

Untersuchungen zum keimbahnspezifischen Lamin B3 Protein in Vertebraten

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

-Dr. rer. nat-

Vorgelegt dem Promotionsausschuss
des Fachbereichs 2 (Biologie und Chemie)
der Universität Bremen

von

Tanja Barendziak

Oktober 2006

1. Gutachter Prof. Dr. R. Stick
2. Gutachter Prof. Dr. A. Becker

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Bremen, den

Unterschrift:

Inhaltsverzeichnis

A Einleitung	1
1. Der Zellkern und die Lamina	1
2. Die Klasse V der Intermediärfilamente	6
3. Die Lamine der Vertebraten	8
4. Die Spermatogenese und die Kernlamina	10
5. Apoptose in der Frühentwicklung des Krallenfrosches <i>Xenopus laevis</i>	13
6. Ziele der vorliegenden Arbeit	14
B Ergebnisse	15
1. Datenbanksuche nach dem keimbahnspezifischen Lamin B3	15
2. Generierung Epitop-getagter Lamin B3 Konstrukte	20
3. Versuche mit Oozyten	20
3.1 Nachweis des Lamins B3 in Oozyten durch Westernblot Analyse	21
3.2 Immunhistologischer Nachweis des Lamins B3 an der Kernhülle von Oozyten	22
3.3 Saccharosegradientenzentrifugation	24
3.4 Hochsalzextraktion	26
4. Versuche mit Embryonen	26
4.1 Expression von Lamin B3 in <i>Xenopus</i> Embryonen	27
4.2 Nachweis von Lamin B3 in Embryonen durch Westernblot Analyse	28
4.3 Histologie Lamin B3 injizierter Embryonen	30
4.4 Coinjektion von Lamin B3 und Bcl-2 in <i>Xenopus</i> Embryonen	30
4.5 Nachweis der Apoptose in Lamin B3 injizierten Embryonen durch TUNEL-Färbung	33
4.6 Untersuchungen zur zygotischen Transkription zum Zeitpunkt der MBT in Lamin B3 injizierten Embryonen	34
5. Untersuchungen an Kulturzellen	35
5.1 Indirekte Immunfluoreszenz von COS 7-Zellen	36
5.2 Indirekte Immunfluoreszenz von A6-Zellen	38
5.3 Indirekte Immunfluoreszenz von Hela-Zellen	41
5.4 Statistische Berechnungen über den Grad der Kernverformung in Hela-Zellen	43
6. Experimentelle Untersuchungen zum Vorhandensein von Lamin B3 in der Spermatogenese von <i>Xenopus</i>	45

6.1 Nachweis des Lamin B2/B3 in <i>Xenopus</i> Leber- und Testisgewebe durch Westernblot Analyse	45
6.2 Nachweis von Lamin B2/B3 in <i>Xenopus</i> Testisgewebeschnitten durch indirekte Immunfluoreszenz	46
C Diskussion	49
1. Datenbanksuche nach Lamin B3 Sequenzmotiven	49
2. Lamin B3 in der Spermatogenese von <i>Xenopus</i>	51
3. Analyse des humanen Lamins B3 in <i>Xenopus</i> Oozyten	53
4. Analyse des humanen Lamins B3 in <i>Xenopus</i> Embryonen	54
5. Analyse des humanen Lamins B3 in somatischen Kulturzellen	57
6. Schlussfolgerungen und Ausblick	60
D Material und Methoden	61
1. Material	61
1.1 Bakterien	61
1.2 Zellkulturen	61
1.3 Versuchstiere	61
1.4 Datenbanken	61
1.5 Plasmide	61
1.6 Antikörper	62
1.6.1 Primärantikörper	62
1.6.2 Sekundärantikörper	63
1.7 Primer	63
1.8 Chemikalien, Puffer und Standardlösungen	63
2. Methoden	64
2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren	64
2.1.1 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren	64
2.2 Arbeiten mit DNA	64
2.2.1 Restriktionsspaltungen	64
2.2.2 Auffüllreaktionen	64
2.2.3 Dephosphorylierung von Vektor-DNA	65
2.2.4 Ligation	65
2.2.5 Whole-Mount TUNEL Assay	65
2.2.6 Reverse Transkriptase–Polymerase-Ketten-Reaktion	66
2.2.7 PCR mit genspezifischen Primern	66
2.2.8 Agarosegele	67

2.2.9	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	67
2.2.10	Saure Ethanolfällung	67
2.3	Arbeiten mit RNA	68
2.3.1	Herstellung von mRNA für die Mikroinjektion	68
2.3.2	RNA-Isolation aus <i>Xenopus</i> Embryonen	68
2.4	Arbeiten mit Bakterien	69
2.4.1	Präparation von Plasmid-DNA	69
2.4.2	Transformation	70
2.5	Arbeiten mit Proteinen	70
2.5.1	Proteinisolation aus <i>Xenopus</i> Embryonen	70
2.5.2	Proteinisolation aus verschiedenen Geweben	71
2.5.3	SDS-Polyacrylamidgele und Westernblot	71
2.6	Arbeiten mit <i>Xenopus</i>	73
2.6.1	Haltung und Manipulation von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	73
2.6.2	Mikroinjektion von <i>Xenopus</i> Oozyten	74
2.6.3	Trennung von Kern und Cytoplasma und Aufarbeitung der Proben	74
2.6.4	Hochsalzextraktion von Oozytenkernen	74
2.6.5	Eireifung mit Progesteron	75
2.6.6	Saccharosegradientenzentrifugation von <i>Xenopus</i> Eihomogenaten	75
2.6.7	Haltung und Manipulation von <i>Xenopus laevis</i> Embryonen	76
2.7	Histologische Methoden	77
2.7.1	Immunhistologie von Embryonen und Oozyten	77
2.7.2	Immunfluoreszenzfärbung von Cryostatschnitten	77
2.7.3	Immunhistologie von Testisgewebe	78
2.7.4	Mikroskopische Analyse	78
2.8	Zellkultur und Transfektion	79
2.8.1	Haltung der Zellen	79
2.8.2	Transfektion	79
2.8.3	Analyse von Kulturzellen	80
2.8.4	Immunfluoreszenz von Kulturzellen	80
E Zusammenfassung		81
F Literaturverzeichnis		82
G Anhang		92

Abkürzungsverzeichnis

(w/v)	Gewicht pro Volumen
°C	Grad Celsius
μ	Micro
A	Ampère
Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATG	Startcodon bestehend aus den Nukleotiden: Adenin, Thymin, Guanin
BAF	Barrier of autointegration factor
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CMT	Charcote-Marie-Tooth-Disorder
CO ₂	Kohlendioxid
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
Cy-3	Indocarbocyanin
DAPI	Diamidinphenylindol
DCM	Dilated cardiomyopathy
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
EAAT4	Excitatory amino acid transporter 4
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDMD	Emery Dreifuss Muskeldystrophie

Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	Expressed sequence tag
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
FCS	fötales Kälberserum
FLIP	Fluorescent loss in photobleaching
FPLD	Familial partial lipodystrophy
FRAP	Fluorescent recovery after photobleaching
Ft	Flag-Tag
g	Gramm
GADD45B	growth arrest and DNA-damage-inducible protein, beta
GFP	green fluorescent protein
GNG7	guanine nucleotide binding protein, gamma 7 subunit
GS-17	Gastrula spezifisches Transkript 17
GSP	genspezifischer Primer
h	Stunde
hCG	humanes Choriongonadotropin
HCl	Salzsäure
ID	Identification
IF	Intermediärfilament
IgG	Immunglobulin G
k	Kilo
K	Kontrolle
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilo Dalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LBR	Lamin B Rezeptor
LEM	LAP, Emerin, Man1
LGMD	Limb girdle muscular dystrophy
LiCl	Lithiumchlorid
LMN	Lamin
M	Marker

Abkürzungsverzeichnis

m	Meter
m	milli
M	molar
MBS	Modified Barth's Saline
MBT	Mid Blastula Transition
MEM	MOPS, EGTA, MgSO ₄
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
M-Phase	Mitose-Phase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblautetrazoliumsalz
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NLS	Kernlokalisierungssignal
nt	Nukleotide
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PBST	Phosphate-buffered saline + Tween
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PHA	Pelger Huet-anomaly
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
POD	Peroxidase
pRB	Retinoblastoma Protein
PSC1	presenilin-like protein 1
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNase	Ribonuklease
RPL36	ribosomal protein L36

Abkürzungsverzeichnis

RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkriptase
S	Sediment
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
S-Phase	Synthese-Phase
St.	Stadium
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TdT	Terminale deoxynucleotidyl Transferase
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIMM13	translocase of inner mitochondrial membrane 13
TMPRSS9	transmembrane protease, serine 9
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labeling
U	Einheit für die Aktivität eines Enzyms
Ü	Überstand
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultra violet
V	Volt
YFP	yellow fluorescent protein

A Einleitung

1. Der Zellkern und die Lamina

Während der Interphase des Zellzyklus stellt die Kernhülle eine Barriere zwischen dem Nukleoplasma und dem Cytoplasma in eukaryotischen Zellen dar. Die Kernhülle umfasst die Kernmembran, die Kernporenkomplexe und die Kernlamina. Die Kernmembran kann in drei morphologisch unterscheidbare Domänen unterteilt werden: die innere- und äußere Membran und die Kernporenmembran (Abb. 1). Die äußere und innere Membran gehen an den Kernporen kontinuierlich ineinander über und stehen mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) in Verbindung. Die äußere Membran stellt eine spezielle Region des ER dar und besitzt sowohl Eigenschaften des rauen, als auch des glatten ER's. Die innere Kernmembran ist frei von Ribosomen, ist aber mit einer Vielzahl spezifischer Proteine assoziiert. Der perinukleäre Raum trennt die innere und äußere Kernmembran und geht in das Lumen des ER über (Schirmer *et al.*, 2003; Übersichten in Mounkes *et al.*, 2003a; Worman und Gundersen, 2006). Die Kernporenkomplexe bilden Kanäle von 10 nm Durchmesser, die die innere und äußere Kernmembran durchspannen und den Transport von Proteinen, Nukleinsäuren und anderen Molekülen zwischen Kern und Cytoplasma regulieren (Übersicht in Gerace und Burke, 1988).

Unterhalb der inneren Kernmembran liegt die Kernlamina, ein tetragonales Netzwerk aus Intermediärfilament-Proteinen, den Laminen (Aebi, 1986; Nigg, 1997). Die Zusammensetzung der Kernlamina variiert abhängig vom Zelltyp und dem Differenzierungsstadium der Zelle (Übersicht in Rzepecki, 2002). Die Kernlamina bildet eine heterogene Proteinschicht von 10-50 nm Dicke (Übersicht in Cohen *et al.*, 2001). Sie stellt das Hauptstrukturelement des Zellkerns dar und verleiht dem Zellkern seine globuläre Struktur. Eine Ausnahme stellen Oozyten dar, in deren großen Zellkernen neben den Laminen nukleäres Actin und damit assoziierte Proteine als weiteres Strukturelement gefunden wurden. Kleinere Zellkerne somatischer Zellen besitzen zwar auch nukleäres Actin, aber dies unterliegt einem ständigen Exportprozess, sodass es zu keiner signifikanten Anreicherung von Actin kommt (Stuven *et al.*, 2003; Bohnsack *et al.*, 2006). Zellen, in denen die Expression eines oder mehrerer Lamine unterdrückt wird, weisen fragile Zellkerne auf, die ihre globuläre Struktur verloren haben (Sullivan *et al.*, 1999; Übersicht in Herrmann und Foisner, 2003). Während in der Vergangenheit angenommen wurde, dass Kernlamine ausschließlich Strukturelemente in der Kernperipherie aufbauen, hat die

Identifizierung von Laminen im Nukleoplasma, sowie die Charakterisierung neuer Lamin-Bindungspartner den Laminen weitere essenzielle Funktionen in fundamentalen zellulären Prozessen zugeschrieben. So spielen die Lamine eine Rolle bei der Zellzyklus-Regulation, Chromatin-Organisation, DNA-Replikation, Transkription, Apoptose, sowie bei der Organisation der Mitosespindel (Tsai *et al.*, 2006; Übersichten in Gruenbaum *et al.*, 2000; Moir *et al.*, 1994; Herrmann und Foisner, 2003).

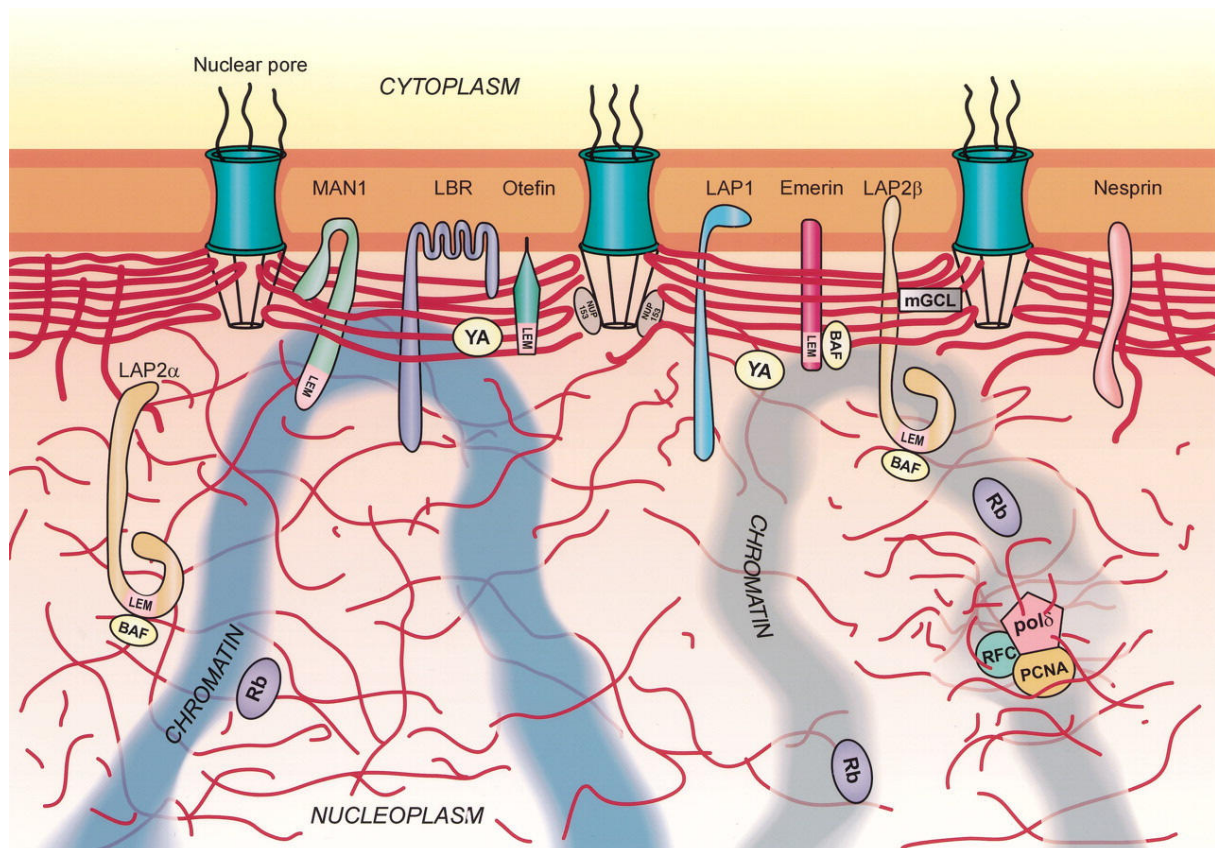


Abb.1: Schematische Übersicht der Kernhülle, Kernlamina und Chromatin.

Die innere und äußere Kernmembran stehen an den Kernporenkomplexen miteinander in Verbindung. Die Lamine sind in rot als dickere Filamente in der Kernperipherie und als dünnere Filamente im Nucleoplasma dargestellt. Eine Reihe Lamin-assoziiierter Proteine sind ebenfalls abgebildet, deren Funktion zum Teil im Text erläutert wird. Das Chromatin in der Kernperipherie liegt in kondensierter Form vor und ist in der Regel transkriptionsinaktiv. Nach Goldmann *et al.*, 2002, unverändert.

Der Begriff Kernlamina schließt nicht nur die Lamine, sondern auch periphere und integrale Membranproteine, sowie Lamin-assoziierte Proteine (LAPs) mit ein. Die enge Assoziation der Kernlamina mit der Kernhülle wird durch integrale Membranproteine vermittelt (Shumaker *et al.*, 2001). Über 20 solcher Proteine sind bisher bekannt und weitere bleiben zu entdecken (Schirmer *et al.*, 2003 und 2005; Übersicht in Schirmer und Gerace, 2005). Integrale Membranproteine sind durch

Transmembrandomänen in der inneren Kernmembran verankert und weisen nukleoplasmatische Domänen auf, die mit Laminen und auch Chromatin interagieren können. Die Proteine mit einer LEM-Domäne bilden eine große Gruppe dieser Proteine. Ihr Name leitet sich von den LEM-Domänen tragenden Proteinen der LAP-Familie, Emerin und Man 1 ab. Weitere Proteine mit einer LEM-Domäne sind Otefin und Lem-3 (Lee *et al.*, 2000; Shumaker *et al.*, 2001). Die LEM-Domäne ragt ins Nukleoplasma und interagiert dort mit dem Faktor BAF (barrier of autointegration factor). BAF wiederum bindet Chromatin. Vermutlich wird auf diese Weise eine Verbindung zwischen dem Chromatin und der inneren Kernhülle geschaffen (Shumaker *et al.*, 2001; Übersicht in Burke und Stewart, 2002). Lamine selbst können DNA und Histone über ihre Rod- bzw. Schwanzdomäne binden (Übersicht in Gruenbaum *et al.*, 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass Lamine eine Rolle bei der DNA-Replikation spielen. Kern-Assembly Versuche in Zellextrakten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* haben gezeigt, dass sich in Zellextrakten ohne Lamine Zellkerne bilden können. Allerdings kommt es zu einer Blockierung der DNA-Replikation in diesen Zellkernen (Newport *et al.*, 1990; Moir *et al.*, 2000; Übersicht in Goldman *et al.*, 2002). Ähnliche Ergebnisse wurden mit dominant-negativen Lamin-Mutanten erzielt. Diese Mutanten zerstören die endogene Struktur der Lamina und blockieren so die DNA-Synthese (Ellis *et al.*, 1997; Spann *et al.*, 1997; Übersicht in Goldman *et al.*, 2002). Andere Studien zeigten eine direkte Rolle der Lamine bei der DNA-Synthese. Während der S-Phase colokalisieren Lamine an Stellen des Nukleotideinbaus mit dem Faktor PCNA (proliferating cell nuclear antigen). PCNA ist für die Elongationsphase der Replikation erforderlich (Übersichten in Moir *et al.*, 1995; Goldman *et al.*, 2002).

Eine Interaktion von Transkriptionsfaktoren und chromatinassoziierten Proteinen mit der Kernlamina bestätigt eine Rolle in der Genregulation. Inzwischen gibt es viele Beispiele spezifischer Transkriptionsfaktoren, die Lamine oder Lamin-assoziierte Proteine binden. Das Retinoblastomprotein p110^{Rb} (pRB) stellt das Hauptkontrollelement des Zellzyklus dar. pRB kontrolliert den Zellzyklus durch die Repression des E2F-Transkriptionskomplexes. E2F aktiviert Gene, deren Produkte für den Übergang in die S-Phase erforderlich sind (Übersicht in Muller und Helin, 2000). Eine Domäne des pRB bindet an die Coil 2 Domäne der Lamine A und C *in vitro* und *in vivo*. An die gleiche Domäne im Lamin A und C bindet auch der Transkriptionsfaktor MOK2. Es wird vermutet, dass Lamin A eine Andockstelle für

eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren darstellt (Ozaki *et al.*, 1994; Dreuillet *et al.*, 2002; Übersicht in Mattout-Drubezki und Gruenbaum, 2003).

Andere Studien zeigen eine direkte Rolle der Kernlamina an der RNA-Polymerase II abhängigen Transkription. Die Expression von dominant-negativen Lamin-Mutanten kann die Aktivität der Polymerase II in verschiedenen Zellen inhibieren. Diese Versuche zeigten, dass die bei der Transkription der Polymerase II involvierten Lamine nukleoplasmatisch und nicht peripher organisiert sind (Spann *et al.*, 2002; Übersicht in Mattout-Drubezki und Gruenbaum, 2003).

Der programmierte Zelltod (Apoptose) ist ein Prozess, der für die normale Entwicklung und Homöostase von Geweben erforderlich ist (Übersichten in Hetts, 1998; Gruenbaum *et al.*, 2000). Nach Erhalt eines apoptotischen Signals kommt es zu spezifischen morphologischen Veränderungen in Zellkern und Cytoplasma. Die Veränderungen im Zellkern beinhalten die proteolytische Spaltung der Lamine, Ablösung des Chromatins von der Kernhülle, räumliche Umordnung der Kernporenkomplexe, DNA-Fragmentierung und Chromatin-Kondensation.

Der Zusammenbruch der Kernlamina ist ein früher Schritt in der Apoptose und ist für den weiteren Ablauf des apoptotischen Signalwegs erforderlich. Die proteolytische Spaltung der Lamine erfolgt innerhalb der Nukleolardomäne, wahrscheinlich durch Caspase 6. Die Spaltung der Lamine erfolgt bevor eine Fragmentierung der DNA oder eine Kondensation des Chromatins beobachtet werden kann (Rao *et al.*, 1996; Übersicht in Gruenbaum *et al.*, 2000). Die Spaltung der Lamine und auch der Lamin-assoziierten Proteine während der Apoptose ist möglicherweise erforderlich, um das Chromatin von der Kernhülle zu lösen. Einen Hinweis darauf lieferten Versuche mit unspaltbaren Lamin-Mutanten in Kulturzellen. Obwohl Caspasen aktiviert werden, kondensiert in diesen Zellen das Chromatin nicht und die Fragmentierung der DNA ist verzögert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die proteolytische Spaltung der Lamine die Aktivierung von Nukleasen, die für die Fragmentierung der DNA erforderlich sind, fördert (Ruchaud *et al.*, 2002; Übersicht in Cohen *et al.*, 2001).

Neueste Untersuchungen weisen darauf hin, dass eine Verbindung zwischen dem Cytoskelett und dem Kernskelett einer Zelle besteht. Hierbei spielen die Proteine der inneren und äußeren Kernmembran eine zentrale Rolle. Bei SUN Proteinen handelt es sich um integrale Transmembranproteine der inneren Kernmembran. Sie können Lamine innerhalb des Kerns binden. SUN Proteine können auf der anderen Seite mit Nesprinen in der äußeren Membran über den perinukleären Raum hinweg

interagieren. Nesprin Proteine wiederum stehen mit dem cytoplasmatischen Actinnetzwerk in Verbindung. Auf diese Weise wird eine Verbindung zwischen dem Cytoskelett und dem Kernskelett geschaffen (Zhang *et al.*, 2005; Padmakumar *et al.*, 2005; Crisp *et al.*, 2006; Übersicht in Worman und Gundersen, 2006).

Die pathophysiologische Bedeutung der Kernlamina wurde in den letzten Jahren durch die Entdeckung, dass mutierte Kernhüllenproteine für eine wachsende Anzahl von humanen Erbkrankheiten verantwortlich sind, besonders deutlich. Die meisten dieser Krankheiten sind auf Mutationen im Lamin A Gen zurückzuführen, woher sich auch die Bezeichnung „Laminopathien“ ableitet (Übersicht in Somech *et al.*, 2005). Insgesamt sind drei verschiedene Kernhüllenproteine bekannt, in denen Mutationen zu humanen Erbkrankheiten führen: Lamin A/C, Emerin und der Lamin B Rezeptor (LBR). Der klinische Phänotyp der einzelnen Krankheiten ist sehr unterschiedlich und reicht von Herz- und Skelettmypopathien über partielle Lipodystrophie und periphere Neuropathie bis hin zur Progerie (Mounkes *et al.*, 2003b; Übersicht in Somech *et al.*, 2005). Bis jetzt sind etwa 50 Mutationen allein im *LMNA* Gen bekannt, die Laminopathien verursachen. Diese beinhalten Punktmutationen, Leserasterverschiebungen, Deletionen und „non-sense“-Mutationen.

Bei der ersten Krankheit die entdeckt wurde handelt es sich um die X-chromosomal vererbte Emerin-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD) (Bione *et al.*, 1994; Übersicht in Burke und Stewart, 2002). Die X-chromosomale EDMD wird durch den Verlust von Emerin in der Kernperipherie hervorgerufen. Autosomale Formen der EDMD sind mit Mutationen im *LMNA* Gen assoziiert. Bei den weiteren Laminopathien handelt es sich um die Familial partial lipodystrophy (FPLD), die Limb girdle muscular dystrophy (LGMD), Dilated cardiomyopathy (DCM), Charcot-Marie-Tooth disorder (CMT), Pelger Huet-anomaly (PHA, Mutation im LBR) und Hutchinson-Gilford progeria syndrom (HGPS) (Östlund *et al.*, 2001, Übersichten in Mounkes *et al.*, 2003a; Worman und Courvalin, 2004; Mounkes und Stewart, 1994).

Interessanterweise finden sich Mutationen, die zur EDMD führen in allen Domänen des *LMNA* Gens, wohingegen Mutationen, die DCM und LGMD verursachen, nur in der Rod- und Schwanzdomäne zu finden sind. FPLD Mutationen werden nur in der Schwanzdomäne der A-Typ Lamine gefunden (Übersicht in Goldman *et al.*, 2002).

2. Die Klasse V der Intermediärfilamente

Die Gruppe der Lamine bildet die Klasse V der Intermediärfilament-Proteine (IF-Proteine). Im Gegensatz zu allen anderen Typen von IF-Proteinen, die im Cytoplasma Filamente bilden, sind die Lamine die einzigen IF-Proteine, die innerhalb des Zellkerns lokalisiert sind. Die Lamin Proteine sind evolutionär stark konserviert. Wie alle IF-Proteine weisen sie eine charakteristische dreiteilige Struktur auf (Abb. 2). Die dreiteilige Struktur beinhaltet eine stabförmige, zentrale „Rod“-Domäne, die von einer Kopf- und Schwanzdomäne flankiert wird (Geisler *et al.*, 1983; Übersichten in Aebi *et al.*, 1988; Fuchs und Weber, 1994). Die Roddomäne zeigt ein Heptadenmuster mit einem Wiederholungsmotiv von sieben Aminosäuren (Heptade), wobei Aminosäuren mit hydrophoben Resten die Positionen eins und vier in einer Heptade besetzen. Sie bilden ein hydrophobes Band, das sich um die Helix windet. Das Wiederholungsmotiv ist kennzeichnend für die „Coiled-Coil“-Faltung einer Vielzahl von Proteinen. Zwei solcher Helices können einander umwinden und so ein „Coiled-Coil“-Dimer ausbilden. Das Heptadenmuster der Roddomäne ist an mehreren Stellen unterbrochen. Daraus resultieren die 4 α -helikalen Segmente 1A, 1B, 2A und 2B, die durch die Linker L1, L12 und L2 verbunden sind (Strelkov *et al.*, 2002).

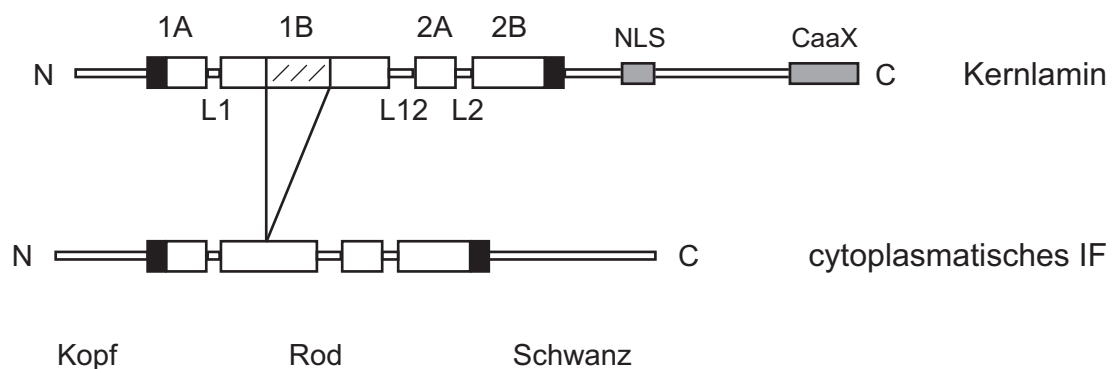


Abb.2: Schematische Struktur eines Kernlamins und eines cytoplasmatischen IF-Proteins

Die Struktur basiert auf dem Vergleich der Primärsequenzen der Kernlamine und der cytoplasmatischen IF's der Vertebraten. Die Roddomäne wird an den Enden von einer nicht-helikalen Kopf- und Schwanzdomäne flankiert. Die hochkonservierten Regionen an beiden Enden der Roddomäne sind in schwarz hervorgehoben. Die hochkonservierten Regionen an beiden Enden der Roddomäne sind in schwarz hervorgehoben. Die helikalen Segmente 1A, 1B, 2A und 2B sind durch die sogenannten Linker-Segmente L1, L12 und L2 unterbrochen. Im Gegensatz zu den cytoplasmatischen IF's verfügen die Kernlamine über ein Kernlokalisierungssignal (NLS), eine CaaX-Box, sowie eine Insertion von 42 Aminosäuren im 1B Segment der Roddomäne.

Die Konservierung der Sequenz der IF-Proteine ist in zwei Regionen besonders hoch. Diese Regionen flankieren die beiden Enden der Roddomäne. Die erste Region umfasst 26 Aminosäurereste und befindet sich am Anfang des 1A Segments.

Am Ende des 2B Segments befindet sich die zweite hochkonservierte Region, die 32 Aminosäurereste umfasst, von denen einige in allen IF-Proteinen konserviert sind (YRKLLGEE) (Herrmann *et al.*, 2000). Chemische Bindungsstudien erbrachten den Nachweis, dass die beiden hochkonservierten Regionen an verschiedenen Dimer-Dimer Interaktionen der Filamente beteiligt sind (Wu *et al.*, 2000; Strelkov *et al.*, 2002).

Die Roddomäne der cytoplasmatischen IF-Proteine der Vertebraten besitzt 310 Aminosäurereste. Die Intermediärfilamente der Klasse V und die cytoplasmatischen Intermediärfilamente der Evertrebraten besitzen im 1B Segment der Roddomäne eine Insertion von 42 Aminosäuren (6 Heptaden). Da bereits der entwicklungs-geschichtlich ursprüngliche Organismus *Hydra* ein Lamin besitzt, wird vermutet, dass die Lamine als erste IF-Proteine in der Evolution aufgetreten sind und dass es sich bei ihnen um die Vorläuferproteine der cytoplasmatischen IF-Proteine handelt (Übersichten in Fuchs und Weber, 1994; Stuurman *et al.*, 1998; Parry und Steinert, 1999; Herrmann und Foisner, 2003).

Die Schwanzdomäne der Lamine besitzt zwei charakteristische Sequenzmotive, die sie von den cytoplasmatischen IF-Proteinen unterscheiden. Bei der ersten handelt es sich um das Kernlokalisierungssignal (NLS), einer kurzen Erkennungssequenz, die die Lamine in den Kern lenkt. Die zweite charakteristische Sequenz ist das C-terminal gelegene CaaX-Sequenzmotiv (bestehend aus Cystein, zwei aliphatischen Aminosäuren und einer variablen Aminosäure X). Diese CaaX-Box unterliegt einer Reihe posttranslationaler Modifikationen. Hierbei erfolgt zunächst eine Isoprenylierung des Cysteins, anschließend werden die letzten drei Aminosäuren abgespalten und die Carboxylgruppe des dann C-terminalen Cysteinrests carboxymethyliert (Übersichten in Schafer und Rine, 1992; Stick, 1995; Stuurman *et al.*, 1998). Isoprenylierung und Carboxymethylierung spielen bei der Membran-assoziaton der Lamine mit der inneren Kernmembran eine Rolle. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass ein extra Cysteinrest, sowie ein zusätzliches Cluster basischer Aminosäuren Voraussetzung für eine stabile Membranassoziaton ist. Dieser zusätzliche Cysteinrest ist vermutlich Ziel einer weiteren Lipidmodifikation, nämlich einer Palmytylierung (Hofemeister *et al.*, 2000).

Über das „Assembly“ der Kernlamine zu Filamenten ist bisher wenig bekannt. Wie bei allen IF-Proteinen erfolgt im ersten Schritt die Dimerisierung, indem sich die α -

Helices zweier Lamine umeinanderwinden. *In vitro* assoziieren die Lamindimere in Längsrichtung aneinander und bilden so Kopf-an-Schwanz Polymere aus. Im nächsten Schritt assoziieren die Kopf-Schwanz-Polymere lateral, möglicherweise in einer antiparallelen, nahezu halbversetzten Weise (Heitlinger *et al.*, 1991). Diese Moleküle sind nicht stabil. Sie assoziieren weiter lateral zu Fasern oder bilden große parakristalline Strukturen. Möglicherweise sind die Kopf-an-Schwanz Polymere erforderlich für die Ausbildung höherer Strukturen, allerdings bleibt ihre Signifikanz für die Lamin Oligomerisierung *in vivo* zu klären (Stuurman *et al.*, 1996). Die Tendenz der Kernlamine *in vitro* Fasern und Parakristalle auszubilden, wurde bei cytoplasmatischen Intermediärfilamenten bisher nicht beobachtet. Es wird vermutet, dass dieses Verhalten auf fehlende Bindungspartner der Kernlamine zurückzuführen ist (Übersicht in Stuurman *et al.*, 1998).

3. Die Lamine der Vertebraten

Wie bereits erwähnt besitzt bereits der relativ einfache Organismus *Hydra* ein Lamin. Von der Sequenz ähnelt es einem B-Typ Lamin (Übersicht in Fuchs und Weber, 1994). Auch der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* besitzt nur ein Lamin Gen, das für das sogenannte Ce-Lamin codiert. In seiner Struktur ähnelt das Ce-Lamin ebenfalls einem B-Typ Lamin (Lee *et al.*, 2000). *Drosophila melanogaster* besitzt zwei Lamin Gene; eines codiert für Lamin Dm_o, einem B-Typ Lamin. Das zweite codiert für Lamin C (Übersicht in Rzepecki, 2002).

Generell können in Vertebraten hinsichtlich ihres biochemischen Charakters zwei Typen von Laminen unterschieden werden: die A- und B-Typ Lamine. A-Typ Lamine sind durch einen neutralen isoelektrischen Punkt charakterisiert, während B-Typ Lamine leicht sauer sind (Übersichten in Gerace und Burke, 1988; Stuurman *et al.*, 1998). Die beiden Lamintypen unterscheiden sich weiterhin in ihrem Verhalten während der Zellteilung, sowie in ihrer Expression. Während der Mitose, wenn es zum Kernhüllenzusammenbruch kommt, bleiben B-Typ Lamine mit den Membranvesikeln assoziiert, wohingegen sich A-Typ Lamine von der Membran lösen und im Cytoplasma verteilen. Eine Ausnahme stellt hier das Lamin LIIIa dar, das als einziges B-Typ Lamin während des Kernhüllenzusammenbruchs in löslicher Form vorliegt (Hofemeister *et al.*, 2000). Das unterschiedliche Verhalten von A-Typ und B-Typ Laminen wird damit begründet, dass B-Typ Lamine an ihrer CaaX-Box permanent isoprenyliert bleiben, wohingegen A-Typ Lamine während oder kurz nach

der Assoziation mit der inneren Kernmembran am C-Terminus proteolytisch prozessiert werden und damit ihren Isoprenrest verlieren (Weber *et al.*, 1989; Furukawa und Hotta, 1993; Übersichten in Georgatos *et al.*, 1994; Stuurman *et al.*, 1998). Für die endoproteolytische Spaltung ist die Protease Zmpste24 (Face1 beim Menschen) verantwortlich (Bergo *et al.*, 2002; Übersicht in Scaffidi und Misteli, 2006). Während B-Typ Lamine in allen Zellen exprimiert werden, werden die A-Typ Lamine meist erst weit nach der Gastrulation, in differenzierten Zellen exprimiert (Übersicht in Burke und Stewart, 2002). B-Typ Lamine sind essenziell in *Drosophila*, *C. elegans* und Zellen der Säuger. A-Typ Lamine sind für die embryonale Entwicklung nicht essenziell, besitzen aber Funktionen in der Differenzierung von Zellen und der Homöostase von Geweben, so dass Lamin A^{-/-} „Knock-Out“-Mäuse 6-8 Wochen nach ihrer Geburt sterben (Sullivan *et al.*, 1999; Übersicht in Herrmann und Foisner, 2003). Bei allen höheren Vertebraten wurden bisher mindestens drei verschiedene Lamin Gene identifiziert: *LMNB1*, *LMNB2* und *LMNA*.

In Fischen, Amphibien und Vögeln gibt es ein weiteres Gen, das Lamin LIII codiert. Seine generelle Struktur ist die eines B-Typ Lamins. Da aber keine eindeutigen Sequenzübereinstimmungen mit den Lamin Subtypen B1 und B2 vorliegen, repräsentiert Lamin LIII vermutlich den dritten B-Subtyp (Stick, 1988; Übersicht in Stick, 1995).

Die Gruppe der A-Typ Lamine besteht aus Lamin A, C, C2 und A Δ 10. Sie sind alle alternative Spleißvarianten eines einzigen Gens, dem *LMNA* Gen. Lamin A und C sind die Spleißvarianten, die am häufigsten auftreten. Sie wurden bisher in allen untersuchten Säugern beschrieben. Bei Lamin A Δ 10 handelt es sich um ein schwach exprimiertes Genprodukt, das bisher nur beim Menschen nachgewiesen wurde (Machiels *et al.*, 1996). Lamin C2 stellt eine kurze Spleißvariante dar, die spezifisch während der Spermatogenese der Säuger exprimiert wird (Alzheimer *et al.*, 1999; Übersicht in Goldman *et al.*, 2002).

Das *LMNB2* Gen codiert neben dem somatischen Lamin B2, auch für eine kurze keimbahnspezifische Spleißvariante, das Lamin B3 (Furukawa und Hotta, 1993). Für das *LMNB1* Gen wurden bisher keine Spleißvarianten identifiziert.

4. Die Spermatogenese und die Kernlamina

Die Spermatogenese der Säuger ist ein komplexer Differenzierungsprozess, an dessen Ende befruchtungsfähige, reife Spermien stehen (Abb. 3). Dieser Differenzierungsprozess kann grob in drei Phasen unterteilt werden: 1. Die Proliferationsphase, die durch die mitotische Teilung der Spermatogonien gekennzeichnet ist, 2. die meiotische Phase, in der das genetische Material der Spermatozyten rekombiniert und verteilt und der Chromosomensatz reduziert wird und 3. die Spermiogenese, die die Differenzierung der runden haploiden Spermatozyten zu reifen Spermien umfasst (Yoshinaga *et al.*, 1991; Übersicht in Kleinig und Maier, 1999).

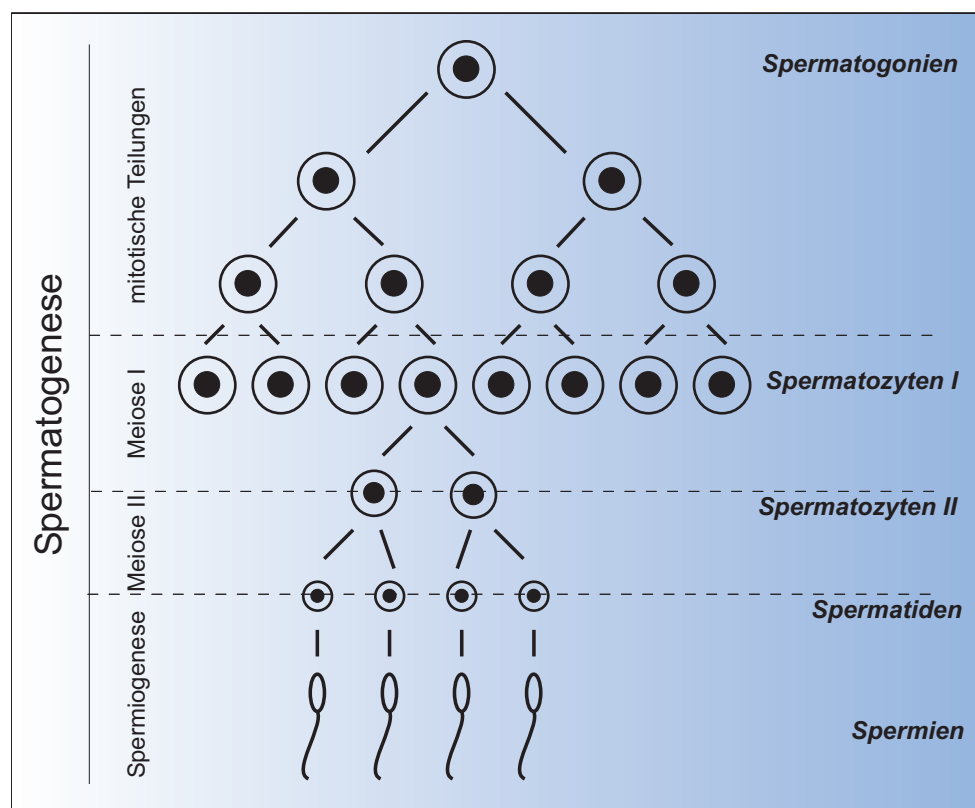


Abb.3: Schematische Darstellung der Spermatogenese der Säuger

Die Spermatogenese umfasst die mitotischen Teilungen der Spermatogonien, die meiotischen Teilungen der Spermatozyten I. und II. Ordnung, in denen das genetische Material rekombiniert und verteilt wird, und die Spermiogenese, in der sich die runden Spermatozyten zu reifen Spermien differenzieren.

Die Spermatogenese ist von dramatischen Veränderungen im Kerninnenraum begleitet. In der Prophase I der Meiose kommt es zur Paarung der homologen Chromosomen und zur Rekombination (*crossing over*). Während diese Ereignisse stattfinden, werden die Telomerregionen der Chromosomen an die Kernhülle

geheftet. Diese Bewegung gilt als Voraussetzung für die homologe Paarung der Chromosomen (Ding *et al.*, 2004 und 2005; Schutz *et al.*, 2005b).

Im Verlauf der Spermiogenese kommt es zu einer kompletten Umorganisation des Zellkerns. Frühe Spermatiden weisen einen runden Kern auf, der im Verlauf der Spermiogenese länger und kleiner wird (Übersicht in Dadoune, 2003). Das Chromatin wird im Verlauf der Spermiogenese sehr stark kondensiert, so dass es sechsmal kompakter vorliegt als in Metaphasechromosomen somatischer Zellen. Aufgrund der starken Kondensierung liegt das Chromatin in reifen Spermien in transkriptionsinaktiver Form vor. Das Chromatin in Spermien unterscheidet sich stark vom somatischen Chromatin. Es ist nur noch zu 15% mit den somatischen Histonen komplexiert. Während die Spermatiden im Verlauf der Spermiogenese verlängert werden, werden die Histone durch Transitionsproteine ersetzt. Diese werden daraufhin durch Pro-Protamine ersetzt, die zu reifen Protaminen gespalten werden (Übersichten in Dadoune, 2003; Mc Lay und Clark, 2003).

Im Vergleich zu somatischen Zellen weist die Kernlamina von Zellen der Spermatogenese einige bemerkenswerte Unterschiede auf. Von den bekannten somatischen Laminen wurde Lamin B1 als das einzige beschrieben, das während der Spermatogenese exprimiert wird. Die somatischen Lamine A, C, und B2 sind in keiner Phase des Differenzierungsprozesses detektierbar (Vester *et al.*, 1993; Schutz *et al.*, 2005b). Statt der typischen somatischen Lamine werden zwei kürzere Varianten, Lamin B3 und C2, exprimiert (Furukawa und Hotta, 1993; Alsheimer und Benavente, 1996). Bei den Laminen B3 und C2 fehlt der Kopf und Teile der Roddomäne, die in diesen Proteinen durch kurze nicht-helikale Sequenzen ersetzt sind. Die Verkürzung der Roddomäne hat zur Folge, dass die keimbahnspezifischen Lamine im Vergleich zu den bisher bekannten somatischen Laminen ein deutlich geringeres Molekulargewicht aufweisen (etwa 52 kD im Gegensatz zu 60-80 kD).

Bei Lamin C2 handelt es sich um eine Spleißvariante des *LMNA* Gens, das in seiner Struktur dem somatischen Lamin C ähnelt (Abb. 4). Beide Proteine besitzen einen identischen C-Terminus, dem eine CaaX-Box fehlt. Coil 1A und etwa 1/3 des Coils 1B sind im Lamin C2 durch eine kurze, nur sechs Aminosäurereste umfassende Kopfsequenz ersetzt (GNAEGR). Es konnte gezeigt werden, dass der N-terminale Glyzinrest durch das Anhängen einer Myristylgruppe posttranslational modifiziert wird. Die Lipidmodifikation ist für die Zielsteuerung des Lamin C2 an die innere

Kernmembran erforderlich (Alzheimer *et al.*, 2000; Prüfert *et al.*, 2005). Lamin C2 konnte bisher in den Spezies Maus und Ratte detektiert werden. Immunhistologische Untersuchungen an Testisgewebe der Ratte zeigten, dass Lamin C2 selektiv während der meiotischen Prophase in primären Spermatozyten exprimiert wird. Es konnte auch gezeigt werden, dass die meiotische Expression des Lamin C2 auf der Ebene der Transkription reguliert wird. Dies steht in Kontrast zur Oogenese der Amphibien, in der die Expression der meisten Lamine hauptsächlich posttranskriptional reguliert wird (Alzheimer und Benavente, 2000).

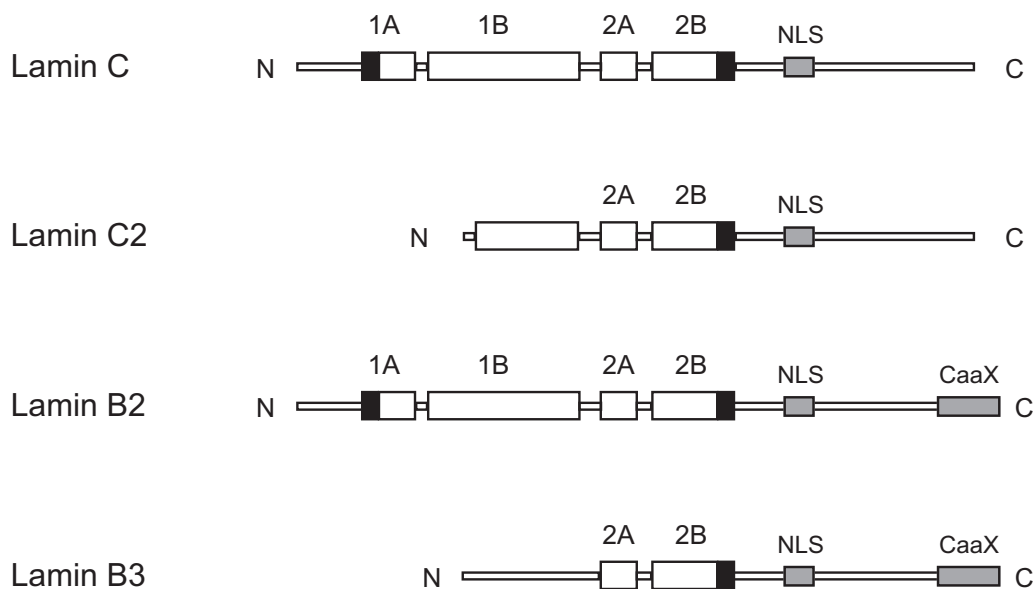


Abb.4: Schematische Struktur der keimbahnspezifischen Lamine C2 und B3 im Vergleich zu ihren somatischen Spleißvarianten

Im Gegensatz zu den somatischen Laminen C und B2 weisen die keimbahnspezifischen Lamine C2 und B3 trunke Roddomänen auf, die durch kurze, nicht-helikale-Sequenzen ersetzt sind.

Lamin B3 stellt eine Spleißvariante des *LMNB2* Gens dar, das bisher nur in der Maus identifiziert werden konnte. Coil 1A und B der helikalen Roddomäne sind im murinen Lamin B3 durch eine 84 Aminosäure lange nicht-helikale Sequenz ersetzt (Furukawa und Hotta, 1993). Expressionsstudien der Spermatogenese der Maus erbrachten den Nachweis, dass Lamin B3 selektiv in postmeiotischen Stadien während der Spermiogenese exprimiert wird. In frühen Stadien der Spermiogenese ist Lamin B3 an der Kernhülle und auch im Nukleoplasma der runden Spermatischenkerne lokalisiert. Im weiteren Verlauf der Spermiogenese konzentriert sich Lamin B3 am posterioren Pol des verlängerten Spermatischenkerns (Schutz *et al.*, 2005b). Die

ektopische Expression von Lamin B3 in somatischen Kulturzellen führt zu einer hakenförmigen Deformierung der Zellkerne (Furukawa und Hotta, 1993).

Es wird vermutet, dass die verkürzte Roddomäne der keimbahnspezifischen Lamine der Kernhülle spermatogenetischer Zellen eine höhere Flexibilität verleiht, die für die spermatogenetischen Ereignisse erforderlich ist (Schutz *et al.*, 2005b).

5. Apoptose in der Frühentwicklung des Krallenfrosches *Xenopus laevis*

Im Krallenfrosch *Xenopus laevis* werden die verschiedenen Lamine entwicklungs- und zelltypspezifisch exprimiert. Lamin LIII bildet die Hauptkomponente der Oozytenlamina und der Lamina der frühen Furchungskerne. Für das Lamin LIII liegen in *Xenopus* zwei Spleißvarianten vor, Lamin LIIIa und LIIIb. Es liegen zwei Kopien eines jeden Gens pro haploidem Genom vor (Doring und Stick, 1990; Übersicht in Stick, 1995). Dies wird dadurch erklärt, dass das *Xenopus* Genom pseudotetraploid ist. Es wird vermutet, dass die Tetraploidisierung das Resultat einer Genomduplikation in der Gattung *Xenopus* vor mehr als 30 Millionen Jahren ist (Bisbee *et al.*, 1977).

Die Lamine B1 und B2 liegen in Oozyten nur in geringen Mengen vor (Lourim *et al.*, 1996). Die mRNAs der Lamine B1 und B2 liegen in Oozyten in translationsinaktiver Form vor. Sie werden erst mit Beginn des Blastula- bzw. Gastrulastadiums translatiert. Die Expression von Lamin A beginnt erst in den Kaulquappenstadien (Wolin *et al.*, 1987; Übersicht in Stick, 1995).

Die Frühentwicklung von *Xenopus* besteht aus einer Serie von schnellen Teilungszyklen, die durch einen maternalen Pool von Proteinen und mRNAs reguliert werden (Newport und Kirschner, 1982a und b; Hensey und Gautier, 1997). Die ersten 12 Teilungszyklen dauern jeweils nur 25 Minuten und bestehen lediglich aus abwechselnder M- und S-Phase (Newport und Kirschner, 1982a und b; Stack und Newport, 1997). Im Anschluss an die 12. Teilung verlängert sich der Zellzyklus und die Zellteilungen werden asynchron. Dieser Zeitpunkt wird als Mid-Blastula-Transition (MBT) bezeichnet und ist gleichzeitig der Zeitpunkt, an dem die zygotische Transkription beginnt (Stack und Newport, 1997; Newport und Kirschner, 1982a und b). Trotz des Beginns der zygotischen Transkription zum Zeitpunkt der MBT findet eine zygotische Kontrolle des Zellzyklus erst zu Beginn der Gastrulation statt, wenn die maternalen mRNAs degradiert worden sind (Howe *et al.*, 1995; Howe und Newport, 1996; Stack und Newport, 1997).

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, ist natürlicher Bestandteil vieler Entwicklungsschritte (Hensey und Gautier, 1998; Übersicht in Jacobsen *et al.*, 1997). Apoptotische Zellen können in der *Xenopus* Entwicklung erst im Stadium 10,5, dem Beginn der Gastrulation, detektiert werden. Wird Apoptose in *Xenopus* Embryonen vor der MBT durch Gamma-Bestrahlung induziert, so können die ersten apoptotischen Zellen ebenfalls erst im Stadium 10,5 detektiert werden (Hensey und Gautier, 1997; Übersicht in Nieuwkoop und Faber, 1967). Eine Inhibierung der zygotischen Transkription durch hohe Dosen von Zellgiften wie Cycloheximid oder α -Amanitin vor der MBT kann ebenfalls die Apoptose in *Xenopus* Embryonen im Stadium 10,5 induzieren. Es wird vermutet, dass das apoptotische Programm in den Embryonen durch eine maternale Komponente aufrechterhalten wird, die nach der MBT durch eine zygotische Komponente degradiert werden muss. Wird die zygotische Transkription inhibiert, so wird die maternale Kontrolle aufrechterhalten und die Embryonen leiten die Apoptose ein (Hensey und Gautier, 1997; Stack und Newport, 1997; Sible *et al.*, 1997).

6. Ziele der vorliegenden Arbeit:

Bei dem keimbahnspezifischen Lamin B3 handelt es sich um ein untypisches Lamin, das eine verkürzte Roddomäne aufweist. Aufgrund seiner Struktur kann vermutet werden, dass es die Filamentbildung der somatischen Lamine, die eine vollständige Roddomäne besitzen, negativ beeinflusst. Transfektionsexperimente in COS 7- und Hela-Zellen haben gezeigt, dass eine ektopische Expression des Lamin B3 in somatischen Zellen zu einer Veränderung der Kernform führt (Furukawa und Hotta, 1993; Schutz *et al.*, 2005a). Diese Beobachtungen sind in Hinsicht auf die inneren und äußeren Veränderungen des Zellkerns während der Spermatogenese besonders interessant. Lamin B3 wurde bisher nur in der Maus, also in einem Säugetier, identifiziert. Das Ziel dieser Arbeit beinhaltete die Suche nach weiteren Lamin B3 Sequenzmotiven mit Hilfe von Gen- und EST-Datenbanken. Hierbei sollte geklärt werden, ob es sich bei dem Lamin B3 um ein Säuger-spezifisches Lamin handelt, oder ob dieses Lamin auch in anderen Vertebratenklassen existiert. Für die Suche in *Xenopus* bot es sich an, einen anderen experimentellen Versuchsansatz zu wählen, da sowohl Versuchstiere, als auch eine Reihe spezifischer Antikörper im Labor zur Verfügung standen.

B Ergebnisse

1. Datenbanksuche nach dem keimbahnspezifischen Lamin B3

Bisher konnte das keimbahnspezifische Lamin B3 Protein nur in der Maus identifiziert werden. Eine cDNA des Lamins B3 wurde aus Testis isoliert und als eine Spleißvariante des *LMNB2* Gens identifiziert. Die Kopfdomäne und die Hälfte der helikalen Roddomäne des Lamins B2, die durch die Exons 0-3 codiert werden, sind im Lamin B3 der Maus durch eine 84 Aminosäuren (AS) lange, nicht-helikale Sequenz ersetzt (Furukawa und Hotta, 1993). Durch eigene Vorarbeiten konnte die Sequenz des murinen B3-Kopfes in einem alternativen Exon im Intron III des *LMNB2* Gens lokalisiert werden (Abb. 5). Dieses B3 spezifische Exon besitzt ein Start ATG, codiert für die B3 spezifischen 84 Aminosäuren und besitzt in der Phase 3 eine Spleißdonorsequenz, die einen Spleiß im richtigen Leseraster des Exons 4 des *LMNB2* Gens erlaubt.

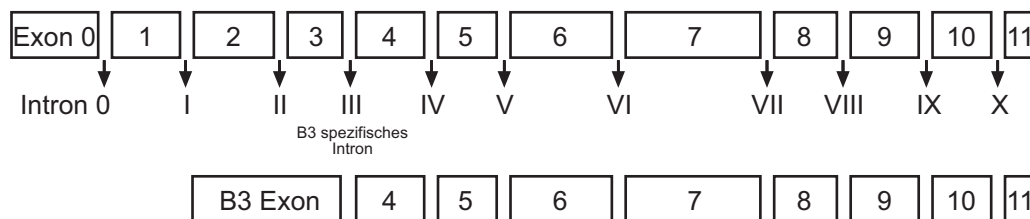


Abb. 5: Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur von Lamin B2 (oben) und Lamin B3 (unten).

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit bestand darin, mit Hilfe von NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) Gendatenbanken in weiteren Spezies nach Lamin B3 Sequenzmotiven zu durchsuchen. Es wurden die Datenbanken aller Vertebraten untersucht, für die genomische Sequenzen vorlagen. Die Suche erfolgte nach folgendem Schema: Zunächst wurde in der Datenbank nach der Nukleotidsequenz der Lamin B2 mRNA der entsprechenden Spezies gesucht. Nicht bei allen Spezies konnte eine Lamin B2 mRNA identifiziert werden. In diesen Fällen wurde eine Lamin B2 Sequenz einer nahe verwandten Spezies zur weiteren Suche verwendet. Mit dieser Sequenz wurde eine BLAST-Suche (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul *et al.*, 1990) gegen das Genom in der Datenbank der jeweiligen Spezies durchgeführt. Wurde eine entsprechende Sequenz im Genom gefunden, wurden diese und die cDNA mit Hilfe des Programms BLAST2Seq aligniert. Diese Vorgehensweise ermöglichte es, die Exon-Intron-Struktur der *LMNB2*

Gene verschiedener Spezies zu bestimmen. Die Exon-Intron Übergänge wurden, falls nötig, manuell korrigiert. Wie in Tabelle 1 zusammengefasst, konnte auf diese Weise das Intron III von 10 weiteren Spezies identifiziert werden. Die Introns wurden danach auf codierende Sequenzen hin untersucht. Die gesuchte Sequenz muss ein Start ATG besitzen, für eine längere Folge von Aminosäuren codieren und, da der Übergang von Exon 3 in Exon 4 des *LMNB2* Gens genau zwischen zwei Codons liegt, muss die gesuchte Sequenz in Phase 3 eine Spleißdonorsequenz aufweisen. Die erhaltenen putativen B3 Sequenzen bzw. das gesamte Intron III wurden dann benutzt, um EST-Datenbanken nach entsprechenden B3-EST-Klonen zu durchsuchen. Hierzu wurde ein BLAST-Algorithmus gewählt, der für kurze nahezu exakte Treffer geeignet ist. Des Weiteren wurde untersucht, ob die jeweiligen Nachbarschaften des *LMNB2* Gens evolutionär konserviert sind.

Vom Kugelfisch *Tetraodon nigroviridis* konnte die komplette Genstruktur des *LMNB2* Gens bestimmt werden. Das Intron III umfasst 123 Nukleotide (nt). Ein mögliches Startcodon ist in dieser Sequenz zwar vorhanden, enthält aber in Phase 3 keine passende Spleißdonorsequenz. Beim Pufferfisch *Takifugu rubripes* konnte ebenfalls die komplette Genstruktur des *LMNB2* Gens bestimmt werden. Wie beim Kugelfisch ist bei dieser Spezies das Intron III sehr klein. Es umfasst nur 178 nt. Auch beim Pufferfisch ist in dieser Sequenz ein Startcodon vorhanden, allerdings fehlt auch hier eine passende Spleißdonorsequenz. Die Introns dieser beiden Fische weisen ansonsten keinerlei Ähnlichkeiten zueinander auf. Da bei den Spezies *Tetraodon* und *Fugu* der Zusammenbau der einzelnen Genomabschnitte noch nicht vollständig ist, war es nicht möglich die Gennachbarschaftsverhältnisse des *LMNB2* Gens auf evolutionäre Konservierung hin zu prüfen.

Die *LMNB2* Genstruktur vom Zebrafisch *Danio rerio* konnte vollständig bestimmt werden. Sie konnte dem Chromosom 1 zugeordnet werden und die Gene in der Nachbarschaft des *LMNB2* Gens konnten bestimmt werden. Es zeigte sich aber keine Konservierung der Region um das *LMNB2* Gen zwischen *Danio* und den untersuchten Säugern. Im Intron III des *LMNB2* Gens, das 2893 nt lang ist, konnten mehrere kurze codierende Sequenzen identifiziert werden, die den oben angegebenen Kriterien entsprechen. Die putativen B3-Köpfe hätten eine Länge von: 30 AS, 16 AS, 26 AS, 9 AS oder 48 AS. Ob jedoch eine dieser Sequenzen tatsächlich exprimiert wird ist nicht klar.

Beim Krallenfrosch *Xenopus tropicalis* konnten bisher nur die Exons 0-7 des *LMNB2* Gens in der Datenbank gefunden werden. Auch die Gennachbarschaft konnte bei dieser Spezies nicht identifiziert werden. Das Intron III umfasst 770 nt und beinhaltet mehrere kurze codierende Regionen, die in einer passenden Spleißdonorsequenz enden. In diesem Fall hätten die putativen B3-Köpfe eine Länge von: 4 AS, 12 AS, 7 AS, 26 AS oder 28 AS.

Beim Huhn (*Gallus gallus*) liegt das *LMNB2* Gen auf dem Chromosom 28. Die Nachbarschaftsverhältnisse des *LMNB2* Gens sind gegenüber den *LMNB2* Genen der untersuchten Säuger nicht konserviert. Die Exon-Intron-Struktur des *LMNB2* Gens konnte vollständig bestimmt werden. Das Intron III weist eine Länge von 1883 nt auf. Innerhalb dieses Introns konnte lediglich ein putativer B3-Kopf mit einer Länge von 21 AS ausgemacht werden.

Die *LMNB2* Genstruktur konnte beim Rind (*Bos taurus*) nur unvollständig identifiziert werden. Es konnten die Exons 0-8 bestimmt werden, wobei der Anfang des Exon 0 ebenfalls fehlt. Das *LMNB2* Gen ist auf dem Chromosom 7 lokalisiert. Die Gennachbarschaft des *LMNB2* Gens ist gegenüber den *LMNB2* Genen der anderen untersuchten Säugetiere konserviert. Das Intron III umfasst 1626 nt. Innerhalb des Introns III konnten mehrere codierende Sequenzen gefunden werden, die ein Start ATG besitzen, für eine längere Folge von Aminosäuren codieren und in der dritten Phase in eine Spleißdonorsequenz übergehen. Diese putativen B3-Köpfe hätten eine Länge von: 27 AS, 20 AS oder 18 AS.

Das *LMNB2* Gen liegt beim Hund (*Canis familiaris*) auf dem Chromosom 20. Die Gennachbarschaft des *LMNB2* Gens ist gegenüber denen der anderen untersuchten Säuger konserviert. Die Exon-Intron-Struktur konnte fast vollständig bestimmt werden. Vom Exon 0 fehlt lediglich der Anfang. Intron III umfasst 2292 nt. Innerhalb dieses Introns konnten zwölf codierende Sequenzen gefunden werden, die den oben angegebenen Kriterien entsprechen. Die putativen B3-Köpfe hätten eine Länge von: 18 AS, 11 AS, 84 AS, 11 AS, 59 AS, 10 AS, 13 AS, 68 AS, 16 AS, 22 AS, 38 AS oder 74 AS.

Bei der Ratte (*Rattus norvegicus*) konnte die Genstruktur des *LMNB2* vollständig bestimmt werden. Das *LMNB2* Gen liegt auf dem Chromosom 7. Die Gennachbarschaft des *LMNB2* Gens ist gegenüber denen der anderen untersuchten Säuger ebenfalls konserviert. Das Intron III der Ratte hat eine Größe von 2182 nt. Innerhalb dieses Introns konnte eine codierende Region von 59 AS ausgemacht

werden, die in der Phase 3 eine Spleißdonorsequenz aufweist. In der EST-Datenbank wurde mit Hilfe der Sequenz des dritten Introns ein entsprechender B3 EST-Klon der Ratte gefunden (CK595079). Die RNA, die diesem EST-Klon zu Grunde liegt, wurde aus Testis isoliert.

Die Sequenzen der *LMNB2* Gene von Mensch (*Homo sapiens*) und Affe (*Pan troglodytes*) liegen beide auf Chromosom 19 und weisen starke Ähnlichkeiten auf. Die Gennachbarschaften des *LMNB2* Gens sind in beiden Spezies gegenüber den *LMNB2* Genen von Ratte und Maus evolutionär konserviert. Im Intron III beider Spezies konnte eine codierende Region von 91 AS gefunden werden, die in der dritten Phase in eine Spleißdonorsequenz übergeht. Mit einer BLAST-Suche konnte in der EST-Datenbank des Menschen mit dem Intron III ein entsprechender EST-Klon gefunden werden (BM563418). Die RNA, die diesem EST-Klon zu Grunde liegt, wurde aus der Medulla (Gehirn) isoliert. Ein unvollständiger EST-Klon (DB457056), der mehr als die Hälfte der 91 AS des humanen Lamin B3-Kopfes besitzt konnte ebenfalls gefunden werden. Dieser EST-Klon stammte aus Testis.

Auch die putativen B3-Köpfe und das Intron III der weiter oben beschriebenen Spezies wurden benutzt, um EST-Datenbanken nach entsprechenden EST-Klonen zu durchsuchen. Bis auf die beschriebenen Fälle bei Mensch, Maus und Ratte blieb diese Suche jedoch bisher erfolglos.

Ein Sequenzvergleich der gefundenen B3 Köpfe zeigt, das schon bei den nahe verwandten Arten Ratte und Maus nur wenig Sequenzübereinstimmungen vorhanden sind. Der humane B3-Kopf zeigt fast keine Übereinstimmungen mehr mit den Sequenzen der beiden Nager. Aufgrund der hohen Sequenzunterschiede ist es *in silico* praktisch unmöglich zu entscheiden, welcher putative B3-Kopf der anderen Säuger für das Lamin B3 verwendet werden könnte.

Tabelle 1: Zusammengefasste Darstellung der Lamin B2 Gene und dem dazugehörigen Intron III verschiedener Spezies

Spezies	LMNB2 Gen	Lokalisation	Gen-Nachbarschaft des LMNB2 Gens	Intron III	Codierende Sequenz im Intron III
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Vollständig	Gerüst 14488	Bisher nicht auszumachen	123 nt	1 ATG, aber keine Spleißdonorsequenz
<i>Takifugu rubripes</i>	Vollständig	Gerüst 6482/7678/3912	Bisher nicht auszumachen	178 nt	1 ATG, aber keine Spleißdonorsequenz
<i>Danio rerio</i>	Vollständig Gene ID: 30196	Chromosom 1	-2 Ubiquitin spezifische Protease 34; Gene ID: 562779 -1 Syntaxin 16 Isoform b; Gene ID: 562857 +1 RPL36; Gene ID: 405888 +2 LON Protease; Gene ID: 563257	2893 nt	30 AS, 16 AS, 26 AS, 9 AS, 48 AS
<i>Xenopus tropicalis</i>	Exons 0-7	Gerüst 1800	Bisher nicht auszumachen	770 nt	4 AS, 12 AS, 7 AS, 26 AS, 28 AS
<i>Gallus gallus</i>	Vollständig Gene ID: 396222	Chromosom 28	-2 PSL1; Gene ID: 420056 -1 TMPRSS9; Gene ID: 428320 +1 RPL36; Gene ID: 373936 +2 EAAT4; Gene ID: 420057	1883 nt	21 AS
<i>Bos taurus</i>	Exons 0-8 Gene ID: 516326	Chromosom 7	-3 GNG7; Gene ID: 618399 -2 hypothetisches Protein; Gene ID: 618401 -1 GADD45B; Gene ID: 618405 +1 TIMM13; Gene ID: 516325 +2 TMPRSS9; Gene ID: 518647	1626 nt	27 AS, 20 AS, 18 AS
<i>Canis familiaris</i>	Fast vollständig Gene ID: 485070	Chromosom 20	-2 GNG7; Gene ID: 612139 -1 GADD45B; Gene ID: 485069 +1 TIMM13; Gene ID: 612151 +2 TMPRSS9; Gene ID: 612155	2292 nt	18 AS, 11 AS, 84 AS, 11 AS, 59 AS, 10 AS, 13 AS, 68 AS, 16 AS, 22 AS, 38 AS, 74 AS
<i>Pan troglodytes</i>	Fast vollständig Gene ID: 468657	Chromosom 19	-2 TMPRSS9; Gene ID: 468655 -1 TIMM13; Gene ID: 468656 Sequenz dahinter unvollständig	3666 nt	91 AS Zu 97% identisch mit Hs B3-Kopf
<i>Homo sapiens</i>	Vollständig Gene ID: 84823	19p13.3	-2 TMPRSS9; Gene ID: 360200 -1 TIMM13; Gene ID: 26517 +1 GADD45B; Gene ID: 4616 +2 GNG7; Gene ID: 2788	2990 nt	91 AS EST-Klon: BM563418 DB457056
<i>Rattus norvegicus</i>	Vollständig Gene ID: 299625	7q11	-2 GADD45B; Gene ID: 299626 -1 GNG7; Gene ID: 58979 +1 TIMM13; Gene ID: 252928 +2 TMPRSS9; Gene ID: 314636	2182 nt	59 AS EST-Klon: CK595079
<i>Mus musculus</i>	Vollständig Gene ID: 16907	10 43.0 cM	-2 TMPRSS9; Gene ID: 432478 -1 TIMM13; Gene ID: 30055 +1 GADD45B; Gene ID: 17873 +2 GNG7; Gene ID: 14708	1633 nt	84 AS EST-Klone: BB573072 BB574040 CJ046645

*die Abkürzungen der Gene können dem Abkürzungsverzeichnis entnommen werden

2. Generierung Epitop-getagter Lamin B3 Konstrukte

Der Klon BM563418, der die gesamte Sequenz des humanen Lamin B3 umfasst, wurde von der Firma Invitrogen bezogen. Der Klon befand sich im Vektor pCMVSPORT6. Um das humane Lamin B3 in den nachfolgenden Untersuchungen von seiner somatischen Lamin B2 Variante unterscheiden zu können, wurde eine Flag-Epitop markierte Variante generiert. Epitop-Tags werden bei den Laminen generell am N-Terminus eingebaut, da ein Epitop am C-Terminus die Membranassoziation beeinflussen würde. Die codierende Region des Lamins B3 wurde durch einen *EcoRI/NotI* Doppelverdau aus dem Sport-Vektor ausgeschnitten und in den *EcoRI/NotI* geschnittenen pCS Ft-Vektor (Flag) einkloniert. Zur Kontrolle wurde der pCS Ft-B3-Vektor sequenziert. Die zugehörige Sequenz ist im Anhang zu finden.

Des Weiteren bestand eine Zusammenarbeit mit Dr. Amy Rowats (University of Southern Denmark) über die mechanische Veränderung der Kernhülle in Abhängigkeit von der Expression verschiedener Lamine. Für die Arbeiten in diesem Rahmen war es notwendig eine Fluorophor-tragende Version des Lamin B3 herzustellen, das in den Versuchen eine Unterscheidung zu GFP-Lamin A (green fluorescent protein) zulässt. Da YFP (yellow fluorescent protein) als Fluorophor für diese Zwecke geeignet ist und ein YFP-Vektor zur Verfügung stand, wurde YFP gewählt. Das YFP-Insert wurde aus dem YFP-Actin Vektor mit Hilfe spezifischer Primer in einer Standard-PCR amplifiziert. Das YFP-Insert wurde an den N-Terminus des Ft-B3 einkloniert. Hiermit stand ein doppelt markiertes Lamin B3 zur Verfügung.

Das Verhalten der generierten Konstrukte wurde in *Xenopus* Oozyten und Embryonen sowie in verschiedenen Kulturzellen analysiert.

3. Versuche mit Oozyten

Um zu prüfen, ob sich das in der Datenbank gefundene Lamin B3 *in vivo* wie ein typisches Lamin verhält, wurden zunächst Versuche mit *Xenopus* Oozyten durchgeführt. Hierbei sollte ebenfalls geklärt werden, ob die ektopische Expression des Lamins B3 einen Einfluss auf die Kernform oder die Struktur der endogenen Lamina hat. Die Expression von Lamin Ft-B3 in Oozyten erfolgte durch Mikroinjektion von mRNA in das Cytoplasma. Es wurden 3,2 ng mRNA (in 32 nl) pro Oozyte injiziert.

3.1 Nachweis des Lamins B3 in Oozyten durch Westernblot Analyse

Für die nachfolgenden Versuche war es wichtig zu untersuchen, ob der Antikörper L7-8C6, der ein Epitop in der Schwanzdomäne des *Xenopus* Lamins B2 erkennt, mit dem humanen Lamin B3 kreuzreagiert. Außerdem sollte geklärt werden, ob Lamin B2 und B3 in dem von uns verwendeten Gelsystem aufgrund ihres Molekulargewichts voneinander zu unterscheiden sind.

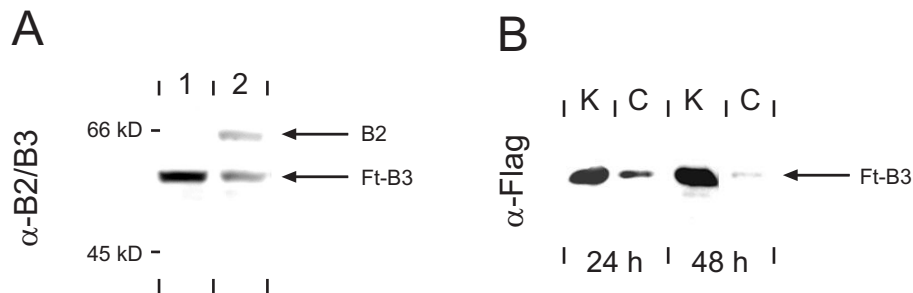


Abb. 6: Immundetektion von Lamin Ft-B3 und B2 in Kernen, Cytoplasmen und gesamten Oozyten

A: 1) Oozyten nach Injektion von Lamin Ft-B3; 2) Oozyte nach Coinjektion von Lamin B2 und Ft-B3. Die Immundetektion erfolgte mit dem Lamin B2 spezifischen Antikörper L7-8C6.

B: Nachweis von Ft-B3 in Kernen und Cytoplasmen von Oozyten 24 und 48 h nach der Injektion. Die Immundetektion erfolgte mit dem Flag-Epitop spezifischen Antikörper M2.

Die mRNA des humanen Lamins Ft-B3 und/oder des *Xenopus* Lamins B2 wurden in Oozyten injiziert. 24 h nach der Injektion wurden die Proteine aus einzelnen Oozyten isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen. Ein Ausschnitt eines Westernblots ist in Abbildung 6 A gezeigt. In der ersten Spur ist die Proteinfraction einer Lamin Ft-B3 injizierten Oozyte aufgetragen. Es wurde ein Lamin Ft-B3 spezifisches Signal im Molekulargewichtsbereich von etwa 55 kD detektiert. In der zweiten Spur wurde die Proteinfraction einer Lamin B2 und Ft-B3 coinjizierten Oozyte aufgetragen. Es wurden zwei Signale detektiert: eines ist spezifisch für das *Xenopus* Lamin B2 und liegt im Molekulargewichtsbereich von etwa 66 kD, das andere, spezifisch für Lamin B3, liegt im Molekulargewichtsbereich von 55 kD. Die Ergebnisse belegen eine Kreuzreaktion des *Xenopus* Lamin B2 spezifischen Antikörpers L7-8C6 mit dem humanen Lamin B3. Die beiden Spleißvarianten sind aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts deutlich voneinander zu unterscheiden. Aus der Abbildung 6 A (Spur 1) wird auch deutlich, dass in *Xenopus*

Oozyten unter den gegebenen Bedingungen kein endogenes Lamin B2 nachweisbar ist.

Durch die manuelle Trennung von Kern und Cytoplasma einer Oozyte sollte untersucht werden, wo das ektopisch exprimierte Lamin B3 lokalisiert ist. Aufgrund des Vorhandenseins eines NLS sollte Lamin B3 nach seiner Translation im Cytoplasma in den Kern transportiert werden und dort angereichert werden. Nach 24 bzw. 48 h wurden Kerne und Cytoplasmen der Oozyten manuell getrennt und aufgearbeitet. Die entsprechenden Proteinfractionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen. Die Detektion im Westernblot erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper M2, der gegen das Flag-Epitop gerichtet ist. Ein Ausschnitt des Westernblots, der die Lamin Ft-B3 spezifischen Signale enthält, ist in der Abbildung 6 B dargestellt. Nach 24 h ist bereits ein großer Anteil des Lamin B3 Proteins im Kern der Oozyten detektierbar. Im dazugehörigen Cytoplasma ist ebenfalls ein deutliches, wenn auch schwächeres Lamin Ft-B3 Signal detektierbar. Nach 48 h ist die Lamin B3 Proteinmenge im Kern noch weiter angestiegen und im dazugehörigen Cytoplasma lässt sich nur noch ein schwaches Signal erkennen. Die Ergebnisse zeigen, dass Lamin B3 *in vivo* effizient translatiert und, wie erwartet, nach seiner Translation im Cytoplasma in den Kern transportiert wird.

3.2 Immunhistologischer Nachweis des Lamins B3 an der Kernhülle von Oozyten

Die bisherigen Ergebnisse konnten zeigen, dass Lamin B3 nach seiner Translation im Cytoplasma in den Kern der Oozyte transportiert wird. Mit Hilfe von Gefrierschnitten sollte die Lokalisation des Lamins B3 im Kern der Oozyten näher untersucht werden. Aufgrund des Vorhandenseins einer CaaX-Box wird eine Interaktion mit der inneren Kernmembran erwartet. Des Weiteren sollte sich bei diesen Versuchen zeigen, ob die ektopische Lamin B3 Expression Einfluss auf die endogene Laminstruktur nimmt. Oozyten wurden 24 h nach der Injektion fixiert. Nach der Aufarbeitung wurden die Oozyten eingebettet und am Gefriermikrotom geschnitten. Es wurden 10 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte nach Standardprotokoll gefärbt und eingebettet. Die Analyse der Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops.

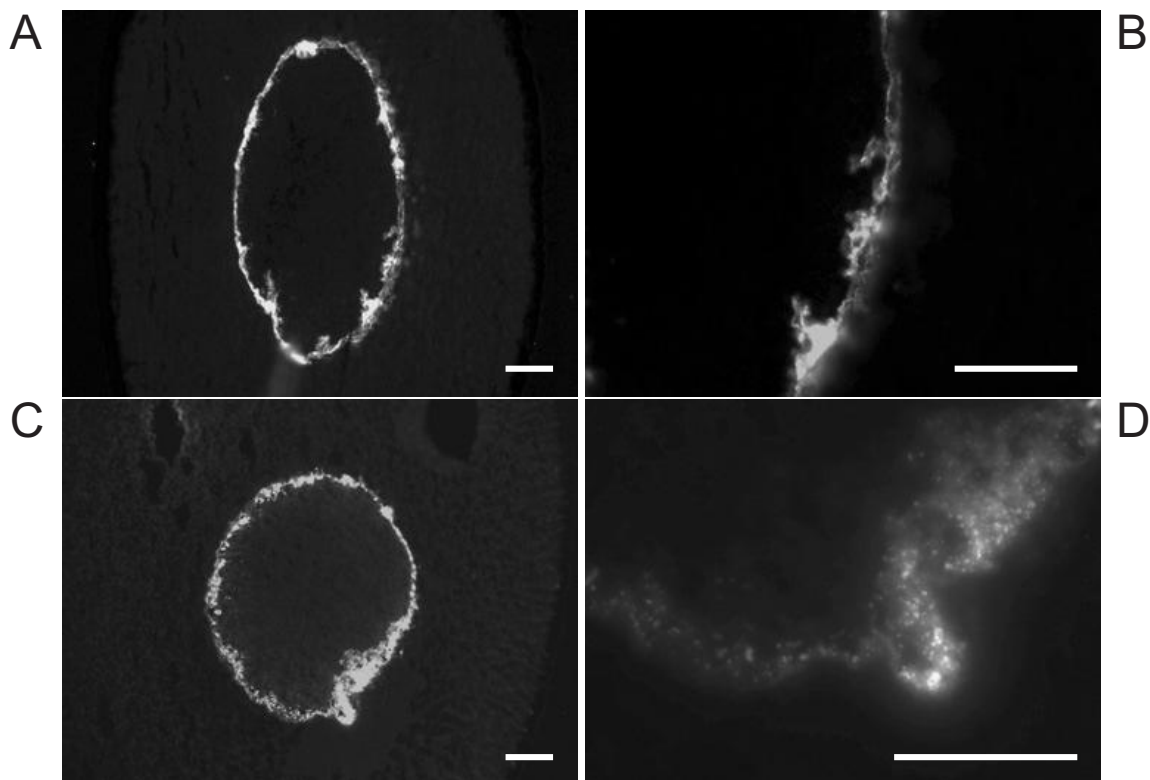


Abb. 7: Indirekte Immunfluoreszenz von Gefrierschnitten Lamin Ft-B3 injizierter Oozyten

Die Schnittdicke beträgt 10 μm . Alle gezeigten Oozyten wurden mit Ft-B3 mRNA injiziert.
A+B: Nachweis des endogenen Lamins LIII mit dem monoklonalen Antikörper L₀46F7
C+D: Nachweis des Lamins Ft-B3 mit dem monoklonalen Antikörper M2 (anti Flag)
Maßstab: 50 μm .

In Abbildung 7 sind ausschließlich Schnitte von Lamin Ft-B3 injizierte Oozyten gezeigt. In den Aufnahmen A und B wurde das endogene Lamin LIII angefärbt. Lamin LIII ist ausschließlich in der Kernperipherie nachzuweisen. Die Aufnahmen C und D zeigen das ektopisch exprimierte Lamin Ft-B3. Lamin Ft-B3 ist ebenfalls in der Kernperipherie lokalisiert. Im Gegensatz zu der Struktur des endogenen Lamins LIII erscheint die Verteilung des ektopisch exprimierten Lamins B3 diffuser. Außerdem sind die Lamin Ft-B3 Strukturen weniger homogen als die des endogenen Lamins LIII. Wie in der Detailaufnahme D zu sehen ist, bildet Lamin Ft-B3 kleine punktförmige Aggregate aus, die für das endogene Lamin LIII nicht detektiert werden konnten. Eine Veränderung der endogenen Laminstruktur war nicht festzustellen.

3.3 Saccharosegradientenzentrifugation

Zur Untersuchung der Membranassoziation des Lamins B3 wurden Ultrazentrifugationsversuche mit *Xenopus* Eihomogenaten durchgeführt.

Oozyten des Stadiums V und VI wurden mit Lamin Ft-B3 mRNA injiziert. 24 h nach der Injektion wurden die Oozyten durch Zugabe des Hormons Progesteron zu befruchtungsfähigen Eiern gereift. Befruchtungsfähige Eier sind in der Metaphase II der Meiose arretiert, d. h. die Kernhülle ist zusammengebrochen und die Lamine liegen in depolymerisierter Form vor. Lamine die über eine CaaX-Box verfügen, sollten in dieser Phase mit den Membranen assoziiert bleiben. Durch Saccharosegradientenzentrifugation können Membranvesikel und Membranassoziierte Proteine von löslichen Proteinen oder Proteinaggregaten aufgrund ihrer geringeren Dichte getrennt werden. Membranvesikel, die mit einer abnehmenden Konzentration Saccharose überschichtet sind, sollten während der Ultrazentrifugation mit den an ihnen assoziierten Proteinen flottieren und daher nach Beendigung der Zentrifugation in den oberen Fraktionen eines solchen Gradienten zu finden sein. Lösliche Proteine hingegen sollten in den Bodenfraktionen verbleiben.

In Abbildung 8 zeigen die oberen beiden Westernblots den Nachweis des ektopisch exprimierten Lamins Ft-B3. Lamin Ft-B3 ist zwar auch in den beiden Bodenfraktionen detektierbar, die größte Menge wurde aber in den höheren Fraktionen gefunden. In den beiden Bodenfraktionen und den ersten Membranfraktionen sind zusätzlich noch Banden mit niedrigem Molekulargewicht detektierbar. Hierbei handelt es sich um unspezifische Hintergrundsreaktionen, die nach längeren Expositionen der Westernblots sichtbar werden. Da die meisten Proteine in diesen Eiextrakten löslich sind und sich daher nach der Ultrazentrifugation in den Bodenfraktionen befinden, sind diese Fraktionen stark überladen. Die sehr hohe Proteinmenge begünstigt unspezifische Hintergrundfärbung.

Als Kontrolle für die effiziente Trennung von löslichen und membrangebundenen Proteinen während der Gradientenzentrifugation diene das endogene lösliche Protein Nucleoplasmin. Nucleoplasmin ist das häufigste Kernprotein in *Xenopus* Oozyten. Es hat in seiner monomeren Form ein Molekulargewicht von 30 kD. Es ist aber bekannt, dass es in SDS-Gelen ein etwas höheres Molekulargewicht aufweist. Nucleoplasmin ist außerdem in der Lage auch unter denaturierenden Bedingungen stabile Pentamere auszubilden (Bürglin *et al.*, 1986; Wedlich und Dreyer, 1988).

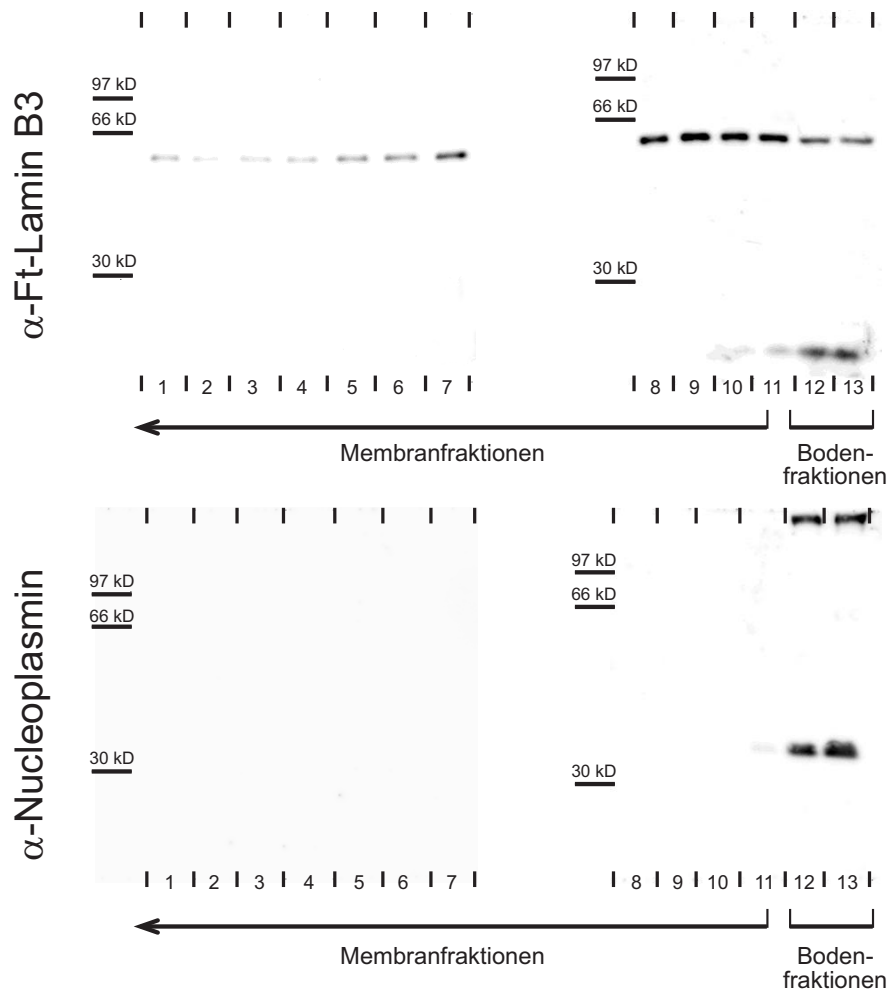


Abb. 8: Immundetektion von Lamin Ft-B3 und Nucleoplasmin in Progesteron gereiften Oozyten nach Saccharosegradientenzentrifugation

Nach der Zentrifugation erfolgte die Fraktionierung des Gradienten. Bei der Fraktion 1 handelt es sich um die oberste Membranfraktion. Zusammen mit den Fraktionen 2-11 bilden sie die Membranfraktionen, in denen membranassoziierte Proteine zu finden sind. Die Fraktionen 12 und 13 bilden die Bodenfraktionen, in denen lösliche Proteine zu finden sind. Oben: Nachweis des ektopisch exprimierten Lamins Ft-B3 mit Hilfe des Flag spezifischen Antikörpers M2. Unten: Nachweis des löslichen Nucleoplasmin durch eine zweite nachfolgende Immunreaktion mit Hilfe des Antikörpers B7-1A9. Als Sekundärantikörper diente der POD gekoppelte anti-Maus Antikörper aus der Ziege.

In dem in Abbildung 8 gewählten Gelsystem läuft Nucleoplasmin in seiner monomeren Form entsprechend dem Molekulargewicht von etwa 35 kD. Die Nucleoplasmin spezifischen Signale sind fast ausschließlich in den beiden Bodenfraktionen zu detektieren. Ein schwaches Signal ist auch noch in der Fraktion 11, der Übergangsfraction, zu finden. In den beiden Bodenfraktionen sind auch noch Signale im höheren Molekulargewichtsbereich detektierbar. Hierbei handelt es sich vermutlich um Pentamere des Nucleoplasmins, die nicht vollständig denaturiert wurden. Aus dem Ergebnis der Saccharosegradientenzentrifugation wird deutlich,

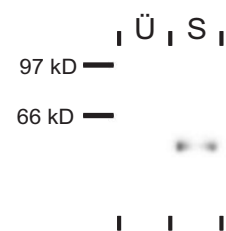
dass es sich bei Lamin B3 um ein Protein handelt, das während des Kernhüllen-zusammenbruchs mit Membranen assoziiert bleibt.

3.4 Hochsalzextraktion

Ein typisches Lamin sollte nach Behandlung mit nicht-ionischen Detergenzien oder hohen Salzkonzentrationen weiterhin supramolekulare Strukturen bilden (Übersicht in Krohne und Benavente, 1986). Im Anschluss an eine typische Hochsalzbehandlung sollte ein Lamin daher nach der Zentrifugation in der Sedimentfraktion zu finden sein. Es wurden 20 Kerne Lamin Ft-B3 injizierter Oozyten manuell isoliert und einer Hochsalzbehandlung unterzogen. Die erhaltenen Überstand- und Sedimentfraktionen wurden zur Analyse gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 9). Die Immundetektion im Westernblot erfolgte mit dem gegen das Flag-Epitop gerichteten Antikörper M2. In der Überstandsfraktion ist kein Lamin Ft-B3 spezifisches Signal nachzuweisen. Die Sedimentfraktion weist dagegen ein Lamin Ft-B3 spezifisches Signal im Molekulargewichtsbereich von etwa 55 kD auf.

Abb. 9: Immundetektion von Lamin Ft-B3 in Kernen von Oozyten nach Hochsalzextraktion

20 Lamin Ft-B3 injizierte Kerne wurden einer Hochsalzextraktion unterzogen. Die aufgearbeiteten Fraktionen des Überstands (Ü) und des Sediments (S) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Immundetektion erfolgte mit dem Flag-Epitop spezifischen Antikörper M2. Als Sekundärantikörper diente ein POD-gekoppelter anti-Maus Antikörper aus der Ziege.



Dieses Ergebnis zeigt eine Lamin-typische Eigenschaft für das Lamin Ft-B3 Protein. Die supramolekularen Strukturen des Lamin Ft-B3 sind auch nach einer Hochsalzbehandlung noch stabil und Lamin B3 ist in der Sedimentfraktion zu finden.

4. Versuche mit Embryonen

Xenopus Embryonen eignen sich hervorragend für die Expressionsanalyse der Lamine. Die Entwicklung der *Xenopus* Embryonen verläuft in den frühen Stadien sehr schnell und eine Teilung der Zellen erfolgt bis zum Stadium 8 in kurzen Zyklen von etwa 25 Minuten Dauer. Ein Effekt der Lamin B3 Expression auf die Kernstruktur sollte sich hier leichter nachweisen lassen als in Oozyten, deren Kerne mit einem Durchmesser von bis zu 600 µm sehr groß sind. Da die verwendeten Oozyten in der Prophase der ersten meiotischen Reifeteilung arretiert sind, sind ihre Kerne außerdem relativ inert gegen Veränderungen (Baulieu *et al.*, 1978).

4.1 Expression von Lamin B3 in *Xenopus* Embryonen

Die Expression von Lamin Ft-B3 in *Xenopus* Embryonen erfolgte durch die Injektion von synthetischer mRNA im 1-Zellstadium. Es wurden 0,82 ng mRNA (in 8,2 nl) pro Embryo injiziert. Zur weiteren Entwicklung wurden die Embryonen bei RT inkubiert. Die Einteilung der Stadien entsprach der von Nieuwkoop und Faber (1967). Hatten die Embryonen die bestimmten Entwicklungsstadien erreicht, wurden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder für die Immunhistologie fixiert.

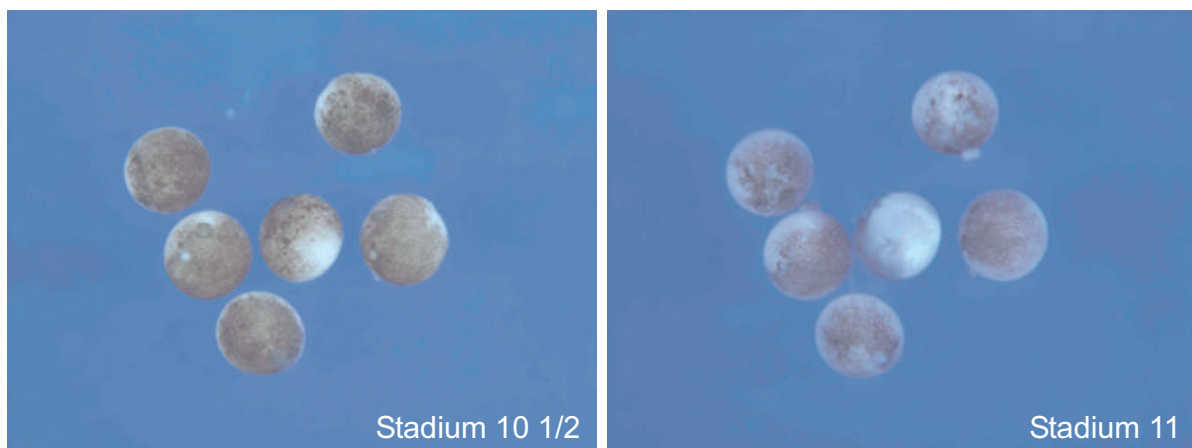


Abb. 10: Hellfeldaufnahmen Lamin Ft-B3 injizierter *Xenopus* Embryonen

Bei den beiden Abbildungen handelt es sich um Hellfeldaufnahmen von Lamin Ft-B3 injizierten Embryonen in Stadium 10,5 (links) und Stadium 11 (rechts). Während die Embryonen in Stadium 10,5 erst wenige Pigmentstörungen zeigen, sind diese in Stadium 11 bereits sehr stark ausgeprägt und eine weitere Entwicklung der Embryonen war nicht mehr auszumachen.

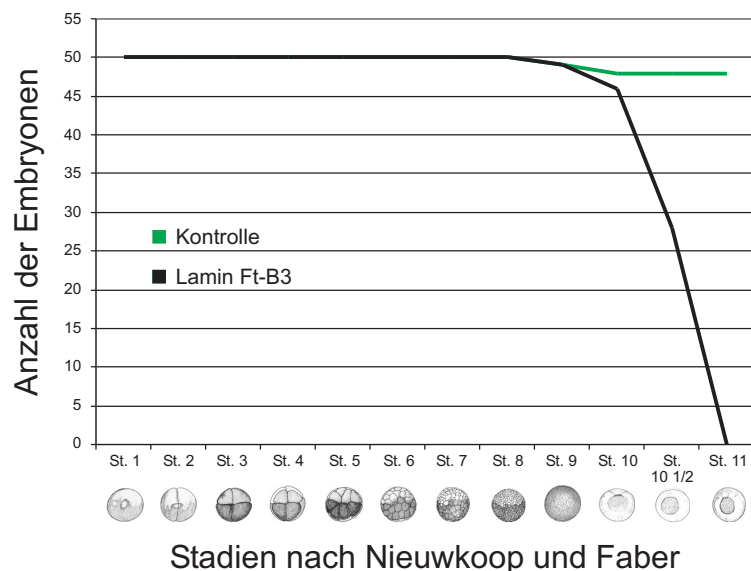
Lamin Ft-B3 injizierte Embryonen entwickelten sich zunächst normal. Die Zellteilungen erfolgten alle 20-30 Minuten und verliefen in etwa synchron mit den Teilungen der nicht oder mit H₂O injizierten Kontrollembryonen. Ab dem Stadium 10,5 konnten weißliche Verfärbungen der Embryonen beobachtet werden, die sich mit fortschreitender Entwicklung schnell ausbreiteten und in Stadium 11 bereits den ganzen Embryo einnahmen (Abb. 10). Die Bildung des Urmunds der Embryonen hatte bei Einsetzen der Verfärbung bereits begonnen. Allerdings wurden die Gastrulationsbewegungen nicht vollendet, da die Embryonen vorher abstarben. Eine CD mit einer Filmsequenz, die die Entwicklung der Lamin Ft-B3 injizierten Embryonen im Stadium 10,5 bis 11 wiedergibt, ist der letzten Seite dieser Arbeit beigelegt.

In Abbildung 11 ist die Entwicklung Lamin Ft-B3 injizierter Embryonen im Vergleich zu H₂O injizierten Kontrollembryonen grafisch dargestellt. Die Anzahl der überlebenden Lamin Ft-B3 injizierten Embryonen ist bis Stadium 10,5 konstant und

nimmt dann drastisch ab. Die Embryonen wurden als tot klassifiziert, wenn sich mindestens 50% ihrer Oberfläche weißlich verfärbt hatte. Die meisten der Lamin Ft-B3 injizierten Embryonen sterben zwischen Stadium 10,5 und 11. Nach Stadium 11 waren alle Lamin Ft-B3 injizierten Embryonen tot. Im Gegensatz dazu durchliefen nahezu alle Kontrollembryonen eine normale Gastrulation und zeigten keine Defekte. Um zu untersuchen, ob der dominant negative Effekt durch das Lamin B3 oder durch das Flag-Epitop verursacht wird, wurde dieser Versuch mit einem Lamin B3 ohne Flag-Epitop wiederholt (Daten nicht gezeigt). Auch in dieser Injektionsserie entwickelten sich die Embryonen zunächst normal und starben wiederum kurz nach dem Eintritt in die Gastrulation im Stadium 10,5-11. Diese Ergebnisse zeigen, dass die gestörte Entwicklung der *Xenopus* Embryonen auf die ektopische Expression des Lamins B3 zurückzuführen ist und nicht durch die Flag-Markierung bedingt ist.

Abb. 11: Grafische Darstellung der Entwicklung Lamin Ft-B3 injizierter Embryonen im Vergleich zu Kontrollembryonen

Auf der X-Achse sind die Entwicklungsstadien nach Nieuwkoop und Faber (1967) eingetragen, auf der Y-Achse die Anzahl der zum jeweiligen Zeitpunkt noch lebenden Embryonen. Bei den Kontrollen handelt es sich um H₂O injizierte Embryonen.



4.2 Nachweis von Lamin B3 in Embryonen durch Westernblot Analyse

Die Expression von Lamin Ft-B3 in *Xenopus* Embryonen wurde durch eine Westernblot Analyse kontrolliert.

Lamin Ft-B3 injizierte Embryonen der Stadien 3-10,5 wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zusätzlich wurde ein toter Embryo 24 h nach der Injektion schockgefroren. Die Proteine wurden isoliert und in einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen. Im Westernblot wurde zunächst das endogene Lamin LIII nachgewiesen. Die Immundetektion erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper L₀46F7, der gegen Lamin LIII gerichtet ist (Benavente

et al., 1985). Wie Abbildung 12 A zeigt ist das endogene LIII Protein in allen untersuchten Stadien der embryonalen Entwicklung detektierbar. Die Lamin LIII spezifischen Signale befinden sich in einer Position entsprechend einem Molekulargewicht von 66 kD. Nach Stadium 8, dem Zeitpunkt der MBT kann ein Anstieg der LIII Menge beobachtet werden. Dieser Anstieg ist in der Literatur beschrieben und weist darauf hin, dass die Entwicklung der Embryonen bis zu diesem Stadium normal verläuft (Stick und Hausen, 1985). Nach 24 Stunden kann nur noch ein schwaches LIII spezifisches Signal detektiert werden.

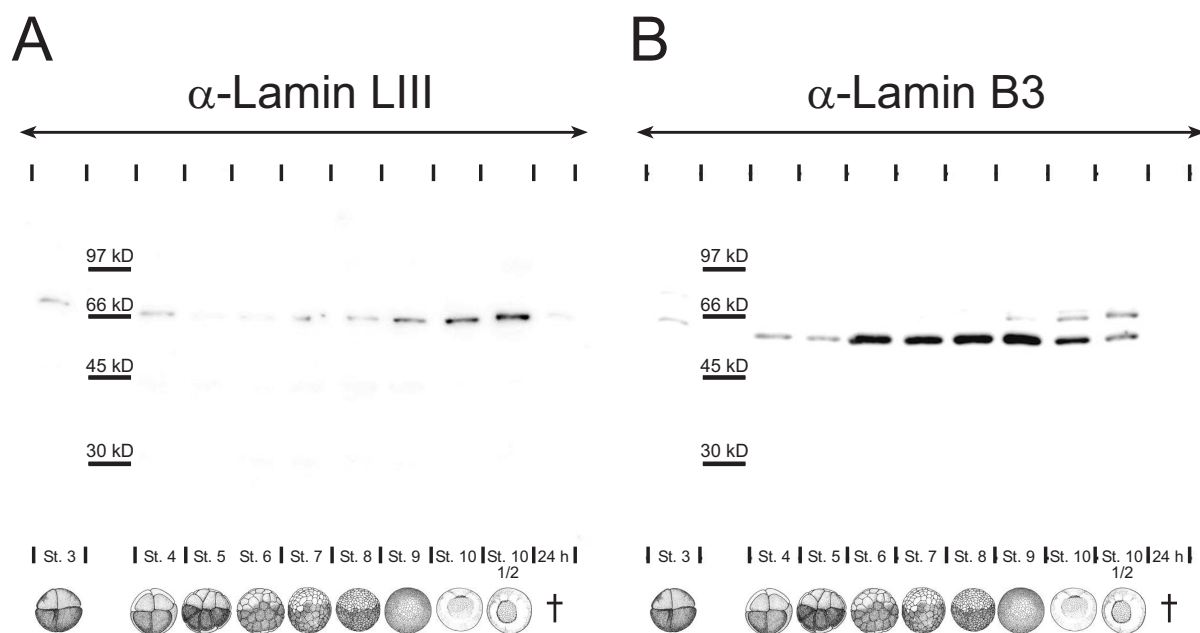


Abb. 12: Immundetektion von Lamin Ft-B3 und LIII in Lamin Ft-B3 injizierten Embryonen verschiedener Stadien

A: Nachweis des endogenen Lamins LIII mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers L₀46F7.

B: Nachweis des ektopisch exprimierten Lamins Ft-B3 mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers M2 (α -Flag).

Aufgrund der schwächeren Reaktivität des Lamin LIII spezifischen Antikörpers, wurde dieser im ersten Immunnachweis eingesetzt. Im zweiten Nachweis erfolgte die Immundetektion des ektopisch exprimierten Lamin Ft-B3. Die Einteilung der Stadien erfolgte nach Nieuwkoop und Faber (1967).

Im zweiten Nachweis erfolgte die Immundetektion des ektopisch exprimierten Lamins Ft-B3. Es wurde der Flag-Epitop spezifische Antikörper M2 verwendet. Die Signale sind spezifisch für das Lamin Ft-B3. Es läuft entsprechend einem Molekulargewicht von 55 kD. Bereits in Stadium 3 kann ein schwaches Lamin Ft-B3 spezifisches Signal detektiert werden. Die Menge des Ft-B3 nimmt im Laufe der embryonalen Entwicklung ständig zu und erreicht ihr Maximum in Stadium 9. In den darauf

folgenden Stadien geht die Menge des Ft-B3 zurück. 24 h nach der Injektion ist kein Lamin Ft-B3 mehr nachweisbar. Bei den Signalen im Molekulargewichtsbereich von 66 kD in den Stadien 9-10,5 handelt es sich um das endogene LIII. Da die Antikörper des ersten Nachweises nicht entfernt wurden und diese Stadien im ersten Nachweis die stärksten Signale aufweisen, können diese auch im zweiten Nachweis weiterhin detektiert werden.

4.3 Histologie Lamin B3 injizierter Embryonen

Zur weiteren Analyse wurden die Lamin Ft-B3 injizierten Embryonen immunhistologisch untersucht. Frühere Studien zeigten, dass die Expression des murinen Lamins B3 in somatischen Kulturzellen zu einer Veränderung der Kernform führt (Furukawa und Hotta, 1993).

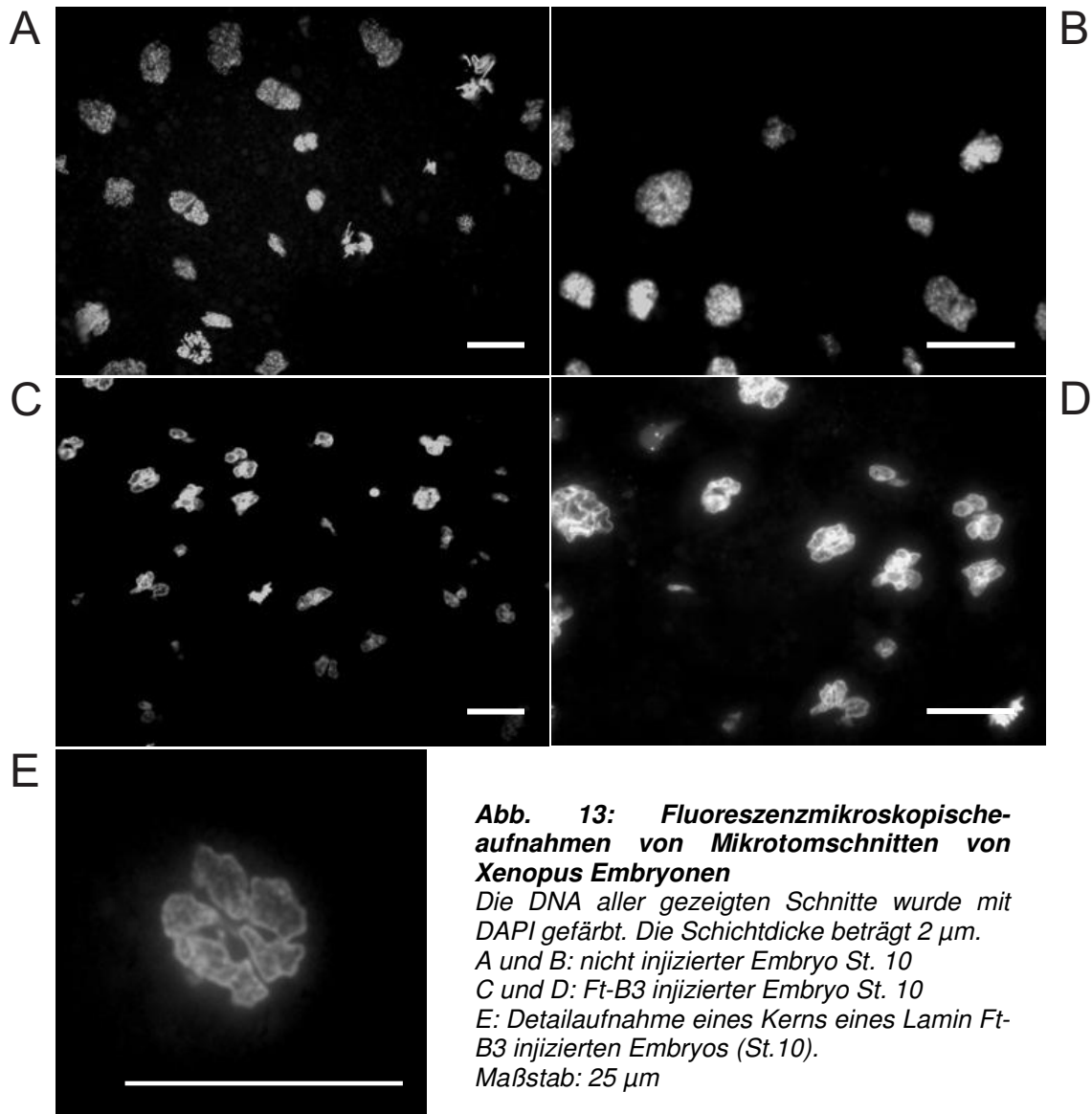
Um eine gute Strukturhaltung zu gewährleisten, wurden die Embryonen in Methacrylatharz eingebettet. Es wurden Schnitte mit einer Schichtdicke von 2 μm angefertigt. Die Einbettung in Kunststoff erlaubte allerdings keine Antikörperfärbung, so dass das ektopisch exprimierte Lamin Ft-B3 in diesen Präparaten nicht nachgewiesen werden konnte. Die DNA der Zellkerne wurde durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht.

In Abbildung 13 sind Kerne von nicht injizierten Kontroll- (A und B) und Lamin Ft-B3 injizierten Embryonen (C-E) im Stadium 10 gezeigt. Zum Zeitpunkt, zu dem die Embryonen fixiert wurden, wiesen sie noch keine äußerlichen Veränderungen auf. Die Kerne der Kontrollembryonen weisen eine normale, ovale Form auf. Die Kerne der Lamin Ft-B3 injizierten Embryonen hingegen sind verformt. Sie unterscheiden sich in ihrer Morphologie eindeutig von den Kernen der Kontrollembryonen. Anders als für das murine Lamin B3 in der Literatur beschrieben, ist die Verformung der Kerne nicht hakenförmig, sondern die Kerne weisen zahlreiche Lobulierungen und Einstülpungen auf. Die Einstülpungen und Lobulierungen sind in der Detailaufnahme in der Abbildung 13 E besonders gut zu erkennen.

4.4 Coinjektion von Lamin B3 und Bcl-2 in *Xenopus* Embryonen

Der Zeitpunkt, an dem Apoptose während der Entwicklung von *Xenopus* erstmalig auftritt, ist strikt reguliert. In der Normalentwicklung von *Xenopus* treten die ersten apoptotischen Zellen im Stadium 10,5, kurz nach dem Beginn der Gastrulation, auf. Verschiedene Zellgifte wie Cycloheximid oder α -Amanitin lösen in Embryonen

Apoptose aus. Diese tritt erst mit dem Beginn der Gastrulation ein, auch wenn die Gifte schon sehr früh in der Entwicklung ihre Wirkung entfaltet haben (Sible *et al.*, 1997; Hensey und Gautier, 1997).



Mit dem Beginn der Gastrulation in Stadium 10,5 treten auch in den Lamin Ft-B3 injizierten Embryonen die ersten Pigmentstörungen auf. Es kann daher vermutet werden, dass die Expression von Lamin B3 Apoptose auslöst. In der Literatur wurde beschrieben, dass die ektopische Expression von Bcl-2 in *Xenopus* Embryonen die Apoptose verzögert. In Anwesenheit von Bcl-2 treten die ersten apoptotischen Zellen dann signifikant später, im Stadium 12 auf (Hensey und Gautier, 1997).

Sollte es sich beim Tod der Lamin Ft-B3 injizierten Embryonen um Apoptose handeln, sollte dieser durch Coinjektion von Bcl-2 bis zum Stadium 12 verzögert werden. Nach der *in vitro* Fertilisation wurden Embryonen der gleichen Ablage zum einen mit Lamin Ft-B3 mRNA allein und zum anderen mit Lamin Ft-B3 und Bcl-2 mRNA coinjiziert. Eine Grafik der embryonalen Entwicklung der coinjizierten Embryonen ist in der Abbildung 14 A im Vergleich zu der Lamin Ft-B3 injizierter Embryonen dargestellt. Während alle Lamin Ft-B3 injizierten Embryonen zwischen Stadium 10,5 und 11 gestorben waren, starben die meisten der mit Lamin Ft-B3 und Bcl-2 coinjizierten Embryonen erst im Stadium 12.

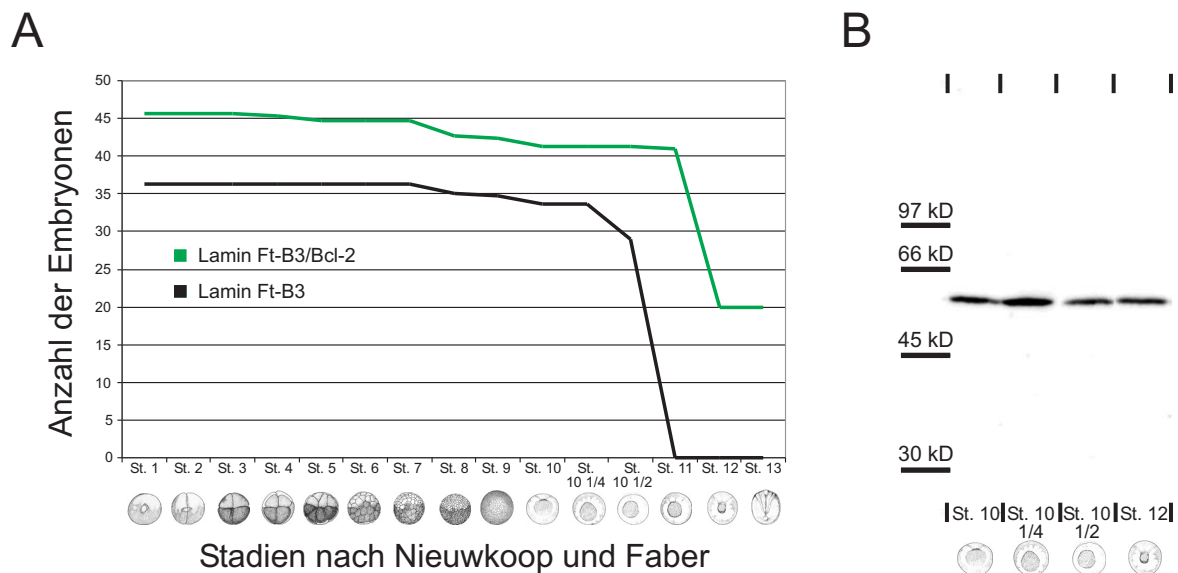


Abb. 14: Coinjektion von Lamin Ft-B3 und Bcl-2 in Xenopus Embryonen

A: Grafische Darstellung der Entwicklung von Xenopus Embryonen

Auf der X-Achse sind die Entwicklungsstadien nach Nieuwkoop und Faber (1967) eingetragen, auf der Y-Achse die Anzahl der zum jeweiligen Zeitpunkt noch lebenden Embryonen.

B: Immundetektion von Lamin Ft-B3 in Lamin Ft-B3 und Bcl-2 coinjizierten Embryonen

Westernblot der Stadien 10, 10 1/4, 10,5 und 12. Die Immundetektion erfolgte mit dem Flag-Epitop spezifischen Antikörper M2.

Auch bei den mit Bcl-2 coinjizierten Embryonen wurde die ektopische Expression des Lamin Ft-B3 im Westernblot analysiert (Abb. 14 B). Der abgebildete Westernblot zeigt nur die Gastrulationsstadien. In den mit Bcl-2 coinjizierten Embryonen kann das Lamin Ft-B3 bis zum Stadium 12 nachgewiesen werden. Eine Verringerung der Lamin Ft-B3 Proteinmenge ab Stadium 9, wie sie bei den mit Ft-B3 injizierten Embryonen beobachtet wurde, konnte bei den mit Bcl-2 coinjizierten Embryonen nicht beobachtet werden.

Die Beobachtung, dass das durch Lamin Ft-B3 bedingte Absterben der Embryonen durch die Co-Expression von Bcl-2 bis zum Stadium 12 verzögert werden kann, lässt den Schluss zu, dass Lamin Ft-B3 in Embryonen Apoptose auslöst.

4.5 Nachweis der Apoptose in Lamin B3 injizierten Embryonen durch TUNEL-Färbung

Eine Möglichkeit die Apoptose auf zellulärer Ebene nachzuweisen stellt die TUNEL-Färbung dar (TUNEL = terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling). Hierbei handelt es sich um eine histologische Färbungsmethode, bei der die bei der Apoptose entstandenen Enden der DNA durch das Enzym terminale Nucleotidyltransferase mit markierten Nukleotiden versehen werden. Der Nachweis der eingebauten Digoxigenin-markierten Desoxyuridylnukleotide erfolgte mit einem mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörper, der gegen Digoxigenin gerichtet ist. Apoptose-positive Zellen können anhand einer bläulichen Färbung innerhalb des Kerns identifiziert werden. Als Positivkontrolle dienten Embryonen, die im Stadium 6,5 für 15 min mit 100 µg/ml Cycloheximid behandelt wurden. Aus früheren Studien ist bekannt, dass die Behandlung der Embryonen mit Cycloheximid Apoptose in Stadium 10,5 induziert (Sible *et al.*, 1997).

In Abbildung 15 A ist ein TUNEL-positiver Zellkern eines Cycloheximid behandelten Embryos im Stadium 10,5 gezeigt. Das in einer Region des Zellkerns akkumulierte Chromatin ist dunkel angefärbt. Die gleichen punktförmigen Anfärbungen können auch in Kernen Lamin Ft-B3 injizierter Embryonen im Stadium 10,5 beobachtet werden (15 C und D). Bei der Aufnahme 15 B handelt es sich um einen Lamin Ft-B3 injizierten Embryo im Stadium 10, der fixiert wurde, als die Apoptose noch nicht eingetreten war. Die Zellkerne dieses Embryos weisen keine TUNEL-Färbung auf.

Die TUNEL-Färbung der Lamin Ft-B3 injizierten Embryonen entspricht der Färbung der mit Cycloheximid behandelten Kontrollembryonen. Auch die Beobachtung, dass die TUNEL-Reaktion bei Lamin-B3 injizierten Embryonen im Stadium 10 negativ ist, lässt eindeutig auf Apoptose als Ursache für den Tod der Embryonen schließen.

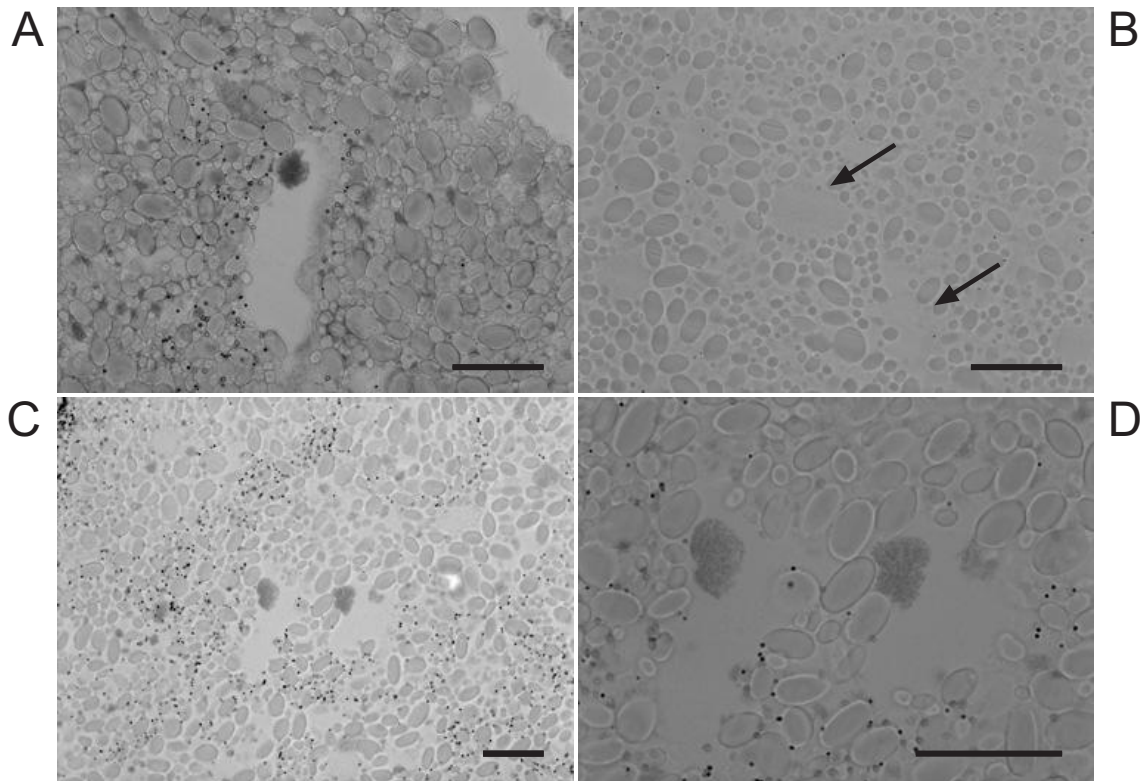


Abb. 15: Hellfeldaufnahmen von Mikrotomschnitten TUNEL-gefärbter *Xenopus* Embryonen
 Die Schichtdicke beträgt 2 μm . Alle gezeigten Embryonen wurden einer Whole Mount TUNEL-Färbung unterzogen.
 A: Cycloheximid behandelter nicht injizierter Embryo Stadium 10,5
 B: Ft-B3 injizierter Embryo Stadium 10, die Pfeile weisen auf Zellkerne
 C und D: Ft-B3 injizierte Embryonen Stadium 10,5-11 (apoptotisch);
 Maßstab: 25 μm

4.6 Untersuchungen zur zygotischen Transkription zum Zeitpunkt der MBT in Lamin B3 injizierten *Xenopus* Embryonen

Frühere Studien zeigten, dass die Apoptose in Stadium 10,5 mit Hilfe von Zellgiften ausgelöst werden kann. Die Induktion der Apoptose durch Cycloheximid kann auf die indirekte Inhibierung der zygotischen Transkription zum Zeitpunkt der MBT zurückgeführt werden (Sible *et al.*, 1997). Von den Laminen ist bekannt, dass sie mit einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren und auch mit der RNA-Polymerase II selbst interagieren können (Spann *et al.*, 2002; Übersicht in Mattout-Drubezki und Gruenbaum, 2003). Daher wurde das Einsetzen der zygotischen Transkription zum Zeitpunkt der MBT untersucht. Hierzu wurde die RNA aus Lamin Ft-B3 injizierten Embryonen isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend als Matrize in eine PCR eingesetzt. Als Nachweis für die Transkription wurde das GS-17 Transkript (Gastrula spezifisches Transkript) gewählt. GS-17 ist im frühen Embryo nicht vorhanden. Seine Transkription wird zur MBT aktiviert (Krieg und Melton, 1985). In

der Abbildung 16 sind die PCR Produkte Lamin Ft-B3 injizierter Embryonen der Stadien 5-10 (1-6) und einer Wasserkontrolle (K) nach der Auftrennung in einem 1%igen Agarosegel gezeigt. Wie erwartet ist bei der Wasserkontrolle kein PCR Produkt zu detektieren. In den Stadien 5-10 lässt sich das GS-17 PCR Produkt mit der erwarteten Größe von 297 nt nachweisen. Ab Stadium 8 ist ein Anstieg der Menge des PCR-Produkts zu beobachten. Da alle Proben gleich aufgearbeitet wurden und für die PCR-Reaktionen immer die gleiche cDNA-Menge eingesetzt wurde, ist der Anstieg auf die zygotische Transkription zum Zeitpunkt der MBT zurückzuführen. Eine Amplifikation genomischer DNA kann ausgeschlossen werden, da einer der Primer so gewählt wurde, dass der Bindungsbereich im Übergangsbereich von zwei Exons liegt.

Die zygotische Transkription zum Zeitpunkt der MBT ist also durch die ektopische Expression des Lamins Ft-B3 nicht inhibiert. Die Induktion der Apoptose kann demnach nicht auf die Inhibierung der zygotischen Transkription zurückgeführt werden.

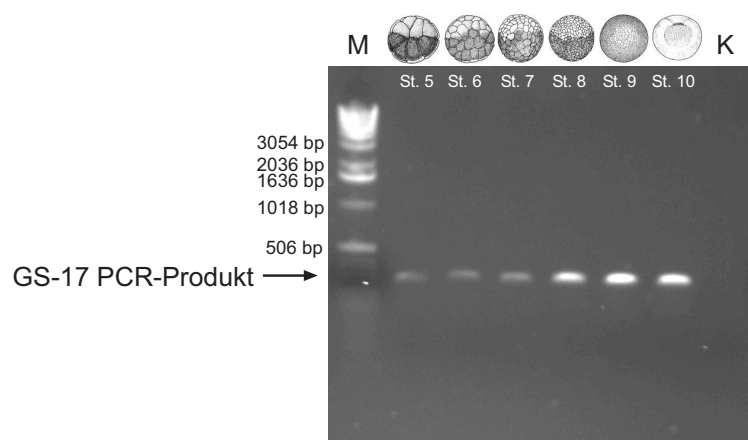


Abb. 16: Gelelektrophoretische Auftrennung von GS-17 spezifischen PCR-Produkten von Lamin Ft-B3 injizierten Embryonen

Die RNA wurde aus Ft-B3 injizierten *Xenopus* Embryonen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Jeweils 2 µg cDNA wurden in eine Standard PCR-Reaktion mit GS-17 spezifischen Primern eingesetzt.

M: Marker, 1 kb-Leiter

St. 5-10: PCR-Produkte Lamin Ft-B3 injizierter Embryonen der Stadien 5-10

K: Kontrolle

5. Untersuchungen an Kulturzellen

In früheren Transfektionsexperimenten wurde gezeigt, dass die Expression von murinem Lamin B3 in somatischen Zellen zu einer dramatischen Veränderung der Kernmorphologie führt (Furukawa und Hotta, 1993). Es wurde vermutet, dass die N-terminale Lamin B3 spezifische Kopfdomäne für die Veränderung der Kernform verantwortlich ist. Von einer anderen Arbeitsgruppe konnte jedoch kürzlich gezeigt werden, dass nicht die Lamin B3 spezifische Kopfdomäne, sondern das Fehlen der

Coils 1A und B für die Deformation der Zellkerne verantwortlich ist (Schutz *et al.*, 2005a).

Um zu prüfen, ob die ektopische Expression des humanen Lamins B3 ebenfalls eine Veränderung der Kernform in somatischen Kulturzellen herbeiführen kann, wurden Transfektionsexperimente durchgeführt. Als Kontrollen dienten verschiedene Wildtyp und Flag-Epitop markierte Lamine. Für die Transfektionen wurden HeLa-, COS 7- und *Xenopus* A6-Zellen verwendet. Für den Immunfluoreszenznachweis wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion fixiert und anschließend mit den entsprechenden monoklonalen Antikörpern inkubiert. Als zweiter Antikörper diente in diesen Versuchen ein Cy-3 gekoppelter anti-Maus Antikörper aus der Ziege, der einen Nachweis mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie erlaubt. Die DNA der Zellkerne wurde durch eine DAPI-Färbung sichtbar gemacht.

5.1 Indirekte Immunfluoreszenz von COS 7-Zellen

Bei COS 7-Zellen handelt es sich um eine Karzinom-Zelllinie des Nierenepithels einer afrikanischen Meerkatze (Labow und Berns, 1988). Die Zellen wurden transient mit verschiedenen Lamin Konstrukten transfiziert (Abb. 17). In den Aufnahmen 17 A und A' handelt es sich um nicht transfizierte Zellen, in denen das endogene Lamin B2 mit Hilfe des Antikörpers L7-8C6 angefärbt wurde. Die nicht transfizierten Kerne weisen eine ovale Form mit einer glatten Oberfläche auf. Das endogene Lamin B2 ist größtenteils in der Kernperipherie, aber auch schwach im Nukleoplasma detektierbar. Die Kernperipherie weist eine Lamin-typische „Rim“-Färbung auf. Innerhalb des Nukleoplasmas ist das Lamin B2 homogen verteilt. Es können auch intranukleäre Strukturen beobachtet werden. Da es sich bei den gezeigten Aufnahmen um ganze Zellen handelt und keine konfokale Mikroskopie verwendet wurde, könnte es sich bei dem „nukleoplasmatischen“ Anteil des Lamins B2 auch um Protein handeln, das an der (oberen bzw. unteren) Kernperipherie lokalisiert ist.

Die Aufnahmen 17 B und B' zeigen Lamin Ft-B3 transient transfizierte Zellen. Lamin Ft-B3 ist ausschließlich im Kern nachweisbar. Die Kerne der transfizierten Zellen weisen eine starke Veränderung ihrer Form auf. Die Kerne besitzen zahlreiche Lobulierungen und Einstülpungen. Die Kerne sind gekrümmt und verlängert und anhand ihrer Form sind sie deutlich von den ovalen nicht transfizierten Zellkernen zu unterscheiden.

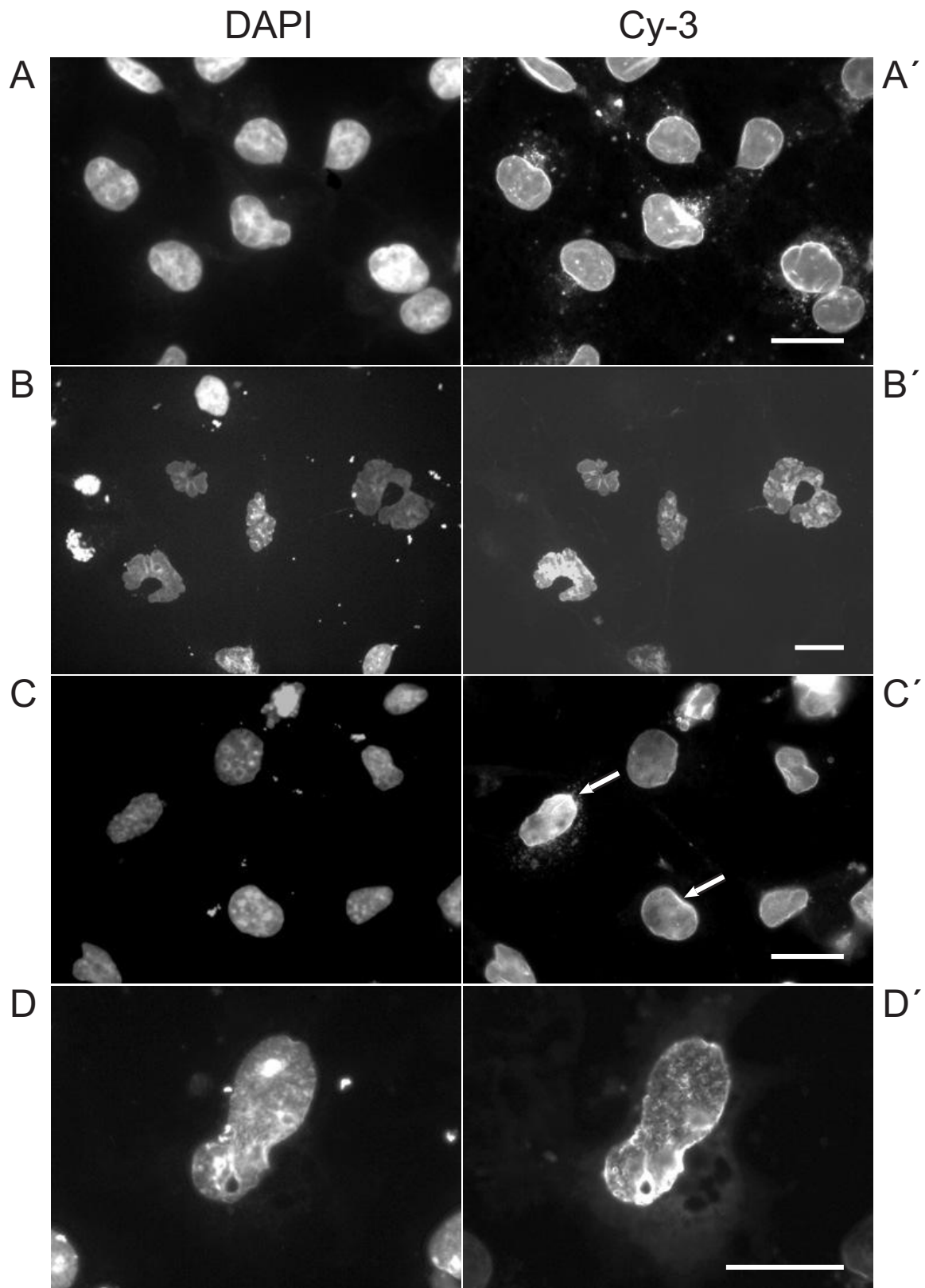


Abb. 17: Indirekte Immunfluoreszenz von COS-7 Zellen

A/A': nicht transfizierte Zellen (anti-B2)

B/B': Lamin Ft-B3 transfizierte Zellen

C/C': Lamin B2 transfizierte Zellen

D/D': Lamin B2 transfizierte Zelle bei hoher Vergrößerung

A-D: Zellkerne mit DAPI gefärbt; *A', C', D'*: monoklonaler Antikörper L7-8C6 (anti-B2/B3), *B'*: monoklonaler Antikörper M2 (anti-Flag); Maßstab 25 µm

Nur ein kleiner Teil des Lamins Ft-B3 ist in der Kernperipherie zu finden. Ft-B3 scheint überwiegend im Nukleoplasma lokalisiert zu sein, wo es sehr heterogen verteilt ist. Wie bereits weiter oben erwähnt könnte es sich hierbei auch um Lamin B3 handeln, das an der Kernmembran lokalisiert ist. Es sind viele intranukleäre Strukturen zu beobachten, die zum Teil auf die ektopische Überexpression des Lamins Ft-B3 zurückzuführen sind.

Die Aufnahmen 17 C/C' und D/D' zeigen Zellen, die mit humanem Lamin B2 transfiziert wurden. Der Nachweis erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper L7-8C6, der sowohl das endogene Lamin B2, als auch das transfizierte Lamin B2 des Menschen erkennt. Unter dem Mikroskop lassen sich die transfizierten Zellen anhand ihrer stärkeren Fluoreszenz leicht erkennen. Da dies im Druck nicht immer eindeutig ist, sind die transfizierten Zellen mit Pfeilen markiert (17 C'). Die Zellkerne, die das humane Lamin B2 exprimieren, weisen kaum eine Veränderung der Kernform auf. In der Abbildung 17 D/D' ist einer der am stärksten verformten Zellkerne bei hoher Vergrößerung gezeigt. Wie die Aufnahme zeigt, handelt es sich lediglich um eine leichte Verformung des Zellkerns, die deutlich von den Einstülpungen und Lobulierungen der Lamin B3 transfizierten Zellkerne zu unterscheiden ist.

5.2 Indirekte Immunfluoreszenz von A6-Zellen

Bei A6-Zellen handelt es sich um Epithelzellen der Niere des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* (Handler *et al.*, 1981). Die Transfektion der A6-Zellen erfolgte mit Plasmiden, die die offenen Leseraster für das einfach markierte Lamin Ft-B3 und das doppelt markierte Lamin Ft-YFP-B3 enthalten. Die doppelt markierte Lamin B3 Variante ermöglichte den Nachweis mit Hilfe des Antikörpers L7-8C6, der sowohl das endogene Lamin B2, als auch das ektopisch exprimierte Lamin B3 erkennt. Durch die zusätzliche Fluoreszenz des YFP konnten in diesem Fall die transfizierten Zellen von den nicht transfizierten eindeutig unterschieden werden. Auch der monoklonale Antikörper M2 würde eine Detektion der transfizierten Zellen aufgrund des Flag-Epitops zulassen. Es wäre aber nicht möglich, im gleichen Schnitt das endogene Lamin B2 nachzuweisen. Da A6-Zellen sehr klein und zudem stark abgerundet sind, lassen sich die Zellkerne in der Immunfluoreszenz nur schwer darstellen.

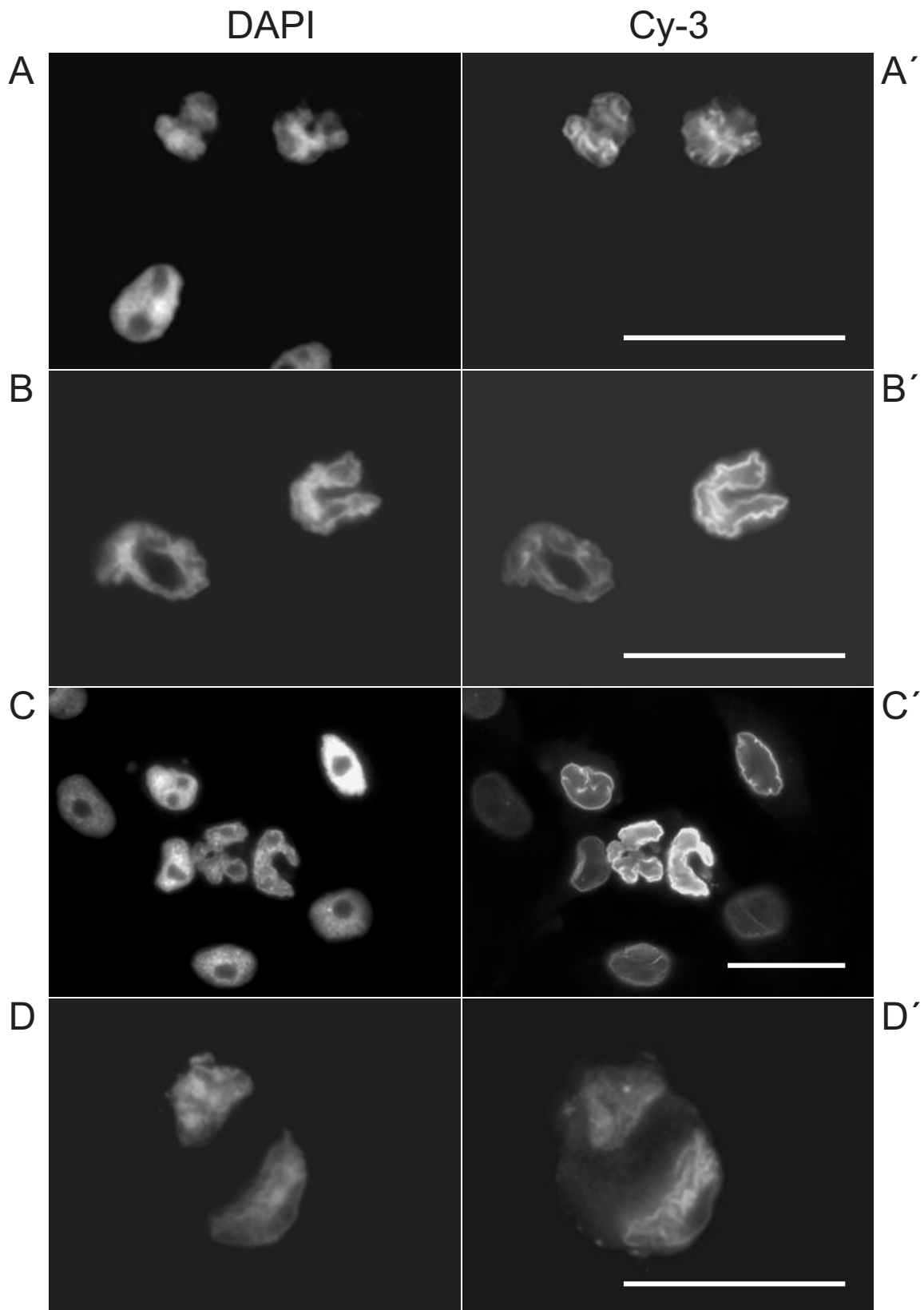


Abb. 18: Indirekte Immunfluoreszenz von A6-Zellen

A/A' und B/B': Lamin Ft-B3 transfizierte Zellen

C/C': Lamin Ft-YFP-B3 transfizierte Zellen

D/D': Lamin Ft-YFP-B3 transfizierte Zelle in Mitose (Telophase)

A-D: Zellkerne mit DAPI gefärbt; A', B' und D': monoklonaler Antikörper M2 (anti-Flag), C': monoklonaler Antikörper L7-8C6 (anti-B2/B3). Maßstab: 25 µm.

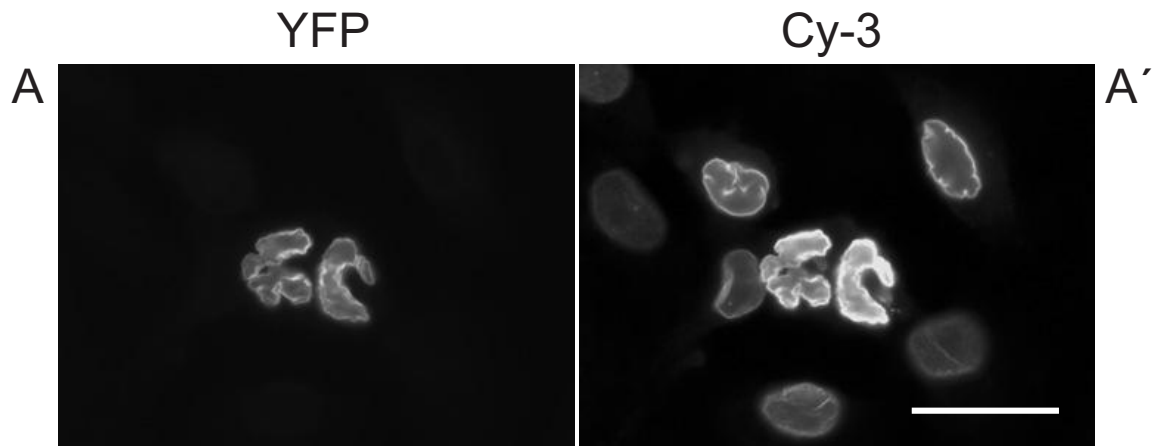


Abb. 18.1: Indirekte Immunfluoreszenz von A6-Zellen

A/A': Lamin Ft-YFP-B3 transfizierte Zellen

A: YFP-Fluoreszenz

A': Nachweis mit dem monoklonalen Antikörper L7-8C6 (anti-Lamin-B2/B3).

Maßstab: 25 µm

Die Aufnahmen A/A' und B/B' der Abbildung 18 zeigen Kerne von Zellen, die mit humanem Lamin Ft-B3 transfiziert wurden. Auch in A6-Zellen induziert die ektopische Expression des Lamin Ft-B3 die Verformung der Zellkerne. In der Aufnahme 18 A/A' sind zwei leicht verformte Kerne Lamin Ft-B3 transfizierter Zellen abgebildet. Die Kerne der transfizierten Zellen in 18 B/B' weisen eine stärkere Verformung auf. In einem der beiden Kerne weist das Lamin Ft-B3 Protein eine Rim-Färbung auf. Bei dem anderen transfizierten Kern scheint der größte Teil des Lamins Ft-B3 im Nukleoplasma organisiert zu sein.

Die Aufnahmen 18 C/C' und D/D' zeigen Zellen, die mit dem Laminkonstrukt Ft-YFP-B3 transfiziert wurden. In 18 C' erfolgte der Nachweis mittels des monoklonalen Antikörpers L7-8C6, der sowohl das endogene Lamin B2, als auch das ektopisch exprimierte Lamin B3 erkennt. Mit Hilfe der Fluoreszenz des YFP wurden die zwei verformten Kerne in der Mitte eindeutig als Kerne transfizierter Zellen identifiziert (Abb. 18.1). Gegenüber den nicht transfizierten Zellen weisen die transfizierten Zellen mit dem Antikörper L7-8C6 eine stärkere Fluoreszenz auf (Abb. 18 C'/18.1 A'). Dies zeigt, dass das Lamin Ft-YFP-B3 in den A6-Zellen stark exprimiert wird. Eine Lamin typische Rim-Färbung ist in fast allen Zellkernen auszumachen. Sie ist in den beiden Kernen der transfizierten Zellen allerdings sehr viel ausgeprägter. Lamin B2 und Lamin B3 können in den transfizierten und nicht transfizierten Zellen im Nukleoplasma nachgewiesen werden. In den Kernen beider Zellen können intranukleäre Strukturen detektiert werden. Diese Beobachtung könnte

möglicherweise wieder auf die ektopische Überexpression des Lamin B3 und auf die zahlreichen Einstülpungen der Kernhülle zurückzuführen sein. Abbildung 18 D´/D zeigt eine Lamin Ft-YFP-B3 transfizierte Zelle in der Telophase der Mitose. Während der Telophase ist nur ein kleiner Teil des Lamin Ft-YFP-B3 Proteins noch im Cytoplasmas verteilt. Der Großteil des Proteins ist bereits wieder mit dem Chromatin, bzw. der Kernhülle assoziiert.

5.3 Indirekte Immunfluoreszenz von Hela-Zellen

Bei Hela-Zellen handelt es sich um eine epithelartige Zelllinie, die in den 50er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts aus dem Zervix-Karzinom einer Patientin isoliert wurde. Hela-Zellen sind die ersten menschlichen Zellen, von denen eine permanente Zelllinie etabliert wurde (Scherer *et al.*, 1953). Verschiedene Lamine wurden für die Transfektion von Hela-Zellen eingesetzt. In den Aufnahmen A´ und B´ der Abbildung 19 handelt es sich um den Nachweis des humanen Lamin Ft-B3 Proteins mit Hilfe des Flag-Epitop spezifischen Antikörpers M2. Abbildung 19 A´ zeigt eine Lamin Ft-B3 transfizierte Zelle in der Telophase der Mitose. Das Lamin Ft-B3 Protein ist während der Telophase bereits wieder mit den Chromosomen, bzw. der Kernhülle assoziiert. Abbildung 19 B´ zeigt eine Detailaufnahme eines Kerns einer Lamin Ft-B3 transfizierten Zelle. Die Oberfläche des Kerns ist durch zahlreiche Lobulierungen und Einstülpungen stark vergrößert. Eine für Lamine typische Rim-Färbung kann nicht beobachtet werden. Das Protein ist nur zum Teil in der Kernperipherie lokalisiert. Lamin Ft-B3 befindet sich im gesamten Nukleoplasma des Kerns und es können viele intranukleäre Strukturen und Aggregate ausgemacht werden. Als Kontrolle wurde die Expression von humanem Lamin B2 und *Xenopus* Lamin Ft-B2 in Hela-Zellen analysiert (19 C/C´ und D/D´). Da das endogene Lamin B2 in Hela-Zellen nicht sehr stark exprimiert wird, ließ sich das ektopisch exprimierte humane Lamin B2 mit dem Antikörper L7-8C6 nachweisen. Der Antikörper erkennt zwar sowohl das endogene, als auch das ektopisch exprimierte Lamin B2, aber aufgrund der stärkeren Expression lassen sich die transfizierten Zellen leicht identifizieren. Zellkerne, die mit humanen Lamin B2 transfiziert wurden, weisen im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen (19 C), keine wesentlichen Veränderungen ihrer Form auf (19 C´). Es können einige kleine Lobulierungen gefunden werden, die aber auf die ektopische Überexpression zurückzuführen sind.

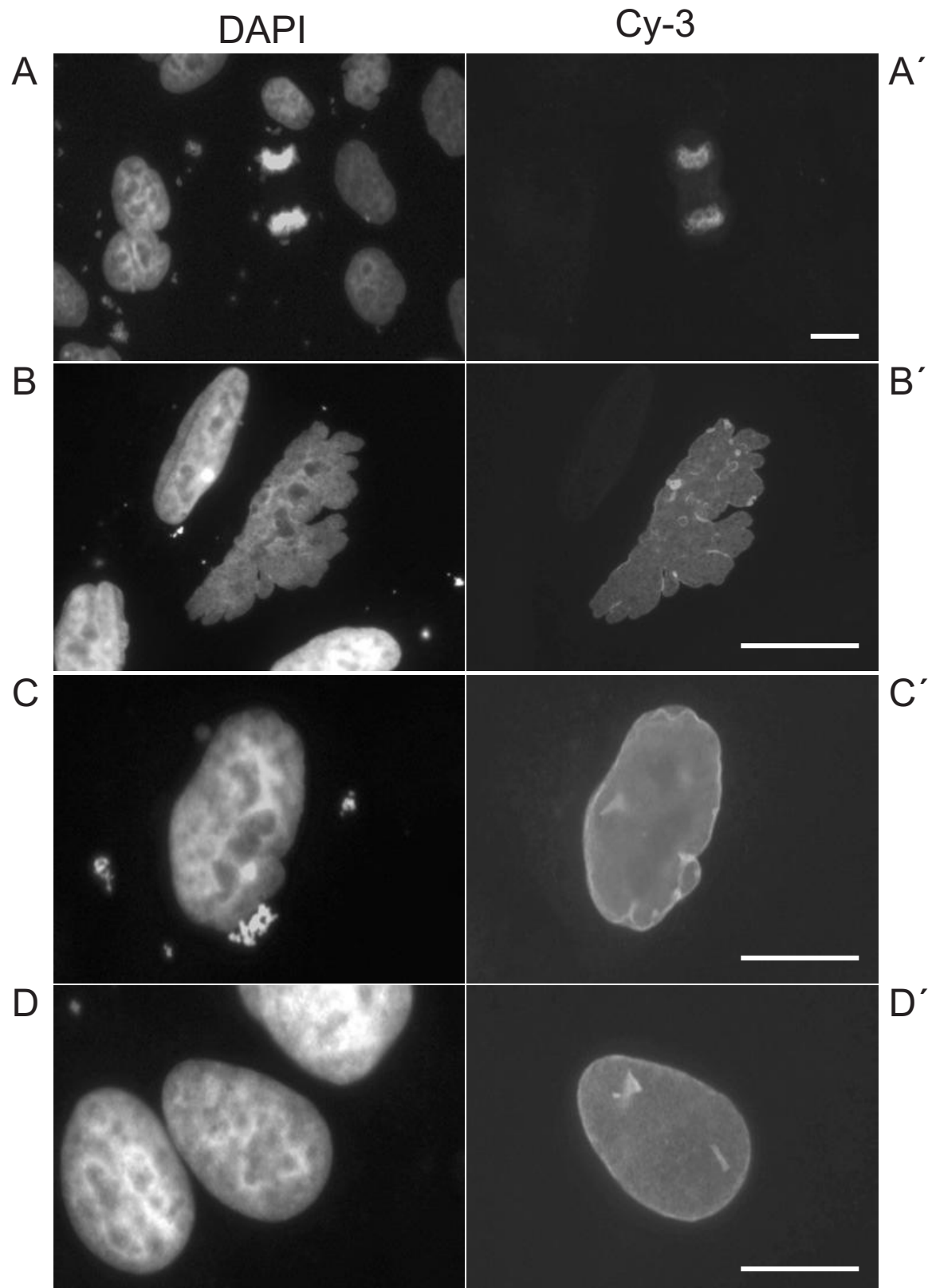


Abb. 19: Indirekte Immunfluoreszenz von HeLa-Zellen

A und A': Lamin Ft-B3 transfizierte Zelle in Mitose (Telophase)

B und B': Detailaufnahme eines verformten Kerns einer Lamin Ft-B3 transfizierten Zelle

C und C': Detailaufnahme eines Kerns einer mit humanem Lamin B2 transfizierten Zelle

D und D': Detailaufnahme eines Kerns einer mit Xenopus Lamin Ft-B2 transfizierten Zelle

A-D: Zellkerne mit DAPI gefärbt; A', B' und D': monoklonaler Antikörper M2 (anti-Flag); C': monoklonaler Antikörper L7-8C6 (anti-Lamin B2/B3). Maßstab: 25 μ m.

Lamin B2 zeigt in der Kernperipherie eine Rim-Färbung, liegt aber auch homogen verteilt im Nukleoplasma vor. Einige intranukleäre Strukturen sind ebenfalls auszumachen. Aufnahme 19 D´ zeigt den Kern einer mit *Xenopus* Lamin Ft-B2 transfizierten Zelle im Detail. Im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen kann keine Veränderung der Kernform in diesen Zellen beobachtet werden. Lamin Ft-B2 lässt sich in der Kernperipherie und auch im Nukleoplasma nachweisen. Allerdings erscheint das *Xenopus* Lamin Ft-B2 Protein im Nukleoplasma nicht so homogen verteilt, wie das humane Lamin B2. Intranukleäre Strukturen innerhalb des Nukleoplasmas können ebenfalls beobachtet werden.

5.4 Statistische Berechnungen über den Grad der Kernverformung in Hela-Zellen

Um eine genaue Vorstellung über den Grad der Kernverformung Lamin B3 transfizierter Zellen zu erhalten, wurde eine statistische Berechnung an mit verschiedenen Laminen transfizierten Zellen durchgeführt. Die Kerne nicht transfizierter Zellen dienten als Kontrolle. Die Deformation der Kerne wurde anhand der Formel $4\pi \times \text{Fläche}/\text{Umfang}^2$ (Goldman *et al.*, 2004) berechnet. Bei einem Kreis ergibt sich hierbei der Wert 1. Je höher der Grad der Verformung eines Zellkerns ist, desto mehr geht der Wert gegen 0. Der Umfang und die Fläche von jeweils 100 nicht transfizierten und mit verschiedenen Laminen transfizierten Zellkernen wurden mit Hilfe des Programms Axiovision (Zeiss) ermittelt. Anschließend wurde der Grad der Verformung nach der oben aufgeführten Formel berechnet. Die Mittelwerte einschließlich der Standardabweichungen der untersuchten Kerne sind in der Abbildung 20 als Säulendiagramm dargestellt. Eine detaillierte Auflistung der einzelnen Werte ist im Anhang zu finden. Wie in Abbildung 19 zu sehen, besitzen die Zellkerne von Hela-Zellen eine ovale Form. Im Durchschnitt ergibt sich für Zellkerne von nicht transfizierten Zellen nach der Formel $4\pi \times \text{Fläche}/\text{Umfang}^2$ ein Wert von 0,8. Die Kerne Lamin transfizierter Zellen weisen niedrigere Werte auf, d. h. die Kerne weisen leichte Veränderungen der Form auf, die auf die ektopische Überexpression des transfizierten Lamins zurückzuführen sind. Bei den Lamin Ft-A transfizierten Zellen ist die Kernverformung am wenigsten ausgeprägt. Die Werte liegen mit etwas über 0,7 nur knapp unter denen für die Kerne von nicht transfizierten Zellen. Für Lamin Ft-B1 und Ft-LIII ergeben sich im Durchschnitt Werte zwischen 0,55 und 0,6. Doch generell kann auch hier die leichte Verformung der Kerne auf die

starke Expression zurückgeführt werden. Lamin Ft-A, Ft-B1 und LIII besitzen nur leicht verformte Kerne und daher nur eine geringe Standardabweichung, also eine geringe Streuung der Werte um den Mittelwert. Lamin Ft-B3 besitzt sehr stark verformte, lobulierte Zellkerne. Die am stärksten verformten Kerne weisen Werte von 0,3 auf. Solch niedrige Werte wurden nur für Lamin Ft-B3 gefunden. Da sowohl leicht deformierte Kerne, wie auch sehr stark verformte und lobulierte Kerne in die Messungen mit eingingen, ist für Lamin Ft-B3 die Standardabweichung am größten. Der Mittelwert der Lamin Ft-B3 untersuchten Kerne liegt unter 0,5.

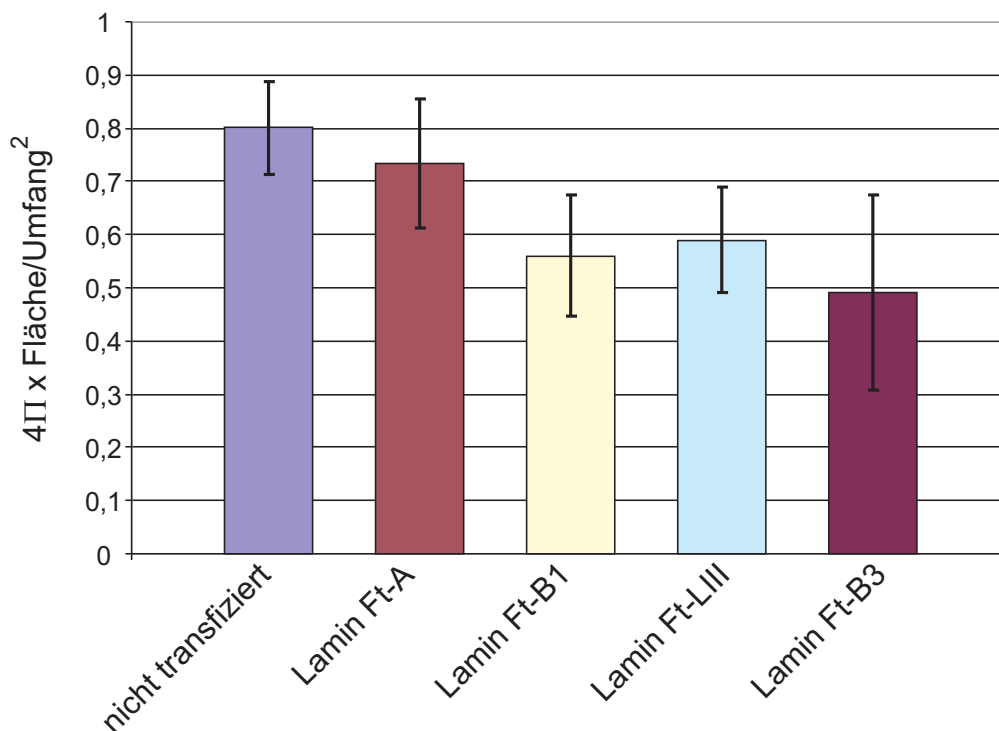


Abb. 20: Statistische Darstellung der Kernverformung in HeLa-Zellen

Die Y-Achse gibt den Grad der Kernverformung nach der Formel $4\pi \times \text{Fläche}/\text{Umfang}^2$ wieder. Ein Kreis hat hierbei den Wert 1. Je weiter die Kernform von der Kreisform abweicht, desto niedriger ist der Wert. Die arithmetischen Mittel der Werte von jeweils 100 nicht transfizierten, bzw. Lamin transfizierten Zellen sind mit ihren Standardabweichungen als Säulen dargestellt.

Die untersuchten Lamin B3 Kerne weisen im Durchschnitt den niedrigsten Wert und die größte Standardabweichung auf. Die statistischen Berechnungen sind ein weiterer Beleg dafür, dass die Lamin B3 induzierten Verformungen der Kerne nicht auf ektopische Überexpression zurückgeführt werden können.

6. Experimentelle Untersuchungen zur Suche nach Lamin B3 in der Spermatogenese von *Xenopus*

Die Datenbanksuche nach Lamin B3 Sequenzmotiven zeigte, dass es sich bei Lamin B3 positiven Spezies bisher ausschließlich um Säugetiere handelt. Da der Krallenfrosch *Xenopus laevis* für die Suche nach Lamin B3 sowie geeignete Antikörper im Labor zur Verfügung standen, lag es nahe diesbezüglich weitere experimentelle Untersuchungen durchzuführen.

6.1 Nachweis von Lamin B2/B3 in *Xenopus* Leber- und Testisgewebe durch Westernblot Analyse

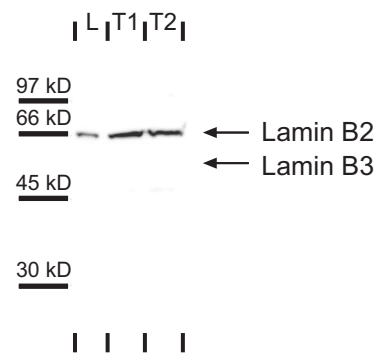
Da Lamin B2 und B3 in der Immunfluoreszenz nicht zu unterscheiden sind, wurden zunächst Westernblot Analysen durchgeführt. Wie bereits bei der Expression in Oozyten gezeigt, sollten Lamin B2 und B3 in der SDS-PAGE aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts voneinander zu unterscheiden sein.

Proteine aus *Xenopus* Leber- und Testisgewebe wurden isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen. Der Nachweis des endogenen Lamin B2, bzw. B3 erfolgte mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers L7-8C6, der gegen ein Epitop in der Schwanzdomäne des Lamin B2 von *Xenopus* gerichtet ist. Dieser Antikörper sollte daher auch ein putatives Lamin B3 erkennen.

Die absolute Menge des aufgetragenen Proteins wurde nicht bestimmt. In der Abbildung 21 wurden Leberlysate (L), Testislysate (T1), sowie die zweifache Menge an Testislysate (T2) aufgetragen. In allen Lysaten lässt sich nur Lamin B2 detektieren. Ein Vergleich der Lamin B2 spezifischen Banden der beiden Testislysate zeigt, dass die Verdopplung der Auftragsmenge im Fall von T2 zu keiner Erhöhung der Signalstärke führt. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Proteinbindekapazität der PVDF-Membran erschöpft ist. Weder im Leberlysate, noch im Testislysate lässt sich ein Signal in der für Lamin B3 erwarteten Höhe detektieren. Im stärker konzentrierten Testislysate ist noch eine schwache Bande im Molekulargewichtsbereich um 45 kD zu sehen. Diese Bande taucht nach längeren Expositionszeiten in allen Lysaten auf, und konnte als eine Kreuzreaktion des Antikörpers L7-8C6 mit einem cytoplasmatischen Protein identifiziert werden. Daraus kann geschlossen werden, dass ein Lamin B3 entsprechendes Protein in Testisgewebe von *Xenopus* nicht in signifikanten Mengen vorhanden ist.

Abb. 21: Immundetektion von Lamin B2 in *Xenopus* Leber- und Testislysate

Die Immundetektion erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper L7-8C6, der Lamin B2 in *Xenopus* erkennt und der auch ein keimbahnspezifisches Lamin B3 erkennen sollte. Als Sekundärantikörper, diente ein POD gekoppelter Antikörper aus der Ziege. Leberlysate (L); Testislysate (T1); Testislysate, doppelte Menge (T2).



6.2 Nachweis von Lamin B2 in *Xenopus* Testisgewebeschnitten durch indirekte Immunfluoreszenz

Die Westernblot Analyse von *Xenopus* Testislysate ergab keinen Hinweis auf das Vorhandensein von Lamin B3 in diesem Gewebe. Zur weiteren Analyse wurden Testisgewebeschnitte immunhistologisch untersucht. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich die Expression des murinen Lamin B3 auf postmeiotische männliche Keimbahnzellen beschränkt. Lamin B3 konnte während der Spermatogenese der Maus in runden und verlängerten Spermatozyten nachgewiesen werden (Schutz *et al.*, 2005b).

Die DNA der Zellkerne wurde durch eine DAPI-Färbung sichtbar gemacht (Abb. 22 A-D). Die Immundetektion von Lamin B2 und B3 erfolgte mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers L7-8C6, der gegen ein Epitop in der Schwanzdomäne des Lamins B2 gerichtet ist und mit dem das putative *Xenopus* Lamin B3 detektiert werden müsste (Abb. 22 A'-D'). Als zweiter Antikörper diente ein Cy-3 gekoppelter anti-Maus Antikörper aus der Ziege.

Die Aufnahmen 22 A und A' zeigen eine Übersicht über einen Hodenkanal. In *Xenopus* sind die Zellen der einzelnen Stadien der Spermatogenese in Gruppen angeordnet. Die Spermatozyten und Spermatozyten liegen jeweils zusammen meist im äußeren Bereich und die Spermatozyten und Spermien weiter im Inneren des Hodenkanals. In der Immunfluoreszenz ist zu sehen, dass nur Kerne des Epithels und des äußeren Bereichs des Hodenkanals angefärbt sind.

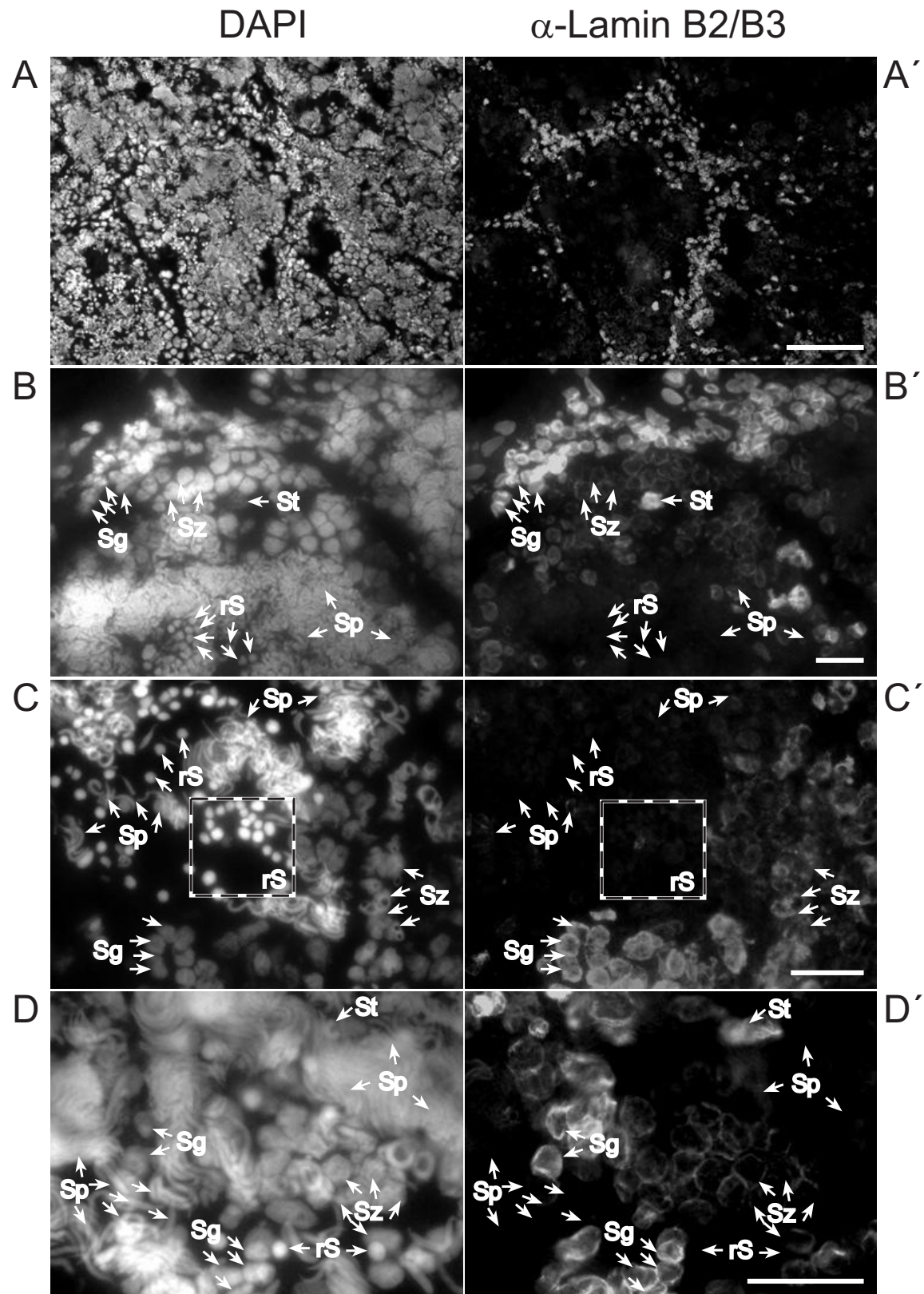


Abb. 22: Indirekte Immunfluoreszenz von *Xenopus* Testisgefrierschnitten (10 μ m)
 Die Position der Kerne wurde durch Färbung der DNA mit DAPI sichtbar gemacht (A-D).
 Die Immundetektion erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper L7-8C6 (anti-Lamin B2/B3) (A'-D')
 A und A': Übersicht über einen Hodenkanal (Maßstab 100 μ m).
 B/B', C/C' und D/D': Detailansichten von Zellen der Spermatogenese (Maßstab 50 μ m).
 Abkürzungen: **Sg**: Spermatogonien; **Sz**: Spermatozyten; **rS**: runde Spermatiden; **Sp**: Spermien;
St: Sertolizellen

Da in diesem Versuch die Färbung an Schnitten erfolgte, kann eine verminderte Zugänglichkeit des Antikörpers zum Inneren des Hodenkanals ausgeschlossen werden.

Die Abbildungen 22 B/B' bis D/D' zeigen Zellen der Spermatogenese bei höherer Vergrößerung. Aus den Aufnahmen wird deutlich, dass die sich mitotisch teilenden Spermatogonien (Sg) eine stärkere Lamin B2 Färbung aufweisen, als die sich meiotisch teilenden Spermatozyten (Sz). Sertolizellen lassen sich anhand der starken Lamin B2 Färbung identifizieren. Außerdem liegen die Sertolizellen (St) einzeln und nicht wie die anderen Zellen gehäuft vor. Die Bereiche von runden Spermatiden (rS) und Spermien (Sp) weisen keine Färbung mit dem Antikörper L7-8C6 auf (22 C/C').

Es ist anzumerken, dass mit Hilfe des Antikörpers L7-8C6 in der Immunfluoreszenz nicht zwischen Lamin B2 und B3 unterschieden werden kann. Da in der Westernblot Analyse des Testislysats ausschließlich Lamin B2 nachgewiesen wurde, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Signalen in der Immunfluoreszenz ebenfalls ausschließlich um Lamin B2 handelt. Zudem zeigten frühere Studien, dass sich die Expression von Lamin B3 auf postmeiotische Stadien, nämlich auf Spermatiden beschränkt (Schutz *et al.*, 2005b). Die postmeiotischen Stadien und insbesondere die Spermatiden weisen in dieser Arbeit jedoch eindeutig keine Färbung auf. Daher kann ein Vorhandensein des Lamin B3 in *Xenopus*, wie es für verschiedene Säuger gefunden wurde, ausgeschlossen werden.

C Diskussion

1. Datenbanksuche nach Lamin B3 Sequenzmotiven

Bei dem keimbahnspezifischen Lamin B3 handelt es sich um eine Spleißvariante des *LMNB2* Gens. Die Kopfdomäne und die Hälfte der Roddomäne des Lamins B2 sind im Lamin B3 durch eine nicht-helikale Sequenz ersetzt. Bisher wurde das Lamin B3 nur in der Spezies Maus identifiziert. Bei der Maus umfasst die Lamin B3 spezifische Kopfregion 84 Aminosäuren (Furukawa und Hotta, 1993). Die Sequenz des murinen B3-Kopfes konnte im Rahmen dieser Arbeit in einem alternativen Exon im Intron III des *LMNB2* Gens lokalisiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe von Gendatenbanken in weiteren Spezies nach Lamin B3 Sequenzmotiven gesucht. Das Intron III des *LMNB2* Gens von 10 verschiedenen Spezies wurde identifiziert und auf Lamin B3 Sequenzmotive hin untersucht. Mit putativen B3 Sequenzmotiven wurde nach entsprechenden EST-Klonen gesucht. Für die Spezies Mensch, Maus und Ratte konnten Lamin B3 EST-Klone gefunden werden. Bei der Maus umfassen die Kopfregionen der Lamin B3 EST-Klone, wie bereits in der Literatur beschrieben, 84 Aminosäuren. Alle für die Maus gefundenen Lamin B3 EST-Klone stammen aus Testisgewebe. Für die Ratte konnte ein Lamin B3 EST-Klon identifiziert werden, dessen Kopfregion 59 Aminosäuren umfasst. Auch dieser EST-Klon wurde aus Testisgewebe isoliert. Beim Menschen konnte ebenfalls ein Lamin B3 EST-Klon gefunden werden. Die Lamin B3 spezifische Kopfregion umfasst hier 91 Aminosäuren. Die RNA, die dem humanen Lamin B3 EST-Klon zu Grunde liegt, wurde aus der Medulla isoliert. Aus Testisgewebe konnte lediglich ein unvollständiger EST-Klon, der über die Hälfte der 91 Aminosäuren der humanen Lamin B3 spezifischen Kopfregion enthält, identifiziert werden.

Die Lamin B3 EST-Klone wurden ausschließlich in Säugetieren gefunden. Bis auf den einen Fall beim Menschen stammen die Lamin B3 EST-Klone bisher aus Testisgewebe. Das Vorhandensein von mRNA des „keimbahnspezifischen“ Lamin B3 im Gewebe der Medulla erscheint auf den ersten Blick ungewöhnlich. Aus der Literatur ist allerdings bekannt, dass es viele Ähnlichkeiten zwischen den Expressionsmustern des Testis und des Gehirns gibt. Sowohl bei Neuronen, als auch bei Spermatozyten und Spermien handelt es sich um hochdifferenzierte Zellen, die sich nicht mehr teilen. Ein Vergleich von EST-Sequenzen zeigte, dass die Expressionsmuster der Proteine der Transkription und Translation, sowie der Signaltransduktion in diesen beiden Geweben sehr hohe Ähnlichkeiten aufweisen (Berruti, 1998). Eine

andere Studie konnte zeigen, dass ein Testis-spezifischer Promotor ebenfalls im Gehirn aktiv ist (Kido und Lau, 2005).

Für einige Fische kann ausgeschlossen werden, dass es für das Lamin B3 eine den Säugern entsprechende Situation gibt. Die Genstruktur des *LMNB2* ist zwar gegenüber der Genstruktur der Säuger konserviert, die Introns III des Kugelfischs *Tetraodon nigroviridis* und des Pufferfisches *Takifugu rubripes* sind mit einer Länge von 123 bzw. 178 nt aber zu kurz, um für ein Lamin B3 spezifisches Exon, wie es in den Säugern gefunden wurde, zu codieren. Zusätzlich beinhalten diese kurzen Introns zwar ein Start ATG, verfügen aber über keine codierende Region, die einen Spleiß im richtigen Leseraster mit dem Exon 4 des *LMNB2* Gens erlaubt.

Auch für die Spezies *Danio*, *Xenopus* und *Gallus* ist das Vorhandensein eines Lamin B3 eher unwahrscheinlich. Zwar besitzen die Spezies ein ausreichend großes Intron III im *LMNB2* Gen, aber die putativen B3-Köpfe weisen für die Lamin B3 spezifische Kopfregion mit maximal 48 Aminosäuren vermutlich eine zu geringe Größe auf. Die Beobachtungen sprechen dafür, dass es sich bei dem Lamin B3 Protein um eine Neuentwicklung der Säugetiere handelt.

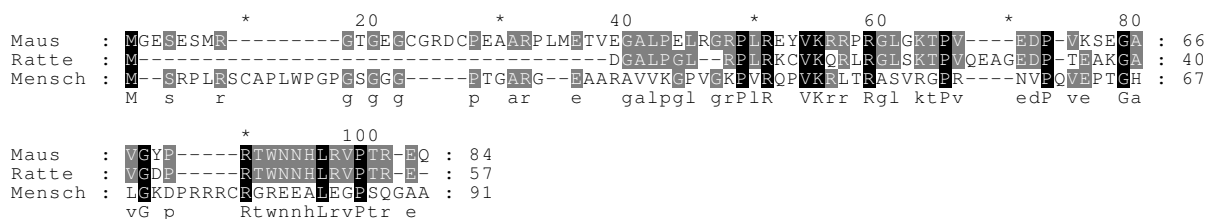


Abb. 23: Alignment der Aminosäuresequenzen der Lamin B3 spezifischen Kopfdomänen aus Maus, Ratte und Mensch.

Das Alignment wurde mit dem Programm MegAlign (DNA Star) nach der Jotun-Hein-Methode erstellt und mit dem Programm Genedoc weiterbearbeitet. Die unterste Reihe gibt den Consensus wieder. Die Aminosäuren, die alle drei Spezies gemeinsam besitzen, sind schwarz unterlegt (Großbuchstabe im Consensus). Aminosäuren, die nur zwei der drei Spezies gemeinsam haben sind grau unterlegt (Kleinbuchstaben im Consensus).

Die identifizierten B3-Köpfe aus Maus, Ratte und Mensch sind in ihrer Länge sehr unterschiedlich und reichen von 59-91 Aminosäuren (Abb. 23). Sie weisen nur sehr wenige Sequenzähnlichkeiten auf. Selbst zwischen den nahe verwandten Arten Maus und Ratte gibt es nur einige kurze Sequenzinseln, die signifikante Übereinstimmungen aufweisen. Die Sequenz des humanen B3-Kopfes weist noch weniger Ähnlichkeiten mit den Sequenzen der Nager auf. Hier gibt es nur einige sehr wenige Übereinstimmungen. Im vorderen Bereich der Sequenz gibt es bei Maus und Mensch einige identische Aminosäurepositionen, die lückenlos aligniert werden

können. Die Sequenzen der Nager zeigen einige Übereinstimmungen der Aminosäurepositionen im hinteren Bereich. Insgesamt besitzen die drei Sequenzen in diesem Alignment nur 13 identische Aminosäurepositionen, wobei die meisten dieser Aminosäuren im hinteren Bereich der Sequenz liegen.

Aufgrund der geringen Sequenzähnlichkeit ist es fast unmöglich in den anderen Säugetieren die Lamin B3 Sequenzmotive zu finden. Nur das Auffinden eines entsprechenden EST-Klons der jeweiligen Spezies kann einen Beleg für das Vorhandensein des Lamin B3 Proteins geben.

2. Lamin B3 in der Spermatogenese von *Xenopus*

In *Xenopus* wurden weitere experimentelle Untersuchungen zum Nachweis eines potentiellen Lamin B3 Proteins durchgeführt. In Vorversuchen wurde geklärt, dass der monoklonale Antikörper L7-8C6, der gegen ein Epitop in der Schwanzdomäne des *Xenopus* Lamins B2 gerichtet ist, mit dem humanen Lamin B3 kreuzreagiert und dass Lamin B2 und B3 im gewählten Gelsystem aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts voneinander unterschieden werden können.

Testisgefrierschnitte wurden mit dem Antikörper L7-8C6 gefärbt und mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz analysiert. Zusätzlich wurden die Proteine aus Leber- und Testisgewebe isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Westernblot mit Hilfe des gleichen Antikörpers analysiert.

Im Westernblot konnte in Leber- und Testisproteinlysate jeweils nur ein Signal mit Hilfe des Antikörpers L7-8C6 detektiert werden. Dieses Signal ist in beiden Fällen für Lamin B2 spezifisch und besitzt ein Molekulargewicht von 66 kD. Ein Lamin B3 spezifisches Signal mit einem geringeren Molekulargewicht konnte in keinem der beiden Lysate detektiert werden.

In der Immunfluoreszenz wird gezeigt, dass der Lamin B2 spezifische Antikörper L7-8C6 die Kerne von Sertolizellen, Spermatogonien und Spermatozyten färbt. Postmeiotische Zellen, wie runde Spermatozoen und Spermien weisen keine Färbung auf.

Früher wurde das Lamin B3 als Meiose-spezifisches Protein beschrieben, wobei die Expressionsanalysen allerdings nicht sehr detailliert waren (Furukawa und Hotta, 1993).

Weitere Expressionsstudien der Spermatogenese der Maus erbrachten kürzlich den Nachweis, dass Lamin B3 selektiv in postmeiotischen Stadien und hier speziell in

den runden und verlängerten Spermatiden exprimiert wird. Lamin B3 konnte in runden Spermatiden in der Kernperipherie und auch homogen verteilt im Nukleoplasma detektiert werden. Mit fortschreitender Spermiogenese konzentriert sich Lamin B3 am posterioren Pol des sich verlängernden Spermatidenkerns (Schutz *et al.*, 2005b). Da runde Spermatiden in den hier durchgeführten Untersuchungen an *Xenopus* keine Färbung aufweisen, kann ein Vorhandensein des Lamin B3 Proteins, entsprechend der Situation, wie sie für die Maus gezeigt wurde, für *Xenopus* ausgeschlossen werden.

Es zeigte sich ebenfalls, dass die Zusammensetzung der Kernlamina während der Spermatogenese in *Xenopus* generell anders ist als die in der Maus oder Ratte. Während der Spermatogenese der Nagetiere ist Lamin B1 das einzige somatische Lamin, das neben den keimbahnspezifischen Laminen B3 und C2 gefunden wurde (Vester *et al.*, 1993). In primären Spermatozyten verteilt sich Lamin B1 homogen innerhalb der Kernhülle. Während der Spermiogenese kommt es zu einer Umverteilung des Lamins B1, in dem es vorwiegend am posterioren Kernpol akkumuliert (Alsheimer *et al.*, 1998). Lamin B2 ist in keinem Stadium der Spermatogenese nachweisbar (Schutz *et al.*, 2005b).

In *Xenopus laevis* hingegen ist Lamin B2 eindeutig in Spermatozyten und in Spermatozyten I. und II. Ordnung detektierbar. Expressionsstudien für andere Lamine in *Xenopus* Testisgewebe wurden im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls durchgeführt, erbrachten aber aufgrund der schwachen Antikörperreaktionen keine eindeutigen Aussagen.

Die Zusammensetzung der Lamina in Zellen der Spermatogenese ist anders als in somatischen Zellen. Neben dem somatischen Lamin B1 werden die zwei kurzen Spleißvarianten, Lamin B3 und C2, exprimiert (Furukawa und Hotta, 1993; Alsheimer und Benavente, 1996). Lamin A und C sind in keinem Stadium der Spermatogenese nachweisbar (Alsheimer *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass die verkürzte Roddomäne der keimbahnspezifischen Lamine B3 und C2 der Kernhülle in spermatogenetischen Zellen eine höhere Flexibilität verleiht, die für die chromosomale Umorganisation erforderlich ist (Schutz *et al.*, 2005b). Lamin C2 wird zudem eine Rolle bei der Telomeranheftung an die innere Kernmembran zugesprochen (Alsheimer *et al.*, 1999).

3. Analyse des humanen Lamins B3 in *Xenopus* Oozyten

Xenopus Oozyten haben sich in der Vergangenheit als ein bevorzugtes Studienobjekt für die Analyse der Lamina und die Funktion der Kernlamine erwiesen. In *Xenopus* Oozyten wurde zum Beispiel erstmalig der Intermediärfilament-Charakter der Lamina beschrieben (Aebi *et al.*, 1986). Das humane Lamin B3 Protein wurde in dieser Arbeit in *Xenopus* Oozyten exprimiert und sein Verhalten mit Hilfe verschiedener Methoden analysiert. Durch die manuelle Trennung von Kern und Cytoplasma und anschließende Analyse im Westernblot, konnte Lamin B3 im Kern der Oozyten nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Immunhistologie konnte gezeigt werden, dass Lamin B3 an der inneren Kernmembran lokalisiert ist. Aufgrund des Vorhandenseins eines NLS und einer CaaX-Box am C-Terminus im Lamin B3 wurde die Lokalisation an der inneren Kernmembran erwartet. Die CaaX-Box unterliegt einer Reihe posttranslatiöner Modifikationen, die für den Einbau der Lamina in die Struktur der Lamina essenziell sind (Holtz *et al.*, 1989; Firmbach-Kraft und Stick, 1995; Ralle *et al.*, 2004). Eine Ausnahme stellt hier nur Lamin C dar, das über keine CaaX-Box verfügt und daher andere Lamine für die Zielsteuerung an die innere Kernmembran benötigt (Ye und Worman, 1995, Schutz *et al.*, 2005b).

Innerhalb des Nukleoplasmas des Oozytenkerns ist Lamin B3 nicht zu detektieren. Die Struktur der B3-Lamina ist aber zum Teil sehr dick, ragt ins Nukleoplasma hinein und bildet hier neben einer homogenen Struktur zahlreiche stark gefärbte Proteinaggregate. Bei diesen Proteinaggregaten handelt es sich vermutlich um intranukleäre Membranen. Aus mehreren Studien ist bereits bekannt, dass Lamine und andere Proteine, die über eine CaaX-Box verfügen, durch ektoische Überexpression das Membranwachstum fördern können (Prufert *et al.*, 2005; Ralle *et al.*, 2004).

In der Oozyte ist Lamin LIII mengenmäßig das Hauptprotein der Lamina (Lourim *et al.*, 1996). Die Expression des Lamin B3 Proteins in Oozyten nimmt keinen Einfluss auf die Struktur und die Verteilung des endogenen Lamin LIII. Mit früheren Studien übereinstimmend ist Lamin LIII nach der ektoischen Expression von Lamin B3 weiterhin ausschließlich an der Kernhülle und nicht im Nukleoplasma zu detektieren (Stick und Krohne, 1982).

Analysen zur Löslichkeit und Membranassoziation des Lamin B3 Proteins wurden mit Hilfe einer Hochsalzbehandlung und einer Gradientenzentrifugation durchgeführt. Ein typisches Lamin sollte durch die Behandlung mit hohen Salzkonzentrationen nicht

löslich werden und aufgrund des Vorhandenseins einer CaaX-Box während der Gradientenzentrifugation mit den Membranvesikeln assoziiert bleiben und flottieren (Hofemeister *et al.*, 2000). Nach der Hochsalzbehandlung konnte das Lamin B3 Protein, wie für ein typisches Lamin erwartet, ausschließlich in der Sedimentfraktion detektiert werden. Untersuchungen zur Membranassoziation des Lamin B3 mit Hilfe der Gradientenzentrifugation bestätigen ebenfalls den Charakter eines typischen Lamins. Wie erwartet blieb das über eine CaaX-Box verfügende Lamin B3 während der Zentrifugation mit Membranvesikeln assoziiert und flottierte im Gradienten. Das Verhalten von Lamin B3 während der Gradientenzentrifugation, konnte in früheren Studien auch mit dem somatischen Lamin B2 beobachtet werden (Hofemeister *et al.*, 2000). Da Lamin B2 und B3 über den gleichen C-Terminus verfügen, war dieses Ergebnis zu erwarten.

Die bisherigen Analysen des Lamin B3 in Oozyten ergeben, dass sich das humane Lamin B3 nach den hier geprüften Kriterien trotz des Fehlens der Coils 1 A und B der Roddomäne *in vivo* wie ein typisches Lamin verhält.

4. Analyse des humanen Lamins B3 in *Xenopus* Embryonen

Zusätzlich zu der Analyse in Oozyten wurde das Verhalten von Lamin B3 in *Xenopus* Embryonen untersucht. Lamin B3 injizierte Embryonen entwickelten sich zunächst normal. Zu Beginn der Gastrulation im Stadium 10,5 kam es zu auffallenden Störungen der Entwicklung. Nachdem sich der Urmund ausgebildet hatte, bekamen die Embryonen zunehmend Pigmentstörungen, stoppten in ihrer Entwicklung und starben ab. Aus der Literatur ist bekannt, dass apoptotische Zellen, in der natürlichen Entwicklung von *Xenopus*, erstmals in Stadium 10,5, dem Beginn der Gastrulation, nachgewiesen werden können (Hensey und Gautier, 1997). Auch ist bekannt, dass zu Beginn der Gastrulation ein apoptotisches Programm durch die Behandlung mit verschiedenen Zellgiften induziert werden kann (Sible *et al.*, 1997). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Tod der Lamin B3 injizierten Embryonen auf Apoptose zurückzuführen ist. Zum Nachweis der Apoptose wurde eine immunhistologische TUNEL-Färbung durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten hierbei Cycloheximid behandelte Embryonen (Sible *et al.*, 1997). Sowohl in der Kontrolle, als auch in Lamin B3 injizierten Embryonen des Stadiums 10,5 konnte anhand einer positiven TUNEL-Färbung Apoptose nachgewiesen werden. Lamin B3 injizierte Embryonen des Stadiums 10 hingegen weisen noch keine TUNEL-Färbung

auf. Diese Ergebnisse stehen mit früheren Studien im Einklang, in denen eine TUNEL-Färbung bei Cycloheximid behandelten Embryonen ebenfalls erst ab dem Stadium 10,5 detektiert werden konnte (Hensey und Gautier, 1997; Sible *et al.*, 1997).

Frühere Studien zeigten, dass das apoptotische Programm zu Beginn der Gastrulation in *Xenopus* durch die Injektion von Bcl-2 mRNA verzögert werden kann (Hensey und Gautier, 1997; Takayama *et al.*, 2004). Bei Bcl-2 handelt es sich um einen Regulator des Zelltods mit anti-apoptotischer Wirkung (Sible *et al.*, 1997; Hensey und Gautier, 1997; Takayama *et al.*, 2004).

Die Ergebnisse der Coinjektion von Lamin B3 und Bcl-2 in *Xenopus* Embryonen im Rahmen dieser Arbeit stimmen mit den Daten der Literatur überein (Hensey und Gautier, 1997; Takayama *et al.*, 2004). Durch die Coinjektion konnte der Tod der Embryonen bis in das Stadium 12 verzögert werden. Dieser Phänotyp konnte bei 50% der coinjizierten Embryonen gefunden werden. Die restlichen Embryonen entwickelten sich völlig normal weiter. Vielleicht wurde in diesen Embryonen das Lamin B3 nicht exprimiert. Möglicherweise kam es bei den coinjizierten Embryonen zu einer ungleichen Translation der beiden Proteine. Hierfür würde auch die Tatsache sprechen, dass Ausfälle beim Lamin B3 Nachweis im Westernblot bei den coinjizierten Embryonen deutlich häufiger gefunden wurden, als bei den Embryonen, die mit Lamin B3 allein injiziert wurden. Die Apoptose könnte in diesen Embryonen durch die Expression von Bcl-2 auch ganz verhindert worden sein. Da dies aber aus der Literatur nicht bekannt ist, ist wohl eher davon auszugehen, dass Lamin B3 in diesen Embryonen nicht exprimiert wurde.

Der synchrone Tod der Embryonen mit dem Beginn der Gastrulation, die TUNEL-positiven Zellen, sowie die Verzögerung des Todes der Embryonen durch die Coinjektion von Bcl-2 sind der Beweis, dass der Tod der Lamin B3 injizierten Embryonen durch Apoptose verursacht wird.

Die Ursachen für die Apoptose zu Beginn der Gastrulation, die durch verschiedene Zellgifte induziert werden kann, können auf Schädigung der DNA, die Inhibierung der Replikation oder die Inhibierung der Transkription und Translation zurückgeführt werden (Hensey und Gautier, 1997).

Aus den früheren Studien ist bekannt, dass Cycloheximid indirekt die zygotische Transkription zum Zeitpunkt der MBT inhibiert (Sible *et al.*, 1997). Es wird vermutet, dass hierdurch die zygotische Transkription eines apoptotischen Inhibitors verhindert

wird, und dadurch das apoptotische Programm zu Beginn der Gastrulation ausgelöst wird. Weitere Vermutungen gehen dahin, dass es sich bei diesem Inhibitor um das Protein Bcl-2 handeln könnte (Hensey und Gautier, 1997; Sible *et al.*, 1997).

In anderen Studien wurde gezeigt, dass dominant negative Lamin Mutanten, die in die endogene Lamina integriert werden, die Aktivität der Polymerase II inhibieren können. Diese Versuche bestätigen eine Rolle der Lamine bei der Transkription. Darüber hinaus wird vermutet, dass der Effekt auf die Polymerase II durch B-Typ Lamine vermittelt wird (Spann *et al.*, 2002; Übersicht in Hutchison 2002). Daher ist es nicht auszuschließen, dass Lamin B3 auf die Polymerase II wirken könnte und somit den Tod der Embryonen hervorruft.

Untersuchungen zur zygotischen Transkription zum Zeitpunkt der MBT wurden in dieser Arbeit mit Hilfe einer PCR-Reaktion durchgeführt. GS-17 Transkripte wurden mit Hilfe spezifischer Primer nachgewiesen. Von GS-17 ist bekannt, dass es im frühen Embryo nicht vorhanden ist und dass seine Transkription zur MBT aktiviert wird (Krieg und Melton, 1985, 1987). Im Rahmen dieser Arbeit ließ sich das GS-17 Transkript bereits vor der MBT nachweisen. Die Gründe hierfür sind unklar, da sich in der Kontrolle kein GS-17 spezifisches PCR-Produkt nachweisen lässt. In den früheren Studien wurde ein GS-17 Transkript mit Hilfe von Northernblots nachgewiesen (Krieg und Melton, 1985). Die hier gewählte Methode der PCR ist sensitiver. Dies könnte der Grund sein, warum der Nachweis des Transkripts schon vor der MBT möglich war. Vor der MBT lassen sich die GS-17 spezifischen PCR-Produkte nur schwach nachweisen. Nach Stadium 8 (MBT) ist ein deutlicher Anstieg der PCR-Produkte auszumachen. Da in den PCR-Reaktionen der einzelnen Stadien immer gleiche cDNA-Mengen eingesetzt wurden, kann der Anstieg des PCR-Produkts nur durch zygotische Transkription bedingt sein.

Ein Anstieg der endogenen Lamin LIII Menge in Lamin B3 injizierten Embryonen konnte im Westernblot ebenfalls nach Stadium 8 beobachtet werden. Dieser Anstieg wurde bereits in früheren Studien beschrieben und ist auf die Aktivierung von maternalen Transkripten zum Zeitpunkt der MBT zurückzuführen (Stick und Hausen, 1985). Die Aktivierung von maternalen Transkripten zum Zeitpunkt der MBT wurde schon für weitere Proteine wie Histon H1 (Woodland *et al.*, 1979) und Fibronectin gezeigt (Lee *et al.*, 1984).

Die Ergebnisse zeigen, dass kein genereller Block der Transkription oder Translation in den Lamin B3 injizierten Embryonen stattfindet. Demnach wird der durch Apoptose

induzierte Tod der Embryonen vermutlich nicht durch die Inhibierung der zygotischen Transkription oder Translation verursacht. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die zygotische Transkription einiger weniger Gene inhibiert sein könnte. Auch ist nicht geklärt, ob die Translation der maternalen und zygotischen Transkripte der gleichen Regelung unterliegt.

Eine Inhibierung der Replikation kann ebenfalls ausgeschlossen werden. Die Embryonen entwickelten sich anfänglich völlig normal und es konnten zahlreiche Mitosen beobachtet werden. Auch konnten in Schnitten von injizierten und nicht injizierten Embryonen des gleichen Stadiums in etwa die gleiche Zellzahl beobachtet werden.

Die Injektion von Lamin B3 in *Xenopus* Embryonen löst Apoptose aus. Der molekulare Mechanismus dieser Störung konnte im Rahmen dieser Arbeit aber nicht geklärt werden. Trotzdem wirkt Lamin B3 in den Embryonen wie ein Zellgift. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Lamin A erhalten. Die Injektion von Lamin A in *Xenopus* Embryonen induziert ebenfalls den synchronen Zelltod zu Beginn der Gastrulation (unveröffentlichte Ergebnisse aus dem Labor).

5. Analyse des humanen Lamins B3 in somatischen Kulturzellen

Frühere Transfektionsstudien zeigten, dass ektopische Expression des murinen Lamin B3 in somatischen Kulturzellen zu einer Veränderung der Kernform führt (Furukawa und Hotta, 1993; Schutz *et al.*, 2005a). Diese Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit mit humanen Lamin B3 bestätigt werden. In A6-, Hela- und COS 7-Zellen weisen die transfizierten Zellen verformte Zellkerne auf. Der Grad der Verformung ist hierbei bei den einzelnen Zelltypen verschieden. Dies ist auf die unterschiedliche Beschaffenheit der einzelnen Zelltypen zurückzuführen. Während aber in den vorherigen Arbeiten von hakenförmigen, leicht lobulierten Zellkernen berichtet wird, zeigen die transfizierten Kerne in dieser Arbeit sehr starke Lobulierungen und Verformungen. Vorwiegend bei COS 7-Zellen sind die Kerne so stark lobuliert und gekrümmt, dass sie in der Mitte ein Loch aufweisen. Derartige Deformationen wurden mit murinem Lamin B3 bisher nicht gezeigt. Dies könnte auf das unterschiedliche Expressionsverhalten des Lamin B3 in verschiedenen Expressionsvektoren und Zelllinien zurückzuführen sein.

Ähnlich stark lobulierte Zellkerne wie in dieser Arbeit wurden in Transfektionsexperimenten mit einer Lamin B1 Mutante in Kulturzellen erhalten. Dieser Lamin B1

Mutante fehlen 4/5 des internen Teils der Roddomäne, wobei die konservierten Regionen an den Enden der Roddomäne noch vorhanden sind. In den Zellen, die mit der Lamin B1 Mutante transfiziert wurden, konnte neben der Kernverformung eine Umverteilung der endogenen Lamine gefunden werden. Die endogenen Lamine gehen von einer homogenen zu einer Aggregat-ähnlichen Verteilung über (Schirmer *et al.*, 2001). Für das humane Lamin B3 konnte zwar eine Kernverformung, aber keine offensichtliche Umverteilung der endogenen Lamine nachgewiesen werden. Diese Beobachtung trifft auch auf das murine Lamin B3 zu. Für das murine Lamin B3 konnte ebenfalls eine Kernverformung, aber keine Umverteilung der endogenen Lamine beobachtet werden (Schutz *et al.*, 2005a).

Diese Unterschiede können vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass in der Lamin B1 Mutante die beiden konservierten Regionen am Ende der Roddomäne vorhanden sind, während die vordere der beiden Regionen im Lamin B3 fehlt.

Die stark konservierten Regionen an den Enden der Roddomäne sind wichtig für die Dimerisierung der Lamine. Sie sind zusammen mit der Kopf- und Schwanzdomäne für die Polymerisierung der Dimere in Oligomere höherer Ordnung verantwortlich (Schirmer *et al.*, 2001; Übersicht in Stuurman, 1998). Da das Lamin B3 Protein über eine andersartige Kopfregion verfügt und zusätzlich das Coil 1 A und B der Roddomäne fehlen, wird vermutlich die Interaktion mit anderen Laminen beeinträchtigt und es kann daher kein Effekt auf die endogenen Lamine nachgewiesen werden.

Früher wurde angenommen, dass die Deformation der Zellkerne auf die Lamin B3 spezifische nicht-helikale Kopfdomäne zurückzuführen ist (Furukawa und Hotta, 1993). Studien mit verschiedenen Deletionsmutanten konnten aber zeigen, dass nicht die Lamin B3 spezifische Kopfdomäne, sondern das Fehlen der Coils 1A und B für die Kerndeformation verantwortlich ist (Schutz *et al.*, 2005a). Diese These wird auch dadurch gestützt, dass mit einer Lamin B1 Mutante, der 4/5 der Roddomäne fehlen, in Transfektionsexperimenten lobulierte Zellkerne erhalten wurden (Schirmer *et al.*, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten das ektopisch exprimierte Lamin B3 und B2 in den somatischen Zellen sowohl in der Kernperipherie, als auch homogen verteilt im Nukleoplasma detektiert werden. Für das Lamin B3 stehen diese Beobachtungen mit früheren Studien in Einklang. In somatischen Kulturzellen und im Testisgewebe der Maus konnte Lamin B3 ebenfalls in der Kernperipherie und dem Nukleoplasma

nachgewiesen werden (Schutz *et al.*, 2005a). Für das Lamin B2 wurden bisher andere Beobachtungen gemacht. Die Lokalisation des Lamin B2 beschränkte sich bisher ausschließlich auf den Bereich der Kernhülle (Schutz *et al.*, 2005b). Wie bereits erwähnt handelt es sich bei den in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen um Aufnahmen ganzer Zellen. Es wurde keine konfokale Mikroskopie angewendet. Daher könnte es sich bei dem nukleoplasmatischen Anteil des Lamin B2 auch um Protein handeln, das innerhalb des oberen oder unteren Bereichs der Kernhülle lokalisiert ist und daher in der Fluoreszenz nur nukleoplasmatisch erscheint.

Es wurde gezeigt das Lamin B3 in postmeiotischen Zellen exprimiert wird, in denen eine natürliche Veränderung der Kernform stattfindet. Die Kerne von Zellen der Spermatogenese besitzen im Vergleich zu somatischen Kernen eine geringere Menge an Laminen (Vester *et al.*, 1993; Alsheimer und Benavente, 1996). Zudem stellen die Hauptvertreter der Lamine die kurzen Laminvarianten C2 und B3 dar, die signifikant kürzer sind als ihre somatischen Vertreter. Zusammen mit der Deformation somatischer Zellkerne kann angenommen werden, dass Lamin B3 in der inneren Kernhülle den Zellkernen eine höhere Flexibilität verleiht und somit bewirken könnte, dass aus runden Spermatidenkernen längliche Spermienkerne entstehen können. Diese Ergebnisse konnten durch FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) und FLIP (fluorescence loss in photobleaching) Analysen untermauert werden, die zeigten das Lamin B3 mobil in der Kernperipherie vorliegt und mit einem nukleoplasmatischen Pool im Austausch steht (Schutz *et al.*, 2005b).

Im Gegensatz zu den Kernen von Embryonen und verschiedenen Kulturzellen konnte in Oozyten keine Verformung des Zellkerns durch die ektopische Expression des Lamin B3 nachgewiesen werden. Das unterschiedliche Verhalten kann zum einen mit dem riesigen Größenunterschied dieser Kerne begründet werden. Das Kernvolumen der Oozyte ist in etwa um das 300000fache größer als das der Kerne somatischer Zellen (Stick und Hausen, 1985). Dadurch ist auch die Oberfläche des Kerns und die enthaltene Menge an Laminen um ein vielfaches größer als in somatischen Kernen. Hierdurch wird möglicherweise die Verformung des Zellkerns durch den Einbau von Lamin B3 in die Lamina erschwert. Außerdem konnte für Oozyten gezeigt werden, dass ihre großen Kerne im Gegensatz zu somatischen Kernen Actin als weiteres Strukturelement beinhalten (Bohnsack *et al.*, 2006). Dies

führt wiederum zu einer erhöhten Stabilität der Kerne und erschwert damit eine Veränderung der Form.

6. Schlussfolgerungen und Ausblick

Durch Datenbankanalysen wurde das keimbahnspezifische Lamin B3 im Rahmen dieser Arbeit erstmals außerhalb der Spezies Maus identifiziert. Spezies, in denen das Lamin B3 sicher nachgewiesen wurde, beschränkten sich hierbei auf Säugetiere. Durch zusätzliche experimentelle Untersuchungen der Spermatogenese von *Xenopus* kann das Vorhandensein von Lamin B3 in dieser Spezies ausgeschlossen werden. Es zeigte sich außerdem, dass die Zusammensetzung der Kernlamina in der Spermatogenese von *Xenopus* anders ist, als die bei den Nagetieren. In dieser Arbeit konnte Lamin B2 in der Spermatogenese von *Xenopus* mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz in Spermatogonien und Spermatozyten I. und II. Ordnung nachgewiesen werden. In der Spermatogenese der Nagetiere hingegen, konnte ausschließlich Lamin B1 als einziges somatisches Lamin identifiziert werden (Vester *et al.*, 1993).

Für die Fische *Tetraodon* und *Fugu* konnte ausgeschlossen werden, dass es für das Lamin B3 eine den Säugern entsprechende Situation gibt. Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, dass es sich bei Lamin B3 um ein Protein handelt, das nur in Säugern vorkommt. Da EST-Datenbanken der einzelnen Spezies ständig erweitert werden, wäre es auch in Zukunft sinnvoll in weiteren Säugern nach Lamin B3 Sequenzmotiven zu suchen.

Die Expression von Lamin B3 in *Xenopus* Embryonen zeigte einen dominant negativen Effekt in der Entwicklung. Eine Ursache für den dominant negativen Effekt konnte in dieser Arbeit nicht ausgemacht werden. Es wäre allerdings interessant das Verhalten des anderen keimbahnspezifischen Lamins, Lamin C2, in der embryonalen Entwicklung zu analysieren. Sollte es hierbei ebenfalls zu einem dominant negativen Effekt kommen, so könnte dies auf die verkürzten Roddomänen zurückzuführen sein, die beiden Proteinen gemeinsam ist. Möglicherweise könnte dies auch weiteren Aufschluss über die Funktionen der keimbahnspezifischen Lamine geben.

D Material und Methoden

1. Material

1.1 Bakterien

Es wurde der superkompetente Bakterienstamm *Escherichia coli* XL-1 Blue (Stratagene) verwendet.

1.2 Zellkulturen

Als Zellkulturen dienten humane Hela-Zellen (ATCC (American Type Culture Collection) Nr. CCL2), *Xenopus* A6-Zellen (ATCC Nr. CCL102) und COS-7 Zellen (ATCC Nr. CRL1651) aus einer afrikanischen Affenart. Die aktuellen Zelllinien wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt.

1.3 Versuchstiere

Als Versuchstier diente der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis*. Die Tiere wurden von der African *Xenopus* Facility (Knysna, Südafrika) oder einem Züchter aus Hamburg (Firma Kähler) bezogen. Die Tiere wurden gemäß den Bestimmungen des Tierschutzes gehalten und behandelt.

1.4 Datenbanken

Die Datenbanksuche nach Lamin B3 Sequenzmotiven wurde ausschließlich mit Hilfe der Sequenzdatenbank von NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

1.5 Plasmide

pCMV-Sport6-B3 In diesem Vektor ist die cDNA des EST-Klons BM563418 einkloniert, die dem humanen Lamin B3 entspricht. Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte über die auf dem Vektor vorhandene Ampicillinresistenz (Invitrogen).

pCS²⁺ Der Vektor pCS²⁺ besitzt im Polylinker I zwischen der *Bam*HI- und *Eco*RI-Schnittstelle ein nachträglich eingefügtes Flag-Antikörperepitop. Hinter der Flag-Sequenz sind die cDNAs der verschiedenen *Xenopus* Lamin Subtypen einkloniert (A, B1, B2, LIII und B3). Die transformierten Bakterien wurden über die auf

-
- dem Vektor vorhandene Ampicillinresistenz selektioniert (Rupp *et al.*, 1994).
- pSP64 Dieser Vektor besitzt kein zusätzliches Antikörperepitop. Die cDNAs der einklonierten *Xenopus* Lamin Subtypen werden als Wildtypen exprimiert. Die Selektion der Bakterien erfolgte über eine Ampicillinresistenz (Promega).
- pEYFP-Actin Dieser Vektor codiert für ein Fusionsprotein aus dem „verstärkten gelben fluoreszierenden Protein“ (EYFP) und einem humanen cytoplasmatischen β -Actin. Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte über die im Vektor vorhandene Kanamycin Resistenz (Clontech).
- pRc/CMV-Bcl2 In diesem Vektor ist die cDNA des humanen Bcl-2 einkloniert. Die Selektion erfolgte über die auf dem Vektor vorhandene Ampicillinresistenz (Invitrogen).
- p163/7-B2 Dieser Vektor codiert für das humane Lamin B2. Die Selektion erfolgte über die im Vektor vorhandene Ampicillinresistenz (Geschenk von H. Herrmann, DKFZ, Heidelberg).

1.6 Antikörper

1.6.1 Primärantikörper

- M2 anti-Flag Epitop, monoklonaler Antikörper aus der Maus (Sigma, Bestellnr. F3165), Konzentration 2,8 mg/ml IgG (Immunglobulin), 1:10000 im Westernblot, 1:500 in der Immunfluoreszenz
- L7-8C6 anti-Lamin B2 (*Xenopus*), monoklonaler Antikörper aus der Maus (Stick, 1988), Ascites, 1:10000 im Westernblot, 1:500 in der Immunfluoreszenz
- L₀46F7 anti-Lamin LIII (*Xenopus*), monoklonaler Antikörper aus der Maus (Benavente *et al.*, 1985), IgG1, 1:500 im Westernblot, 1:100 in der Immunfluoreszenz

Nuc 195	anti-Lamin LIII (<i>Xenopus</i>), monoklonaler Antikörper aus der Maus (Kneissel <i>et al.</i> , 2001), Zellkulturüberstand, 1:10 im Westernblot, unverdünnt in der Immunfluoreszenz
B7-1A9	anti-Nucleoplasmin (<i>Xenopus</i>), monoklonaler Antikörper aus der Maus (Dreyer <i>et al.</i> , 1985), IgG1, 1:20000 im Westernblot

1.6.2 Sekundärantikörper

Anti-Maus-POD	Meerrettichperoxidase (POD) konjugierter, polyklonaler Antikörper aus der Ziege (Dianova, Bestellnr. 115-035-003), IgG, 1:10000 im Westernblot
Anti-Maus-Cy-3	Indocarbocyanin (Cy-3) konjugierter, polyklonaler Antikörper aus der Ziege (Dianova, Bestellnr. 115-165-003), IgG, 1:500 in der Immunfluoreszenz
Anti-DIG-AP	Alkalische Phosphatase (AP) konjugierter, anti-Digoxigenin Antikörper aus dem Schaf (Roche, Bestellnr. 11093274) , Fab-Fragment, 1:1500 in der Immunhistologie

1.7 Primer

GS-17 (vorwärts)	5´d[TCCTCATTATGCCAGTCCAACTTC]3´	(56 °C)
GS-17 (rückwärts)	5´d[CCGTAAACTTGTGTAGCACCGC]3´	(56 °C)
YFP (vorwärts)	5´d[GCCGAATTCGGTGAGCAAGGGCGA]3´	(65 °C)
YFP (rückwärts)	5´d[CGAATTCGATCTGAGTCCGGACTTG]3´	(65 °C)

1.8 Chemikalien, Puffer und Standardlösungen

Salze und Standardchemikalien wurden von den Firmen Merck, Fluka, Riedel de Haen oder Sigma bezogen. Lösungen und Puffer wurden mit doppeltdestilliertem Wasser (ddH₂O) hergestellt und nach Bedarf autoklaviert oder sterilfiltriert.

2. Methoden

Wenn nicht anders angegeben wurden die molekularbiologischen Standard-Methoden nach Sambrook *et al.*, 2001 durchgeführt.

2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.1.1 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die DNA-Konzentrationen der aus der TELT-Methode stammenden Plasmide wurden aufgrund des Reinheitsgrades mit Proben bekannter DNA-Konzentrationen auf Agarosegelen abgeschätzt. Die DNA- und RNA-Konzentrationen der Midipräparationen, mRNA-Synthese und -Isolation wurden photometrisch bestimmt. Hierbei entspricht eine OD_{260} von 1 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA oder 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Der Quotient $OD_{260/280}$ spiegelt den Reinheitsgrad der Nukleinsäure wider und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2 Arbeiten mit DNA

2.2.1 Restriktionsspaltungen

Durch Restriktionsendonukleasen des Typs II können Plasmide linearisiert werden, oder aus Plasmid-Vektoren spezifisch einzelne DNA-Fragmente herausgeschnitten werden. In dieser Arbeit wurden Restriktionsenzyme verschiedener Hersteller verwendet (Fermentas, Amersham und New England Biolab). Ein Restriktionsansatz von 50 μl setzte sich aus 5 μl des entsprechenden 10 x Restriktionspuffers, 2 μg DNA, 1 μl des jeweiligen Restriktionsenzym (5-10U/ μl) und einem entsprechenden Auffüllvolumen ddH_2O zusammen. Die Inkubation der Restriktionsansätze erfolgte in der Regel für 2 h bei 37°C.

2.2.2 Auffüllreaktion

Mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase können bei den Restriktionsspaltungen entstandene überstehende 5'-Enden („sticky ends“) zu stumpfen Enden („blunt ends“) aufgefüllt werden.

Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 20 μl durchgeführt. Ein Ansatz setzte sich aus 4 μl 5x T4-Puffer (Fermentas), 1 μl dNTPs (10 mM, Boeringer), 1 μl T4-Polymerase (5U/ μl , Fermentas), dem linearisierten Vektor und einem entsprechenden Auffüllvolumen ddH_2O zusammen. Die Inkubation erfolgte für 15 min

bei RT. Anschließend wurden die Ansätze mit dem PCR-Purification Kit der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers aufgearbeitet.

2.2.3 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um zu verhindern, dass es bei den bei der Restriktionsspaltung entstandenen kompatiblen Enden ohne Einbau des gewünschten Fragments zu einer Religation kommt, wurde das 5'-Ende der Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase behandelt. Die Dephosphorylierung erfolgte in einem Volumen von 50 μ l. Der geschnittene Vektor wurde mit ddH₂O bis auf ein Volumen von 48 μ l aufgefüllt. Es wurde zweimal 1 μ l Alkalische Phosphatase (1U/ μ l, Roche) zugefügt und der Ansatz jeweils für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Reaktion wurde der Ansatz mit dem PCR-Purification Kit nach dem Protokoll des Herstellers (Qiagen) aufgearbeitet.

2.2.4 Ligation

Die kovalente Verknüpfung von Vektor-DNA und DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der T4-Ligase. Für die Reaktionen wurde ein molares Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA von 1:5 gewählt. Ein Ligationsansatz hatte ein Volumen von 10 μ l und setzte sich aus 1 μ l 10 x Ligationspuffer (Fermentas), 100 ng Vektor, 500 ng Insert, 1 μ l T4-Ligase (1U/ μ l, Fermentas) und einem entsprechendem Auffüllvolumen ddH₂O zusammen. Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte \bar{u} N bei 16°C im Wasserbad.

2.2.5 Whole-Mount TUNEL Assay

Für den TUNEL Assay (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling) wurden Aliquots zu je fünf Embryonen gesammelt, über Nacht in 3,7% Formaldehyd in MEM-Puffer (1 M MOPS; 20 mM EGTA; 10 mM MgSO₄; pH 7,4) fixiert und bis zur weiteren Aufarbeitung in Methanol bei -20°C gelagert. Die Rehydrierung erfolgte in 90% MeOH/H₂O, 70% MeOH/H₂O, 50% MeOH/PBS, 30% MeOH/PBS und PBS (1,4 M NaCl; 26 mM KCl; 14 mM KH₂PO₄; 66 mM Na₂HPO₄; pH 7,4) für jeweils zehn Minuten. Anschließend wurden die Embryonen für 1 h in TdT-Puffer (Terminale Nukleotidyltransferasepuffer, Fermentas) äquilibriert. Die Markierung der DNA-Enden erfolgte in TdT-Puffer, der mit 0,5 μ M Dig-dUTP (Roche) und 150 U/ml TdT versetzt war über Nacht bei 4°C. Der Reaktionsstopp erfolgte in 2mM PBS/EDTA für 2 h bei 65°C. In dieser Zeit wurde der der Puffer einmal

gewechselt. Anschließend wurden die Embryonen viermal mit PBS gewaschen. Die Embryonen wurden für eine Stunde mit PBST + 20% Ziegen Serum blockiert, und daraufhin über Nacht in PBST + 20% Ziegen Serum mit einem anti-Digoxigenin Alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelten Antikörper (1:1500) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Embryonen sechsmal bei RT und noch einmal über Nacht bei 4°C in PBS gewaschen (end over end). Die Farbreaktion erfolgte in 1 ml AP-Puffer (100 mM Tris-HCl; 50 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 0,1% Tween 20; pH 9,5) mit 4,5 µl NBT (75 mg/ml Nitroblau-Tetrazolium) und 3,5 µl BCIP (50 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat) für drei Tage auf Eis. Daraufhin wurden die Embryonen in einer aufsteigenden EtOH-Reihe dehydriert und anschließend in den Kunststoff Technovit 7100 (Kulzer) eingebettet.

2.2.6 Reverse Transkriptase–Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Damit die isolierte RNA der *Xenopus* Embryonen für eine PCR mit genspezifischen Primern (GSP) eingesetzt werden konnte, musste diese zunächst durch eine RT-PCR in cDNA umgeschrieben werden. Die Reaktion wurde mit Hilfe des SuperScript™ First-Strand Synthese-Kits der Firma Invitrogen durchgeführt. Es wurde 1 µg cDNA für die nachfolgende Reaktion eingesetzt. Die RT-PCR erfolgte mit Oligo-dT-Primern nach Angaben des Herstellers. Die Reaktionen wurden in einem „Thermocycler“ der Firma Eppendorf durchgeführt.

2.2.7 PCR mit genspezifischen Primern

Die PCR mit genspezifischen Primern wurde durchgeführt um DNA-Fragmente spezifischer Größe für den Einbau in Plasmid-Vektoren zu erhalten, oder den Nachweis spezifischer Transkripte in *Xenopus* Embryonen oder einer humanen Testis-cDNA-Bank zu erbringen. Die PCR erfolgte in einem Volumen von 50 µl und setzte sich aus 5 µl 10 x PCR-Puffer (Invitrogen), 3 µl MgCl₂ (25 mM, Invitrogen), 1 µl dNTPs (10 mM, Invitrogen), 1 µl GSP-vorwärts (10 µM), GSP-rückwärts (10 µM), 2 µl der jeweiligen cDNA, 0,4 µl Taq- oder Pfu-Polymerase (3U/µl, Roche) und einem entsprechendem Auffüllvolumen Diethylpyrocarbonat-behandelten H₂O (DEPC). Die Reaktion erfolgte im Thermocycler mit folgenden Parametern:

<i>Initiale Denaturierung</i>	94 °C	2 min	
<i>Denaturierung</i>	94 °C	45 sec	} 30-40 Zyklen
<i>Primerbindung</i>	50-65 °C	45 sec	
<i>Verlängerung</i>	72 °C	1 min	
<i>Finale Verlängerung</i>	72 °C	10 min	
	20 °C	∞	

2.2.8 Agarosegele

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA Fragmenten erfolgte mit Hilfe von 1-2%igen Agarosegelen. Zur Herstellung wurde die Agarose (SeaKem) in einem entsprechendem Volumen 1x TBE-Puffer (89 mM Tris; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA) durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml mit Ethidiumbromid (10 mg/ml, Merck) versetzt. Die Gelläufe erfolgten unter Verwendung von 1 x TBE als Laufpuffer und einer konstanten Stromstärke von 50-100 mA, abhängig von der Gelgröße.

2.2.9 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die zu Klonierzwecken benötigten DNA-Fragmente wurden unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht und mit einem Skalpell herausgeschnitten. Nachdem nicht Ethidiumbromid gefärbtes Material weitestgehend entfernt wurde, wurde das Gewicht der Gelstücke ermittelt und diese anschließend mit Hilfe des Gelextraktionskits (Qiagen) weiter aufgearbeitet. Die DNA stand letztendlich in einem Volumen von 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8) zur Verfügung und wurde anschließend durch saure Ethanolfällung aufkonzentriert.

2.2.10 Saure Ethanolfällung

Um DNA oder RNA in wässrigen Lösungen zu konzentrieren wurde die Methode der sauren Ethanolfällung angewendet. Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat und dem 2,5 fachen Volumen Ethanol versetzt. Um das Präzipitat sichtbar zu machen wurden dem Ansatz optional 1 µl Glykogen (20 mg/ml, Roche) beigefügt. Nach dem Mischen wurde der Ansatz für 25 min bei 13200 Upm und 4°C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 70% Ethanol gewaschen, in einer

SpeedVac getrocknet und anschließend in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer oder H₂O resuspendiert.

2.3 Arbeiten mit RNA

2.3.1 Herstellung von mRNA für die Mikroinjektion

Die Herstellung der mRNA für die Mikroinjektion in *Xenopus* Oozyten und Embryonen erfolgte mit Hilfe des mMessage Maschine-Kit der Firma Ambion. Für diese *in vitro* Reaktion muss die DNA linearisiert vorliegen. Die Plasmide wurden daher mit dem entsprechenden Restriktionsenzym linearisiert und erhaltene 3'Überhänge gegebenenfalls mit T4-Polymerase aufgefüllt. Vor der Transkriptionsreaktion wurde die DNA mit dem PCR-Purification Kit der Firma Qiagen gereinigt und nach dem Prinzip der sauren Ethanolfällung konzentriert. Ein 20 µl Ansatz für die mRNA-Synthese setzte sich aus 2 µl 10 x Reaktionspuffer, 10 µl 2 x Ribonukleotidmix, 1 µg linearisierter DNA, 2 µl 10 x SP6- oder T7-Polymerase und einem entsprechenden Auffüllvolumen H₂O zusammen. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37°C. Im Anschluss an die RNA-Synthese erfolgte der Abbau der Plasmid-DNA durch Zugabe von 2 µl Dnase I (2U/µl) und einer weiteren Inkubation bei 37°C für 30 min. Vor der photometrischen Bestimmung wurde die mRNA mit Hilfe des RNeasy-Kits der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers gereinigt. Die mRNA Ausbeuten lagen in der Regel zwischen 10 und 15 µg. Die Lagerung der mRNA erfolgte bei -80°C.

2.3.2 RNA-Isolation aus *Xenopus* Embryonen

Zur RNA-Isolation aus *Xenopus* Embryonen wurden diese in Aliquots zu je fünf Embryonen gesammelt. Der überschüssige Puffer wurde weitestgehend abgenommen, die Embryonen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Embryonen in 400 µl frisch angesetztem 1x Extraktionspuffer (20 mM EDTA; 200 mM Tris-HCl; 600 mM NaCl, 4% SDS; pH 7,5) mit Proteinase K (20 mg/ml, Fermentas) homogenisiert und für eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Isolierung der Nukleinsäuren nach der Phenol/Chloroform Methode (1 x Phenol, 2 x Phenol/Chloroform, 2 x Chloroform). Optional wurde der wässrige Überstand mit 7,5 M LiCl gefällt. Es folgte eine saure Ethanolfällung für alle Proben. Das Sediment wurde einmal mit 70% Ethanol

gewaschen und dann in einem Volumen von 40 μl H_2O aufgenommen. Zur Kontrolle wurden 5 μl der RNA-Lösung mit Formamid-haltigem Auftragspuffer (Ambion) gemischt und in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt.

2.4 Arbeiten mit Bakterien

2.4.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die verschiedenen Plasmide wurden in dem Bakterienstamm *E. coli* XL-1 Blue unter Selektionsbedingungen amplifiziert. Hierbei wurde Ampicillin in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$, Tetrazyklin und Kanamycin in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ dem LB-Medium (1% Bacto Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 17,1 mM NaCl; pH 7,5) oder Agar (LB-Medium inkl. 1,5% AgarAgar) beigefügt.

Die Minipräparation aus 1,5 ml Kulturmedium wurde unter Verwendung des TELT-Protokolls (Wilmzig, 1985) durchgeführt. 1,5 ml Bakteriensuspension wurden bei 6000 Upm abzentrifugiert und das entstandene Zellsediment in 150 μl TELT-Lösung (50 mM Tris-HCl ; 62,5 mM EDTA ; 2,5 M LiCl ; 0,4% Triton X-100 (w/v); pH 7,5) resuspendiert und mit 15 μl Lysozym (10 mg/ml, Sigma) versetzt. Nach einer Inkubation von fünf Minuten bei RT wurde die Probe drei Minuten im Wasserbad gekocht und anschließend fünf Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei 13400 Upm. Nach Entfernung des entstandenen Sediments wurden 100 μl Isopropanol zum Überstand gegeben. Der Ansatz wurde gemischt und für 15 min bei 13400 Upm zentrifugiert. Das Präzipitat wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend zwei bis fünf Minuten im Vakuum (SpeedVac, Eppendorf) getrocknet. Abschließend wurden die Plasmide in 50 μl TE-Puffer oder H_2O gelöst. Für den nachfolgenden Testverdau waren 5 μl der Plasmid-Lösung ausreichend.

Die Plasmidpräparation im mittleren Maßstab erfolgte mit Hilfe des Qiafilter-Plasmid-Midi-Kits der Firma Qiagen. Mit 1 ml aus einer Minikultur wurden 50 ml selektives LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200U/min auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die 50 ml Kulturen abzentrifugiert und die Plasmide nach Anleitung des Herstellers isoliert. Das erhaltene Sediment wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend in 100 μl TE-Puffer resuspendiert. Die Konzentration der Plasmidlösung wurde

photometrisch bestimmt. Die Ausbeute der Plasmidpräparation lag hierbei bei zwischen 50 und 150 µg.

2.4.2 Transformation

Durch die Technik der Transformation wurden Plasmide, in die die entsprechenden cDNAs einkloniert waren, auf den superkompetenten Bakterienstamm *E. coli* XL-1 Blue übertragen. Die Transformation der Plasmide erfolgte durch Elektroporation. Hierzu wurde ein 50 µl Ansatz elektrokompetenter Zellen mit 1 µl Plasmidlösung (1 ng-1 µg/µl) vermischt und in eine Elektroporationsküvette überführt. In allen Experimenten wurde eine 2 mm Küvette verwendet und eine Spannung von 1,8 kV gewählt. Sofort nach der Elektroporation wurde 500 µl vorgewärmtes SOC-Medium (2% Bacto Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glucose; pH 7) auf die Zellen gegeben und diese zur Regenerierung für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Volumina der Bakteriensuspension mit Hilfe von sterilen Glaskügelchen auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausplattiert.

2.5 Arbeiten mit Proteinen

2.5.1 Proteinisolation aus *Xenopus* Embryonen

Die Proteinisolation aus *Xenopus* Embryonen erfolgte nach der Methode von Stick und Hausen (Stick und Hausen, 1985). 1-3 *Xenopus* Embryonen des gleichen Stadiums wurden in 10 µl Isolationspuffer (5 mM Tris-HCl; 2 mM MgCl₂; 0,5 mM Spermine; 0,25 M Saccharose; 0,5% Triton X-100 (w/v); 0,1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid); pH 8) homogenisiert. Das Homogenat wurde auf 10 µl 60% Percoll in Isolationspuffer geschichtet. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 10 min bei 3000 g und 4°C. Die Interphase wurde in einem Volumen von 15 µl abgenommen und zur Degradierung der Nukleinsäuren mit 0,2 µl Benzonase (250U/µl, Merck) versetzt. Die Inkubation mit der Benzonase erfolgte für zehn Minuten bei RT. Anschließend wurde die Probe mit 7,5 µl 2x Sol E (100 mM Tris-HCl; 0,8 mM EDTA; 6% SDS (w/v); 0,2 M DTT; 35% Glycerin (w/v); pH 6,8; mit Bromphenolblau) versetzt und zur Denaturierung der Proteine für fünf Minuten auf 99°C erhitzt. Direkt vor dem Gelauftrag wurde die Probe nochmals mit 1 µl 1M DTT (Dithiotreitol) versetzt.

2.5.2 Proteinisolation aus verschiedenen Geweben

Das Gewicht der Gewebestücke wurde ermittelt. Das Gewebe wurde im halbgefrorenen Zustand mit einer kleinen Schere homogenisiert. Das Homogenat wurde in 2 x Sol E aufgenommen (150 µl/100 mg) und zur Degradierung der Nukleinsäuren mit 3 µl Benzonase (250U/µl, Merck) versetzt. Die Inkubation erfolgte für zehn Minuten bei RT. Etwa 10 mg Gewebe wurden für die gelelektrophoretische Auftrennung pro Spur eingesetzt.

2.5.3 SDS-Polyacrylamidgele und Westernblot

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung von Proteinen basierte auf der Methode von Laemmli (1970). Sie beruht auf einem diskontinuierlichen Gelelektrophorese-System, bestehend aus Sammelgel und Trenngel, unter denaturierenden Bedingungen. Durch die Verwendung von SDS als Detergenz werden die Proteine in ihre einzelnen Polypeptidketten zerlegt und es wird eine Auftrennung der einzelnen Polypeptide nach ihrem Molekulargewicht ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich 10%ige Polyacrylamidgele eingesetzt. Folgende Gellösungen wurden verwendet:

Trenngel (10%):	3,3 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid-Lösung (Roth); 2,5 ml Sol B (1,5 M Tris-HCl; 3 mM EDTA; pH 8,8); 50 µl 20 % SDS; 40 µl Thiodiethylenglykol (25%); ad 10 ml H ₂ O
Sammelgel (4,5%):	2 ml 30% Acrylamid-0,8% Bisacrylamid-Lösung; 2,5 ml Sol D (0,5 M Tris-HCl; 4 mM EDTA; pH 6,8); 50 µl 20 % SDS; 40 µl Thiodiglykol (25%); ad 10 ml H ₂ O
10 x Laufpuffer:	192 mM Glycin; 25 mM Tris Base; 0,1% SDS (w/v)

Die Gele wurden in Mehrfachgießständen gegossen. Die Glasscheiben (8x10 cm) wurden vor dem Einsatz gründlich mit 70% Ethanol gereinigt. Je zwei Glasscheiben wurden durch 1 mm Abstandshalter („Spacer“) getrennt, und diese vertikal in einem Mehrfachgießstand aufgereiht. Um die Polymerisierung zu starten wurden die Gellösungen mit 50 µl APS (Ammoniumpersulfat; 10% in H₂O) und 25 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) versetzt. Das Trenngel wurde 6 cm hoch gegossen und anschließend mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade, luftblasenfreie Oberfläche zu erhalten. Nach der Polymerisierung wurde das

Isopropanol mit Wasser abgespült und das überschüssige Wasser mit einem Filterpapier abgenommen. Das Trenngel wurde daraufhin mit dem Sammelgel überschichtet und die Kämme luftblasenfrei eingesteckt. Nach der Polymerisierung wurde der Gießstand auseinander gebaut, die einzelnen Gele entnommen und von äußeren Gelresten befreit. Die Gele wurden entweder sofort verwendet oder in feuchte Tücher gewickelt für maximal zwei Wochen bei 4°C gelagert.

Die Proteinproben wurden vor dem Gelauftrag mit 1x oder 2 x Sol E als Probenpuffer vermischt. Es erfolgte ein Denaturierungsschritt von fünf Minuten bei 99°C. Die Auftrennung der Proteine im Sammelgel erfolgte unter einem konstanten Strom von 18 mA. Nach dem Einlauf der Proben ins Trenngel wurde die Stromstärke auf 25 mA erhöht.

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch ElektrobloTTing mit Hilfe einer ElektrobloTT-Apparatur (Biorad) auf eine PVDF-Membran (0,45 µm Porengröße, Millipore) transferiert. Die Membran wurde vor der Verwendung 30 sec in Methanol getränkt und anschließend in Transferpuffer (1 x Borat-Puffer; 20 mM Borat; 1 mM EDTA; pH 8,8, mit fester NaOH eingestellt) äquiliibriert. Aus der Membran (6x9 cm), dem Trenngel (6x9 cm) und sechs mit Transferpuffer getränkten Filterpapieren (6x9 cm) wurden in einer mit Transferpuffer-gefüllten Schale ein Sandwich hergestellt. Hierzu wurde zuerst die Membran luftblasenfrei auf das Trenngel gelegt und mit drei feuchten Filterpapieren überschichtet. Auf die noch freie Seite des Gels wurden ebenfalls drei befeuchtete Filterpapiere gelegt. Das Sandwich wurde vertikal in die BloTT-Apparatur zwischen zwei mit 1x Borat-Puffer getränkten Schaumstofftüchern eingespannt. Der Strom wurde so angelegt, dass die Membran sich auf der Seite der Anode befand. Zuerst wurde für jeweils 20 min ein Strom von 200 mA, 300 mA und 400 mA angelegt und später für eine Stunde ein Strom von 500 mA.

Die Membran wurde für eine Minute reversibel mit einer Coomassie-Lösung (40% Ethanol; 5% Essigsäure; 0,2% Coomassie Brilliant Blue R 250) gefärbt. Anschließend wurde die Membran mit Entfärber-Lösung (40% Ethanol; 5% Essigsäure) gewaschen, bis das Bandenmuster deutlich zu erkennen war. Die Membran wurde für 15 min getrocknet. Zur weiteren Orientierung wurden die Markerbanden mit Kugelschreiber nachgezeichnet und die Membran gescannt. Vor

der Inkubation mit einem primären Antikörper wurde die Membran 30 sec in Methanol inkubiert und für 15 min getrocknet.

Nach dem Trocknen wurde die Membran in PBST äquilibriert. Der Antikörper wurde in PBST mit 0,1% Milchpulver verdünnt. Die Membran wurde mit 10 ml Antikörperlösung in Plastikfolie eingeschweißt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Schüttelinkubator. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für zehn Minuten mit PBST gewaschen und nachfolgend mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran wieder dreimal für zehn Minuten mit PBST gewaschen.

An den sekundären Antikörper ist das Reporterenzym Peroxidase gekoppelt, das das Chemilumineszenzsubstrat „Supersignal“ der Firma Pierce umsetzen kann. Das Substrat besteht aus zwei Lösungen, die im Verhältnis 1:1 gemischt wurden, wobei ein Endvolumen von 1,5 ml für eine Membran ausreichend war. Nach einer Inkubation von fünf Minuten bei RT, wurde die Membran in dünne Plastikfolie eingeschweißt. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte in einem Geldokumentationssystem der Firma Fuji (LAS3000). Die Bilder lagen elektronisch vor und wurden mit den Softwareprogrammen AIDA (Fuji) und Adobe Photoshop 7.0 bearbeitet.

2.6 Arbeiten mit *Xenopus*

2.6.1 Haltung und Manipulation von *Xenopus laevis* Oozyten

Für *in vitro* Eireifungsexperimente wurden adulte Weibchen, abhängig vom Körpergewicht, fünf bis sieben Tage vor der Oozytenentnahme mit 50-75 µl PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin, 1U/µl, Sigma) geprimt. Für die partielle Ovariectomie wurde das Weibchen in 0,2% MS222 betäubt. Das Ovarstück wurde nach der Entnahme in OR-2-Medium (82,5 mM NaCl; 2,5 M KCl; 1 mM MgCl₂; 1 mM Na₂HPO₄; 5 mM HEPES-NaOH; pH 7,8) überführt, manuell zerkleinert und anschließend zwei bis dreimal gewaschen. Zur Vereinzelnung wurden die Oozyten einem Collagenase-Verdau (0,2% Collagenase (Sigma) in OR-2-Medium) für drei bis fünf Stunden bei RT unterzogen. Durch den Collagenase-Verdau wurden ebenfalls die Follikelhäute der Oozyten entfernt und so die nachstehende Injektion erleichtert. Im Anschluss wurden die Oozyten mit 1 x MBS-Puffer (88 mM NaCl; 1 mM KCl; 1

mM MgSO₄; 5 mM HEPES-NaOH; 2,5 mM NaHCO₃; pH 7,4) gewaschen. Oozyten der Stadien V und VI wurden gesammelt und über Nacht bei 18 °C in MBS-Puffer inkubiert.

2.6.2 Mikroinjektion von *Xenopus* Oozyten

Für die Mikroinjektion wurden Oozyten der Stadien V und VI (Dumont, 1972) verwendet. Die Injektion erfolgte mit Hilfe eines Nano Jet-Injektionsgeräts (Drummond) und selbst gezogenen Injektionsnadeln. Pro Oozyte wurden 32 nl der jeweiligen mRNA mit einer Konzentration von 100 ng/µl injiziert. Um die Translation der injizierten mRNA zu gewährleisten wurden die Oozyten in 1 x MBS-Puffer bei 18 °C inkubiert.

2.6.3 Trennung von Kern und Cytoplasma und Aufarbeitung der Proben

Die Isolierung der Kerne aus Oozyten erfolgte 24 bzw. 48 h nach der Injektion manuell unter dem Stereomikroskop in 5:1 Puffer (83 mM KCl; 17 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; pH 7,2). Nach der Isolierung wurden die Kerne in 100% Ethanol transferiert. Hier wurden sie solange in Bewegung gehalten, bis ihre Fixierung durch eine weiße Färbung sichtbar wurde. Anschließend wurden sie in Reaktionsgefäße überführt und das restliche Ethanol abgezogen. Die Kerne wurden für fünf Minuten im Vakuum getrocknet, anschließend in 5 µl Auftragspuffer (1xSol E) aufgenommen, für fünf Minuten bei 99 °C erhitzt und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die dazugehörigen Cytoplasmen wurden, wenn sie benötigt wurden, ebenfalls aufgearbeitet. Die Cytoplasmen wurden in 10 µl MEB-Puffer (10 mM HEPES-KOH; 50 mM KCl; 20 mM β-Glycerolphosphat; 2 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 1 mM EGTA; 1 mM ATP; pH 7) mit 1% Triton X-100 homogenisiert und anschließend für drei Minuten bei 8000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 5 µl Auftragspuffer (2xSol E) versetzt, für fünf Minuten bei 99 °C erhitzt und durch SDS-PAGE aufgetrennt.

2.6.4 Hochsalzextraktion von Oozytenkernen

Es wurden 20 manuell isolierte Oozytenkerne für die Hochsalzextraktion eingesetzt. Die Kerne wurden in 100 µl Hochsalzpuffer (MEB-Puffer mit 2M NaCl; 0,1% Triton X-100) aufgenommen und für 8 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die extrahierten Kerne für 15 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand des Sediments wurde abgenommen. Das Sediment wurde kurz an der Luft getrocknet, in

15 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, 5 min auf 99°C erhitzt und durch SDS-PAGE aufgetrennt.

Der Überstand wurde einer Proteinfällung nach Wessel und Flugge (1984) unterzogen. Hierzu wurde der Überstand mit 4 Volumen MeOH, 1 Volumen Chloroform und 3 Volumen H₂O vermischt und für 5 min bei 10000 Upm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen. Das restliche Volumen wurde mit 3 Volumen MeOH vermischt. Im Anschluss wurde das Protein im Überstand für 2 min bei 8000 Upm sedimentiert. Die erhaltenen Sedimente wurden wieder kurz an der Luft getrocknet, in 15 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, 5 min auf 99°C erhitzt und durch SDS-PAGE aufgetrennt.

2.6.5 Eireifung mit Progesteron

Die Eireifung von Oozyten der Stadien V und VI kann *in vitro* durch die Zugabe des Hormons Progesteron induziert werden. Hierzu wurden die Oozyten mit 5 µM Progesteron (Sigma) in 1 x MBS bei RT inkubiert. Die Eireifung erfolgte in der Regel nach sechs bis acht Stunden. Gereifte Eier konnten durch den hellen Reifungsfleck am animalen Pol identifiziert werden. Zur weiteren Kontrolle der Eireifung wurden einige Eier und Oozyten zehn Minuten in 100% Ethanol fixiert und anschließend aufgebrochen. Gereifte Eier weisen nach dem Zusammenbruch der Kernhülle, im Gegensatz zu Oozyten, keinen Kern mehr auf. Die gereiften Eier wurden gesammelt, in Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

2.6.6 Saccharosegradientenzentrifugation von *Xenopus* Eihomogenaten

Für die Ultrazentrifugationsversuche wurden die gereiften Eier in Aliquots zu je 50 Embryonen gesammelt. Die gereiften Eier wurden mit einer Pipette homogenisiert und anschließend für zehn Minuten bei 10000 Upm und 4°C zentrifugiert. Die Interphase wurde abgenommen und für drei Minuten bei 8000 Upm und 4°C zentrifugiert. Die Interphase wurde erneut abgenommen und ihr Volumen bestimmt. Sie wurde mit Hilfe einer 2,3 M MEB-Saccharosestammlösung auf eine Saccharosekonzentration von 1,3 M eingestellt und in ein Zentrifugenröhrchen für TLS-55 Rotoren (Beckman) überführt. Über der Probe wurde ein Stufengradient angelegt. Die Probe wurde nacheinander mit je 300 µl 1,1 M, 0,9 M und 0,7 M Saccharose in MEB überschichtet. Die Ultrazentrifugation erfolgte für zwei Stunden bei 48000 Upm und 4°C in der Ultrazentrifuge TL-100 (Beckman). Nach der

Zentrifugation wurde der Gradient von oben beginnend in 75 µl Aliquots abgenommen und fraktioniert. Zur Kontrolle wurden 20 µl aus jeder Fraktion abgenommen, mit 60 µl H₂O gemischt und im Refraktometer die Saccharosekonzentration bestimmt. Die restlichen 55 µl jeder Fraktion wurden mit 22 µl Auftragspuffer (2 x Sol E) versetzt. Jeweils 18 µl davon wurden in die gelelektrophoretische Analyse eingesetzt.

2.6.7 Haltung und Manipulation von *Xenopus laevis* Embryonen

Die *Xenopus* Weibchen wurden zur Stimulation der Oogenese eine Woche vor der Eiablage abhängig vom Körpergewicht mit 50-75 U hcG (humanes Choriongonadotropin, 1U/µl Sigma) geprimt. Etwa zehn Stunden vor der Ablage wurden sie erneut mit 400-750 U hcG geprimt. Die Injektion des Hormons erfolgte in den dorsalen Lymphsack. Zur Spermengewinnung wurde ein männlicher Frosch dekapitiert, die Hoden manuell isoliert und in 1 x MBS überführt. Ein Stück Hoden wurde in 100 µl 1 x MBS mazeriert. Um die Salzstarre der Spermien aufzuheben wurden sie mit 900 µl Wasser versetzt (entspricht 0,1 x MBS) und anschließend für die *in vitro* Befruchtung auf die abgelegten Eier gegeben. Die Befruchtung konnte anhand der Rotationsbewegung kontrolliert werden. Die Gallerthülle der Embryonen wurde in 2% Cystein-NaOH (pH 7,9-8,0) aufgelöst. Die Embryonen wurden mit 0,1 x MBS gewaschen und in 0,1 x MBS mit 5% Ficoll inkubiert. Die Mikroinjektion erfolgte noch vor der ersten Teilung bzw. in eine Blastomere des Zweizellstadiums. Es wurden jeweils 8,2 nl mRNA mit einer Konzentration von 100 ng/µl pro Embryo injiziert. Die Injektion erfolgte mit einem Femtoject-Injektor der Firma Eppendorf. Die Bestimmung der embryonalen Stadien erfolgte nach Nieuwkoop und Faber (1967). Alle injizierten und nicht-injizierten Embryonen wurden bis zum Stadium 6,5 in 0,1 x MBS mit 5% Ficoll inkubiert. Dann wurden sie sorgfältig mit 0,1 x MBS gewaschen. In diesem Puffer wurden sie zur weiteren Entwicklung bei RT inkubiert. Zur Induktion der Apoptose zu Beginn der Gastrulation wurden einige Embryonen in Stadium 6,5 für 15 min mit 0,1 mg/ml Cycloheximid in 0,1 x MBS inkubiert und anschließend dreimal mit 0,1 x MBS gewaschen.

2.7 Histologische Methoden

2.7.1 Immunhistologie von Embryonen und Oozyten

Für die Anfertigung von Cryostatschnitten wurden die Embryonen und Oozyten ün in Dent's Fixativ (20% DMSO; 80% MeOH) fixiert. Daraufhin wurden sie in 15% Fischgelantine (16,6 ml 45% Fischgelantine; 7,5 g Saccharose; ad 50 ml mit ddH₂O) überführt und darin für 24 h bei RT auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend konnten sie bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4°C gelagert werden. Die einzelnen Embryonen und Oozyten wurden mit Hilfe von flüssigem Stickstoff in 15% Fischgelantine eingefroren. Mit einem Gefriermikrotom (Jung Frigocut 2800E) wurden Gewebeschnitte mit einer Dicke von 10 µm angefertigt. Die Schnitte wurden auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger transferiert und vor der weiteren Aufarbeitung für einige Tage getrocknet.

2.7.2 Immunfluoreszenzfärbung von Cryostatschnitten

Die Schnitte wurden für zwei Minuten bei -20°C in Aceton fixiert und anschließend getrocknet. Sie wurden kurz mit PBS gewaschen und in 5% Milchpulver in PBS für 30 min bei 37°C blockiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden monoklonalen Antikörper in einer mit PBS befeuchteten Kammer für zwei Stunden bei 37°C. Die Schnitte wurden dreimal für zehn Minuten mit 1% Milchpulver in PBS bei 37°C gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Fluorophor-gekoppelten Antikörper erfolgte für eine Stunde bei RT wieder in einer feuchten Kammer. Die Schnitte wurden bei RT zunächst zehn Minuten mit 1% Milchpulver in PBS und daraufhin zweimal für zehn Minuten mit PBS gewaschen. Um die DNA anzufärben, erfolgte eine zweiminütige Färbung mit 0,1 µg/ml DAPI (Diamidino-phenylindol, Sigma) in PBS. Nach der DNA-Färbung wurden die Schnitte noch zweimal für zehn Minuten in PBS gewaschen, getrocknet und anschließend in Fluoromount eingebettet.

Um dünnere Schnitte zu erhalten wurden einige Embryonen in Kunstharz eingebettet. Am Mikrotom konnten so Schnitte mit einer Dicke von 2 µm angefertigt werden. Hierfür wurden die Embryonen ün in 3,7% Formaldehyd in MEM-Puffer fixiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Embryonen in einer aufsteigenden EtOH-Reihe dehydriert. Die Einbettung in das Methacrylatharz Technovit 7100 (Kulzer) erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Durch die Einbettung in das

Methacrylatharz konnten zwar Schnitte mit einer Dicke von 2 μm angefertigt werden, aber eine Färbung mit Antikörpern war nicht mehr möglich. Um die DNA sichtbar zu machen wurden die angefertigten Schnitte mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI für zehn Minuten gefärbt. Im Anschluss wurden die Schnitte kurz in PBS gespült, getrocknet und in Fluoromount eingebettet.

2.7.3 Immunhistologie von Testisgewebe

Für die Entnahme von Testisgewebe wurden ausschließlich männliche adulte Tiere verwendet. Die frisch entnommenen Organe wurden vom Fettgewebe befreit und in Stickstoff-vorgekühltem 2-Methylbutanol schockgefroren. Das Gewebe wurde bis zur weiteren Aufarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Das noch gefrorene Gewebe wurde mit Hilfe von flüssigem Stickstoff in 15-25% Fischgelatine eingebettet. Mit einem Gefriermikrotom wurden Gewebeschnitte mit einer Dicke von 10 μm angefertigt. Die Schnitte wurden auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger transferiert und vor der weiteren Aufarbeitung für einige Tage getrocknet.

Die Fixierung der Proteine erfolgte für zehn Minuten bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Aceton. Nach dem Trocknen erfolgte die Fixierung der Nukleinsäuren für zehn Minuten mit 1% Formaldehyd in PBS. Es folgte ein kurzer Waschschrift mit PBS. Daraufhin wurde ein Blockierungsschritt in PBS mit 2% BSA (Rinderserumalbumin) für eine Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper in PBS für 15 min bei RT in einer feuchten Kammer. Danach wurde dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Fluorophor-gekoppelten Antikörper erfolgte ebenfalls in PBS für 15 min in einer feuchten Kammer bei RT. Anschließend wurde wieder dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Um die DNA sichtbar zu machen, erfolgte eine zweiminütige Färbung mit 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI in PBS. Die Gewebeschnitte wurden kurz mit PBS gespült, getrocknet und anschließend in Fluoromount eingebettet.

2.7.4 Mikroskopische Analyse

Die Analyse der Präparate erfolgte mit Hilfe eines Axioplan Fluoreszenzmikroskops der Firma Zeiss (Jena). Die Aufnahme der Bilder wurde mit der Digitalkamera AxioCam MRc5 und der daran angeschlossenen Software Axiovision 6.0 von Zeiss

durchgeführt. Zur Bearbeitung der Bilder wurden die Programme Adobe Photoshop 7.0 und Makromedia Freehand MX verwendet.

2.8 Zellkultur und Transfektion

2.8.1 Haltung der Zellen

Für Zellkulturexperimente wurden die folgenden eukaryotischen Zelllinien unter den angegebenen Bedingungen kultiviert. Alle für die Zellkultur verwendeten Medien und Zusätze wurden als sterile Lösungen von der Firma PAA bezogen.

COS-7-Zellen: 90% DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
10% FCS (fötales Kälberserum)
(Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂)

Hela-Zellen: 90% DMEM
10% FCS
(Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂)

A6-Zellen: 78,3% DMEM
8,7% FCS
13% Wasser
(Inkubation bei 27 °C und 5% CO₂)

Als antibiotische Zusätze enthielten die angegebenen Medien 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin und 2,5 µg/ml Amphotericin B.

2.8.2 Transfektion

Für die Transfektion wurden die verschiedenen Zelllinien auf sterilen Glasplättchen in 6-Well-Platten (Nunc) bis zu einer Dichte von 40-50% kultiviert. Die Transfektion erfolgte mit dem Reagenz FuGene6 (Roche) nach Anleitung des Herstellers. 3 µl FuGene und 1 µg gereinigte Plasmid-DNA waren für die Transfektion der Zellen in einem 3,2 mm Well einer 6-Well-Platte ausreichend. Nach der Transfektion wurden die Zellen wie gewohnt weiter inkubiert. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte in der Regel 24 h nach der Transfektion.

2.8.3 Analyse von Kulturzellen

Um ein objektives Maß der Kerndeformation Lamin-B3 transfizierter Zellen zu erhalten wurde eine statistische Berechnung an verschiedenen Lamin-transfizierten und nicht-transfizierten Zellen durchgeführt. Die Deformation der Kerne wurde anhand der folgenden Formel berechnet: $4\pi \times \text{Fläche}/\text{Umfang}^2$. Bei Umfang und Fläche eines Kreises ergibt sich hierbei der Wert 1. Je höher der Grad der Verformung des Zellkerns ist, desto mehr geht der Wert gegen 0. Fläche und Umfang der Zellkerne wurden manuell mit Hilfe der Software Axiovision 6.0 und einer elektronischen Maus ermittelt.

2.8.4 Immunfluoreszenz von Kulturzellen

Um Reste des Kulturmediums zu entfernen wurden die bewachsenen Glasplättchen vor der Fixierung zweimal kurz mit PBS gewaschen. Die Doppelfixierung wurde für 20 min mit 3,7-% Formaldehyd in PBS und daraufhin für 10 min mit 3,7% Formaldehyd in PBS mit 5% Triton bei RT durchgeführt. Nach einem dreimaligen Waschschrift für fünf Minuten mit PBS erfolgte die Absättigung des Fixativs mit 50 mM Ammoniumchlorid in PBS ebenfalls für dreimal fünf Minuten. Anschließend wurden die Zellen dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Die Antikörperinkubation erfolgte in einer feuchten Kammer. Hierzu diente ein umgestülptes Plastikgefäß, das mit PBS getränkten Tüchern ausgelegt war. Die Inkubation mit dem ersten monoklonalen Antikörper erfolgte bei entsprechender Verdünnung für 30 min bei RT. Nach einem dreimaligen Waschschrift für fünf Minuten mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Cy-3 gekoppelten Antikörper für 15 min bei RT. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift mit PBS. Die spezifische Färbung der DNA erfolgte mit 0,1 µg/ml DAPI in PBS für eine Minute. Die Glasplättchen wurden noch einmal kurz gewaschen, getrocknet und dann auf einem Objektträger in einen Tropfen Fluoromount eingebettet. Jetzt standen sie für die mikroskopische Analyse zur Verfügung oder konnten bei -20°C gelagert werden.

E Zusammenfassung

Das keimbahnspezifische Protein Lamin B3 ist ein alternatives Spleißprodukt des *LMNB2* Gens. Dieses Protein konnte bisher nur in der Spezies Maus nachgewiesen werden (Furukawa und Hotta, 1993). Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe von Gen- und EST-Datenbanken nach Lamin B3 Sequenzmotiven in weiteren Spezies gesucht. Durch das Vorhandensein der entsprechenden EST-Klone konnte das Lamin B3 in den Spezies Ratte und Mensch nachgewiesen werden. Datenbankanalysen ergaben für zwei Fischarten (*Takifugu rubripes* und *Tetraodon nigroviridis*), dass für Lamin B3 eine entsprechende Situation, wie sie für das Maus *LMNB2* Gen gezeigt wurde, in diesen Arten nicht vorliegt. Durch zusätzliche experimentelle Untersuchungen konnte für *Xenopus* belegt werden, dass in dieser Art ein Lamin B3 in der Entwicklung männlicher Keimzellen nicht auftritt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei dem Lamin B3 um eine Neuentwicklung der Säugetiere handelt.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der Lamina in der Spermatogenese von *Xenopus* anders ist als die der Nagetiere. Bisher wurde Lamin B1, neben den keimbahnspezifischen Laminen B3 und C2, als einziges somatisches Lamin in der Spermatogenese der Nagetiere beschrieben (Vester *et al.*, 1993; Schutz *et al.*, 2005b). In dieser Arbeit konnte das somatische Lamin B2 in Spermatogonien und Spermatozyten I. und II. Ordnung in der Spermatogenese von *Xenopus* nachgewiesen werden.

Ein humaner Lamin B3 EST-Klon wurde in dieser Arbeit in verschiedenen Versuchsansätzen charakterisiert. Die Analysen des Lamins B3 in Oozyten ergaben, dass sich das humane Lamin B3, trotz der verkürzten Roddomäne, *in vivo* wie ein typisches Lamin verhält.

Die Expression von Lamin B3 in *Xenopus* Embryonen hingegen induziert den synchronen Zelltod der Embryonen zu Beginn der Gastrulation. Es konnte gezeigt werden, dass der Tod der Embryonen durch Apoptose ausgelöst wird.

Ektopische Expression des Lamins B3 in verschiedenen somatischen Kulturzellen führt zur Verformung der Zellkerne. Die Zellkerne sind stark vergrößert und zeigen zahlreiche Lobulierungen und Einstülpungen. Diese Effekte wurden quantifiziert. Die Verformung somatischer Zellkerne wurde bereits mit murinen Lamin B3 und einer Lamin B1-Mutante, der 4/5 der Rod-Domäne fehlen, gezeigt und ist auf die verkürzte Roddomäne zurückzuführen (Schutz *et al.*, 2005a; Schirmer *et al.*, 2001).

F Literaturverzeichnis

Aebi, U., J. Cohn, L. Buhle, and L. Gerace. 1986. The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature*. 323:560-4.

Aebi, U., Häner, M., Troncoso, T., Eichner, J. and Engel, A. 1988. Unifying principles in intermediate filament (IF) structure and assembly. *Protoplasma*. 145:73-81.

Alzheimer, M., and R. Benavente. 1996. Change of karyoskeleton during mammalian spermatogenesis: expression pattern of nuclear lamin C2 and its regulation. *Exp Cell Res*. 228:181-8.

Alzheimer, M., E. Fecher, and R. Benavente. 1998. Nuclear envelope remodelling during rat spermiogenesis: distribution and expression pattern of LAP2/thymopoietins. *J Cell Sci*. 111 (Pt 15):2227-34.

Alzheimer, M., E. von Glasenapp, R. Hock, and R. Benavente. 1999. Architecture of the nuclear periphery of rat pachytene spermatocytes: distribution of nuclear envelope proteins in relation to synaptonemal complex attachment sites. *Mol Biol Cell*. 10:1235-45.

Alzheimer, M., E. von Glasenapp, M. Scholzer, H. Heid, and R. Benavente. 2000. Meiotic lamin C2: the unique amino-terminal hexapeptide GNAEGR is essential for nuclear envelope association. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:13120-5.

Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 215:403-10.

Baulieu, E.E., F. Godeau, M. Schorderet, and S. Schorderet-Slatkine. 1978. Steroid-induced meiotic division in *Xenopus laevis* oocytes: surface and calcium. *Nature*. 275:593-8.

Benavente, R., G. Krohne, and W.W. Franke. 1985. Cell type-specific expression of nuclear lamina proteins during development of *Xenopus laevis*. *Cell*. 41:177-90.

Bergo, M.O., B. Gavino, J. Ross, W.K. Schmidt, C. Hong, L.V. Kendall, A. Mohr, M. Meta, H. Genant, Y. Jiang, E.R. Wisner, N. Van Bruggen, R.A. Carano, S. Michaelis, S.M. Griffey, and S.G. Young. 2002. *Zmpste24* deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:13049-54.

Berruti, G. 1998. Signaling events during male germ cell differentiation: bases and perspectives. *Front Biosci*. 3:D1097-108.

Bione, S., E. Maestrini, S. Rivella, M. Mancini, S. Regis, G. Romeo, and D. Toniolo. 1994. Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet*. 8:323-7.

- Bisbee, C.A., M.A. Baker, A.C. Wilson, I. Haji-Azimi, and M. Fischberg.** 1977. Albumin phylogeny for clawed frogs (*Xenopus*). *Science*. 195:785-7.
- Bohnsack, M.T., T. Stuken, C. Kuhn, V.C. Cordes, and D. Gorlich.** 2006. A selective block of nuclear actin export stabilizes the giant nuclei of *Xenopus* oocytes. *Nat Cell Biol*. 8:257-63.
- Burglin, T., Robertis, E.** 1987. The nuclear migration signal of *Xenopus laevis* nucleoplasmin. *EMBO J*. 6:2617-25.
- Burke, B., and C.L. Stewart.** 2002. Life at the edge: the nuclear envelope and human disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:575-85.
- Cohen, M., K.K. Lee, K.L. Wilson, and Y. Gruenbaum.** 2001. Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional evolution of the nuclear lamina. *Trends Biochem Sci*. 26:41-7.
- Crisp, M., Q. Liu, K. Roux, J.B. Rattner, C. Shanahan, B. Burke, P.D. Stahl, and D. Hodzic.** 2006. Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol*. 172:41-53.
- Dadoune, J.P.** 2003. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc Res Tech*. 61:56-75.
- Ding, D.Q., A. Yamamoto, T. Haraguchi, and Y. Hiraoka.** 2004. Dynamics of homologous chromosome pairing during meiotic prophase in fission yeast. *Dev Cell*. 6:329-41.
- Ding, D.Q., and Y. Hiraoka.** 2005. [Dynamics of homologous chromosome pairing as observed in living cells of fission yeast]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 50:131-5.
- Doring, V., and R. Stick.** 1990. Gene structure of nuclear lamin LIII of *Xenopus laevis*; a model for the evolution of IF proteins from a lamin-like ancestor. *Embo J*. 9:4073-81.
- Dreuillet, C., J. Tillit, M. Kress, and M. Ernoult-Lange.** 2002. In vivo and in vitro interaction between human transcription factor MOK2 and nuclear lamin A/C. *Nucleic Acids Res*. 30:4634-42.
- Dreyer, C., Y.H. Wang, and P. Hausen.** 1985. Immunological relationship between oocyte nuclear proteins of *Xenopus laevis* and *X. borealis*. *Dev Biol*. 108:210-9.
- Dumont, J.N.** 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol*. 136:153-79.
- Ellis, D.J., H. Jenkins, W.G. Whitfield, and C.J. Hutchison.** 1997. GST-lamin fusion proteins act as dominant negative mutants in *Xenopus* egg extract and reveal the function of the lamina in DNA replication. *J Cell Sci*. 110 (Pt 20):2507-18.

- Firnbach-Kraft, I., and R. Stick.** 1995. Analysis of nuclear lamin isoprenylation in *Xenopus* oocytes: isoprenylation of lamin B3 precedes its uptake into the nucleus. *J Cell Biol.* 129:17-24.
- Fuchs, E., and K. Weber.** 1994. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem.* 63:345-82.
- Furukawa, K., and Y. Hotta.** 1993. cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *Embo J.* 12:97-106.
- Geisler, N., E. Kaufmann, S. Fischer, U. Plessmann, and K. Weber.** 1983. Neurofilament architecture combines structural principles of intermediate filaments with carboxy-terminal extensions increasing in size between triplet proteins. *Embo J.* 2:1295-302.
- Georgatos, S.D., J. Meier, and G. Simos.** 1994. Lamins and lamin-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 6:347-53.
- Gerace, L., and B. Burke.** 1988. Functional organization of the nuclear envelope. *Annu Rev Cell Biol.* 4:335-74.
- Goldman, R.D., Y. Gruenbaum, R.D. Moir, D.K. Shumaker, and T.P. Spann.** 2002. Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev.* 16:533-47.
- Goldman, R.D., D.K. Shumaker, M.R. Erdos, M. Eriksson, A.E. Goldman, L.B. Gordon, Y. Gruenbaum, S. Khuon, M. Mendez, R. Varga, and F.S. Collins.** 2004. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:8963-8.
- Gruenbaum, Y., K.L. Wilson, A. Harel, M. Goldberg, and M. Cohen.** 2000. Review: nuclear lamins--structural proteins with fundamental functions. *J Struct Biol.* 129:313-23.
- Gruenbaum, Y., R.D. Goldman, R. Meyuhas, E. Mills, A. Margalit, A. Fridkin, Y. Dayani, M. Prokocimer, and A. Enosh.** 2003. The nuclear lamina and its functions in the nucleus. *Int Rev Cytol.* 226:1-62.
- Handler, J.S., A.S. Preston, F.M. Perkins, M. Matsumura, J.P. Johnson, and C.O. Watlington.** 1981. The effect of adrenal steroid hormones on epithelia formed in culture by A6 cells. *Ann N Y Acad Sci.* 372:442-54.
- Heitlinger, E., M. Peter, M. Haner, A. Lustig, U. Aebi, and E.A. Nigg.** 1991. Expression of chicken lamin B2 in *Escherichia coli*: characterization of its structure, assembly, and molecular interactions. *J Cell Biol.* 113:485-95.
- Hensey, C., and J. Gautier.** 1997. A developmental timer that regulates apoptosis at the onset of gastrulation. *Mech Dev.* 69:183-95.
- Hensey, C., and J. Gautier.** 1998. Programmed cell death during *Xenopus* development: a spatio-temporal analysis. *Dev Biol.* 203:36-48.

Herrmann, H., S.V. Strelkov, B. Feja, K.R. Rogers, M. Brettel, A. Lustig, M. Haner, D.A. Parry, P.M. Steinert, P. Burkhard, and U. Aebi. 2000. The intermediate filament protein consensus motif of helix 2B: its atomic structure and contribution to assembly. *J Mol Biol.* 298:817-32.

Herrmann, H., and R. Foisner. 2003. Intermediate filaments: novel assembly models and exciting new functions for nuclear lamins. *Cell Mol Life Sci.* 60:1607-12.

Hetts, S.W. 1998. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *Jama.* 279:300-7.

Hofemeister, H., K. Weber, and R. Stick. 2000. Association of prenylated proteins with the plasma membrane and the inner nuclear membrane is mediated by the same membrane-targeting motifs. *Mol Biol Cell.* 11:3233-46.

Holtz, D., R.A. Tanaka, J. Hartwig, and F. McKeon. 1989. The CaaX motif of lamin A functions in conjunction with the nuclear localization signal to target assembly to the nuclear envelope. *Cell.* 59:969-77.

Howe, J.A., M. Howell, T. Hunt, and J.W. Newport. 1995. Identification of a developmental timer regulating the stability of embryonic cyclin A and a new somatic A-type cyclin at gastrulation. *Genes Dev.* 9:1164-76.

Howe, J.A., and J.W. Newport. 1996. A developmental timer regulates degradation of cyclin E1 at the midblastula transition during *Xenopus* embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:2060-4.

Hutchison, C.J. 2002. Lamins: building blocks or regulators of gene expression? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:848-58.

Jacobson, M.D., M. Weil, and M.C. Raff. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell.* 88:347-54.

Kido, T., and Y.F. Lau. 2005. A Cre gene directed by a human TSPY promoter is specific for germ cells and neurons. *Genesis.* 42:263-75.

Kleinig, H., Maier, U. 1999. *Zellbiologie.* Gustav Fischer Verlag.

Kneissel, S., W.W. Franke, J.G. Gall, H. Heid, S. Reidenbach, M. Schnolzer, H. Spring, H. Zentgraf, and M.S. Schmidt-Zachmann. 2001. A novel karyoskeletal protein: characterization of protein NO145, the major component of nucleolar cortical skeleton in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell.* 12:3904-18.

Krieg, P.A., and D.A. Melton. 1985. Developmental regulation of a gastrula-specific gene injected into fertilized *Xenopus* eggs. *Embo J.* 4:3463-71.

Krieg, P.A., and D.A. Melton. 1987. An enhancer responsible for activating transcription at the midblastula transition in *Xenopus* development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:2331-5.

Krohne, G., and R. Benavente. 1986. The nuclear lamins. A multigene family of proteins in evolution and differentiation. *Exp Cell Res.* 162:1-10.

Labow, M.A., and K.I. Berns. 1988. The adeno-associated virus rep gene inhibits replication of an adeno-associated virus/simian virus 40 hybrid genome in cos-7 cells. *J Virol.* 62:1705-12.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.

Lee, G., R. Hynes, and M. Kirschner. 1984. Temporal and spatial regulation of fibronectin in early *Xenopus* development. *Cell.* 36:729-40.

Lee, K.K., Y. Gruenbaum, P. Spann, J. Liu, and K.L. Wilson. 2000. *C. elegans* nuclear envelope proteins emerin, MAN1, lamin, and nucleoporins reveal unique timing of nuclear envelope breakdown during mitosis. *Mol Biol Cell.* 11:3089-99.

Lourim, D., A. Kempf, and G. Krohne. 1996. Characterization and quantitation of three B-type lamins in *Xenopus* oocytes and eggs: increase of lamin LI protein synthesis during meiotic maturation. *J Cell Sci.* 109 (Pt 7):1775-85.

Machiels, B.M., A.H. Zorenc, J.M. Endert, H.J. Kuijpers, G.J. van Eys, F.C. Ramaekers, and J.L. Broers. 1996. An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10. *J Biol Chem.* 271:9249-53.

Mattout-Drubezki, A., and Y. Gruenbaum. 2003. Dynamic interactions of nuclear lamina proteins with chromatin and transcriptional machinery. *Cell Mol Life Sci.* 60:2053-63.

McLay, D.W., and H.J. Clarke. 2003. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction.* 125:625-33.

Moir, R.D., M. Montag-Lowy, and R.D. Goldman. 1994. Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication. *J Cell Biol.* 125:1201-12.

Moir, R.D., T.P. Spann, and R.D. Goldman. 1995. The dynamic properties and possible functions of nuclear lamins. *Int Rev Cytol.* 162B:141-82.

Moir, R.D., T.P. Spann, H. Herrmann, and R.D. Goldman. 2000. Disruption of nuclear lamin organization blocks the elongation phase of DNA replication. *J Cell Biol.* 149:1179-92.

Mounkes, L., S. Kozlov, B. Burke, and C.L. Stewart. 2003a. The laminopathies: nuclear structure meets disease. *Curr Opin Genet Dev.* 13:223-30.

Mounkes, L.C., S. Kozlov, L. Hernandez, T. Sullivan, and C.L. Stewart. 2003b. A progeroid syndrome in mice is caused by defects in A-type lamins. *Nature.* 423:298-301.

- Mounkes, L.C., and C.L. Stewart.** 2004. Aging and nuclear organization: lamins and progeria. *Curr Opin Cell Biol.* 16:322-7.
- Muller, H., and K. Helin.** 2000. The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochim Biophys Acta.* 1470:M1-12.
- Newport, J., and M. Kirschner.** 1982a. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: II. Control of the onset of transcription. *Cell.* 30:687-96.
- Newport, J., and M. Kirschner.** 1982b. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell.* 30:675-86.
- Newport, J.W., K.L. Wilson, and W.G. Dunphy.** 1990. A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly. *J Cell Biol.* 111:2247-59.
- Nieuwkoop, P.D., Faber, J.** 1967. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Elsevier North Holland, Amsterdam.
- Nigg, E.A.** 1997. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature.* 386:779-87.
- Ostlund, C., G. Bonne, K. Schwartz, and H.J. Worman.** 2001. Properties of lamin A mutants found in Emery-Dreifuss muscular dystrophy, cardiomyopathy and Dunnigan-type partial lipodystrophy. *J Cell Sci.* 114:4435-45.
- Ozaki, T., M. Saijo, K. Murakami, H. Enomoto, Y. Taya, and S. Sakiyama.** 1994. Complex formation between lamin A and the retinoblastoma gene product: identification of the domain on lamin A required for its interaction. *Oncogene.* 9:2649-53.
- Padmakumar, V.C., T. Libotte, W. Lu, H. Zaim, S. Abraham, A.A. Noegel, J. Gotzmann, R. Foisner, and I. Karakesisoglou.** 2005. The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J Cell Sci.* 118:3419-30.
- Parry, D.A., and P.M. Steinert.** 1999. Intermediate filaments: molecular architecture, assembly, dynamics and polymorphism. *Q Rev Biophys.* 32:99-187.
- Prufert, K., M. Alsheimer, R. Benavente, and G. Krohne.** 2005. The myristoylation site of meiotic lamin C2 promotes local nuclear membrane growth and the formation of intranuclear membranes in somatic cultured cells. *Eur J Cell Biol.* 84:637-46.
- Ralle, T., C. Grund, W.W. Franke, and R. Stick.** 2004. Intranuclear membrane structure formations by CaaX-containing nuclear proteins. *J Cell Sci.* 117:6095-104.
- Rao, L., D. Perez, and E. White.** 1996. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol.* 135:1441-55.

- Ruchaud, S., N. Korfali, P. Villa, T.J. Kottke, C. Dingwall, S.H. Kaufmann, and W.C. Earnshaw.** 2002. Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. *Embo J.* 21:1967-77.
- Rupp, R.A., L. Snider, and H. Weintraub.** 1994. *Xenopus* embryos regulate the nuclear localization of XMyoD. *Genes Dev.* 8:1311-23.
- Rzepecki, R.** 2002. The nuclear lamins and the nuclear envelope. *Cell Mol Biol Lett.* 7:1019-35.
- Sambrook, J., and Russel, D. W.** 2001. *Molecular Cloning.* CSHL Press.
- Scaffidi, P., and T. Misteli.** 2006. Good news in the nuclear envelope: loss of lamin A might be a gain. *J Clin Invest.* 116:632-4.
- Schafer, W.R., and J. Rine.** 1992. Protein prenylation: genes, enzymes, targets, and functions. *Annu Rev Genet.* 26:209-37.
- Scherer, W.F., J.T. Syverton, and G.O. Gey.** 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med.* 97:695-710.
- Schirmer, E.C., T. Guan, and L. Gerace.** 2001. Involvement of the lamin rod domain in heterotypic lamin interactions important for nuclear organization. *J Cell Biol.* 153:479-89.
- Schirmer, E.C., L. Florens, T. Guan, J.R. Yates, 3rd, and L. Gerace.** 2003. Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics. *Science.* 301:1380-2.
- Schirmer, E.C., and L. Gerace.** 2005. The nuclear membrane proteome: extending the envelope. *Trends Biochem Sci.* 30:551-8.
- Schirmer, E.C., L. Florens, T. Guan, J.R. Yates, 3rd, and L. Gerace.** 2005. Identification of novel integral membrane proteins of the nuclear envelope with potential disease links using subtractive proteomics. *Novartis Found Symp.* 264:63-76; discussion 76-80, 227-30.
- Schutz, W., R. Benavente, and M. Alsheimer.** 2005a. Dynamic properties of germ line-specific lamin B3: the role of the shortened rod domain. *Eur J Cell Biol.* 84:649-62.
- Schutz, W., M. Alsheimer, R. Ollinger, and R. Benavente.** 2005b. Nuclear envelope remodeling during mouse spermiogenesis: postmeiotic expression and redistribution of germline lamin B3. *Exp Cell Res.* 307:285-91.
- Shumaker, D.K., K.K. Lee, Y.C. Tanhehco, R. Craigie, and K.L. Wilson.** 2001. LAP2 binds to BAF-DNA complexes: requirement for the LEM domain and modulation by variable regions. *Embo J.* 20:1754-64.

- Sible, J.C., J.A. Anderson, A.L. Lewellyn, and J.L. Maller.** 1997. Zygotic transcription is required to block a maternal program of apoptosis in *Xenopus* embryos. *Dev Biol.* 189:335-46.
- Somech, R., S. Shaklai, N. Amariglio, G. Rechavi, and A.J. Simon.** 2005. Nuclear envelopathies-raising the nuclear veil. *Pediatr Res.* 57:8R-15R.
- Spann, T.P., R.D. Moir, A.E. Goldman, R. Stick, and R.D. Goldman.** 1997. Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *J Cell Biol.* 136:1201-12.
- Spann, T.P., A.E. Goldman, C. Wang, S. Huang, and R.D. Goldman.** 2002. Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *J Cell Biol.* 156:603-8.
- Stack, J.H., and J.W. Newport.** 1997. Developmentally regulated activation of apoptosis early in *Xenopus* gastrulation results in cyclin A degradation during interphase of the cell cycle. *Development.* 124:3185-95.
- Stick, R., and G. Krohne.** 1982. Immunological localization of the major architectural protein associated with the nuclear envelope of the *Xenopus laevis* oocyte. *Exp Cell Res.* 138:319-3.
- Stick, R., and P. Hausen.** 1985. Changes in the nuclear lamina composition during early development of *Xenopus laevis*. *Cell.* 41:191-200.
- Stick, R.** 1988. cDNA cloning of the developmentally regulated lamin LIII of *Xenopus laevis*. *Embo J.* 7:3189-97.
- Stick, R.** 1995. Nuclear lamins and the nucleoskeleton. *The Cytoskeleton.* 1:257-296.
- Strelkov, S.V., H. Herrmann, N. Geisler, T. Wedig, R. Zimbelmann, U. Aebi, and P. Burkhard.** 2002. Conserved segments 1A and 2B of the intermediate filament dimer: their atomic structures and role in filament assembly. *Embo J.* 21:1255-66.
- Stuurman, N., B. Sasse, and P.A. Fisher.** 1996. Intermediate filament protein polymerization: molecular analysis of *Drosophila* nuclear lamin head-to-tail binding. *J Struct Biol.* 117:1-15.
- Stuurman, N., S. Heins, and U. Aebi.** 1998. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol.* 122:42-66.
- Stuven, T., E. Hartmann, and D. Gorlich.** 2003. Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profiling-actin complexes. *Embo J.* 22:5928-40.
- Sullivan, T., D. Escalante-Alcalde, H. Bhatt, M. Anver, N. Bhat, K. Nagashima, C.L. Stewart, and B. Burke.** 1999. Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol.* 147:913-20.

- Takayama, E., T. Higo, M. Kai, M. Fukasawa, K. Nakajima, H. Hara, T. Tadakuma, K. Igarashi, Y. Yaoita, and K. Shiokawa.** 2004. Involvement of caspase-9 in execution of the maternal program of apoptosis in *Xenopus* late blastulae overexpressed with S-adenosylmethionine decarboxylase. *Biochem Biophys Res Commun.* 325:1367-75.
- Tsai, M.Y., S. Wang, J.M. Heidinger, D.K. Shumaker, S.A. Adam, R.D. Goldman, and Y. Zheng.** 2006. A mitotic lamin B matrix induced by RanGTP required for spindle assembly. *Science.* 311:1887-93.
- Vester, B., A. Smith, G. Krohne, and R. Benavente.** 1993. Presence of a nuclear lamina in pachytene spermatocytes of the rat. *J Cell Sci.* 104 (Pt 2):557-63.
- Weber, K., U. Plessmann, and P. Traub.** 1989. Maturation of nuclear lamin A involves a specific carboxy-terminal trimming, which removes the polyisoprenylation site from the precursor; implications for the structure of the nuclear lamina. *FEBS Lett.* 257:411-4.
- Wedlich, D., and C. Dreyer.** 1988. The distribution of nucleoplasmin in early development and organogenesis of *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res.* 254:295-300.
- Wessel, D., and U.I. Flugge.** 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem.* 138:141-3.
- Wilmzig, M.** 1985. LiCl-boiled method for plasmid mini-preps. *Trends Genet.* 1.
- Wolin, S.L., G. Krohne, and M.W. Kirschner.** 1987. A new lamin in *Xenopus* somatic tissues displays strong homology to human lamin A. *Embo J.* 6:3809-18.
- Woodland, H.R., J.M. Flynn, and A.J. Wyllie.** 1979. Utilization of stored mRNA in *Xenopus* embryos and its replacement by newly synthesized transcripts: histone H1 synthesis using interspecies hybrids. *Cell.* 18:165-71.
- Worman, H.J., and J.C. Courvalin.** 2004. How do mutations in lamins A and C cause disease? *J Clin Invest.* 113:349-51.
- Worman, H.J., and G.G. Gundersen.** 2006. Here come the SUNs: a nucleocytoskeletal missing link. *Trends Cell Biol.* 16:67-9.
- Wu, K.C., J.T. Bryan, M.I. Morasso, S.I. Jang, J.H. Lee, J.M. Yang, L.N. Marekov, D.A. Parry, and P.M. Steinert.** 2000. Coiled-coil trigger motifs in the 1B and 2B rod domain segments are required for the stability of keratin intermediate filaments. *Mol Biol Cell.* 11:3539-58.
- Ye, Q., and H.J. Worman.** 1995. Protein-protein interactions between human nuclear lamins expressed in yeast. *Exp Cell Res.* 219:292-8.
- Yoshinaga, K., S. Nishikawa, M. Ogawa, S. Hayashi, T. Kunisada, and T. Fujimoto.** 1991. Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development.* 113:689-99.

Zhang, Q., C.D. Ragnauth, J.N. Skepper, N.F. Worth, D.T. Warren, R.G. Roberts, P.L. Weissberg, J.A. Ellis, and C.M. Shanahan. 2005. Nesprin-2 is a multi-isomeric protein that binds lamin and emerin at the nuclear envelope and forms a subcellular network in skeletal muscle. *J Cell Sci.* 118:673-87.

G Anhang

Tabelle A: Kernparameter nicht transfizierter Hela-Zellen

Fläche in μm^2	Umfang in μm	$4\pi \times$ Fläche/Umfang ²	Fläche in μm^2	Umfang in μm	$4\pi \times$ Fläche/Umfang ²
1036,25	132,25	0,74	997,14	124,93	0,8
969,56	120,51	0,84	1035,32	130,46	0,76
1018,27	136,88	0,68	963,62	121,72	0,82
783,92	107,95	0,85	1004,18	127,73	0,77
1100,06	140,62	0,7	1201,62	132,93	0,85
1225,3	145,44	0,73	853,49	124,99	0,69
1211,21	137,36	0,81	1832,39	173,38	0,77
1199,93	133,8	0,84	698,3	112,02	0,7
1341,88	154,45	0,71	1319,99	141,3	0,83
1247,27	137,24	0,83	785,36	112,08	0,79
699,41	115,07	0,66	913,99	111,73	0,92
1191,02	130,12	0,88	1792,34	174,08	0,74
615,66	93,47	0,89	1358,85	138,39	0,89
918,48	129,08	0,69	768,73	106,64	0,85
1386,76	149,71	0,78	1269,33	136,89	0,85
1416,21	148,42	0,81	1204,25	136,36	0,81
1059,59	138,83	0,69	718,07	110,39	0,74
1081,82	125,93	0,86	2134,02	177,75	0,85
1048,47	130,17	0,78	1280,7	151,86	0,7
1185,42	143,7	0,72	1138,07	126,52	0,89
1119,92	143,44	0,68	1210,11	129,47	0,91
1083,09	129,51	0,81	1271,12	138	0,84
1304,21	137,88	0,86	1295,13	142,1	0,81
549,65	102,82	0,65	1180,41	140,7	0,75
1237,01	131,91	0,89	947,93	136,33	0,64
791,72	111,67	0,8	2259,38	238,17	0,5
1276,04	139,95	0,82	1032,53	155,83	0,53
1023,53	142,17	0,64	978,67	118,06	0,88
1358,25	145,43	0,81	1360,51	139,66	0,88
1189,41	128,61	0,9	1227,59	133,86	0,86
695,84	101,93	0,84	845,99	109,6	0,89
955,39	118,09	0,86	1331,65	139,51	0,86
1025,56	119,17	0,91	980,98	121,8	0,83
918,48	114,91	0,87	736,86	100,88	0,91
1183,3	134,4	0,82	1109,06	125,9	0,88
1810,67	168,66	0,8	490,88	88,49	0,79
1121,36	165,03	0,52	488,65	83,38	0,88
1007,15	127,01	0,78	931,76	116,91	0,86
1125,43	128,33	0,86	1517,36	158,99	0,75
1207,05	133,13	0,86	790,23	115,32	0,75
1243,12	131,64	0,9	788,44	113,36	0,77
1244,56	134,15	0,87	1606,36	150,82	0,89
1006,98	120,89	0,87	785,21	107,94	0,85
1117,03	124,33	0,91	700,32	104,19	0,81
1321,52	141,09	0,83	1366,57	139,51	0,88
1139,94	135,67	0,78	989,71	120,25	0,86
878,69	116,38	0,82	990,23	115,9	0,93
901,68	120,13	0,79	904,66	116,98	0,83
967,27	125,83	0,77	1284,94	153,75	0,68
1322,02	140,53	0,84	979,4	128,58	0,74

Tabelle B: Kernparameter Lamin Ft-B1 transfizierter Hela-Zellen

Fläche in μm^2	Umfang in μm	$4\pi \times$ Fläche/Umfang ²	Fläche in μm^2	Umfang in μm	$4\pi \times$ Fläche/Umfang ²
1230,78	160,55	0,6	2380,34	219,2	0,62
1189,14	143,37	0,73	870,3	135,14	0,6
1304,49	247,95	0,27	956,77	139,84	0,61
907,73	126,27	0,72	973,01	145,6	0,58
959,03	127,98	0,74	707,83	118,53	0,63
795,96	111,9	0,8	1840,79	193,39	0,62
471,85	85,64	0,81	1532,38	203,83	0,46
583,83	105,36	0,66	1483,66	179,9	0,58
924,39	132,98	0,66	1404,78	168,44	0,62
959,4	116,28	0,89	1638,93	185,75	0,6
981,24	162,34	0,47	1628,05	182,29	0,62
1179,66	174,79	0,49	1146,86	159,24	0,57
1261,05	158,03	0,63	1916,47	288,92	0,29
972,6	145,73	0,58	1965,99	240,71	0,43
1555,78	177,2	0,62	1400,76	178,69	0,55
2235,54	218,76	0,59	1596,9	243,74	0,34
2138,63	234,99	0,49	1951,82	242,43	0,42
1123,35	156,81	0,57	1769,24	254,65	0,34
608,7	112,85	0,6	1018,19	145,88	0,6
1661,43	228,73	0,4	2337,1	219,75	0,61
1575,87	198,41	0,5	1547,4	191,71	0,53
2045,86	222,62	0,52	1115,91	167,65	0,5
1263,97	166,45	0,57	1135,72	154,42	0,6
1712,31	179,02	0,67	951,76	155,06	0,5
1667,11	180,77	0,64	1108,43	146,13	0,65
2276,69	205,88	0,67	987,2	163,21	0,47
1930,35	198,28	0,62	1483,88	213,98	0,41
505,37	110,57	0,52	1170,09	159,33	0,58
620,14	124,7	0,5	1819,69	216,18	0,49
2103,87	196,11	0,69	1751,86	224,02	0,44
770,38	115,95	0,72	2187,38	254,71	0,42
773,52	120,34	0,67	2316,16	222,51	0,59
1663,35	172,79	0,7	1566,84	184,26	0,58
2147,36	241,64	0,46	985,37	145,25	0,59
1120,57	165,63	0,51	985,37	145,25	59
1589,54	178,49	0,63	1361,66	179,14	0,53
1890,14	186,78	0,68	1942,5	191,87	0,66
653,08	146,95	0,38	1657,56	192,89	0,56
2495,53	319,29	0,31	1498,61	188,55	0,53
2327,73	315,26	0,29	1172,67	155,43	0,61
1731,49	199,68	0,55	835,54	140,81	0,53
1813,21	219,89	0,47	847,51	130,91	0,62
1649,67	199,08	0,52	1341,06	180,95	0,51
591,77	114,9	0,56	1761,11	230,08	0,42
1368,07	191,84	0,47	1512,5	222,26	0,38
808	147,69	0,47	1471,66	192,06	0,5
1293,39	168,07	0,58	1393,7	188,52	0,49
928,57	132,93	0,66	1573,32	175,26	0,64
725,45	118,09	0,65	788,38	123,78	0,65
1625,31	177,78	0,65	1214,87	159,63	0,6

Tabelle C: Kernparameter Lamin Ft-B3 transfizierter Hela-Zellen

Fläche in μm^2	Umfang in μm	$4\pi \times$ Fläche/Umfang ²	Fläche in μm^2	Umfang in μm	$4\pi \times$ Fläche/Umfang ²
1844,35	299,2	0,26	1462,87	182,85	0,55
1846,9	197,2	0,6	1173,54	160,76	0,57
2337,49	263,93	0,42	1825,26	197,14	0,59
984,84	166,77	0,44	1960,85	197,07	0,63
1381,33	168	0,62	1087,42	141,81	0,68
662,07	111,94	0,66	1580,73	221,08	0,41
783,32	141,85	0,49	5650,91	481,26	0,31
2307,62	272,77	0,39	1481,96	189,53	0,52
2168,73	259,32	0,41	3639,66	316,1	0,46
1791,41	244,14	0,38	2668,74	246,78	0,55
1828,32	231,41	0,43	2014,84	344,51	0,21
1016,57	176,72	0,41	2311,58	287,62	0,35
741,83	124,33	0,6	1640,05	258,58	0,31
1464,99	184,01	0,54	9816,55	627,93	0,31
2023,81	337,76	0,22	2082,17	316,49	0,26
1569,53	170,97	0,67	2070,08	426,89	0,14
1194,07	146,42	0,7	2266,32	391,97	0,19
1422,99	221,8	0,36	1506,58	317,6	0,19
1434,19	197,76	0,46	2133,91	427,68	0,15
904,74	144,97	0,54	1607,28	274,87	0,27
1059,42	149,19	0,6	1172,86	191,59	0,4
1389,73	200,74	0,43	1181,3	270,98	0,2
1569,61	215,92	0,42	998,68	161,07	0,48
1397,88	142,66	0,86	931,81	181,83	0,35
1791,49	166,2	0,81	1010,56	138,65	0,66
1347,05	136,93	0,9	1140,65	173,4	0,48
1046,35	128,61	0,8	1428,75	286,37	0,22
1959,49	209,17	0,56	1508,68	236,62	0,34
1242,18	167,54	0,56	1415,85	215,53	0,38
1325,42	277,91	0,26	812,86	118,53	0,73
1457,27	303,4	0,2	1364,76	190,94	0,47
2230,33	319	0,28	2497,1	299,1	0,35
1458,38	230,66	0,34	2074,81	209,06	0,6
1401,95	192,19	0,48	934,8	129,31	0,7
1186,52	158,92	0,59	1086,25	137,48	0,72
1256,18	192,5	0,43	1507,36	156,7	0,77
1499,36	189,13	0,53	2066,55	182,84	0,78
973,55	153,38	0,52	2872,43	245,86	0,6
1301,92	198,75	0,41	2569,46	299,08	0,36
1500,55	166,1	0,68	1277,8	146,77	0,75
1783,52	182,5	0,67	1632,66	164,32	0,76
1715,04	284,68	0,27	2920,61	307,98	0,39
1506,91	242,12	0,32	721,67	111,34	0,73
1711,56	293,38	0,25	945,52	123,28	0,78
1324,4	191,26	0,45	2005,79	171,29	0,86
1549,33	214,49	0,42	2474,48	292,82	0,36
1604,99	213,48	0,44	5935,2	380,95	0,51
572,9	103,57	0,67	2693,05	276,5	0,44
934,01	121,88	0,79	1868,39	206,37	0,55
1576,91	175,85	0,64	1050,34	145,43	0,62

Tabelle D: Kernparameter Lamin Ft-A transfizierter Hela-Zellen

Fläche in μm^2	Umfang in μm	$4\pi \times$ Fläche/Umfang ²	Fläche in μm^2	Umfang in μm	$4\pi \times$ Fläche/Umfang ²
1354,78	166,4	0,61	1309,81	158,47	0,66
1537,29	157,12	0,78	1146,81	139,46	0,74
1473,48	169,16	0,65	1005,03	146,02	0,59
1324,57	151,35	0,73	1066,12	119,58	0,94
816,16	124,01	0,67	1373,61	161,22	0,66
1071,81	135,9	0,73	1652,42	160,44	0,81
1168,87	152,95	0,63	1287,24	142,38	0,8
885,22	110,49	0,91	1326,86	138,46	0,87
1561,21	162,85	0,74	1083,18	149,99	0,6
1658,36	199,58	0,52	1183,55	134,88	0,82
1399,92	153,66	0,75	1075,12	130	0,8
1208,07	138,4	0,79	1178,89	158,57	0,59
1471,1	150,04	0,82	1210,87	142,91	0,75
1347,99	151,83	0,73	1227,84	143,74	0,75
1196,45	160,1	0,59	1296,06	141,77	0,81
1660,82	164,08	0,78	1405,77	159,82	0,69
1305,56	156,3	0,67	1122,12	138,82	0,73
1161,41	127,04	0,9	1524,13	168,96	0,67
1381,33	143,04	0,85	766,01	103,42	0,9
265,24	67,19	0,74	1110,58	135,86	0,76
1267,72	143,49	0,77	824,22	115,08	0,78
1035,58	124,96	0,83	1093,61	128,2	0,84
1601,66	159,57	0,79	1175,83	124,05	0,96
1176,59	142,5	0,73	1241,93	142,44	0,77
1118,98	145,74	0,66	786,72	118,98	0,7
1182,19	147,82	0,68	884,12	147,79	0,51
1193,31	143,18	0,73	487,03	84,6	0,86
1207,56	139,44	0,78	1576,4	161,83	0,76
1413,58	151,28	0,78	870,72	114,35	0,84
1174,56	134,63	0,81	1520,91	345,54	0,16
940,55	123,31	0,78	1344,09	151,64	0,73
1105,32	122,59	0,92	1385,49	145,72	0,82
1921,22	177,58	0,77	1342,39	148,71	0,76
835,59	114,67	0,79	930,53	154,07	0,49
1649,62	155,9	0,85	1416,63	186,32	0,51
1326,44	156,88	0,67	1825,6	168,96	0,8
589,1	92,05	0,87	1369,12	144,29	0,82
1437,25	183,81	0,53	964,64	114,65	0,92
1321,85	152,45	0,71	1212,65	140,58	0,77
882,59	126,4	0,69	1281,64	138,38	0,84
117,03	145,24	0,67	1477,81	151,69	0,8
1155,3	149,38	0,65	1379,13	172,91	0,58
794,35	117,54	0,72	1662,86	177,81	0,66
1150,63	138,35	0,76	1526,42	162,34	0,73
1022,85	124,23	0,83	1723,1	170,95	0,74
932,32	116,15	0,87	1718,18	205,74	0,51
1078,17	134,24	0,75	1004,78	128,19	0,77
1674,91	194,29	0,56	1369,79	140,89	0,87
1254,57	148,51	0,71	1516,02	179,05	0,59
811,24	117,5	0,74	923,93	153,44	0,49

Tabelle E: Kernparameter Lamin Ft-LIII transfizierter Hela-Zellen

Fläche in μm^2	Umfang in μm	$4\pi \times$ Fläche/Umfang ²	Fläche in μm^2	Umfang in μm	$4\pi \times$ Fläche/Umfang ²
884,33	124,9	0,71	1364,56	161,58	0,66
985,05	142,79	0,61	1140,92	159,56	0,56
2044,36	184,65	0,75	1359,27	169,67	0,59
1134,68	138,05	0,75	2097,92	205,7	0,62
1092,71	141,88	0,68	1803,82	192,98	0,61
1124,31	161,31	0,54	1081,86	162,32	0,52
1042,01	155,81	0,54	1309,21	163,26	0,62
1362,87	140,64	0,87	937,12	144,89	0,56
899,29	119,4	0,79	1040,65	161,78	0,5
1073,55	128	0,82	1079,71	161,63	0,52
1424,57	159,42	0,7	472,64	120,9	0,41
1592,66	177,43	0,64	791,85	131,26	0,58
1294,2	147,29	0,75	1757,44	187,57	0,63
1108,56	129,2	0,83	1463,04	179,85	0,57
1447,66	154,56	0,76	1136,07	146,57	0,66
1125,44	129,2	0,85	1385,73	167,95	0,62
722,79	114,26	0,7	1765,82	189,84	0,62
1547,01	213,5	0,43	1227,43	167,79	0,55
1932,65	213,93	0,53	708,91	126,62	0,56
1440,3	187,03	0,52	1352,14	168,06	0,6
1325,74	180,31	0,51	1553,49	190,34	0,54
1199,21	173,29	0,5	696,92	152,45	0,38
1225,93	155,99	0,63	1237,87	187,9	0,44
1282,61	167,55	0,58	1104,78	155,92	0,57
1614,5	174,01	0,67	1032,91	146,43	0,61
1267,6	181,86	0,48	704,14	121,33	0,6
1430,63	169,1	0,63	1041,07	148,23	0,6
1406,06	172,07	0,6	1168,93	150,16	0,65
1231,9	162,19	0,59	1392,42	182,44	0,53
1515,02	194,97	0,5	1058,86	169,68	0,46
1594,37	178,65	0,63	8980,1	140,84	0,57
1705,58	196,05	0,56	1158,55	150,61	0,64
1289,41	172,34	0,55	1105,75	146,29	0,65
1255	174,74	0,52	1287,87	158,35	0,65
997,97	160,41	0,49	903,53	132,72	0,64
1140,64	171,39	0,49	1338,87	192,23	0,46
1056,23	165,66	0,48	1389,65	170,42	0,6
2049,19	196,79	0,66	1272,11	186,4	0,46
1874,83	184,96	0,69	1023,47	162,9	0,48
860,77	132,59	0,62	811,46	146,36	0,48
923,93	138,26	0,61	1903,62	211,39	0,54
1025,96	152,76	0,55	1296,74	170,48	0,56
1061,87	149,13	0,6	1093,07	144,56	0,66
14480,3	179,4	0,57	728,24	146,39	0,43
1198,5	144,73	0,72	1065,01	158,17	0,53
1155,56	165,54	0,53	917,48	132,89	0,65
1330,07	156,53	0,68	827,76	132,8	0,59
1403,62	158,86	0,69	1364,65	209,89	0,39
1228,99	178,95	0,48	1480,39	191,17	0,51
1204	154,74	0,63	1519,24	198,28	0,49

Sequenz des humanen EST-Klons BM563418

```

1      CGGTCCGGAA TTCCTGGGAT CAGGGAGAGC TGCTGGCTGC TGGTGGAGGG ATGTCCAGGC
61     CGCTCAGGAG CTGCGCCCCG CTCCGGCCAG GCCCAGGGAG TAGGGGGGGC CCCACAGGAG
121    CCAGAGGGGA GGCCGCCAGG GCAGTTGTGA GGGGGCCTGT GGGGAAACCT GTGAGACAGC
181    CCGTGAAGAG ACTCACGAGA GCTTCTGTGC GGGGGCCCAG GAACGTGCCC CAGGTGGAAC
241    CCACAGGGCA CCTGGGAAAA GACCCACGAA GGCGGTGCAG GGGCCGGGAA GAGGCCCTGG
301    AGGGGCCCTC ACAGGGAGCT GCGGAGGTGC GGGAGACGCG GCGGCGGCAC GAGCGGCACC
361    TGGTGGAGGT GGACAGCAGC CGGCAGCAGG AGTACGACTT CAAGATGGCA CAGGCGCTGG
421    AGGAGCTGCG GAGCCAGCAC GACGAGCAAG TGCGGCTCTA CAAGCTGGAG CTGGAGCAGA
481    CCTACCAGGC CAAGCTGGAC AGCGCCAAGC TGAGCTCTGA CCAGAACGAC AAGGCGGCCA
541    GTGCGGCTCG CGAGGAGCTG AAGGAGGCCC GCATGCGCCT GGAGTCCCTC AGCTACCAGC
601    TCTCCGGCCT CCAGAAGCAG GCCAGTGCCG CTGAAGATCG CATTCCGGGAG CTGGAGGAGG
661    CCATGGGCCG GGGGAGCGGG GACAAGTTTC GGAAGATGCT GGACCGCCAG GAGCAGGAGA
721    TGACGGAGAT GCGGGAACGT GATGCAGCAA CAGCTGGGCC GAAGTACCAG GAGCTGCTGG
781    ACGTAAAGCT TGGGCCCTGG GACATGGGAG ATCAACGCCT ACCGGAAGCT CCTGNAGGGG
841    CAAGGAGGAA AAGCTTAAAC TTGTTCCCCC AGCCCATTCC TTGGGCGTTA CCGGTCTTCC
901    GGAGCCCACC TCCAAGCAGC CAACGGGAAC TTTGTCCCCC CCACCGGGCG CTTTGGGCCC
961    GCAATAAACC GAAAACCGGC TGGGAAGTGG GAAGGAACCC CTTGGGGGAA GGGGCCCCAG
1021   GCGGTCTTTG GGCACAGGAC CACGGGTGGC CAACGGGTGG GCTTTCCCCC TTGGGCCCAA
1081   CAGGCCCCCC GGCCTCTCGG GGAGCGTTTC GATTTCTGGG AGAATCCCCC TGTGGAAGGC
1141   CCAAGTTTGG GGCACCCTCC AAAAAACAAT TCCTGGACAA GGGT

```

Sequenz des pCS-Flag-Lamin B3 (Hs) Vektors

```

1      CGCCATTCTG CCTGGGGACG TCGGAGCAAG CTTGATTTAG GTGACACTAT AGAATACAAG
61     CTACTTGTTT TTTTTCAGG ATCGCCGCCA TGGACTACAA GGACGACGAT GACAAGAATT
121    CCTGGGATCA GGGAGAGCTG CTGGCTGCTG GTGGAGGGAT GTCCAGGCCG CTCAGGAGCT
181    GCGCCCCGCT CCGGCCAGGC CCAGGGAGTA GGGGGGGCCC CACAGGAGCC AGAGGGGAGG
241    CCGCCAGGGC AGTTGTGAGG GGGCCTGTGG GGAAACCTGT GAGACAGCCC GTGAAGAGAC
301    TCACGAGAGC TTCTGTGCGG GGGCCCAGGA ACGTGCCCCA GGTGGAACCC ACAGGGCACC
361    TGGGAAAAGA CCCACGAAGG CGGTGCAGGG GCCGGGAAGA GGCCCTGGAG GGGCCCTCAC
421    AGGGAGCTGC GGAGGTGCGG GAGACGCGGC GCGGCGACGA GCGGCGCCTG GTGGAGGTGG
481    ACAGCAGCCG GCAGCAGGAG TACGACTTCA AGATGGCACA GCGCTGGAG GAGCTGCGGA
541    GCCAGCACGA CGAGCAAGTG CGGCTCTACA AGCTGGAGCT GGAGCAGACC TACCAGGCCA
601    AGCTGGACAG CGCCAAGCTG AGCTCTGACC AGAACGACAA GCGGCCAGT GCGGCTCGCG
661    AGGAGCTGAA GGAGGCCCGC ATGCGCCTGG AGTCCCTCAG CTACCAGCTC TCCGGCCTCC
721    AGAAGCAGGC CAGTGCCGCT GAAGATCGCA TTCGGGAGCT GGAGGAGGCC ATGGCCGGGG
781    AGCGGGACAA GTTCCGGAAG ATGCTGGACG CCAAGGAGCA GGAGATGACG GAGATGCGGG
841    ACGTGATGCA GCAGCAGCTG GCCGAGTACC AGGAGCTGCT GGACGTGAAG CTGGCCCTGG
901    ACATGGAGAT CAACGCCTAC CGGAAGCTCC TGGAGGGCGA GGAGGAGAGG CTGAAGCTGT
961    CCCCCAGCCC ATCCTCGCGC GTCACCGTCT CACGAGCCAC CTCGAGCAGC AGCGGCAGCT
1021   TGTCCGCCAC CGGGCGCCTG GGCCGCAGTA AGCGGAAGCG GCTGGAGGTG GAGGAGCCCT
1081   TGGGCAGCGG CCCAAGCGTC CTGGGCACGG GCACGGGTGG CAGCGGTGGC TTCCACCTGG
1141   CCCAGCAGGC CTCGGCCTCG GGTAGCGTCA GCATCGAGGA GATCGACCTG GAGGGCAAGT
1201   TTGTGCAGCT CAAGAACAAC TCGGACAAGG ATCAGTCTCT GGGGAACTGG AGAATCAAGA
1261   GGCAGGTCTT GGAGGGGGAG GAGATCGCCT ACAAGTTTAC GCCCAAGTAC ATCCTGCGCG
1321   CCGGCCAGAT GGTCACGGTG TGGGCAGCTG GTGCGGGGGT GGCCACAGC CCCCCCTCGA
1381   CGTGGTGTG GAAGGGCCAG AGCAGCTGGG GCACGGGCGA GAGCTTCCG ACCGTCTCTG
1441   TTAACGCGGA TGGCGAGGAA GTGGCCATGA GGACTGTGAA GAAGTCTCTG GTGATGCGTG
1501   AGAATGAGAA TGGGGAGGAA GAGGAGGAGG AAGCCGAGTT TGGCGAGGAG GATCTTTTCC
1561   ACCAACAGGG GGACCCGAGG ACCACCTCAA GAGGCTGCTA CGTGATGTGA ACCCACACTC
1621   CTCATCCACA CACCTTTCTT TACCCAGAGC CACTGAAAAC TATTTTTATA TCATTGGCTT
1681   TCTTTAGTTC TTGATACATT TCTAGAGAAT TTCTAAGCGA ACTGCCAGAA CGTGCGGCCG
1741   CGGCGCCAAT GCATTGGGCC CGGTACCCAG CTTTTGTTCC CTTTAGTGAG GGTTAATTGC
1801   GCGCTTGGCG TAATCATGGT CATAGCTGTT TCCTGTGTGA AATTGTTATC CGCTCACAAT
1861   TCCACACAAC ATACGAGCCG GAAGCATAAA GTGTAAAGCC TGGGGTGCC TATGAGTGAG
1921   CTAACTCACA TTAATTGCGT TGCCTCACT GCCCGCTTTC CAGTCGGGAA ACCTGTGCTG
1981   CCAGCTGCAT TAATGAATCG GCCAACGCGC GGGGAGAGGC GGTGTCGTA TTGGGCGCTC
2041   TTCCGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTGCG CTCGGTCTGT CCGCTGCGGC GAGCGGTATC

```

2101	AGCTCACTCA	AAGGCGGTAA	TACGGTTATC	CACAGAATCA	GGGGATAACG	CAGGAAAGAA
2161	CATGTGAGCA	AAAGGCCAGC	AAAAGGCCAG	GAACCGTAAA	AAGGCCGCGT	TGCTGGCGTT
2221	TTTCCATAGG	CTCCGCCCCC	CTGACGAGCA	TCACAAAAAT	CGACGCTCAA	GTCAGAGGTG
2281	GCGAAACCCG	ACAGGACTAT	AAAGATACCA	GGCGTTTCCC	CCTGGAAGCT	CCCTCGTGCG
2341	CTCTCCTGTT	CCGACCCTGC	CGCTTACCGG	ATACCTGTCC	GCCTTTCTCC	CTTCGGGAAG
2401	CGTGGCGCTT	TCTCATAGCT	CACGCTGTAG	GTATCTCAGT	TCGGTGTAGG	TCGTTTCGCTC
2461	CAAGCTGGGC	TGTGTGCACG	AACCCCCCGT	TCAGCCCCGAC	CGCTGCGCCT	TATCCGGTAA
2521	CTATCGTCTT	GAGTCCAACC	CGGTAAGACA	CGACTTATCG	CCACTGGCAG	CAGCCACTGG
2581	TAACAGGATT	AGCAGAGCGA	GGTATGTAGG	CGGTGCTACA	GAGTTCTTGA	AGTGGTGGCC
2641	TAACTACGGC	TACACTAGAA	GGACAGTATT	TGGTATCTGC	GCTCTGCTGA	AGCCAGTTAC
2701	CTTCGGAAAA	AGAGTTGGTA	GCTCTTGATC	CGGCAAACAA	ACCACCGCTG	GTAGCGGTGG
2761	TTTTTTTGT	TGCAAGCAGC	AGATTACGCG	CAGAAAAAAA	GGATCTCAAG	AAGATCCTTT
2821	GATCTTTTCT	ACGGGTCTG	ACGCTCAGTG	GAACGAAAAC	TCACGTTAAG	GGATTTTGGT
2881	CATGAGATTA	TCAAAAAGGA	TCTTCACCTA	GATCCTTTTA	AATTA AAAAT	GAAGTTTTAA
2941	ATCAATCTAA	AGTATATATG	AGTAAACTTG	GTCTGACAGT	TACCAATGCT	TAATCAGTGA
3001	GGCACCTATC	TCAGCGATCT	GTCTATTTTCG	TTCATCCATA	GTTGCCTGAC	TCCCCGTCGT
3061	GTAGATAACT	ACGATACGGG	AGGGCTTACC	ATCTGGCCCC	AGTGCTGCAA	TGATACCGCG
3121	AGACCCACGC	TCACCGGCTC	CAGATTTATC	AGCAATAAAC	CAGCCAGCCG	GAAGGGCCGA
3181	GCGCAGAAGT	GGTCTTGCAA	CTTTATCCGC	CTCCATCCAG	TCTATTAATT	GTTGCCGGGA
3241	AGCTAGAGTA	AGTAGTTCGC	CAGTTAATAG	TTTGCGCAAC	GTTGTTGCCA	TTGCTACAGG
3301	CATCGTGGTG	TCACGCTCGT	CGTTTGGTAT	GGCTTCATTC	AGCTCCGGTT	CCCAACGATC
3361	AAGGCGAGTT	ACATGATCCC	CCATGTTGTG	CAAAAAAGCG	GTTAGCTCCT	TCGGTCTCTC
3461	GATCGTTTGC	AGAAGTAAGT	TGGCCGCGAT	GTTATCACTC	ATGGTTATGG	CAGCACTGCA
3521	TAATTCTCTT	ACTGTCAATG	CATCCGTAAG	ATGCTTTTCT	GTGACTGGTG	AGTACTCAAC
3601	CAAGTCAATC	TGAGAATAGT	GTATGCGGCG	ACCGAGTTGC	TCTTGCCCGG	CGTCAATACG
3661	GGATAATACC	GCGCCACATA	GCAGAACTTT	AAAAGTGCTC	ATCATTGGAA	AACGTTCTTC
3721	GGGGCGAAAA	CTCTCAAGGA	TCTTACCGCT	GTTGAGATCC	AGTTCGATGT	AACCCACTCG
3781	TGCACCCAAC	TGATCTTCAG	CATCTTTTAC	TTTCACCAGC	GTTTCTGGGT	GAGCAAAAAAC
3841	AGGAAGGCAA	AATGCCGCAA	AAAAGGGAAT	AAGGGCGACA	CGGAAATGTT	GAATACTCAT
3901	ACTCTTCTCT	TTTCAATATT	ATTGAAGCAT	TTATCAGGGT	TATTGTCTCA	TGAGCGGATA
3961	CATATTTGAA	TGTATTTAGA	AAAATAAACA	AATAGGGGTT	CCGCGCACAT	TTCCCCGAAA
4021	AGTGCCACCT	AAATTGTAAG	CGTTAATATT	TTGTTAAAAAT	TCGCGTTAAA	TTTTTGTAA
4081	ATCAGCTCAT	TTTTTAACCA	ATAGGCCGAA	ATCGGCAAAA	TCCCTTATAA	ATCAAAAAGAA
4141	TAGACCGAGA	TAGGGTTGAG	TGTTGTTCCA	GTTTGGAAACA	AGAGTCCACT	ATTAAGAAGAC
4201	GTGGACTCCA	ACGTCAAAGG	GCGAAAAACC	GTCTATCAGG	GCGATGGCCC	ACTACGTGAA
4261	CCATCACCTT	AATCAAGTTT	TTTGGGGTCC	AGGTGCCGTA	AAGCACTAAA	TCGGAACCTT
4321	AAAGGGAGCC	CCCGATTTAG	AGCTTGACGG	GGAAAAGCCG	CGAACGTGGC	GAGAAAAGGAA
4381	GGGAAGAAAG	CGAAAGGAGC	GGGCGCTAGG	GCGCTGGCAA	GTGTAGCGGT	CACGCTGCGC
4441	GTAACCACCA	CACCCGCCGC	GCTTAATGCG	CCGCTACAGG	GCGCGTCCCA	TTCGCCATTC
4501	AGGCTGCGCA	ACTGTTGGGA	AGGGCGATCG	GTGCGGGCCT	CTTCGCTATT	ACGCCAGTCG
4561	ACCATAGCCA	ATTCAATATG	GCGTATATGG	ACTCATGCCA	ATTCAATATG	GTGGATCTGG
4621	ACCTGTGCCA	ATTCAATATG	GCGTATATGG	ACTCGTGCCA	ATTCAATATG	GTGGATCTGG
4681	ACCCAGCCA	ATTCAATATG	GCGGACTTGG	CACCATGCCA	ATTCAATATG	GCGGACTTGG
4741	CACTGTGCCA	ACTGGGGAGG	GGTCTACTTG	GCACGGTGCC	AAGTTTGAGG	AGGGGTCTTG
4801	GCCCTGTGCC	AAGTCCGCCA	TATTGAATTG	GCATGGTGCC	AATAATGGCG	GCCATATTGG
4861	CTATATGCCA	GGATCAATAT	ATAGGCAATA	TCCAATATGG	CCCTATGCCA	ATATGGCTAT
4921	TGGCCAGGTT	CAATACTATG	TATTGGCCCT	ATGCCATATA	GTATTCCATA	TATGGGTTTT
4981	CCTATTGACG	TAGATAGCCC	CTCCCAATGG	GCGGTCCCAT	ATACCATATA	TGGGCTTCC
5041	TAATACCGCC	CATAGCCACT	CCCCCATTGA	CGTCAATGGT	CTCTATATAT	GGTCTTTCTC
5101	ATTGACGTCA	TATGGGCGGT	CCTATTGACG	TATATGGCGC	CTCCCCCATT	GACGTCAATT
5161	ACGGTAAATG	GCCCCGCTGG	CTCAATGCC	ATTGACGTCA	ATAGGACCAC	CCACCATTGA
5221	CGTCAATGGG	ATGGCTCATT	GCCCCATTCAT	ATCCGTTCTC	ACGCCCCCTA	TTGACGTCAA
5281	TGACGGTAAA	TGGCCCACTT	GGCAGTACAT	CAATATCTAT	TAATAGTAAC	TTGGCAAGTA
5341	CATTACTATT	GGAAAGGACGC	CAGGGTACAT	TGGCAGTACT	CCCATTGACG	TCAATGGCGG
5401	TAAATGGCCC	GCGATGGCTG	CCAAGTACAT	CCCCATTGAC	GTCAATGGGG	AGGGGCAATG
5461	ACGCAAATGG	GCGTTCATT	GACGTAAATG	GGCGGTAGGC	GTGCCTAATG	GGAGGTCTAT
5521	ATAAGCAATG	CTCGTTTAGG	GAAC			

Abgeleitete Aminosäuresequenz des humanen Lamin B3 Proteins

1 MSRPLRSCAP LRPGPGSRGG PTGARGEAAR AVVRGPVGKP VRQPVKRLTR ASVRGPRNVP
61 QVEPTGHLGK DPRRRCRGRE EALEGPSQGA AEVRETRRRH ERRLVEVDSS RQQEYDFKMA
121 QALEELRSQH DEQVRLYKLE LEQTYQAKLD SAKLSSDQND KAASAAREEL KEARMRLESL
181 SYQLSGLQKQ ASAAEDRIRE LEEAMAGERD KFRKMLDAKE QEMTEMRDVM QQQLAEYQEL
241 LDVKLALDME INAYRKLLEG EEERLKLSPS PSSRVTVSRA TSSSSGSLSA TGRLGRSKRK
301 RLEVEEPLGS GPSVLGTGTG GSGGFHLAQO ASASGSVSIE EIDLEGKFVO LKNNSDKDQS
361 LGNWRIKRQV LEGEEIAYKF TPKYILRAGQ MVTVWAAGAG VAHSPSTLV WKGQSSWGTG
421 ESFRTVLVNA DGEEVAMRTV KKSSVMRENE NGEEEEEEEAE FGEEDLFHQO GDPRTTSRGC
481 YVM

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. R. Stick für die Überlassung des Themas, für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, sowie die sehr gute Ausbildung während des gesamten Zeitraums.

Weiterer Dank gilt Prof. Dr. A. Becker für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe Stick möchte ich mich für die Unterstützung, den Rat in fachlichen Fragen und die nette Atmosphäre bedanken. Es hat viel Spaß gemacht hier zu arbeiten.

Besonderer Dank geht an dieser Stelle an Dr. Annette Peter, die mir unermüdlich bei allen anfallenden Problemen im Labor und beim Schreiben meiner Arbeit geholfen hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei meiner Familie und bei meinem Freund Sascha Sturm bedanken, die mich in den vergangenen Jahren auch in Krisenzeiten immer moralisch unterstützt haben.

Lebenslauf

Tanja Barendziak

- 09.12.1976 Geburt in Bremen
Eltern: Klaus-Dieter Barendziak und Karin Barendziak,
geb. Kuczera
- 1983–1987 Besuch der Grundschule in Bremen
- 1987-1989 Besuch der Orientierungsstufe in Bremen
- 1989-1996 Besuch des Gymnasiums in Bremen, einschl. Abitur 1996
- 1996-2001 Studium der Biologie an der Universität Bremen,
Spezialisierungsfächer Zell- und Molekularbiologie,
Mikrobiologie und Biochemie
- Jan 2002 Beginn der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Zellbiologie
von Prof. Dr. R. Stick an der Universität Bremen
- Nov 2002 Abschluss des Studiums mit dem Hochschulgrad Diplom-
Biologin, Thema der Diplomarbeit: „*In vitro*
Untersuchungen zur Oligomerisierung verschiedener
Lamin Subtypen“
- Seit 2002 Anfertigung der Dissertation an der Universität Bremen in
der Arbeitsgruppe Zellbiologie von Prof. Dr. R. Stick:
„Untersuchungen zum keimbahnspezifischen Lamin B3
Protein in Vertebraten“