



Der Einfluss von Mutationen im *LMNA*-Gen auf die Struktur und Funktion des Zellkerns

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

vorgelegt von
Sebastian Kandert
aus
Bad Windsheim

Würzburg 2009

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde von September 2005 bis September 2008 am Lehrstuhl für Elektronenmikroskopie am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg durchgeführt.

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin J. Müller

Erstgutachter: Prof. Dr. Marie-Christine Dabauvalle

Zweitgutachter: Prof. Dr. Clemens Müller-Reible

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	8
2.1	<i>Die Kernhülle</i>	8
2.2	<i>Die Kern-Lamina und die Lamine</i>	9
2.2.1	Die molekulare Struktur der Lamine	10
2.2.2	Die Proteinfamilie der Lamine	12
2.2.3	Die Funktion der Lamine	13
2.3	<i>Weitere Proteine der Kernhülle</i>	16
2.3.1	Die LEM-Domänen-Proteine	18
2.3.1.1	Die Lamina-assoziierten Polypeptide 1 und 2 (LAP1, LAP2)	18
2.3.1.2	Emerin	20
2.3.1.3	MAN1	22
2.3.2	Die SUN-Proteine	23
2.3.3	Die Nesprine	23
2.3.4	BAF	25
2.4	<i>Krankheiten ausgelöst durch Mutationen in Proteinen der Kernhülle</i>	26
2.4.1	Die primären Laminopathien	28
2.4.1.1	Die Emery-Dreifuss Muskeldystrophie	30
2.4.1.2	Das Hutchinson-Gilford Progerie-Syndrom	32
2.4.1.3	Die Mutation <i>LMNA</i> S143F und die damit verbundene Krankheit	34
2.4.1.4	Hypothetische Mechanismen der primären Laminopathien	36
2.5	<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	39
3	Material	40
3.1	<i>Biologisches Material</i>	40
3.1.1	Zelllinien	40
3.1.3	Zellkulturmedien	41
3.1.4	Bakterienstämme	41
3.1.5	Antikörper	42
3.1.5.1	Primär-Antikörper	42
3.1.5.2	Sekundär-Antikörper	44
3.2	<i>Molekularbiologisches Material</i>	45
3.2.1	Plasmidvektoren	45
3.2.2	Enzyme	49
3.2.3	Oligonukleotide	49
3.2.4	Größenstandards	50
3.2.5	Kits und Kitbestandteile	50
3.3	<i>Chemikalien</i>	50
3.4	<i>Geräte</i>	51

4	Methoden	53
4.1	<i>Mikrobiologische Methoden</i>	53
4.1.1	Flüssigkeitskultur von Bakterien	53
4.1.2	Bestimmung der Bakteriendichte einer Flüssigkultur durch photometrische Messung	53
4.1.3	Glyzerinkultur	53
4.1.4	Herstellung von LB-Agar-Selektionsplatten	53
4.1.5	Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien	54
4.1.6	Bestimmung der erreichten Kompetenz	54
4.1.7	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien	55
4.1.7.1	Transformation von Rosetta™ (DE3)pLysS Competent Cells E.coli	55
4.1.7.2	Transformation von E.coli XL1blue	55
4.2	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	55
4.2.1	PCR (Polymerase Kettenreaktion) zur Vermehrung von DNA-Abschnitten	55
4.2.2	RT-PCR (Reverse-Transkriptions-Polymerasekettenreaktion)	57
4.2.3	Primer und Primerdesign	57
4.2.4	Kolonie-PCR	58
4.2.5	Punktmutagenese	58
4.2.6	Primerdesign für eine Punktmutagenese	59
4.2.7	Plasmid-DNA-Isolation	60
4.2.7.1	Miniprep	60
4.2.7.2	Midiprep	60
4.2.8	Restriktionsverdau	60
4.2.9	Verdau von PCR-Produkten	61
4.2.10	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren (DNA und RNA)	61
4.2.11	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese	61
4.2.12	Gelextraktion von DNA-Fragmenten (Peqlab)	63
4.2.13	DNA-Fällung	63
4.2.14	DNA-Sequenzierung	63
4.2.15	AT-Klonierung von PCR-Fragmenten	65
4.2.15.1	Klonierung in den pCR®2.1-Vektor mit dem TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen)	65
4.2.15.2	Klonierung in den pDrive-Vektor mit dem Qiagen PCR Cloning Kit	66
4.2.16	Klonierung von DNA-Fragmenten	67
4.2.16.1	Gewinnung des Inserts	67
4.2.16.2	Dephosphorylierung des Vektors	67
4.2.16.3	Phosphorylierung der Primer	67
4.2.17	Ligation	68
4.3	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	69
4.3.1	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Thomas und Kornberg	69
4.3.1.1	Herstellung der Gele	69
4.3.1.2	Vorbereitung der Proben	70
4.3.1.3	Elektrophoresebedingungen	70
4.3.1.4	Coomassie-Färbung	71
4.3.1.5	Page Blue™-färbung	71
4.3.1.6	Trocknen von SDS-Gelen	71

4.3.2 Westernblot (Semidry-Elektroblot nach Towbin)	71
4.3.2.1 Proteintransfer auf Nitrocellulose	72
4.3.2.2 Immunreaktion mittels Antikörper-Nachweis	73
4.3.2.3 Detektion über ECL (Enhanced Chemi-Luminescence)	73
4.3.2.4 Entfernen von gebundenen Antikörpern (Strippen)	73
4.3.3 Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion über einen „Overlay-Blot-Assay“	74
4.3.4 Herstellung und Aufreinigung von Histidin-Fusionsproteinen	74
4.3.4.1 Expression von Hexa-Histidin-Fusionsproteinen in Bakterien	74
4.3.4.2 Aufreinigung von Proteinen mit einem Histidin-Tag unter denaturierenden Bedingungen	75
4.3.4.3 Säulenvorbereitung	76
4.3.4.4 Aufschluss der Bakterien	76
4.3.4.5 Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose-Säule	76
4.3.4.6 Protokoll einer Proteinreinigung über „His-Tag“ unter denaturierenden Bedingungen	76
4.3.4.6.1 Aufbereitung der Säulenmatrix	76
4.3.4.6.2 Vorbereiten der Proben für die SDS-Page	77
4.3.4.6.3 Bestimmung der Proteinausbeute	77
4.3.5 Herstellung und Aufreinigung von ungetagten Laminen	77
4.3.5.1 Expression von Laminen in Bakterien	77
4.3.5.2 Aufreinigung der Lamine unter denaturierenden Bedingungen	78
4.3.6 <i>in vitro</i>-Bildung von Laminfilamenten	79
4.3.7 Renaturierung von Proteinen durch Dialyse	80
4.3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration	80
4.3.8.1 BSA-Konzentrationsreihe	80
4.3.8.2 Bradford-Test	80
4.3.9 Extraktion von Proteinen aus Kulturzellen	81
4.3.10 Fällung von Proteinen	81
4.3.10.1 Proteinfällung mit Methanol und Chloroform	81
4.3.10.2 Proteinfällung mit Aceton	82
4.3.11 Salzextraktion von Proteinen aus Kulturzellen	82
4.3.12 Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion über einen „Pull-Down-Assay“	84
4.3.13 Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen über ELISA	85
4.3.13.1 Experimentelles Prinzip	85
4.3.13.2 Auswertung	86
4.4 <i>Methoden der Zellkultur</i>	86
4.4.1 Kultivieren von Zellen	86
4.4.2 Passagieren adhärenter Kulturzellen	87
4.4.3 Einfrieren von Kulturzellen	87
4.4.4 Auftauen von Kulturzellen	87
4.4.5 Verbesserung der Zelladhäsion auf Deckgläschen	88
4.4.6 Behandlung von Kulturzellen mit dem Proteasominhibitor Lactacystein	88
4.4.7 Isolierung von Zellkernen aus Kulturzellen	88
4.4.8 Mengenbestimmung von Partikeln mit der Neubauer-Zählkammer	89
4.4.9 Test der Zellkultur auf eine Kontamination mit Mycoplasmen	89
4.4.10 Transfektion von Kulturzellen	90

4.4.10.1	Transfektion eukaryontischer Zellen mit Effectene™ (Qiagen)	90
4.4.10.2	Transfektion eukaryontischer Zellen mit Lipofectamine™ (Invitrogen)	91
4.4.10.3	Transfektion eukaryontischer Zellen mit FuGene HD™ (Roche Diagnostics)	91
4.4.11	Einleitung der Zell-Differenzierung in Muskelzellen	92
4.5	<i>Licht- und elektronenmikroskopische Methoden</i>	92
4.5.1	Analyse von Fluoreszenzpräparaten am Epifluoreszenzmikroskop	92
4.5.2	Analyse am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM)	92
4.5.3	Lebendbeobachtung von Zellen unter dem Mikroskop	93
4.5.3.1	Herstellung von Lebendbeobachtungskammern	93
4.5.3.2	Analyse unter dem Mikroskop	93
4.5.4	Fixierung von Zellen	93
4.5.4.1	Fixierung mit Formaldehyd-Triton™	93
4.5.4.2	Fixierung mit Methanol-Aceton	93
4.5.5	Indirekte Immunfluoreszenz bei Kulturzellen	94
4.5.6	FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)	95
4.5.6.1	Experimentelles Prinzip	95
4.5.6.2	Durchführung	95
4.5.6.3	Auswertung	96
4.5.7	Analysen mittels Durchflusszytometer	97
4.5.7.1	Experimentelles Prinzip	97
4.5.7.2	Durchführung	97
4.5.7.2.1	Apotosenachweis nach der sub-G1-peak-Methode	97
4.5.7.2.2	Zellmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen	98
4.5.7.3	Auswertung	98
4.5.8	BIFC (Bimolecular fluorescence complementation)	98
4.5.8.1	Experimentelles Prinzip	99
4.5.8.2	Durchführung	99
4.5.9	TUNEL-Assay	99
4.5.10	Nachweis von DNA-Reparatur-Foci	101
4.5.11	Untersuchung der Seneszenz in Kulturzellen	102
4.5.12	Herstellung der Präparate für die Elektronenmikroskopie	102
4.5.12.1	Präparate für morphologische Übersichtsaufnahmen	103
4.5.12.1.1	Lokalisation von transfizierten Zellen	103
4.5.12.1.2	Fixierung, Kontrastierung und Entwässerung der Zellen	103
4.5.12.1.3	Einbettung der Proben in Epon	104
4.5.12.2	Präparate für Immungoldlokalisationen	104
4.5.12.2.1	Antikörperinkubation	104
4.5.12.2.2	Fixierung, Kontrastierung, Entwässerung und Einbettung der Zellen	104
4.5.12.3	Anfertigen der Ultradünnschnitte	104
4.5.12.4	Kontrastierung der Kupfernetzchen	104
4.5.13	Aufnahmen am Transmissions-Elektronenmikroskop	105
4.5.14	negative staining	105
4.5.14.1	Auswertung	105

5	Ergebnisse	106
5.1	Charakterisierung von Fibroblasten mit der Mutation LMNA S143F	106
5.1.1	Aminosäuresequenzvergleich der Stabdomäne im Lamin A/C	106
5.1.2	Morphologische Veränderungen der Fibroblasten mit der LMNA S143F Mutation	107
5.1.3	Die Lokalisation und Expression von Proteinen der inneren Kernmembran in LMNA S143F Fibroblasten ist verändert	110
5.1.4	Chromatin-assoziierte Proteine und Gen-regulierende Proteine in LMNA S143F Fibroblasten sind umverteilt	112
5.1.5	Fibroblasten mit der LMNA S143F Mutation weisen eine erhöhte Anzahl an DNA-Reparatur-Foci auf	116
5.1.6	Die LMNA S143F Mutation beeinflusst die Lokalisation der Nesprin2 Proteine	117
5.1.7	Nesprin2 Giant exprimierende LMNA S143F Fibroblasten zeigen eine normale Zellkernmorphologie	118
5.1.8	Eine Reduktion von Nesprin2 Giant ist an Kerndeformationen von LMNA S143F Fibroblasten nicht nachweisbar	120
5.1.9	Die Lokalisation von Kernproteinen in Nesprin2 Giant reduzierten LMNA S143F Fibroblasten ist verändert	121
5.1.10	Ektopische Expression von LMNA S143F-GFP	122
5.1.10.1	Die Expression von LMNA S143F-GFP induziert den für Patientenfibroblasten charakteristischen Phänotyp	122
5.1.10.2	Die Expression von LMNA S143F-GFP induziert eine abnormale Lokalisation von LAP2α und der transkriptionell aktiven Form der RNA-Polymerase II	123
5.1.11	Fibroblasten mit der LMNA S143F-Mutation zeigen keine erhöhte Apoptoserate	124
5.1.12	FRAP-Analysen zeigen Veränderungen der Mobilität von Lamin S143F	126
5.1.13	Lamin A/C zeigt eine reduzierte Löslichkeit in Fibroblasten mit der LMNA S143F-Mutation	128
5.1.14	Verändertes Bänderungsmuster in Laminfilamenten bei der Formation von Lamin S143F-Parakristallen <i>in vitro</i>	129
5.1.15	Nachweis der Kooperation von Lamin wt und Lamin S143F über Bimolekular Fluorescence Complementation (BiFC) <i>in vivo</i>	132
5.1.16	Untersuchung der Interaktionen von Lamin S143F-Proteinen und -Protofilamenten mit Proteinen der inneren Kernmembran	134
5.2	Charakterisierung von Myoblasten mit der Mutation LMNA R545C	135
5.2.1	Morphologische Veränderungen und abnormale Lokalisation von Lamin A/C und Emerin in LMNA R545C Myoblasten	135
5.2.2	LMNA R545C Myoblasten zeigen eine veränderte Lokalisation von Markern von aktivem und inaktivem Chromatin	138
5.2.3	Die Mutation LMNA R545C induziert eine vorzeitige Seneszenz in Myoblasten	141
5.2.4	Abnormale Aggregation der nukleären Proteasomen in LMNA R545C Myoblasten	142
5.2.5	LMNA R545C Myoblasten weisen eine veränderte Verteilung des CDK-Inhibitors p21 auf	144
5.2.6	Heterochromatin akkumuliert im Zellkern von LMNA R545C Myoblasten	146
5.2.7	LMNA R545C Myoblasten zeigen eine verringerte Effizienz der Zell-Differenzierung und der Formierung von Myotuben	146
5.2.8	Wildtypisches Bänderungsmuster in Laminfilamenten bei der Formation von Lamin R545C-Parakristallen <i>in vitro</i>	149

6	Diskussion	150
6.1	<i>Die Mutation LMNA S143F</i>	150
6.1.1	<i>LMNA S143F</i> Fibroblasten zeigen morphologische Defekte des Zellkerns	150
6.1.2	Einfluss der Mutation <i>LMNA S143F</i> auf die Lokalisation und Funktion von Proteinen der inneren Kernhülle	151
6.1.3	Die Mutation <i>LMNA S143F</i> beeinflusst die Lokalisation der Nesprin2-Proteine	155
6.1.4	Nesprin2 Giant exprimierende <i>LMNA S143F</i> Fibroblasten zeigen eine normale Zellkernmorphologie und Verteilung von Zellkernproteinen	156
6.1.5	Die ektopische Expression von <i>LMNA S143F</i> -GFP ruft den für Patientenfibroblasten charakteristischen Phänotyp hervor	159
6.1.6	Einfluss der Mutation <i>LMNA S143F</i> auf die Struktur und Dynamik der Lamina	159
6.2	<i>Die Mutation LMNA R545C</i>	163
6.2.1	<i>LMNA R545C</i> Myoblasten zeigen morphologische Defekte des Zellkerns	164
6.2.2	Einfluss der Mutation <i>LMNA R545C</i> auf die Lokalisation von Proteinen der inneren Kernhülle sowie von Markern von aktivem und inaktivem Chromatin	164
6.2.3	Myoblasten von Patienten mit der Mutation <i>LMNA R545C</i> zeigen Anzeichen einer Seneszenz und proteasomaler Inhibierung	165
6.2.4	Die Zell-Differenzierung der Myoblasten von Patienten mit der Mutation <i>LMNA R545C</i> ist unterdrückt	166
6.2.5	Einfluss der Mutation <i>LMNA R545C</i> auf die Struktur und Dynamik der Lamina	167
6.3	<i>Abschließende Anmerkungen und Ausblick</i>	168
7	Literaturverzeichnis	170
8	Anhang	184
8.1	<i>Abkürzungen</i>	184
8.2	<i>Oligonukleotide</i>	187

1 Zusammenfassung

Die Lamina ist ein Netzwerk aus Lamin-Proteinen und befindet sich unterhalb der inneren Kernmembran. Die Lamine A/C, die zu den Typ V Intermediärfilamenten gehören, spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität des Zellkernes sowie der Chromatinorganisation, der Transkription, der DNA-Replikation, der Differenzierung und der Genomstabilität. In den letzten Jahren wurden über 200 verschiedene Mutationen im Lamin A/C kodierenden *LMNA* Gen gefunden, die mehr als 10 unterschiedliche Krankheiten, die so genannten Laminopathien, auslösen können. Zu diesen Laminopathien zählen unter anderem die Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD) und das Progerie-Syndrom.

Die Mutation *LMNA* S143F

In dieser Arbeit wurde zunächst die Punktmutation *LMNA* S143F, die in der N-terminalen Domäne des Lamin A/C lokalisiert ist, näher untersucht. Diese Mutation ist der Auslöser von einzigartigen phänotypischen Merkmalen einer frühen Myopathie sowie einer Progerie. Strukturelle Analysen mit dem Elektronenmikroskop ergaben, dass die primären dermalen Fibroblasten der Laminopathie-Patientin morphologisch veränderte Zellkerne hatten, was sich in zahlreichen Bläschenbildungen der Kernmembran äußerte. Die Häufigkeit des Auftretens der Bläschenbildungen korrelierte mit dem Alter der Zellen.

Weiterhin ergaben Immunfluoreszenzanalysen, dass das mutierte Protein Lamin S143F nicht wildtypisch homogen entlang der inneren Kernmembran lokalisierte, sondern an verschiedenen Bereichen der Kernhülle bzw. im Karyoplasma in Form eines „Honigwabenmuster“ akkumulierte. Neben den strukturellen Veränderungen der Zellkernmorphologie konnte gezeigt werden, dass die Verteilung von Kernproteinen mit einer LEM-Domäne, welche wichtig für die Bindung dieser Proteine an Chromatin ist, verändert war. Untersuchungen der Verteilung dieser Proteine ergab, dass zum Einen LAP2 α in 50 % der Patientenzellen nicht mehr im Nukleoplasma nachweisbar war, und zum Anderen die Proteine LAP2 β und Emerin in der Kernmembran ungleichmäßig lokalisiert waren.

Darüber hinaus konnten wir eine Umverteilung von acetyliertem Kern-Histon, ein Marker von Euchromatin, sowie von Histon H1, ein Marker von Heterochromatin, beobachten. Diese abnormale Chromatinorganisation und die daraus resultierende Veränderung der Transkription konnte durch die Misslokalisierung der aktiven Form der RNA-Polymerase II, sowie des transkriptionellen Repressors MeCP2 und des transkriptionellen Regulators Retinoblastoma-Protein bestätigt werden. Weiterhin wurde eine erhöhte Anzahl von DNA-Reparatur-Foci in den Patientenzellen beobachtet, welche ein Zeichen einer dauerhaften Aktivierung von Kontrollpunkten für DNA-Schäden sind. Diese DNA-Schäden sind häufig eine Folge von genomischer Instabilität.

In Abhängigkeit von S143F Lamin A/C konnte in den Patientenfibroblasten eine abnormale Lokalisation der Kernproteine Nesprin2 Giant und den kürzeren Nesprin2-Isoformen nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten wir beobachten, dass eine reduzierte Expression von Nesprin2 Giant eine Rolle bei der Ausprägung der morphologischen Kerndeformationen spielte. Patientenzellen, die Nesprin2 Giant in hohem Maße exprimierten, zeigten keine Deformationen des Zellkerns und eine normale Verteilung verschiedener Kernproteine. Im Gegensatz dazu offenbarten Nesprin2 Giant defiziente Patientenzellen morphologische Defekte des Kernes, sowie Fehllokalisationen des Kernproteins LAP2a und der transkriptionell aktiven Form der RNA-Polymerase II.

Um zu zeigen, dass die Mutation *LMNA* S143F auch tatsächlich Auslöser des für die Patientenzellen charakteristischen Phänotyps war, wurde Lamin A S143F in wildtypischen Fibroblasten ektopisch exprimiert. Immunfluoreszenzanalysen der transfizierten Fibroblasten bestätigten diese Hypothese. Es konnten Kerndeformationen und Misslokalisationen der Proteine LAP2a und der transkriptionell aktiven Form der RNA-Polymerase II beobachtet werden. Auch hier war der Effekt der Expression von ektopischem S143F Lamin A in wildtypischen Zellen abhängig von der Stärke der Expression von Nesprin2 Giant.

FRAP-Analysen *in vivo* und biochemische Proteinextraktionsstudien des S143F-Lamin A/Cs *in vitro* zeigten eine verringerte Mobilität und Dynamik, sowie eine reduzierte Löslichkeit von S143F Lamin A/C gegenüber wildtypischem Lamin A/C. Die Mutation *LMNA* S143F liegt im Außenbereich der coiled-coil-Struktur des Lamins. Dadurch führt der Austausch der neutralen AS Serin durch die große hydrophobe AS Phenylalanin nicht zu einer Störung in der Dimerbildung, sondern zu einer Beeinflussung der Formierung zu Protofilamenten bzw. höheren Strukturen. Dies konnte durch *in vitro* Untersuchungen von rekonstituierten Parakristallen aus S143F Lamin A/C dargestellt werden, die eine Veränderung des transversalen Bänderungsmusters aufwiesen. Eine weitere Frage war, inwieweit sich Homopolymere aus Lamin A S143F bzw. Heteropolymere aus wildtypischem und mutiertem Lamin A *in vivo* bilden. BIFC-Untersuchungen ergaben zum Einen, dass sich Heteropolymere aus wildtypischen Lamin A und mutiertem Lamin A S143F, als auch Homopolymere *in vivo* formen. Darüber hinaus wurde die Lokalisation dieser Homo- bzw. Heteropolymere in der Lamina *in vivo* analysiert. Die Untersuchungen ergaben, dass die Lamin-Heteropolymere, sowie die wildtypischen Homopolymere korrekt in der Lamina lokalisierten. Im Gegensatz dazu beeinflusste die Bildung von mutierten Lamin S143F-Homopolymeren die korrekte Lokalisation dieser in der Lamina, sowie die Kernmorphologie der transfizierten Zellen.

Zusammengenommen zeigen die Resultate, dass die Mutation *LMNA* S143F die Lamin-A-Polymerisation beeinflusst und dadurch die Dynamik und Mobilität der Typ A-Lamine beeinträchtigt. Weiterhin hat die Mutation Einfluss auf die Kernarchitektur und -Protein-

verteilung, die Chromatinorganisation und die Genexpression. Außerdem konnte erstmals nachgewiesen werden, dass das Nesprin2 Giant Protein eine essentielle Rolle in der Pathogenese von Laminopathien einnimmt, indem es die Struktur des Zellkerns verstärkt und als struktureller „Gegenspieler“ zu Lamin A/C fungiert.

Die Mutation *LMNA* R545C

Die Punktmutation *LMNA* R545C, die in der C-terminalen Domäne des Lamin A/C lokalisiert, ist Auslöser eines sehr gravierenden Phänotyps der autosomal dominanten Form der Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (AD-EDMD). Strukturelle Analysen ergaben, dass die primären Myoblasten des EDMD-Patienten morphologisch veränderte Zellkerne haben, was sich, ähnlich wie bei der *LMNA* S143F Mutation, in zahlreichen Bläschenbildungen der Kernmembran äußerte und die Häufigkeit des Auftretens dieser Kerndeformationen mit dem Alter der Zellen korrelierte. Ein Vergleich von deformierten Kernen aus Zellen mit verschiedenen Laminopathie-auslösenden Mutationen wie *LMNA* R545C, *LMNA* S143F und *LMNA* R377H zeigten allerdings, dass die untersuchten Mutationen nicht immer zu gleichen abnormalen Phänotypen der Kernmorphologie, sondern zu divergenten Ausprägungen der morphologischen Kernveränderungen in Patientenzellen führten. Immunfluoreszenzanalysen ergaben, dass auch die Proteine Lamin A/C und Emerin in den Patientenzellen eine fehlerhafte Verteilung aufwiesen und „Honigwabenmuster“ ausbildeten. Darüber hinaus war in mutierten Myoblasten die nukleäre Verteilung von trimethyliertem Histon3 sowie der transkriptionell aktiven Form der RNA-Polymerase II verändert. Diese Resultate weisen auch hier auf eine abnormale Genexpression hin.

Interessanterweise konnte auch eine vom Alter der Zellen abhängige Akkumulation der 20S-Untereinheit des Proteasoms in kleine nukleäre Foci beobachtet werden. Diese Foci kolokalisierten weitgehend mit den promyelotischen Leukämie-Körperchen (PML). In den Patientenmyoblasten war der CDK-Inhibitor p21 stark angereichert, was ein Hinweis auf eine Beeinträchtigung der proteasomalen Funktion ist. Ferner ist die Akkumulation von p21 im Kern von Patientenzellen ein Zeichen einer vorzeitigen zellulären Seneszenz, was durch den Nachweis Seneszenz-spezifischer β -Galaktosidase, der Anhäufung von Heterochromatin in späten Passagen, sowie die 1-2-fache Vergrößerung des Kernvolumens der mutierten Myoblasten bestätigt wurde. Nach Kultivierung der Patientenmyoblasten in Minimalmedium zeigten diese eine eingeschränkte Fähigkeit zur *ex-vivo* Differenzierung zu Myotuben. Dementsprechend war die Expression des Myogenese-spezifischen Transkriptionsfaktors Myogenin, sowie des Proliferationsmarkers hypophosphoryliertes Retinoblastoma-Protein in Patientenmyoblasten nicht korrekt induziert.

Zusammengenommen weisen diese Daten darauf hin, dass auch die Mutation *LMNA* R545C Einfluss auf die Kernarchitektur und -Proteinverteilung, die Chromatinorganisation, Gen-

expression und Funktion des Proteasoms einnimmt. Darüber hinaus beeinträchtigte die Mutation *LMNA* R545C die Fähigkeit zur korrekten Proliferation und Differenzierung der Myoblasten, welches eine potentielle Rolle in der Pathogenese von Laminopathien einnimmt.

Summary

The nuclear lamina is a network of lamin polymers underlying the inner nuclear membrane. The lamins A/C, which are type V intermediate filaments, are involved in the organisation of chromatin, gene regulation, DNA-replication, differentiation and the integrity of the genome. In recent years more than 200 mutations in the lamin A/C coding *LMNA* gene were discovered, which cause more than 10 genetic diseases, collectively termed as laminopathies. These laminopathies include the Emery-Dreifuss-muscular dystrophy (EDMD) and the progeria syndrome.

The mutation *LMNA* S143F

First we observed the S143F lamin A/C point mutation, located in the N-terminal domain of the lamin A/C. This mutation causes a phenotype combining features of myopathy and progeria. Structural analyses revealed that patient dermal fibroblast cells had dysmorphic nuclei containing numerous blebs and lobulations, which progressively accumulated as cell age in culture. The lamin S143F organization was altered, showing intranuclear and nuclear envelope aggregates and often presenting a honeycomb appearance.

Immunofluorescence microscopy showed an altered localisation of proteins, containing a LEM-domain, which is necessary for binding to chromatin. LAP2 α was recovered in the cytoplasm or not detectable in 50 % of the patient cells, whereas LAP2 β and emerin were unevenly localized along the nuclear envelope.

In addition, the intranuclear organization of acetylated histones, a marker of euchromatin and histone H1, a marker of heterochromatin were markedly different in patient cells. The observed abnormal organization of chromatin and the resulting change in transcription were supported by the mislocalization of the transcriptional active form of RNA polymerase II, the transcriptional repressor MeCP2 and the hyperphosphorylated form of the transcriptional regulator retinoblastoma-protein. Furthermore there is an increase in the number of DNA-repair-foci, which is the result of persistently activated DNA damage checkpoints because of a possible compromise in genomic integrity.

Subject to the S143F lamin A/C, there is a reduced expression and an altered distribution of nesprin2 giant and the shorter nesprin2 isoforms in patient fibroblasts. A subpopulation of mutant cells, however, expressing the nesprin2 giant isoform, did not show an overt nuclear phenotype. By contrast, nesprin2 giant deficient cells reveal an aberrant nuclear phenotype and a mislocalization of LAP2 α and the transcriptional active form of the RNA-Polymerase II.

To confirm that the mutation S143F lamin A recapitulates the patient cell phenotype, we ectopically expressed S143F lamin A/C in dermal fibroblasts. No effects were observed by immunofluorescence-analysis in cells, which highly express nesprin2 giant. Overexpression of the mutant lamin A protein had a more severe impact on the nuclear envelope of nesprin2 giant

deficient fibroblasts when compared with wildtype, resulting in nuclear deformations and mislocalizations of the proteins LAP2 α and the transcriptional active form of the RNA-polymerase II. More detailed analyses of the S143F lamin A/C structure by FRAP-analysis *in vivo* and biochemical extraction studies *in vitro* revealed that S143F lamin is less dynamic and dissoluble compared to wildtype lamin A/C. The *LMNA* S143F mutation occupies the surface of the coiled-coil-structure of the lamin A/C. Thus, the structural topology and particularly the substitution by a bulky, hydrophobic amino acid do not affect the lamin A/C dimer structure but rather perturb intermolecular interactions. This was confirmed by *in vitro* analysis of reconstituted paracrystals of lamin A/C, which exhibited an altered transversal stratification-pattern. Beyond that, another question was, whether there is a formation of heteropolymers of wildtype and S143F lamin A/C and a formation of homopolymers *in vivo*. BIFC-analysis confirmed that wildtype and mutated lamins had the capacity to form heteropolymers and homopolymers *in vivo*. Moreover, the wildtype homopolymers and the lamin A/C-heteropolymers localized correctly in the nuclear envelope. In contrast, the formation of the S143F lamin A/C homopolymers influenced their correct localization in the nuclear envelope and lead to an aberrant nuclear morphology.

In summary, our results suggest that the S143F lamin A/C mutation affected lamin-polymerisation, the dynamic of lamin A/C, nuclear envelope architecture and the distribution of nuclear proteins, chromatin organization, gene expression and transcription. Furthermore, our findings implicate a direct involvement of nesprin2 in laminopathies and propose nesprin2 giant as a structural reinforcer at the nuclear envelope.

The mutation *LMNA* R545C

Myoblasts of patients developing a serious form of the autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy (AD-EDMD) in response to the R545C lamin A/C point mutation, located in the C-terminal domain, have been analyzed. Structural analyses revealed that subpopulations of these patient myoblast precursor cells had nuclear structural defects as lobulations, whose frequency increased with cell passages in culture. This overt phenotype was compared to other dysmorphic nuclei from laminopathy-causing mutations like *LMNA* S143F or *LMNA* R377H. These analyses pointed out, that each mutation leads to a specific nuclear phenotype. Immunofluorescence microscopy showed that the organisation of both lamin A/C and its inner nuclear membrane partner emerin were altered, showing a honeycomb appearance too. In addition, the altered distribution of histone H3 trimethylated on lysine 27 and of the transcriptional active form of the RNA polymerase II, markers of inactive and active chromatin domains, respectively, suggest an alteration of gene expression.

Furthermore, our data showed for the first time that in an EDMD context, a progressive accumulation of the 20S proteasomal core subunits into foci that largely colocalized with

promyelocytic leukemia bodies (PML) was obvious, as cells age in culture. Moreover, the impairment of proteasome function, as pointed out by p21 nuclear accumulation, may contribute to the high index of premature cellular senescence we observed in patient cells. Another signal concerning the premature senescence was the accumulation of heterochromatin in late passages and the one- to twofold increase of the nuclear volume of the patient myoblasts. When transferred into low serum medium, patient myoblasts expressing R545C mutated lamin A/C were deficient for *ex-vivo* differentiation into myotubes. Accordingly, the myogenesis transcription factor myogenin and the hypophosphorylated retinoblastoma-protein were not induced properly in patient myoblasts.

These data suggest that the *LMNA* R545C mutation also affected the nuclear envelope architecture and the distribution of nuclear proteins, chromatin organization, gene expression and the proper function of the proteasome. Furthermore, the *LMNA* R545C mutation impaired both proliferation and differentiation capacities of myoblasts precursors as part of the pathogenesis of the AD-EDMD.

2 Einleitung

2.1 Die Kernhülle

Ein Unterscheidungsmerkmal zwischen Eukaryonten und Prokaryonten ist der Zellkern (Nukleus), welcher die genetische Information der Zelle enthält. Die Komplexität des Nukleus besteht nicht nur in der strukturellen Organisation, sondern auch in den vielfältigen Prozessen, die mit diesem prominenten Organell der Zelle assoziiert sind, zu welchen die DNA-Replikation und -Transkription, die mRNA-Prozessierung und die Ribosomen-Biogenese zählen. Neben den Proteinen, die für die gerade genannten Prozesse benötigt werden, befindet sich die genetische Erbinformation des Organismus in Form der Desoxyribonukleinsäure (DNA) im Zellkern. Diese ist mit einer Reihe von Proteinen assoziiert und liegt verpackt als Chromatin vor (Horn und Peterson, 2002). Die Kernhülle dient dabei als Barriere und trennt die im Kern befindlichen Komponenten vom umgebenden Zytoplasma. Die Kernhülle selbst ist eine Struktur bestehend aus einer Lipiddoppelmembranschicht, der äußeren und der inneren Kernmembran (ONM = outer nuclear membrane bzw. INM = inner nuclear membrane), den Kernporenkomplexen (NPC = nuclear pore complex) und der Kern-Lamina. Membranen, innere und äußere Kernhülle, weisen eine biochemisch sehr ähnliche Lipidzusammensetzung auf, unterscheiden sich allerdings im Bezug auf die mit ihnen assoziierten Proteine. Die äußere Kernmembran bildet mit dem rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) eine kontinuierliche Verbindung, wobei die funktionellen Eigenheiten beider Organellen ähnlich sind. Durch dieses Kontinuum von ONM und ER wird die Wanderung größerer Proteine über das Lumen des ER oder die ER-Membran zur Kernhülle hin ermöglicht. Die innere Kernmembran ist mit zahlreichen integralen und peripheren Proteinen assoziiert, über die beispielsweise das Chromatin mit der Kernhülle in Verbindung steht (Worman und Courvalin, 2000; Foisner, 2001). Die Kernhülle wird durch Kernporenkomplexe (NPCs) durchbrochen. Die NPCs sind große Proteinkomplexe, die bei Vertebraten aus geschätzten 50 Einzelproteinen aufgebaut sind. Die molekulare Masse eines einzelnen NPC beträgt etwa 125 MDa (Reichelt et al., 1990; Cronshaw et al., 2002). Über die NPCs ($\varnothing \sim 90$ nm) findet ein Stoffaustausch zwischen dem Nukleoplasma und dem Zytoplasma statt. Mit wenigen Ausnahmen können Moleküle, die eine kleinere Größe als der Porendurchmesser haben, ungehindert diffundieren. Moleküle, die eine größere molekulare Masse als 60 kDa aufweisen, werden aktiv durch die Poren transportiert (Wente, 2000; Hetzer et al., 2005).

Auf nukleoplasmatischer Seite liegt der INM die Kern-Lamina an, ein dichtes proteinöses Netzwerk (Durchmesser etwa 10-50 nm), das hauptsächlich aus Laminen aufgebaut ist, welche zur Familie der Typ V Intermediärfilamente zählen. Die Lamina interagiert mit verschiedenen integralen Proteinen der INM, trägt zur strukturellen Stabilität des Zellkerns bei und spielt

darüber hinaus eine Rolle bei einigen wichtigen Prozessen, die mit dem Zellkern assoziiert sind, wie beispielsweise der DNA-Replikation und Transkription oder der Organisation des Chromatins (Gruenbaum et al., 2003; 2005).

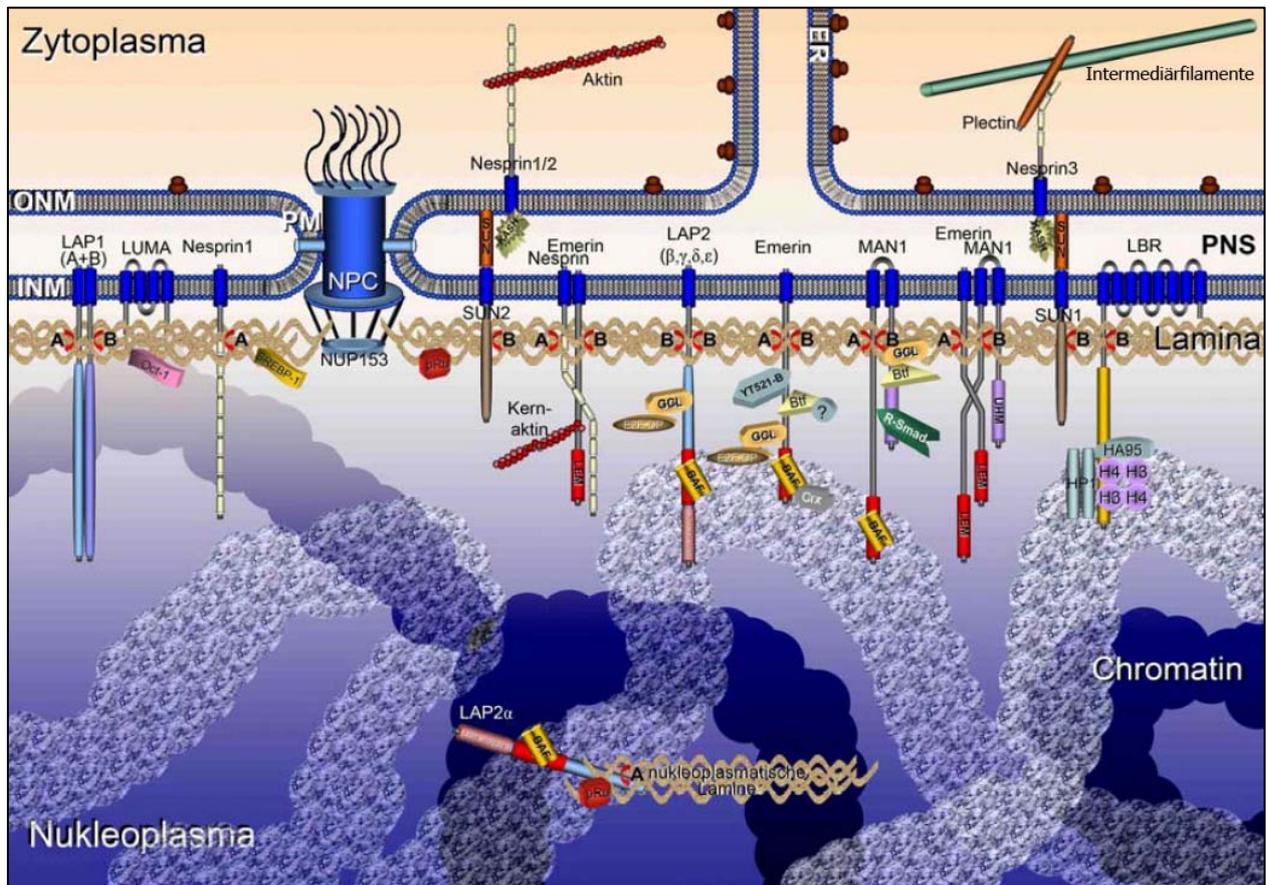


Abb. 2.1: Schematische Representation der Organisation der Kernhülle. Der Querschnitt zeigt die innere und äußere Kernmembran (INM und ONM) sowie die Porenmembran (PM), einen Kernporenkomplex (NPC) und eine Auswahl beteiligter Proteine. Dazu gehören die Lamina, die aus A- und B Typ-Laminen aufgebaut ist, und Proteine, die mit den Kernlaminen assoziiert sind. Als INM-Proteine sind die Lamina-assoziierten Proteine 1 und 2 (LAP1 und 2), LUMA, Nesprin1, SUN1 und -2, Emerin, MAN1, Young Arrest (YA) und der Lamin B Rezeptor (LBR) gezeigt. SUN1 und -2 interagieren mit den ONM-Proteinen Nesprin1/2 bzw. Nesprin3 im perinukleären Spalt (PNS), die wiederum mit Zytoskelettelementen (Aktin oder Intermediärfilamente) assoziiert sind. Einige lösliche Proteine interagieren mit der Lamina oder den nukleoplasmatischen Domänen einiger INM-Proteine und stellen dadurch die Verbindung gewisser Chromatinbereiche an die Kernhülle her. Zu diesen Chromatinlinker-Proteinen gehören der Barrier-to Autointegration Factor (BAF) und das Heterochromatinprotein 1 (HP1). Andere Proteine binden direkt oder indirekt an die Lamina oder an Lamin-assoziierte Proteine (SREBP-1= ‚Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1‘; pRb= ‚Retinoblastoma-Protein‘; E2F-DP-Komplex; GCL= ‚Germ Cell-less‘; YT521-B= Spleißfaktor; Btf= ‚Bcl2-assoziiertes Transkriptionsfaktor‘; R-SMAD= ‚Rezeptor-vermittelte SMAD‘; HA95= homolog zu AKAP95 [= ‚A-kinase anchoring protein 95‘]; H3/H4= ‚Histonprotein 3/4‘) (Foisner, 2001; Roux und Burke, 2006; Abbildung nach Gareiß, 2006).

2.2 Die Kern-Lamina und die Lamine

Eine wichtige Komponente der Kernhülle ist neben ONM, INM und Kernporenkomplexen die Kern-Lamina (siehe 2.1). Hauptstrukturelemente der Kern-Lamina sind die Lamine, die der Familie der Intermediärfilamente zugehörig sind und ein Netzwerk bilden, welches mit der INM assoziiert ist (Gerace et al., 1978; Aebi et al., 1986). Diese Vernetzung wird sowohl durch die Interaktion mit INM-Proteinen, als auch über hydrophobe Wechselwirkungen mit den Porenkomplexen bewerkstelligt (Aaronson und Blobel, 1975; Dwyer und Blobel, 1976; Scheer et al., 1976; Aebi et al., 1986; Foisner, 2001; Krohne et al., 2005). Lamine kommen als „nukleäre

Retikuli“ auch im Nukleoplasma vor, überwiegend kann die Lamina aber als elektronendichte, mit der INM assoziierte Struktur erkannt werden, die eine Schichtdicke von durchschnittlich 10-50 nm aufweist, in seltenen Fällen auch bis zu 60 nm. (Fawcett, 1966; Dwyer und Blobel, 1976; Aebi et al., 1986; Krohne, 1998, Liu et al., 2000).

2.2.1 Die molekulare Struktur der Lamine

Die Lamine bilden die Klasse V der sechs Klassen der IF (Intermediärfilament)-Proteinfamilie. Die IF-Proteine haben molekulare Massen zwischen 60 und 80 kDa und lagern sich zu Filamenten mit einem Durchmesser von 7-12 nm zusammen, aus denen unter anderem Teile des Zytoskeletts aufgebaut sind (McKeon et al., 1986; Stewart, 1993). Die Lamine lassen sich in zwei Gruppen einteilen, die Typ A- und Typ B-Lamine und zeigen wie alle anderen IF-Proteine eine dreigeteilte Molekülstruktur auf.

Der Aufbau der Lamine lässt sich strukturell und funktionell in eine kurze nicht-helikale aminoterminalen Kopfdomäne, eine α -helikale Stabdomäne und einen langen carboxyterminalen Schwanz einteilen. Das C-terminale Ende trägt eine Faltung ähnlich einer Immunglobulin-Domäne (Ig-Faltung; Abb. 2.2).

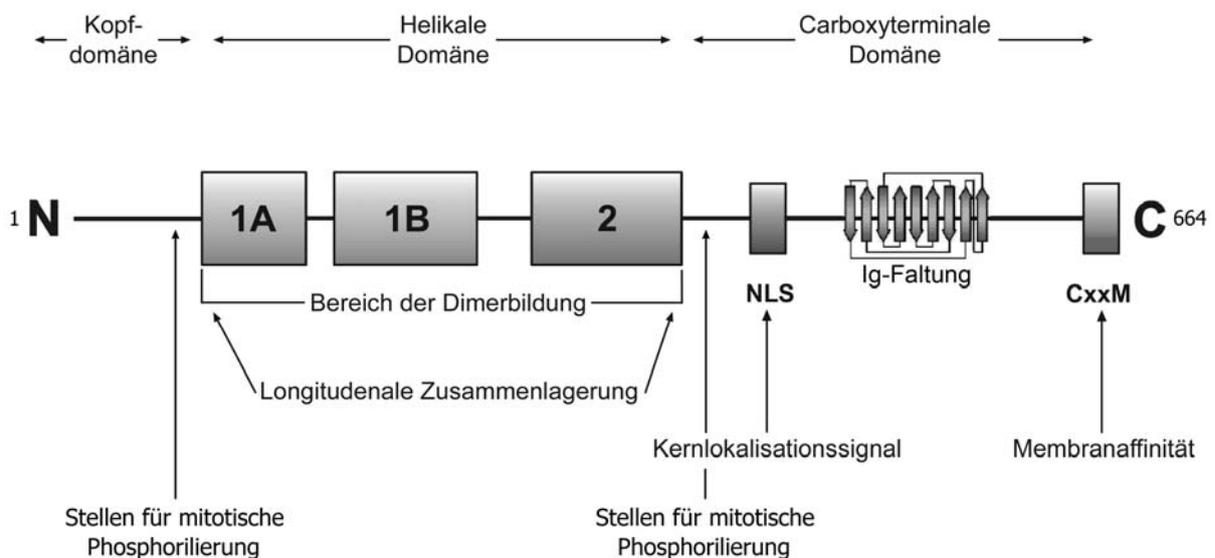


Abb. 2.2: Schemazeichnung eines Lamin-Moleküls. Die Helices 2A und 2B sind zu einer Domäne zusammengefasst. Es sind die wichtigsten Domänen dargestellt, die bei Polymerbildung und Lokalisation des Moleküls in der Kernhülle eine wichtige Rolle spielen (NLS = Kernlokalisations-Signal, „nuclear localisation signal“; Ig=Immunglobulin-Domäne; CxxM = Aminosäuresequenz, beginnend mit Cystein, gefolgt von zwei variablen Aminosäuren und Methionin) (Abbildung nach Krohne, 1998).

Die zentrale Stabdomäne besitzt eine Reihe von Heptadwiederholungen hydrophober Aminosäuren, welche an der Bildung von „coiled-coil“-Strukturen beteiligt und daher charakteristisch für α -Helix-Proteine sind (McKeon 1987; Stuurman et al., 1998). Insgesamt vier α -Helices (1A, 1B, 2A, 2B) werden durch drei hoch konservierte, nicht-helikale Linkerregionen (L1, L2, L3) getrennt. Im Gegensatz zu anderen IF-Proteinen enthalten die Linkerregionen der Lamine keine Proline, welche die Helix aufbrechen, wodurch die α -helikale Anordnung gewähr-

leistet bleibt. Außerdem besitzen die Lamine im Gegensatz zu anderen IF-Proteinen eine um 42 Aminosäuren verlängerte Helix 1B (Sturmann et al., 1998). Aufgrund dieser α -Helices wird die Dimerisierung der Lamine gewährleistet. Die zentrale Stabdomäne wird auf beiden Seiten von Phosphorylierungsstellen flankiert, die während der Mitose von den p34/cdc2 Kinasen phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung resultiert in der Depolymerisation der Lamine und scheint damit den Zusammenbruch der Kernhülle einzuleiten. Diese Phosphorylierung beeinflusst aber lediglich die Polymerisation der Lamine, die Dimerisierung hingegen ist nicht betroffen (Gerace und Blobel, 1980; Newport und Spann, 1987; Heitlinger et al., 1991; Nigg 1992a, b).

Der carboxyterminale Schwanz besitzt ebenfalls zwei wichtige Regionen. Zum einen das Kern-Lokalisations-Signal (NLS = "nuclear location signal"), das die Translokation der Proteinen in den Zellkern ermöglicht (Loewinger und McKeon, 1988) und zum anderen das *CxxM* (C: Cystein; x: variable Aminosäure, M: Methionin) -Motiv am C-terminalen Ende des Proteins. Das *CxxM*-Motiv ist für die Interaktion der Lamine mit der inneren Kernmembran essentiell, reicht aber nicht aus um dort dauerhaft zu halten (Nigg 1992; Hofemeister et al., 2000; Maske et al., 2003).

Aufgrund ihrer strukturellen und biochemischen Eigenschaften, sowie ihres Verhaltens während der Mitose, können die Lamine in Typ A- und Typ B-Lamine unterteilt werden. Die Typ B-Lamine sind während der Entwicklung in allen Stadien und allen Zelltypen zu finden. Das Cystein wird kurz nach der Translation im Zytoplasma farnesyliert, worauf die letzten drei Aminosäuren abgespalten werden. Anschließend folgt eine Methylierung des Cysteins (Moir et al., 1995). Der durch diese Modifikation sehr hydrophobe Carboxyterminus interagiert schließlich mit der Kernmembran. Auch während der Mitose bleiben die Typ B-Lamine über das *CxxM*-Motiv mit der inneren Kernmembran assoziiert.

Im Gegensatz dazu folgt bei Typ A-Laminen in differenzierten Zellen, die ebenfalls ein *CxxM*-Motiv besitzen, noch ein weiterer Prozessierungsschritt. Das modifizierte Cystein sowie weitere 14 Aminosäuren werden durch eine spezifische Protease (ZMPSTE24) proteolytisch abgespalten, was zu einem Verlust der Membraninteraktion führt. Dies gilt auch für Lamin C, einer Spleißvariante des Lamin A, das von vornherein kein *CxxM*-Motiv besitzt. Lamin C kann nur über die Bildung von Heterodimeren mit Lamin A in die Kernhülle integriert werden (Pendas et al., 2002; Vaughan et al., 2001)

Im Nukleus lagern sich die Kopf- und Schwanzdomänen der Dimere longitudinal zusammen, wodurch polare Filamente entstehen, welche sich dann unterhalb der INM antiparallel ausrichten und die fibrilläre Kern-Lamina bilden (Krohne, 1998; Stuurman et al., 1998). Diese Aneinanderlagerung der Dimere wird durch die Randbereiche der zentralen Stäbchendomäne und die ersten 10 Aminosäuren der flankierenden Bereiche erreicht. Im Gegensatz zur variablen

Aminosäuresequenz der Stäbchendomäne sind diese Bereiche hoch konserviert. Mutationen in diesen Bereichen können die Ausbildung der Filamente beeinflussen, nicht aber die Dimerbildung (Stuurman et al., 1998; Strelkov et al., 2002).

Die Einlagerung von neu synthetisierten Lamin-Polymeren in die Kern-Lamina ist noch nicht geklärt. *In vitro* bilden die Lamin-Filamente durch laterale Aneinanderlagerung parakristalline Strukturen mit einem regelmäßigen Muster heller und dunkler Banden, die *in vivo* bisher nur in isolierten Kernhüllen von *Xenopus*-Oozyten in ähnlicher Form gefunden wurden (Aebi et al., 1986; Klapper et al., 1997; Stuurman et al., 1998).

2.2.2 Die Proteinfamilie der Lamine

Wie im vorigen Abschnitt bereits erwähnt, gibt es zwei Subklassen von Kern-Laminen, die Typ A- und die Typ B-Lamine. Sie werden aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften, ihres unterschiedlichen Expressionsmusters und ihres Verhaltens während der Zellteilung unterschieden (Gruenbaum et al., 2003; Gruenbaum et al., 2005).

Typ A-Lamine haben einen neutralen isoelektrischen Punkt und verteilen sich während der Mitose als lösliche Proteine im Zytoplasma. Bei Säugern gibt es vier Typ A-Lamin-Isoformen (Lamin A, C, A Δ 10 und C2), die durch ein einziges Gen (*LMNA*, 1q21) kodiert werden und durch alternatives Spleißen entstehen. Die Typ A-Lamine unterscheiden sich nur in ihren C-terminalen Schwanzdomänen und sind sonst vollkommen identisch (Fisher et al., 1986). Typ A-Lamine werden gewebe- und entwicklungspezifisch exprimiert. Das Lamin C2 kommt exklusiv in Spermien vor. In humanen Zellen kann Lamin A Δ 10 nachgewiesen werden, das sich von normalem Lamin A durch das Fehlen des Exons 10 unterscheidet. Die Funktion bzw. das Expressionsprofil ist bisher allerdings noch unbekannt (Machiels et al., 1996).

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

Die Laminexpression ist speziesabhängig. In Pflanzen, wie z.B. im Reis *Oryza* oder bei *Arabidopsis thaliana* sowie in den Hefen *Schizosaccharomyces pombe* oder *Saccharomyces cerevisiae* konnten bislang keine Lamin-Gene gefunden werden. Man vermutet, dass sich die Lamine während der Evolution beim Übergang von einer „geschlossenen“ zu einer „offenen“ Mitose entwickelt haben. Hefen durchlaufen eine geschlossene Mitose, bei der sich die Mitosespindel im Kern aufbaut und die Kernhülle erhalten bleibt. Vertebraten dagegen haben eine offene Mitose, bei der die Kernhülle in den meisten Fällen aufgelöst wird.

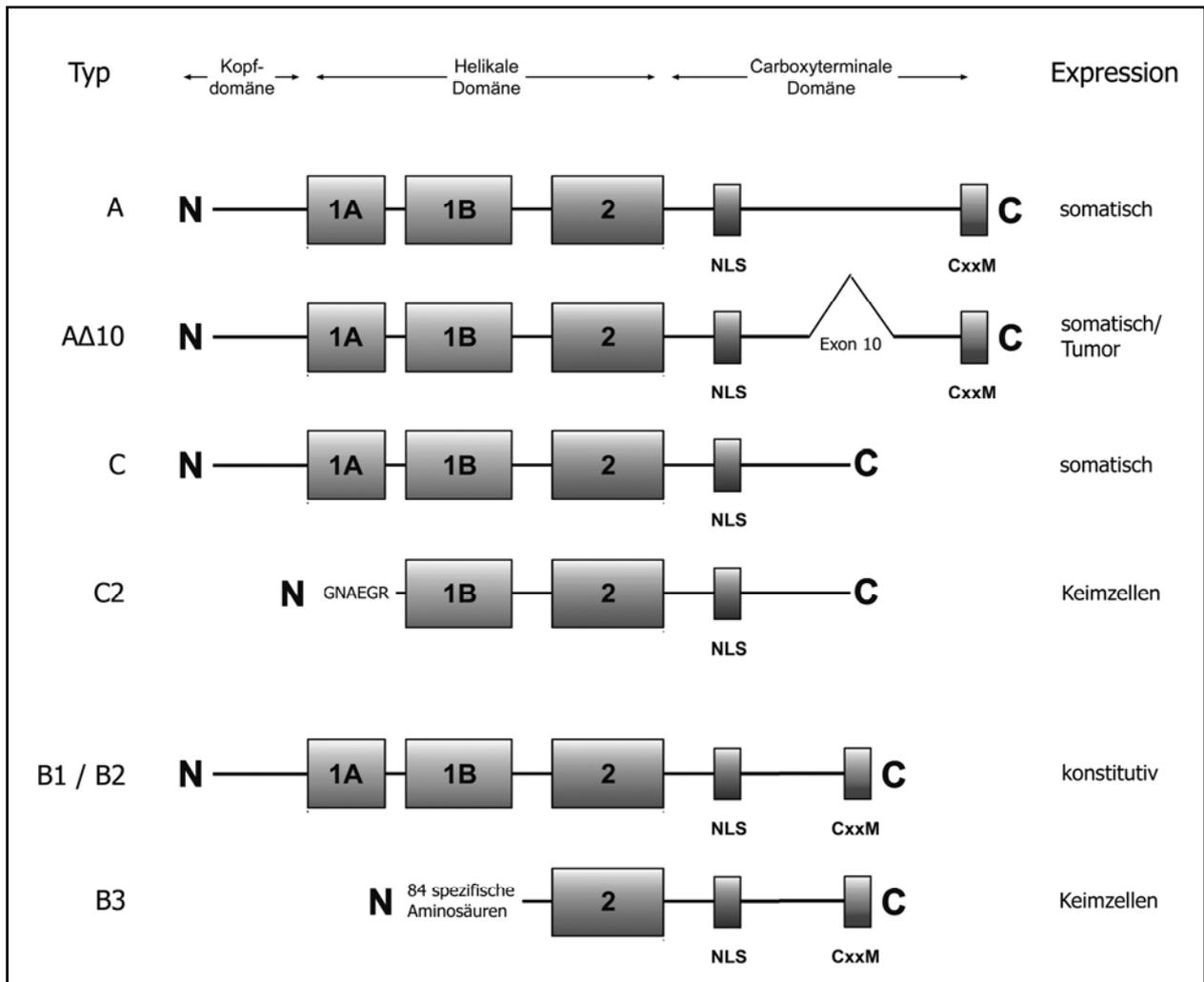


Abb. 2.3: Schematische Übersicht der bekannten Lamin-Isoformen bei Säugern. Die Lamine A und C sind Produkte des Gens *LMNA*, die durch alternatives Spleißen entstehen. Dem Lamin AΔ10 fehlt das Exon 10 im Vergleich zu Lamin A. Lamin C2 ist keimzell-spezifische Variante des Lamin-A-Gens. Die Lamine B1 und B2 sind durch verschiedene Gene kodiert (*LMNB1* bzw. *LMNB2*), Lamin B3 ist eine keimzell-spezifische Spleißvariante des Lamin-B2-Gens (NLS = Kernlokalisations-Signal, „nuclear localisation signal“; CxxM = Aminosäuresequenz, beginnend mit Cystein, gefolgt von zwei variablen Aminosäuren und Methionin) (Abbildung nach Krohne, 1998).

Im Genom des Nematoden *Caenorhabditis elegans* wurde ein Lamin-Gen (*Imn-1*) entdeckt, kodierend für einen Typ B-Lamin das Ce-Lamin (Liu et al., 2000). Bei *Drosophila* dagegen wurden bisher zwei Lamin-Gene entdeckt: ein Typ B-Lamin, *Dm0* und ein Typ A-Lamin, Lamin C (Bossie und Sanders, 1993; Riemer et al., 1995). Wie bereits erwähnt besitzen Säuger drei, andere Vertebraten vier verschiedene Lamin-Gene. Daher kann davon ausgegangen werden, dass im Tierreich ein Zusammenhang zwischen Evolutionsstufe und Komplexität der Kernhülle und damit die Anzahl der Lamin-Gene und ihrer Spleiß-Isoformen, besteht (Gruenbaum et al., 2003).

2.2.3 Die Funktion der Lamine

Es wurde 20 Jahre lang angenommen, dass die Lamine ausschließlich als Hauptstrukturelement der Kernhülle dienen, der sie als filamentöses Netzwerk von innen her anliegen und als mechanische Stütze fungieren. Neben ihrem Einfluss auf die strukturelle Integrität des Zellkerns

wurden in neueren Studien immer mehr zelluläre Vorgänge identifiziert, in die die Lamina involviert ist.

- Die Lamine spielen während der Mitose, sowohl bei der Dissoziation als auch beim Wiederaufbau der Kernhülle, eine wichtige Rolle. Die Dissoziation der Kernhülle wird durch die Phosphorylierung einer Reihe von Proteinen durch eine Zellzyklus-abhängige p34-CDC2-Kinase herbeigeführt. Dazu gehören neben Kernporenkomplexproteinen und Lamin-bindenden Proteinen (LAP1; LBR) auch die Lamine selbst (Dabauvalle und Scheer, 1991; Favreau et al., 1996; Übersicht: Gruenbaum et al., 2003). Durch die Phosphorylierung der Lamine kommt es zur Depolymerisation des Lamin-Netzwerkes, was in einer Auflösung der Lamina und schließlich der Kernhülle resultiert (Gerace und Bloble, 1980; Newport und Spann, 1987). Während die Tochterchromosomen voneinander getrennt werden, sind die Lamine recht mobil, wohingegen die Lamine nach der Kernhüllenrebildung, wenn sie sich wieder zu einem dichten Netzwerk zusammengelagert haben, nahezu immobil sind (Moir et al., 2000c). Durch Immunodepletions- und Mikroinjektions- Experimente von Laminen, denen die aminoterminalen Kopfdomäne fehlte, konnte durch eine Verhinderung des Kernhüllenabbaus nachgewiesen werden, dass Lamine bei dem Zerfall der Kern-Lamina essenziell sind (Lopez-Soler et al., 2001; Spann et al., 1997).
- Ein weiterer wichtiger Prozess, an dem die Lamine beteiligt sind, ist die postmitotische Reorganisation des Kerns sowie der Kernporenkomplexe. In humanen Zellen konnte eine erhöhte Instabilität der Kernhülle sowie eine auffällige Umverteilung der NPCs, die unnormale Aggregate bilden, beobachtet werden, wenn der Lamingehalt in diesen Zellen reduziert ist. Dies führt zu einem vorzeitigen Zelltod (Benavente und Krohne 1986; Dabauvalle et al., 1991; Liu et al., 2000; Schirmer et al., 2001; Schirmer und Gerace, 2004). Auch konnte bei *Drosophila* gezeigt werden, dass eine Inhibierung des Typ B-Lamins (Lamin Dm0) die Verteilung von NPCs beeinflusst (Lenz-Bohme et al., 1997).
- Weiterhin konnte dargelegt werden, dass sich nach Depletion des *Xenopus* Lamin_{III} brüchige Zellkerne bilden, die keine DNA replizieren konnten (Dabauvalle und Scheer, 1991). Nach Zugabe von gereinigtem Lamin_{III} zum depletierten Eiextrakt konnte die Fähigkeit zur DNA-Replikation wiederhergestellt werden (Newport et al., 1990). Besonders interessant ist dabei die Tatsache, dass Lamine neben ihrer Lokalisation an der Kernperipherie auch innerhalb des Nukleoplasmas nachgewiesen wurden (Goldman et al., 1992; Bridger et al., 1993; Moir et al., 1994; Holaska et al., 2003). In diesem Zusammenhang konnte Lamin B1 an den Orten im Nukleoplasma, wo auch DNA-Replikation stattfindet, lokalisiert werden (Moir et al., 1994). Lamine sind auch an DNA-Reparaturprozessen beteiligt. In Kulturzellen, welche mutierte Lamine exprimierten, fehlte in DNA-Reparaturzentren die ATR-Kinase, die eine wesentlichen Komponente der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur ist (Manju et al., 2006).

- Die Lamina hat auch eine wichtige Aufgabe bei der Organisation des Chromatins während der Interphase. Transkriptionell inaktives Heterochromatin ist in vielen Spezies mit der Lamina assoziiert (Fawcett, 1966; Paddy et al., 1990; Gruenbaum et al., 2003). Darüber hinaus konnte eine direkte Interaktion der Lamina mit Chromatin und mit bestimmten DNA-Sequenzen (MARs [= „matrix attachment regions“] und SARs [= „scaffold attachment regions“]) nachgewiesen werden (Luderus et al., 1992, 1994; Taniura et al., 1995; Zhao et al., 1996). In einer neuen Studie wurde gezeigt, dass Chromatin über spezifische DNA-Regionen, den so genannten LADs (**L**amina-**a**ssoziierte **D**omänen), an das Lamina-Protein Lamin B1 bindet. Diese LADs variieren in der Größe von 0,1 bis zu 10 Mb mit einer durchschnittlichen Größe von etwa 0,53 Mb. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Genexpression in Bereichen dieser LADs herunterreguliert war (Guelen et al., 2008). Außerdem interagieren die Lamine indirekt über ihre zahlreichen Wechselwirkungen mit anderen Kernhüllen-Proteinen mit Chromatin und sind auch an anderen Chromatin-assoziierten Prozessen beteiligt. So beeinflussen Lamine durch die Interaktion mit der RNA-Polymerase II und spezifischen Transkriptionsfaktoren die Transkription entsprechender Gene. Auf die RNA-Polymerasen I und III scheinen die Lamine jedoch keinen Einfluss zu haben (Spann et al., 2002). Aber nicht nur die RNA-Polymerasen selbst, sondern auch Transkriptionsfaktoren interagieren mit der Lamina. Ein Beispiel ist das Retinoblastoma-Protein (pRb), das an Typ A-Lamine, an das Lamina-assoziierte Polypeptid 2 alpha (LAP2α) und an den E2f-DP3-Komplex bindet. Erst wenn pRb aus diesem Komplex dissoziiert, werden zellzyklus-abhängige Gene aktiviert (Mancini et al., 1994; Markiewicz et al., 2002, Dorner et al., 2006). Ein weiterer Transkriptionsfaktor ist „Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1“ (SREBP-1) der bei der Cholesterol-Biosynthese in Fettzellen benötigt wird. Durch eine fehlerhafte der Bindung von Typ A- Laminen an SREBP-1 wird eine Degeneration der Adipozyten verursacht (Favreau et al., 2003; Lloyd et al., 2002).

- Die Anzeichen für eine bevorstehende Apoptose, dem programmiertem Zelltod, sind stark kondensiertes Chromatin, blasenförmig Membranen, Auftreten von apoptotischen Körpern, proteolytischer Abbau von Kernhüllen-Proteinen und Fragmentierung der DNA. Die Fragmentierung von DNA und die proteolytischen Degradationsprozesse von integralen Membranproteinen (LAP2β, LAP2α), Kernproteinen (NUP153, POM121) sowie von Laminen erfolgt durch spezifische Cystein-Proteasen, den so genannten Kaspasen (Buendia et al., 1999; Gotzman 2000; Kihlmark et al., 2001). Dabei gehören die Lamine zu den ersten Proteinen die von den Kaspasen angegriffen werden. In Vertebratenzellen konnten als Substrate der Kaspase 6 die Lamine A und C identifiziert werden (Ruchaud et al., 2002). Der Zerfall der Lamina scheint dabei die Ablösung des Chromatins von der Kernhülle und die Fragmentierung der DNA-Moleküle zu bewirken. Anhand von Lamin-Mutanten, die nicht mehr von Kaspasen geschnitten werden konnten, wurde gezeigt, dass sich die Apoptose für mehrere Stunden verzögert (Rao et al.,

Protein	assoziierte Proteine	Domänen	Organismus	Referenz
AKAP149	PP1, PKARII, RNA	TM	Vertebraten	Steen et al., 2000
Bocksbeutel-a	Lamin DmO	LEM	Drosophila	Wagner et al., 2004
Bocksbeutel-B	Lamin DmO	TM	Drosophila	Wagner et al., 2004
Emerin	Lamine A und B, BAF, GCL, MAN1, Actin, Btf	LEM 1 TM	Vertebraten Drosophila C. elegans	Bione et al., 1994
GCL	Emerin, LAP2 β , Chromatin, MAN1	BTB/POZ	Vertebraten	Jongens et al., 1992
LAP1A-C	Lamine A, B1, C	1 TM	Vertebraten	Senior und Gerace, 1988 Foisner und Gerace, 1993 Martin et al., 1995
LAP2α LAP2β-ϵ	Lamine A, B1, C; BAF, GCL, HA95, pRb, Chromatin	LEM 1 TM (β - ϵ)	Vertebraten	Foisner und Gersche, 1993 Harris et al., 1994 Berger et al., 1996
LEM2	Lamin A/C, Emerin, MAN1, BAF	LEM 2 TM	Vertebraten Drosophila C. elegans	Brachner et al., 2005
LBR	Lamin B, HP1, HA95, Histone (H3/H4-Tetramer), DNA	8 TM	Vertebraten Drosophila Seeigel	Worman et al., 1988 Schild-Prüfert et al., 2006
MAN1	BAF, GCL, Btf, Emerin, Lamine A, B1; R-Smads	LEM 2 TM	Vertebraten Drosophila C. elegans	Lin et al., 2000 Wagner et al. 2006
Nesprin1 (α,β) (Syne-1)	Lamin A, Emerin, Unc-84, Actin	Spectrin repeats ? TM	Vertebraten Drosophila C. elegans	Apel et al., 2000 Mislow et al., 2002 Zhang et al., 2001
Nesprin2 (α-γ) (Syne-2; NUANCE)	Lamin A, Emerin, Unc-84, Actin	Spectrin repeats ? TM	Vertebraten Drosophila C. elegans	Padmakumar et al., 2004 Zhang et al., 2002 Zhen et al., 2002
Nesprin3 (α, β)	Plectrin, Intermediärfilamente	Spectrin repeats ? TM	Säuger	Wilhelmsen et al., 2005
Nurim	?	6 TM	Vertebraten Drosophila	Rolls et al., 1999
Otefin	Lamin Dm0, Chromatin	LEM	Drosophila	Padan et al., 1990
p18	Lamin B, LBR		Vertebraten	Simos et al., 1996
RFBP	RUSH	ATP-Bindung 8 oder 9 TM	Säuger	Mansharamani et al., 2001
SUN1 / Matefin	Typ A und B- Lamine	SUN 3 TM	Vertebraten C. elegans	Fridkin et al., 2004 Tzur et al., 2006
SUN2	?	SUN 3 TM	Vertebraten	Schirmer et al., 2003 Hodzic et al., 2004
TMEM43 / LUMA	?	4 TM	Vertebraten Drosophila	Dreger et al., 2001
Unc-83	Unc-84	TM	C.elegans	Starr et al., 2001
Unc-84	Unc-83, ANC-1	TM	C.elegans	Malone et al., 1999
UNCL (= Unc-50)	RNA	RNA Bindung	Säuger C.elegans	Lewis et al., 1987
YA	Lamin Dm0, Chromatin, Histon H2B	Zinkfinger SPKK	Drosophila	Liu et al., 1995 Lopez und Wolfner, 1997
ZYG-12	Matefin/SUN-1, Zentrosomen	TM	Vertebraten Drosophila	Malone et al., 2003

Tab. 2.1: Die Tabelle zeigt eine unvollständige Übersicht bisher bekannter Kernhüllenproteine ohne Berücksichtigung der Kernporenkomplexe. Die verwendeten Abkürzungen bedeuten: TM = Transmembrandomäne; LEM = homologe Domäne, entdeckt in den Proteinen **LAP2**, **Emerin** und **MAN1**; SUN = homologe Domäne, entdeckt in den Proteinen **Sad1** und **Unc-84**; AKAP = „A-kinase anchoring protein“; GCL = „germ cell-less“; LAP = Lamina-assoziiertes Polypeptid; LBR = Lamin B Rezeptor; BAF = „**B**arrier-to-**A**utointegration **F**actor“; pRb = Retinoblastoma-Protein; HP1 = Heterochromatinprotein 1; Unc = „**u**ncoordinated movement“; RFBP = „ring finger binding protein“; HA95 = „homolog zu AKAP95.“

Dabei nimmt die Komplexität der Kernhülle und entsprechend die Anzahl der vorhandenen Kernhüllen-Proteine mit der Stufe der Evolution zu (Übersichten in Dechat et al., 2000; Georgatos, 2001; Gruenbaum et al., 2003). Tabelle 2.1 enthält eine unvollständige Zusammenstellung bisher bekannter Kernhüllen-Proteine, deren Anzahl stetig steigt. Eine Auswahl davon wird im Anschluss näher beschrieben.

2.3.1 Die LEM-Domänen-Proteine

Die LEM-Domäne ist eine konservierte globuläre Domäne, die aus etwa 40 Aminosäuren besteht. Diese Domäne erhielt ihren Namen von den drei Proteinen **LAP2**, **Emerin** und **MAN1**, in denen sie zuerst identifiziert und erstmals von der Gruppe um Jean-Claude Courvalin beschrieben wurde (Lin et al., 2000). Die LEM-Domäne zeichnet sich durch eine kurze N-terminale α -Helix, gefolgt von zwei parallelen α -Helices, welche durch eine 11-12 Reste lange Schleife getrennt werden, aus (Lin et al., 2000; Cai et al., 2001). Die LEM-Domäne ist für die Interaktion des Proteins mit Chromatin wichtig. Dabei erfolgt die Interaktion nicht direkt, sondern wird über ein kleines, ebenfalls hoch konserviertes Protein **BAF** (**B**arrier to **A**utointegration **F**actor) vermittelt, welches für die Interaktion der LEM-Domäne mit Chromatin über Histon- und Linker-Proteine essentiell ist. Aufgrund seiner Fähigkeit, unspezifisch doppelsträngige DNA zu binden, scheint es nicht nur eine wichtige Rolle bei der Chromatinorganisation zu spielen, sondern auch wichtige Funktionen während der Mitose und der Interphase innezuhaben (Furukawa et al., 2003).

Zur wachsenden Familie der LEM-Domänen-Proteine zählen bisher: verschiedene Isoformen von LAP2 (Berger et al., 1996; Dechat et al., 2000), Emerin (Bione et al., 1994), MAN1 (Lin et al., 2000), LEM2 (Branchner et al., 2005), LEM3 (Lee et al., 2000) sowie die *Drosophila*-Proteine Otefin (Ashery-Padan et al., 1997) und Bocksbeutel (Wagner et al., 2004). LEM-Domänen-Proteine interagieren ebenso mit Transkriptionsregulatoren /-faktoren wie GCL (**G**erm **c**ell-**l**ess) oder Btf (**B**CL-2 verwandter **T**ranskriptions**f**aktor). Weiterhin können LEM-Domänen-Proteine mit Typ A- oder Typ B-Laminen assoziieren (Haraguchi et al., 2004; Holaska et al., 2003; Wilkinson et al., 2003; Zastrow et al., 2004).

Im Anschluss werden drei wichtige Proteine der aus der LEM-Familie näher charakterisiert:

2.3.1.1 Die Lamina-assoziierten Polypeptide 1 und 2 (LAP1, LAP2)

Eines der integralen Membranproteine ist das Lamina-assoziierte Polypeptid 1 (LAP1). Es gehört zum Typ II der integralen Membranproteine, der durch einen nukleoplasmatischen Amino-terminus, einer Transmembrandomäne und einen kurzen Carboxyterminus, der im perinukleären Raum lokalisiert ist, charakterisiert wird. Die drei bekannten Formen LAP1A (~75 kDa), LAP1B (~68 kDa) und LAP1C (~55 kDa) sind durch alternatives Spleißen aus dem LAP1-Gen entstanden (Foisner und Gerace 1993; Martin et al., 1995). Im Gegensatz zur LAP1C

Isoform, besitzen die Isoformen LAP1A und LAP1B jeweils ein 27 Aminosäure langes coiled-coil α -Helix Motiv, mit dem eine LAP1-Dimerisierung ermöglicht wird (Martin et al., 1995). Die nukleoplasmatische Domäne aller drei Isoformen scheint sowohl mit der kalziumabhängigen Kinase cdc2, als auch mit den Laminen zu interagieren. Dabei zeigen die einzelnen Isoformen jedoch eine unterschiedliche Affinität zu den Laminen. LAP1A und B besitzen im Gegensatz zu LAP1C eine wesentlich höhere Affinität zu Lamin A/C. Die Expression von LAP1A und LAB1B ist mit der Expression von den Laminen A/C in differenzierten Zellen vergleichbar, zu denen sie ohnehin eine hohe Affinität aufweisen. Somit könnte die Interaktion dieser Proteine eine wichtige Rolle für die Organisation von nukleären Komponenten spielen. Für LAP1C konnte bisher nur eine Interaktion mit Lamin B1 nachgewiesen werden. Die LAP1 Proteine, die in einer geordneten Struktur an der inneren Kernmembran zu finden sind, bleiben auch während der Mitose mit den Membranvesikeln assoziiert (Foisner und Gerace, 1993; Worman und Courvalin, 2000). Das LAP1 konnte bis jetzt nur in Vertebraten gefunden werden, im Gegensatz zu den Lamina-assoziierten Polypeptiden 2 (LAP2).

Die Lamina-assoziierten Polypeptide 2 (LAP2) bilden eine größere Proteinfamilie (früher als Thymeopietine bezeichnet) und gliedern sich durch alternatives Spleißen des Gens *TMPO* (12q22) in eine ganze Reihe von Isoformen auf. Bei der Maus wurden bis zu sieben Isoformen (α , β , β' , δ , ϵ , γ , ζ) (Berger et al., 1996) identifiziert und obwohl beim Menschen erst drei Isoformen (α , β , γ) näher charakterisiert wurden (Harris et al., 1994, 1995), ist es wohl nicht auszuschließen, dass auch hier noch weitere Isoformen existieren. Die LAP2 Proteine sind in allen Vertebraten zu finden. Der strukturelle Aufbau der LAP2 Proteine ist in allen Spezies und fast allen Isoformen ähnlich. Das Protein gliedert sich in eine hoch konservierte 40 Aminosäure umfassende aminoterminal Domäne, die im Nukleoplasma lokalisiert ist und eine carboxyterminale Domäne. Am Ende der carboxyterminalen Domäne befindet sich, mit Ausnahmen der α - und ζ -Isoform der Säuger, eine Transmembrandomäne, die das Protein in der Kernhülle verankert. Nur ein kleiner Rest ragt in den perinukleären Raum, während der Großteil des Proteins im Nukleoplasma zu finden ist. Hier interagiert das LAP2 Protein mit einer Reihe von Kernproteinen. Die aminoterminalen Domänen aller Isoformen sind innerhalb einer Spezies identisch und weiterhin zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert. In ihr befinden sich zwei globuläre Domänen die mit Chromatin interagieren können. Eine dieser Domänen ist das LEM-Motiv und die zweite die „LEM-like“-Domäne. Die „LEM-like“-Domäne zeigt strukturell eine gewisse Homologie zur LEM-Domäne und unterscheidet sich nur in der Abfolge weniger Aminosäuren, kann aber im Unterschied dazu direkt mit Chromatin assoziieren (Furukawa et al., 1998; Cai et al., 2001). Die Assoziation der LEM-Domäne mit Chromatin erfolgt dagegen über BAF. Auch die carboxyterminale Domäne weist eine hoch konservierte Region auf, die in allen Isoformen, außer α und ζ , zu finden ist. Neben der Transmembrandomäne befindet sich hier

eine Lamin-Bindungsdomäne, mit der nicht nur eine Interaktion zur Lamina hergestellt wird, sondern auch der Einbau des Proteins zur inneren Kernmembran gewährleistet ist (Furukawa et al., 1995; Lang und Krohne 2002). Das LAP2 β gehört mit zu den am besten untersuchten Isoformen. Die Interaktion mit der Lamina, die sowohl über die Bindung mit Typ A und B-Laminen erfolgt, hat Einfluss auf das Kernwachstum am Ende der Mitose (Yang et al., 1997). Aufgrund einer zusätzlichen Chromatin-Bindungsdomäne in der β -spezifischen Region (Furukawa et al., 1995) und der Fähigkeit allein oder mit seinem Bindungspartner GCL (Germ cell-less) die Transkription reprimieren zu können (Nili et al., 2001), scheint das LAP2 β nicht nur ein Verbindungsglied zwischen Chromatin und Kernmembran zu sein, sondern auch regulatorische Funktionen bei der Chromatinorganisation zu besitzen. Eine weitere gut charakterisierte Isoform ist das LAP2 α , welches bis jetzt nur in Säugern identifiziert wurde und beim Kern-Assembly, speziellen Abläufen im Zellzyklus, sowie der Apoptose eine Rolle zu spielen scheint (Vlcek et al., 2002). Auch ist es an Differenzierungsprozessen, durch Bindung an das Retinoblastoma-Protein pRb, beteiligt (Dorner et al., 2006; Markiewicz et al., 2002a). Beide Isoformen interagieren mit E2F-Transkriptionsfaktoren und können dadurch die Transkription spezifischer Gene reprimieren (Parise et al., 2006; Somech et al., 2005b).

Mutationen im LAP2-kodierenden *TMPO*-Gen können beim Menschen zu verschiedenen Krankheiten, wie der dilatierten Kardiomyopathie führen (Taylor et al., 2005), welche auch durch Mutationen im *LMNA*-Gen verursacht werden können (Decostre et al., 2005).

2.3.1.2 Emerin

Das 34 kDa große Emerin gehört neben der Gruppe der Lamina-assoziierten Polypeptide 1 und 2 (Furukawa et al., 1995; Martin et al., 1995, Dabauvalle et al.; 1999) und dem Lamin B-Rezeptor (Soullam und Worman, 1993) zu den Typ II integralen Kernmembranproteinen. Emerin (254 AS) ist ein Produkt des *EMD*-Gens, welches auf dem langen Arm des X-Chromosoms nahe dem Telomer Xq28 lokalisiert ist und mit einer Größe von 2100 bp aus 6 Exons besteht (Emery, 2000). In den verschiedenen Geweben zeigt Emerin eine ubiquitäre Verteilung. Orthologe Emerin-Gene konnten beim Nematoden *C. elegans* (Ce-Emerin; Lee et al., 2000) und beim afrikanischen Krallenfrosch *X. laevis* (Xemerin) nachgewiesen werden, wobei Xemerin in den zwei Isoformen Xemerin 1 und 2 auftritt (GareiB et al., 2005).

Emerin gehört neben LAP2 und MAN1 zur Familie der LEM-Domänenproteine (Laguri et al., 2001) und bindet über die 45 Aminosäuren umfassende LEM-Domäne das Chromatin-assoziierte Protein BAF.

Unterschiedliche Untersuchungen haben gezeigt, dass Emerin eine direkte Bindung mit Laminen, wie Lamin B1 und Lamin A/C, eingeht (Fairley et al., 1999; Wilson et al., 2001). Die Bindung an Typ A-Lamine könnte dabei Einfluss auf die Verankerung von Emerin im Kern

nehmen (Sullivan et al., 1999). In mutierten Zellen, in welchen Typ A-Lamin depletiert ist, lokalisiert Emerin im Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Sullivan et al., 1999; Muchir et al., 2003).

Auch eine Interaktion mit dem Nesprin1 α , einer Splicevariante des Nesprin1, konnte nachgewiesen werden (Mislow et al., 2002a). Ebenso wie Lamin A scheint auch Nesprin2 für die korrekte Lokalisation von Emerin in der Kernhülle verantwortlich zu sein, da es in Nesprin2 defizienten Zellen zu einer Fehllokalisierung von Emerin ins ER kommt, was aber keinen Einfluss auf die Lokalisation von Lamin A hat (Libotte et al., 2005).

Emerin kann auch mit Aktin interagieren, ein weiteres wichtiges Molekül bezüglich der Kernhüllarchitektur, welches ebenso im Kern vorkommt (Pederson und Aebi, 2002). Emerin kann *in vivo* globuläres (G-) Aktin (Fairley et al., 1999; Lattanzi et al., 2003) und *in vitro* auch filamentöses (F-) Aktin binden und dieses durch Bindung an die Spitzen der Filamente stabilisieren und somit als Anker für das Aktin-Spektrin-Netzwerk der INM dienen (Holaska et al., 2004). Dieses Emerin-Aktin-Spektrin-Netzwerk ist in der Lage das Lamina-Netzwerk zu stabilisieren (Lattanzi et al., 2003).

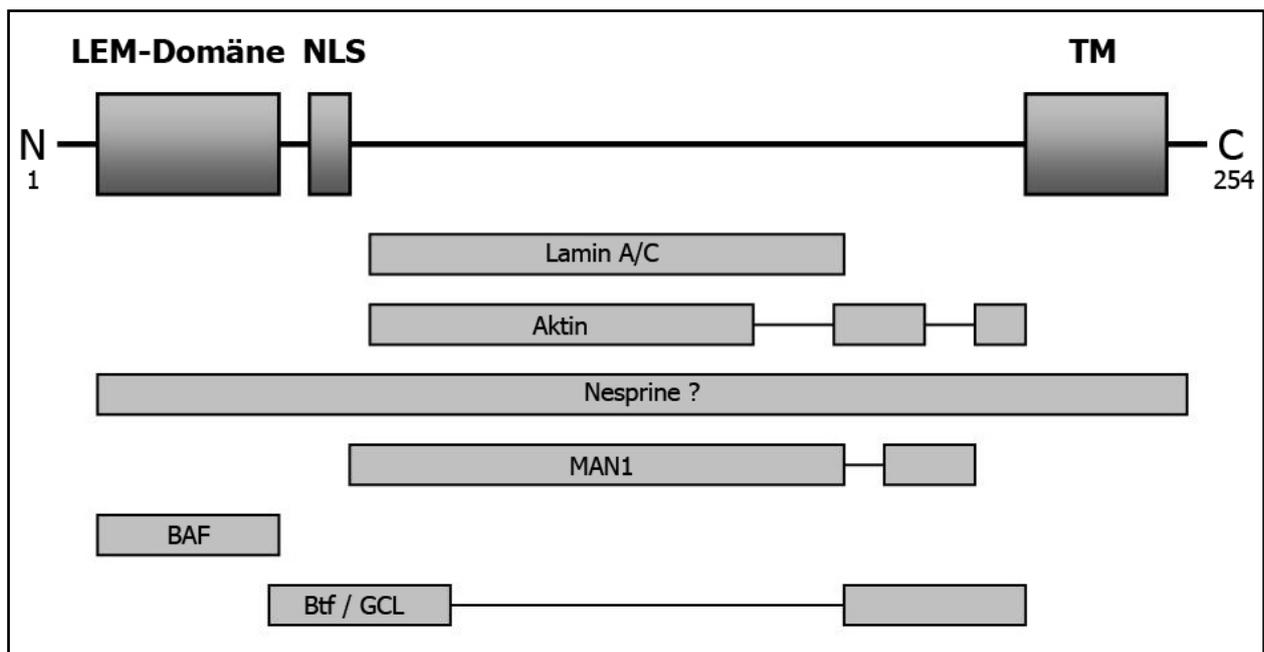


Abb. 2.5: Schematische Übersicht des Emerin-Proteins mit den Bindungsbereichen einiger potentiellen Bindungspartner. Die verwendeten Abkürzungen bedeuten: TM = Transmembrandomäne; LEM = homologe Domäne, entdeckt in den Proteinen **LAP2**, **Emerin** und **MAN1**; NLS = Kernlokalisierungssignal, „nuclear localisation signal“; GCL = „germ cell-less“; BAF = „**B**arrier-to-**A**utointegration **F**actor“; Btf = **BCL-2** verwandter **T**ranskriptionsfaktor) (nach Schlosser et al., 2006).

Weitere Bindungspartner des Emerins sind unter anderem Transkriptionsrepressoren wie Germ cell-less (GCL) (Haraguchi et al., 2001; Holaska et al., 2003) und Btf (**BCL-2** verwandter **T**ranskriptionsfaktor; Haraguchi et al., 2004), die mRNA Spleißfaktoren YT521-B (Wilkinson et al., 2003) und BAF (Lee et al., 2001). Dies deutet darauf hin, dass Emerin in der Gen-

regulierung mit involviert sein könnte. Emerin spielt auch eine Rolle bei der Signaltransduktion, was die Bindung an MAN1 belegt (Liu et al., 2003).

Neueste Studien belegen, dass Emerin über die Bindung an β -Tubulin für die korrekte Positionierung des Zentrosoms an der ONM über Mikrotubuli, unabhängig von der Nesprin2-Expression, beteiligt ist (Salpingidou et al., 2007).

Es gibt Hinweise darauf, dass Emerin in Zellzyklus- und Mitose- und Differenzierungsvorgängen eine Bedeutung hat (Haraguchi et al., 2001). Emerin weist zahlreiche spezifische Phosphorylierungsstellen auf, welche teilweise mit den Bindungsstellen seiner Interaktionspartner übereinstimmen und somit die Bindungsaffinität gesteuert werden könnte. (Schlosser et al., 2006). Diese verschiedenen Phosphorylierungszustände beeinflussen auch die Dissoziation zu BAF und somit zu Chromatin (Hirano et al., 2005).

Seine medizinische Relevanz erlangte das Protein durch die Entdeckung der Emerin Dreifuss-Muskeldystrophie, die durch Mutationen im Emerin-Gen ausgelöst werden kann (Kapitel 2.4.1.1).

2.3.1.3 MAN1

MAN1 wurde ursprünglich durch die Charakterisierung von Antikörpern eines Patienten, der an einer Autoimmunerkrankung leidet, entdeckt (Lin et al., 2000). MAN1 (82 kDa) wird beim Menschen durch das *LEMD3*-Gen kodiert und weist zwei C-terminale Transmembrandomänen auf, mit denen es in der INM verankert ist. In der Nähe des N-Terminus befindet sich die LEM-Domäne, die ins Nukleoplasma ragt und über die es wie die LAPs2 mit BAF und damit assoziierten Proteinen interagieren kann. Daneben besitzt MAN1 am nukleoplasmatischen C-Terminus ein RNA-Erkennungs-Motiv (RRM, *RNA recognition motif*; Birney et al., 1993). Das menschliche Genom kodiert neben MAN1 noch ein strukturell ähnliches Protein, welches LEM2 genannt wird, dem jedoch das RRM-Motiv fehlt (Brachner et al., 2005).

MAN1 besitzt zahlreiche Bindungspartner wie GCL, Btf, und BAF, wodurch ihm zahlreiche Aufgaben in der Genregulation zukommen.

Für MAN1 wurde auch eine direkte Interaktion mit Smad2 und 3 (Lin et al., 2005) und den SMAD-Proteinen 1, 2, 3 und 5 (Pan et al., 2005) nachgewiesen, die bei der Übermittlung von Signalen nach der Bindung von Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie beteiligt sind. MAN1 wirkt hemmend auf diese Signaltransduktionskette und kann somit maßgeblich die Expression SMAD-abhängig exprimierter Gene beeinflussen (Osada et al., 2003; ten Dijke und Hill, 2004).

MAN1 bindet auch an Emerin, Lamine A und B1, was für eine Kernhüll-stabilisierende Funktion spricht und außerdem den Kontakt zur Lamina und Chromatin vermittelt. Diese Gemeinsamkeiten von MAN1 und Emerin lassen auf ähnliche, teilweise überlappende Funktionen beider Proteine schließen (Mansharamani und Wilson, 2005).

Mutationen Im *LEMD3*-Gen sind für sklerosierende Knochendysplasien verantwortlich, die durch Veränderungen der Knochendichte und der Haut charakterisiert sind (Hellemans et al., 2004).

2.3.2 Die SUN-Proteine

Sie SUN-Proteine sind weitere integrale Membranproteine der INM mit vier Transmembransegmenten. Die SUN-Proteine besitzen am Carboxyterminus einen ~200 Aminosäure langen konservierten Bereich, der eine starke Homologie zu dem *Caenorhabditis elegans* UNC-84 Protein und zum Spindelkörper-Protein Sad1p der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* aufweist (Worman und Gundersen, 2006). Dieser Bereich wird als SUN-(**Sad1/UNC-84**-Homologie)-Domäne bezeichnet und lokalisiert in dem perinukleären Spalt zwischen der inneren und der äußeren Kernmembran (Roux und Burke, 2006; Tzur et al., 2006).

Bei Säugern konnten bislang fünf verschiedene Gene identifiziert werden, die für SUN-Proteine kodieren (Crisp et al., 2006; Hodzic et al., 2004). Die Säugerproteine SUN1 und -2 weisen eine ähnliche Topologie wie UNC-84 auf. Das Protein SUN1 kann über dessen nukleoplasmatische Domäne mit dem farnesylierten Prelamin A interagieren. Neuere Studien zeigen, dass SUN1 bei dem Lamina-Assembly eine Rolle spielen könnte (Crisp et al., 2006). In Lamin A/C „Knockout“-Fibroblasten ist die Lokalisation von SUN1 nicht verändert, was dafür spricht, dass SUN1, im Gegensatz zu SUN2, kein Lamin A/C für die korrekte Lokalisierung benötigt. Die Rolle des Lamin Bs ist dabei allerdings noch ungeklärt (Libotte et al., 2005; Padmakumar, 2005).

SUN1 hat weiterhin eine Funktion bei der Verankerung von Nesprin2 in der Kernhülle von Säugern. Dadurch werden zytoplasmatische Nesprine über SUN1 und assoziierten Proteinen als „Brücke“ mit der Kern-Lamina verknüpft (Padmakumar et al., 2005, Starr und Han, 2003). Auch eine Depletierung von SUN2 hat zur Folge, dass Nesprine nicht mehr korrekt in der Kernhülle lokalisiert sind (Crisp et al., 2006; Zhen et al., 2002). Die SUN-Proteine scheinen somit bei der Verknüpfung von nukleoplasmatischen Stützstrukturen mit dem Zytoskelett essenziell zu sein (Worman und Gundersen, 2006).

Mutationen im SUN-Protein UNC-84 führt bei *C.elegans*-Embryonen zu einer unkoordinierten Bewegung („**Uncoordinated Movement**“) und dadurch zum Zelltod. Weiterhin haben SUN-Proteine außerdem eine wichtige Funktion bei der Zellkernpositionierung (Malone et al., 1999).

2.3.3 Die Nesprine

Die Proteinfamilie der Nesprine (**N**uclear **e**nvelope **s**pectrin **r**epeat containing **p**roteins) in Säugetieren gliedert sich auf in Nesprin1 und 2, auch bezeichnet als Myne1 und 2 bzw. Syne1 und 2, und Nesprin3. Die Nesprine repräsentieren eine neue Klasse multifunktionaler Proteine (Starr und Han, 2002; Warren et al., 2005), die durch ihre C-terminale hoch konservierte Typ 2-

Transmembrandomäne („Klarsicht, **ANC-1** und **Syne-Homologie**“ = KASH) in der Kernmembran verankert werden (Padmakumar et al., 2005; Starr und Fischer, 2005; Tzuret al., 2006).

Das humane Gen für Nesprin1 ist auf dem Chromosom 6q25 lokalisiert, das für Nesprin2 auf Chromosom 14q22.1-23.3. Ihre aus einem Gen bestehenden Orthologe werden als Interaptin in *Dictyostelium discoideum*, ANC-1 in *Caenorhabditis elegans* und MSP-300 in *Drosophila melanogaster* bezeichnet.

Die Nesprin-Gene generieren durch alternatives Spleißen verschiedene Isoformen, die in Länge und Domänenarchitektur stark variieren (Warren et al., 2005). Bislang sind für Nesprin1 acht verschiedene Isoformen (Nesprin-1 α 1, Nesprin-1 α 2, Nesprin-1 β 1, Nesprin-1 β 2, Nesprin-1 χ , CPG2, Enaptin-165 und Enaptin) und für das Nesprin2 Protein ebenfalls acht Isoformen (Nesprin-2 α 1, Nesprin-2 α 2, Nesprin-2 β 1, Nesprin-2 β 2, Nesprin-2 χ und NUANCE) bekannt. Die Isoformen Nesprin-2 α 2 Δ TM und Nesprin-2 Δ TM1 bestehen nur aus der aus Spektrinwiederholungen bestehenden Stabdomäne (Zhen et al., 2002). Die verschiedenen Isoformen variieren in ihrer Gewebsspezifität und subzellulären Lokalisierung. Die größte Isoform des Nesprin1 ist das 1014 kDa große Enaptin oder Nesprin1 Giant, die des Nesprin2 das 796 kDa große NUANCE oder Nesprin2 Giant (Padmakumar et al., 2004; Zhen et al., 2002). Diese zwei Isoformen besitzen eine N-terminale Aktin-Bindungsdomäne (ABD), eine große Stabdomäne bestehend aus Spektrinwiederholungen und die C-terminale KASH-Domäne, welche die Verankerung des Zellkerns zum Aktin-Zytoskelett vermitteln. Die ABD-Domänen der Nesprine unterscheiden sich von den herkömmlichen ABDs anderer aktinbindenden Proteine des α -Aktinin-Typs dadurch, dass die beiden CH-Domänen durch eine 30 Aminosäuren lange Serinreiche Linkerregion voneinander getrennt sind, so dass sie eine eigene Familie innerhalb der α -Aktinin Superfamilie bilden.

Im Vergleich dazu besitzt das viel kürzere Nesprin3 keine ABD-Domäne und verbindet die Kernmembran mit dem Intermediärfilamentsystem über eine direkte Interaktion des N-Terminus mit Plektin. Von Nesprin3 sind bisher 2 Isoformen bekannt (Nesprin-3 α und Nesprin-3 β ; Wilhelmsen et al., 2005).

Die kleineren Isoformen der Nesprine befinden sich in der INM und binden unter anderem Emerin und Lamin A, die größeren sind in der ONM lokalisiert und binden, bis auf Nesprin1 Giant und Nesprin2 Giant, Aktin über die Calponin-homologe Domäne (CH).

Wie schon erwähnt, wird Nesprin2 über SUN1 als „Brücke“ in der Kern-Lamina und damit in der Kernhülle von Säugern verankert (Padmakumar et al., 2005, Starr und Han, 2003).

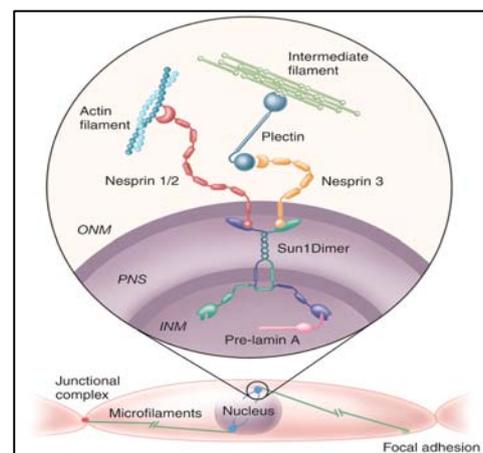
Während die SUN-Domäne somit für die Interaktion mit den Nesprinen sorgt, ragt der aminoterminal Teil von SUN1 in den Kern und interagiert dort mit Laminen. Diese Bindungseigenschaften liegen der Theorie des **L**Inker of **N**ucleoskeleton and **C**ytoskeleton - Komplexes (LINC; Crisp et al., 2006) zugrunde. Komponenten des Zytoskeletts stehen über die Verbindung

von Nesprinen und SUN-Proteinen im perinukleären Raum mit der Kern-Lamina in Kontakt. Dadurch ist eine stabile Positionierung des Kerns in der Zelle möglich und die Stabilität des Kerns wird unterstützt.

Für eine korrekte Lokalisierung der Nesprine wird ein intaktes Lamin A/C Netzwerk benötigt (Libotte et al., 2005; Zhang et al., 2005). Ebenso sind die Nesprine1 α und 2 β essentiell für die Verankerung von Emerin in der INM. Es wurde gezeigt, dass Emerinmutationen, die Auslöser der X-chromosomal-vermittelten Emery Dreifuss-Muskeldystrophie sind, die Interaktion zu den beiden Nesprinen unterbinden (Wheeler et al., 2007). In einer neuen Studie konnte allerdings gezeigt werden, dass eine Depletion der ABD-Domäne bei NUANCE keinen Einfluss auf die korrekte Emerinverteilung hat, auch die Kernhüllenstruktur bleibt intakt (Lüke et al., 2008). Verschiedene Nesprin-Isoformen beeinflussen durch ihre Lokalisation die Organisation und Funktion von Fokaladhäsionen, Sarkoplasmatischem Retikulum, Golgi Apparat und Mitochondrienpositionierung (Star et al., 2002; Pare et al., 2005; Beck 2005).

Die exakten Funktionen der Nesprine sind weiterhin unbekannt.

Abb. 2.6: Schematische Darstellung des Modells für den Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton (LINC) -Komplex. Lamin A/C interagiert mit einem SUN1-Domänen-Protein-Dimer der inneren Kernmembran (INM), welches wiederum im perinukleären Raum (PNS) an die KASH-Domänen der Nesprine der äußeren Kernmembran (ONM) bindet. Über die Aktinbindungsdomäne (ABD) der Nesprine1 und 2 wird eine Verbindung zum Aktinfilamentnetzwerk des Zytoskeletts hergestellt. Nesprin3 interagiert mit den Intermediärfilamenten über Plektrin (Abbildung aus Stewart et al., 2007).



2.3.4 BAF

Der „Barrier-to-Autointegration-Factor“ (BAF) wurde 1998 ursprünglich als zelluläre Komponente entdeckt, welche die Autointegration von retroviraler cDNA ins Wirtsgenom *in vitro* verhindern kann. Es ist ein hoch konserviertes Protein im Reich der Metazoa, zeigt aber keine Homologien zu anderen Proteinen und spielt eine Rolle in der Chromatin-Organisation, dem Kernzusammenbau und in der Regulation der Genexpression (Lee et al., 2001, Segura-Totten und Wilson, 2004).

BAF liegt in Lösung als Dimer vor und bindet unspezifisch über ein „helix-hairpin-helix“ Motiv (HhH-Motiv) an doppelsträngige DNA (Zheng et al., 2000). Die unspezifische Interaktion an die DNA erfolgt über eine Reaktion der Amid-Gruppen der Polypeptidkette mit den Phosphatgruppen der DNA (Umland et al., 2000). BAF bindet die LEM-Domänenproteine LAP2 α/β , Emerin und MAN1 über den zentralen Bereich, wogegen es mit den Chromatin-Proteinen

Histon H3 und dem Linkerhiston H1.1 über zwei spezielle Domänen interagiert (Lee und Craigie, 1998; Mansharamani und Wilson, 2005).

Über die zellulären Funktionen ist noch relativ wenig bekannt. Während der Neubildung der Kernmembran muss BAF an Emerin assoziiert sein, damit Emerin an die Chromosomen binden kann (Lee et al., 2001). In mitotischen HeLa Zellen konnte eine Kollokalisierung des BAF mit Emerin in bestimmten Regionen der Chromosomen nachgewiesen werden (Haraguchi et al., 2001; Segura-Totten et al., 2002). Die Expression einer Mutante des BAF in Kulturzellen verhindert die Assoziation von Emerin und Lamin A mit der sich neu bildenden Kernhülle (Haraguchi et al., 2001). Über das SRV-Motiv ist BAF in der Lage MAN1 trotz dessen depletierter LEM-Domäne zu binden, (Mansharamani und Wilson, 2005). Die gleichzeitige Bindung von LAP2 und DNA *in vitro* (Shumaker et al., 2001) zeigt, dass BAF eine wichtige Rolle in der Regulation nukleärer Funktionen und Organisation spielt. Durch die Bindung an die LEM-Domäne von Proteinen der INM vernetzt das BAF das Chromatin mit der Kernmembran und der Kern-Lamina (Segura-Totten et al., 2002). Diese Interaktionen sind für mitotische Prozesse, sowie für die Chromatin-Dekondensation während der Kernhüllenreuebildung sehr wichtig. Die Herunterregulierung des BAF in *C. elegans* durch RNA interference, resultiert in gravierenden Defekten in der Mitose und in einem embryonalen letalen Phänotyp (Zheng et al., 2000). Durch die Interaktion des BAF mit Transkriptionsfaktoren wie dem Crx (**C**one-**R**od Homeobox) und weiteren Transkriptionsfaktoren der Homöobox-Protein Familie und deren Unterdrückung scheint BAF ebenfalls eine wichtige Rolle in der von gewebespezifischer Genexpression zu spielen (Wang et al., 2003)

2.4 Krankheiten ausgelöst durch Mutationen in Proteinen der Kernhülle

Mutationen in Genen, welche für Lamine oder Lamina-assoziierte Proteine kodieren, führen zu zahlreichen unterschiedlichen Erbkrankheiten, den so genannten „Laminopathien“ oder „Envelopathien“. Die phänotypischen Auswirkungen der verschiedenen Mutationen treten jedoch gewebespezifisch auf, auch wenn dasselbe Gen betroffen ist. So betreffen die klinischen Symptome ausschließlich Herz- und Skelettmuskeln, Fettgewebe, Knochenstrukturen, Haut- und Nervengewebe sowie Kombinationen dieser Gewebe.

Neben den primären Laminopathien (nähere Beschreibung: siehe 2.4.1), die direkt durch Mutationen im *LMNA*-Gen verursacht werden, konnten noch sekundäre Laminopathien entdeckt werden, die durch Mutationen in Lamina-assoziierten Proteinen ausgelöst werden. Zu den sekundären Laminopathien gehören Mutationen im *EMD*-Gen, das für das integrale Membranprotein Emerin kodiert. Diese Mutation verursacht die X-gebundene Form der Emery-Dreifuss Muskeldystrophie (EDMD1; OMIM 310300; Bione et al., 1994). Eine Nonsense-Mutation im *STE24*-Gen, das für die Zink-Metalloprotease ZMPSTE24 (FACE-1) kodiert, führt zu

demselben Phänotyp wie das Hutchinson-Gilford Progerie-Syndrom (Denecke et al., 2006). Zu erklären ist dies dadurch, dass ZMPSTE24 für die posttranslationale Prozessierung des Lamin A-Vorläuferpeptids benötigt wird (Navarro et al., 2004; siehe auch 2.4.1.2). Eine Mutation im *TMPO*-Gen, das für das Lamina-assoziierte Polypeptid 2 kodiert, führt zu einer anderen Envelopathie, der dilatierten Kardiomyopathie (Taylor et al., 2005). Homozygote Mutationen im Gen das für den Lamin B Rezeptor kodiert, können zu der Greenberg Skelettdysplasie (rezessiv vererbt; OMIM 215140) führen (Waterham et al., 2003), wohingegen heterozygote Patienten Symptome einer Pelger-Huët-Anomalie (autosomal dominant vererbt; OMIM 169400) aufweisen (Hoffmann et al., 2002). Beide Erbkrankheiten sind durch Cholesteroldefizite während der frühen Embryogenese gekennzeichnet, die sich in einer geistigen Retardation, cranofacialen Anomalien sowie schweren Defekten in der Knochenbildung manifestieren. Auch führen krankheitsverursachende Mutationen im Kernhüllenprotein MAN1 zu Erkrankungen, die zu Störungen in der Knochenstruktur führen. Zu diesen Envelopathien gehören das Buschke-Ollendorff-Syndrom (OMIM 166700) und die Osteopoikilose (OMIM 166700; Hellemans et al., 2004).

Neueste Studien belegen, dass Mutationen in den Typ B-Laminen zu einer Leukodystrophie, (Mutation im *LMNB1*-Gen; OMIM 169500) oder aber zu dem Barraquer-Simons-Syndrom (Mutation im *LMNB2*-Gen; OMIM 608709) führen können. Die Leukodystrophie ist durch langsam fortschreitenden Myelinschwund im ZNS gekennzeichnet. Der Phänotyp ist ähnlich wie bei Sklerosen, die Krankheit beginnt erst im Erwachsenenalter (Padiath et al., 2006). Patienten, die an dem Barraquer-Simons-Syndrom erkranken, leiden an Fettverlust an Gesicht, Nacken, Thorax, Armen und Oberbauch und massiven Fettansammlungen an Hüften und Beinen, beginnend im Jugendalter (Hegele et al., 2006).

Erkrankung	Vererbung	Phänotyp	Protein	Referenz
Emery-Dreifuss Muskeldystrophie	AR	Langsames Fortschreiten von Kontrakturen und Muskelschwäche, Skelettmuskelschwund und Kardiomyopathie	Lamin A/C	Raffaele di Barletta et al., 2000
	AD	Langsames Fortschreiten von Kontrakturen und Muskelschwäche, Skelettmuskelschwund und Kardiomyopathie	Lamin A/C	Bonne et al., 1999
	X-gebunden	Langsames Fortschreiten von Kontrakturen und Muskelschwäche, Skelettmuskelschwund und Kardiomyopathie	Emerin	Bione et al., 1994 Nagano et al., 1996 Manilal et al., 1998
Gliedergürtel Muskeldystrophie 1B	AD	Langsame progressive Schwächung der Knochengürtelmuskulatur, später Entwicklung von Kontrakturen und Herzstörungen	Lamin A/C	Muchir et al., 2000 Kitaguchi et al., 2001
Hutchinson-Gilford Progerie-Syndrom	<i>de novo</i> Mutation	Vorzeitiges Altern, Kleinwuchs, Haarausfall, Schädel- und Gesichts-Disproportionen, verzögerte Zahnbildung, gealtert-aussehende Haut, Osteoporose und Gelenkprobleme. Früher Tod durch Artherosklerose und Herzgefäßerkrankung	Lamin A/C	Eriksson et al., 2003 De Sandre-Giovannoli et al., 2003

Atypisches Werner'sches Syndrom	AR	Sklerodema-ähnliche Haut, Grauer Star, subkutane Kalzifizierung, frühreife Arteriosklerose, Diabetes mellitus, frühzeitig gealterte Gesichtszüge	Lamin A/C	Chen et al., 2003 Vigouroux et al., 2001
Dilatierte Kardiomyopathie mit Reizleitungsstörung 1A	AD	Dilatierte Kardiomyopathie	Lamin A/C LAP2	Fatkin et al., 1999 Verga et al., 2003 Taylor et al., 2005
Charcot-Marie-Tooth	AR	Motorische und sensorische Neuropathie, Diabetes	Lamin A/C	Tazir et al., 2003
Mandibuloacrale Dysplasie	AD	Postnatale Wachstumsretardation, Schädel- und Gesichts-Anomalien, Skelettverformungen, gesprenkelte Hautpigmentierung	Lamin A/C	Novelli et al., 2002
Dunnigan-Typ familiäre partielle Lipodystrophie	AD	Verlust der subkutanen Fettschicht, Bildung von Fettgewebewucherungen (Gesicht und Hals), Insulinresistenz, Diabetes	Lamin A/C	Cao und Hegele, 2000
Restriktive Dermopathie	AR	Früher neonataler letaler Verlauf. Intra-uterinale Wachstumsverzögerung, feste und steife Haut mit Erosionen, Mineralisierungs-Defekte des Schädelknochens, Lungen-Hypoplasie	Lamin A/C	Navarro et al., 2004
	AD	Früher neonataler letaler Verlauf. Intra-uterinale Wachstumsverzögerung, feste und steife Haut mit Erosionen, Mineralisierungs-Defekte des Schädelknochens, Lungen-Hypoplasie	ZMPSTE24 (FACE-1)	Shultz et al., 2003
Leukodystrophie	AD	langsam fortschreitender Myelinschwund im ZNS, Phänotyp ähnlich wie Sklerosen, Krankheit beginnt in Erwachsenenalter	Lamin B (LMNB1)	Padiath et al., 2006
Barraquer-Simmons-Syndrom	AD	Fettverlust an Gesicht, Nacken, Thorax, Armen und Oberbauch und massive Fettsammlungen an Hüften und Beinen mit Beginn im Kindes- oder Jugendalter	Lamin B (LMNB2)	Hegele et al., 2006
Pelger-Huët Anomalie	AD	Überlobulierte Neutrophilen-Kerne, raues Chromatin, unterschiedliche Grade der Entwicklungsverzögerung, Epilepsie und Skelett-Abnormalitäten	Lamin B Rezeptor	Hoffmann et al., 2002
Greenberg Skelett-Dysplasie	AR	Letaler Verlauf, Hydrops fetalis (Flüssigkeitsansammlungen im Fötus), Kurze Gliedmaßen, abnormale Knorpel-/Knochen-Kalzifizierung	Lamin B Rezeptor	Waterham et al., 2003
Buschke-Ollendorff Syndrom	AD	Dermatofibröse Hautveränderungen mit sklerotische Bereiche in den Knochenenden	MAN1	Debeer et al., 2003 Hellemans et al., 2004

Tab. 2.2: Auflistung aller bisher identifizierten Envelopathien und Laminopathien. Laminopathien zeichnen sich durch Mutationen im Gen für Typ A und Typ B-Lamine und in Genen, die für Proteine der inneren Kernhülle kodieren, aus. Eine Ausnahme bildet die Zink-Metalloprotease ZMPSTE24 (auch FACE-1 genannt), die an der Reifung der Typ A-Lamine beteiligt ist. Die phänotypischen Auswirkungen der verschiedenen Mutationen treten jedoch gewebespezifisch auf, auch wenn dasselbe Gen betroffen ist. So betreffen die klinischen Symptome ausschließlich Herz- und Skelettmuskeln, Fettgewebe, Knochenstrukturen, Haut- und Nervengewebe oder eine Kombination dieser Gewebe. AR = autosomal rezessive bzw. AD = autosomal dominante Erbfolge.

2.4.1 Die primären Laminopathien

Mutationen im Typ A-Lamin kodierenden *LMNA*-Gen verursachen ein großes Spektrum von seltenen aber schweren menschlichen Erbkrankheiten und es konnten etwa 10 verschiedene klinische Syndrome den *LMNA*-Mutationen zugeordnet werden (siehe auch Tab. 2.2). Mutationen im *LMNA*-Gen können in vier verschiedene Gruppen von Erkrankungen mit gegen-

seitigen Überschneidungen eingeteilt werden: Erkrankungen der quergestreiften Muskulatur (1), Erkrankungen des Fettgewebes (2), Erkrankungen des peripheren Nervensystems (3) und Erkrankungen, einhergehend mit vorzeitiger Alterung (4). Zu (1) gehören die dominante Form (EDMD2; OMIM 181350) und die autosomal rezessiv-vererbte Form der Emery-Dreifuss Muskeldystrophie (EDMD3; OMIM 604929), die Gliedergürtel-Muskeldystrophie (LGMD-1B; OMIM 159001) und die dilatierte Kardiomyopathie 1A (DCM1A; OMIM 115200). (2) beinhaltet die familiäre Dunnigan-Typ Partial-Lipodystrophie 2 (FPLD2; OMIM 151660). Die Charcot-Marie-Tooth Typ-2 Erkrankung (CMT2; OMIM 605588) gehört der Gruppe (3) an. Zu (4) sind das Hutchinson-Gilford Progerie-Syndrom (HGPS; OMIM 176670), die angeborene restriktive Dermatopathie (RD, OMIM 275210) und das atypische Werner'sche Syndrom (WRN; OMIM 27700) zuzuordnen. Die Mandibuloacrale Dysplasie (MAD; OMIM 248 370) ist nicht eindeutig einer Gruppe zuzuschreiben (Agarwal und Garg, 2006; Ben Yaou et al., 2005; Gruenbaum et al., 2005; Mattout et al., 2006; Somech et al., 2005a).

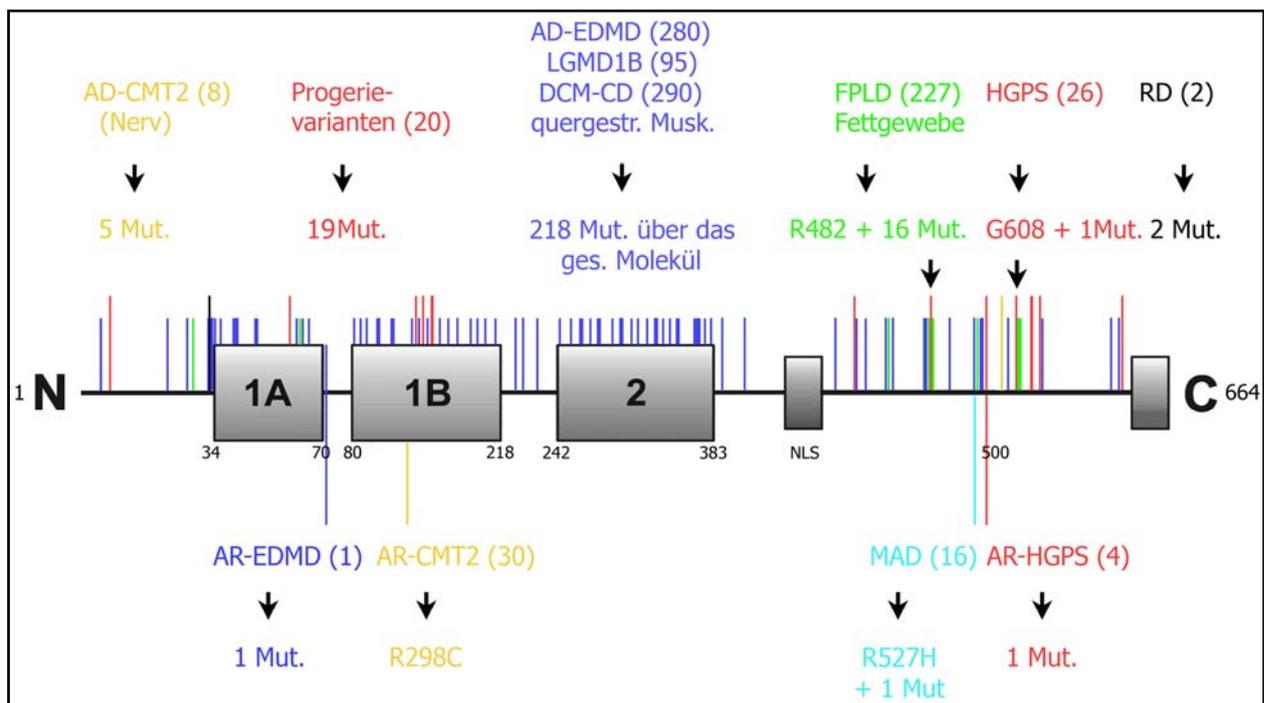


Abb. 2.7: Schematische Darstellung der verschiedenen krankheitsauslösenden *LMNA*-Mutationen. Dominante Erkrankungen sind oben, rezessive unten angeordnet. Die Zahlen in den Klammern geben die Anzahl der Patienten wieder, die den speziellen Phänotypen zuzuordnen sind. NLS: Kernlokalisations-Signal, „nuclear localisation signal“; AR = autosomal rezessive; AD = autosomal dominante Erbfolge; EDMD = Emery-Dreifuss Muskeldystrophie; CMT2 = Charcot-Marie-Tooth Typ-2; LGMD = Gliedergürtel-Muskeldystrophie; DCM = dilatierte Kardiomyopathie; FPLD = Dunnigan-Typ Partial-Lipodystrophie; RD = angeborene restriktive Dermatopathie; HGPS = Hutchinson-Gilford Progerie-Syndrom; MAD = Mandibuloacrale Dysplasie (Abbildung nach Broers et al., 2006)

Die Bedeutung eines völligen Verlustes von Typ A-Laminen konnte man durch genetisch veränderte Säugetiermodelle zeigen. Mit „Knockout“ (KO)-Mäusen, in denen das *LMNA*-Gen ausgeschaltet wurde, konnten die Auswirkungen des kompletten Verlusts der Typ A-Lamine, untersucht werden (Sullivan et al., 1999). Homozygote KO-Mäuse zeigen zur Geburt einen normalen Phänotyp, nach 2-3 Wochen konnte eine signifikante Retardierung des Größen-

wachstums um bis zu 50 % gegenüber gesunden oder heterozygoten Mäusen festgestellt werden. Die Mäuse zeigten Symptome von Muskeldystrophien und Herzerkrankungen, nicht aber von Lypodystrophien (Nikolova et al., 2004; Mounkes et al., 2005). Außerdem konnten geschädigte Nervenzellen beobachtet werden, die zu einer Degeneration der Axone führten. Die Überlebensdauer der *LMNA*^{-/-} Mäuse beträgt nur 8 Wochen (Sullivan et al., 1999). Eine Studie zeigt jedoch, dass Prelamin A und Lamin A zumindest in der Maus entbehrlich zu sein scheinen, da Mäuse, die nur Lamin C exprimieren, einen normalen Phänotyp besitzen (Fong et al., 2006). Abb. 2.7 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Mutationen und die dadurch ausgelösten Erkrankungen. Wie in dieser Übersicht gut zu erkennen ist, lassen sich Erkrankungen einer bestimmten Gruppe von Mutationen keinem bestimmten Bereich des Moleküls zuordnen. Die Krankheits-spezifischen Mutationen sind meist über das ganze Gen verteilt.

2.4.1.1 Die Emery-Dreifuss Muskeldystrophie

Diese Krankheit wurde zuerst von Emery und Dreifuss 1966 ausführlich als eine mild verlaufende Form einer Muskeldystrophie beschrieben (Emery und Dreifuss, 1966). Die X-chromosomal vermittelte Form der Emery-Dreifuss Muskeldystrophie (X-EDMD, OMIM 310300) basiert auf Mutationen im Kernmembranprotein Emerin, ein 34 kDa schweres Produkt des *EMD*-Gens (Bione et al., 1994). Von diesen Mutationen wurden bis heute etwa hundert verschiedene Varianten beschrieben. Diese Mutationen in Bereichen des X-Chromosoms / Xq 28-Gens, führen häufig zu einem vorzeitigem Translationsstopp und damit zu einem verkürztem Protein, oft ohne Transmembrandomäne. Ein pathologischer Effekt tritt allerdings nur in Herz- und Skelettmuskeln auf (Yates et al., 1999). Später wurde die autosomal dominante Form dieser Krankheit (EDMD2 und EDMD3, OMIM 181350) auf eine missense-Mutation des *LMNA*-Gens auf dem Chromosom 1q21, welches Lamin A/C kodiert, zurückgeführt. Verteilt über das ganze *LMNA*-Gen (außer Exon 12) findet man mehr als 180, meist missense-Mutationen, die diese Formen der EDMD auslösen. Zu den EDMD-auslösenden Mutationen gehört auch die in dieser Arbeit behandelte Mutation p.R545C (c.1633C>T) im *LMNA*-Gen. Diese Mutation wurde bisher in nur einem männlichen Patienten gefunden und führte zu einem sehr gravierenden Phänotyp der Erkrankung mit frühzeitigem Verlust der Mobilität, ausgeprägter Skoliose, sowie einer schwerwiegenden Herzinsuffizienz ab dem 18. Lebensjahr. Diese Mutation scheint nicht vererbbar zu sein, da in keinem der anderen untersuchten Familienmitglieder, einschließlich der Mutter, diese Mutation nachgewiesen werden konnte.

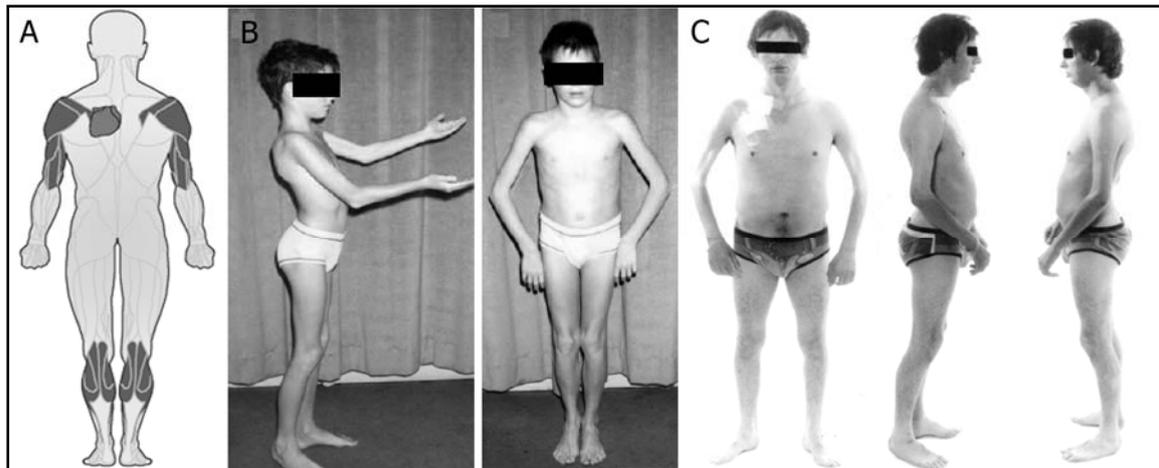


Abb. 2.8: Klinischer Phänotyp von Emery-Dreifuss Muskeldystrophie-Patienten. (A) Betroffene Muskelsegmente: distale bzw. proximale Extremitäten, postcervikale Muskeln. (B) 12-jähriger bzw. 17-jähriger EDMD-Patient mit verkürzten Achilles- und Ellenbogensehnen, sowie proximal beginnendem Muskelschwund an Oberarmen und Unterschenkeln (Abbildungen aus Broers et al., 2006; Emery, 2000).

Erste Symptome der Erkrankung treten in früher Kindheit auf, wobei die inter- oder intrafamiliäre Ausprägung der Erkrankung sehr unterschiedlich sein kann. Die EDMD ist charakterisiert durch folgende klinische Hauptmerkmale (Übersicht: Emery, 1989):

Es sind früh auftretende Kontrakturen der Achillessehnen, Wirbelsäule, Ellenbogen und postcervikalen Muskeln (mit zunehmender Nackensteife) zu beobachten, wie auch progressive Muskelschwäche bzw. -atrophie (in den oberen Extremitäten proximal, in den unteren distal beginnend). Da die Krankheit nur relativ langsam fortschreitet, bleiben die meisten Patienten bis über das 40. Lebensjahr hinaus gehfähig. Die gravierendsten Veränderungen zeigen sich jedoch am Herzmuskel durch Kardiomyopathie und Herzreizleitungsstörungen von Sinusbradycardie bis hin zur Blockade des Herzmuskels, in Kombination mit einer vergrößerten rechten Herzkammer. Die Beeinträchtigung des Herzens tritt etwa ab dem 30. Lebensjahr ein und ist in 40 % der Fälle, ohne Implantation eines Herzschrittmachers, durch plötzlichen Herzstillstand tödlich (Emery, 2000; Yates, 1999; Voit et al., 1988).

Der Phänotyp der AD-EDMD ist ähnlich der der X-EDMD, wobei mehr Frauen betroffen sind und die Ausprägung der Reizleitungsstörungen weniger stark ist. Allgemein tritt diese autosomal-dominante Art der Erkrankung weit weniger oft auf.

Die autosomal-dominante dilatierte Kardiomyopathie 1 (DCM-1A, OMIM 115200) beschränkt sich dagegen die Symptome mit Herzerweiterung und reduzierter systolischer Funktion auf das Herz, die Skelettmuskulatur wird nicht betroffen (Verga et al., 2003).

Die Erkrankung EDMD ist sehr interessant, da die meisten Formen von Muskeldystrophien mit Mutationen in Genen einhergehen, die Strukturproteine kodieren, welche direkt mit dem Sarkolemma assoziiert sind (Dystrophin, Sarcoglycane, Caveolin). Defekte dieser Proteine verursachen eine Zerstörung des Sarkolemma-Proteinkomplexes und dem damit verbundenen Verlust von Muskelproteinen, was die Symptome der Krankheiten erklärt. Bisher ist noch nicht

vollständig geklärt, welche Rolle Kernmembranproteine, die nur wenig mit dem Aufbau des Sarkolemmas zu tun haben, in der Entstehungsgeschichte der EDMD spielen.

2.4.1.2 *Das Hutchinson-Gilford Progerie-Syndrom*

Das Hutchinson-Gilford Progerie-Syndrom (OMIM 176670) wurde erstmalig in der medizinischen Weltliteratur von Jonathan Hutchinson als ein Fall von fehlendem Haar und atrophischen Brustwarzen beschrieben (Hutchinson, 1886). Es ist eine seltene und nur sporadisch auftretende, genetisch bedingte Krankheit (heterozygot, autosomal-dominant bzw. autosomal-rezessiv) die mit einem charakteristischen Erscheinungsbild von frühzeitiger Alterung einhergeht. Die Auftretenswahrscheinlichkeit dieser Krankheit liegt bei ca. 1/8 Mill. und momentan gibt es weltweit etwa 40-50 bekannte Fälle (www.hgps.net). Es wird jedoch vermutet, dass in vielen Ländern Progerie-Fälle falsch diagnostiziert werden.

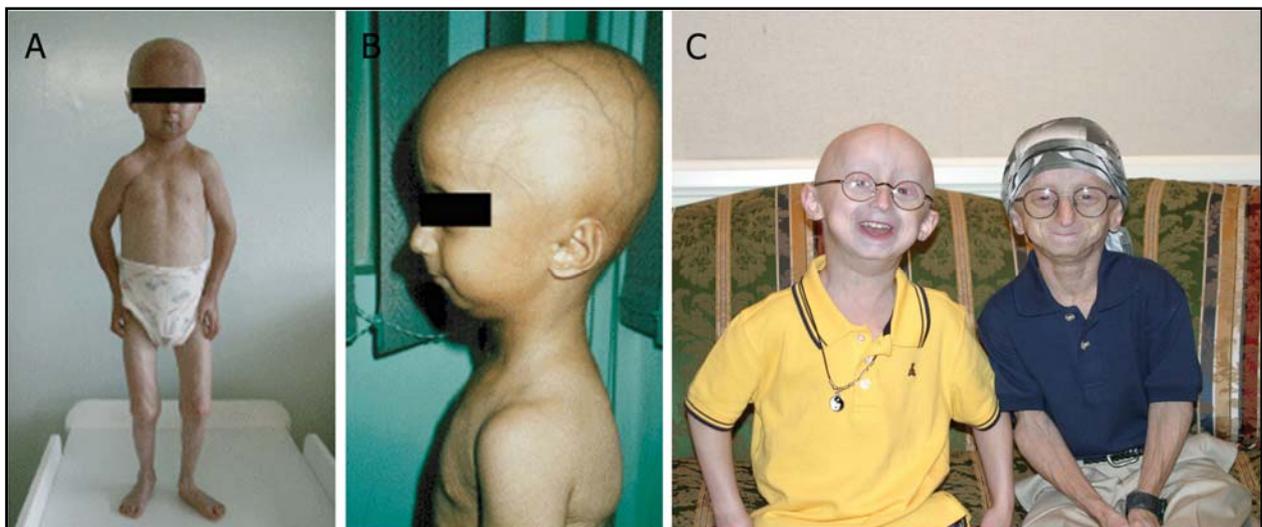


Abb. 2.9: Klinischer Phänotyp von HGPS-Patienten. (A, B, C) Typischer Phänotyp geht einher mit Minderwuchs, geringem Körpergewicht, verkleinertem Brustkorb, dystrophem Schlüsselbein, Coxa valga („Reiter-Haltung“), dünnen Extremitäten, Gesichtszyanose, Gesichtsdisproportion, prominenten Schädelvenen und Augen, Alopezie (A, B, C), Mikrognathie und einer abnormalen Verzahnung (C) sowie einer Verminderung des Unterhautfettgewebes (A). (C) Die Patienten sind 6 und 15 Jahre alt (Abbildungen aus Pereira et al., 2008; Pollex und Hegele, 2004).

Die Pathogenese zeigt einen typischen Verlauf. Bei der Geburt sehen die Kinder normal aus, aber innerhalb der ersten 3 Jahre zeigen sich die ersten Symptome des vorzeitigen Alterns. Häufig entwickeln diese Kinder arterio-sklerotische Veränderungen und sterben durchschnittlich im Alter von 13,5 Jahren an kardiovaskulären Erkrankungen (deBusk, 1972). Der linke Ventrikel ist dabei stark vergrößert und die Gefäße meist völlig verkalkt. Zu den immer auftretenden klinischen Merkmalen gehören eine kleine Statur (Minderwuchs), ein der Größe entsprechend zu geringes Körpergewicht, fehlende sexuelle Reifung, Herzkranzgefäßerkrankungen, Verminderung des Unterhautfettgewebes, verkleinerter Brustkorb, dystrophe Schlüsselbeine, Coxa valga („Reiter-Haltung“), dünne Extremitäten sowie ein schlüpfender Gang. Auch im Gesicht zeigen sich schwerwiegende Veränderungen wie Mikrognathie, Gesichtszyanose, Gesichts-

disproportion, prominente Schädelvenen und Augen sowie abnormale Verzahnung. Häufig vorhanden sind Sklerodermie und eine durchscheinende, trockene faltige Haut, ebenso Haarveränderungen wie Alopezie, fehlende Augenbrauen und Wimpern, eine hohe Stimme und dystrophe Nägel (Wollina et al., 1992). Die durchschnittliche Größe eines Progerie-Kindes ist dabei 110 cm bei einem Gewicht von 14,5 kg (Gordon et al., 2007). Andere Kennzeichen der normalen Alterung wie Linsentrübung, Störungen der kognitiven Fähigkeiten oder eine erhöhte Anfälligkeit für Tumorerkrankungen werden nicht beschrieben.

Zu den häufigsten Mutationen bei Progerie-Kindern gehört die Punktmutation G608G (GGC-GGT), bei der die Base Thymin die Base Cytosin im Exon 11 des *LMNA*-Gens auf dem Chromosom Iq23 ersetzt. Weitere bekannte, aber nur in Einzelfällen vorkommende Mutationen sind G608S (GGC-AGC) und E145K (GAG-AAG) (Eriksson et al., 2003; Pollex und Hegele, 2004). Durch diese Mutationen werden neue Spleißstellen im *LMNA*-Gen eingeführt und dadurch die mRNA um 150 Nukleotide gekürzt. Somit wird ein um 49 AS reduziertes Lamin A-Protein synthetisiert, das so genannte Progerin, welches im Gegensatz zu dem Wildtyp-Lamin A noch die *CxxM*-Box trägt, die normalerweise durch endoproteolytische Spaltung durch die Metalloprotease ZMPSTE24 (FACE1) entfernt wird. Unter anderem wird die Zusammenlagerung der Proteine zu Dimeren bzw. Multimeren gestört, was zu einer instabilen und formveränderten Kernmembran führt (Pollex und Hegele; 2004).

Die restriktive Dermomyopathie (RD) ist eine weitere Erkrankung, die man zu den Krankheiten des vorzeitigen Alterns zählen kann. Diese Krankheit beruht auf einer Mutation in der Protease ZMPSTE24. Dies führt dazu, das Lamin A komplett fehlt; dafür aber farnesyliertes Prelamin A stark angereichert ist (Navarro et al., 2004, 2005)

Zwischen 2004 und 2005 wurde eine neue schwere Form von HGPS und RD entdeckt, die aufgrund dominanter Splicing-Mutationen im *LMNA*- kombiniert mit den bekannten Mutationen im ZMPSTE24-Gen mit einem völligen Verlustes des Exon 11 im *LMNA*-Gen einhergeht (Navarro et al., 2005).

Eine große Anzahl schwerwiegender Erkrankungen des vorzeitigen Alterns beruhen auf veränderten Reparaturmechanismen der DNA. Dazu gehören unter anderem das Werner-Syndrom und das Rothmund-Thompson-Syndrom mit Mutationen in der RecQL2 DNA Helikase oder aber auch die Trichothiodystrophie mit Mutationen in Genen, die Untereinheiten des Transkriptionsfaktors TFIID und TFIIH kodieren (Giglia-Mari et al., 2004). Diese Defekte schließen auf eine wichtige Rolle der DNA-Reparatur im Prozess des Alterns.

Auch wurde bei HGPS nachgewiesen, dass eine Anreicherung von Progerin eine Unterdrückung der Rekrutierung von Faktoren für die DNA-Reparatur zur Folge hat (Liu et al., 2005).

Andere wichtige Mechanismen dieser Krankheit finden durch verschiedene Prozesse statt: Der mechanische Defekt des Zellkerns, ein veränderter Vorgang der Transkription, Veränderungen

der epigenetischen Kontrolle, zelluläre Seneszenz, Defekte im Zellzyklus und in der Mitose, gestörtes Stammzellenwachstum und eine abnormale Regulation der Genexpression und der Differenzierung (Pollex und Hegele; 2004; Perreira, 2008).

Die bisherigen therapeutischen Ansätze zur Linderung der HGPS-Auswirkungen beruhen auf einer Reduktion von Progerin-exprimierenden Zellen sowie der Modifikation der chemischen Eigenschaften der inkorrekt farnesylierten und methylierten Lamin A-Proteine. Dazu gehört die Behandlung von HGPS mit Farnesyltransferase-Inhibitoren (FTIs), was zur Folge hat, dass Progerin nicht mehr mit der Kernmembran assoziiert und die Abnormalitäten der Kernhüllenstruktur reduziert werden (Capell et al., 2005; Mallampalli et al., 2005). Dieser Therapieansatz ist aber nicht unumstritten, da die Behandlung der Zellen mit FTIs auch zu Zellzyklusarrest, durch Inhibition der Chemotrypsin-Aktivität der Proteasomen, führen kann (Efuet und Keyomarshi, 2006).

Auch die atypische Form des Werner Syndroms (OMIM 277700) äußert sich durch vorzeitige Alterung, beginnend in der zweiten Dekade. Eine hohe Tumorinzidenz, Katarakte, Arteriosklerose, Diabetes, Sklerodermie und früher Tod durch Myokardinfarkte (gewöhnlich nach dem 40. Lebensjahr) kennzeichnen dieses Syndrom (Chen et al., 2003). Während bei dem klassischen Werner Syndrom ein Helikase-Exonuklease mutiert ist, kennt man für die atypische Form drei Mutationen im *LMNA*-Gen, die wohl für Störungen der Interaktionen mit anderen Proteinen verantwortlich zeichnen.

2.4.1.3 Die Mutation *LMNA* S143F und die damit verbundene Krankheit

Die Mutation *LMNA* S143F im Lamin A/C-Protein wurde bei einer jungen Patientin entdeckt. Diese einzigartige Erkrankung weist phänotypische Merkmale einer frühen Myopathie, sowie Merkmale von Progerien auf (Kirschner et al., 2005).

Die Symptome in den ersten Monaten nach der Geburt waren progressive Muskelhypertonien und ausgeprägte Schwächungen der Rumpf- und Wirbelmuskulatur, welche zu einer herabgesetzten Kontrolle der Kopfbewegungen führten. Die Kreatinkinasewerte waren um das 4-5fache erhöht, was ein Indiz für den Grad des Muskelverfalls ist. Muskelbiopsien zeigten dennoch keine signifikanten Unterschiede im Aufbau der Muskelfasern, auch konnte keine aktive Degeneration der Muskeln festgestellt werden.



Abb. 2.10: 7-jährige Patientin mit der Mutation *LMNA*-S143F. (Kirschner et al.; 2005)

Durch genetische Untersuchungen konnte ein normaler Karyotyp sowie eine normale Verteilung von Dystrophin diagnostiziert werden. Mit der Magnetresonanzbildgebung wurden Fetteinlagerungen in den Halsmuskeln nachgewiesen. Im Alter von 5 Jahren konnten eine Mittelgesichtshypoplasie und eine allgemeine Osteopenie und Osteolyse - typische Merkmale

des Hutchinson-Gilford Progerie-Syndroms (siehe Kapitel 2.4.1.2) - festgestellt werden (Eriksson et al., 2003). Sowohl die Symptome der Myopathien sowie der allgemeine Muskelschwund verstärkten sich zunehmend und breiteten sich auch auf andere Körperregionen aus.

Dennoch wurden keinerlei Anzeichen des HGPS von kompletter Alopezie, Kontrakturen der Achillessehnen oder Ellenbogen gefunden. Auch konnten zunächst keine kardiovaskulären oder respiratorischen Defizite festgestellt werden. Im Alter von 8 Jahren manifestierten sich allerdings sehr schnell starke arterio-sklerotische Veränderungen; die Patientin verstarb innerhalb von 3 Monaten an kardiovaskulärer Herzinsuffizienz.

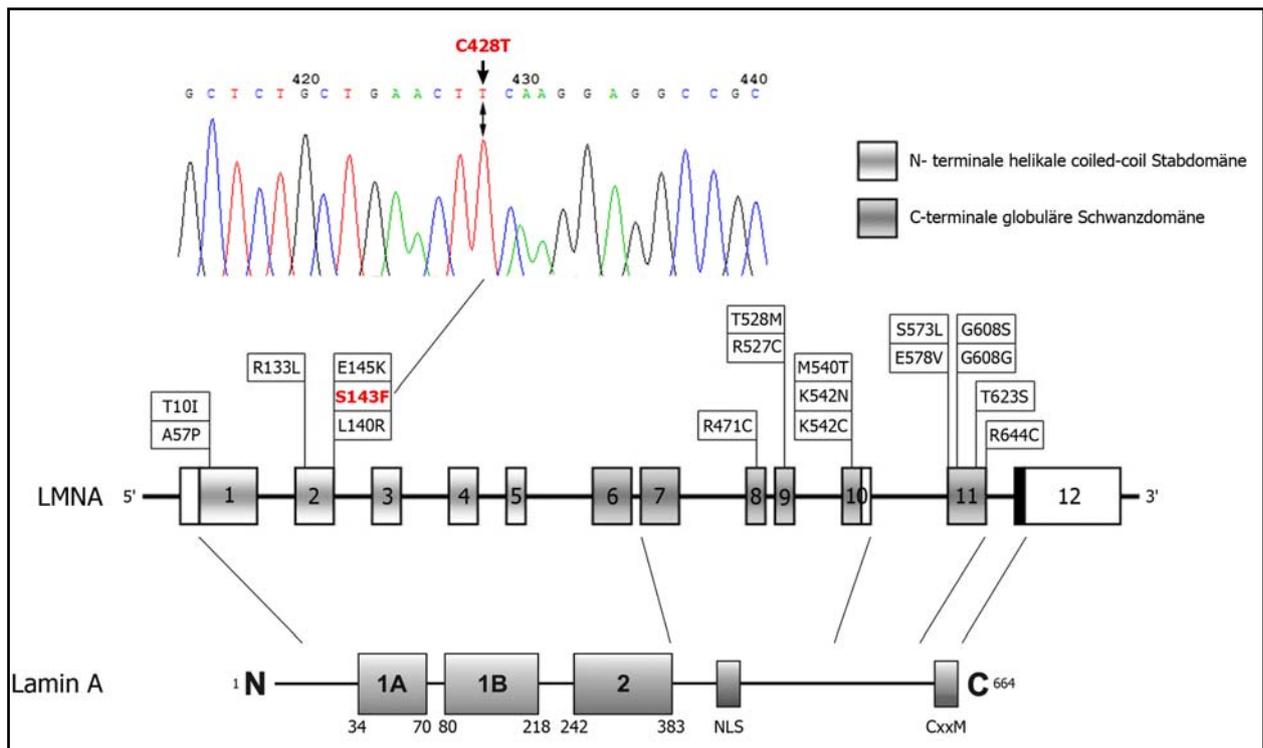


Abb. 2.11: Schematische Illustration von *LMNA*-Mutationen, die das Hutchinson-Gilford Progerie-Syndrom und andere atypische Progerien auslösen. Die Punktmutation in dem Exon 2 (C428T) führt zu einem Austausch von Serin durch Phenylalanin (rot markiert). NLS = Kernlokalisations-Signal, „nuclear localisation signal“; *CxxM* = Aminosäuresequenz, beginnend mit Cystein, gefolgt von zwei variablen Aminosäuren und Methionin.

Diese Erkrankung ist auf eine Variation im Exon 2 des *LMNA*-Gens zurückzuführen. Das Resultat dieser heterozygoten missense-Mutation c.428C>T (TCC>TTC) ist ein Lamin A/C-Protein mit einer AS-Substitution S143F (Serin→Phenylalanin), welche aber nicht zu einer neuen Spleißstelle und dadurch nicht zu einem verkürzten Protein, wie bei dem HGPS, führt. Diese Mutation, die in der helikalen Stabdomäne 1B des Lamin A/C-Proteins liegt, konnte weder bei den Eltern, noch in einer Kontrollgruppe von Polymorphismenträgern festgestellt werden (De Sandre-Giovannoli et al., 2003).

Eine neue Studie berichtet von einer weiteren 6-jährigen Patientin, die dieselbe Mutation im *LMNA*-Gen trägt. Auch der Phänotyp beider Patienten sind ähnlich, nur wurde bei diesem Mädchen bisher noch keine Beteiligung des Herzens festgestellt (Madej-Pilarczyk et al., 2008).

Es sind noch einige weitere Mutationen bekannt, die zu Myopathien in dieser Region des *LMNA*-Gens führen. Die Punktmutation *LMNA* S143P, also ein Austausch derselben AS führt interessanterweise zu einem Phänotyp mit Reizleitungsstörungen im Herzen, aber keiner Beteiligung von Skelettmuskeln (Kärkkäinen et al., 2004), was einen völlig anderen Phänotyp im Vergleich zu der *LMNA* S143F-Variante charakterisiert (Kirschner et al., 2005).

2.4.1.4 Hypothetische Mechanismen der primären Laminopathien

Es konnte bisher noch nicht erklärt werden, warum sich die vielfältigen Laminopathien nur auf spezifische Gewebetypen wie z.B. Fett-, Nerven- oder Muskelgewebe beschränken. Die verschiedenen pathologischen Phänotypen sind nur schwer zu verstehen, da die Mutationen auf einem einzigen Gen lokalisiert sind und die Typ A-Lamine in differenzierten Zellen ubiquitär exprimiert werden. Um die molekularen Mechanismen hinter den Laminopathien zu klären, wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt.

- Das „Strukturmodell“ beschreibt die Auswirkungen der verschiedenen Punktmutationen im *LMNA*-Gen auf den Zusammenbau und die Struktur der Laminfilamente. Diese Defizite im Aufbau der Lamin-Polymere könnten die strukturelle Stabilität der Lamina und somit auch des Zellkerns schwächen. Durch den mechanischen Stress, dem insbesondere die Skelettmuskel- und Herzmuskelzellen ausgesetzt sind, könnte die starke Belastung während jeder Kontraktion in einer Deformierung und Zerstörung der Zellkerne durch induzierte Apoptose resultieren. Die Skelettmuskulatur, die aus einem Syncytium verschiedener Zellen besteht, könnte erst bei Beschädigung sehr vieler Zellkerne betroffen sein, da die Schädigung von nur wenigen Kernen durch verstärkte Proliferation von Myoblasten kompensiert werden könnte (Burke et al., 2001). Diese Theorie könnte Laminopathien erklären, die den quergestreiften Muskel betreffen, wie z.B. EDMD. Aber auch bei HPGS-Patienten konnten morphologische Veränderungen des Zellkerns diagnostiziert werden. Zu diesen Abnormalitäten zählen eine Verdickung der Lamina, eine Aggregation der Kernporenkomplexe, eine Blasenbildung in der Kernhülle und eine Umstrukturierung des Chromatins (Bridger und Kill, 2004; Goldman et al., 2004).

Wie schon erwähnt, interagieren SUN-Proteine über ihre aminoterminalen Domänen mit der Lamina, Nesprinen mit Aktin. Somit stellen die LINC-Komplexe (**L**Inker of **N**ucleoskeleton and **C**ytoskeleton, siehe 2.3.3) eine Verbindung zwischen Kern- und Zytoplasmagerüst dar (Crisp et al., 2006). Über LINC-Komplexe kann mechanischer Stress auf den Kern übermittelt werden, der sich über eine geschwächte Lamina negativ auf die Integrität des Zellkerns auswirken könnte.

Der Effekt eines kompletten „Knockouts“ von Typ A-Laminen konnte in Kernen von *LMNA*^{-/-}-Mäusen gezeigt werden. Die Depletion führte zu einer erhöhten Fragilität des Zellkerns bei starker Zugbelastung. Ebenso konnte eine erhöhte Apotoserate in diesen *LMNA*-„KO“-Zellen nachgewiesen werden (Broers et al., 2004; Lammerding et al., 2004; Manilal et al., 1999).

- Das Modell des veränderten Zellzyklus bzw. Differenzierung basiert auf einer Störung in dem Komplex von Lamin A/C, LAP2a und dem Retinoblastoma-Protein (Rb). Das Rb-Protein steuert Zellzyklus-, Proliferations- und Differenzierungsprozesse über eine Regulation der E2F-Transkriptionsfaktoren. Durch Bindung von Rb an die Lamine in diesem Komplex könnte es vor einem proteolytischen Abbau geschützt werden. Durch gestörte Interaktionen von Lamin A/C mit Rb in diesem Komplex könnten die *LMNA*-Mutationen negative Auswirkungen auf diese Prozesse haben (Dorner et al., 2006; Johnson et al., 2004; Markiewicz et al., 2002). Ein Beleg dafür ist die *LMNA*^{-/-}-Maus, deren Fibroblasten eine verlangsamte Zellzyklusrate, sowie eine erniedrigte Rb-Konzentration zeigen (Johnson et al., 2004). Auch konnte in Muskelzellen eines EDMD-Patienten eine eingeschränkte Differenzierung nachgewiesen werden (Favreau et al., 2004).

- Das „Genexpressions-Modell“ beruht auf einer veränderten Affinität der *LMNA*-Mutanten zu Chromatin, zellspezifischen Bindungspartnern oder Transkriptionsfaktoren und dadurch zu einer Beeinflussung der zelltypischen Genexpression oder bestimmter Signaltransduktionswege (Goldman et al., 2004).

Es ist bekannt, dass Heterochromatin eng mit der Kern-Lamina assoziiert ist (Boyle et al., 2001; Marshall et al., 1996) und somit Mutationen in den Typ A-Laminen diese Wechselwirkungen beeinflussen und dadurch eine Umstrukturierung des Chromatins an der Kernperipherie verursachen könnten (Goldman et al., 2004; Scaffidi und Misteli, 2005). Abwesenheit von Lamin A/C in der Maus führt zu einer veränderten Heterochromatinorganisation (Sullivan et al., 1999). Auch zeigen Patienten mit Laminopathien eine veränderte Chromatinstrukturierung auf (Sabatelli et al., 2001; Fidzianska et al., 2003; Reichert et al., 2004). Weiterhin ist bekannt, dass Lamine in der Lage sind den RNA Polymerase II-Transkriptionskomplex zu inhibieren (Spann et al., 2002).

Außerdem wurden Interaktionen mit transkriptionellen Regulatorproteinen, wie dem schon oben erwähntem Retinoblastoma-Protein (Rb, Markiewicz et al., 2002a), dem Protein „Germ-Cell-Less“ (GCL, Holaska et al., 2003) und dem Sterol-Reduktase-Bindungsprotein-1 SREBP-1 (Lloyd et al., 2002) nachgewiesen. Auch könnten Lamine durch Interaktion mit MAN1 Signalwege über BMB, TGF- β und Aktivin die Genexpression beeinflussen (Feng, 2005). Weiterhin wirkt eine fehlerhafte Lamina auch repressiv auf die DNA-Replikation. Bei *Xenopus* wurde gezeigt, dass es zu einer Misslokalisierung der Elongationsfaktoren wie PCNA und RCF und somit zu einer verminderten DNA-Replikation kommt, falls verkürzte Lamine mikroinjiziert werden (Moir et al., 2000).

- Eine weitere Hypothese zu Erklärung der molekularen Mechanismen bei Laminopathien ist die „ER-Retentionstheorie“. Durch Mutationen im *LMNA*-Gen können Interaktionen mit Kernproteinen und deren Immobilisierung in der INM gestört werden. Dies hat zur Folge, dass diese

Bindungspartner nun über Lipidbilayer frei durch die ONM in das raue Endoplasmatische Retikulum diffundieren und dort die strukturelle und funktionelle Integrität des ER und der Kernhülle verändern könnten. Der Verlust von Lamin A/C kann zu einer fehlerhaften Lokalisation von Emerin im ER führen (Fairley et al., 1999; Fairley et al., 2002). Die Umverteilung der integralen Membranproteine könnte sich auf die enzymatische Aktivität der Proteine der Cholesterol- und Fettsäuren-Synthesen auswirken, welche im ER stattfinden und dadurch durch eine Veränderung des Lipidstoffwechsels der Grund für die auftretenden Symptome der Lipodystrophie sein. Bezüglich der Skelett- und Herzmuskulatur könnte die Freisetzung von Kalzium während der Kontraktionen ebenfalls durch Veränderungen des Sarkoplasmatischen Retikulums negativ beeinflusst werden (Burke und Stewart, 2006).

Es ist sehr unwahrscheinlich, dass eine einzige Hypothese alleine den spezifischen Phänotyp einer Laminopathie erklären kann und somit vereint das „Regenerations-Model“ deshalb die bisherigen Hypothesen (Gotzmann und Foisner, 2005). Dieses beruht darauf, dass alle betroffenen Gewebearten von mesenchymalen Zellen abstammen. Das könnte darauf hinweisen, dass sich Defekte in der Gewebsregeneration aus mesenchymalen Stammzellen (MSC) summieren und dadurch zu einem postnatalen Krankheitsbeginn und einer langsamen Ausprägung des Phänotyps führen. Die Satellitenzellen sind die am besten untersuchten MSCs. Diese Zellen liegen inaktiviert unterhalb der Basalmembran von Muskelfibrillen vor, bis sie durch einen bestimmten Reiz, wie eine Verletzung, beginnen sich zu Myoblasten zu differenzieren (Charge und Rudnicki, 2004). Eine inkorrekte Proliferation oder Differenzierung in diesen Stammzellen, bedingt durch Mutationen in Typ A-Laminen, könnte erst mit der Zeit und mit der notwendig werdenden Regeneration des Muskels in Erscheinung treten. Dadurch könnte sich die unterschiedliche Ausprägung der einzelnen Laminopathien erklären lassen. So belegen auch neuere Studien, dass das Myokard nach einem Infarkt durch multipotente, kardiale Stammzellen regenerieren kann (Laugwitz et al., 2005; Linke et al., 2005; Urbanek et al., 2005), was nach dieser Theorie auch Laminopathien mit Beteiligung des Herzmuskels erklären könnte.

Eine Theorie, die sich nur auf die Laminopathien mit vorzeitiger Alterung wie dem Hutchinson-Gilford Progerie-Syndrom oder der angeborenen restriktive Dermatopathie bezieht, geht davon aus, dass eine Anhäufung von Progerin an der Kernhülle zu Ausprägung dieser Laminopathien führt. Durch Mutationen in einer Spleißstelle des Lamin-Proteins bzw. in der Metalloprotease ZMPSTE24, bleibt das Prelamin A farnesyliert, was sich toxisch auf die Zellen auswirkt und zu morphologischen Strukturveränderungen führt (Gruber et al., 2005). Durch Behandlung der betroffenen Zellen mit einem Farnesyltransferaseinhibitor (FTI) konnten die morphologische Defekte wieder rückgängig gemacht werden (Yang et al., 2005). Diese Anhäufung der farnesylierten Proteine könnte die Reparaturmechanismen bei DNA-Schäden beeinflussen und

somit zu genomischer Instabilität (Liu et al., 2005), oder durch Interaktion mit dem p53-Signalweg, zu beschleunigtem Altern führen (Varela et al., 2005).

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl in den letzten Jahren viele Erkenntnisse über das Lamin A/C-Protein gewonnen werden konnten, ist über die patho-physiologischen Vorgänge bei Laminopathien noch relativ wenig bekannt.

Mit dieser Arbeit sollte erörtert werden, wie sich die Laminopathien-auslösenden Mutationen *LMNA* S143F und *LMNA* R545C auf intrazelluläre Vorgänge auswirken.

Die heterozygote Punktmutation S143F im Lamin A/C und der einzigartige Phänotyp der jungen Patientin verknüpft Merkmale von Muskeldystrophien und Progerien miteinander. Die ebenfalls heterozygote Mutation *LMNA* R545C im Lamin A/C ist hingegen Auslöser der Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie.

Das erste Ziel war es herauszufinden, wie sich diese Mutationen auf die Struktureigenschaften, die Bildung von Filamenten, die Mobilität und die Bindungseigenschaften von Lamin A/C auswirken. Auch sollte erörtert werden, inwieweit die Mutation die Expression und Verteilung verschiedener Kernproteine, die Genexpression und Chromatinverteilung in den Patientenzellen beeinflusst. Weiterhin sollte durch GFP-Fusionsproteine gezeigt werden, ob zelluläre Veränderungen wie in Patientenzellen, auch in wildtypischen Fibroblasten induzierbar sind. Zusätzlich sollte noch analysiert werden, ob Nesprin eine potentielle Rolle bei der Pathogenese von Laminopathien spielt, da Nesprine erst kürzlich in Verbindung mit der Krankheit EDMD gebracht wurden und darüber hinaus ein intaktes Lamin A/C-Netzwerk für eine korrekte Lokalisierung der Nesprine benötigt wird. Ein anderer wichtiger Aspekt dieser Arbeit war der Einfluss der Mutation *LMNA* R545C auf die Differenzierung und Zellproliferation von Myoblasten.

3 Material

3.1 Biologisches Material

3.1.1 Zelllinien

HeLa-Zellen	Humane epitheloide Cervixkarzinomzellen (von Patientin Henrietta Lack; Scherer et al., 1953) , kultiviert bei 37°C, 5 % CO ₂
COS-7-Zellen	<i>Cercopithecus aethiops</i> , Fibroblasten-ähnliche Nierenzelllinie (von CV-1 Zellen der grünen Meerkatze abgeleitet; Gluzman, 1981), kultiviert bei 37°C, 5 % CO ₂
Kontroll-Fibroblasten	Humane Fibroblasten (erhalten von Dr. Wehnert, Institut für Humangenetik, Universität Greifswald), kultiviert bei 37°C, 5 % CO ₂
Kontroll-Myoblasten	Strukturell unauffälliger humaner Skelettmuskel (erhalten von Dr. Wehnert, Institut für Humangenetik, Universität Greifswald); kultiviert bei 37°C, 5 % CO ₂
G-12660-Zellen	Humane Fibroblasten, mit der Punktmutation p.S143F in dem <i>LMNA</i> -Gen (von der Patientin G-12660 mit Progerie / EDMD; erhalten von Dr. Wehnert, Institut für Humangenetik, Universität Greifswald); kultiviert bei 37°C, 5 % CO ₂
G-11220-Zellen	Humane Myoblasten, mit der Punktmutation p.R545C in dem <i>LMNA</i> -Gen (von dem Patienten G-11220 mit EDMD; erhalten von Dr. Wehnert, Institut für Humangenetik, Universität Greifswald); kultiviert bei 37°C, 5 % CO ₂
G-12651-Zellen	Humane Myoblasten, mit der Punktmutation p.R453W in dem <i>LMNA</i> -Gen (von dem Patientin G-12651 mit EDMD; erhalten von Dr. Wehnert, Institut für Humangenetik, Universität Greifswald); kultiviert bei 37°C, 5 % CO ₂
G-13556-Zellen	Humane Myoblasten, mit der Punktmutation p.406delTT in dem <i>ST4</i> -Gen (von dem Patientin G-12651 mit EDMD; erhalten von Dr. Wehnert, Institut für Humangenetik, Universität Greifswald); kultiviert bei 37°C, 5 % CO ₂

3.1.3 Zellkulturmedien

Komplettmedium für COS-7/HeLa-Zellen:

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

in DMEM (Dulbecco´s modified eagle´s medium; Eurobio, Biotechnology)

Komplettmedium für Kontroll-Fibroblasten:

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

in DMEM (Dulbecco´s modified eagle´s medium; Eurobio, Biotechnology) High Glucose

Komplettmedium für Kontroll-Myoblasten/G-11220/G-13556/G12651-Zellen:

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

in Skeletal Muscle Cell Growth Medium "low Serum" (Promocell)

Komplettmedium für G-12660-Zellen:

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

in MEM (Minimum essential medium; Invitrogen)

Differenzierungsmedium für Myoblasten:

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

in Skeletal Muscle Cell Growth Medium "low Serum" (Promocell)

3.1.4 Bakterienstämme

One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*

Chemisch kompetente Zellen, die im TOPO TA Cloning® Kit der Firma Invitrogen enthalten sind, wurden für Transformationen mit TOPO® cloning reactions verwendet. Mit geeignetem Plasmid ist eine blau-weiß-Selektion der Klone möglich.

Genotyp: *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*

XL1-Blue Competent Cells *E. coli*

Diese chemisch kompetenten Zellen der Firma Stratagene wurden zum Vermehren von Plasmiden verwendet. Mit geeignetem Plasmid ist eine blau-weiß-Selektion der Klone möglich.

Material

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)].*

Rosetta™ (DE3)pLysS Competent Cells *E. coli*

Diese chemisch kompetenten Zellen der Firma Novagen wurden transformiert und zur Expression von Lamin A verwendet. Sie sind Derivate der BL21-Zellen und verfügen auf einem Chloramphenicol resistenten Plasmid über tRNAs für die Codons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, und GGA und zeigen somit eine verbesserte Expression für eukaryontische Proteine. Sie sind lysogen für einen λ Prophagen, der IPTG induzierbare T7 RNA Polymerase enthält. Außerdem enthalten sie ein Plasmid, das das T7 Lysozym codiert. Dabei handelt es sich um einen natürlichen T7 RNA Polymerase-Inhibitor, es wird somit eine basale Expression der Zielgene unter der Kontrolle des T7 Promotors reprimiert.

Genotyp: *F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pLysSRARE2 (CamR)*

3.1.5 Antikörper

3.1.5.1 Primär-Antikörper

Antikörper	Antigen	Typ	Verdünnung für WB (in TBST)	Verdünnung für IF (in PBS)	Quelle/Herkunft
R27	Lamin A/C (human)	monoklonal Maus	1:1000	1:100	Höger et al., 1991
X223	Lamin B (human)	monoklonal Maus	1:1000	1:100	Lourim et al., 1996
NCL-Emerin	Emerin	monoklonal Maus	1:2000	1:200	medac (Hamburg)
Histon H1	Histon H1	monoklonal Maus	nicht getestet	1:100	ICN (Berkshire, UK)
Ab6002	Histon 3, trimethyl. K27	monoklonal Maus	nicht getestet	1:100	Abcam (Cambridge, England)
mAb051	humane Kern-Histone H2A, H2B, H3, H4	monoklonal Maus	nicht getestet	1:1000	Chemicon (Hofheim)
Ab12178	Histon H3, acet. K9	polyklonal Kaninchen	nicht getestet	1:50	Upstate (Dundee, UK)
acet. Lysine Klon 4G12	acet. Lysine	polyklonal Kaninchen	nicht getestet	1:50	Upstate (Dundee, UK)
mAb414	Kernporenkomplex (NPC-p62)	monoklonal Maus	nicht getestet	1:5000	Hiss Diagnostics (Freiburg)
Ab9057	Heterochromatinprotein1 alpha	polyklonal Ziege	1:1000	1:100	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
H14	phosphoryl. CTD-Region der RNA-Polymerase II	monoklonal Maus	1:1000	1:100	Bregman et al., 1995

Antikörper	Antigen	Typ	Verdünnung		Quelle/Herkunft
			für WB (in TBST)	für IF (in PBS)	
8WG16	unphosphoryl. CTD- Region der RNA- Polymerase II	monoklonal Maus	1:1000	1:100	Thompson et al., 1989
S18	RNA-Polymerase I	polyklonal human	nicht getestet	1:100	Reimer et al., 1987
13d4	Lamin-assoziiertes Polypeptid 2	polyklonal Maus	1:2000	1:500	Alsheimer et al., 1998
LAP2a	Lamin-assoziiertes Polypeptid 2a	polyklonal Kaninchen	1:1000	1:100	Dechat et al., 1998
K20-478	Nesprin2 Giant	monoklonal Maus	1:20	1:2	Libotte et al., 2005
K1	Nesprin2	polyklonal Kaninchen	1:1000	1:200	Zhen et al., 2002
SC 35	Speißfaktor SC 35	polyklonal Maus	1:5000	1:500	Fu et al., 1990
PML-N	promyelocytic leukemia (PML) nuclear body; N- Terminus	polyklonal Ratte	nicht getestet	1:100	Sternsdorf et al., 1995
P27	20S-Untereinheit des 26s-Proteasoms, Klon 26S-104	monoklonal Maus	1:2000	1:200	Progen (Heidelberg)
Rb-Ser612	Retinoblastoma	monoklonal Maus	1:1000	1:100	BD Biosciences (Heidelberg)
Phospo-Rb (S780)	Retinoblastoma (phosph. an Serin 780)	monoklonal Maus	1:1000	1:100	BD Biosciences (Heidelberg)
SX118	CDK-Inhibitor p21	monoklonal Maus	1:1000	1:100	BD Biosciences (Heidelberg)
Ab2893	gamma H2A.X (phosph. an Serin 139)	polyklonal Kaninchen	nicht getestet	1:500	Abcam (Cambridge, England)
ATM	Ataxia Telangiectatica Mutated	monoklonal Maus	nicht getestet	1:500	Abcam (Cambridge, England)
anti-Dig	Digoxigenin, für TUNEL- assay	monoklonal Maus	nicht getestet	1:100	Boehringer Mannheim GmbH

Antikörper	Antigen	Typ	Verdünnung für WB (in TBST)	Verdünnung für IF (in PBS)	Quelle/Herkunft
anti-c-Myc	Myc-Epitop, Klon 9E10	monoklonal Maus	nicht getestet	1:200	BD Biosciences (Heidelberg)
anti-His	Epitop aus 4-6 Histidinen	monoklonal Maus	1:1000	1:100	BD Biosciences (Heidelberg)
Ab3250	Flag-Epitop (DYKDDDK)	monoklonal Maus	nicht getestet	1:500	Upstate (Dundee, UK)

Tab. 3.1: verwendete Primärantikörper

3.1.5.2 Sekundär-Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Quelle
anti-Maus-Texas Red [®]	<u>IF</u> : 1:100 in PBS	Dianova, Hamburg
anti-Maus-Cy3	<u>IF</u> : 1:50 in PBS	
anti-Maus-Cy5	<u>IF</u> : 1:50 in PBS	
anti-Maus-Cy2	<u>IF</u> : 1:50 in PBS	
anti-Maus-FITC	<u>IF</u> : 1:50 in PBS	
anti-Kaninchen-Texas Red [®]	<u>IF</u> : 1:100 in PBS	
anti-Kaninchen-Cy2	<u>IF</u> : 1:50 in PBS	
anti-Ziege-Texas Red [®]	<u>IF</u> : 1:50 in PBS	
anti-Mensch-Texas Red [®]	<u>IF</u> : 1:50 in PBS	
anti-Mensch- FITC	<u>IF</u> : 1:50 in PBS	
anti-Meerschwein-Texas Red [®]	<u>IF</u> : 1:100 in PBS	
anti-Meerschwein-Cy5	<u>IF</u> : 1:100 in PBS	
anti-Ratte-Texas Red [®]	<u>IF</u> : 1:100 in PBS	
anti-Maus gekoppelt an 12nm kolloidalem Gold	<u>EM</u> : 1:10 in PBS	Promega, Mannheim
anti-Maus-Peroxidase	<u>Blot</u> : 1:5000 in 10 % Milch/TBST pH 7,4	
anti-Kaninchen-Peroxidase	<u>Blot</u> : 1:5000 in 10 % Milch/TBST pH 7,4	
anti-Maus-alk. Phosphatase	<u>Elisa</u> : 1:1000 in DEA	
anti-Kaninchen-alk. Phosphatase	<u>Elisa</u> : 1:1000 in DEA	

Tab. 3.2: verwendete Sekundärantikörper

Dieser Vektor ist Bestandteil des „TOPO TA Cloning® Kits“ der Firma Invitrogen. Er wurde für eine Klonierung von PCR-Produkten durch Adenosin-Überhänge (AT-Cloning) konzipiert. Der Vektor enthält neben dem Lac-Operon, das eine Blau-Weiß-Selektion transformierter Bakterienklone ermöglicht, eine Ampicillin- und eine Kanamycin-Kassette. Dieser Vektor wurde ausschließlich zur „Zwischen-Klonierung“ längerer PCR-Produkte verwendet.

pEGFP-C1, Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg

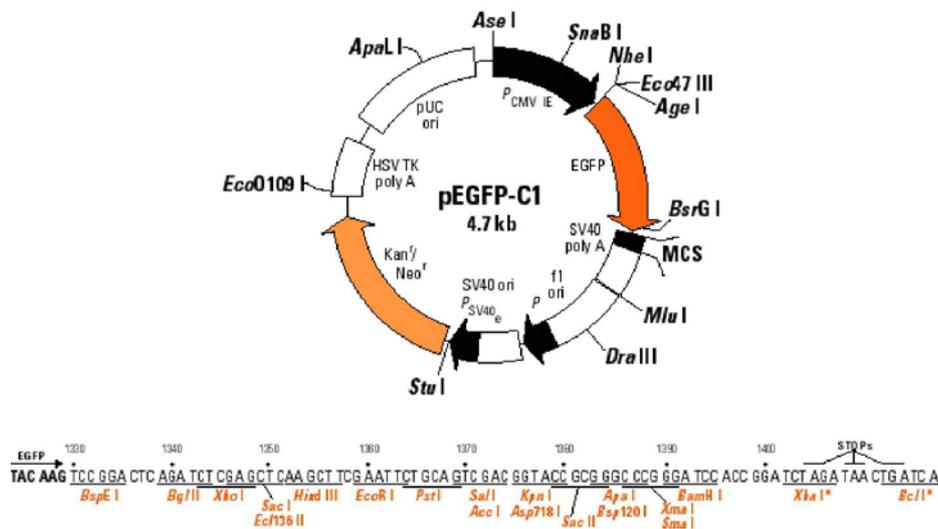
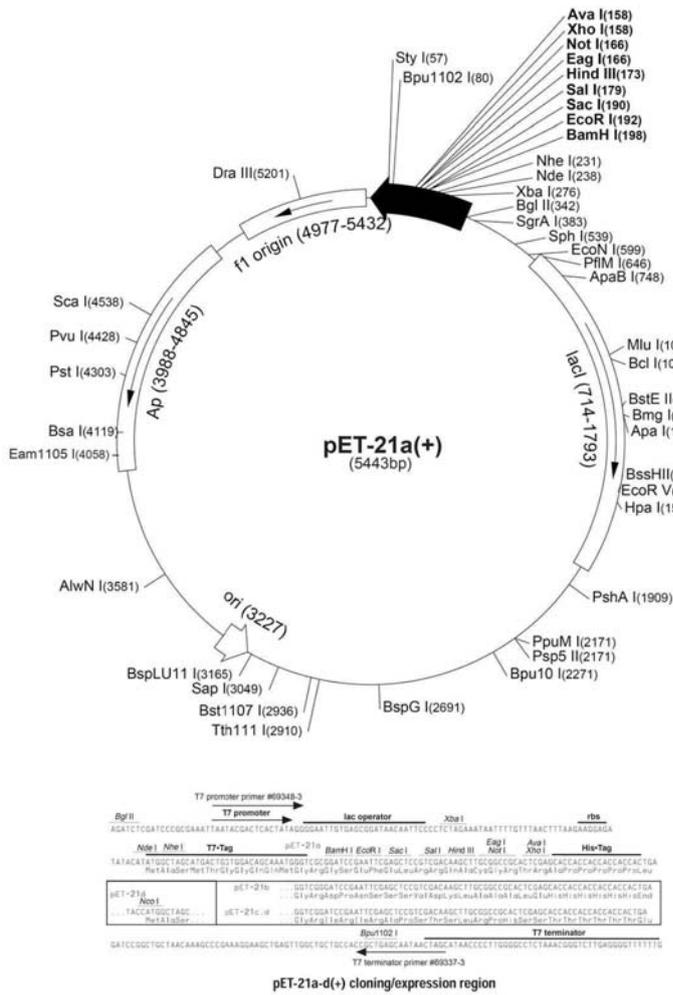


Abb. 3.3: Vektorkarte von pEGFP-C1, Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg

pEGFP-C1 kodiert für das verstärkt leuchtende grün-fluoreszierende Protein (EGFP), das für die Expression in Säugerzellen optimiert wurde (Extinktions-Maximum = 488 nm; Emissions-Maximum = 507 nm). Das GFP wurde ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert. Hohe Expressionslevel werden in tierischen Zellen durch den menschlichen Cytomegalovirus (CMV)-Promotor erreicht. Durch die SV40-Region des Vektors wird ein Polyadenylierungs-Signal an das entstehende Transkript angefügt. Durch das Klonieren von Genen in die MCS des pEGFP-C1 Vektors werden die entstehenden Proteine am N-Terminus mit dem EGFP fusioniert. Die grünleuchtenden Fusionsproteine können dadurch mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie lokalisiert werden. Neben diesem Vektor stehen noch andere Vektoren zur Verfügung (pEGFP-C2 oder -C3), die in der MCS entweder ein verändertes Leseraster („reading-frame“) aufweisen oder das grün-fluoreszierende Protein am carboxyterminalen Ende des zu untersuchenden Proteins anhängen (pEGFP-N1, -N2 oder -N3). Alle EGFP-Vektoren weisen ein Kanamycin-Resistenzgen auf.

pET-21a, Novagen, Darmstadt



Dieser Vektor der Firma Novagen ermöglicht die Expression eines Proteins mit einem „His-Tag“ an dessen C-Terminus. Das „His-Tag“ ermöglicht die Reinigung des Proteins über eine Matrix aus Ni-NTA-Agarose. Soll ausschließlich das C-terminale „His-Tag“ angehängt werden, muss die entsprechende cDNA mit ihrem 5'-Ende über NdeI kloniert werden, sonst wird N-terminal zusätzlich ein „T7-Tag“ angehängt. Zur Selektion transformierter Bakterien trägt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz.

Abb. 3.5: Vektorkarte von pET-21a, Novagen, Darmstadt

pBiFC-YC155- / pBiFC-YN155 BiFC-System-Vektoren von T. Kerppola

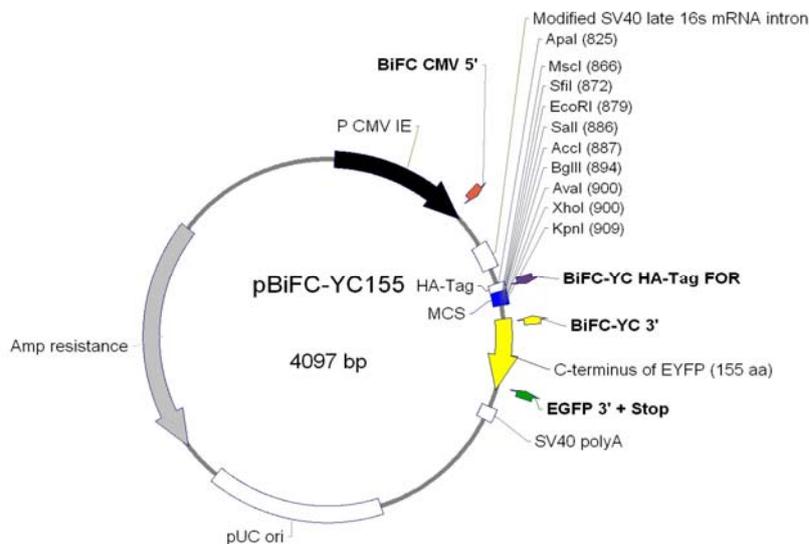


Abb. 3.6: pBiFC-YC155 BiFC-System-Vektoren von T. Kerppola

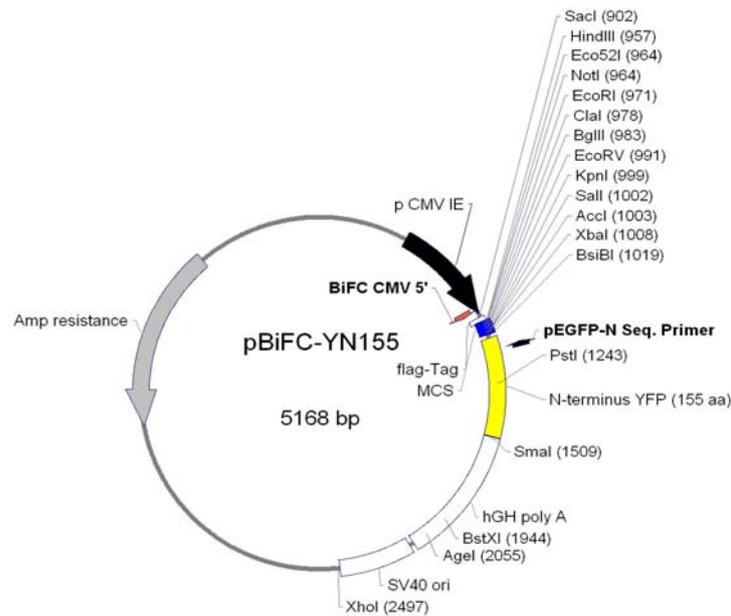


Abb. 3.7: pBiFC-YN155 BiFC-System-Vektoren von T. Kerppola

pBiFC-YN155- / pBiFC-YN155 BiFC-System-Vektoren kodieren für die N- bzw C-terminale Hälfte des leuchtend gelb-fluoreszierenden Proteins YFP. Durch das Klonieren von Genen in die MCS der BiFC-Vektoren werden die entstehenden Proteine am C-Terminus mit dem jeweiligen YFP-Hälften fusioniert. Erst wenn die zwei interagierenden Proteine aneinander binden kann sich das funktionale YFP-Fluorophor rekonstituieren. Alle BiFC-System-Vektoren weisen ein Kanamycin-Resistenzgen auf.

3.2.2 Enzyme

DNase I	AppliChem (Darmstadt)
Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase	Finnzymes (Frankfurt/Main)
Pfu-DNA-Polymerase	Promega (Mannheim)
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Ribonuklease Inhibitor (RNasin)	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Proteinase K	Serva (Heidelberg)
RNase A	Serva (Heidelberg)
Shrimp Alkalische Phosphatase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Taq-Polymerase	Promega (Mannheim), Institutseigene Herstellung

3.2.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide für die spezifische Amplifikation von cDNA-Fragmenten oder für Sequenzierungen wurden bei der Firma Thermo Electron (Ulm) bzw. bei Biomers (Ulm) bestellt. Der für die Reverse Transkription verwendete Oligo(dT)-Primer wurde von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Alle verwendeten Primer sind im Anhang detailliert aufgelistet.

3.2.4 Größenstandards

Lambda DNA/EcoRI+HindIII	MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Marker 3 FastRuler™ DNA Ladder Middle Range	MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Markers O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladde	MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Precision Plus Protein™ Standards, Dual Color	Bio-Rad (München)
High-und Low-Range-Marker	Bio-Rad (München)

3.2.5 Kits und Kitbestandteile

ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit	Pierce (US)
DIG RNA Labeling Mix, 10x konz.	Roche (Mannheim)
ECL™ Detection Kit	Amersham Pharmacia Biotech (Braunschweig)
Effectene™ Transfection Reagent	Qiagen (Hilden)
E.Z.N.A Plasmid Mini Präp Kit I®	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
E.Z.N.A Gel Extraction Kit®	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Lipofectamine™ Reagent	Invitrogen (Karlsruhe)
Ni-NTA-Agarose	Qiagen (Hilden)
pDrive Cloning Kit	Qiagen (Hilden)
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
ApopTag® Apoptosis Detection Kit	Serologicals Corporation (Norcross, USA)
QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Amsterdam (Niederlande)

3.3 Chemikalien

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Chemikalien und Lösungsmittel in Analysequalität von folgenden Firmen bezogen:

Merck	Darmstadt
AppliChem	Darmstadt
Roth	Karlsruhe
Serva	Heidelberg
Sigma-Aldrich	München
Fluka	Berlin
Calbiochem	Darmstadt

3.4 Geräte

Biophotometer	Eppendorf (Hamburg)
Brutschrank	MWG-Biotech (München)
Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) Typ TCS SP2 AOBS	Leica (München)
Drehtisch, regelbar	Heidolph, über Hartenstein (Würzburg)
Einkanal-Photometer Anthos 2010	Anthos (Krefeld)
Eisbereiter	Scotsman, über Hartenstein (Würzburg)
Elektronenmikroskop Zeiss EM10	Carl Zeiss (Oberkochen)
Elektrophorese System für Minigele	BIO-RAD (München)
Feinwaage AC 100	Mettler (Gießen)
Flachbettscanner V700 Photo	Epson (Meerbusch)
Fluoreszenzmikroskop Axiophot Stereo HB050 mit Quecksilberlampe	Carl Zeiss (Oberkochen)
Graphit-Blotkammer	Cti, über Hartenstein (Würzburg)
Heizblock	Liebisch, über Hartenstein (Würzburg)
Hybridisierungsöfen MINI 10	Thermo Hybaid (Ulm)
Kühlschrank (4°C)	Liebherr (Bieberach)
Kühlzentrifugen	Eppendorf (Hamburg)
Kühlzentrifuge RC5B	Sorvall, Du Pont (Bad Homburg)
Kühlzentrifuge Minifuge RF und GL	Heraeus-Christ (Osterode)
Laborwaage PB 3002 Delta Range	Mettler (Gießen)
Lichtmikroskop (Zellkultur)	Leitz (Wetzlar)
Magnetrührer M35	GLW (Würzburg)
pH-Meter pH 525	WTW, über Hartenstein (Würzburg)
Proteingelkammer Mini V8	Gibco BRL (Karlsruhe)
Rotor TLA 100.2	Beckman Instruments, GmbH (München)
Sequenzierer ABI PRISMTR310 Genetic Analyser	Applied Biosystems GmbH (Weiterstadt)
Schüttler Certomat R und S	B. Braun Biotech international, über Hartenstein (Würzburg)
Schwenktisch 3013	GLF, über Hartenstein (Würzburg)
Stabilisiertes Netzgerät	Fischer (Heidelberg)
Stereomikroskop Wild M8	Leica (Heidelberg)
Sterilbank Steril GARD Hood Class III	Müller Labortechnik (Windhagen)
Thermocycler Thermodux	Progene (Wertheim)
Tiefkühlschrank (-20°C)	Privileg Quelle
Tiefkühltruhe (-86°C)	Forma Scientific; Labotect (Göttingen)
Tischzentrifuge Biofuge A	Heraeus-Christ (Osterode)
Tischzentrifuge 5415 R, kühlbar	Eppendorf (Hamburg)
Ultramikrotom Microm HM500 OM	Carl Zeiss (Oberkochen)
Ultrazentrifugen LB-70	TLA 100.2, Beckman Instruments GmbH (München)
Umkehrmikroskop IM35	GSA (13000 rpm max) Du Pont Company Wilmington, USA)
	Zeiss (Oberkochen)

Material

UV-Transilluminator Typ IL-350.M,

VL Vilber Lourmat, 320 nm

Vortex L46

Wasseraufbereitung Milli-Q UF plus

Wasserbad WTH 500

Bachhofer Laboratoriumsgeräte (Reutlingen)

CF-8 Videokamera,

Firma Kappa

SSM-121 CE-Monitor

Firma Sony (Japan)

GLW, über Hartenstein (Würzburg)

Millipore (Heidelberg)

Köttermann, über Hartenstein (Würzburg)

4 Methoden

4.1 Mikrobiologische Methoden

4.1.1 Flüssigkeitskultur von Bakterien

Lösungen:

LB-Medium (Luria Bertami):	10 g Bacto-Trypton (Gibco)
	10 g NaCl
	ad 1 l H ₂ O _{bidest}
	pH 7,5 (NaOH)
	⇒ autoklavieren
Antibiotika-Stammlösungen:	Ampicillin: 100 mg/ml in H ₂ O _{bidest}
	Kanamycin: 50 mg/ml in H ₂ O _{bidest}
	Chloramphenicol: 34 mg/ml MetOH

Durchführung:

Für eine Übernachtskultur (ÜNK) wurden ca. 7 ml LB-Medium in einem Greinerröhrchen vorgelegt und je nach verwendetem Bakterienstamm zur Selektion ein Antibiotikum zugesetzt. Ampicillin und Kanamycin wurden in Endkonzentrationen von 50 µg/ml, Chloramphenicol in 34 µg/ml eingesetzt. Zum Animpfen wurde Bakterienmaterial aus einer Glycerinkultur oder eine Bakterienkolonie von einer Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze in das Medium überführt. Die Kultur wurde anschließend bei 37°C über Nacht geschüttelt.

Für Flüssigkulturen größerer Volumina bzw. für Kulturen zur *in-vivo*-Expression wurde zunächst wie beschrieben eine ÜNK angesetzt. Mit 5 ml dieser ÜNK wurden dann am nächsten Tag Volumina von 200 ml angeimpft.

4.1.2 Bestimmung der Bakteriendichte einer Flüssigkultur durch photometrische Messung

Zur Bestimmung der Bakteriendichte in einer Flüssigkultur wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch ermittelt. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht einer Schichtdicke von 1 cm $8 \cdot 10^8$ Zellen pro Milliliter. Als Nullwert wird nicht angeimpftes Kulturmedium verwendet.

4.1.3 Glycerinkultur

Um Bakterien längere Zeit aufzubewahren, wurden Glycerinkulturen angesetzt. Zur Herstellung wurden 170 µl steriles Glycerin mit 830 µl einer ÜNK vermischt und bei -70°C gelagert. Um aus einer Glycerinkultur eine Flüssigkultur zu machen, wurde mit einer sterilen Pipettenspitze über die Glycerinkultur gestrichen und die anhaftenden Bakterien in ein mit LB-Medium gefülltes Greinerröhrchen überführt.

4.1.4 Herstellung von LB-Agar-Selektionsplatten

Für die Herstellung von Agarplatten wurden 1 % Agar (Select Agar, Gibco) in LB-Medium eingewogen und das Gemisch autoklaviert. Nachdem sich die Lösung nach dem Autoklavieren auf etwa 50°C (handwarm) abgekühlt hatte, wurde für Selektionsplatten ein Antibiotikum zugegeben. Ampicillin und Kanamycin wurden in einer Endkonzentration von 1 U bzw. 50 µg/ml verwendet. Der flüssige Agar wurde anschließend in sterile Petrischalen gegossen, so dass der Boden einer Schale gerade bedeckt war. Nach Erstarren des Agars wurden die Schalen umgedreht, um ein

Auftropfen von Kondenswasser auf den Nährboden zu verhindern. Die Platten wurden über Nacht bei RT zum Trocknen aufbewahrt. Die Lagerung (3-4 Wochen) erfolgte bei 4°C.

Soll aus einer Flüssig- eine Plattenkultur hergestellt werden, wurde ca. 100-200 µl der Kultur auf die Platte pipettiert und diese anschließend mit einem sterilen Drygalski-Spatel ausgestrichen. Soll außerdem auf Chloramphenicolresistenz selektiert werden, wurden 30 µl der Stammlösung (34 mg/ml) in 100 µl LB-Medium gegeben und dieses Gemisch dann 1 h vor Animpfen mit einem Drygalski-Spatel auf die Platte ausgestrichen. Für ein blau-weiß Screening wurden 20 µl der 100 mg/ml X-gal Stammlösung und 1 µl der 1M IPTG Stammlösung zu 100 µl LB-Medium pipettiert und dieses Gemisch dann 2 h vor dem Animpfen auf die Platte ausgestrichen.

4.1.5 Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien

Kompetente Bakterien können unter geeigneten Bedingungen plasmid-förmige DNA aus ihrer Umgebung aufnehmen. Bakterien wurden durch Modifikation der Lipiddoppelschicht, die sie umgibt, chemisch kompetent gemacht (Chung et al., 1989)

Lösungen:

LB-Medium (siehe 4.1.1)

Tetrazyklin: 5 mg/ml in Ethanol (100 %, p.a.)

TSS (Transformation and Storage Solution):

⇒ pH 6,5

LB-Medium

+ 10 % (w/v) PEG 3350 oder 8000

+ 5 % (v/v) DMSO

+ 20-50 mM Mg²⁺ (MgSO₄ oder MgCl₂)

⇒ sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C

Durchführung:

Zunächst wurden 10 ml LB-Medium mit einer Endkonzentration von 15 µg/ml Tetrazyklin versehen. Die Flüssigkultur wurde mit einer Einzelkolonie oder aus einer Glycerinkultur des gewünschten Bakterienstammes angeimpft. Im Regelfall wurde der Bakterienstamm XL1-blue oder Rosetta verwendet. Die Übernachtskultur wurde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 200 ml LB-Medium mit einer Endkonzentration von 15 µg/ml Tetrazyklin mit 1-5 ml der Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien wurden nun bei 37°C unter Schütteln (ca. 2 h) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 vermehrt. Dann wurde die Flüssigkultur auf vier 50 ml Röhrchen verteilt und bei 1.000 g und 4°C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1/40 des Ausgangsvolumens (2,5 ml) eiskaltem TSS aufgenommen und resuspendiert. Die Suspension wurde in Aliquots zu 100 µl auf vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Bakterien wurden bei -70°C gelagert und waren mehrere Wochen haltbar.

4.1.6 Bestimmung der erreichten Kompetenz

Die erzielte Kompetenz der Bakterienzellen kann mit folgender mathematischer Gleichung berechnet werden: Anzahl der nach der Transformation Kolonie bildenden Bakterieneinheiten („colony forming units“ = cfu) dividiert durch die eingesetzte Menge an Plasmid-DNA in Mikrogramm. Wünschenswert ist ein Wert von 107-109 cfu/µg Plasmid-DNA, in Bezug auf den pUC18-Vektor.

Um die Kompetenz der Bakterienzellen möglichst genau zu berechnen, wurden 10, 100 und 1.000 pg der pUC18-Vektor-DNA in die Bakterien transformiert (Transformation von Bakterien siehe 4.1.7), die sich auf den Selektionsplatten bildenden Kolonien ausgezählt und daraus die Transformationsrate für 1 µg DNA des pUC18-Vektors extrapoliert.

4.1.7 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Lösungen:

LB-Medium (siehe 4.1.1)

4.1.7.1 Transformation von Rosetta™ (DE3)pLysS Competent Cells E.coli

Ein Aliquot (100 µl) kompetenter Rosetta-Bakterien wurde mit 300 ng Plasmid-DNA vermischt. Der Ansatz wurde 45 min auf Eis inkubiert, dann für 45 Sek bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt, nach dem der Ansatz sofort wieder auf Eis gestellt wurde. Anschließend wurden 800 µl LB-Medium zugegeben und das Gefäß 1,5 h bei 37°C geschüttelt. Der Überstand wurde bis auf ca. 400 µl abgenommen, in denen das Pellet vorsichtig resuspendiert wurde. Anschließend wurden 150 µl bzw 300 µl auf entsprechenden Selektionsplatten (je nach Antibiotikaresistenz, die das transformierte Plasmid trägt, sowie Chloramphenicol) ausgestrichen.

4.1.7.2 Transformation von E.coli XL1blue

Ein Aliquot (100 µl) kompetenter XL 1blue wurde mit 50-100 ng Plasmid-DNA vermischt. Der Ansatz wurde 60 Min auf Eis inkubiert, dann für 90 Sek bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt, nach dem der Ansatz sofort wieder auf Eis gestellt wurde. Anschließend wurden 900 µl LB-Medium zugegeben und das Gefäß 1 h bei 37°C geschüttelt. Danach wurden zwei Verdünnungen auf entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen (je nach Antibiotikaresistenz, die das transformierte Plasmid trägt). Zunächst wurden 100 µl entnommen und ausgestrichen (1/10), der Rest wurde bei 10.000 rpm für 30 sek in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 100 µl abgenommen, in denen das Pellet vorsichtig resuspendiert wurde. Anschließend wurde alles auf einer zweiten Platte ausgestrichen ($^9/_{10}$).

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 PCR (Polymerase Kettenreaktion) zur Vermehrung von DNA-Abschnitten

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

- 1) Denaturierung (= „Aufschmelzen“) des DNA-Doppelstrangs bei 95°C.
- 2) Annealing (= „Anlagerung“) der im Überschuss vorliegenden Oligonukleotid-Primer bei 50 – 60°C; die Primer bilden das 5'-Ende der neu zu synthetisierenden Komplementärstränge.
- 3) Elongation (= „Verlängerung“) des komplementären Tochterstrangs durch die DNA-Polymerase bei 72°C.

Nach wiederholtem Denaturierungsschritt (1) bilden nun die beiden neu gebildeten DNA-Abschnitte ihrerseits eine Matrize aus. Durch die Dublettierung der DNA nach jedem Zyklusdurchlauf kommt es zu einer exponentiellen Anreicherung des gewünschten DNA-Fragmentes (2^n), wobei „n“ die Anzahl der Zyklusdurchläufe widerspiegelt. Im Normalfall wird ein PCR-Zyklus 25-35 Mal wiederholt.

Durchführung der PCR:

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

Methoden

ca. 1000 Basen pro Minute und besitzt keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (Fehlerkorrektur). Für die Klonierung in Expressionsvektoren oder bei der Erzeugung von Punktmutationen mussten amplifizierte DNA-Bereiche ein hohes Maß an Genauigkeit bezüglich des Ausgangstemplates aufweisen. Zu diesem Zweck wurden DNA-Polymerasen mit einer Korrekturlese (Proofreading)-Funktion herangezogen. Es wurde zum einen mit der Pfu-Polymerase (Promega/eigene Herstellung) aus *Pyrococcus furiosus* gearbeitet, die eine niedrigere Syntheseleistung von 500 Basen pro Minute aufweist. Zum anderen wurde die High Fidelity Polymerase Phusion™ (Finnzymes) verwendet, die eine 6-fach niedrigere Fehlerrate wie die Pfu-Polymerase aufweist, dabei jedoch 8-fach schneller arbeitet. Es handelt sich um bei dem Enzym um eine optimierte Form der Pfu-Polymerase. Die jeweiligen Syntheseleistungen der verschiedenen DNA-Polymerasen mussten bei der Bestimmung der Elongationszeiten einer PCR berücksichtigt werden.

Pipetierschema für Taq-Polymerase (50 µl-Ansatz):

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

Pipetierschema für Pfu-Polymerase (50 µl-Ansatz):

5-100 ng	Template-DNA	
5 µl	10-fach-Puffer + MgSO ₄	(Promega)
1 µl	dNTP-Mix	(10 mM SL je Nukleotid, MBI)
1 µl	5'-Primer	(10 pmol/µl), biomers.net GmbH)
1 µl	3'-Primer	(10 pmol/µl), biomers.net GmbH)
0,2 µl	Pfu-DNA-Polymerase	(5 U/µl, Promega)
<hr/>		
auf 50 µl	H ₂ O _{bidest}	auffüllen

Pipetierschema für Phusion™-Polymerase (50 µl-Ansatz):

5-100 ng	Template-DNA	
5 µl	10-fach-Puffer + MgSO ₄	(Promega)
0,5 µl	dNTP-Mix	(10 mM SL je Nukleotid, MBI)
1 µl	5'-Primer	(10 pmol/µl), biomers.net GmbH)
1 µl	3'-Primer	(10 pmol/µl), biomers.net GmbH)
0,2 µl	Phusion™-DNA-Polymerase	(5 U/µl, Finnzymes)
<hr/>		
auf 50 µl	H ₂ O _{bidest}	auffüllen

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

Zyklen	Vorgang	Bedingungen
1	initiale Denaturierung	1 min, 98°C
25-30	Denaturierung	30 sek, 98°C
	Primer Annealing	30 sek (Temperatur je nach Primer)
	Elongation	1 min pro 1000 Basen (Taq) 72°C
		1 min pro 500 Basen (Pfu) 68°C
		15 sek pro 1000 Basen (Phusion™) 72°C
1	finale Elongation	5 min, 72°C
	Kühlung	4°C

Die Auswertung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1 %igen Agarose-Gel (siehe 4.2.11).

4.2.2 RT-PCR (Reverse-Transkriptions-Polymerasekettenreaktion)

Die RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) gliedert sich in zwei Abschnitte. Zunächst wird RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in DNA übersetzt. Da mRNA nur aus Exons besteht, unterscheidet sich die bei dieser Prozedur entstehende DNA von der im Genom des Organismus, aus dem die RNA isoliert wurde. Man nennt die entstandene DNA cDNA, wobei das c für „complementary“ steht. Man nutzt diese Technik beispielsweise für die Klonierung unbekannter cDNA-Sequenzen, indem man zunächst die isolierte Gesamt-RNA in cDNA umschreibt und dann mit spezifischen Primern (die Sequenzen können z.B. aus dem entsprechenden Gen eines verwandten Organismus stammen) die gesuchte cDNA amplifiziert.

Pipettierschema für eine RT-Reaktion (20 µl-Ansatz):

1 µl	RNase-Inhibitor (40 U/µl, MBI)
4 µl	RT-Puffer (10x, Promega)
1 µl	dNTPs (500 µg/µl MBI Fermentas GmbH)
1 µl	Oligo(dT) Primer (MBI Fermentas GmbH)
1 µl	Reverse Transkriptase MMULV (200 U/µl, Promega)

auf 20 µl H₂O_{bidest} auffüllen

Durch Auf- und Abpipettieren gut mischen und im Thermocycler 1 h bei 37°C inkubieren, 5 min bei 95°C hitzeinaktivieren und schließlich bei 4°C kühlen. Aus einem RT-Ansatz wurden 2 µl in eine sich anschließende PCR eingesetzt. Der RT-Ansatz konnte mehrere Wochen stabil bei 4°C gelagert werden, um für weitere PCR-Reaktionen verwendet zu werden.

4.2.3 Primer und Primerdesign

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

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

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

4.2.4 Kolonie-PCR

Nach der Klonierung von DNA-Fragmenten in bakterielle Vektoren wurden die erhaltenen Klone u.a. durch Kolonie-PCR auf eine erfolgreiche Ligation hin überprüft. Außerdem war es möglich, die Orientierung, in der das einklonierte DNA-Fragment in den Vektor inseriert hatte, herauszufinden. Für die PCR wurde statt isolierter DNA etwas Bakterienmaterial als „Template“ eingesetzt und mit geeigneten Primern überprüft, ob das Insert im Vektor war (5'- und 3'-Primer binden innerhalb der inserierten Sequenz oder an Sequenzbereiche des Vektors, die vor und hinter dem Insert liegen) bzw. in welcher Orientierung es inseriert hatte (5'-Primer bindet im Vektor, 3'-Primer am 3'-Ende des Inserts, oder umgekehrt). Hierfür wurde eine Taq-DNA-Polymerase verwendet.

Pipettierschema für Kolonie-PCR (25 µl-Ansatz):

5-100 ng	Template-DNA	
1,5 µl	MgCl ₂	(25 mM)
2,5 µl	10-fach-Puffer	(Promega)
0,5 µl	dNTP-Mix	(10 mM SL je Nukleotid, MBI)
0,25 µl	5'-Primer	(10 pmol/µl), biomers.net GmbH)
0,25 µl	3'-Primer	(10 pmol/µl), biomers.net GmbH)
0,5 µl	Taq-DNA-Polymerase	(5 U/µl, Promega, eigene Herstellung)
auf 25 µl	H ₂ O _{bidest}	auffüllen

Durchführung:

Zunächst wurde je nach Anzahl der zu testenden Klone ein „Master-Mix“ des 25 µl-PCR-Ansatzes pipettiert, der auf PCR-Reaktionsgefäße verteilt wurde. Die zu testende Bakterienkolonie wurde von einer Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt. Mit der Pipettenspitze wurde ein Teil des Bakterienmaterials auf eine neue Replika-Agarplatte übertragen, die man bei 37°C inkubiert, um am Abend eine Übernachtskultur animpfen zu können (siehe 4.1.1). Der Rest des Bakterienmaterials in der Pipettenspitze wurde mit dem PCR-Ansatz vermischt. Programm für den Thermocycler: siehe 4.2.1.

4.2.5 Punktmutagenese

Zum Erzeugen einer Punktmutation (Insertion bzw. Deletion einer Base) in einer DNA-Sequenz wurde nach einer Arbeitsanleitung des QuickChange® Site-Directed Mutagenese Kit (Stratagene) gearbeitet. Dazu wird ein Primerpaar benötigt, das die gewünschte Mutation aufweist. Die Mutationsstelle wird zu beiden Seiten von ca. 15 Basen flankiert. Der zu mutierende DNA-Bereich muss in einem Klonierungsvektor inseriert sein. Die Primer binden an die komplementären DNA-Bereiche (mit Ausnahme der punktmultierten Stelle). In einer PCR-Reaktion verlängert eine Phusion™-DNA-Polymerase die Primer und synthetisiert die DNA-Stränge des gesamten Vektors. Durch den Einbau der Primer entsteht ein mutiertes Plasmid mit versetzten Lücken. Anschließend wird der PCR-Ansatz (50 µL) mit der DNA-Endonuklease Dpn I (0,5 µL = 2.5 U/µL) für 1 h bei 37°C verdaut. Dpn I schneidet spezifisch methylierte und hemi-methylierte DNA und wird zum Entfernen des parentalen DNA-Templates verwendet. Plasmid-DNA, die aus

E.coli-Bakterien isoliert wurde, ist immer methyliert und kann deswegen von Dpn I beseitigt werden. Deshalb werden nur die Template-DNA oder Hybride aus einem mutierten und einem Template-Strang verdaut, nicht aber die mutierten Plasmide. Nach einer 15 minütigen Hitzeinaktivierung (85°C) der Endonuklease Dpn I wurde der zurückbleibende Vektor, der die gewünschte Punktmutation im Insert enthält, in kompetente XL1-Blue Bakterienzellen transformiert und vermehrt. Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA isoliert und mit geeigneten Primern sequenziert. Die Punktmutagenese wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.2.6 Primerdesign für eine Punktmutagenese

Die Primer einer punktgerichteten Mutagenese müssen nachfolgende Eigenschaften aufweisen:

- 1) 5'- und 3'-Primer müssen die gewünschte Mutation enthalten und jeweils an dieselbe Sequenz der komplementären DNA-Stränge binden.
- 2) Die Primer müssen eine Länge von 25-45 Basen aufweisen und ihre Schmelztemperatur (T_m) sollte mindestens 78°C betragen.
- 3) Für die Berechnung der Schmelztemperatur von Primern zur Herstellung von Punktmutanten wurde diese Formel benutzt:

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

N = Länge des Primers in Basen

% GC = GC-Gehalt in ganzen Zahlen

% mismatch = Anteil an Nichtpaarungen in ganzen Zahlen

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

Durchführung:

Pipetierschema:

x µl	Template-DNA	(20, 50 ng)
5 µl	10-fach-Puffer	(Finnzymes)
1 µl	dNTP-Mix	(10 mM SL je Nukleotid, MBI)
1 µl	5'-Primer	(10 pmol/µl), biomers.net GmbH)
1 µl	3'-Primer	(10 pmol/µl), biomers.net GmbH)
0,2 µl	Phusion TM -DNA-Polymerase	(5 U/µl, Finnzymes)
auf 25 µl	H ₂ O _{bidest} auffüllen	

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

Zyklen	Vorgang	Bedingungen
1	initiale Denaturierung	5 min, 95°C
15	Denaturierung	30 sek, 95°C
	Primer Annealing	30 sek 57°C
	Elongation	15 sek pro 1000 Basen 72°C
1	finale Elongation	5 min, 72°C
	Kühlung	4°C

4.2.7 Plasmid-DNA-Isolation

Diese Methode ist eine Kombination aus alkalischer Lyse und Adsorption der DNA an ein Silika-Gel unter Hochsalz-Bedingungen. Die DNA wird dabei nicht gefällt, sondern an das Gel gebunden und anschließend mit einem Niedrigsalz-Puffer (z. B. $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$) bei pH 7,0-8,5 eluiert. Die durch diese Methode gewonnene Plasmid-DNA besitzt eine sehr hohe Reinheit und ist somit auch für empfindlichere Reaktionen wie Sequenzierungen oder Transfektionen einsetzbar.

4.2.7.1 Miniprep

Die Präparation wurde mit dem E.Z.N.A.[®] Plasmid MiniPrep Kit I der Firma Peqlab Biotechnologie GmbH nach Herstellerprotokoll ausgehend von 7 ml Übernachtskultur durchgeführt. Eluiert wurde mit 50 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ was Ausbeuten von 100 bis 600 ng/ μL erbrachte

4.2.7.2 Midiprep

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

Es wurde 100-ml-Bakterien-Übernachtskultur verwendet. Die Durchführung erfolgte genau nach dem Protokoll des Herstellers. Die sedimentierte Plasmid-DNA wurde in 100 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgenommen, wobei Ausbeuten von 1,5 bis 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ erzielt wurden.

4.2.8 Restriktionsverdau

Restriktionsverdaus wurden zur Umklonierung von DNA-Fragmenten, zur Linearisierung von Vektoren und zur Analyse von Klonen durchgeführt, um festzustellen, ob ein Insert in den Vektor ligiert hatte und eventuell, um die Orientierung des Inserts im Vektor zu bestimmen.

Für solche Verdaue benötigt man Restriktionsenzyme (genauer: Restriktionsendonukleasen). Diese schneiden DNA an definierten Sequenzen. Man unterscheidet Restriktionsenzyme vom Typ I, II und III. In der Molekularbiologie werden meistens Vertreter des Typs II, sog. Nukleasen, und dort speziell die Endonukleasen verwendet, die jeweils eine spezifische Nukleotidsequenz erkennen und innerhalb des DNA-Stranges darin schneiden. Dabei können je nach verwendetem Restriktionsenzym glatte (blunt) oder kohäsive (sticky) Enden entstehen. Schnittstellen mit überhängenden Enden können effizient mit komplementären Enden ligiert werden, die mit demselben Enzym geschnitten wurden, was man sich auch bei der Umklonierung von DNA-Fragmenten zu Nutze machen kann.

Standardansatz für einen Restriktionsverdau (20 μL):

1-2 μg	Plasmid-DNA
2 μL	10-fach Puffer (MBI Fermentas GmbH)
1 μL	Restriktionsenzym (5 U/ μL MBI Fermentas GmbH)

auf 20 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auffüllen

Der Ansatz wurde gemischt und 1-2 h bei 37°C (Temperatur ist abhängig vom verwendeten Enzym!) inkubiert. Anschließend wurden 4 μL 6x DNA-Beladungspuffer zugegeben und der Verdau im 1%igen Agarosegel analysiert (siehe 4.2.11).

Wurde die verdaute DNA für Folgeversuche benötigt, erfolgte vor der Gelelektrophorese je nach Enzym ein Inaktivierungsschritt bei 65-85°C für 15 min

4.2.9 Verdau von PCR-Produkten

Die PCR ermöglicht das Anhängen von Restriktionsstellen an das 5'- und 3'-Ende des PCR-Produkts. Damit diese Schnittstellen erkannt und geschnitten werden können, müssen sie einen Überhang von einer oder mehreren Basen besitzen. Die Mindestanzahl der Basen in diesem Überhang ist dabei abhängig vom verwendeten Enzym. Entsprechende Tabellen finden sich im Katalog von MBI oder auf <http://www.fermentas.com/techinfo/re/restrdigpcrrii.htm>.

Die in dieser Arbeit am häufigsten verwendeten Schnittstellen benötigen meist nur 1 Base Überhang, standardmäßig wurden jedoch immer mindestens 3-4 Basen angehängt. Das PCR-Produkt kann entweder direkt verdaut werden durch Zugabe des Restriktionsenzym zum PCR-Ansatz (falls die Pufferzusammensetzung es zulässt), oder nach einem Reinigungsschritt (siehe auch 4.2.7) über einen normalen Restriktionsverdau (siehe 4.2.8).

4.2.10 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (DNA und RNA)

Die Konzentration der gewonnenen DNA und RNA wurde photometrisch (Biophotometer, Eppendorf) über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen (Nukleinsäuren besitzen dort ihr Absorptionsmaximum). Gemessen wurde eine 1:100-Verdünnung gegen einen entsprechenden Leerwert. Dabei gilt, dass eine OD_{260} von 1 etwa 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA entspricht. Aus den Quotienten OD_{260}/OD_{280} und OD_{260}/OD_{230} konnten Aussagen über die Reinheit der Probe getroffen werden. Die Absorption bei 280 nm spiegelt die Verunreinigungen durch Proteine wieder, während Peptide, aromatische Verbindungen und Kohlenhydrate bei 230 nm ihr Absorptionsmaximum haben. In nachfolgender Tabelle ist zusammengefasst, wie von der OD auf die Konzentration geschlossen werden kann und wie die Quotienten $^{260}/_{280}$ und $^{260}/_{230}$ bei reinen Proben aussehen sollten.

	$OD_{260} = 1$ entspricht	$OD_{260}/OD_{280} \geq$	$OD_{260}/OD_{230} \geq$
dsDNA	50 $\mu\text{g/ml}$	1,8	2,2
ssDNA	37 $\mu\text{g/ml}$	1,8	2,2
RNA	40 $\mu\text{g/ml}$	2,0	2,2
Oligonukleotide	30 $\mu\text{g/ml}$	1,8	2,2

Tab. 4.1: Abhängigkeit der OD von der Nukleinsäurekonzentration

4.2.11 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgt am negativ geladenen Phosphoribose-Rückgrat. Wird ein elektrisches Feld angelegt bewegen sich die DNA-Moleküle in wässriger Lösung zur positiv geladenen Anode. Laufen diese Bewegungen in einem molekularen Netzwerk ab, wie in einem Agarosegel, so werden die einzelnen DNA-Moleküle je nach Größe und Form aufgetrennt, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit mit der Größe abnimmt. Aber auch die Konformation der DNA beeinflusst die Wanderungsgeschwindigkeit. Ringförmige kovalent geschlossene DNA läuft schneller, je größer ihre Verwindungszahl ist, egal ob die DNA negativ oder positiv superspiralisiert vorliegt. Linearisierte DNA wandert etwas schneller als das entspannte, geschlossene Plasmid.

Die Trennschärfe hängt von der Gesamtlauflänge und der Agarosekonzentration im Gel ab. Die Konzentration sollte dem Größenbereich der erwarteten Fragmente angepasst werden.

Um die DNA-Banden im Agarosegel sichtbar zu machen, wird Ethidiumbromid zugegeben. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert zwischen den Basen der DNA und erzeugt bei Anregung mit UV-Licht eine orange Fluoreszenz.

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

Tab. 4.2: Verschiedene Agarosekonzentrationen bei entsprechenden PCR-Produktlängen.

Lösungen:

20x SB-Puffer (pH 8,5): 200 mM NaOH
 ⇒ pH 8,5 mit Borsäure einstellen

6x MassRuler™ Loading Dye Solution MBI Fermentas GmbH

Laufpuffer 1x SB

Ethidiumbromid-Stammlösung (50 mg/ml)

Durchführung:

Für ein 1 %iges Gel wurden 0,5 g Agarose (Peqlab) in 50 ml 1x SB gelöst und aufgeköcht. Nachdem die Lösung auf etwa 50°C abgekühlt war, wurde 1 µl der Ethidiumbromid-Stammlösung zugegeben. Die Lösung wurde gut gemischt und in einen Gelschlitten gegossen, welcher vorher mit Tesafilm abgedichtet wurde. Zum Auftragen der Proben wurde anschließend ein Kamm eingesteckt. Nach ca. 30 min war das Gel komplett polymerisiert und konnte verwendet werden. Sollte die Polymerisation schneller erfolgen konnte das Gel auch bei 4°C gegossen werden, was aber die Qualität der Auftrennung etwas verschlechtert. Das Gel wurde nach Entfernen des Tesafilms mit dem Gelschlitten in eine mit 1x SB-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt und mit 1x SB-Puffer überschichtet. Dann wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen und eventuell vorhandene Luftblasen aus den Taschen entfernt. Anschließend wurden die zu analysierenden Proben mit Loading Dye versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Um die Größen der aufgetrennten DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde in einer Spur ein Gemisch aus Fragmenten definierter Größe als Marker mit aufgetragen. Es wurde dabei einer der folgenden Marker benutzt:

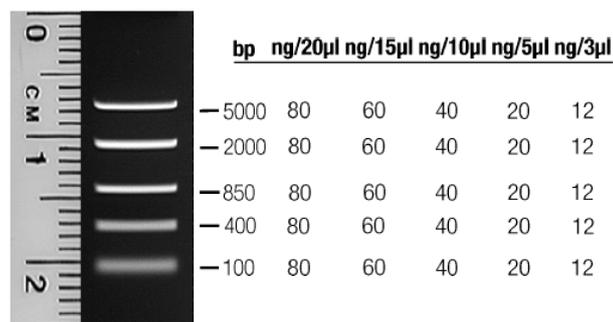


Abb. 4.1: DNA Fragmente spezifischer Länge des DNA Markers FastRuler™ DNA Ladder, Middle Range, MBI Fermentas GmbH

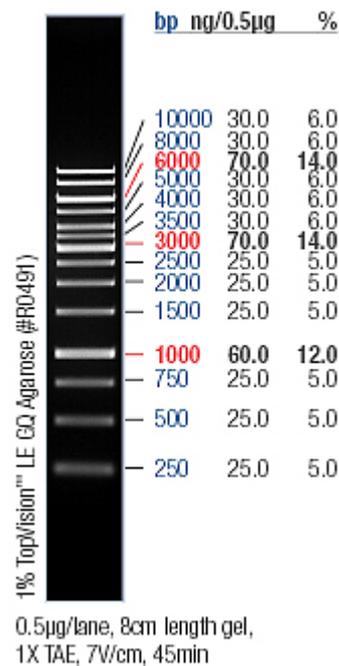


Abb. 4.2: DNA Fragmente spezifischer Länge des DNA Markers O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, MBI Fermentas GmbH

4.2.12 Gelextraktion von DNA-Fragmenten (Peqlab)

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem Peqlab Gel Extraction Kit der Firma Peqlab durchgeführt. Die gewünschten Banden wurden mit einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend die DNA aus dem Gel extrahiert. Vorgegangen wurde dabei nach Herstellerprotokoll, die finale Elution der DNA wurde je nach erwünschter Konzentration mit 40 µl HPLC-H₂O durchgeführt.

Es wurde Agarose der Firma Peqlab verwendet, die eine niedrige Bindungsaffinität zu Nukleinsäuren besitzt. Dadurch wurde die Elution der DNA erleichtert und die Ausbeuten erhöht. Die eluierte DNA stand sofort ohne weitere Bearbeitungsschritte für Folgeversuche zur Verfügung. Lagerung erfolgte bei -20°C.

4.2.13 DNA-Fällung

DNA wurde mit Natriumacetat und Ethanol gefällt. Dafür wurde 1/10 Volumen 3M Na-Acetat (pH 5,2) bzw. 4M (pH 4,6) zur DNA-Lösung zugegeben. DNA-Fällungen erfolgten standardmäßig in 100 µl Ansätzen. Kleinere Ansätze, z. B. bei einem Verdau oder bei Sequenzierungen wurden mit H₂O_{bidest} aufgefüllt. Danach wurden 2,5 Volumina 100 %-iges Ethanol p.a. zum Ansatz gegeben und gut vermischt. Um die Ausbeute zu erhöhen, konnte der Ansatz über Nacht bei -20°C gelagert werden. Anschließend wurde die Lösung 20-30 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment wurde mit 500 µl 70 %-igem Ethanol p.a. gewaschen. Anschließend wurde der Ansatz 15 min erneut bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert, dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt. Der Überstand wurde vorsichtig, ohne das Sediment zu berühren, abgenommen. Das Sediment wurde luftgetrocknet.

4.2.14 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden nach der von Sanger et al. (1977) entwickelten Kettenabbruch-Methode durchgeführt. Die Methode beruht darauf, dass bei einer PCR Didesoxynukleosid-Triphosphate (ddNTPs) in stöchiometrischer Menge beigefügt werden. Wird bei der DNA-Polymerisation durch die Polymerase ein solches Nukleotid eingebaut, kommt es zum Abbruch der Polymerisation, da die DNA-Polymerase wegen der fehlenden 3'-OH-Gruppe an der Ribose des Nukleotids kein weiteres anfügen kann. Auf diese Weise erhält man DNA-Fragmente verschiedenster Längen, die alle

Methoden

an ihren Enden ein ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP oder ddGTP) tragen. Früher mussten 4 parallele Ansätze gefahren werden, jeweils einer für die 4 verschiedenen Nukleotide (A, T, C, G). Um die DNA-Fragmente zu markieren wurden die Reaktionen mit Radioisotopen durchgeführt, die anschließend über spezielle Sequenziergele aufgetrennt wurden, mit denen dann ein Röntgenfilm belichtet wurde. Aus den Bandenmustern konnte dann die DNA-Sequenz abgelesen werden.

In einer verfeinerten Methode kommen fluoreszenzmarkierte ddNTPs zum Einsatz, wobei jedes Nukleotid mit einem anderen Farbstoff markiert ist (Adenin: R6G, grün; Thymin: ROX, rot; Cytosin: TAMRA, gelb; Guanin: R110, blau). In diesem System wird die zu sequenzierende DNA mit einem entsprechenden Primer und einem Premix (ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit), der dNTPs, markierte ddNTPs, Taq-DNA-Polymerase, MgCl₂ und den Puffer enthält, gemischt und in einer PCR amplifiziert. So entstehen DNA-Fragmente verschiedenster Längen, mit jeweils einem markierten Nukleotid an ihren Enden, wobei Fragmente gleicher Länge auch den gleichen Farbstoff als Markierung tragen. Diese Fragmente werden in einem Kapillar-Gelsystem der Größe nach aufgetrennt und mit einem Laser angeregt. Je nach Farbstoff wird ein Licht spezifischer Wellenlänge emittiert, das von einem Photoelement registriert und an einen Computer weitergeleitet wird. Der Computer setzt die einzelnen Messdaten über eine geeignete Software schließlich zu einer Sequenz zusammen.

Durchführung:

Standardansatz einer Sequenzierungs-Reaktion (20 µl):

5 µl	Premix (Bigdye™, Applied Biosystems)
200-300 ng	Plasmid-DNA
10 pmol	Sequenzierungsprimer
auf 20 µl HPLC-H ₂ O auffüllen	

Dieser Ansatz wurde gut vermischt und anschließend in einem Thermocycler bei folgendem Programm inkubiert:

Zyklen	Vorgang	Bedingungen
1	initiale Denaturierung	2 min, 96°C
25	Denaturierung	30 sek, 96°C
	Primer Annealing	30 sek (Temperatur je nach Primer)
	Elongation	4 min, 60°C
	Kühlung	4°C

Die Annealing-Temperatur wurde je nach Primer gewählt, für Standard-Sequenzierprimer (T3, T7, M13 forward, M13 reverse) wurde sie auf 48°C eingestellt.

Der Ansatz wurde nach der Reaktion mit Na-Acetat und Ethanol gefällt (siehe 4.2.13), getrocknet und in 25 µl HiDi Formamid (Applied Biosystems) aufgenommen und über Nacht bei 4°C gelöst. Anschließend wurde er in ein Sequenzierungs-Gefäß mit aufgesetztem Septum überführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Software Chromas 1.45 geöffnet und durch Sequenzvergleich mit einem frei zugänglichem Internetprogramm (<http://genome.cs.mtu.edu/align/align.html>) ausgewertet.

4.2.15 AT-Klonierung von PCR-Fragmenten

4.2.15.1 Klonierung in den pCR[®]2.1-Vektor mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen)

Die Klonierungsmethode des TOPO TA Cloning[®] Kits (Invitrogen) macht sich die Tatsache zu Nutze, dass Taq- und Tfl-Polymerasen durch ihre terminale Transferase-Aktivität einen 3'-Überhang aus Desoxyadenosinen an das PCR-Produkt anfügen. Der Vektor liegt in linearisiertem Zustand vor und besitzt einen 3'-Überhang aus Thymidinen. Außerdem ist das Enzym Topoisomerase I kovalent an die offenen 3'-Enden des Vektors gebunden. Durch die Ligationsaktivität der Topoisomerase I, wird ein PCR-Produkt mit 3'-A-Überhang schnell in den Vektor integriert,

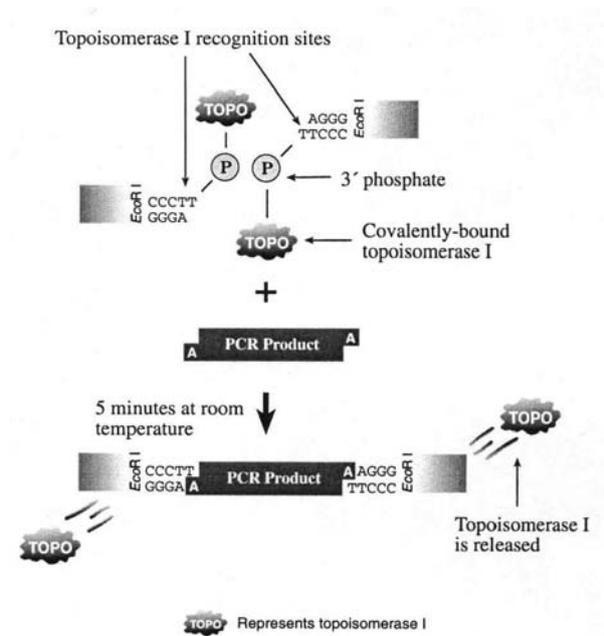


Abb. 4.3: Prinzip des TOPO TA Cloning[®] Kits
(Abb. von der Firma Invitrogen)

wobei das Enzym dissoziiert. Das Prinzip ist in Abb. 4.3 verdeutlicht. Diese Methode erlaubt auch eine Vorauswahl möglicher positiver Klone über Blau/Weiß-Selektion, wobei die positiven, also die Klone mit integriertem PCR-Produkt, weiß bleiben, während die Klone ohne Insert blau werden. Ohne Insert wird das lacZ-Gen exprimiert und X-Gal als Substrat der β -Galaktosidase gespalten, wobei ein blauer Farbstoff entsteht. Das PCR-Produkt inseriert zwischen Promotor und lacZ-Gen, so dass keine Expression dieses Gens mehr möglich ist. Nach der Ligation wurde der Ansatz in chemisch kompetente *E. coli* XL1-blue (Invitrogen) transformiert. Die Transformation wurde dann in zwei Verdünnungen auf LB_{Kan}-Platten (mit X-Gal für Blau/Weiß-Selektion) ausgestrichen.

Durchführung:

Wurde die PCR mit Phusion[™] High-Fidelity DNA Polymerase durchgeführt, mussten zunächst wie folgt A-Überhänge geschaffen werden.

40 μ l	aus Gel eluierter PCR-Ansatz
3 μ l	MgCl ₂ (25 mM)
5 μ l	10-fach Puffer (Finnzymes)
1 μ l	dNTPs (10 mM, MBI Fermentas GmbH)
0,5 μ l	Phusion [™] -DNA-Polymerase (Finnzymes)
auf 50 μ l HPLC-H ₂ O auffüllen	

Programm für den Thermocycler:

Zyklen	Vorgang	Bedingungen
1	Anhängen von terminalen As	10 min, 72°C

Anschließend wurde folgender Ansatz für die TOPO-Reaktion pipettiert:

4 µl	PCR-Produkt mit A-Überhängen
1 µl	Salt Solution (Invitrogen)
0,5 µl	TOPO [®] -Vektor (Invitrogen)

auf 6 µl HPLC-H₂O auffüllen

Der Ansatz wurde gemischt und 30 min bei 22°C inkubiert, bevor ein aufgetautes Aliquot kompetenter E. coli XL1-blue zupipettiert wurde. Danach erfolgten eine 45 min Inkubation auf Eis und ein 30 sek Hitzeschock bei 42°C. Zum Abkühlen wurde das Reaktionsgefäß anschließend für 2 min auf Eis gestellt. 250 µl SOC-Medium wurden zugegeben; vor der Ausplattierung folgte eine 1 h Inkubation bei 37°C. Für das blau-weiß Screening wurden 20 µl der 100 mg/ml X-gal Stammlösung und 1 µl der 1 M IPTG Stammlösung zu 100 µl LB-Medium pipettiert und dieses Gemisch dann 1 h vor dem Animpfen auf LB_{Kan}-Platte ausgestrichen. Der Ansatz wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.15.2 Klonierung in den pDrive-Vektor mit dem Qiagen PCR Cloning Kit

Durchführung:

Analog zur Klonierung in TOPO TA Cloning[®] Kit müssen auch hier wie folgt A-Überhänge am PCR-Produkt geschaffen werden.

40 µl	aus Gel eluierter PCR-Ansatz
3 µl	MgCl ₂ (25 mM)
5 µl	10-fach Puffer (MBI Fermentas GmbH)
1 µl	dNTPs (10 mM, MBI Fermentas GmbH)
0,5 µl	Taq-DNA-Polymerase (Promega)

auf 50 µl HPLC-H₂O auffüllen

Programm für den Thermocycler:

Zyklen	Vorgang	Bedingungen
1	Anhängen von terminalen As	10 min, 72°C

Anschließend wurde folgender Ansatz für die Ligation pipettiert:

4 µl	PCR-Produkt mit A-Überhängen
5 µl	Ligation Master Mix, 2x
1 µl	pDrive Cloning Vector (50 ng/µl, Qiagen)

Nach vorsichtigem Mischen wurde 1 h auf Eis inkubiert und die Ligase 10 min bei 70°C inaktiviert. Währenddessen wurde ein Aliquot kompetenter E. coli XL1-blue auf Eis aufgetaut und dann zur Ligation pipettiert. Es wurde vorsichtig gemischt und 45 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 60 sek einem 42°C-Hitzeschock ausgesetzt und 2 min auf Eis wieder abgekühlt. Anschließend wurden 250 µl SOC-Medium zupipettiert und für die Expression der Resistenzen bei 37°C geschüttelt. Für das blau-weiß Screening wurden 20 µl der 100 mg/ml X-gal Stammlösung und 1 µl der 1 M IPTG Stammlösung zu 100 µl LB-Medium pipettiert und dieses Gemisch dann 1 h vor dem Animpfen auf LB_{Kan}-Platte ausgestrichen. Der Ansatz wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.16 Klonierung von DNA-Fragmenten

4.2.16.1 Gewinnung des Inserts

Wenn man eine bestimmte cDNA in einem speziellen Plasmidvektor klonieren möchte, muss das entsprechende DNA-Fragment zunächst gewonnen werden. Liegt die cDNA z.B. in einem anderen Plasmid vor, wird das Fragment über einen Restriktionsverdau (siehe 4.2.8) ausgeschnitten. Um genügend Insert zu erhalten, wurden meistens 3-4 Ansätze mit jeweils 3 µg DNA verdaut, anschließend über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und die gewünschte DNA aus dem Gel eluiert (siehe 4.2.12). Wurde die DNA über eine PCR gewonnen, wurde das PCR-Produkt verdaut (siehe 4.2.8), der Verdau anschließend mit Na-Acetat/Ethanol gefällt und in 10-20 µl H₂O_{bidest} aufgenommen. Sollte ein PCR-Produkt direkt über glatte Enden kloniert werden, so wurden die Primer vor der PCR, die in solchen Fällen mit Pfu-bzw. PhusionTM-Polymerase durchgeführt wurde, phosphoryliert, um eine Ligation des PCR-Produktes zu ermöglichen (siehe auch 4.2.17).

4.2.16.2 Dephosphorylierung des Vektors

Die Dephosphorylierung wurde bei ungerichteter Klonierung, d.h., wenn nur ein Restriktionsenzym verwendet wird, durchgeführt, um die Autoligationsrate des Vektors zu vermindern. Die Ligase benötigt phosphorylierte Enden, um zwei DNA-Moleküle miteinander verbinden zu können. Durch die Entfernung der Phosphatgruppe am 5'-Ende des DNA-Stranges kann der geöffnete Vektor nicht mehr durch die Ligase geschlossen werden, was die Anzahl der Falschpositiven reduziert. Bei gerichteter Klonierung war die Dephosphorylierung nicht notwendig, d.h., wenn mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten wird, da eine Ligation von nicht-komplementären Enden nicht möglich ist. Der Vektor wurde zunächst linearisiert, das Restriktionsenzym 10 min bei 85°C hitzeinaktiviert und dann der Ansatz mit Na-Acetat und Ethanol gefällt (siehe 4.2.13). Das Pellet wurde so in H₂O_{bidest} resuspendiert, dass in 1 µl etwa 200 ng DNA enthalten waren.

Pipettierschema eines Standardansatzes (5 µl):

100-150 ng	linearisierter Vektor
0,5 µl	10-fach SAP-Puffer (MBI Fermentas GmbH)
1 µl	Shrimp alkalische Phosphatase (1 U/µl, MBI Fermentas GmbH)
<hr/>	
auf 5 µl H ₂ O _{bidest} auffüllen	

Der Ansatz wurde gemischt und 1-2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym 15 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Der Ansatz wurde bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt, was mehrere Wochen möglich war.

4.2.16.3 Phosphorylierung der Primer

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

Durchführung:

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

Methoden

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

1 µL	Primer (100 pmol/µl)
2 µl	10-fach T4 DNA Ligasepuffer (MBI Fermentas GmbH)
2 µl	rATP (25 mM, Stratagene)
2 µl	T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl, MBI Fermentas GmbH)

auf 20 µl H₂O_{bidest} auffüllen

Der Ansatz wurde gemischt und 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kinase für 15 min bei 68°C hitzeinaktiviert. Nach der Hitzeinaktivierung wurde der Ansatz bis zur Verwendung bei 4°C gekühlt. Phosphorylierte Primer wurden vor einer PCR immer frisch kinasiert verwendet. Aus einem Phosphorylierungsansatz wurden jeweils direkt 1 µL (entspricht 10 pmol) für eine PCR eingesetzt (Durchführung einer PCR mit „Proof-reading“-Polymerase siehe 4.2.1).

4.2.17 Ligation

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

Pipettierschema eines Ligations-Ansatzes (20 µL):

150 ng	Linearisierter und aufgereinigter Vektor
450-600 ng	Geschnittenes und aufgereinigtes Insert
2 µl	10-fach T4-DNA Ligase Puffer (MBI Fermentas GmbH)
1 µl	T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl, MBI Fermentas GmbH)

auf 20 µl H₂O_{bidest} auffüllen

Der Ansatz wurde 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde der Gesamtansatz für eine chemische Transformation in *E.coli*-Bakterien eingesetzt (siehe 4.1.7).

Kurzprotokoll einer Transformation:

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

Test der erhaltenen Klone:

Mit einer Kolonie-PCR (siehe 4.2.4) wurde überprüft, ob die selektierten Bakterienklone den Klonierungsvektor mit dem inserierten DNA-Abschnitt aufgenommen haben. Bei ungerichteten Klonierungen wurde darüber hinaus die Orientierung des Inserts analysiert. Konnten mit der PCR keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden, wurden die Klone mit einem Restriktionsverdau (siehe 4.2.8) überprüft. Im Allgemeinen wurden bei Expressionsvektoren die inserierten DNA-Fragmente vollständig sequenziert, um Fehler während der Klonierung auszuschließen.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Thomas und Kornberg (1975)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine anhand ihrer Masse aufgetrennt werden. Normalerweise ist die Wanderungsgeschwindigkeit von Molekülen im elektrischen Feld abhängig von drei Faktoren: der Größe, ihrer Form und ihrer elektrischen Ladung. Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist jedoch ausschließlich die Masse von Bedeutung, da die Proteine durch Zugabe von SDS, einem stark amphipatischen Reagenz, denaturiert, d.h. in ihre Untereinheiten zerlegt werden. An die entfalteten Peptid-Ketten binden SDS-Moleküle und verleihen ihnen eine stark negative Ladung. Die Eigenladung der Proteine kann deshalb vernachlässigt werden. Zur vollständigen Denaturierung wird zusätzlich noch β -Mercaptoethanol zugegeben, das alle Disulfidbrücken im Protein spaltet.

4.3.1.1 Herstellung der Gele

Lösungen:

- A´: Acrylamid-Bis-Lösung für das Sammelgel:
30 % (w/v) Acrylamid
0,8 % (w/v) Bis (N,N´-methylendiacylamid)
- B: 0,15 % (w/v) Bis (N,N´-methylendiacylamid)
- C: Sammelgelpuffer (pH 6,8):
0,75 M Tris-HCl
0,4 % (w/v) SDS

10 % (w/v) APS (Ammoniumperoxodisulfat-Lösung) in H_2O_{bidest}

TEMED (Tetramethylethyldiamin)

Durchführung:

Für die Herstellung eines Minigels wurden zwei Glasplatten, zwei Spacer und ein Kamm (13 Taschen) benötigt, die zunächst mit Ethanol gereinigt wurden. Anschließend wurden die Glasplatten übereinander gelegt, die Spacer seitlich eingesetzt und der untere Teil von außen mit Tesafilm abgedichtet. Zusätzlich wurde der innere Teil mit 0,5 % Agarose abgedichtet, so dass eine Schicht von ca. 5 mm entstand. Der Kamm wurde vorübergehend eingesetzt, damit eine Markierung für das Trenngel ca. 0,5 cm unterhalb der Taschen angebracht werden konnte. Danach wurde die Trenngellösung pipettiert, gut vermischt und bis zur Markierung zwischen die beiden Glasplatten gegossen. Das Trenngel wurde bis zum Ende der Polymerisation mit Wasser überschichtet, damit sich eine plane Oberfläche bilden konnte. Danach wurde das Wasser entfernt, das Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet und der Kamm eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisation konnte dieser vorsichtig entfernt werden. Vor dem Einsetzen in die Gelkammer mussten die Tesafilmstreifen und die Klammern an den Glasplatten entfernt werden.

4.3.2.1 Proteintransfer auf Nitrocellulose

Erforderliche Lösungen:

Westernblot-Puffer 1:	25 mM	Tris-HCl
	20 % (v/v)	Methanol
	⇒ pH einstellen auf 10,4	
Westernblot-Puffer 2:	300 mM	Essigsäure
	20 % (v/v)	Methanol
	⇒ pH einstellen auf 10,4	
Westernblot-Puffer 3:	25 mM	Tris-HCl
	40 mM	DL-Norleucin
	20 % (v/v)	Methanol
	⇒ pH einstellen auf 9,4	
TBST (pH 8,0)	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	150 mM	NaCl
	0,05 % (w/v)	Tween® 20
Absättigungslösung	10 % (w/v)	Magermilchpulver in TBST
	⇒ pH einstellen auf 7,8	
Ponceau S	gebrauchsfertige 0,2 %ige Lösung (Serva)	
ECL-Lösungen 1 und 2	(Amersham Pharmacia Biotech)	

Durchführung:

Nach Beendigung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das Gel aus der Kammer genommen und das Sammelgel mit einem Skalpell vom Trenngel entfernt. Durch das Abschneiden der linken unteren Ecke wurde die Orientierung des Gels markiert. Anschließend wurde das Gel für 15 min im Westernblot-Puffer 3 äquilibriert. Während dieser Zeit wurden die Nitrozellulose-Membran und die Whatman-Filter auf die Gelgröße zugeschnitten. Danach wurde der Westernblot -wie in Abb. 4.5 dargestellt- aufgebaut. Der Transfer erfolgte mit einer Glaskohlenstoff-Elektroden-Blottingkammer (Fa. Cti GmbH). Jeweils drei Whatman-Filter wurden kurz in den jeweiligen Westernblot-Puffern eingeweicht, bevor sie in der Blottingkammer übereinander geschichtet wurden. Um Luftblasen-Bildungen zu vermeiden, wurden die Whatman-Filter mit einem Zentrifugenröhrchen mit sanftem Druck gewalzt. Luftblasen unter dem Gel wurden vorsichtig mit befeuchteten Fingern heraus gestrichen, die Nitrozellulose-Membran wurde nur aufgelegt.

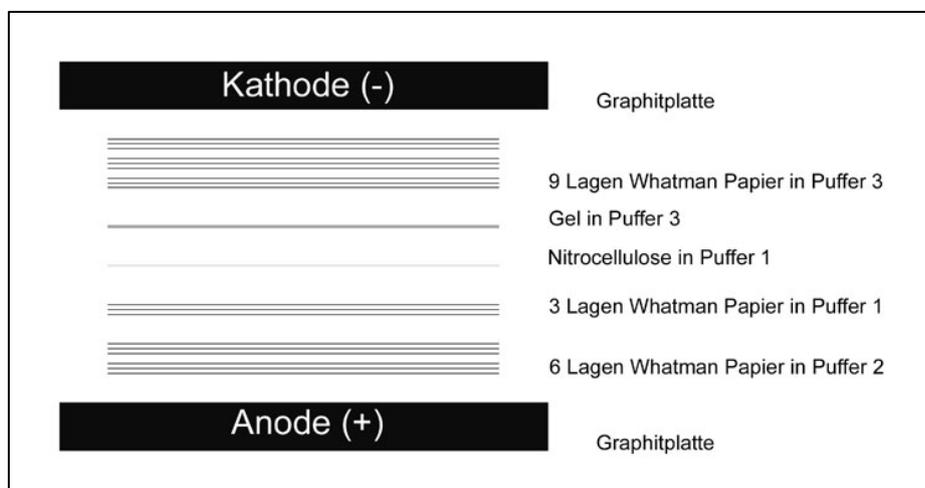


Abb. 4.5: Schematischer Aufbau eines Westernblots

Nach dem vollständigen Übereinanderschichten wurde die Kathodenplatte aufgesetzt und die Kammer an eine Stromquelle angeschlossen. Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm für 1,5 h. Danach wurde der Blot abgebaut und die transferierten Proteine mit Ponceau S auf der Nitrozellulose-Membran nachgewiesen. Dazu wurde der Blot in einer Glasschale mit etwa einem Zentimeter Ponceau S überschichtet und für 5 min unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit entsalztem Wasser entfärbt und für Dokumentationszwecke eingescannt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran entweder über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei RT mit 10 % (w/v) Magermilch in TBST, pH 7,8 in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper abgesättigt.

4.3.2.2 Immunreaktion mittels Antikörper-Nachweis

Die in Milch abgesättigte Nitrozellulose wurde 1 h mit dem in TBST verdünnten Antikörper bei RT inkubiert. Die Verdünnung war abhängig vom verwendeten Antikörper (siehe 3.1.5). Nach der Antikörperinkubation wurde der Blot kurz in TBS oder TBST gespült und anschließend 3x 10 min gewaschen. Danach wurde 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper in 10 % Magermilchpulver in TBST inkubiert (Verdünnung und Puffer siehe 4.3.2.1). Anschließend wurde wieder 3- bis 4x 10 min in TBS oder TBST gewaschen. Die Detektion erfolgte dann über ECL (siehe 4.3.2.3).

4.3.2.3 Detektion über ECL (Enhanced Chemi-Luminescence)

Zum Nachweis von spezifisch gebundenen Primärantikörpern mit Hilfe der „Enhanced Chemiluminescence“-ECL-Detektion, müssen Sekundärantikörper verwendet werden, an die das Enzym Peroxidase (isoliert aus Meerrettich) gekoppelt ist. Die ECL-Reaktion wurde im Anschluss an die oben beschriebenen Antikörperinkubations- und Waschschritte durchgeführt. Die beiden ECL-Reagenzien (Amersham Pharmacia Biotech) wurden im Verhältnis von 40:1 gemischt, die Nitrozellulose-Membran mit dieser Lösung befeuchtet und für vier min unter leichter Bewegung inkubiert. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation der Substanz „Luminol“ mit der Substanz „Perhydrol“ in dem Gemisch. Dadurch wird Licht in Form von chemischer Lumineszenz emittiert. Nach der Einwirkzeit wurde die Lösung abgetropft und der Blot in Frischhaltefolie eingeschlagen. Anschließend wurde auf die Nitrozellulose ein Röntgenfilm (Cronex) in einer Dunkelkammer in eine Filmkassette gelegt. Das emittierte Licht reicht aus, um den Röntgenfilm zu belichten. Die Expositionsdauer richtete sich nach der Intensität des Lichtsignals. Im Allgemeinen wurden Zeiten zwischen einer und 30 min gewählt. Der Röntgenfilm wurde anschließend im Entwicklerbad für 15 sek bis 5 min inkubiert und nach kurzem Spülen in Wasser in Fixierlösung für eine Minute fixiert. Abschließend wurde der Film gründlich mit entionisiertem Wasser abgespült, getrocknet und zur Dokumentation eingescannt und mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe® Photoshop editiert. Die Nitrozellulose wurde gründlich in TBST gewaschen und luftdicht im Dunkeln bei 4°C für mehrere Wochen gelagert.

4.3.2.4 Entfernen von gebundenen Antikörpern (Strippen)

Lösungen:

Strip-Puffer (50 ml):	100 mM	Tris/HCl pH 6,7
	2 % (w/v)	SDS
	390 µl	β-Mercaptoethanol
TBST:	(siehe 3.4.4.1)	

Durchführung:

Die Nitrozellulose wurde zunächst gut in TBS oder TBST gewaschen, dann 30 min (nicht länger!) bei 50°C unter Schütteln in Strip-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Nitrozellulose sehr gründlich mit TBST gewaschen. Danach konnte die Nitrozellulose neu abgesättigt und mit einem neuen Antikörper entwickelt werden.

4.3.3 Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion über einen „Overlay-Blot-Assay“

Dieser Bindungsassay wurde in Anlehnung an Lounsbury et al. (1994) durchgeführt. Er dient der Detektion von Protein-Protein-Interaktionen.

Lösungen:

Renaturierungspuffer:	20 mM	MOPS pH 7,1
	100 mM	Na-Acetat
	5 mM	Mg-Acetat
	0,25 %	Tween [®] -20
	10 %	Magermilchpulver
	5 mM	DTT
Bindungspuffer:	20 mM	MOPS pH 7,1
	100 mM	K-Acetat
	5 mM	Mg-Acetat
	1 %	Tween [®] -20
	5 mM	DTT
TBST:	siehe 4.3.2.1	

Durchführung:

Mittels SDS-PAGE getrennte Polypeptide wurden auf Nitrocellulosemembran transferiert und über Nacht in bei 4°C in Renaturierungspuffer inkubiert. Dies dient der Entfernung von SDS und unterstützt die Rückfaltung der auf der Membran immobilisierten Proteine in ihre annähernd native Konformation. Am nächsten Tag wurde die Nitrozellulose zweimal für 15 min in Bindungspuffer gewaschen und anschließend in Bindungspuffer, der die möglichen Bindungsproteine enthält, für 1 h bei RT inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Nitrozellulose fünfmal für 5 min in Bindungspuffer und zweimal für 5 min in 1x TBST gewaschen und anschließen über Nacht in 1x TBST + 10 % Magermilchpulver bei 4°C abgesättigt. Am darauf folgenden Tag erfolgten die Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern sowie die ECL-Reaktion (siehe 4.3.2.3).

4.3.4 Herstellung und Aufreinigung von Histidin-Fusionsproteinen

Um Histidin-Fusionsproteine herstellen zu können, wurde zunächst der entsprechende kodierende DNA-Abschnitt unter Berücksichtigung des Leserasters in den Expressionsvektor pET-21a inkloniert und in Bakterien transformiert. Bei der Expression dieses Konstrukts entsteht ein Protein, das am Carboxyterminus sechs Histidinreste trägt. Durch diese spezifische Aminosäureabfolge ist es möglich das Fusionsprotein über Ni-NTA-Agarosekügelchen aufzureinigen. Die Histidine bilden dabei mit den immobilisierten Nickelatomen eine starke Affinität aus, wodurch das Fusionsprotein an die Trägermatrix bindet. Proteine, die keine Abfolge von Histidinen besitzen, bleiben frei und werden durch Waschschrte aus der Säulenmatrix eluiert. Durch stufenweise Absenkung des pH-Wertes wurde die Affinität zwischen Histidinresten und Nickelatomen sukzessive geschwächt, so dass sich das Protein bei einem bestimmten Säuregrad von den Ni-NTA-Agarosekügelchen eluieren lies.

4.3.4.1 Expression von Hexa-Histidin-Fusionsproteinen in Bakterien

Für die Expression eines Proteins mit Histidin-Anhang („Tag“) wurde der Bakterienstamm M Rosetta[™] (DE3)*pLysS* Competent Cells *E. coli* verwendet (siehe auch 3.1.4).

Lösungen:

LB-Selektionsmedium (siehe 4.1.1)

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

Durchführung:

Zunächst wurde der Klonierungsvektor in Rosetta™ (DE3)*pLysS* Competent Cells *E. coli* transformiert. Am nächsten Tag wurde eine Übernachtskultur von einer Bakterienkolonie angeimpft. Nach 12-stündiger Vermehrung der Bakterien wurden diese auf 200 ml mit LB-Selektionsmedium verdünnt und weiter bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Nachdem die Bakterienkultur eine Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,6-0,8 erreicht hatte, wurde die Expression des Fusionsproteins durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration = 1 mM) in den Bakterien induziert. Die Induktionsdauer betrug 4 h. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurde kurz vor der IPTG-Induktion ein definiertes Volumen aus der Expressionskultur entnommen und ebenfalls für 4 h bei denselben Bedingungen weiter kultiviert. Diese Probe diente zum einen als Wachstumskontrolle der Bakterienzellen. Durch parallele Messung der Zelldichten konnte eine eventuelle zytotoxische Wirkung des exprimierten Proteins erkannt werden. Zum anderen diente die nicht-induzierte Probe in vergleichenden Analysen als Kontrolle, ob das Fusionsprotein nach der Induktion von den Bakterienzellen im gewünschten Maß exprimiert wurde. Beide Kulturen wurden anschließend für 10 min bei 5.000 g zentrifugiert. Die Bakteriensedimente konnten entweder direkt für die Aufreinigung verwendet oder für einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert werden.

4.3.4.2 Aufreinigung von Proteinen mit einem Histidin-Tag unter denaturierenden Bedingungen

Lösungen:

Ni-Nickel-Agarose (Qiagen)

Lysispuffer (pH 8,0)	8 M	Harnstoff
	100 mM	Na ₂ HPO ₄
	10 mM	Tris-HCl
	⇒ pH einstellen auf 8,0	
Waschpuffer (pH 6,3)	Zusammensetzung wie Lysispuffer (pH 8,0)	
	⇒ pH einstellen auf 6,3	
Elutionspuffer (pH 5,9)	Zusammensetzung wie Lysispuffer (pH 8,0)	
	⇒ pH einstellen auf 5,9	
Elutionspuffer (pH 4,5)	Zusammensetzung wie Lysispuffer (pH 8,0)	
	⇒ pH einstellen auf 4,5	
Neutralisationspuffer	1 M	Tris-HCl
	⇒ pH einstellen auf 9,5	

4.3.4.3 Säulenvorbereitung

Die Aufreinigung von Proteinen mit einem Histidin-Tag wurde stets in einer Säule durchgeführt. Für die Aufreinigung eines Proteins aus einer 250 ml-Kultur wurden 2 ml Ni-NTA-Agarose-Suspension (Qiagen) auf eine entsprechende Säule (BD Biosciences) pipettiert, was einem Säulenvolumen von 1 ml entsprach. Nachdem die überschüssige Lagerungsflüssigkeit die Säule passiert hatte, wurde die Agarosematrix mit 20 ml Lysispuffer äquilibriert. Nach diesem Vorgang war die Säule gebrauchsfertig und konnte beladen werden. Bei der Zugabe eines neuen Puffers wurde stets darauf geachtet, dass kein Säulenmaterial aufgewirbelt wurde. Darüber hinaus musste ein Trockenfallen der Agarosematrix vermieden werden.

4.3.4.4 Aufschluss der Bakterien

Die Bakteriensedimente wurden entweder aus Eis aufgetaut oder unmittelbar nach der Zentrifugation in 5 ml Lysispuffer pro Gramm Pellet (entspricht in etwa 250 ml Kulturvolumen) resuspendiert. Der Resuspensionsvorgang wurde stets auf Eis durchgeführt und es wurde darauf geachtet, dass sich möglichst kein Schaum bildete. Die Suspension wurde dann für 30–60 min bei RT unter Rollen inkubiert und anschließend für 30 sek sonifiziert. Vor der abschließenden Zentrifugation für 10 min bei 10.000 g und 4°C wurde vom Lysat eine Probe entnommen, die 500 µl der Ausgangs-Bakterienkultur entspricht.

4.3.4.5 Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose-Säule

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

4.3.4.6 Protokoll einer Proteinreinigung über „His-Tag“ unter denaturierenden Bedingungen

5-10 ml Probe	⇒ einen Teil aufbewahren, den Rest werfen
40 ml Lysispuffer (pH 8,0)	⇒ komplett sammeln
15 ml Waschpuffer (pH 6,3)	⇒ in 1 ml Aliquots sammeln
10 ml Elutionspuffer (pH 5,9)	⇒ in 1 ml Aliquots sammeln
10 ml Elutionspuffer (pH 4,5)	⇒ in 1 ml Aliquots sammeln

Zu jedem Aliquot ab pH 6,3 wurde $\frac{1}{10}$ Volumen Neutralisationspuffer zugegeben bzw. vorgelegt. Das Eluat wurde in kleine Aliquots à 1 ml aufgefangen, um den Zeitpunkt der Elution besser eingrenzen zu können. Die aufgereinigten Proteine konnten im neutralisierten Elutionspuffer für mehrere Tage bei 4°C oder über einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert werden, ohne dass Degradationserscheinungen auftraten.

4.3.4.6.1 Aufbereitung der Säulenmatrix

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

4.3.4.6.2 Vorbereiten der Proben für die SDS-Page

Von allen Fraktionen einschließlich des Sonifikats, Sediment des Sonifikats sowie dem Durchfluss wurde soviel abgenommen, dass es einem Volumen von 500 μL der ursprünglichen Bakterienexpressionskultur entsprach. Bei einer 250-ml-Kultur errechnet sich das abgenommene Volumen wie folgt:

250.000 μL / 500 μL = 500 \Rightarrow 1 / 500 einer jeden Fraktion musste eingesetzt werden.

Die entsprechenden Volumina wurden abgenommen und für die SDS-PAGE vorbereitet. Je nach Volumen wurden sie entweder direkt im 2-fachen SDS-Probenpuffer (siehe 4.3.1) aufgenommen oder vorher mit Methanol/Chloroform gefällt (siehe 4.3.10) und dann im 1-fachen SDS-Probenpuffer (siehe 4.3.1) aufgenommen.

4.3.4.6.3 Bestimmung der Proteinausbeute

Die Konzentration der in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurde durch eine Extinktionsmessung über eine BSA-Standardreihe im SDS-Polyacrylamidgel abgeschätzt (siehe 4.3.1) und anschließend mit den Volumina der Elutionsfraktionen verrechnet.

4.3.5 Herstellung und Aufreinigung von ungetagten Laminen

Um Proteine herstellen zu können, wurde zunächst der entsprechende kodierende DNA-Abschnitt unter Berücksichtigung des Leserasters in den Expressionsvektor pET-21a inkloniert und in RosettaTM(DE3)*pLys* Competent Cells *E.coli* Bakterien transformiert.

4.3.5.1 Expression von Laminen in Bakterien

Für die Expression des Lamins wurde der Bakterienstamm M RosettaTM(DE3)*pLysS* Competent Cells *E. coli* verwendet (siehe auch 3.1.4).

Lösungen:

LB-Selektionsmedium (siehe 4.1.1)

IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid; SL: 1 M in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$)

Durchführung:

Am Tag nach der Transformation wurde eine Übernachtskultur von einer Bakterienkolonie angeimpft. Nach 12-stündiger Vermehrung der Zellen wurden 5 ml davon zu 200 ml LB-Selektionsmedium mit Chloramphenicol (34 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und Ampicillin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gegeben und weiter bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Nachdem die Bakterienkultur eine Zelldichte von $\text{OD}_{600} = 0,5-0,8$ erreicht hatte, wurde die Expression des Fusionsproteins durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration = 1 mM) in den Zellen induziert. Die Induktionsdauer betrug 5 h. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurde kurz vor der IPTG-Induktion ein 1 ml aus der Expressionskultur entnommen und ebenfalls für 5 h bei denselben Bedingungen weiter kultiviert. Diese Probe diente zum einen als Wachstumskontrolle der Bakterienzellen. Durch parallele Messung der Zelldichten konnte eine eventuelle zytotoxische Wirkung des exprimierten Proteins erkannt werden. Zum anderen diente die nicht-induzierte Probe in vergleichenden Analysen als Kontrolle, ob das Fusionsprotein nach der Induktion von den Bakterienzellen im gewünschten Maß exprimiert wurde. Dann wurde erneut eine Probe abgenommen, beide Proben wurden anschließend für 10 min bei 3.000 g zentrifugiert. Die Bakteriensedimente wurden in 40 μl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen.

4.3.5.2 Aufreinigung der Lamine unter denaturierenden Bedingungen

Das Aufbrechen der Bakterien und die Aufreinigung von Lamin über Anionen-Kationen Tauscher erfolgten nach dem Protokoll von G. Krohne (2004).

Lösungen:

MgCl ₂	1 M in H ₂ O
DTT	1 M in H ₂ O
PMSF	100 mM in MetOH
DNase	50 mg/ml: 25 mg DNase I (AppliChem) in 250 µl Tris-Puffer (100 mM NaCl, 2 2 2 mM MgCl ₂ , 20 mM Tris, pH 7,5), + 250 µl Glycerin
RNase	10 mg/ml: 10 mg RNase A (Sigma) in 500 µl Tris-Puffer (100 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂ , 20 mM Tris, pH 7,5) 10 min 80°C, + 500 µl Glycerin
Bakterien Lyse Puffer	1 mM EDTA, 25 % Saccharose, 50 mM Tris, pH 8,0
Bakterien Detergenz Puffer	0,2 M NaCl, 1 % (w/v) SDS, 1,5 % (w/v) Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 7,5
Bakterien Triton™ Puffer	0,75 % Triton™ X-100, 2 mM EDTA, pH 7,5
DEAE-Sepharose	fast flow; Pharmacia
CM-Sepharose	fast flow; Pharmacia
„Basischer“ Harnstoffpuffer	8 M Harnstoff, 2 mM DTT, 0,2 mM PMSF, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
„Saurer“ Harnstoffpuffer	8 M Harnstoff, 2 mM DTT, 0,2 mM PMSF, 50 mM Natriumacetat, pH 5,6

Die folgenden Schritte wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei 4°C durchgeführt.

Die Kultur wurde schrittweise in 50 ml-Falcons bei 4.000 g pelletiert und die Pellets in 8 ml Bakterien Lyse Puffer resuspendiert. Dabei wurde ein enger Glas-Homogenisator verwendet. 4 ml Bakterien Lyse Puffer mit 50 mg/ml Lysozym wurden zugegeben und bei 4°C 30 min auf einem Rollgerät inkubiert. Nacheinander wurden 200 µl 1 M MgCl₂, 200 µl 0,1 M PMSF, 200 µg RNase und 500 µg DNase zupipettiert und die Inkubation weitere 20 min fortgesetzt. Anschließend werden 20 ml Bakterien Detergenz Puffer zugefügt und die lysierten Bakterien für 10 min bei 6.000 g zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden dreimal in Bakterien Triton™ Puffer resuspendiert und anschließend jeweils 10 min bei 6.000 g zentrifugiert. Die erhaltenen Pellets wurden in 8 ml „basischem“

Methoden

Harnstoffpuffer resuspendiert und in einer Ultrazentrifuge bei 100.000 g für 50 min bei 15°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und konnte bei -70°C aufbewahrt werden.

Die Säulenfraktionierung wurde bei RT in Poly-Prep Säulen (Durchmesser 8 mm, Länge 10 cm) der Firma Bio-Rad mit Hilfe einer Pumpe durchgeführt, die einen konstanten Fluss von 1-2 Tropfen/s erlaubte. Die Säule wurde mit 5 ml DEAE-Sepharose gefüllt und nach dem Absetzen des Säulenmaterials mit 50 ml "basischem" Harnstoffpuffer gewaschen. Die Säule wurde mit dem gelösten Protein in "basischem" Harnstoffpuffer geladen und die ungebundenen Proteine durch erneutes Waschen mit 40 ml "basischem" Harnstoffpuffer entfernt. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 0-250 mM NaCl in "basischem" Harnstoffpuffer. Der Gradient wurde durch einen Gradienten-Mixer erzeugt. Fraktionen von 1,5 ml wurden gesammelt, von denen jeweils 10 µl mit 10 µl 2x SDS-Probenpuffer versetzt wurden. Die Proteine in den Fraktionen wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel gefärbt. Laminreiche Fraktionen, also die Fraktionen, die auf der zu erwartenden Höhe von ca. 70 kDa die stärksten Banden zeigten, wurden vereinigt und bei -70°C gelagert oder sofort dialysiert.

Die Dialyse erfolgte in Dialyseschläuchen (Typ Spectra/Por 1, 6 – 8.000 MWCO, Flachbreite 10 mm, Ø 6,4 mm) der Firma Spectrum Laboratories (Breda, Niederlande). Die laminreichen Fraktionen wurden in den Dialyseschlauch gegeben und bei 20°C gegen „saurer“ Harnstoffpuffer dialysiert.

Die anschließende Säulenfraktionierung erfolgte mit CM-Sepharose nach demselben Ablauf wie die DEAE-Sepharose Säulenaufreinigung, wobei „saurer“ Harnstoffpuffer zur Elution verwendet wurde. Auch hier wurde wieder eine SDS-PAGE gefahren um die laminreichen Fraktionen zu identifizieren. Diese konnten bei -70°C aufbewahrt werden.

4.3.6 *in vitro*-Bildung von Laminfilamenten

Lösungen:

MES-Puffer	20 mM MES, 175 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 6,5
2,5 % Glutaraldehyd mit Ionen	5 ml 25 % Glutaraldehyd, 2,5 ml 1M KCl, 1,25 ml 0,1M MgCl ₂ , 41,25 ml 0,05 M Cacodylatpuffer, pH 7,2
Uranylacetat	
Cacodylatpuffer 0,2 M	0,2 M Cacodylsäure Na-Salz Trihydrat, pH 7,2
Cacodylatpuffer 0,05 M	0,05 M Cacodylsäure Na-Salz Trihydrat, pH 7,2
Osmiumtetroxid 2 %	2 Teile 4 % OsO ₄ , 1 Teil H ₂ O _{bidestr.} 1 Teil 0,2 M Cacodylatpuffer
Propylenoxid	
Epon-Lösung A	50 ml DDSA, 31 ml Epon 812 (Serva, Heidelberg)
Epon-Lösung B	44,5 ml MNA, 50 ml Epon 812
Epon-Lösung C	2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)-phenol

Durch die Dialyse gegen MES-Puffer wird den Lamin-Fraktionen unter anderem der Harnstoff entzogen und die Struktur der Lamine kann wieder rekonstituiert werden. Die Versuche erfolgten nach dem Protokoll von C. Gieffers (1991).

4.3.7 Renaturierung von Proteinen durch Dialyse

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

Durchführung:

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

Protokol einer Proteinrenaturierung durch Dialyse:

6 h bei 4°C	3 M Harnstoff / 1-fach PBS (siehe 4.3.1) 3 L
6 h bei 4°C	1-fach PBS oder MES 3 L
oder	
12 h bei 4°C	3 M Harnstoff / 1-fach PBS 3 L

4.3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

4.3.8.1 BSA-Konzentrationsreihe

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

4.3.8.2 Bradford-Test

Eine genauere Proteinquantifizierung ermöglicht der Bradford-Test (Bradford, 1976). Die Bestimmungsgrenze des Tests liegt zwischen 1 und 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein. Reduzierende Chemikalien wie z. B. β -Mercaptoethanol dürfen nicht in der zu messenden Lösung vorhanden sein, da sie das Messergebnis negativ beeinflussen. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva) bindet in saurer Lösung an kationische und nichtpolare, hydrophobe Proteinreste. Durch die Bindung verändert sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffs und verschiebt sich zu einem Maximum bei 595 nm. Mit einer Kalibrierungsreihe eines bekannten Proteins (BSA) ist eine Berechnung der genauen Proteinmenge möglich.

Durchführung:

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

4.3.9 Extraktion von Proteinen aus Kulturzellen

Zur Gewinnung von mit der Kernhülle assoziierten Proteinen aus Kulturzellen wurde ein Gesamtproteinextrakt hergestellt.

Lösungen:

PBS (siehe 4.3.1)

Lysis-Puffer (pH 7,5):	50 mM	Tris-HCl
	150 mM	NaCl
	0,5 % (v/v)	Triton™ X-100
	5 mM	EDTA
	0,2 mM	PMSF

Durchführung:

Als Ausgangsmaterial wurden durch Zellkultur vermehrte COS-7 oder HeLa verwendet. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei einer Temperatur von 4°C und unter Anwesenheit von Proteaseinhibitoren (PMSF) durchgeführt, um einen proteolytischen Abbau der Proteine vorzubeugen.

Für einen Gesamtproteinextraktionsansatz wurden Kulturzellen in 6 große Plastik-Petrischalen (Ø 18 cm) bis zu einer Zelldichte von maximal 2-3 10^6 Zellen pro Milliliter Kulturmedium kultiviert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgeschabt, in PBS gewaschen mit einer Pipette in zwei 50 ml-Röhrchen überführt. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Röhrchen für 10 min bei 500 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Lysis-Puffer / 5×10^6 Zellen aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde für 4x 15 sek sonifiziert und wiederum 15 min auf Eis inkubiert, wodurch die Zellen aufgeschlossen und die Proteine in Lösung gingen. Anschließend wurde die Suspension für 15 min bei 15.000 g zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und in flüssigem Stickstoff bei -195,8°C schock-gefroren. Danach konnten die Proteinproben für mehrere Monate bei -20°C aufbewahrt werden.

4.3.10 Fällung von Proteinen

4.3.10.1 Proteinfällung mit Methanol und Chloroform

Für eine Fällung wurden 400 µL einer wässrigen Proteinlösung mit 400 µL Methanol (100 %, p.a.) und 300 µL Chloroform (100 %, p.a.) vermischt. Nach Zugabe von Chloroform wurde die Lösung milchig. Anschließend wurde die Suspension für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen, wobei sich die Proteine in der weißlichen Interphase befinden. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, der verbleibende Rest mit 300 µL Methanol (100 %, p.a.) erneut vermischt. Es folgte eine weitere Zentrifugation für eine Minute bei 13.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinsediment für 15 min bei RT luftgetrocknet. Schwerlösliche Präzipitate wurden zunächst in einem kleinen Volumen (5 µL) 2 M Harnstoff vorgelöst und dann in 1-fach SDS-Probenpuffer (siehe 4.3.1) gelöst. Die gefällten Proteinproben wurden so lange bei 95°C erhitzt, bis sie vollständig in Lösung gegangen waren. Anschließend konnten die Proteine für längere Zeit bei -20°C aufbewahrt werden.

4.3.10.2 Proteinfällung mit Aceton

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

4.3.11 Salzextraktion von Proteinen aus Kulturzellen

Die Löslichkeit bzw. die Resistenz einiger Proteine gegen höhere Salzkonzentrationen ist eine charakteristische Eigenschaft insbesondere bei Strukturproteinen, wie z.B. Bestandteilen des Zytoskeletts oder der Kern-Lamina.

Lösungen:

PBS (siehe 4.3.1):	+ 1 mM	PMSF
	+ 0,5 mM	DTT
SL DNase I:	50 mg/µl in 20 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	1 mM	MgCl ₂
	50 % (v/v)	Glyzerin
	bei -20°C aufbewahren (max. 3-4 Wochen!)	
Proteinase-Inhibitoren-Mix: (nach Dhadialla und Raikhel, 1990)	5 mM	ot-Aminocopronsäure
	1 mM	Benzamidin
	1 mM	EDTA
	2 µg/ml	Aprotinin
	2 µg/ml	Antipain
	2 µg/ml	Chymostatin
	2 µg/ml	Leupeptin
	2 µg/ml	Pepstatin
als SL (100-fach in H ₂ O) angesetzt		
Puffer A (pH 7,4) 4°C:	10 mM	Tris/HCl pH 7,4
	1 mM	PMSF (SL 200 mM in 100 % Methanol; bei -20°C)
	0,5 mM	DTT (SL 1 M in H ₂ O; bei -20°C)
	Inhibitoren-Mix ¹ / ₁₀₀ verdünnt zugeben	
	0,1 %	Triton™ X-100
Puffer B (pH 7,4):	10 mM	Tris/HCl pH 7,4
	10 mM	MgCl ₂ (vor Gebrauch zugeben)
	5 mM	CaCl ₂ (vor Gebrauch zugeben)
	100 µg	RNase
	200 µg	DNase
	Inhibitoren-Mix ¹ / ₁₀₀ verdünnt zugeben	
Puffer C (pH 7,4) 4°C:	10 mM	Tris/HCl pH 7,4
	1 mM	PMSF
	0,5 mM	DTT
	Inhibitoren-Mix ¹ / ₁₀₀ verdünnt zugeben	
	250 mM	NaCl
Puffer D (pH 7,4) 4°C:	10 mM	Tris/HCl pH 7,4
	1 mM	PMSF
	0,5 mM	DTT

	Inhibitoren-Mix $1/_{100}$ verdünnt zugeben	
	500 mM	NaCl
Puffer E (pH 7,4) 4°C:	10 mM	Tris/HCl pH 7,4
	1 mM	PMSF
	0,5 mM	DTT
	Inhibitoren-Mix $1/_{100}$ verdünnt zugeben	
	1000 mM	NaCl

Mit diesem Versuch wurden Unterschiede in der Löslichkeit verschiedener endogener Proteine in Kulturzellen untersucht. Verwendet wurden die aus Menschen stammenden HeLa-Zellen. Pro Ansatz wurden 4 Minischälchen (\varnothing 35 mm) angesetzt. Die Puffer wurden immer direkt vor Benutzung vervollständigt, denn PMSF verliert seine Aktivität bei RT bereits nach 30 min. Puffer A, C, D und E mussten auf Eis vorgekühlt werden, Puffer B sollte bei Verwendung etwa RT haben.

Zu Beginn wurde das Kulturmedium abgenommen und verworfen, bevor die Zellen vorsichtig mit 1 ml PBS pro Schale gewaschen wurden. Zum Ernten der Zellen wurde zunächst pro Schale 1 ml PBS zugegeben, worin die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Schalenboden gelöst wurden. Durch zusätzliches Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vollständig vom Boden gelöst und außerdem weiter vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in ein 15-ml-Röhrchen gegeben, dann wurden die Kulturschalen mit insgesamt 1 ml PBS nachgespült, was ebenfalls in das Röhrchen gegeben wurde. Die Suspension wurde bei 1.000 g bei 4°C zentrifugiert, das Pellet in 3 ml Puffer A aufgenommen, mit dem Glas-Teflon-Homogenisator homogenisiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde dann gleichmäßig auf zwei 1,5-ml-Eppendorf-Gefäße verteilt. Das eine diente als unbehandelte Kontrolle, damit die Gesamtmenge des analysierten Proteins abgeschätzt werden konnte und somit das Ergebnis der Fraktionierung besser zu interpretieren war. Die Kontrollzellen wurden 10 min bei 16.000 g in einer Tischzentrifuge pelletiert, der Überstand verworfen und die Zellen schließlich in 2-4 μ l 2 M Harnstoff vorgelöst und dann durch Zugabe von 20 μ l SDS-Probenpuffer vollständig gelöst (so lange kochen, bis Lösung klar ist!).

Die andere Hälfte der Zellsuspension wurde zunächst 10 min bei 4500 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen und das Pellet schließlich in 500 μ l Puffer B resuspendiert. Die Suspension wurde 15 min bei RT auf dem Rollinkubator inkubiert. Dabei sollte durch den Verdau der DNA nach kurzer Zeit das Pellet zerfallen. Dieser Schritt soll DNA-bindende Proteine besser in Lösung bringen. Anschließend wurde 10 min bei 4500 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde erneut in 500 μ l Puffer A aufgenommen, für 10 min auf Eis gestellt und 4500 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 μ l Puffer C versetzt und für 15 min auf dem Drehinkubator bei 4°C inkubiert, bei 16.000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Die letzten drei Schritte wurden mit den Puffern D und E wiederholt. Das Pellet wurde, wie das Pellet der unbehandelten Kontrollzellen, in SDS-Probenpuffer aufgenommen und gelöst. Die Proteine der gesammelten Überstände wurden mit Methanol/Chloroform gefällt (siehe 4.3.10) und in insgesamt 20 μ l SDS-Probenpuffer gelöst. Auch hier empfiehlt es sich die Pellets in 2-4 μ l 2 M Harnstoff vorzulösen. Sehr wichtig dabei ist, die Proben so lange zu behandeln, bis die Proteine vollständig gelöst sind (Lösung klar). Bei der Analyse des Experiments in der SDS-PAGE wurden alle Proben vollständig aufgetragen.

4.3.12 Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion über einen „Pull-Down-Assay“

Bei Pull-Down Experimenten handelt es sich um Bindungsstudien in Lösung. Hierbei wird ein Fusionsprotein über Ligandenaffinität an eine Matrix gebunden, die gezielt nur dieses Fusionsprotein bindet. Nach dem Entfernen der nicht gebundenen Proteine wird die Säule mit dem gebundenen Protein mit anderen Proteinen inkubiert. Alle Proteine, die ihrerseits eine Bindung mit dem Fusionsprotein eingehen können, werden nun ebenfalls über

Methoden

Ligandenaffinität an das Fusionsprotein gebunden. Ungebundene Proteine werden durch eine erhöhte Salzkonzentration, oder durch eine kompetitive Verdrängung durch ein molekulares Analogon, in diesem Fall Imidazol, entfernt. Schließlich werden die an die Säule gebundenen Proteine eluiert. Die gebundenen Proteine können dann durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Immunblots analysiert werden. Pull-Down-Experimente wurden mit Ni-NTA-Agarose als Matrix durchgeführt, die spezifisch nur Proteine mit 6 angehängten Histidinresten bindet. In diesem Falle wurde als Fusionsprotein Lamin A-His, sowie verschiedene Lamin A-His-Mutationen verwendet.

Lösungen:

Lysispuffer:	50 mM	Na ₂ HPO ₄
	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	⇒ Na ₂ HPO ₄ mit NaH ₂ PO ₄ auf pH 7,4 titrieren	
	300 mM	NaCl
Waschpuffer:	50 mM	Na ₂ HPO ₄
	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	⇒ Na ₂ HPO ₄ mit NaH ₂ PO ₄ auf pH 7,4 titrieren	
	300 mM	NaCl
	20 mM	Imidazol
Elutionspuffer:	50 mM	Na ₂ HPO ₄
	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	⇒ Na ₂ HPO ₄ mit NaH ₂ PO ₄ auf pH 7,4 titrieren	
	300 mM	NaCl
	250 mM	Imidazol

Ni-NTA-Agarose (Qiagen)

Pro Ansatz wurde für 20 µl Säulenvolumen 40 µl Ni-NTA-Agarose in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und für 2x 5 min bei 700 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Agarose mit 800 µl Lysispuffer äquilibriert. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 min bei 700 g folgte die Bindung des His-gekoppelten Proteins an die Matrix. Hierfür wurden etwa 10 bis 20 µg aufgereinigtes Lamin A-His in einer Konzentration von 100 ng/µl in PBS pH 8,0 auf die Säule pipettiert und für 30 min auf dem Rollinkubator inkubiert. Nach gutem Durchmischen der Suspension folgte eine Zentrifugation von 2 min bei 700 g und 4°C. Der Überstand, mit ungebundenem Lamin-His, wurde abgenommen und als nicht an die Säule gebundene Fraktion in 6x Volumen Aceton p.a. bei -20°C ÜN gefällt. Auf die Säule wurden nun 200 µl eines vorher hergestellten Zellkern-Proteinextraktes (siehe 4.3.9) pipettiert und für 2 h bei RT auf einem Drehtisch inkubiert. Anschließend wurde die Säule für 2 min bei 700 g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand, welcher die ungebundenen Proteine enthielt, mit 6x Volumen Aceton p.a. gefällt. Es folgte zweimaliges Waschen der Säule mit je 1 ml Waschpuffer und Zentrifugation für 2 min bei 700 g und 4°C. Alle an die Matrix-gebundenen Proteine wurden nun mit 800-1000 µl Elutionspuffer gelöst und nach Zentrifugation für 2 min bei 700 g und 4°C als Überstand in Aceton gefällt. Alle gefällten Proteine wurden schließlich in 20 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, für 15 min bei 95°C denaturiert und per SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 4.3.1). Zusätzlich zu den oben beschriebenen Proben wurde zur Kontrolle jeweils noch aufgereinigtes Lamin-His mit und ohne Inkubation mit Zellkern-Proteinextrakt mit auf das Gel aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend geblottet. Zur Kontrolle wurden noch zwei weitere Säulen angefertigt. An der einen Kontrollsäule wurde nur der Antikörper gegen Lamin A

gebunden, ohne eine anschließende Inkubation mit Zellkern-Proteinextrakt, an die zweite Säule war kein Antikörper gebunden, diese wurde jedoch mit Zellkern-Proteinextrakt inkubiert.

4.3.13 Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen über ELISA

4.3.13.1 Experimentelles Prinzip

Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest bzw. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Zur quantitativen Bestimmung eines spezifischen Antigens in Proteingemischen werden ELISA-Tests (Hautanen und Linder, 1981) durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird die Antigen-Lösung an die Oberfläche von kunststoffbeschichteten Mikrotiterplatten adsorbiert und danach mit der entsprechenden Antikörper-Lösung inkubiert. Der zweite Antikörper ist an das Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt, das im alkalischen Milieu Phosphomonoesterbindungen spaltet. Die Menge an gebundenem zweitem Antikörper wird über eine Enzym-Substrat-Reaktion nachgewiesen.

Als Substrat wird das farblose p-Nitrophenylphosphat verwendet, das nach Spaltung der Phosphomonoesterbindung in Phosphat und das gelb gefärbte p-Nitrophenol übergeht. Die Menge an umgesetztem Substrat kann direkt an der Intensität der Gelbfärbung gemessen werden. Durch den zusätzlichen Amplifikationseffekt der Enzym-Substrat-Reaktion ist die Sensitivität des ELISA-Tests relativ hoch, so dass noch Antigenmengen im Nanogrammbereich nachweisbar sind.

Diese Technik wurde verwendet, um eventuelle Unterschiede in Protein-Protein-Interaktionen von wildtypischen oder mutierten *in-vitro* gebildeten Lamin A-Filamenten und Proteinen der Kernmembran zu detektieren. Es wurden als Antigene verschiedene Lamin A-Filamente (siehe 4.3.6) verwendet, dazu Gesamtproteinextrakt aus Kernhüllen (siehe 4.3.9) pipetiert und mögliche Bindungen mit spezifischen Antikörpern gegen Proteine der Kernhülle nachgewiesen.

Durchführung:

Lösungen:

PBS	siehe 4.3.1	
PBS/Tween®	0,605 g in 1000 ml PBS	Tween® 20 in 1000
BSA-Lösung	1 g in 100 ml PBS	BSA in 100
DEA-Puffer	97 ml	Diethanolamin (DEA)
	80 mg	MgCl ₂
MES-Puffer	Siehe 4.3.6	
	in 1000 ml H ₂ O _{bidest.} pH 9,8, mit HCl eingestellt	
Primärantikörper	Verdünnung siehe 3.1.5	
Sekundär-Antikörper	1:1000 in BSA-Lösung	α-Maus / α-Kaninchen, alk. Phosphatase konjugiert
Colometrisches Nachweißreagenz	2 Tabletten in 10 ml PBS	Sigma 104-Phosphatase-Substrat-Tabletten (Sigma)

In Polyvinyl-Mikrotiterplatten (96 Löcher, Anthos) wurden pro Loch je 20 µl der zu testenden Lamin A-Filament-Lösung in 8 M Harnstoff pipettiert, mit 180 ml MES-Puffer versetzt, so dass sich die Filamente frei rekonstituieren konnten und für 2 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Platte wurde 5x mit PBS gewaschen. Zur Absättigung noch freier Bindungsstellen wurde mit 300 µl einer BSA-Lösung (1 %) pro Loch für 2 h bei RT inkubiert. Die Platte wurde 5x mit PBS/Tween® gewaschen und anschließend mit Gesamtproteinextrakt aus Kernhüllen für 2 h bei RT versetzt. Die Platte wurde wieder 5x mit PBS/Tween® gewaschen, über Nacht bei 4°C mit 50 µl Antikörperlösung inkubiert und am nächsten Tag 5x mit PBS/Tween® gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu

Durchführung:

Alle 2-3 Tage, wenn die Zellen konfluent waren, wurden sie gesplittet und neu ausgesät. Je nach Proliferationsverhalten wurden die Zellen so ausgesät, dass sie nach 2-3 Tagen wieder die Konfluenz erreichten. Dafür wurde zuerst das Zellkulturmedium abgesaugt. Dann wurden die Zellen mit 2 ml (bei einer 25-cm²-Zellkulturflasche) warmem PBS gewaschen und mit 0,5-1 ml Trypsinlösung überschichtet. Die Zellen wurden dann je nach Zelltyp etwa 10 min bei RT inkubiert, bis sich die Zellen vom Flaschenboden lösen. Die Ablösung wurde am Inversmikroskops beobachtet. In eine frische Flasche wurden inzwischen 4-5 ml Zellkulturmedium vorgelegt. Durch leichtes Klopfen der Flasche wurde das Ablösen der Zellen unterstützt. Dann wurden die Zellen mit 5 ml warmem Zellkulturmedium vom Boden der Flasche abgespült. Die frische Flasche wurde mit 0,5-1 ml Zellsuspension angeimpft (für HeLa-Zellen, Fibroblasten).

4.4.3 Einfrieren von Kulturzellen

Lösungen:

PBS	(siehe 4.3.1)
Trypsinlösung	(siehe 4.2.1)
Zellkulturmedium	(siehe 3.1.3)
Einfriermedium	(Zellkulturmedium mit 10 % DMSO und 20 % FCS)

Durchführung:

Die Zellen einer konfluenten Flasche wurden, wie unter 4.2.1 beschrieben, trypsinisiert und in 5 ml Medium aufgenommen. Sie wurden in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 1.000 g pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 3,6 ml Einfriermedium resuspendiert. Je 1,8 ml der Suspension wurden dann in ein Kryoröhrchen gefüllt. Die Röhrchen wurden in eine Einfrierbox gestellt und diese eben in eine -70°C-Truhe platziert. Die Einfrierbox bewirkt ein langsames Einfrieren der Zellen (1°C Temperatursenkung pro 1 h), was die Bildung von tödlichen Kristallen verhindert. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen dann in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert.

4.4.4 Auftauen von Kulturzellen

Das für die Zelllinie verwendete Kulturmedium wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Dann wurde das aus dem Stickstoffbehälter entnommene Kryoröhrchen vorsichtig im Wasserbad so lange aufgetaut, bis gerade noch ein Rest gefroren war. Anschließend wurde das Kryoröhrchen mit 70 %igem Alkohol desinfiziert und der Inhalt in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit 10 ml vorgewärmtem Medium gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 1.000 g für 5 min. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml frischem, vorgewärmtem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt und bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Beginnend mit dem ersten Tag nach dem Auftauen erfolgte ein Mediumwechsel bzw. das Umsetzen der Zellen alle 2-3 Tage.

4.4.5 Verbesserung der Zelladhäsion auf Deckgläschen

Während der Präparation von Zellen für die Elektronenmikroskopie (siehe 4.5.12) wurden im Verlaufe der verschiedenen Ethanol-Entwässerungsstufen stellenweise viele dieser Zellen von den Deckgläschen abgelöst. Um dies zu vermeiden, wurden die Deckgläschen mit Poly-D-Lysin vorbehandelt, um damit die Zelladhäsion während dieser Prozedur zu verbessern.

Durchführung:

Die Poly-D-Lysin-Lösung (0,1 %) wurde mit PBS (siehe 4.3.1) auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml verdünnt, anschließend sterile Deckgläschen damit benetzt, 5 min inkubiert und der Rest der Flüssigkeit abgenommen. Danach wurden die Deckgläschen für 1 min mit PBS gewaschen, die nun bei -20°C für 2 Wochen gelagert werden konnten.

4.4.6 Behandlung von Kulturzellen mit dem Proteasominhibitor Lactacystein

Lactacystein ist ein zellpermeabler, irreversibler Proteasomen-Inhibitor. Es inhibiert spezifisch das 20S- und 26S-Proteasom und blockiert die Proteasomaktivität, indem es an die katalytische β -Untereinheit des Proteasoms bindet. Die Substanz zeigt dabei aber keine Wirkung auf die Serin- oder Cysteinproteaseaktivitäten des Proteasoms.

Durchführung:

Zellen wurden in Zellkulturschälchen (\varnothing 35 mm) bis zu einer Konfluenz von ca. 90 % kultiviert. Anschließend wurden zu den 2,5 ml Kulturmedium 1-3 μ M Lactacystein (1 μ M; Stock: 200 μ M / 100 % Ethanol p.a.; *Genaxxon*) dazugegeben und 24-36 h bei 37°C inkubiert.

4.4.7 Isolierung von Zellkernen aus Kulturzellen

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

Lösungen:

TKM-Puffer	70 mM	KCl
	3 mM	MgCl ₂
	10 mM	Tris/HCl, pH 7,2
	100 mM	PMSF in EtOH
Lyse-Puffer	10 mM	Tris/HCl, pH 7,2
SDS-Probenpuffer	60 mM	Tris/HCl, pH 6,8
(nach Laemmli)	10 %	Glycerin
	5 %	SDS
SDS-Probenpuffer	10 %	β -Mercaptoethanol

Durchführung:

Es wurden Kulturzellen in Zellkulturschälchen in einer geeigneten Menge des jeweiligen Mediums kultiviert, bis die gewünschte Zelldichte von maximal 10^5 Zellen pro ml Kulturmedium erreicht wurde. Das Medium wurde abgegossen, und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen vorsichtig in 10 ml TKM mit einem Gummischaber vom Schalenboden abgeschabt und auf Eis in 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Anschließend wurde die Zellschale nochmals mit 5 ml TKM gespült, um möglichst keine Verluste von Zellen zu erleiden. Die Sedimentierung der Zellen wurde durch eine Zentrifugation von 5 min bei 2.000 g und 4°C erreicht. Die sedimentierten Zellen wurden in 10 ml Lysispuffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Der hypotonische Lysepuffer ließ die Zellen anschwellen und erleichterte das anschließende Aufbrechen der Zellen in einem Glas-Teflon-Homogenisator. Das Homogenisieren wurde unter ständiger lichtmikroskopischer Kontrolle so lange durchgeführt, bis möglichst alle Zellen aufgeschlossen waren und nur noch die intakten Kerne vorlagen (ca. 25 Hübe). Im Anschluss wurde die Zell-Lyse am Mikroskop untersucht. Waren nahezu alle Zellen aufgeschlossen und nur noch intakte Kerne vorhanden, wurde die Homogenisation beendet. Die Anzahl der Kerne wurde in einer Neubauer-

Kammer (siehe 4.4.8) bestimmt. Dann wurden die Kerne bei 2.000 g für 20 min bei 4°C pelletiert und das Sediment nach Verwerfen des Überstandes in Laemml-Probenpuffer resuspendiert (10^6 Kerne / 20 μ l; für eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden $0,5 \times 10^6$ Kerne / Spur benötigt), in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 10 min bei 95°C aufgeköcht.

4.4.8 Mengenbestimmung von Partikeln mit der Neubauer-Zählkammer

Die Auszählung von Zellen oder Zellkernen erfolgte stets lichtmikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer, wodurch sich die Anzahl der Partikel pro Volumeneinheit berechnen ließ. Im Mittelsteg der Kammer sind Zählnetze eingraviert. Diese bestehen aus mehreren Großquadraten, wobei ein Großquadrat in 16 Kleinquadrate aufgeteilt ist. Die Höhe der Kammer beträgt 0,1 mm und wird durch den Abstand zwischen Steg und einem Glasdeckplättchen festgelegt, welches auf den Glassteg der Zählkammer in Querrichtung geschoben wird. Das Deckgläschen sitzt korrekt auf, wenn so genannte Newton'schen Ringe zu sehen sind. Die Fläche eines Großquadrates beträgt 1 mm², wodurch sich ein Volumen des Großquadrates von 0,1 mm³ (= 0,1 μ L) ergibt. Es wurden stets 4 Großquadrate ausgezählt, wobei darauf zu achten war, dass Zellen oder Kerne, die auf den Begrenzungslinien zwischen den Quadraten lagen, nicht doppelt gezählt wurden. Aus dem Durchschnittswert der ausgezählten Zellen pro Großquadrat konnte die Zellzahl im Gesamtvolumen mit nachfolgender Formel berechnet werden:

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

4.4.9 Test der Zellkultur auf eine Kontamination mit Mycoplasmen

Lösungen:

Vgl. PCR mit Taq-Polymerase (siehe 4.2.2)

Primer 1: myco_5': 5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT A-3'

Primer 2: myco_3': 5'-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3'

Durchführung:

Zunächst wurden 1,5 ml des Zellkulturmediums in ein Eppendorf-Gefäß überführt und anschließend 5 min bei 3.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und wieder bei 13.000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen, das Pellet schließlich in 25 μ l H₂O_{bidest} gelöst. Diese Lösung wurde mit Hilfe einer PCR auf die Anwesenheit Mycoplasma-spezifischer Gene hin getestet. Mit den verwendeten Primern wird ein Abschnitt der 16S-rDNA spezifisch in Mycoplasmen amplifiziert. Ist ein PCR-Produkt mit einer Länge von 720 bp nachweisbar, liegt eine Kontamination mit Mycoplasmen vor.

PCR-Ansatz (25 μ l):

5 μ l	Lösung (siehe oben)	
1,5 μ l	MgCl ₂ (25 mM)	
5 μ l	10-fach-Puffer	
0,5 μ l	dNTP-Mix	(10 mM SL je Nukleotid, MBI)
0,5 μ l	5'-Primer	(10 pmol/ μ l), biomers.net GmbH)
0,5 μ l	3'-Primer	(10 pmol/ μ l), biomers.net GmbH)
2,5 μ l	Taq-DNA-Polymerase	
auf 25 μ l	H ₂ O _{bidest} auffüllen	

PCR-Programm:

Zyklen	Vorgang	Bedingungen
1	initiale Denaturierung	5 min, 94°C
40	Denaturierung	30 sek, 94°C
	Primer Annealing	30 sek 60°C
	Elongation	34 sek 72°C
	Kühlung	4°C

Die Analyse erfolgte anschließend über ein Agarosegel (siehe 4.2.11).

4.4.10 Transfektion von Kulturzellen

Transfektion bedeutet das Einbringen von DNA in eukaryontische Zellen. Genau wie bei der Transformation von Bakterien muss die DNA die Zellmembran passieren und kann dann unabhängig von der Transfektionsmethode in den Zellkern gelangen. Dort wird die Information der DNA in RNA umgesetzt, und es kann zur Expression der im Vektor kodierten Gene kommen. Es wurden mehrere Methoden zur Transfektion von Kulturzellen angewendet.

4.4.10.1 Transfektion eukaryontischer Zellen mit Effectene™ (Qiagen)

Effectene™ ist ein nicht-liposomales Lipid, welches unter spontaner Mizellenbildung die DNA in Lipidmoleküle hüllt. Nach Herstellerangaben soll dabei keine Größen- und Ladungsvarianz auftreten, wie dies bei liposomalen Transfektionen der Fall ist. Die Transfektionsraten bei COS-7-Zellen lagen mit Effectene™ bei 40-90 %.

Lösungen:

Qiagen Effectene™ Transfection Reagent Kit	enthält Effectene™, Enhancer und Puffer EC
PBS	siehe 4.3.1; steril
Zellkulturmedium	siehe 3.1.3

Durchführung:

Die Transfektion von Zellen in Minischälchen (Ø 35 mm) wurde mit 500 ng Plasmid-DNA weitgehend nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurde am Vortag ein Minischälchen mit vier Deckgläschen mit $4 \cdot 10^5$ COS-7- bzw. Fibroblasten-Zellen ausgesät. Pro Minischälchen wurden 500 ng DNA eingesetzt. Die DNA wurde mit Puffer EC auf 100 µl aufgefüllt, gemischt und mit 3,2 µl Enhancer versetzt. Nach 2 bis 5-minütiger Inkubation bei RT wurden 10 µl Effectene™ zugegeben und vermischt. Während einer weiteren Inkubation von 5-10 min bei RT wurden die Zellen einmal mit 2 ml PBS gewaschen und mit 1600 µl Medium überschichtet. Dann konnte die Mischung aus DNA und Transfektionsreagenz mit 600 µl Medium versetzt und tropfenweise auf die Zellen pipettiert werden. Die Inkubation mit dem Transfektionsreagenz erfolgte immer über Nacht. Transfizierte Zellen wurden am nächsten oder übernächsten Tag für weitere Experimente verwendet, ohne dass das Medium zuvor gewechselt wurde. Bei den angewandten Inkubationszeiten konnte keine zelltoxische Wirkung beobachtet werden.

4.4.10.2 Transfektion eukaryontischer Zellen mit Lipofectamine™ (Invitrogen)

Die Transfektion mit Lipofectamine™ erfolgte nach Herstellerprotokoll. Im Gegensatz zu Effectene™ benötigt man für dieses Protokoll zusätzlich serumfreies Medium (Optimem), da die Serumproteine mit der Transfektion interferieren würden. Zellen wurden wie für eine Transfektion mit Effectene™ am Vortag ausgesät.

Lösungen:

Optimem	serumfreies Medium, Gibco Life Technologies
Lipofectamine™	Invitrogen
PBS	siehe 4.3.1; steril
Zellkulturmedium	siehe 3.1.3

Durchführung:

Pro Minischale wurden 2 Eppendorf-Gefäße vorbereitet. In Gefäß A wurden 12 µl Lipofectamine™ mit 88 µl Optimem gemischt, in Gefäß B 4 µg Plasmid-DNA mit Optimem auf 100 µl aufgefüllt. Dann wurden die Inhalte von Gefäß A und B vereinigt, gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen, mit 1 ml Optimem überschichtet und wieder in den Brutschrank gestellt. Für die Transfektion wurde die DNA-Lipofectamine™-Mischung mit 800 µl Optimem vorsichtig vermischt und tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 4-5 h im Brutschrank inkubiert, dann wurde das Medium gewechselt.

4.4.10.3 Transfektion eukaryontischer Zellen mit FuGene HD™ (Roche Diagnostics)

Die Transfektion mit FuGene HD™ erfolgte nach Herstellerprotokoll. Wie bei Lipofectamine™ benötigt man für dieses Protokoll zusätzlich serumfreies Medium (Optimem). Zellen wurden wie für eine Transfektion mit Effectene™ und Lipofectamine™ am Vortag ausgesät.

Lösungen:

Optimem	serumfreies Medium, Gibco Life Technologies
FuGene HD™	Roche Diagnostics
PBS	siehe 4.3.1; steril
Zellkulturmedium	siehe 3.1.3

Durchführung:

Pro Minischale wurde 1 Eppendorf-Gefäß vorbereitet. In das Gefäß wurde 1 – 2 µg DNA vorgelegt, mit Optimem auf 100 µl aufgefüllt. Dann wurden 3,2 µl des FuGene HD™ direkt in die Lösung gegeben, gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen, mit 2 ml frischem Medium überschichtet und wieder in den Brutschrank gestellt. Für die Transfektion wurde die DNA-FuGene HD™-Mischung tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 4-5 h im Brutschrank inkubiert, dann wurde das Medium gewechselt.

4.4.11 Einleitung der Zell-Differenzierung in Muskelzellen

Um die Differenzierung von Myoblasten zu Myocyten einzuleiten, wurden die Zellen in einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro 35 mm-Schälchen in DMEM mit 15 % FCS, 1 % L-Glutamine und 1 % Penizillin/Streptomycin ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen in ein Medium transferiert, welches 2 % Pferdeserum enthielt. Die Zellen wuchsen 2, 3 oder 6 Tage. Die Quantifizierung der Zellfusionen erfolgte nach Fixation in Methanol und Färbung mit dem Farbstoff Giemsa. Zellen, die 3 oder mehr Kerne enthielten, wurden als Myotuben gezählt und das Verhältnis der Kerne [(Kerne in Myotuben/Gesamt-Kerne)] kalkuliert.

4.5 Licht- und elektronenmikroskopische Methoden

4.5.1 Analyse von Fluoreszenzpräparaten am Epifluoreszenzmikroskop

Für die mikroskopische Analyse von Fluoreszenzpräparaten wurde ein Zeiss Axiophot HB050 mit Quecksilberlampe verwendet. Zur Dokumentation wurde ein digitales Kamerasystem der Firma Pixelfly verwendet (CCD-Sensor). Die erhaltenen Daten wurden mit Adobe® Photoshop bearbeitet.

4.5.2 Analyse am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM)

Verwendet wurde ein konfokales Mikroskop des Typs TCS-SP2 der Firma Leica (Mannheim). Bei der konfokalen Mikroskopie wird ein im Präparat vorhandener Fluoreszenzfarbstoff durch einen Laserimpuls bei einer spezifischen Wellenlänge angeregt, worauf dieser seinerseits Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Dieses emittierte Licht wird durch eine Blende im optischen System des Mikroskops (das sog. Pinhole) zurück auf ein Kameraelement geleitet. Dieses Pinhole lässt fast ausschließlich emittiertes Licht der Fokusebene des Anregungslasers durch. Dadurch kann man mit einem konfokalen Mikroskop optische Schnitte durch ein Präparat legen, die als Ergebnis ein Bild liefern, das neben einer guten Auflösung in den x- und y-Ebenen auch eine gute Auflösung in der z-Ebene besitzt. Dabei wurden folgende Einstellungen der Software standardmäßig verwendet:

Ölimmersionsobjektiv	HCX PI APO lbd.Bl. 63x 1.4
Pinhole	1 AE
Zoom	2x für Übersichten, 4-6x für einzelne Zellen
Argon-Laser-Level	Drehknopf stets auf 40 % eingestellt
Anzahl der Scans pro Bild	8
Scangeschwindigkeit	400-800 mW

Tab. 4.5: Verwendete Laserlinien und Einstellungen der Photomultiplier

Detektion	Laser	Laser Power	PMT-Detektionsbereich (nm)
Hoechst 33258	405 nm (Diode)	25 %	410-550 nm
EGFP / Cy3	488 nm (Argon)	25 %	500-580 nm
Texas [®] Red / Cy2	561 nm (Diode)	50 %	570-680 nm
Cy5	633 nm (HeNe)	50 %	650-750 nm
BiFC (YFP)	488 nm (Argon)	50 %	520-560 nm
Interferenzkontrast	+ 488 nm	20 %	

Die Aufnahmen erfolgten im „sequential scan“-Modus, bei welchem jeweils spezifisch ein Fluorochrom angeregt wurde, um einen Nebensignaleffekt (crosstalk) der einzelnen Detektionskanäle zu vermeiden.

4.5.3 Lebendbeobachtung von Zellen unter dem Mikroskop

4.5.3.1 Herstellung von Lebendbeobachtungskammern

Um lebende Zellen an einem Mikroskop zu beobachten, wurden Lebendbeobachtungskammern hergestellt. Dazu wurde zunächst auf einen Objektträger mit Folienstift der Umriss eines Deckgläschens gezeichnet. Dieser Objektträger diente als Vorlage. Auf diese Vorlage wurde ein frischer Objektträger gelegt und dann mit Fixogum (ein elastischer Montagekleber der Firma *Marabu*) ein an einer Seite offener Ring mit der Größe eines Deckgläschens

aufgetragen. Zur besseren Dosierung des Klebers wurde eine abgeschnittene gelbe Pipettenspitze auf die Fixogum-Tube gesteckt. Nach einer Trockenzeit von 15 min konnten die Kammern benutzt werden.

4.5.3.2 Analyse unter dem Mikroskop

Für die *in-vivo*-Lokalisation von EGFP-Fusionsproteinen wurden 5-10 µl Zellkulturmedium in den Ring einer Lebendbeobachtungskammer pipettiert und ein mit transfizierten Zellen bewachsenes und auf der nicht bewachsenen Seite sorgfältig abgewischtes Deckgläschen aufgelegt. Überschüssiges Medium wurde mit einer Pipette entfernt und das Deckgläschen mit einem geschlossenen Ring aus Fixogum abgedichtet. Das Fixogum sollte dann für mindestens 10 min trocknen. Die eingedeckelten Zellen waren bei RT über einen Zeitraum von mindestens 2 h vital.

4.5.4 Fixierung von Zellen

4.5.4.1 Fixierung mit Formaldehyd-Triton™

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

Lösungen:

Paraformaldehyd-Lösung:	1–2 % (w/v)	Paraformaldehyd in PBS
Triton™-Lösung:	0,1 %-0,5 % (v/v)	Triton™ X-100 in PBS
PBS (pH 7,4):	140 mM	NaCl
	6,4 mM	Na ₂ HPO ₄
	2,6 mM	KCl
	1,4 mM	KH ₂ PO ₄

Durchführung:

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

4.5.4.2 Fixierung mit Methanol-Aceton

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

Lösungen:

Methanol:	100 %	(techn.), -20°C
Aceton:	100 %	(techn.), -20°C
PBS	(siehe 4.3.1)	

Durchführung:

Auf Deckgläschen gewachsene Kulturzellen wurden kurz in PBS gewaschen und anschließend für 5-10 min bei -20°C in Methanol entwässert. Anschließend wurden die Deckgläschen für 10 min in Aceton bei -20°C gestellt. Danach

wurden die Zellen für 30 min luftgetrocknet und konnten anschließend für die indirekte Immunfluoreszenz verwendet werden.

4.5.5 Indirekte Immunfluoreszenz bei Kulturzellen

Lösungen:

PBS	(siehe 3.2)	
Formaldehyd	1-2 %	in PBS pH 7,4 (alternativ: 1-2 % PFA (w/v) in PBS pH 7,4; zum Lösen auf 65°C erhitzen!)
Triton™ X-100	0,1 % (v/v)	in PBS pH 7,4
Glyzin	100 mM	in PBS pH 7,4 (optional)
PBT (Blockpuffer; optional):		PBS pH 7,4
	+ 1,5 %	BSA
	+ 0,1 %	Tween® 20
Primär- und Sekundärantikörper	in PBS verdünnt (siehe 4.3.1)	
Hoechst 33258	(SL 5 µg/ml; Roche)	
Mowiol	10 g	Mowiol (Hoechst) in 40 ml KH ₂ PO ₄ -freiem PBS (pH 8,0) 16 h rühren; 20 ml Glycerin zugeben und nochmals 16 h rühren; ungelöste Partikel abzentrifugieren und Überstand aliquotiert bei -20°C auf- bewahren.

Durchführung:

Vor Beginn der Immunlokalisation wurden die auf Deckgläschen gezogenen Zellen 5-10 min mit Formaldehydlösung fixiert (siehe auch 4.5.4.1). Danach wurden die Zellen durch eine 10 minütige Inkubation mit Triton™ permeabilisiert, damit die Antikörper in die Zellen gelangen können. Bei einer Fixierung mit Methanol/Aceton (siehe 4.5.4.2), müssen die Zellen nicht permeabilisiert werden. Bevor die Deckgläschen in eine Feuchtkammer überführt wurden, wurde optional 10 min mit Glyzin-Puffer inkubiert, um den Hintergrund zu minimieren, insbesondere nach Fixierung mit Formaldehyd. Nach diesem Absättigungsschritt folgte die Inkubation für 30 min mit dem primären Antikörper in geeigneter Verdünnung (siehe 3.1.5). In einigen Fällen wurde vor der Antikörperinkubation ein weiterer optionaler Absättigungsschritt eingeschoben: eine 30-60 minütige Inkubation mit PBT. Von dem verdünnten Primärantikörper wurden pro Deckglas 50 µl verwendet. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Deckgläschen 3x 5 min in PBS gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper für 20-30 min inkubiert.

Die an FITC, Cy2, Texas® Red oder Cy3 gekoppelten Sekundärantikörper wurden nach Herstellerangaben mit PBS verdünnt (siehe 3.1.5). Um DNA bzw. Zellkerne sichtbar zu machen, wurden der Sekundär-Antikörperlösung 10 min vor Ablauf der Inkubationszeit 40 µl Hoechst 33258 (5 µg/ml) zugegeben. Nach Waschen in PBS 3x 5 min wurde die Rückseite der Deckgläschen vorsichtig mit einem fusselfreien Papiertuch getrocknet. Es wurde ein kleiner Tropfen Mowiol auf einen Objektträger gegeben und das feuchte Deckgläschen vorsichtig mit den Zellen nach unten darauf gelegt, um Luft einschließen zu vermeiden.

Bei Doppelimmunfluoreszenzen wurde zunächst mit dem ersten, danach mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend, nach einem weiteren Waschgang in PBS für 3x 5 min, wurde mit dem zweiten Primärantikörper und danach dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert.

4.5.6 FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

4.5.6.1 Experimentelles Prinzip

Die Methode wurde ursprünglich entwickelt, um die Dynamik membrangebundener Moleküle zu untersuchen (Axelrod et al., 1976). Die Entwicklung der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie hat es ermöglicht, die Untersuchungen auf intrazellulär lokalisierte Partikel auszudehnen. Für die Analyse der Dynamik eines spezifischen Proteins bedient man sich des bisher einzigen bekannten fluoreszierenden Proteins und der von ihm abgeleiteten Farbvarianten, dem „Green Fluorescent Protein“ (GFP), das ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert worden war (zusammengefasst in Tsien, 1998).

Für die *in-vivo*-Markierung eines Proteins wird es als Fusionsprotein exprimiert, das EGFP („enhanced green fluorescent protein“, eine verbesserte GFP-Variante) beinhaltet und somit ohne eine Behandlung mit Antikörpern unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden kann. Zur Untersuchung der Dynamik des betreffenden Proteins wird nun durch eine Bestrahlung mit hoher Laserenergie das EGFP in einem bestimmten Bereich der Zelle irreversibel ausgebleicht (dabei wird nur das Chromophor, nicht aber das Protein selbst geschädigt), und anschließend wird die Erholung der Fluoreszenz innerhalb dieses Bereiches gemessen. Die Erholung der Fluoreszenz erfolgt ausschließlich aufgrund des Austausches gebleichter durch intakte EGFP-Fusionsproteinmoleküle.

4.5.6.2 Durchführung

Für Mobilitätsmessungen von EGFP-Fusionsproteinen wurden COS-7 bzw. Fibroblasten-Zellen auf Deckgläschen ausgesät, am nächsten Tag mit den entsprechenden Vektorkonstrukten mit FuGene HD™ transfiziert und am darauf folgenden Tag für die Messungen eingesetzt. Dazu wurden die Zellen in Lebendbeobachtungskammern eingedeckelt (siehe 4.5.3) und innerhalb der folgenden 10-15 min bei RT mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop der Firma Leica (TCS-SP2) analysiert.

Die FRAP-Experimente wurden mit dem in der Leica Software integrierten „FRAP Wizard“ durchgeführt. Die Basiseinstellungen des Mikroskops waren:

Ölimmersionsobjektiv	HCX PI APO lbd.BI. 63x 1.4
Pinhole	1 AE
Zoom	8x
Argon-Laser-Level	Drehknopf stets auf 40 % eingestellt
Anzahl der Scans pro Bild	8
Scangeschwindigkeit	1000 mW
Beam exp.	3

Innerhalb des Zellkerns wurde die zu untersuchende Fläche ($\sim 0,6$ - $0,8 \mu\text{m}^2$) markiert (ROI = region of interest). Beim FRAP wurde zuerst ein einzelner Scan bei 5 % Laserpower bei einer Wellenlänge von 488 nm durchgeführt, um die Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen zu messen. Die Intensität wurde so gering gewählt, um ein vorzeitiges ausbleichen des Präparates zu vermeiden. Danach wurde 2-5x innerhalb der ROI bei den Wellenlängen von 458, 476 und 488 geblichen.

Danach erfolgten 30-50 Scans bei einer Wellenlänge von 488 nm, durch welche die Erholung der Fluoreszenz innerhalb der ROI aufgrund der Diffusion von ungebleichten Fusionsproteinen bestimmt werden konnte. Für die

spätere Auswertung mussten die Fluoreszenzintensitäten in 3 Feldern über den Verlauf der Messung quantitativ erfasst werden: (ROI 1) der Bleichpunkt selbst, (ROI 2) ein Bereich des Hintergrundes und (ROI 3) die gesamte Zelle bzw. der Teil der Zelle, der ein Fluoreszenzsignal aufweist.

Die Daten wurden über die Software des Mikroskops exportiert und später in Microsoft® Excel ausgewertet (siehe unten).

4.5.6.3 Auswertung

Die FRAP-Erholungskurven wurden nach Phair und Misteli (2000) mit Hintergrund-bereinigten Bildern erstellt. Aufgrund der gemessenen und aufgezeichneten Fluoreszenz-Intensitätswerte konnte die relative Intensität nach folgender Formel errechnet werden:

$$I_{\text{rel}} = \frac{T_0 \cdot I_t}{T_t \cdot I_0}$$

T_0 = Fluoreszenzintensität des gesamten Zellvolumens vor dem Bleichpuls, korrigiert um den Hintergrundwert

T_t = Fluoreszenzintensität des gesamten Zellvolumens zum Zeitpunkt t , korrigiert um den Hintergrundwert

I_0 = Fluoreszenzintensität der Akkumulation vor dem Bleichpuls

I_t = Fluoreszenzintensität der Akkumulation zum Zeitpunkt t , korrigiert um den Hintergrundwert

Die über die Steuerungssoftware des Mikroskops gesammelten Messdaten wurden zur Auswertung zunächst in Microsoft® Excel importiert. Man erhält die Werte der Fluoreszenzintensitäten für den Bleichpunkt, den Hintergrund und die ganze Zelle im Verlauf des Experiments. Mit diesen Daten kann die relative Fluoreszenzintensität nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Fluoreszenz}_{\text{rel}} = \frac{[(\text{ROI } 1_t - \text{ROI } 2_t) \cdot (\text{ROI } 3_0 \cdot \text{ROI } 2_0)]}{[(\text{ROI } 3_t - \text{ROI } 2_t) \cdot (\text{ROI } 1_0 \cdot \text{ROI } 2_0)]}$$

Die Mittelwerte aus jeweils mindestens 30 Messungen, aus drei Versuchen gesammelt, wurden in einem Graphen über der Zeit aufgetragen. Die statistische Signifikanz der Werte wurde über den Student's t-test ermittelt (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>).

4.5.7 Analysen mittels Durchflusszytometer

Die Durchflusszytometrie ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben (Antikörper, Rezeptoren) bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu dokumentieren.

4.5.7.1 Experimentelles Prinzip

Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Hierbei werden die in einer Lösung befindlichen Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, welches mittels Detektoren (Photomultiplier) nachgewiesen wird. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe der Zelle

und mit ihrer Komplexität. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidewards Scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird. Zugleich mit dem gestreuten Licht kann man im Durchflusszytometer Fluoreszenzfarben messen. Man verwendet Farbstoffe, die an bestimmte Bestandteile der Zellen binden. Setzt man Propidiumiodid oder Hoechst-33258-Farbstoff ein, welche in die DNA einer Zelle interkalieren, kann man den Grad der Apoptose oder aber den Zellzyklus analysieren. Auch Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, können verwendet werden. Nach Markierung kann dann auch die Sortierung nach diesen Merkmalen erfolgen. Die Analysen auf der Zelloberfläche wurden mit einem *Coulter Epics XL™ Flow Cytometer* durchgeführt. Das Gerät ist ausgestattet mit einem Argon-Ionen-Laser, der Licht der Wellenlänge 488 nm erzeugt. Zur Zellmarkierung eignen sich somit Fluoreszenzfarbstoffe, die eine Anregungswellenlänge von 488 nm besitzen. Für die Detektion des emittierten Fluoreszenzlichtes stehen drei Fluoreszenz- und zwei Streuungsdetektoren mit fest eingestellten Filtersets zur Verfügung. Diese Filtersets ermöglichen die Transmission einer genau definierten Lichtbande und löschen das Licht aller anderen Wellenlängen. Mit einer Flussrate zwischen 100 und 200 Zellen pro Sekunde beruht jede Messung auf 10.000 bis 30.000 Zellen.

4.5.7.2 Durchführung

Lösungen:

PBS	(siehe 4.5.1)	
Formaldehyd	2 %	in PBS pH 7,4
Triton™ X-100	0,1 % (v/v)	in PBS pH 7,4
Primär- und Sekundärantikörper	in PBS verdünnt (siehe 4.3.1)	
Hoechst 33258	SL 5 µg/ml	Roche
Propidiumjodid-Lösung	1 mM	Propidiumjodid in PBS

4.5.7.2.1 Apotosenachweis nach der sub-G1-peak-Methode

Ein typisches Apoptosemerkmal ist die Spaltung der DNA durch Endonukleasen in charakteristische, ca. 180 bp-große DNA-Fragmente (Wyllie, 1980). In apoptotischen Zellen ist daher – verglichen mit vitalen Zellen – der Gehalt an niedermolekularer DNA erhöht, der Anteil hochmolekularer DNA dagegen reduziert. Induziert man nun eine Lyse der Zellmembran, kommt es zum Austreten und nachfolgendem Verlust der niedermolekularen DNA-Fragmente in apoptotischen Zellen, während intakte, hochmolekulare DNA im Zellkern verbleibt. Auf dem Nachweis des somit niedrigeren DNA-Gehalts apoptotischer Zellen beruht die sub-G1-peak-Methode (Nicoletti et al., 1991). Hierbei wird der zelluläre DNA-Gehalt nach Permeabilisierung der Zellmembran und Anfärbung der DNA mit Propidiumjodid durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei erscheinen apoptotische Zellkerne als breiter, hypodiploider, schwächer-fluoreszierender DNA-Peak (sub-G1-Peak), der leicht vom schmalen DNA-Doppelpeak gesunder Zellen mit diploidem DNA-Gehalt unterschieden werden kann. Apoptotische Zellen sind auch permeabler für Propidiumjodid und weisen somit eine verstärkte Propidiumjodid-Fluoreszenz auf.

Für die Durchführung der sub-G1-peak-Methode wurden 2×10^5 Fibroblasten-Zellen in 15 ml-Falcons überführt und bei 1,5 g und 4°C für 1 min abzentrifugiert. Der Pellet wurde in PBS gewaschen, nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert, resuspendiert und in 2 Röhrchen aufgeteilt, wobei das eine zu Autofluoreszenz-Kontrolle der Zellen diente. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet mit 2 %iger PFA-Lösung für 10 min behandelt, wiederum abzentrifugiert und mit Triton™X-100 permeabilisiert. Nach wiederholter Zentrifugation und Waschens wurde das Pellet in 200 µl einer Propidiumjodid-Lösung resuspendiert. Nach 10 minütiger Inkubation bei 4°C im Dunkeln, konnten die Proben am Durchflusszytometer gemessen werden. Da bei dieser Methode nur die Fluoreszenz

der Zellkerne gemessen wird, musste vor der Messung ein Gate gesetzt werden, um den durch die Lyse entstandenen Zellschutt von der Messung auszuschließen.

4.5.7.2.2 Zellmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Die Präparation der Zellen wird wie unter 4.5.7.2.1 durchgeführt, nur wird das Zellpellet mit Antikörpern statt mit Propidiumjodid inkubiert. Es wurden $100 \mu\text{l}/10^5$ Zellen Primär-Antikörper für 45 min bei 4°C dazupipettiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen (1,5 g, 1 min, 4°C). Für die Kopplung mit dem Sekundärintikörper wurden jeweils 10^5 Zellen mit $50 \mu\text{l}$ des FITC-gekoppelten Sekundärintikörpers versetzt und bei 4°C für 30 min unter Lichtschutz inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen sofort bei 1,5 g und 4°C für 1 min abzentrifugiert und dreimal mit PBS (1,5 g, 1 min, 4°C) gewaschen. Die Zellen wurden in $200 \mu\text{l}$ PBS aufgenommen und bis zur Messung bei 4°C unter Lichtausschluss auf Eis gelagert.

4.5.7.3 Auswertung

Die Messungen wurden mit einer Software WinMDI (Windows Multiple Document Interface Flow Cytometry) Version 2.8 ausgewertet. Über einen Dot Plot der jeweiligen Messung wurde erneut die Fibroblasten-Population eingegrenzt. Anschließend wurden verschiedene Parameter wie Anzahl, Fluoreszenzintensität, Granularität oder Größe der Zellen in Abhängigkeit von einander als Histogramm dargestellt.

4.5.8 BIFC (Bimolecular fluorescence complementation)

Das von Tom Kerppola's Labor entwickelte Prinzip von BiFC ist die Verbindung zweier nicht fluoreszierender Fragmente eines Fluorophors, welche sich anschließend zu dem funktionellen, fluoreszierenden Fluorophor falten. Diese beiden Fluorophorfragmente werden mit den zu untersuchenden Proteinen fusioniert und eine Interaktion der beiden Proteine führt dazu, dass die Fluorophore in so engen Kontakt kommen, dass sie sich in ~ 60 sek zusammenlagern und einen intermediären Komplex bilden. Dieser reift in einem Zeitraum von ~ 50 min zum funktionellen Fluorophor. Dieser Prozess tritt in Konkurrenz mit alternativen Interaktionspartnern (endogene Proteine) auf, die sich gegenseitig ausschließen können (Kerppola 2006). Unter normalen Umständen ist die Bildung dieser Komplexe aus Interaktionspartnern irreversibel.

Die spektralen Charakteristiken des Bimolekularen Fluoreszenzkomplexes sind von denen des intakten Fluoreszenzproteins nicht voneinander zu unterscheiden. Fluoreszenzprotein-Fragmente, die nicht mit komplementären Fragmenten assoziiert sind, unterlaufen eine irreversibel falsche Faltung. Somit kann kein unspezifisches Signal aufgrund nicht gebundener Fusionsproteine entstehen.

4.5.8.1 Experimentelles Prinzip

Das BiFC-System besteht aus den zwei Plasmiden pBiFC-YN155 und pBiFC-YC155. pBiFC-YN155 besitzt vor der „multiple cloning site“ (MCS) ein Flag-Tag, der pBiFC-YC155 ein Hämagglutinin (HA)-Tag. Diese ermöglichen eine Immunlokalisation der Fusionsproteine innerhalb der transfizierten Zellen, um Transfektionseffizienz und relatives Expressionslevel der beiden potentiellen Interaktionspartner festzustellen.

Die beiden Vektoren mussten jedoch weitgehend umgebaut werden, da sich die YFP-Sequenzen C-terminal von der MCS befanden. Da aber Lamin A-Sequenzen in die MCS kloniert werden sollte, mussten die YFP-Konstrukte sowie die jeweiligen Tags N-terminal von der MCS inseriert werden. Ansonsten hätte die Gefahr bestanden, dass durch Abspaltung der C-terminalen *CxxM*-Box auch das YFP-Protein mitabgespalten werden könnte, bzw. die korrekte Faltung des C-terminalen Endes des Lamin As nicht gegeben wäre.

4.5.8.2 Durchführung

Am Tag vor der Transfektion wurden COS-7-Zellen in 35 mm-Schalen auf 4 Deckgläsern (12 mm) ausgesät. Die zu transfizierenden Plasmidkombinationen (1,2 mg pro Plasmid) im Eppendorf-Reaktionsgefäß sorgfältig gemischt (DNA-Menge insgesamt: 2,4 µg). Dieses Gemisch wurde wie unter 4.4.10 beschrieben mittels FuGene™ transfiziert. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden 2 Deckgläser für Lebendbeobachtungen präpariert.

Die anderen beiden Deckgläser wurden 5-10 min mit Formaldehydlösung fixiert (siehe auch 4.5.4.1). Danach wurden die Zellen durch eine 10 minütige Inkubation mit 0,1 % Triton™ X-100 permeabilisiert. Nach diesem Schritt folgte die Inkubation für 60 min mit dem anti-Ratte-Cy5 Antikörper (1:100). Danach wurde der Antikörper Maus anti-Flag-Tag (1:1000 in PBS) dazugegeben. Nach der Inkubation mit den primären Antikörpern wurden die Deckgläschen 3x 5 min in PBS gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper anti-Maus-Texas® Red (1:100 in PBS) 20-30 min inkubiert. Der Sekundär-Antikörperlösung wurde 10 min vor Ablauf der Inkubationszeit 40 µl Hoechst 33258 (5 µg/ml) hinzupipettiert. Nach 3x 5 min Waschen in PBS wurde die Rückseite der Deckgläschen vorsichtig mit einem fusselfreien Papiertuch getrocknet. Es wurde ein kleiner Tropfen Mowiol auf einen Objektträger gegeben und das feuchte Deckgläschen vorsichtig mit den Zellen nach unten darauf gelegt. Die Analyse erfolgte am CLSM.

4.5.9 TUNEL-Assay

Die Apoptose folgt einem genetisch kontrollierten Programm. Der charakteristische Verlauf gliedert sich in Abschnürung der Plasmamembran, was zu einer Verkleinerung des Zellvolumens führt, bestimmte Proteasen bauen spezifische Proteine ab und Endonukleasen spalten das Chromatin. Eine Möglichkeit, Apoptose in Kulturzellen nachzuweisen, ist der TUNEL-Assay (Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling). Bei dieser Methode werden die Einzelstrangbrüche in der genomischen DNA nachgewiesen, die durch die Aktivität apoptotischer Nukleasen während der Apoptose entstehen. Man macht sich dabei der Eigenschaften der Terminalen Desoxyribosyl-Transferase (TdT) zunutze, welche an freie DNA-Enden, dNTP-Nukleotide anhängt. Die Nukleotide sind mit Digoxigenin markiert, welche durch Zugabe eines anti-Digoxigenin-Antikörpers und indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen werden können. Der Apoptose-Test wurde mit einem Kit der Firma AppliChem durchgeführt. Sämtliche benötigten Enzyme und Lösungen sind im Lieferumfang enthalten.

Lösungen:

PBS	(siehe 4.3.1)	
Formaldehyd	2 %	in PBS pH 7,4
Triton™ X-100	0,1 % (v/v)	in PBS pH 7,4
Primär- und Sekundärantikörper	in PBS verdünnt (siehe unten)	
Hoechst 33258	SL 5 µg/ml	Roche
DNase I-Puffer	2 mM	MgCl ₂ in H ₂ O _{bidest}
EDTA (pH 8,0)	0,2 mol/l	
DNaseI	0,5 µg/ml	AppliChem
Äquilibrierungspuffer		AppliChem
Stop/Wasch-Puffer		AppliChem

TdT-Reaktions-Lösung:

	1 x	2 x	2,5 x	3 x
Reaktionspuffer	77 µl	154 µl	192,5 µl	231 µl
5 x TdT-Puffer (MBI)	7 µl	14 µl	17,5 µl	21 µl
CoCl ₂ (MBI)	2,8 µl	5,6 µl	7 µl	8,4 µl
H ₂ O _{bidest}	24,2 µl	48,4 µl	60,5 µl	72,6 µl
TdT-Enzym (MBI)	1 µl	2 µl	2,5 µl	3 µl

Durchführung:

Die mit Kulturzellen bewachsenen Deckgläschen werden 20 min in 2 % Formaldehyd fixiert. Das Formaldehyd wird vom Präparat durch 2x 5 min Waschen mit 1x PBS entfernt. Permeabilisiert werden die Zellmembranen der Zellen durch eine Inkubation von 5 min in 0,1 % Triton™ X-100. Abschließend werden die Präparate 2x 5 min in PBS gewaschen.

Die Zellen für die Positivkontrolle werden in DNase I-Puffer (2 mM MgCl₂ in H₂O_{bidest}) äquilibriert und 10 min bei RT mit 0,5 µg/ml DNase I inkubiert. Die Reaktion wird nach der Inkubationszeit durch Zugabe von 2 µl 0,2 mol/l EDTA (pH 8,0) und anschließendem 5 min Waschen in 1x PBS gestoppt. Das EDTA komplexiert zweiwertige Ionen, und entzieht dadurch der DNase I das für ihre enzymatische Aktivität notwendige Mg²⁺ aus dem Reaktionsansatz. Die anschließende TdT-Reaktion wird in einer Feuchtkammer bei 37°C durchgeführt. Die Deckgläschen, einschließlich der Positivkontrolle, werden in 25 µl Äquilibrierungspuffer für 10 sek bei RT inkubiert. Es werden 77 µl Reaktionspuffer und 33 µl Enzymlösung frisch gemischt, und jeweils 25 µl der Lösung auf ein Deckgläschen gegeben. Nach 1 h wird die Reaktion mit 25 µl Stop/Wasch-Puffer (1:34 Verdünnung der Stammlösung mit H₂O_{bidest}) 10 min lang bei RT abgestoppt.

Die Präparate werden zweimal mit PBS für je 5 min gewaschen und mit 100 µl des primären Antikörpers (Anti-Digoxigenin Verdünnung 1:100) für 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS für 5 min, erfolgt die Inkubation des sekundären Antikörpers, der mit Cy2 gekoppelt ist, für 30 min. 10 min vor Ende der Inkubationszeit wird der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS zugefügt. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Präparate 2x 5 min in PBS gewaschen, für 2 min in technischem Ethanol dehydriert und anschließend im noch feuchten Zustand in Mowiol eingebettet. Die Präparate konnten bei 4°C in Dunkelheit aufbewahrt werden und sind bis zu 6 Monate lang haltbar.

4.5.10 Nachweis von DNA-Reparatur-Foci

Bei DNA-Doppelstrangbrüchen werden Reparaturproteine zu dem Strangbruch delegiert und bilden einen Komplex, den man auch als Focus bezeichnet. Das Histon H2A.X (normalerweise gleichmäßig im Genom eingebaut) spielt bei Doppelstrangbrüchen eine wichtige Rolle, da es unter anderem eines der ersten Proteine ist, welches im Zuge der Reparaturprozesse durch ATM (Ataxia Telangiectatica Mutated) oder der DNA-PK phosphoryliert wird. Schon innerhalb weniger Minuten nach Erzeugung eines DSB, werden hundert bis tausend DSB-flankierende H2A.X-Histone am Serin 139 (C-terminales Motiv) phosphoryliert. Die Phosphorylierung wird durch die Bezeichnung γH2A.X ausgedrückt. Durch die Anfärbung mittels spezifischer Antikörper kann man die Foci und somit die Doppelstrangbrüche sichtbar machen.

IN der DNA-Doppelstrangbruch-Signalkaskade ist die Proteinkinase ATM eine wesentliche Komponente. ATM aktiviert unmittelbar nach dem Auftauchen der Brüche wichtige Enzyme der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur, Faktoren, welche wie p53 und BRCA1 die Qualitätskontrolle dieser Reparatur übernehmen und Kinasen, die wie Chk1 und Chk2 dafür sorgen, dass das Wachstum gestoppt wird; bis die Schäden repariert wurden. Doppelstrangbrüche sind oft Hinweise auf genomische Instabilität, können aber auch durch mitotische oder meiotische Prozesse (Rekombination) ausgelöst werden.

Methoden

Nachweis der Reparatur-Foci erfolgt mittels Doppelimmunfluoreszenz. Der erste Antikörper detektiert phosphoriliertes Histon γ H2A.X. Um sicher zu stellen, dass auch wirklich Reparatur-Foci bzw. DBS detektiert werden, wird anschließend noch ein zweiter Antikörper gegen ATM verwendet. Bei einer Kolo-kalisation ist davon auszugehen, dass an diesen Foci die DNA-Reparaturmaschinerie angehäuft ist. Dies ist aber noch kein Beweis dafür, dass DNA-Reparatur auch tatsächlich stattfindet.

Lösungen:

PBS	(siehe 4.3.1)	
Formaldehyd	2 %	in PBS pH 7,4
Triton™ X-100	0,1 % (v/v)	in PBS pH 7,4
Primär- und Sekundärantikörper	in PBS verdünnt (siehe unten)	
Hoechst 33258	SL 5 μ g/ml	Roche

Durchführung:

Die Deckgläser wurden 10 min mit Formaldehydlösung fixiert (siehe auch 4.5.4.1). Danach wurden die Zellen durch eine 10-minütige Inkubation mit 0,1 % Triton™ X-100 permeabilisiert. Nach diesem Schritt folgte die Inkubation für 60 min mit dem Antikörper anti- γ H2A.X (1:100). Danach wurde der Antikörper anti-ATM (1:1000 in PBS) dazugegeben. Nach der Inkubation mit den primären Antikörpern wurden die Deckgläschen 3x 5 min in PBS gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper anti-Maus-Texas® Red (1:100 in PBS) 20-30 min inkubiert. Der Sekundär-Antikörperlösung wurde 10 min vor Ablauf der Inkubationszeit 40 μ l Hoechst 33258 (5 μ g/ml) hinzupipettiert. Nach Waschen in PBS 3x 5 min wurde die Rückseite der Deckgläschen vorsichtig mit einem fusselfreien Papiertuch getrocknet. Es wurde ein kleiner Tropfen Mowiol auf einen Objektträger gegeben und das feuchte Deckgläschen vorsichtig mit den Zellen nach unten darauf gelegt. Die Präparate konnten bei 4°C in Dunkelheit aufbewahrt werden und sind bis zu 6 Monate lang haltbar. Die Analyse erfolgte am CLSM.

4.5.11 Untersuchung der Seneszenz in Kulturzellen

Senescente Zellen unterscheiden sich biochemisch von viablen Zellen durch erhöhte Werte bestimmter Marker wie Fibronectin, Collagenase I oder β -Galactosidase. Das in dieser Arbeit verwendete Assay beruht auf dem histochemischen Nachweis der seneszenz-assoziierten β -Galactosidase (SA- β -Gal). Dieser Biomarker lässt sich spezifisch im Zytosol seneszenten, nicht aber viabler, präseneszenten Zellen nachweisen.

Lösungen:

PBS	(siehe 4.3.1)	
Formaldehyd	3 %	in PBS pH 7,4
β -Galaktosidase-Lösung (pH 4 oder pH 6)	0,1 mg/ml	X-Gal (Stock: 100mg/ml)
	40 mM	Zitronensäure
	40 mM	Na ₃ PO ₆
	5 mM	K ₃ Fe(CN) ₆
	5 mM	K ₄ Fe(CN) ₆
	150 mM	NaCl
	2 mM	MgCl ₂

Durchführung:

Die Zellen wurden auf Deckgläschen mit PBS gewaschen und 5 min mit 3 % Formaldehydlösung fixiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen bei 37°C mit frischer seneszenz-assoziiertes β -Galaktosidase-Lösung pH 6 inkubiert (pro Minischälchen 1-2 ml). Bei Galaktosidaseaktivität färbten sich die Zellen durch Spaltung des X-Gals blau (Inkubationszeit: 12-14 h). Die Deckgläschen wurden kurz in PBS gewaschen, in 100 % Ethanol 1 min entwässert und anschließend in Mowiol eingebettet. Die Zellen wurden am Fluoreszenzmikroskop mit einer 20-fachen Vergrößerung im Hellfeld fotografiert. Als positiver Vergleich diente die lysosomale Galaktosidaseaktivität bei pH 4 im gleichen Puffersystem.

4.5.12 Herstellung der Präparate für die Elektronenmikroskopie

Die für das Elektronenmikroskop verwendeten Proben mussten für die Analyse in einer sehr dünnen Schicht vorliegen, damit die Elektronen sie auch durchdringen konnten. Die Proben wurden zuerst fixiert und kontrastiert. Anschließend folgte eine Einbettung in einen Kunststoffharz, von dem schließlich mit einem Spezialmikrotom ultradünne Schichten abgeschnitten werden konnten. Die Ultradünnschnitte wurden vor der Untersuchung im Elektronenmikroskop noch kontrastiert.

Lösungen:

PBS	siehe 4.3.1	
Cacodylatpuffer 0,2 M	0,2 M	Cacodylsäure Na-Salz Trihydrat ⇒ pH einstellen auf 7,2
Cacodylatpuffer 0,05 M	0,05 M	Cacodylsäure Na-Salz Trihydrat ⇒ pH einstellen auf 7,2
2,5 % Glutaraldehyd mit Ionen	2,5 ml	25 % Glutaraldehyd
	2,5 ml	1 M KCl
	1,25 ml	0,1 M MgCl ₂
	41,25 ml	0,05 M Cacodylatpuffer ⇒ pH einstellen auf 7,2
Osmiumtetroxid 2 %	2 Teile	OsO ₄ 4 %
	1 Teil	H ₂ O _{bidest}
	1 Teil	0,2M Cacodylatpuffer
Propylenoxid		
Epon-Lösung A		(1 ml = 1,077 g)
	50 ml	DDSA
	31 ml	Epon 812 (Serva, Heidelberg)
Epon-Lösung B		(1 ml 1,212 g)
	44,5 ml	MNA
	50 ml	Epon 812
Epon-Lösung C		2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)-phenol

4.5.12.1 Präparate für morphologische Übersichtsaufnahmen

4.5.12.1.1 Lokalisation von transfizierten Zellen

Um transfizierte Zellen (siehe 4.4.10) auch unter dem Elektronenmikroskop analysieren zu können, wurden spezielle CELLocate™ Plättchen (Eppendorf) als Deckgläschen verwendet. Anhand des auf die Plättchen gedruckten Rasters

Methoden

Es wurden 100 µl Primärantikörper dazugegeben und die Proben 60 min bei RT inkubiert. Danach wurde sehr vorsichtig 3x 5 min in PBS gewaschen, bevor jeweils 50 µl des mit an 12 nm kolloidalem Gold gekoppelten Sekundärantikörpers auf jede Probe gegeben wurde. Inkubiert wurde bei 4°C über Nacht. Dann wurde erneut 2x 5 min vorsichtig mit PBS gewaschen.

Verwendete Antikörper:

Antikörper	Verdünnung
a-Nesprin2 Giant K20	1:2 in PBS
anti-Maus (gekoppelt an 12 nm kolloidalem Gold; Sekundärantikörper)	1:10 in PBS

4.5.12.2.2 Fixierung, Kontrastierung, Entwässerung und Einbettung der Zellen

Diese Methoden wurden wie unter 4.5.12.1.2 beschrieben durchgeführt. Der einzige Unterschied bestand darin, dass die Kontrastierung mit Uranylacetat weggelassen wurde, da sonst möglicherweise die Goldpartikel durch zu starke Schwärzung des Präparates schlechter hätten detektiert werden können.

4.5.12.3 Anfertigen der Ultradünnschnitte

Die getrockneten Eponkapseln wurden aus dem Brutschrank genommen und vorsichtig von der Aluminiumfolie gelöst. Die Unterseite des Plättchens wurde mit Hilfe einer Rasierklinge von trockenem Epon befreit und anschließend an den Rändern auf die Größe der Kapsel zugeschnitten. Das Absprennen des Plättchens beruhte auf den verschiedenen Ausdehnungseigenschaften des Plättchens und des Kunststoffes. Durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff kühlten beide Fraktionen gleichmäßig ab, das Auftauen dagegen erfolgte unterschiedlich schnell. Dadurch entstanden zwischen beiden Komponenten Spannungen die bei Verwendung von etwas Luftdruck ein Ablösen des Plättchens vom Epon bewirkte. Die Zellen befanden sich nun auf der flachen Seite der Eponkapseln.

Zur Vorbereitung der Schnittfläche wurde der Präparateblock in einen Halter gespannt, der in einem Untersatz unter der Stereolupe befestigt wurde. Während des sogenannten Trimmens wurde das Epon um das Präparat mit einer Rasierklinge entfernt, so dass eine pyramidenförmige Schnittfläche mit einer Kantenlänge von ca. 0,5 mm entstand. Der Eponblock wurde in ein Ultramikrotom eingespannt. Mit einem Glasmesser wurden einige Semidünnschnitte angefertigt, die nach dem Übertragen auf einen Objektträger unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden konnten. Wenn die Schnittebene für einen Ultradünnschnitt geeignet waren, wurde der Harzblock wieder eingespannt und das Glasmesser gegen ein Diamantmesser ausgetauscht, mit dem die Ultradünnschnitte angefertigt wurden. Die Dicke der Schnitte betrug 60 – 80 nm. Die Schnitte wurden auf ein mit Pioloform beschichtetes Kupfernetz übertragen und getrocknet. Zur Aufbewahrung wurden die Kupfernetze in eine „Grid-Box“ gelegt.

4.5.12.4 Kontrastierung der Kupfernetzchen

Zur Kontrastierung wurden die Netzchen mit der beschichteten Seite nach unten in einen Tropfen 2 % Uranylacetat (in Ethanol) gelegt und für 15-20 min inkubiert. Durch Eintauchen des Netzchens in 100 % Ethanol, 50 % Ethanol, reines dH₂O und anschließendem Abspülen mit einer Spritzflasche wurden die Proben gewaschen. Das feuchte Netzchen wurde an einem Filterpapier abgestreift und mit der beschichteten Seite nach unten auf einen Tropfen Bleiacetat gelegt. Außerdem wurden auf dem Filterpapier noch NaOH-Plätzchen postiert, um den CO₂-Gehalt so gering wie möglich zu halten – das Filterpapier wurde mit einer Glasschale abgedeckt. Nach dreimaligem Waschen mit dH₂O und Abspülen der Netzchen mit dH₂O wurden diese an einem Filterpapier abgestreift. Nach dem Trocknen konnten die Proben am Transmissionselektronenmikroskop untersucht werden.

4.5.13 Aufnahmen am Transmissions-Elektronenmikroskop

Die Analyse am Transmissions-Elektronenmikroskop diente im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung der Morphologie bzw. der Lokalisierung bestimmter Strukturen/Proteine der Fibroblasten. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einer eingebauten Kamera mit automatischer Belichtungssteuerung hergestellt. Die Planfilme (Kodak) werden mit dem EM-Negativentwickler *Kodak-D19* (Kodak) entwickelt. Danach wurden die Filme im *Tetenal Schnellfixierbad* fixiert. Von den Negativen wurden mit einem Vergrößerungsapparat (*Focomat*; Durst) Positivabzüge auf Fotopapier (*Brovira Speed*, Härten 1-5; Agfa) hergestellt. Die Abzüge wurden in *Neutol Positiventwickler* (Agfa) entwickelt und im Fixierbad für Positive (*Tetenal Fixiersalz*; Agfa) fixiert. Die Negative wurden mit einem Durchlichtscanner gescannt.

4.5.14 negative staining

Die Proteinproben wurden in Collodium Bags der Firma Sartorius (Göttingen) bei 4°C gegen MES-Puffer dialysiert (siehe 4.3.7). 15 µl des Dialysats wurden nach ½, 1, 2, 3 h und nach Dialyse über Nacht auf Kohlenstoff bedampfte Kupfernetzchen (Mesh 400) pipettiert, nach 30 sek Absorption wurde der Tropfen auf Whatman-Papier abgestreift und die Probe für 15 sek mit 1,25 % Glutaraldehyd (2,5 % in H₂O_{bidest} verdünnt) fixiert. Nach dem Waschen mit 3 Tropfen H₂O_{bidest} wurde 20 sek mit 2 % wässrigem Uranylacetat gefärbt.

4.5.14.1 Auswertung

Die Analyse am Transmissions-Elektronenmikroskop diente im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung der Morphologie von rekonstituiertem Lamin A und dem Vergleich zwischen WT und Mutation. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einer eingebauten Kamera mit automatischer Belichtungssteuerung hergestellt. Die Planfilme (Kodak) werden mit dem EM-Negativentwickler *Kodak-D19* (Kodak) entwickelt. Danach wurden die Filme im *Tetenal Schnellfixierbad* fixiert. Die Negative wurden mit einem Durchlichtscanner gescannt. Die Parakristallbänderung wurde statistisch ausgewertet indem jeweils 25 Wiederholungen auf ihre Gesamterstreckung gemessen wurden. Mindestens 25 Messungen gingen in die Mittelwertberechnung ein, die auf eine hell/dunkel-Bänderung berechnet mittels Microsoft® Excel wurde. Anschließend wurde mit einem ungepaarten Student'schen T-Test (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>) die statistische Signifikanz berechnet.

5.1.2 Morphologische Veränderungen der Fibroblasten mit der *LMNA* S143F Mutation

Ein charakteristisches Kennzeichen von Laminopathien sind morphologische Veränderungen der Zellkerne. Um Abnormitäten der Kernmorphologie von *LMNA* S143F Fibroblasten zu charakterisieren, wurden dermale Fibroblasten in Epon eingebettet, Ultradünnschnitte angefertigt und mit dem Transmissionselektronenmikroskop untersucht (Abb. 5.2 A, B). Weiterhin wurden Zellkerne mit dem DNA-spezifischen fluoreszierenden Farbstoff Hoechst angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (Abb. 5.2 C).

Anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen der *LMNA* S143F Fibroblasten konnten bei 41 % der Zellen in früher Passage (#13) eine Bläschenbildung der Kernhülle festgestellt werden (Abb. 5.2 A, B). Diese Verformung der Kernhülle äußerte sich als Ausstülpung der beiden Kernmembranen, wobei ein Teil der Kern-Lamina die Bläschen auskleidete und mit Chromatin in Kontakt blieb (Abb. 5.2 B; b, d). Die Dicke der Lamina erschien allerdings in diesen Bläschen reduziert (Abb. 5.2 B; d; großer Pfeil). Auch konnten in diesen Veränderungen der Membranstruktur Kernporenkomplexe (NPC) gefunden werden, die keine strukturellen Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen (Abb. 5.2 B; c, d; kleine Pfeile). Diese Deformationen reichten bis zur Bildung von Mikrokernen (Abb. 5.2 A, Pfeil). Es konnte eine Relation zwischen der Häufigkeit der Zellkerndeformationen und der Passage der Zellen festgestellt werden, Kontrollfibroblasten zeigten selbst in höheren Passagen nur geringe morphologische Abnormitäten (Abb. 5.2 B; a).

Auch Fluoreszenzaufnahmen der mit dem DNA-spezifischen fluoreszierenden Farbstoff Hoechst angefärbten Patientenzellkernen wiesen die Veränderungen der Kernmorphologie bis hin zur Mikrokern-Bildung auf (Abb. 5.2 C, Kooperation mit Y. Lüke, Institut für Biochemie, Universität Köln).

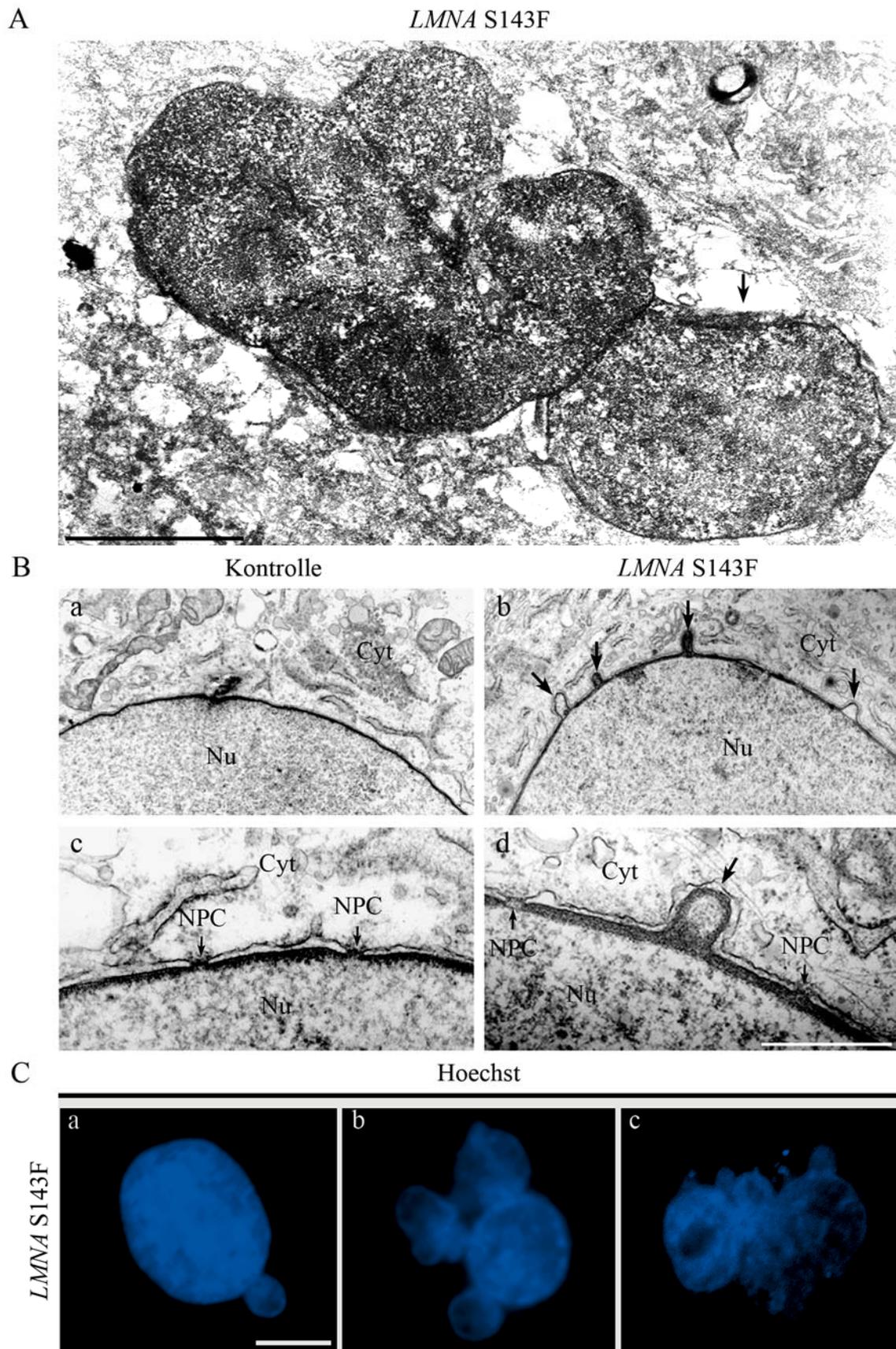


Abb. 5.2: Veränderungen der Kernmorphologie in *LMNA S143F* Fibroblasten. (A) Die veränderte Kernmorphologie bis hin zur Bildung eines Mikrokernes (A, Pfeil) wird durch elektronenmikroskopische Aufnahmen ersichtlich. Eichstrich: 1 µm. (B) Elektronenmikroskopische Analysen zeigen auffällige Bläschen der Kernhülle der Patientenzelle (b, d; Pfeile) im Vergleich zur Kontrollzelle (a, c). Die Kernporenkomplexe sind in beiden Zellen gleich verteilt (c, d; Pfeile; Eichstrich: 1 µm). (C) Die Färbung der nukleären DNA mit Hoechst zeigt ebenfalls morphologische Abnormitäten des Kernes (a-c). Eichstrich: 10 µm. NPC: Kernporenkomplexe, Nu: Nukleus, Cyt: Zytoplasma.

Nach der Beobachtung morphologischer Veränderungen in der Kernhülle war es von großem Interesse, ob die Mutation *LMNA* S143F Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation bzw. Expression von Proteinen der Kern-Lamina, den Typ A- und Typ B-Laminen, nahm.

Um die Verteilung von Lamin A/C zu untersuchen, wurde eine indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen Lamin A/C durchgeführt (Abb. 5.3, Kooperation mit Y. Lücke, Institut für Biochemie, Universität Köln).

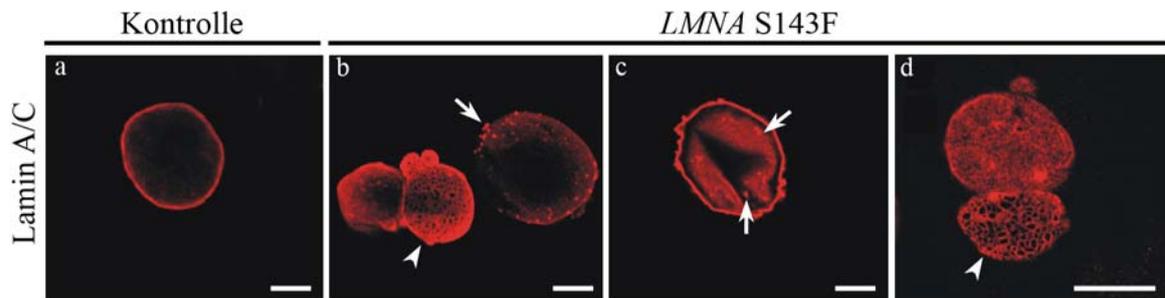


Abb. 5.3 Verteilung von Lamin A/C in *LMNA* S143F - und Kontrollfibroblasten. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen weisen die Patientenzellen Veränderungen in der Lamin A/C Lokalisation auf. Indirekte Fluoreszenzmikroskopie mit einem monoklonalen Antikörper gegen Lamin A/C zeigt eine abnormale Verteilung von Lamin A/C in Form von Protein-Aggregaten an der Kernmembran (b, Pfeil; c) und im Nukleoplasma (c, Pfeile) sowie die Ausbildung einer Honigwabenstruktur (b, linker Zellkern; c, Pfeilköpfe). In Kontrollzellen ist Lamin A/C gleichmäßig entlang der Kernhülle lokalisiert (a). Eichstriche: 10 µm.

Im Unterschied zu den Kontrollfibroblasten (Abb. 5.3 a) zeigten die *LMNA* S143F Fibroblasten eine ungleichmäßige Verteilung von Lamin A/C. Diese Unterschiede waren in Form von Protein-Aggregationen an der Kernmembran (Abb. 5.3 b, Pfeil; c), sowie im Nukleoplasma (Abb. 5.3 c, Pfeile) zu erkennen. In Fluoreszenzaufnahmen ist die Verteilung von Lamin A/C in Form einer „löchrigen“ Honigwabe zu erkennen (Abb. 5.3 b, linker Zellkern; c, Pfeilköpfe). Diese Verteilung wird auch als „Honigwabenstruktur“ bezeichnet. Allerdings zeigte eine quantitative Analyse der Expression von Lamin A/C in *LMNA* S143F Fibroblasten und Kontrollfibroblasten mittels Immunblot keine signifikanten Unterschiede (Diplomarbeit S. Kandert, 2005).

Ein weiteres wichtiges Hauptstrukturelement der Kern-Lamina sind die Typ B-Lamine, welche ebenfalls mit der inneren Kernmembran assoziiert sind (Aebi et al., 1986). Um eventuelle Auswirkungen der Typ A-Lamin Mutation auf die Lokalisation und Funktion der Typ B-Lamine zu analysieren, wurden indirekte Immunfluoreszenzanalysen mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen Lamin B angefertigt. Während in Kontrollfibroblasten Lamin B homogen an der Kernhülle lokalisiert (Abb. 5.4 a'), konnte in *LMNA* S143F Zellen in deformierten Bereichen des Kernes bzw. in Mikrokernen ein reduziertes Signal von Lamin B detektiert werden (Abb. 5.4, b', Pfeil).

Zusätzlich wurde auch die Verteilung des Lamin B Rezeptors und der Nukleoporine untersucht, die ebenfalls mit Lamin A interagieren (Gruenbaum et al., 2005). Diese Proteine zeigten in *LMNA* S143F Zellen eine wildtypische gleichmäßige Verteilung (Daten werden nicht gezeigt).

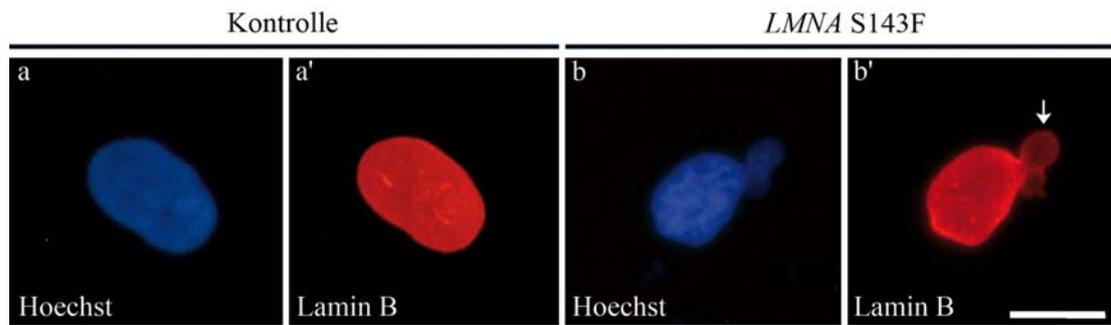


Abb. 5.4: Indirekte Fluoreszenzaufnahmen zeigen eine fehlerhafte Lokalisation von Lamin B in den deformierten Bereichen des Zellkerns nach Inkubation mit spezifischen monoklonalen Antikörpern. In Kontrollzellen, wie auch in Patientenzellen, ist Lamin B homogen an der Kernhülle lokalisiert (a', b'). Die deformierten Bereiche des Kernes bzw. die Mikrokerne von *LMNA* S143F Fibroblasten weisen eine schwächere Expression von Lamin B auf (b', Pfeil). Die korrespondierenden Hoechstfärbungen sind zusätzlich dargestellt (a, b). Eichstrich 20 μ m.

5.1.3 Die Lokalisation und Expression von Proteinen der inneren Kernmembran in *LMNA* S143F Fibroblasten ist verändert

Die korrekte Lokalisation einer Vielzahl integraler Proteine der inneren Kernmembran wird über nukleoplasmatische Domänen, die direkt oder indirekt an Lamin binden können, gewährleistet (Furukawa et al., 1998). So beruht auch die Verankerung des LEM-Domänen-Proteins Emerin im Kern wahrscheinlich auf einer Interaktion mit der Lamina (Sullivan et al., 1999). Auch ist bekannt, dass andere LEM-Domänen-Proteine zu deren Familie auch LAP2 gehört, Interaktionen mit der Lamina eingehen (Haraguchi et al., 2004; Holaska et al., 2003; Wilkinson et al., 2003; Zastrow et al., 2004). Da Mutationen im *LMNA*-Protein diese Interaktionen stören könnten, wurde die Lokalisation und Expression der Proteine LAP2 und Emerin untersucht.

Die LAP2 Proteine bilden eine große Proteinfamilie und gliedern sich durch alternatives Spleißen in eine ganze Reihe von Isoformen auf, zu welchen auch LAP2 α und LAP2 β gehören (Berger et al., 1996). Während LAP2 β durch eine Transmembrandomäne in der Kern-Lamina verankert ist, lokalisiert LAP2 α im Nukleoplasma (siehe auch 2.3.1.1). Indirekte Doppelfluoreszenzaufnahmen nach Inkubation mit einem monoklonalen Antikörper gegen LAP2, der verschiedene LAP2 Isoformen erkennt, zeigten eine fehlerhafte Lokalisation und Expression von LAP2 in *LMNA* S143F Fibroblasten (Abb. 5.5 A, c', d'). Da häufig nur eine Färbung von Aggregaten an der Kernmembran zu erkennen war (Abb. 5.5 A, c', Pfeil), ist anzunehmen, dass es sich um Misslokalisationen des LAP2 β handelte, welches normalerweise mit der inneren Kernmembran assoziiert ist. Kontrollzellen zeigten eine homogene Verteilung der LAP2 Proteine im Nukleoplasma, sowie in der Kernmembran (Abb. 5.5 A, a').

Die Detektion der Isoform LAP2 α mittels eines spezifischen polyklonalen Antikörpers zeigte eine normale Lokalisation im Nukleoplasma in 99,6 % der Kontrollzellen (Abb. 5.5 A, b'). Die Patientenzellen wiesen dagegen in 54 % eine Reduktion von LAP2 α im Kerninneren auf, bzw. war es sogar nicht mehr nachweisbar (Abb. 5.5 A, c'', d'').

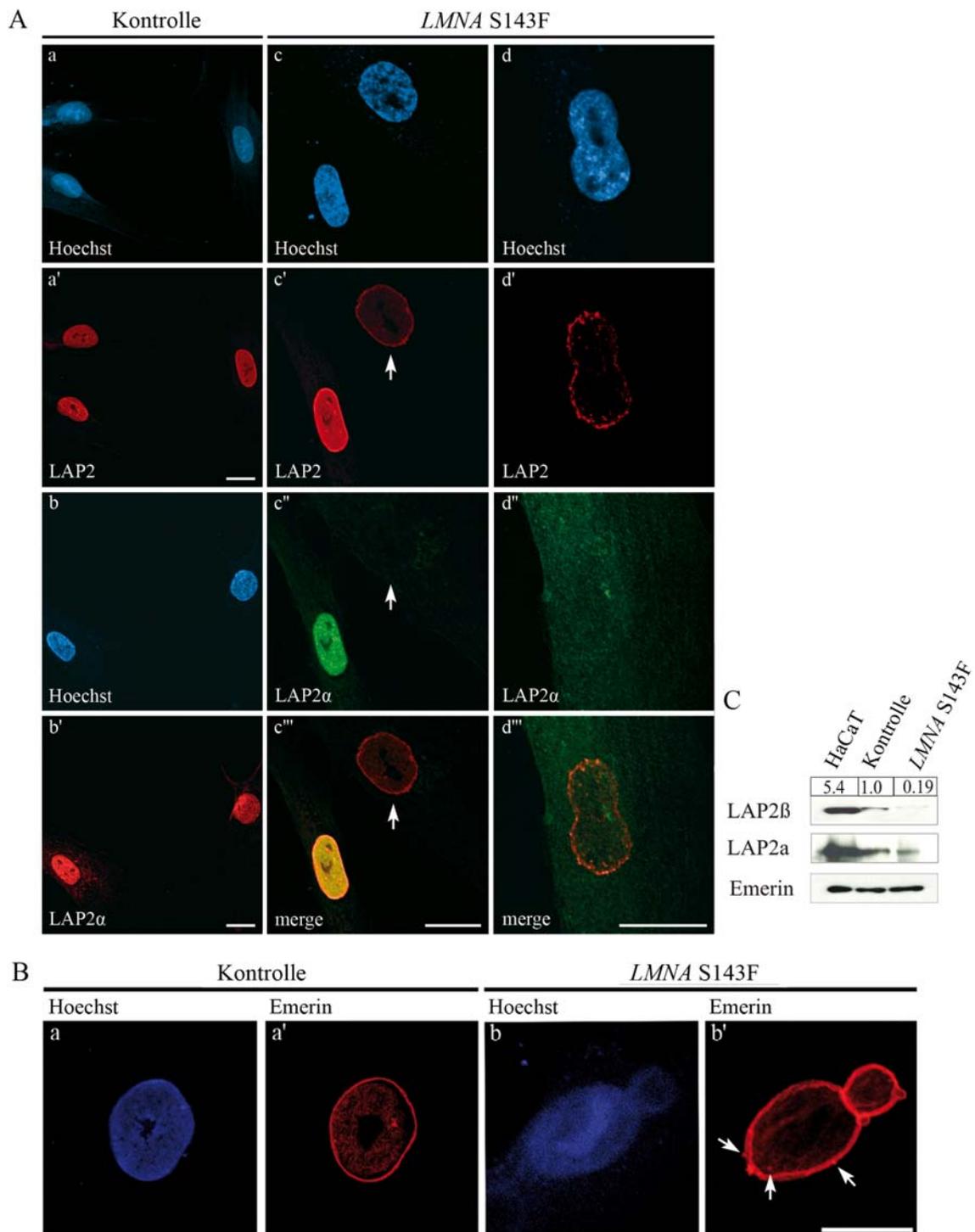


Abb. 5.5: Indirekte Fluoreszenzaufnahmen zeigen eine fehlerhafte Lokalisation und von LAP2, der Isoform LAP2 α und Emerin nach Inkubation mit spezifischen monoklonalen LAP2 und polyklonalen LAP2 α und Emerin Antikörpern. (A) Die Kontrollzellen zeigen eine gleichmäßige Verteilung von LAP2 und LAP2 α an der Kernmembran und im Nukleoplasma (a', b'), während in *LMNA S143F* Fibroblasten eine Aggregation von LAP2 entlang der Kernmembran (c' Pfeil, d') und eine Reduktion von LAP2 α (c'', Pfeil; d'') zu beobachten ist. Die Abbildungen (c''', d''') sind Überlagerungen von (c', d') und (c'', d''). (B) Emerin aggregiert stellenweise an der Kernmembran in Patientenzellen (b', Pfeile), während das Protein in Kontrollzellen normal homogen an der Kernhülle lokalisiert (a'). Die korrespondierenden Hoechstfärbungen sind zusätzlich dargestellt (A, a-d; B a, b). Eichstriche 20 μ m. (C) Immunblot-Analysen der Zellextrakte von Kontroll- und Patientenfibroblasten. Der Immunblot zeigt eine verminderte LAP2 β und LAP α Expression verglichen zur Kontrolle, während die Emerin-Expression unverändert bleibt. HaCaT-Zellysate dient als interne Kontrolle, da in dieser Zelllinie LAP2 α und LAP2 β stark exprimiert werden.

Ergebnisse

Die Verteilung des LEM-Proteins Emerin zeigte stellenweise eine Aggregation an der Kernmembran in Patientenzellen (Abb. 5.5 A, b', Pfeile), während das Protein in Kontrollzellen normal homogen an der Kernhülle lokalisierte (Abb. 5.5 A, a').

Um nachzuprüfen, ob die Proteine im Zellkern lediglich umlokalisiert waren, oder aber die Expression verändert war, wurde das Expressionslevel dieser Proteine in beiden Zelllinien verglichen. Dazu wurde ein Immunblot der Zellextrakte von Kontroll- und Patientenfibroblasten durchgeführt. Die Immunblot-Analyse zeigte eine Reduktion der LAP2 β und LAP α Expression in *LMNA* S143F Fibroblasten verglichen mit der Kontrolle, während die Emerin-Expression unverändert blieb.

5.1.4 Chromatin-assoziierte Proteine und Gen-regulierende Proteine in *LMNA* S143F Fibroblasten sind umverteilt

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass eine abnormale Organisation der Kernkomponenten zu Veränderungen in der Genexpression führen kann („Genexpressions-Modell, siehe 2.4.1.4.; Filesi et al., 2005; Goldman et al., 2004; Reichart et al., 2004). Es wurde auch berichtet, dass eine veränderte Laminorganisation die RNA-Polymerase II-abhängige Transkription inhibiert (Spann et al., 2002).

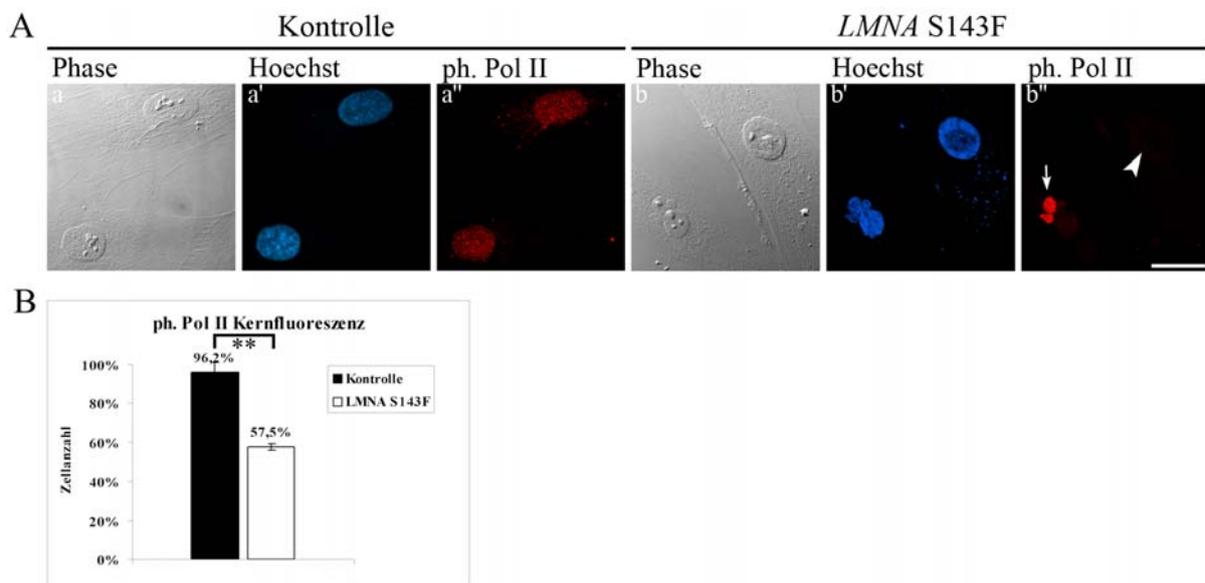


Abb. 5.6: Indirekte Fluoreszenzaufnahmen zeigen eine Umverteilung von transkriptionell aktiver RNA-Polymerase II nach Inkubation mit spezifischen monoklonalen Antikörpern. (A) In Kontrollzellen ist die trans. akt. Pol II wildtypisch homogen in Form von „speckles“ im Kern verteilt (a''). In Patientenzellen ist die trans. akt. Pol II dagegen entweder nicht nachweisbar (b'', Pfeilspitze) oder aber angereichert an den Zellpolen zu finden (b'', Pfeil). Die korrespondierenden Hoechstfärbungen (a', b') und der Phasenkontrast (a, b) sind zusätzlich dargestellt. Eichstrich 20 μ m. (B) Statistische Auswertung der Kernlokalisierung von trans. akt. Pol II in Kontroll- und Patientenfibroblasten. Es wurden jeweils 200 Zellen ausgewertet (#9 Kontrolle; #10 Patientenzellen; ** P<0,01).

Immunfluoreszenzanalysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen die phosphorylierte transkriptionell aktive Form der RNA-Polymerase II zeigten, dass diese in 57,2 % der Patientenzellen im Kern nicht nachweisbar war (Abb. 5.6 A, b''; B, Pfeilspitze). Zusätzlich zeigte die

Immunfluoreszenzanalyse, dass die RNA-Polymerase II in bestimmten fokalen Bereichen der Zellen stärker akkumulierte (Abb. 5.6 A, b''; B, Pfeil). Im Gegensatz dazu war die aktive Form der Polymerase II in 96,2 % der Kontrollzellen wildtypisch in Form eines Pünktchenmusters im Kern zu lokalisieren (Abb. 5.6 A, a''; B).

Die gleiche Beobachtung der Lokalisation an den Zellpolen konnte auch für die transkriptionell inaktive Form der Polymerase II gemacht werden, allerdings in weit weniger Zellen, auch war die inaktive Form in jedem Patientenzellkern nachzuweisen (Diplomarbeit S. Kandert, 2005).

Die Transkription ist aber nicht nur abhängig von der RNA-Polymerase II, sondern auch von Transkriptionsfaktoren, die mit der Lamina interagieren können. Ein Beispiel ist das Retinoblastoma-Protein (pRb), das an Typ A-Lamine, an das Lamina-assoziierte Polypeptid 2 alpha (LAP2a) und an den E2f-DP3-Komplex bindet. Erst wenn pRb aus diesem Komplex entlassen wird, werden zellzyklus-abhängige Gene aktiviert (Mancini et al., 1994; Markiewicz et al., 2002; Dorner et al., 2006). Liegt Retinoblastoma in hyperphosphorylierter Form vor, kann es den Transkriptionsfaktor E2F nicht mehr binden, dieser ist somit aktiv und kann die DNA-Synthese aktivieren. Hypophosphoryliert ist Retinoblastoma als Repressor aktiv, bindet E2F und unterdrückt dadurch die DNA-Synthese (Nevins et al., 1991). Eine fehlerhafte Komplexbildung aufgrund einer Laminmutation könnte somit zu einer veränderten Lokalisation von Retinoblastoma führen.

In FACS-Analysen wurde die Lokalisation von hypophosphoryliertem (pRB) und hyperphosphoryliertem (ppRb) Retinoblastoma-Protein analysiert. Die Fluoreszenzintensitäten von hypophosphoryliertem Retinoblastoma-Protein, bezogen auf die gemessenen Zellen, ergaben im Durchschnitt keinen signifikanten Unterschied von Kontrollzellen (Abb. 5.7 a) zu Patientenzellen (Abb. 5.7 b). Dagegen ist im Durchschnitt eine 30 %ige Erhöhung der Fluoreszenzintensität von hyperphosphoryliertem Retinoblastoma in Kontrollzellen (Abb. 5.7 c, rote Kurve) im Vergleich zu Patientenzellen (Abb. 5.7 c, gelbe Kurve) zu beobachten.

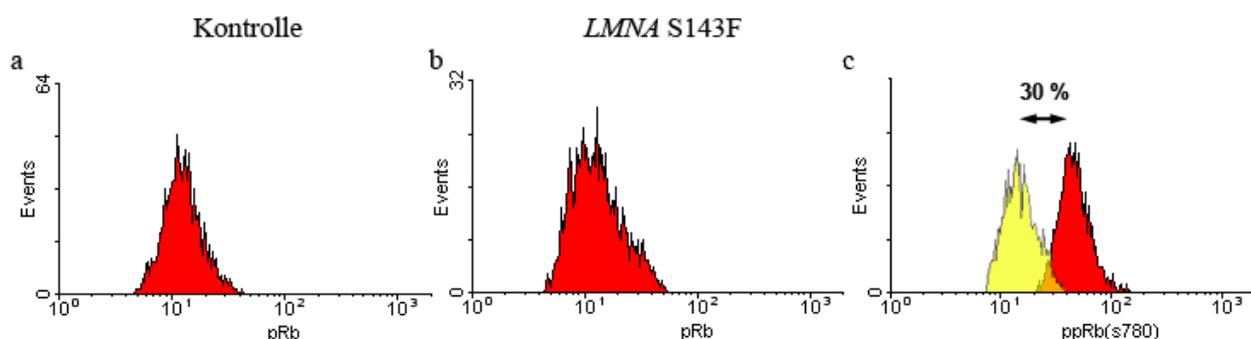


Abb. 5.7: FACS-Analysen der Kernfluoreszenz von hypophosphoryliertem (pRB) und hyperphosphoryliertem (ppRb) Retinoblastoma-Protein. Die Fluoreszenzintensität jeder gemessenen Zelle ist logarithmisch entlang der x-Achse dargestellt. Die y-Achse zeigt die Anzahl der gemessenen Zellen. Die Fluoreszenzintensitäten von hypophosphoryliertem Retinoblastoma-Protein bezogen auf die gemessenen Zellen, zeigen im Durchschnitt keinen signifikanten Unterschied von Kontrollzellen (a) zu Patientenzellen (b). Dagegen ist im Durchschnitt eine 30 %ige Erhöhung der Fluoreszenzintensität von hyperphosphoryliertem Retinoblastoma in Kontrollzellen (c, rote Kurve) im Vergleich zu Patientenzellen (c, gelbe Kurve) zu beobachten. Verwendet wurden spezifische monoklonale Antikörper. Es wurden jeweils 10000 Zellen ausgewertet (#16 Kontrolle; #22 Patientenzellen).

Wie vorher beschrieben, kam es zu einer Umlokalisierung von Lamin A, LAP2 und der RNA-Polymerase II. Typ A-Lamine binden über ihre carboxyterminale Domäne zwei Komponenten des Chromatins, die DNA und die Histone (Taniura et al., 1995; Stierlé et al., 2003). Ein Grund für die abnormale Lokalisation der RNA Polymerase II könnte eine veränderte Bindung von Lamin A zu Chromatin sein (Spann et al., 2002). Eine fehlerhafte Lamin-Chromatin-Interaktion und daraus resultierende Histonmodifikationen, können zu einer Veränderung der Chromatin-Organisation führen und somit eine wichtige Rolle in der Auslösung der Krankheit spielen (Shumaker et al., 2006; Shaklai et al., 2007).

Um die Organisation des Chromatins näher zu analysieren, wurde die Verteilung bestimmter Histone beobachtet. Histon H1 wird benötigt, um eine 30 nm-Faser zu bilden. Dies ist eine übergeordnete Struktur, die einer Helix aus Nukleosomen entspricht. Dadurch wird die DNA-Packung zu Heterochromatin weiter verstärkt (Kamakaka et al., 2005). Eine indirekte Immunfluoreszenzanalyse mit spezifischen monoklonalen Antikörpern zeigte, dass das Protein Histon H1 in 41,5 % der Patientenzellen nur in fokalen deformierten Bereichen des Kernes vorhanden war (Abb. 5.8 A, b'', Pfeile; B), während Histon H1 in Kontrollzellen gleichmäßig im ganzen Kern lokalisierte (Abb. 5.8 A, a''). Acetyliertes Lysin spielt dagegen eine Rolle in der Zugänglichkeit der DNA für transkriptionsrelevante Proteine. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Lokalisation von acetyliertem Lysin ergaben, dass in 53 % der Patientenzellen acetyliertes Lysin nicht detektiert werden konnte (Abb. 5.8 A, b'', Pfeil; C). Im Gegensatz dazu lies sich in 98 % der wildtypischen Zellen acetyliertes Lysin nachweisen (Abb. 5.8 A, a''; C).

Das Methyl-CpG-Bindungsprotein 2 (MeCP2) ist ein transkriptioneller Repressor, der zu einer lokalen Deacetylierung der in den Nukleosomen vorhandenen Histonen und somit zu einer kompakten Chromatinstruktur, die für die Transkriptionsmaschinerie nicht mehr zugänglich ist, führt (Wade et al., 1998). Aus diesem Grund wurde weiterhin die Verteilung von (MeCP2) durch immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung analysiert. Auch hier konnte eine Anreicherung des Proteins an den Zellpolen, bzw. in den Mikrokernen beobachten werden. Auch war ersichtlich, dass in einer Vielzahl von Patientenzellen das Protein nicht detektierbar war (Daten werden nicht gezeigt).

In FACS-Analysen wurde die Expression von weiteren Faktoren der Chromatin-Organisation untersucht. So wurde die Fluoreszenzintensität von Heterochromatinprotein 1 (HP1) und Histon H3, welches an der Stelle Lysin9 acetyliert ist, näher beobachtet. HP1 ist für die Verpackung des Chromatins zu Heterochromatin wichtig (Maison et al., 2004), die Acetylierung des Histons H3 an der Stelle Lysin 9 sorgt für eine gesteigerte Zugänglichkeit des Chromatins für den Transkriptionsapparat (Tse et al., 1998).

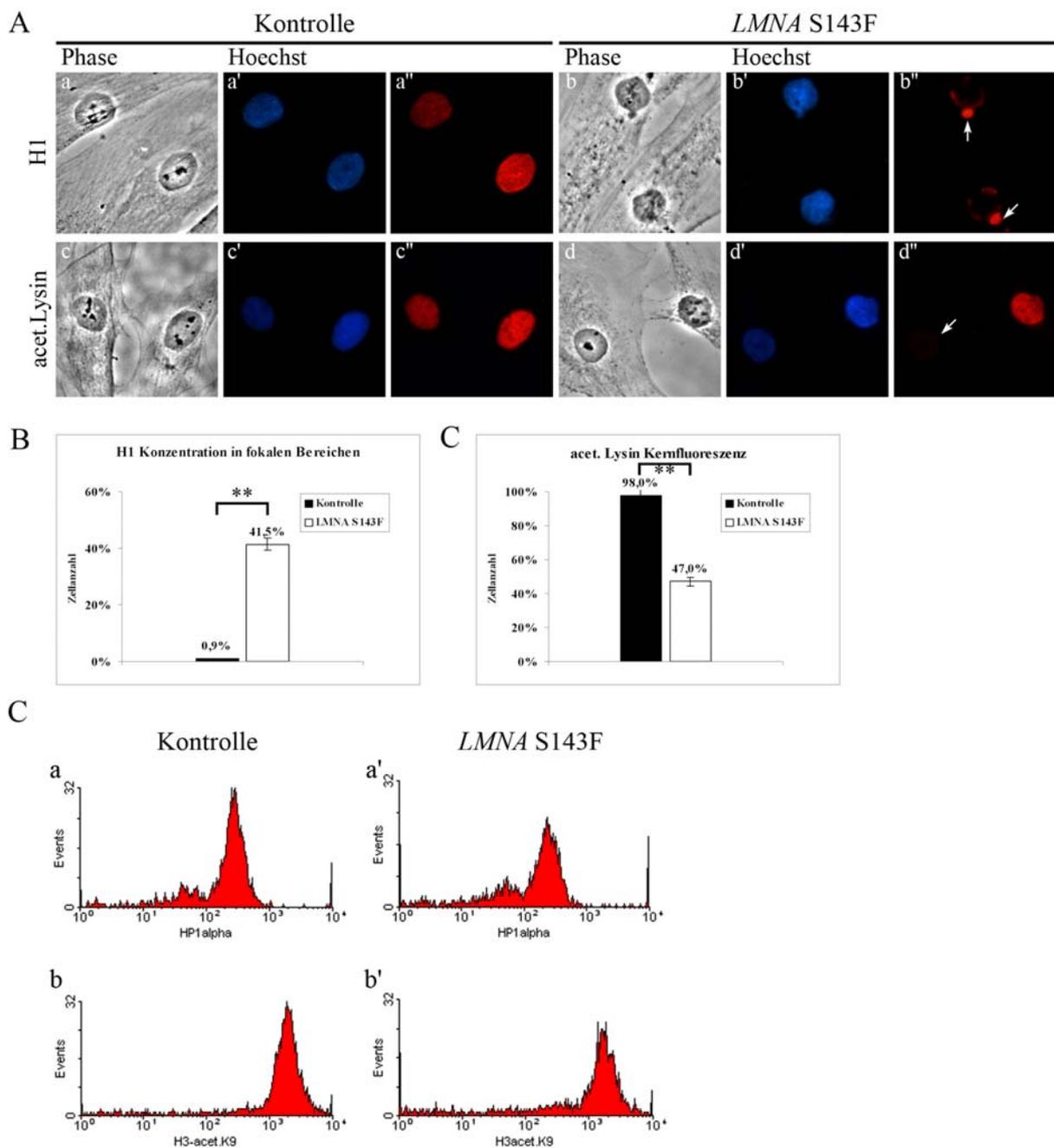


Abb. 5.8: Umverteilung von Chromatin-assoziierten Proteinen in *LMNA* S143F Zellen. (A) Durch indirekte Doppelfluoreszenzaufnahmen ist eine Umverteilung von Histon H1 an die Zellpole, bzw. Mikrokerne der Patientenzellen sichtbar (b'' Pfeile). Acetyliertes Lysin ist in Patientenzellkernen teilweise nicht detektierbar (d'' Pfeil). In Kontrollzellen ist Histon H1, sowie acet. Lysin wildtypisch im Kern verteilt (a'', c''). Verwendet wurden spezifische monoklonale Antikörper gegen Histon H1 und polyklonale Antikörper gegen acet. Lysin. Die korrespondierenden Hoechstfärbungen (a', b', c', d') und der Phasenkontrast (a, b, c, d) sind zusätzlich dargestellt. Eichstrich 20 μ m. (B, C) Statistische Auswertung der H1-Konzentration in fokalen Bereichen, sowie der Kernlokalisierung von acet. Lysin in Kontroll- und Patientenzellen. Es wurden jeweils 200 Zellen ausgewertet (#12 Kontrolle; #14 Patientenzellen; ** $P < 0,05$). (C) FACS-Analysen der Fluoreszenz von HP1alpha und acetyliertes H3K9 in Kontrollzellen und Patientenzellen. Die Fluoreszenzintensität jeder gemessenen Zelle ist logarithmisch entlang der x-Achse dargestellt. Die y-Achse zeigt die Anzahl der gemessenen Zellen. Die Fluoreszenzintensitäten von HP1 (a, a'), bzw. acet. H3K9 (b, b') bezogen auf die gemessenen Zellen, zeigen im Durchschnitt keinen signifikanten Unterschied von Kontroll- zu Patientenzellen. Verwendet wurden spezifische monoklonale Antikörper. Es wurden jeweils 10000 Zellen ausgewertet (#12 Kontrolle; #14 Patientenzellen).

Interessanterweise konnten im Durchschnitt bei 10000 gemessenen Zellen keine Unterschiede der Fluoreszenzintensität von Kontrollfibroblasten (Abb. 5.8 C, a, b) und *LMNA* S143F Fibroblasten (Abb. 5.8 a', b') festgestellt werden. Dies könnte damit zu erklären sein, dass es bei den

Immunfluoreszenzen Zugänglichkeitsprobleme der verwendeten Antikörper zum spezifischen Epitop, aufgrund von Chromatinstruktur-Veränderungen gab.

5.1.5 Fibroblasten mit der *LMNA* S143F Mutation weisen eine erhöhte Anzahl an DNA-Reparatur-Foci auf

In einer früheren Studie wurde bereits gezeigt, dass Zellen von HGPS-Patienten, aufgrund von genomischer Instabilität bzw. gehäuften DNA-Schäden, die sich oftmals in DNA-Doppelstrangbrüche äußern, eine dauerhafte Aktivierung von Kontrollpunkten für DNA-Schäden aufweisen (Liu et al., 2006).

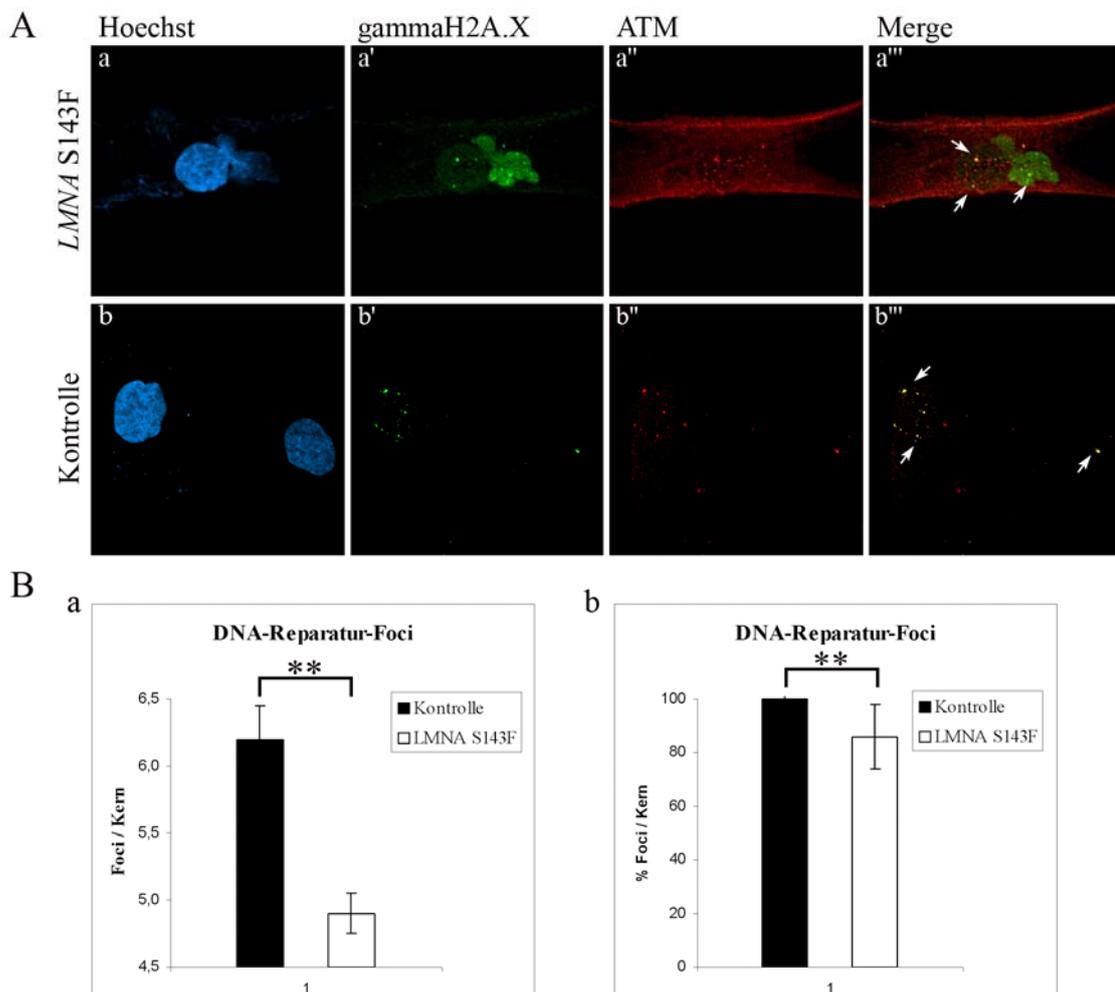


Abb. 5.9: Indirekte Doppelfluoreszenzaufnahmen zeigen eine erhöhte Anzahl von DNA-Reparatur-Foci in *LMNA*-S143F-Fibroblasten. (A) Die grüne Fluoreszenz zeigt die Verteilung von gammaH2A.X in Form von punktförmigen Aggregationen im Kern von Kontroll- (b'') und Patientenzellen (a''), nach Inkubation mit einem spezifischen polyklonalen Antikörper. In Patientenzellen ist eine Anhäufung von gammaH2A.X in den deformierten Bereichen zu erkennen (a', Pfeilspitze). Die rote Fluoreszenz zeigt die Verteilung von ATM in Form von punktförmigen Aggregationen im Kern von Kontroll- (b'') und Patientenzellen (a''), nach Inkubation mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper. Die Abbildungen (c''', d''') sind Überlagerungen von (c'; d') und (c'', d''). Die gelben Punkte stellen die Kolokalisation von gammaH2A.X und ATM dar (a''', b''', Pfeile) und spiegeln somit die DNA-Reparatur-Foci wieder. Die korrespondierenden Hoechstfärbungen (a, b) sind zusätzlich dargestellt. Eichstrich 20 µm. (B, C) Statistische Auswertung der Anzahl der DNA-Reparatur-Foci / Kern (B) und der prozentuale Vergleich der Anzahl der DNA-Reparatur-Foci / Kern (C) in Kontroll- und Patientenfibroblasten (Anzahl in Kontrolle = 100 %). Es wurden jeweils 100 Zellen ausgewertet (#14 Kontrolle; #19 Patientenzellen; ** P<0,05).

Die Phosphorylierung von Histon H2A.X (als gammaH2A.X bezeichnet) und die Mobilisierung von Ataxia-telangiectasia mutated (ATM), spielen zentrale Rollen bei der Aktivierung der Kontrollpunkte (Abraham, 2001; Li und Zou, 2005; siehe auch 4.5.10). Durch die Anfärbung mittels spezifischer Antikörper gegen gammaH2A.X und ATM kann man die DNA-Reparatur-Foci und somit die Doppelstrangbrüche sichtbar machen. Doppelimmunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von *LMNA* S143F-Fibroblasten zeigten eine erhöhte Anzahl von DNA-Reparatur-Foci im Vergleich zu Kontrollzellen. Die gelben punktförmig dargestellten Bereiche sind Kollokationen von gammaH2A.X und ATM und stellen Orte der aktiven DNA-Reparatur an DNA-Doppelstrangbrüchen dar (Abb. 5.9 A a''', b''', Pfeile). Auch war eine Anhäufung von gammaH2A.X in den deformierten Bereichen der Patientenzellen zu erkennen (Abb. 5.9 A, a', Pfeilspitze). Die statistische Auswertung zeigte, dass in Patientenzellen im Durchschnitt 6,2 Foci / Kern und im Gegensatz dazu in Kontrollzellen nur 4,8 Foci / Kern nachgewiesen werden konnten (Abb. 5.9 B, a). Die prozentuale Differenz in der Anzahl der DNA-Reparatur-Foci / Kern in Kontroll- und Patientenfibroblasten beträgt 14 % (Anzahl in Kontrolle = 100 %, Abb. 5.9 B, b). Dies drückt eine signifikant erhöhte Anzahl von Doppelstrangbrüchen bzw. DNA-Schäden in Patientenzellen aus.

5.1.6 Die *LMNA* S143F Mutation beeinflusst die Lokalisation der Nesprin2 Proteine

Wie schon beschrieben wurde, ist die korrekte Lokalisation von Nesprin1 und Nesprin2 an der Kernmembran, von einem intakten Lamin A/C Netzwerk abhängig (Libotte et al., 2005; Zhang et al., 2005). Um zu überprüfen, ob die *LMNA* S143F Mutation einen Einfluss auf Verteilung dieser Proteine hat, wurden Patientenzellen immunfluoreszenzmikroskopisch analysiert (Kooperation mit Y. Lücke, Institut für Biochemie, Universität Köln).

Fluoreszenzmarkierungen mit einem polyklonalen Antikörper gegen Nesprin1 zeigten, dass sowohl in Kontroll- (Abb. 5.10 A; b) als auch in den Patientenzellen (Abb. 5.10 A; e und h) Nesprin1 wildtypisch an der Kernhülle vorlag und dort mit Lamin A/C kollokalisierte (Abb. 5.10 A; c, f, i). Im Gegensatz dazu, wiesen Immunfluoreszenzaufnahmen nach Inkubation mit dem polyklonalen Antikörper gegen alle Isoformen von Nesprin2 deutliche Unterschiede zwischen Kontroll- und Patientenzellen auf. In den Kontrollzellen konnte Nesprin2 durchgehend an der Kernhülle (Abb. 5.10 B; b, Pfeilspitzen), als auch im Zytoplasma lokalisiert werden (Abb. 5.10 B; b, Pfeile), dagegen war die Verteilung in den Patientenzellen verändert. In Patientenfibroblasten, die eine normale Struktur des Kernes aufwiesen, lies sich Nesprin2 wie in Kontrollfibroblasten an der Kernhülle sowie zytoplasmatisch detektieren (Abb. 5.10 B; e). In *LMNA* S143F-Zellen mit deformierten Kernen, war Nesprin2 weder an der Kernhülle nachzuweisen (Abb. 5.10 B; e, Sterne; h), noch lokalisierte es an Lamin A/C (Abb. 5.10 .B; f und i). Zusammengefasst konnte in 51,3 % aller Patientenfibroblasten keine Lokalisation

des Nesprin2 Proteins an der Kernhülle nachgewiesen werden, im Gegensatz zu lediglich 8,4 % der Kontrollfibroblasten.

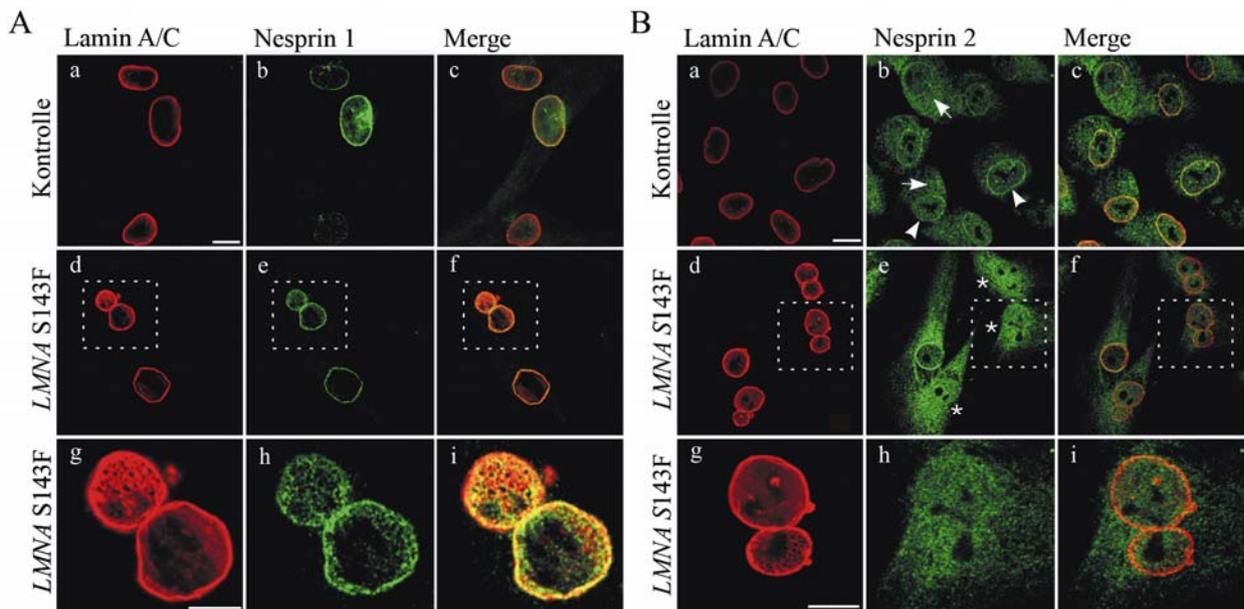


Abb. 5.10: Die *LMNA* S143F Mutation beeinflusst die Nesprin2 Lokalisation an der Kernhülle. (A) Indirekte Doppelfluoreszenzaufnahmen mit dem Nesprin1 spezifischen polyklonalen Antikörper (b, e, h) und dem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen Lamin A/C (a, d, g) detektieren in Kontroll- (b) und Patientenzellen (e, h) eine Nesprin1-Kolokalisation mit Lamin A/C (c, f, i) entlang der Kernhülle. Die markierten Bereiche sind vergrößert dargestellt (g, h, i). Die Abbildungen (c, f, i) sind Überlagerungen von (a, b), (d, e) und (g, h) Eichstrich: 10 μ m. (B) Indirekte Doppelfluoreszenzaufnahmen mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen Lamin A/C (a, d, g) und dem Nesprin2 spezifischen polyklonalen Antikörper pAb K1 (b, e, h), zeigen in Kontrollfibroblasten (b) eine zytoplasmatische Lokalisation (b, Pfeile) und eine Lokalisation von Nesprin2 an der Kernhülle (b, Pfeilspitzen). In Patientenzellen mit Deformationen in der Kernmorphologie (e; Sterne) ist Nesprin2 nicht entlang der Kernhülle lokalisiert und lokalisiert auch nicht an Lamin A/C (f, i). Die markierten Bereiche sind vergrößert dargestellt (g, h, i). Die Abbildungen (f, i) sind Überlagerungen von (d, e) und (g, h) Eichstrich: 10 μ m.

Im Vergleich zu Nesprin2, konnte man dagegen bei Nesprin1 nur eine geringfügig verstärkte zytoplasmatische Lokalisation des Proteins in Patientenzellen, im Vergleich zu Kontrollzellen feststellen. Die Resultate bestätigten deutlich den Einfluss der S143F Mutation auf die Nesprin2 Lokalisation an der Kernhülle.

5.1.7 Nesprin2 Giant exprimierende *LMNA* S143F Fibroblasten zeigen eine normale Zellkernmorphologie

Um die Rolle von Nesprin2 in der Pathogenese der *LMNA* S143F Mutation näher zu erörtern, wurde die Lokalisation verschiedener Nesprin2 Isoformen analysiert. Für diese Untersuchungen wurden Doppelimmunlokalisationsanalysen mit zwei Nesprin2 Antikörpern durchgeführt. Der monoklonale Antikörper K20-478 war spezifisch gegen die Aktin-bindende Domäne der großen Isoform (Nesprin2 Giant) gerichtet, wogegen der polyklonale Antikörper K1 spezifisch den C-Terminus des Nesprin2 und somit auch die kürzeren Isoformen erkannte (Kooperation mit Y. Lücke, Institut für Biochemie, Universität Köln).

Nur eine Subpopulation von Kontroll- als auch Patientenzellen wiesen eine Nesprin2 Giant-Markierung auf (Abb. 5.11 A a', Pfeile). Interessanterweise zeigten die Nesprin2 Giant-positiven *LMNA* S143F Zellen keine morphologischen Kerndeformationen (Abb. 5.11 A a', Pfeile), sowie

eine wildtypische Lokalisation der Nesprin2-Isoformen an der Kernhülle nach Inkubation mit dem polyklonalen K1-Antikörper (Abb. 5.11 A; a). Auch erschienen die Kerne dieser Zellen kleiner und kompakter. Im Vergleich dazu besitzen die deformierten Zellkerne der Nesprin2 Giant negativen Zellen (Abb. 5.11 A; a', Sterne) eine abgeschwächte diffuse K1-Fluoreszenzmarkierung entlang der Kernmembran (Abb. 5.11 A; a, Pfeilspitzen).

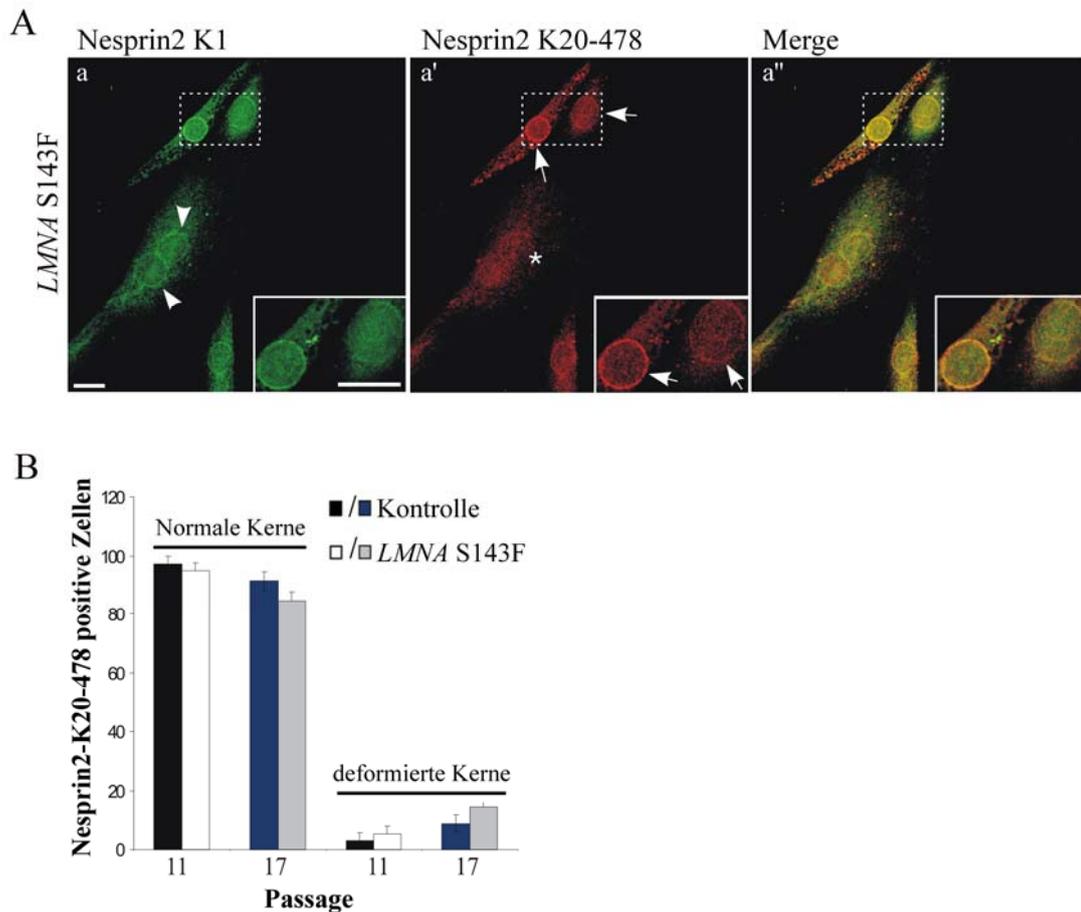


Abb. 5.11 Indirekte Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen eine normale Zellkernmorphologie von Nesprin2 Giant exprimierenden *LMNA* S143F Fibroblasten. (A) Patientenzellen, deren Kernhülle mit dem monoklonalen Antikörper K20-478 gegen Nesprin2 Giant markiert sind, zeigen eine normale wildtypische Morphologie des Kerns (a', Pfeile). *LMNA* S143F-Fibroblasten, die keine Nesprin2 Giant Kernhüll-Färbung aufweisen, besitzen Deformationen des Kerns (a', Stern) und die Fluoreszenz erscheint nach Inkubation mit dem polyklonalen Antikörper K1 diffus (a, Pfeilspitzen). Die Abbildung (a'') ist eine Überlagerung von (a) und (a'). Eichstriche: 10 µm. (B) Statistische Auswertung der K20-478 positiven Zellen. Die Expression von Nesprin2 Giant ist notwendig für den Erhalt einer normalen Kernmorphologie. Es wurden 300 K20-478 positive Kontroll- und Patientenzellen ausgewertet.

Diese Beobachtungen beschränkten sich nicht auf niedrige Passagen, auch höhere Passagen zeigten dasselbe Phänomen. Eine statistische Analyse (Abb. 5.11 B) lässt erkennen, dass Kontrollzellen, wie auch Patientenzellen die Nesprin2 Giant positiv waren, in 97,1 % bzw. 94,9 % in Passage 11 über eine normale Kernmorphologie aufwiesen. Auch in der späteren Passage 17 konnten diese Resultate, die zeigen, dass die Expression von Nesprin2 Giant mit einer normalen Zellkernmorphologie zusammenhängt, bestätigt werden.

Darüber hinaus konnte mittels einer Immunblotanalyse festgestellt werden, dass die Nesprin2 Giant Expression in *LMNA*-S143F-Fibroblasten im Vergleich zu Kontrollfibroblasten reduziert war (Kooperation mit Y. Lücke, Institut für Biochemie, Universität Köln).

5.1.8 Eine Reduktion von Nesprin2 Giant ist an Kerndeformationen von *LMNA* S143F Fibroblasten nicht nachweisbar

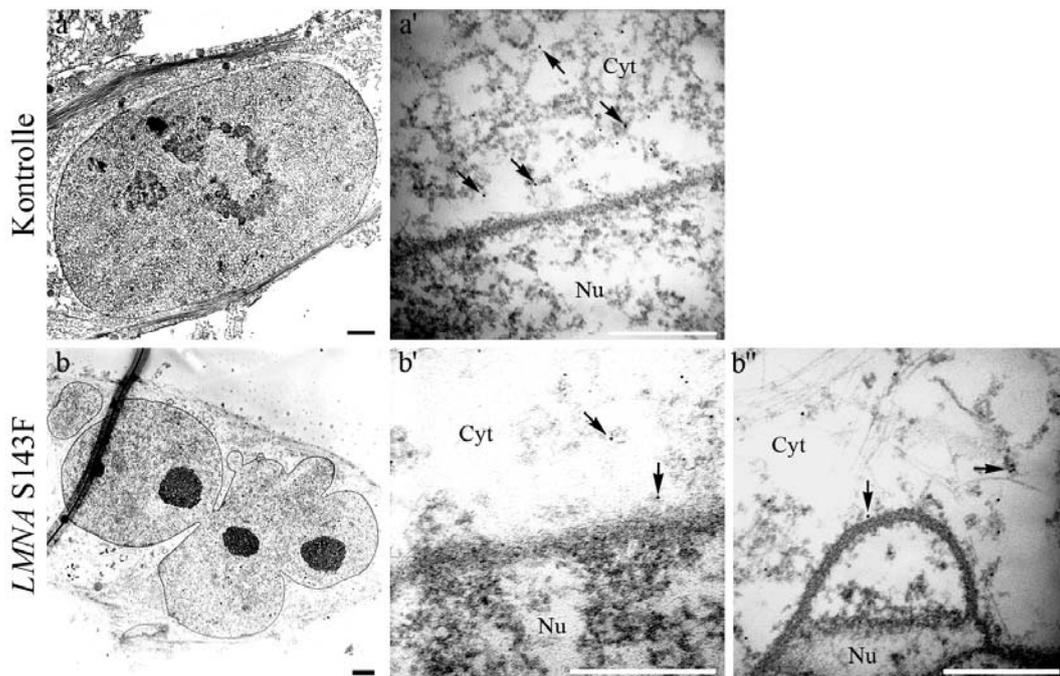


Abb. 5.12: Die Nesprin2 Giant Lokalisation ist in Kerndeformationen von *LMNA* S143F Fibroblasten nicht verändert. Kontrollfibroblasten und Patientenzellen wurden mit dem monoklonalen K20 Antikörper und anschließend mit einem kolloidal an 12 nm Gold gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert und elektronenmikroskopisch ausgewertet. In beiden Zelllinien ist Nesprin2 Giant an der Kernhülle sowie im Zytoplasma unmittelbar an der Kernhülle verteilt, jedoch ist die Menge an Nesprin2 Giant in *LMNA* S143F Zellen (*b'*, *b''*, Pfeile) gegenüber den wildtypischen Zellen verringert (*a'*, Pfeile). Es ist kein Unterschied in der Verteilung von Nesprin2 Giant zwischen deformierten Kernbereichen (*b''*, Pfeile) und nicht deformierten Kernbereichen der Patientenzellen (*b'*, Pfeile) zu erkennen. Eichstriche: (*a*, *b*): 1 μm ; (*a'*, *b'*, *b''*): 0,5 μm . Nu: Nukleus, Cyt: Zytoplasma.

Um einen genaueren Einblick in die Nesprin2 Giant Lokalisation in *LMNA* S143F Fibroblasten zu erhalten, wurden transmissionselektronenmikroskopische Analysen durchgeführt. Kontroll- sowie Patientenzellen wurden zuerst mit dem monoklonalen K20 Antikörper und anschließend mit einem an 12 nm kolloidalem Gold gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert und in Epon eingebettet. Die Goldpartikel sind auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen als schwarze runde Färbungen sichtbar. Zunächst konnte beobachtet werden, dass in beiden Zelllinien Nesprin2 Giant an der Kernhülle, sowie im Zytoplasma unmittelbar an der Kernhülle lokalisiert. Wie zu erwarten, war die Menge an Nesprin2 Giant in *LMNA* S143F Zellen (Abb. 5.12 *b'*, *b''*, Pfeile) gegenüber den wildtypischen Zellen reduziert (Abb. 5.12 *a'*, Pfeile). Darüber hinaus stellte sich die Frage, inwieweit Nesprin2 Giant in Nähe der Deformationen gegenüber den nicht deformierten Bereichen in den Patientenzellen verringert war, da eine Abnahme des Nesprin2 Giant in diesen Arealen die morphologischen Anomalitäten erklären könnte. Es konnte aber kein Unterschied in der Verteilung von Nesprin2 Giant zwischen deformierten Kernbereichen (Abb. 5.12 *b''*, Pfeile) und nicht deformierten Kernbereichen (Abb. 5.12 *b'*, Pfeile) der Patientenzellen erkannt werden.

5.1.9 Die Lokalisation von Kernproteinen in Nesprin2 Giant reduzierten *LMNA* S143F Fibroblasten ist verändert

Aufgrund der veränderten Verteilung von der transkriptionell aktiven Form der RNA-Polymerase II, LAP2 α (siehe 5.1.3) und Nesprin2-Proteinen (siehe 5.1.6) in den Patientenzellen, stellte sich die Frage, ob diese abnormale Lokalisation dieser Proteine dieselben *LMNA* S143F-Zellen betraf. Durch Doppelfluoreszenzanalysen konnte gezeigt werden, dass die veränderten Verteilungsmuster von Nesprin2 und LAP α , mit der fehlerhaften Lokalisation der transkriptionell aktiven Form der RNA-Polymerase II in Patientenzellen korrelierte. Die fehlerhafte Lokalisation der transkriptionell aktiven Form der RNA-Polymerase II und Nesprin2 (Abb. 5.13 a'-a''', Pfeile; b'-b'''), wie auch der transkriptionell aktiven Form der RNA-Polymerase II und LAP2 α (Abb. 5.13 c'-c''', Pfeile), betraf dieselben Patientenfibroblastenzellen. Nur in wenigen mutierten Fibroblasten mit morphologischen Kerndefekten stimmte die veränderte Verteilung der transkriptionell aktiven Form der RNA-Polymerase II nicht mit der anormalen Lokalisation von Nesprin2 überein (Abb. 5.13 a'-a''', Pfeilspitzen).

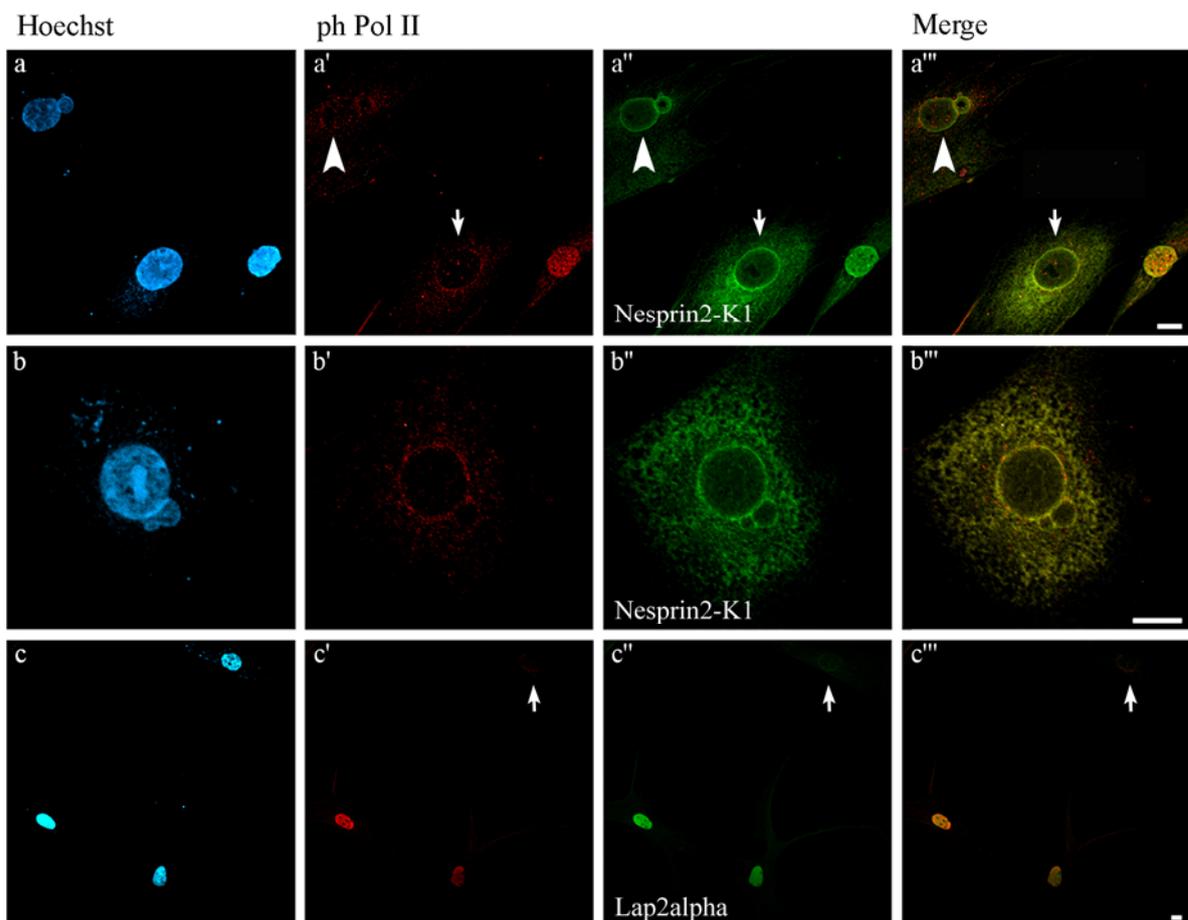


Abb. 5.13: Indirekte Doppelfluoreszenzaufnahmen zeigen eine Umlokalisation von LAP2 α , transkriptionell aktiver Form der RNA-Polymerase II und Nesprin2 in *LMNA* S143F Zellen nach Inkubation mit spezifischen monoklonalen trans. akt. Pol II und polyklonalen LAP2 α und K1 Antikörpern. Die fehlerhafte Lokalisation der transkriptionell aktiven RNA-Polymerase II und Nesprin2 (a'-a''', Pfeile; b'-b'''), wie auch der transkriptionell aktiven RNA-Polymerase II und LAP2 α (c'-c''', Pfeile), ist in denselben Zellen zu beobachten. Nur wenige Zellen zeigen eine abnormale Verteilung von trans. akt. Pol II und eine normale Lokalisation von Nesprin2 an der Kernhülle (a'-a''', Pfeilspitzen). Die Abbildungen (a''', b'''; c''') sind Überlagerungen von (a', b', c') und (a'', b'', c''). Die korrespondierenden Hoechstfärbungen sind zusätzlich dargestellt (a, b, c). Eichstriche 20 μ m.

Auch ergaben andere Fluoreszenzuntersuchungen, dass Nesprin2 Giant positive Patientenzellen nicht nur eine normale Kernmorphologie, sondern auch eine wildtypische Verteilung verschiedener anderer Kernproteine aufwiesen (Daten werden nicht gezeigt).

5.1.10 Ektopische Expression von *LMNA* S143F-GFP

5.1.10.1 Die Expression von *LMNA* S143F-GFP induziert den für Patientenfibroblasten charakteristischen Phänotyp

Um näher zu erörtern, ob die Mutation S143F im Lamin A die beschriebenen morphologischen Kerndeformationen induzierte, wurde ein *LMNA* S143F-GFP Fusionsprotein hergestellt, humane wildtypische Fibroblasten mit diesem Konstrukt transient transfiziert und dieses überexprimiert. Die Überexpression von *LMNA* S143F-GFP in Fibroblasten zeigte nach 48 Stunden bei 37°C und 5 % die besten Resultate. Im Gegensatz zu *LMNA* wt-GFP exprimierenden Zellen, die eine wildtypische Morphologie des Kernes aufwiesen (Daten werden nicht gezeigt), waren in 42 % der Fibroblasten, die das mutierte Lamin A exprimierten, Kerndeformationen, vergleichbar mit denen in Patientenzellen, zu beobachten (Abb. 5.14 a, b, Diplomarbeit S. Kandert, 2005).

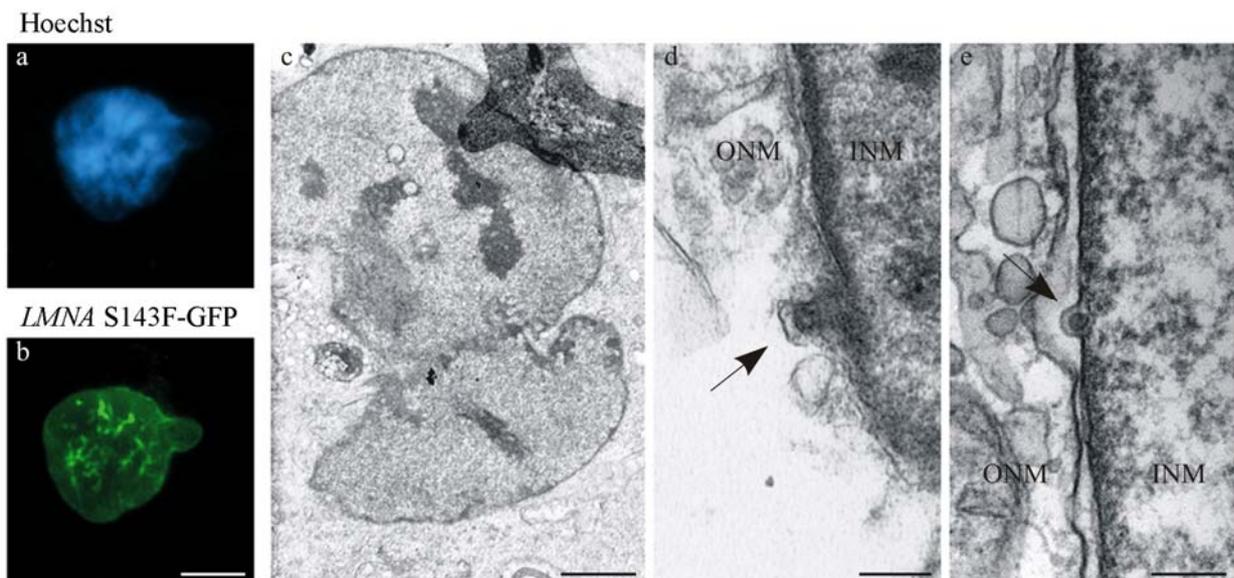


Abb. 5.14: Die Expression von *LMNA* S143F-GFP ruft den für Patientenfibroblasten charakteristischen Phänotyp hervor. Humane dermale Fibroblasten wurden mit *LMNA* S143F-GFP transfiziert (b) und ihre Kernmorphologie immunfluoreszenz- (a, b) und elektronenmikroskopisch (c, d, e) untersucht. Die Expression des mutierten Lamins induziert in wildtypischen Fibroblasten morphologische Kerndeformationen (a, b) von der Bildung kleiner Bläschen an der Kernmembran (d, e, Pfeile), bis hin zur Bildung von Mikrokernen (c). Die korrespondierende Hoechstfärbung ist zusätzlich dargestellt (a). Eichstriche: b: 20 µm; c: 2µm; d, e: 0,2 µm.

Um eine genauere Analyse von morphologischen Veränderungen der transfizierten Fibroblasten erstellen zu können, wurden die Zellen für transmissionselektronenmikroskopische Analysen vorbereitet. Am Fluoreszenzmikroskop wurden Zellen zuerst auf eine *LMNA* S143F-GFP-Expression hin überprüft, transfizierte Zellen durch das Gittermuster der CELLocates™ lokalisiert und anschließend für die Beobachtung unter dem Elektronenmikroskop präpariert (siehe 4.5.12.1). Auch anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnte der morphologische

Phänotyp der Patientenzellen nach Überexpression von *LMNA* S143F-GFP beobachtet werden. Die Veränderungen des Zellkerns reichten von Bläschenbildungen der Kernhülle (Abb. 5.14 d, e, Pfeile) bis hin zur Bildung von Mikrokernen (Abb. 5.14 c; Diplomarbeit T. Kleinhenz, 2007).

Analysen von Überexpressionen von *LMNA* S143F-GFP in Zelllinien, die entweder große Mengen von Nesprin2 Giant (HaCaT-Zellen) oder geringe Mengen von Nesprin2 Giant exprimieren, zeigten eine deutliche Abhängigkeit des Grades der nukleären Deformationen von der Nesprin2 Giant Expression. HaCat-Zellen, die eine große Menge an Nesprin2 Giant exprimieren, zeigten kaum Veränderungen der Kernmorphologie (Kooperation mit Y. Lücke, Institut für Biochemie, Universität Köln).

5.1.10.2 Die Expression von *LMNA* S143F-GFP induziert eine abnormale Lokalisation von LAP2α und der transkriptionell aktiven Form der RNA-Polymerase II

Wie zuvor schon beschrieben wurde, ist die Lokalisation von Kernproteinen in Patientenzellen verändert. Um zu evaluieren, ob in die ektopische Expression von *LMNA* S143F-GFP in wildtypischen Fibroblasten ebenso die Lokalisation von Kernproteinen beeinflusste, wurden weitere Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt.

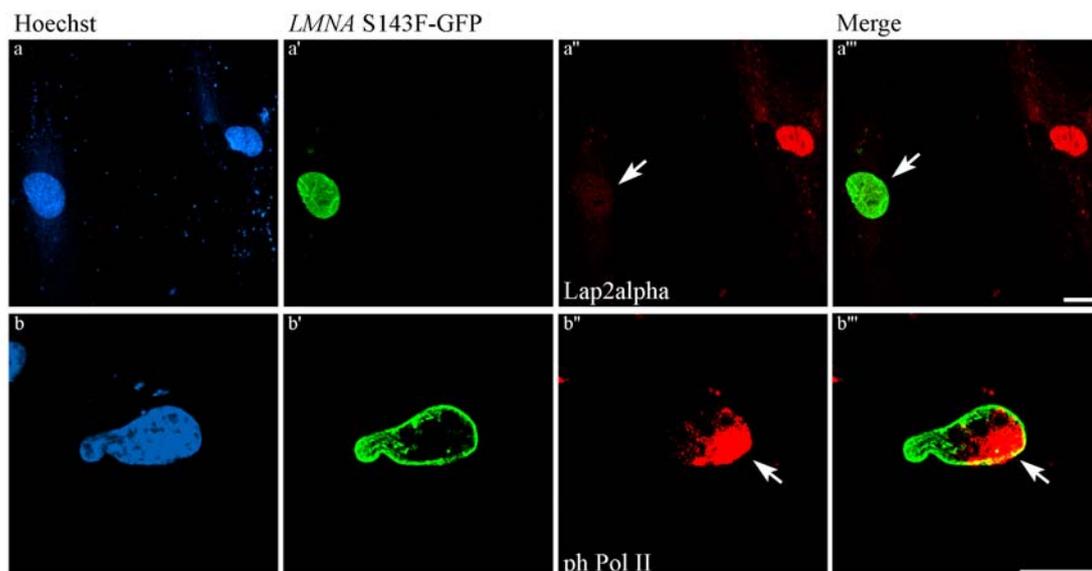


Abb. 5.15: Die Expression von *LMNA* S143F-GFP ruft eine abnormale Lokalisation von LAP2α und der trans. akt. RNA-Polymerase II hervor. Humane dermale Fibroblasten wurden mit *LMNA* S143F-GFP transfiziert (a' b') und die Verteilung von LAP2α und der transkriptionell aktiven Form der RNA-Polymerase II unter Verwendung von spezifischen monoklonalen trans. akt. Pol II und polyklonalen LAP2α Antikörpern immunfluoreszenzmikroskopisch analysiert. In transfizierten Fibroblasten war die LAP2α Fluoreszenzmarkierung reduziert, bzw. nicht nachweisbar (a'', a''', Pfeile); die transkriptionell aktive Form der RNA-Polymerase II war wie in Patientenzellen an fokalen Bereichen der Zelle angereichert (b'', b''', Pfeile). Die Abbildungen (a''', b''') sind Überlagerungen von (a', b') und (a'', b''). Die korrespondierenden Hoechstfärbungen sind zusätzlich dargestellt (a, b). Eichstriche 20 µm.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *LMNA* S143F-GFP eine veränderte Lokalisation von LAP2α und transkriptionell aktiver Form der RNA-Polymerase II hervorruft. In transfizierten Fibroblasten war die LAP2α Fluoreszenzmarkierung reduziert, bzw. nicht detektierbar (Abb. 5.15 a'', a''', Pfeile); die transkriptionell aktive Form der RNA-Polymerase II war wie in Patientenzellen an den Kernpolen der Zelle akkumuliert (Abb. 5.15 b'', b''', Pfeile).

Auch konnte eine Aggregation von Emerin an der inneren Kernhülle beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war in Fibroblasten, die wildtypisches *LMNA*-GFP überexprimierten, keine Misslokalisierung nukleärer Proteine festzustellen (Daten werden nicht gezeigt).

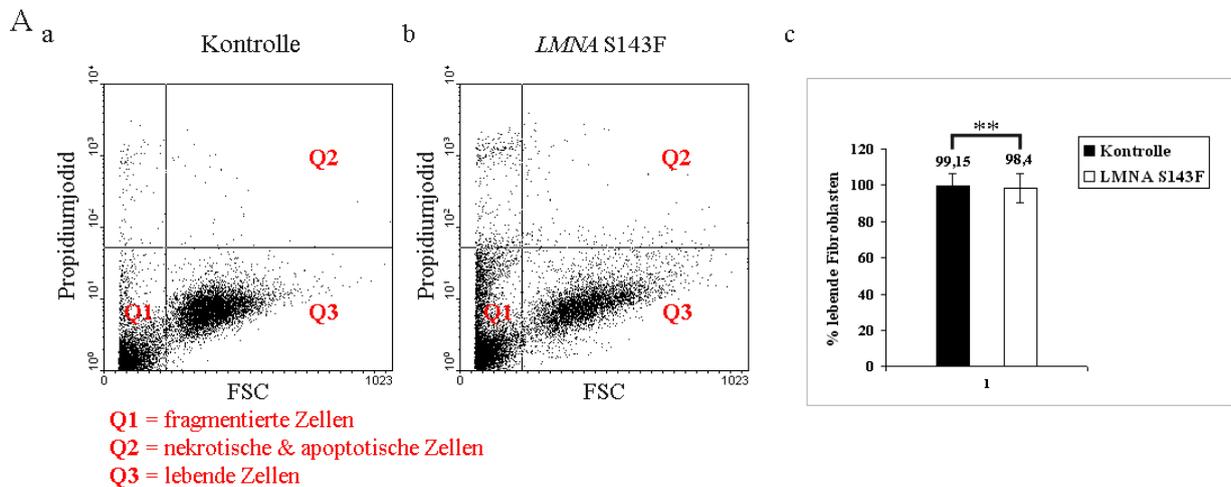
Diese Resultate, des durch Überexpression von *LMNA* S143F-GFP induzierten charakteristischen Phänotyps der Patientenzellen, bestätigen die Annahme, dass die Lamin A Mutation die primäre Ursache der gefundenen nukleären Abnormitäten ist.

5.1.11 Fibroblasten mit der *LMNA* S143F-Mutation zeigen keine erhöhte Apoptoserate

Durch die Mutation *LMNA* S143F könnten in den Patientenzellen z.B. durch eine instabile Kernhülle vorzeitig apoptische Vorgänge induziert werden. Um auszuschließen, dass der beobachtete zelluläre Phänotyp in *LMNA* S143F Fibroblasten durch apoptotische Vorgänge begründet war, wurden Analysen zur Bestimmung der Apoptoserate durchgeführt. Eine Möglichkeit zum Nachweis der Apoptoserate sind FACS (fluorescence-activated cell sorter) - Analysen. Hierbei wird der zelluläre DNA-Gehalt nach Permeabilisierung der Zellmembran und Anfärbung mit Propidiumjodid (PI) durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 4.5.7). Apoptotische Zellen sind permeabler für Propidiumjodid und zeigen somit eine stärkere PI-Fluoreszenz. Außerdem erscheinen apoptotische Zellen breiter, kleiner, und hypodiploider. Durch die Detektion des Vorwärtsstreulichts (FSC) kann die relative Größe der Zellen bestimmt werden. Die Resultate dieser FACS-Analysen sind in Abb. 5.16 dargestellt. Im Quadranten Q1 ist die Anzahl der fragmentierten, in Q2 die Anzahl der nekrotischen und apoptotischen und in Q3 die Anzahl der lebenden Zellen dargestellt (Abb. 5.16 A, a, b). Die statistische Auswertung der Apoptosebestimmung mittels FACS-Analyse zeigte keine signifikanten prozentualen Unterschiede in der Anzahl der apoptotischen bzw. lebenden Zellen zwischen Kontrollfibroblasten (99,15 %) und Patientenfibroblasten (98,4 %) (Abb. 5.16 A, c).

Ein anderes typisches Apoptosemerkmal ist die Spaltung der DNA durch Endonukleasen in charakteristische, ca. 180 bp-große DNA-Fragmente (Wyllie, 1980). Eine Möglichkeit die DNA-Fragmente nachzuweisen ist der TUNEL-Assay (Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling). Bei dieser Methode werden die Einzelstrangbrüche in der genomischen DNA markiert. Man macht sich dabei der Eigenschaften der Terminalen Desoxyribosyl-Transferase (TdT) zunutze, welche an freie DNA-Enden dNTP-Nukleotide anhängt. Die Nukleotide sind mit Digoxigenin markiert, welche durch Zugabe eines anti-Digoxigenin-Antikörpers und indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen werden können. Die Behandlung mit DNase I bewirkt in Zellen eine DNA-Fragmentierung und dient der Positivkontrolle (siehe 4.5.9). Eine statistische Auswertung eines TUNEL-Assays von 200 analysierten Zellen zeigte keinen signifikanten Unterschied im Grad der DNA-Fragmentierung und damit der Apoptose zwischen Kontroll- (3,8 %) und Patientenfibroblasten (5,6 %). Im

Gegensatz dazu war nach der DNase I Behandlung in nahezu allen Zellen der beiden Fibroblastenlinien DNA-Fragmentierung zu beobachten (Abb. 5.16 B).



B

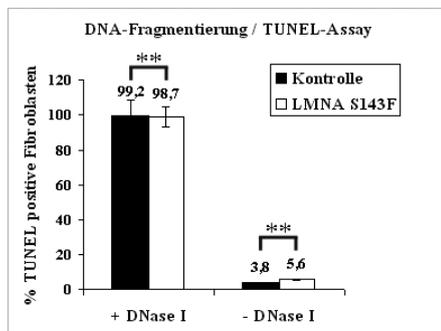


Abb. 5.16: Die Apoptoserate in *LMNA* S143F Fibroblasten ist nicht erhöht. (A) Nachweis der Apoptoserate durch FACS-Analysen. Die y-Achse zeigt die Stärke der Propidiumjodidmarkierung, die x-Achse die relative Größe der Zellen (Vorwärtsstreulicht - *FSC*). Die Werte sind logarithmisch aufgetragen. Apoptotische Zellen sind permeabler für Propidiumjodid, welches niedermolekulare DNA markiert. Apoptotische Zellkerne erscheinen breiter, kleiner, hypodiploider und die Propidiumjodidfluoreszenz ist erhöht. Im Quadranten Q1 ist die Anzahl der fragmentierten, in Q2 die Anzahl der nekrotischen und apoptotischen und in Q3 die Anzahl der lebenden Zellen dargestellt (a, b). In (c) ist die statistische Auswertung der FACS-Analyse dargestellt. Es ist kein signifikanter prozentualer Unterschied in der Anzahl der lebenden Zellen zwischen Kontrollfibroblasten und Patientenfibroblasten festzustellen. Es wurden 10000 Zellen gemessen (#14 Kontrolle; #16 Patientenzellen; ** $P > 0,05$). (B) Statistische Auswertung eines TUNEL-Assays zu Apoptosebestimmung. Die DNA-Fragmentierung zeigt den Grad der Apoptose an. Zellen, die mit DNase I zur DNA-Fragmentierung behandelt wurden, dienen als Positivkontrolle. Es ist kein signifikanter Unterschied im Grad der DNA-Fragmentierung zwischen Kontroll- und Patientenfibroblasten zu erkennen. Es wurden 200 Zellen ausgezählt (#9 Kontrolle; #12 Patientenzellen; ** $P > 0,05$).

Zusammengenommen kann durch diese Resultate ausgeschlossen werden, dass der beobachtete zelluläre Phänotyp der Patientenzellen eine Folge apoptotischer Vorgänge ist.

Weiterhin wurde festgestellt, dass es auch keine Unterschiede in der Proliferation zwischen Kontroll- und Patientenfibroblasten gibt, die ebenso als Ursache für die beobachteten subzellulären Veränderungen sein könnten (Daten werden nicht gezeigt).

5.1.12 FRAP-Analysen zeigen Veränderungen der Mobilität von Lamin S143F

Es ist bekannt, dass die Lamine als Hauptstrukturelement der Kernhülle dienen, der sie als filamentöses Netzwerk von innen her anliegen und als mechanische Stütze fungieren (Gruenbaum et al., 2003). Typ A-Lamine, die in dieses Protein-Netzwerk integriert sind, weisen

innerhalb der Lamina eine sehr niedrige Mobilität auf (Gilchrist et al. 2004; Broers et al. 1999). Da die Aminosäure S143 nicht innerhalb der coiled-coil-Struktur, sondern in einem Bereich auf der Außenseite der coiled-coil-Struktur liegt, ist anzunehmen, dass die Mutation *LMNA* S143F nicht die Dimerbildung beeinträchtigt, sondern die Zusammenlagerung der Homodimere zu Protofilamenten bzw. höher geordneten Strukturen (siehe 5.1.1). Diese Veränderung der Bindungsverhältnisse innerhalb dieser Filamente könnte Einfluss auf die Mobilität der Lamin A-Protofilamente innerhalb der Lamina haben und auch die Bindungsaffinitäten zu anderen Kernproteinen beeinflussen. In Fibroblasten von HGPS-Patienten konnte durch FRAP-Analysen schon eine gegenüber wildtypischen dermalen Fibroblasten verringerte Mobilität bis hin zu einer Immobilisierung von Lamin A gezeigt werden (Dahl et al., 2006).

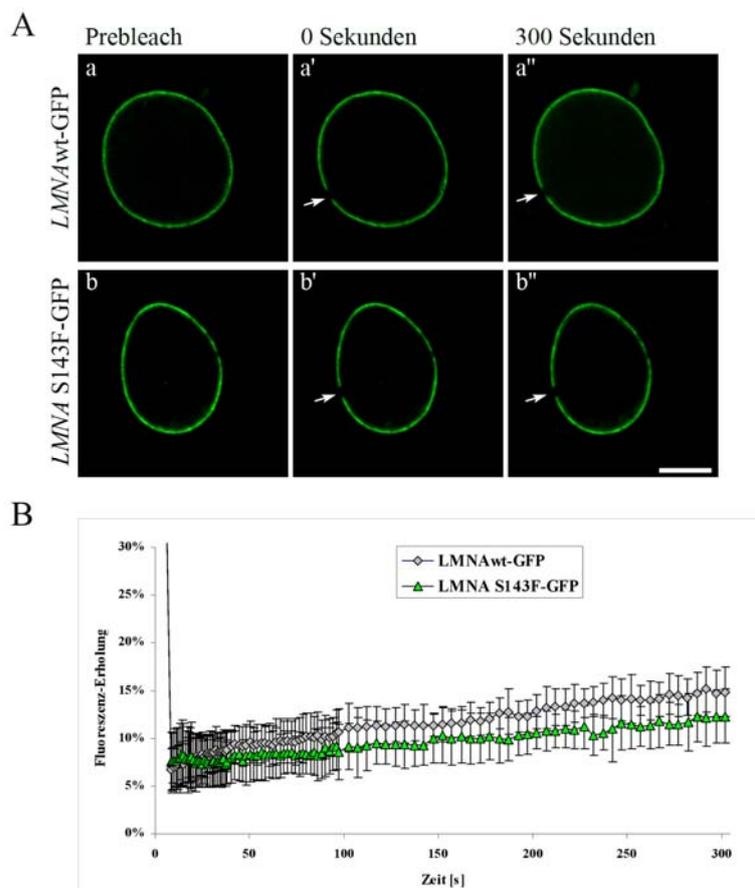


Abb. 5.17: „Fluorescence recovery after photobleaching“ (FRAP) - Analysen zeigen Veränderungen der Mobilität von Lamin S143F. (A) FRAP-Analyse von den Fusionsproteinen *LMNA* wt-GFP (a-a'') und *LMNA* S143F-GFP (b-b''), exprimiert in wildtypischen Fibroblasten-Zellen. Ein kleiner Bereich innerhalb der Kernhülle wurde gebleicht (a', a'', b', b'', Pfeile) und die Erholung der Fluoreszenzintensität innerhalb dieses Bereiches über die Zeit gemessen. Eichstrich: 10 μ m. (B) Quantitative Auswertung der FRAP-Experimente. Die Erholungskinetiken von *LMNA* wt-GFP verglichen mit denen von *LMNA* S143F-GFP. Die Erholung der Fluoreszenz verlief signifikant langsamer bei dem Fusionsprotein *LMNA* S143F-GFP bei einer Messdauer von 300 Sekunden. Es wurden jeweils 15 Zellen gemessen. Die Standardabweichung ist jeweils angegeben. $P < 0,006$.

Ob die Mutation *LMNA* S143F auch Einfluss auf die Mobilität von Lamin A hat, wurde mit Hilfe von „fluorescence recovery after photobleaching“ (FRAP) näher untersucht. Dazu wurden wildtypische Fibroblasten mit dem EGFP-*LMNA*-S143F bzw. EGFP-*LMNA* wt-Konstrukt transient transfiziert und nach Überexpression von etwa 18-24h bei 37°C und 5 % CO₂ unter dem

konfokalen Laser-scanning Mikroskop in Lebendbeobachtungskammern untersucht. Dazu wurde ein kleines Feld im Bereich der Kernhülle gebleicht und anschließend die Erholung der Fluoreszenzintensität innerhalb dieses Feldes analysiert (Abb. 5.17 A, a', a'', b', b'', Pfeile).

Die *LMNA* wt-GFP Fluoreszenz erreichte nach 300 sek etwa 15,2 % der Ausgangsintensität. *LMNA* S143F-GFP zeigte dagegen eine signifikant niedrigere Erholung der Fluoreszenz auf etwa 12,1 % der Ausgangsintensität nach 300 sek (Abb. 5.17 B). Die Mutation S143F im Lamin A schien somit die Mobilität des wildtypischen Lamin A Proteins deutlich zu verringern.

5.1.13 Lamin A/C zeigt eine reduzierte Löslichkeit in Fibroblasten mit der *LMNA* S143F-Mutation

Neue Studien beschreiben, dass eine reduzierte Dynamik der Lamina in Fibroblasten von HGPS-Patienten, infolge einer Anreicherung des mutierten Lamin A (Progerin, Lamin A Δ 50), zu einer verringerten Löslichkeit von Lamin A führt (Dahl et al., 2006). Um den negativen Einfluss der Mutation *LMNA* S143F auf die Löslichkeit und damit Stabilität der Lamina zu prüfen, wurden Proteinextraktionsversuche mit ansteigenden Salzkonzentrationen durchgeführt.

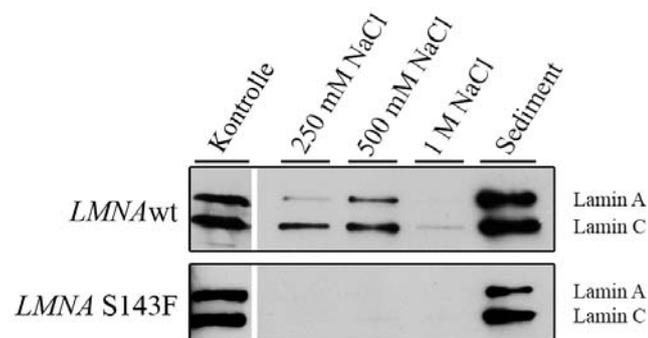


Abb. 5.18: Lamin A zeigt eine reduzierte Löslichkeit in Fibroblasten mit der *LMNA* S143F-Mutation. Immunblot-Analyse einer Extraktion von Lamin A/C mit ansteigenden Salzkonzentrationen aus Kontroll- und Patientenfibroblasten mittels monoklonalem Lamin A/C Antikörper. Es wurde jeweils die Hälfte der Zellen ($0,5 \times 10^6$) als unbehandelte Kontrolle eingesetzt, die andere Hälfte wurde in ansteigenden Salzkonzentrationen von 250 mM bis 1 M Salzpuffern extrahiert. Das Sediment enthält die unlöslichen Proteine. Lamin A/C S143F zeigt eine stark reduzierte Löslichkeit in den verschiedenen Extraktionsfraktionen und ist nur im Sediment nachweisbar.

Dazu wurden durch Homogenisationen von Kontroll- und Patientenzellen Suspensionen hergestellt, die gleichmäßig auf zwei Hälften verteilt wurden (jeweils ca. 2×10^6 Zellen). Die eine diente als unbehandelte Kontrolle, damit die Gesamtmenge des analysierten Proteins abgeschätzt werden konnte. Die andere Hälfte wurde abzentrifugiert und die Überstände in Puffern mit aufsteigenden Salzkonzentrationen von 250 mM bis 1 M aufgenommen. Die unlöslichen Anteile der Proteine (Sediment) wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und Lamin A/C unter Verwendung eines spezifischen monoklonalen Antikörpers in den einzelnen Fraktionen durch einen Immunblot nachgewiesen.

Das mutierte Lamin A/C konnte unter diesen Bedingungen in den einzelnen Extraktionsschritten nicht nachgewiesen und somit nicht gelöst werden. Im Vergleich dazu konnte das wildtypische

Lamin A/C in den einzelnen Salzpufferfraktionen nachgewiesen werden (Abb. 5.18). Dieses Resultat der reduzierten Löslichkeit von *LMNA* S143F bestätigt die Ergebnisse der verringerten Mobilität dieses Proteins.

5.1.14 Verändertes Bänderungsmuster in Laminfilamenten bei der Formation von Lamin S143F-Parakristallen *in vitro*

Um zu prüfen, ob die verringerte Mobilität sowie die reduzierte Löslichkeit von Lamin A S143F auf molekulare Veränderungen in der Zusammenlagerung zu Protofilamenten oder höher geordneten Strukturen durch die Lamin-Mutation S143F begründet sind, wurde die Laminfilamentbildung *in vitro* untersucht. Es ist schon seit längerem bekannt, dass Lamin A *in vitro* Parakristalle bildet (Gieffers und Krohne, 1991). Somit ist eine Möglichkeit solche molekularen, strukturellen Veränderungen zu untersuchen, der Vergleich von *in vitro*-Parakristallen, gebildet aus wildtypischem bzw. mutiertem Lamin A.

Die Mutation R545C im Lamin A-Protein ist ein Auslöser der Krankheit Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie. Diese Mutation liegt nicht im Domänenbereich des Lamin A-Proteins, der für die Zusammenlagerung der Dimere zu Protofilamenten zuständig ist. Formationen zu Parakristallen wurden deshalb auch mit Lamin A R545C durchgeführt, um der Fragestellung nachzugehen, ob eventuelle messbare Unterschiede im Bänderungsmuster auch tatsächlich auf eine abnorme Formierung von Lamin A S143F zu höher geordneten Strukturen zurückzuführen sind.



Abb. 5.19: Lamin A-Filamente nach negative staining. Zu sehen sind Parakristalle von Lamin A wt (a), Lamin A S143F (b) und Lamin A R545C (c) nach *in vitro*-Rekonstitution und negative staining. Die Laminfraktionen wurden gegen MES-Puffer dialysiert und auf Kohlenstoff-bedampfte Kupfernnetzchen pipettiert, fixiert, kontrastiert und mit dem Transmissionelektronenmikroskop analysiert. Die Parakristalle sind untereinander vernetzt und das transversale Bänderungsmuster ist sichtbar (a, b, c; Leitern). Eichstrich: 0,2 μm .

Dafür wurden zunächst die *LMNA* wt, *LMNA* S143F und *LMNA* R545C Sequenzen in den Expressionsvektor pET21a kloniert, die Vektoren anschließend in RosettaTM (*DE3*)pLysS *Competent Cells E. coli* amplifiziert, und die Expression der Proteine eingeleitet. Nach 5-stündiger Inkubation erfolgte die Aufreinigung über einen Anionen- als auch über einen

Kationentauscher, so dass ein höherer Reinheitsgrad des Proteins erzielt werden konnte. Die laminhaltigen Fraktionen wurden gesammelt und konnten für die Rekonstituierung von Lamin A und die Untersuchung der *in vitro*-Bildung von Parakristallen mit negative staining verwendet werden.

Die in Harnstoff gelagerten Lamin A Proteine wurden 30-240 Minuten gegen MES-Puffer dialysiert, um die Faltung der Proteine zu Dimeren, Filamenten und Parakristallen zu gewährleisten (siehe 4.3.5.1 – 3.3.7). Die Dialysate mit den rekonstituierenden Lamin A-Fraktionen wurden auf Kohlenstoff-bedampfte Kupfernetzchen pipettiert. Das Protein adsorbierte am Kupfernetzchen und wurde anschließend fixiert und kontrastiert. Durch diese Technik des negative stainings (siehe 4.5.14) wurde die transversale Bänderung der Parakristalle durch Analysen am Transmissionselektronenmikroskop besonders gut sichtbar.

Die Parakristalle waren miteinander quer verbunden und bildeten eine netzartige Struktur (Abb. 5.19). Parakristalle von Lamin A wt (Abb. 5.19 a, Leiter), Lamin A S143F (Abb. 5.19 b, Leiter) und Lamin A R545C (Abb. 5.19 c, Leiter) wiesen nach *in vitro*-Rekonstitution und negative staining untereinander ein transversales Bänderungsmuster mit Wiederholungen von abwechselnd heller und dunkler Färbung auf, welche in kleiner Vergrößerung nach Betrachtung am Elektronenmikroskop keine Unterschiede zeigten.

Dafür wurden die axialen Wiederholungen des transversalen Bänderungsmusters und deren Länge am Elektronenmikroskop genauer analysiert. Die Auswertung erfolgte wie in Abb. 5.20 beschrieben. Aus den ermittelten Daten wurden jeweils die Mittelwerte für die Länge einer hell/dunkel-Bande errechnet.

Wie in einer früheren Studie schon beschrieben wurde, zeigen *in vitro* gebildete, wildtypische-Lamin A-Parakristalle eine axiale hell/dunkel-Bänderungs-Wiederholung von etwa 25 nm (Gieffers und Krohne 1991).

Die Resultate zeigten ein Ergebnis von 26,47 nm in den aus wildtypischen Lamin A gebildeten Parakristallen. Dagegen waren die Längen der axialen Wiederholungen von Lamin A S143F-Parakristallen mit 25,22 nm im Vergleich zu den Lamin A R545C, bzw. wildtypischen Parakristallen signifikant verkürzt. Interessanterweise waren keine signifikanten Unterschiede in den Längen der axialen Wiederholungen von wildtypischem Lamin A zu Lamin A R545C mit 26,28 nm zu beobachten (Abb. 5.20 B). Die Untersuchungen wurden am gleichen Tag am gleichen Elektronenmikroskop gemacht, um sicherzustellen, dass die sehr kleinen Unterschiede nicht auf veränderte Einstellungen des Mikroskops zurückzuführen waren.

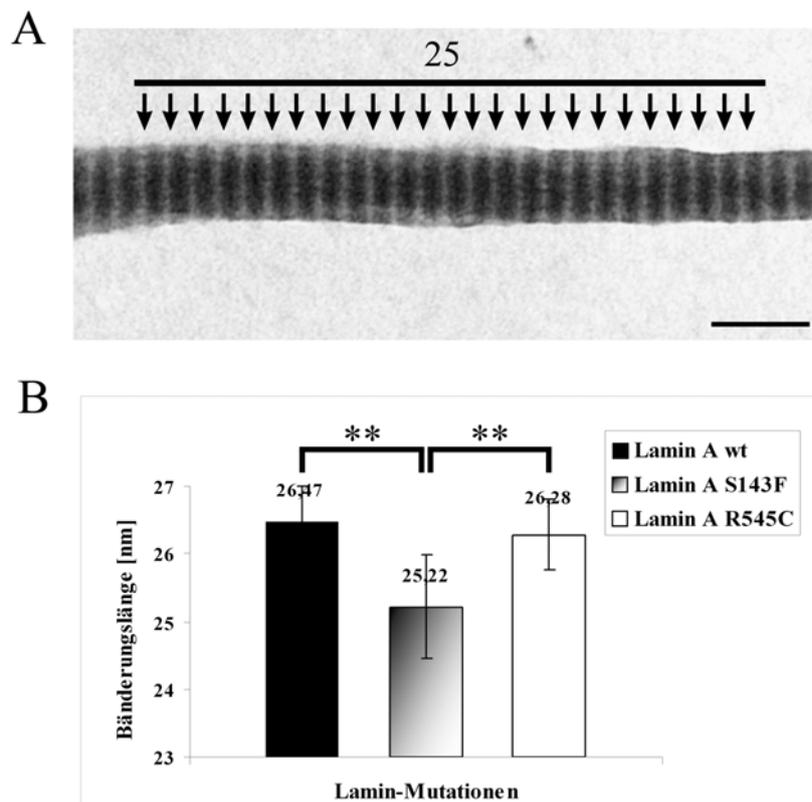


Abb. 5.20: Darstellung der Evaluierungsmethode zur Messung von Längenunterschieden im transversalen Bänderungsmuster von Laminfilamenten und deren Auswertung. (A) Es wurden 20x jeweils die Strecken von 25 hell/dunkel-Wiederholungen gemessen. Markiert ist jeweils eine hell/dunkel-Bande (Pfeile); die Linie darüber entspricht der Strecke von 25 Wiederholungen im Bänderungsmuster. Eichstrich: 100 μm . (B) Statistische Auswertung der Messung von Längenunterschieden im transversalen Bänderungsmuster. Die Mittelwerte der axialen hell/dunkel-Bänderungswiederholung mit Standardabweichungen sind graphisch dargestellt. Es wurden jeweils 20x 25 axiale Wiederholungen ausgezählt und daraus die Mittelwerte für je eine hell/dunkel-Bande errechnet. Die Längen der axialen Wiederholungen von Lamin A S143F-Parakristallen zu Lamin A R545C bzw. wildtypischen Parakristallen unterscheiden sich signifikant. Zwischen den Längen der axialen Wiederholungen von wildtypischen Lamin A zu Lamin A R545C-Parakristallen sind dagegen keine signifikanten Unterschiede zu beobachten. ** $P < 0,01$.

Die Patientin ist eine heterozygote Trägerin der Mutation *LMNA* S143F, was bedeutet, dass in den Patientenzellen sowohl wildtypische als auch S143F Lamin A-Proteine exprimiert werden. Um dies bei der *in vitro*-Parakristallbildung zu simulieren, wurde Lamin A wt und Lamin A S143F im Verhältnis 1:1 gemischt, die Parakristallbildung induziert und die Resultate am Elektronenmikroskop ausgewertet. Die Ergebnisse dieser heterogenen Mischung zeigten mit 25,28 nm ebenfalls eine signifikante Verkürzung in den Längen der axialen Wiederholungen auf. Auch wurde eine heterogene Mischung von Lamin A wt und der EDMD-Mutation Lamin A R545C analysiert, mit dem Ergebnis, dass hierbei kein signifikanter Unterschied in den Längen der axialen Wiederholungen zu homogenen Lamin A wt bzw. homogenen Lamin A R545C-Parakristallen beobachtet werden konnte (Daten werden nicht dargestellt). Diese Resultate bestätigen die Annahme, dass es durch die Mutation *LMNA* S143F im Lamin A zu Abnormitäten in der Bildung von heterogenen sowie homogenen Lamin-Protofilamenten kommt.

5.1.15 Nachweis der Kooperation von Lamin wt und Lamin S143F über Bimolekular Fluorescence Complementation (BiFC) *in vivo*

Es wurde schon beschrieben, dass Lamin A-Mutationen Einfluss auf die Formierung von höher geordneten Laminstrukturen *in vitro* haben (Wiesel et al., 2007). Bisher konnte allerdings noch nicht gezeigt werden, inwieweit Mutationen im Lamin A die Formation von Protofilamenten oder höher geordneten Strukturen *in vivo* beeinflussen. Auch ist nicht bekannt, ob Heteropolymere aus mutiertem Lamin A und wildtypischem Lamin A, bzw. Homopolymere aus mutiertem Lamin A sich durch Interaktionen mit anderen Lamin A-Polymeren *in vivo* korrekt in die Lamina integrieren.

Um dies zu prüfen wurde die Methode der Bimolekular Fluorescence Complementation (BiFC) (Hu et al. 2002; Kerppola, 2006) angewendet. Bei BiFC werden zwei Proteine an jeweils eine nicht-fluoreszierende Hälfte des Fluorophors YFP gekoppelt. Die Bildung eines funktionellen Fluorophors durch Komplementierung der beiden Fluorophor-Hälften ist ein Indikator für die Interaktion der Fusionsproteine in lebenden Zellen und führt zu einem gelben fluoreszierenden Signal. BiFC, und damit ein Fluoreszenzsignal, kommt zustande, wenn die YFP-Fragmente durch ihre Fusionspartner in Kontakt treten, was bedeutet, dass diese innerhalb einer Distanz von weniger als 100 Å bzw. 10 nm miteinander assoziieren (Hu et al., 2002).

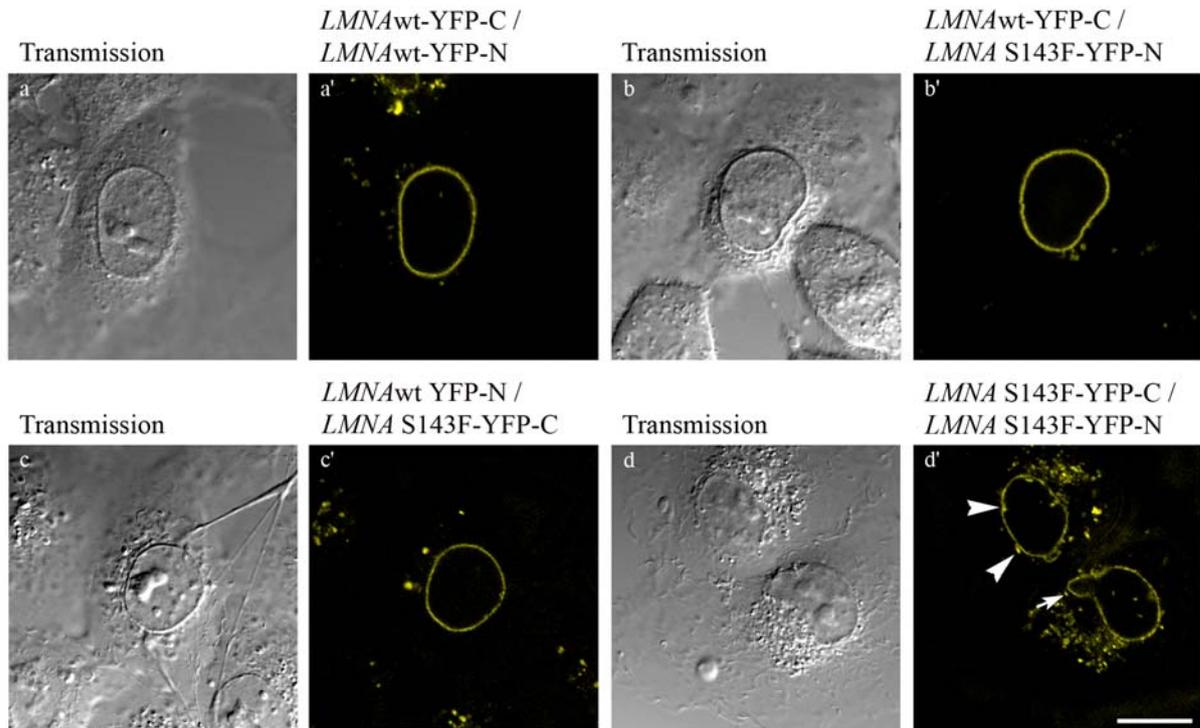
Dazu wurden kodierenden Sequenzen von wildtypischem Lamin A und Lamin A S143F jeweils in die Vektoren des BiFC-Systems (pBiFC-YC155 und pBiFC-YN155, von T. Kerppola) ligiert und amplifiziert. Um die Interaktion *in vivo* nachzuweisen, wurden wildtypische Fibroblasten mit einer Kombination der jeweiligen zu untersuchenden Interaktionspartner transient mit gleichen Mengen an DNA transfiziert. Nach einer Überexpression von etwa 18-24 h bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die Zellen unter dem konfokalen Laser-scanning Mikroskop in Lebendbeobachtungskammern untersucht. Um die Expression zu überprüfen, wurden zusätzlich Immunlokalisationen derselben Transfektionsansätze der beiden Fusionsproteine mittels spezifischer Antikörper gegen die in den Fusionsproteinen enthaltenen HA- und Flag-Markierungen durchgeführt.

Es wurden nur Transfektionsansätze ausgewertet, in welchen beide Konstrukte mittels Immunlokalisationen nachgewiesen werden konnten. Ansätze in denen die Tag-Markierungen der beiden Konstrukte nicht nachgewiesen werden konnten, wurden bei der Auswertung außer Acht gelassen. Die BiFC-Experimente mit den verschiedenen Lamin-Varianten zeigten in 85 % der transfizierten Zellen eine detektierbare Anlagerung der Lamine zueinander (Daten werden nicht gezeigt). Verwendet wurden die Konstrukt-Kombinationen *LMNA* wt-YFP-C : *LMNA* wt-YFP-N (Abb. 5.21, a'), *LMNA* wt-YFP-C : *LMNA* S143F-YFP-N (Abb. 5.21, b'), *LMNA* S143F-YFP-C : *LMNA* wt-YFP-N (Abb. 5.21, c') und *LMNA* S143F-YFP-C : *LMNA* S143F-YFP-N (Abb. 5.21, d'). Die heterogen bzw. homogen aus wildtypischen oder mutierten Lamin A-Fusionproteinen gebildeten Laminpolymere, zeigten nach der Transfektion jeweils eine wildtypische Lokalisation

Ergebnisse

in der Lamina an der inneren Kernhülle (Abb. 5.21, a', b', c'). Die Kombination der beiden *LMNA* S143F-Konstrukte hatte dagegen ein Verteilungsmuster ähnlich wie Lamin A in Patientenzellen. Die Fusionsproteine verteilten sich zwar innerhalb der Lamina, jedoch zeigten sich Aggregationen der Lamin A-Fusionsproteine an der inneren Kernhülle (Abb. 5.21 d' Pfeilspitzen).

A



B

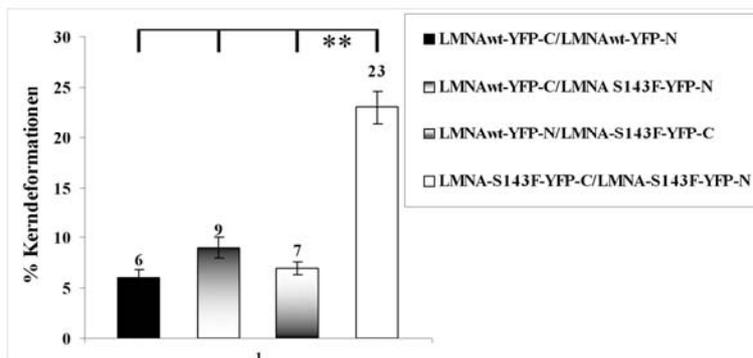


Abb. 5.21: Nachweis der Interaktionen von Lamin wt und Lamin S143F über Bimolekular Fluoreszenz Complementation (BiFC) *in vivo*. (A) Die Zellen wurden 18-24h nach der Transfektion *in vivo* am konfokalen Fluoreszenzmikroskop analysiert. (a') zeigt eine Zelle, die mit den Fusionsproteinen *LMNA* wt-YFP-C und *LMNA* wt-YFP-N, (b') eine Zelle, die mit *LMNA* wt-YFP-C und *LMNA* S143F-YFP-N, (c') eine Zelle, die mit *LMNA* S143F-YFP-C und *LMNA* wt-YFP-N und (d') Zellen, die mit *LMNA* S143F-YFP-C und *LMNA* S143F-YFP-N transfiziert wurden. Das Verhältnis der beiden jeweils für die Transfektion verwendeten Fusionsproteine betrug stets 1:1. Die heterogen bzw. homogen aus wildtypischen oder mutierten Lamin A-Fusionproteinen gebildeten Laminpolymere zeigen jeweils eine wildtypische Verteilung in der Lamina an der inneren Kernmembran (a', b', c'). Nur die homogene Kombinationsvariante *LMNA* S143F-YFP-C:*LMNA* S143F-YFP-N zeigt morphologische Kerndeformationen (d', Pfeil), sowie Aggregationen von den Lamin A-Fusionsproteinen an der Kernmembran (d', Pfeilköpfe). Die korrespondierenden Transmissionaufnahmen (a, b, c, d) sind zusätzlich dargestellt. Eichstrich 20µm. (B) Statistische Auswertung der Häufigkeit der Kerndeformationen. Es konnten signifikant mehr morphologische Kerndeformationen nach Transfektion mit der homogenen Kombinationsvariante *LMNA* S143F-YFP-C:*LMNA* S143F-YFP-N gegenüber den anderen Transfektions-Varianten festgestellt werden. Es wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt ** P<0,01.

Eine weitere interessante Fragestellung war, inwieweit die Integration der heterogenen Laminpolymere, bzw. die homogenen Laminpolymere aus Lamin A S143F, die Integrität und die

Morphologie der Kernhülle beeinflussten. Um dies zu prüfen, wurden Zellen nach Transfektion der jeweiligen Konstrukt-Kombinationen auf das Auftreten von Kerndeformationen hin analysiert und das Resultat statistisch ausgewertet. Die Untersuchung ergab, dass signifikant mehr morphologische Kerndeformationen nach Transfektion mit der homogenen Mutanten-Kombinationsvariante *LMNA* S143F-YFP-C : *LMNA* S143F-YFP-N (23 %) gegenüber den anderen Transfektions-Varianten (6-9 %) festgestellt werden konnten (Abb. 5.21 B).

Diese Resultate belegten, dass sich zum einen Heteropolymere aus wildtypischen Lamin A und mutiertem Lamin A S143F als auch Homopolymere *in vivo* formierten. Außerdem lokalisierten die Lamin-Heteropolymere, sowie die wildtypischen Homopolymere korrekt in der Lamina. Im Gegensatz dazu beeinflusste die Bildung von mutierten Lamin-Homopolymeren die korrekte Lokalisation dieser in der Lamina sowie die Kernmorphologie der transfizierten Zellen *in vivo*.

5.1.16 Untersuchung der Interaktionen von Lamin S143F-Proteinen und -Protofilamenten mit Proteinen der inneren Kernmembran

Wie schon im „Genexpressions-Modell“ beschrieben, könnten Mutationen im Lamin A zu einer veränderten Affinität des Lamins zu Chromatin, zellspezifischen Bindungspartnern, oder Transkriptionsfaktoren und dadurch zu einer Beeinflussung der zelltypischen Genexpression, oder bestimmter Signaltransduktionswege führen (Goldman et al., 2004). Auch ist bekannt, dass Lamin A-Mutationen negative Auswirkungen auf die Interaktionen mit anderen Proteinen der inneren Kernmembran wie Emerin (Fairley et al., 1999), LAP2 (Markiewicz et al., 2002) und den SUN-Proteinen (Crisp et al., 2006) haben könnten. Allerdings konnte noch nicht nachgewiesen werden, welche Ebene der Lamin A-Polymerisierung - die Stufe der Dimerisierung, oder aber die Stufe der Protofilamentbildung bzw. die Bildung höher geordneter Strukturen - diese Bindungsaffinitäten beeinflusst.

Um dies zu prüfen, wurden Enzymgekoppelte Immunadsorptionstests bzw. Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) durchgeführt. Es sollte analysiert werden, ob eine veränderte Bildung von Protofilamenten bzw. höherer geordneter Strukturen die Affinitäten zu Bindungspartner beeinflussen.

Diese Technik wurde verwendet, um eventuelle Unterschiede in Protein-Protein-Interaktionen von wildtypischen oder mutierten *in-vitro* gebildeten Lamin A-Filamenten und Proteinen der Kernmembran zu detektieren. Dazu wurden in Mikrotiterplatten Fraktionen der zu testenden Lamin A-Filament-Lösungen in Harnstoff pipettiert, mit MES-Puffer versetzt, so dass sich die Filamente frei rekonstituieren konnten und für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde Gesamtproteinextrakt aus Kernhüllen dazugegeben, die Platte mit spezifischen Antikörperlösungen gegen LAP2, LAP1, Emerin, SUN1, SUN2 und Nesprin2 inkubiert und am nächsten Tag die Lösung mit einem zweiten alk. Phosphatase-konjugiertem sekundären Antikörpern versetzt. Als Nachweisreagenz wurden Phosphatase-Substrat-Tabletten verwendet.

Die spektralphotometrische Auswertung erfolgt durch Messung der Extinktion bei 405 nm nach 30, 60 und 120 min am Einkanal-Photometer (siehe auch 4.3.13). Durch dieses Experiment sollte nachgewiesen werden, ob es Differenzen der Bindungsaffinitäten auf der Ebene der gebildeten Laminfilamente zwischen homogenen und heterogenen Lamin A-Kombinationen von wildtypischem Lamin und Lamin A S143F bzw. Lamin A R545C gab. Unterschiede in den Extinktionen der verschiedenen Laminfilament-Kombinationen würden für eine Beeinflussung der Interaktion zu Proteinen der inneren Kernmembran durch die Mutationen *LMNA* S143F bzw. *LMNA* R545C auf der Ebene der Laminfilamente sprechen.

Um auszuschließen, ob evtl. gefundene Unterschiede in den Bindungsaffinitäten nicht schon auf einer möglichen veränderten Dimerisierung der Lamin-Mutanten begründet waren, wurde mit denselben Gesamtkernextrakten und Primärantikörpern die Interaktion über „Pull-Down-Assays“ bestimmt. Hierbei wurden die Fusionsproteine Lamin A wt-His, sowie Lamin A S143F-His bzw. Lamin A R545C-His hergestellt, über Ligandenaffinität an eine Matrix gebunden und die Säule mit dem Gesamtzellkernextrakt inkubiert. Alle Proteine, die ihrerseits eine Bindung mit dem Fusionsprotein eingehen konnten, wurden nun über Ligandenaffinität an die Lamin-Fusionsproteine gebunden. Ungebundene Proteine wurden entfernt, die an die Säule gebundenen Proteine eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Immunblots analysiert.

Trotz mehrmaliger Versuche mit verschiedenen Parametern wie veränderter Laminmenge, unterschiedlichen Inkubationzeiten und variierenden Antikörperkonzentrationen konnten keine einheitlichen Ergebnisse erzielt werden. Der Grund dafür liegt in der nicht konstanten bzw. homogenen oder völligen Umsetzung zu testenden Lamin A-Filament-Lösungen zu frei rekonstituierten Filamenten in den Mikrotiterplatten. Das bedeutet, dass die Laminfilament-Aggregate nicht in gleicher Menge in den einzelnen Reaktionsräumen der Mikrotiterplatten vorlagen. Die gewonnenen Ergebnisse konnten leider nicht zur einer Auswertung verwendet werden und tragen auch nicht über mögliche Unterschiede der Bindungsaffinitäten auf der Ebene der gebildeten Laminfilamente bei.

5.2 Charakterisierung von Myoblasten mit der Mutation *LMNA* R545C

5.2.1 Morphologische Veränderungen und abnormale Lokalisation von Lamin A/C und Emerin in *LMNA* R545C Myoblasten

Die Mutation R545C im carboxyterminalen Bereich von Lamin A/C ist Auslöser für die autosomal-dominante Form der Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (AD-EDMD). Wie in früheren Arbeiten berichtet wurde, ist das Auftreten von morphologischen Kerndeformationen in Patientenmyoblasten ein klassisches Anzeichen von EDMD (Sabatelli et al., 2001; Fidzianska et al., 2003). Um eventuelle Abnormitäten der Kernmorphologie von *LMNA* R545C Myoblasten festzustellen, wurden Patientenzellen in Epon eingebettet, Ultradünnschnitte angefertigt und diese mit dem Transmissionselektronenmikroskop untersucht.

Anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen der *LMNA* R545C Myoblasten konnte im Gegensatz zu wildtypischen Kontrollmyoblasten (Abb. 5.22 A, a) eine Bläschenbildung der beiden Kernmembranen festgestellt werden (Abb. 5.22 A, b, b', Pfeile).

Bisher konnten zwar bei vielen verschiedenen EDMD-auslösenden Mutationen in Patientenmyoblasten morphologische Kerndeformationen beobachtet werden, doch wurden diese Unterschiede der Kernstruktur bisher nie miteinander verglichen. Hier konnte zum ersten Mal dargelegt werden, dass verschiedene Laminopathie-auslösende Mutationen nicht immer zu gleichen abnormalen Phänotypen der Kernmorphologie, sondern zu divergenten Ausprägungen der morphologischen Kernveränderungen in Patientenzellen führen. Bei der EDMD-auslösenden Mutation *LMNA* R545C kleidete in Myoblasten die Lamina die Bläschen aus (Abb. 5.22 b' Pfeil). Dagegen war bei der Progerie-auslösenden Mutation *LMNA* S143F (Abb. 5.22 c, c', siehe auch Abschnitt 5.1) in Fibroblasten die Lamina zusätzlich unterhalb der Bläschen zu beobachten und blieb mit Chromatin in Kontakt (Abb. 5.22 c', Pfeil). Die EDMD-auslösende Mutation *LMNA* R377H (Abb. 5.22 d, d') führte in Lymphoblastoiden-Zellen zu einem vergrößerten perinukleären Spalt zwischen INM und ONM mit zahlreichen sehr kleinen Bläschen (Abb. 5.22 d', Pfeile) und das kondensierte Heterochromatin war nicht mit der Kernmembran assoziiert (Abb. 5.22 d, Pfeile).

Eine statistische Analyse (Abb. 5.22 B) lies erkennen, dass das Auftreten von Deformationen in der Häufigkeit und auch in der Größe der Kernstruktur von *LMNA* R545C-Zellen ebenfalls von der Passage der Zellen abhängig ist. Bis zur Passage 9 zeigten nur etwa 4 % der Kontroll- bzw. Patientenzellen strukturelle Kerndefekte. In Passage 9 waren die Kerndeformationen ausgeprägter und konnten in 13 % der Patientenmyoblasten beobachtet werden. Dieser Wert stieg in späten Passagen nicht mehr weiter an, in Passage 15 zeigten 10 % der Patientenzellen im Gegensatz zu 5 % der Kontrollmyoblasten morphologische Veränderungen der Kernstruktur. Nach der Beobachtung morphologischer Veränderungen in der Kernhülle war es von Interesse, ob die Mutation *LMNA* R545C auch Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation bzw. Expression

Ergebnisse

von Lamin A/C und anderen Proteinen der inneren Kernmembran nahm. Das integrale Membranprotein Emerin spielt dabei eine besondere Rolle, da Mutationen im *EMD*-Gen, das für das Emerin kodiert, die X-gebundene Form der Emery-Dreifuss Muskeldystrophie auslösen.

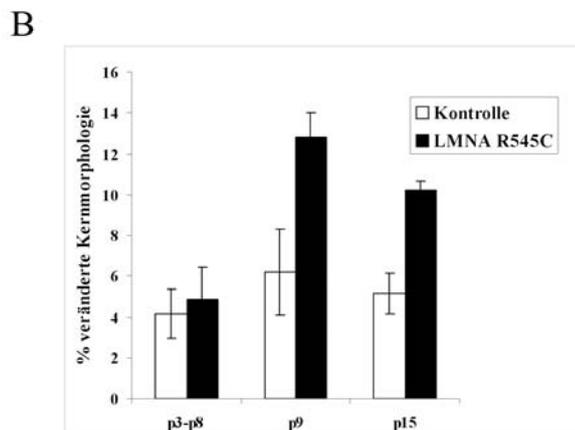
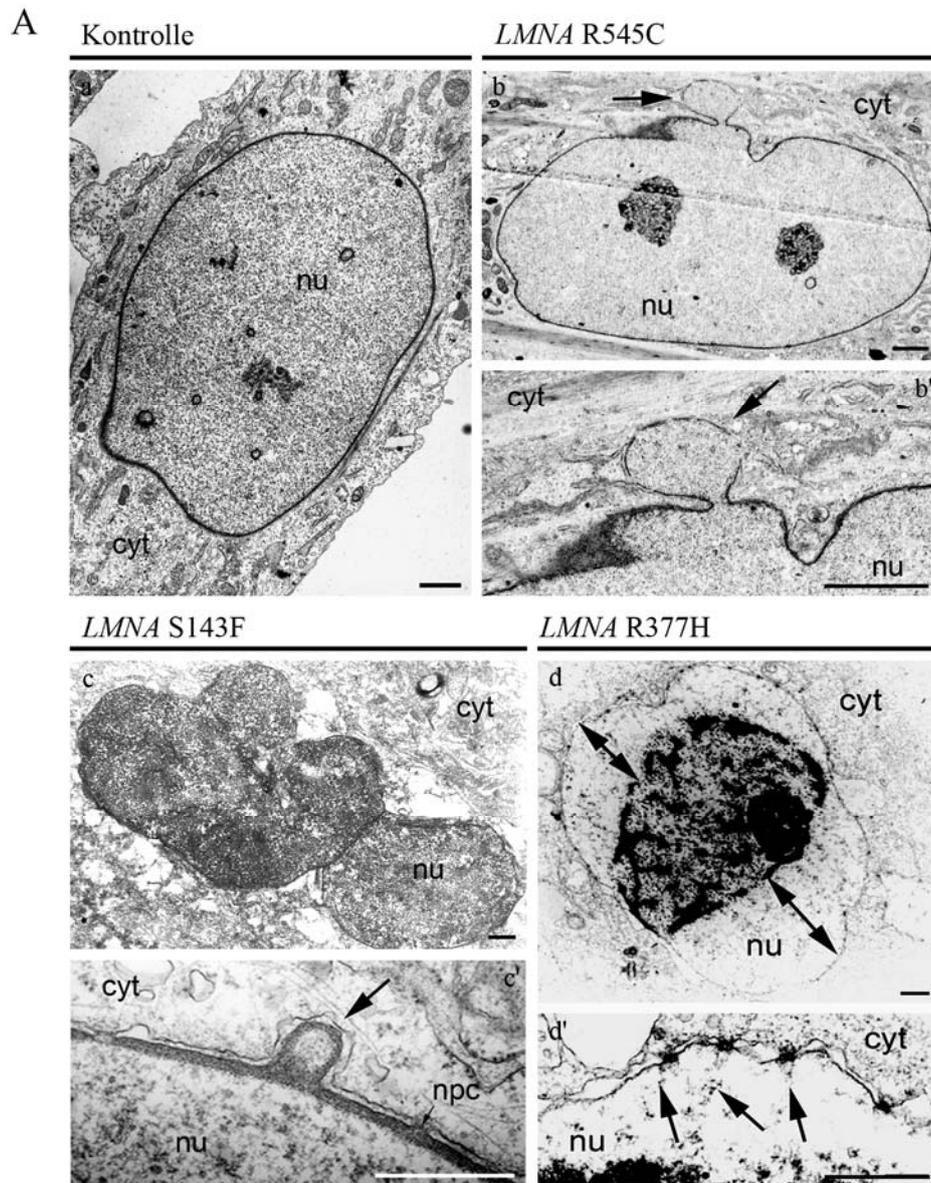


Abb. 5.22: Veränderungen der Kernmorphologie in *LMNA* R545C Myoblasten. Abbildungslegende siehe folgende Seite.

Abbildungslegende zu 5.22:

(A) Die veränderte Kernmorphologie in *LMNA* R545C-Zellen zeigt im Gegensatz zu wildtypischen Kontrollzellen (a) auffällige Bläschen der Kernhülle (b, b', Pfeile). Verschiedene Laminopathie-auslösende Mutationen führen zu divergenten Ausprägungen der morphologischen Kernveränderungen in Patientenzellen. Bei der EDMD-auslösenden Mutation *LMNA* R545C kleidet in Myoblasten die Lamina das Bläschen aus (b' Pfeil). Bei der Progerie-auslösenden Mutation *LMNA* S143F (c, c') ist die Lamina in Fibroblasten zusätzlich unterhalb des Bläschen zu beobachten (c', Pfeil). Die EDMD-auslösende Mutation *LMNA* R377H (d, d') führt in Lymphoblastoiden-Zellen zu einem vergrößerten perinukleären Spalt zwischen INM und ONM mit zahlreichen kleinen Bläschen (d', Pfeile) und das kondensierte Heterochromatin ist mit der Kernmembran nicht assoziiert (d, Pfeile). Eichstriche: (a, b, c, d): 2µm; (b', c', d'): 0,2 µm. Nu: Nukleus, Cyt: Zytoplasma. (B) Statistische Auswertung der morphologischen Kerndeformationen in *LMNA* R545C-Myoblasten. Das Auftreten von Deformationen in der Kernstruktur ist von der Passage der Zellen abhängig. Es wurden jeweils 500 Kontroll- und Patientenzellen ausgewertet. ** P<0,01.

Um die Verteilung von Lamin A/C und Emerin zu untersuchen, wurde eine indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen Lamin A/C und Emerin durchgeführt (Abb. 5.23). Wie auch *LMNA* S143F-Fibroblasten zeigten die *LMNA* R545C-Myoblasten eine fehlerhafte Verteilung von Lamin A/C sowie Emerin, im Gegensatz zu Kontrollzellen, deren Lamin A/C und Emerin wildtypisch an der Kernmembran lokalisierte (Abb. 5.23 a', a''). In Patientenzellen mit keinen oder nur leichten Kerndeformationen (Abb. 5.23 b', Pfeil) war Lamin und Emerin ebenso normal an der Kernhülle lokalisiert (b', b''), während in Patientenzellen mit starken Kerndeformationen (Abb. 5.23 c', d' Pfeilspitzen) die Lamin A/C und Emerin-Verteilung unregelmäßig war und eine Honigwabenstruktur aufzeigte (Abb. 5.23 c', d' Pfeilspitzen; c'', d''). Diese Beobachtungen korrelierten mit einer lokalen irregulären DNA-DAPI-Markierung.

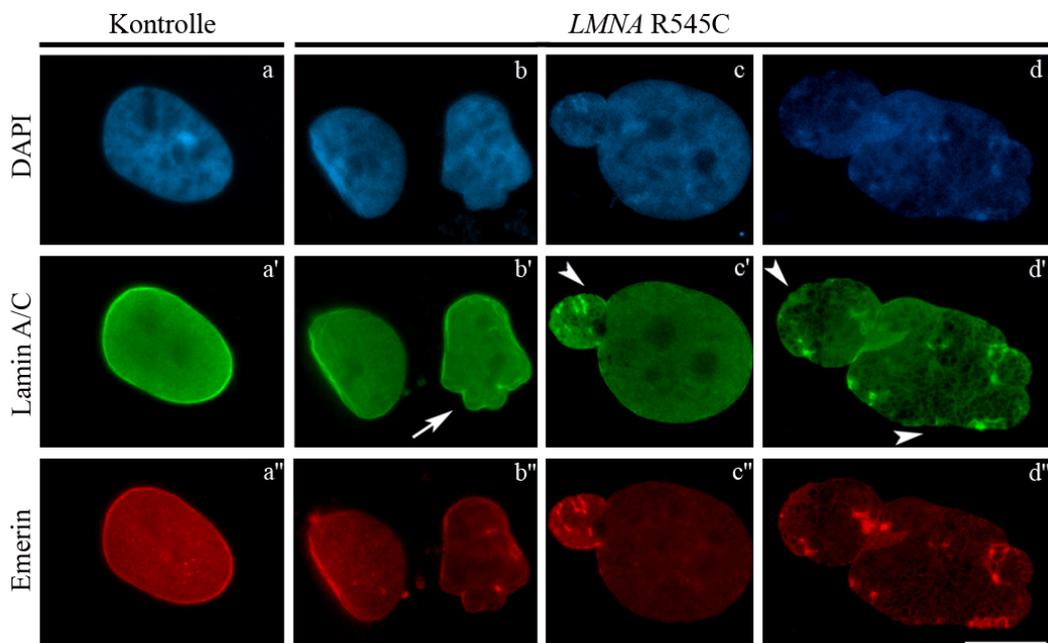


Abb. 5.23: Indirekte Fluoreszenzaufnahmen zeigen eine fehlerhafte Lokalisation von Lamin A/C und Emerin nach Inkubation mit spezifischen polyklonalen Lamin A/C und monoklonalen Emerin Antikörpern. (A) Kontrollzellen zeigen eine normale Verteilung von Lamin A/C und Emerin entlang der Kernmembran (a', a''). In Patientenzellen mit keinen oder nur leichten Kerndeformationen (b', Pfeil) ist Lamin und Emerin wildtypisch homogen an der Kernhülle zu beobachten (b', b''), während Patientenzellen mit starken Kerndeformationen (c', d' Pfeilspitzen) die Lamin A/C und Emerin-Lokalisation unregelmäßig ist und eine Honigwabenstruktur aufweist (c', d' Pfeile; c'', d''). Eichstriche 10 µm.

Auch ist bekannt, dass andere Proteine der inneren Kernmembran wie Lamin B oder die LEM-Domänen-Proteine, zu deren Familie auch LAP2 gehört, Interaktionen mit der Lamina eingehen (Haraguchi et al., 2004; Holaska et al., 2003; Wilkinson et al., 2003; Zastrow et al., 2004). Um zu überprüfen, ob die *LMNA* R545C-Mutation ebenso Einfluss auf die Lokalisation dieser Proteine nahm, wurden entsprechende immunfluoreszenzmikroskopische Analysen angefertigt. Die Verteilung von Lamin B2, LAP2 α und LAP2 β war in Patientenmyoblasten nicht verändert. Die Lokalisation war, wie auch in Kontrollzellen, an der Kernmembran bzw. im Nukleoplasma zu beobachten (Daten werden nicht gezeigt).

5.2.2 *LMNA* R545C Myoblasten zeigen eine veränderte Lokalisation von Markern von aktivem und inaktivem Chromatin

Wir konnten schon in Zellen von Laminopathie-Patienten eine veränderte Genexpression beobachten. So wurde in *LMNA* S143F-Fibroblasten eine abnormale Genexpression nachgewiesen (siehe 5.1.4). Auch in Myoblasten von AD-EDMD-Patienten, die Träger der Mutation *LMNA* R377H sind, konnte gezeigt werden, dass die transkriptionell aktive Form der RNA Pol II abnormal verteilt war (Reichert et al., 2004). Daraufhin stellte sich die Frage, ob in anderen Mutationen, die als Auslöser von EDMD gelten, derselbe zelluläre Phänotyp beobachtet werden konnte. Um dies zu prüfen, wurden EDMD-Myoblasten, welche die Mutationen *LMNA* R545C exprimieren, immunfluoreszenzmikroskopisch näher analysiert.

Die transkriptionell nicht aktive Form der RNA Pol II zeigte in Kontroll- sowie in den Patientenzellen ein normales charakteristisches Muster von „speckles“ im Kern (Abb. 5.24 A a“, b“, c“).

Nach Verwendung eines Antikörpers, der die transkriptionell aktive Form der RNA Pol II erkannte, war die Fluoreszenz entweder homogen im kompletten Nukleoplasma (Abb. 5.24 B a‘), oder aber peripher am Zellkernrand (Abb. 5.24 B b‘, Pfeil) in Kontroll- sowie Patientenzellen detektierbar. Jedoch war in einer Subpopulation von Patientenzellen eine Akkumulation der transkriptionell aktiven Form der RNA Pol II in großen fokalen Arealen (1/5-1/3 des kompletten Kernvolumens) oder in Mikronuklei zu erkennen (Abb. 5.24 B c‘, d‘, Pfeile). Diese abnormalen Lokalisationen stimmten mit einer schwächeren DAPI-Markierung überein, welches eine veränderte lokale Chromatinkondensierung signalisierte (Abb. 5.24 B, c-d“). Dieses veränderte Verteilungsmuster konnte in 13 % in Passage 9 und 28 % in Passage 10 der Patientenmyoblasten beobachtet werden (Abb. 5.24 C).

Die Resultate ließen vermuten, dass auch die EDMD-verursachende Mutation *LMNA* R545C die Chromatintopologie, sowie die Genexpression beeinflusste. Modifizierungen von Histonen, wie Acetylierung oder Methylierung mit speziellen Lysinen, können als Marker für die Art der Chromatintopologie und Genexpression verwendet werden (Kamakaka und Biggins, 2005). So ist zum Beispiel der Nachweis von Histon H3, welches an Lysin 27 trimethyliert ist (H3K27me3),

Ergebnisse

ein Marker von Heterochromatin und einer Abschaltung der Transkription (Chadwick und Wilard, 2004). In anderen Laminopathien konnte schon beobachtet werden, dass die Expression von H3K27me3 verändert war (Shumaker et al., 2006; Östlund et al., 2008). Aufgrund dessen wurde die Verteilung von H3k27me3 in *LMNA* R545C-Zellen immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht.

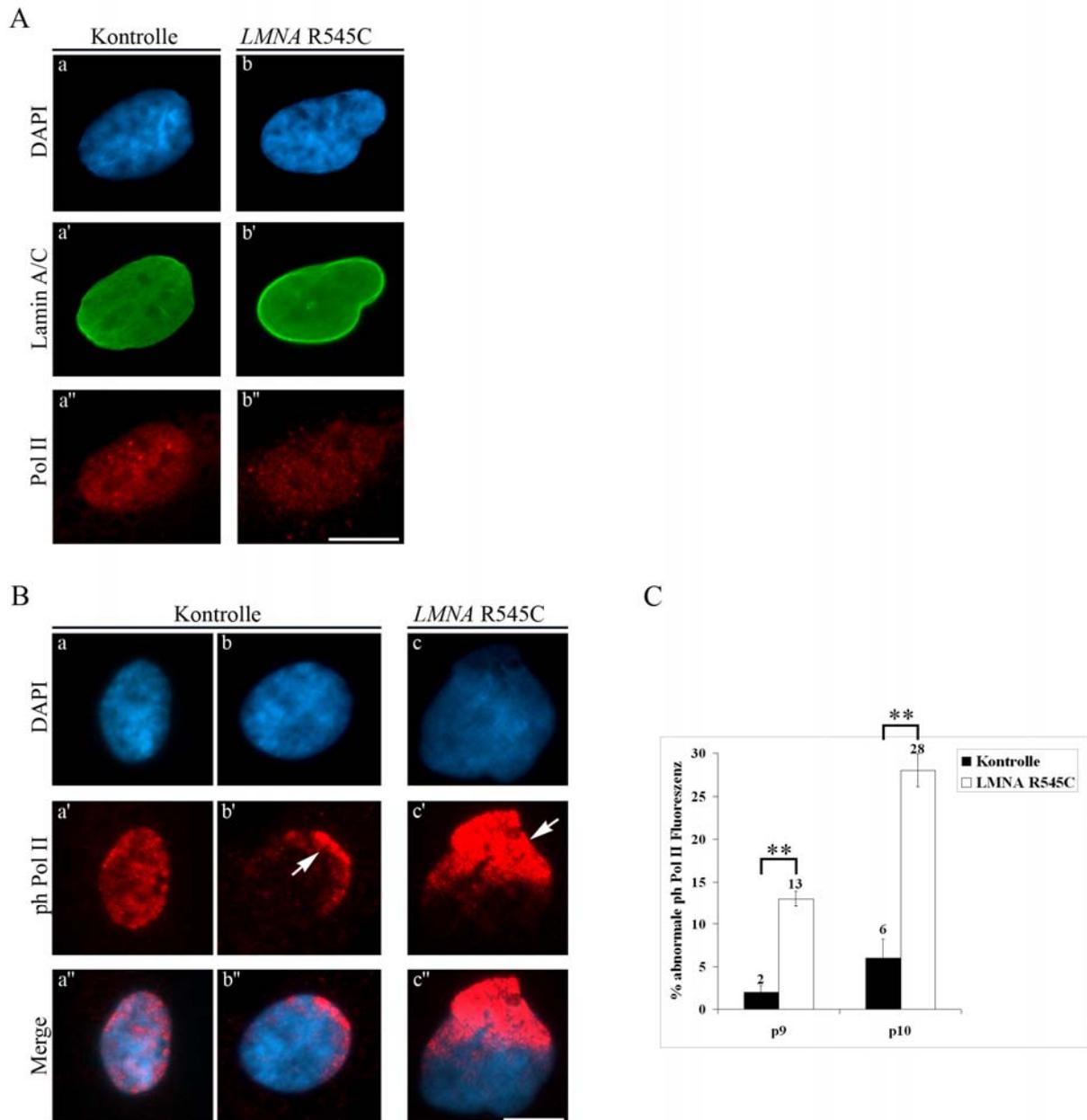


Abb. 5.24: Indirekte Fluoreszenzaufnahmen zeigen eine Umverteilung der transkriptionell aktiven Form der RNA Polymerase II nach Inkubation mit spezifischen monoklonalen Antikörpern. (A) In Kontrollzellen (a-a''), wie auch in der EDMD-Myoblastenlinie *LMNA* R545C (b-b''), ist die transkriptionell inaktive Form der RNA Polymerase II wildtypisch homogen im gesamten Kern verteilt (a'', b'', c''). (B) In Kontrollzellen ist die transkriptionell aktive Form der RNA Polymerase II entweder homogen im Kern lokalisiert, oder aber in bestimmten Randarealen des Nucleus angereichert (b', Pfeil; b''). In Patientenzellen ist die trans. akt. Pol II dagegen sehr stark in fokalen Bereichen des Kernes angehäuft (c', d', Pfeile; c'', d''). Die korrespondierenden Hoechst- (A a, b, c; B a, b, c, d) und Lamin A/C-Färbungen (A a', b', c') sind zusätzlich dargestellt. Eichstrich 10 μ m. (C) Statistische Auswertung der abnormalen Kernlokalisation der transkriptionell aktiven Form der Pol II in Kontroll- und *LMNA* R545C Patientenmyoblasten. In Passage 9 und 10 ist die ph Pol II signifikant mehr in großvolumigen Arealen in Patientenzellen misslokalisiert als in Kontrollzellen. Es wurden jeweils 100 Zellen ausgewertet. ** P<0,01).

Ergebnisse

In der Mehrzahl der Kontroll- sowie Patientenzellen war H3K27me3 punktförmig im ganzen Zellkern verteilt (Daten werden nicht gezeigt). In Patientenzellen war H3K27me3 in kleinen distinkten Bereichen im Kern angereichert (Abb. 5.25 A a'', b'', Pfeile). Eine statistische Auswertung der Akkumulation von H3K27me3 in diesen spezifischen distinkten Bereichen ergab, dass 28 % der Patientenfibroblasten H3K27me3-Aggregationen aufwiesen. Auch zeigte eine geringe Anzahl von Kontrollmyoblasten eine H3K27me3-Anreicherung in kleinen Kernbereichen, jedoch trat diese Beobachtung nur in 12 % der untersuchten Kontrollzellen auf (Abb. 5.25, B). Diese Beobachtung war unabhängig von dem Auftreten dysmorpher Kerne.

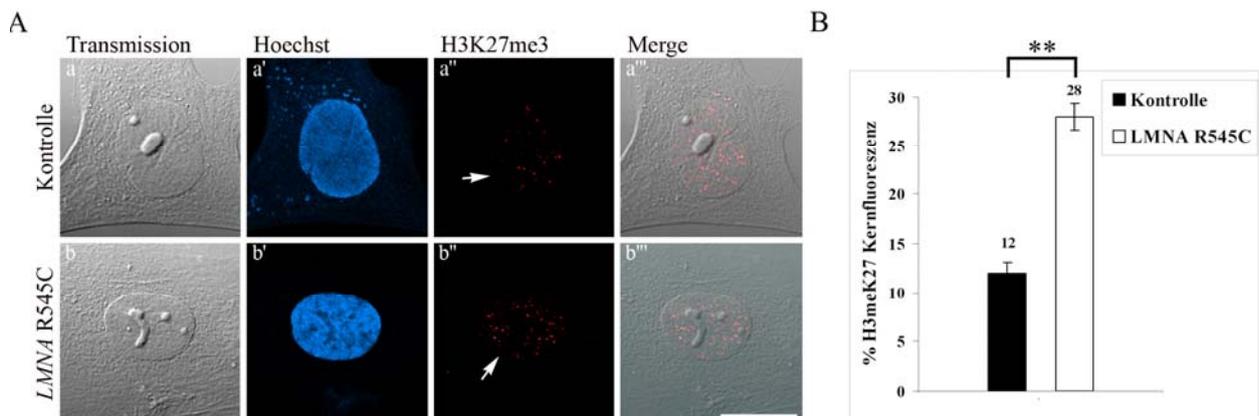


Abb. 5.25: Indirekte Fluoreszenzaufnahmen zeigen in *LMNA* R545C-Myoblasten, nach Inkubation mit spezifischen monoklonalen Antikörpern, eine Akkumulation von Histon H3, welches an Lysin 27 methyliert ist. (A) In einigen Kontrollzellen wie auch in Patientenzellen, ist H3K27me3 in kleinen distinkten Bereichen im Kern angereichert (a'', b'', Pfeile). Die korrespondierenden Hoechstfärbungen (a', b') und die Transmissionsaufnahmen (a, b) sind zusätzlich dargestellt. Eichstrich 20 μ m. (B) Statistische Auswertung der Akkumulation von H3K27me3 in spezifischen distinkten Bereichen im Kern von Kontroll- und Patientenmyoblasten. Es sind signifikant mehr Patientenzellen betroffen als Kontrollzellen. Es wurden jeweils 100 Zellen ausgewertet (#9 Kontrolle; #10 Patientenzellen; ** P<0,01).

Zusätzlich wurde die Verteilung von Histon H1 analysiert. Im Gegensatz zu der Mutation *LMNA* S143F konnten keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Patientenzellen beobachtet werden (Daten werden nicht gezeigt).

Zusammengenommen weisen die veränderte Verteilung von der transkriptionell aktiven Form der RNA Pol II und die Verminderung des H3K27me3-Signals in einer Subpopulation von Patientenzellkernen auf einen Einfluss der Mutation *LMNA* R545C auf die Chromatintopologie, -organisation und Genexpression hin.

Aber nicht nur die RNA-Polymerase II, sondern auch Transkriptionsfaktoren können mit der Lamina interagieren. Ein Beispiel ist das Retinoblastoma-Protein (pRb), das an Typ A-Lamine, Lamina-assoziiertem Polypeptid 2 alpha (LAP2 α) und an den E2f-DP3-Komplex bindet. Wie Untersuchungen in Zellen mit der Mutation *LMNA* S143F zeigten, kann eine fehlerhafte Komplexbildung aufgrund der Laminmutation zu einer veränderten Lokalisation von Retinoblastoma führen (siehe 5.1.4). In Immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen wurde die Lokalisation von hypophosphoryliertem (pRb) und hyperphosphoryliertem (ppRb) Retinoblastoma-Protein analysiert. Sowohl die pRb wie auch die ppRb-Markierung war in Kontroll- wie

auch in *LMNA* R545C-Myoblasten gleich, beide Zelllinien wiesen eine homogene Verteilung der Proteine im Zellkern auf (Daten werden nicht gezeigt).

5.2.3 Die Mutation *LMNA* R545C induziert eine vorzeitige Seneszenz in Myoblasten

Um zu prüfen, ob die veränderte Verteilung von Markern der transkriptionellen Aktivität in Verbindung mit Seneszenz steht, wurde ein Experiment zum Nachweis der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Aktivität in Kontroll- und *LMNA* R545C-Myoblasten durchgeführt. Dieser Biomarker lässt sich spezifisch im Zytosol seneszenten, nicht aber viabler präseneszenten Zellen nachweisen (siehe auch 4.5.11). Zelluläre Seneszenz ist ein genetisch festgelegtes Programm, welches in nahezu allen Körperzellen nach Ablauf einer begrenzten Zellteilungskapazität, oder nach irreparablen Erbgutschäden aktiviert wird und weitere Zellteilungen verhindert (Dimri et al., 1995; Severino et al., 2000).

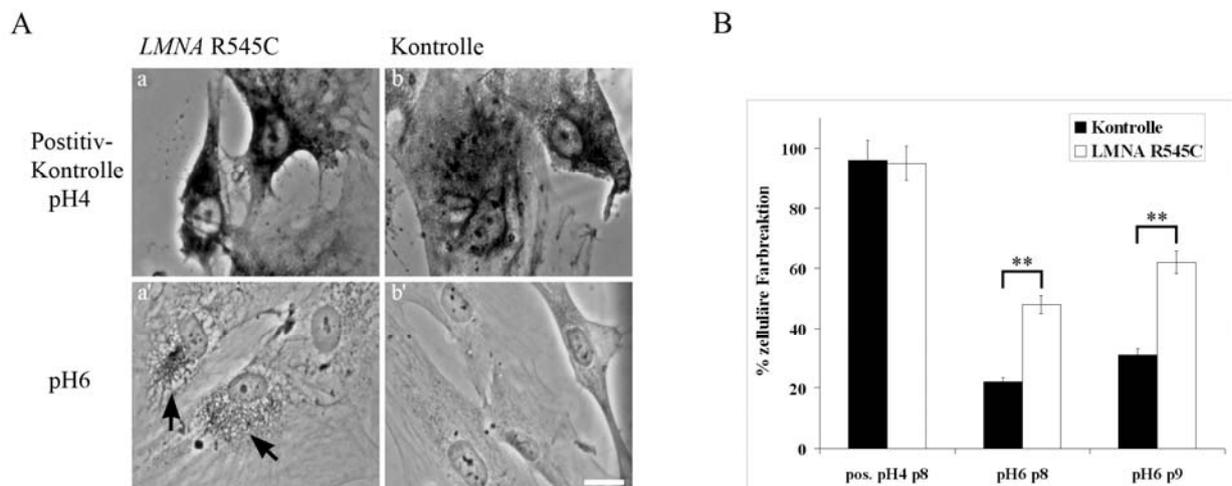


Abb. 5.26: Die *LMNA* R545C-Myoblasten weisen eine vorzeitige Seneszenz auf. (A) In Kontroll- und Patientenzellen in Passage 8 bzw. 9 wurde lysosomale (pH4) bzw. Seneszenz-spezifische β -Galaktosidase (pH6) durch spezifische Färbung nachgewiesen. Lysosomale β -Galaktosidase dient als Positiv-Kontrolle und zeigt eine intensive Färbung des Zytoplasmas in Kontroll- sowie Patientenzellen (A a, b). In *LMNA* R545C-Zellen ist eine schwache Markierung der Seneszenz-spezifischen β -Galaktosidase zu beobachten (A, a' Pfeile). (B) Statistische Auswertung der β -Galaktosidase-Färbung in Kontroll- und Patientenmyoblasten in Passage 8 und 9. Die Positiv-Kontrolle zeigt in nahezu jeder Kontroll- bzw. Patientenzelle eine lysosomale β -Galaktosidase-Färbung. Es konnte eine Erhöhung der Seneszenz in Patienten- verglichen mit Kontrollzellen nachgewiesen werden. Die Seneszenz korreliert mit Zunahme der Passage. Es wurden je 500 Zellen ausgewertet. ** $P > 0,01$.

Eine Anfärbung der Zellen mit einer spezifischen Lösung bei pH4 resultierte in einer Anfärbung der konstitutiven lysosomalen β -Galaktosidase und konnte als Positiv-Kontrolle, zur Überprüfung der Funktionalität des Experimentes, verwendet werden. Eine Färbung der Zellen bei pH6 dagegen markierte nur die Seneszenz-spezifische β -Galaktosidase. Wie zu erwarten war, zeigten nahezu alle Zellen eine positive β -Galaktosidase-Markierung bei pH4 auf (Abb. 5.26 A a, b; B). Dagegen konnte nur in einer Subpopulation von Zellen eine schwache Markierung der Seneszenz-spezifischen β -Galaktosidase beobachtet werden (Abb. 5.26 A a'). In Passage 8 konnte diese Färbung in 48 % der Patienten- und nur in 22 % der Kontrollmyoblasten nachgewiesen werden. In Passage 9 konnte sogar in 62 % der *LMNA* R545C und 31 % der Kontrollzellen die Seneszenz-spezifische β -Galaktosidase detektiert werden (Abb. 5.26 B). Diese

Resultate zeigten eine zweifache Zunahme der vorzeitigen zellulären Seneszenz in Patientenzellen im Vergleich zu Kontrollmyoblasten.

5.2.4 Abnormale Aggregation der nukleären Proteasomen in *LMNA* R545C Myoblasten

Das Proteasom ist ein Proteinkomplex, der im Zytoplasma und im Zellkern Proteine zu Fragmenten abbaut und daher zu den Peptidasen zählt. Durch diesen zellulären Vorgang wird die Funktionalität der Zelle gesichert und die Akkumulation von fehl-gefalteten Proteinen, die zu Krankheiten, einhergehend mit Protein-Aggregationen, führen, vermieden (Goldberg, 2003).

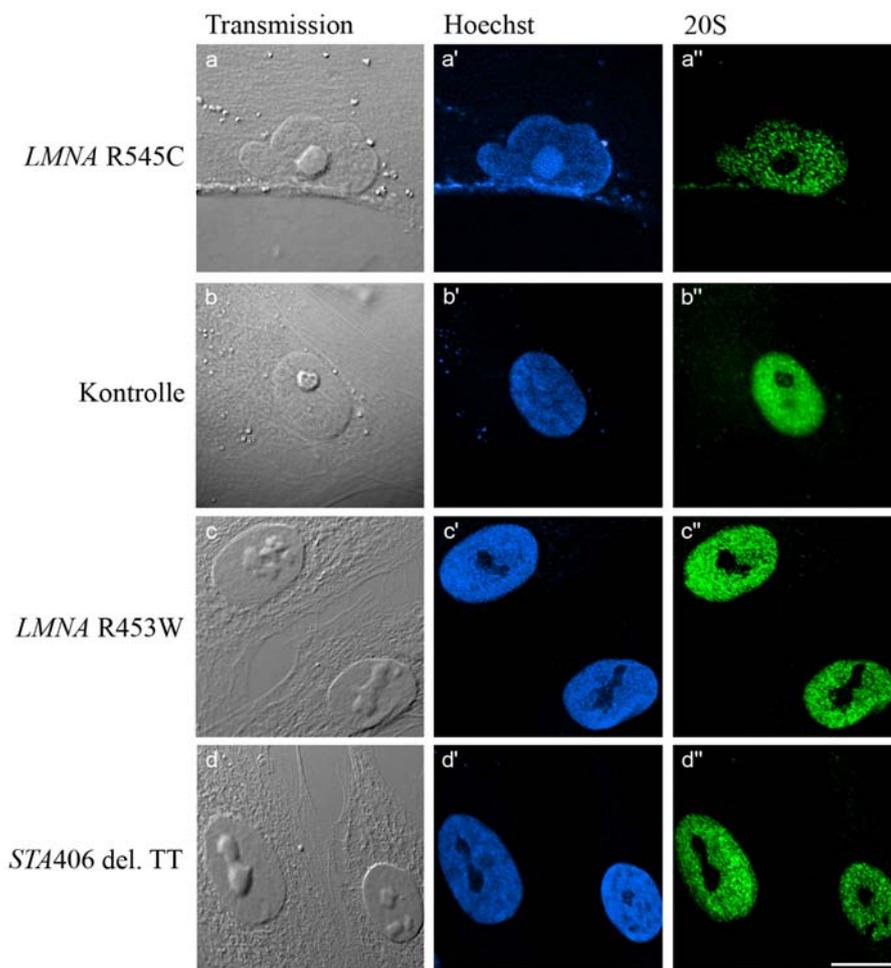


Abb. 5.27: Indirekte Fluoreszenzaufnahmen zeigen nach Inkubation mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen die 20S-Untereinheit des 26S-Proteasoms eine Aggregation der nukleären 20S Proteasom-Untereinheit in *LMNA* R545C-Myoblasten. In *LMNA* R545C-Zellen der Passage 8 ist eine leichte Aggregation der Proteasomen zu beobachten (a''), während in Kontrollzellen die Proteasomen gleichmäßig im Kern verteilt sind (b''). Auch in anderen EDMD-Myoblasten mit den Mutationen *LMNA* R453W und der Deletions-Mutation im Emerin-Gen *STA406* del. TT sind die Proteasomen homogen im Kern markiert (c'', d''). Die korrespondierenden Hoechstfärbungen (a', b', c', d') und die Transmissionsaufnahmen (a, b, c, d) sind zusätzlich dargestellt. Eichstrich 20 μ m.

Es ist bekannt, dass in Zellen, die eine replikative Seneszenz aufweisen, die proteasomale Aktivität vermindert ist und es dadurch zu einer Anreicherung von fehl-gefalteten und oxidierten Proteinen kommt (Chondrogianni und Gonod, 2005). Auch konnte nachgewiesen werden, dass eine Inhibierung der Proteasomen durch spezifische Drogen (Apoxomycin, Lactacystin) eine

Störung der Zellproliferation und damit eine Verkürzung der Lebensdauer der Zellen zur Folge hat (Torres et al., 2006). Aufgrund der beobachteten Seneszenz in *LMNA* R545C-Myoblasten stellte sich die Frage, ob die proteasomale Funktion in den Patientenzellen beeinträchtigt wurde. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz war es möglich Proteasomen zu beobachten. So konnte gezeigt werden, dass die 20S Untereinheit des 26S-Proteasoms schon in niedrigen Passagen (#8) in kleinen nukleoplasmatischen Foci verteilt war. Im Gegensatz dazu waren die Proteasomen in Kontrollzellen (#6) gleichmäßig in einem punktchenförmigen Muster im Kern lokalisiert (Abb. 5.27 b''). Um zu prüfen, ob diese abnormale Verteilung der Proteasomen auch in anderen EDMD-Myoblasten vorkommt, wurden Patientenzellen mit der Punktmutation *LMNA* R453W (c-c'') sowie Patientenzellen mit der Deletions-Mutation *STA* 406 del. TT im Emerin-Gen untersucht. Auch in diesen Zellen waren die Proteasomen wildtypisch gleichmäßig im Kern verteilt (Abb. 5.27 c'', d'').

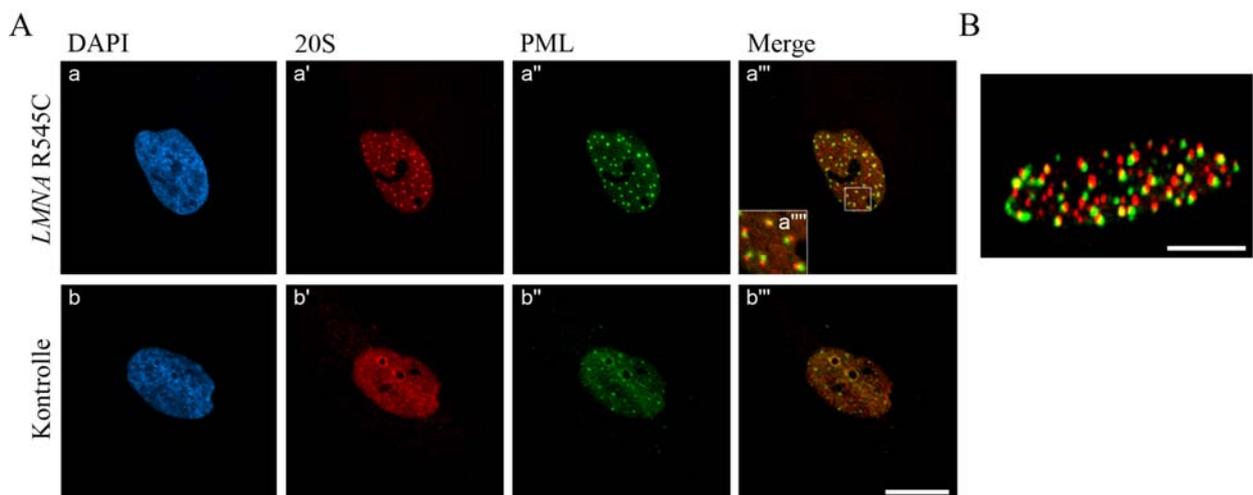


Abb. 5.28: Indirekte Doppelfluoreszenzaufnahmen zeigen eine verstärkte Aggregation der nukleären 20S Proteasom-Untereinheit in *LMNA* R545C-Myoblasten in späterer Passage und eine Anlagerung der Proteasomen an PML-Körperchen. (A) In *LMNA* R545C-Zellen in einer späteren Passage ist eine verstärkte Aggregation der Proteasomen nach Inkubation mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen die 20S-Untereinheit des 26S-Proteasoms zu beobachten (a'), während in Kontrollzellen in höherer Passage die Proteasomen homogen im Kern verteilt sind (b'). Doppelimmunfluoreszenzaufnahmen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern zeigen eine Anlagerung und stellenweise Kolokalisierung der Proteasomen an PML-Körperchen in Patientenzellen (a'', a'''). Die Abbildungen (a''', b''') sind Überlagerungen von (a', b') und (a'' und b''). Die korrespondierenden Hoechstfärbungen (a, b) sind zusätzlich dargestellt. Eichstrich 20 µm; #12 Kontrolle; #12 Patientenzellen. (B) Die Aneinanderlagerung und Kolokalisationen von PML-Körperchen und Proteasomen ist nach 3D-Rekonstruktion von Aufnahmen aus verschiedenen Ebenen der Patientenzelle dargestellt. Die roten Punkte repräsentieren die Proteasomen, die grünen die PML-Körperchen nach Inkubation mit spezifischen monoklonalen Antikörpern. Die gelben Bereiche spiegeln die Kolokalisationen von PML-Körperchen und Proteasomen wieder. Die Schichtaufnahmen wurden am CLSM, die 3D-Rekonstruktion mit der Software Amira angefertigt. Eichstrich 10 µm.

In späten Passagen (#12) war die Aggregation der 20S-Proteasomen in distinkten punktförmigen Kernarealen im Vergleich zu Kontrollmyoblasten derselben Passage (#12) noch wesentlich stärker ausgeprägt (Abb. 5.28 A a').

In einer Studie wurde beschrieben, dass die nukleäre Proteindegradation durch Proteasomen in bestimmten nukleoplasmatischen Kernbereichen vorkommt. Weiterhin ist bekannt, dass diese Bereiche stellenweise mit Proteinen aus bestimmten nukleären Domänen, wie den „promyeocytic leukemia“ (PML)-Körperchen überlappen (Rockel et al., 2005). Diese PML-

Körperchen spielen eine wichtige Rolle als dynamische Sensoren für zellulären Stress und repräsentieren Bereiche, in welchen wichtige Faktoren in Folge von zellulärem Stress post-transkriptionell modifiziert werden (Dellaire et al., 2004). Auch wurde berichtet, dass PML-Körperchen als Zentren des proteolytischen Abbaus fungieren können (Rockel et al., 2005; Wojcik und DeMartino, 2003). Um festzustellen, ob auch die beobachteten Proteasomen-aggregate in Kontakt zu PML-Körperchen stehen, wurden Doppelimmunfluoreszenzstudien mit monoklonalen Antikörpern gegen PML-Körperchen und der 20S-Proteasom-Untereinheit durchgeführt.

Wie in Abb. 5.28 darstellt, konnte eine Anlagerung und eine partielle Kolokalisierung der Proteasomen an PML-Körperchen in *LMNA* R545C-Patientenzellen nachgewiesen werden (Abb. 5.28 A a''', a''''). Dagegen war in Kontrollzellen die Anzahl der PML-Körperchen reduziert und es konnte keine Aneinanderlagerung von PML-Körperchen und Proteasomen, aufgrund fehlender Aggregation, festgestellt werden (Abb. 5.28 A b'-b''')

Um diesen Phänotyp besser analysieren zu können, wurden die Aneinanderlagerungen und Kolokalisationen von PML-Körperchen und Proteasomen nach 3D-Rekonstruktion von Aufnahmen aus verschiedenen Ebenen der Patientenzelle dargestellt (Abb. 5.28 B). Die Aufnahmen wurden mit dem CLSM angefertigt und die einzelnen Bilder mit der Software Amira zusammengefügt. Die roten Punkte repräsentieren die Proteasomen, die grünen die PML-Körperchen. Die gelben Bereiche spiegeln die Kolokalisationen von PML-Körperchen und Proteasomen wieder. Auch hier ist die partielle Kolokalisation bzw. Aneinanderlagerung von PML-Körperchen und Proteasomen gut zu erkennen.

Zusammengenommen lässt sich sagen, dass es in Patientenzellen zu einer Passagen-abhängigen Aggregation von Proteasomen kam, die mit PML-Körperchen partiell kolokalisierten oder an diese angelagert waren.

5.2.5 *LMNA* R545C Myoblasten weisen eine veränderte Verteilung des CDK-Inhibitors p21 auf

Die abnormale Akkumulation der Proteasomen im Kern von *LMNA* R545C-Myoblasten warf nun die Frage auf, ob diese Beobachtung mit einer Veränderung der Funktionalität des Proteasoms in Verbindung steht. Neben den schon erwähnten Funktionen des Proteasoms (siehe auch 5.2.4) verhindert das Proteasom die Anreicherung der CDK-Inhibitoren p19, p21 und p27 im Kern, welche unter anderem als Seneszenz-hemmende Faktoren gelten (Noda et al., 1994; Mawal-Dewan et al., 2003). Es ist bekannt, dass eine Inhibierung des Proteasoms durch die Droge MG-132, zu einer Verminderung der proteasomalen Degradation von p21 führt (Sheaff et al., 2000). Um die proteasomale Aktivität zu untersuchen, wurden immunfluoreszenz-mikroskopische Analysen zur Verteilung von p21 in Kontroll- und *LMNA* R545C-Myoblasten durchgeführt. In wildtypischen Myoblasten (#12) konnte p21 nur im Zytoplasma nachgewiesen

Ergebnisse

werden, während in Patientenzellen (#12) eine p21-Markierung entweder im Kern (Abb. 5.28 A c', Pfeil) bzw. im Zytoplasma (Abb. 5.28 A b'), oder aber in beiden Fraktionen (Abb. 5.28 A b', Pfeil) festgestellt werden konnte. Um zu evaluieren, ob p21 tatsächlich umverteilt ist, wurden zusätzlich Immunblot-Analysen durchgeführt. Dafür wurden Proteinextrakte aus 10^6 Kernen von Kontroll- bzw. Patientenzellen aufgetrennt (Abb. 5.29 B) und mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen p21 inkubiert. Diese Experimente ergaben, dass p21 nur in *LMNA* R545C-Zellkernextrakten detektiert werden konnte (Abb. 5.29 C).

Die Anreicherung des CDK-Inhibitors p21 in Patientenzellen bestätigt die Hypothese, dass die Aktivität der 20S-Proteasomen in *LMNA* R545C-Myoblasten tatsächlich inhibiert ist.

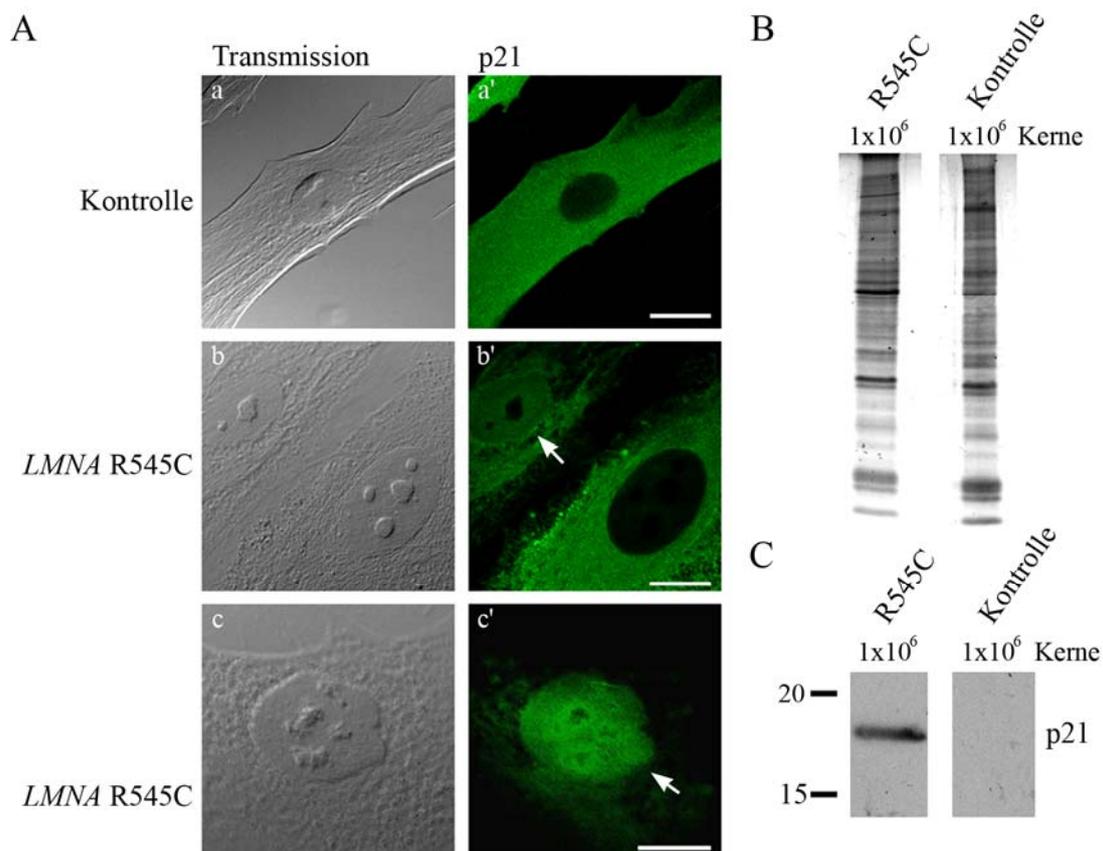


Abb. 5.29: Veränderte Lokalisation des CDK-Inhibitors p21 in *LMNA* R545C-Myoblasten. (A) Indirekte Fluoreszenzaufnahmen zeigen eine Anreicherung von p21 in Kernen einer Subpopulation von Patientenzellen (#9) nach Inkubation mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper (A b', c', Pfeile). In Kontrollzellen ist p21 im Zytoplasma verteilt (A a'). Etwa 50 % der Patientenzellkerne sind im Vergleich zu Kontrollzellen um das 1-2fache vergrößert (a', c'). Die korrespondierenden Transmissionsaufnahmen (a, b, c) sind zusätzlich dargestellt. Eichstriche 20 μ m. (B) Proteine aus 10^6 *LMNA* R545C-Zellen bzw. Kontrollzellen der Passage 9 wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und mit dem Farbstoff Coomassie markiert. (C) Die aufgetrennten Proteine wurden auf Nitrozellulose transferiert und mit dem monoklonalen Antikörper p21 inkubiert. Nur der Kernextrakt aus Patientenzellen zeigt ein p21-Signal.

Eine Vergrößerung von Zellkernen ist ein weiteres Anzeichen für eine frühzeitige Seneszenz (Kobayashi et al., 2008). Es konnte auch eine Passagen-abhängige 1-2fache Vergrößerung von 50 % der Kerne aus Patientenzellen in späten Passagen im Vergleich zu Kernen von Kontrollzellen beobachtet werden (Abb. 5.29 A a', c').

5.2.6 Heterochromatin akkumuliert im Zellkern von *LMNA* R545C Myoblasten

Eine frühere Studie hat ergeben, dass eine Inhibierung der Proteasomen eine Veränderung der Chromatinstruktur induziert, die charakteristisch für seneszente Zellen ist. Diese Akkumulation von Heterochromatin konnte in Zellen, die sich in späten Passagen befanden, beobachtet werden (Ukekawa et al., 2004). Um festzustellen, ob es auch in *LMNA* R545C-Myoblasten zu Seneszenz-bedingter Änderung der Chromatinstruktur kommt, wurden Patientenzellen in späten Passagen (#22) mit dem DNA-spezifischen Farbstoff DAPI gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht, sowie Präparate für das Elektronenmikroskop hergestellt und analysiert.

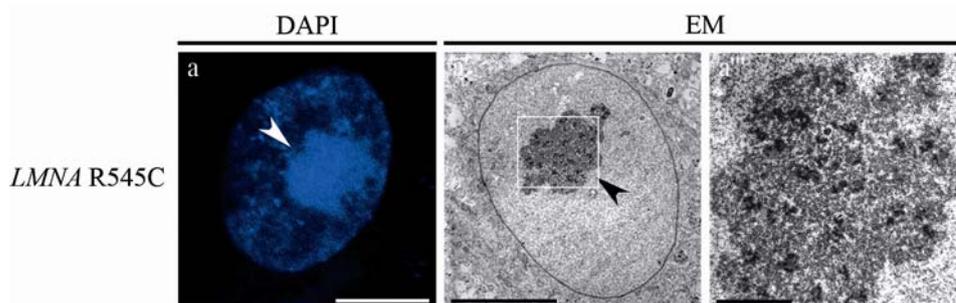


Abb. 5.30: Heterochromatin akkumuliert im Zellkern von *LMNA* R545C-Myoblasten. Die DNA-Markierung mit dem DNA-spezifischen Farbstoff DAPI zeigt eine Akkumulation von Heterochromatin in Patientenzellen in späten Passagen (#22). Auch weisen transmissionselektronische Aufnahmen Anreicherungen von Heterochromatin im Kern auf, welches nicht mehr an die Kernhülle angeheftet ist (a', a''). Der markierte Bereich ist vergrößert dargestellt (a''). Eichstriche (a, a') 20 μm ; (a'') 2 μm .

Im Gegensatz zu Patientenzellen in frühen Passagen bzw. Kontrollzellen (Daten werden nicht gezeigt), konnte in Patientenmyoblasten in der späten Passage 12 eine deutliche Heterochromatinakkumulation im Zellkern beobachtet werden. Auch war das Chromatin in diesen Zellen nicht mehr an die Kernhülle angeheftet, wie die Fluoreszenz- und EM-Aufnahmen deutlich zeigen (Abb. 5.30 a-a'').

5.2.7 *LMNA* R545C Myoblasten zeigen eine verringerte Effizienz der Zelldifferenzierung und der Formierung von Myotuben

Bisher haben viele verschiedene Hypothesen versucht zu erklären, wie Mutationen im *LMNA*-Gen die verschiedenen Krankheiten auslösen könnten. Eine Hypothese davon basiert auf einer veränderten Regulierung der Genexpression in differenzierenden Zellen, beruhend auf fehlerhaften Typ A-Laminen. Diese abnormale Genregulation könnte in einem Verlust der Zelldifferenzierung resultieren (Cohen et al., 2001). Um dies zu prüfen, wurde der mögliche Einfluss der AD-EDMD-Mutationen auf die Differenzierung von Myotuben *in vitro* getestet. Das Ausmaß der Differenzierung wurde durch die Analyse der Formierung von mehrkernigen Zellen zu Myocyten am Phasenkontrastmikroskop überprüft. Dafür wurde die Differenzierung der Myoblasten zu Myocyten durch Inkubation der Myoblastenlinien in Minimalmedium („low serum medium“) eingeleitet (Tag 0). Die Zellen wuchsen 2, 3 oder 6 Tage. Die Quantifizierung der

Zellfusionen erfolgte nach Fixation in Methanol und Färbung mit dem Farbstoff Giemsa. Zellen, die 3 oder mehr Kerne hatten, wurden als Myotuben/mehrkernige Zellen gezählt und das Verhältnis der Kerne [(Kerne in Myotuben/Gesamt-Kerne)] kalkuliert.

Die Beobachtungen am Phasenkontrastmikroskop ließen erkennen, dass die Formierung von mehrkernigen Myocyten in AD-EDMD-Myoblasten mit der Mutation *LMNA* R545C (#8) im Gegensatz zu wildtypischen Myoblasten (#4, 8), herabgesetzt war. Die statistische Auswertung der Anzahl von mehrkernigen Zellen in den verschiedenen Passagen von Kontrollzellen ergab, dass die Formierung mehrkerniger Myocyten von Passage 4 bis zur Passage 16 von 47 % auf 11 % reduziert war. Da sich im Gegensatz zu Kontrollzellen die Kultivierung von AD-EDMD-Zellen als sehr schwierig gestaltete, waren wir nur in der Lage *LMNA* R545C-Myoblasten der Passagen 8 bis 16 zu analysieren. Die Untersuchungen zeigten, dass die Formierung von mehrkernigen Myocyten in *LMNA* R545C-Zellen in allen untersuchten Passagen nahezu unterbunden wurde. Der Anteil von mehrkernigen Myocyten reduzierte sich von 4 % (#8) auf 1 % (#16).

Das beobachtete reduzierte Potential zur Differenzierung der Patientenmyoblasten lies vermuten, dass die Expression von wichtigen regulatorischen Faktoren des Differenzierungsprozesses verändert war. Um dies zu klären, wurden der Grad der Expression von den Proteinen Lamin A, Lamin C, MyoD, Myogenin und hyperphosphoryliertem Retinoblastoma-Protein (ppRb) und hypophosphoryliertem Retinoblastoma-Protein (pRb) analysiert. MyoD und Myogenin sind zwei bHLH (basische Helix-Loop-Helix) Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle in der Myogenese spielen. Das hypophosphorylierte Retinoblastoma-Protein reguliert die Arretierung des Zellzyklus und agiert synergistisch zu MyoD, um die Transkription von späten Muskelspezifischen Faktoren zu aktivieren (Puri et al., 2001; Guo et al., 2003). Dafür wurden Gesamtproteinextrakte aus Kontroll- sowie *LMNA* R545C-Zellen, nach Einleitung der Differenzierung durch Inkubation der Zellen in Minimalmedium von Tag 0 und Tag 6 hergestellt. Die Extrakte wurden mittels Immunblot und spezifischer Antikörper auf die Expression der Proteine hin untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die Expression von Lamin A und C von Tag 0 bis Tag 6 in Kontroll- und Patientenzellen stabil war. In primären humanen Kulturen undifferenzierter Myoblasten konnte MyoD nicht nachgewiesen werden (Abb. 5.31 C, Tag 0). Nach 6 Tagen, als sich mehrkernige Myocyten formten, konnte in Kontrollzellen MyoD und Myogenin nachgewiesen werden (Abb. 5.31 C, Tag 6). Im Gegensatz dazu konnte wegen der reduzierten Differenzierung Myogenin weder an Tag 1, noch an Tag 6 detektiert werden (Abb. 5.31 C).

Es ist bekannt, dass MyoD während der Myogenese früher als Myogenin induziert wird (Parker et al., 2006; Baskin und Hauschka, 1989). Da MyoD in Patientenzellen nachgewiesen werden konnte, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Differenzierung der *LMNA* R545C-Zellen erst nach der Einleitung des Differenzierungsprozesses gestört wurde.

Ergebnisse

Auch die Expression von Retinoblastoma, ein Marker der Proliferation, war in Patientenzellen verändert. Kontroll- sowie *LMNA* R545C-Myoblasten exprimierten am Tag 0 sowohl pRb und ppRb, was für nicht-synchronisierte Zellpopulationen zu erwarten war. 6 Tage nach Einleitung der Differenzierung konnte in Kontroll- sowie in Patientenzellen ppRb nicht mehr nachgewiesen, sowie eine Akkumulation von pRb beobachtet werden, was ein Zeichen für einen Proliferationsarrest ist. Die Detektion von pRb war in Patientenzellen im Vergleich zu Kontrollzellen jedoch signifikant erniedrigt, was durch eine ineffiziente Induktion der Expression durch MyoD erklärt werden könnte.

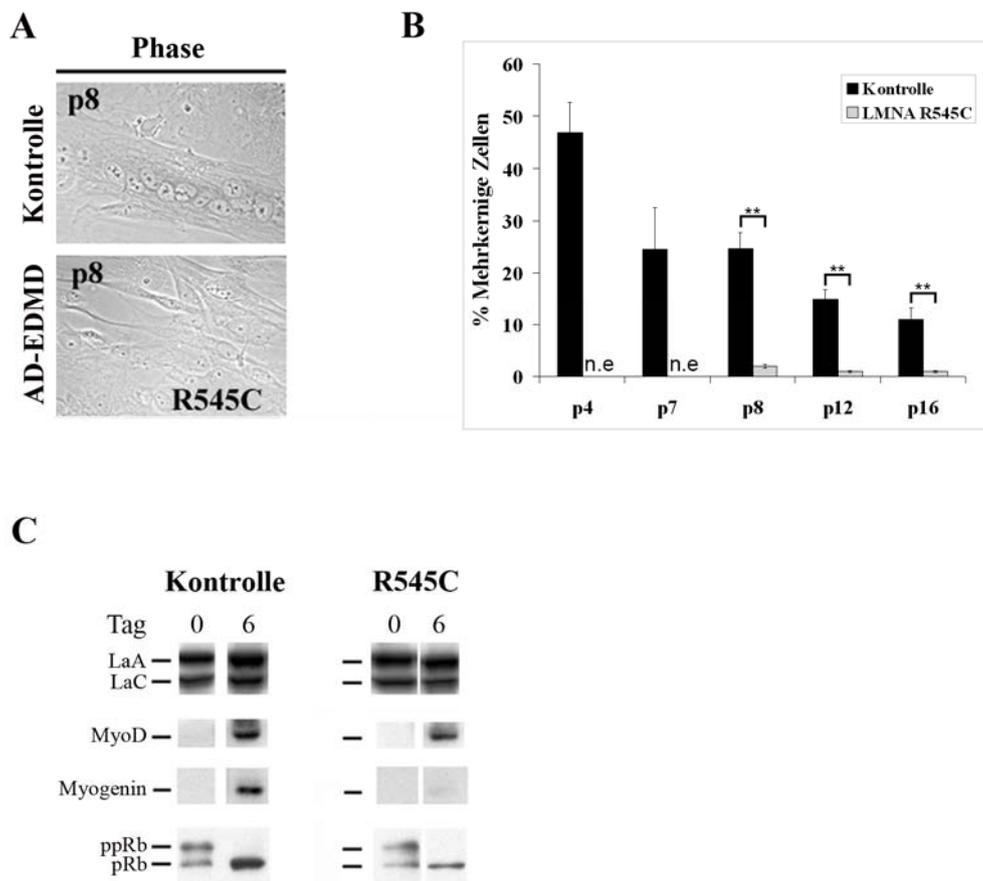


Abb. 5.31: AD-EDMD-Myoblasten zeigen eine verminderte Effizienz der Zell-Differenzierung. (A) Beobachtungen am Phasenkontrastmikroskop weisen eine verringerte Formierung von mehrkernigen Myocyten in AD-EDMD-Myoblasten mit der Mutation *LMNA* R545C (#8) auf. In wildtypischen Muskelzellen sind Formierungen von mehrkernigen Myocyten (#4, 8) zu erkennen. (B) Statistische Auswertung der Anzahl mehrkerniger Zellen in den Passagen 4, 7, 8, 12 und 16 von Kontrollzellen und AD-EDMD-Zellen mit der Mutationen *LMNA* R545C. Je höher die Passage der Muskelzellen ist, desto niedriger ist die Anzahl der formierten mehrkernigen Zellen. Die Formierung von mehrkernigen Muskelzellen in *LMNA* R545C-Zellen ist in allen Passagen nahezu unterbunden. Der Anteil von mehrkernigen Myocyten reduzierte sich von 4 % (#8) auf 1 % (#16). Es wurden je 100 Zellen ausgewertet. n.e = nicht ermittelbar. $** < 0,01$. (C) Durch Immunblotanalysen von aufgetrennten Proteinextrakten (10 µg/Spur) wurde die Expression von Lamin A und Lamin C, MyoD, Myogenin, hyperphosphoryliertem Retinoblastoma-Protein (ppRb) und hypophosphoryliertem Retinoblastoma-Protein (pRb) an den Tagen 0 und 6 nach Einleitung der Differenzierung in Kontroll- und *LMNA* R545C-Zellen analysiert. Am Tag 6 der Differenzierung ist eine eingeschränkte Expression von Rb in Patientenzellen zu beobachten. Die Expression von Myogenin an Tag 6 ist in Patientenzellen nicht zu detektieren.

Diese Resultate zeigen, dass die Mutation *LMNA* R545C zu einer Anhäufung von Muskel-Vorläuferzellen führt, die nicht in der Lage sind, eine korrekte Myogenese zu durchlaufen.

5.2.8 Wildtypisches Bänderungsmuster in Laminfilamenten bei der Formation von Lamin R545C-Parakristallen *in vitro*

Wie gezeigt werden konnte, ist die Mobilität sowie die Löslichkeit von Lamin A S143F reduziert, was auf molekulare Veränderungen in der Zusammenlagerung zu Protofilamenten oder höher geordneten Strukturen durch die Lamin-Mutation S143F begründet sein könnte. Die Mutation *LMNA* R545C liegt im carboxyterminalen Bereich des Lamin A_s, welcher nicht für die Dimerisierung bzw. Polymerisierung der Lamine verantwortlich ist. Um zu Überprüfen, ob die Bildung von höheren Strukturen von Laminen dennoch beeinflusst war, wurde auch mit dieser Mutation die Laminfilamentbildung *in vitro* untersucht (siehe 5.1.14; Abb. 5.19 c).

Wie festgestellt werden konnte, war kein messbarer Unterschied im Bänderungsmuster nach Formationen zu Parakristallen mit Lamin A R545C im Vergleich zu Formationen aus wildtypischen Laminen, ersichtlich (Abb. 5.20 B). Auch heterogene Gemische aus wildtypischem und *LMNA* R545C-Lamin zeigten keine Unterschiede im Bänderungsmuster.

6 Diskussion

Lamine sind Typ V Intermediärfilamente, die eine wichtige Rolle bei der strukturellen Integrität des Zellkernes, der Chromatinorganisation, der Transkription, der DNA-Replikation, der Differenzierung und der Genomstabilität einnehmen (Goldman et al., 2002; Worman und Courvalin, 2005). In den letzten Jahren wurden über 200 unterschiedliche Mutationen im *LMNA* Gen gefunden, die bis zu 10 verschiedene Erkrankungen auslösen können (Broers et al., 2006; Gotzmann und Foisner, 2005; Gruenbaum et al., 2005). Obwohl die Kern-Lamina eine Struktur ist, welche in allen Zelltypen vorkommt, sind die klinischen Symptome der Laminopathien auf bestimmte Gewebearten wie z.B. Fett- oder Muskelgewebe, beschränkt. Zu diesen Gewebespezifischen Erkrankungen gehören z.B. das Hutchinson-Gilford Progerie-Syndrom, eine Erkrankung, einhergehend mit vorzeitiger Alterung (HGPS; Erikson et al., 2003), und die Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD; Bonne et al., 1999; Clement et al., 2000).

6.1 Die Mutation *LMNA* S143F

Die Patientin mit der Mutation *LMNA* S143F zeigte eine einzigartige Kombination phänotypischer Merkmale einer frühen Myopathie und einer Progerie. Symptome dieser Erkrankung sind unter anderem progressive Muskelhypertonien, Schwächungen der Rumpf- und Wirbelmuskulatur, Osteopenie bis hin zur Osteolyse und Kontrakturen der Achillessehnen oder Ellenbogen (siehe 2.4.1.3; Kirschner et al., 2005). Diese Krankheit lässt sich somit der Gruppe der Laminopathien zuordnen, für die überwiegend Mutationen im Lamin- und Emerin-Gen verantwortlich sind (Übersicht siehe Gruenbaum et al., 2003). Diese heterozygote, nicht vererbare missense-Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch von Serin durch Phenylalanin an der Position 143 (S143F) im aminoterminalen Bereich des *LMNA*-Gens. Diese Mutation resultiert aber nicht, wie bei dem Hutchinson-Gilford Progerie-Syndrom, in einem verkürzten Protein (De Sandre-Giovannoli et al., 2003). In dieser Arbeit wurden die Fibroblasten einer 7-jährigen Patientin mit der Mutation *LMNA* S143F untersucht. Im Unterschied zu den meisten Progerie-auslösenden Mutationen, die im C-terminalen Bereich des Lamin A-Proteins lokalisieren, ist nur wenig über Mutationen bekannt, die sich im N-Terminus des Proteins befinden.

6.1.1 *LMNA* S143F Fibroblasten zeigen morphologische Defekte des Zellkerns

In einigen wissenschaftlichen Studien wurde dargelegt, dass EDMD und progeroide Erkrankungen (das Werner-Syndrom (Adelfalk et al., 2005), das atypische Werner-Syndrom (Jacob et al., 2005) und die klassische HGPS mit der stillen Mutation G608G (Goldmann et al., 2004)), deutliche morphologische Abnormalitäten des Zellkerns aufweisen. Es konnte z.B. bei dem HGPS eine ausgeprägte Lappung der Kernhülle bis hin zur Bildung von Mikronuklei, sowie Veränderungen der Dichte des Heterochromatins (Goldman et al., 2004) beobachtet werden.

Weiterhin weisen Myozyten von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie Ausstülpungen auf, die auf einer Ablösung der äußeren von der inneren Kernmembran basieren (Verga et al., 2003). Auch waren in *LMNA* S143F-Fibroblasten morphologische Deformationen des Zellkerns zu erkennen, die allerdings bisher in noch keiner anderen Laminopathie nachgewiesen werden konnten. So waren partielle Ausstülpungen der Kernhülle, welche von einer verdickten Lamina umrahmt sind, zu beobachten. Die Ausprägung der Deformationen der Kernhülle der Patienten-Fibroblasten reichten von kleinen partiell auftretenden „blebs“ bis hin zu einer Bildung von Mikronuklei, wie sie auch schon bei dem HGPS festgestellt werden konnten (Abb. 5.2; Hegele 2003).

Die Proteine der SUN-Familie sind Bestandteile des LINC Komplexes (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton), der das Aktin über Nesprine mit der Lamina und nukleoplasmatischen Komponenten verbindet (Crisp et al., 2006). Dass eine Störung dieses Komplexes zu morphologischen Defekten des Zellkerns führen kann, wurde durch ein Experiment belegt, in dem der zelluläre Phänotyp von SUN1/2 depletierten Zellen näher analysiert wurde. So konnte auch in diesen Zellen morphologische Kern-Abnormitäten festgestellt werden, die jedoch auf einer Vergrößerung des perinukleären Spaltes beruhen (Crisp et al., 2006) und sich somit von dem beobachteten morphologischen Phänotyp der S143F-Fibroblasten unterscheiden. Allerdings konnte mittels Immunfluoreszenzanalysen eine normale Verteilung von SUN1/2 entlang der Kernmembran von *LMNA* S143F-Zellen beobachtet werden (Daten werden nicht gezeigt). Dies lässt darauf schließen, dass das mutierte Lamin A für das Auftreten der Kerndeformationen verantwortlich ist.

6.1.2 Einfluss der Mutation *LMNA* S143F auf die Lokalisation und Funktion von Proteinen der inneren Kernhülle

Einfluss der Mutation auf die Chromatin-assoziierten Proteine

Nach Untersuchungen der Lokalisation von Markern von aktivem und inaktivem Chromatin konnten wir feststellen, dass die Organisation und Topologie des Chromatins in den S143F-Patientenzellen verändert war. So konnten in 50 % der Patientenzellen in großen Bereichen des Zellkerns keine acetylierten Lysinreste beobachtet werden (Abb. 5.8 c, d). Eine erniedrigte Acetylierung von Lysinresten („Hypoacetylierung“) der Kern-Histone bedeutet eine dichtere Verpackung der DNA und damit eine erniedrigte Zugänglichkeit der DNA für transkriptionsrelevante Proteine, woraus eine herabgesetzte transkriptionelle Aktivität resultiert (Allfrey, 1966). Nicht nur die acetylierten Kern-Histone waren umlokalisiert, sondern auch das Linker-Histon H1, das für die Bildung des Heterochromatins zuständig ist, d.h. es ist verantwortlich für die Ausbildung der 30 nm Solenoidstruktur (Cole, 1987). Histon H1 war in vielen Zellen in fokale Bereiche umverteilt (Abb. 5.8 A a, b). Eine weitere Bestätigung der Annahme der abnormalen

Chromatinorganisation war die veränderte Verteilung des Methyl-CpG-Bindungsproteins 2 (MeCP2) in Patientenzellkernen. MeCP2 ist ein transkriptioneller Repressor, der zu einer lokalen Deacetylierung der in den Nukleosomen vorhandenen Histonen und somit zu einer kompakten Chromatinstruktur, die für die Transkriptionsmaschinerie nicht mehr zugänglich ist, führt (Wade et al., 1998). So konnte eine Akkumulation des Proteins an den Zellpolen bzw. in den Mikrokernen beobachtet werden. Auch war ersichtlich, dass in einer Vielzahl von Patientenzellen das Protein nicht detektierbar war (Daten werden nicht gezeigt). Diese Daten sprechen dafür, dass durch Veränderungen der Chromatinstruktur Einfluss auf die Transkription genommen werden könnte.

Allerdings konnten Analysen mit dem Durchflusszytometer die Veränderung der Chromatinstruktur nicht direkt bestätigen. Wir untersuchten die Fluoreszenzintensität des Heterochromatinproteins 1 alpha (HP1), einem Marker von inaktivem Chromatin, und des acetylierten Histons H3, einem Marker von aktivem Chromatin. HP1 ist für die Verpackung des Chromatins zu Heterochromatin wichtig (Maison et al., 2004), die Acetylierung des Histons H3 an der Stelle Lysin 9 sorgt für eine gesteigerte Zugänglichkeit des Chromatins für den Transkriptionsapparat (Tse et al., 1998). Die Intensitäten der untersuchten Proteine waren in Patienten- sowie Kontrollzellen gleich (Abb. 5.8 C). Da mittels Durchflusszytometrie aber nur Fluoreszenzintensitäten der gesamten Zelle gemessen werden können, schließen diese Resultate eine Umverteilung der Proteine im Zellkern nicht aus.

Einfluss der Mutation auf die RNA-Polymerase II

Eine Analyse der Verteilung der RNA Polymerase II konnte bestätigen, dass die Transkription in den mutierten Fibroblasten verändert war. So konnten wir die transkriptionell aktive Form der RNA-Polymerase II in über der Hälfte der Patientenzellen nicht nachweisen (Abb. 5.6 A, B). Dies ist nicht überraschend, da aus früheren Arbeiten schon bekannt war, dass eine abnormale Kernorganisation zu Veränderungen in der Genexpression führen kann („Genexpressions-Modell, siehe 2.4.1.4; Filesi et al., 2005; Goldman et al., 2004; Reichart et al., 2004). Weiterhin wurde auch postuliert, dass die Lamina ein Gerüst für Proteinkomplexe zur Verfügung stellen, die in der Lage sind, regulatorisch in die Genexpression eingreifen zu können (Cohen et al., 2001). Wie wir feststellen konnten, und es auch aufgrund der morphologischen Kerndeformationen zu erwarten war, lokalisierte Lamin A/C in den S143F-Zellen nicht normal an der Kernhülle (Abb. 5.3). Allerdings konnte die unregelmäßige Verteilung von Lamin A/C in Form eines Honigwabenmusters schon in anderen Fibroblasten von Laminopathie-Patienten nachgewiesen werden (Vigouroux et al., 2001; Favreau et al., 2003). Durch die Erkenntnis, dass die innere Kernmembran als „Ruheplatz“ für Transkriptionsfaktoren fungiert (Heessen und

Fornerod, 2007) könnte somit eine veränderte Laminorganisation bestimmte Transkriptionsfaktoren und damit die Polymerase II-abhängige Transkription inhibieren (Spann et al., 2002). Es ist weiterhin beschrieben worden, dass Lamine zusätzlich in die Bildung und Aufrechterhaltung funktionaler höher geordneter Chromatinstrukturen involviert sind (Gotzmann und Foisner, 1999). Typ A-Lamine können z.B. direkt mit Chromatin durch ihre C-terminale Domäne interagieren (Stierle et al., 2003; Mattout et al., 2007), jedoch wird dieser Bereich nicht durch die Mutation *LMNA* S143F, die sich im N-terminalen Bereich des Lamin A befindet, beeinflusst.

Einfluss der Mutation auf LEM-Proteine

Eine alternative Erklärung der beobachteten Abnormitäten in der Chromatinorganisation und transkriptionellen Aktivität könnte die drastische Reduktion von LAP β und die Umverteilung von LAP2 α (Abb. 5.4 A, C) und Emerin (Abb. 5.4 B) in den *LMNA* S143F-Zellen sein.

Es ist bekannt, dass LAP2 und Emerin nicht nur eine Rolle in der strukturellen Integrität des Zellkerns spielen, indem sie die Lamina in der Kernmembran verankern, sondern dass diese Proteine direkt bzw. indirekt an DNA binden (Foisner und Gerace, 1993; Ye und Worman, 1994; Furukawa et al., 1998 und 1999) und mit Chromatin Komplexe bilden können (Dechat et al., 2000).

Darüber hinaus gehören Proteine der LAP2-Familie und Emerin zu den LEM-Domänen-Proteinen und können über diese hoch konservierte Domäne mit dem Protein BAF (Barrier-to-Autointegration-Factor), welches unspezifisch an DNA bindet, interagieren. Durch diese Bindung an BAF können Emerin und LAP2 β während der Interphase Chromatin an die Kernhülle binden und spielen somit eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung höher geordneter Chromatinstrukturen (Lee et al., 2000; Lin et al., 2000). Auch ist das nukleoplasmatische LAP2 α in der Lage BAF, nukleoplasmatisches Lamin A/C und Chromatin zu binden (Dechat et al., 1998; Dechat et al., 2000; Vlcek et al., 2002).

Weiterhin ist bekannt, dass LAP2 β als transkriptioneller Repressor dient, welcher mit der Klasse-I Histon-Deacetylase (HDAC3) an der Kernmembran interagiert und dadurch die Histon H4-Deacetylierung induziert (Somech et al., 2005). Dadurch könnten Veränderungen in der Expression von LAP2 β direkten Einfluss auf Kernfunktionen, wie die Transkription nehmen.

Es nahe liegend, dass der pathogene Einfluss der *LMNA* S143F Mutation auf die Struktur und Integrität der Kern-Lamina sowie auf das nukleoplasmatische Laminnetzwerk so gravierend ist, dass es zu abnormalen Verteilungen von Emerin und LAP2-Proteinen kommt, obwohl die jeweiligen Bindestellen von Lamin A zu Emerin bzw. LAP2 nicht direkt beeinflusst werden. Somit könnte über die oben genannten Mechanismen Einfluss auf die Transkription genommen werden.

Aufgrund dessen könnten diese Abnormitäten in der Lokalisation eine direkte Auswirkung auf die Genregulation haben, da die Proteine LAP2 und Emerin mit transkriptionellen Regulatoren interagieren. So konnte schon nachgewiesen werden, dass Emerin *in vitro* einen Komplex mit Lamin A und GCL, einem transkriptionellem Repressor, bilden kann (Holaska et al., 2003). Bestätigt werden kann diese Annahme durch Analysen mit dem Durchflusszytometer zur Lokalisation des transkriptionellen Regulators Retinoblastoma-Protein. Das Retinoblastoma-Protein kann an den Komplex aus Typ A-Lamin, LAP2 α und E2f-DP3 binden. Erst wenn pRb aus diesem Komplex entlassen wird, werden zellzyklus-abhängige Gene aktiviert (Mancini et al., 1994; Markiewicz et al., 2002, Dorner et al., 2006). Liegt Retinoblastoma in hyperphosphorylierter Form vor, kann es den Transkriptionsfaktor E2F nicht mehr binden, dieser ist somit aktiv und kann die DNA-Synthese aktivieren (Nevins et al, 1991).

Wir konnten durch Untersuchungen von *LMNA* S143F-Patientenzellen zeigen, dass es zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität von hyperphosphoryliertem Retinoblastoma im Vergleich zu Kontrollzellen kommt (Abb. 5.7 c). Dies könnte eine Deaktivierung der DNA-Synthese zur Folge haben. Ursache dafür könnte eine fehlerhafte Komplexbildung aufgrund einer Misslokalisierung von LAP2 α oder einer gestörten Bindungsaffinität zu dem mutierten S143F Lamin A sein. So wurde schon dargelegt, dass eine Reduktion oder veränderte Lokalisation von LAP2 α zu einer fehlerhaften Lokalisation von Rb führen kann (Markiewics et al., 2002).

Wie wir weiterhin beobachten konnten, war Lamin B, eine weitere wichtige Hauptstrukturkomponente der Lamina, in deformierten Bereichen des Kernes von *LMNA* S143F-Fibroblasten nur reduziert zu detektieren (Abb. 5.5). Diese fehlerhafte Verteilung von Lamin B könnte ebenso die Genregulation beeinflussen. Erst kürzlich ist berichtet worden, dass Chromatin an Lamin B1 über spezifische DNA-Regionen, den so genannten LADs (Lamina-assoziierte Domänen) bindet (siehe 2.2.3). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Genexpression in Bereichen dieser LADs herunterreguliert ist (Guelen et al., 2008). Eine fehlerhafte Verteilung von Lamin B könnte somit über eine veränderte Bindung an Chromatin über die LADs die Genexpression beeinflussen. Ein Zusammenhang von LADs und Lamin A/C konnte bisher allerdings noch nicht hergestellt werden.

Zusammengenommen lassen diese Resultate darauf schließen, dass die *LMNA* S143F Mutation, neben der strukturellen Integrität des Zellkerns, auch direkt oder indirekt in die transkriptionelle Aktivität und die Chromatinorganisation beeinflusst.

Ein anderes spezifisches zelluläres Merkmal der *LMNA* S143F-Fibroblasten im Vergleich zu Kontrollzellen war die erhöhte Anzahl von DNA-Reparatur-Foci (Abb. 5.9 A, B). In einer früheren Studie wurde bereits gezeigt, dass Zellen von HGPS-Patienten aufgrund von genomischer Instabilität bzw. gehäuften DNA-Schäden, die sich oftmals in DNA-Doppelstrangbrüchen äußern, eine dauerhafte Aktivierung von Kontrollpunkten für DNA-Schäden aufweisen (Liu et al., 2006).

Die Phosphorylierung von Histon H2A.X (als gammaH2A.X bezeichnet) und die Mobilisierung von Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) spielen zentrale Rollen bei der Aktivierung der Kontrollpunkte (Abraham, 2001; Li und Zou, 2005; siehe auch 4.5.10). Jedoch wurde in dieser Studie berichtet, dass der Grund der genomischen Instabilität die Anhäufung von Prelamin A sei, welches jedoch in den S143F-Fibroblasten nicht vorzufinden ist. Auch steht mit den DNA-Schäden eine erhöhte zelluläre Seneszenz in Verbindung (Lombard et al., 2005). Analysen von zellulärer Seneszenz zeigten aber keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Patientenzellen auf (Daten werden nicht gezeigt). Über die Ursache dieser Erhöhung der DNA-Reparatur-Foci kann nur spekuliert werden. Eventuell spielt hier auch die Umstrukturierung des Chromatins oder aber die erwähnte mögliche Beeinflussung der DNA-Synthese durch spezifische Transkriptionsfaktoren eine Rolle.

6.1.3 Die Mutation *LMNA* S143F beeinflusst die Lokalisation der Nesprin2-Proteine

Die Proteinfamilie der Nesprine gliedert sich in Säugetieren in Nesprin1, Nesprin2 und Nesprin3 auf und repräsentiert eine neue Klasse multifunktionaler Proteine. Die zwei Isoformen Nesprin1 und Nesprin2 besitzen eine N-terminale Aktin-Bindungsdomäne (ABD), eine große Stabdomäne bestehend aus Spektrinwiederholungen und die C-terminale KASH-Domäne, welche die Verankerung des Zellkerns zum Aktin-Zytoskelett vermitteln (Padmakumar et al., 2005; Starr und Fischer, 2005; Tzur et al., 2006).

In verschiedenen Arbeiten konnte schon dargelegt werden, dass Nesprin1 α *in vitro* und Nesprin2 *in vivo* mit Lamin A/C und Emerin interagieren können und die Lokalisation von Nesprin2 von einer intakten Lamina abhängt (Muchir et al., 2003; Libotte et al., 2005).

Eine frühere Studie belegte die Beteiligung von Nesprinen an Laminopathien. So wurde gezeigt, dass die LGMD-auslösende heterozygote bzw. homozygote Mutation Y259X im Lamin A/C zu einer Misslokalisierung von Nesprin1 α und Emerin führt (Muchir et al., 2003). Andere Arbeiten bringen Nesprine mit der Entstehung von EDMD in Verbindung (Mislow et al., 2002.; Zhang et al., 2005; Wheeler et al., 2007). Interessanterweise wurde verdeutlicht, dass Mutationen im Emerin und Lamin A/C nur in ca. 50 % der EDMD-betroffenen Patienten gefunden wurden und somit andere mutierte Proteine mit involviert sein könnten (Bonne et al., 2003). Eine erst kürzlich veröffentlichte Arbeit bringt Nesprin als direkten Auslöser von EDMD in Verbindung. So wurden in EDMD-Patienten verschiedene Nesprin1- und Nesprin2-Mutationen nachgewiesen (Zhang et al., 2007). Einer Erklärung zur Entstehung dieser EDMD liegt die fehlerhafte Interaktion von Nesprin mit Lamin A/C und Emerin und damit eine Störung des LINC-Komplexes (**L**inker of **N**ucleoskeleton and **C**ytoskeleton) zugrunde. Durch die Ausbildung dieses Komplexes stehen Komponenten des Zytoskeletts über die Verbindung von Nesprinen und SUN-Proteinen im perinukleären Raum mit der Kern-Lamina in Kontakt. Dadurch ist eine stabile Positionierung des Kerns in der Zelle möglich und die Stabilität des Kerns wird unterstützt (Crisp et al., 2006).

Durch eine Störung des Komplexes könnte die mechanische Stabilität der Muskelzellen, sowie mechano-sensitive Signaltransduktionswege beeinflusst und dadurch der EDMD-spezifische Phänotyp hervorgerufen werden (Tzur et al., 2006). Allerdings war die Verteilung der vermittelnden SUN1 und 2-Proteine, wie schon erwähnt, nicht betroffen (Daten werden nicht gezeigt).

Aufgrund der Interaktionen von Nesprin1 und Nesprin2 mit Lamin A/C und der Involvierung der Nesprine in die Entstehung von Laminopathien, wurden die Verteilung und Lokalisation der Nesprine in den *LMNA* S143F-Fibroblasten untersucht. Diese Analysen ergaben eine veränderte Lokalisation von Nesprin2 (Abb. 5.10 B). In Kontrollzellen war Nesprin2 entlang der Kernhülle sowie im Zytoplasma lokalisiert. Im Gegensatz dazu war in der Kernhülle von *LMNA* S143F-Fibroblasten mit deformierten Zellkernen kein Nesprin2 zu detektieren, im Zytoplasma dieser Zellen konnte Nesprin2 jedoch nachgewiesen werden. Die Mutation schien die korrekte Integration des Nesprin2 in die Kernhülle zu beeinflussen. Im Gegensatz dazu konnte eine normale Verteilung von Nesprin1 in der Kernhülle von Patientenzellen beobachtet werden, die Mutation beeinflusste die Lokalisation von Nesprin1 nicht (Abb. 5.10 A). Dies könnte für unterschiedliche Protein-Interaktionen der Nesprin1 und Nesprin2 Proteine sprechen.

6.1.4 Nesprin2 Giant exprimierende *LMNA* S143F Fibroblasten zeigen eine normale Zellkernmorphologie und Verteilung von Zellkernproteinen

Die Untersuchungen der *LMNA* S143F-Fibroblasten ergaben, dass diese Patientenzellen keine morphologischen Deformationen aufwiesen, wenn die 796 kDa große Nesprin2 Giant Isoform in diesen Zellen an der Kernhülle lokalisierte (Abb. 5.11 A). Auch erscheinen diese Zellen kleiner und kompakter. Diese Beobachtungen unterstützt eine statistische Auswertung, die beschreibt, dass Kontrollzellen wie auch Patientenzellen, die Nesprin2 Giant positiv sind, eine normale Kernmorphologie besaßen. Diese Feststellung konnte unabhängig von der Zellpassage getroffen werden (Abb. 5.11 B). Aber nicht nur die Lokalisation, sondern auch die Expression von Nesprin2 Giant war verändert. Dies konnte durch Immunblotanalysen dargelegt werden, die ergaben, dass in *LMNA* S143F Fibroblasten die Expression von Nesprin2 Giant reduziert war (Kooperation mit Y. Lüke). Die Anwesenheit von Nesprin2 Giant scheint somit ein Indikator für eine normale Zellkernmorphologie zu sein.

Um einen genaueren Einblick in die Verteilung von Nesprin2 Giant entlang der Kernmembran von *LMNA* S143F-Zellen zu bekommen, wurden transmissionselektronenmikroskopische Analysen der Nesprin2 Giant Verteilung in Patientenzellen durchgeführt. Wie zu erwarten ist, war die Lokalisation von Nesprin2 Giant in *LMNA* S143F Zellen gegenüber Kontrollzellen stark reduziert. Doch warf sich die Frage auf, ob in Bereichen der Bläschenbildungen in der Kernmembran nochmals ein Unterschied in der Verteilung von Nesprin2 Giant gegenüber nicht deformierten Bereichen der Kernhülle vorzufinden war. Eine stärkere Depletierung in den

Bereichen der Kernmembran, einhergehend mit Bläschenbildungen, könnte erklären warum diese morphologischen Deformationen der Kernhülle nur partiell auftreten. Doch war kein Unterschied in der Markierung von Nesprin2 Giant mittels Goldpartikeln in den verschiedenen Kernhüll-Bereichen festzustellen. Ein Grund dafür war die allgemein schon sehr reduzierte Anwesenheit von Nesprin2 Giant in den *LMNA* S143F-Fibroblasten, so dass Unterschiede nur schwer zu detektieren waren.

Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob die Verteilung der kürzeren Nesprin2 Isoformen ebenso beeinflusst ist. Durch die Markierung der C-terminalen Segmente konnten auch die kürzeren Nesprin2 Isoformen detektiert werden. Interessanterweise war zu beobachten, dass die Fluoreszenzmarkierung der C-terminalen Nesprin2 Segmente in Nesprin2 Giant-reduzierten Patientenzellen gleichfalls abgeschwächt war (Abb. 5.11 A). Dies deutet an, dass die Anwesenheit von Nesprin2 Giant die kürzeren Nesprin2 Isoformen stabilisierte. Ein möglicher Mechanismus dafür wäre die Interaktion der verschiedenen Isoformen durch Homodimerisation bzw. Heterodimerisation der Spektrinwiederholungen der Nesprine. Ein ähnlicher Mechanismus wurde schon für die Bildung von Nesprin1 α -Polymeren postuliert (Mislow et al., 2002).

Zusammenfassend lässt sich die Hypothese aufstellen, dass Nesprin2 Giant die Rolle eines strukturellen Verstärkers der Kernmembran einnimmt. Diese Funktion wurde schon anderen Proteinen mit Spektrinwiederholenden Domänen zugeschrieben (Bennet et al., 1990; Pasternak et al., 1995; Lapidos et al., 2004). Lamin A/C und Nesprin2 Giant scheinen in *LMNA* S143F-Zellen strukturelle Gegenspieler zu sein. Kommt es aufgrund von der *LMNA* S143F Mutation zu Veränderungen der Stabilität und Integrität der Lamina, können die pathogenen Effekte auf die Morphologie der Kernmembran durch die korrekte Lokalisation von Nesprin2 Giant abgefangen werden. Ist allerdings die Lokalisation von Nesprin2 Giant in den Patientenfibroblasten gestört, wird die pathogene Wirkung der Lamin-Mutation auf die Struktur der Kernhülle nicht „abgefangen“ und es kommt zu morphologischen Defiziten an der Kernmembran.

Demnach sollten Gewebe, die eine hohe Expression von Nesprin2 Giant aufweisen, keine morphologischen Abnormalitäten zeigen. Zu diesen Geweben gehören neben Epidermis und Gehirn auch die Skelettmuskulatur (Zhen et al., 2002). Die Patientin mit der Mutation *LMNA* S143F zeigte neben den progeroiden Phänotyp allerdings auch Anzeichen einer Myopathie. Eine Erklärung, warum die Myoblasten-Zellen der Skelettmuskulatur trotz hoher Nesprin2 Giant Expression dennoch pathologische Effekte aufzeigten, könnte der hohe mechanische Stress sein, der auf diese Zellen wirkte. Es wurde außerdem berichtet, dass die Expression von Nesprin1 und Nesprin2 während der Muskeldifferenzierung zunimmt. So könnte die Mutation einen pathogenen Effekt auf Myoblasten ausüben, der noch nicht durch die Anwesenheit von

Nesprin-2 Giant „abgefangen“ werden könnte (Mislow et al., 2002; Zhang et al., 2005). Die Konsequenz davon wäre die Beeinträchtigung des Regenerationsprozess der Skelettmuskulatur. Die korrekte Lokalisation und Funktion von Proteinen der inneren Kernmembran, aber auch von anderen Kernproteinen, die direkt oder indirekt mit Chromatin oder der Kern-Lamina interagieren, ist abhängig von einer intakten Kernmembran bzw. -Lamina (Furukawa et al., 1998; Sullivan et al., 1999; Spann et al., 2002; Holaska et al., 2003; Wilkinson et al., 2003; Haraguchi et al., 2004; Zastrow et al., 2004). Da die Reduktion des Nesprin2 Giant-Proteins in *LMNA* S143F-Fibroblasten zu morphologischen Defiziten der Kernmembran führte, wurde analysiert, ob eine fehlerhafte Lokalisation dieser Proteine mit einer Reduktion von Nesprin2 Giant korrelierte. Es konnte gezeigt werden, dass die veränderten Verteilungsmuster von Nesprin2 und LAP α mit der fehlerhaften Lokalisation der transkriptionell aktiven Form der RNA-Polymerase II in Patientenzellen zusammenhing (Abb. 5.13). Die fehlerhafte Lokalisation von LAP2 α und Nesprin2, wie auch der transkriptionell aktiven Form der RNA-Polymerase II und LAP2 α , betraf dieselben Patientenfibroblastenzellen. Diese Resultate bestätigten die Annahme, dass die Reduktion von Nesprin2 Giant durch die Mutation *LMNA* S143F, die Lokalisierung bestimmter Kernproteine, die mit der Kernmembran interagieren, beeinträchtigte. Im Umkehrschluss konnte dies auch dadurch bestätigt werden, dass Nesprin2 Giant-positive Patientenzellen nicht nur eine normale Kernmorphologie, sondern auch eine wildtypische Verteilung von verschiedenen Kernproteinen aufwiesen (Daten werden nicht gezeigt). Somit scheint die korrekte Verteilung von Nesprin2 Giant nicht nur die morphologischen Effekte der Mutation *LMNA* S143F auf die Kernmembran, sondern auch die Veränderungen der Chromatinstruktur und die negative Beeinflussung der Genexpression in den Patientenzellen, zu „kompensieren“.

Der beobachtete zelluläre Phänotyp in *LMNA* S143F Fibroblasten war nicht die Folge von apoptotischen Vorgängen, induziert durch negative Auswirkungen der Mutation *LMNA* S143F auf zelluläre Vorgänge. Dies bestätigen Analysen zur Bestimmung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometer-Analysen (Abb. 5.16 A). Dieses Resultat vermittelte auch die Messung der Apoptose-typischen Fragmentierung der DNA. Auch hier war nach TUNEL-Assays keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Patientenzellen zu beobachten (Abb. 5.16 B).

Eine andere Frage war, inwiefern zellzyklusabhängige Prozesse in den Patientenzellen eine Rolle spielten. Messungen mit dem Durchflusszytometer zeigten in Patienten- und Kontrollzellen einen synchronen Verlauf des Zellzyklus (Daten werden nicht gezeigt). Zwar war der Anteil apoptotischer Zellen unter den Patientenzellen ab Passage 24 geringfügig erhöht, was aber an der kürzeren Lebensspanne der *LMNA* S143F-Zellen lag, die durchschnittlich zwischen den Passagen 24 bis 26 sterben. Aufgrund dessen wurden für Experimente nur Zellen bis zu einer

Passage von 22 verwendet. Zusammengenommen kann durch diese Resultate ausgeschlossen werden, dass die beobachteten zellulären Abnormitäten in den *LMNA* S143F-Fibroblasten durch apoptotische oder zellzyklusabhängige Vorgänge induziert waren.

6.1.5 Die ektopische Expression von *LMNA* S143F-GFP ruft den für Patientenfibroblasten charakteristischen Phänotyp hervor

Verschiedene Transfektionsstudien bestätigten, dass die Mutation *LMNA* S143F der Auslöser des beobachteten patho-physiologischen zellulären Phänotyps war. So zeigten fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Analysen nach ektopischer Expression von *LMNA* S143F-GFP in wildtypischen Fibroblasten ähnliche morphologische Abnormitäten wie in *LMNA* S143F-Patientenzellen (Abb. 5.14). Allerdings war das Auftreten von morphologischen Kerndeformationen, wie Bläschen und Ausstülpungen der Kernmembran, weniger stark ausgeprägt als in den Patientenzellen. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass neben dem mutierten S143F-Lamin A/C auch endogenes wildtypisches Lamin A/C exprimiert und dadurch die Struktur der Kernhülle stabilisiert wurde und den pathologischen Effekt des *LMNA* S143F-GFP etwas „abmilderte“.

Weiterhin wurde analysiert, ob die Stärke der Expression von Nesprin2 Giant die Ausprägung der morphologischen Kerndeformationen beeinflusste. Dazu wurde *LMNA* S143F-GFP in Zellen überexprimiert die sich stark in der Stärke der Expression von Nesprin2 Giant unterschieden. Die Untersuchungen ergaben, dass in humanen Keratinozyten (HaCaT-Zellen), welche große Mengen von Nesprin2 Giant exprimieren, keine morphologischen Defekte induziert wurden. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen, die nur geringe Mengen von Nesprin2 Giant exprimieren, starke morphologische Abnormitäten der Kernhülle (Kooperation mit Y. Lüke). Diese Resultate unterstützen die Hypothese, dass die Anwesenheit von Nesprin2 Giant den pathologischen Effekt der *LMNA* S143F-Mutation auf die Kernhüll-Morphologie „abfing“.

Auch konnte bestätigt werden, dass die Expression von *LMNA* S143F-GFP die Lokalisation von Kernproteinen beeinflusste. Wie schon in Patientenzellen festzustellen war, konnte auch in *LMNA* S143F-GFP-exprimierenden Zellen eine abnormale Lokalisation der transkriptionell aktiven Form der RNA-Polymerase II und des LAP2 α -Proteins beobachtet werden.

Zusammengenommen identifizieren diese Resultate die Mutation *LMNA* S143F als primären Auslöser des anormalen zellulären Phänotyps.

6.1.6 Einfluss der Mutation *LMNA* S143F auf die Struktur und Dynamik der Lamina

Zur Klärung der Ätiologie der aus der Mutation *LMNA* S143F resultierenden Erkrankung, wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, die die Auswirkungen der Mutation auf die Struktur der Lamina, bzw. der Kern-Lamina näher beleuchten. Wie schon erwähnt, bilden Lamina coiled-coil-Dimere, die sich longitudinal zu head-to-tail Protofilamenten zusammenlagern und diese,

durch antiparallele laterale Zusammenlagerung, Polymere höherer Struktur bilden (siehe 2.2; Stuurman et al., 1998; Strelkov et al., 2002, 2004).

Es ist bekannt, dass im Bereich der Subdomäne 1B, in welcher die Mutation *LMNA* S143F vorzufinden ist, noch andere Laminopathie-auslösende Mutationen liegen. So löst der AS-Austausch an der Position Ser143 durch Prolin (S143P) die familiäre dilatative Kardiomyopathie aus (Kärkkäinen et al., 2004; siehe 2.4). Auch scheint der Bereich eine wichtige Rolle als Auslöser von progeroiden Erkrankungen zu spielen. Die Mutationen R133L und L140R sind verantwortlich für das atypische Werner-Syndrom (Chen et al., 2002) und die Mutation E145K löst HGPS aus (Eriksson et al., 2003). Die Häufungen von Mutationen in diesem Domänenabschnitt lassen darauf schließen, dass die Subdomäne 1B ein wichtiger Faktor zur Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der Lamina ist. Die coiled-coil-Struktur zeigt eine charakteristische Periodizität in der Abfolge von 7 Aminosäuren (a-f). Die Mutation S143F liegt an Position c in der konservierten Heptadwiederholungs-AS-Sequenz, die den Außenbereich der coiled-coil-Struktur markiert. Das bedeutet, dass der Austausch der neutralen AS Serin durch die große hydrophobe AS Phenylalanin nicht zu einer Störung in der Dimerbildung führt, sondern vielmehr die Formierung von Protofilamenten bzw. höheren Strukturen und somit auch molekulare Interaktionen beeinflusst werden (siehe 5.1.1; Burkhard et al., 2001; Strelkov et al., 2004). So wurde schon bei der Mutation *LMNA* E145K berichtet, dass nicht die Dimerisierung, sondern die Bildung von Polymeren gestört war (Wiesel et al., 2008). Demnach könnte die Mutation *LMNA* S143F einen dominant negativen Effekt auf die Zusammenlagerung und Dynamik der Lamine haben. Dieses Modell wird von der Beobachtung der Misslokalisierung von Lamin A/C und Lamin B in *LMNA* S143F-Fibroblasten unterstützt. Serine sind auch potentielle Ziele für Phosphorylierungen von Aminosäuren. Eine bioinformatische Studie zur Position Ser143 berechnete eine mögliche Phosphorylierung des Serins von 72 % voraus. Interessant ist hierbei, dass die Phosphorylierung von Laminen lediglich die Polymerisation der Lamine beeinflusst, die Dimerisierung hingegen ist nicht betroffen (Gerace und Blobel, 1980; Newport und Spann, 1987; Heitlinger et al., 1991; Nigg 1992a, b).

Erste Hinweise auf eine veränderte Struktur der S143F-Lamine lieferten FRAP-Analysen, die zeigten, dass *LMNA* S143F-Fusionsproteine eine geringere Mobilität gegenüber dem wild-typischen Lamin A-GFP aufwiesen (Abb. 5.17 A, B). Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, dass in den Laminopathie-auslösenden Mutationen wie L85R und L530P, die nicht in Bereichen liegen die für die Polymerisation der Lamine verantwortlich sind, die Mobilität des Lamin A erhöht ist (Gilchrist et al., 2004). Der Einbau der großen AS Phenylalanin schien tatsächlich die Zusammenlagerung der Lamine A/C zu höheren Laminstrukturen zu verändern. Die Substitution der AS führte zu einem stabileren Einbau des Lamin A/C in die Lamina und folglich zu einer verringerten Dynamik der Kern-Lamina. Eine reduzierte Dynamik konnte auch schon nach

Expression des HGPS-auslösenden $\Delta 50$ -Lamin A-GFP in humanen Fibroblasten nachgewiesen werden (Dahl et al., 2006).

Bestätigt wurde diese These durch biochemische Proteinextraktionsstudien von Lamin A/C aus *LMNA* S143F-Fibroblasten *in vitro* (Abb. 5.18). Das mutierte Lamin A/C zeigte im Vergleich zu wildtypischen Lamin A/C eine deutlich reduzierte Löslichkeit. Das S143F Lamin A/C schien eine stärkere Bindung innerhalb der Lamina einzugehen, was eine reduzierte Löslichkeit und dadurch eine geringere Mobilität des Lamins zur Folge hatte.

Inwieweit die Mutation die Bildung von Lamin-Polymeren beeinflusste, wurde durch *in-vitro* Rekonstitutionen von Lamin-Polymeren und der Analyse der gebildeten Parakristalle näher beleuchtet. Laminfilamente entstehen, wie schon beschrieben, indem sich 50-52 nm lange Lamin-Dimere zu polaren Kopf-Schwanz-Polymeren zusammenlagern. Das unterscheidet sie von zytoplasmatischen Intermediärfilamenten, die antiparallele Tetramere ausbilden (Gieffers und Krohne, 1991). Anschließend lagern sich diese Protofilamente antiparallel lateral zu Polymeren zusammen (siehe 2.2; Stuurman et al., 1998; Strelkov et al., 2002, 2004).

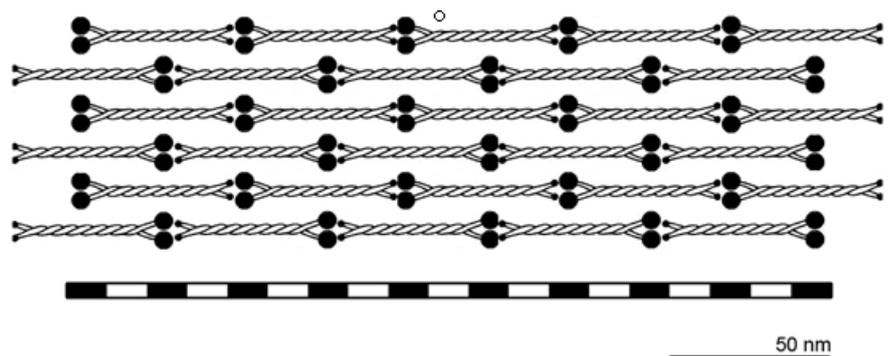


Abb. 6.1: Zusammenlagerung der Laminfilamente und Ausbildung der Parakristalle. Das axiale hell-dunkel Bänderungsmuster kommt durch die um 50 % versetzte Zusammenlagerung der Kopf-Schwanz-Polymere zustande (Abbildung aus Diplomarbeit T. Kleinhenz, 2007).

Durch weitere laterale Interaktionen bilden sich die Parakristalle aus (Abb. 5.19; 5.20 A), welche ein quer orientiertes Bandenmuster mit einer axialen Wiederholung von ca. 25 nm zeigen (Heitlinger et al., 1991). Das Bandenmuster der hell-dunkel-Wiederholungen erklärt sich durch die um 50 % versetzte Zusammenlagerung der Kopf-Schwanz-Polymere (Abb. 6.1).

Die Analysen zeigten eine signifikante Verkürzung der axialen Bänderungsmuster in Lamin-Polymeren zwischen S143F- und wildtypischen Parakristallen (Abb. 5.20 B). Den dominant-negativen Effekt der Mutation *LMNA* S143F auf die Zusammenlagerung von Laminfilamenten zu Parakristallen konnte durch Simulationen des heterozygoten Zustandes, durch Bildung von Parakristallen aus wildtypischen und mutierten Laminen, nachgewiesen werden. Auch hier sind die Wiederholungen im Bänderungsmuster verkürzt (Daten werden nicht gezeigt). Verursacht werden könnte diese Verkürzung in der axialen Zusammenlagerung der Protofilamente zu Polymeren durch einen „Knick“ im Lamin-Dimer, aufgrund des Einbaus der großen Aminosäure

Phenylalanin in der Subdomäne 1B. Da diese strukturelle Veränderung in dem Bereich liegt, der für Formierung von Protofilamenten bzw. höheren Strukturen verantwortlich ist, wird auch erst die Bildung von Polymeren in Form von Parakristallen beeinflusst. Interessant dabei ist, dass gleiche Analysen der Struktur von Parakristallen, formiert aus dem EDMD-auslösenden Lamin R545C, keine Veränderungen der axialen Wiederholungen der Bänderungsmuster aufwiesen. Diese Mutation liegt aber nicht im Bereich, der für die Formierung von Protofilamenten bzw. höheren Strukturen zuständig ist, sondern im C-terminalen Bereich des Lamins A/C. Dies bestätigt die Hypothese, dass Veränderungen in der Zusammenlagerung bzw. der Struktur der Lamin-Polymere, für die veränderte Dynamik, Löslichkeit und molekularen Interaktionen verantwortlich sind. Die durch den Einbau der großen hydrophoben Aminosäure Phenylalanin auftretenden Spannungen in den Lamin-Polymeren, könnten sich im Verlauf der Formierung zu höheren Strukturen soweit addieren, dass es zu einer Ruptur der Lamina kommt. Dies könnte in der Ausprägung von morphologischen Defekten der Kern-Lamina, wie in der Bildung von Bläschen, resultieren.

Um den Einfluss der Mutation *LMNA* S143F bei der Formation von Protofilamenten bzw. höheren Strukturen *in vitro* nachzuweisen, wurden Bimolekular Fluorescence Complementation (BiFC)-Studien durchgeführt. Bei BiFC werden zwei Proteine an jeweils eine nicht-fluoreszierende Hälfte des Fluorophors YFP gekoppelt. Die Bildung eines funktionellen Fluorophors durch Komplementierung der beiden Fluorophor-Hälften ist ein Indikator für die Interaktion der Fusionsproteine in lebenden Zellen und führt zu einem gelben fluoreszierendem Signal. BiFC, und damit ein Fluoreszenzsignal, kommt zustande, wenn die YFP-Fragmente durch ihre Fusionspartner in Kontakt treten, was bedeutet, dass diese innerhalb einer Distanz von weniger als 100 Å bzw. 10 nm miteinander assoziieren (Hu et al. 2002).

Diese Untersuchungen belegten, dass sich zum Einen Heteropolymere aus wildtypischen Lamin A und mutiertem Lamin A S143F als auch Homopolymere *in vivo* formierten. Außerdem lokalisierten die Lamin-Heteropolymere sowie die wildtypischen Homopolymere korrekt in der Lamina. Im Gegensatz dazu beeinflusste die Bildung von mutierten Lamin S143F-Homopolymeren deren korrekte Lokalisation in der Lamina, sowie die Kernmorphologie der transfizierten Zellen *in vivo*. Allerdings ist es schwer eine Aussage zu treffen, auf welcher Ebene der Lamin-Polymerisation ein YFP-Signal zustande kam. Mit der Methode der BiFC kann nur eine Aussage getroffen werden dass die Proteine innerhalb einer Distanz von weniger 10 nm miteinander assoziieren. Da die Polymerisierung der Lamine bis hin zur lateralen Zusammenlagerung von Protofilamenten in einem Bereich stattfindet, der kleiner ist 10 nm, könnte ein BiFC-Signal durch die Dimerisierung zweier Konstrukt-Kombinationen, aber auch erst durch die laterale Zusammenlagerung zweier Konstrukt-Kombinationen ausgelöst werden. Es kann somit keine eindeutige Aussage getroffen werden wodurch die Misslokalisationen des YFP-Lamin A/C,

bzw. die Kerndeformationen nach Transfektion mit den zwei S143F-Konstrukt-Kombinationen, zustande kommt. Es könnte dafür eine Veränderung in der Bildung von Protofilamenten, aber auch eine fehlerhafte Dimerisierung von Lamin S143F verantwortlich sein.

Auch können geringfügige strukturelle Abweichungen im Aufbau der Lamina die molekularen Interaktionen beeinflussen. So ist bekannt, dass die Aktivität der Polymerase II von einem korrekten Lamingerüst abhängig ist (Reichart et al., 2004). Lamin A-Mutationen wirken sich auch negativ auf die Interaktionen mit anderen Proteinen der inneren Kernmembran aus, wie Emerin (Fairley et al., 1999), LAP2 (Markiewicz et al., 2002) und den SUN-Proteinen (Crisp et al., 2006). Mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) und „Pull-Down-Assays“ sollte überprüft werden, auf welcher Ebene der Lamin A-Polymerisierung - die Stufe der Dimerisierung, oder aber die Stufe der Protofilamentbildung bzw. die Bildung höher geordneter Strukturen - diese Bindungsaffinitäten beeinflusst wurden (siehe auch 5.1.16). Trotz mehrmaliger Versuche mit verschiedenen Versuchs-Parametern konnten keine einheitlichen Ergebnisse erzielt werden (siehe auch 5.1.16). Die erhaltenen Resultate konnten somit keinen Aufschluss über mögliche Unterschiede der Bindungsaffinitäten auf der Ebene der gebildeten Laminfilamente geben.

Momentan existieren mehrere sich überlappende Hypothesen, die versuchen die Pathophysiologie der Laminopathien zu erklären. Die strukturelle Hypothese geht davon aus, dass Mutationen im Lamin A/C die strukturelle Integrität der Lamina und dadurch die der Zellkerne negativ beeinflussen. Das Genexpressionsmodell basiert auf der Tatsache, dass Lamin A/C mit Chromatin und Chromatin-assoziiierenden Faktoren interagiert. Mutationen im Lamin A/C könnten diese Interaktionen beeinträchtigen und somit die Genregulation negativ beeinflussen, was die Pathophysiologie der Erkrankung erklären könnte (Hutchinson und Worman, 2004; Worman und Courvalin, 2004). Die präsentierten Daten sprechen dafür, dass beide erwähnten Hypothesen eine Rolle in der Pathogenese der *LMNA* S143F-Patientenzellen spielen. Auch scheint es so, dass die veränderte Genexpression eine Folge strukturellen Veränderungen der Lamina ist und somit die eine Hypothese auf der anderen aufbaut.

6.2 Die Mutation *LMNA* R545C

Die Mutation *LMNA* R545C im Lamin A-Protein ist ein Auslöser einer sehr gravierenden Form der autosomal-dominanten Form der Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (AD-EDMD). Diese heterozygote Punkt-Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch von Arginin durch Cystein an der Position 545 (R545C) im carboxyterminalen Bereich des *LMNA* Gens. Es sind bisher zahlreiche Mutationen im gesamten Bereich des *LMNA* Gens bekannt, welche EDMD herbeiführen. Die Erkrankung manifestiert sich meist in der zweiten Lebensdekade und ist durch Merkmale wie

früh auftretende Kontrakturen der Achillessehnen, Wirbelsäule, Ellenbogen und postzervikalen Muskeln und progressive Muskelschwäche bzw. -atrophie charakterisiert. Da die Krankheit nur relativ langsam fortschreitet, bleiben die meisten Patienten bis über das 40. Lebensjahr hinaus gehfähig. Die gravierendsten Veränderungen zeigen sich jedoch am Herzmuskel durch Kardiomyopathie und Herzreizleitungsstörungen von Sinusbradycardie bis hin zur Blockade des Herzmuskels (Emery, 1989). Die Mutation *LMNA* R545C löst einen sehr schwerwiegenden Phänotyp der EDMD mit frühzeitigem Verlust der Mobilität, ausgeprägter Skoliose, sowie einer schwerwiegenden Herzinsuffizienz ab dem 18. Lebensjahr, aus. Diese Mutation scheint nicht vererbbar zu sein, da in keinem der anderen untersuchten Familienmitglieder, einschließlich der Mutter, diese Mutation nachgewiesen werden konnte.

6.2.1 *LMNA* R545C Myoblasten zeigen morphologische Defekte des Zellkerns

Auch die *LMNA* R545C-Myoblasten zeigten morphologische Defekte des Zellkerns, wie schon anhand der *LMNA* S143F-Patientin oder anderen Patienten mit Laminopathien berichtet wurde (Sabatelli et al., 2001; Fidzianska et al., 2003; Goldmann et al., 2004; Adelfalk et al., 2005; Jacob et al., 2005; Kandert et al., 2007). Es konnten Ausstülpungen bis hin zur Bläschenbildung der Kernhülle festgestellt werden. Die Ausprägung war allerdings im Gegensatz zu den *LMNA* S143F-Fibroblasten lokal begrenzt, so war z.B. keine Bildung von großvolumigen Mikronuklei zu beobachten (Abb. 5.22 b, b'). Ebenso war bei diesen mutierten Myoblasten das Auftreten der Kerndeformationen abhängig vom Alter der Zellen (Abb. 5.22 B). Eine interessante Beobachtung war, dass Laminopathie-auslösende Mutationen nicht immer zu gleichen pathogenen Phänotypen der Kernmorphologie, sondern zu verschiedenartigen Ausprägungen von morphologischen Kernveränderungen in Patientenzellen führen (Abb. 5.22 A). Ein ähnlicher Vergleich der Kernabnormalitäten bei Zellen von Laminopathie-Patienten konnte bisher noch nicht gezeigt werden.

6.2.2 Einfluss der Mutation *LMNA* R545C auf die Lokalisation von Proteinen der inneren Kernhülle sowie von Markern von aktivem und inaktivem Chromatin

Wie zu erwarten war, konnten nicht nur morphologische Abnormalitäten des Zellkerns, sondern ebenso eine veränderte Verteilung von Lamin A/C und Emerin in *LMNA* R545C-Myoblasten festgestellt werden (Abb. 5.23). Diese Beobachtungen wurden auch schon bei anderen Laminopathie-Patienten getroffen (siehe 6.1.2, FPLD: Vigouroux et al., 2001; AD-EDMD: Favreau et al., 2003, Reichert et al.; 2004). Die Verteilung anderer Kernproteine, wie LAP2 und Lamin B war im Gegensatz zu den *LMNA* S143F-Fibroblasten interessanterweise unverändert. Allerdings war die Organisation und Topologie des Chromatins in den *LMNA* R545C-Zellen verändert. So konnte in einem Drittel der Patientenzellen eine Akkumulierung von trimethyliertem Histon H3 (H3K27me3) beobachtet werden (Abb. 5.25). Trimethyliertes Histon

H3 dient als ein Marker von Heterochromatin und einer Abschaltung der Transkription (Chadwick und Wilard, 2004). Es konnte schon bei anderen Laminopathien festgestellt werden, dass die Expression von trimethyliertem Histon H3 verändert war (Shumaker et al.; 2006, Östlund et al.; 2008). Dass die Transkription in den *LMNA* R545C-Myoblasten ebenso beeinflusst war wie in den *LMNA* S143F-Fibroblasten, konnte auch die Untersuchung der Verteilung der RNA Polymerase II bestätigen (Abb. 5.24 A, B). Wie bereits in 6.1.2 erwähnt, ist bekannt, dass eine veränderte Kernorganisation zu Abnormalitäten in der Genexpression führen kann (Filesi et al., 2005; Goldman et al., 2004; Reichart et al., 2004) und eine veränderte Laminorganisation die Polymerase II-abhängige Transkription inhibiert (Spann et al., 2002). Weiterhin ist aus einigen Publikationen bekannt, dass Lamine zusätzlich an der Bildung und Aufrechterhaltung funktionaler höher geordneter Chromatinstrukturen beteiligt sind (Gotzmann und Foisner, 1999). Typ A-Lamine können direkt mit Chromatin durch ihre C-terminale Domäne interagieren (Stierle et al., 2003), in deren Bereich die Mutation *LMNA* R545C liegt. Aber nicht nur die Laminorganisation, sondern auch die veränderte Verteilung von Emerin könnte die divergente Transkription erklären. Es wurde gezeigt, dass Emerin *in vitro* einen Komplex mit Lamin A und GCL, einem transkriptionellem Repressor, bilden kann (Holaska et al., 2003). Außerdem ist Emerin mit der Kern-Lamina assoziiert und Lamin A für die Verankerung von Emerin in der inneren Kernmembran essentiell (Sullivan et al., 1999; Tsuchiya et al., 1999). Durch eine veränderte Struktur der Lamina könnte somit dieser Komplex und damit die Transkription in *LMNA* R545C-Zellen manipuliert werden.

Diese Resultate bestätigen die Hypothese der veränderten Genexpression, welche besagt, dass Laminopathie-verursachende Mutationen, neben der strukturellen Integrität des Zellkerns, ebenso direkt oder indirekt die transkriptionelle Aktivität und die Chromatinorganisation beeinflussen können.

6.2.3 Myoblasten von Patienten mit der Mutation *LMNA* R545C zeigen Anzeichen einer Seneszenz und proteasomaler Inhibierung

Die Beobachtung der zellulären Seneszenz in Verbindung mit einer möglichen Inhibierung des Proteasoms in den R545C-Myoblasten konnte bisher in noch keiner anderen Laminopathie-auslösenden Mutation nachgewiesen werden. Der Funktionsverlust des Proteasoms konnte durch die Aggregation des 20S-Proteasoms an „promyelocytic leukemia“ (PML)-Körperchen, sowie der Akkumulation von p21 im Kern nachgewiesen werden. Diese PML-Körperchen, die Zentren des proteolytischen Abbaus bilden (Rockel et al., 2005; Wojcik und DeMartino, 2003), sind ein Indikator für zellulären Stress und repräsentieren Bereiche, in welchen wichtige Faktoren in Folge von zellulärem Stress post-transkriptionell modifiziert werden (Dellaire et al., 2004).

Wie neueste Studien zeigen regelt Lamin A die Produktion von ROS („reactive oxygen species“), senkt damit die Oxidation innerhalb der Zelle und sorgt für ein vermindertes Auftreten zellulärer Seneszenz. Der zugrunde liegende Mechanismus ist die Formation von Intra- und Inter-molekularen Disulfidbrücken durch die Cystein-Aminosäuren im C-terminalen Schwanz des Lamin As. Dadurch wird die Bildung von ROS und damit die zelluläre Oxidation reduziert. So wurde bei Lamin A-Mutanten, deren Aminosäure Cystein durch Alanin ersetzt war, beobachtet, dass Lamin A nicht mehr in der Lage war korrekte Disulfidbrückenbindungen auszubilden. Dies hatte dramatische Effekte auf die Kernmorphologie der Zelle und führte zu vorzeitiger Seneszenz in Folge einer herabgesetzten Toleranz gegenüber oxidativem Stress und ROS-induzierter DNA-Schädigung (persönliches Gespräch mit C. Hutchinson; Durham University, Durham). Bei der Laminmutation R545C ist zwar ein Arginin durch ein zusätzliches Cystein ersetzt - der umgekehrte Fall also - aber dieses Cystein könnte auch die Inter- bzw. Intramolekularen Disulfidbrückenbindungen beeinflussen. Dadurch könnte auch hier die verminderte Toleranz gegenüber erhöhtem oxidativem Stress und damit die beobachtete zelluläre Seneszenz erklärt werden. Die Erhöhung der oxidativen Stimuli in den R545C-Zellen könnte zu einer Anreicherung oxidierten Proteine an Zentren des proteolytischen Abbaus (PML-Körperchen) führen. Diese Anreicherung von oxidierten Proteinen kann einen Funktionsverlust der Proteasomen zur Folge haben (Davies et al., 2006). Der Einfluss der Mutation *LMNA* R545C auf die korrekte Bildung von Disulfidbrücken könnte somit auch ein weiterer Auslöser der beobachteten morphologischen Kerndeformationen sowie der Umstrukturierung des Chromatins sein. Eine Erhöhung der ROS konnte interessanterweise schon in *LMNA*-Mutationen, die zu FPLD führen, beobachtet werden (Caron et al.; 2007).

6.2.4 Die Zell-Differenzierung der Myoblasten von Patienten mit der Mutation *LMNA* R545C ist unterdrückt

Es wurde bereits dargelegt, dass bei EDMD-Patienten die Expression von Proteinen, die eine Schlüsselrolle im Rb (Retinoblastoma)-Signalweg spielen, verändert ist. Das Protein Retinoblastoma ist eine wichtige Komponente im E2F-vermittelten Zellzyklusarrest und in der MyoD-vermittelten Induktion der späten Myogenese (siehe auch 2.2.3 und 2.4.1.4; Classon und Harlow, 2002; Frolov und Dyson, 2004). In den R545C-Vorläufer-Myoblasten war zu beobachten, dass die Induktion von MyoD, sowie die Anreicherung von pRb, stark reduziert waren. Das ist ein Indiz dafür, dass die Differenzierung sehr früh unterbunden wurde.

Das Retinoblastoma-Protein bildet einen Komplex mit Typ A-Laminen und dem Lamina-assoziiertem Polypeptid 2 alpha (LAP2 α). Dieser Komplex bindet an den E2f-DP3-Komplex. Erst wenn pRb aus diesem Komplex dissoziiert, werden zellzyklus-abhängige Gene aktiviert (Mancini et al., 1994; Markiewicz et al., 2002, Dorner et al., 2006). Eine mögliche Ursache für die

Erniedrigung von pRb und die resultierende Inhibierung der Myogenese-Induktion könnte eine fehlerhafte Bildung des Komplexes sein, aufgrund der *LMNA* R545C-Mutation. Daraus könnten eine vorzeitige Dissoziation und ein damit verbundener Abbau von pRb einhergehen. Eine andere Erklärung des verminderten Differenzierungs-Potentials legten zwei Studien dar, die postulieren, dass es in Lamin A bzw. Emerin-„Knockout“-Muskelgeweben zu einem Missverhältnis in der Stärke der Expression zwischen MyoD und Rb im Rb/MyoD-Signalweg kommt. Diese Deregulierung hat eine Abnahme der Differenzierung zur Folge (Melcon et al., 2006).

6.2.5 Einfluss der Mutation *LMNA* R545C auf die Struktur und Dynamik der Lamina

Auch an *LMNA* R545C-Myoblasten wurden zur Klärung der Ätiologie der resultierenden Erkrankung Untersuchungen durchgeführt, die die Auswirkungen der Mutation auf die Struktur der Lamina bzw. der Kern-Lamina näher beschreiben. Im Gegensatz zu der Mutation *LMNA* S143F, die im Bereich der Subdomäne 1B und damit in der coiled-coil-Struktur liegt, ist die Mutation *LMNA* R545C im carboxyterminalen Bereich des Lamin As, außerhalb der Ig („immunglobulin-like“)-Domäne, zu finden. Da dieser Bereich nicht für die Dimerisierung bzw. Polymerisierung der Lamina verantwortlich ist, kann spekuliert werden, dass nicht die Netzwerk-Struktur der Lamina, sondern intermolekulare Interaktionen zu anderen Proteinen gestört wurden (Burkhard et al., 2001; Strelkov et al., 2004).

Bestätigt wurde diese These durch die Bildung von Lamin-Polymeren aus R545C Lamin A durch *in-vitro* Rekonstitutionen und der Analyse der gebildeten Parakristalle. Im Gegensatz zu der Mutation *LMNA* S143F zeigten Analysen keine signifikanten Verkürzungen der axialen Bänderungsmuster in Lamin-Polymeren zwischen R545C- und wildtypischen Parakristallen (Abb. 5.20 B). Auch die Simulationen des heterozygoten Zustandes, durch Bildung von Parakristallen aus wildtypischen und mutierten Laminen, zeigten keine Unterschiede (Daten werden nicht gezeigt). Das verstärkt die Annahme, dass diese Mutation nicht die Formierung von Protofilamenten bzw. höheren Strukturen, wie es bei der Mutation *LMNA* S143F der Fall ist, beeinflusste. Mutationen außerhalb des coiled-coil-Domänenbereichs scheinen keine Auswirkungen auf die Struktur der Parakristalle zu nehmen.

Die Ausprägung von morphologischen Defekten der Kern-Lamina, wie in der Bildung von Bläschen, könnte durch veränderte Interaktionen mit anderen integralen Kernproteinen, die ebenfalls eine Rolle in der strukturellen Integrität der Kernhülle spielen, zu erklären sein. Ein Hinweis darauf könnte die massiv gestörte Lokalisation des inneren Kernhüllproteins Emerin geben (Abb. 5.23). Ein weiterer Aspekt hinsichtlich der Ausprägung der Kerndeformationen könnte der Einfluss der Mutation *LMNA* R545C auf die korrekte Bildung von Disulfidbrücken sein (siehe auch 6.2.3).

Mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) sollte auch bei dieser Mutation überprüft werden, auf welcher Ebene der Lamin A-Polymerisierung - die Stufe der Dimerisierung oder aber die Stufe der Protofilamentbildung bzw. die Bildung höher geordneter Strukturen - diese Bindungsaffinitäten beeinflusst wurden (siehe auch 5.1.16). Auch hier konnten keine einheitlichen Ergebnisse erzielt werden (siehe auch 5.1.16).

Die gewonnenen Resultate bestätigen auch hier das Genexpressionsmodell, welches aussagt, dass Lamin A/C mit Chromatin und Chromatin-assoziiierenden Faktoren interagiert. Mutationen im Lamin A/C könnten diese Interaktionen beeinträchtigen und somit die Genregulation negativ beeinflussen, was die Pathophysiologie der Erkrankung mit erklären könnte (Hutchinson und Worman, 2004; Worman und Courvalin, 2004). Weiterhin scheint die Mutation auch die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung zu beeinflussen, was das Modell des veränderten Zellzyklus bzw. Differenzierung unterstützt (Dorner et al., 2006; Johnson et al., 2004; Markiewicz et al., 2002). Die präsentierten Daten sprechen dafür, dass beide erwähnten Hypothesen eine Rolle in der Pathogenese der *LMNA* R545C-Patientenzellen spielen. Einzigartig für diese Mutation sind die beobachtete Seneszenz der Myoblasten und die Veränderung der Funktion des Proteasoms. Dies könnte möglicherweise ein Hinweis auf eine erhöhte Oxidation in diesen Zellen sein, aufgrund veränderter Disulfidbrückenbindungen im Lamin A.

6.3 Abschließende Anmerkungen und Ausblick

Um festzustellen, ob die gefundenen Veränderungen in der Zusammenlagerungen bzw. der Struktur der S143F-Lamin-Polymere neben der Dynamik und Löslichkeit auch die molekularen Interaktionen zu anderen Kernproteinen beeinflussen, müssen weitere Bindungsstudien mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) durchgeführt werden. Der Schwerpunkt dabei sollte zunächst darin liegen, eine konstante bzw. homogene Umsetzung der zu testenden Lamin A-Filament-Lösungen zu frei rekonstituierten Filamenten zu gewährleisten, um somit vergleichbare Resultate zu erhalten. Ferner wären Overlay-Blot-Assays, weitere Pulldown-Versuche sowie „yeast-to-hybrid“-Experimente Möglichkeiten, Bindungsanalysen von Lamin-A-Mutanten *in vitro* durchzuführen. Auch könnten proteomische Vergleichsanalysen verschiedener EDMD und Progerie-auslösenden Lamin-A-Mutanten und wildtypischem Lamin A Aufschluss über Affinitätsunterschiede zu putativen Bindungspartnern geben. Es sollte abgeglichen werden, inwieweit andere Mutationen im coiled-coil-Bereich des Lamin A-Proteins die Polymerstruktur bzw. die intermolekularen Bindungsaffinitäten, ähnlich wie die *LMNA* S143F-Mutation, beeinträchtigen.

Unterschiede in diesem Proteinpool könnten Hinweise auf veränderte Bindungsaffinitäten geben und somit mögliche Interaktionen identifizieren, die für die Ätiologie der Laminopathien verantwortlich sind.

Ein weiterer Ansatzpunkt wäre die Überprüfung des Oxidationsgrades bzw. der ROS (reactive oxygen species)-Konzentration in *LMNA* R545C-Myoblasten. Eine Erhöhung des ROS gegenüber wildtypischen Myoblasten könnte ein Hinweis auf veränderte Disulfidbrückenbindungen innerhalb des Lamin A geben und somit die Seneszenz, sowie die beobachteten morphologischen Kerndeformationen erklären.

Um weitere Erkenntnisse bezüglich der veränderten Genexpression zu erlangen, wäre ein anderes Ziel, sich auf die Bindungseigenschaften der *LMNA*-Mutanten zu Transkriptionsfaktoren und Chromatin-assoziierten Proteine zu fokussieren. Es ist bekannt, dass Lamin B1 über spezifische DNA-Regionen, den so genannten LADs (Lamina-assoziierte Domänen) an Chromatin bindet (siehe 2.2.3). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Genexpression in Bereichen dieser LADs herunterreguliert ist (Guelen et al., 2008). Ein interessanter Versuchsansatz wäre zu überprüfen, ob Lamin A ebenso wie Lamin B1 über LADs an Chromatin bindet. Somit könnten *LMNA*-Mutationen in Bereichen der LADs, bzw. mutationsbedingte Strukturveränderungen der Lamina in diesen Domänen, die Bindung zu Chromatin beeinflussen. Dies könnte weiterer Ansatz zur Erklärung der veränderten Genexpression sein.

Ein anderes viel versprechendes Experiment wäre die Überprüfung der Topographie der Chromosomen in den morphologischen Kerndeformationen wie „blebs“ oder Mikrokernen von Patientenzellen. Über bestimmte Techniken lässt sich Aufschluss erlangen, ob in diesen Strukturen Gene in aktiver oder inaktiver Form vorliegen (Crämer et al., 2006). Dadurch könnte abgeglichen werden, ob die Akkumulation von transkriptionell aktiver RNA Polymerase II mit Bereichen aktiver Gene übereinstimmt.

Nach der Charakterisierung verschiedener Lamin A-Bindungspartner, bzw. der veränderten Bindungsaffinitäten dieser Proteine zu verschiedenen Lamin A-Mutanten, könnte das Zebrafisch-Modell näheren Aufschluss bringen, welche Rolle diese Proteine in der Muskeldifferenzierung spielen. Der Zebrafisch ist ein gutes Modell, um die Entwicklung von Gewebe und Organen zu untersuchen. Mittels Morpholino-Oligonukleotide könnten diese Lamin A-Bindungspartner „ausgeschaltet“ und die resultierenden Auswirkungen auf die Muskeldifferenzierung dokumentiert werden.

7 Literaturverzeichnis

- Aaronson, R.P. and Blobel, G.** (1975) Isolation of nuclear pore complexes in association with a lamina. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 1007-1011.
- Abraham, R.T.** (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev*, **15**, 2177-2196.
- Adelfalk, C., Scherthan, H., Hirsch-Kauffmann, M. and Schweiger, M.** (2005) Nuclear deformation characterizes Werner syndrome cells. *Cell Biol Int*, **29**, 1032-1037.
- Aebi, U., Cohn, J., Buhle, L. and Gerace, L.** (1986) The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature*, **323**, 560-564.
- Agarwal, A.K., Zhou, X.J., Hall, R.K., Nicholls, K., Bankier, A., Van Esch, H., Fryns, J.P. and Garg, A.** (2006) Focal segmental glomerulosclerosis in patients with mandibuloacral dysplasia owing to ZMPSTE24 deficiency. *J Investig Med*, **54**, 208-213.
- Allfrey, V.G.** (1966) Structural modifications of histones and their possible role in the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proc Can Cancer Conf*, **6**, 313-335.
- Alsheimer, M., Fecher, E. and Benavente, R.** (1998) Nuclear envelope remodelling during rat spermiogenesis: distribution and expression pattern of LAP2/thymopoiens. *J Cell Sci*, **111 (Pt 15)**, 2227-2234.
- Apel, E.D., Lewis, R.M., Grady, R.M. and Sanes, J.R.** (2000) Syne-1, a dystrophin- and Klarsicht-related protein associated with synaptic nuclei at the neuromuscular junction. *J Biol Chem*, **275**, 31986-31995.
- Ashery-Padan, R., Ulitzur, N., Arbel, A., Goldberg, M., Weiss, A.M., Maus, N., Fisher, P.A. and Gruenbaum, Y.** (1997) Localization and posttranslational modifications of otefin, a protein required for vesicle attachment to chromatin, during *Drosophila melanogaster* development. *Mol Cell Biol*, **17**, 4114-4123.
- Axelrod, D., Koppel, D.E., Schlessinger, J., Elson, E. and Webb, W.W.** (1976) Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J*, **16**, 1055-1069.
- Beck, K.A.** (2005) Spectrins and the Golgi. *Biochim Biophys Acta*, **1744**, 374-382.
- Ben Yaou, R., Becane, H.M., Demay, L., Laforet, P., Hannequin, D., Bohu, P.A., Drouin-Garraud, V., Ferrer, X., Mussini, J.M., Ollagnon, E., Petiot, P., Penisson-Besnier, I., Streichenberger, N., Toutain, A., Richard, P., Eymard, B. and Bonne, G.** (2005) [Autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy associated with conduction defects (LGMD1B): a description of 8 new families with the LMNA gene mutations]. *Rev Neurol (Paris)*, **161**, 42-54.
- Benavente, R. and Krohne, G.** (1986) Involvement of nuclear lamins in postmitotic reorganization of chromatin as demonstrated by microinjection of lamin antibodies. *J Cell Biol*, **103**, 1847-1854.
- Bennett, V.** (1990) Spectrin: a structural mediator between diverse plasma membrane proteins and the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol*, **2**, 51-56.
- Berger, R., Theodor, L., Shoham, J., Gokkel, E., Brok-Simoni, F., Avraham, K.B., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Rechavi, G. and Simon, A.J.** (1996) The characterization and localization of the mouse thymopoiens/lamina-associated polypeptide 2 gene and its alternatively spliced products. *Genome Res*, **6**, 361-370.
- Bione, S., Maestrini, E., Rivella, S., Mancini, M., Regis, S., Romeo, G. and Toniolo, D.** (1994) Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet*, **8**, 323-327.
- Birney, E., Kumar, S. and Krainer, A.R.** (1993) Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Res*, **21**, 5803-5816.
- Bogdanos, D.P., Baum, H., Butler, P., Rigopoulou, E.I., Davies, E.T., Ma, Y., Burroughs, A.K. and Vergani, D.** (2003) Association between the primary biliary cirrhosis specific anti-sp100 antibodies and recurrent urinary tract infection. *Dig Liver Dis*, **35**, 801-805.
- Bonne, G., Di Barletta, M.R., Varnous, S., Becane, H.M., Hammouda, E.H., Merlini, L., Muntoni, F., Greenberg, C.R., Gary, F., Urtizberea, J.A., Duboc, D., Fardeau, M., Toniolo, D. and Schwartz, K.** (1999) Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet*, **21**, 285-288.
- Bonne, G., Yaou, R.B., Beroud, C., Boriani, G., Brown, S., de Visser, M., Duboc, D., Ellis, J., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Lattanzi, G., Merlini, L., Morris, G., Muntoni, F., Opolski, G., Pinto, Y.M., Sangiuolo, F., Toniolo, D., Trembath, R., van Berlo, J.H., van der Kooi, A.J. and Wehnert, M.** (2003) 108th ENMC International Workshop, 3rd Workshop of the MYO-CLUSTER project: EUROMEN, 7th International Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy (EDMD) Workshop, 13-15 September 2002, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*, **13**, 508-515.
- Bossie, C.A. and Sanders, M.M.** (1993) A cDNA from *Drosophila melanogaster* encodes a lamin C-like intermediate filament protein. *J Cell Sci*, **104 (Pt 4)**, 1263-1272.
- Boyle, S., Gilchrist, S., Bridger, J.M., Mahy, N.L., Ellis, J.A. and Bickmore, W.A.** (2001) The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet*, **10**, 211-219.
- Brachner, A., Reipert, S., Foisner, R. and Gotzmann, J.** (2005) LEM2 is a novel MAN1-related inner nuclear membrane protein associated with A-type lamins. *J Cell Sci*, **118**, 5797-5810.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.

- Bregman, D.B., Du, L., van der Zee, S. and Warren, S.L. (1995) Transcription-dependent redistribution of the large subunit of RNA polymerase II to discrete nuclear domains. *J Cell Biol*, **129**, 287-298.
- Bridger, J.M. and Kill, I.R. (2004) Aging of Hutchinson-Gilford progeria syndrome fibroblasts is characterised by hyperproliferation and increased apoptosis. *Exp Gerontol*, **39**, 717-724.
- Bridger, J.M., Kill, I.R., O'Farrell, M. and Hutchison, C.J. (1993) Internal lamin structures within G1 nuclei of human dermal fibroblasts. *J Cell Sci*, **104 (Pt 2)**, 297-306.
- Broers, J.L., Machiels, B.M., van Eys, G.J., Kuijpers, H.J., Manders, E.M., van Driel, R. and Ramaekers, F.C. (1999) Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. *J Cell Sci*, **112 (Pt 20)**, 3463-3475.
- Broers, J.L., Peeters, E.A., Kuijpers, H.J., Endert, J., Bouten, C.V., Oomens, C.W., Baaijens, F.P. and Ramaekers, F.C. (2004) Decreased mechanical stiffness in LMNA-/- cells is caused by defective nucleocytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies. *Hum Mol Genet*, **13**, 2567-2580.
- Broers, J.L., Ramaekers, F.C., Bonne, G., Yaou, R.B. and Hutchison, C.J. (2006) Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev*, **86**, 967-1008.
- Buendia, M., Salvador, R., Cibrian, R., Laguia, M. and Sotoca, J.M. (1999) Determination of the object surface function by structured light: application to the study of spinal deformities. *Phys Med Biol*, **44**, 75-86.
- Burke, B., Mounkes, L.C. and Stewart, C.L. (2001) The nuclear envelope in muscular dystrophy and cardiovascular diseases. *Traffic*, **2**, 675-683.
- Burke, B. and Stewart, C.L. (2006) The laminopathies: the functional architecture of the nucleus and its contribution to disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **7**, 369-405.
- Burkhard, P., Stetefeld, J. and Strelkov, S.V. (2001) Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol*, **11**, 82-88.
- Buskin, J.N. and Hauschka, S.D. (1989) Identification of a myocyte nuclear factor that binds to the muscle-specific enhancer of the mouse muscle creatine kinase gene. *Mol Cell Biol*, **9**, 2627-2640.
- Cai, M., Huang, Y., Ghirlando, R., Wilson, K.L., Craigie, R. and Clore, G.M. (2001) Solution structure of the constant region of nuclear envelope protein LAP2 reveals two LEM-domain structures: one binds BAF and the other binds DNA. *EMBO J*, **20**, 4399-4407.
- Cao, H. and Hegele, R.A. (2000) Nuclear lamin A/C R482Q mutation in canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet*, **9**, 109-112.
- Capell, B.C., Erdos, M.R., Madigan, J.P., Fiordalisi, J.J., Varga, R., Conneely, K.N., Gordon, L.B., Der, C.J., Cox, A.D. and Collins, F.S. (2005) Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 12879-12884.
- Chadwick, B.P. and Willard, H.F. (2004) Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 17450-17455.
- Charge, S.B. and Rudnicki, M.A. (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*, **84**, 209-238.
- Chen, L., Lee, L., Kudlow, B.A., Dos Santos, H.G., Sletvold, O., Shafeghati, Y., Botha, E.G., Garg, A., Hanson, N.B., Martin, G.M., Mian, I.S., Kennedy, B.K. and Oshima, J. (2003) LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. *Lancet*, **362**, 440-445.
- Chen, L. and Oshima, J. (2002) Werner Syndrome. *J Biomed Biotechnol*, **2**, 46-54.
- Chondrogianni, N. and Gonos, E.S. (2005) Proteasome dysfunction in mammalian aging: steps and factors involved. *Exp Gerontol*, **40**, 931-938.
- Classon, M. and Harlow, E. (2002) The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer*, **2**, 910-917.
- Clements, L., Manilal, S., Love, D.R. and Morris, G.E. (2000) Direct interaction between emerin and lamin A. *Biochem Biophys Res Commun*, **267**, 709-714.
- Cohen, S.B., Waha, A., Gelman, I.H. and Vogt, P.K. (2001) Expression of a down-regulated target, SSeCKS, reverses v-Jun-induced transformation of 10T1/2 murine fibroblasts. *Oncogene*, **20**, 141-146.
- Cremer, T., Cremer, M., Dietzel, S., Muller, S., Solovei, I. and Fakan, S. (2006) Chromosome territories--a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 307-316.
- Crisp, M., Liu, Q., Roux, K., Rattner, J.B., Shanahan, C., Burke, B., Stahl, P.D. and Hodzic, D. (2006) Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol*, **172**, 41-53.
- Cronshaw, J.M., Krutchinsky, A.N., Zhang, W., Chait, B.T. and Matunis, M.J. (2002) Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol*, **158**, 915-927.
- Dabauvalle, M.C., Muller, E., Ewald, A., Kress, W., Krohne, G. and Muller, C.R. (1999) Distribution of emerin during the cell cycle. *Eur J Cell Biol*, **78**, 749-756.
- Dabauvalle, M.C. and Scheer, U. (1991) Assembly of nuclear pore complexes in *Xenopus* egg extract. *Biol Cell*, **72**, 25-29.
- Dahl, K.N., Scaffidi, P., Islam, M.F., Yodh, A.G., Wilson, K.L. and Misteli, T. (2006) Distinct structural and mechanical properties of the nuclear lamina in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 10271-10276.
- Davies, K.J. and Shringarpure, R. (2006) Preferential degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome may be inhibited in aging and in inflammatory neuromuscular diseases. *Neurology*, **66**, S93-96.
- De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., Lyonnet, S., Stewart, C.L., Munnich, A., Le Merrer, M. and Levy, N. (2003) Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science*, **300**, 2055.

- Debeer, P., De Borre, L., De Smet, L. and Fryns, J.P. (2003) Asymmetrical Larsen syndrome in a young girl: a second example of somatic mosaicism in this syndrome. *Genet Couns*, **14**, 95-100.
- DeBusk, F.L. (1972) The Hutchinson-Gilford progeria syndrome. Report of 4 cases and review of the literature. *J Pediatr*, **80**, 697-724.
- Dechat, T., Gotzmann, J., Stockinger, A., Harris, C.A., Talle, M.A., Siekierka, J.J. and Foisner, R. (1998) Detergent-salt resistance of LAP2alpha in interphase nuclei and phosphorylation-dependent association with chromosomes early in nuclear assembly implies functions in nuclear structure dynamics. *EMBO J*, **17**, 4887-4902.
- Dechat, T., Vlcek, S. and Foisner, R. (2000) Review: lamina-associated polypeptide 2 isoforms and related proteins in cell cycle-dependent nuclear structure dynamics. *J Struct Biol*, **129**, 335-345.
- Decostre, V., Ben Yaou, R. and Bonne, G. (2005) Laminopathies affecting skeletal and cardiac muscles: clinical and pathophysiological aspects. *Acta Myol*, **24**, 104-109.
- Dellaire, G. and Bazett-Jones, D.P. (2004) PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays*, **26**, 963-977.
- Denecke, J., Brune, T., Feldhaus, T., Robenek, H., Kranz, C., Auchus, R.J., Agarwal, A.K. and Marquardt, T. (2006) A homozygous ZMPSTE24 null mutation in combination with a heterozygous mutation in the LMNA gene causes Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS): insights into the pathophysiology of HGPS. *Hum Mutat*, **27**, 524-531.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. and et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9363-9367.
- Dorner, D., Vlcek, S., Foeger, N., Gajewski, A., Makolm, C., Gotzmann, J., Hutchison, C.J. and Foisner, R. (2006) Lamina-associated polypeptide 2alpha regulates cell cycle progression and differentiation via the retinoblastoma-E2F pathway. *J Cell Biol*, **173**, 83-93.
- Dreger, C.K., Konig, A.R., Spring, H., Lichter, P. and Herrmann, H. (2002) Investigation of nuclear architecture with a domain-presenting expression system. *J Struct Biol*, **140**, 100-115.
- Dreger, M., Bengtsson, L., Schoneberg, T., Otto, H. and Hucho, F. (2001) Nuclear envelope proteomics: novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 11943-11948.
- Dwyer, N. and Blobel, G. (1976) A modified procedure for the isolation of a pore complex-lamina fraction from rat liver nuclei. *J Cell Biol*, **70**, 581-591.
- Efuet, E.T. and Keyomarsi, K. (2006) Farnesyl and geranylgeranyl transferase inhibitors induce G1 arrest by targeting the proteasome. *Cancer Res*, **66**, 1040-1051.
- Emery, A.E. (1989) Emery-Dreifuss syndrome. *J Med Genet*, **26**, 637-641.
- Emery, A.E. (2000) Emery-Dreifuss muscular dystrophy - a 40 year retrospective. *Neuromuscul Disord*, **10**, 228-232.
- Emery, A.E. and Dreifuss, F.E. (1966) Unusual type of benign x-linked muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **29**, 338-342.
- Eriksson, M., Brown, W.T., Gordon, L.B., Glynn, M.W., Singer, J., Scott, L., Erdos, M.R., Robbins, C.M., Moses, T.Y., Berglund, P., Dutra, A., Pak, E., Durkin, S., Csoka, A.B., Boehnke, M., Glover, T.W. and Collins, F.S. (2003) Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*, **423**, 293-298.
- Fairley, E.A., Kendrick-Jones, J. and Ellis, J.A. (1999) The Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype arises from aberrant targeting and binding of emerin at the inner nuclear membrane. *J Cell Sci*, **112 (Pt 15)**, 2571-2582.
- Fairley, E.A., Riddell, A., Ellis, J.A. and Kendrick-Jones, J. (2002) The cell cycle dependent mislocalisation of emerin may contribute to the Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype. *J Cell Sci*, **115**, 341-354.
- Fatkin, D., Christe, M.E., Aristizabal, O., McConnell, B.K., Srinivasan, S., Schoen, F.J., Seidman, C.E., Turnbull, D.H. and Seidman, J.G. (1999) Neonatal cardiomyopathy in mice homozygous for the Arg403Gln mutation in the alpha cardiac myosin heavy chain gene. *J Clin Invest*, **103**, 147-153.
- Fatkin, D., MacRae, C., Sasaki, T., Wolff, M.R., Porcu, M., Frenneaux, M., Atherton, J., Vidaillet, H.J., Jr., Spudich, S., De Girolami, U., Seidman, J.G., Seidman, C., Muntoni, F., Muehle, G., Johnson, W. and McDonough, B. (1999) Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med*, **341**, 1715-1724.
- Favreau, C., Dubosclard, E., Ostlund, C., Vigouroux, C., Capeau, J., Wehnert, M., Higuete, D., Worman, H.J., Courvalin, J.C. and Buendia, B. (2003) Expression of lamin A mutated in the carboxyl-terminal tail generates an aberrant nuclear phenotype similar to that observed in cells from patients with Dunnigan-type partial lipodystrophy and Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Exp Cell Res*, **282**, 14-23.
- Favreau, C., Higuete, D., Courvalin, J.C. and Buendia, B. (2004) Expression of a mutant lamin A that causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy inhibits in vitro differentiation of C2C12 myoblasts. *Mol Cell Biol*, **24**, 1481-1492.
- Favreau, C., Worman, H.J., Wozniak, R.W., Frappier, T. and Courvalin, J.C. (1996) Cell cycle-dependent phosphorylation of nucleoporins and nuclear pore membrane protein Gp210. *Biochemistry*, **35**, 8035-8044.
- Fawcett, D.W. (1966) On the occurrence of a fibrous lamina on the inner aspect of the nuclear envelope in certain cells of vertebrates. *Am J Anat*, **119**, 129-145.
- Feng, X.H. and Derynck, R. (2005) Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **21**, 659-693.

- Fidzianska, A. and Hausmanowa-Petrusewicz, I.** (2003) Architectural abnormalities in muscle nuclei. Ultrastructural differences between X-linked and autosomal dominant forms of EDMD. *J Neurol Sci*, **210**, 47-51.
- Filesi, I., Gullotta, F., Lattanzi, G., D'Apice, M.R., Capanni, C., Nardone, A.M., Columbaro, M., Scarano, G., Mattioli, E., Sabatelli, P., Maraldi, N.M., Biocca, S. and Novelli, G.** (2005) Alterations of nuclear envelope and chromatin organization in mandibuloacral dysplasia, a rare form of laminopathy. *Physiol Genomics*, **23**, 150-158.
- Fisher, D.Z., Chaudhary, N. and Blobel, G.** (1986) cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 6450-6454.
- Foisner, R.** (2001) Inner nuclear membrane proteins and the nuclear lamina. *J Cell Sci*, **114**, 3791-3792.
- Foisner, R. and Gerace, L.** (1993) Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell*, **73**, 1267-1279.
- Fong, L.G., Ng, J.K., Lammerding, J., Vickers, T.A., Meta, M., Cote, N., Gavino, B., Qiao, X., Chang, S.Y., Young, S.R., Yang, S.H., Stewart, C.L., Lee, R.T., Bennett, C.F., Bergo, M.O. and Young, S.G.** (2006) Prelamin A and lamin A appear to be dispensable in the nuclear lamina. *J Clin Invest*, **116**, 743-752.
- Fridkin, A., Mills, E., Margalit, A., Neufeld, E., Lee, K.K., Feinstein, N., Cohen, M., Wilson, K.L. and Gruenbaum, Y.** (2004) Matefin, a *Caenorhabditis elegans* germ line-specific SUN-domain nuclear membrane protein, is essential for early embryonic and germ cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 6987-6992.
- Frolov, M.V. and Dyson, N.J.** (2004) Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J Cell Sci*, **117**, 2173-2181.
- Fu, X.D. and Maniatis, T.** (1990) Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature*, **343**, 437-441.
- Furukawa, K.** (1999) LAP2 binding protein 1 (L2BP1/BAF) is a candidate mediator of LAP2-chromatin interaction. *J Cell Sci*, **112** (Pt 15), 2485-2492.
- Furukawa, K., Fritze, C.E. and Gerace, L.** (1998) The major nuclear envelope targeting domain of LAP2 coincides with its lamin binding region but is distinct from its chromatin interaction domain. *J Biol Chem*, **273**, 4213-4219.
- Furukawa, K. and Kondo, T.** (1998) Identification of the lamina-associated-polypeptide-2-binding domain of B-type lamin. *Eur J Biochem*, **251**, 729-733.
- Furukawa, K., Pante, N., Aebi, U. and Gerace, L.** (1995) Cloning of a cDNA for lamina-associated polypeptide 2 (LAP2) and identification of regions that specify targeting to the nuclear envelope. *EMBO J*, **14**, 1626-1636.
- Furukawa, K., Sugiyama, S., Osouda, S., Goto, H., Inagaki, M., Horigome, T., Omata, S., McConnell, M., Fisher, P.A. and Nishida, Y.** (2003) Barrier-to-autointegration factor plays crucial roles in cell cycle progression and nuclear organization in *Drosophila*. *J Cell Sci*, **116**, 3811-3823.
- Gareiss, M., Eberhardt, K., Kruger, E., Kandert, S., Bohm, C., Zentgraf, H., Muller, C.R. and Dabauvalle, M.C.** (2005) Emerin expression in early development of *Xenopus laevis*. *Eur J Cell Biol*, **84**, 295-309.
- Georgatos, S.D.** (2001) The inner nuclear membrane: simple, or very complex? *EMBO J*, **20**, 2989-2994.
- Gerace, L. and Blobel, G.** (1980) The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell*, **19**, 277-287.
- Gerace, L., Blum, A. and Blobel, G.** (1978) Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution. *J Cell Biol*, **79**, 546-566.
- Gieffers, C. and Krohne, G.** (1991) In vitro reconstitution of recombinant lamin A and a lamin A mutant lacking the carboxy-terminal tail. *Eur J Cell Biol*, **55**, 191-199.
- Giglia-Mari, G., Coin, F., Ranish, J.A., Hoogstraten, D., Theil, A., Wijgers, N., Jaspers, N.G., Raams, A., Argentini, M., van der Spek, P.J., Botta, E., Stefanini, M., Egly, J.M., Aebersold, R., Hoeijmakers, J.H. and Vermeulen, W.** (2004) A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. *Nat Genet*, **36**, 714-719.
- Gilchrist, S., Gilbert, N., Perry, P., Ostlund, C., Worman, H.J. and Bickmore, W.A.** (2004) Altered protein dynamics of disease-associated lamin A mutants. *BMC Cell Biol*, **5**, 46.
- Gluzman, Y.** (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, **23**, 175-182.
- Goldman, A.E., Moir, R.D., Montag-Lowy, M., Stewart, M. and Goldman, R.D.** (1992) Pathway of incorporation of microinjected lamin A into the nuclear envelope. *J Cell Biol*, **119**, 725-735.
- Goldman, R.D., Shumaker, D.K., Erdos, M.R., Eriksson, M., Goldman, A.E., Gordon, L.B., Gruenbaum, Y., Khuon, S., Mendez, M., Varga, R. and Collins, F.S.** (2004) Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8963-8968.
- Gordon, L.B., McCarten, K.M., Giobbie-Hurder, A., Machan, J.T., Campbell, S.E., Berns, S.D. and Kieran, M.W.** (2007) Disease progression in Hutchinson-Gilford progeria syndrome: impact on growth and development. *Pediatrics*, **120**, 824-833.
- Gotzmann, J. and Foisner, R.** (1999) Lamins and lamin-binding proteins in functional chromatin organization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, **9**, 257-265.
- Gotzmann, J. and Foisner, R.** (2006) A-type lamin complexes and regenerative potential: a step towards understanding laminopathic diseases? *Histochem Cell Biol*, **125**, 33-41.

- Gotzmann, J., Vlack, S. and Foisner, R.** (2000) Caspase-mediated cleavage of the chromosome-binding domain of lamina-associated polypeptide 2 alpha. *J Cell Sci*, **113 Pt 21**, 3769-3780.
- Gruber, J., Lampe, T., Osborn, M. and Weber, K.** (2005) RNAi of FACE1 protease results in growth inhibition of human cells expressing lamin A: implications for Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *J Cell Sci*, **118**, 689-696.
- Gruenbaum, Y., Goldman, R.D., Meyuhas, R., Mills, E., Margalit, A., Fridkin, A., Dayani, Y., Prokocimer, M. and Enosh, A.** (2003) The nuclear lamina and its functions in the nucleus. *Int Rev Cytol*, **226**, 1-62.
- Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R.D., Shumaker, D.K. and Wilson, K.L.** (2005) The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 21-31.
- Gruver, E.J., Fatkin, D., Dodds, G.A., Kisslo, J., Maron, B.J., Seidman, J.G. and Seidman, C.E.** (1999) Familial hypertrophic cardiomyopathy and atrial fibrillation caused by Arg663His beta-cardiac myosin heavy chain mutation. *Am J Cardiol*, **83**, 13H-18H.
- Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M.B., Talhout, W., Eussen, B.H., de Klein, A., Wessels, L., de Laat, W. and van Steensel, B.** (2008) Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature*, **453**, 948-951.
- Guo, C.S., Degrin, C., Fiddler, T.A., Stauffer, D. and Thayer, M.J.** (2003) Regulation of MyoD activity and muscle cell differentiation by MDM2, pRb, and Sp1. *J Biol Chem*, **278**, 22615-22622.
- Haraguchi, T., Holaska, J.M., Yamane, M., Koujin, T., Hashiguchi, N., Mori, C., Wilson, K.L. and Hiraoka, Y.** (2004) Emerin binding to Btf, a death-promoting transcriptional repressor, is disrupted by a missense mutation that causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Eur J Biochem*, **271**, 1035-1045.
- Haraguchi, T., Koujin, T., Segura-Totten, M., Lee, K.K., Matsuoka, Y., Yoneda, Y., Wilson, K.L. and Hiraoka, Y.** (2001) BAF is required for emerin assembly into the reforming nuclear envelope. *J Cell Sci*, **114**, 4575-4585.
- Harborth, J., Elbashir, S.M., Bechert, K., Tuschl, T. and Weber, K.** (2001) Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci*, **114**, 4557-4565.
- Harris, C.A., Andryuk, P.J., Cline, S.W., Mathew, S., Siekierka, J.J. and Goldstein, G.** (1995) Structure and mapping of the human thymopoietin (TMPO) gene and relationship of human TMPO beta to rat lamin-associated polypeptide 2. *Genomics*, **28**, 198-205.
- Hautanen, A. and Linder, E.** (1981) C3c-binding ELISA for the detection of immunoglobulins and immunoglobulin aggregates. *Methods Enzymol*, **74 Pt C**, 588-607.
- Heessen, S. and Fornerod, M.** (2007) The inner nuclear envelope as a transcription factor resting place. *EMBO Rep*, **8**, 914-919.
- Hegele, R.A., Cao, H., Liu, D.M., Costain, G.A., Charlton-Menys, V., Rodger, N.W. and Durrington, P.N.** (2006) Sequencing of the reannotated LMNB2 gene reveals novel mutations in patients with acquired partial lipodystrophy. *Am J Hum Genet*, **79**, 383-389.
- Heitlinger, E., Peter, M., Haner, M., Lustig, A., Aebi, U. and Nigg, E.A.** (1991) Expression of chicken lamin B2 in Escherichia coli: characterization of its structure, assembly, and molecular interactions. *J Cell Biol*, **113**, 485-495.
- Hellemans, J., Preobrazhenska, O., Willaert, A., Debeer, P., Verdonk, P.C., Costa, T., Janssens, K., Menten, B., Van Roy, N., Vermeulen, S.J., Savarirayan, R., Van Hul, W., Vanhoenacker, F., Huylebroeck, D., De Paepe, A., Naeyaert, J.M., Vandesompele, J., Speleman, F., Verschueren, K., Coucke, P.J. and Mortier, G.R.** (2004) Loss-of-function mutations in LEMD3 result in osteopoikilosis, Buschke-Ollendorff syndrome and melorheostosis. *Nat Genet*, **36**, 1213-1218.
- Hetzer, M.W., Walther, T.C. and Mattaj, I.W.** (2005) Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **21**, 347-380.
- Hirano, Y., Segawa, M., Ouchi, F.S., Yamakawa, Y., Furukawa, K., Takeyasu, K. and Horigome, T.** (2005) Dissociation of emerin from barrier-to-autointegration factor is regulated through mitotic phosphorylation of emerin in a xenopus egg cell-free system. *J Biol Chem*, **280**, 39925-39933.
- Hodzic, D.M., Yeater, D.B., Bengtsson, L., Otto, H. and Stahl, P.D.** (2004) Sun2 is a novel mammalian inner nuclear membrane protein. *J Biol Chem*, **279**, 25805-25812.
- Hofemeister, H., Weber, K. and Stick, R.** (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**, 3233-3246.
- Hoffmann, K., Dreger, C.K., Olins, A.L., Olins, D.E., Shultz, L.D., Lucke, B., Karl, H., Kaps, R., Muller, D., Vaya, A., Aznar, J., Ware, R.E., Sotelo Cruz, N., Lindner, T.H., Herrmann, H., Reis, A. and Sperling, K.** (2002) Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huet anomaly). *Nat Genet*, **31**, 410-414.
- Hoger, T.H., Grund, C., Franke, W.W. and Krohne, G.** (1991) Immunolocalization of lamins in the thick nuclear lamina of human synovial cells. *Eur J Cell Biol*, **54**, 150-156.
- Holaska, J.M., Kowalski, A.K. and Wilson, K.L.** (2004) Emerin caps the pointed end of actin filaments: evidence for an actin cortical network at the nuclear inner membrane. *PLoS Biol*, **2**, E231.
- Holaska, J.M., Lee, K.K., Kowalski, A.K. and Wilson, K.L.** (2003) Transcriptional repressor germ cell-less (GCL) and barrier to autointegration factor (BAF) compete for binding to emerin in vitro. *J Biol Chem*, **278**, 6969-6975.
- Horn, P.J. and Peterson, C.L.** (2002) Molecular biology. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription. *Science*, **297**, 1824-1827.

- Hu, C.D., Chinenov, Y. and Kerppola, T.K.** (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell*, **9**, 789-798.
- Hutchison, C.J. and Worman, H.J.** (2004) A-type lamins: guardians of the soma? *Nat Cell Biol*, **6**, 1062-1067.
- Jacob, K.N., Baptista, F., dos Santos, H.G., Oshima, J., Agarwal, A.K. and Garg, A.** (2005) Phenotypic heterogeneity in body fat distribution in patients with atypical Werner's syndrome due to heterozygous Arg133Leu lamin A/C mutation. *J Clin Endocrinol Metab*, **90**, 6699-6706.
- Johnson, B.R., Nitta, R.T., Frock, R.L., Mounkes, L., Barbie, D.A., Stewart, C.L., Harlow, E. and Kennedy, B.K.** (2004) A-type lamins regulate retinoblastoma protein function by promoting subnuclear localization and preventing proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9677-9682.
- Jongens, T.A., Hay, B., Jan, L.Y. and Jan, Y.N.** (1992) The germ cell-less gene product: a posteriorly localized component necessary for germ cell development in *Drosophila*. *Cell*, **70**, 569-584.
- Kamakaka, R.T. and Biggins, S.** (2005) Histone variants: deviants? *Genes Dev*, **19**, 295-310.
- Karkkainen, S., Helio, T., Miettinen, R., Tuomainen, P., Peltola, P., Rummukainen, J., Ylitalo, K., Kaartinen, M., Kuusisto, J., Toivonen, L., Nieminen, M.S., Laakso, M. and Peuhkurinen, K.** (2004) A novel mutation, Ser143Pro, in the lamin A/C gene is common in Finnish patients with familial dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*, **25**, 885-893.
- Kandert, S.** (2005) Untersuchung der Kernstruktur und der Verteilung nukleärer Proteine bei Laminopathien. *Diplomarbeit*; Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie, Universität Würzburg.
- Kandert, S., Luke, Y., Kleinhenz, T., Neumann, S., Lu, W., Jaeger, V.M., Munck, M., Wehnert, M., Müller, C.R., Zhou, Z., Noegel, A.A., Dabauvalle, M.C. and Karakesisoglou, I.** (2007) Nesprin-2 giant safeguards nuclear envelope architecture in LMNA S143F progeria cells. *Hum Mol Genet*, **16**, 2944-2959.
- Kerppola, T.K.** (2006) Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat Protoc*, **1**, 1278-1286.
- Kihlmark, M., Imreh, G. and Hallberg, E.** (2001) Sequential degradation of proteins from the nuclear envelope during apoptosis. *J Cell Sci*, **114**, 3643-3653.
- Kirschner, J., Brune, T., Wehnert, M., Denecke, J., Wasner, C., Feuer, A., Marquardt, T., Ketelsen, U.P., Wieacker, P., Bonnemann, C.G. and Korinthenberg, R.** (2005) p.S143F mutation in lamin A/C: a new phenotype combining myopathy and progeria. *Ann Neurol*, **57**, 148-151.
- Kitaguchi, T., Matsubara, S., Sato, M., Miyamoto, K., Hirai, S., Schwartz, K. and Bonne, G.** (2001) A missense mutation in the exon 8 of lamin A/C gene in a Japanese case of autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy and cardiac conduction block. *Neuromuscul Disord*, **11**, 542-546.
- Klapper, M., Exner, K., Kempf, A., Gehrig, C., Stuurman, N., Fisher, P.A. and Krohne, G.** (1997) Assembly of A- and B-type lamins studied in vivo with the baculovirus system. *J Cell Sci*, **110** (Pt 20), 2519-2532.
- Kleinhenz, T.** (2007) In vitro- und in vivo-Untersuchung der Effekte der LMNA-S143F-Mutation auf die Bildung der Lamina. *Diplomarbeit*; Lehrstuhl für Elektronenmikroskopie, Universität Würzburg.
- Kobayashi, Y., Sakemura, R., Kumagai, A., Sumikawa, E., Fujii, M. and Ayusawa, D.** (2008) Nuclear swelling occurs during premature senescence mediated by MAP kinases in normal human fibroblasts. *Biosci Biotechnol Biochem*, **72**, 1122-1125.
- Krohne, G.** (1998) Lamin assembly in vivo. *Subcell Biochem*, **31**, 563-586.
- Krohne, G.** (2004) Lamins. *Methods Cell Biol*, **78**, 573-596.
- Krohne, G., Benavente, R., Scheer, U. and Dabauvalle, M.C.** (2005) The nuclear lamina in Heidelberg and Würzburg: a personal view. *Eur J Cell Biol*, **84**, 163-179.
- Laguri, C., Gilquin, B., Wolff, N., Romi-Lebrun, R., Courchay, K., Callebaut, I., Worman, H.J. and Zinn-Justin, S.** (2001) Structural characterization of the LEM motif common to three human inner nuclear membrane proteins. *Structure*, **9**, 503-511.
- Lammerding, J., Schulze, P.C., Takahashi, T., Kozlov, S., Sullivan, T., Kamm, R.D., Stewart, C.L. and Lee, R.T.** (2004) Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J Clin Invest*, **113**, 370-378.
- Lapidos, K.A., Kakkar, R. and McNally, E.M.** (2004) The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res*, **94**, 1023-1031.
- Lattanzi, G., Cenni, V., Marmioli, S., Capanni, C., Mattioli, E., Merlini, L., Squarzone, S. and Maraldi, N.M.** (2003) Association of emerin with nuclear and cytoplasmic actin is regulated in differentiating myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, **303**, 764-770.
- Laugwitz, K.L., Moretti, A., Lam, J., Gruber, P., Chen, Y., Woodard, S., Lin, L.Z., Cai, C.L., Lu, M.M., Reth, M., Platoshyn, O., Yuan, J.X., Evans, S. and Chien, K.R.** (2005) Postnatal Isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*, **433**, 647-653.
- Lee, K.K., Gruenbaum, Y., Spann, P., Liu, J. and Wilson, K.L.** (2000) *C. elegans* nuclear envelope proteins emerin, MAN1, lamin, and nucleoporins reveal unique timing of nuclear envelope breakdown during mitosis. *Mol Biol Cell*, **11**, 3089-3099.
- Lee, K.K., Haraguchi, T., Lee, R.S., Koujin, T., Hiraoka, Y. and Wilson, K.L.** (2001) Distinct functional domains in emerin bind lamin A and DNA-bridging protein BAF. *J Cell Sci*, **114**, 4567-4573.
- Lee, M.S. and Craigie, R.** (1998) A previously unidentified host protein protects retroviral DNA from autointegration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 1528-1533.
- Lenz-Bohme, B., Wismar, J., Fuchs, S., Reifegerste, R., Buchner, E., Betz, H. and Schmitt, B.** (1997) Insertional mutation of the *Drosophila* nuclear lamin Dm0 gene results in defective nuclear envelopes, clustering of nuclear pore complexes, and accumulation of annulate lamellae. *J Cell Biol*, **137**, 1001-1016.

- Lewis, J.A., Fleming, J.T., McLafferty, S., Murphy, H. and Wu, C. (1987) The levamisole receptor, a cholinergic receptor of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol Pharmacol*, **31**, 185-193.
- Li, A., Eirin-Lopez, J.M. and Ausio, J. (2005) H2AX: tailoring histone H2A for chromatin-dependent genomic integrity. *Biochem Cell Biol*, **83**, 505-515.
- Libotte, T., Zaim, H., Abraham, S., Padmakumar, V.C., Schneider, M., Lu, W., Munck, M., Hutchison, C., Wehnert, M., Fahrenkrog, B., Sauder, U., Aebi, U., Noegel, A.A. and Karakesisoglou, I. (2005) Lamin A/C-dependent localization of Nesprin-2, a giant scaffold at the nuclear envelope. *Mol Biol Cell*, **16**, 3411-3424.
- Lin, F., Blake, D.L., Callebaut, I., Skerjanc, I.S., Holmer, L., McBurney, M.W., Paulin-Levasseur, M. and Worman, H.J. (2000) MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated polypeptide 2 and emerin. *J Biol Chem*, **275**, 4840-4847.
- Linke, A., Muller, P., Nurzynska, D., Casarsa, C., Torella, D., Nascimbene, A., Castaldo, C., Cascapera, S., Bohm, M., Quaini, F., Urbanek, K., Leri, A., Hintze, T.H., Kajstura, J. and Anversa, P. (2005) Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 8966-8971.
- Liu, B., Wang, J., Chan, K.M., Tjia, W.M., Deng, W., Guan, X., Huang, J.D., Li, K.M., Chau, P.Y., Chen, D.J., Pei, D., Pendas, A.M., Cadinanos, J., Lopez-Otin, C., Tse, H.F., Hutchison, C., Chen, J., Cao, Y., Cheah, K.S., Tryggvason, K. and Zhou, Z. (2005) Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat Med*, **11**, 780-785.
- Liu, J., Lee, K.K., Segura-Totten, M., Neufeld, E., Wilson, K.L. and Gruenbaum, Y. (2003) MAN1 and emerin have overlapping function(s) essential for chromosome segregation and cell division in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 4598-4603.
- Liu, J., Song, K. and Wolfner, M.F. (1995) Mutational analyses of fs(1)Ya, an essential, developmentally regulated, nuclear envelope protein in *Drosophila*. *Genetics*, **141**, 1473-1481.
- Liu, X., Ouyang, Q., Huang, L., Ma, H., Hu, R. and Zhang, Y. (2000) [Isolation and phenotypic analysis of lamina propria mononuclear cells from colonoscopic biopsy specimens]. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao*, **31**, 116-118.
- Liu, Y., Rusinol, A., Sinensky, M., Wang, Y. and Zou, Y. (2006) DNA damage responses in progeroid syndromes arise from defective maturation of prelamin A. *J Cell Sci*, **119**, 4644-4649.
- Lloyd, D.J., Trembath, R.C. and Shackleton, S. (2002) A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum Mol Genet*, **11**, 769-777.
- Loewinger, L. and McKeone, F. (1988) Mutations in the nuclear lamin proteins resulting in their aberrant assembly in the cytoplasm. *EMBO J*, **7**, 2301-2309.
- Lombard, D.B., Chua, K.F., Mostoslavsky, R., Franco, S., Gostissa, M. and Alt, F.W. (2005) DNA repair, genome stability, and aging. *Cell*, **120**, 497-512.
- Lopez, J.M. and Wolfner, M.F. (1997) The developmentally regulated *Drosophila* embryonic nuclear lamina protein 'Young Arrest' (fs(1)Ya) is capable of associating with chromatin. *J Cell Sci*, **110** (Pt 5), 643-651.
- Lopez-Soler, R.I., Moir, R.D., Spann, T.P., Stick, R. and Goldman, R.D. (2001) A role for nuclear lamins in nuclear envelope assembly. *J Cell Biol*, **154**, 61-70.
- Lounsbury, K.M., Beddow, A.L. and Macara, I.G. (1994) A family of proteins that stabilize the Ran/TC4 GTPase in its GTP-bound conformation. *J Biol Chem*, **269**, 11285-11290.
- Lourim, D., Kempf, A. and Krohne, G. (1996) Characterization and quantitation of three B-type lamins in *Xenopus* oocytes and eggs: increase of lamin LI protein synthesis during meiotic maturation. *J Cell Sci*, **109** (Pt 7), 1775-1785.
- Luderus, M.E., de Graaf, A., Mattia, E., den Blaauwen, J.L., Grande, M.A., de Jong, L. and van Driel, R. (1992) Binding of matrix attachment regions to lamin B1. *Cell*, **70**, 949-959.
- Luderus, M.E., den Blaauwen, J.L., de Smit, O.J., Compton, D.A. and van Driel, R. (1994) Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. *Mol Cell Biol*, **14**, 6297-6305.
- Luke, Y., Zaim, H., Karakesisoglou, I., Jaeger, V.M., Sellin, L., Lu, W., Schneider, M., Neumann, S., Beijer, A., Munck, M., Padmakumar, V.C., Gloy, J., Walz, G. and Noegel, A.A. (2008) Nesprin-2 Giant (NUANCE) maintains nuclear envelope architecture and composition in skin. *J Cell Sci*, **121**, 1887-1898.
- Machiels, B.M., Zorenc, A.H., Endert, J.M., Kuijpers, H.J., van Eys, G.J., Ramaekers, F.C. and Broers, J.L. (1996) An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10. *J Biol Chem*, **271**, 9249-9253.
- Madej-Pilarczyk, A., Kmiec, T., Fidzianska, A., Rekawek, J., Niebroj-Dobosz, I., Turska-Kmiec, A., Nestorowicz, K., Jozwiak, S. and Hausmanowa-Petrusewicz, I. (2008) Progeria caused by a rare LMNA mutation p.S143F associated with mild myopathy and atrial fibrillation. *Eur J Paediatr Neurol*, **12**, 427-430.
- Maison, C. and Almouzni, G. (2004) HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 296-304.
- Mallampalli, M.P., Huyer, G., Bendale, P., Gelb, M.H. and Michaelis, S. (2005) Inhibiting farnesylation reverses the nuclear morphology defect in a HeLa cell model for Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 14416-14421.

- Malone, C.J., Fixsen, W.D., Horvitz, H.R. and Han, M.** (1999) UNC-84 localizes to the nuclear envelope and is required for nuclear migration and anchoring during *C. elegans* development. *Development*, **126**, 3171-3181.
- Malone, C.J., Misner, L., Le Bot, N., Tsai, M.C., Campbell, J.M., Ahringer, J. and White, J.G.** (2003) The *C. elegans* hook protein, ZYG-12, mediates the essential attachment between the centrosome and nucleus. *Cell*, **115**, 825-836.
- Mancini, M.A., Shan, B., Nickerson, J.A., Penman, S. and Lee, W.H.** (1994) The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 418-422.
- Manilal, S., Recan, D., Sewry, C.A., Hoeltzenbein, M., Llense, S., Leturcq, F., Deburgrave, N., Barbot, J., Man, N., Muntoni, F., Wehnert, M., Kaplan, J. and Morris, G.E.** (1998) Mutations in Emery-Dreifuss muscular dystrophy and their effects on emerin protein expression. *Hum Mol Genet*, **7**, 855-864.
- Manilal, S., Sewry, C.A., Pereboev, A., Man, N., Gobbi, P., Hawkes, S., Love, D.R. and Morris, G.E.** (1999) Distribution of emerin and lamins in the heart and implications for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*, **8**, 353-359.
- Manju, K., Muralikrishna, B. and Parnaik, V.K.** (2006) Expression of disease-causing lamin A mutants impairs the formation of DNA repair foci. *J Cell Sci*, **119**, 2704-2714.
- Mansharamani, M., Hewetson, A. and Chilton, B.S.** (2001) Cloning and characterization of an atypical Type IV P-type ATPase that binds to the RING motif of RUSH transcription factors. *J Biol Chem*, **276**, 3641-3649.
- Mansharamani, M. and Wilson, K.L.** (2005) Direct binding of nuclear membrane protein MAN1 to emerin in vitro and two modes of binding to barrier-to-autointegration factor. *J Biol Chem*, **280**, 13863-13870.
- Mariappan, I. and Parnaik, V.K.** (2005) Sequestration of pRb by cyclin D3 causes intranuclear reorganization of lamin A/C during muscle cell differentiation. *Mol Biol Cell*, **16**, 1948-1960.
- Markiewicz, E., Dechat, T., Foisner, R., Quinlan, R.A. and Hutchison, C.J.** (2002) Lamin A/C binding protein LAP2alpha is required for nuclear anchorage of retinoblastoma protein. *Mol Biol Cell*, **13**, 4401-4413.
- Markiewicz, E., Ledran, M. and Hutchison, C.J.** (2005) Remodelling of the nuclear lamina and nucleoskeleton is required for skeletal muscle differentiation in vitro. *J Cell Sci*, **118**, 409-420.
- Markiewicz, E., Venables, R., Mauricio Alvarez, R., Quinlan, R., Dorobek, M., Hausmanowa-Petrucewicz, I. and Hutchison, C.** (2002) Increased solubility of lamins and redistribution of lamin C in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy fibroblasts. *J Struct Biol*, **140**, 241-253.
- Marshall, W.F., Dernburg, A.F., Harmon, B., Agard, D.A. and Sedat, J.W.** (1996) Specific interactions of chromatin with the nuclear envelope: positional determination within the nucleus in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Cell*, **7**, 825-842.
- Martin, L., Crimardo, C. and Gerace, L.** (1995) cDNA cloning and characterization of lamina-associated polypeptide 1C (LAP1C), an integral protein of the inner nuclear membrane. *J Biol Chem*, **270**, 8822-8828.
- Maske, C.P., Hollinshead, M.S., Higbee, N.C., Bergo, M.O., Young, S.G. and Vaux, D.J.** (2003) A carboxyl-terminal interaction of lamin B1 is dependent on the CAAX endoprotease Rce1 and carboxymethylation. *J Cell Biol*, **162**, 1223-1232.
- Mattout, A., Dechat, T., Adam, S.A., Goldman, R.D. and Gruenbaum, Y.** (2006) Nuclear lamins, diseases and aging. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 335-341.
- Mattout, A., Goldberg, M., Tzur, Y., Margalit, A. and Gruenbaum, Y.** (2007) Specific and conserved sequences in *D. melanogaster* and *C. elegans* lamins and histone H2A mediate the attachment of lamins to chromosomes. *J Cell Sci*, **120**, 77-85.
- Mawal-Dewan, M., Frisoni, L., Cristofalo, V.J. and Sell, C.** (2003) Extension of replicative lifespan in WI-38 human fibroblasts by dexamethasone treatment is accompanied by suppression of p21 Waf1/Cip1/Sdi1 levels. *Exp Cell Res*, **285**, 91-98.
- McConnell, B.K., Jones, K.A., Fatkin, D., Arroyo, L.H., Lee, R.T., Aristizabal, O., Turnbull, D.H., Georgakopoulos, D., Kass, D., Bond, M., Niimura, H., Schoen, F.J., Conner, D., Fischman, D.A., Seidman, C.E. and Seidman, J.G.** (1999) Dilated cardiomyopathy in homozygous myosin-binding protein-C mutant mice. *J Clin Invest*, **104**, 1771.
- McKeon, F.D.** (1987) Nuclear lamin proteins and the structure of the nuclear envelope: where is the function? *Bioessays*, **7**, 169-173.
- McKeon, F.D., Kirschner, M.W. and Caput, D.** (1986) Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature*, **319**, 463-468.
- Mehdirad, A.A., Fatkin, D., DiMarco, J.P., MacRae, C.A., Wase, A., Seidman, J.G., Seidman, C.E. and Benson, D.W.** (1999) Electrophysiologic characteristics of accessory atrioventricular connections in an inherited form of Wolff-Parkinson-White syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*, **10**, 629-635.
- Melcon, G., Kozlov, S., Cutler, D.A., Sullivan, T., Hernandez, L., Zhao, P., Mitchell, S., Nader, G., Bakay, M., Rottman, J.N., Hoffman, E.P. and Stewart, C.L.** (2006) Loss of emerin at the nuclear envelope disrupts the Rb1/E2F and MyoD pathways during muscle regeneration. *Hum Mol Genet*, **15**, 637-651.
- Mislow, J.M., Kim, M.S., Davis, D.B. and McNally, E.M.** (2002) Myne-1, a spectrin repeat transmembrane protein of the myocyte inner nuclear membrane, interacts with lamin A/C. *J Cell Sci*, **115**, 61-70.
- Misteli, T. and Scaffidi, P.** (2005) Genome instability in progeria: when repair gets old. *Nat Med*, **11**, 718-719.
- Moir, R.D., Montag-Lowy, M. and Goldman, R.D.** (1994) Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication. *J Cell Biol*, **125**, 1201-1212.
- Moir, R.D., Spann, T.P. and Goldman, R.D.** (1995) The dynamic properties and possible functions of nuclear lamins. *Int Rev Cytol*, **162B**, 141-182.

- Moir, R.D., Yoon, M., Khuon, S. and Goldman, R.D. (2000) Nuclear lamins A and B1: different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells. *J Cell Biol*, **151**, 1155-1168.
- Mounkes, L.C., Kozlov, S.V., Rottman, J.N. and Stewart, C.L. (2005) Expression of an LMNA-N195K variant of A-type lamins results in cardiac conduction defects and death in mice. *Hum Mol Genet*, **14**, 2167-2180.
- Muchir, A., Bonne, G., van der Kooij, A.J., van Meegen, M., Baas, F., Bolhuis, P.A., de Visser, M. and Schwartz, K. (2000) Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet*, **9**, 1453-1459.
- Muchir, A., van Engelen, B.G., Lammens, M., Mislow, J.M., McNally, E., Schwartz, K. and Bonne, G. (2003) Nuclear envelope alterations in fibroblasts from LGMD1B patients carrying nonsense Y259X heterozygous or homozygous mutation in lamin A/C gene. *Exp Cell Res*, **291**, 352-362.
- Nagano, A., Koga, R., Ogawa, M., Kurano, Y., Kawada, J., Okada, R., Hayashi, Y.K., Tsukahara, T. and Arahata, K. (1996) Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet*, **12**, 254-259.
- Navarro, C.L., Cadinanos, J., De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Courrier, S., Boccaccio, I., Boyer, A., Kleijer, W.J., Wagner, A., Giuliano, F., Beemer, F.A., Freije, J.M., Cau, P., Hennekam, R.C., Lopez-Otin, C., Badens, C. and Levy, N. (2005) Loss of ZMPSTE24 (FACE-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and accumulation of Lamin A precursors. *Hum Mol Genet*, **14**, 1503-1513.
- Navarro, C.L., De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Boccaccio, I., Boyer, A., Genevieve, D., Hadj-Rabia, S., Gaudy-Marqueste, C., Smitt, H.S., Vabres, P., Faivre, L., Verloes, A., Van Essen, T., Flori, E., Hennekam, R., Beemer, F.A., Laurent, N., Le Merrer, M., Cau, P. and Levy, N. (2004) Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) defects cause nuclear disorganization and identify restrictive dermopathy as a lethal neonatal laminopathy. *Hum Mol Genet*, **13**, 2493-2503.
- Nevins, J.R., Chellappan, S.P., Mudryj, M., Hiebert, S., Devoto, S., Horowitz, J., Hunter, T. and Pines, J. (1991) E2F transcription factor is a target for the RB protein and the cyclin A protein. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **56**, 157-162.
- Newport, J. and Spann, T. (1987) Disassembly of the nucleus in mitotic extracts: membrane vesicularization, lamin disassembly, and chromosome condensation are independent processes. *Cell*, **48**, 219-230.
- Newport, J.W., Wilson, K.L. and Dunphy, W.G. (1990) A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly. *J Cell Biol*, **111**, 2247-2259.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F. and Riccardi, C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, **139**, 271-279.
- Nigg, E.A. (1992) Assembly and cell cycle dynamics of the nuclear lamina. *Semin Cell Biol*, **3**, 245-253.
- Nigg, E.A., Kitten, G.T. and Vorburger, K. (1992) Targeting lamin proteins to the nuclear envelope: the role of CaaX box modifications. *Biochem Soc Trans*, **20**, 500-504.
- Nikolova, V., Leimena, C., McMahon, A.C., Tan, J.C., Chandar, S., Jogia, D., Kesteven, S.H., Michalicek, J., Otway, R., Verheyen, F., Rainer, S., Stewart, C.L., Martin, D., Feneley, M.P. and Fatkin, D. (2004) Defects in nuclear structure and function promote dilated cardiomyopathy in lamin A/C-deficient mice. *J Clin Invest*, **113**, 357-369.
- Nili, E., Cojocaru, G.S., Kalma, Y., Ginsberg, D., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Berger, R., Shklai, S., Amariglio, N., Brok-Simoni, F., Simon, A.J. and Rechavi, G. (2001) Nuclear membrane protein LAP2beta mediates transcriptional repression alone and together with its binding partner GCL (germ-cell-less). *J Cell Sci*, **114**, 3297-3307.
- Noda, A., Ning, Y., Venable, S.F., Pereira-Smith, O.M. and Smith, J.R. (1994) Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res*, **211**, 90-98.
- Novelli, G., Muchir, A., Sangiuolo, F., Helbling-Leclerc, A., D'Apice, M.R., Massart, C., Capon, F., Sbraccia, P., Federici, M., Lauro, R., Tudisco, C., Pallotta, R., Scarano, G., Dallapiccola, B., Merlini, L. and Bonne, G. (2002) Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C. *Am J Hum Genet*, **71**, 426-431.
- Ohba, T., Schirmer, E.C., Nishimoto, T. and Gerace, L. (2004) Energy- and temperature-dependent transport of integral proteins to the inner nuclear membrane via the nuclear pore. *J Cell Biol*, **167**, 1051-1062.
- Osada, S., Ohmori, S.Y. and Taira, M. (2003) XMAN1, an inner nuclear membrane protein, antagonizes BMP signaling by interacting with Smad1 in *Xenopus* embryos. *Development*, **130**, 1783-1794.
- Padan, R., Nainudel-Epszteyn, S., Goitein, R., Fainsod, A. and Gruenbaum, Y. (1990) Isolation and characterization of the *Drosophila* nuclear envelope otefin cDNA. *J Biol Chem*, **265**, 7808-7813.
- Paddy, M.R., Belmont, A.S., Saumweber, H., Agard, D.A. and Sedat, J.W. (1990) Interphase nuclear envelope lamins form a discontinuous network that interacts with only a fraction of the chromatin in the nuclear periphery. *Cell*, **62**, 89-106.
- Padiath, Q.S., Saigoh, K., Schiffmann, R., Asahara, H., Yamada, T., Koepfen, A., Hogan, K., Ptacek, L.J. and Fu, Y.H. (2006) Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy. *Nat Genet*, **38**, 1114-1123.
- Padmakumar, V.C., Abraham, S., Braune, S., Noegel, A.A., Tunggal, B., Karakesisoglou, I. and Korenbaum, E. (2004) Enaptin, a giant actin-binding protein, is an element of the nuclear membrane and the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res*, **295**, 330-339.

- Padmakumar, V.C., Libotte, T., Lu, W., Zaim, H., Abraham, S., Noegel, A.A., Gotzmann, J., Foisner, R. and Karakesisoglou, I.** (2005) The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J Cell Sci*, **118**, 3419-3430.
- Pan, D., Estevez-Salmeron, L.D., Stroschein, S.L., Zhu, X., He, J., Zhou, S. and Luo, K.** (2005) The integral inner nuclear membrane protein MAN1 physically interacts with the R-Smad proteins to repress signaling by the transforming growth factor- β superfamily of cytokines. *J Biol Chem*, **280**, 15992-16001.
- Pare, G.C., Easlick, J.L., Mislow, J.M., McNally, E.M. and Kapiloff, M.S.** (2005) Nesprin-1alpha contributes to the targeting of mAKAP to the cardiac myocyte nuclear envelope. *Exp Cell Res*, **303**, 388-399.
- Parise, P., Finocchiaro, G., Masciadri, B., Quarto, M., Francois, S., Mancuso, F. and Muller, H.** (2006) Lap2alpha expression is controlled by E2F and deregulated in various human tumors. *Cell Cycle*, **5**, 1331-1341.
- Parker, M.H., Perry, R.L., Fauteux, M.C., Berkes, C.A. and Rudnicki, M.A.** (2006) MyoD synergizes with the E-protein HEB beta to induce myogenic differentiation. *Mol Cell Biol*, **26**, 5771-5783.
- Pasternak, C., Wong, S. and Elson, E.L.** (1995) Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J Cell Biol*, **128**, 355-361.
- Pederson, T. and Aebi, U.** (2002) Actin in the nucleus: what form and what for? *J Struct Biol*, **140**, 3-9.
- Pendas, A.M., Zhou, Z., Cadinanos, J., Freije, J.M., Wang, J., Hultenby, K., Astudillo, A., Wernerson, A., Rodriguez, F., Tryggvason, K. and Lopez-Otin, C.** (2002) Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet*, **31**, 94-99.
- Pereira, S., Bourgeois, P., Navarro, C., Esteves-Vieira, V., Cau, P., De Sandre-Giovannoli, A. and Levy, N.** (2008) HGPS and related premature aging disorders: from genomic identification to the first therapeutic approaches. *Mech Ageing Dev*, **129**, 449-459.
- Phair, R.D. and Misteli, T.** (2000) High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*, **404**, 604-609.
- Pollex, R.L. and Hegele, R.A.** (2004) Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Clin Genet*, **66**, 375-381.
- Puri, P.L., Iezzi, S., Stiegler, P., Chen, T.T., Schiltz, R.L., Muscat, G.E., Giordano, A., Kedes, L., Wang, J.Y. and Sartorelli, V.** (2001) Class I histone deacetylases sequentially interact with MyoD and pRb during skeletal myogenesis. *Mol Cell*, **8**, 885-897.
- Raffaele Di Barletta, M., Ricci, E., Galluzzi, G., Tonali, P., Mora, M., Morandi, L., Romorini, A., Voit, T., Orstavik, K.H., Merlini, L., Trevisan, C., Biancalana, V., Housmanowa-Petrusewicz, I., Bione, S., Ricotti, R., Schwartz, K., Bonne, G. and Toniolo, D.** (2000) Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am J Hum Genet*, **66**, 1407-1412.
- Rao, L., Perez, D. and White, E.** (1996) Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol*, **135**, 1441-1455.
- Reichart, B., Klafke, R., Dreger, C., Kruger, E., Motsch, I., Ewald, A., Schafer, J., Reichmann, H., Muller, C.R. and Dabauvalle, M.C.** (2004) Expression and localization of nuclear proteins in autosomal-dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy with LMNA R377H mutation. *BMC Cell Biol*, **5**, 12.
- Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E.L., Jr., Jarnik, M., Engel, A. and Aebi, U.** (1990) Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J Cell Biol*, **110**, 883-894.
- Reimer, G., Rose, K.M., Scheer, U. and Tan, E.M.** (1987) Autoantibody to RNA polymerase I in scleroderma sera. *J Clin Invest*, **79**, 65-72.
- Riemer, D., Stuurman, N., Berrios, M., Hunter, C., Fisher, P.A. and Weber, K.** (1995) Expression of Drosophila lamin C is developmentally regulated: analogies with vertebrate A-type lamins. *J Cell Sci*, **108** (Pt 10), 3189-3198.
- Rockel, T.D., Stuhlmann, D. and von Mikecz, A.** (2005) Proteasomes degrade proteins in focal subdomains of the human cell nucleus. *J Cell Sci*, **118**, 5231-5242.
- Rolls, M.M., Stein, P.A., Taylor, S.S., Ha, E., McKeon, F. and Rapoport, T.A.** (1999) A visual screen of a GFP-fusion library identifies a new type of nuclear envelope membrane protein. *J Cell Biol*, **146**, 29-44.
- Roux, K.J. and Burke, B.** (2006) From pore to kinetochore and back: regulating envelope assembly. *Dev Cell*, **11**, 276-278.
- Ruchaud, S., Korfali, N., Villa, P., Kottke, T.J., Dingwall, C., Kaufmann, S.H. and Earnshaw, W.C.** (2002) Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. *EMBO J*, **21**, 1967-1977.
- Sabatelli, P., Lattanzi, G., Ognibene, A., Columbaro, M., Capanni, C., Merlini, L., Maraldi, N.M. and Squarzone, S.** (2001) Nuclear alterations in autosomal-dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, **24**, 826-829.
- Salpingidou, G., Smertenko, A., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Hussey, P.J. and Hutchison, C.J.** (2007) A novel role for the nuclear membrane protein emerin in association of the centrosome to the outer nuclear membrane. *J Cell Biol*, **178**, 897-904.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Scaffidi, P. and Misteli, T.** (2006) Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science*, **312**, 1059-1063.
- Scheer, U., Kartenbeck, J., Trendelenburg, M.F., Stadler, J. and Franke, W.W.** (1976) Experimental disintegration of the nuclear envelope. Evidence for pore-connecting fibrils. *J Cell Biol*, **69**, 1-18.

- Scherer, W.F., Syverton, J.T. and Gey, G.O.** (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.
- Schild-Prufert, K., Giegerich, M., Schafer, M., Winkler, C. and Krohne, G.** (2006) Structural and functional characterization of the zebrafish lamin B receptor. *Eur J Cell Biol*, **85**, 813-824.
- Schirmer, E.C., Florens, L., Guan, T., Yates, J.R., 3rd and Gerace, L.** (2003) Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics. *Science*, **301**, 1380-1382.
- Schirmer, E.C. and Gerace, L.** (2004) The stability of the nuclear lamina polymer changes with the composition of lamin subtypes according to their individual binding strengths. *J Biol Chem*, **279**, 42811-42817.
- Schirmer, E.C., Guan, T. and Gerace, L.** (2001) Involvement of the lamin rod domain in heterotypic lamin interactions important for nuclear organization. *J Cell Biol*, **153**, 479-489.
- Schlosser, A., Amanchy, R. and Otto, H.** (2006) Identification of tyrosine-phosphorylation sites in the nuclear membrane protein emerlin. *FEBS J*, **273**, 3204-3215.
- Segura-Totten, M., Kowalski, A.K., Craigie, R. and Wilson, K.L.** (2002) Barrier-to-autointegration factor: major roles in chromatin decondensation and nuclear assembly. *J Cell Biol*, **158**, 475-485.
- Segura-Totten, M. and Wilson, K.L.** (2004) BAF: roles in chromatin, nuclear structure and retrovirus integration. *Trends Cell Biol*, **14**, 261-266.
- Senior, A. and Gerace, L.** (1988) Integral membrane proteins specific to the inner nuclear membrane and associated with the nuclear lamina. *J Cell Biol*, **107**, 2029-2036.
- Severino, J., Allen, R.G., Balin, S., Balin, A. and Cristofalo, V.J.** (2000) Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp Cell Res*, **257**, 162-171.
- Shaklai, S., Amariglio, N., Rechavi, G. and Simon, A.J.** (2007) Gene silencing at the nuclear periphery. *FEBS J*, **274**, 1383-1392.
- Sheaff, R.J., Singer, J.D., Swanger, J., Smitherman, M., Roberts, J.M. and Clurman, B.E.** (2000) Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol Cell*, **5**, 403-410.
- Shultz, L.D., Lyons, B.L., Burzenski, L.M., Gott, B., Samuels, R., Schweitzer, P.A., Dreger, C., Herrmann, H., Kalscheuer, V., Olins, A.L., Olins, D.E., Sperling, K. and Hoffmann, K.** (2003) Mutations at the mouse ichthyosis locus are within the lamin B receptor gene: a single gene model for human Pelger-Huet anomaly. *Hum Mol Genet*, **12**, 61-69.
- Shumaker, D.K., Dechat, T., Kohlmaier, A., Adam, S.A., Bozovsky, M.R., Erdos, M.R., Eriksson, M., Goldman, A.E., Khuon, S., Collins, F.S., Jenuwein, T. and Goldman, R.D.** (2006) Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 8703-8708.
- Shumaker, D.K., Lee, K.K., Tanhehco, Y.C., Craigie, R. and Wilson, K.L.** (2001) LAP2 binds to BAF.DNA complexes: requirement for the LEM domain and modulation by variable regions. *EMBO J*, **20**, 1754-1764.
- Simos, G., Maison, C. and Georgatos, S.D.** (1996) Characterization of p18, a component of the lamin B receptor complex and a new integral membrane protein of the avian erythrocyte nuclear envelope. *J Biol Chem*, **271**, 12617-12625.
- Siu, B.L., Niimura, H., Osborne, J.A., Fatkin, D., MacRae, C., Solomon, S., Benson, D.W., Seidman, J.G. and Seidman, C.E.** (1999) Familial dilated cardiomyopathy locus maps to chromosome 2q31. *Circulation*, **99**, 1022-1026.
- Somech, R., Shaklai, S., Amariglio, N., Rechavi, G. and Simon, A.J.** (2005) Nuclear envelopathies--raising the nuclear veil. *Pediatr Res*, **57**, 8R-15R.
- Somech, R., Shaklai, S., Geller, O., Amariglio, N., Simon, A.J., Rechavi, G. and Gal-Yam, E.N.** (2005) The nuclear-envelope protein and transcriptional repressor LAP2beta interacts with HDAC3 at the nuclear periphery, and induces histone H4 deacetylation. *J Cell Sci*, **118**, 4017-4025.
- Soullam, B. and Worman, H.J.** (1993) The amino-terminal domain of the lamin B receptor is a nuclear envelope targeting signal. *J Cell Biol*, **120**, 1093-1100.
- Spann, T.P., Goldman, A.E., Wang, C., Huang, S. and Goldman, R.D.** (2002) Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *J Cell Biol*, **156**, 603-608.
- Spann, T.P., Moir, R.D., Goldman, A.E., Stick, R. and Goldman, R.D.** (1997) Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *J Cell Biol*, **136**, 1201-1212.
- Starr, D.A. and Fischer, J.A.** (2005) KASH 'n Karry: the KASH domain family of cargo-specific cytoskeletal adaptor proteins. *Bioessays*, **27**, 1136-1146.
- Starr, D.A. and Han, M.** (2002) Role of ANC-1 in tethering nuclei to the actin cytoskeleton. *Science*, **298**, 406-409.
- Starr, D.A. and Han, M.** (2003) ANChors away: an actin based mechanism of nuclear positioning. *J Cell Sci*, **116**, 211-216.
- Starr, D.A., Hermann, G.J., Malone, C.J., Fixsen, W., Priess, J.R., Horvitz, H.R. and Han, M.** (2001) unc-83 encodes a novel component of the nuclear envelope and is essential for proper nuclear migration. *Development*, **128**, 5039-5050.
- Steen, R.L., Martins, S.B., Tasken, K. and Collas, P.** (2000) Recruitment of protein phosphatase 1 to the nuclear envelope by A-kinase anchoring protein AKAP149 is a prerequisite for nuclear lamina assembly. *J Cell Biol*, **150**, 1251-1262.

- Sternsdorf, T., Guldner, H.H., Szostecki, C., Grotzinger, T. and Will, H.** (1995) Two nuclear dot-associated proteins, PML and Sp100, are often co-autoimmunogenic in patients with primary biliary cirrhosis. *Scand J Immunol*, **42**, 257-268.
- Stewart, C.L., Roux, K.J. and Burke, B.** (2007) Blurring the boundary: the nuclear envelope extends its reach. *Science*, **318**, 1408-1412.
- Stewart, M.** (1993) Intermediate filament structure and assembly. *Curr Opin Cell Biol*, **5**, 3-11.
- Stierle, V., Couprie, J., Ostlund, C., Krimm, I., Zinn-Justin, S., Hossenlopp, P., Worman, H.J., Courvalin, J.C. and Duband-Goulet, I.** (2003) The carboxyl-terminal region common to lamins A and C contains a DNA binding domain. *Biochemistry*, **42**, 4819-4828.
- Strelkov, S.V., Herrmann, H., Geisler, N., Wedig, T., Zimbelmann, R., Aebi, U. and Burkhard, P.** (2002) Conserved segments 1A and 2B of the intermediate filament dimer: their atomic structures and role in filament assembly. *EMBO J*, **21**, 1255-1266.
- Strelkov, S.V., Schumacher, J., Burkhard, P., Aebi, U. and Herrmann, H.** (2004) Crystal structure of the human lamin A coil 2B dimer: implications for the head-to-tail association of nuclear lamins. *J Mol Biol*, **343**, 1067-1080.
- Stuurman, N., Heins, S. and Aebi, U.** (1998) Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol*, **122**, 42-66.
- Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Bhatt, H., Anver, M., Bhat, N., Nagashima, K., Stewart, C.L. and Burke, B.** (1999) Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol*, **147**, 913-920.
- Taniura, H., Glass, C. and Gerace, L.** (1995) A chromatin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones. *J Cell Biol*, **131**, 33-44.
- Taylor, P.W.** (2005) Isaacs' syndrome (autoimmune neuromyotonia) in a patient with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, **32**, 757-758.
- Tazir, M., Azzedine, H., Assami, S., Sindou, P., Nouioua, S., Zemmouri, R., Hamadouche, T., Chaouch, M., Feingold, J., Vallat, J.M., Leguern, E. and Grid, D.** (2004) Phenotypic variability in autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease due to the R298C mutation in lamin A/C. *Brain*, **127**, 154-163.
- ten Dijke, P. and Hill, C.S.** (2004) New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci*, **29**, 265-273.
- Thomas, J.O. and Kornberg, R.D.** (1975) Cleavable cross-links in the analysis of histone-histone associations. *FEBS Lett*, **58**, 353-358.
- Thompson, N.E., Steinberg, T.H., Aronson, D.B. and Burgess, R.R.** (1989) Inhibition of in vivo and in vitro transcription by monoclonal antibodies prepared against wheat germ RNA polymerase II that react with the heptapeptide repeat of eukaryotic RNA polymerase II. *J Biol Chem*, **264**, 11511-11520.
- Torres, C., Lewis, L. and Cristofalo, V.J.** (2006) Proteasome inhibitors shorten replicative life span and induce a senescent-like phenotype of human fibroblasts. *J Cell Physiol*, **207**, 845-853.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- Tse, C., Fletcher, T.M. and Hansen, J.C.** (1998) Enhanced transcription factor access to arrays of histone H3/H4 tetramer-DNA complexes in vitro: implications for replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12169-12173.
- Tsien, R.Y.** (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, **67**, 509-544.
- Tzur, Y.B., Margalit, A., Melamed-Book, N. and Gruenbaum, Y.** (2006) Matefin/SUN-1 is a nuclear envelope receptor for CED-4 during *Caenorhabditis elegans* apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 13397-13402.
- Ukekawa, R., Maegawa, N., Mizutani, E., Fujii, M. and Ayusawa, D.** (2004) Proteasome inhibitors induce changes in chromatin structure characteristic of senescent human fibroblasts. *Biosci Biotechnol Biochem*, **68**, 2395-2397.
- Umland, T.C., Wei, S.Q., Craigie, R. and Davies, D.R.** (2000) Structural basis of DNA bridging by barrier-to-autointegration factor. *Biochemistry*, **39**, 9130-9138.
- Urbanek, K., Torella, D., Sheikh, F., De Angelis, A., Nurzynska, D., Silvestri, F., Beltrami, C.A., Bussani, R., Beltrami, A.P., Quaini, F., Bolli, R., Leri, A., Kajstura, J. and Anversa, P.** (2005) Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 8692-8697.
- Varela, I., Cadinanos, J., Pendas, A.M., Gutierrez-Fernandez, A., Folgueras, A.R., Sanchez, L.M., Zhou, Z., Rodriguez, F.J., Stewart, C.L., Vega, J.A., Tryggvason, K., Freije, J.M. and Lopez-Otin, C.** (2005) Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature*, **437**, 564-568.
- Vaughan, A., Alvarez-Reyes, M., Bridger, J.M., Broers, J.L., Ramaekers, F.C., Wehnert, M., Morris, G.E., Whitfield, W.G.F. and Hutchison, C.J.** (2001) Both emerin and lamin C depend on lamin A for localization at the nuclear envelope. *J Cell Sci*, **114**, 2577-2590.
- Verga, L., Concardi, M., Pilotto, A., Bellini, O., Pasotti, M., Repetto, A., Tavazzi, L. and Arbustini, E.** (2003) Loss of lamin A/C expression revealed by immuno-electron microscopy in dilated cardiomyopathy with atrioventricular block caused by LMNA gene defects. *Virchows Arch*, **443**, 664-671.
- Vigouroux, C., Auclair, M., Dubosclard, E., Pouchelet, M., Capeau, J., Courvalin, J.C. and Buendia, B.** (2001) Nuclear envelope disorganization in fibroblasts from lipodystrophic patients with heterozygous R482Q/W mutations in the lamin A/C gene. *J Cell Sci*, **114**, 4459-4468.

- Vlcek, S., Korbei, B. and Foisner, R. (2002) Distinct functions of the unique C terminus of LAP2alpha in cell proliferation and nuclear assembly. *J Biol Chem*, **277**, 18898-18907.
- Voit, T., Krogmann, O., Lenard, H.G., Neuen-Jacob, E., Wechsler, W., Goebel, H.H., Rahlf, G., Lindinger, A. and Nienaber, C. (1988) Emery-Dreifuss muscular dystrophy: disease spectrum and differential diagnosis. *Neuropediatrics*, **19**, 62-71.
- Wade, P.A., Jones, P.L., Vermaak, D., Veenstra, G.J., Imhof, A., Sera, T., Tse, C., Ge, H., Shi, Y.B., Hansen, J.C. and Wolffe, A.P. (1998) Histone deacetylase directs the dominant silencing of transcription in chromatin: association with MeCP2 and the Mi-2 chromodomain SWI/SNF ATPase. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **63**, 435-445.
- Wagner, N., Weber, D., Seitz, S. and Krohne, G. (2004) The lamin B receptor of *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci*, **117**, 2015-2028.
- Wang, W. (2003) The SWI/SNF family of ATP-dependent chromatin remodelers: similar mechanisms for diverse functions. *Curr Top Microbiol Immunol*, **274**, 143-169.
- Warren, D.T., Zhang, Q., Weissberg, P.L. and Shanahan, C.M. (2005) Nesprins: intracellular scaffolds that maintain cell architecture and coordinate cell function? *Expert Rev Mol Med*, **7**, 1-15.
- Waterham, H.R., Koster, J., Mooyer, P., Noort Gv, G., Kelley, R.I., Wilcox, W.R., Wanders, R.J., Hennekam, R.C. and Oosterwijk, J.C. (2003) Autosomal recessive HEM/Greenberg skeletal dysplasia is caused by 3 beta-hydroxysterol delta 14-reductase deficiency due to mutations in the lamin B receptor gene. *Am J Hum Genet*, **72**, 1013-1017.
- Wente, S.R. (2000) Gatekeepers of the nucleus. *Science*, **288**, 1374-1377.
- Wheeler, M.A., Davies, J.D., Zhang, Q., Emerson, L.J., Hunt, J., Shanahan, C.M. and Ellis, J.A. (2007) Distinct functional domains in nesprin-1alpha and nesprin-2beta bind directly to emerin and both interactions are disrupted in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Exp Cell Res*, **313**, 2845-2857.
- Wiesel, N., Mattout, A., Melcer, S., Melamed-Book, N., Herrmann, H., Medalia, O., Aebi, U. and Gruenbaum, Y. (2008) Laminopathic mutations interfere with the assembly, localization, and dynamics of nuclear lamins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 180-185.
- Wilhelmsen, K., Litjens, S.H., Kuikman, I., Tshimbalanga, N., Jansen, H., van den Bout, I., Raymond, K. and Sonnenberg, A. (2005) Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J Cell Biol*, **171**, 799-810.
- Wilkinson, F.L., Holaska, J.M., Zhang, Z., Sharma, A., Manilal, S., Holt, I., Stamm, S., Wilson, K.L. and Morris, G.E. (2003) Emerin interacts in vitro with the splicing-associated factor, YT521-B. *Eur J Biochem*, **270**, 2459-2466.
- Wilson, K.L., Zastrow, M.S. and Lee, K.K. (2001) Lamins and disease: insights into nuclear infrastructure. *Cell*, **104**, 647-650.
- Wojcik, C. and DeMartino, G.N. (2003) Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol*, **35**, 579-589.
- Wollina, U., Reuter, A., Schaarschmidt, H., Muller, E., Maak, B. and Schmidt, U. (1992) [Hutchinson-Gilford syndrome]. *Hautarzt*, **43**, 453-457.
- Worman, H.J. and Courvalin, J.C. (2000) The inner nuclear membrane. *J Membr Biol*, **177**, 1-11.
- Worman, H.J. and Courvalin, J.C. (2005) Nuclear envelope, nuclear lamina, and inherited disease. *Int Rev Cytol*, **246**, 231-279.
- Worman, H.J. and Gundersen, G.G. (2006) Here come the SUNs: a nucleocytoskeletal missing link. *Trends Cell Biol*, **16**, 67-69.
- Worman, H.J., Yuan, J., Blobel, G. and Georgatos, S.D. (1988) A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 8531-8534.
- Wyllie, A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, **284**, 555-556.
- Yang, L., Guan, T. and Gerace, L. (1997) Lamin-binding fragment of LAP2 inhibits increase in nuclear volume during the cell cycle and progression into S phase. *J Cell Biol*, **139**, 1077-1087.
- Yang, S.H., Bergo, M.O., Toth, J.I., Qiao, X., Hu, Y., Sandoval, S., Meta, M., Bendale, P., Gelb, M.H., Young, S.G. and Fong, L.G. (2005) Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear blebbing in mouse fibroblasts with a targeted Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 10291-10296.
- Yates, J.R., Bagshaw, J., Aksmanovic, V.M., Coomber, E., McMahon, R., Whittaker, J.L., Morrison, P.J., Kendrick-Jones, J. and Ellis, J.A. (1999) Genotype-phenotype analysis in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy and identification of a missense mutation associated with a milder phenotype. *Neuromuscul Disord*, **9**, 159-165.
- Ye, Q. and Worman, H.J. (1994) Primary structure analysis and lamin B and DNA binding of human LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *J Biol Chem*, **269**, 11306-11311.
- Zastrow, M.S., Vlcek, S. and Wilson, K.L. (2004) Proteins that bind A-type lamins: integrating isolated clues. *J Cell Sci*, **117**, 979-987.
- Zhang, Q., Bethmann, C., Worth, N.F., Davies, J.D., Wasner, C., Feuer, A., Ragnauth, C.D., Yi, Q., Mellad, J.A., Warren, D.T., Wheeler, M.A., Ellis, J.A., Skepper, J.N., Vorgerd, M., Schlotter-Weigel, B., Weissberg, P.L., Roberts, R.G., Wehnert, M. and Shanahan, C.M. (2007) Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *Hum Mol Genet*, **16**, 2816-2833.

- Zhang, Q., Ragnauth, C., Greener, M.J., Shanahan, C.M. and Roberts, R.G.** (2002) The nesprins are giant actin-binding proteins, orthologous to *Drosophila melanogaster* muscle protein MSP-300. *Genomics*, **80**, 473-481.
- Zhang, Q., Ragnauth, C.D., Skepper, J.N., Worth, N.F., Warren, D.T., Roberts, R.G., Weissberg, P.L., Ellis, J.A. and Shanahan, C.M.** (2005) Nesprin-2 is a multi-isomeric protein that binds lamin and emerin at the nuclear envelope and forms a subcellular network in skeletal muscle. *J Cell Sci*, **118**, 673-687.
- Zhang, Q., Skepper, J.N., Yang, F., Davies, J.D., Hegyi, L., Roberts, R.G., Weissberg, P.L., Ellis, J.A. and Shanahan, C.M.** (2001) Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *J Cell Sci*, **114**, 4485-4498.
- Zhao, K., Harel, A., Stuurman, N., Guedalia, D. and Gruenbaum, Y.** (1996) Binding of matrix attachment regions to nuclear lamin is mediated by the rod domain and depends on the lamin polymerization state. *FEBS Lett*, **380**, 161-164.
- Zhen, Y.Y., Libotte, T., Munck, M., Noegel, A.A. and Korenbaum, E.** (2002) NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton. *J Cell Sci*, **115**, 3207-3222.
- Zheng, R., Ghirlando, R., Lee, M.S., Mizuuchi, K., Krause, M. and Craigie, R.** (2000) Barrier-to-autointegration factor (BAF) bridges DNA in a discrete, higher-order nucleoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 8997-9002.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

%	Prozent
#	Passage der in Kultur gehaltenen Zellen
Å	Angström
A	Ampere oder Adenin
Abb.	Abbildung
AD	autosomal dominant
AMP	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-triphosphat
BAF	barrier-to-autointegration Factor
bidest	bidestilliert
BIFC	Bimolecular fluorescence complementation
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	circa
CaaX-Box	Aminosäuremotiv: Cystein-aliphatisch-aliphatisch-beliebig
cDNA	complementary DNA
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
cm	Zentimeter
CMT	Charcot-Marie-Tooth Erkrankung
CTP	Cytosin-triphosphat
Cy	Cyanin
d	Tag
D	Dalton
DCM	Dilatierete Cardiomyopathie
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleotid
ddH ₂ O	zweifach deionisiertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
ddNTP	Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat
ds	doppelsträngig (double stranded)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDMD	Emery-Dreifuss Muskeldystrophie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest bzw. Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	Et altera (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid

EtOH	Ethanol
F	Phenylalanin
FACS	Fluorescence-activated cell-sorter
FCS	Fötales Kälberserum
FG	Phenylalanin-Glycin
FPLD	Dunnigan familiäre partielle Lipodystrophie
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
FTI	Farnesyltransferase-Inhibitoren
g	Gramm
G	Guanin
GCL	germ cell-less
GDP	Guanosin-diphosphat
GFP	Green Fluorescent Protein
Gly	Glycin
GTP	Guanosin-triphosphat
h	Stunde
H	Histidin
HGPS	Hutchinson-Gilford Progerie-Syndrom
HP1	Heterochromatinprotein 1
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
INM	innere Kernmembran (inner nuclear membrane)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
L	Leucin
LAP	Lamin-assoziierte Polypeptide (lamin associated polypeptids)
LB-Medium	Luria Bertami-Medium
LBR	Lamin B Rezeptor
LEM-Domäne	gemeinsame Domäne von LAP2, Emerin und MAN1
LGMD	"Limp girdle" Muskeldystrophie
LINC	Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton
μ	mikro (10 ⁻⁶)
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
m	Meter oder milli (10 ⁻³)
M	Molar
mA	Milliampere
mAK (mAb)	monoklonaler Antikörper
MD	Megadalton
MetOH	Methanol
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
MCS	Multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
MSC	mesenchymal stem cells
N-(terminal,-Terminus)	N-(terminal,-Terminus) Amino- (terminal,-Terminus)
NE	Kernhülle (nuclear envelope)
NESPRIN	Nuclear Envelope Spectrin Repeat
NLS	Kernlokalisierungssignal (nuclear lokalisation signal)
nm	Nanometer (10 ⁻⁹)
NPC	Kernporenkomplex (nuclear pore complex)
NUANCE	Nucleus and Actin Connecting Element

OD	optische Dichte
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
ONM	Äußere Kernmembran (outer nuclear membrane)
P < 0,05	signifikanter Unterschied
P < 0,01	hoch signifikanter Unterschied
P > 0,05	kein signifikanter Unterschied
P	Prolin
p.A.	für die Analyse (per analysis)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	potentia hydrogenii
ph Pol II	phosphorylierte RNA-Polymerase II
pmol	Pikomol (10 ⁻¹²)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol II	RNA-Polymerase II
Q	Glutamin
®	registriertes Warenzeichen
R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonucleoprotein particle
RP	Retinoblastomprodukt
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
sek bzw. s	Sekunde
SL	Stammlösung
ss	einzelsträngig (single stranded)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Bor-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	Transkription-growth-factor
TUNEL	Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling
™	Trademark
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymin-triphosphat
U	Einheit (unit)
ÜNK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Tryptophan
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
X-Gal	Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-DGalaktopyranosid
z. B.	zum Beispiel

8.2 Oligonukleotide

Primer	Sequenz	Zielgen
Egfp _c _seq3'	5'-TGTTTCAGGTTTCAGGGGG-3'	pEGFP-C1,2,3
Egfp _c _seq5'	5'-GGTCCTGCTGGAGTTCGT-3'	pEGFP-C1,2,3
Egfp _n _seq3'	5'-CCGTTTACGTCGCCGT-3'	pEGFP-C1,2,3
Topo _{ml3f}	5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGA-3'	pCR2.1-TOPO
Topo _{ml3r}	5'-GGTTTTCCAGTCACGACGTTG-3'	pCR2.1-TOPO
pBI _{seq5'}	5'-TGTA AACGACGCCAGTGAG-3'	pBlueskript SK+
pBI _{seq3'}	5'-ATGACCATGATTACGCCAAGC-3'	pBlueskript SK+
pcDNA3.1 _{seq3'}	5'-GGAGGGGCAAACAACAGA-3'	pcDNA3.1
pcDNA3.1 _{seq5'} :	5'-CGTGTACGGTGGGAGGTC-3'	pcDNA3.1
NuanceGiant-1	5'-GAACACAGCCCGCAUCAUUUU-3'	Nesprin2 Giant
NuanceGiant-2	5'-AACAU CUGGCUAACAGUUA-3'	Nesprin2 Giant
hLMNA NdeI 5'	5'-CATATGGAGACCCCGTCCCAG-3'	Lamin A
hLMNA EcoRI 3'	5'-GAATTCTTACATGATGCTGCAGTTCTGG-3'	Lamin A
hLMNA R545C _{seq5'}	5'-CGGCTCTCATCAACTCCAC-3'	Lamin A
hLMNA R545C _F :	5'-ATGCGCAAGCTGGTGTGCTCAGTACTGTGG-3'	Lamin A
hLMNA R545C _R :	5'-CCACAGTCACTGAGCACACCAGCTTGCGCAT-3'	Lamin A
hLMNA S143F _{seq5'}	5'-CGCAATACCAAGAAGGAGG-3'	Lamin A
hLMNA S143F _F	5'-GGAGGCTCTGCTGAACTTCAAGGAGGCCGCACTGA-3'	Lamin A

Primer	Sequenz	Zielgen
HLMNA S143F_R:	5'-TCAGTG CGGCCTCCTTGAAGTTCAGCAGAGCCTC-3'	Lamin A
hLMNA 429-445_seq	5'-GTGCGGCCTCCTTGGA-3'	Lamin A
hLMNA 868-884 RC_seq	5'-TGCTGCAGCTCCTCGTG-3'	Lamin A
hLMNA 1090-1107_seq	5'-CTGGACATCAAGCTGGCC-3'	Lamin A
hLMNA 1125-1141 RC_seq	5'-AGAGCTTGCGGTAGGCG-3'	Lamin A
hLMNA 1616-1630 RC_seq	5'-GCTTGCGCATGGCCA-3'	Lamin A
hLMNA 987-1002_seq	5'-TGAGCGGGACACCAGC-3'	Lamin A
pET21a_seq5'	5'-CGATCCC CGCAAATTAATACG-3'	pET21a
pET_seq3'	5'-GGCAGCAGCCAACTCAGCTTC-3'	pET21a
M13 forward	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	M13-Regionen div. Vekoren
M13 reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	M13-Regionen div. Vekoren
pEGFP-C1-YFP_seq3'	5'-ATCATTGAGCTCCTGCAGGT-3'	YFP
pEGFP-C1-YFP_seq5'	5'-GAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGT-3'	YFP
YFP-C-FLAG-BAMHI_3'RC	5'-GGCATGGACGAGCTGTACAAGGCCCGGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGGATCCTC-3'	YFP
YFP-C-ECO473_5'	5'-TCAGCGCTACCGGTCGCCACCATGAACCACGACAAGCAGAAGAAC-3'	YFP
YFP-N-MYC-BAMHI_3'RC	5'-GGATCCCAGATCTTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTCCCGGGCCAT-3'	YFP
YFP-N-MYC-BAMHI_3'RC	5'-GATATAGACGTTGTGGC-3'	YFP
YFP-N-ECO473_5'	5'-AGCGCTACCGGTCGCCACCATGGTGAAGCAAGGGCGAGG-3'	YFP
pBiFC-VC_seq3'	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	pBiFC-YFP

Lebenslauf

Persönliche Daten

Sebastian Martin Kandert
geboren am 15. April 1975 in Bad Windsheim
ledig

Schulausbildung

09/1982 - 06/1985 Grundschole Bad Windsheim
09/1985 - 07/1994 Gymnasium Georg-Wilhelm-Steller in Bad Windsheim
1994 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

11/1994 - 01/1996 Frankenlandklinik Bad Windsheim

Berufsausbildung

04/1997 - 04/2000 Ausbildung zum staatlich anerkannten Krankenpfeleger,
Universitätsklinikum Würzburg

Berufspraxis

05/2000 - 09/2000 Tätigkeit als Krankenpfeleger,
Missionsärztliches Krankenhaus, Würzburg

Hochschulausbildung

10/2000 - 06/2005 Diplomstudiengang Biologie
Schwerpunkt: Zell- und Entwicklungsbiologie
Nebenfächer: Neurobiologie / Tierphysiologie

Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zell- und
Entwicklungsbiologie
Titel: „Untersuchung der „Kernstruktur und der
Verteilung nukleärer Proteine bei Laminopathien“

Promotion

09/2005 - 02/2009 Promotionsarbeit am Lehrstuhl für Elektronenmikroskopie
Titel: „Der Einfluss von Mutationen im *LMNA*-Gen auf die
Struktur und Funktion des Zellkerns“

Publikationsliste

- Gareiss, M., Eberhardt, K., Kruger, E., Kandert, S., Bohm, C., Zentgraf, H., Müller, C.R. and Dabauvalle, M.C.** (2005) Emerin expression in early development of *Xenopus laevis*. *Eur J Cell Biol*, **84**, 295-309.
- Kandert, S., Luke, Y., Kleinhenz, T., Neumann, S., Lu, W., Jaeger, V.M., Munck, M., Wehnert, M., Müller, C.R., Zhou, Z., Noegel, A.A., Dabauvalle, M.C. and Karakesisoglou, I.** (2007) Nesprin-2 giant safeguards nuclear envelope architecture in LMNA S143F progeria cells. *Hum Mol Genet*, **16**, 2944-2959.
- Kandert, S., Wehnert, M., Müller, C.R., Buendia, B., Dabauvalle, M.C.** (2009) Impaired nuclear functions in human myoblasts with a dominant p.R545C mutation in the *LMNA* gene. *Mol. Biol. of the Cell*, submitted.

Ehrenwörtliche Erklärung

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

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

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

Würzburg, den 12. Februar 2009

.....

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Marie-Christine Dabauvalle für die freundliche Aufnahme in ihren Arbeitskreis, für die Möglichkeit, an diesen interessanten Themen zu arbeiten, für die Unterstützung bei allen Fragen und Problemen und für das nette und humorvolle Arbeitsklima.

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Prof. Clemens Müller-Reible für die Übernahme des Zweit-Gutachtens und Frau Prof. Brigitte Buendia für die gute Zusammenarbeit mit dem Institut Jaque Monod in Paris.

Herrn Prof. Wehnert von der Universität Greifswald danke ich für die Bereitstellung der verschiedenen Zelllinien.

Ein weiteres großes Dankeschön gilt Prof. Georg Krohne für die gute Betreuung während der praktischen Arbeit.

Des Weiteren möchte ich dem Muskeldystrophie-Netzwerk „MD-NET“ meinen Dank aussprechen, das durch die Unterstützung die Verbrauchsmaterialien und Chemikalien finanzierte.

Spezieller Dank gilt auch Prof. U. Scheer und Dr. M. Alsheimer für die wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen sowie Bereitstellung diverser Antikörper; PD R. Hock und Dr. T. Krüger für die Hilfestellung bei Aufnahmen am confokalen Laser-Scanning Mikroskop und Dr. N. Wilken für die grandiose EDV-Betreuung.

Für eine erstklassige, stimulierende und inspirierende Laboratmosphäre bei Christian, Hannah, Rike, Frank, Michael und Anne sowie allen zwischenzeitlich in der Arbeitsgruppe Dabauvalle engagierten Personen.

Bei Claudia und für den Sequenzierservice und ein dickes Dankeschön an Natalia, Silke und Kathrin für den guten Zellkulturservice.

Ein großer Dank gilt auch Claudia und Daniela aus der Abteilung für Elektronenmikroskopie.

Auch bei allen anderen nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Lehrstuhls für Zell- und Entwicklungsbiologie sowie der Abteilung für Elektronenmikroskopie möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Am allermeisten möchte ich mich jedoch bei meiner Familie bedanken, mein großer Rückhalt, deren Unterstützung mir erst alles ermöglicht hat.