnten schließlich nach einer Inkubationszeit von ca. 30 Minuten mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

4.5. Zellfreies System aus *Xenopus laevis* Eiern

Das zellfreie System aus *Xenopus laevis* Eiern (Eiextrakt) eignet sich besonders für die Untersuchung der Mechanismen während der Kernbildung. Durch die Zugabe von Spermienchromatin und Energie kann die Bildung von in vitro-Kernen induziert werden. Zudem ist dieses System leicht manipulierbar.

Wird der Eiextrakt mit Energie vorinkubiert, bilden sich sogenannte Annulate Lamellae. Dies sind zytoplasmatische Organellen, welche aus einem Stapel abgeflachter Membranzisternen bestehen, von zahlreichen Kernporenkomplexen durchzogen sind, jedoch keine Kernlamina besitzen (Dabauvalle et al., 1991). Sie treten meist in, sich schnell teilenden oder differenzierenden Zellen, wie den männlichen oder weiblichen Gameten auf. Es wird vermutet, dass den AL eine Speicherfunktion für die Kernhülle und Komponenten der Kernporen für den späteren Gebrauch zukommt (Kessel, 1989, 1992; Stafstrom und Staehelin, 1984; Merisko, 1989). Der aktivierte Eiextrakt enthält, bis auf die DNA, nahezu alle Komponenten (z.B. Histone, Kernmembranvesikel, Lamina-Proteine und Nukleoporine), welche für die Bildung von in vitro-Kernen bzw. Annulate Lamellae notwendig sind. Kerne, die in diesem vorinkubierten Extrakt gebildet werden, besitzen eine Doppelmembran jedoch keinerlei Kernporen.

4.5.1. Herstellung eines aktivierten Eiextraktes (Interphase-Extrakt)

Die Gewinnung von aktiviertem Eiextrakt gliedert sich in mehrer Schritte (siehe Abbildung 4-5).

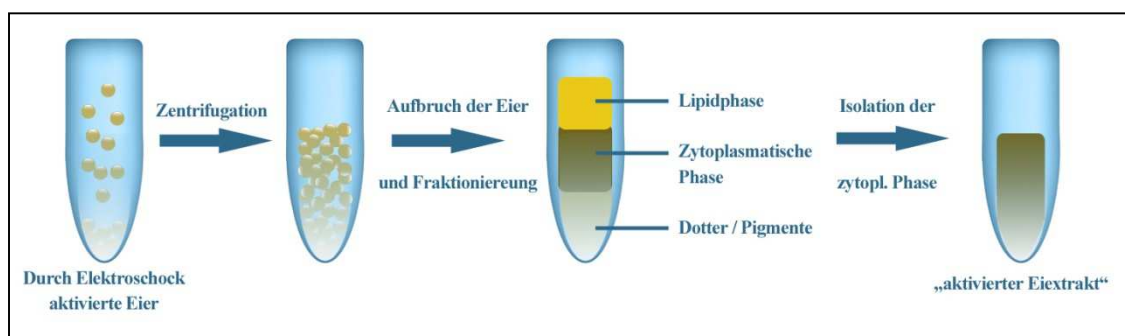


Abbildung 4-5: Herstellung eines aktivierten Eiextraktes

Zunächst werden die Eier abzentrifugiert und der überschüssige Puffer abgenommen. Durch eine Zentrifugation bei hoher Drehzahl werden die Eier aufgebrochen und in drei Phasen fraktioniert.

Methoden

Die obere Phase enthält dabei vor allem Lipide und die untere Phase Dotter, Pigmente und unlösliche Bestandteile. Für das weitere Vorgehen ist die mittlere Phase von Bedeutung, da diese die zytoplasmatischen Proteine enthält. Diese Phase wird entnommen und durch mehrer Zentrifugationsschritte aufgereinigt.

Lösungen:

0,1 M NaCl:	in Leitungswasser
1% (w/v) Agarose:	in ¼ MMR
2 % (w/v) Cystein:	in dest. Wasser, pH 7,8 (NaOH)
MMR (pH 7,8):	0,1 M NaCl 20 mM KCl 10 mM MgSO ₄ 20 mM CaCl ₂ 50 mM Hepes 1 mM EDTA
¼ MMR:	MMR, 1:4 verdünnt in H ₂ O _{bidest.}
Puffer 6:	250 mM Saccharose 50 mM KCl 1 mM DTT 2,5 mM MgCl ₂ 100 mg/ml Cycloheximid 5 µg/ml Cytochalasin B (20 mg/ml Stammlösung)

Durchführung:

Bis zur Versuchsdurchführung wurden die *Xenopus laevis* Eier in 0,1 M NaCl aufbewahrt. Zur Vorbereitung der Schockkammer wurden zunächst 100 ml einer aufgekochten 1%igen Agarose-Lösung in ¼ MMR gegossen und sobald diese auspolymerisiert war 200 ml ¼ MMR zugegeben. Pro Durchgang kamen 20-30 ml Eier in 50 ml Röhren zur Verwendung, wobei die überschüssige Flüssigkeit abgenommen wurde. Die Röhren wurden dann mit der 2% Cystein-Lösung aufgefüllt, luftdicht verschlossen und vorsichtig gedreht bis sich die Gallerthülle aufgelöst hatte. Die Cystein-Lösung musste dabei mehrmals gewechselt werden, wobei das Auflösen der Gallerthülle nicht mehr als zehn Minuten in Anspruch nehmen durfte um Schäden an den Eier zu verhindern. Cystein drängt sich zwischen die Disulfidbrücken der Proteine der Gallerthülle, wodurch diese gelöst werden.

Anschließend wurden die Eier 4-6 Mal mit MMR und einmal mit ¼ MMR gewaschen. Nachdem die Eier in die Schockkammer gegeben und darin für zwei Sekunden bei 12 V aktiviert wurden, musste eine 20minütige Wartezeit eingehalten und währenddessen schlechte Eier aussortiert werden. Danach wurde die Flüssigkeit aus der Kammer abgegossen, mit 50 ml des eisgekühlten Puffers 6 befüllt und die Eier in Eppendorf-Caps überführt, welche mit 500 µl Puffer 6 gefüllt waren und auf Eis lagerten.

Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für sechs Sekunden bei 3.000 x g und 4°C und das Absaugen des überschüssigen Puffers. Nach einer weiteren Zentrifugation für zehn Minuten bei 12.000 x g und 4°C waren 3 Phasen zu erkennen, wobei nur die mittlere Phase entnommen und in ein neues Eppendorf Cap auf Eis überführt wurde. Dabei war darauf zu achten, mit einer Spritzenkanüle von oben

durch die erste Phase einzustechen und die mittlere Phase so zu entnehmen, dass keine Bestandteile der anderen beiden Phasen mit verschleppt wurden. Nachfolgend zentrifugierte man die mittlere Phase für zehn Minuten bei 12.000 x g und 4°C und überführte den gereinigten Überstand mit einer Kanüle in ein neues Eppendorf-Cap.

Dieser Schritt wurde noch zwei Mal wiederholt um ein mögliches Verschleppen der abzentrifugierten Bestandteile möglichst gering zu halten. Der isolierte Eiextrakt wurde schließlich in 50 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

4.5.2. Isolierung von Spermienchromatin aus *Xenopus laevis*-Hoden

Lösungen:

Lysolecithin-Lösung:	1 mg/ml Lysolecithin (Fluka, Neu-Ulm) in 75 mM NaCl
MS 222:	0,2% MS222 (3-Aminobenzoesäure-ethylester-methansulfonat) in Leitungswasser → Lagerung bei 4°C
Stopplösung:	3 % (w/v) BSA in SuNaSp
SuNaSp:	250 mM Saccharose 75 mM NaCl 0,5 mM Spermidin (SERVA Electrophoresis GmbH Heidelberg) 0,15mM Spermin (SERVA Electrophoresis GmbH Heidelberg) (Lagerung bei -70°C)

Durchführung:

In MS 222 anästhesierten *Xenopus laevis* Männchen wurde die Bauchdecke geöffnet und beide Hoden entnommen, die in jeweils 1 ml gekühlten SuNaSp-Puffer in 1,5 ml Eppendorf-Caps überführt wurden. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Mittels einer Schere wurden die Hoden in kleine Stücke geschnitten und mit einem Eppendorfhomogenisator homogenisiert. Anschließend wurden die Eppendorf-Caps mit SuNaSp aufgefüllt und für drei Minuten bei 4°C inkubiert, wodurch größere Stücke sedimentierten. Der entnommene Überstand wurde dann für fünf Minuten bei 2.200 rpm (Heraeus Minifuge RF, 4°C) zentrifugiert, das Pellet in 600 µl Lysolecithin-Lösung resuspendiert und für 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lysolecithin-Lösung diente dem enzymatischen Abbau der Zellmembran und der Kernhülle, da nur das Spermienchromatin benötigt wurde.

Zum Abstoppen der Reaktion wurden anschließend 1 ml 3% BSA (in SuNaSp) zugegeben und für zwei Minuten bei 4°C inkubiert. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei 4.000 rpm und 4°C wurde das Pellet 3 Mal mit SuNaSp gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 3.000 rpm und 4°C erfolgte.

Das Pellet wurde schließlich in 700 µl SuNaSp aufgenommen, mit 300 µl 30 % Glycerin versetzt, diese Lösung durch Invertieren gemischt und das Chromatin in Aliquots á 50µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Nach dem Auftauen wurde das Spermienchromatin zunächst für fünf Minuten bei 3.000 x g und 4°C zentrifugiert und anschließend zweimal mit SuNaSp gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift eine Zentrifugation von fünf Minuten bei 3.000 x g und 4°C erfolgte. Das Pellet wurde in 15 µl SuNaSp aufgenommen und die Spermienchromatinsuspension bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

Für die Bildung von in-vitro Kernen musste vorerst die Konzentration des Spermienchromatins bestimmt werden. Hierzu wurde das gewaschene Spermienchromatin 1:100 in SuNaSp verdünnt und die Spermien mittels einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dazu wurden die Spermien in einem Großquadrat (=16 Kleinquadrate) gezählt und die Spermienkonzentration nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Spermienanzahl eines Großquadrates} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Spermienzahl / ml}$$

4.5.3. Bildung von in vitro Kernen

Lösungen:

ATP regenerierendes System: 0,1 M ATP in Puffer 6
1 M Kreatinphosphat (KP) in Puffer 6
5 µg/ml Kreatinkinase (KK) in Puffer 6

Puffer 6: (siehe 4.5.1.)

SuNaSp: (siehe 4.5.2.)

Durchführung:

Zunächst wurden ein Aliquot aktivierter Eiextrakt sowie das Spermienchromatin auf Eis aufgetaut und die Spermien wie in 4.5.2. beschrieben gewaschen und ausgezählt. Anschließend wurden pro Ansatz Spermienchromatin in einer Endkonzentration von 1×10^6 Spermien sowie 3 µl des ATP-regenerierenden Systems (Je 1 µl ATP, KP und KK) zum Eiextrakt gegeben, sorgfältig vermischt und 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Durchmischung der Lösung wurde das Eppendorf-Cap nach etwa 25 Minuten leicht geschnippt. Schließlich konnten die gebildeten in-vitro Kerne für die Immunfluoreszenzlokalisierung (siehe 4.4.3.2.) oder zur EM-Einbettung (siehe 4.5.4.) weiter verwendet werden.

4.5.4. EM-Einbettung von in vitro Kernen

Das Elektronenmikroskop (EM) ist mit einer Auflösungsgrenze von 1-3 nm bei biologischen Präparaten im Gegensatz zum Lichtmikroskop (0,2 µm) optimal geeignet sehr kleine Strukturen zu untersuchen und darzustellen. Dabei werden Elektronen von einer Kathode ausgehend in einem elektrischen Feld zu einer Anode hin beschleunigt. Die Kathode besteht dabei aus einem haarnadelförmig ausgezogenen Wolframdraht, der stromdurchflossen durch Glühemission Elektroden emittiert. Ausgehend davon werden sie in einem elektrischen Feld zu einer Anode hin beschleunigt. Um eine Ablenkung der

Elektronen durch Gas- oder Staubmoleküle auf dem Weg von der Kathode zur Anode zu verhindern, muss im EM ein Vakuum herrschen. Der so erzeugte Elektronenstrahl tritt durch ein zentrales Loch in der Anode und wird durch ein Kondensatorsystem auf das Präparat fokussiert.

Da der Elektronenstrahl nur sehr dünne Schichten durchdringen kann, müssen von den Präparaten Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 25-80 nm hergestellt werden. Da sich die Präparate durch Wechselwirkungen mit den Elektronen stark erwärmen muss der gesamte Probenraum mit flüssigem Stickstoff gekühlt werden. Um die Lokalisation bestimmter Proteine an zellulären Strukturen (wie z.B. der Kernhülle) zu untersuchen wird die Methode der indirekten Immungoldlokalisierung durchgeführt. Dabei bindet ein spezifischer Antikörper das zu detektierende Antigen und wird wiederum durch einen sekundären Antikörper gebunden, an den Goldpartikel mit einem Durchmesser von 12 nm kovalent gebunden sind. Die Goldpartikel dienen dazu dem, bei der Elektronenmikroskopie eingesetzten, Elektronenstrahl den Durchtritt zu verwehren wodurch es an diesen Stellen zu keiner nachfolgenden Belichtung des Röntgenfilms kommt. Die Goldpartikel sind schließlich in dokumentierten EM-Bildern als schwarze Punkte erkennbar und geben so die Lokalisation des Antigens wieder. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels der Elektronenmikroskopie die Bildung der Kernhülle bei in vitro Kernen näher untersucht.

4.5.4.1. Fixierung der Proben

Lösungen:

2,5 % Glutaraldehyd, mit Ionen (pH7,2):	5 ml 25 % Glutaraldehyd 2,5 ml 1 M KCl 1,25 ml 0,1 M MgCl ₂ 41,25 ml 0,05 M Cacodylatpuffer
0,05 M / 0,2 M Cacodylatpuffer:	0,05 M / 0,2 M Cacodylsäure Na-Salz Trihydrat; pH 7,2
2% Osmiumtetroxid (OsO₄):	2 Teile 4% OsO ₄ 1 Teil H ₂ O _{bidest.} 1 Teil 0,2 M Cacodylatpuffer

0,5% wässriges Uranylacetat

Durchführung:

Nach Bildung der in vitro Kerne wurden diese direkt mit 4 Volumina 2,5% Glutaraldehyd (mit Ionen) versetzt und darin für 30 Minuten auf Eis fixiert. Dabei diente das Glutaraldehyd der Vernetzung der Proteine und somit deren Strukturhaltung. Direkt im Anschluss wurden die fixierten Kerne für 10 Minuten bei 2600 x g und 4°C (ohne Bremse!) zentrifugiert. Das Sediment wurde dann vier Mal für jeweils 3 Minuten in 50mM Cacodylatpuffer auf Eis gewaschen. Bei den einzelnen Waschschrinen musste besonders darauf geachtet werden das Sediment nicht zu resuspendieren. Die Kerne wurden dann vier Mal für je 3 Minuten in eiskalten H₂O_{bidest.} gewaschen. Anschließend wurden die Proben für 1,5 - 3 Stunden (auf Eis) in einer 2%igen OsO₄-Lösung kontrastiert. Osmiumtetroxid oxidiert

Doppelbindungen und wird dabei selbst zu Osmiumdioxid reduziert, welches wasserunlöslich ist und kontrastgebend ausfällt.

Nach erneutem viermaligem Waschen der Proben für je 3 Minuten in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$, wurden die Proben über Nacht bei 4°C in 0,5% Uranylacetat inkubiert. Dieser Schritt diente der Negativkontrastierung der Proben.

4.5.4.2. Entwässerung und Einbettung der Proben

Da das Elektronenmikroskop mit Hochvakuum arbeitet, müssen die Präparate wasserfrei sein. Die Proben wurden daher über eine ansteigende Alkoholreihe entwässert und nachfolgend in Kunstharz eingebettet.

Lösungen:

Epon-Lösung A:	(1 ml = 1,077 g) 50 ml DDSA 31 ml Epon 812
Epon-Lösung B:	(1 ml = 1,212 g) 44,5 ml MNA 50 ml Epon 812
Epongemisch:	24,6 g Lösung A 20,8 g Lösung B 0,8 ml DMP-30

Durchführung:

Zunächst wurden die Proben viermal für je drei Minuten mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen. Die Präparate wurden dann über eine aufsteigende Alkoholreihe, für je zwei mal 15 Minuten in 50 %, 70 % und 96 % p.a. auf Eis dehydriert. Die finale Dehydrierung erfolgte in 100% Ethanol p.a. (3x je 20 Minuten). Nachdem der Ethanol abgezogen wurde, erfolgte die Inkubation der Proben für drei mal 20 Minuten in Propylenoxid. Eingebettet wurden die Präparate über Nacht bei Raumtemperatur mit einer Mischung aus Propylenoxid und Epongemisch (Mischverhältnis 1:1). Die Eppendorf-Caps durften dabei nicht verschlossen werden um eine vollständige Verdunstung des Propylenoxids zu erreichen. Am nächsten Tag wurde das Epongemisch dreimal durch Epon ausgetauscht und für jeweils zwei Stunden darin inkubiert. Zur vollständigen Aushärtung des Epons wurden die Proben für mindestens 48 Stunden in einem Wärmeschrank bei 60°C inkubiert.

Nach der Aushärtung wurde das Eppendorf-Cap entfernt, die Proben in einen Schneideblock eingespannt und geschnitten.

4.5.4.3. Anfertigung von Ultradünnschnitten

Die Ultradünnschnitte wurden mit einem Diamanten (DIATOME, Swiss diamond knife, Messerwinkel 5°C, Reichert-Jung, Nußloch) am Ultramikrotom (EM UC7, Leica oder RMC MT-7000, Köttermann) hergestellt. Die Schnittdicke betrug 60-80 nm. Aus dem, hinter dem Messer angebrachten, Wassertrog wurden die Schnitte mit einem vorher mit Pioloform F (Wacker-Chemie GmbH, München) beschichteten EM-Kupfernetzchen (Typ 75, 3 mm Durchmesser, VECO Industrieprodukte GmbH, Solingen-Höhscheid) abgefischt und eine halbe Stunde luftgetrocknet.

4.5.4.4. Kontrastierung der Ultradünnschnitte

Lösungen:

Bleicitrat nach Reynolds (1963): 1,33 g Bleinitrat
1,76 g Natriumcitrat
8 ml 1 N NaOH
→ auffüllen auf 50 ml mit abgekochtem H₂O_{bidest.}

Uranylacetat: 20 % Uranylacetat in Ethanol

Durchführung:

Auf einem Stück Parafilm wurde ein Tropfen 20 % Uranylacetat pipettiert und das Kupfernetzchen mit der glänzenden Seite nach unten auf den Tropfen gelegt. Anschließend wurde eine Glaspetrischale darüber gestülpt und für 20 Minuten inkubiert. Während dieser Zeit wurde eine weitere Glaspetrischale umgedreht auf den Parafilm gelegt, unter der sich NaOH-Plätzchen befanden. Diese dienten zur Vermeidung jeglicher Reaktionen mit dem Bleicitrat, da die NaOH-Plätzchen mit dem CO₂ reagierten. Nach der Inkubation mit Uranylacetat wurde das Netzchen zunächst in 100 % Ethanol p.a., dann in 50% Ethanol (verdünnt mit abgekochtem Wasser) und noch zweimal in abgekochtem Wasser gewaschen. Dabei wurde das Netzchen mit einer Pinzette in der entsprechenden Lösung etwa 40 Mal auf- und abgetaucht. Anschließend erfolgte die Inkubation der Netzchen für acht Minuten auf einem Tropfen Bleicitrat. Diese Inkubation wurde unter der Petrischale mit NaOH-Plätzchen durchgeführt. Zuletzt wurde das Netzchen viermal mit abgekochtem Wasser gewaschen und konnte nach einer halben Stunde Lufttrocknen im Elektronenmikroskop bei 80 kV betrachtet werden. Die am Elektronenmikroskop aufgenommenen Röntgenfilme wurden entwickelt und eingescannt. Die Editierung der Bilder wurde mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop durchgeführt.

4.6. Arbeiten mit *Xenopus laevis*

4.6.1. Stimulierung der Eireifung

Lösungen:

HCG (Humanes Choriogonadotropin):	2 U/ μ l (Sigma) → lyophilisiertes Hormon in 5 ml sterilem H ₂ O _{bidest.} lösen
MMR:	(siehe 4.5.1.)

Durchführung:

Durch die Injektion des humanen Hormons Choriogonadotropin können geschlechtsreife *Xenopus laevis* Weibchen zur Eireifung und Ablaihen angeregt werden. Etwa vier Tage vor Versuchsbeginn wurde die Eireifung durch Injektion von etwa 100-150 U des Hormons in den dorsalen Lymphsack induziert. Nach drei Tagen erfolgte die eigentliche Hauptspritzung. Pro Versuchstier wurden dabei je nach Größe des Tieres 500 – 700 U des Hormons in den dorsalen Lymphsack injiziert. Nach etwa 12 Stunden beginnt das Weibchen mit dem Ablaihen der Eier, was an einer dunkelrot gefärbten Kloake zu erkennen ist. Durch sanftes Massieren des Hinterleibs kann die Eiablage zusätzlich gefördert werden. Die abgestreiften Eier wurden direkt in eine 150 mm-Kulturschale mit MMR abgelaiht. Erst nach einer Regenerationszeit von etwa 2-3 Monaten konnten die Weibchen erneut zur Stimulation herangezogen werden.

4.6.2. Isolierung von *Xenopus*-Organen

4.6.2.1. Isolierung von Ovar

Lösungen:

MS222:	(siehe 4.5.2.)
Barth-Medium:	90 mM NaCl 10 mM HEPES 2 mM NaHCO ₃ 1 mM KCl 0,8 mM MgSO ₄ 0,4 mM CaCl ₂ 0,3 mM Ca(NO ₃) ₂ → Zugabe einer Spatelspitze Phenolrot → pH einstellen auf 7,6 (mit NaOH)

Durchführung:

Xenopus laevis Weibchen, welche für ca. 20 Minuten in MS222 anästhesiert wurden, legte man anschließend auf Eis um ein zu frühes Erwachen zu vermeiden. Die Bauchdecke wurde mit einem Schnitt von ca. 0,5-1 cm Länge geöffnet, das Ovar portionsweise entnommen und in Barth-Medium überführt. Schließlich wurde der Frosch unter sterilen Bedingungen zugenäht und nach dem Aufwachen in die Zuchtbecken zurückgegeben. Das Ovar konnte im Barth-Medium bei 16°C für maximal 48 h gelagert werden. Der Frosch konnte erst nach einer Regenerationszeit von 2-3 Monaten erneut für eine operative Entnahme des Ovars herangezogen werden.

4.6.2.2. Isolierung von Hoden

Lösungen:

MS222	(siehe 4.5.2.)
Hodenaufbewahrungsmedium:	1x MMR (Endkonzentration) +30% (v/v) FCS (fetales Kälberserum) + 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
Eiskaltes PBS:	(siehe 4.3.5.)

Durchführung:

Zunächst wurde ein mittelgroßes *Xenopus laevis* Männchen für 30 Minuten in MS222 anästhesiert. Auf einem Eisbett gelagert wurde dem Versuchstier dann die Bauchdecke geöffnet und die entsprechenden Organe entnommen. Die isolierten Hoden wurden sofort in Hodenaufbewahrungsmedium überführt und bei 4°C für maximal 7 Tage gelagert. Für eine Isolation von Spermienchromatin (siehe 4.5.2.) wurden die Hoden in SuNaSp überführt. Wurden weitere Organe für Folgeversuche benötigt, so wurden diese zunächst in eiskaltem PBS gewaschen und für die jeweilige Weiterverwendung in entsprechend große Stücke zerteilt.

4.6.3. In vitro Fertilisation

Lösungen:

MMR:	(siehe 4.5.1.)
0,1x MMR:	MMR 1:10-verdünnt in H ₂ O _{bidest.}
Cystein-Lösung:	2% (w/v) L-Cystein-HCl in H ₂ O _{bidest.} → pH einstellen auf 7,8

Durchführung:

Frisch abgelaichte *Xenopus laevis* Eier wurden wie in 4.6.1. beschrieben in MMR überführt. Zunächst wurde das MMR vollständig entfernt und ein isolierter *Xenopus laevis* Hoden (siehe 4.6.2.2.) mit einem Skalpell längs aufgeschnitten. Mit dem Hoden wurde dann vorsichtig über alle Eier gestrichen und so der Spermieintritt ermöglicht. Nach 5 Minuten wurden die Eier vollständig mit 0,1x MMR

überschichtet. Nach 15 Minuten war zu beobachten, dass sich die pigmentierte animale Seite nach oben drehte. Nach weiteren 15 Minuten konnten erfolgreich befruchtete Eier daran identifiziert werden, dass sich der helle Chromosomenfleck am animalen Pol aufgelöst hatte. 40 Minuten nach der Befruchtung erfolgte die chemische Entfernung der Gallerthülle, indem das Medium vollständig entfernt und die Eier in einer 2%igen Cystein-Lösung inkubiert wurde. Das Auflösen wurde durch leichtes Schwenken gefördert und dabei unter einem Stereomikroskop beobachtet. Dabei war darauf zu achten, dass die maximale Einwirkzeit von 5 Minuten nicht überschritten wurde, da es andernfalls zu einer Schädigung der embryonalen Proteine und folglich zu Fehlentwicklungen kommen konnte.

4.6.4. Embryonenhaltung

Lösungen:

0,1x MMR: (siehe 4.6.3.)

Aktivkohle-Agarschalen: 20 g Aktivkohle (fein zerreiben)
20 g Agar-Agar
→ mit H₂O_{bidest.} auf 1 L auffüllen
→ Suspension aufkochen und auf 50°C abkühlen lassen
+5 g Sulfodiazin
→ Lösung luftblasenfrei in 150mm-Kulturschalen gießen

Durchführung:

Nach der erfolgreichen Befruchtung der *Xenopus laevis* Eier und der Entfernung der Gallerthülle wurden die Embryonen mehrmals in 0,1x MMR gewaschen um das Cystein vollständig zu entfernen. Die Embryonen wurden schließlich in eine Aktivkohle-Agarschale überführt. Aktivkohle und Sulfodiazin fördern die Entwicklung der Embryonen welche in 0,1x MMR bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Entwicklungsstadien der sich entwickelnden Embryonen wurden anhand der Normaltafel nach Nieuwkoop und Faber (Nieuwkoop and Faber, 1975) bestimmt.

4.7. Arbeiten mit *Xenopus laevis* Embryonen

4.7.1. EM-Einbettung von *Xenopus*-Embryonen

Diese Versuchsdurchführung gilt vor allem zur Fixierung, Kontrastierung, Entwässerung und Einbettung von größeren Organen und Organstücken und wurde daher zur Einbettung von Embryonen der Entwicklungsstadien 41 (ca. 3 Tage nach Befruchtung) und 46 (ca. 5-6 Tage nach Befruchtung) herangezogen. Alle nachfolgenden Schritte wurden (falls nicht anders angegeben) bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt.

4.7.1.1. Fixierung der Proben

Lösungen (Zusammensetzungen, siehe 4.5.4.1.):

2,5 % Glutaraldehyd, mit Ionen (pH7,2)

0,05 M / 0,2 M Cacodylatpuffer

2% Osmiumtetroxid (OsO₄)

0,5% wässriges Uranylacetat

Durchführung:

Embryonen definierter Entwicklungsstadien wurden zunächst aus den Aktivkohleschalen in Schnappdeckelgläschen überführt und das überschüssige MMR entfernt. Die Embryonen wurden dann für 45 Minuten in 2,5% Glutaraldehyd (mit Ionen) fixiert. Anschließend wurden die Embryonen fünf Mal für je drei Minuten in 50 mM Cacodylatpuffer gewaschen. Nun erfolgte die Fixierung der Embryonen für 90-120 Minuten in 2% Osmiumtetroxid, welches anschließend abgenommen und in fünf Waschschritten für je drei Minuten in H₂O_{bidest.} vollständig entfernt wurde. Die Embryonen konnten (falls notwendig) bis zu drei Tage in Wasser bei 4°C gelagert werden. Danach wurden die Embryonen über Nacht in 0,5% Uranylacetat kontrastiert.

4.7.1.2. Entwässerung und Einbettung der Proben

Die Embryonen wurden zunächst fünfmal für jeweils 3 Minuten in H₂O_{bidest.} gewaschen und nach dem Protokoll aus Tabelle 4-15 entwässert und eingebettet:

Entwässerung / Einbettung von Embryonen		
Reagenz	Zeit	Temperatur
50% Ethanol p.a.	30 min	4°C
70% Ethanol p.a.	30 min	4°C
90% Ethanol p.a.	30 min	4°C
96% Ethanol p.a.	30 min	4°C
100% Ethanol p.a.	30 min	4°C
100% Ethanol p.a.	30 min	Raumtemperatur
100% Ethanol p.a.	30 min	Raumtemperatur
Propylenoxid	30 min	Raumtemperatur
Propylenoxid	30 min	Raumtemperatur
Propylenoxid	30 min	Raumtemperatur
Propylenoxid : Epon (1:1)	über Nacht	Raumtemperatur
Epon	2 h	Raumtemperatur
Epon	2 h	Raumtemperatur

Tabelle 4-15: Entwässerung und Einbettung von *Xenopus laevis* Embryonen

Schließlich wurden die Embryonen in Epon-gefüllte Einbettformen überführt und entsprechend der gewünschten Schnittorientierung (transversal/sagittal) ausgerichtet und mit Epon überschichtet. Sie wurden darin eine weitere Stunde inkubiert und ihre Orientierung falls notwendig nochmals korrigiert. Zur vollständigen Aushärtung des Epons wurden die Proben für mindestens 48 Stunden in einem Wärmeschrank bei 60°C inkubiert. Nach der Aushärtung wurden die Probenblöckchen aus der Einbettform gelöst, in einen Schneideblock eingespannt und geschnitten.

4.7.2. Herstellung von Quetschpräparaten

Lösungen:

Fixierungspuffer: 83 mM KCl
 17 mM NaCl
 3 mM MgCl₂
 1,5 mM KH₂PO₄
 7 mM Na₂HPO₄
 3,5 % Formaldehyd (37%-SL)
 100 mM Saccharose

Durchführung:

Auf Aktivkohle-Platten entwickelte *Xenopus*-Embryonen wurden einzeln auf einen gereinigten Objektträger überführt. Überschüssiges MMR wurde abgezogen und durch mehrere Tropfen des Fixierungspuffers ersetzt. Die Embryonen wurden darin für zwei Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde ein Deckglas vorsichtig und luftblasenfrei aufgelegt und leicht festgedrückt. Die Präparate wurden sofort in einen Objektträgerständer überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Präparate konnten so bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert werden. Vor Verwendung der Präparate für die Immunfluoreszenzlokalisierung wurde das Deckglas vorsichtig mit einer Pinzette abgesprengt und entfernt. Das Präparat musste dabei stets im gefrorenen Zustand bleiben. Die Präparate wurden schließlich komplett luftgetrocknet und mittels Aceton-Methanol-Fixierung (siehe 4.4.2.2.) für die indirekte Immunfluoreszenzlokalisierung vorbereitet (siehe 4.4.3.)

4.7.3. Whole-mount Immunlokalisierung (WMIL)

Die Methode der Whole-mount Immunlokalisierung ermöglicht die Analyse der Lokalisation endogener Proteine im gesamten Embryo (Whole mount). Dabei werden entsprechende Embryostadien mit einem spezifischen Primärantikörper inkubiert, welcher gegen das zu detektierende Protein gerichtet ist. Der Nachweis des gebundenen Antikörpers erfolgt mittels eines sekundären Peroxidase-konjugierten Antikörpers. Dabei bildet die Peroxidase mit ihrem Substrat Wasserstoffperoxid (H₂O₂) einen Komplex, wobei das Reagenz Diaminobenzidin (DAB) als elektronenspendendes Chromogen fungiert. Durch die Oxidation bildet der Farbstoff DAB einen braunen, in wässrigen oder organischen Lösungen, unlöslichen Niederschlag. Folglich gibt das Färbungsmuster das Verteilungsmuster des Proteins wieder.

Alle Schritte wurden, falls nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur auf einem Drehtisch in 2 ml-Eppendorfcaps durchgeführt. Waschschritte erfolgten in jeweils 1 ml der entsprechenden Lösung. Bei einem Wechsel der verschiedenen Lösungen musste darauf geachtet werden, die Embryonen weder trocken fallen zu lassen noch mit der Pipette zu berühren oder anzusaugen. Da der Farbstoff DAB kanzerogen ist, wurden die DAB-enhaltenden Lösungen mit Dent´s Bleach neutralisiert und gesondert entsorgt.

4.7.3.1. Fixierung / Bleichen der Embryonen

Lösungen:

Dent´s Fixativ:	80% (v/v) Methanol (p.a.) 20% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)
Dent´s Bleach:	33% (v/v) 30%iges H ₂ O ₂ 66% (v/v) Dent´s Fixativ

Durchführung:

Embryonale Entwicklungsstadien, die sich nach einer in vitro Fertilisation in einer Aktivkohle-Agarschale mit 0,1x MMR entwickelten, wurden anhand der Normaltafel von Nieuwkoop und Faber (1975) identifiziert und abgesammelt. Das Medium wurde dann entnommen, die Embryonen in Schnappdeckelgläschen überführt und über Nacht bei -20°C in Dent´s Fixativ inkubiert. Dieses Reagenz dient einerseits der Fixierung der embryonalen Proteine und andererseits durch das enthaltene DMSO der Perforierung um die Zugänglichkeit des Gewebes für die Antikörper zu verbessern.

Am nächsten Tag wurde das Reagenz durch Dent´s Bleach ersetzt und drei Mal alle 1-2 Stunden ausgewechselt. Die Lösung wurde am drauffolgenden Tag erneut zweimal gewechselt. Dent´s Bleach fungiert dabei als Bleichmittel wodurch der gesamte Embryo sowie alle pigmentierten Bereich aufgehellt werden. Schließlich wurden die Embryonen bis zur Antikörperinkubation in 100% Methanol (p.a.) bei -20°C gelagert.

4.7.3.2. Antikörperinkubation

Lösungen:

TBS:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl
Antikörperpuffer:	TBS + 10% (v/v) FCS (Fetal calf serum, hitzeinaktiviert, 30 min bei 56°C)

Durchführung:

Zunächst wurden die Embryonen in 2ml-Eppendorfcaps überführt und zweimal für je 15 Minuten in TBS rehydriert. Anschließend erfolgte die Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen für eine Stunde in 250 µl Antikörperpuffer. Nachfolgend wurden die Embryonen mit dem Primärantikörper

(Verdünnung in Antikörperpuffer, siehe 3.1.4.1.) für 2 Stunden inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 Minuten in TBS erfolgte die Bindung des sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörpers (1:3750 Verdünnung in Antikörperpuffer) über Nacht bei 4°C unter leichter Rotation. Dabei wurden 250 µl (pro Ansatz) der verdünnten Antikörperlösung verwendet.

4.7.3.3. Nachweis der gebundenen Antikörper durch Peroxidase-Reaktion

Lösungen:

TBS:	(siehe 4.7.3.2.)
Färbelösung:	TBS + 0,75 mg/ml DAB → Lösung steril filtrieren + 0,04% H ₂ O ₂ (Endkonzentration, SL: 30%)
Methanol:	100% (p.a.)
Murray's Miracle Clear:	Benzylalkohol : Benzoat = 2 : 1

Durchführung:

Die Embryonen wurden zunächst drei Mal für je 10 Minuten in TBS gewaschen. Anschließend erfolgte der Nachweis des gebundenen Antikörpers über die Peroxidase-Reaktion. Dazu wurden die Embryonen in eine 6-Well-Platte überführt, das TBS entnommen und in der Färbelösung inkubiert bis ein spezifisches Färbungsmuster zu erkennen war. Die Inkubationszeit betrug dabei zwischen einer und drei Stunden. Die Reaktion wurde schließlich durch die Entwässerung der Embryonen für zwei Mal 20 Minuten in 100% Methanol (p.a.) abgestoppt. Das Klären der Embryonen wurde für 15-30 Minuten bei Raumtemperatur in Murray's Miracle Clear durchgeführt, wobei die Embryonen vollständig transparent wurden. Die Dokumentation der Embryonen erfolgte im Klärungs-Medium mit einem Stereomikroskop mit Durchlicht und angeschlossener Kamera. Die aufgenommenen Bilder wurden schließlich mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop editiert.

4.7.4. Whole-mount Immunfluoreszenzlokalisierung (WMIF) „Heating Methode“

Im Gegensatz zur Whole-mount Immunlokalisierung werden bei der hier beschriebenen Methode Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet, welche mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Durch aktuelle Mikroskopietechniken ergibt sich dadurch der Vorteil einer deutlich erhöhten Auflösung. Zudem ermöglicht dies bei Anwendung der Konfokalen Mikroskopie, eine Lokalisierung der Proteine im dreidimensionalen Raum. Dies ist in der vorliegenden Arbeit der Fall, da nur mittels der WMIF die Lokalisierung kardialer Proteine und somit die Anatomie des embryonalen Herzens bestmöglich dreidimensional dargestellt werden konnte. Die nachfolgenden Schritte wurden, falls nicht anders angegeben, unter Rotation bei Raumtemperatur durchgeführt. Die einzelnen Waschschriffe erfolgten in jeweils 1ml der entsprechenden Lösung.

4.7.4.1. Fixierung der Embryonen

Lösungen:

4% Paraformaldehyd: (in PBS; 37%-SL)

PBS: (siehe 4.3.5.)

Durchführung:

Entsprechende Embryonalstadien wurden zunächst in ein Schnappdeckelgläschen überführt und mit Paraformaldehyd über Nacht bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Embryonen bei Raumtemperatur dreimal für je fünf Minuten in PBS gewaschen. Die Embryonen konnten schließlich bis zur weiteren Verwendung in 100% Methanol (p.a.) bei -20°C gelagert werden.

4.7.4.2. Rehydrierung und Vorbereitung der Embryonen für die Antikörperinkubation

Lösungen:

PBS: (siehe 4.3.5.)

PBS-T: 1% (v/v) Triton-X-100 in PBS

75% / 50% / 25% Methanol: (p.a., in PBS-T)

150 mM Tris-HCl (pH 9,0)

1x PTw: 0,1% (v/v) Tween-20 in PBS

Absättigungspuffer: 10 % (v/v) FCS
0,8% (v/v) Triton-X-100
1 % (w/v) BSA (bovine serum albumin)
in 1x PTw

Durchführung:

Die bei -20°C gelagerten Embryonen (in Methanol) wurden zunächst für etwa 10 Minuten auf Raumtemperatur gebracht und in 2 ml-Eppendorfcaps überführt. Anschließend erfolgte die Rehydrierung mittels einer absteigenden Methanolreihe. Hierzu wurden die Embryonen für jeweils fünf Minuten bei Raumtemperatur in 75%, 50% und 25% Methanol (in PBS-T) inkubiert. Die finale Rehydrierung erfolgte für zweimal fünf Minuten in PBS-T. Als Vorbereitung für den Hitzeschritt wurden die Embryonen für fünf Minuten bei Raumtemperatur in 150 mM Tris-HCl inkubiert. Der nachfolgende Hitzeschritt diente zur Demaskierung der Antigene und dadurch auch der Verbesserung der Antikörperspezifität und der Signalintensität. Hierzu wurden die Embryonen für 15 Minuten bei 70°C in 150 mM Tris-HCl inkubiert. Damit die Demaskierung von Bestand bleibt, wurden die Embryonen anschließend sofort für 20 Minuten bei -20°C in Aceton (p.a.) fixiert. Die Embryonen wurden dann sechs Mal für jeweils fünf Minuten in 1x PTw gewaschen. Die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte über Nacht bei 4°C in Absättigungspuffer.

4.7.4.3. Antikörperinkubation

Lösungen:

1x PTw:	(siehe 4.7.4.2.)
PBS-T:	(siehe 4.7.4.2.)
PBS-TS:	10% (v/v) FCS 1 % (v/v) Triton-X-100 in PBS
Antikörperpuffer:	1 % (v/v) FCS 0,8% (v/v) Triton-X-100 1 % (w/v) BSA in 1x PTw

Durchführung:

Nach der Absättigung wurden die Embryonen mit dem Primärantikörper (in Antikörperpuffer, Verdünnung siehe 3.1.4.1.) für drei Tage bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen drei Mal für jeweils eine Stunde in PBS-TS gewaschen. Nach zwei Waschschritten für je 10 Minuten in PBS-T wurde erneut mit PBS-TS gewaschen (zweimal je eine Stunde). Schließlich erfolgte die Inkubation mit dem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper für 2,5 Tage im Dunkeln bei 4°C (in PBS-T, Verdünnung siehe 3.1.4.2.). Optional wurde der Antikörperlösung zum Anfärben der Zellkerne Hoechst zugegeben (1:500, Hoechst-SL: 5mg/ml). Abschließend wurden die Embryonen unter Lichtausschluss dreimal in PBS-TS und zweimal in PTw (jeweils eine Stunde) gewaschen. Die Embryonen wurden dann auf einem Hohlschliffobjektträger (Tiefe ca. 0,7 mm) in 100% Glycerin (p.a.) eingebettet und das aufgelegte Deckglas mit transparentem Nagellack versiegelt. Die Präparate wurden schließlich mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

4.7.5. Bildgebung mittels NMR-Spektroskopie

Die Kernspinresonanzspektroskopie oder kurz NMR-Spektroskopie (nuclear magnetic resonance) stellt eine spektroskopische Methode dar, mit deren Hilfe es möglich ist die elektronische Umgebung von Atomen oder deren Wechselwirkungen mit benachbarten Atomen zu untersuchen. Dadurch ist es möglich die Struktur von Molekülen wie beispielsweise von Proteinen oder sogar den Aufbau von Geweben zu analysieren. Da die Methodik nichtinvasiv erfolgt, eignet sich die NMR besonders zur Untersuchung von internen Gewebestrukturen in *Xenopus* Embryonen.

Die NMR beruht im Prinzip auf der sogenannten magnetischen Kernresonanz. Diese ist eine resonante Wechselwirkung zwischen dem magnetischen Moment von Atomkernen innerhalb eines sehr starken Magnetfeldes und einem hochfrequenten, magnetischen Wechselfeld. Es werden hier vor allem die magnetischen Eigenschaften von Wasserstoff-Atomen zu Nutze gemacht. Die Analyse anhand von Wasserstoff-Atomen rührt daher, dass nur Isotope für die NMR zugänglich sind, welche im Grundzustand einen Kernspin aufweisen der von Null verschieden ist. Diese Isotope besitzen damit ein

magnetisches Moment. Weitere Isotope wären beispielsweise Lithium (${}^6\text{Li}$), Bor (${}^{10,11}\text{B}$), Kohlenstoff (${}^{13}\text{C}$), Stickstoff (${}^{15}\text{N}$) oder auch Sauerstoff (${}^{17}\text{O}$).

Der Kernspin stellt eine physikalische Eigenschaft von Atomen dar. So besitzen verschiedene Atomkerne auch verschiedene Spins. Ein Wasserstoffkern (${}^1\text{H}$) besitzt z.B. einen Spin mit der Quantenzahl $\frac{1}{2}$. Ein Spin von $\frac{1}{2}$ kann sich in einem statischen Magnetfeld (B_0) entweder parallel oder antiparallel ausrichten. Beispielsweise stellt sich in einer Flüssigkeit ein Gleichgewicht aller paralleler und antiparalleler Spins mit einem Verhältnis von 1 ein. Statistisch gesehen trifft man bei $10^5 - 10^6$ Spins lediglich Einen, welcher im Überschuss parallel ausgerichtet ist. Da jedoch allein diese überschüssig parallel ausgerichteten Spins zur makroskopischen Magnetisierung der untersuchten Probe beitragen, muss das Verhältnis begünstigt werden. Dies wird dadurch erreicht, dass zur Messung ein starkes Magnetfeld mit einer einhergehend großen Feldstärke verwendet wird. In diesem statischen Magnetfeld richten sich die Spins entsprechend der Magnetfeldrichtung aus. Dies geschieht mit einer Frequenz, welche zur Magnetfeldstärke proportional ist (z.B. bei einer Magnetfeldstärke von 1 T [Tesla] / 42,57 MHz [Megahertz] und dementsprechend hier bei 17,6T / 750 MHz). Eine solche Frequenz mit einer Spule eingestrahlt (siehe Abbildung 4-6). Die Spule dient dabei zugleich als Sender und Empfänger. Dabei wird die Magnetisierung, je nach Dauer des Hochfrequenz-Feldes, um einen bestimmten Winkel geneigt.

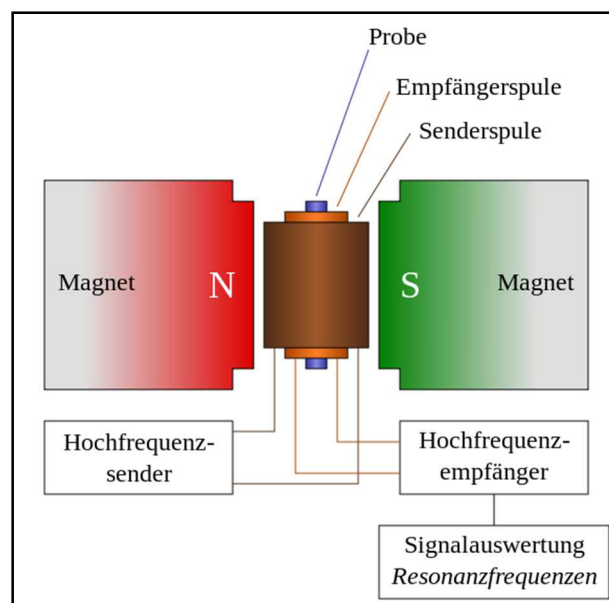


Abbildung 4-6: Schematische Darstellung des Arbeitsprinzips der NMR
(Abbildung nach David Meisel; Parexus at de.wikipedia)

Nach Abschalten des Hochfrequenz-Feldes kehren die Spins wieder in ihr Gleichgewichtsverhältnis zurück (also parallel zu B_0). Die Zeitkonstante, mit der dieser Vorgang geschieht, ist die sog. Relaxationszeit T_1 . Aufgrund der sogenannten Dephasierung geht jedoch die Kontinuität der Spins schon vorher verloren. Die Magnetisierung der Spins geht dabei aufgrund von Wechselwirkungen

zwischen den einzelnen Spins verloren. Diese Relaxationszeit bezeichnet man als T_2 -Zeit. Diese Zeiten werden als NMR-Signale aufgenommen und weiter prozessiert.

Wird die NMR zur Bildgebung herangezogen, werden zusätzlich angelegte Magnetfeldgradienten verwendet. Diese führen zu einem linearen Zusammenhang zwischen Ort und Magnetfeld. Die Frequenz mit der sich die Spins in der Probe ausrichten kann somit einem bestimmten Ort in der Probe zugeordnet werden. Mit Hilfe der mathematischen Fouriertransformation ist es möglich das NMR-Signal von der Zeitdomäne in die Frequenzdomäne zu transformieren. Bei einem einseitig angelegtem Magnetfeld erhält man so ein eindimensionales Profil der Probe. Zur dreidimensionalen Bildgebung werden Magnetfeldgradienten in allen drei Raumrichtungen angelegt. Daher ergeben sich aufgrund gewebespezifischer Unterschiede in Spindichte und Relaxationszeiten verschiedene Bildkontraste, welche aufsummiert und mit Hilfe spezieller Software dargestellt werden können.

Die NMR-Messungen erfolgten in der vorliegenden Arbeit in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Experimentelle Physik V (Biophysik) des Physikalischen Instituts der Universität Würzburg. Die Messungen wurden von Dr. Volker Behr durchgeführt. Zur Verwendung kam dabei ein Bruker 17,6 T (750 MHz) Wide-bore Magnet sowie ein Bruker AVANCE™ Spektrometer (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland; siehe Abbildung 4-7). Die Feldstärke dieses Magneten ist mit 17,6 T etwa 360.000 mal stärker als das Erdmagnetfeld.

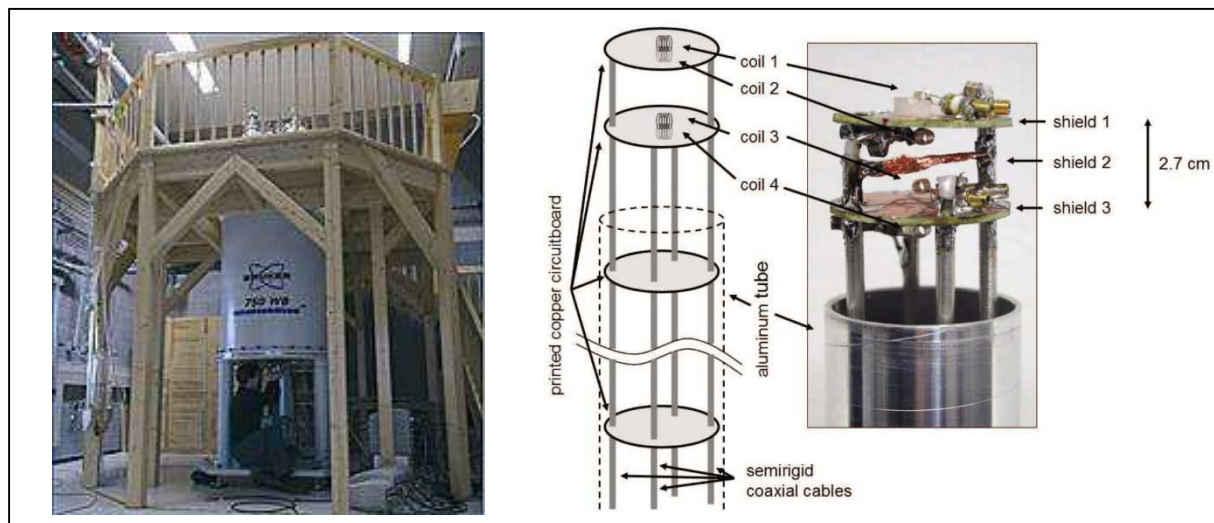


Abbildung 4-7: Verwendeter Magnet Bruker-750WB (links, Abbildung vom Zentralinstitut für Medizintechnik der TU-München) sowie eine Beispielabbildung einer Spule (rechts, Abbildung nach Porea, 2008).

Das verwendete Gradientensystem hatte eine Stärke von 1 T / m. Als Bildgebungssequenz wurde eine Spin-Echo-Sequenz, die sogenannte „Rare“-Sequenz verwendet. (Bruker; auch bekannt als Turbo-Spin-Echo [TSE]). Als Spulensystem kam eine sog. Birdcage-Spule mit einem Durchmesser von 20 mm und einer Höhe von 40 mm zur Verwendung.

Durchführung:

Zur Untersuchung der Somiten wurden drei Tage alte Embryonen (Stadium 43) und zur Untersuchung der Herzanatomie 5 Tage alte Embryonen (Stadium >46) verwendet. Diese wurden zunächst in 4% Formaldehyd (37%-SL, verdünnt in H₂O_{bidest.}) bei 4°C für etwa 24 Stunden fixiert. Am Tag vor der NMR-Messung wurden 3-5% (w/v) Hydroxyethyl-Cellulose (HEC) bei 35-40°C in 4% Formaldehyd eingerührt. Nachdem die Hydroxyethyl-Cellulose vollständig gelöst und die Lösung stark viskos wurde, überführte man die Embryonen in diese Lösung und lies sie darin für etwa 30 Minuten inkubieren. Anschließend wurden die Embryonen zusammen mit der HEC-Lösung in Glasröhrchen überführt (Durchmesser: 5mm). Die Embryonen wurden dabei so positioniert, dass sie die Glaswand des Röhrchens nicht berührten und mit dem Schwanz zum verschlossenen Ende des Glasröhrchens gerichtet waren. Da jedwede Bewegung des Embryos die NMR-Messung verfälschen würde, kann der Embryo bei einem Absinken so lediglich auf dem Schwanz zum Liegen kommen. Die Probe wurde zunächst bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis alle vorhandenen Luftblasen aufgestiegen waren. Das Röhrchen wurde schließlich überschüssig mit der HEC-Lösung aufgefüllt, mit einem Gummistopfen verschlossen und zusätzlich mit Parafilm abgedichtet. Die Lagerung erfolgte bis zur Messung bei 4°C. Die Messungen erfolgten mit folgenden Parametern:

Bezeichnung	Messgröße
Messdauer	123 Stunden
Gemessene Matrixgröße	384 x 192 x 192
FOV (Field of View)	10 x 5 x 5 mm ³
Ortsauflösung	26 x 26 x 26 µm ³
Maximal erreichte Auflösung	26 µm / Pixel
Spin-Echo-Sequenz	Rare (Bruker)
Anzahl Echo-Bilder	6
Echozeiten	T _{E1} =9,58 ms, T _{E2} =2x 9,58 ms, etc.
Mittlungen	12
Repetitionzeit T _R	1 Sekunde
Bandbreite	75 kHz

Tabelle 4-16: Messparameter der NMR-Messung

Die Auswertung der erhaltenen Daten sowie die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit Hilfe der Software Amira®.

4.7.6. Mikroinjektion in befruchtete Xenopus-Eier

Die Methode der Mikroinjektion ermöglicht es fremde Moleküle in Zellsysteme wie z.B. verschiedene Kompartimente einer Oozyte oder in Zwei-Zell-Stadien befruchteter Eizellen mittels einer Mikrokapillare einzubringen. Dadurch kann die Funktion oder die Verteilung eines Proteins bzw. die Auswirkung der Fremdmoleküle auf das Zellsystem untersucht werden.

In dieser Arbeit wurden Morpholino-Oligonukleotide (siehe 3.2.3.2.) in befruchtete Eizellen injiziert. Dadurch konnte die Translation der zu untersuchenden Proteine herunterreguliert (Knock-down) und anhand des embryonalen Phänotyps Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins geschlossen werden. Darüber hinaus wurden Kontrollmorpholinos (5-Basen-mismatch-Morpholinos) injiziert um die Spezifität des Knockdowns nachzuweisen. In weiterführenden „Rescue“-Studien wurde zudem simultan zu den Morpholinos in vitro synthetisierte mRNA injiziert (siehe 4.2.13.), welche für ein weiteres LEM-Domänen Protein codiert.

4.7.6.1. Herstellung der Mikroinjektionsnadel

Zunächst wurde ein Glasröhrchen über einem Bunsenbrenner erhitzt und nahe der Schmelztemperatur rasch auseinander gezogen, wodurch in der Mitte des Glasröhrchens eine dünne Kapillare entstand. Diese wurde anschließend in der Mitte gebrochen und mit der Standflamme des Bunsenbrenners ein Haken in die Kapillare gebogen. Die Kapillare wurde dann in die Apparatur zur Herstellung von Mikroinjektionsnadeln eingespannt und ein kleines Gewicht an dem Haken befestigt (siehe Abbildung 4-8). Nachfolgend wurde ein Filament zum Glühen gebracht und an die Kapillare angenähert ohne diese jedoch zu berühren. Sobald sich bei erreichter Schmelztemperatur ein dünner Hals in der Kapillare gebildet hatte, wurde diese mit einem Drehrad höher positioniert und der Schmelzvorgang so lange weiter durchgeführt bis die Kapillare einen ausreichend geringen Durchmesser zeigte. Die so geschmolzene Kapillare wurde mit einer Uhrmacherpinzette vorsichtig auf eine Länge von etwa 1-2 mm abgetrennt. Die Mikroinjektionsnadel wurde schließlich aus der Apparatur entfernt.

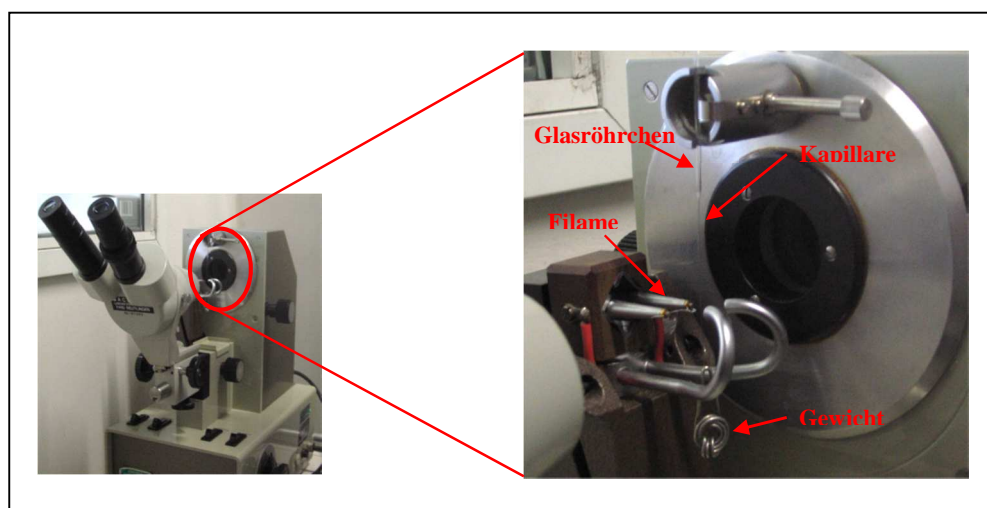


Abbildung 4-8: Apparatur zur Herstellung von Mikroinjektionsnadeln

4.7.6.2. Mikroinjektion in befruchtete Eizellen

Lösungen:

5% Ficoll: 5% (w/v) Ficoll in $\frac{1}{4}$ MMR

MMR / $\frac{1}{4}$ MMR / 0,1x MMR: (siehe 4.5.1.)

Morpholino-Oligonukleotide: (1-2 ng/nl)

Durchführung:

Zunächst musste die Mikroinjektionsnadel vorbereitet werden. Hierzu wurde sie auf ein Millimeterpapier gelegt und pro Millimeter ein Eichstrich aufgezeichnet. Daher betrug das Volumen zwischen zwei Eichstrichen ca. 100 nl (Abweichungen abhängig vom Durchmesser der Nadel). Die Injektionsnadel konnte schließlich in die Injektionsapparatur eingespannt und in einen, mit Paraffinöl gefüllten, Schlauch gesteckt werden (siehe Abbildung 4-9).

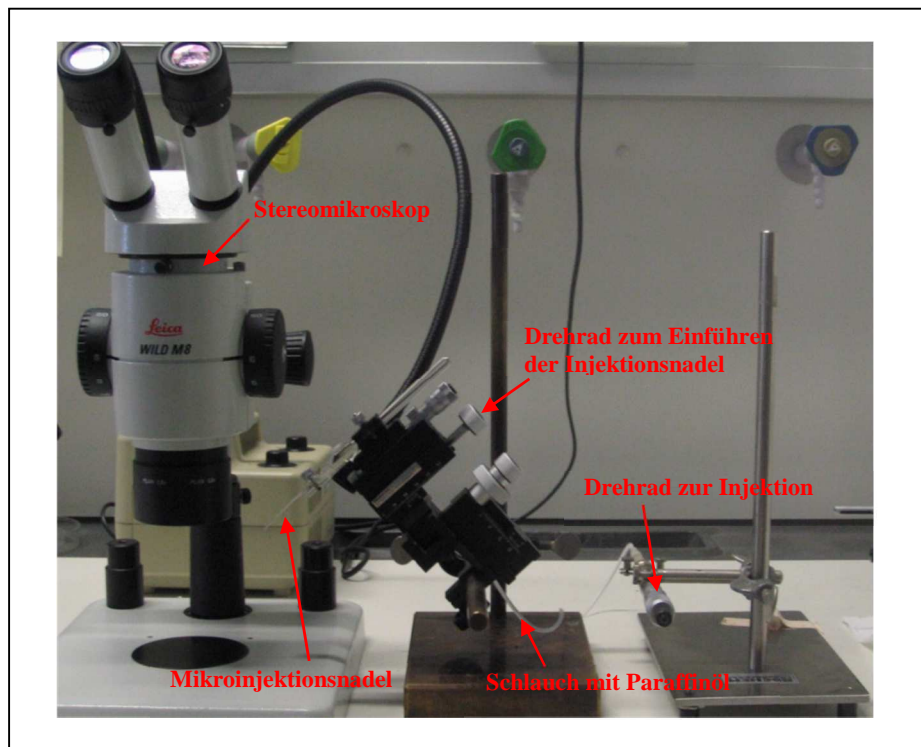


Abbildung 4-9: Apparatur zur Mikroinjektion

Mittels *in vitro* Fertilisation (siehe 4.6.3.) befruchtete Eier wurden nach Entfernen der Gallerthülle in Aktivkohle-Agarschalen mit 0,1x MMR überführt und darin weiter inkubiert. Positiv befruchtete Eizellen (bzw. bei Mikroinjektion im Zwei-Zell-Stadium) wurden in ein, mit 5% Ficoll befülltes, Schälchen überführt, in dem sich Positionslöcher zur Fixierung der Embryonen befanden. Die Embryonen wurden darin so positioniert, dass sich der pigmentierte animale Pol oben befand.

Anschließend wurde die zu injizierende Probe auf einen Objektträger pipettiert (ca. 3-5 μ l), welcher mit Parafilm umhüllt war und auf Eis inkubiert wurde. Die Probe wurde vorsichtig mit der Injektionsnadel

aufgenommen. Schließlich wurde die Nadel behutsam in die befruchtete Eizelle oder alternativ in eine Blastomere eines Zwei-Zell-Embryos eingeführt und ca. 50 nl der Probe injiziert (mittels Drehrad der Mikroinjektionsapparatur). Die Embryonen wurden nach erfolgter Injektion in ein Schälchen mit 0,1x MMR überführt und darin bis zum Erreichen des gewünschten Entwicklungsstadiums weiter inkubiert. Der Phänotyp der injizierten Embryonen wurde mit einem Stereomikroskop (mit Durchlicht) und einer angeschlossenen Kamera dokumentiert. Die aufgenommenen Bilder wurden schließlich mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop editiert.

4.8. Mikroskopie

4.8.1. Mikroskopie von Fluoreszenzpräparaten

Zur mikroskopischen Auswertung von Fluoreszenzpräparaten (Kulturzellen, in-vitro Kerne und Quetschpräparate) wurde ein Zeiss Axiophot HB050 (Zeiss, Oberkochen) mit Epifluoreszenzoptik und Selektivfiltern für Texas-Red, FITC und Hoechst-DNA-Fluoreszenz eingesetzt. Die Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einer digitalen Kamera der Firma Pixelfly (CCD-Sensor) durchgeführt. Die Editierung der dokumentierten Bilder erfolgte schließlich mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop.

4.8.2. Mikroskopie von PLA-Präparaten

Um Protein-Interaktionen, welche mittels Proximity-Ligation-Assay (PLA) detektiert wurden, dreidimensional analysieren zu können, wurden mehrere Bildserien (Z-Stacks) von entsprechenden Zellkernen aufgenommen. Die Aufnahme der Z-Stacks (150 Bilder, 100-nm Abstand) wurde mit einem speziell konstruierten iMIC-Mikroskop der Firma TILL Photonics (Gräfelfingen) durchgeführt. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Objektiv (60x; Numerische Apertur 1,45) der Firma Olympus (Tokyo, Japan) und einer Sensicam QE CCD-Kamera (PCO, Kehlheim, Deutschland). Die Dekonvolution der Z-Stacks erfolgte mit der Software Huygens Essential (SVI, Hilversum, Niederlande). Zweidimensionale Z-Projektionen (Methode: Maximum Intensity) wurden mittels der Software ImageJ erstellt. Zur dreidimensionalen Darstellung der Zellkerne und der PLA-Signale wurden die dekonvolvierten Z-Stacks mittels der Software Imaris (Version 7.6; Bitplane, Belfast, Irland) Volumen- und Oberflächen-gerendert. Detaillierte Messparameter können im Anhang unter 8.1.1. eingesehen werden.

4.8.3. Mikroskopie und statistische Auswertungen an *Xenopus* Embryonen

Die Mikroskopie von *Xenopus laevis* Embryonen wurde mit einem Leica MZ 16 FA Stereomikroskop unter Verwendung einer Leica EC3 Digitalkamera durchgeführt. Die Dokumentation der Embryonen und beobachteten Phänotypen erfolgte mittels der Mikroskopie-Software LAS EZ (Version 3.0; Leica). Die Embryonen wurden hierzu zunächst mit verdünntem MS222 (siehe 4.5.2.; Verdünnung 1:2 in 0,1x

MMR) anästhesiert. Anschließend wurden die Embryonen in Agarschalen (0,5%; w/v) mit verdünntem MS222 positioniert und dokumentiert. Die Editierung der dokumentierten Bilder erfolgte schließlich mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop.

Die Aufnahme von Videodaten des schlagenden Herzens sechs Tage alter Embryonen erfolgte unter identischen Bedingungen. Zur Aufnahme des Herzschlags wurde zusätzlich die Software FRAPS™ (FRAPS™ v3.5.9; Beepa Pty Ltd, VIC, Australien) herangezogen. Videos wurden bei 20°C mit einer konstanten Bildfrequenz von 30 Bildern pro Sekunde über einen Zeitraum von 10 Sekunden (→ 300 Bilder) aufgenommen. Die Auswertung der Videos sowie die Analyse der einzelnen Herzmerkmale erfolgte mit der Software Adobe Premiere CS5.5 in Abhängigkeit von den jeweiligen Zeitpunkten/Frames. Das Volumen / die Größe der embryonalen Herzen wurde mittels Adobe Photoshop CS5 ermittelt. Zur Auswertungen der Physiologie der jeweiligen Herzphänotypen wurden mehrere Merkmale ermittelt, welche im Anhang unter 8.1.4. eingesehen werden können.

4.8.4. Dreidimensionale Darstellung embryonaler Herzen

Zur Dokumentation embryonaler Herzen, die einer Whole-mount Immunfluoreszenz unterzogen wurden, wurde ein Mikroskop-Bundle von Leica verwendet (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar). Dies beinhaltet das Stativ DMI6000B sowie die Kamera DFC365FX. Bilderserien durch das Herz wurden mit Hilfe der Software LAS AF (Leica) aufgenommen. Die Dekonvolution der Z-Stacks wurde analog zur PLA mit Huygens Essential durchgeführt. Zweidimensionale Z-Projektionen (Methode: Maximum Intensity) wurde mittels ImageJ erstellt und eingefärbt (LUT: Hot Red). Die dreidimensionale Volumendarstellung der dekonvolierten Daten erfolgte mit Imaris. Detaillierte Messparameter können im Anhang unter 8.1.1. eingesehen werden.

5. Ergebnisse

5.1. Die Rolle von XMAN1 während der Kernhüllbildung

Anhand eigener vorangegangener Untersuchungen wurde festgestellt, dass eine Inhibition von XMAN1 mittels Mikroinjektion spezifischer Antikörper in das 2-Zell-Stadium befruchteter *Xenopus* Embryonen zu einem Arrest der Zellteilung der injizierten Blastomere führte (Daten nicht gezeigt). Da das LEM-Domänen Protein Xemerin in diesen Stadien noch nicht exprimiert ist, war es möglich zu prüfen, ob XMAN1 und Xemerin während der Zellteilung überlappende Funktionen besitzen. Dabei wurde erstmals gezeigt, dass eine simultane Injektion von Xemerin die Inhibition von XMAN1 kompensiert und eine normale Zellteilung gewährleistet.

Eine Erklärung für den Arrest der Zellteilung konnte jedoch bisher nicht erbracht werden. Nach Befruchtung einer Eizelle finden zunächst synchron ablaufende Furchungsteilungen der Blastomere statt. Diese Teilungen gleichen einem stark verkürzten Zellzyklus somatischer Zellen, da sie sich nur aus der S- und M-Phase zusammensetzen. Da XMAN1 und Xemerin integrale Proteine der inneren Kernmembran sind, lag die Vermutung nahe, dass es durch Antikörper-vermittelte Inhibition von XMAN1 zu einer Störung der Kernhüllbildung kam. Diese These sollte anhand der *in vitro* Bildung von Kernen im aktivierten Eiextrakt überprüft werden (siehe Abb. 5-1).

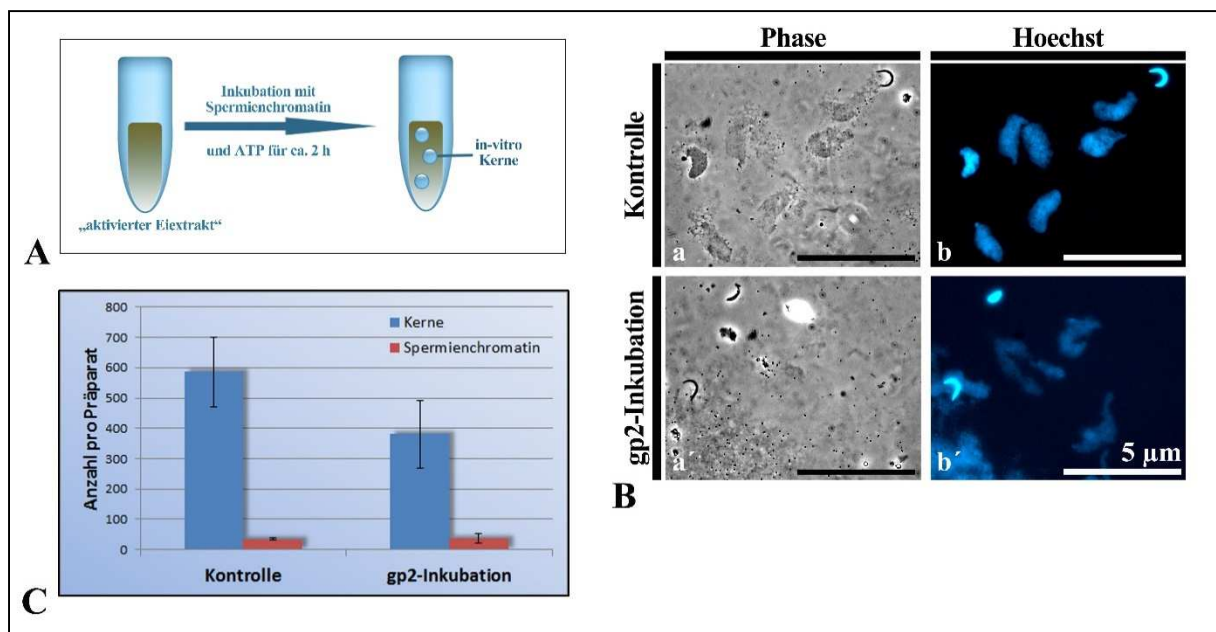


Abbildung 5-1: Die Antikörper-vermittelte Inhibition von XMAN1 führt zu Defekten bei der Bildung von *in vitro* Kernen. (A) Schematische Darstellung der *in vitro* Bildung von Kernen im aktivierten Eiextrakt. (B) Fluoreszenzaufnahmen Hoechst-gefärbter *in vitro* Kerne. Die Inkubation des Eiextraktes mit XMAN1-Antikörpern (gp2) zeigt eine diffuse Verteilung der Chromatins der gebildeten *in vitro* Kerne (b'). (C) Quantifizierung der Anzahl der *in vitro* Kerne und des Spermienchromatins pro Präparat. Durch Antikörper-vermittelte Inhibition von XMAN1 kam es zu einer verminderten Anzahl von *in vitro*-Kernen. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des arithmetischen Mittels.

Der aktivierte Eiextrakt beinhaltet alle zellulären Komponenten, die zur Bildung von Kernen benötigt werden. Ein fehlender Bestandteil ist jedoch Chromatin (siehe Abb. 5-1A). Die Inkubation mit ATP und einem ATP-regenerierenden System aus Kreatinphosphat/Kreatinkinase, stellt die notwendige Energie bereit und beschleunigt zudem die Kernbildung im vorliegenden *in vitro* System. Als Kontrolle wurden 50 µl Eiextrakt für zwei Stunden mit einem ATP-regenerierenden System sowie mit isoliertem Spermienchromatin inkubiert (siehe 4.5.3.). Um eine Inhibierung von XMAN1 während der Kernbildung zu überprüfen, wurde der Eiextrakt in separaten Ansätzen zusätzlich mit einem XMAN1-spezifischen Antikörper (gp2) inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die DNA mittels Hoechstfärbung markiert und die *in vitro* Kerne mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Dabei konnte einerseits beobachtet werden, dass eine Inkubation mit dem XMAN1-Antikörper zu Kernen mit einer augenscheinlich diffusen Chromatinverteilung führte (Abb. 5-1B, b'). Andererseits wurde bemerkt, dass sich in den Antikörper-inkubierten Proben deutlich weniger intakte *in vitro* Kerne gebildet hatten. Um dies zu quantifizieren, wurde die Bildung der *in vitro* Kerne in mehreren, unabhängig voneinander durchgeführten Ansätzen wiederholt und die Anzahl der Kerne sowie des Spermienchromatins der gesamten Präparate ausgezählt (Abb. 5-1C). Dabei wurde ermittelt, dass die durchschnittliche Kernanzahl bei Inkubation mit dem XMAN1-Antikörper um etwa 35% reduziert war. Als interne Kontrolle wurde zusätzlich die Anzahl des Spermienchromatins pro Präparat ausgewertet. Eine verminderte Anzahl wurde dabei nicht beobachtet (Abb. 5-1C), was darauf schließen lässt, dass es durch Inhibition von XMAN1 tatsächlich zu einer fehlerhaften Kernbildung kam und nicht aufgrund unspezifischer Effekte des Antikörpers auf die Dekondensation des Spermienchromatins. Um die Ursache der verminderten Kernbildung sowie der anormalen Chromatinverteilung beurteilen zu können, wurden die *in vitro* Kerne einer EM-Einbettung unterzogen und deren Ultrastruktur mittels Elektronenmikroskopie untersucht (Abb. 5-2).

Hierbei konnte beobachtet werden, dass Proben, welche mit XMAN1-Antikörpern inkubiert wurden, keinerlei korrekt gebildeten Zellkerne zeigten (Abb. 5-2b). Entsprechende Strukturen waren lediglich durch dekondensiertes Chromatin charakterisiert (Pfeil). Aufgrund zahlreicher nahe dem Chromatin lokalisierter Membranvesikel (Pfeilköpfe) scheint es, dass eine Fusion der Vesikel zu einer intakten Doppelmembran nicht stattgefunden hat.

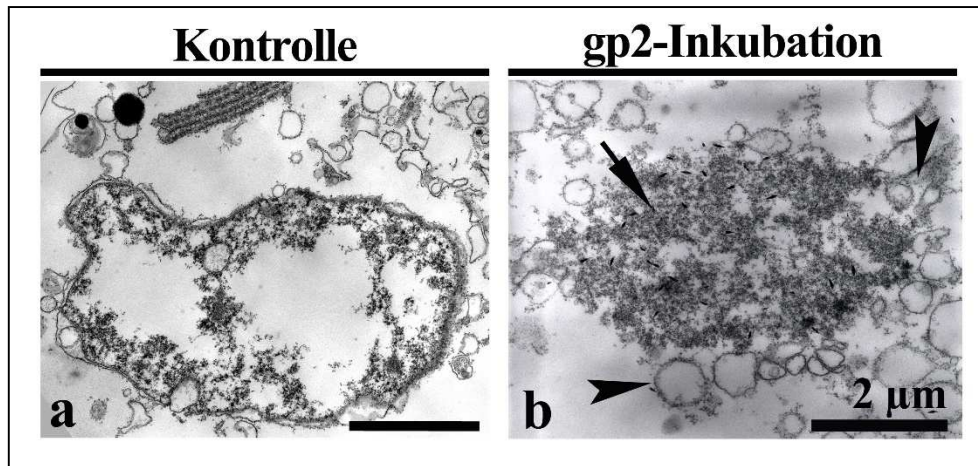


Abbildung 5-2: Ultrastruktur der gebildeten in vitro Kerne nach Inkubation mit XMAN1-Antikörpern (gp2). (a) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines in vitro Kerns, welcher unter normalen Bedingungen gebildet wurde. (b) Durch Inkubation des Eiextraktes mit dem XMAN1-Antikörper kam es zu keiner Bildung intakter in vitro Kerne. Entsprechende Strukturen zeigen dekondensiertes Chromatin (Pfeil), welches jedoch nicht von einer Kernhülle umgeben ist. Zahlreiche Membranvesikel im Bereich des Chromatins (Pfeilköpfe) deuten auf eine fehlerhafte Fusion der Vesikel zu einer intakten Doppelmembran hin.

Im Gegensatz dazu zeigten Kerne der Kontrollansätze eine durchgehende Doppelmembran mit inserierten Kernporenkomplexen (Abb. 5-2a). Da es in der vorliegenden Arbeit zu gravierenden Problemen bei der Synthese von Xemerin-Fusionsproteinen kam, konnten entsprechende Rescue-Experimente zur Untersuchung von überlappenden Funktionen zwischen XMAN1 und Xemerin während der Kernbildung nicht durchgeführt werden.

5.2. Die Rolle von XMAN1 während der Organentwicklung

Bisher wurde vermutet, dass LEM-Domänen Proteine vor allem an kernspezifischen Vorgängen beteiligt sind (zur Übersicht, siehe Wagner und Krohne, 2007). Darunter zählen beispielsweise Aufgaben bei der Aufrechterhaltung der Kernhüllarchitektur durch Interaktionen mit der Kernlamina, die Regulation der Chromatinorganisation oder auch der Genexpression. Die funktionelle Rolle der LEM-Domänen Proteine, vor allem im Kontext der Pathologie bei Envelopathien, ist jedoch bis dato nicht aufgeklärt.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher die Funktionen der LEM-Domänen Proteine MAN1 und Emerin während der embryonalen Frühentwicklung von *Xenopus laevis* untersucht werden. Um dies zu gewährleisten, wurde zunächst der Knockdown von XMAN1 während der Embryonalentwicklung eingehend analysiert.

5.2.1. Knockdown von XMAN1 mittels Mikroinjektion spezifischer Oligonukleotid Morpholinos

Durch Verwendung von Morpholinos kann die Expression spezifischer Gene manipuliert und somit die funktionelle Rolle der entsprechenden Proteine während verschiedener zellulärer Vorgänge untersucht werden. Um die Expression von XMAN1 während der Frühentwicklung von *Xenopus laevis* herunter zu regulieren, wurden spezifische Oligonukleotid-Morpholinos verwendet (MO-XMAN1). Deren Sequenz wurde dabei so entworfen, dass es zu einer Blockierung der Translation kommt. Die Morpholinos waren daher gegen den Translationsstart (AUG) des *X. laevis*-spezifischen *LEMD3*-Gens gerichtet.

Um zunächst den Morpholino-vermittelten Knockdown von XMAN1 zu testen, wurden befruchtete Embryonen während des 1-Zell-Stadiums injiziert. Dabei wurden pro Embryo 100 ng MO-XMAN1 verwendet. Schließlich wurden die Expressionsniveaus von XMAN1 während der Embryogenese mittels Immunblot analysiert (Abb. 5-3).

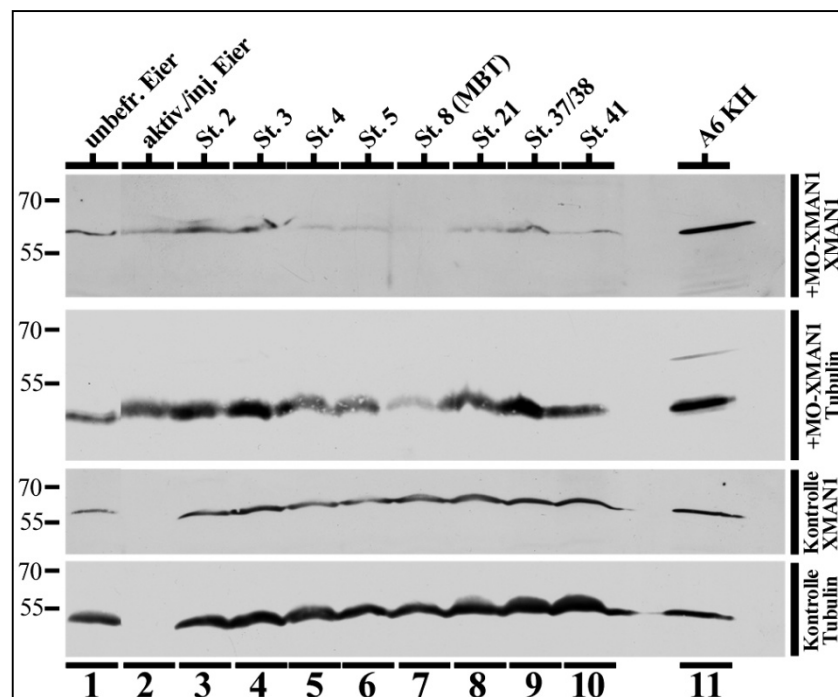


Abbildung 5-3: Expressionsniveaus von XMAN1 durch Morpholino-vermitteltem Knockdown. Proteinhomogenate von 5 unbefruchteten Eiern (Spur 1), aktivierten und injizierten Eiern (Spur 2), Embryonen verschiedener Entwicklungsstadium (Spuren 3 – 10) sowie 5×10^6 A6-Kernhüllen (Spur 11) wurden mittels 18% SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend geblottet. Die Nitrocellulose (NC) wurde mit XMAN1-spezifischen Antikörpern (gp2) inkubiert. Embryonen, welche mit MO-XMAN1 injiziert wurden, zeigen eine deutlich reduzierte Expression von XMAN1 ab Stadium 4 (erste Reihe, Spur 5). Diese verminderte Expression bleibt während der weiteren Embryonalentwicklung bestehen (Spuren 6-10). Uninjizierte Kontrollembryonen zeigen eine kontinuierliche Expression von XMAN1 mit gleichbleibenden Expressionsniveaus (dritte Reihe). As interne Ladekontrolle wurde die NC erneut mit anti-Tubulin Antikörpern inkubiert. Die Tubulin-Expression bleibt dabei während der Embryogenese konstant (zweite und letzte Reihe). Die molekularen Massen der Markerproteine sind in kDa angegeben. St: Stadium.

Embryonen, welche mit spezifischen Morpholinos (MO-XMAN1) injiziert wurden, zeigten eine signifikante Abnahme der XMAN1-Expression ab Stadium 4 (Abb. 5-3, obere Reihe, Spur 5). Zum Zeitpunkt der Midblastulatransition konnte XMAN1 kaum noch detektiert werden (Spur 7).

Im direkten Vergleich zu uninjizierten Kontroll-Embryonen, zeigten diese eine kontinuierliche Expression von XMAN1 während der gesamten Embryonalentwicklung (Abb. 5-3, dritte Reihe). Als interne Ladekontrolle wurde die Nitrocellulose mit einem Tubulin-spezifischen Antikörper inkubiert. Tubulin zeigte dabei in beiden Versuchsansätzen weitgehend gleichbleibende Expressionsniveaus (Abb. 5-3, zweite und letzte Reihe). Obwohl die Expression von Tubulin in Morpholino-injizierten Embryonen im Entwicklungsstadium 8 schwächer erschien (Abb. 5-3, zweite Reihe, Spur 7), blieben die durchgehend erniedrigten Expressionsniveaus von XMAN1 dennoch bestehen. Auch durch Quantifizierungen der XMAN1-Expressionsniveaus der Knockdown-Embryonen in Relation zu uninjizierten Embryonen, konnte die verminderte Expression von XMAN1 verdeutlicht werden (Abb. 5-4).

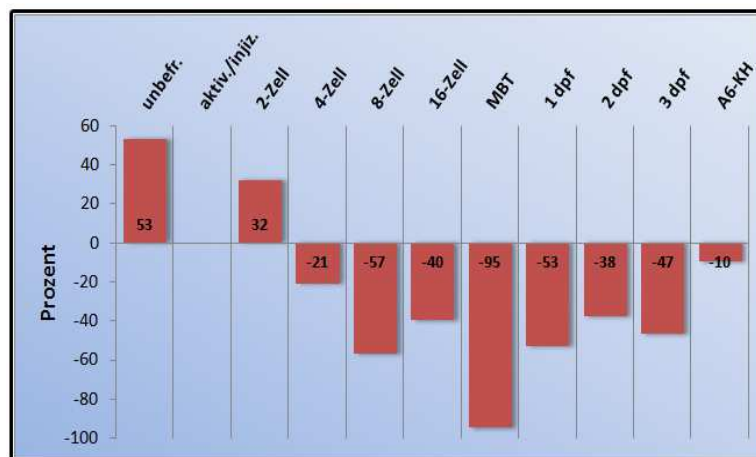


Abbildung 5-4: Quantifizierung der XMAN1- Expressionsniveaus MO-XMAN1-injizierter Embryonen in Relation zu uninjizierten Embryonen. Zur Quantifizierung wurden die jeweiligen Expressionsniveaus von XMAN1 mit denen der Ladekontrolle (Tubulin) normalisiert und anschließend miteinander verglichen. Es zeigte sich eine reduzierte Expression von XMAN1 ab dem 4-Zell-Stadium. Zum Zeitpunkt der Midblastulatransition (MBT) konnte die Expression von XMAN1 kaum noch nachgewiesen werden (-95%). Die Quantifizierung der Expressionsniveaus wurde mit der Software GelScan (Version 6.0, Serva) durchgeführt dpf: Tage nach Befruchtung, KH: Kernhüllen.

Dabei war deutlich zu erkennen, dass es ab dem 4-Zell-Stadium bis hin zu drei Tage nach Befruchtung, zu einer reduzierten Expression von durchschnittlich 50% kam. Zum Zeitpunkt der Midblastulatransition konnte zudem eine Reduktion der XMAN1-Expression von 95% ermittelt werden.

Diese Resultate zeigen, dass mittels Mikroinjektion von MO-XMAN1 ein effektiver Knockdown von XMAN1 erzielt werden konnte. Daraufhin wurden weiterführende Knockdown-Experimente durchgeführt, indem Embryonen in eine Blastomere des 2-Zell-Stadiums injiziert wurden (siehe Abb. 5-5). Der Vorteil einer Injektion in eine Blastomere liegt darin, dass die Effekte des Knockdowns mit der Embryonalentwicklung der uninjizierten Seite simultan verglichen werden können.

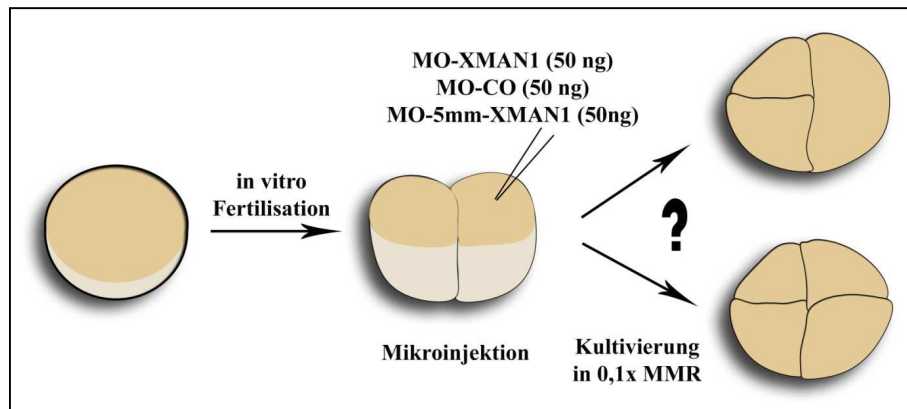


Abbildung 5-5: Schematische Darstellung der Mikroinjektion verschiedener Oligonukleotid-Morpholinos in eine Blastomere von Embryonen im 2-Zell-Stadium.

Da lediglich in eine Blastomere injiziert wurde, war es ausreichend 50 ng der entsprechenden Morpholinos zu injizieren (vgl. Abb. 5-5). Mikroinjektionen verschiedener Morpholino-Konzentrationen haben ergeben, dass es bei Konzentrationen unter 50 ng pro Blastomere zu keinen Effekten während der Embryonalentwicklung kam. Konzentrationen über 50 ng führten hingegen neben unspezifischen Defekten während der Entwicklung zu einer stark gesteigerten Mortalität der Embryonen während der Gastrulation.

Um die Spezifität der beobachteten Phänotypen verifizieren zu können, wurden in separaten Versuchsansätzen unspezifische Kontrollmorpholinos (MO-CO) oder Morpholinos injiziert, deren Sequenz eine 5-Basen-Fehlpaarung aufweisen (MO-5mm-XMAN1). Ebenso wurden alle Mikroinjektionen in mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsreihen wiederholt.

5.2.2. Der Knockdown von XMAN1 führt zu einer Störung der Augen-Entwicklung

Infolge des XMAN1-Knockdowns wurden drei unterschiedliche Phänotypen während der Frühentwicklung von *Xenopus laevis* beobachtet. Dabei konnte zunächst eine veränderte Entwicklung der Augen in der injizierten Seite festgestellt werden (Abb. 5-6). Erwartungsgemäß wurde dieser Phänotyp erstmals ab Stadium 37/38 beobachtet und bestätigte

sich etwa drei Tage nach Befruchtung (Stadium 41), da in diesem Zeitraum die Entwicklung der Augen ersichtlich ist.. Dabei zeigte die Mehrheit der Embryonen einen starken Phänotyp (89%), welcher durch ein vollständiges Fehlen der Augen in der injizierten Seite charakterisiert war (Abb. 5-6A, b'-c', Pfeile). Nur wenige Embryonen (9%) zeigten zudem einen abgeschwächten Phänotyp, welcher vor allem durch rudimentär ausgebildete oder kleinere Augen gekennzeichnet war.

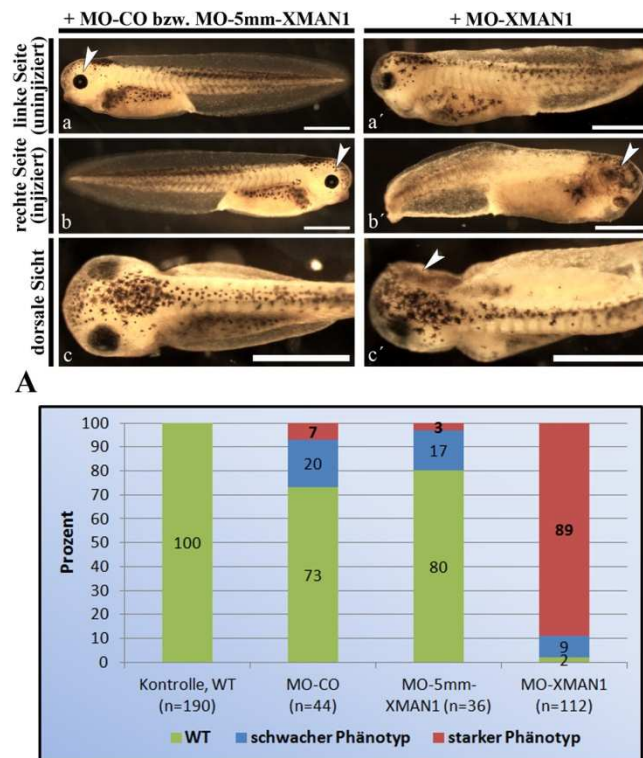


Abbildung 5-6: Der Knockdown von XMAN1 führt zu Defekten während der Augen-Entwicklung. (A) Stereomikroskopische Aufnahmen von Embryonen, drei Tage nach Injektion mit Kontrollmorpholinos (MO-CO oder MO-5mm-XMAN1, a-c) oder MO-XMAN1 (a'-c'). Die injizierte Seite der XMAN1-Knockdown Embryonen zeigt keine oder nur teilweise entwickelte Augen (b'-c', Pfeile). Die Kontrollembryonen entwickelten zwei normale Augen (a-b, Pfeile). Referenzbalken: 1 mm. (B) Quantifizierung der beobachteten Phänotypen. Die XMAN1-Knockdown Embryonen zeigten vorwiegend einen schweren (rot) oder abgeschwächten (blau) pathologischen Phänotyp. Die Mehrheit der Kontrollembryonen entwickelte zwei Wild-Typ-Augen (WT, grün). n: Anzahl der Embryonen.

Embryonen, welche mit unspezifischen (MO-CO) oder spezifischen Kontrollmorpholinos (MO-5mm-XMAN1) injiziert wurden, entwickelten weitgehend zwei normale Augen (jeweils 73% und 81%; Abb. 5-6A, a-c). Im Vergleich zu XMAN1-Knockdown Embryonen, zeigte nur ein geringer Anteil der Kontrollembryonen verkleinerte Augen (jeweils 20% und 17%), was demzufolge auf unspezifische Defekte aufgrund der experimentellen Manipulation der Embryonen zurückzuführen ist.

Obwohl eine gestörte Entwicklung der Augen in XMAN1-Knockdown Embryonen bereits anhand vorangegangener Studien beschrieben wurde (Osada et al., 2003), fehlten bis dato jedoch detaillierte histologische Untersuchungen der Augen. Daher wurden entsprechende Knockdown-Embryonen, die vorzugsweise den abgeschwächten Phänotyp aufwiesen zur elektronenmikroskopischen Untersuchung in Epon eingebettet und zunächst histologische Semidünnschnitte angefertigt (Abb. 5-7A). Dabei wurde anhand der injizierten Seite ein

anormal gebildetes Auge festgestellt (Abb. 5-7A, b, Pfeil). Das Auge erschien dabei nicht nur kleiner, auch die Morphologie zeigte anhand einer veränderten zellulären Organisation sowie einer veränderten Pigmentation deutliche Unterschiede im Gegensatz zum Wild-Typ (WT) Auge der uninjizierten Seite (Pfeilkopf). Darüber hinaus waren in der injizierten Seite Hautabnormalitäten erkennbar, da die Haut Verdickungen sowie ein mehrschichtiges Epithel zeigte (Abb. 5-7A, b, weißer Pfeil). Zudem zeigte die gesamte injizierte Seite des Embryos eine deutlich erhöhte Ansammlung dunkel gefärbter Granula. Untersuchungen an Kontrollembryonen, zeigten dagegen bilateral normal geformte Augen (Abb. 5-7A, a).

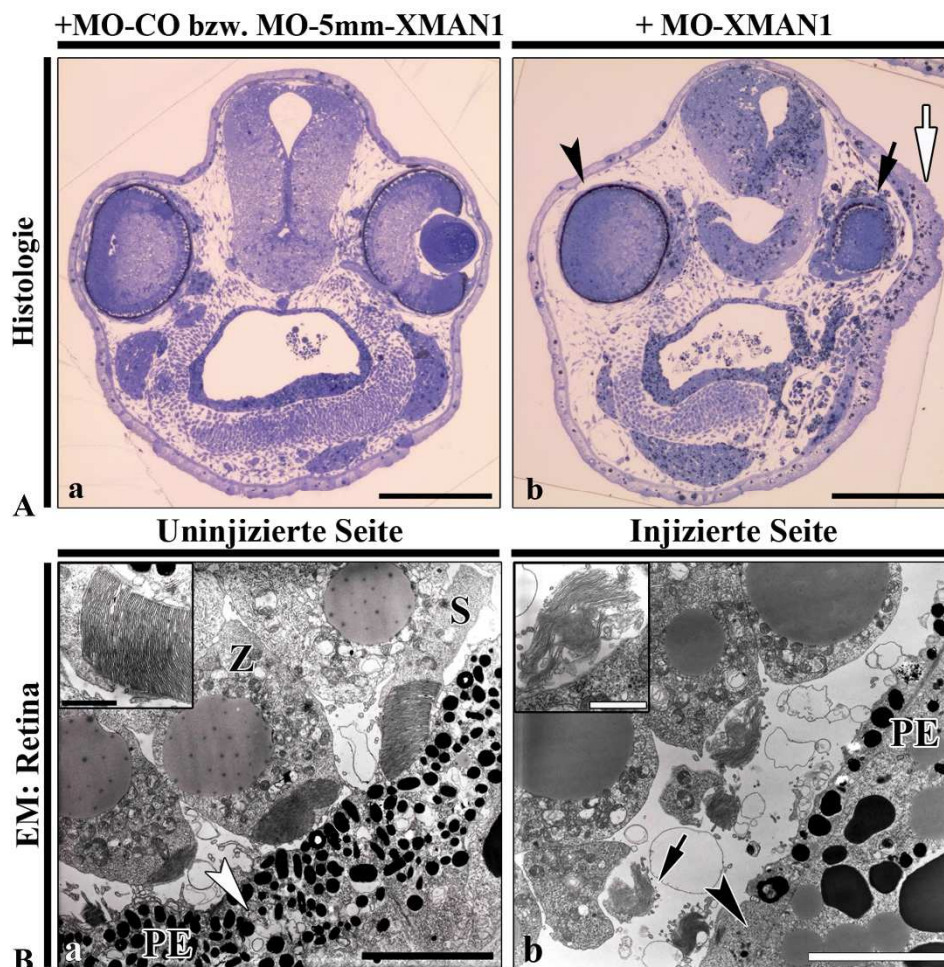


Abbildung 5-7: Morphologische Untersuchung des Augen-Phänotyps. (A) Methylen-Blau gefärbte transversale Semidünnschnitte durch Kopfstrukturen von Kontroll- (a) und XMAN1-Knockdown Embryonen (b). Die Histologie der XMAN1-Knockdown Embryonen offenbart eine anomale Morphologie des Auges (Pfeil) sowie Verdickungen der Haut in der injizierten Seite (weißer Pfeil). Referenzbalken: 250 μm . (B) Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Retina von WT (a) und anomalen Augen (b). Die Photorezeptorzellen der veränderten Augen zeigen einen Verlust des äußeren Membransegments (b, Pfeil) sowie eine ungeordnete Organisation der Membranstapel (Vergrößerung in b). XMAN1-Knockdown Embryonen zeigen ebenfalls eine reduzierte und inhomogene Pigmentation innerhalb des Pigmentepithels (PE; Pfeilkopf in b). S: Stäbchen, Z: Zapfen. Referenzbalken: 5 μm und 1 μm (in der Vergrößerung).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Retina zeigten mehrere schwerwiegende Defekte (Abb. 5-7B). Diese sind durch eine deutlich reduzierte Menge und inhomogene Verteilung von Pigmenten innerhalb des Pigmentepithels charakterisiert (Abb. 5-7B, b). Die Pigmentgranula waren vorwiegend in einer Ebene angeordnet und das Pigmentepithel zeigte Bereiche ohne Pigmente (Pfeilkopf). Ebenso zeigten die Photorezeptoren der XMAN1-Knockdown Embryonen einen Verlust der äußeren Segmente (Pfeil). Diese Segmente beinhalten üblicherweise die für die Phototransduktion essentiellen Membranstapel. Die Membranen der äußeren Segmente erschienen zudem ungeordnet (Vergrößerung in Abb. 5-7B, b).

Im Vergleich dazu zeigte die Retina der WT-Augen zahlreiche Ebenen von regelmäßig verteilten Pigmenten (Abb. 5-7B, a, Pfeilkopf). Die Photorezeptorzellen zeigten zudem parallel angeordnete Membranstapel der äußeren Segmente (Vergrößerung in Abb. 5-7B, a). Um weitere Aussagen über die zelluläre und retinale Organisation der Augen treffen zu können, wurden histologische Sagittalschnitte von XMAN1-Knockdown-Embryonen angefertigt (Abb. 5-8).

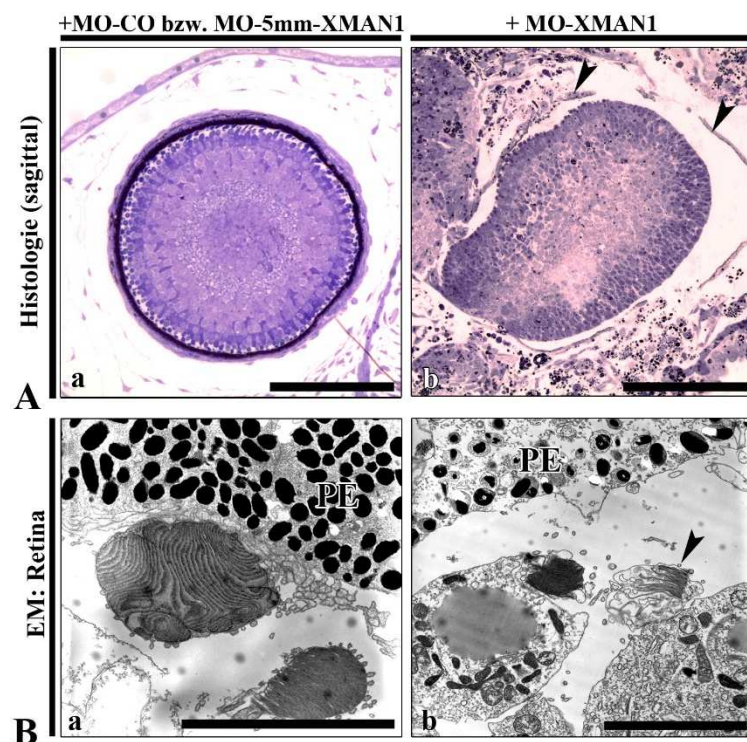


Abbildung 5-8: Morphologische Untersuchung des Augen-Phänotyps anhand von Sagittalschnitten.

(A) Methylblau gefärbte Semi-dünnschnitte sagittal segmentierter Kopfstrukturen von Kontroll- (a) und XMAN1-Knockdown Embryonen (b). Das anormale Auge zeigt eine stark veränderte Form in Verbindung mit desorganisierten Retinaschichten sowie ein abgehobenes Pigmentepithel (b, Pfeile). Referenzbalken: 250 μm .

(B) Elektronenmikroskopische Untersuchung der Retina von WT (a) und anormalen Augen (b). Die Retina veränderter Augen weist eine inhomogene Orientierung der Rezeptorzellen auf. Ebenso kann erneut eine veränderte Organisation der Membranstapel in den äußeren Segmenten beobachtet werden (b', Pfeil). Referenzbalken: 5 μm .

Dabei wurde beobachtet, dass das Pigmentepithel des anormalen Auges deutlich vom Rest des Auges abgehoben erschien (Abb. 5-8A, b, Pfeile). Ebenso erschien das Auge in seiner gesamten Form abnorm gegenüber dem WT-Auge (Abb. 5-8A, a). Die verschiedenen Retinaschichten zeigten eine starke Desorganisation, da sich keine definierten Schichten wie beispielsweise die der Ganglienzellen abzeichneten (vgl. Abb. 5-8A, a und b).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Retina zeigten neben einem anormal organisierten Pigmentepithel stark ungeordnete Membranen der äußeren Segmente (Abb. 5-8B, b, Pfeil). Da zudem transversal- als auch sagittal-geschnittene Photorezeptoren simultan beobachtet werden konnten, deutet dies auf eine allgemein gestörte zelluläre Organisation der Retina hin. Im Gegensatz dazu wies die Retina der WT-Augen unidirektional orientierte Photorezeptoren auf, da die Photorezeptorzellen ausschließlich transversale Schnittebenen durch das äußere Segment zeigten (Abb. 5-8B, a).

5.2.3. Der Knockdown von XMAN1 führt zu einer anormalen Muskelbildung

Neben Fehlbildungen des Auges offenbarten die XMAN1-Knockdown Embryonen zusätzlich einen stark gebogenen Körper sowie Defekte in den Muskelvorläufern, den Somiten. Dieser Phänotyp wurde erwartungsgemäß 3 Tage nach Injektion der Morpholinos (MO-XMAN1) beobachtet. In 93% der analysierten Embryonen zeigte sich ein stark ausgeprägter Phänotyp, welcher einen Verlust an Somiten sowie desorganisierte Muskelstrukturen entlang der Schwanzextremität zeigte (Abb. 5-9A, b'-c', Pfeile). Nur 3% der Embryonen besaßen einen schwachen Phänotyp, der durch geradförmige oder eine verminderte Anzahl von Somiten charakterisiert war. Im Gegensatz dazu zeigten Injektionen mit Kontrollmorpholinos (MO-CO und MO-5mm-XMAN1) überwiegend normale Embryonen mit beidseitig „pfeilförmig“ organisierten Somiten (Abb. 5-9A, a-c; jeweils 100% und 86%).

Zusätzlich zeigte sich die injizierte Seite der XMAN1-Knockdown Embryonen stark unterpigmentiert (Abb. 5-9A, b). Stattdessen waren in Arealen posterior des Auges dunkle Bereiche von Pigmentaggregaten zu erkennen. Diese Beobachtungen deuten auf eine fehlerhafte Auswanderung der Neuralleistenzellen in der Haut hin.

Um zu zeigen, dass bei einem Knockdown von XMAN1 tatsächlich die Somitenbildung beeinträchtigt ist, wurden Whole mount Immunlokalisationen mit Desmin-Antikörpern durchgeführt (Abb. 5-9C). Desmin fungiert dabei als molekularer Marker für Somiten (Debus et al., 1983). Die uninjizierte Seite zeigte demzufolge die bekannte Somiten-spezifische Färbung für Desmin (Abb. 5-9C, a', Pfeilkopf). Jedoch konnte in der injizierten Seite keinerlei Färbung detektiert werden, was auf ein Ausbleiben der Somitenbildung hinweist (Abb. 5-9C, b', Pfeil).

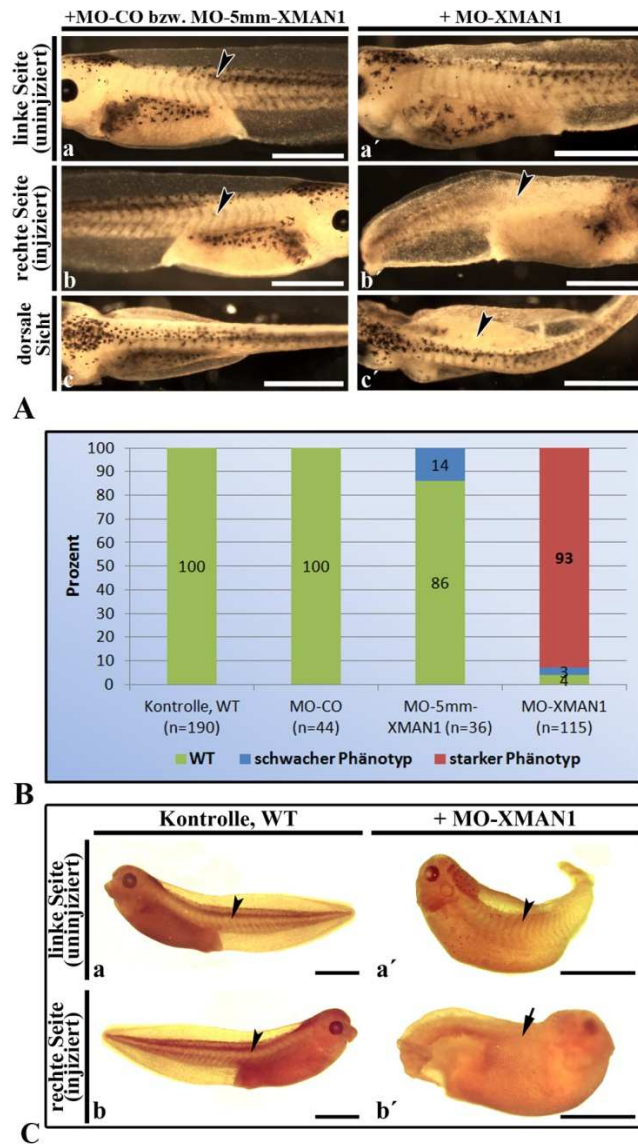


Abbildung 5-9: Der Knockdown von XMAN1 führt zu einer anormalen Ausbildung der Skelettmuskulatur.

(A) Stereomikroskopische Aufnahmen drei Tage alter Embryonen, welche mit Kontrollmorpholinos (a-c) oder MO-XMAN1 (a'-c') injiziert wurden. In der injizierten Seite der XMAN1-Knockdown Embryonen kam es zum Ausbleiben oder lediglich zu einer teilweisen Ausbildung von Somiten (b'-c', Pfeile). Referenzbalken: 1 mm.

(B) Quantifizierung der beobachteten Phänotypen. Die Mehrheit der XMAN1-Knockdown Embryonen zeigte einen schweren (rot) oder schwachen (blau) Phänotyp der Somiten. Der Großteil der Kontrollembryonen entwickelte beidseitig normale Somiten (WT, grün). n: Anzahl der Embryonen.

(C) Whole mount Immunlokalisation auf Embryonen, welche mit Desmin-spezifischen Antikörpern markiert wurden. WT Embryonen zeigten die bekannte Somiten-spezifische Färbung (a-b, Pfeilkopf). Eine vergleichbare Färbung konnte auf der injizierten Seite von XMAN1-Knockdown Embryonen nicht festgestellt werden (b', Pfeil). Referenzbalken: 1 mm.

Um die Morphologie der Somiten näher beurteilen zu können, wurden die Embryonen zunächst anhand histologischer Transversalschnitte der Schwanzextremität untersucht (Abb. 5-10A). XMAN1-Knockdown Embryonen zeigten dabei nur ansatzweise gebildete Somiten innerhalb der injizierten Seite (Abb. 5-10A, b, Pfeil). Auch anhand der vorliegenden histologischen Schnitte konnte bestätigt werden, dass der Knockdown von XMAN1 einen Einfluss auf die Organisation des Epithels hatte. Die verdickt erscheinende Haut der injizierten Seite zeigte ebenfalls ein mehrschichtiges Epithel (Abb. 5-10A, b, weißer Pfeil). Im Gegensatz dazu zeigten Embryonen, welche mit Kontrollmorpholinos injiziert wurden, vollständig gebildete Somiten sowie ein einschichtiges Epithel auf beiden Seiten (Abb. 5-10A, a).

Anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen wurde die Ultrastruktur der anormal organisierten Somiten betrachtet. Dabei zeigte sich, dass die gebildeten Muskelgewebe und -zellen einer schwerwiegenden Fehlorganisation unterlagen (Abb. 5-10B, b).

Die Muskelzellen zeigten eine deutlich reduzierte Anzahl der Sarkomere (Pfeil). Darüber hinaus erschienen die meisten Muskelzellen zu benachbarten Zellen isoliert. Ebenso fiel auf, dass die Muskelzellen der XMAN1-Knockdown Embryonen eine erhöhte Ansammlung von Mitochondrien im Zytoplasma zeigten (Daten nicht gezeigt). Es sollte jedoch überprüft werden ob es sich dabei lediglich um eine bestimmte Schnittebene der Zelle oder um zytoplasmatische Aggregationen aufgrund fehlender Sarkomere handelt. Benachbarte Zellen zeigten jedoch identische Phänotypen. Die Morphologie der Mitochondrien erschien jedoch weitgehend normal.

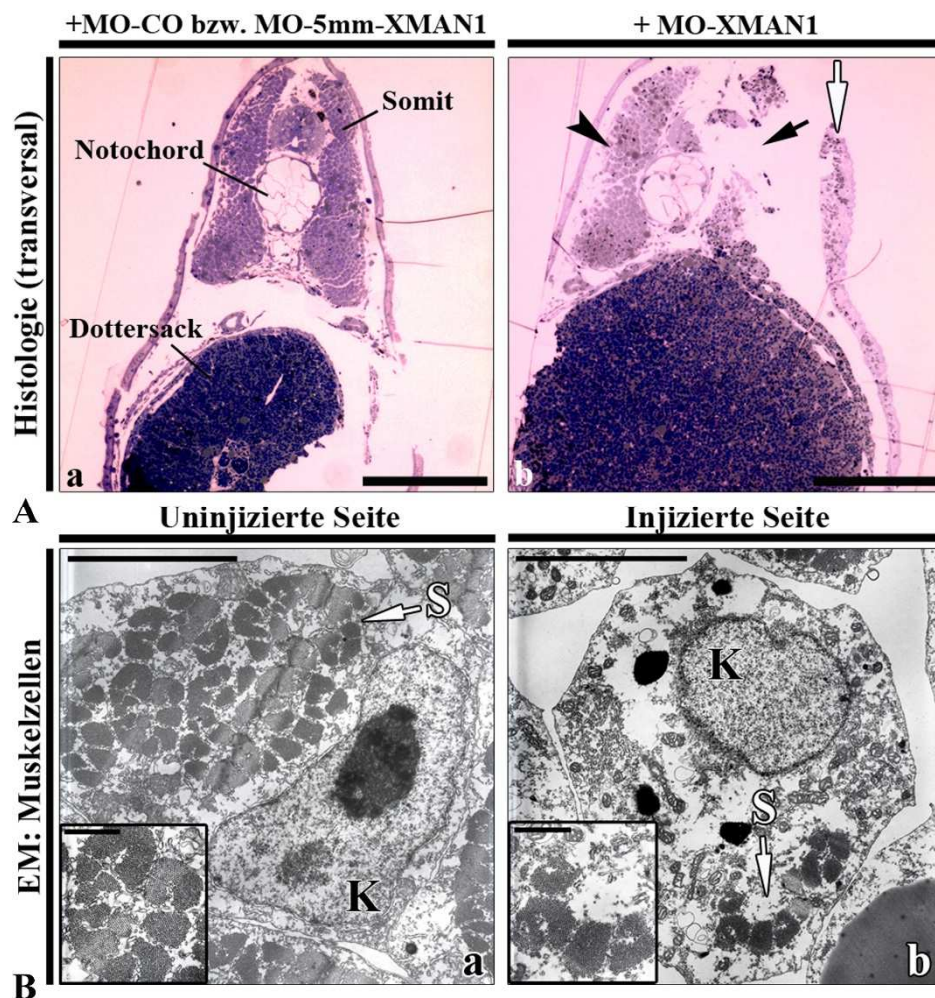


Abbildung 5-10: Morphologische Untersuchungen der Somiten in XMAN1-Knockdown Embryonen. (A) Methylen-Blau gefärbte Transversalschnitte der Schwanzextremität von Kontroll- (a) und XMAN1-Knockdown Embryonen (b). Die Morpholino-injizierte Seite zeigt Fragmente von Muskelstrukturen (b, Pfeil) sowie Verdickungen der Haut (b, weißer Pfeil). Referenzbalken: 250 µm. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Skelettmuskelzellen. Muskelzellen der XMAN1-Knockdown Embryonen zeigen eine deutlich reduzierte Anzahl an Sarkomeren (b, Pfeil). K: Zellkern, S: Sarkomere. Referenzbalken: 5 µm und 1 µm (in der Vergrößerung).

Vergleiche mit Muskelzellen der uninjizierten Seite von XMAN1-Knockdown Embryonen, zeigten zahlreiche zu Myofibrillen organisierte Sarkomere sowie eine Anordnung der Muskelzellen in enge Zellverbände (Abb. 5-10B, a).

Zur näheren Beurteilung der Organisation der Sarkomere wurden Sagittalschnitte von XMAN1-Knockdown Embryonen angefertigt und die Ultrastruktur der Skelettmuskelzellen elektronenmikroskopisch untersucht (Abb. 5-11).

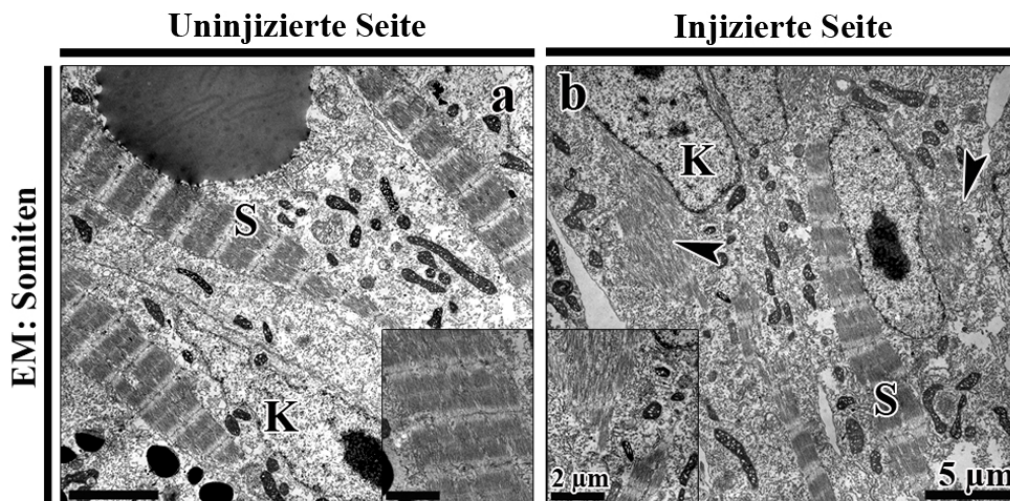


Abbildung 5-11: Der Knockdown von XMAN1 führt zu einer anormalen Sarkomerorganisation. Elektronenmikroskopische Aufnahmen transversal segmentierter Skelettmuskelzellen der Morpholino-injizierten Seite zeigen ungeordnete Sarkomere sowie zahlreiche Sarkomer-Fragmente (b, Pfeile). K: Zellkern. S: Sarkomere. Referenzbalken: 5 μm und 2 μm (in der Vergrößerung).

Muskelzellen der injizierten Seite zeigten vorwiegend ungeordnete Sarkomere sowie zahlreiche Sarkomer-Fragmente (Abb. 5-11b, Pfeile). Dennoch konnten gelegentlich Zellen mit vereinzelt normal organisierten Sarkomeren beobachtet werden (Abb. 5-11b, S). Erwartungsgemäß zeigten Aufnahmen von WT-Muskelzellen zahlreiche langgezogene Sarkomere mit der charakteristisch bandenförmigen Anordnung der Filamente (Abb. 5-11a).

5.2.4. Der Knockdown von XMAN1 führt zu Herz-spezifischen Fehlern

Der Knockdown von XMAN1 führte ebenfalls zu Defekten während der Herzentwicklung (Abb. 5-12). Stereomikroskopische Untersuchungen an Herzen von 6 Tage alten XMAN1-Knockdown Embryonen zeigten eine veränderte Anordnung der Ventrikel und Atria (in 95% der untersuchten Embryonen; Abb. 5-12A, vergleiche a, b mit c). Zusätzlich zeigten bekannte Strukturen, wie der *Truncus arteriosus* oder die Aortenbögen Fehlbildungen oder erschienen zurückgebildet. Interessanterweise waren die Ventrikel in XMAN1-Knockdown Embryonen stark vergrößert. Im direkten Vergleich mit WT-Hezen, war das Ventrikelvolumen während

der Diastole (Entspannungsphase) durchschnittlich um den Faktor 1,5 höher. Während der Systole (Kontraktionsphase) war das Ventrikelvolumen sogar um das 1,9-fache höher (Abb. 5-12C).

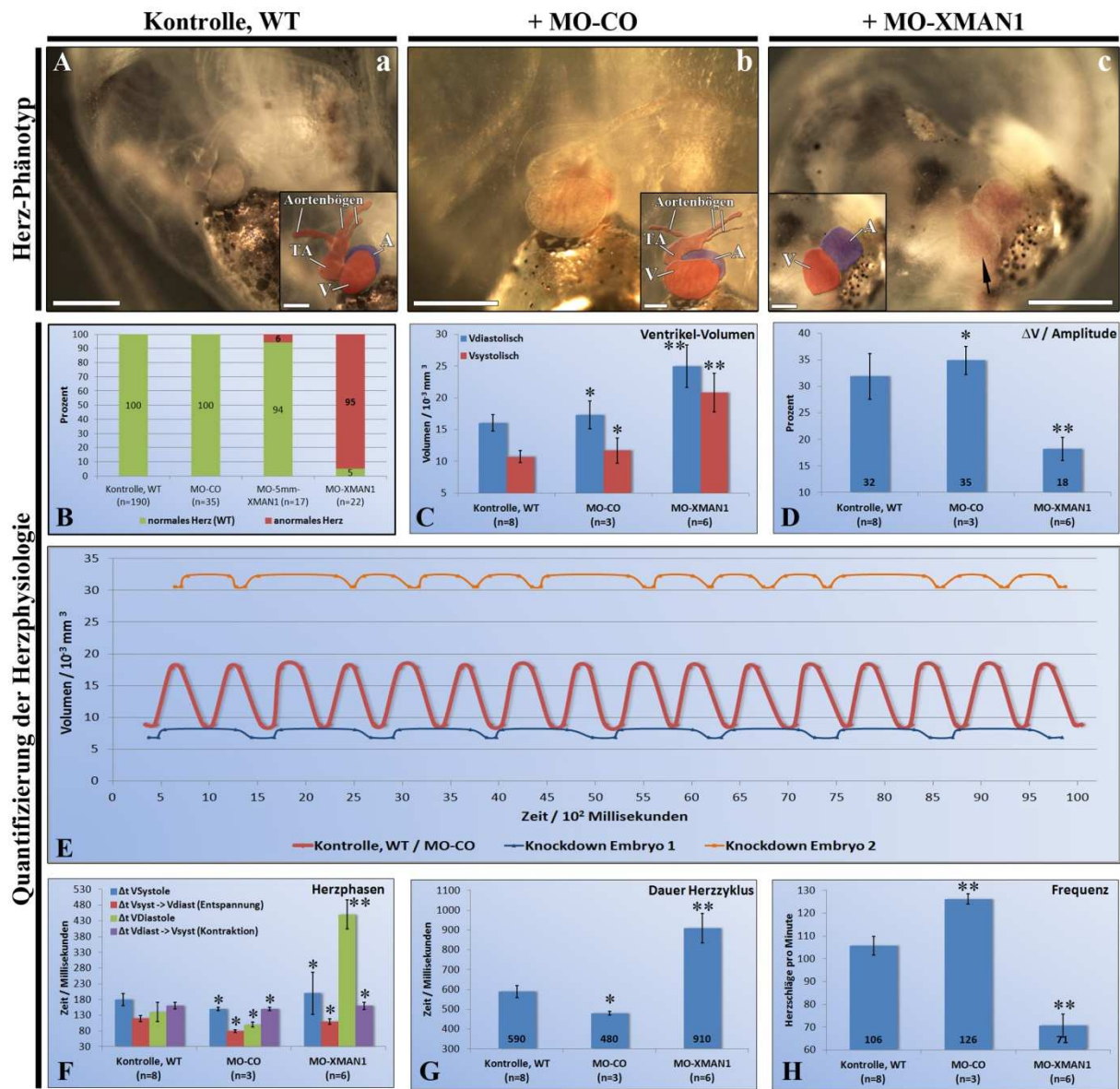


Abbildung 5-12: Der Knockdown von XMAN1 führt zu einer gestörten Herzentwicklung und –physiologie. (A) Stereomikroskopische Aufnahmen der Herzen 6 Tage alter Embryonen. WT- (a) und Kontrollembryonen (b) zeigen die prominente Herz Anatomie. Die Herzen von XMAN1-Knockdown Embryonen zeigen vergrößerte Ventrikel sowie eine veränderte Herz Anatomie (c). Die Vergrößerungen zeigen annotierte Herzstrukturen. A: Atria, TA: *Truncus arteriosus*, V: Ventrikel. Referenzbalken: 500 μ m und 200 μ m (in der Vergrößerung). (B) Quantifizierung der beobachteten Herzphänotypen. Während in Kontrollembryonen hauptsächlich WT-Hezen beobachtet wurden (grün), zeigen XMAN1-Knockdown Embryonen überwiegend morphologisch veränderte Herzen (rot). n: Anzahl der Embryonen. (C-H) Auswertungen verschiedener Herzmerkmale anhand von Videodaten des Herzschlags zeigen Herzrhythmusstörungen in XMAN1-Knockdown Embryonen. Jeder Balken repräsentiert das arithmetische Mittel in Abhängigkeit von der Anzahl der analysierten Embryonen (n). Zahlenwerte an der Basis einzelner Balken stellen die entsprechenden Messdaten dar. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des arithmetischen Mittels. Die ermittelten Unterschiede in Bezug auf WT-Hezen waren statistisch signifikant. Die Signifikanz wurde mittels des Studentischen T-Tests berechnet. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$.

Aufgrund der stark veränderten Ventrikelvolumina zeigten die Ventrikel zudem eine signifikant reduzierte Amplitude. Vergleiche mit WT-Herzen ergaben, dass die Amplitude der vergrößerten Ventrikel um annähernd 47% reduziert war (Abb. 5-12D). Folglich zeigten auch Videos der schlagenden Herzen, dass die Ventrikel durchgehend blutgefüllt erschienen (siehe DVD: Video 1; vgl. auch Abb. 5-12A, c) und eine verminderte Auswurfleistung aufwiesen.

Im Gegensatz zu den XMAN1-Knockdown Embryonen, führten Injektionen mit MO-CO oder MO-5mm-XMAN1 zu einer Entwicklung normaler Herzen (jeweils 100% und 94%; siehe auch Abb. 5-12A, a und b; Video 3).

Neben einer stark veränderten Morphologie der Herzen, zeigte die statistische Auswertung von Videodaten des Herzschlags, schwerwiegende Herzrhythmusstörungen auf (Abb. 5-12E-H). Die Kontraktionen der Ventrikel zeigten entweder unregelmäßige Zeiten (Abb. 5-12E, Morphant 1; Video 1) und/oder eine stark verlängerte Verweildauer in der Diastole (Abb. 5-12E, Morphant 2; Video 2). Quantifizierungen dieser Beobachtungen bestätigten, dass die Ventrikel durchschnittlich 3,9-fach länger benötigten um die Diastole zu durchlaufen (Abb. 5-12F). Folglich war auch die Dauer des gesamten Herzzyklus im Durchschnitt 1,7 Mal länger (Abb. 5-12G). Die Herzen der XMAN1-Knockdown Embryonen zeigten daher auch eine signifikant reduzierte Schlagfrequenz des Herzens. Im Vergleich zu WT-Herzen, war die Frequenz der anormalen Herzen um etwa 40% vermindert (Abb. 5-12H). Vergleichende Beobachtungen an WT-Herzen zeigten dagegen periodisch fortlaufende Wechsel von systolischer und diastolischer Phase (Abb. 5-12E, Kontrolle, WT; Video 3).

Da diese Ergebnisse auf eine beeinträchtigte Entwicklung der Herzmuskelzellen hindeuten, sollte mittels Elektronenmikroskopie die Ultrastruktur der Herzmuskulatur eingehend untersucht werden. Herzmuskelzellen der XMAN1-Knockdown Embryonen zeigten dabei massive zelluläre Fehlorganisationen (Abb. 5-13B-B').

Die Muskelfilamente waren nicht in Sarkomere organisiert, sondern erschienen unorganisiert oder fraktioniert. Diese Fragmente waren zudem willkürlich im Zytoplasma der Zelle verteilt. Darüber hinaus waren die Zellkerne dieser Muskelzellen von einer durchgehenden Doppelmembran der Kernhülle umgeben, welche jedoch lappenartige Ausstülpungen zeigte (Abb. 5-13B). Erwartungsgemäß wurden in Herzmuskelzellen der WT-Herzen Sarkomere beobachtet, welche die übliche bandenförmige Organisation aufwiesen. Ebenso zeigten die Zellkerne eine normale Morphologie (Abb. 5-13A).

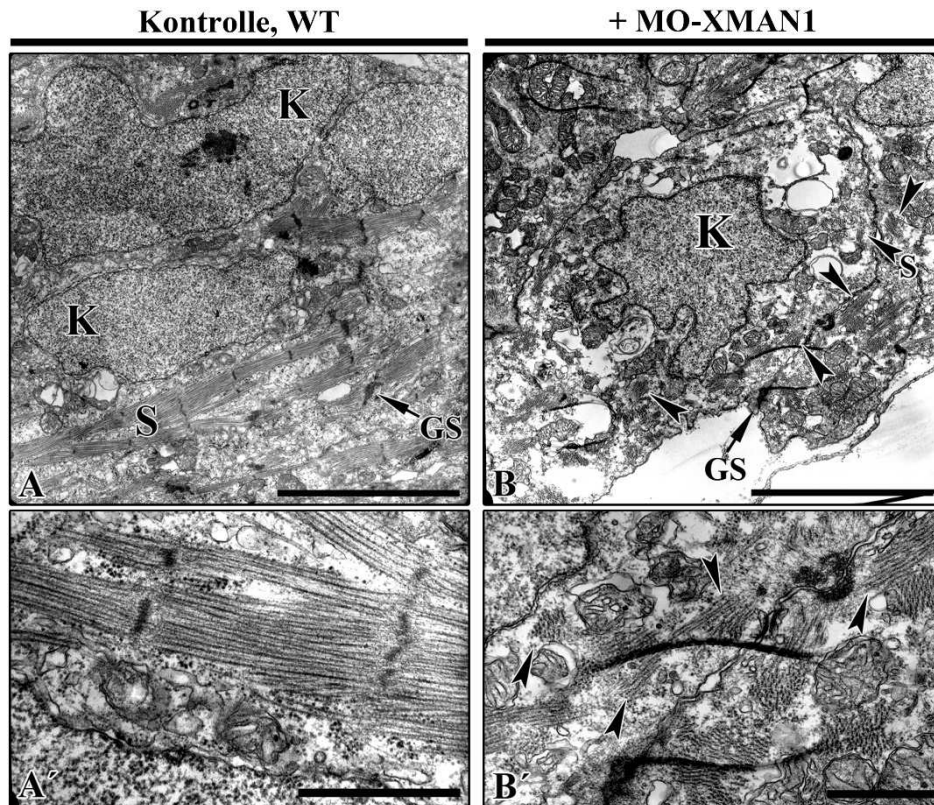


Abbildung 5-13: Veränderte Organisation der Herzmuskelzellen. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von WT-Muskelzellen. (A') Vergrößerung von A. Die Aufnahmen zeigen normal organisierte Sarkomere. (B) XMAN1-Knockdown Embryonen zeigen eine veränderte Organisation der Herzmuskelzellen. Während die Sarkomere fragmentiert erscheinen (Pfeilköpfe), zeigt die Kernhülle des Zellkerns zahlreiche lappenartige Ausstülpungen. (B') Vergrößerung von B. Die Aufnahme stellt Sarkomer-Fragmente dar. GS: Glanzstreifen, K: Zellkern, S: Sarkomere. Referenzbalken: 5 μm (A-B) und 1 μm (A'-B').

5.2.5. Untersuchung der veränderten Herzanatomie

5.2.5.1. Bildgebung mittels NMR-Spektroskopie

Um eine mögliche Beeinträchtigung der Herzentwicklung aufgrund des XMAN1-Knockdowns untersuchen zu können, ist es erforderlich die Anatomie der Herzen näher zu analysieren. Dadurch können Rückschlüsse auf etwaige Änderung im strukturellen Aufbau des Herzens getroffen werden. Eine optimale Beurteilung der Herzanatomie war mit den zur Verfügung stehenden Mitteln (EM-Einbettung/Histologie und Stereomikroskopie) jedoch nur eingeschränkt möglich. Daher mussten alternative Methoden evaluiert werden, um das Herz in seiner gesamten Struktur möglichst nicht-invasiv und dreidimensional darstellen zu können. In diesem Zusammenhang wurde zunächst in Kooperation mit Dr. Volker Behr (Lehrstuhl für Experimentelle Physik V / Biophysik, Physikalisches Institut, Universität Würzburg) die Methode der NMR-Bildgebung gewählt. Aufgrund der Nichtinvasivität und einer theoretischen Auflösungsgrenze von etwa 10 μm erschien diese Methode als optimal.

Zunächst wurden testweise NMR-Messungen anhand von vorbereiteten Kontrollembryonen (6 Tage alt; uninjiziert) an einem Bruker 17,6T (750 MHz) Wide-bore Magnet in Kombination mit einer Bruker AVANCE™ Konsole (Bruker BioSpin GmbH) durchgeführt. Die Messung wurde dabei über einen Zeitraum von 123 Stunden durchgeführt. Daraus resultierend konnte jedoch nur eine Auflösungsgrenze von 26 μm / Pixel erreicht werden (siehe auch 4.7.5.). Trotz dieser geringen Auflösung wurden die erhaltenen Rohdaten mittels der Software Amira ausgelesen um eine 3D-Rekonstruktion des Herzens zu testen (siehe Abb. 5-14; Amira-Parameter können im Anhang unter 8.1.3. eingesehen werden).

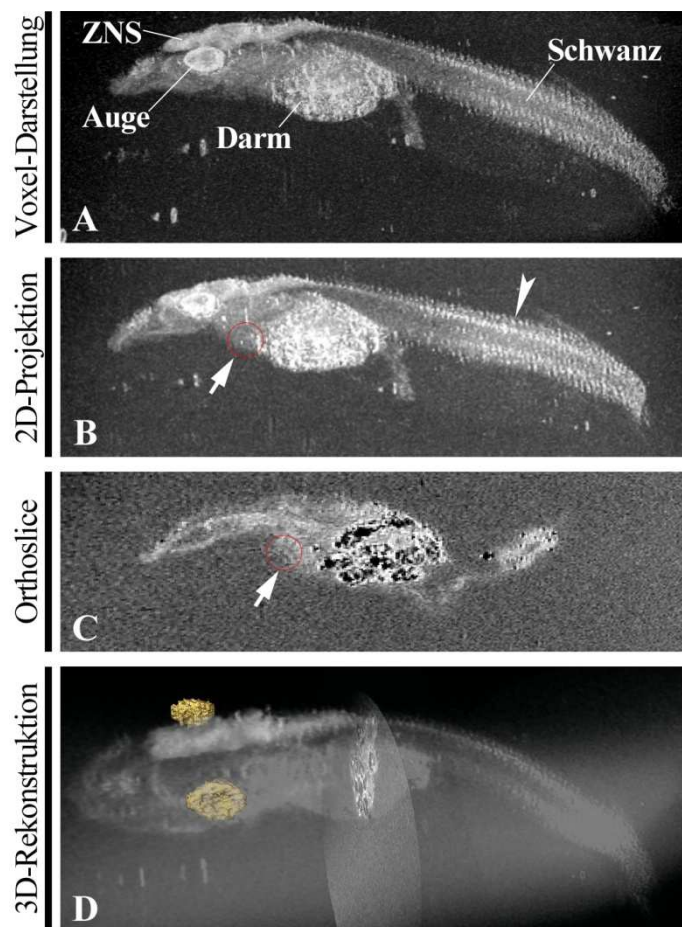


Abbildung 5-14: Bildgebung von *Xenopus* Embryonen (Wild-Typ) mittels NMR-Spektroskopie.

(A) Voxeldarstellung der NMR-Daten, visualisiert mittels Amira. ZNS: Zentrales Nervensystem. (B) Die zweidimensionale Projektion aller Ebenen entlang der Z-Achse durch den Embryo ermöglicht die Identifizierung einzelner Somiten (Pfeilkopf). Im Bereich des Herzens (Pfeil) können aufgrund des geringen Signal/Rausch-Verhältnisses keine bekannten Strukturen identifiziert werden.

(C) Virtueller Sagittalschnitt (Orthoslice) durch den Embryo.

(D) Zum Test durchgeführte dreidimensionale Oberflächenrekonstruktion der Augen.

Anhand der Voxeldarstellung (Voxel = dreidimensionales Pixel) des Datensatzes konnte der Embryo zunächst dreidimensional dargestellt werden (Abb. 5-14A). Dies ermöglichte bereits die Identifizierung bestimmter Organe wie dem Auge, dem Darm oder dem zentralen Nervensystem. In der zweidimensionalen Projektion aller Z-Ebenen war es zudem möglich einzelne Somiten voneinander zu unterscheiden (Abb. 5-14B, Pfeilkopf). Jedoch war dabei sowie in einem virtuellen Sagittalschnitt (Orthoslice) des Embryos ersichtlich, dass die Kontrastierung im Bereich des Herzens zu gering war um das Herz optimal darstellen zu können (Abb. 5-14A und B, Pfeil).

Strukturen wie der Darm oder die Augen boten dagegen genug Kontrast (bzw. ein optimales Signal/Rausch-Verhältnis) um sie von umliegenden Geweben unterscheiden zu können. Dies zeigte sich vor allem in der 3D-Rekonstruktion der Augen (mittels Segmentierungs-Tool in Amira). Diese ließen sich dreidimensional darstellen, sodass einzelne Strukturen wie die Linse erkennbar waren (Abb. 5-14D). Eine dreidimensionale Darstellung des Herzen war aufgrund des geringen Signal/Rausch-Verhältnisses und einer zu geringen Auflösung von 26 µm nicht realisierbar, da das Herzgewebe, sofern korrekt identifizierbar, nicht optimal von umliegendem Gewebe differenziert werden konnte. Auch diverse softwareseitige Variationen der Messparameter konnten zu keiner Verbesserung führen.

5.2.5.2. Bildgebung mittels Immunfluoreszenzlokalisierung

Da die Bildgebung mittels NMR-Spektroskopie keine befriedigenden Resultate zur Beurteilung der Herz Anatomie lieferte, wurde die Methode der Whole mount Immunfluoreszenzlokalisierung (WMIF) gewählt. Diese ermöglicht eine spezifische Markierung bestimmter Proteine, welche ausschließlich im Herzen vorkommen. Hierzu wurde das kardiale Proteine Troponin T gewählt. Dabei handelt es sich um einen herzspezifischen Marker, welcher vorwiegend in der Herzmuskulatur nachweisbar ist. Sechs Tage alte Embryonen wurden zunächst fixiert und mit Antikörpern gegen Troponin T inkubiert. Nach der Inkubation mit entsprechenden Fluorochrom-konjugierter Sekundärantikörpern, wurden die Embryonen mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert und eine Serie (Z-Stack) von 227 Bildern des Herzens aufgenommen. Nach Dekonvolution der Z-Stacks konnten die Herzen mittels einer speziellen Software (Imaris) dreidimensional dargestellt werden (Abb. 5-15). Detaillierte Messparameter können im Anhang unter 8.1.1. eingesehen werden.

Eine dreidimensionale Oberflächenrekonstruktion der Herzen war jedoch aufgrund eines zu geringen Signal/Rausch-Verhältnisses und der Größe der Präparate nicht realisierbar. Dies rührte daher, da der Arbeitsbereich des verwendeten Mikroskop-Objektivs (20x) bestimmten Einschränkungen unterlag. Die Herzen konnten daher nicht vollständig dokumentiert werden, da ihre Größe den Arbeitsbereich des Objektivs deutlich überschritt und in Zonen außerhalb dieses Arbeitsbereichs lediglich Rausch-Signale aufgenommen wurden.

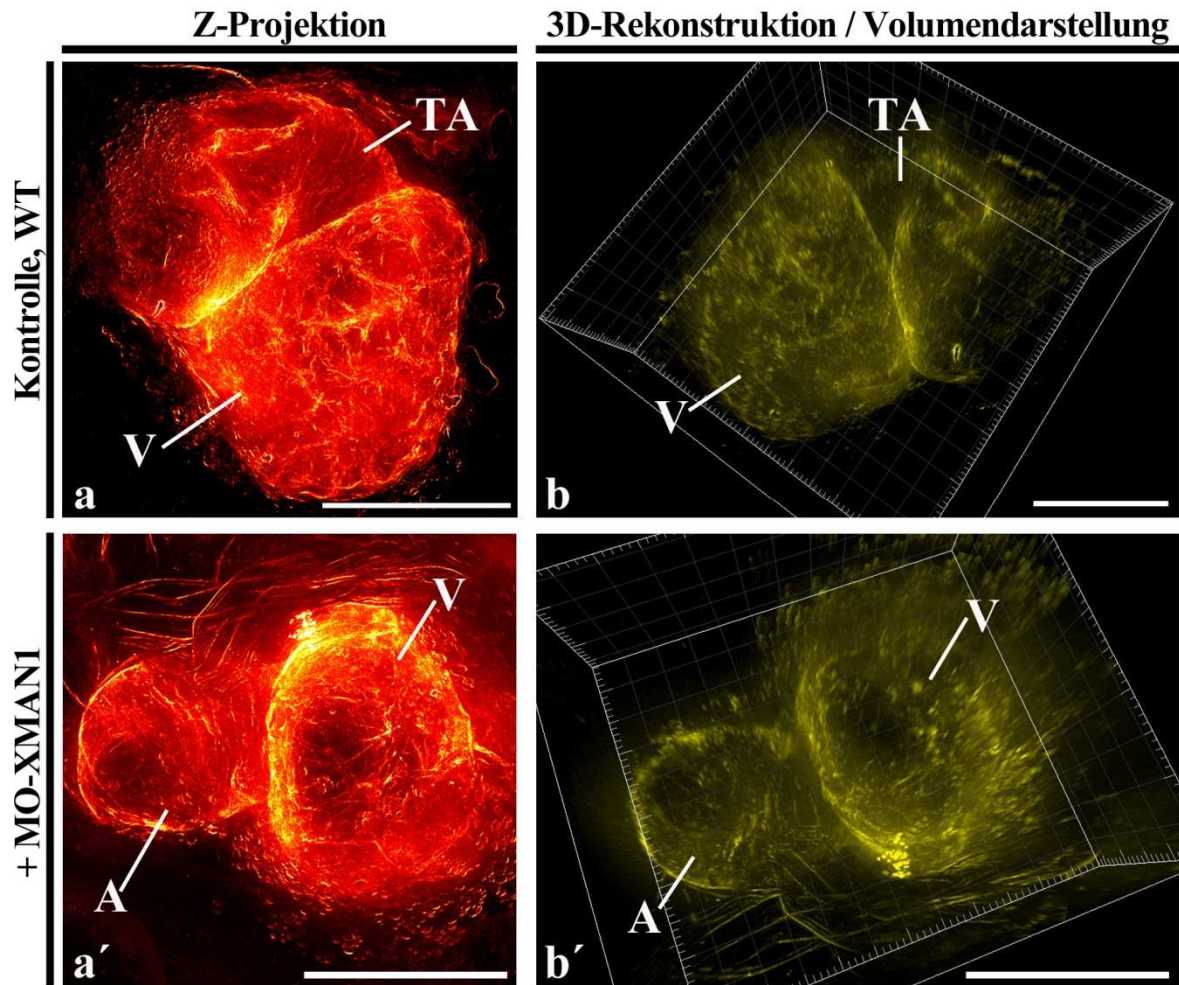


Abbildung 5-15: Bildgebung embryonaler Herzen mittels Immunfluoreszenzlokalisierung. Die Herzen von Kontrollembryonen zeigen sowohl in der Z-Projektion aller Ebenen (**a**) als auch in der dreidimensionalen Volumendarstellung mittels Imaris (**b**) prominente Strukturen wie Ventrikel (V) oder den *Truncus arteriosus* (TA). Referenzbalken: 200µm. Die Herzen der XMAN1-Knockdown Embryonen zeigen dagegen nur Ventrikel (V) oder Atria (A). Herzgefäße können nicht beobachtet werden. Referenzbalken: 200 µm.

Die erhaltenen Daten konnten daher kaum vergleichende Rückschlüsse auf die Herz Anatomie der Kontroll- und Knockdown-Embryonen geben. Animationen der dreidimensionalen Volumendarstellung der Herzen von XMAN1-Knockdown Embryonen zeigten lediglich Strukturen wie Ventrikel und Atrium (siehe Abb. 5-15, a'-b'). Gefäße wie der *Truncus arteriosus* konnten nicht identifiziert werden, da das Signal/Rausch-Verhältnis aufgrund der genannten methodischen Einschränkungen in diesen Bereichen zu gering war. Entsprechende Herzgefäße konnten jedoch in WT-Hezen der Kontrollembryonen identifiziert werden (Abb. 5-15, a-b). Ebenso war der Ventrikel eindeutig identifizierbar. Eine Aussage über die Größe des Ventrikels konnte jedoch nicht getroffen werden, da der Arbeitsbereich des Objektivs vorzeitig endete. Daher war es auch nicht möglich das Atrium zu dokumentieren, da dieses vermutlich in Bereichen hinter dem Ventrikel positioniert war.

5.2.6. Veränderte Expression gewebe-spezifischer Gene als Resultat des XMAN1-Knockdowns

Da der Morpholino-vermittelte Knockdown von XMAN1 drastische Defekte während der Organentwicklung aufzeigte, stellte sich die Frage, ob die verminderten Expressionsniveaus von XMAN1 Auswirkungen auf die Transkription bestimmter Gene haben. Hierzu wurden RT-PCR-Analysen anhand von isolierter Gesamt-RNA verschiedener Embryonalstadien durchgeführt (siehe 4.2.1. und 4.2.5.). Dabei wurden die Expressionsniveaus von Genen untersucht, von denen bekannt war, dass sie an der Differenzierung von Geweben und der Entwicklung von Organen beteiligt sind (Abb. 5-16).

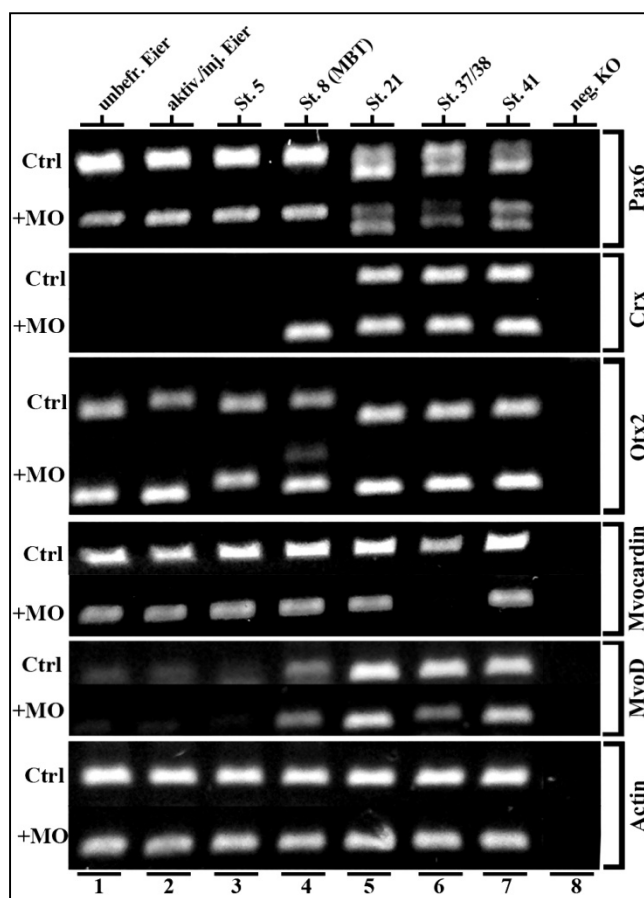


Abbildung 5-16: RT-PCR-Untersuchung der Expression gewebe-spezifischer Gene nach Knockdown von XMAN1 in verschiedenen Embryonalstadien. Augen-spezifische Gene: *pax6*, *crx* und *otx2*. Muskel- und Herz-spezifische Gene: *myoD* und *myocardin*. Die Expression von *actin* wurde als Ladekontrolle untersucht. Als interne Negativkontrolle (neg. KO) diente cDNA, welche ohne die Verwendung der RT-Polymerase synthetisiert wurde. Die Analyse der Amplifikate erfolgte anhand von 1%igen Agarosegelen. Ctrl: uninjizierte Kontrollembryonen. +MO: MO-XMAN1-injizierte Embryonen. St: Stadium.

Die Untersuchung Augen-spezifischer Gene in XMAN1-Knockdown Embryonen zeigte, dass *pax6* (paired box transcription factor 6) eine leicht reduzierte Expression zwei Tage nach Befruchtung aufwies (Abb. 5-16, erste Reihe, Stadium 37/38). Der Transkriptionsfaktors *crx* (cone-rod homeobox) zeigten dagegen eine verfrühte Expression zum Zeitpunkt der Midblastulatransition (Abb. 5-16, zweite Reihe). Zum selben Zeitpunkt zeigten Untersuchungen des Expressionsmusters des Kopf- und Augen-spezifischen

Transkriptionsfaktors *otx2* (orthodenticle homeobox 2) ein zusätzliches Amplifikat mit einer Größe von etwa 580 bp (Abb. 5-16, dritte Reihe). Normalerweise waren *otx2*-Amplifikate bei einer Größe von annähernd 360 bp detektierbar. Sequenzierungen dieses zusätzlichen Amplifikats sowie Sequenz-Vergleiche durch BlastN-Alignment mit der WT-Sequenz zeigten, dass es sich dabei um eine inserierte Sequenz handelte, welche von den 3'- und 5'-Sequenzen von *otx2* flankiert wurde (siehe Abb. 5-17). Dies lässt vermuten, dass es sich bei diesem Amplifikat um eine ungespleißte oder fehlerhaft gespleißte Variante von *otx2* handelt.

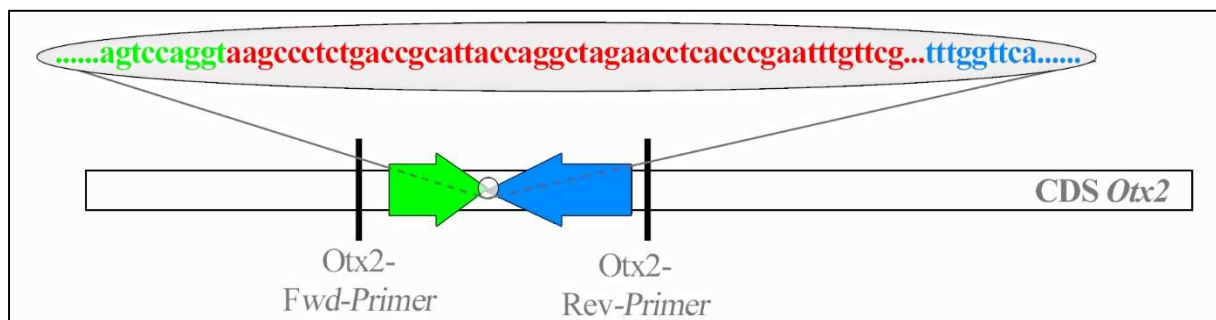


Abbildung 5-17: Schematische Darstellung der Sequenzierung des alternativen *otx2*-Amplifikats. Die Sequenzierung erfolgte mit denselben Forward (Fwd)- und Reverse (Rev)-Primern, welche bereits in der RT-PCR verwendet wurden. Grün: Sequenzierung mittels Fwd-Primer. Blau: Sequenzierung mittels Rev-Primer. Rot: Darstellung der inserierten Nukleotidsequenz der ersten 50 Nucleotide, die durch Sequenzierung mittels Fwd-Primer identifiziert wurde. CDS: kodierende Sequenz von *otx2*.

RT-PCR Analysen von Muskel-spezifischen Genen zeigten, dass *myocardin* (ein für Herzmuskeln und glatte Muskeln spezifischer Transkriptions-Koaktivator von SRF [Serum response factor]) sowie *myoD* (Myogenic factor 3) eine signifikant reduzierte Expression bei Stadium 37/38 aufwiesen (Abb. 5-16, vierte und fünfte Reihe). Als Ladekontrolle wurde die Expression von *actin* in XMAN1-Knockdown- sowie uninjizierten Kontrollembryonen untersucht. Dabei konnte eine konstante Expression von *actin* während der Embryonalentwicklung beobachtet werden (Abb. 5-16, letzte Reihe).

Da anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen eine reduzierte Anzahl an Sarkomeren in Skelettmuskelzellen der Knockdown Embryonen ersichtlich war, wurde die Expression von *myosin* untersucht, welches ebenfalls in Sarkomeren vertreten ist. RT-PCR Untersuchungen ergaben dabei, dass Expressionssignale für *myosin* während den ersten Furchungsteilungen reduziert waren, sich aber ab der Midblastulatransition wieder auf WT-Niveau normalisierten (Daten nicht gezeigt, siehe auch Tab. 5-1).

Analysen weiterer gewebespezifischer Gene, welche für die korrekte Entwicklung der Augen und der Muskulatur notwendig sind (siehe Tab. 5-1), ergaben hingegen keine Unterschiede in ihrer Expression zwischen XMAN1-Knockdown- und Kontrollembryonen.

	unbefr.	aktiv.	16-Zell	MBT	1dpf	2dpf	3dpf	neg. KO	Gen	
Ctrl	+	+	+	+	+	+	+	-	Pax6	Aug-spezifische Gene
+MO	+	+	+	+	+/-	-	+	-		
Ctrl	-	-	-	-	+	+	+	-	Crx1	
+MO	-	-	-	+	+	+	+	-		
Ctrl	+	+	+	+	+	+	+	-	Otx2	
+MO	+	+	+	++ (*)	+	+	+	-		
Ctrl	-	-	-	-	+	+	+	-	Nrl	
+MO	-	-	-	-	+	+	+	-		
Ctrl	+	+	+	+	+	+	+	-	Kermit	
+MO	+	+	+	+	+	+	+	-		
Ctrl	-	-	-	+/-	+	+	+	-	MyoD	Muskel-spezifische Gene
+MO	-	-	-	+/-	+	-	+	-		
Ctrl	+/-	-	+/-	+	+	+	+	-	Myosin	
+MO	-	-	-	+	+	+	+	-		
Ctrl	-	-	-	+/-	+	+	+	-	Skeletal Aktin	
+MO	-	-	-	+/-	+	+	+	-		
Ctrl	-	-	-	+	+	+	+	-	Desmin	
+MO	-	-	-	+	+	+	+	-		
Ctrl	+	+	+	+	+	+	+	-	Myocardin	Herz-/Muskel-spezifische Gene
+MO	+	+	+	+	+	-	+	-		
Ctrl	-	-	-	-	+	+	+	-	Popdc2	
+MO	-	-	-	-	+	+	+	-		
Ctrl	+	+	+	+	+	+	+	-	Cardiac Aktin	
+MO	+	+	+	+	+	+	+	-		
Ctrl	+	+	+	+/-	-	-	-	-	XMAN1	Lade - Kontrolle
+MO	+	+	+	+/-	-	-	-	-		
Ctrl	+	+	+	+	+	+	+	-	XH3	
+MO	+	+	+	+	+	+	+	-		
	unbefr.	aktiv.	16-Zell	MBT	1dpf	2dpf	3dpf	neg. KO	Gen	

Tabelle 5-1: Übersicht aller mittels RT-PCR untersuchten gewebespezifischen Gene. Farblich hervorgehobene Zellen, stellen die Expressionsniveaus der entsprechenden Gene dar. Grün: Normale Expression. Gelb: Leicht verminderte Expression. Orange: stark verminderte Expression. Rot: Kein Nachweis eines Amplifikats und somit negative Expression. Ctrl: uninjizierte Kontrollembryonen, +MO: MO-XMAN1-injizierte Embryonen, ++ (*): zusätzliches Amplifikat.

5.3. Überlappende Funktionen von XMAN1 und Xemerin während der Organentwicklung

5.3.1. Ektopische Expression von Xemerin mittels Mikroinjektion von Xemerin-mRNA

Es wird vermutet, dass LEM-Domänen Proteine redundante oder überlappende Funktionen besitzen, die für Entwicklungsprozesse in Vertebraten essentiell sind. Beispielsweise zeigen die LEM-Domänen Proteine LEM2 und Emerin in Mauszellen teilweise überlappende Funktionen während der Myogenese bei der Regulation des ERK-Signalwegs (Huber et al., 2009). Frühere Studien konnten darüber hinaus zeigen, dass Emerin und MAN1 überlappende Funktionen in *C. elegans* Embryonen besitzen, welche für die Trennung der Chromosomen und die Zellteilung von Bedeutung sind (Liu et al., 2003). Ebenso konnte demonstriert werden, dass MAN1 und Emerin Interaktionen mit gemeinsamen Proteinen, wie Transkriptionsfaktoren (bsp. GCL, Btf) und Laminen eingehen. Insbesondere der sog. Barrier-to-Autointegration Factor (BAF) zeigt eine hohe Affinität zu diesen beiden Proteinen (Mansharamani und Wilson, 2005). Daher kann spekuliert werden, dass MAN1 und Emerin während bestimmter Signalwege redundante Funktionen besitzen und Xemerin möglicherweise in der Lage ist den Morpholino-vermittelten Knockdown von XMAN1 zu kompensieren (vgl. Abschnitt 5.2.).

In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass Emerin erst während der späten *Xenopus* Embryogenese exprimiert wird (Gareiss et al., 2005). Daher ist es möglich die Hypothese der überlappenden Funktionen beider Proteine zu überprüfen, indem die Expression von Xemerin in XMAN1-Knockdown Embryonen induziert wird.

Daher sollte *in vitro* synthetisierte mRNA, welche für Xemerin codiert, in befruchtete Embryonen injiziert werden. Um die Synthese der Xemerin-mRNA zu gewährleisten wurde die codierende Sequenz des Isotyps Xemerin1 in den Vektor pCMV-Sport6 kloniert. Das Plasmid wurde anschließend mittels enzymatischem Verdau durch *EcoRI* linearisiert und die „capped“ Poly(A) mRNA mit dem T7 mMESSAGE mMACHINE Kit sowie dem Poly(A)-Tailing Kit hergestellt. Nach Aufreinigung und photometrischer Bestimmung der Konzentration, konnte die mRNA zur Mikroinjektion verwendet werden (Abb. 5-18).

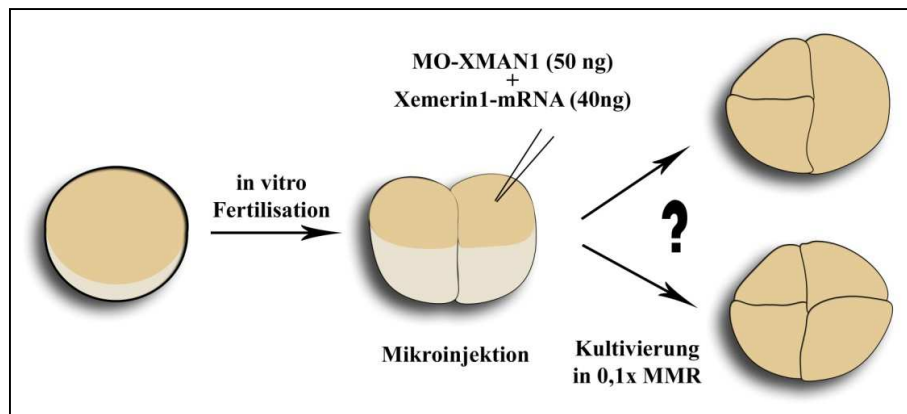


Abbildung 5-18: Schematische Darstellung der durchgeführten Rescue-Experimente mittels Mikroinjektion von MO-XMAN1 und Xemerin1-mRNA in eine Blastomere befruchteter Embryonen.

In den nachfolgenden Rescue-Experimenten, wurden Embryonen während des 2-Zell-Stadiums mit 50 ng MO-XMAN1 sowie 40 ng Xemerin1-mRNA injiziert. Wie bereits erwähnt wurde, ist Xemerin in WT-Embryonen normalerweise erst ab Stadium 41 nachweisbar. Daher war es möglich die ektopische Expression von Xemerin nach Injektion der mRNA in vorhergehenden Stadien (<41) mittels Immunblot zu verifizieren (Abb. 5-19).

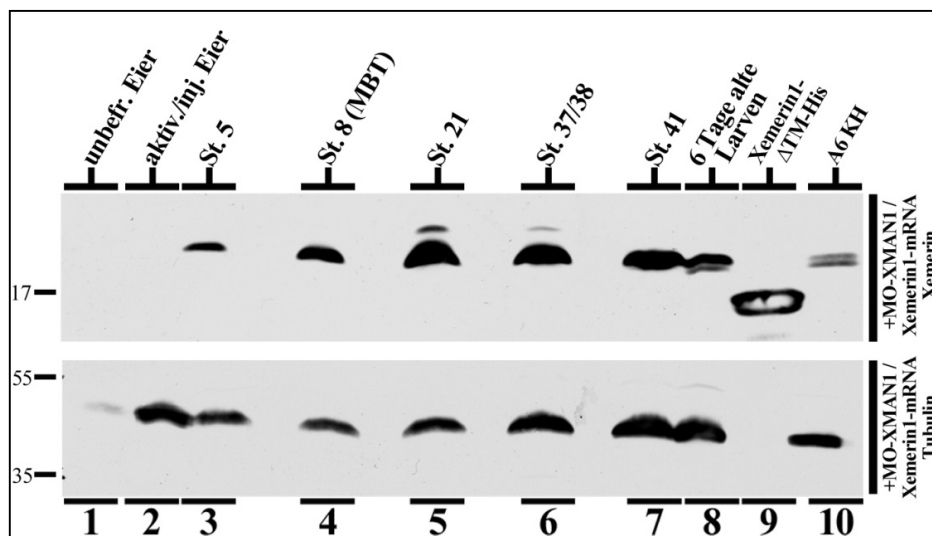


Abbildung 5-19: Untersuchung der ektopischen Expression von Xemerin nach Mikroinjektion der codierenden mRNA in befruchtete Embryonen. Proteinextrakte von 5 unbefruchteten Eiern (Spur 1), aktivierten Eiern (Spur 2), Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien (Spuren 3-8), 500 ng des rekombinanten His-getagten Xemerin (ohne Transmembrandomäne, Xemerin1ΔTM-His, Spur 9) sowie 5×10^6 Kernhüllen aus A6-Zellen (Spur 10) wurden mittels 18% SDS-PAGE separiert und auf eine Nitrocellulose transferiert. Nach Inkubation mit Xemerin-spezifischen Antikörpern, konnte Xemerin anhand spezifischer Banden mit einem Molekulargewicht von etwa 24 kDa in allen Entwicklungsstadien ab Stadium 5 nachgewiesen werden (obere Reihe). Als interne Ladekontrolle wurde die Nitrocellulose zusätzlich mit Antikörpern gegen Tubulin inkubiert (untere Reihe). Tubulin ist dabei in allen Entwicklungsstadien mit gleichbleibender Intensität nachweisbar. Die molekularen Massen der Markerproteine sind in kDa angegeben. St: Stadium.

Dabei konnte Xemerin bereits ab Stadium 5 detektiert werden. Die Expressionsniveaus blieben während der weiteren Embryogenese weitgehend konstant (Abb. 5-19, obere Reihe, Spuren 3-8). Als interne Ladekontrolle wurde die Nitrocellulose zusätzlich mit Tubulin-spezifischen Antikörpern inkubiert. Tubulin war dabei in jedem Entwicklungsstadium mit gleichbleibender Intensität nachweisbar (Abb. 5-19, untere Reihe).

Um die erwartete Lokalisation des ektopisch exprimierten Xemerin in der Kernhülle zu überprüfen, wurden Quetschpräparate von zwei Tage alten Embryonen angefertigt, die zuvor mit MO-XMAN1 und der Xemerin1-mRNA injiziert wurden. Mittels Immunfluoreszenz wurde schließlich die Verteilung von Xemerin und XMAN1 verifiziert (Abb. 5-20).

Zunächst wurde die Lokalisation von XMAN1 in Kontrollembryonen untersucht. Die Zellkerne uninjizierter Kontrollembryonen zeigten dabei anhand der prominenten Färbung der Kernperipherie, dass XMAN1 in der Kernhülle lokalisiert (Abb. 5-20, c, Pfeile). Dies verdeutlicht, dass mittels embryonaler Quetschpräparate die Lokalisation von Kernhüllproteinen erfolgreich nachgewiesen werden kann. Nach Injektion von MO-XMAN1 und der Xemerin1-mRNA konnte keine Färbung für XMAN1 in der Kernhülle nachgewiesen werden (Abb. 5-20, c'). Dies verdeutlicht, dass es in den injizierten Embryonen zu einem effektiven Knockdown von XMAN1 kam.

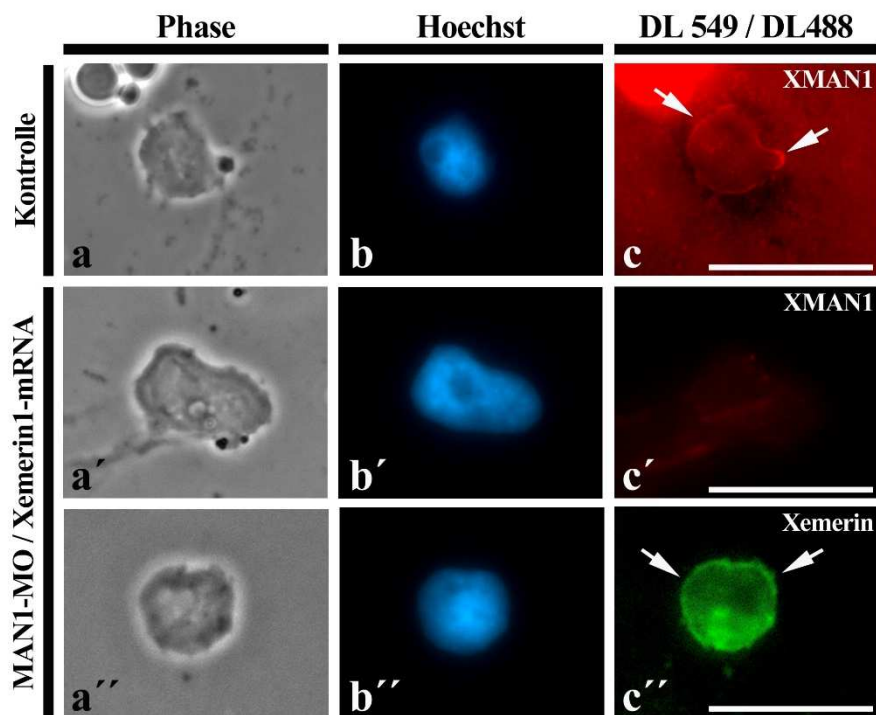


Abbildung 5-20: Untersuchung der Lokalisation von XMAN1 und Xemerin in Zellkernen anhand von Quetschpräparaten zwei Tage alter Kontroll (a-c) und injizierter Embryonen (a'-c'). Zellkerne uninjizierter Kontrollembryonen zeigen eine XMAN1-spezifische Färbung im Bereich der Kernhülle (c, Pfeile), welche nach Knockdown von XMAN1 nicht mehr nachweisbar ist (c'). Die Zellkerne der injizierten Embryonen zeigen eine randständige Lokalisation von Xemerin in der Kernhülle (c'', Pfeile). Referenzbalken: 10 µm.

Jedoch konnte anhand der Untersuchung der Xemerin-Verteilung in injizierten Embryonen eine spezifische Färbung der Kernhülle beobachtet werden (Abb. 5-20, c'', Pfeile). Dies bestätigt zum einen die erfolgreiche Expression von Xemerin und zum anderen, dass das Protein in die Kernhülle integriert wurde. Im nächsten Schritt wurden die Phänotypen der injizierten Embryonen in Bezug auf die Augen-, Somiten- und Herz-Entwicklung eingehend untersucht.

5.3.2. Die ektopische Expression von Xemerin führt zu einem Rescue der Augen-Entwicklung

Während der Knockdown von XMAN1 zu Defekten während der Augen-Entwicklung führte, entwickelte die Mehrheit der Rescue-Embryonen sowohl in der uninjizierten als auch in der injizierten Seite Augen (Abb. 5-21, a-c, Pfeile). Ein Teil der Embryonen wies dabei zwei WT-Augen auf (18%) wobei der Großteil der Embryonen verkleinerte Augen in der injizierten Seite zeigte (56%). Nur ein kleiner Teil der Rescue-Embryonen war nicht in der Lage Augen zu bilden (26%). Darüber hinaus scheint im direkten Vergleich mit XMAN1-Knockdown Embryonen eine normale Pigmentierung der injizierten Seite stattgefunden zu haben (vgl. Abb. 5-4, b' mit Abb. 5-21, b).

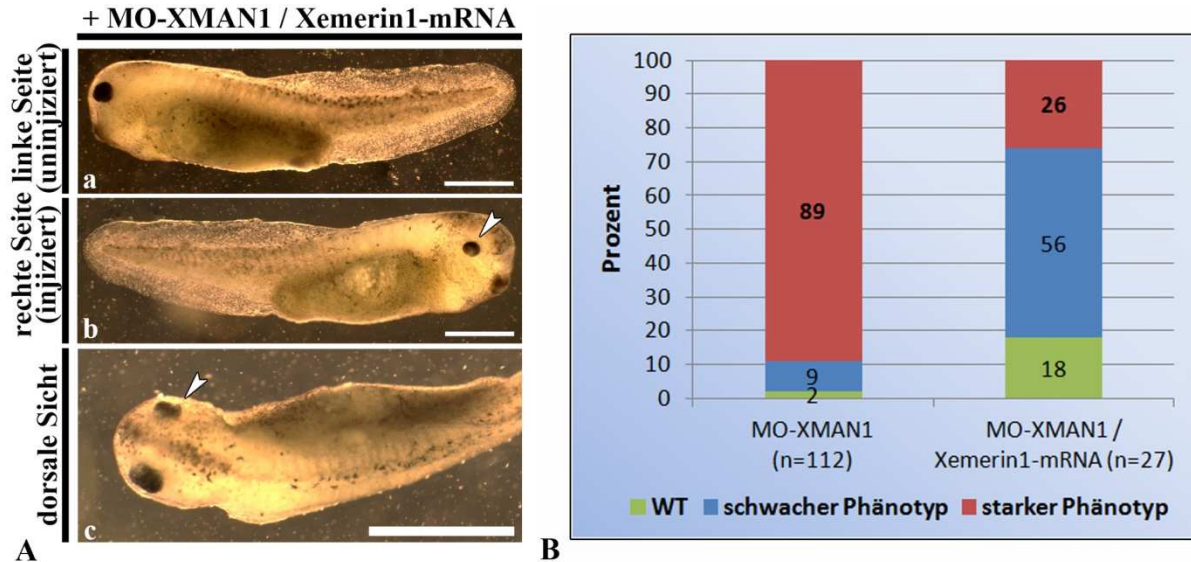


Abbildung 5-21: Die ektopische Expression von Xemerin führt zu einem Rescue der Augen-Entwicklung. (A) Stereomikroskopische Aufnahmen drei Tage alter Embryonen nach Injektion mit MO-XMAN1 und Xemerin1-mRNA. Es konnte ein Rescue der Augenbildung innerhalb der injizierten Seite erreicht werden (b-c, Pfeile). Referenzbalken: 1mm. (B) Quantifizierung der entsprechenden Phänotypen. Die Rescue-Embryonen waren in der Lage zwei WT-Augen (grün) oder verkleinerte Augen (blau) zu bilden. Nur wenige Embryonen zeigten kein Auge in der injizierten Seite (rot). n: Anzahl der Embryonen.

Histologische Gewebeschnitte durch Kopfstrukturen der Rescue-Embryonen zeigten ein leicht verkleinertes Auge innerhalb der injizierten Seite (Abb. 5-22A, Pfeil). Die allgemeine Morphologie dieses Auges war jedoch nicht von WT-Augen (Pfeilkopf) zu unterscheiden, was auf eine normale Anatomie des Auges hindeutet.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der retinalen Ultrastruktur zeigten eine normale Organisation der Retina beider Augen (Abb. 5-22B, a-b).

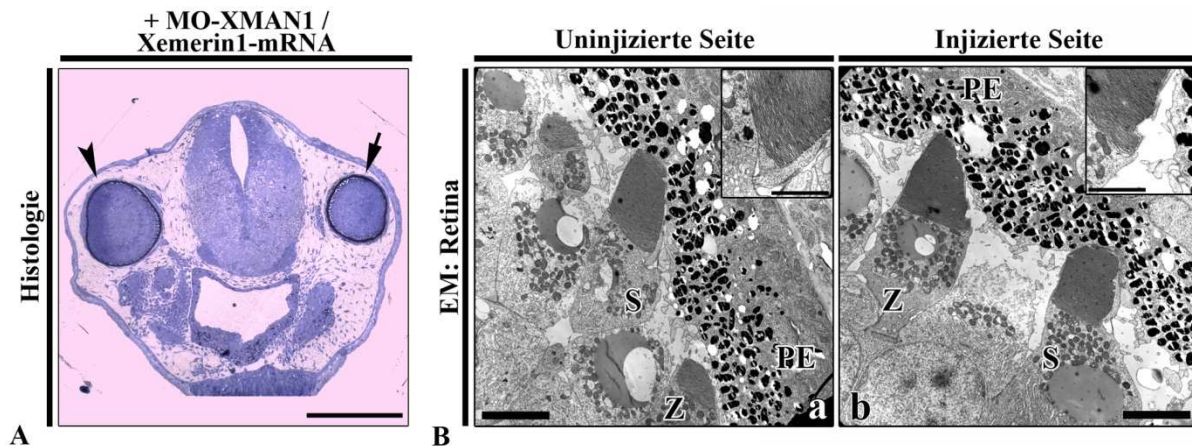


Abbildung 5-22: Morphologische Untersuchung des Augen-Phänotyps anhand von Rescue-Embryonen. (A) Methylen-Blau gefärbte Gewebeschnitte der Kopfstruktur. Beide Augen zeigten eine normale Morphologie. Referenzbalken: 250 µm. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Auges der injizierten Seite (b) zeigen eine im Vergleich zu WT-Augen (a) normale Organisation der Retina. PE: Pigmentepithel, S: Stäbchen, Z: Zapfen. Referenzbalken: 5 µm und 2 µm (in der Vergrößerung).

5.3.3. Xemerin1 ermöglicht eine partielle Bildung der Somiten

Neben der normalen Entwicklung der Augen, wurde die Bildung der Somiten in Rescue-Embryonen untersucht. Im Gegensatz zu XMAN1-Knockdown Embryonen, wurden Embryonen beobachtet, welche in beiden Seiten Somiten gebildet hatten (37%). Davon zeigte der Großteil der Embryonen (26%) einen schwach ausgeprägten Phänotyp, der anhand geradlinig geformter oder dünnerer Somiten identifiziert wurde (Abb. 5-31A, b, Pfeil). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Bildung der Somiten nur teilweise wiederhergestellt werden konnte. Dennoch waren 2/3 aller Rescue-Embryonen nicht in der Lage Somiten in der injizierten Seite auszubilden.

Anhand von Whole mount Immunfärbungen sollte die partielle Entwicklung der Somiten untersucht werden (Abb. 5-23C). Dabei wurde eine Somiten-spezifische Färbung innerhalb der injizierten Seite beobachtet, welche jedoch von der uninjizierten Seite sowie von Kontrollembryonen abwich. Die Färbungen erschienen sehr schwach und geradlinig in ihrer Form (Abb. 5-23C, b', Pfeil).

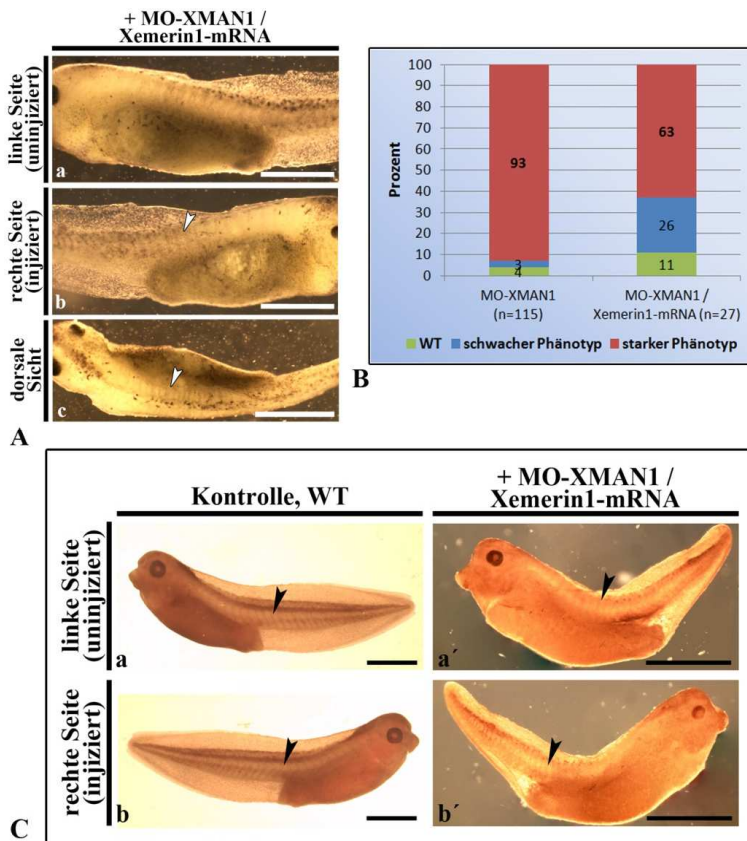


Abbildung 5-23: Xemerin ermöglicht eine partielle Bildung der Somiten. (A) Stereomikroskopische Bilder von Embryonen drei Tage nach Injektion mit MO-XMAN1 und Xemerin1-mRNA. Die Somitenbildung wurde teilweise wiederhergestellt (b-c, Pfeile). Referenzbalken: 1mm. (B) Quantifizierung der beobachteten Phänotypen. Mehr als ein Drittel der Embryonen war in der Lage Somiten in beiden Seiten zu bilden (grün und blau). Jedoch zeigte die Mehrheit der Embryonen eine fehlerhafte Somitenbildung (rot). n: Anzahl der Embryonen. (C) Whole mount Immunlokalisierung von Desmin in Rescue-Embryonen. Die injizierte Seite zeigt eine signifikante, jedoch geradlinige Färbung der Somiten (b', Pfeil). Referenzbalken: 1mm.

Die Morphologie der Somiten wurde anhand histologischer Transversalschnitte der Schwanzextremität (Abb. 5-24A) sowie mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Skelettmuskulatur analysiert (Abb. 5-24B).

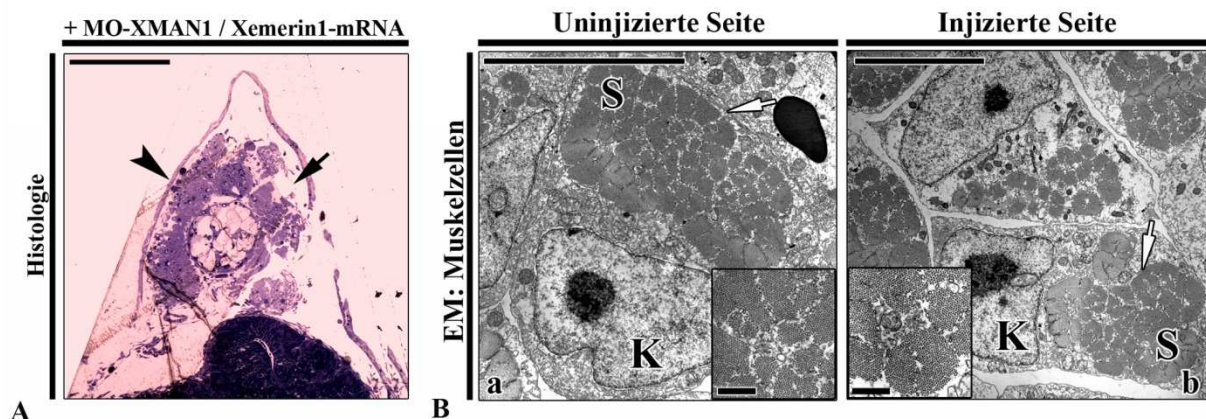


Abbildung 5-24: Morphologische Untersuchung der Somiten in Rescue-Embryonen. (A) Methylblau gefärbte Transversalschnitte der Schwanzextremität. Die injizierte Seite beinhaltet zahlreiche unterbrochene Muskelstrukturen (Pfeil). Referenzbalken: 250 µm. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Skelettmuskulatur. Zellen der injizierten Seite (b) zeigen im Vergleich zu WT-Zellen (a) eine normale Organisation. K: Zellkern, S: Sarkomere. Referenzbalken: 10 µm und 1 µm (in der Vergrößerung).

Dabei konnte bestätigt werden, dass es in der injizierten Seite zu einer teilweise normalen Bildung von Muskelstrukturen kam (Abb. 5-24A, Pfeil). Die Somiten hatten sich gebildet, erschienen jedoch vergleichsweise fragmentiert. Dennoch zeigten elektronenmikroskopische Untersuchungen dieser Zellen im Vergleich zu Muskelzellen der uninjizierten Seite eine ausschließlich normale Organisation (vergleiche Abb. 5-24B, a und b).

5.3.4. Die ektopische Expression von Xemerin führt zu einem Rescue der Herz-Entwicklung

Die hier dargestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass Xemerin die Bildung der Skelettmuskulatur ermöglicht. Daher lag die Vermutung nahe, dass Xemerin ebenfalls den Verlust von XMAN1 während der Herzentwicklung kompensieren kann. Demzufolge wurden die Herzen 6 Tage alter Rescue-Embryonen näher untersucht (Abb. 5-25).

Der Großteil der Rescue-Embryonen zeigte eine normale Anatomie der Herzen, welche von WT-Herzen nicht zu unterscheiden war (vergleiche Abb. 5-25A, a und b mit c). Während die Ventrikel in der Diastole nur leicht um den Faktor 1,4 vergrößert erschienen, war die Ventrikelgröße während der Systole weitgehend unverändert (Abb. 5-25C). Aufgrund des erhöhten diastolischen Ventrikelvolumens, wurde eine 1,6-fach erhöhte Amplitude des Herzschlags ermittelt (Abb. 5-25D).

Die Auswertung von Videodaten des Herzschlags zeigten im Vergleich zu WT-Herzen weitgehend normale Herzzyklen (Abb. 5-25E; siehe auch DVD: Videos 3, 4 und 5). Die Herzzyklen waren dabei durch periodisch fortlaufende Wechsel zwischen systolischer und diastolischer Phase charakterisiert (Abb. 5-25E, Rescue-Embryonen 1 und 2).

Obwohl die Herzen der Rescue-Embryonen eine durchschnittlich leicht verlängerte diastolische Phase aufwiesen (Abb. 5-25F), zeigten die meisten Herzen übliche diastolische Zeiten zwischen 100 und 130 Millisekunden (WT-Herzen: 80-140 Millisekunden). Daher war auch die Dauer des gesamten Herzzyklus dem der WT-Herzen annähernd identisch (Abb. 5-25G). Demzufolge konnte in Rescue-Embryonen auch eine unveränderte Schlagfrequenz des Herzens beobachtet werden (Abb. 5-25H).

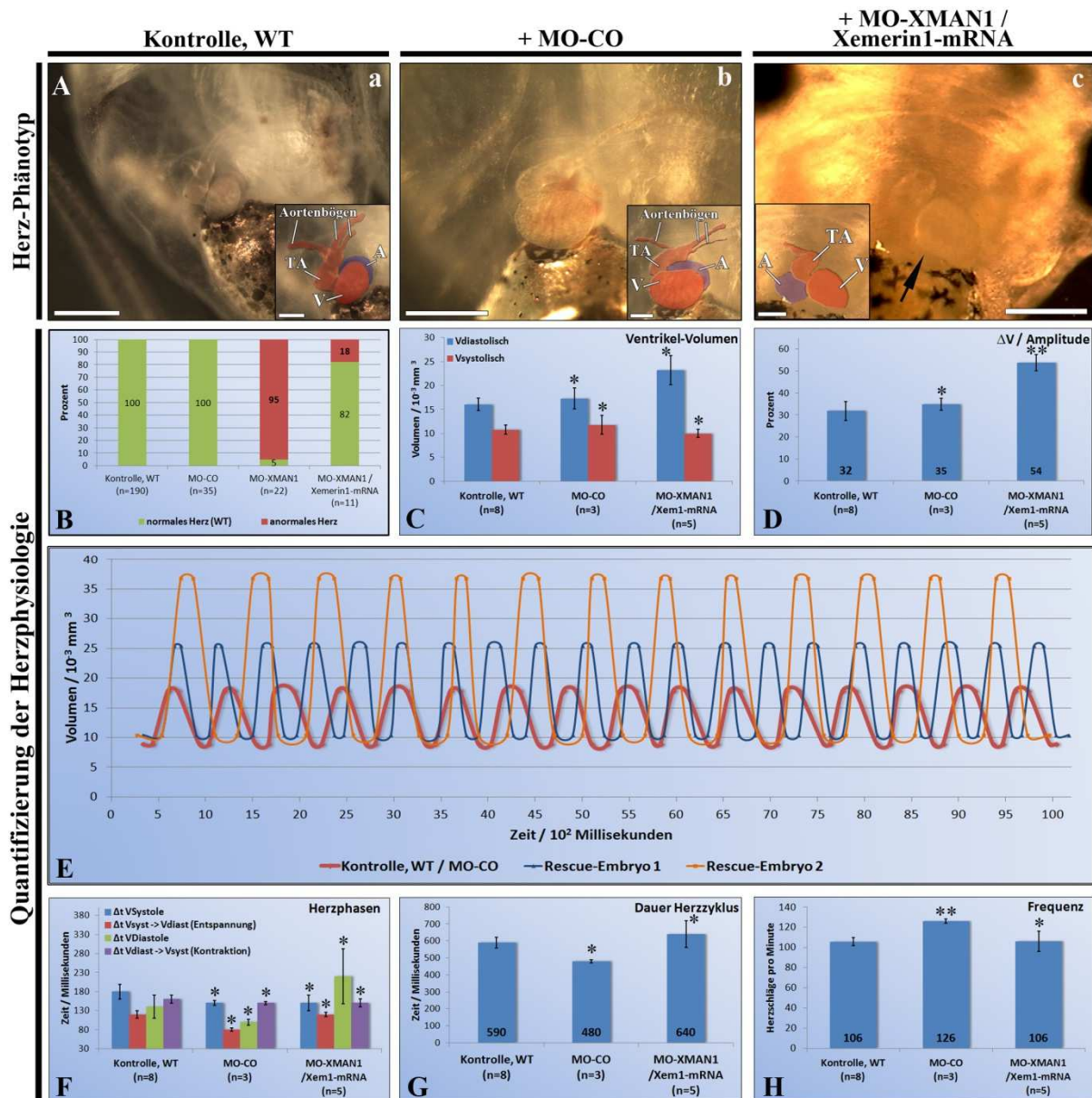


Abbildung 5-25: Die ektopische Expression von Xemerin führt zu einem Rescue der Herz-Entwicklung. (A) Stereomikroskopische Aufnahmen der Herzen 6 Tage alter Embryonen. Im Allgemeinen zeigen alle Embryonen (WT, MO-CO-injiziert und Rescue-Embryonen) eine normale Anatomie des Herzens. Die Vergrößerungen zeigen annotierte Herzstrukturen. A: Atria, TA: *Truncus arteriosus*, V: Ventrikel. Referenzbalken: 500 μm und 200 μm (in der Vergrößerung). (B) Quantifizierung der Herz-Phänotypen. Die Mehrheit der Rescue-Embryonen entwickelte normale Herzen (grün). (C-H) Auswertung verschiedener Herzmerkmale anhand von Videodaten des Herzschlags zeigen eine weitgehend normale Physiologie der untersuchten Embryonen. Jeder Balken repräsentiert das arithmetische Mittel in Abhängigkeit der Anzahl der analysierten Embryonen (n). Zahlenwerte an der Basis einzelner Balken stellen die entsprechenden Messdaten dar. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des arithmetischen Mittels. Die ermittelten Unterschiede in Bezug auf WT-Hezen waren statistisch signifikant. Die Signifikanz wurde mittels des Studentschen T-Tests berechnet. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$.

Untersuchungen der Ultrastruktur kardialen Muskelzellen ergab zudem, dass Rescue-Embryonen morphologisch normal organisierte Herzmuskelzellen zeigten (Abb. 5-26A). Ebenso konnte wie bei WT-Hezen eine gleichförmige Organisation der Sarkomere beobachtet werden (Abb. 5-26B), welche bereits durch Analyse von WT-Hezen bekannt war.

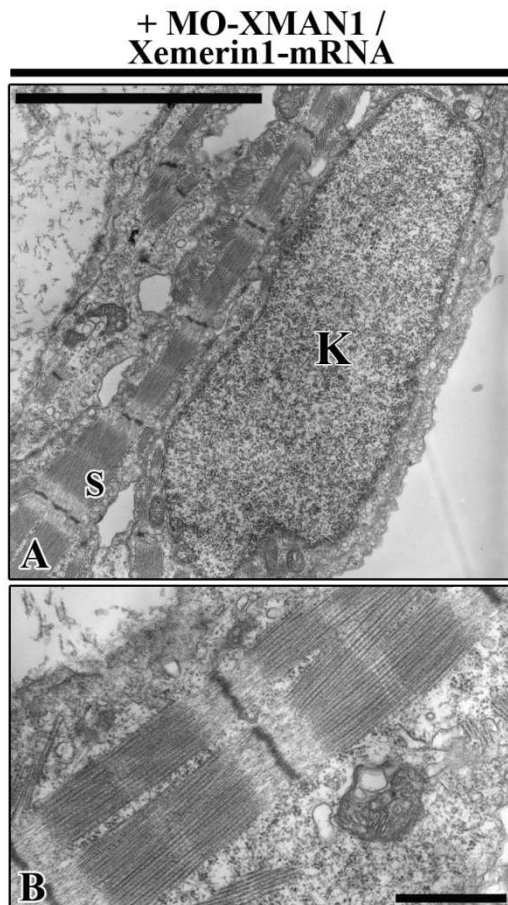


Abbildung 5-26: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Herzmuskelzellen in Rescue-Embryonen zeigen eine normale Organisation (A). K: Zellkern, S: Sarkomere. Referenzbalken: 5 μm .

(B) Vergrößerung von A. Die Aufnahmen zeigen normal organisierte Sarkomere. Referenzbalken: 1 μm .

5.4. Protein-Protein-Interaktionen von Kernhüllproteinen in somatischen Zellen

5.4.1. Interaktionen von XMAN1 und Xemerin Interphasekernen

Wie bereits erwähnt, wurde in vorhergehenden Untersuchungen gezeigt, dass XMAN1 und Xemerin während der Zellteilung überlappende Funktionen besitzen. Abgesehen davon wurde zudem postuliert, dass beide Proteine die Möglichkeit besitzen miteinander Interaktionen auszubilden. Eine *in vitro* Interaktion zwischen XMAN1 und Xemerin konnte bereits in früheren Studien mittels Co-Immunpräzipitation dokumentiert werden (Gareiss, 2006). Bisher konnten jedoch keine Aussagen darüber getroffen werden, ob Interaktionen beider Proteine möglicherweise auch in der Zelle stattfinden. Daher wurden die Interaktionen beider Proteine mittels der Methode des Proximity-Ligation-Assays (PLA) untersucht. Diese Methode kombiniert dabei klassische immunologische Ansätze mit molekularbiologischen Techniken der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Um die Epitope der zu untersuchenden Proteine spezifisch detektieren zu können, mussten die verwendeten Primärantikörper zunächst affinitätsgereinigt vorliegen. Hierzu wurden bakteriell exprimierte und aufgereinigte Fusionsproteine an eine Matrix aus Nickel-NTA-Agarose immobilisiert und mit den

entsprechenden Antikörpern inkubiert. Nach Elution des Antikörpers, wurde dessen optimale Arbeitsverdünnung anhand einer Immunfluoreszenzlokalisierung auf *Xenopus* A6-Zellen ermittelt (Daten nicht gezeigt).

Der hier angewendete PLA wurde auf A6-Zellen durchgeführt. Wie in Abbildung 5-27 dargestellt, wurde als Kontrollansatz die bereits bekannte Interaktion des Kernmembranproteins LAP2 mit den Laminaproteinen Lamin A/B1 untersucht.

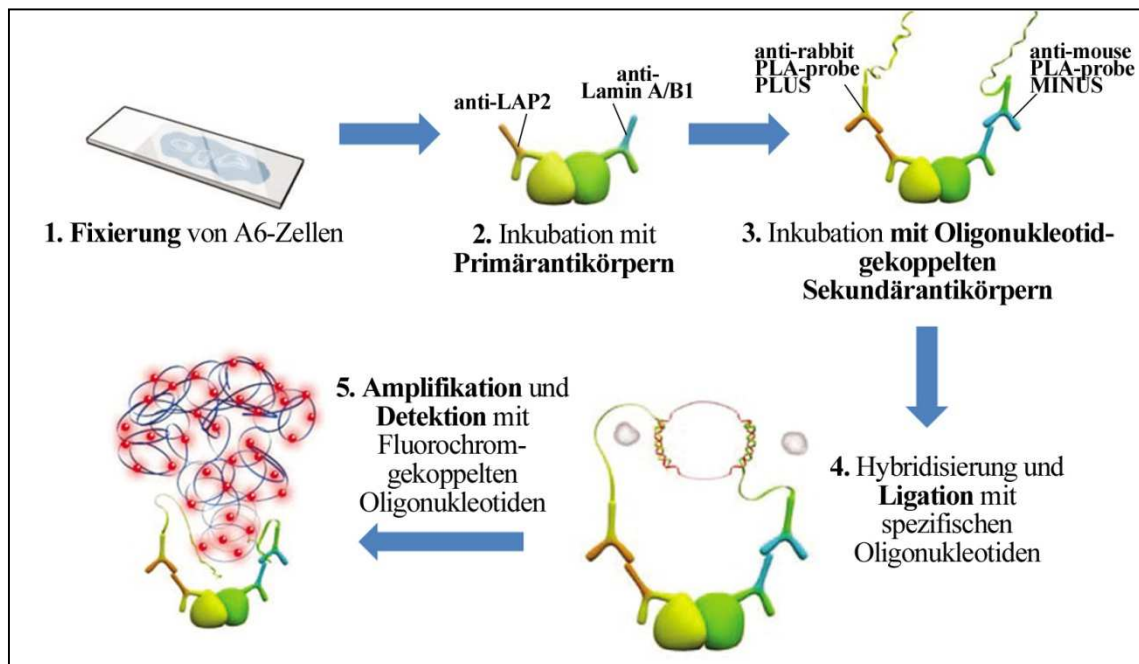


Abbildung 5-27: Schematische Darstellung des angewandten Proximity-Ligation-Assays zur Untersuchung von XLAP2/LaminA,B1-Interaktionen. (Abbildungen modifiziert nach www.olink.com)

Nach Fixierung der Zellen und Detektion der Epitope mit entsprechenden Primärantikörpern wurden die Proben mit spezifischen Oligonukleotid-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. Nach Hybridisierung mit spezifischen Oligonukleotiden erfolgte die Ligation zu einem ringförmigen DNA-Template. Dieses wurde anschließend molekularbiologisch amplifiziert und das naszierende Amplifikat mittels Fluorochrom-gekoppelter Oligonukleotide detektiert (vgl. Abb. 5-27). Die mit einem Fluoreszenzmikroskop beobachteten PLA-Signale repräsentierten dabei jeweils eine einzelne Protein-Protein-Interaktion. Positive PLA-Signale können nur dann generiert werden, wenn die Epitope der zu untersuchenden Proteine einen maximalen Abstand von etwa 30-40 nm zueinander aufweisen. Zur besseren Orientierung bei Untersuchung der intrazellulären Lokalisation der PLA-Signale, wurden die Zellen zusätzlich mittels Tubulin-spezifischer Antikörper gegengefärbt.

Um die Interaktionen zwischen XMAN1 und Xemerin untersuchen zu können, musste das klassische PLA-Protokoll abgewandelt werden, da der Hersteller des Reaktionskits eine

Detektion primärer Meerschweinantikörper (hier anti-XMAN1, gp1) bis dato nicht unterstützte (siehe Abb. 5-28). Daher war es erforderlich den XMAN1-Antikörper direkt mit Oligonukleotid-Armen zu koppeln. Der so modifizierte PLA-Ansatz wurde daher mit lediglich drei Antikörpern durchgeführt (siehe Abb. 5-28, unten).

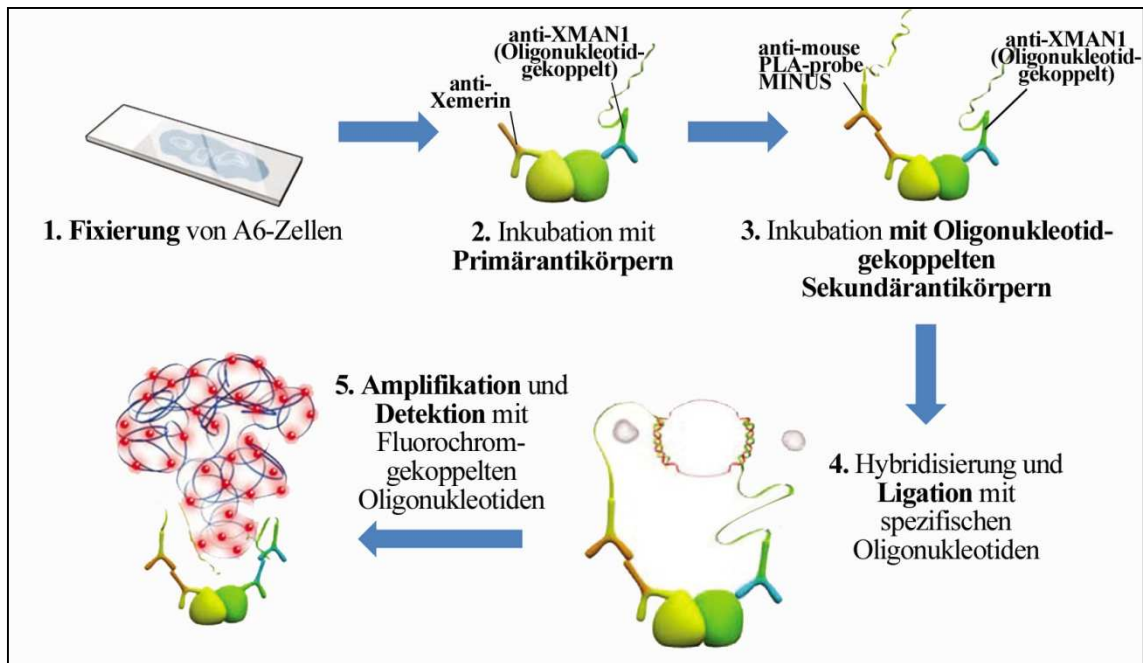


Abbildung 5-28: Schematische Darstellung des angewandten Proximity-Ligation-Assays zu Untersuchung von Interaktionen zwischen XMAN1 und Xemerin. (Abbildungen modifiziert nach www.olink.com)

Die Auswertung beider PLA-Ansätze (XLAP2/XlaminA/B1 und XMAN1/Xemerin) wurde zunächst mit Hilfe eines konventionellen Fluoreszenzmikroskops durchgeführt (Abb. 5-29).

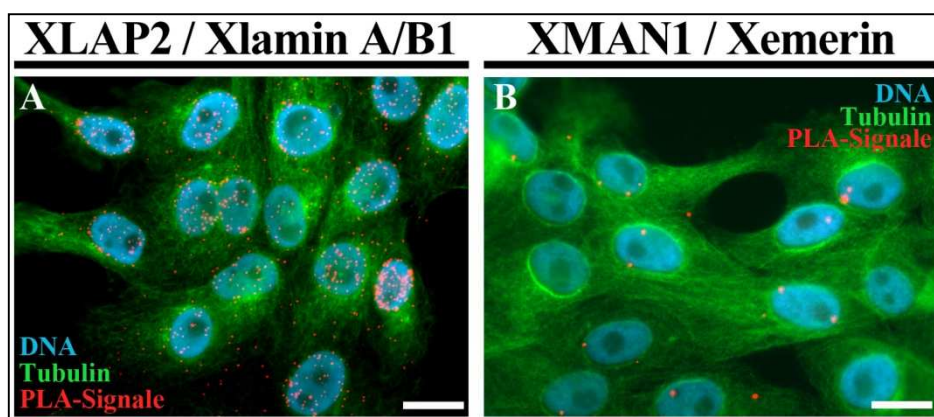


Abbildung 5-29: Interaktionen von XLAP2 / XlaminA/B1 und XMAN1 / Xemerin visualisiert mittels PLA. (A) Immunfluoreszenzaufnahmen der PLA-Signale, welche auf Interaktionen zwischen XLAP2 und XlaminA/B1 hindeuten. Die Signale sind vorwiegend im Bereich der Zellkerne identifizierbar. (B) Immunfluoreszenzaufnahmen der PLA-Signale aufgrund der Interaktion von XMAN1 und Xemerin. Es zeigen sich nur vereinzelte Signale im Randbereich der Zellkerne. Referenzbalken: 10 μ m.

Erwartungsgemäß wurden die Interaktionen zwischen XLAP2 und XlaminA/B1 vorwiegend im Bereich der Zellkerne beobachtet (Abb. 5-29A). Im Falle von XMAN1 und Xemerin konnten nur vereinzelte PLA-Signale im Randbereich des Zellkerns oder vereinzelt auch im Zytoplasma identifiziert werden. Da pro Zellkern überwiegend nur ein PLA-Signal beobachtet wurde, lag die Vermutung nahe, dass die Interaktionen zwischen XMAN1 und Xemerin im Bereich des Centrosoms lokalisiert sind. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Zellen in separaten PLA-Ansätzen mit einem Antikörper gegen das Centrosom-spezifische γ -Tubulin gefärbt. Jedoch konnte eine Lokalisation der PLA-Signale in Bereichen des Centrosoms nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Wie bereits erwähnt wurde, können PLA-Signale nur dann detektiert werden, wenn sich die Epitope der zu untersuchenden Proteine innerhalb eines Abstands von 30-40 nm zueinander befinden. Dabei ist die durchschnittliche Größe der verwendeten Antikörper von etwa 7 nm bereits berücksichtigt. Bei der hier modifizierten PLA-Methode wurde der XMAN1-Antikörper zur Untersuchung der XMAN1/Xemerin-Interaktionen direkt Oligonukleotid-gekoppelt und somit kein Sekundärantikörper zur Detektion verwendet (vgl. Abb. 5-28). Daher lag die Vermutung nahe, dass der methodisch maximal zugelassene Abstand von 40 nm überschritten wurde. Aus diesem Grund wurde der PLA-Ansatz einer erneuten Modifizierung unterzogen und die primären Xemerin-Antikörper ebenfalls direkt mit Oligonukleotiden konjugiert (siehe Abb. 5-30).

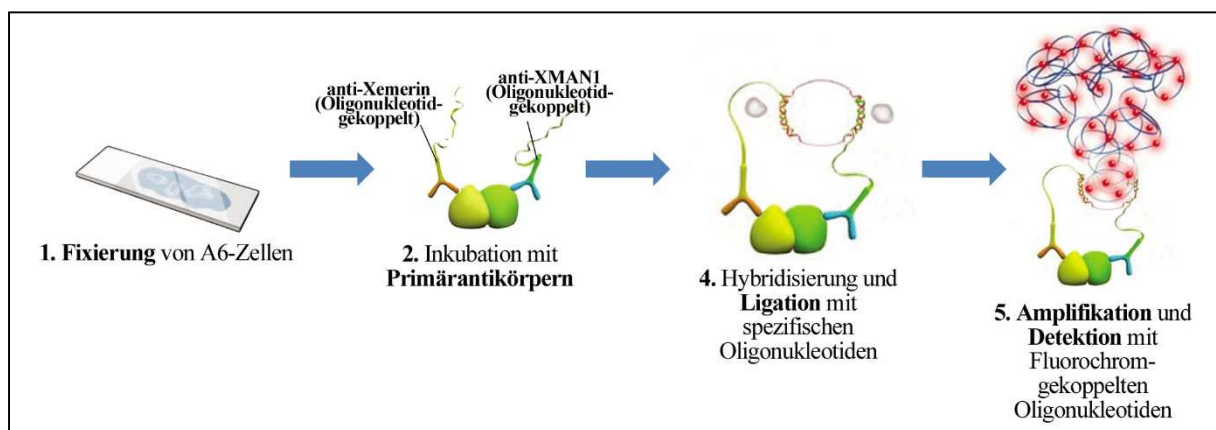


Abbildung 5-30: Schematische Darstellung des modifizierten Proximity-Ligation-Assays zur Untersuchung von XMAN1/Xemerin-Interaktionen. (Abbildungen modifiziert nach www.olink.com)

Wie in Abbildung 5-30 ersichtlich ist, wurde der PLA-Ansatz demzufolge mit nur zwei gekoppelten Primärantikörpern durchgeführt. Es wurde vermutet, dass sich der Abstand der Oligonukleotide zueinander dadurch reduzierte und es zu einer erfolgreichen Hybridisierung und Ligation zum ringförmigen DNA-Template kommt.

Der PLA-Ansatz zu Untersuchung der Interaktion von XLAP2 und XlaminA/B1 blieb unverändert. Da die detektierten PLA-Signale vorwiegend im Bereich des Kerns jedoch kaum im Zytoplasma lokalisierten, wurden die Zellen in den folgenden PLA-Ansätzen mit einem Kernhüll-spezifischen Marker gegengefärbt (hier gegen den Lamin-B-Rezeptor; LBR). Dadurch konnte die Lokalisation der PLA-Signale innerhalb des Kerns genauer erfasst werden.

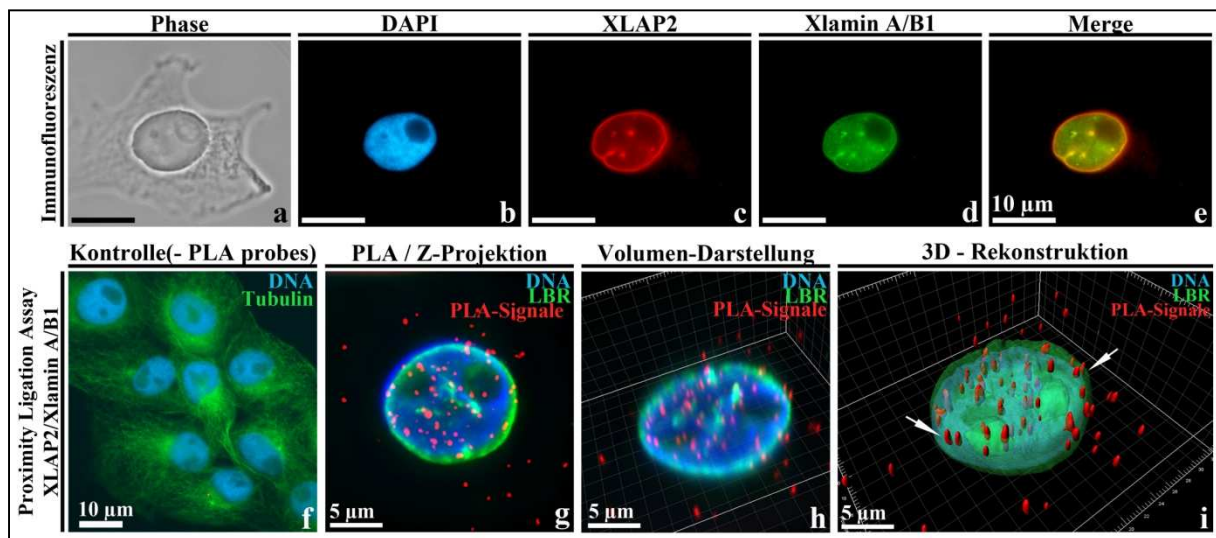


Abbildung 5-31: Intrazelluläre Lokalisation von XLAP2 und XlaminA/B1 sowie dreidimensionale Darstellung der Interaktionen beider Proteine. (a-e) Immunfluoreszenzlokalisierung von XLAP2 und XlaminA/B1. Entsprechende Färbungen zeigen eine randständige Lokalisation beider Proteine im Bereich der Kernhülle. Signale für XlaminA/B1 können zudem im Nukleoplasma beobachtet werden. Referenzbalken: 10 µm. (f) Negativkontrollen ohne Verwendung Oligonukleotid-konjugierter Sekundärantikörper zeigen keinerlei PLA-Signale. (g-i) PLA-Signale in Interphasekernen, welche auf Interaktionen von XLAP2 und XlaminA/B1 hindeuten. Die Z-Projektion aller Bildebenen (g) zeigt, dass die Signale vorwiegend im Kern und teilweise auch außerhalb lokalisiert sind. Die dreidimensionale Oberflächenrekonstruktion des Kerns (i) zeigt, dass die Interaktionssignale in der Kernhülle lokalisiert sind (Pfeile).

Zunächst wurde die intrazelluläre Verteilung von XLAP2 und XlaminA/B1 mittels konventioneller Doppel-Immunfluoreszenzlokalisierung untersucht (Abb. 5-31, a-e). Beide Proteine zeigten dabei eine vorwiegend ringförmige Fluoreszenz in der Peripherie der Interphasekerne (c - e). Neben Fluoreszenzsignalen im Randbereich des Kerns wurde XlaminA/B1 zudem im Nukleoplasma der Kerne detektiert (d). Anhand der PLA-Signale wurden Interaktionen zwischen XLAP2 und XlaminA/B1 vor allem im Bereich des Kerns und vereinzelt auch außerhalb des Kerns beobachtet (Abb. 5-31, g). Da die PLA-Signale in mehreren Ebenen entlang der räumlichen Z-Achse lokalisierten, war es notwendig die Zellkerne dreidimensional darzustellen.

Hierzu wurden mit einem speziellen Fluoreszenzmikroskop Bilderserien entlang der Z-Achse durch den Kern aufgenommen (Z-Stacks, 150 Bilder, Abstand je 100 nm). Nach

Dekonvolution der Z-Stacks (Abb. 5-31, g) wurden diese mittels der Software Imaris dreidimensional als Volumen-/Voxeldarstellung visualisiert und eine Oberflächenrekonstruktion durchgeführt (Abb. 5-31, h-i). Detaillierte Messparameter können im Anhang unter 8.1.1. eingesehen werden. Die 3D-Rekonstruktionen zeigten daraufhin, dass die PLA-Signale vorwiegend in Bereichen zwischen dem Chromatin (blau) und der Kernhülle (grün, Marker LBR) lokalisierten. Erwartungsgemäß deutet dies auf XLAP2/XlaminA/B1-Interaktionen in nukleoplasmatischen Bereichen nahe der inneren Kernhülle hin. PLA-Signale, die außerhalb des Kerns anzutreffen waren, lagen überwiegend in einer Ebene vor. Dies deutet daher auf unspezifische Signale auf dem Deckglas hin.

Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von XMAN1 und Xemerin zeigten anhand ringförmiger Färbungen, dass beide Proteine in der Kernhülle lokalisieren (Abb. 5-32, c-e).

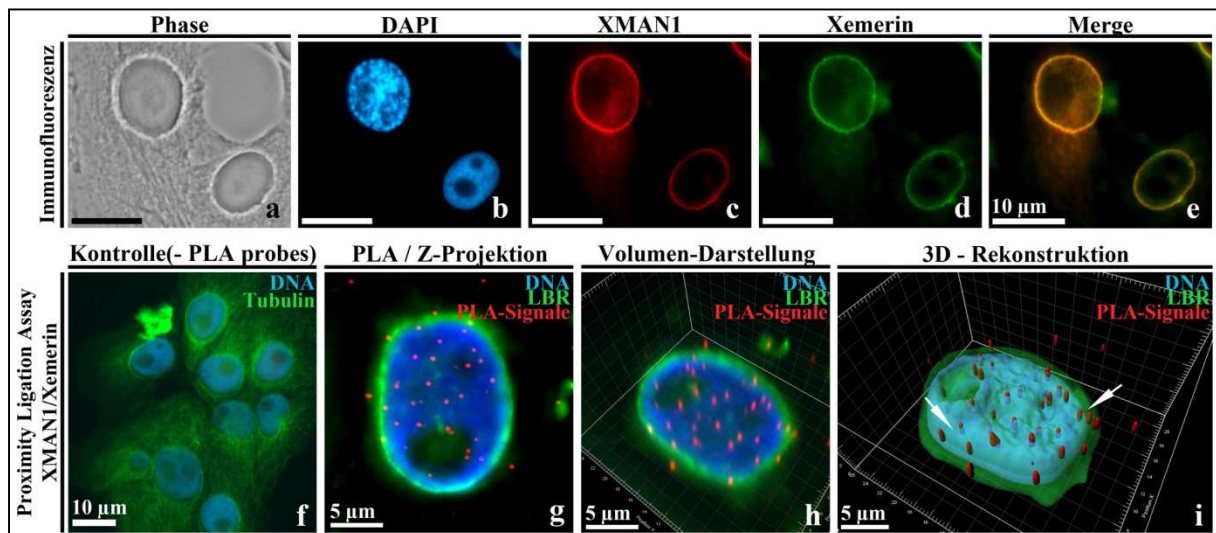


Abbildung 5-32: Intrazelluläre Lokalisation von XMAN1 und Xemerin sowie dreidimensionale Darstellung der Interaktionen beider Proteine. (a-e) Immunfluoreszenzlokalisierung von XMAN1 und Xemerin. Entsprechende Färbungen zeigen eine randständige Lokalisation beider Proteine im Bereich der Kernhülle. Referenzbalken: 10 μ m. (f) Negativkontrollen ohne Verwendung Oligonukleotid-konjugierter Antikörper zeigen keinerlei PLA-Signale. (g-i) Interphasekerne zeigten anhand der Z-Projektion (g) eine Lokalisation der PLA-Signale für XMAN1 und Xemerin im Kern. Die dreidimensionale Oberflächenrekonstruktion des Kerns (i) zeigt eine Lokalisation der XMAN1/Xemerin-Interaktionssignale im Bereich der Kernhülle (Pfeile).

Nach Modifizierung der PLA-Experimente (vgl. Abb. 5-30) zur Untersuchung der XMAN1/Xemerin-Interaktionen wurde eine Zunahme der Anzahl der PLA-Signale im Bereich des Zellkerns beobachtet (vgl. Abb. 5-29B und 5-32, g). Die 3D-Rekonstruktionen der Zellkerne zeigten ein vergleichbares Bild, wie für XLAP2 und XlaminA/B1 beobachtet wurde: Da die PLA-Signale überwiegend im Bereich der Kernhülle lokalisiert waren, kann angenommen werden, dass auch XMAN1 und Xemerin im Bereich der Kernhülle von Interphasekernen miteinander Interaktionen ausbilden (Abb. 5-32, h-i).

5.4.2. Interaktionen zwischen XLAP2 und XlaminA/B1 während der Mitose

Der Zellkern unterliegt während der Mitose zahlreichen morphologischen Änderungen. Dies beginnt mit der Kondensation der Chromosomen zu Beginn der Mitose sowie dem sukzessiven Abbau der Kernhülle. Deren integrale Proteine und Membranbestandteile werden dabei auf die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) verteilt. Nach Trennung der Schwesterchromatiden während der Anaphase beginnt sich die Kernhülle erneut zu bilden, indem zunächst die ER-Membranen mittels integraler Proteine an das Chromatin gebunden werden. Diese Membranen fusionieren daraufhin, wodurch die Chromosomen erneut von einer durchgehenden Kernhülle umgeben werden (zur Übersicht siehe Schooley et al., 2012). Es stellte sich daher die Frage, wie sich die Interaktionen zwischen XMAN1 und Xemerin während der Mitose verhalten und ob diese bestehen bleiben. Um hierzu eine vergleichende Beurteilung der Interaktions-Dynamik vornehmen zu können, wurden zunächst die Interaktionen von XLAP2 und XlaminA/B1 während der Mitose untersucht. Deren Verteilung während der Mitose wurde zudem bereits eingehend untersucht (Markiewicz et al., 2002; Schoft et al., 2003). Alle PLA-Experimente wurden dabei wie bereits beschrieben (siehe 5.3.1.) durchgeführt. Die räumliche Verteilung der PLA-Signale wurde ebenfalls mittels 3D-Rekonstruktion visualisiert.

Klassische Immunfluoreszenz-Experimente zeigten, dass XLAP2 und Xlamin A/B1, abgesehen von der Interphase auch während der Prophase noch immer in der Peripherie des Kerns lokalisiert sind. Beide Proteine sind nach Abbau der Kernhülle und während der Metaphase ausschließlich im Zytoplasma nachweisbar (Abb. 5-33, a-c), lokalisieren jedoch bereits während der Anaphase wieder in Bereichen um die sich trennenden Schwesterchromatiden. XLAP2 und XlaminA/B1 relokalisieren schließlich wieder in die neu aufgebaute Kernhülle (Abb. 5-33, d-e). PLA-Untersuchungen zeigten interessanterweise, dass die Interaktionen zwischen XLAP2 und XlaminA/B1 während der Mitose durchgehend bestehen bleiben. Entsprechende PLA-Signale konnten auch während der Prophase noch in der Peripherie des Kerns beobachtet werden (Abb. 5-33, b''). Jedoch zeigten sich bereits erste Signale im Zytoplasma. Interaktionen beider Proteine wurden nach Abbau der Kernhülle ausschließlich im Zytoplasma beobachtet, wobei diese bereits während der Anaphase an die Schwesterchromatiden translozierten und nach erneutem Aufbau der Kerne wiederum in der Kernhülle lokalisierten (Abb. 5-33, c'''-e''').

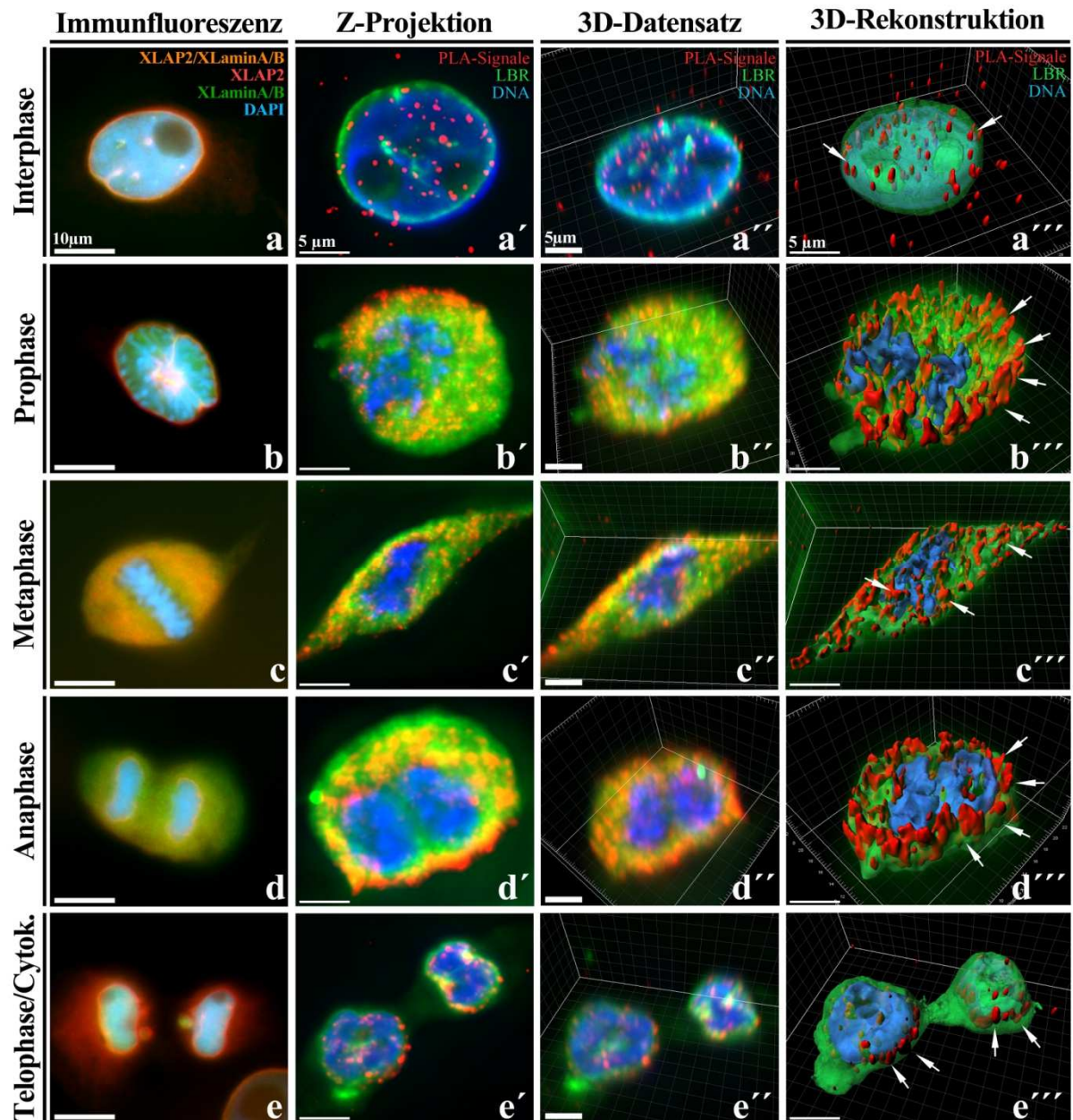


Abbildung 5-33: Interaktions-Dynamiken zwischen XLAP2 und XlaminA/B1 während der Mitose. (a-e) Immunfluoreszenzlokalisierung von XLAP2 und XlaminA/B1 während der Mitose. (a'''-e''') Dreidimensionale Oberflächenrekonstruktion der XLAP2/XlaminA/B1-Interaktionssignale während der Mitose. Während entsprechende Signale in der Prophase vorwiegend in der sich auflösenden Kernhülle lokalisieren (b''', Pfeile), sind diese während der Metaphase hauptsächlich im Zytoplasma zu erkennen (c'''). Bereits in der Anaphase können die PLA-Signale in direkter Nähe um die Schwesterchromatiden nachgewiesen werden (d''', Pfeile). Nach Aufbau der Kernhülle sind die Signale erneut in dieser zu beobachten (e''', Pfeile).

5.4.3. Interaktionen zwischen XMAN1 und Xemerin während der Mitose

Da gezeigt wurde, dass Interaktionen zwischen XMAN1 und Xemerin in Interphasekernen im Bereich der Kernhülle stattfinden, stellte sich die Frage, wie sich die Dynamik dieser Interaktionen während der Mitose verhält. Klassische Immunfluoreszenzlokalisierungen für XMAN1 und Xemerin zeigten zunächst sowohl in Interphase- als auch Prophase-Kernen eine überwiegend randständige Fluoreszenz der Kernhülle (Abb. 5-34, a-b). Im Gegensatz zu

XLAP2 und XlaminA/B1 scheinen beide Proteine nach Abbau der Kernhülle vor allem im Bereich der Mitosespindeln konzentriert vorzuliegen (Abb. 5-34, c). Erst nach Wiederaufbau der Kernhülle, lokalisierten XMAN1 und Xemerin wieder in dieser (Abb. 5-34, d-e). Die Interaktionsdynamik der XMAN1/Xemerin-Interaktionen ist weitgehend mit der von XLAP2/XlaminA/B1 vergleichbar. So waren die PLA-Signale nach Abbau der Kernhülle homogen im Zytoplasma verteilt (b''-d'', Pfeile). Jedoch lokalisierten diese erst nach vollständigem Wiederaufbau des Kerns erneut in der Kernhülle (e'').

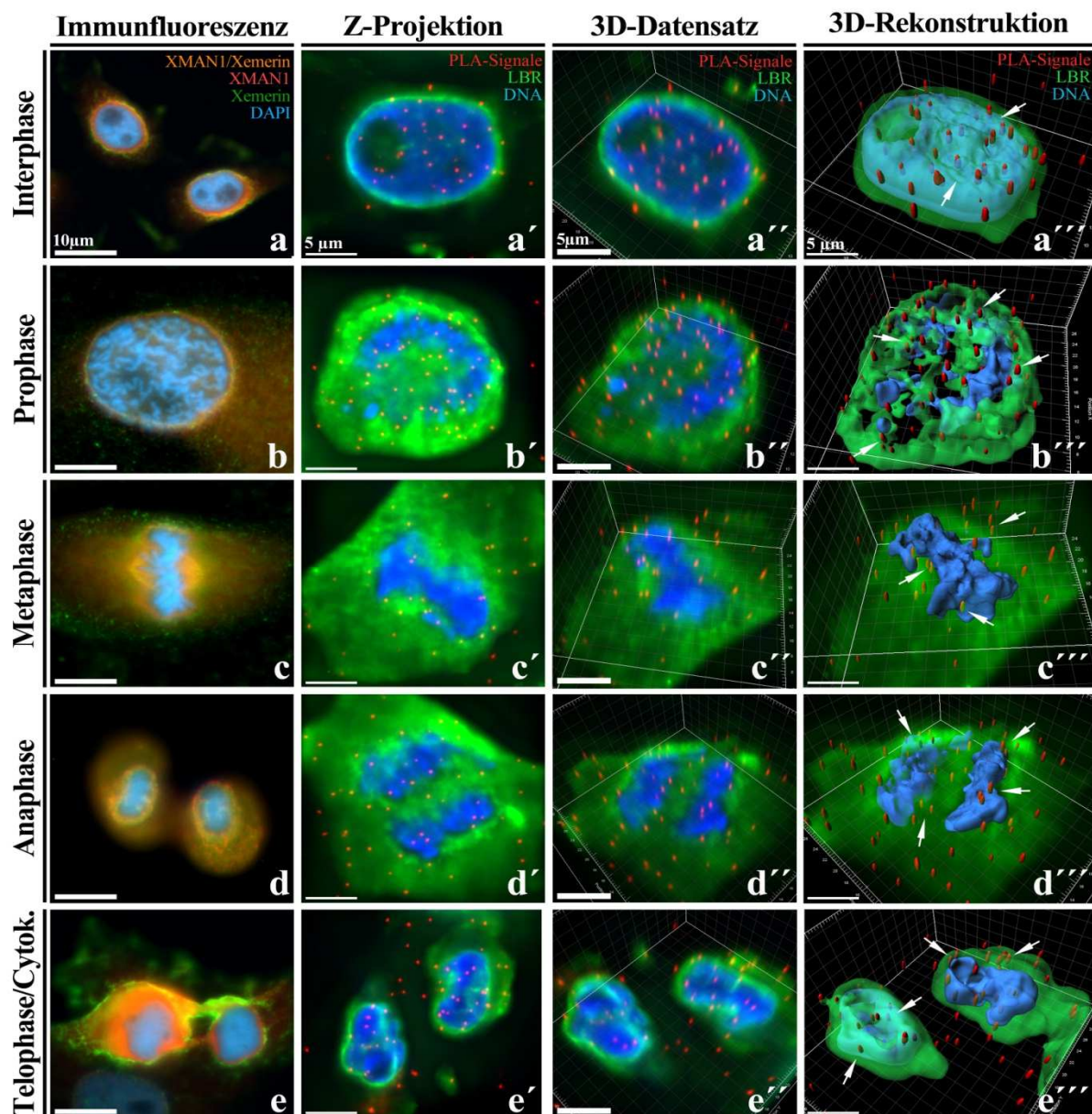


Abbildung 5-34: Protein-Protein-Interaktionen von XMAN1 und Xemerin während der Mitose. (a-e) Immunfluoreszenzlokalisierung von XMAN1 und Xemerin während der Mitose. (a'''-e''') Dreidimensionale Oberflächenrekonstruktion der XMAN1/Xemerin-Interaktionssignale während der Mitose. Während der späten Prophase lokalisieren die Interaktionssignale vor allem im Zytoplasma und teilweise in der noch vorhandenen Kernhülle (b'', Pfeile). Während die PLA-Signale in der Meta- und Anaphase im Zytoplasma verteilt sind (c''-d''), können sie erst nach Wiederaufbau des Kerns wieder in der Kernhülle detektiert werden (e'', Pfeile).

5.5. Die Rolle des Barrier-to-Autointegration Factors (BAF) während der Organentwicklung

Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, dass das LEM-Domänen Protein MAN1 essentielle Rollen bei der embryonalen Entwicklung von Organen in *Xenopus laevis* einnimmt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Emerin die Funktionen von MAN1 übernehmen kann. Es stellte sich daher die Frage, durch welchen Mechanismus Emerin in der Lage ist den Verlust von XMAN1 zu kompensieren. Beide Proteine besitzen die Fähigkeit gemeinsame Faktoren wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren zu binden (zur Übersicht siehe Margalit et al., 2007). Daher wurde vermutet, dass die Regulation der Organentwicklung mittels gemeinsamer Signalwege abläuft. Auf der Suche nach gemeinsamen Bindungspartnern der LEM-Domänen Proteinen trifft man vor allem auf den sogenannten Barrier-to-Autointegration Factor (BAF). BAF ist als wichtigster Bindungspartner der LEM-Domäne beschrieben worden (Furukawa, 1999). Daher wurde die These aufgestellt, dass BAF vermutlich der essentielle Faktor bei der Regulation der Organentwicklung in *Xenopus* ist.

Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten spezifische Oligonukleotid-Morpholinos für BFA in Embryonen injiziert und die nachfolgend auftretenden Phänotypen untersucht werden.

5.5.1. Knockdown von BAF mittels Mikroinjektion spezifischer Oligonukleotid-Morpholinos

BAF wird in *Xenopus laevis* in Form zweier Spleißvarianten exprimiert (BAF1a und BAF1b). Aus diesem Grund wurden die mRNA-Sequenzen beider Varianten miteinander verglichen (Abb. 5-35). Dabei wurde ermittelt, dass die Sequenzen beider mRNAs zu 80% und die codierenden Sequenzen (grün markiert) zu 92% übereinstimmen. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen ergab eine Übereinstimmung zwischen BAF1a und BAF1b von 96%. Dies deutet auf eine hohe Konservierung hin und lässt vermuten, dass es sich bei beiden Varianten um homologe Proteine handelt.

Um einen effektiven Knockdown von BAF gewährleisten zu können musste beachtet werden, dass die Morpholinos in der Lage sind mit den mRNA-Sequenzen beider Varianten zu hybridisieren. Leider zeigten sich im Bereich des Start-Codons (rot markiert) zahlreiche Basenfehlpaarungen in den Sequenzen von BAF1a und BAF1b, weshalb sich dieser Bereich nicht als Target für Morpholinos eignete. Wie bereits beschrieben (siehe 4.2.14.), kann das Target der Morpholinos jedoch auch in Bereichen 20 Nukleotide downstream bis hin zu 80 Nukleotide upstream des Start-Codons gewählt werden.

BAF1A	31	tgttcgggggagcagttggcgggaa	tacgtgaaaggagtgaaa	<u>ATG</u> TCGTCAACGTCACAAA
BAF1B	41	tgttcgggggagcagttggcgggaaa	gacgtgaaaattgtgaaa	<u>ATG</u> TCATCAACATCCAAA
BAF1A	91	AGCACAGAGACTTTGTTCGAGAGCCAATGGGAGAAAAGTCAGTCCAGTGTCTGGCGGGTA		
BAF1B	101	AACACAGAGACTTTGTGGCAGAGCCAATGGGAGAAAAGTCAGTCCAATGTCTGGCAGGTA		
BAF1A	151	TTGGCGAAGCATTGGGGCACAGGCTTGAGGAAAAAGGCTTTGATAAGGCTTATGTCGTGT		
BAF1B	161	TTGGTGACACATTGGGGCGCAGGCTTGAGGAAAAAGGTTTGATAAGGCTTATGTGGTGT		
BAF1A	211	TGGGCCAGTTTCTTGTTTTGAAGAAGGATGAAGAGCTTTTCAAGGAGTGGCTGAAGGATA		
BAF1B	221	TGGGTCAAGTTTCTTGTTTTGAAGAAGGATGAAGAGCTTTTCAAGGAGTGGCTGAAAGATG		
BAF1A	271	TCTGTTTCAAGCAATGCCAAGCAGTCTAGAGACTGCTATGGCTGCCTGAAAGAATGGTGTG		
BAF1B	281	CCTGTTTCTGCCAATGCCAAGCAGTCTAGAGATTGTTACGGCTGCCTAAAAGAATGGTGTG		
BAF1A	331	<u>ATGCCTTTTTGTAA</u> tgtagctatTTTTTTTTtatgcctttccaaaccagctctaaagag		
BAF1B	341	<u>ATGCCTTTTTGTAA</u> tgta--t-tcgtg-----atgcctcccaaagcca-cac-aaggtt		
BAF1A	391	aacca--ccaagtcac-agcta-aag-ccacagaagtttgccagatgcatcggttatca-a		
BAF1B	391	g-ccagacgca-tcattatcttgaaggcca-agcaacttgcc-----ca-cggt-tgaga		
BAF1A	445	c-ttcc-attggactaggaagaaatctgtgggaatatgaacaatttttaggaataacaaa		
BAF1B	441	catttctattggactaggaagaaatctatgggcatatgaacaattttaaaataacaga		
BAF1A	503	accgagaatccacaattaatgaccatttcaaataaataatccacatagtaatccctcaa		
BAF1B	501	t--ga---tcca---tg-atgaccatttccaaataaataatcc-ctt-g-a-ta--t---		
BAF1A	563	gatgattaaaattgatacttccacatgtgtggttagccacagccataacattcgctattgt		
BAF1B	543	--t-attcaatctgatgcttctatatgtgtagtagcaactgcccataattctctattct		
BAF1A	623	gtatgttttagtttatgggaatttcagtgccatgttttatttattttaaatatgctaaaa		
BAF1B	600	gtatatttagtttaataaggaatttcagtgccatgttttatttattttaata--c-ac--		
BAF1A	683	tgcaacatggtgcaactgtttttatcttcatcctatgttaagggtc-acgtaaagca-tt		
BAF1B	655	t-cga-a---tgcaactggttttatcttcatcctatgctaaggggtgagctaacgcattt		
BAF1A	741	ttcttgggaaaatgtcatcaatattgt	767	
BAF1B	710	ttcttgggaagatgtcatcaatgttgt	736	

Abbildung 5-35: Sequenzvergleiche zweier Spleißvarianten des Barrier-to-Autointegration Factors (BAF1a: NM_001091089.1 und BAF1b: NM_001093845.1) in *Xenopus laevis*. Der kodierende Bereich ist in Großbuchstaben (grün), die 3'- bzw. 5'-UTR (nicht translatierte Bereiche) in Kleinbuchstaben dargestellt. Start- (Rot) und Stopp-Codon (Blau) sind fett gedruckt und unterstrichen. Der zur Synthese spezifischer Oligonukleotid-Morpholinos gewählte Bereich ist gelb hinterlegt.

Ein optimaler Bereich mit möglichst hoher Übereinstimmung beider Sequenz wurde daraufhin etwa 20 Nukleotide upstream des Start-Codons gefunden (siehe Abb. 5-35, gelb hinterlegter Bereich). Daher wurde schließlich die entsprechende Sequenz von BAF1a als Target gewählt (MO-BAF).

Als spezifische Kontrolle wurden Morpholinos entworfen, welche in 5 Basen Fehlpaarungen aufwiesen (MO-5mm-BAF). Die so entworfenen Morpholinos wurden schließlich analog zum Knockdown von XMAN1 mit einer Konzentration von 50 ng pro Blastomere injiziert (vgl. Abb. 5-36).

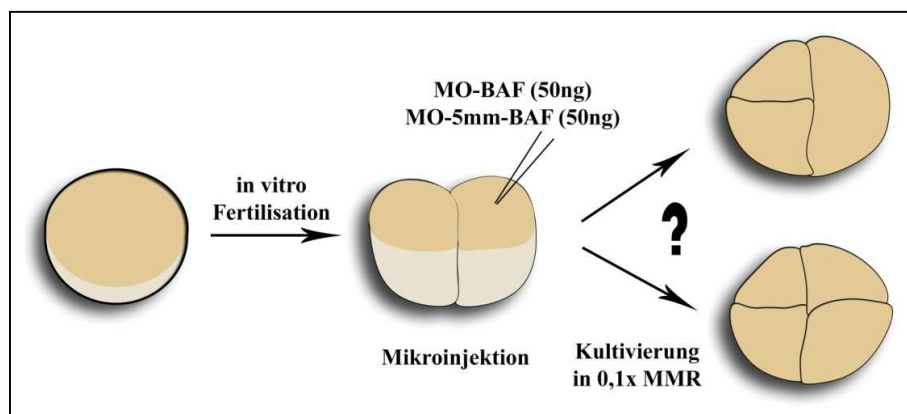


Abbildung 5-36: Schematische Darstellung der Mikroinjektion verschiedener BAF-Morpholinos in eine Blastomere von Embryonen im 2-Zell-Stadium

5.5.2. Der Knockdown von BAF führt zu einem Ausbleiben der Augen-Entwicklung

Infolge des BAF-Knockdowns konnten identische Phänotypen wie bei Knockdown von XMAN1 beobachtet werden. Durch Untersuchung drei Tage alter BAF-Knockdown Embryonen wurden vorwiegend Embryonen (90%) mit einem fehlenden oder deutlich verkleinerten Auge (9%) beobachtet (Abb. 5-37A, b'-c', Pfeile). Embryonen, welche mit Kontrollmorpholinos (MO-5mm-BAF) injiziert wurden, zeigten dagegen überwiegend zwei normale WT-Augen (Abb. 5-37A, a-b, Pfeile).

In histologischen Untersuchungen der BAF-Knockdown Embryonen konnten kaum Strukturen identifiziert werden, welche auf ein Auge hindeuteten (Abb. 5-37C, b, Pfeil). Es wurde lediglich eine kleine Ansammlung von Zellen beobachtet, die Interneuronen und Ganglienzellen glichen. Dies wurde anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen dieser Gewebe bestätigt (Daten nicht gezeigt). Bekannte Retinastrukturen oder Photorezeptoren konnten hingegen nicht identifiziert werden.

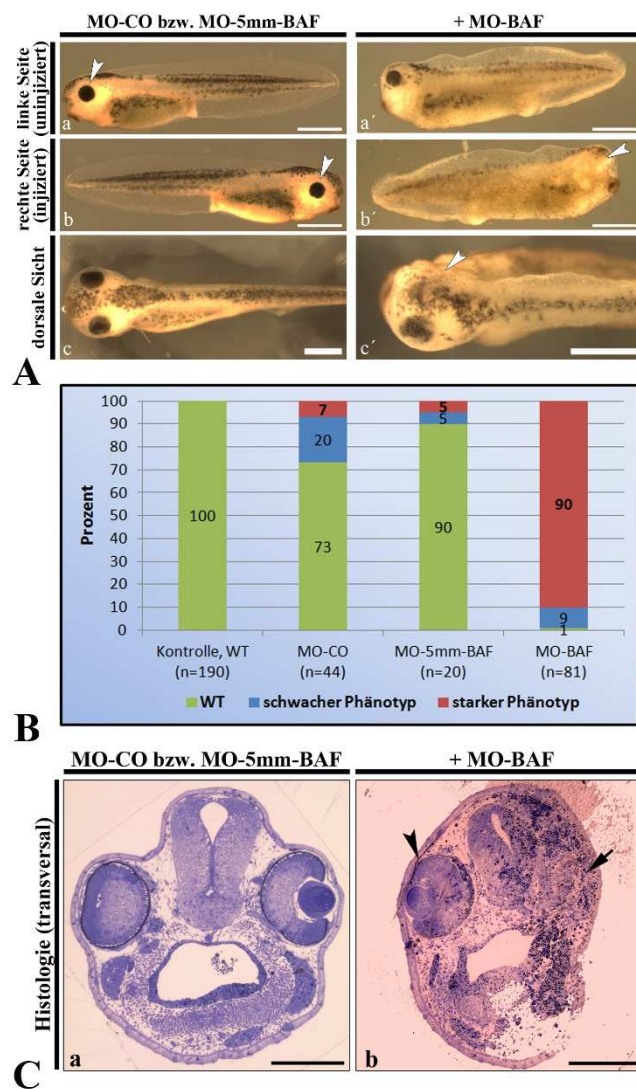


Abbildung 5-37: Der Knockdown von BAF führt zu einem Ausbleiben der Augen-Entwicklung.

(A) Stereomikroskopische Aufnahmen drei Tage alter Embryonen nach Mikroinjektion mit MO-BAF. In der injizierten Seite können keinerlei Augenstrukturen beobachtet werden (b'-c', Pfeile). Referenzbalken: 1mm. (B) Quantifizierung der beobachteten Phänotypen. BAF-Knockdown-Embryonen waren nicht (rot) oder nur teilweise (blau) in der Lage Augen zu bilden. n: Anzahl der Embryonen. Die Mikroinjektion von Kontrollmorpholinos (MO-5mm-BAF) lieferte überwiegend wild-typische Embryonen (grün). (C) Methylen-Blau gefärbte Transversalschnitte der Kopfstruktur von Kontroll- (a) und Knockdown Embryonen (b). Die injizierte Seite der BAF-Knockdown Embryonen lässt keine Augenstrukturen erkennen (b, Pfeil). Referenzbalken: 250 µm.

5.5.3. Der Knockdown von BAF verhindert die korrekte Bildung von Somiten

Auch Embryonen, welche mit MO-BAF injiziert wurden, zeigten neben Fehlbildungen des Auges eine beeinträchtigte Entwicklung der Schwanzextremität (Abb. 5-38). Die Mehrheit der Knockdown Embryonen (94%) zeigte drei Tage nach Befruchtung keine Somiten auf der injizierten Seite (Abb. 5-38A, b', Pfeil). Ebenso konnte erneut eine starke Unterpigmentierung der injizierten Seite beobachtet werden (Abb. 5-38A, vergleiche b und b'). Eine zu XMAN1-Knockdown Embryonen vergleichbare Aggregation von Pigmentzellen in Bereichen hinter dem Auge wurde jedoch nicht beobachtet. Lediglich 5% der Knockdown Embryonen wiesen einen schwächeren Phänotyp anhand geradlinig geformter oder dünnerer Somiten auf. Mikroinjektionen mit MO-5mm-BAF lieferten weitgehend normale Embryonen (80%) mit „pfeilförmigen“ Somiten sowie einer normalen Pigmentierung auf beiden Seiten (Abb. 5-38A, a-b, Pfeile). Jedoch konnten erneut einzelne Embryonen mit einem schwachen Phänotyp identifiziert werden (15%).

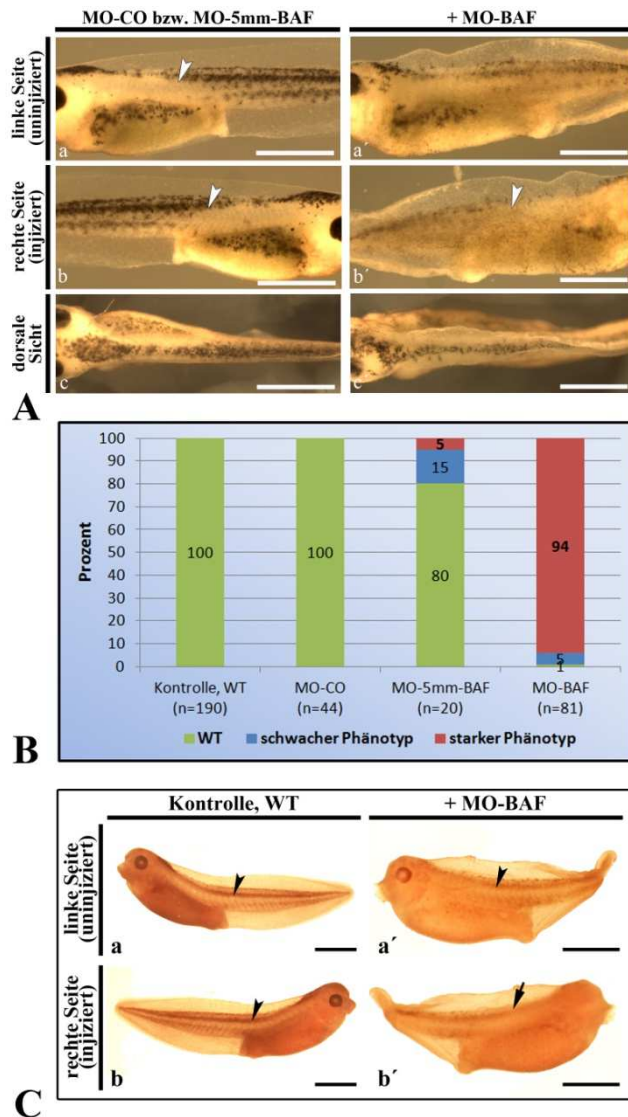


Abbildung 5-38: Der Knockdown von BAF verhindert die korrekte Ausbildung der Somiten. (A) Stereomikroskopische Aufnahmen MO-BAF-injizierter Embryonen drei Tage nach Befruchtung. Die injizierte Seite der Knockdown Embryonen zeigt keine Somiten (b', Pfeil). Referenzbalken: 1mm. (B) Quantifizierung der entsprechenden Phänotypen. BAF-Knockdown Embryonen zeigten ausschließlich einen schweren (rot) oder abgeschwächten Phänotyp (blau) der Somiten. Kontrollembryonen entwickelten vorwiegend normale Somiten (grün). n: Anzahl der Embryonen. (C) Whole mount Immunlokalisation von Desmin. WT Embryonen zeigen die bekannte Somiten-spezifische Färbung (a-b, Pfeilkopf). Eine vergleichbare Färbung der injizierten Seite von BAF-Knockdown Embryonen kann nicht festgestellt werden (b, Pfeil). Referenzbalken: 1 mm.

Whole mount Immunfärbungen bestätigten, dass eine Bildung der Somiten nicht stattgefunden hat. Es konnte keine Somiten-spezifische Färbung für Desmin in der injizierten Seite der Embryonen beobachtet werden (Abb. 5-38C, b', Pfeil).

Zur Untersuchung der Morphologie der Somiten wurden BAF-Knockdown Embryonen, welche den schwachen Phänotyp auswiesen in Epon eingebettet und histologische Transversalschnitte der Schwanzextremität angefertigt. Die Knockdown Embryonen zeigten dabei, dass sich in der injizierten Seite kaum Muskelstrukturen gebildet hatten (Abb. 5-39A, b, Pfeil). In entsprechenden Bereichen wurde stattdessen eine verstärkte Ansammlung dunkel gefärbter Granula beobachtet. In diesen Gewebeschnitten war ebenfalls ersichtlich, dass die Haut der injizierten Seite deutlich dicker erschien und augenscheinlich aus mehreren Epithelschichten bestand. Die uninjizierte Seite sowie die darin gebildeten Somiten erschienen dagegen weitgehend normal (Abb. 5-39A, b, Pfeilkopf).

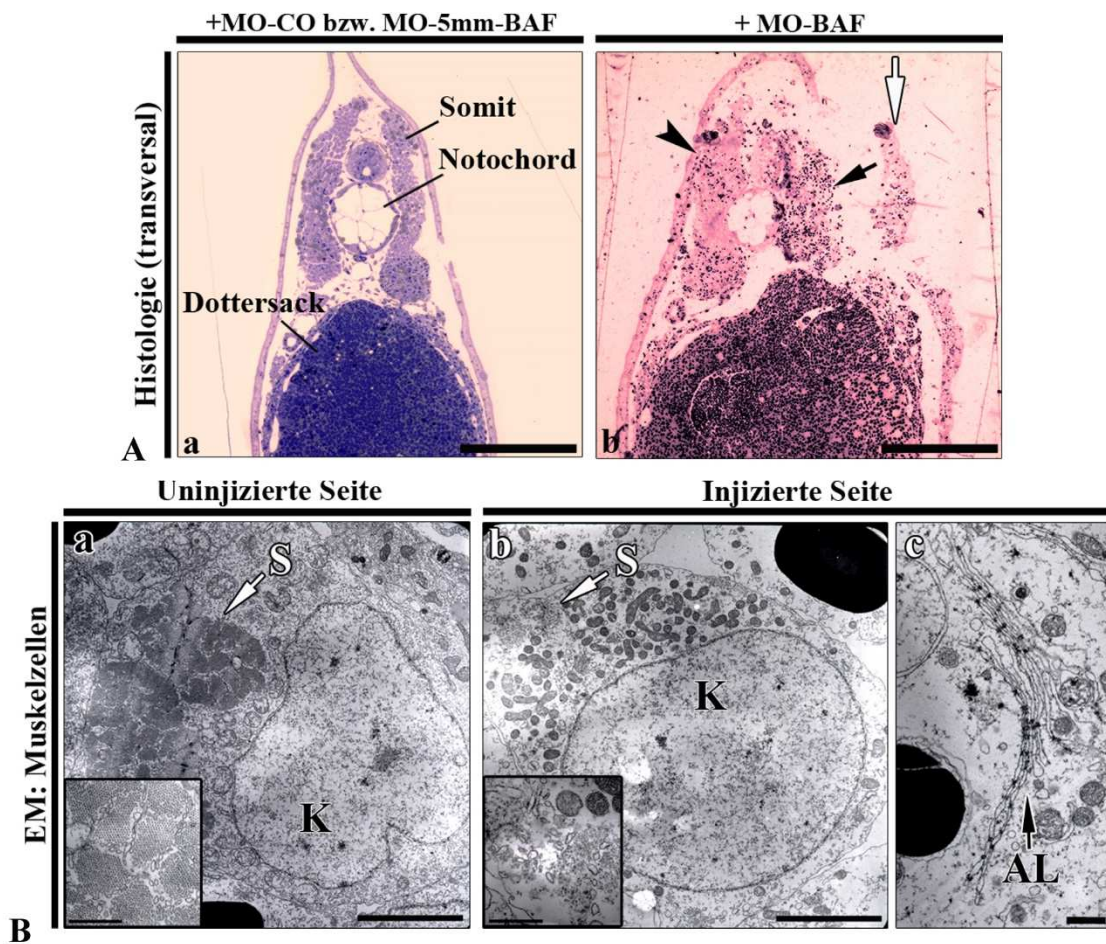


Abbildung 5-39: Morphologische Untersuchung der Somiten in BAF-Knockdown Embryonen. (A) Methylen-Blau gefärbte Transversalschnitte der Schwanzextremität von Kontroll- (a) und Knockdown Embryonen (b). Die Morpholino-injizierte Seite zeigt lediglich Fragmente von Muskelstrukturen (b, Pfeil) sowie eine verdickte Haut (b, weißer Pfeil). Referenzbalken: 250 μm . (B) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Skelettmuskelzellen. Muskelzellen der Knockdown Embryonen zeigen eine deutlich reduzierte Anzahl an Sarkomeren (b, Pfeil). Manche Zellen zeigten an Stelle von intakten Kernen nur Annulate Lamellae (AL, c). K: Zellkern, S: Sarkomere. Referenzbalken: 5 μm und 1 μm (in der Vergrößerung und in c).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der injizierten Seite ergaben ein vergleichbares Bild, wie bereits aus XMAN1-Knockdown Embryonen bekannt (vgl. Abb. 5-10). Die Muskelzellen zeigten eine signifikant reduzierte Anzahl von Sarkomeren (Abb. 5-39B, b, Pfeil). Dennoch vorhandene Sarkomere erschienen überwiegend desorganisiert (Vergrößerung in b). Ebenfalls zeigte sich, dass die meisten Muskelzellen vereinzelt vorlagen und intrazellulär mehr Mitochondrien identifiziert werden konnten, als dies der Fall in WT-Zellen war. Besonders hervorzuheben ist, dass zahlreiche Muskelzellen beobachtet wurden, in denen kein Zellkern identifiziert werden konnte. Stattdessen wurden sog. Annulate Lamellae beobachtet (Abb. 5-39B, c). Dies sind meist parallel angeordnete Membranstapel, welche von zahlreichen Kernporenkomplexen durchsetzt jedoch nicht mit Chromatin assoziiert sind. Diese Strukturen kommen einerseits in Zellen vor, welche eine erhöhte Teilungs- und Syntheserate aufweisen, wie z.B. Tumor- oder embryonale Zellen (Kessel 1989, 1992). Andererseits können Annulate

Lamellae auch in Zellen identifiziert werden, in denen es zu einer Inhibierung der Kernhüllbildung kam (Dabauvalle et al., 1991). Ein Vorkommen von Annulate Lamellae in den Muskelzellen der BAF-Knockdown Embryonen stellt daher vermutlich einen Hinweis auf eine fehlerhafte Kernhüllbildung dar. Muskelzellen der uninjizierten Seite zeigten dagegen eine normale Organisation (Abb. 5-39B, a).

5.5.4. Analysen der Herzanatomie und –physiologie nach Knockdown von BAF.

Ein Effekt des Knockdowns von BAF auf die Herzentwicklung während der Embryogenese in *Xenopus laevis* konnte nur teilweise bestätigt werden. Sechs Tage nach Injektion von MO-BAF zeigten sich zwei unterschiedliche Populationen von Embryonen (Abb. 5-40B). Während die eine Population (56%) keine oder nur rudimentär gebildete Herzen aufwies, zeigte die andere Population (44%) weitgehend normal entwickelte Herzen. Daher war es nach aktuellem Stand nur möglich die teilweise normal gebildeten Herzen näher zu untersuchen (Abb. 5-40).

Die untersuchten Herzen der BAF-Knockdown Embryonen zeigten eine im Vergleich zu WT-Herzen weitgehend normale Anatomie (Abb. 5-40A; vergleiche a, b mit c). Sowohl Ventrikel und Atrium als auch Herzgefäße wie der *Truncus arteriosus* waren gut erkennbar. Obwohl die Ventrikel der BAF-Knockdown Embryonen während der Diastole normal groß waren, zeigte sich während der Systole ein erniedrigtes Ventrikelvolumen (um 23% verkleinert; Abb. 5-40C). Aufgrund der Diskrepanz zwischen diastolischem und systolischem Ventrikelvolumen konnte eine erhöhte Amplitude der Ventrikel beobachtet werden. Diese war im Vergleich zu WT-Herzen um 30% erhöht (Abb. 5-40D).

Statistische Auswertungen von Videodaten des schlagenden Ventrikels zeigten sowohl in Kontrollembryonen als auch in BAF-Knockdown Embryonen weitgehend normale Herzzyklen (Abb. 5-40E; siehe auch DVD: Videos 3, 6 und 7). Diese waren durch einen periodischen Wechsel von systolischer und diastolischer Phase charakterisiert. Die Herzzyklen der BAF-Knockdown Embryonen bestätigten zudem eine teilweise erhöhte Amplitude (Abb. 5-40E).

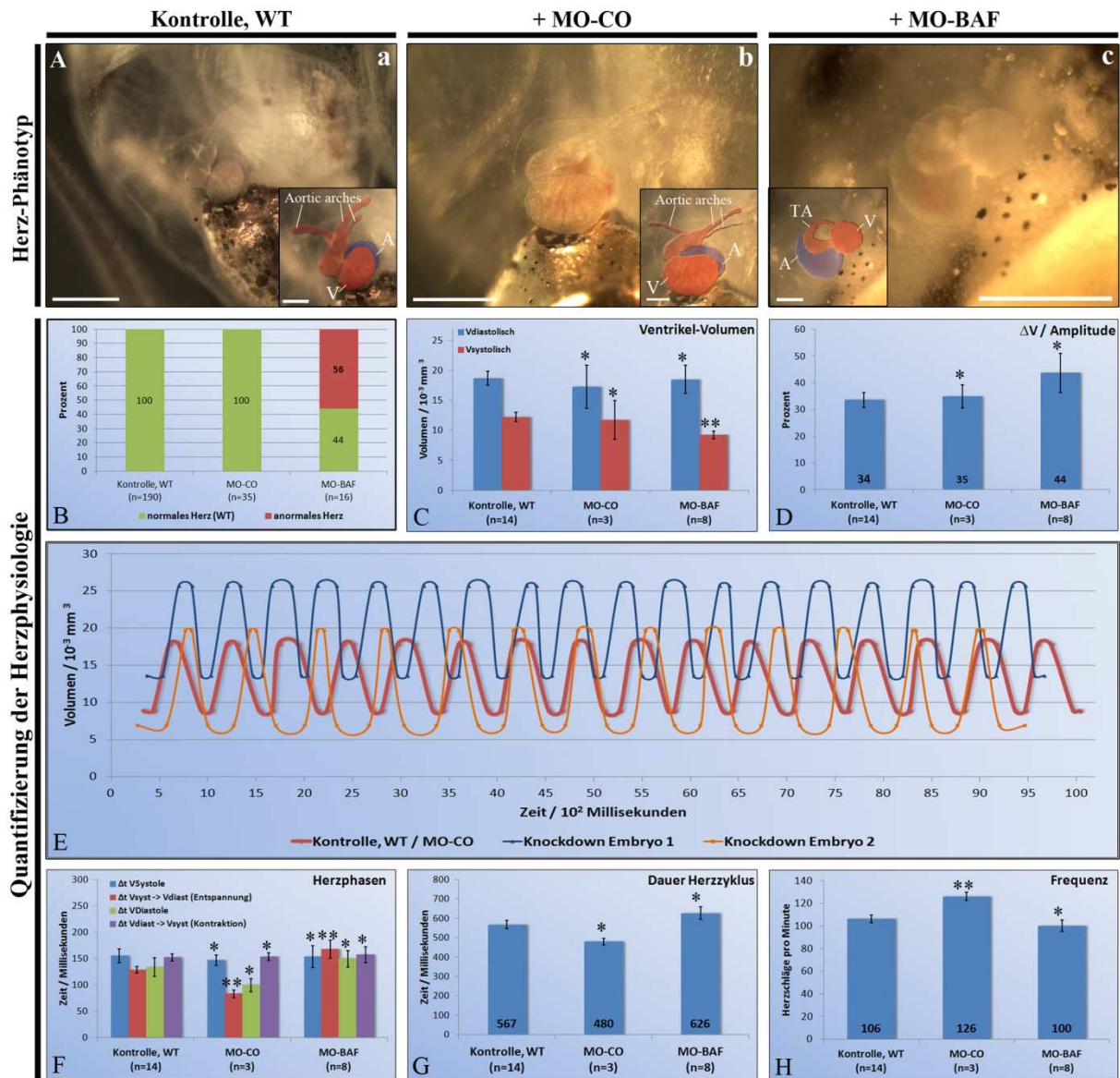


Abbildung 5-40: Der Knockdown von BAF führt zu Embryonen mit einer teilweise normalen Herzentwicklung. (A) Stereomikroskopische Aufnahmen der Herzen 6 Tage alter Embryonen. Alle Embryonen zeigen eine weitgehend normale Anatomie des Herzens. Die Vergrößerungen zeigen annotierte Herzstrukturen. A: Atria, TA: *Truncus arteriosus*, V: Ventrikel. Referenzbalken: 500 μm und 200 μm (in der Vergrößerung). (B) Quantifizierung der beobachteten Herzphänotypen. Während in Kontrolleembryonen hauptsächlich WT-Hezen beobachtet wurden (grün), zeigten BAF-Knockdown Embryonen zum einen ein Ausbleiben der Herzentwicklung oder nur rudimentär entwickelte Herzen (rot). Zum anderen wurden Embryonen mit einer augenscheinlich normalen Herz Anatomie beobachtet (grün). n: Anzahl der Embryonen. (C-H) Auswertungen der Videodaten des Herzschlags zeigen, dass die Knockdown Embryonen weitgehend normale Herzmerkmale aufweisen. Jeder Balken repräsentiert das arithmetische Mittel in Abhängigkeit von der Anzahl der analysierten Embryonen (n). Zahlenwerte an der Basis einzelner Balken stellen die entsprechenden Messdaten dar. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des arithmetischen Mittels. Die ermittelten Unterschiede in Bezug auf WT-Hezen waren statistisch signifikant. Die Signifikanz wurde mittels des Studentischen T-Tests berechnet. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$.

Quantifizierungen verschiedener Herzphasen zeigten eine leicht verlängerte Dauer während der Entspannung des Ventrikel (Abb. 5-40F, $\Delta t V_{\text{Syst}} \rightarrow V_{\text{diast}}$). Andere Herzphasen zeigten zu WT-Hezen vergleichbare Zeiten. Aufgrund der verlängerten Entspannungsphase, zeigte sich zudem die Dauer des gesamten Herzzyklus nur leicht verlängert (Abb. 5-40G; Faktor 1,1 – 1,3). Die

Schlagfrequenz der Ventrikel in BAF-Knockdown Embryonen zeigte im Durchschnitt weitgehend normale Werte. Dennoch wies die Hälfte der untersuchten Ventrikel stark erniedrigte Schlagfrequenzen im Bereich von 80-90 Schlägen pro Minute auf (eine Verminderung von etwa 20-25%).

Da die hier dargestellten Ergebnisse in Bezug auf die Anatomie und Physiologie der BAF-Knockdown Herzen voneinander abwichen, sollte die Morphologie der Herzmuskelzellen mittels Elektronenmikroskopie näher untersucht werden (Abb. 5-41).

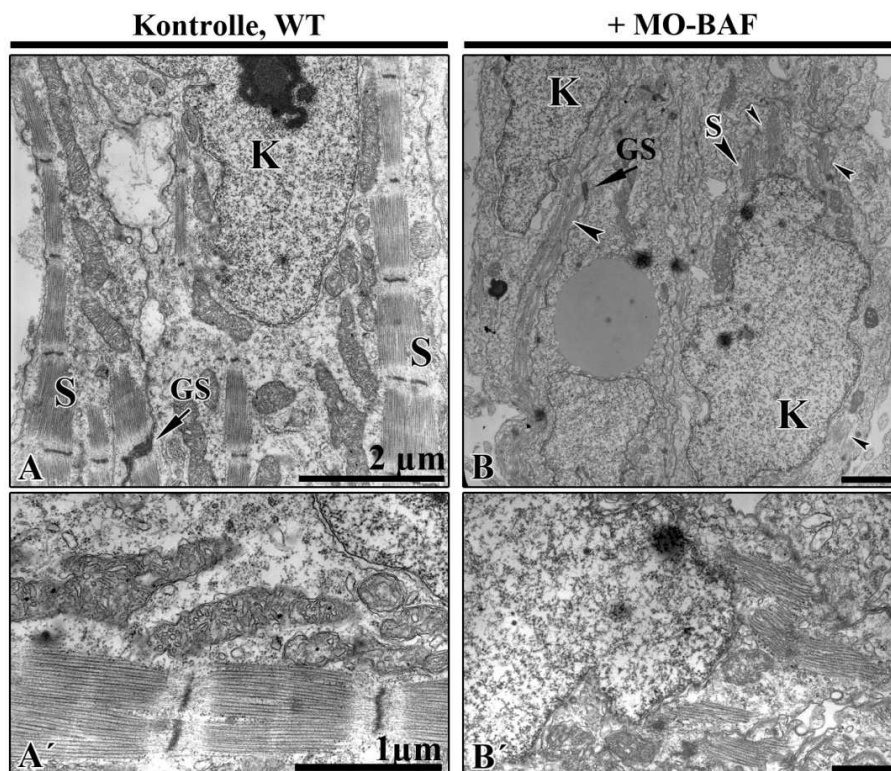


Abbildung 5-41: Morphologische Untersuchung der Herzmuskelzellen von WT-Herzen (A-A') und Herzen in BAF-Knockdown Embryonen (B-B'). Analog zum XMAN1-Knockdown, zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen kardialer Muskelzellen in BAF-Knockdown-Embryonen fragmentierte und desorganisierte Sarkomere (B und B', Pfeile). Ebenso können lappenartige Ausstülpungen der Kernhülle beobachtet werden (B). GS: Glanzstreifen, K: Zellkern, S: Sarkomere. Referenzbalken: 5 μm (A-B) und 1 μm (A'-B').

Analysen der Ultrastruktur kardialer Muskelzellen in BAF-Knockdown Embryonen zeigten analog zum XMAN1-Knockdown erheblich desorganisierte Sarkomere (Abb. 5-41B-B'). Anhand der transversal geschnittenen Sarkomere konnte beobachtet werden, dass diese in Form zahlreicher Fragmente im Zytoplasma verteilt vorlagen (Abb. 5-41B). Ebenso zeigten die Zellkerne erneut lappenartige Ausstülpungen der Kernhülle.

Muskelzellen der WT-Herzen besaßen dagegen normal organisierte, quer durch die Zelle verlaufende Sarkomere. Auch die Zellkerne und die Kernhülle wiesen eine normale Morphologie auf (Abb. 5-41A-A').

6. Diskussion

Kernhüllproteine sind von großer Bedeutung, da eine stetig zunehmende Zahl genetischer Erkrankungen beim Menschen direkt mit Defekten z.B. in Laminen oder Lamina-bindenden Proteinen assoziiert sind (zur Übersicht siehe Worman et al., 2010). Dies gilt insbesondere für die Gruppe der LEM-Domänen Proteine, da Mutationen in den entsprechenden Genen zu sog. Envelopathien führen, welche meist unterschiedliche aber spezifische Gewebearten betreffen. Es wird angenommen, dass LEM-Domänen Proteine eine Reihe von wichtigen Aufgaben während der Chromatinorganisation, der Aufrechterhaltung der Kernhüllarchitektur sowie der Genregulation einnehmen (zur Übersicht siehe Wagner und Krohne, 2007). Dennoch konnten die physiologischen Funktionen von LEM-Domänen Proteinen bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Dies würde jedoch zu einem besseren Verständnis der Pathologie von Envelopathien verhelfen.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher die Funktionen der LEM-Domänen Proteine MAN1 (XMAN1) und Emerin (Xemerin) während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* eingehend untersucht werden. Entsprechende Untersuchungen wurden an *Xenopus* durchgeführt, da dieser einen einfachen Modellorganismus für Manipulationsexperimente darstellt. Da zudem entwicklungsbiologische Vorgänge auf molekularer Ebene in *Xenopus* weitgehend evolutionär konserviert sind, können entsprechende Resultate auch auf andere Spezies übertragen werden.

Daher wurde mittels Morpholino-vermitteltem Knockdown von XMAN1 untersucht, welchen Einfluss der Knockdown von XMAN1 auf die Embryonalentwicklung hat. Durch ektopische Expression von Xemerin sollte zudem untersucht werden ob es den Verlust von MAN1 kompensieren kann und ob beide Proteine dementsprechend überlappende Funktionen besitzen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass LEM-Domänen Proteine Schlüsselemente während bestimmten Signalwegen sowie der Chromatinorganisation darstellen, welche die ordnungsgemäße Regulation gewebespezifischer Gene ermöglichen.

6.1. Funktionen von MAN1 in *Xenopus laevis*

6.1.1. Die Rolle von XMAN1 während der Kernhüllbildung

In eigenen vorangegangenen Untersuchungen wurde erstmals der Hinweis erbracht, dass MAN1 während der Zellteilung eine wichtige Rolle einnimmt. Dabei zeigte die Mikroinjektion spezifischer Antikörper in das Zwei-Zell-Stadium befruchteter Embryonen einen Arrest der Zellteilung in der injizierten Blastomere. Eine Erklärung für den Arrest der Zellteilung konnte bislang jedoch nicht erbracht werden. Co-Injektionen verschiedener Xemerin-Konstrukte zeigten jedoch wieder eine normale Zellteilung der injizierten Blastomere. Es wurde daher spekuliert, dass es bei Inhibition von XMAN1 zu einer Störung während der Kernhüllbildung kommt.

Alle bis heute untersuchten LEM-Domänen Proteine sind in der Lage Lamine zu binden (zur Übersicht siehe Wagner und Krohne, 2007) und benötigen diese Interaktion für ihre korrekte Lokalisation in der Kernhülle (Sullivan et al., 1999; Vaughan et al., 2001; Brachner et al., 2005). LEM-Domänen Proteine interagieren wiederum mittels ihrer LEM-Domäne mit dem sogenannten Barrier-to-Autointegration Factor (BAF). Lamine, BAF sowie manche Vertreter der LEM-Domänen Proteine sind ihrerseits in der Lage an Histone oder auch direkt an DNA zu binden (Shoeman und Traub 1990; Taniura et al., 1995; Margalit et al., 2007; Cai et al., 2007; Laguri et al., 2001). Dies zeigt, dass die Architektur der Kernhülle mittels zahlreicher Interaktionen zwischen Kernhüllproteinen aufrechterhalten wird und eine spezifische Quervernetzung zum Chromatin notwendig ist (siehe Abb. 6-1).

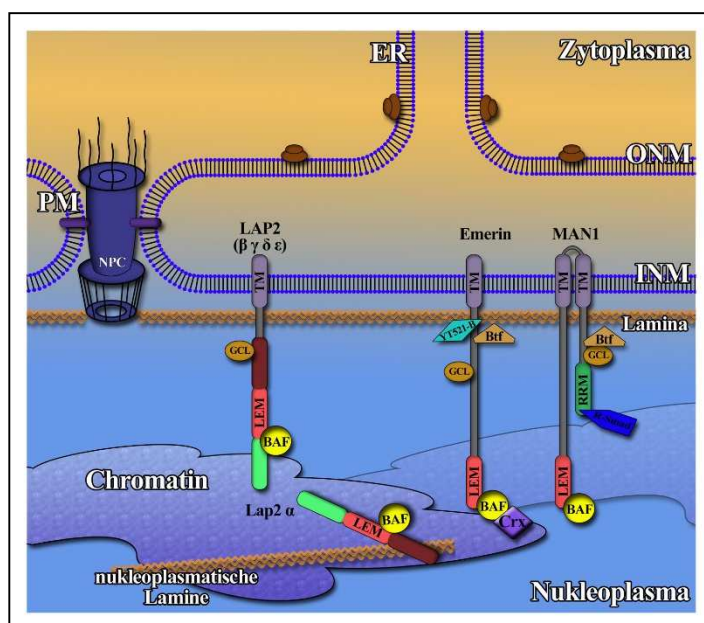


Abbildung 6-1: Schematische Darstellung der Kernhülle mit den LEM-Domänen Proteinen somatischer Zellen. Somatische Säugerzellen exprimieren die LEM-Domänen Proteine MAN1, Emerin, das nukleoplasmatische LAP2 α sowie die membrandurchspannenden LAP2-Isoformen β , γ , δ und ϵ . Die LEM-Domäne stellt mittels des Barrier-to-Autointegration Factors (BAF) eine Verbindung zum Chromatin her. Die LEM-Domänen Proteine sind zudem mit der Lamina und verschiedenen Transkriptionsfaktoren assoziiert. Erläuterungen der Abkürzungen siehe Abb. 1-1.

Die Veränderung einer der genannten Komponenten würde demzufolge eine Störung der entsprechenden Protein-Protein-Interaktionen nach sich ziehen. Dies könnte zu einer fehlerhaften Bildung des Kerns oder der Kernhülle führen. In der Tat zeigten Studien in *C. elegans*, dass der simultane Knockdown von Emerin und Lem2 (ein MAN1-Analogon) zu Defekten in der Chromatinorganisation und der Kernstruktur führte und es zum Ende der Mitose ein Ausbleiben der Kernbildung beobachtet wurde (Liu et al., 2003). Vergleichbare Effekte wurden durch Knockdown von Laminen oder BAF in *C. elegans* beobachtet (Gruenbaum et al., 2005; Margalit et al., 2005a). Ebenso zeigten genetisch veränderte HeLa-Zellen, in denen Emerin und BAF nicht mehr in der Lage waren Interaktionen auszubilden, eine Inhibition der Kernbildung (Haraguchi et al., 2001).

Der erneute Aufbau des Zellkerns zum Ende der Mitose erfolgt aufgrund zahlreicher Interaktionen zwischen Chromatin, Membranen, Proteinen der äußeren und inneren Kernhülle, Laminen sowie anderen Komponenten wie bsp. den Nukleoporinen, welche während der Mitose im Zytoplasma vorliegen (Anderson und Hetzer, 2008; Schooley et al., 2012). Dabei kommt es zunächst zu einer Rekrutierung und Konzentration integraler Membranproteine wie LBR oder der LEM-Domänen Proteine aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) an die Oberfläche des Chromatins. Nach Bindung und lateraler Ausbreitung der ER-Membranen, wird schließlich durch Fusion der Membran die neue Kernhülle gebildet. Es wird vermutet, dass die Fusion der Membranen durch sogenannte SNAREs (Soluble NSF attachment protein receptors) oder auch durch integrale Membran-GTPasen des ER, den Alastinen vermittelt wird (Jahn und Scheller, 2006; Orso et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit kam es nach Inkubation des Eiextraktes mit einem XMAN1-Antikörper zur Bildung von in vitro Kernen, bei denen Membranvesikel an das Chromatin gebunden hatten, eine Fusion der Membranen zu einer intakten Kernhülle jedoch nicht stattgefunden hat. Es kann daher angenommen werden, dass die Bindung des Antikörpers an XMAN1 zu einer Inhibierung weiterer Bindungspartner oder Faktoren kam welche für die Fusion der Membranen von Bedeutung sind. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Faktoren wie NSF und α -SNAP für die Aktivierung der SNAREs benötigt werden (Baur et al., 2007). Es wäre daher interessant zu untersuchen ob die genannten Faktoren mögliche Bindungspartner von XMAN1 darstellen und es zu einer Inhibierung der SNARE-vermittelten Membranfusion kam. Neueren Berichten zufolge, sind manche Mitglieder der LEM-Domänen Proteine, wie z.B. LEM-4, während der Mitose in der Lage spezifische Proteinphosphatasen zur Kernhülle zu rekrutieren (vgl. 2.3.). Dadurch kann mittels Dephosphorylierung spezifischer Proteine die Reorganisation der Kernhülle gewährleistet werden. In weiterführenden

Experimenten sollte daher untersucht werden ob MAN1 ebenfalls an der Bindung von Proteinphosphatasen beteiligt ist und ob es möglicherweise durch Bindung des hier verwendeten Antikörpers zu einer sterischen Hinderung einer Phosphatase oder entsprechender Substrate kam.

Anhand der vorliegenden Daten können jedoch unspezifische Bindungen oder sterische Behinderungen durch den XMAN1-Antikörper nicht ausgeschlossen werden. Um jedoch die Funktion von XMAN1 während der frühen Embryonalentwicklung eingehend untersuchen zu können war es ratsam, Methoden mit einer eindeutigen Spezifität in Betracht zu ziehen. In diesem Sinne, wurde ein Knockdown von XMAN1 mittels Injektion spezifischer Oligonukleotid-Morpholinos durchgeführt.

6.1.2. XMAN1 ist ein essentieller Faktor während der Organentwicklung

Vorangegangene Untersuchungen konnten zeigen, dass LEM-Domänen Proteine während der Frühentwicklung von *Xenopus* unterschiedliche Expressionsmuster besitzen (siehe Abbildung 6-2). Emerin ist beispielsweise nicht in Oozyten nachweisbar und kann in Embryonen erstmals ab Stadium 41 detektiert werden. Während in Säugern bisher sieben LAP2-Isoformen identifiziert wurden (LAP2 α , β , β' , γ , δ , ϵ and ζ), konnten in *Xenopus laevis* lediglich die Isoformen LAP2 β und ω sowie eine weitere hypothetische LAP2-Isoform nachgewiesen werden (Lang et al., 1999).

Die Expression von LAP2 β während der Embryonalentwicklung findet erstmals ab der Gastrulation statt. LAP2 ω ist hingegen bereits maternal exprimiert und in frühen Furchungsstadien in *Xenopus* nachweisbar. Da die LAP2-Isoformen an der Bindung des Chromatins beteiligt sind, besitzen sie auch eine bedeutende Rolle während der Kernhüllbildung (Schoft et al., 2003).

Funktionen von LAP2 ω während der Embryonalentwicklung wurden bislang nicht diskutiert. Da die Expression dieser Isoform ab der späten Neurula bereits wieder abnimmt (Lang et al., 1999), kann eine Beteiligung während der Organogenese ausgeschlossen werden. Lediglich MAN1 erscheint während der Entwicklung in *Xenopus* kontinuierlich exprimiert. Dies ermöglichte in der vorliegenden Arbeit die Effekte des XMAN1-Knockdowns während der Embryonalentwicklung zu untersuchen ohne Einflüsse anderer LEM-Domänen zu befürchten.

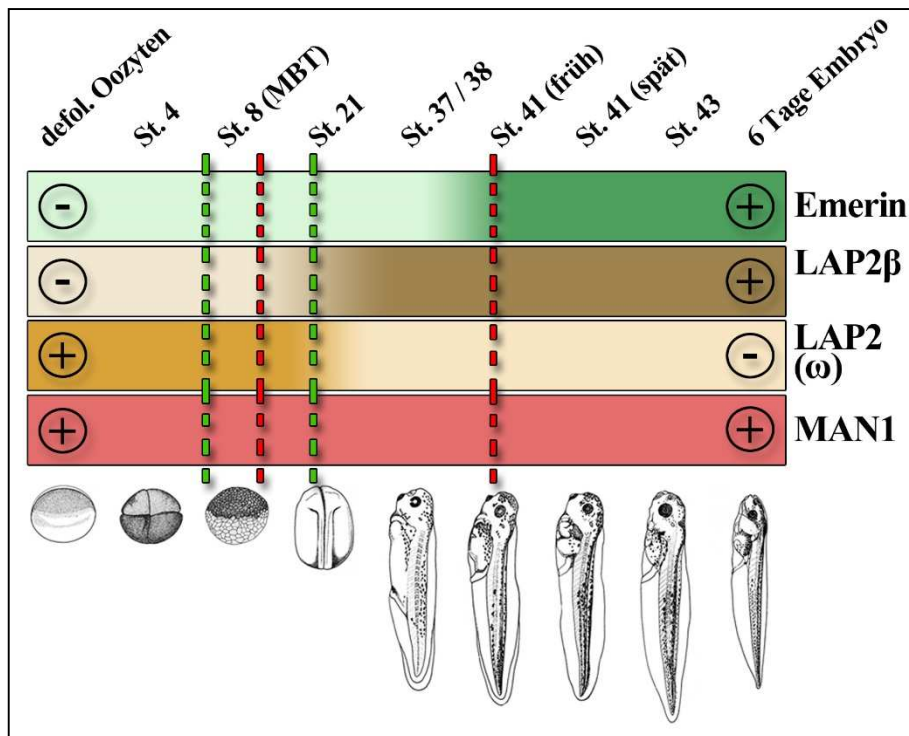


Abbildung 6-2: Schematische Übersicht der embryonal regulierten Expression von LEM-Domänen Proteinen in *Xenopus laevis*. Emerin ist erstmals ab Stadium 41 nachweisbar. Ebenso wird die Expression von LAP2β erst ab der frühen Neurula (Stadium 18) vermehrt initiiert (Lang et al., 1999). LAP2ω kann hingegen bereits in Oozyten und der frühen Embryonalentwicklung nachgewiesen werden (Lang et al., 1999). Die Expression von LAP2ω nimmt jedoch ab der späten Neurula (Stadium 23) wieder ab und ist in späteren Stadien nicht mehr nachweisbar. MAN1 gilt als einziges LEM-Domänen Protein, welches in *Xenopus* sowohl in Oozyten als auch während der gesamten Embryonalentwicklung exprimiert wird. Grüne Linien markieren den Zeitraum der Gastrulation bis hin zur Neurulation. Während diesem Zeitraum finden für die Embryonalentwicklung entscheidende Umverteilungen von Morphogenen sowie die Determination von Geweben statt. Rote Linien stellen den Zeitraum dar, während dem die Organentwicklung stattfindet. Die berichteten Phänotypen des XMAN1-Knockdowns waren in dieser Zeit zu beobachten. defol.: defollikuliert, MBT: Midblastulatransition, St.: Stadium.

Die beobachteten Phänotypen waren erstmals in einem Zeitraum zwischen der Gastrulation und der späten Organogenese zu beobachten (vgl. Abb. 6-2, rote Linien). Quantifizierungen der Expression von XMAN1 in diesen Knockdown-Embryonen zeigten zudem, dass XMAN1 zu diesem Zeitraum um bis zu 95% reduziert war (vgl. Abb. 5-4 und Abb. 6-2, grüne Linien). Die Morpholino-vermittelte Reduktion der Expression blieb während der Embryonalentwicklung weitgehend bestehen was die Spezifität der beobachteten Phänotypen während der Organogenese bestätigt.

In früheren Studien wurde postuliert, dass XMAN1 eine neuralisierende Funktion besitzt, welche für die Augen-Entwicklung wichtig ist und vor allem in ektodermalen und neuroektodermalen Strukturen während dem Kaulquappenstadium exprimiert wird (Osada et al., 2003). Die hier durchgeführten Knockdown-Experimente verdeutlichen, dass XMAN1 für die korrekte Bildung der Augen essentiell ist. XMAN1 repräsentiert zudem einen Antagonisten des BMP-Signalwegs, indem es mit Smad-Proteinen interagiert (Osada et al., 2003).

Vergleichbare Resultate konnten zudem in *Drosophila* erbracht werden (Wagner et al., 2010). Eine Inhibition des BMP-Signalwegs führt bekanntlich zu einer Induktion von Neuralgewebe während der *Xenopus*-Entwicklung (Osada et al., 2003). Der hier erwähnte Augenphänotyp erscheint daher im Einklang mit einem erhöhten BMP-Signal aufgrund des Verlusts von XMAN1 zu sein. Interessanterweise erschien die injizierte Seite der XMAN1-Knockdown Embryonen weniger pigmentiert und zeigte posterior des Auges Aggregate von Pigmentzellen (siehe Abb. 5-9). Diese Beobachtungen deuten möglicherweise auf Fehler während der Auswanderung der Neuralleistenzellen hin, welche im späteren Verlauf der Embryonalentwicklung die Epithelzellen sowie die Pigmentzellen der Haut bilden. Diese Defekte treten dabei vermutlich aufgrund der fehlenden neuralisierenden Funktion von XMAN1 auf.

Untersuchungen der Ultrastruktur der Retina konnten erstmals zeigen, dass XMAN1 für die Differenzierung der Photorezeptorzellen benötigt wird. XMAN1-Knockdown Embryonen zeigten eine gestörte Retinaorganisation, welche bereits beim Menschen anhand von retinalen Dystrophien wie der autosomal-dominanten Zapfen-Stäbchen-Dystrophie (CORD2) oder der Retinitis Pigmentosa beobachtet wurden (Freund et al., 1997). Diese Krankheiten sind durch eine Degeneration oder den vollständigen Verlust der Zapfen und/oder Stäbchen sowie Defekten in der Organisation des Pigmentepithels charakterisiert (Bird 1995). Da die Ausbildung der Augen in den XMAN1-Knockdown Embryonen grundsätzlich nicht stattgefunden zu haben scheint, ist zu vermuten, dass die beobachteten Phänotypen nicht aufgrund einer Degeneration der Photorezeptoren aufgetreten sind, sondern vielmehr aufgrund einer Störung während der Differenzierung der Rezeptorzellen. Es wurden jedoch auch Embryonen beobachtet, die statt einem vollständigen Verlust retinaler Strukturen, lediglich verkleinerte Augen oder Augen mit einer Desorganisation der verschiedenen Retinaschichten, wie beispielsweise der Ganglienzellen, aufwiesen.

Eigene vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass XMAN1 in den Somiten exprimiert wird. Ebenso wurden XMAN1-Transkripte in Geweben nachgewiesen, welche im späteren Verlauf das Herz bilden. Daher kann spekuliert werden, dass XMAN1 ebenfalls eine Rolle während der Entwicklung und Differenzierung von Muskeln einnimmt. Diese These konnte in der vorliegenden Arbeit belegt werden, da gezeigt wurde, dass XMAN1 für die korrekte Bildung der Skelett- sowie Herzmuskulatur von Bedeutung ist. Eine Beeinträchtigung anderer Muskelarten konnte nicht beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass die hier beschriebenen Effekte spezifisch für quergestreifte Muskulatur sind.

Der Knockdown von XMAN1 führt zudem zu Embryonen, welche eine veränderte Herzmorphologie und Herzrhythmusstörungen zeigten. Vergleichbare Phänotypen wurden in Patienten berichtet, welche an einer sog. dilatativen Kardiomyopathie leiden (DCM; Taylor et al., 2006). Analog zu den hier beschriebenen XMAN1-Knockdown Embryonen (vgl. Abb. 5-12), zeigen DCM-Patienten eine Dilatation der Ventrikel, Herzrhythmusstörungen sowie eine gestörte Systole, da entsprechende Ventrikel eine stark verminderte Auswurfleistung aufwiesen. Im Grunde wird die DCM durch Mutationen in Genen verursacht, welche für zytoplasmatische oder Sarkomer-Proteine kodieren. Eine DCM kann jedoch auch als sekundärer Phänotyp bei genetischen Erkrankungen auftreten, welche die Skelettmuskulatur betreffen. Hierzu zählen vor allem die Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD) oder die Duchenne-Muskeldystrophie (Finsterer and Stollberger, 2000). Mutationen in Genen, welche für Emerin oder Laminaproteine kodieren, können so ebenfalls zu einer DCM führen, die von Erregungsleitungsstörungen des Herzens begleitet wird (Fatkin et al., 1999).

Die Herzmuskelzellen der XMAN1-Knockdownembryonen zeigten starke Deformierungen des Zellkerns, welche durch Ausstülpungen der Kernhülle gekennzeichnet waren. Ein solcher Phänotyp ist bereits im Kontext von Envelopathien / Laminopathien berichtet worden (Eriksson et al., 2003). Bei der EDMD kommt es aufgrund von Mutationen zu Defekten in Lamin A und dem Lamin-bindenden Protein Emerin. Die Zellkerne dieser Patienten zeigen zudem teils starke Deformierungen. Es ist daher naheliegend, dass ein Knockdown des Lamina-bindenden Proteins MAN1 zu gestörten Lamina-/Chromatinbindungen führt, welche die Integrität der Kernhülle verändern und somit entsprechende Deformieren zur Folge haben. Skelettmuskelzellen zeigten jedoch, trotz zahlreicher Desorganisation, keine vergleichbare Morphologie der Zellkerne (vgl. Abb. 5-10 bis 5-13). Da jedoch auch in EDMD-Patienten nur etwa 10% der Kerne Deformierungen zeigen, liegt die Vermutung nahe, dass diese aufgrund abweichender Schnittebenen der histologischen Schnitte der XMAN1-Knockdown Embryonen nicht beobachtet wurden (Fidzianska und Hausmanowa-Petrusewicz, 2003; Kandert et al., 2009).

Eine Beteiligung von MAN1 während der Herzentwicklung wurde anhand von MAN1-Knockout Mäusen postuliert, welche Defekte während des *Herz-Loopings* zeigten (Ishimura et al., 2008). Diese Studie beschrieb zudem, dass MAN1 vermutlich eine Rolle während der Ausbildung der Rechts-Links-Asymmetrie besitzt. Interessanterweise werden Gene, welche an der Rechts-Links-Asymmetrie beteiligt sind, von Signalwegen reguliert, die Smad-Proteine als Signalträger beinhalten (Wright, 2001). Da XMAN1 als Antagonist des BMP-Signalwegs beschrieben wurde (Osada et al., 2003) liegt die Vermutung daher nahe, dass es ein

Schlüsselement darstellt, welches die Aktivität der Smad-Proteine reguliert und dadurch sowohl am *Herz-Looping* als auch an der Bildung der Herzmuskulatur beteiligt ist.

Mutationen im *LEMD3*-Gen, welches im Menschen für MAN1 kodiert, führen zu Osteopoikilose und dem Buschke-Ollendorff-Syndrom. Die Pathologie dieser Erkrankungen betrifft dabei Knochen- und Hautgewebe (Hellemans et al., 2004). Eine Erklärung der Fehlregulation der Knochenbildung konnte durch Erkenntnisse erbracht werden, die zeigen dass entsprechende Mutationen zu einem Verlust des MAN1 C-Terminus führen. Diese Region ist in MAN1 für die Interaktion mit Smad-Proteinen verantwortlich (Osada et al., 2003). Eine gestörte MAN1-Smad-Interaktion kann daher zu einem erhöhten BMP-Signal und einer vermehrten Bildung von Knochengewebe führen. Da die XMAN1-Knockdown Embryonen in dieser Arbeit jedoch bereits etwa 10 Tage nach Befruchtung starben, konnte eine fehlregulierte Knochenbildung in *Xenopus* nicht nachgewiesen werden. Anhand dieser Embryonen wurden allerdings vergleichbare Hautabnormalitäten bestätigt (siehe Abb. 5-7 und 5-10). Da begleitende Herzfehler in den erwähnten menschlichen Erkrankungen bisher jedoch nicht berichtet wurden, deutet dies darauf hin, dass Funktionen von XMAN1 vermutlich Spezies-spezifisch sind.

Die XMAN1-Knockdown Embryonen zeigten eine gestörte Bildung der Skelettmuskulatur. Eine entsprechende Beteiligung des BMP-Signalwegs wurde in *Xenopus* bis dato jedoch nicht berichtet. Es ist daher wichtig, dass weitere Untersuchungen den möglichen Einfluss des BMP-Signalwegs auf die Bildung der Skelettmuskulatur analysieren. Um dies zu gewährleisten, ist es zunächst von großer Bedeutung die Funktionen anderer LEM-Domänen Proteine zu untersuchen. In diesem Sinne wurde die Funktion von Emerin in *Xenopus laevis* anhand von Rescue-Experimenten untersucht.

6.2. XMAN1 und Xemerin besitzen überlappende Funktionen während der Organentwicklung

6.2.1. Interaktionen von XMAN1 und Xemerin

Im Rahmen der Hypothese, dass die LEM-Domänen Proteine MAN1 und Emerin in *Xenopus laevis* überlappende/gemeinsame Funktionen besitzen, wurde auch überprüft ob beide Proteine miteinander interagieren und wie sich die intrazelluläre Lokalisation dieser Interaktionen gestaltet.

In vitro Studien konnten bereits bestätigen, dass XMAN1 und Xemerin in der Lage sind miteinander zu interagieren (Gareiss, 2006). Daher war es wichtig die intrazelluläre Lokalisation beider Proteine und deren Interaktionen zu untersuchen.

Betrachtet man zunächst LAP2, so bindet dieses bereits sehr früh während der Anaphase an Chromatin. Durch Interaktionen mit der Lamina wird zudem die korrekte Relokalisation der Kernhülle an das Chromatin gewährleistet (Schoft et al., 2003). Die detektierten Interaktionssignale zwischen XLAP2 und LaminA/B1 geben daher die Dynamik dieser Proteine während der Mitose optimal wieder (vgl. Abb. 5-33, a-e mit a''-e''). Es zeigte sich, dass XLAP2/LaminA/B1-Interaktionen während der gesamten Mitose bestehen bleiben. Lamin A bildet während der Mitose im Zytoplasma lösliche Oligomere, wohingegen B-Typ Lamine membrangebunden vorliegen. Da auch LAP2 während der Mitose mit Membranen assoziiert bleibt, zeigen die detektierten PLA-Signale vermutlich Interaktionen zwischen XLAP2 und Lamin B1 an. Daher eignen sich die PLA-Signale sehr gut um die Abläufe des Kernhüllauf- und -abbaus zu verfolgen. Da der Großteil der Membranbestandteile nach Abbau der Kernhülle konzentriert in ER-Membranen vorliegt, konnte erwartungsgemäß eine Zunahme der Interaktionssignale beobachtet werden. Eine Reduktion der Interaktionssignale zum Ende der Mitose lässt sich dadurch erklären, dass nach Bildung der Kernhülle Proteine wie LAP2 in der Kernhülle homogen verteilt vorliegen.

Interaktionssignale für XMAN1 und Xemerin in Interphasekernen wurden ausschließlich in der Kernhülle nachgewiesen. Dies deutet auf Funktionen von XMAN1/Xemerin-Komplexen nahe der Kernhülle hin. Jedoch waren für XMAN1 und Xemerin im Durchschnitt weniger Interaktionssignale als für XLAP2/LaminA/B1 detektierbar (vgl. Abb. 5-33 mit 5-34). Da der Proximity-Ligation-Assay jedoch maßgeblich von der Reinheit und der Konzentration der verwendeten Antikörper abhängig ist, können keine quantitativen Vergleiche zwischen XLAP2/XlaminA/B1- und XMAN1/Xemerin-Interaktionen getroffen werden. Dennoch ist anzunehmen, dass Interaktionen zwischen XLAP2 und

LaminA/B1 für die strukturelle Reorganisation der Kernhülle von Bedeutung sind. Interaktionen zwischen XMAN1 und Xemerin dienen vermutlich eher funktionellen Zwecken in Interphasekernen. Um diese These zu untermauern sind weiterführende Experimenten von Bedeutung, welche die Untersuchung der Verteilung definierter Chromatinbereiche, wie Eu- und Heterochromatin ermöglichen und somit einen Zusammenhang mit der Lokalisation der Interaktionssignale aufstellen. Interaktionssignale für XMAN1 und Xemerin waren erst nach Wiederaufbau der Kernhülle in dieser nachweisbar (siehe Abb. 5-34, e''). Dies deutet darauf hin, dass entsprechende Interaktionen nicht für die Reorganisation der Kernhülle von Bedeutung sind, sondern vielmehr für funktionelle Prozesse in Interphasekernen. Es wurde bereits spekuliert, dass Emerin mittels Bindung an MAN1 dessen Aktivität regulieren kann (Bengtsson, 2007). Ein Komplex, bestehend aus MAN1, Emerin und einer Proteinphosphatase reguliert so vermutlich die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, Smad-Proteinen oder BAF.

6.2.2. Xemerin kompensiert den Verlust von XMAN1 während der Organentwicklung

Überlappende Funktionen zwischen LEM-Domänen Proteinen wurden bereits in verschiedenen zellulären Prozessen sowie in verschiedenen Spezies diskutiert (Liu et al., 2003; Huber et al., 2009). Die hier erbrachten Resultate bekräftigen die Hypothese, dass die Funktionen von MAN1 und Emerin während der *Xenopus* Organentwicklung sehr ähnlich sind.

Mittels ektopischer Expression von Xemerin, war es möglich den Verlust von XMAN1 zu kompensieren und somit die wildtypische Entwicklung der Embryonen zu induzieren. Jedoch zeigten manche Rescue-Embryonen nur teilweise gebildete Augen oder Somiten (siehe Abb. 5-21 und 5-23). Dies deutet darauf hin, dass der Rescue stringent aber vermutlich nicht vollständig ist. Es kann daher angenommen werden, dass die injizierten Mengen der Xemerin-mRNA nicht ausreichend waren um einen vollständigen Rescue zu gewährleisten.

Wie bereits erwähnt, scheinen die Funktionen von XMAN1 während der Augen-Entwicklung auf der Regulation des BMP-Signalwegs zu basieren. Jedoch konnten vergleichbare Funktionen für Emerin bzw. eine Interaktion mit Smad-Proteinen bisher nicht nachgewiesen werden. Da Emerin dennoch in der Lage ist einen Rescue des Augenphänotyps zu induzieren, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden ob Emerin das Potential besitzt den BMP-Signalweg zu regulieren oder an Smad-Proteine zu binden.

In Bezug auf die Muskeldifferenzierung wurde anhand von C2C12-Myoblasten demonstriert, dass Emerin in der Lage ist die Funktionen anderer LEM-Domänen Proteine zu kompensieren (Huber et al., 2009). Dies steht im Einklang mit den hier beschriebenen Ergebnissen, da eine vorzeitige Expression von Xemerin in XMAN1-Knockdown Embryonen

die Somitenbildung ermöglichte. Interessanterweise konnte zudem gezeigt werden, dass Xemerin in der Lage ist, die korrekte Ausbildung der Sarkomere sowohl in Skelett- als auch Herzmuskelzellen zu induzieren.

Die hier beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Rescue der Organentwicklung unabhängig vom BMP-Signalweg stattgefunden hat. Daher ist es wichtig alternative Signalwege für XMAN1 und Xemerin in Betracht zu ziehen. Im diesem Sinne wurde die Beteiligung von XMAN1 an der Regulation gewebespezifischer Gene untersucht und der Zusammenhang mit Xemerin diskutiert.

6.3. Beteiligung von XMAN1 und Xemerin an der Regulation der Genexpression

Da eine fehlregulierte Entwicklung der Augen und verschiedener Muskelstrukturen beobachtet wurde, war es von entscheidender Wichtigkeit zu untersuchen, ob reduzierte Expressionsniveaus von XMAN1 die Expression gewebespezifischer Genen beeinflusst. Die Transkription von Genen ist während der *Xenopus*-Entwicklung bis zur Midblastulatransition (MBT) inhibiert. Dagegen bleibt die Translation maternaler mRNA jedoch während der Entwicklung unverändert (Newport and Kirschner, 1982). Effekte auf die Genregulation waren daher ausschließlich während der MBT oder in späteren Stadien zu beobachten (siehe Abb. 5-14).

Untersuchungen der Expression Augen-spezifischer Gene zeigten, dass Pax6, Crx und Otx2, drei Kandidaten des Photorezeptor-spezifischen Netzwerks aus Transkriptionsfaktoren fehlreguliert waren. Die reduzierte Expression von *pax6* steht dabei im Einklang mit den beobachteten Augenphänotypen, da frühere Studien zeigten, dass *pax6* ein Schlüsselgen während der Augen-Entwicklung sowie der Retinaorganisation darstellt (Rungger-Brändle, et al., 2010).

Interessanterweise zeigten die RT-PCR Analysen von *crx* und *otx2* keine reduzierte Expression, sondern ein verändertes Expressionsmuster. Während *crx* eine vorzeitige Expression während der MBT zeigte, wurde zum selben Zeitpunkt für *otx2* ein zusätzliches Amplifikat detektiert. Es ist anzunehmen, dass es sich bei diesem Amplifikat um eine ungespleißte Variante von *otx2* handelt. Dies deutet daher darauf hin, dass ein Knockdown von XMAN1 zu einem veränderten Spleißen führen kann. In der Tat können LEM-Domänen Proteine vermutlich an Spleißprozessen beteiligt sein, da beispielsweise Emerin in der Lage ist den Spleißfaktor YT521-B zu binden (Wilkinson et al., 2003).

Sowohl Crx als auch Otx2 sind für die Augen-Entwicklung essentiell. Crx ist beispielsweise ein Transkriptionsfaktor, welcher für die Differenzierung von Stäbchen und

Zapfen von Bedeutung ist (Chen et al., 1997). *Otx2* scheint für die allgemeine Augen-Entwicklung essentiell zu sein, da heterozygote Maus-Mutanten anormal gebildete Augen zeigten (Matsuo et al., 1995). Zudem wurde in *Xenopus* berichtet, dass *otx2* in der Genkaskade upstream von Augen-spezifischen Genen wie *pax6* agiert (Danno et al., 2008). In der Tat wurde in der vorliegenden Arbeit eine veränderte Expression Augen-spezifischer Gene aufgrund des XMAN1-Knockdowns nachgewiesen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass eine XMAN1-vermittelte Regulation von *otx2* die Expression von Genen, wie *pax6*, downstream in der Genkaskade beeinflussen kann.

Frühere Studien haben gezeigt, dass Myocardin als Hauptaktivator von Reporter genen der glatten sowie der Herzmuskulatur agiert (Wang et al., 2003). Daher scheinen die hier beschriebenen Herzphänotypen mit der beobachteten reduzierten Expression von *myocardin* übereinzustimmen. Es wurde zudem beschrieben, dass *myocardin* für die Differenzierung von glatter und Herzmuskulatur spezifisch ist, jedoch Gene wie *myoD*, welche für die Skelettmuskulatur spezifisch sind nicht aktiviert (Small et al., 2005). Dennoch zeigte auch *myoD* reduzierte Expressionsniveaus in den XMAN1-Knockdown Embryonen. Dies impliziert, dass XMAN1 die Expression von *myoD* auf einem *myocardin*-unabhängigen Weg reguliert.

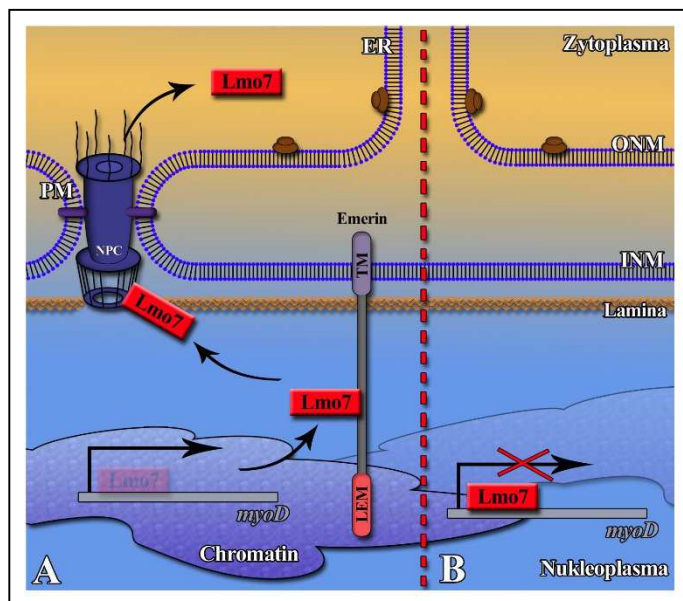


Abbildung 6-3: Potentieller Mechanismus zur Erklärung des Rescue der Somitenentwicklung. (A) Nach Bindung von Lmo7 an Emerin, kann Lmo7 aus dem Kern exportiert werden. Der Promotor von *myoD* liegt nun frei und kann aktiviert werden (B) Ohne Emerin kann Lmo7 den *myoD*-Promotor binden und inhibiert dadurch die Expression von *myoD*. Erläuterungen der Abkürzungen siehe Abb. 1-1.

Interessanterweise wurde in einer aktuellen Studien gezeigt, dass eine verminderte *Lmo7*-Expression in C2C12-Myoblasten zur Expression von *myf5* und *myoD* führte (Dedeic et al., 2011). Dennoch wurden bisher keine Interaktionen zwischen XMAN1 und *Lmo7* berichtet, welche die Regulation von *myoD* erklären würden. Emerin ist jedoch in der Lage *Lmo7* zu binden, wobei es dessen Aktivität inhibiert indem es den Export von *Lmo7* begünstigt (Holaska et al., 2006; siehe auch Abb. 6-3). Demzufolge könnte in den beschriebenen Rescue-

Embryonen, ektopisch exprimiertes Xemerin zu einer Inhibierung von Lmo7 und dadurch zu einer wiederhergestellten *myoD*-Expression geführt haben (siehe Abb. 6-3). Es kann somit angenommen werden, dass dies zum beobachteten Rescue der Somitenbildung führte.

Wie bereits erwähnt, ermöglicht die Inhibierung des BMP-Signalwegs in *Xenopus* vermutlich die Bildung der Augen. Bis heute gab es jedoch keine Berichte für Interaktionen von Emerin mit Smad-Proteinen. Da Xemerin jedoch in der Lage war die Bildung der Augen in den Rescue-Embryonen zu gewährleisten, kann spekuliert werden, dass der Rescue unabhängig von Smad-Proteinen induziert wurde. Diese Hypothese ist anzunehmen, da bereits gezeigt wurde, dass die Expression von *pax6* eine Inhibierung des Wnt/ β -catenin-Signalwegs voraussetzt (Smith et al., 2005). Selbst der Knockout von β -catenin führte zu einer ektopischen Bildung einer Linse (Smith et al., 2005). Interessanterweise ist Emerin ebenfalls in der Lage β -catenin zu binden und inhibiert dessen Aktivität durch den Export aus dem Kern (siehe auch Abb. 6-5; Markiewicz et al., 2006).

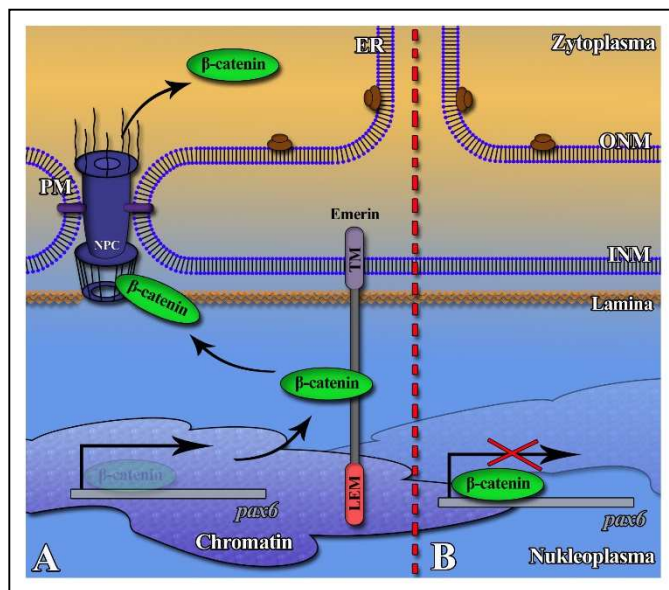


Abbildung 6-4: Schematische Darstellung des potentiellen Mechanismus der Augen-Entwicklung mittels Emerin. (A) Nach Bindung von β -catenin an Emerin, kann β -catenin aus dem Kern exportiert werden. Daraufhin liegt der Promotor von *pax6* frei und kann aktiviert werden. (B) Ohne den Einfluss von Emerin, kann β -catenin den *pax6*-Promotor binden und inhibiert die Expression von *pax6*. Erläuterungen der Abkürzungen siehe Abb. 1-1.

Es ist daher höchst wahrscheinlich, dass die Phänotypen in Folge des XMAN1-Knockdowns aufgrund eines veränderten BMP-Signalwegs auftreten, der Rescue jedoch durch die Emerin-vermittelte Inhibierung des Wnt/ β -catenin-Signalwegs erreicht wurde.

6.4. BAF besitzt essentielle Rollen während der Organentwicklung

Xemerin war in den Rescue-Embryonen in der Lage, den Verlust von XMAN1 zu kompensieren. Jedoch gibt es bisher keinerlei stichhaltige Hinweise auf eine Beteiligung von Emerin am BMP-Signalweg. Daher müssen andere Mechanismen bei der Organentwicklung in *Xenopus* eine Rolle spielen. Auf der Suche nach gemeinsamen Bindungspartnern von LEM-Domäne Proteinen trifft man auf den sogenannten Barrier-to-Autointegration Factor (BAF). BAF ist der wichtigste Bindungspartner der LEM-Domänen Proteine (Furukawa et al., 1999), besitzt die Fähigkeit durch Bindung an DNA die Chromatinorganisation zu modulieren und ist zudem in der Lage gewebespezifische Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise Crx, Otx2 und Pax6 zu binden (Wang et al., 2002). Es wurde zudem berichtet, dass eine direkte Interaktion von BAF mit Crx, dessen Transaktivierungsfähigkeit inhibiert und somit einen negativen Regulator von Crx darstellt. Mutationen in *crx*, welche in direktem Zusammenhang mit der Zapfen-Stäbchen-Dystrophie stehen, führen zu einer fehlerhaften Interaktion mit BAF und folglich einer erhöhten Transaktivierungsfähigkeit von Crx (Chen et al., 2002). BAF ist darüber hinaus in der Lage das Kernhüllprotein Nemp1 zu binden (Mamada et al., 2009). Interessanterweise führten veränderte Expressionsniveaus von Nemp1 ebenfalls zu Defekten während der Augen-Entwicklung (Mamada et al., 2009). Daher scheint BAF als Interaktionspartner der LEM-Domänen Proteine ein wichtiger Faktor während der Organentwicklung zu sein.

In der Tat konnten die vorliegenden Resultate bestätigen, dass BAF während der Organentwicklung in *Xenopus* essentiell ist. Der Morpholino-vermittelte Knockdown von BAF führte zu weitgehend identischen Phänotypen, wie sie bereits für XMAN1 beschrieben wurden. Die Phänotypen erschienen dabei sogar zum Teil schwerwiegender.

Dies war vor allem daran zu erkennen, dass alle mittels histologischer Schnitte untersuchten Embryonen kaum bzw. keine Augenstrukturen aufwiesen (siehe Abb. 5-37, C). Ebenso zeigten zahlreiche Zellen der Skelettmuskulatur statt eines Zellkerns Annulate Lamellae, was auf schwerwiegende Fehler bei der Bildung der Kernhülle am Ende der Mitose hinweist. Es wurde bereits berichtet, dass BAF eine wichtige Rolle während des Wiederaufbaus der Kernhülle spielt, da ein Knockdown von BAF zu einem Ausbleiben der Kernhüllbildung führte (vgl. 6.1.1.).

Diese Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass XMAN1 als Regulator in der Kernhülle agiert und BAF den essentiellen Signalfaktor darstellt, welcher in Signalwegen während der Organentwicklung benötigt wird. Eine Beteiligung von BAF während der Myogenese wurde

auch in *C. elegans* spekuliert, da BAF in dieser Spezies vermutlich für die Aufrechterhaltung der Integrität der Körperwandmuskulatur benötigt wird (Margalit et al., 2007).

XMAN1-Knockdown Embryonen zeigten zudem eine veränderte Expression Augenspezifischer Faktoren, wie Otx2, Crx und Pax6. Bedeutend ist in diesem Zusammenhang vor allem, dass BAF in der Lage ist mit diesen Transkriptionsfaktoren zu interagieren und zum Teil sogar deren Aktivität reguliert (Wang et al., 2002). Dies verdeutlicht, dass BAF in Signalwegen downstream von XMAN1 als essentiell erscheint. Ebenso verdichten sich die Hinweise, dass der hier beschriebene Rescue womöglich mittels Interaktionen zwischen Xemerin und BAF herbeigerufen wurde. Auf der Basis der hier beschriebenen Ergebnisse und im Hinblick auf die aktuelle Literatur, lässt sich daher folgendes Modell beschreiben (Abb. 6-5):

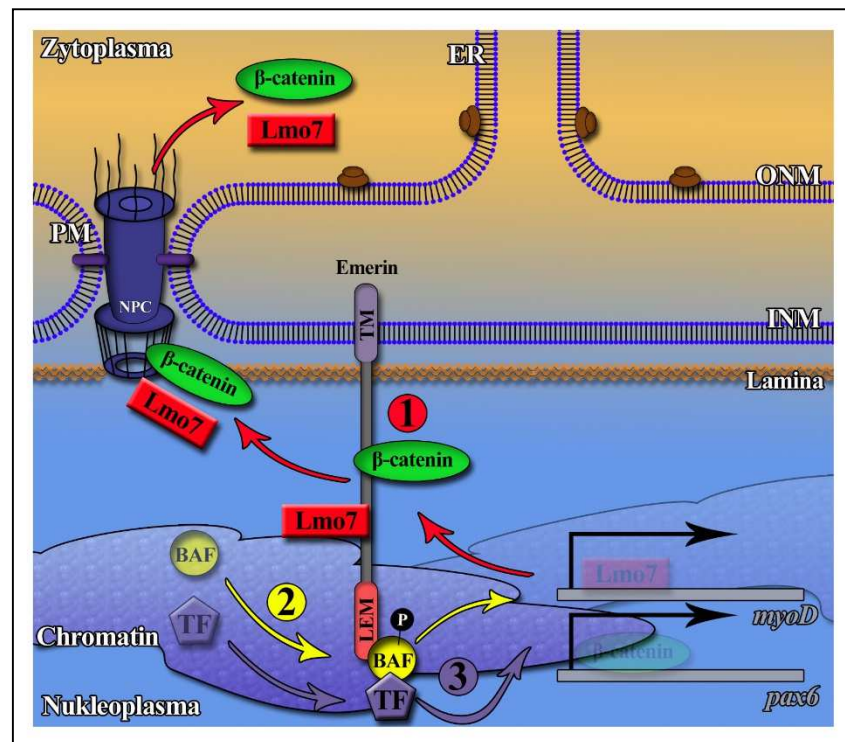


Abbildung 6-5: Schematische Darstellung der möglichen genregulatorischen Fähigkeiten von LEM-Domänen Proteinen, am Beispiel von Emerin, sowie die Involvierung von BAF während der Expression gewebespezifischer Gene. (1) Durch Bindung von Transkriptionsfaktoren, hier Lmo7 oder β -catenin, an LEM-Domänen Proteine, können die Promotoren der entsprechenden Gene aktiviert werden. (2) BAF ist in der Lage die LEM-Domäne zu binden. So kann BAF die Genexpression aktivieren. (3) LEM-Domänen Proteine selbst sowie auch BAF sind in der Lage die Aktivität von spezifischen Transkriptionsfaktoren zu regulieren und so die Aktivierung von Genen einzuleiten. Erläuterungen der Abkürzungen siehe Abb. 1-1.

1. Emerin ist in der Lage β -catenin und Lmo7 zu binden, welche für die Inhibierung der Expression von *pax6* und *myoD* verantwortlich sind (siehe 6.3.). Durch Bindung an Emerin und dem nachfolgenden Export aus dem Zellkern, liegen die Promotoren der entsprechenden Gene frei und könnten somit aktiviert werden (siehe Abb. 6-5, Punkt 1)

2. BAF selbst wurde als Protein beschrieben, welches in der Lage ist die Genregulation direkt zu beeinflussen. Es wurde zudem gezeigt, dass LEM-Domänen Proteine die Fähigkeit besitzen Proteinkinasen oder auch -phosphatasen zur Kernhülle zu rekrutieren und dadurch die Aktivität von BAF oder anderer Transkriptionsfaktoren zu regulieren (Asencio et al., 2012; Gorjanacz, 2013). Es kann daher angenommen werden, dass eine Bindung von BAF an die LEM-Domäne von Emerin, oder von LEM-Domänen Proteinen im Allgemeinen, zu dessen Aktivierung führt. Nachfolgend können spezifische Gene durch BAF aktiviert bzw. deren Expression erhöht werden (Abb. 6-5, Punkt 2)
3. Die Aktivierung von Gene erfolgt zumeist mittels spezifischer Transkriptionsfaktoren. Diese binden normalerweise innerhalb eines Transkriptions-Initiationskomplexes an die Promotoren. Wie bereits beschrieben, besitzen LEM-Domänen Proteine selbst die Fähigkeit die Aktivität von Transkriptionsfaktoren zu regulieren (Abb. 6-5, Punkt 2). Jedoch ist auch BAF selbst an der Regulation spezifischer Transkriptionsfaktoren beteiligt (Wang et al., 2002). Auf diesem Wege ist es daher möglich, dass BAF indirekt zu einer Aktivierung bestimmter Gene beiträgt (Abb. 6-5, Punkt 3).

6.5. Abschließende Anmerkungen und Ausblick

Obwohl die regulatorischen Interaktionen von LEM-Domänen Proteinen mit anderen Faktoren teilweise sehr komplex erscheinen, demonstrieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass MAN1 und Emerin höchstwahrscheinlich als Proteine agieren, welche nahe der Kernhülle definierte Signalwege upstream der beschriebenen gewebespezifischen Genen regulieren. Es kann daher angenommen werden, dass MAN1, oder auch Emerin, regulatorische Komplexe im Bereich der Kernhülle ausbilden. Dies kann entweder direkt mit spezifischen Transkriptionsfaktoren oder indirekt mittels BAF geschehen und führt zur korrekten Expression gewebespezifischer Gene.

Um diese Hinweise genauer eingrenzen zu können, sind weitere Untersuchungen notwendig um die Beteiligung von BAF bzw. der LEM-Domäne an Signalwegen während der Organentwicklung zu validieren. Rescue-Experimente in denen eine mRNA injiziert wird, die für eine tranchierte Variante von Xemerin (ohne LEM-Domäne) codiert, können Aufschlüsse darüber geben ob die LEM-Domäne für den Rescue und somit auch für Signalwege während der Organentwicklung essentiell ist.

Es stellt sich auch die Frage, ob es in Folge eines simultanen Knockdowns von XMAN1 und BAF sowie der zeitgleichen Expression von Xemerin zu einem Rescue der Organentwicklung kommt. Ist dies der Fall, so kann angenommen werden, dass weder die

LEM-Domäne noch BAF am Rescue beteiligt sind und die Organentwicklung über alternative Wege wiedergestellt wird. Kommt es jedoch zu nicht zu einem Rescue, so könnte das in dieser Arbeit vorgeschlagene Modell angenommen werden und eine Beteiligung der LEM-Domäne bzw. von BAF ist sehr wahrscheinlich.

Im Rahmen der Untersuchung der bei der Organentwicklung zugrundeliegenden Mechanismen ist es unabdingbar zu wissen, wie einzelne Faktoren der entsprechenden Signalwege aktiviert und reguliert werden. Wie bereits erwähnt wurde, besitzen LEM-Domänen Proteine das Potential Proteinkinasen oder auch –phosphatasen zur Kernhülle zu rekrutieren um dadurch die Aktivität von Transkriptionsfaktoren oder auch BAF zu regulieren. Eine Untersuchung des Phosphorylierungsgrads dieser Faktoren wie z.B. der Smad-Proteine oder BAF mittels Isoelektrischer Fokussierung kann daher Aufschlüsse über deren Regulationsmechanismen geben. Ebenso kann untersucht werden ob der Knockdown von XMAN1 einen Effekt auf die Phosphorylierung der genannten Faktoren hat. Entsprechende Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit ergaben bisher leider keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Es gab jedoch erste Hinweise darauf, dass es in XMAN1-Knockdown Embryonen zu einer verminderten Phosphorylierung oder auch Dephosphorylierung von BAF kam. Eine Wiederholung dieser Analysen, auch im Zusammenhang anderer hier genannter Transkriptionsfaktoren ist daher unabdingbar. Als wichtigster Regulator von BAF gilt die sogenannte *Vaccinia-related Kinase 1* (VRK-1, Gorjanacz, 2013). Entsprechende Knockdown-Studien mit Verwendung VRK-spezifischer Morpholinos im Zusammenhang mit den beschriebenen Phosphorylierungsuntersuchungen können Hinweise darauf geben, ob eine Phosphorylierung von BAF während der Organentwicklung von Bedeutung ist.

In Folge dieser Arbeit stellt sich auch die Frage, ob der Knockdown von BAF zu vergleichbaren Effekten auf die Expression der beschriebenen Gene führt. Zum anderen sollte in zukünftigen Projekten anhand von RT-PCR Analysen untersucht werden ob der Xemerin-vermittelte Rescue zu einer Wiederherstellung der Expression der entsprechenden Gene führt. Diese Untersuchungen bieten die Möglichkeit ein besseres Verständnis der genregulatorischen Netzwerke downstream von XMAN1 und Xemerin und somit die Rolle von LEM-Domänen Proteinen während der Organogenese zu verstehen.

Weitergehende RT-PCR-Analysen können zudem den Einfluss von LEM-Domänen Proteine auf weitere gewebespezifische Gene untersuchen und somit zu einem besseren Verständnis der Genregulation verhelfen. Um dies in einem größeren Maßstab durchführen zu können, den experimentellen Aufwand dabei jedoch möglichst gering zu halten, empfiehlt es

sich, DNA-Microarrays anhand der verschiedenen Knockdown- sowie Rescue-Embryonen durchzuführen.

Verschiedene Methoden zur Bildgebung der embryonalen Herzanatomie, ergaben in der vorliegenden Arbeit leider keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Die erhaltenen Daten verdeutlichen dennoch die Potentiale der verschiedenen Methoden. Da die Whole mount Immunfluoreszenzlokalisierung bereits hardwareseitig die methodischen Grenzen erreichte, scheint die NMR-Spektroskopie zur Untersuchung der Herzanatomie das größte Potential zu bieten. Hier lassen sich durch Verbesserungen der Hardware (anderer Spulenaufbau oder kleinere Spulen/Probenröhrchen) und folglich auch der Software (angepasste Spin-Echo-Messesequenzen) vermutlich die besten Resultate erzielen.

Da alle hier beschriebenen Knockdown-Phänotypen auch in Bezug zur Pathologie bekannter Envelopathien stehen, können die erhaltenen Resultate einen weitgehenden Einblick in die pathogenetische Ursache der entsprechenden Krankheiten geben. Die vorliegende Arbeit zeigt insbesondere, dass sich *Xenopus laevis* als exzellenter Modell-Organismus zur Untersuchung bekannter Envelopathien eignet. Die große Homologie der Phänotypen zu denen menschlicher Erkrankungen ermöglicht es, dass zukünftige Resultate in *Xenopus* direkt auf Mechanismen im Menschen wiedergespiegelt werden können.

7. Literaturverzeichnis

- Aaronson, R. P. and Blobel, G. (1975). Isolation of nuclear-pore complexes in association with a lamina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**, 1007-1011.
- Alsheimer, M., von Glasenapp, E., Hock, R. and Benavente, R. (1999). Architecture of the nuclear periphery of rat pachytene spermatocytes: Distribution of nuclear envelope proteins in relation to synaptonemal complex attachment sites. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 1235-1245.
- Anderson, D. J. and Hetzer, M. W. (2008). The life cycle of the metazoan nuclear envelope. *Current Opinion in Cell Biology* **20**, 386-392.
- Apel, E. D., Lewis, R. M., Grady, R. M. and Sanes, J. R. (2000). Syne-1, a dystrophin- and klarsicht-related protein associated with synaptic nuclei at the neuromuscular junction. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 31986-31995.
- Asencio, C., Davidson, I. F., Santarella-Mellwig, R., Thi Bach Nga, L.-H., Mall, M., Wallenfang, M. R., Mattaj, I. W. and Gorjanacz, M. (2012). Coordination of Kinase and Phosphatase Activities by Lem4 Enables Nuclear Envelope Reassembly during Mitosis. *Cell* **150**, 122-135.
- Ashery-Padan, R., Weiss, A. M., Feinstein, N. and Gruenbaum, Y. (1997). Distinct regions specify the targeting of otefin to the nucleoplasmic side of the nuclear envelope. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 2493-2499.
- Bakay, M., Wang, Z. Y., Melcon, G., Schiltz, L., Xuan, J. H., Zhao, P., Sartorelli, V., Seo, J., Pegoraro, E., Angelini, C. et al. (2006). Nuclear envelope dystrophies show a transcriptional fingerprint suggesting disruption of Rb-MyoD pathways in muscle regeneration. *Brain* **129**, 996-1013.
- Barkan, R., Zahand, A. J., Sharabi, K., Lamm, A. T., Feinstein, N., Haithcock, E., Wilson, K. L., Liu, J. and Gruenbaum, Y. (2012). Ce-emerin and LEM-2: essential roles in *Caenorhabditis elegans* development, muscle function, and mitosis. *Molecular Biology of the Cell* **23**, 543-552.
- Barton, R. M. and Worman, H. J. (1999a). The association of prenylated prelamin A and Narf, a novel nuclear protein. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 290A-290A.
- Barton, R. M. and Worman, H. J. (1999b). Prenylated prelamin A interacts with Narf, a novel nuclear protein. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 30008-30018.
- Baur, T., Ramadan, K., Schlundt, A., Kartenbeck, J. and Meyer, H. H. (2007). NSF- and SNARE-mediated membrane fusion is required for nuclear envelope formation and completion of nuclear pore complex assembly in *Xenopus laevis* egg extracts. *Journal of Cell Science* **120(16)**, 2895-2903.
- Beck, L. A., Hosick, T. J. and Sinensky, M. (1990). Isoprenylation is required for the processing of the lamin-a precursor. *Journal of Cell Biology* **110**, 1489-1499.
- Belmont, A. S., Bignone, F. and Tso, P. O. P. (1986). The relative intranuclear positions of barr bodies in xxx nontransformed human-fibroblasts. *Experimental Cell Research* **165**, 165-179.
- Benavente, R. and Krohne, G. (1985). Change of karyoskeleton during spermatogenesis of xenopus - expression of lamin liv, a nuclear lamina protein-specific for the male germ line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 6176-6180.
- Benavente, R., Krohne, G. and Franke, W. W. (1985). Cell type-specific expression of nuclear lamina proteins during development of xenopus-laevis. *Cell* **41**, 177-190.
- Bengtsson, L. (2007). What MAN1 does to the smads - TGF beta/BMP signaling and the nuclear envelope. *Febs Journal* **274**, 1374-1382.
- Bengtsson, L. and Wilson, K. L. (2004). Multiple and surprising new functions for emerin, a nuclear membrane protein. *Current Opinion in Cell Biology* **16**, 73-79.
- Bengtsson, L. and Wilson, K. L. (2006). Barrier-to-autointegration factor phosphorylation on Ser-4 regulates emerin binding to lamin A in vitro and emerin localization in vivo. *Molecular Biology of the Cell* **17**, 1154-1163.
- Bengtsson, L. and Otto, H. (2008). LUMA interacts with emerin and influences its distribution at the inner nuclear membrane. *Journal of Cell Science* **121**, 536-548.
- Berger, R., Theodor, L., Shoham, J., Gokkel, E., BrokSimoni, F., Avraham, K. B., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Rechavi, G. and Simon, A. J. (1996). The characterization and localization of the mouse thymopoietin lamina-associated polypeptide 2 gene and its alternatively spliced products. *Genome Research* **6**, 361-370.
- Biamonti, G., Giacca, M., Perini, G., Contreas, G., Zentilin, L., Weighardt, F., Guerra, M., Dellavalle, G., Saccone, S., Riva, S. et al. (1992). The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome-19 which replicates at the onset of s-phase. *Molecular and Cellular Biology* **12**, 3499-3506.
- Bione, S., Maestrini, E., Rivella, S., Mancini, M., Regis, S., Romeo, G. and Toniolo, D. (1994). Identification of a novel x-linked gene responsible for emery-dreifuss muscular-dystrophy. *Nature Genetics* **8**, 323-327.

- Bird, A. C.** (1995). Retinal photoreceptor dystrophies LL-Edward-Jackson-Memorial-Lecture. *American Journal of Ophthalmology* **119**, 543-562.
- Birney, E., Kumar, S. and Krainer, A. R.** (1993). Analysis of the rna-recognition motif and rs and rgg domains - conservation in metazoan pre-messenger-rna splicing factors. *Nucleic Acids Research* **21**, 5803-5816.
- Bossie, C. A. and Sanders, M. M.** (1993). A cDNA from drosophila-melanogaster encodes a lamin c-like intermediate filament protein. *Journal of Cell Science* **104**, 1263-1272.
- Brachner, A., Reipert, S., Foisner, R. and Gotzmann, J.** (2005). LEM2 is a novel MAN1-related inner nuclear membrane protein associated with A-type lamins. *Journal of Cell Science* **118**, 5797-5810.
- Brachner, A., Braun, J., Ghodgaonkar, M., Castor, D., Zlopasa, L., Ehrlich, V., Jiricny, J., Gotzmann, J., Knasmueller, S. and Foisner, R.** (2012). The endonuclease Ankle1 requires its LEM and GIY-YIG motifs for DNA cleavage in vivo. *Journal of Cell Science* **125**, 1048-1057.
- Bradley, C. M., Ronning, D. R., Ghirlando, R., Craigie, R. and Dyda, F.** (2005). Structural basis for DNA bridging by barrier-to-autointegration factor. *Nature Structural & Molecular Biology* **12**, 935-936.
- Breckenridge, R. A., Mohun, T. J. and Amaya, E.** (2001). A Role for BMP Signalling in Heart Looping Morphogenesis in Xenopus. *Developmental Biology* **232**, 191-203.
- Bridger, J. M. and Kill, I. R.** (2004). Aging of Hutchinson-Gilford progeria syndrome fibroblasts is characterised by hyperproliferation and increased apoptosis. *Experimental Gerontology* **39**, 717-724.
- Broers, J. L. V., Peeters, E. A. G., Kuijpers, H. J. H., Endert, J., Bouten, C. V. C., Oomens, C. W. J., Baaijens, F. P. T. and Ramaekers, F. C. S.** (2004). Decreased mechanical stiffness in LMNA-/- cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies. *Human Molecular Genetics* **13**, 2567-2580.
- Buch, C., Lindberg, R., Figueroa, R., Gudise, S., Onischenko, E. and Hallberg, E.** (2009). An integral protein of the inner nuclear membrane localizes to the mitotic spindle in mammalian cells. *Journal of Cell Science* **122**, 2100-2107.
- Burke, B. and Stewart, C. L.** (2002). Life at the edge: The nuclear envelope and human disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**, 575-585.
- Cai, M., Huang, Y., Zheng, R., Wei, S. Q., Ghirlando, R., Lee, M. S., Craigie, R., Gronenborn, A. M. and Clore, G. M.** (1998). Solution structure of the cellular factor BAF responsible for protecting retroviral DNA from autointegration. *Nature Structural Biology* **5**, 903-909.
- Cai, M. L., Huang, Y., Ghirlando, R., Wilson, K. L., Craigie, R. and Clore, G. M.** (2001). Solution structure of the constant region of nuclear envelope protein LAP2 reveals two LEM-domain structures: one binds BAF and the other binds DNA. *Embo Journal* **20**, 4399-4407.
- Chen, S. M., Wang, Q. L., Nie, Z. Q., Sun, H., Lennon, G., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. and Zack, D. J.** (1997). Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron* **19**, 1017-1030.
- Chung, K. H., Park, Y. G., Noh, E. R. and Chun, Y. W.** (1989). Transformation of populus-alba x populus-glandulosa by agrobacterium-rhizogenes. *Journal of Korean Forestry Society* **78**, 372-380.
- Cohen, M., Lee, K. K., Wilson, K. L. and Gruenbaum, Y.** (2001). Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional evolution of the nuclear lamina. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 41-47.
- Corrigan, D. P., Kuszczak, D., Rusinol, A. E., Thewke, D. P., Hrycyna, C. A., Michaelis, S. and Sinensky, M. S.** (2005). Prelamin A endoproteolytic processing in vitro by recombinant Zmpste24. *Biochemical Journal* **387**, 129-138.
- Crisp, M., Liu, Q., Roux, K., Rattner, J. B., Shanahan, C., Burke, B., Stahl, P. D. and Hodzic, D.** (2006). Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *Journal of Cell Biology* **172**, 41-53.
- Dabauvalle, M. C. and Scheer, U.** (1991). Assembly of nuclear-pore complexes in xenopus egg extract. *Biology of the Cell* **72**, 25-29.
- Dabauvalle, M. C., Loos, K., Merkert, H. and Scheer, U.** (1991). Spontaneous assembly of pore complex-containing membranes (annulate lamellae) in xenopus egg extract in the absence of chromatin. *Journal of Cell Biology* **112**, 1073-1082.
- Dabauvalle, M. C., Muller, E., Ewald, A., Kress, W., Krohne, G. and Muller, C. R.** (1999). Distribution of emerin during the cell cycle. *European Journal of Cell Biology* **78**, 749-756.
- Danno, H., Michiue, T., Hitachi, K., Yukita, A., Ishiura, S. and Asashima, M.** (2008). Molecular links among the causative genes for ocular malformation: Otx2 and Sox2 coregulate Rax expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 5408-5413.
- Dauer, W. T. and Worman, H. J.** (2009). The Nuclear Envelope as a Signaling Node in Development and Disease. *Developmental Cell* **17**, 626-638.
- Davies, B. S. J., Fong, L. G., Yang, S. H., Coffinier, C. and Young, S. G.** (2009). The Posttranslational Processing of Prelamin A and Disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **10**, 153-174.
- Debus, E., Weber, K. and Osborn, M.** (1983). Monoclonal antibodies to desmin, the muscle-specific intermediate filament proteins. *Embo Journal* **2**, 2305-2312.

- Dechat, T., Adam, S. A., Taimen, P., Shimi, T. and Goldman, R. D. (2010). Nuclear Lamins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**.
- Dechat, T., Gotzmann, J., Stockinger, A., Harris, C. A., Talle, M. A., Siekierka, J. J. and Foisner, R. (1998). Detergent-salt resistance of LAP2 alpha in interphase nuclei and phosphorylation-dependent association with chromosomes early in nuclear assembly implies functions in nuclear structure dynamics. *Embo Journal* **17**, 4887-4902.
- Dechat, T., Pflieger, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D. K., Solimando, L. and Goldman, R. D. (2008). Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes & Development* **22**, 832-853.
- Dechat, T., Gajewski, A., Korbei, B., Gerlich, D., Daigle, N., Haraguchi, T., Furukawa, K., Ellenberg, J. and Foisner, R. (2004). LAP2 alpha and BAF transiently localize to telomeres and specific regions on chromatin during nuclear assembly. *Journal of Cell Science* **117**, 6117-6128.
- Decostre, V., Ben Yaou, R. and Bonne, G. (2005). Laminopathies affecting skeletal and cardiac muscles: clinical and pathophysiological aspects. *Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology / edited by the Gaetano Conte Academy for the study of striated muscle diseases* **24**, 104-109.
- Dedeic, Z., Cetera, M., Cohen, T. V. and Holaska, J. M. (2011). Emerin inhibits Lmo7 binding to the Pax3 and MyoD promoters and expression of myoblast proliferation genes. *Journal of Cell Science* **124**, 1691-1702.
- DeRobertis, E. M. and Sasai, Y. (1996). A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature* **380**, 37-40.
- Dorner, D., Vlcek, S., Foeger, N., Gajewski, A., Makolm, C., Gotzmann, J., Hutchison, C. J. and Foisner, R. (2006). Lamina-associated polypeptide 2 alpha regulates cell cycle progression and differentiation via the retinoblastoma-E2F pathway. *Journal of Cell Biology* **173**, 83-93.
- Dreger, C. K., Konig, A. R., Spring, H., Lichter, P. and Herrmann, H. (2002). Investigation of nuclear architecture with a domain-presenting expression system. *Journal of Structural Biology* **140**, 100-115.
- Dreger, M., Bengtsson, L., Schoneberg, T., Otto, H. and Hucho, F. (2001). Nuclear envelope proteomics: Novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 11943-11948.
- Dye, B. T. and Patton, J. G. (2001). An RNA recognition motif (RRM) is required for the localization of PTB-associated splicing factor (PSF) to subnuclear speckles. *Experimental Cell Research* **263**, 131-144.
- Emery, A. E. H. (1989). Emery-dreifuss syndrome. *Journal of Medical Genetics* **26**, 637-641.
- Emery, A. E. H. (2000). Emery-Dreifuss muscular dystrophy - a 40 year retrospective. *Neuromuscular Disorders* **10**, 228-232.
- Emery, A. E. H. and Dreifuss, F. E. (1966). Unusual type of benign x-linked muscular dystrophy. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* **29**, 338-&.
- Eriksson, M., Brown, W. T., Gordon, L. B., Glynn, M. W., Singer, J., Scott, L., Erdos, M. R., Robbins, C. M., Moses, T. Y., Berglund, P. et al. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* **423**, 293-298.
- Ewald, A., Hofbauer, S., Dabauvalle, M. C. and Lourim, D. (1997). Preassembly of annulate lamellae in egg extracts inhibits nuclear pore complex formation, but not nuclear membrane assembly. *European Journal of Cell Biology* **73**, 259-269.
- Fairley, E. A. L., Kendrick-Jones, J. and Ellis, J. A. (1999). The Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype arises from aberrant targeting and binding of emerin at the inner nuclear membrane. *Journal of Cell Science* **112**, 2571-2582.
- Farnsworth, C. C., Gelb, M. H. and Glomset, J. A. (1990). Identification of geranylgeranyl-modified proteins in hela-cells. *Science* **247**, 320-322.
- Fatkin, D., MacRae, C., Sasaki, T., Wolff, M. R., Porcu, M., Frenneaux, M., Atherton, J., Vidaillet, H. J., Spudich, S., De Girolami, U. et al. (1999). Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *New England Journal of Medicine* **341**, 1715-1724.
- Fidzianska, A. and Hausmanowa-Petrusewicz, I. (2003). Architectural abnormalities in muscle nuclei. Ultrastructural differences between X-linked and autosomal dominant forms of EDMD. *Journal of the Neurological Sciences* **210**, 47-51.
- Finsterer, J. and Stollberger, C. (2000). Cardiac involvement in primary myopathies. *Cardiology* **94**, 1-11.
- Foisner, R. (2001). Inner nuclear membrane proteins and the nuclear lamina. *Journal of Cell Science* **114**, 3791-3792.
- Foisner, R. and Gerace, L. (1993). Integral membrane-proteins of the nuclear-envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell* **73**, 1267-1279.

- Forne, I., Carrascal, M., Martinez-Lostao, L., Abian, J., Rodriguez-Sanchez, J. L. and Juarez, C.** (2003). Identification of the autoantigen HB as the barrier-to-autointegration factor. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 50641-50644.
- Freund, C. L., GregoryEvans, C. Y., Furukawa, T., Papaioannou, M., Looser, J., Ploder, L., Bellingham, J., Ng, D., Herbrick, J. A. S., Duncan, A. et al.** (1997). Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor-specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor. *Cell* **91**, 543-553.
- Fridkin, A., Penkner, A., Jantsch, V. and Gruenbaum, Y.** (2009). SUN-domain and KASH-domain proteins during development, meiosis and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**, 1518-1533.
- Fridkin, A., Mills, E., Margalit, A., Neufeld, E., Lee, K. K., Feinstein, N., Cohen, M., Wilson, K. L. and Gruenbaum, Y.** (2004). Matefin, a *Caenorhabditis elegans* germ line-specific SUN-domain nuclear membrane protein, is essential for early embryonic and germ cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 6987-6992.
- Furukawa, K.** (1999). LAP2 binding protein 1 (L2BP1/BAF) is a candidate mediator of LAP2-chromatin interaction. *Journal of Cell Science* **112**, 2485-2492.
- Furukawa, K. and Hotta, Y.** (1993). cDNA cloning of a germ-cell specific lamin-b3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic-cells. *Embo Journal* **12**, 97-106.
- Furukawa, K., Sugiyama, S., Osouda, S., Goto, H., Inagaki, M., Horigome, T., Omata, S., McConnell, M., Fisher, P. A. and Nishida, Y.** (2003). Barrier-to-autointegration factor plays crucial roles in cell cycle progression and nuclear organization in *Drosophila*. *Journal of Cell Science* **116**, 3811-3823.
- Gareiss, M.** (2006). Molekulare Charakterisierung und entwicklungsspezifische Expression der Kernmembranproteine Emerin und MAN1 im Tiermodell *Xenopus laevis*. *Dissertation*.
- Gareiss, M., Eberhardt, K., Kruger, E., Kandert, S., Bohm, C., Zentgraf, H., Muller, C. R. and Dabauvalle, M. C.** (2005). Emerin expression in early development of *Xenopus laevis*. *European Journal of Cell Biology* **84**, 295-309.
- Gayathri, N., Taly, A. B., Sinha, S., Suresh, T. G. and Gorai, D.** (2006). Emery Dreifuss muscular dystrophy: A clinico-pathological study. *Neurology India* **54**, 197-199.
- Goldman, R. D., Shumaker, D. K., Erdos, M. R., Eriksson, M., Goldman, A. E., Gordon, L. B., Gruenbaum, Y., Khuon, S., Mendez, M., Varga, R. et al.** (2004). Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 8963-8968.
- Gorjanacz, M.** (2013). LEM-4 promotes rapid dephosphorylation of BAF during mitotic exit. *Nucleus-Austin* **4**, 14-17.
- Greenspan, A. and Azouz, E. M.** (1999). Bone dysplasia series - Melorheostosis: review and update. *Canadian Association of Radiologists Journal-Journal De L Association Canadienne Des Radiologistes* **50**, 324-330.
- Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R. D., Shumaker, D. K. and Wilson, K. L.** (2005). The nuclear lamina comes of age. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 21-31.
- Gruenbaum, Y., Goldman, R. D., Meyuhas, R., Mills, E., Margalit, A., Fridkin, A., Dayani, Y., Prokocimer, M. and Enosh, A.** (2003). The nuclear lamina and its functions in the nucleus. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 226* **226**, 1-62.
- Haraguchi, T., Koujin, T., Segura-Totten, M., Lee, K. K., Matsuoka, Y., Yoneda, Y., Wilson, K. L. and Hiraoka, Y.** (2001). BAF is required for emerin assembly into the reforming nuclear envelope. *Journal of Cell Science* **114**, 4575-4585.
- Haraguchi, T., Holaska, J. M., Yamane, M., Koujin, T., Hashiguchi, N., Mori, C., Wilson, K. L. and Hiraoka, Y.** (2004). Emerin binding to Btf, a death-promoting transcriptional repressor, is disrupted by a missense mutation that causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *European Journal of Biochemistry* **271**, 1035-1045.
- Harris, N. G., Jones, H. C. and Patel, S.** (1994). Ventricle shunting in young h-tx rats with inherited congenital hydrocephalus - a quantitative histological study of cortical grey-matter. *Childs Nervous System* **10**, 293-301.
- Hata, A., Seoane, J., Lagna, G., Montalvo, E., Hemmati-Brivanlou, A. and Massague, J.** (2000). OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-Smad and Olf signaling pathways. *Cell* **100**, 229-240.
- Hellemans, J., Preobrazhenska, O., Willaert, A., Debeer, P., Verdonk, P. C. M., Costa, T., Janssens, K., Menten, B., Van Roy, N., Vermeulen, S. J. T. et al.** (2004). Loss-of-function mutations in LEMD3 result in osteopoikilosis, Buschke-Ollendorff syndrome and melorheostosis. *Nature Genetics* **36**, 1213-1218.
- Hirano, Y., Segawa, M., Ouchi, F. S., Yamakawa, Y., Furukawa, K., Takeyasu, K. and Horigome, T.** (2005). Dissociation of emerin from barrier-to-autointegration factor is regulated through mitotic phosphorylation of emerin in a *Xenopus* egg cell-free system. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 39925-39933.

- Hiraoka, Y., Maekawa, H., Asakawa, H., Chikashige, Y., Kojidani, T., Osakada, H., Matsuda, A. and Haraguchi, T. (2011). Inner nuclear membrane protein Imal is dispensable for intranuclear positioning of centromeres. *Genes to Cells* **16**, 1000-1011.
- Hodzic, D. M., Yeater, D. B., Bengtsson, L., Otto, H. and Stahl, P. D. (2004). Sun2 is a novel mammalian inner nuclear membrane protein. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 25805-25812.
- Holaska, J. M., Kowalski, A. K. and Wilson, K. L. (2004). Emerin caps the pointed end of actin filaments: Evidence for an actin cortical network at the nuclear inner membrane. *Plos Biology* **2**, 1354-1362.
- Holaska, J. M., Rais-Bahrami, S. and Wilson, K. L. (2006). Lmo7 is an emerin-binding protein that regulates the transcription of emerin and many other muscle-relevant genes. *Human Molecular Genetics* **15**, 3459-3472.
- Holaska, J. M., Lee, K. K., Kowalski, A. K. and Wilson, K. L. (2003). Transcriptional repressor germ cell-less (GCL) and barrier to autointegration factor (BAF) compete for binding to emerin in vitro. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 6969-6975.
- Huber, M. D., Guan, T. and Gerace, L. (2009). Overlapping Functions of Nuclear Envelope Proteins NET25 (Lem2) and Emerin in Regulation of Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling in Myoblast Differentiation. *Molecular and Cellular Biology* **29**, 5718-5728.
- Hughes, M. K. and Hughes, A. L. (1993). Evolution of duplicate genes in a tetraploid animal, xenopus-laevis. *Molecular Biology and Evolution* **10**, 1360-1369.
- Ishimura, A., Chida, S. and Osada, S.-I. (2008). Man1, an Inner Nuclear Membrane Protein, Regulates Left-Right Axis Formation by Controlling Nodal Signaling in a Node-Independent Manner. *Developmental Dynamics* **237**, 3565-3576.
- Ishimura, A., Ng, J. K., Taira, M., Young, S. G. and Osada, S.-i. (2006). Man1, an inner nuclear membrane protein, regulates vascular remodeling by modulating transforming growth factor beta signaling. *Development* **133**, 3919-3928.
- Jahn, R. and Scheller, R.H. (2006). SNAREs - engines for membrane fusion. *Nature Reviews of Molecular Cell Biology* **7**(9), 631-643.
- Johnson, B. R., Nitta, R. T., Frock, R. L., Mounkes, L., Barbie, D. A., Stewart, C. L., Harlow, E. and Kennedy, B. K. (2004). A-type lamins regulate retinoblastoma protein function by promoting subnuclear localization and preventing proteasomal degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9677-9682.
- Kandert, S., Wehnert, M., Müller, C.R., Buendia, B. and Dabauvalle, M.-C. (2009). Impaired nuclear functions lead to increased senescence and inefficient differentiation in human myoblasts with a dominant p.R545C mutation in the LMNA gene. *European Journal of Cell Biology* **88**, 593-608.
- Kessel, R. G. (1989). The annulate lamellae from obscurity to spotlight. *Electron Microscopy Reviews* **2**, 257-348.
- Kessel, R. G. (1992). Annulate lamellae a last frontier in cellular organelles. Jeon, K. W. and M. Friedlander (Ed.). *International Review of Cytology*, Vol. 133. Ix+319p. Academic Press, Inc.: San Diego, California, USA; London, England, Uk. Illus, 43-120.
- Kim, G. H., Dy, L. C., Caldemeyer, K. S. and Mirowski, G. W. (2003). Buschke-Ollendorff syndrome. *Journal of the American Academy of Dermatology* **48**, 600-601.
- King, M. C., Drivas, T. G. and Blobel, G. (2008). A network of nuclear envelope membrane proteins linking centromeres to microtubules. *Cell* **134**, 427-438.
- Laguri, C., Gilquin, B., Wolff, N., Romi-Lebrun, R., Courchay, K., Callebaut, I., Worman, H. J. and Zinn-Justin, S. (2001). Structural characterization of the LEM motif common to three human inner nuclear membrane proteins. *Structure* **9**, 503-511.
- Lallemand-Breitenbach, V. and de The, H. (2010). PML Nuclear Bodies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**.
- Lang, C., Paulin-Levasseur, M., Gajewski, A., Alsheimer, M., Benavente, R. and Krohne, G. (1999). Molecular characterization and developmentally regulated expression of Xenopus lamina-associated polypeptide 2 (XLAP2). *Journal of Cell Science* **112**, 749-759.
- Lattanzi, G., Cenni, V., Marmioli, S., Capanni, C., Mattioli, E., Merlini, L., Squarzone, S. and Maraldi, N. M. (2003). Association of emerin with nuclear and cytoplasmic actin is regulated in differentiating myoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **303**, 764-770.
- Lee, K. K. and Wilson, K. L. (2004). All in the family: evidence for four new LEM-domain proteins Lem2 (NET-25), Lem3, Lem4 and Lem5 in the human genome. *Nuclear Envelope*, 329-339.
- Lee, K. K., Gruenbaum, Y. and Wilson, K. L. (2000a). Emerin mutation linked to Emery-Dreifuss muscular dystrophy disrupts emerin binding to BAF. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 22A-22A.
- Lee, K. K., Gruenbaum, Y., Spann, P., Liu, J. and Wilson, K. L. (2000b). C-elegans nuclear envelope proteins emerin, MAN1, lamin, and nucleoporins reveal unique timing of nuclear envelope breakdown during mitosis. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 3089-3099.

- Lee, K. K., Haraguchi, T., Lee, R. S., Koujin, T., Hiraoka, Y. and Wilson, K. L.** (2001). Distinct functional domains in emerin bind lamin A and DNA-bridging protein BAF. *Journal of Cell Science* **114**, 4567-4573.
- Lee, M. S. and Craigie, R.** (1998). A previously unidentified host protein protects retroviral DNA from autointegration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 1528-1533.
- Libotte, T., Zaim, H., Abraham, S., Padmakumar, V. C., Schneider, M., Lu, W. S., Munck, M., Hutchison, C., Wehnert, M., Fahrenkrog, B. et al.** (2005). Lamin A/C-dependent localization of Nesprin-2, a giant scaffold at the nuclear envelope. *Molecular Biology of the Cell* **16**, 3411-3424.
- Lin, F., Morrison, J. M., Wu, W. and Worman, H. J.** (2005). MAN1, an integral protein of the inner nuclear membrane, binds Smad2 and Smad3 and antagonizes transforming growth factor-beta signaling. *Human Molecular Genetics* **14**, 437-445.
- Lin, F., Blake, D. L., Callebaut, I., Skerjanc, I. S., Holmer, L., McBurney, M. W., Paulin-Levasseur, M. and Worman, H. J.** (2000). MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated polypeptide 2 and emerin. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 4840-4847.
- Liu, J., Lee, K. K., Segura-Totten, M., Neufeld, E., Wilson, K. L. and Gruenbaum, Y.** (2003). MAN1 and emerin have overlapping function(s) essential for chromosome segregation and cell division in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 4598-4603.
- Lopez-Soler, R. I., Moir, R. D., Spann, T. P., Stick, R. and Goldman, R. D.** (2001). A role for nuclear lamins in nuclear envelope assembly. *Journal of Cell Biology* **154**, 61-70.
- Lourim, D., Kempf, A. and Krohne, G.** (1996). Characterization and quantitation of three B-type lamins in *Xenopus* oocytes and eggs: Increase of lamin L(I) protein synthesis during meiotic maturation. *Journal of Cell Science* **109**, 1775-1785.
- Lusk, C. P., Blobel, G. and King, M. C.** (2007). Highway to the inner nuclear membrane: rules for the road. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 414-420.
- Machiels, B. M., Zorenc, A. H. G., Endert, J. M., Kuijpers, H. J. H., vanEys, G., Ramaekers, F. C. S. and Broers, J. L. V.** (1996). An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 9249-9253.
- Maison, C., Pyrpasopoulou, A., Theodoropoulos, P. A. and Georgatos, S. D.** (1997). The inner nuclear membrane protein LAP1 forms a native complex with B-type lamins and partitions with spindle-associated mitotic vesicles. *Embo Journal* **16**, 4839-4850.
- Mamada, H., Takahashi, N. and Taira, M.** (2009). Involvement of an inner nuclear membrane protein, Nemp1, in *Xenopus* neural development through an interaction with the chromatin protein BAF. *Developmental Biology* **327**, 497-507.
- Manilal, S., Man, N. T. and Morris, G. E.** (1998). Colocalization of emerin and lamins in interphase nuclei and changes during mitosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **249**, 643-647.
- Manilal, S., Man, N. T., Sewry, C. A. and Morris, G. E.** (1996). The Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein, emerin, is a nuclear membrane protein. *Human Molecular Genetics* **5**, 801-808.
- Mansharamani, M. and Wilson, K. L.** (2005). Direct binding of nuclear membrane protein MAN1 to emerin in vitro and two modes of binding to barrier-to-autointegration factor. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 13863-13870.
- Mansharamani, M., Hewetson, A. and Chilton, B. S.** (2001). Cloning and characterization of an atypical type IVP-type ATPase that binds to the RING motif of RUSH transcription factors. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 3641-3649.
- Mansharamani, M., Graham, D. R. M., Monie, D., Lee, K. K., Hildreth, J. E. K., Siliciano, R. F. and Wilson, K. L.** (2003). Barrier-to-autointegration factor BAF binds p53 Gag and matrix and is a host component of human immunodeficiency virus type 1 virions. *Journal of Virology* **77**, 13084-13092.
- Margalit, A., Segura-Totten, M., Gruenbaum, Y. and Wilson, K. L.** (2005). Barrier-to-autointegration factor is required to segregate and enclose chromosomes within the nuclear envelope and assemble the nuclear lamina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 3290-3295.
- Margalit, A., Brachner, A., Gotzmann, J., Foisner, R. and Gruenbaum, Y.** (2007). Barrier-to-autointegration factor - a BAFfling little protein. *Trends in Cell Biology* **17**, 202-208.
- Markiewicz, E., Dechat, T., Foisner, R., Quinlan, R. A. and Hutchison, C. J.** (2002). Lamin A/C binding protein LAP2 alpha is required for nuclear anchorage of retinoblastoma protein. *Molecular Biology of the Cell* **13**, 4401-4413.
- Markiewicz, E., Tilgner, K., Barker, N., van de Wetering, M., Clevers, H., Dorobek, M., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Ramaekers, F. C. S., Broers, J. L. V., Blankesteyn, W. M. et al.** (2006). The inner nuclear membrane protein Emerin regulates beta-catenin activity by restricting its accumulation in the nucleus. *Embo Journal* **25**, 3275-3285.

- Marshall, W. F. and Sedat, J. W.** (1999). Nuclear architecture. *Results and problems in cell differentiation* **25**, 283-301.
- Martin, L., Crimando, C. and Gerace, L.** (1995). cDNA cloning and characterization of lamina-associated polypeptide 1c (lap1c), an integral protein of the inner nuclear-membrane. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 8822-8828.
- Matsuo, I., Kuratani, S., Kimura, C., Takeda, N. and Aizawa, S.** (1995). Mouse Otx2 functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes & Development* **9**, 2646-2658.
- Melcer, S., Gruenbaum, Y. and Krohne, G.** (2007). Invertebrate lamins. *Experimental Cell Research* **313**, 2157-2166.
- Merisko, E. M.** (1989). Annulate lamellae - an organelle in search of a function. *Tissue & Cell* **21**, 343-354.
- Mislow, J. M. K., Kim, M. S., Davis, D. B. and McNally, E. M.** (2002a). Myne-1, a spectrin repeat transmembrane protein of the myocyte inner nuclear membrane, interacts with lamin A/C. *Journal of Cell Science* **115**, 61-70.
- Mislow, J. M. K., Holaska, J. M., Kim, M. S., Lee, K. K., Segura-Totten, M., Wilson, K. L. and McNally, E. M.** (2002b). Nesprin-1 alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro. *Febs Letters* **525**, 135-140.
- Moir, R. D., Yoon, M., Khuon, S. and Goldman, R. D.** (2000). Nuclear lamins A and B1: Different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells. *Journal of Cell Biology* **151**, 1155-1168.
- Muchir, A., van Engelen, B. G., Lammens, M., Mislow, J. M., McNally, E., Schwartz, K. and Bonne, G.** (2003). Nuclear envelope alterations in fibroblasts from LGMD1B patients carrying nonsense Y259X heterozygous or homozygous mutation in lamin A/C gene. *Experimental Cell Research* **291**, 352-362.
- Naetar, N., Korbei, B., Kozlov, S., Kerenyi, M. A., Dorner, D., Kral, R., Gotic, I., Fuchs, P., Cohen, T. V., Bittner, R. et al.** (2008). Loss of nucleoplasmic LAP2 alpha-lamin A complexes causes erythroid and epidermal progenitor hyperproliferation. *Nature Cell Biology* **10**, 1341-U1213.
- Nagano, A., Koga, R., Ogawa, M., Kurano, Y., Kawada, J., Okada, R., Hayashi, Y. K., Tsukahara, T. and Arahata, K.** (1996). Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature Genetics* **12**, 254-259.
- Neilan, E. G.** (2009). Laminopathies, Other Progeroid Disorders, and Aging: Common Pathogenic Themes and Possible Treatments. *American Journal of Medical Genetics Part A* **149A**, 563-566.
- Newport, J. and Kirschner, M.** (1982a). A major developmental transition in early xenopus-embryos .2. Control of the onset of transcription. *Cell* **30**, 687-696.
- Newport, J. and Kirschner, M.** (1982b). A major developmental transition in early xenopus-embryos .1. Characterization and timing of cellular-changes at the midblastula stage. *Cell* **30**, 675-686.
- Newport, J. W., Wilson, K. L. and Dunphy, W. G.** (1990). A lamin-independent pathway for nuclear-envelope assembly. *Journal of Cell Biology* **111**, 2247-2259.
- Nichols, R. J., Wiebe, M. S. and Traktman, P.** (2006). The vaccinia-related kinases phosphorylate the N' terminus of BAF, regulating its interaction with DNA and its retention in the nucleus. *Molecular Biology of the Cell* **17**, 2451-2464.
- Nieuwkoop, P. D. a. F., J.** (1975). Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). *North- Holland Publ. Comp., Amsterdam*.
- Nizami, Z., Deryusheva, S. and Gall, J. G.** (2010). The Cajal Body and Histone Locus Body. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**.
- O'Farrell, P. H. and Ivarie, R. D.** (1979). The glucocorticoid domain of response: measurement of pleiotropic cellular responses by two-dimensional gel electrophoresis. *Monographs on endocrinology* **12**, 189-201.
- Olmo, E. and Morescalchi, A.** (1978). Genome and cell sizes in frogs - comparison with salamanders. *Experientia* **34**, 44-46.
- Orso, G., Pendin, D., Liu, S., Toso, J., Moss, T.J., Faust, J.E., Micaroni, M., Egorova, A., Martinuzzi, A., McNew, J.A. and Daga A.** (2009). Homotypic fusion of ER membranes requires the dynamin-like GTPase atlastin. *Nature* **460(7258)**, 978-983.
- Osada, S. I., Ohmori, S. and Taira, M.** (2003). XMAN1, an inner nuclear membrane protein, antagonizes BMP signaling by interacting with Smad1 in *Xenopus* embryos. *Development* **130**, 1783-1794.
- Ostlund, C. and Worman, H. J.** (2003). Nuclear envelope proteins and neuromuscular diseases. *Muscle & Nerve* **27**, 393-406.
- Padan, R., Nainudelepszteyn, S., Goitein, R., Fainsod, A. and Gruenbaum, Y.** (1990). Isolation and characterization of the drosophila nuclear-envelope otefin cDNA. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 7808-7813.
- Padmakumar, V. C., Abraham, S., Braune, S., Noegel, A. A., Tunggal, B., Karakesisoglou, L. and Korenbaum, E.** (2004). Enaptin, a giant actin-binding protein, is an element of the nuclear membrane and the actin cytoskeleton. *Experimental Cell Research* **295**, 330-339.

- Pan, D., Estevez-Salmeron, L. D., Stroschein, S. L., Zhu, X. L., He, J., Zhou, S. L. and Luo, K. X.** (2005). The integral inner nuclear membrane protein MAN1 physically interacts with the R-Smad proteins to repress signaling by the transforming growth factor-beta superfamily of cytokines. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 15992-16001.
- Parise, P., Finocchiaro, G., Masciadri, B., Quarto, M., Francois, S., Mancuso, F. and Muller, H.** (2006). Lap2 alpha expression is controlled by E2F and deregulated in various human tumors. *Cell Cycle* **5**, 1331-1341.
- Pederson, T. and Aebi, U.** (2002). Actin in the nucleus: what form and what for? *Journal of Structural Biology* **140**, 3-9.
- Prufert, K., Winkler, C., Paulin-Levasseur, M. and Krohne, G.** (2004). The lamina-associated polypeptide 2 (LAP2) genes of zebrafish and chicken: no LAP2 alpha isoform is synthesised by non-mammalian vertebrates. *European Journal of Cell Biology* **83**, 403-411.
- Purea, A. E.** (2008). New Methods and Applications in Nuclear Magnetic Resonance Microscopy using small RF Coils. *Dissertation*.
- Raju, G. P., Dimova, N., Klein, P. S. and Huang, H. C.** (2003). SANE, a novel LEM domain protein, regulates bone morphogenetic protein signaling through interaction with Smad1. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 428-437.
- Riemer, D., Stuurman, N., Berrios, M., Hunter, C., Fisher, P. A. and Weber, K.** (1995). Expression of drosophila lamin-c is developmentally-regulated - analogies with vertebrate a-type lamins. *Journal of Cell Science* **108**, 3189-3198.
- Rober, R. A., Weber, K. and Osborn, M.** (1989). Differential timing of nuclear lamin a/c expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal - a developmental-study. *Development* **105**, 365-378.
- Rolls, M. M., Stein, P. A., Taylor, S. S., Ha, E., McKeon, F. and Rapoport, T. A.** (1999). A visual screen of a GFP-fusion library identifies a new type of nuclear envelope membrane protein. *Journal of Cell Biology* **146**, 29-43.
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. M. and Chait, B. T.** (2000). The yeast nuclear pore complex: Composition, architecture, and transport mechanism. *Journal of Cell Biology* **148**, 635-651.
- Roux, K. J. and Burke, B.** (2007). Nuclear envelope defects in muscular dystrophy. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* **1772**, 118-127.
- Ruchaud, S., Korfali, N., Villa, P., Kottke, T. J., Dingwall, C., Kaufmann, S. H. and Earnshaw, W. C.** (2002). Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. *Embo Journal* **21**, 1967-1977.
- Rungger-Braendle, E., Ripperger, J. A., Steiner, K., Conti, A., Stieger, A., Soltanich, S. and Rungger, D.** (2010). Retinal Patterning by Pax6-Dependent Cell Adhesion Molecules. *Developmental Neurobiology* **70**, 764-780.
- Rusinol, A. E. and Sinensky, M. S.** (2006). Farnesylated lamins, progeroid syndromes and farnesyl transferase inhibitors. *Journal of Cell Science* **119**, 3265-3272.
- Salpingidou, G., Smertenko, A., Hausmanowa-Petruciewicz, I., Hussey, P. J. and Hutchison, C. J.** (2007). A novel role for the nuclear membrane protein emerin in association of the centrosome to the outer nuclear membrane. *Journal of Cell Biology* **178**, 897-904.
- Schild-Pruefert, K., Giegerich, M., Schaefer, M., Winkler, C. and Krohne, G.** (2006). Structural and functional characterization of the zebrafish lamin B receptor. *European Journal of Cell Biology* **85**, 813-824.
- Schirmer, E. C. and Gerace, L.** (2005). The nuclear membrane proteome: extending the envelope. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 551-558.
- Schirmer, E. C. and Foisner, R.** (2007). Proteins that associate with lamins: many faces, many functions. *Experimental Cell Research* **313**, 2167-2179.
- Schirmer, E. C., Florens, L., Guan, T., Yates, J. R., III and Gerace, L.** (2005). Identification of novel integral membrane proteins of the nuclear envelope with potential disease links using subtractive proteomics. *Nuclear Organization in Development and Disease* **264**, 63-80.
- Schoft, V. K., Beauvais, A. J., Lang, C., Gajewski, A., Prufert, K., Winkler, C., Akimenko, M. A., Paulin-Levasseur, M. and Krohne, G.** (2003). The lamina-associated polypeptide 2 (LAP2) isoforms beta, gamma and omega of zebrafish: developmental expression and behavior during the cell cycle. *Journal of Cell Science* **116**, 2505-2517.
- Schooley, A., Vollmer, B. and Antonin, W.** (2012). Building a nuclear envelope at the end of mitosis: coordinating membrane reorganization, nuclear pore complex assembly, and chromatin de-condensation. *Chromosoma* **121**, 539-554.
- Segura-Totten, M. and Wilson, K. L.** (2004). BAF: roles in chromatin, nuclear structure and retrovirus integration. *Trends in Cell Biology* **14**, 261-266.
- Senior, A. and Gerace, L.** (1988). Integral membrane-proteins specific to the inner nuclear-membrane and associated with the nuclear lamina. *Journal of Cell Biology* **107**, 2029-2036.

- Shimi, T., Pflieger, K., Kojima, S.-i., Pack, C.-G., Solovei, I., Goldman, A. E., Adam, S. A., Shumaker, D. K., Kinjo, M., Cremer, T. et al. (2008). The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription. *Genes & Development* **22**, 3409-3421.
- Shoeman, R. L. and Traub, P. (1990). The invitro DNA-binding properties of purified nuclear lamin proteins and vimentin. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 9055-9061.
- Small, E. M., Warkman, A. S., Wang, D. Z., Sutherland, L. B., Olson, E. N. and Krieg, P. A. (2005). Myocardin is sufficient and necessary for cardiac gene expression in *Xenopus*. *Development* **132**, 987-997.
- Smith, A. N., Miller, L. A. D., Song, N., Taketo, M. M. and Lang, R. A. (2005). The duality of beta-catenin function: A requirement in lens morphogenesis and signaling suppression of lens fate in periocular ectoderm. *Developmental Biology* **285**, 477-489.
- Smith, D. E., Gruenbaum, Y., Berrios, M. and Fisher, P. A. (1987). Biosynthesis and interconversion of drosophila nuclear lamin isoforms during normal growth and in response to heat-shock. *Journal of Cell Biology* **105**, 771-790.
- Smythe, C., Jenkins, H. E. and Hutchison, C. J. (2000). Incorporation of the nuclear pore basket protein Nup 153 into nuclear pore structures is dependent upon lamina assembly: evidence from cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Embo Journal* **19**, 3918-3931.
- Soderberg, O., Leuchowius, K.-J., Gullberg, M., Jarvius, M., Weibrecht, I., Larsson, L.-G. and Landegren, U. (2008). Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay. *Methods* **45**, 227-232.
- Somech, R., Shaklai, S., Geller, O., Amariglio, N., Simon, A. J., Rechavi, G. and Gal-Yam, E. N. (2005). The nuclear-envelope protein and transcriptional repressor LAP2 beta interacts with HDAC3 at the nuclear periphery, and induces histone H4 deacetylation. *Journal of Cell Science* **118**, 4017-4025.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel-electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**, 503-&.
- Spann, T. P., Goldman, A. E., Wang, C., Huang, S. and Goldman, R. D. (2002). Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *Journal of Cell Biology* **156**, 603-608.
- Spector, D. L. and Lamond, A. I. (2011). Nuclear speckles. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**.
- Stafstrom, J. P. and Staehelin, L. A. (1984). Are annulate lamellae in the drosophila embryo the result of overproduction of nuclear-pore components. *Journal of Cell Biology* **98**, 699-708.
- Starr, D. A. (2009). A nuclear-envelope bridge positions nuclei and moves chromosomes. *Journal of Cell Science* **122**, 577-586.
- Stewart, C. L., Roux, K. J. and Burke, B. (2007). Blurring the boundary: The nuclear envelope extends its reach. *Science* **318**, 1408-1412.
- Stuurman, N., Heins, S. and Aebi, U. (1998). Nuclear lamins: Their structure, assembly, and interactions. *Journal of Structural Biology* **122**, 42-66.
- Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Bhatt, H., Anver, M., Bhat, N., Nagashima, K., Stewart, C. L. and Burke, B. (1999). Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *Journal of Cell Biology* **147**, 913-919.
- Taniura, H., Glass, C. and Gerace, L. (1995). A chromatin binding-site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones. *Journal of Cell Biology* **131**, 33-44.
- Taylor, M. R. G., Carniel, E. and Mestroni, L. (2006). Cardiomyopathy, familial dilated. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **1**:27.
- Taylor, M. R. G., Slavov, D., Gajewski, A., Vlcek, S., Ku, L., Fain, P. R., Carniel, E., Di Lenarda, A., Sinagra, G., Boucek, M. M. et al. (2005). Thymopoietin (lamina-associated polypeptide 2) gene mutation associated with dilated cardiomyopathy. *Human Mutation* **26**, 566-574.
- ten Dijke, P. and Hill, C. S. (2004). New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends in Biochemical Sciences* **29**, 265-273.
- Thomas, J. O. and Kornberg, R. D. (1975). Octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**, 2626-2630.
- Tift, K. E., Segura-Totten, M., Lee, K. K. and Wilson, K. L. (2006). Barrier-to-autointegration factor-like (BAF-L): A proposed regulator of BAF. *Experimental Cell Research* **312**, 478-487.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets - procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4350-4354.
- Tzur, Y. B., Margalit, A., Melamed-Book, N. and Gruenbaum, Y. (2006). Matefin/SUN-1 is a nuclear envelope receptor for CED-4 during *Caenorhabditis elegans* apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 13397-13402.
- Vaughan, O. A., Alvarez-Reyes, M., Bridger, J. M., Broers, J. L. V., Ramaekers, F. C. S., Wehnert, M., Morris, G. E., Whitfield, W. G. F. and Hutchison, C. J. (2001). Both emerin and lamin C depend on lamin A for localization at the nuclear envelope. *Journal of Cell Science* **114**, 2577-2590.

- Vlcek, S. and Foisner, R. (2007). A-type lamin networks in light of laminopathic diseases. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1773**, 661-674.
- Vlcek, S., Foisner, R. and Wilson, K. L. (2004). Lco1 is a novel widely expressed lamin-binding protein in the nuclear interior. *Experimental Cell Research* **298**, 499-511.
- Vlcek, S., Just, H., Dechat, T. and Foisner, R. (1999). Functional diversity of LAP2 alpha and LAP2 beta in postmitotic chromosome association is caused by an alpha-specific nuclear targeting domain. *Embo Journal* **18**, 6370-6384.
- Voeltz, G. K., Prinz, W. A., Shibata, Y., Rist, J. M. and Rapoport, T. A. (2007). A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum (vol 124, pg 573, 2006). *Cell* **130**, 754-754.
- Wagner, N. and Krohne, G. (2007). LEM-domain proteins: New insights into lamin-interacting proteins. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 261* **261**, 1+.
- Wagner, N., Schmitt, J. and Krohne, G. (2004). Two novel LEM-domain proteins are splice products of the annotated *Drosophila melanogaster* gene CG9424 (Bocksbeutel). *European Journal of Cell Biology* **82**, 605-616.
- Wagner, N., Kagermeier, B., Loserth, S. and Krohne, G. (2006). The *Drosophila melanogaster* LEM-domain protein MAN1. *European Journal of Cell Biology* **85**, 91-91.
- Wagner, N., Weyhersmueller, A., Blauth, A., Schuhmann, T., Heckmann, M., Krohne, G. and Samakovlis, C. (2010). The *Drosophila* LEM-domain protein MAN1 antagonizes BMP signaling at the neuromuscular junction and the wing crossveins. *Developmental Biology* **339**, 1-13.
- Wang, X. J., Xu, S. Q., Rivolta, C., Li, L. Y., Peng, G. H., Swain, P. K., Sung, C. H., Swaroop, A., Berson, E. L., Dryja, T. P. et al. (2002). Barrier to autointegration factor interacts with the cone-rod homeobox and represses its Transactivation function. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 43288-43300.
- Wang, Z. G., Wang, D. Z., Pipes, G. C. T. and Olson, E. N. (2003). Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 7129-7134.
- Wilhelmsen, K., Litjens, S. H. M., Kuikman, I., Tshimbalanga, N., Janssen, H., van den Bout, I., Raymond, K. and Sonnenberg, A. (2005). Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *Journal of Cell Biology* **171**, 799-810.
- Wilkinson, F. L., Holaska, J. M., Zhang, Z. Y., Sharma, A., Manilal, S., Holt, I., Stamm, S., Wilson, K. L. and Morris, G. E. (2003). Emerin interacts in vitro with the splicing-associated factor, YT521-B. *European Journal of Biochemistry* **270**, 2459-2466.
- Winter-Vann, A. M. and Casey, P. J. (2005). Opinion - Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. *Nature Reviews Cancer* **5**, 405-412.
- Wolin, S. L., Krohne, G. and Kirschner, M. W. (1987). A new lamin in xenopus somatic tissues displays strong homology to human lamin-a. *Embo Journal* **6**, 3809-3818.
- Wolper, L. (2002). Principles of Development: Oxford.
- Woodrow, S. L., Pope, F. M. and Handfield-Jones, S. E. (2001). The Buschke-Ollendorff syndrome presenting as familial elastic tissue naevi. *British Journal of Dermatology* **144**, 890-893.
- Worman, H. J. and Bonne, G. (2007). "Laminopathies": A wide spectrum of human diseases. *Experimental Cell Research* **313**, 2121-2133.
- Worman, H. J., Yuan, J., Blobel, G. and Georgatos, S. D. (1988). A lamin b-receptor in the nuclear-envelope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 8531-8534.
- Worman, H. J., Fong, L. G., Muchir, A. and Young, S. G. (2009). Laminopathies and the long strange trip from basic cell biology to therapy. *Journal of Clinical Investigation* **119**, 1825-1836.
- Wright, C. V. (2001). Mechanisms of left-right asymmetry: what's right and what's left? *Developmental Cell* **1**, 179-186.
- Yang, L., Guan, T. L. and Gerace, L. (1997). Lamin-binding fragment of LAP2 inhibits increase in nuclear volume during the cell cycle and progression into S phase. *Journal of Cell Biology* **139**, 1077-1087.
- Zhang, Q. P., Ragnauth, C., Greener, M. J., Shanahan, C. M. and Roberts, R. G. (2002). The nesprins are giant actin-binding proteins, orthologous to *Drosophila melanogaster* muscle protein MSP-300. *Genomics* **80**, 473-481.
- Zhang, Q. P., Skepper, J. N., Yang, F. T., Davies, J. D., Hegyi, L., Roberts, R. G., Weissberg, P. L., Ellis, J. A. and Shanahan, C. M. (2001). Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *Journal of Cell Science* **114**, 4485-4498.
- Zhang, Q. P., Ragnauth, C. D., Skepper, J. N., Worth, N. F., Warren, D. T., Roberts, R. G., Weissberg, P. L., Ellis, J. A. and Shanahan, C. M. (2005). Nesprin-2 is a multi-isomeric protein that binds lamin and emerin at the nuclear envelope and forms a subcellular network in skeletal muscle. *Journal of Cell Science* **118**, 673-687.
- Zhang, X., Xu, R., Zhu, B., Yang, X., Ding, X., Duan, S., Xu, T., Zhuang, Y. and Han, M. (2007). Syne-1 and Syne-2 play crucial roles in myonuclear anchorage and motor neuron innervation. *Development* **134**, 901-908.

- Zhen, Y. Y., Libotte, T., Munck, M., Noegel, A. A. and Korenbaum, E.** (2002). NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science* **115**, 3207-3222.
- Zheng, R. L., Ghirlando, R., Lee, M. S., Mizuuchi, K., Krause, M. and Craigie, R.** (2000). Barrier-to-autointegration factor (BAF) bridges DNA in a discrete, higher-order nucleoprotein complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8997.

8. Anhang

8.1. Spezielle Programme und Programm-Parameter (Sortiert nach Methoden)

8.1.1. Proximity-Ligation-Assay (PLA) / 3D-Rekonstruktion embryonaler Herzen

IMic

Zur Dokumentation der PLA-Signale wurde ein speziell konstruiertes iMIC-Mikroskop der Firma TILL Photonics (Gräfelfingen) verwendet. Dabei wurden mehrere Bilderserien (Z-Stacks) durch Zellkerne von *Xenopus* A6-Zellen mit folgenden Parametern aufgenommen:

Bezeichnung	Messgröße
Streamer	Default Tiff-Streamer (ome.tiff)
Number of planes	150
Z-Step	100 nm (0.0001 mm)
Exposure	100 - 350 ms
Wavelength	DAPI (375nm), Green (488nm), Red (560nm)
Objective	60x / Oil (1,45)
Intensity	100%
Refraction index	1,44 (Mounting Medium with DAPI, Olink)

Tabelle 8-1: Messparameter zur Aufnahme von Z-Stacks mittels iMIC-Mikroskop.

Leica-Bundle / „Blackbeauty“

Zur Dokumentation embryonaler Herzen wurde ein Mikroskop-Bundle von Leica verwendet (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar). Bilderserien (Z-Stacks) durch das Herz wurden mit Hilfe der Software LAS AF (Leica) und folgenden Parametern aufgenommen.

Bezeichnung	Messgröße
Number of planes	227
Z-Step	1 µm
Exposure	1,27E+04
Wavelength	Red (560nm)
Objective	20x / Air (0.4)
Intensity	100%
Refraction index	1,474 (Glycerine)
LUT	Red / Hot Red (Imaris)

Tabelle 8-2: Messparameter zur Aufnahme von Z-Stacks mittels Leica-Bundle

Huygens Essential

Die Software Huygens Essential der Firma SVI (Version 4.3.0p5 64b for MAC; Hilversum, Niederlande) wurde zur Dekonvolution (softwareseitiges Schärfen) der aufgenommenen Z-Stacks herangezogen. Dabei wurden folgende Parameter für das Mikroskop-Template verwendet:

	Bezeichnung	PLA DAPI (375nm)	PLA Green (488nm)	PLA Red (560nm)	Herz Embryo Red (560nm)
Sampling Interval	x (nm)	107.5			1392
	y (nm)	107.5			1040
	z (nm)	100.0			1000
	T (s)	1.000			1.000
Optical parameters	Microscope type	widefield			widefield
	Numeric Aperture	1.45 (oil)			0.4 (air)
	Object quality	perfect			perfect
	Coverslip position (µm)	0.000			0.000
	Imaging direction	upward			downward
	Pinhole spacing (µm)	0.1			0.1
Refraction indexes	Lens immersion	Oil (1.515)			Air (1.000)
	Embedding medium	Glycerine (80%), 1.44			Glycerine (100%), 1.474
Parameters for Channel 0	Backprojection Pinhole (nm)	250			250
	Excitation wavelength (nm)	375	488	560	560
	Emission wavelength (nm)	420	508	600	600
	Multi photon excitation	1			1
	Excitation fill factor	1.0			1.0
	Deviating micr. type	widefield			widefield

Tabelle 8-3: Mikroskop-Template zur Dekonvolution von Z-Stacks.

Für die eigentliche Dekonvolution wurde ein Dekonvolutions-Template mit folgenden Einstellungen erstellt:

Bezeichnung	Messgröße PLA	Messgröße Herz
Algorithm	Classic MLE	Classic MLE
PSF mode	Theoretical	Theoretical
Max. iterations	20	50
Iteration mode	Optimized	Optimized
Quality change thresh (%)	0.1	0.01
Signal to Noise Ratio	40	40
Background mode	Auto	widefield
Background estimation radius	0.7	0.7
Relative background	0.0	0.0
Bleaching correction	If possible	If possible
Brick mode	Auto	Auto

Tabelle 8-4: Dekonvolutions-Template.

Imaris

Die Software Imaris des Entwicklers Bitplane (Version 7.6; Belfast, Irland) wurde zur Visualisierung der dekonvolierten Z-Stacks sowie zur dreidimensionalen Volumendarstellung oder Oberflächen-Rekonstruktion der Daten herangezogen. Hierzu wurden folgende Einstellungen zur dreidimensionalen Darstellung verwendet:

	Bezeichnung	Einstellung
DAPI (375nm)	smooth	nein
	background subtraction / absolute intensity	background subtraction
	Volumendarstellung	nein
	Oberflächendarstellung	ja
	Transparenz	30%
	Farbcode	(0.200/0.500/1.000)
LBR (Green, 488nm)	smooth	ja
	background subtraction / absolute intensity	background subtraction
	Volumendarstellung	Inter-/Telophase: nein; Pro- bis Anaphase: ja
	Oberflächendarstellung	ja
	Transparenz	60-70%
	Farbcode	(0.200/0.900/0.300)
PLA-Signale (Red, 560nm)	smooth	nein
	background subtraction / absolute intensity	background subtraction
	Volumendarstellung	nein
	Oberflächendarstellung	ja
	Transparenz	0%
	Farbcode	Standard-Einstellungen

Tabelle 8-5: Einstellungen in Imaris zur dreidimensionalen Darstellung der PLA-Daten.

8.1.2. Molekularbiologische Methoden

DNA-Sequenzanalysen / Primer-Design / Klonierungen

Zur Auswertung der Daten von DNA-Sequenzierungen wurde die Software Chromas Pro (Version 1.5; Technelysium, Pty Ltd) verwendet. Das Design von Primern, Vorbereitungen für Klonierungen und generelle Sequenzanalysen wurden mit der Software Vector NTI Advance (Version 10.3.0; Invitrogen) durchgeführt.

Die Bestimmung der Schmelz- / Annealingtemperatur von Primern bei Verwendung der Phusion High Fidelity DNA-Polymerase wurde mittels dem Rechentool der Firma Thermo Scientific/Fermentas durchgeführt (www.thermoscientific.com/pcrwebtools). Dabei wurden als Primer-Konzentration 0.2 μ M und als Salz-Konzentration 50 mM gewählt.

8.1.3. NMR-Spektroskopie / Amira

Die Visualisierung der mittels NMR-Spektroskopie erhaltenen Daten wurde mit der Software Amira durchgeführt. Hierzu wurde der erste Datensatz (Header = 0; 192x512x192) als Raw-Daten (*short*) in das Programm eingelesen. Die dreidimensionale Volumen-/Voxeldarstellung erfolgte mittels der Funktion *Voltrex* (Lookup: luminance/alpha; Colormap: 15.000 – 35.000; Alpha: 0.4553).

8.1.4. Statistische Methoden

Die Auswertung der Videodaten embryonaler Herzen erfolgte mit der Software Adobe Premiere Pro CS5.5 in Abhängigkeit von den jeweiligen Zeitpunkten/Frames. Die Software Adobe Photoshop CS5 wurde zur Ermittlung des Herzvolumens herangezogen. Zur Auswertung der Physiologie der entsprechenden Herzphänotypen wurden folgende Merkmale ermittelt:

Herzmerkmal	Messgröße	Beschreibung	Berechnung / Ermittlung
V_{syst.}	10 ⁻³ mm ³	Systolisches Ventrikel-Volumen	Ellipsoid-Volumen: $4/3 * \pi * a * b * c$
V_{diast.}	10 ⁻³ mm ³	Diastolisches Ventrikel-Volumen	Ellipsoid-Volumen: $4/3 * \pi * a * b * c$
T_{Vsyst. 1/3}	Millisekunden	Zeitpunkt des systolischen Volumens zu Beginn der Systole	Anzahl der Frames zum Zeitpunkt / Bildfrequenz (30Frames/Millisekunde)
T_{Vsyst. 2}	Millisekunden	Zeitpunkt des systolischen Volumens zum Ende der Systole	Anzahl der Frames zum Zeitpunkt / Bildfrequenz (30Frames/Millisekunde)
T_{Vdiast. 1}	Millisekunden	Zeitpunkt des diastolischen Volumens zu Beginn der Diastole	Anzahl der Frames zum Zeitpunkt / Bildfrequenz (30Frames/Millisekunde)
T_{Vdiast. 2}	Millisekunden	Zeitpunkt des diastolischen Volumens zum Ende der Diastole	Anzahl der Frames zum Zeitpunkt / Bildfrequenz (30Frames/Millisekunde)
dV	Prozent	Amplitude / Differenz zwischen diastolischem und systolischem Volumen	$1 - (V_{diast.} / V_{syst.})$
BPM	Schläge/Minute	Schlagfrequenz des Ventrikel	Anzahl Herzschläge / Beobachtungszeitraum
dTV_{Systole}	Millisekunden	Verweildauer während der Systole	$T_{Vsyst. 2} - T_{Vsyst. 1}$
dTV_{Systole->Vdiastole}	Millisekunden	Dauer: Übergang Systole -> Diastole	$T_{Vdiast. 1} - T_{Vsyst. 2}$
dTV_{Diastole}	Millisekunden	Verweildauer während der Diastole	$T_{Vdiast. 2} - T_{Vdiast. 1}$
dTV_{Diastole->Vsystole}	Millisekunden	Dauer: Übergang Diastole -> Systole	$T_{Vsyst. 3} - T_{Vdiast. 2}$
T_{Herzzyklus}	Millisekunden	Dauer des gesamten Herzzyklus	Summe der jeweiligen dT-Werte

Tabelle 8-6: Ermittelte Merkmale zur Auswertung der Herzphänotypen.

Statistische Auswertungen wurden mit Hilfe von Microsoft Excel 2010/2013 durchgeführt. Zur Ermittlung von Durchschnittswerten wurde das arithmetische Mittel verwendet (Excel: =MITTELWERT). Die Standardabweichung wurde ausgehend von der Grundgesamtheit ermittelt (Excel 2010: =STABWN; Excel 2013: =STABW.N). Zur Berechnung des Standardfehlers des arithmetischen Mittels (SEM) wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{Standardabweichung (STABWN)}}{\sqrt{\text{Anzahl der ausgewerteten Embryonen}}}$$

Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz und dementsprechend der p-Werte der einzelnen Merkmale, wurde der Studentsche T-Test durchgeführt (Excel 2010: =TTEST; Excel 2013: =T.TEST). Als Matrix 1 wurden dabei die Messwerte der uninjizierten Kontroll-Embryonen und als Matrix 2 die Messwerte der jeweiligen Knockdown-/Rescue-Embryonen gewählt. Es wurde ein zweiseitiger Test (Seiten = 2) vom Typ 2 durchgeführt.

8.2. Abkürzungen

®	registriertes Warenzeichen
μ	mikro- (= 10 ⁻⁶)
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AL	Annulate Lamellae
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
BAF	Barrier-to-Autointegration Factor
bidest.	Bidestilliert
BMP	Bone-morphogenic protein
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
bsp.	Beispielsweise
Btf	Bcl-2 verwandter Transkriptionsfaktor
BOS	Buschke-Ollendorff-Syndrom
bzw.	Beziehungsweise
C-(-terminal, -Terminus)	Carboxy-(terminal, -Terminus)
ca.	Circa
CAPS	Cyclohexlamino-1-Propansulfonsäure
cDNA	complementary DNA
CDK	Cyclin-Dependent-Kinase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAB	Diaminibenzidin
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
ddNTP	Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
ds	double stranded (doppelsträngig)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDMD	Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie
EDTA	Ethyl diamintetraessigsäure
EE	Eiextrakt
EGTA	Ethyl diamintetraessigsäure
EK	Endkonzentration
EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	Expressed Sequence Tag

et al.	et altera (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
FCS	fetales Kälberserum
GCL	Germ cell-less
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O _{bidest.}	Doppelt destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
HCG	Humanes Choriogonadotropin
HEC	Hydroxyethyl-Cellulose
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazin-1-Ethansulfonsäure
His	Histidin
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
INM	inner nuclear membrane (Innere Kernmembran)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
KASH	Klarsicht, ANC-1 and Syne homology
KK	Kreatinkinase
KP	Kreatinphosphat
LAP	Lamina assoziiertes Protein /Polypeptid
LB-Medium	Lysogenic Broth Medium
LBR	Lamin B-Rezeptor
LiCl	Lithiumchlorid
LINC	Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton
Lmo7	Lim-only 7
MBT	Midblastulatransition
MCS	multiple cloning site
MDa	Megadalton
MetOH	Methanol
MMR	Marc's modified Ringer Lösung
mRNA	messenger-RNA
N-(-terminal, -Terminus)	Amino-(-terminal, -Terminus)
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	p-Nitrotetrazoliumblau
n-	Nano-
NLS	Nuclaeer localization signal (Kernlokalisationsignal)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NPC	Nuclear pore complex (Kernporenkomplex)
Nt	Nukleotid
MS 222	Tricaine Methane Sulfate
MVP	Major Vault Protein
MO-	Morpholino-
OD	Optische Dichte
ONM	outer nuclear membrane (Äußere Kernhülle)
p.A.	per analysis (für die Analyse)

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBT	Blocking-Puffer: PBS + BSA + Tween®20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
p-	Piko-
pH	potential hydrogenii
PLA	Proximity-Ligation-Assay
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	Perinuclear space (Perinukleärer Raum)
PP	Probenpuffer
Rb	Retinoblastomprotein
RNA	Ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RNAi	RNA-Interferenz
RNP-	Ribonukleoprotein-
RRM	RNA recognition motif (RNA-Erkennungs-Motiv)
rRNA	ribosomale RNA
R-Smad	Rezeptor-vermitteltes Smad
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkription
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SL	Stammlösung
ss	Single stranded (einzelsträngig)
SUN	Sad1p-UNC-84 homology
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Bor-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	TBS + Tween®-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	Transforming-growth factor
TM	Transmembrandomäne
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer RNA
Tween-20	Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat
™	Trademark
ÜK	Übernachtskultur
ü.N.	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
Voxel	volumetrisches Pixel
V / Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp, wildtypisch
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid

8.3. Einheiten

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
fps	Bilder pro Sekunde (Frames per second)
g	Gramm
h	Stunde
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
M	Molar (Mol pro Liter)
m	Meter bzw. milli (10^{-3})
mA	milliAmpere
MHz	Megahertz
min	Minuten
mol	Stoffmenge (1 mol = $6,022 \times 10^{23}$ Teilchen)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
s / sek	Sekunde
T	Tesla
U	Units (Einheiten)
V	Volt
W	Watt
x g	x-fache Erdbeschleunigung

8.4. Primer

Bezeichnung	Verwendung	Protein/Gen	Sequenz
XH3_F	RT-PCR	Histon H3	ATGGCTCGTACTAAGCAGACCGC
XH3_R	RT-PCR	Histon H3	TAAGCCCTCTCGCTCGGAT
XLMNA_F	RT-PCR	LaminA	GAGAGGCCAACTTCGGGATC
XLMNA_R	RT-PCR	LaminA	TCTTCTGGGTGTTGGGACTGG
XEMD1_F	RT-PCR	Xemerin1	CGCAGCAAGACTAGGAATCCG
XEMD1_R	RT-PCR	Xemerin1	TCTGGGATATGGGCTGGTACG
XEMD2_F	RT-PCR	Xemerin2	CCAAGCACGATCACGAGT
XEMD2_R	RT-PCR	Xemerin2	GAAACCAACGAACAGGAAC
XMAN1_F	RT-PCR	XMAN1	TGGGCAAAGGAAGAGGAAGAA
XMAN1_R	RT-PCR	XMAN1	GGCTGAATCCATTCCACACC
Nrp1_F	RT-PCR	Pan-neural marker (neuropillin-1)	GAAAGAGCATCCGCATCAGGA
Nrp1_R	RT-PCR	Pan-neural marker (neuropillin-1)	TTTGCTGTTGAGCACTGCC
EF1a_F	RT-PCR	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha	CCCTGCTGGAAGCTCTTGAC
EF1a_R	RT-PCR	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha	GAGGCAGACGGAGAGGCTTAT
BAF_F	RT-PCR	Barrier-to-autointegration factor	AATGGGAGAAAAGTCAGTCCA
BAF_R	RT-PCR	Barrier-to-autointegration factor	AAAGGCATCACACCATTCTTT
Pax6_F	RT-PCR	paired box 6	GTTTGTCAACGGCCGACCCCT
Pax6_R	RT-PCR	paired box 6	CTGTGCTGGTTGGCCAGGTAC
Xrx1_F	RT-PCR	retina and anterior neural fold homeobox	GGCAGCTTAGAGGAATCAGCC
Xrx1_R	RT-PCR	retina and anterior neural fold homeobox	TGGCCTCTATACTGTGCAGCC
Otx2_F	RT-PCR	orthodenticle homeobox 2	GCGACCCCAGGAAACAGAGG
Otx2_R	RT-PCR	orthodenticle homeobox 2	CAGATGGACACAGGGGCTGTG
bB1-crys_F	RT-PCR	bB1-crystallin	CAGGGTAGACACATGGAATC
bB1-crys_R	RT-PCR	bB1-crystallin	TCTTGTTCCTTGAAGTCAG
Xfz3_F	RT-PCR	frizzled family receptor 3	GCAGCGTCCAGAGTAAAGTGAG
Xfz3_R	RT-PCR	frizzled family receptor 3	TACATTCCGTCCCATCAGGCAC
Kermit_F	RT-PCR	GIPC PDZ domain containing family, member 1	TTTCCAGACAAGCAGCATTCC
Kermit_R	RT-PCR	GIPC PDZ domain containing family, member 1	TTCCAGCTCCTTCTTGTGCC

Bezeichnung	Verwendung	Protein/Gen	Sequenz
Psf2_F	RT-PCR	Partner of Sld5 2	GTCATGGATGCCTCTGAGG
Psf2_R	RT-PCR	Partner of Sld5 2	GTGTGTTCTCAGCAGCCAGA
Nemp1a_F	RT-PCR	transmembrane protein 194A	GAGGAGGCTGTAGAGTTAGT
Nemp1a_R	RT-PCR	transmembrane protein 194A	GGACCACTTTACCGTCATAG
Crx1_F	RT-PCR	Cone-rod-homeobox	GAATGGACCTTCTGCACTCAG
Crx1_R	RT-PCR	Cone-rod-homeobox	GGAAGTAGGGGTAAGTGCAGT
Nrl_F	RT-PCR	neural retina leucine zipper	AGGTGAAGAGGGAACCACTGA
Nrl_R	RT-PCR	neural retina leucine zipper	CCGGTTCAATCCCGGACAGA
Myosin_F	RT-PCR	Myosin heavy chain 1	AGCACCCACCTCACTTTGTA
Myosin_R	RT-PCR	Myosin heavy chain 1	CCAAAGTACCCAAAAGACCAGC
Desmin_F	RT-PCR	Desmin	AGCAACCATGAGCCAGTCTTA
Desmin_R	RT-PCR	Desmin	TCCTGCAGCTCCACCTTTTCA
Actin_F	RT-PCR	Actin, alpha sarcomeric/skeletal	GAGACTACCGCTTTGGTGTGCG
Actin_R	RT-PCR	Actin, alpha sarcomeric/skeletal	TTCAGGGGCCACACGCAACTC
BMP4_F	RT-PCR	Bone-morphogenic-protein 4	AGCCCCGTTGTCATAGAACTTC
BMP4_R	RT-PCR	Bone-morphogenic-protein 4	AGTGTGCGTGTGGTGATTCCAG
BMP2_F	RT-PCR	Bone-morphogenic-protein 2	AGCCAGCCGAGCAAATACAGTG
BMP2_R	RT-PCR	Bone-morphogenic-protein 2	GGTGTCCAATAGTCTCACAACAGGG
XNkx2,5_F	RT-PCR	NK2 homeobox 5	TCTGAACTCACTGAGGAA
XNkx2,5_R	RT-PCR	NK2 homeobox 5	AGGACTGGTACAGCTATC
Tbx5_F	RT-PCR	T-box 5	AATGTGGACAGATGTTGGAAGG
Tbx5_R	RT-PCR	T-box 5	AGCACACTGAGTAATACTACTGC
XMyoD_F	RT-PCR	myogenic factor 3	AACTGCTCCGATGGCATGATGGATTA
XMyoD_R	RT-PCR	myogenic factor 3	ATTGCTGGGAGAAGGGATGGTGATTA
CardiacActin_F	RT-PCR	actin, alpha, cardiac muscle 1	TCCCTGTACGCTTCTGGTCGTA
CardiacActin_R	RT-PCR	actin, alpha, cardiac muscle 1	TCTCAAAGTCCAAAGCCACATA
Myocardin_F	RT-PCR	Myocardin	GCCCAAAGCAAATTACAAGAA
Myocardin_R	RT-PCR	Myocardin	GGAAGTCGGTGTGAAGATAC

Bezeichnung	Verwendung	Protein/Gen	Sequenz
Popdc2_F	RT-PCR	Popdc2	agcattccaggtcactctcag
Popdc2_R	RT-PCR	Popdc2	caggcagctcagcaaatcctc
Xem1dTM_5'-BamHI	Klonierung / Fusionsproteine	Xemerin1	TATCTCGGATCCATGGAAAATTATAAACACATGACTGAC
Xem1dTM_Xem1dLEM_3'-HindIII	Klonierung / Fusionsproteine	Xemerin1	TATATCAAGCTTTTGCTTCACACGGATTGGCCT
Xem1dLEM_5'-BamHI	Klonierung / Fusionsproteine	Xemerin1	TATATAGGATCCATGCGCAGCAAGACTAGGAAT
CXMAN1_5'-BamHI	Klonierung / Fusionsproteine	XMAN1	TATATAGGATCCATGTGGGCAAAGGAAGAGGAAGAA
CXMAN1_3'-HindIII	Klonierung / Fusionsproteine	XMAN1	GAGCTCAAGCTTACAGCATGACTGAGAATTTGAAGT
Xem1_Xem1dTM_3'-XbaI	Klonierung / mRNA-Synthese	Xemerin1	GCGCGGTCTAGAATGGAAAATTATAAACAC
Xem1dLEM_3'-XbaI	Klonierung / mRNA-Synthese	Xemerin1	ATATATTCTAGAATGCGCAGCAAGACTAGG
Xem1_5'-Sall	Klonierung / mRNA-Synthese	Xemerin1	GAGATCGTCTGACTTAGTTACTTTCCAG
Xem1dTM_Xem1dLEM_5'-Sall	Klonierung / mRNA-Synthese	Xemerin1	TATATCGTCTGACTCATGGGAAGTATCTCTT

8.5. Inhaltsverzeichnis DVD

Abbildung 5-12: Herzvideos XMAN1-Knockdown

- **Video 1:** Herzschlag des XMAN1-Knockdown Embryos 2. Das Herz zeigt einen unregelmäßigen Herzschlag und eine verminderte Amplitude. Dadurch erscheint das Herz durchgehend Blut-gefüllt.
- **Video 2:** Herzschlag des XMAN1-Knockdown Embryos 1. Das Herz zeigt eine verlängerte Verweildauer während der Diastole sowie eine stark verminderte Amplitude.
- **Video 3:** Herzschlag eines uninjizierten WT-Embryos. Das Herz zeigt einen gleichmäßigen Herzschlag.

Abbildung 5-25: Herzvideos Xemerin1-Rescue

- **Video 3:** Herzschlag eines uninjizierten WT-Embryos. Das Herz zeigt einen gleichmäßigen Herzschlag.
- **Video 4:** Herzschlag des Rescue-Embryos 1. Das Herz zeigt eine normale Morphologie. Der Herzschlag des Ventrikels erscheint regelmäßig.
- **Video 5:** Herzschlag des Rescue-Embryos 2. Die Morphologie des Herzens zeigt sich weitgehend normal. Jedoch zeigt das Herz eine vergrößertes diastolisches Volumen und somit eine erhöhte Amplitude.

Abbildung 5-40: Herzvideos BAF-Knockdown

- **Video 3:** Herzschlag eines uninjizierten WT-Embryos. Das Herz zeigt einen gleichmäßigen Herzschlag.
- **Video 6:** Herzschlag des BAF-Knockdown Embryos 1. Im Vergleich zu WT-Embryonen, zeigt weist das Herz eine leicht veränderte Morphologie auf, da Strukturen wie Ventrikel, Atria oder *Truncus arteriosus*, desorganisiert erscheinen. Das Herz zeigt jedoch eine weitgehend normale Physiologie.
- **Video 7:** Herzschlag des BAF-Knockdown Embryos 2. Sowohl Morphologie als auch Physiologie des Herzens erscheinen weitgehend normal. Eine leicht erhöhte Amplitude ist dennoch erkennbar.