

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. D. Drenckhahn**

**Untersuchungen zum Kernproteinimport in Progeriezellen und neue  
Möglichkeiten der Quantifizierung nukleärer Transportprozesse**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Tilman Kiel  
aus Hammelburg**

**Würzburg, September 2012**

# **Referentenblatt**

**Referent:** Priv.-Doz. Dr. S. Hübner

**Korreferent:** Prof. Dr. E. Conzelmann

**Dekan:** Prof. Dr. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 21.06.2013

**Der Promovend ist Arzt**

# Inhaltsverzeichnis

<b><u>1. Zusammenfassung</u></b> .....	<b>1</b>
<b><u>2. Einleitung</u></b> .....	<b>3</b>
2.1 Der Zellkern.....	3
2.1.1 Die Zellkernhülle.....	3
2.1.2 Die Kernlamina.....	3
2.2 Lamine: Interaktionen und Funktionen.....	7
2.2.1 Lamin - bindende Proteine.....	7
2.2.2 Die Funktionen der Lamine.....	8
2.3 Laminopathien.....	14
2.3.1 Übersicht.....	14
2.3.2 Hutchinson - Gilford Progerie -Syndrom (HGPS).....	16
2.3.3 Restriktive Dermopathie (RD).....	19
2.4 Proteintransport durch den Kernporenkomplex.....	19
2.4.1 Der Kernporenkomplex.....	19
2.4.2 Die Kernlokalisationssequenz .....	20
2.4.3 Importine und Exportine.....	21
2.4.4 Das RanGTPase-System .....	23
<b><u>3. Material und Methoden</u></b> .....	<b>25</b>
3.1 Materialien.....	25
3.1.1 Geräte.....	25
3.1.2 Oligonukleotide.....	25
3.1.3 Vektoren.....	26
3.1.3.1 pC4EN - F1E ( <i>ARIAD Pharmaceuticals</i> ).....	26
3.1.3.2 pC4EM - F2E ( <i>ARIAD Pharmaceuticals</i> ).....	27

3.1.3.3	pC4 - RHE ( <i>ARIAD Pharmaceuticals</i> ) .....	27
3.1.3.4	pcDNA - DEST53 ( <i>Invitrogen</i> ) .....	28
3.1.3.5	pDsRed - Monomer C1 ( <i>Clontech</i> ) .....	28
3.1.3.6	pEpi - 1.....	29
3.1.3.7	Zur Verfügung gestellte Expressionsplasmide.....	29
3.1.4	Chemikalien.....	30
3.1.5	Molekularbiologische Materialien.....	30
3.1.6	Bakterienstämme.....	30
3.1.7	Puffer.....	30
3.1.8	Zellen und Material für die Zellkultur.....	31
3.2	<b>Methoden</b> .....	31
3.2.1	Grundlagen der induzierbaren Proteinheterodimerisation.....	31
3.2.2	Polymerase - Ketten - Reaktion (PCR).....	32
3.2.3	<i>In-Fusion</i> <sup>TM</sup> - Reaktion .....	32
3.2.4	T4 - Ligase - Reaktion .....	32
3.2.5	Schneiden von DNA (Restriktion).....	33
3.2.6	DNA - Sequenzierung.....	33
3.2.7	Transformation .....	33
3.2.8	Anlegen von bakteriellen Langzeitkulturen (Glycerolstocks).....	34
3.2.9	DNA - Aufreinigung.....	34
3.2.9.1	DNA - Präparation aus bakteriellen Übernachtskulturen.....	34
3.2.9.2	DNA - Präparation aus Agarosegelen.....	34
3.2.9.3	DNA - Fällung mit Natriumacetat.....	34
3.2.10	Gelelektrophorese.....	35
3.2.11	Photometrische DNA - Messung.....	35
3.2.12	Transfektion.....	35
3.2.13	Zellkultur.....	35
3.2.14	Zellfixation.....	36

3.2.15	Western Blot-Analyse.....	36
3.2.16	Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit Amidoschwarz.....	37
3.2.17	Fluoreszenzmikroskopie.....	38
3.2.17.1	Phänotypkontrolle.....	38
3.2.17.2	Mikroskopie fixierter Zellen.....	38
3.2.17.3	Lebendzellmikroskopie.....	38
3.2.18	Relative Fluoreszenzintensitätsbestimmungen.....	39
3.2.19	Statistische Methoden.....	39
<b>4.</b>	<b><u>Ergebnisse</u></b> .....	<b>40</b>
4.1	Klonierungen.....	40
4.1.1	Herstellung von Expressionsvektoren, die für Prälamina A (PräLaA) und die Progerie - verursachenden Deletionsmutanten PräLaA $\Delta$ 50 und PräLaA $\Delta$ 90 kodieren.....	40
4.1.1.1	pDsRed - abgeleitete Expressionsvektoren.....	40
4.1.1.2	pEPI - DsRed - abgeleitete Expressionsvektoren.....	40
4.1.2	Plasmide zur Expression heterodimerisierbarer Multidomänenproteine.....	42
4.1.2.1	Herstellung des Heterodimerisierungsvektors pNLS - GFP - FKBP <sub>1x</sub> .....	42
4.1.2.2	Herstellung des Heterodimerisierungsvektors pNLS - GFP - FKBP <sub>3x</sub> .....	42
4.1.2.3	Herstellung des Heterodimerisierungsvektors pDsRed - mKan $\Delta$ NLS - FRB*.....	42
4.2	Morphologische Veränderungen des Zellkerns nach ektopter Prälamina A $\Delta$ 90 - Expression und Reversibilität der Zellkerndysmorphie durch Lovastatin.....	42
4.2.1	Untersuchungen zum Einfluß der ektopter Expression von Prälamina A $\Delta$ 90 auf die Morphologie von Zellkernen humaner Zellen.....	42
4.2.2	Quantifizierung von Prälamina A $\Delta$ 90 - induzierten Zellkerndysmorphien in Gegenwart und Abwesenheit von Lovastatin.....	44
4.3	Einfluß der Expression von Prälamina A - Deletionsmutanten auf den nukleären Import karyophiler Proteine in HeLa-Zellen.....	46
4.4	Quantifizierung der LMB - abhängigen Importkinetik von Rev - GFP in humanen Wildtyp - und ZMPSTE24 <sup>-/-</sup> - Fibroblasten.....	51
4.5	Etablierung eines neuen <i>Kernproteinimportassays</i> durch AP21967 - induzierte	

Proteinheterodimerisierung.....	54
4.6 AP21967 - induzierter Kernproteinimport in Wildtyp - und ZMPSTE24 <sup>-/-</sup> - Fibroblasten.....	57
4.7 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation trunkierter Prälamin A - Mutanten in HeLa-Zellen.....	60
<b><u>5. Diskussion</u></b> .....	<b>63</b>
5.1 Allgemeine Diskussion.....	63
5.2 Quantifizierung von Kernproteinimportvorgängen.....	64
5.3 Nukleäre Veränderungen und Kernproteinimport bei Progeriezellen.....	67
5.3.1 Effekte der ektopen Prälamin A $\Delta 50/\Delta 90$ - Expression auf die Zellkernmorphologie kultivierter HeLa-Zellen.....	67
5.3.2 Reversibilität nukleärer Dysmorphien durch Farnesyltransferaseinhibitoren .....	68
5.3.3 Veränderungen des nukleären Proteinimports in Prälamin A $\Delta 50/\Delta 90$ - exprimierenden HeLa - Zellen und ZMPSTE24 <sup>-/-</sup> - Fibroblasten.....	69
5.3.4 Prälamin A - exprimierende HeLa - Zellen.....	70
5.4 Subzelluläre Lokalisation trunkierter Prälamin A-Mutanten in HeLa- Zellen.....	70
<b><u>6. Literatur</u></b> .....	<b>72</b>
<b><u>7. Abkürzungen</u></b> .....	<b>92</b>
<b><u>8. Anhang</u></b> .....	<b>95</b>

# 1. Zusammenfassung

Vor dem Hintergrund nukleärer Zellkerndysmorphien, dem *Clustering* von Kernporenkomplexen sowie der nukleären Aggregation von Nukleoporinen in Zellen Hutchinson-Gilford Progerie-Syndrom (HGPS)- und restriktive Dermopathie (RD)-betroffener Patienten bzw. in Zellen, die Laminopathie-verursachende Prälamina A-Mutanten exprimieren, sollten in der vorliegenden Arbeit verschiedene Aspekte des Kernproteinimportes in Progeriezellen näher untersucht werden. Die hierfür ausgewählten Zellen entstammten Patienten mit RD (ZMPSTE24<sup>-/-</sup>-Fibroblasten) bzw. bildeten ekto die Progerie (d.h. HGPS und RD) -verursachenden Deletionsmutanten Prälamina A  $\Delta 50$  bzw.  $\Delta 90$  (HeLa-Zellen). In solchen Zellen wurden karyophile, biofluoreszierende Kargo-Moleküle (GFP-M9, GFP-NLS und Rev-GFP) exprimiert und daran anschließend in Abwesenheit und Gegenwart des nukleären Proteinexportinhibitors Leptomycin B (LMB) mit Hilfe von subzellulären Fluoreszenzintensitätsmessungen quantifiziert. Ferner wurde eine LMB-abhängige Importkinetik des zwischen Zytoplasma und Zellkern *shuttelnden* Rev-GFP-Proteins in ZMPSTE24<sup>-/-</sup>-Fibroblasten erstellt. Darüber hinaus wurde ein Zellkernproteinimportassay mittels induzierter Proteinheterodimerisierung etabliert. In den verschiedenen Versuchsanordnungen zeigten sowohl ZMPSTE24<sup>-/-</sup>-Fibroblasten als auch Prälamina A  $\Delta 50$ - bzw.  $\Delta 90$ -exprimierende HeLa-Zellen eine signifikant geringere nukleäre Akkumulation der ausgewählten karyophilen Kargo-Moleküle gegenüber Wildtyp-Zellen (Fibroblasten gesunder Probanden) bzw. HeLa-Zellen in denen Prälamina A ekto exprimiert worden war.

Zusätzlich konnten die bei Progeriezellen schon in der Literatur beschriebenen nukleären Dysmorphien auch an Prälamina A  $\Delta 50$ - insbesondere aber auch in  $\Delta 90$ -exprimierenden HeLa-Zellen sowie humanen Fibroblasten bestätigt werden. Ferner zeigte sich eine Regredienz dieser morphologischen Auffälligkeiten durch den Einsatz des Farnesyltransferaseinhibitors Lovastatin, wie dies in der Vergangenheit bereits für HGPS- und ZMPSTE24<sup>-/-</sup>-Fibroblasten gezeigt werden konnte. Trotz der Unterschiede zwischen HGPS- und RD-Betroffenen respektive klinischem Phänotyp und Mortalität ließen sich keine signifikanten Differenzen hinsichtlich des Ausmaßes nukleärer Dysmorphien bzw. der Reversibilität derselben durch Lovastatin in Prälamina A  $\Delta 50$ - und  $\Delta 90$ -exprimierenden HeLa-Zellen beobachten.

Ein weiterer Teilaspekt der Arbeit galt der Untersuchung der subzellulären Lokalisation trunkierter Prälamin A-Mutanten in HeLa-Zellen. Zum Einsatz kamen die partielle familiäre Lipodystrophie-verursachende Mutante R482L sowie die Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie-verursachende Mutante R527P. Um den Einbau in die Zellkernlamina zu verhindern bzw. quantitative Fluoreszenzintensitätsmessungen zu ermöglichen wurden Expressionsvektoren verwendet, die für Prälamin A-Moleküle kodierten, denen die Kopf- und Stab-Domäne fehlte. Hinweise für Auswirkungen dieser Punktmutationen auf den Kerntransport der entsprechenden Prälamin A-Moleküle ergaben sich in den Fluoreszenzintensitätsmessungen allerdings nicht.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Der Zellkern**

#### **2.1.1 Die Zellkernhülle**

Die Kernhülle trennt in eukaryotischen Zellen zwei große Kompartimente, das Zytoplasma und das den Zellkern ausfüllende Nukleoplasma. Sie schafft somit die Möglichkeit einer räumlichen und zeitlichen Trennung von Transkription und Translation. Die Kernhülle besteht aus einer äußeren und inneren Kernmembran, die im Bereich der Kernporenkomplexe (*nuclear pore complex* – NPC) über die Porenmembran miteinander verbunden sind (Gerace und Burke 1988). Während kleinere Moleküle und Ionen durch den ca. 45 nm großen NPC frei diffundieren können, wird der Transport größerer Moleküle durch einen aktiven Transportmechanismus gewährleistet (Görlich und Kutay 1999, Macara 2001). Eine nähere Beschreibung des NPC findet sich in Kapitel 2.4.1.

Die äußere Kernmembran (*outer nuclear membrane* – ONM) ist nicht nur räumlich sondern auch funktionell eng mit dem rauhen endoplasmatischen Retikulum (rER) verknüpft (Franke et al. 1981). So trägt sie ebenfalls Ribosomen und eine ähnliche Ausstattung an Membranproteinen (Gerace und Burke 1988).

Die dem Nukleoplasma zugewandte innere Kernmembran (*inner nuclear membrane* – INM) unterscheidet sich strukturell und funktionell sehr stark von der ONM sowie anderen zellulären Membransystemen. Die INM ist frei von Ribosomen und mit integralen Membranproteinen versehen, die Bindungsstellen für Heterochromatin und die Kernlamina liefern (Stuurman et al. 1998). Das Lumen zwischen beiden Membranen, als perinukleäre Zisterne bezeichnet, beträgt gewöhnlich 20-100 nm und bildet ein Kontinuum mit dem Lumen des ER.

#### **2.1.2 Die Kernlamina**

Die Kernlamina humaner Zellen setzt sich aus einem dreidimensionalen fibrillären Lamin-Netzwerk zusammen, das größere freie Bereiche aufweist (Paddy et al. 1990). In der *Xenopus*-Oozyte stellt sie sich als ein zweidimensionales Gitter ineinander verschlungener Filamente dar (Aebi et al. 1986). Lamine gehören zur Superfamilie der Intermediärfilamente (IF) und bilden innerhalb dieser Familie die Klasse V. Während IF-Proteine der Klasse I-IV zytoplasmatisch lokalisieren, findet man Lamine ausschließlich im Zellkern. Charakteristisch für alle IF-Proteine ist eine

dreiteilige Domänenorganisation bestehend aus einem zentralen, stabförmigen Abschnitt (Stab-Domäne), der N-terminal von einer Kopf- und C-terminal von einer Schwanz-Domäne flankiert wird (Geisler und Weber 1982). Lamin-Gene findet man in allen vielzelligen Tieren, sie fehlen jedoch in Pflanzen und einzelligen Organismen (Meier 2001, Melcer et al. 2007). Lamine lassen sich in A- und B-Typ Lamine einteilen.

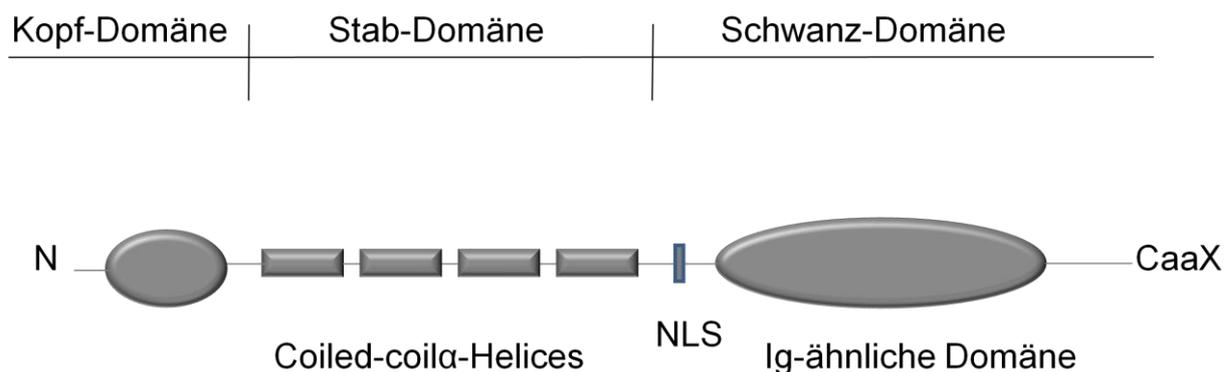


Abb. 2-1: Schematische Darstellung eines Lamin A-Monomers: Dreiteilige Domänenorganisation mit zentralem Stab-, einer Kopf- und einer Schwanz-Domäne. Die Stab-Domäne besteht aus vier  $\alpha$ -helikalen *Coiled-coil*-Segmenten, die durch flexible nicht helikale *Linker*-Regionen miteinander verbunden sind. Die Schwanz-Domäne der Lamine beinhaltet einen globulären Bereich, dessen Struktur als Ig-Domäne beschrieben ist. Ferner beinhaltet die Schwanz-Domäne eine Kernlokalisationssequenz (NLS) und eine CaaX-Box. Die Kopf-Domäne setzt sich größtenteils aus einer globulären, Ig-ähnlichen Struktur zusammen.

In Säugern existieren vier A-Typ Lamine, Lamin A, C, A $\Delta$ 10 und C2, die durch alternatives Spleißen (Broers et al. 2006, Schumacher et al. 2006, Verstraeten et al. 2007) des Gens *LMNA* entstehen. Lamin C unterscheidet sich von Lamin A durch das Fehlen von 98 C-terminalen Aminosäuren (und damit auch der CaaX-Box – siehe unten) sowie einer unigenen, aus 6 Aminosäuren bestehenden Sequenz (Fisher et al. 1986, McKeon et al. 1986). Die Lamin A $\Delta$ 10-Variante hat eine aus 30 Aminosäuren bestehende Deletion im Lamin A spezifischen Teil, die dem Exon 10 entspricht. Lamin A $\Delta$ 10 wurde erstmals in Zellen des Lungenadenokarzinoms nachgewiesen, ist aber auch in einer Vielzahl von Geweben, die nicht neoplastischen Ursprungs sind, vertreten (Machielis et al. 1996). Lamin C2 wird in männlichen Keimzellen exprimiert (Furukawa et al. 1994). Bei dieser Variante ist die Aminosäuresequenz, die dem Exon 1 entspricht, verkürzt. Hier treten die sechs

Aminosäuren GNAEGR an die Stelle der für A-Typ Lamine spezifischen 85 N-terminalen Aminosäuren.

Die B-Typ Lamine werden durch zwei Gene vertreten, *LMNB1* und *LMNB2*. Für *LMNB1* ist ein Produkt, Lamin B1, bekannt. Für *LMNB2* wurden zwei Gen-Produkte, Lamin B2 und B3, gefunden. Lamin B3 wird nicht wie B1 und B2 konstitutiv exprimiert, sondern erscheint analog zu Lamin C2 nur in männlichen Keimzellen (Furukawa und Hotta et al. 1993). In Lamin B3 sind die 208 N-terminalen Aminosäuren des Lamin B2 durch 85 Aminosäuren ersetzt. Wie die meisten IF interagieren auch die Lamine zu höhermolekularen Polymeren, deren Grundbaustein ein *Coiled-coil*-Homodimer darstellt. Entscheidend für die Homodimer-Bildung sind die vier  $\alpha$ -helikalen Abschnitte der Stab-Domäne (1a, 1b, 2a und 2b), die durch kurze *Linker*-Sequenzen verbunden sind (McKeon et al. 1986, Fisher et al. 1986).

Intranukleär erfolgt eine *head-to-tail*-Anlagerung der Homodimere unter Ausbildung polarer Protofilamente, die durch laterale, antiparallele Assoziationen schließlich ein fibrilläres Netzwerk generieren. Die Stab-Domäne (Schirmer et al. 2001, Strelkov et al. 2004) als auch Kopf- und Schwanz-Domäne spielen hierbei eine wichtige Rolle (Stuurman et al. 1998, Shumaker et al. 2005, Isobe et al. 2007). *Fluorescence resonance energy transfer*-Untersuchungen haben für Lamin A und Lamin B1 gezeigt, dass die Polymerisierung Homopolymere hervorbringt (Delbarre 2006). Diese Homopolymerisierung kann durch die Gegenwart einer Lamin A-Mutante gestört werden (Delbarre et al. 2006 – siehe unten).

Während der Zellteilung wird die Kernhülle aufgelöst und in jeder Tochterzelle neu gebildet. Dieser Prozess geht mit Zerfall und Aufbau der Lamina einher. Die Lamin-Polymere de- und polymerisieren nach Phosphorylierung beziehungsweise Dephosphorylierung von konservierten Serin-Resten in der Nähe der Stab-Domäne (Dessev et al. 1991, Peter et al. 1990). Mutationen in diesen Resten können zu einem Arrest des Zellzyklus führen (Heald und Mc Keon 1990).

Bei der Depolymerisation der Kernlamina gibt es hinsichtlich der Lamine Unterschiede. Während die ubiquitär exprimierten B-Typ Lamine bei der Mitose über Modifizierungen an der CaaX-Box (siehe unten) mit Stücken der zerfallenen Kernmembranen assoziiert bleiben, liegen die Lamin A- und Lamin C-Moleküle als Oligomere gelöst vor.

Lamine enthalten im Schwanzbereich eine globuläre Domäne, die als Ig-Domäne beschrieben wird (Dhe-Paganon et al. 2002, Krimm et al. 2002) und eine davor

liegenden NLS, die den nukleären Transport ermöglicht (Loewinger und McKeon 1988). Zusätzlich befindet sich eine CaaX-Box (C = Cystein, a = aliphatische Aminosäure, X = beliebige Aminosäure) am C-Terminus, die einer umfangreichen postrationalen Modifikation (sie kann sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern ablaufen – Barrowman et al. 2008) unterliegt und eine wichtige Rolle bei der Maturierung der Lamine spielt.

Im ersten Schritt wird das Cystein der CaaX-Box der als Prälamine bezeichneten Moleküle durch eine Farnesyltransferase farnesyliert. Daran anschließend werden die Aminosäuren aaX proteolytisch abgespalten, möglicherweise durch das Rce1 (*Ras-converting enzyme 1*) und/oder ZMPSTE24/FACE1 (*Zink-Metalloprotease Ste24/Farnesylated-proteins converting enzyme 1*; Rusinol und Sinensky 2006). Im dritten Schritt wird der Cysteinrest durch die *Isoprenylcystein-carboxyl-methyltransferase* (Icmt) methyliert. Während die Reifung der B-Typ Prälamine auf dieser Stufe sistiert wird Prälam A in einem weiteren Schritt durch ZMPSTE24/FACE1 zum reifen Lamin A prozessiert. Hierbei werden zusätzlich 15 Aminosäuren inklusive des farnesylierten/carboxymethylierten Cysteinrestes abgespalten (Corrigan et al. 2005). Diese Modifikationen spielen eine wichtige Rolle für die membranäre Lokalisation dieser Lamine (Hennekes und Nigg 1994) sowie für Interaktionen zwischen Laminen und Lamin-bindenden Proteinen (Rusinol und Sinensky 2006). Gegenüber den CaaX-Box-tragenden Laminen scheint die membranäre Lokalisation von Lamin C von Lamin A abhängig zu sein (Hutchison 2002).

Prälam A

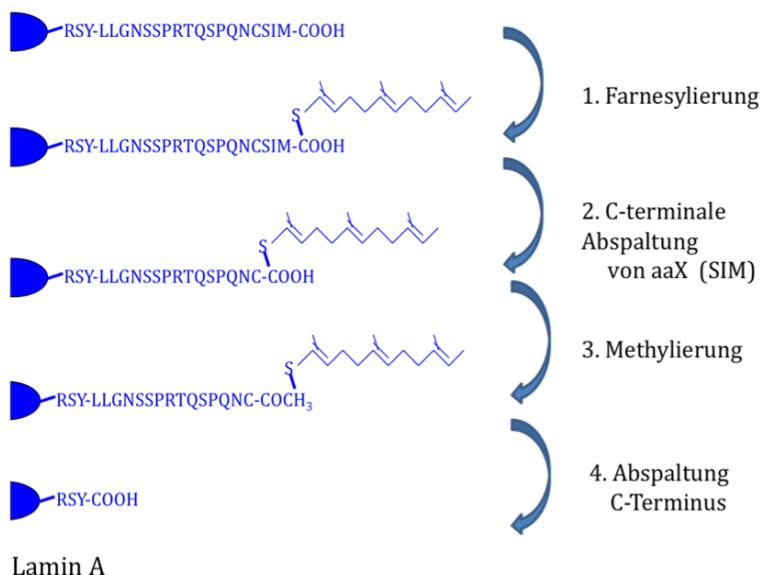


Abb. 2-2: Die Prozessierung von Prälam A ist in vier Schritte gegliedert:

1. Farnesylierung des Cysteins der CaaX-Box
2. Proteolytische Abspaltung des aaX
3. Methylierung des Cysteins
4. Abspaltung des C-terminalen Endes inklusive des farnesylierten/carboxymethylierten Cysteinrestes.

## 2.2 Lamine: Interaktionen und Funktionen

### 2.2.1 Lamin - bindende Proteine

Das wohl bekannteste INM-lokalisierende Protein ist Emerin, das durch Mutation des gleichnamigen Gens Ursache der so genannten Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie ist. Die Interaktion mit A-Typ Laminen scheint für die Retention des Emerins in der INM essentiell zu sein, da in Fibroblasten von *LMNA knock-out* Mäusen eine Diffusion des Emerins in das ER beobachtet wird (Sullivan et al. 1999). Ein weiteres Beispiel ist der **Lamin-B-Rezeptor (LBR)**, der mit B-Typ Laminen sowie dem humanen **Heterochromatin Protein 1 (HP1)** (Ye und Worman 1996, Ye et al. 1997), DNA (Ye und Worman 1994, Duband-Goulet und Courvalin 2000) und ebenso mit Histonen (H3/H4 Tetramer) und dem Protein HA95 (Polioudaki et al. 2001) interagiert/komplexiert. Andere Proteine, die mit beiden Laminen (A/B-Typ Lamine) wechselwirken sind die **Lamina-assoziierten Polypeptide (LAP) 1 und 2** (Foisner und Gerace 1993). Die Isoformen LAP1 und LAP2 binden sowohl A-Typ als auch B-Typ Lamine, während LAP1C eher mit Lamin B1 interagiert.

Während fast alle LAPs transmembranäre und somit INM-lokalisierende Proteine sind, bilden zwei LAP2 Isoformen, LAP2 $\alpha$  und  $\zeta$ , eine Ausnahme. Beiden fehlt eine transmembranäre Domäne. LAP2 $\alpha$  z.B. findet man unter Aussparung der Nukleoli im ganzen Zellkern verteilt (Dechat et al. 1998).

Ein ebenfalls mit Laminen (Lamin A und Lamin B1) interagierendes INM-Protein ist MAN1, das auch Emerin binden kann (Mansharamani und Wilson 2005). Zusammen mit LAP2 und Emerin bilden diese die sog. LEM-Domänen-Proteine. Gemeinsam ist diesen Proteinen die sogenannte LEM-Domäne, eine konservierte aus etwa 40 Aminosäuren bestehende globuläre Domäne. Sie gewährleistet eine Bindung an Chromatin über den **Barrier to Autointegration Factor (BAF)**, welche über Wechselwirkungen zwischen BAF und DNA (Zheng et al. 2000) bzw. BAF und Histonen (Montes de Oca et al. 2005) vermittelt wird.

Weitere integrale Membranproteine der INM sind die SUN-Proteine SUN1 und SUN2, die eine starke Homologie zu Sad1p (*Schizosaccharomyces pombe*) und UNC-84 (*Caenorhabditis elegans*) aufweisen. Gemeinsam ist diesen Proteinen die SUN (**Sad1/UNC-84-Homologie**)-Domäne, die dem perinukleären Raum zugewandt ist. Mit ihrer N-terminalen Domäne wechselwirken die SUN-Proteine mit A-Typ und B-Typ Laminen (Hodzic et al. 2004, Crisp et al. 2006, Haque et al. 2006), während die C-terminale Domäne mit einer Gruppe ONM-lokalisierender

Transmembranproteine wechselwirkt. Dieser Gruppe, zu denen die *D. melanogaster* Proteine *Klarsicht* und Msp-300 (Fischer-Vize und Mosley 1994, Rosenberg-Hasson et al. 1996, Welte et al. 1998), die *Caenorhabditis elegans* Proteine ZYG-12 (Malone et al. 2003), UNC-83 (Starret et al. 2001), ANC-1 (Starr und Han 2002) und die mammalischen Proteine Syne/Nesprin-1 und -2 gehören, ist eine als **Klarsicht/ANC-1/Syne-1 Homologie (KASH)-Domäne** bezeichnete Sequenz gemeinsam, über die diese Proteine mit den SUN-Proteinen wechselwirken. Schließlich binden die KASH-Proteine direkt/indirekt (über Plektin, Kinesin und Dynein) an zytoskeletale Strukturen (Aktin- und Intermediärfilamente sowie Mikrotubuli). Insgesamt bilden diese Proteine den sogenannten LINC-Komplex (*Linkers of the nucleoskeleton complex*).

## 2.2.2 Die Funktionen der Lamine

### Organisation der Kernhülle

Während der Mitose sind die Lamine sowohl für den Zerfall als auch die Neubildung der Kernhülle essentiell. Die Phosphorylierung der Lamine beidseits der Stab-Domäne sowie deren Interaktionspartner (LAP1, LBR, etc.) durch die zellzyklusspezifische p34cdc2-Kinase während der Prophase bzw. der Prometaphase leitet durch die Destabilisierung der Kernlamina den Zerfall der Kernhülle ein (Gerace und Blobel 1980, Ottaviano und Gerace 1985, Übersicht in Moir et al. 2000). Auch bei der Reorganisation der Kernhülle, die mit einer Dephosphorylierung der Lamine einhergeht (Fields und Thompson 1995, Thompson et al. 1997, Moir et al. 2000b, Übersicht: Dechat-Review 2008), spielen Lamine eine wichtige Rolle. So kommt es durch Immundepletionen von Laminen zu einer Inhibition/Einschränkung der Kernhüllenneubildung und der Organisation sowie ordnungsgemäßen Verteilung der NPCs (Burke und Gerace 1986). Auch das Vorliegen einer dominant-negativen Lamin B3-Mutante von *Xenopus laevis* (Eriksson et al. 2003, Goldman et al. 2004) verhindert die Chromatindekondensation und führt zu einer Arretierung der Kernhüllenneubildung (Benavente und Krohne 1986, Lopez-Soler et al. 2001). Desweiteren hat man in Rekonstruktionsexperimenten zeigen können, dass die Bildung von Zellkernen abhängig von Laminen verläuft. So werden bei Depletion von *Xenopus*-Lamin B3 kleine fragile Zellkerne gebildet, die nicht in der Lage sind DNA-Replikationen zu betreiben (Jenkins et al. 1993, Newport et al. 1990, Übersicht: Gruenbaum et al. 2003). Ähnliche Beobachtungen wurden mit N-

terminalen Deletionsmutanten der Lamina B1 und A beobachtet (Spann et al. 1997, Übersicht: Gruenbaum et al. 2003).

Bezüglich der Lamina-NPC-Interaktion wurde durch Goldberg und Allen (1996) elektronenmikroskopisch eine Assoziation zwischen Filamenten der Kernlamina und dem nukleären Korb der NPCs nachgewiesen. Auch wurde gezeigt, dass die NPCs in Lamina-defizienten Zellen aggregieren (Lenz-Böhme et al. 1997, Harborth et al. 2001, Übersicht: Gruenbaum et al. 2003) bzw. einen aberranten Aufbau zeigen (zytoplasmatische Lage des nukleären Korbs) (Goldberg et al. 1995, Smythe et al. 2000). Schließlich beobachteten Lenz-Böhme sowie Harborth und Mitarbeiter (1997, 2001), dass durch eine Inhibierung der Laminaneubildung NPCs gebildet werden, denen das Nukleoporin NUP153 fehlt. Smythe und Mitarbeiter konnten 2000 eine direkte Interaktion zwischen dem *Xenopus* Lamin B3 und NUP153 nachweisen. Weitere Studien belegen die Assoziation der Lamina mit Proteinen des NPCs. So kolokalisieren NUP153 und Lamin A bzw. Lamin A-Mutanten innerhalb nukleärer Aggregate (Bechert et al. 2003, Bastos et al. 1996, Hübner et al. 2006a). Erst kürzlich wurde eine direkte Wechselwirkung zwischen Lamin A und NUP153 nachgewiesen (Al-Haboubi et al. 2011).

### Chromatinorganisation

Heterochromatin ist hochorganisiert und in Säugerzellen hauptsächlich mit Nucleoli und Teilen der Lamina assoziiert (Misteli 2007, Akhtar und Gasser 2007, Taddei et al. 2004). Eine der ersten Hinweise für Lamin-Chromatin-Interaktionen lieferten biochemische Untersuchungen an HeLa-Zellen (Bouvier et al. 1985). Die Interaktionen erfolgen über die C-terminale Schwanz-Domäne der Lamine und überlappen mit der NLS (Mattout et al. 2007) sowie über N- und C-terminale Domänen von Kernhistonen (Hoger et al. 1991, Schmidt und Krohne 1995, Goldberg et al. 1999, Mattout et al. 2007). Wie schon unter 2.2.1 beschrieben wird die Bindung an DNA/Chromatin durch Lamin-bindende Proteine vermittelt. An dieser Stelle seien der LBR sowie die LEM-Domänen-Proteine, welche Chromatin unter Vermittlung von BAF binden (Segura-Totten und Wilson 2002, Margalit et al. 2007), wiederholend erwähnt. BAF ist auch in der Lage direkt mit A-Typ Laminen zu wechselwirken und so diese mit dem Chromatin zu assoziieren (Holaska et al. 2003). Ferner gibt es Hinweise für die direkte Bindung von A- und B-Typ Laminen an DNA (Shoeman und Traub 1990, Baricheva et al. 1996, Rzepecki et al. 1998, Stierle et al. 2003). Hierzu

zählen als S/MARs (*scaffold/matrix attachment regions*) identifizierte DNA-Sequenzen (Luderus et al. 1992/1994, Taniura et al. 1995, Zhao et al. 1996) sowie als *Lamina associated domain* (LAD) bezeichnete DNA-Abschnitte, die sich durch expressionsreprimierende Eigenschaften auszeichnen (Guelen et al. 2008). Ein ähnliches Szenario wurde bei Untersuchungen mit Lamin Dm0, einem *Drosophila* B-Typ Lamin, beobachtet, das mit transkriptionell inaktiven DNA-Sequenzen interagiert (Pickersgill et al. 2006). Croft und Mitarbeiter (1999) zeigten in diesem Zusammenhang, dass genreiche Chromosomen (wie z.B. das Chromosom 19) eher tiefer im Zellkern, während genarme Chromosomen (wie z.B. das Chromosom 18) tendenziell näher an der Lamina lokalisiert sind. Ähnlich repräsentiert sich das inaktivierte X-Chromosom, als das an die Lamina assoziierte Barr-Körperchen (Barr und Bertram 1954).

Die Bedeutung einer intakten Lamina für die Positionierung genetischen Materials zeigt sich letztendlich darin, dass in HGPS-Fibroblasten ein Verlust des peripheren Chromatins festgestellt werden kann (Goldmann et al. 2004).

### Genexpression

Es ist seit längerem bekannt, dass Lamine transkriptionelle Prozesse beeinflussen. So zeigten Spann et al. (2002) und Kumaran et al. (2002), dass die Expression einer N-terminal trunkierten Laminmutante bzw. eine Überexpression von A-Typ Laminen in der Lage sind hemmend auf die Transkription zu wirken. Darüber hinaus interagieren A-Typ Lamine mit dem Transkriptionsfaktor MOK2 (Dreuillet et al. 2002, 2008). Weitere Beispiele sind das Lamin B-bindende Protein Oct (**Octamer transcription factor**)-1, dessen POU (*Pituitary-specific Pit-1 - Octamer transcription factor Oct 1 and 2 - Unc-86*)-Domäne in immortalisierten Zellen die Expression des Kollagenase-Gens reprimiert (Imai et al. 1997) und das A-Typ Lamin-bindende, transkriptionshemmende Retinoblastomprotein (pRB - Ozaki et al. 1994, Markiewicz et al. 2005). Bei den familiären Lipodystrophien wird durch Mutationen in der für die C-terminale Schwanz-Domäne kodierenden Region des *LMNA*-Gens die Assoziation mit dem Transkriptionsfaktor SREBP-1 (**Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1**), das in der Regulation der Cholesterol-Biosynthese und der Adipogenese involviert ist, negativ beeinflusst (Favreau et al. 2003). Für die Regeneration skeletaler Muskelzellen scheint die Wechselwirkung zwischen MyoD, einem Transkriptionsfaktor für die myogene Differenzierung und Lamin A von Bedeutung zu

sein (Bakay et al. 2006). CyclinD3 ist ein weiteres für die Myoblastendifferenzierung wichtiges Lamin A-bindendes Protein (Mariappan et al. 2007).

Vergleichende Genexpressionsuntersuchungen zwischen HGPS- und Wildtyp-Zellen älterer und jüngerer Probanden mittels quantitativer mRNA-Messungen ergaben, dass von 152 untersuchten Genen 47 (31%) bei älteren Menschen und HGPS-Patienten im Vergleich zu den jüngeren Probanden unterschiedlich transkribiert werden, darunter für die Zellteilung wichtige Gene (Ly et al. 2000). Bei einer weiteren Untersuchung zeigten 361 von 33.000 (1.1%) analysierten Genen eine mindestens zweifache Veränderung zu altersentsprechenden Wildtyp-Zellen (Csoka et al. 2004). Zu den prominentesten Kategorien zählten hier interessanterweise Gene für Transkriptionsfaktoren, Regulatoren der Proliferation und Faktoren der DNA-Replikation. Das am meisten betroffene Gen kodiert für den Transkriptionsfaktor *MEOX/GAX*, der als negativer Regulator der Proliferation mesodermaler Gewebe fungiert und auch an der skeletalen und kraniofazialen Entwicklung bzw. myogenen Extremitätenentwicklung mitwirkt. Ferner zeigten Proteine der extrazellulären Matrix eine erhöhte Expression, deren Missverhältnis zu remodellierenden Enzymen zu einer pathologischen Remodellierung der Gefäßwand und damit zur Atherogenese führt.

### DNA Replikation

Zellen vielzelliger Lebewesen enthalten ca. 30.000 Replikons (Keller et al. 2002), die räumlich und zeitlich während der Replikationsphase reguliert werden. Es gibt viele Hinweise dafür, dass Lamine eine wichtige Rolle in diesem komplexen Prozess spielen. Beispielsweise kolokalisiert Lamin B1 in nukleoplasmatischen Aggregaten mit dem Replikationsfaktor PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), der an der Elongation beteiligt ist (Moir et al. 1994), während Lamin A sich in primären Fibroblasten an Orten früher Replikation nachweisen lässt (Kennedy et al. 2000). In *Xenopus laevis* Kernrekonstitutionsversuchen konnte gezeigt werden, dass eine Immundepletion von Typ-B Laminen die DNA-Replikation inhibiert (Newport et al. 1990, Meier et al. 1991, Ellis et al. 1997, Spann et al. 1997, Moir et al. 2000a, Dechat Review). Dieser Effekt konnte durch Zugabe von Lamin B aufgehoben werden (Meier et al. 1991). Eine Inhibierung der DNA-Replikation wurde auch durch die Mikroinjektion einer N-terminalen Lamin A-Deletionsmutante in Säugerzellen erreicht (Spann et al. 1997).

## Zell-Proliferation

Aufgrund der Assoziation von A-Typ Laminen mit pRb (Ozaki et al. 1994), spielen diese auch bei Regulation des Zellzykluses eine wichtige Rolle. Dabei bindet pRb im hypophosphoryliertem Zustand an **Elongation Factor2** (E2F). E2F gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die für die Progression des Zellzyklus obligat sind (Giacinti und Giordano 2006). Nach der Hyperphosphorylierung von pRb durch die Cyclin/CDK (**cyclin-dependent kinase**)-Komplexe wird E2F freigesetzt, um die S-Phase zu initiieren. Die Rolle von A-Typ Laminen in diesem Prozess wird dadurch gestützt, dass hypophosphoryliertes pRb eng mit A-Typ Laminen in nukleoskelettalen Präparationen der frühen G1-Phase assoziiert ist (Mancini et al. 1994). Darüber hinaus enthalten primäre Fibroblasten von früher G1- bis früher S-Phase intranukleäre Bereiche, die mit A-Typ Laminen und pRb assoziiert sind (Kennedy et al. 2000). Auch die Überexpression von mutierten, Aggregate bildenden Laminen fördert die Rekrutierung von pRb (Markiewicz et al. 2002, Hübner et al. 2006a). Lamine scheinen auch den Phosphorylierungszustand von pRb zu beeinflussen. Dies zeigt sich durch einen Rückgang der Dephosphorylierung in A-Typ Lamin-defizienten Zellen vermittelt durch TGF $\beta$ 1 (**transforming growth factor** $\beta$ 1) und durch den Nachweis eines Komplexes aus der PP2A-Phosphatase, pRb und A-Typ Laminen (Van Berlo et al. 2005). In HGPS-Fibroblasten fand man signifikant reduzierte Spiegel des hyperphosphoryliertem pRbs bei unverändertem Gesamtspiegel (Dechat et al. 2007). Einige Untersuchungen konnten hingegen eine Verminderung des gesamt-pRbs in *LMNA*<sup>-/-</sup>-Fibroblasten (Johnson et al. 2004) bzw. in Hepatozyten ZMPSTE24-defizienter Mäuse (Varela et al. 2005) nachweisen, was auf die Bedeutung der Lamine beim Umsatz und der proteasomalen Degradation von pRb hinweist. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde vorgeschlagen, dass die erhöhte Rate der Zellproliferation und die herabgesetzte Fähigkeit des Zellzyklus-Arrestes bei A-Typ Lamin-defizienten Zellen auf die Destabilisierung von pRb zurückzuführen ist (Johnson et al. 2004, Van Berlo et al. 2005). Die Hypophosphorylierung von pRb scheint von LAP2 $\alpha$  reguliert zu werden (Markiewicz et al. 2002, Dorner et al. 2006). So verursacht die RNAi-bedingte Depletion von LAP2 $\alpha$  eine Proliferationszunahme (Dorner et al. 2006). Auch ein Verlust der nukleoplasmatischen Lokalisation von A-Typ Laminen wird in der frühen G1-Phase beobachtet, einhergehend mit einem Ungleichgewicht zwischen Proliferation und

Differenzierung bei regenerativen Prozessen (Naetar und Foisner 2009). Zusammenfassend zeigt sich, dass A-Typ Lamine und LAP2 $\alpha$  Schlüsselproteine des Zellzyklusses darstellen, sowohl auf der Ebene der Modulation, Phosphorylierung und der subzellulären Lokalisation von pRb.

Zusätzlich lässt sich über eine Rolle von *LMNA*-Mutationen und veränderter Tumor-Suppressor-Funktion des pRb in der Tumorgenese spekulieren. Tatsächlich scheinen Lamine hierbei involviert zu sein (Prokocimer et al. 2006), jedoch ist unklar ob Laminopathien direkt an der Entstehung und Progression beteiligt sind oder ob die Veränderung der Laminexpression bei verschiedenen Tumoren (Gaedtker et al. 2007, Hudson et al. 2007) eine indirekte Konsequenz zellulärer Veränderungen ist.

### DNA-Reparatur und Telomere

Hinweise für die Rolle von Laminen bei der DNA-Reparatur liefern vor allem Untersuchungen an Progerie-induzierenden Lamin-Mutanten. So wurde gezeigt, dass Progerin oder auch farnesyliertes Prälamina A bei DNA-Schäden Rekrutierungsstörungen des Reparaturfaktors 53BP1 (*p53-binding protein 1*) verursachen und Reparaturvorgänge nach DNA-fragmentierender Bestrahlung in HGPS-Fibroblasten und *ZMPSTE24*<sup>-/-</sup>-MEFs (*mouse embryonic fibroblast*) verzögert ablaufen (Liu et al. 2005). Insgesamt ist die Empfindlichkeit gegenüber DNA-schädigenden Einwirkungen in *ZMPSTE24*<sup>-/-</sup>-Zellen erhöht (Liu et al. 2005). Aber auch der p53-Signalweg (als Ausdruck zellulären Stresses), der in Folge von DNA-Schäden unterschiedlichster Art initiiert wird, scheint in solchen Zellen aktiviert vorzuliegen (Horn und Vousden 2007). Persistiert der Stress, wird auf diesem Wege ein Vermehren der beschädigten Zellen durch Apoptose und Seneszenz verhindert (Vousden und Lane 2007). Ausserdem konnte man einen Anstieg des phosphorylierten Histons H2AX ( $\gamma$ H2AX), das auf Doppelstrangbrüche hinweist, in *ZMPSTE24*<sup>-/-</sup>-Zellen, HGPS-Fibroblasten und RD-Fibroblasten mit *ZMPSTE24*-Mutation feststellen. Alle genannten Untersuchungen sprechen dafür, dass Defekte in der DNA-Reparatur für die Akkumulation geschädigter Erbinformationen bei Progeriesyndromen verantwortlich sind (Liu et al. 2005/2006, Varela et al. 2005).

Auch Telomerverkürzungen/-dysfunktionen sind wichtige „Spieler“ genomischer Instabilitäten und führen Zellen über einen *DNA damage response* in die Seneszenz (d'Adda di Fagagna et al. 2003). Ein solcher Zusammenhang wurde auch bei Progerie-verursachenden Mutanten beobachtet (Chang et al. 2004, Du et al. 2004,

Übersicht Ding und Sheng 2008, Huang et al.2008, Benson et al. 2010), wobei eine Telomeraseexpression Proliferations-/Seneszenzeffekte reduzieren konnte (Kudlow et al. 2008, Benson et al. 2010). Abb. 2-3 zeigt ein Schema möglicher Mechanismen humaner Alterungsprozesse.

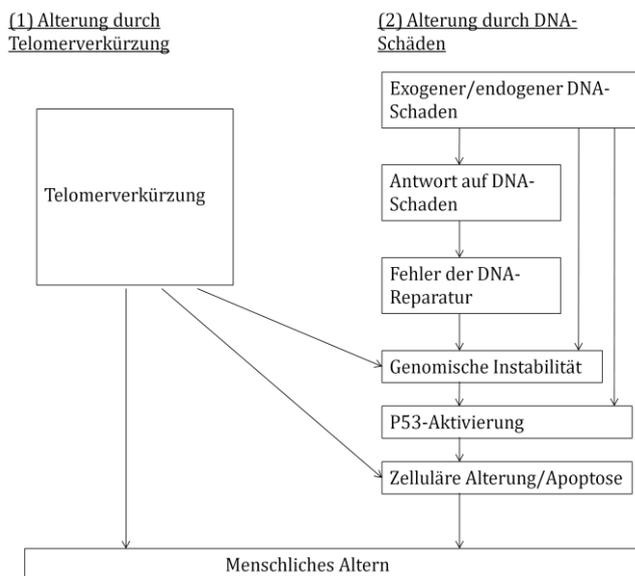


Abb. 2-3 (abgewandelt nach Ding und Shen 2009): Ein hypothetisches Modell: Genomische Instabilität spielt eine zentrale Rolle während des Alterungsprozesses, der durch folgende Hauptmechanismen ausgelöst wird:

(1) Alterung durch Telomerverkürzung: Telomere sind essentiell für die chromosomale Stabilität. Telomerverkürzung/-dysfunktion können eine DNA-Schadensreaktion und damit zelluläres Altern hervorrufen.

(2) Alterung durch DNA-Schäden: Fehlerhafte DNA-Reparatur führt zur Akkumulation von DNA-Schäden, die zur genomischen Instabilität und beschleunigter Zellalterung beitragen. Beide Mechanismen stehen im Zusammenhang mit einer Aktivierung von p53 und können additiv humanes Altern beschleunigen.

## 2.3 Laminopathien

### 2.3.1 Übersicht

Unter den Laminopathien werden alle Erkrankungen zusammengefasst, die entweder durch Mutationen im *LMNA*-Gen oder in den zwei *LMNB*-Genen hervorgerufen werden. Zusätzlich werden auch noch Mutationen in Genen Lamin-assoziiierter Membranproteine unter dem Überbegriff Laminopathie subsummiert. Dazu zählt die X-chromosomal vererbte **Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie** (EDMD) (Mutation im Emerin-Gen) und die Pelger-Huët-Anomalie (Mutation im Lamin-B-Rezeptor-Gen). Seit den ersten Berichten über Veränderungen des Lamin A bei Patienten mit autosomal vererbter EDMD (Bonne et al. 1999) steigt stetig die Anzahl menschlicher Erkrankungen, die sich auf Mutationen in den Lamin-Genen zurückführen lassen. Über 180 unterschiedliche Erkrankungen werden durch Mutationen im *LMNA*-Gen verursacht (Grünbaum et al. 2005), dagegen sind (meist mit dem Leben nicht zu vereinbarende) Mutationen der *LMNB*-Gene weit weniger zahlreich.

Da sich Mutationen des *LMNA*-Gens auf unterschiedlich differenzierte Zelltypen auswirken kommt es zur Ausprägung einer Reihe von klinischen Erscheinungsbildern. In der Gruppe der Myopathien sind neben der oben genannten Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie die Gliedergürtel-Muskeldystrophie Typ 1B (LGM1B) und die Dilatative Kardiomyopathie (**dilated cardiomyopathy** - DCM1A) (Fatkin et al. 1999) zu nennen. Verteilungsstörungen des subkutanen Fettgewebes mit progressiver Fettzelledegeneration ist die Hauptsymptomatik bei der partiellen familiären Lipodystrophie (**familial partial lipodystrophy** - FPLD) (Shackelton et al. 2000). Auch das periphere Nervensystem kann im Rahmen der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit vom Typ 2B1 betroffen sein (**Charcot-Marie-Tooth** – CMT) (De Sandre-Giovannoli et al. 2002). Bei der **mandibulo-akralen Dysplasie** (MAD) handelt es sich um laminopathisch verursachte Störungen vor allem der akralen, mandibulären und klavikulären Osteogenese, welche häufig auch mit Symptomen des vorzeitigen Alterns (Progerie; siehe unten) einhergehen (Novelli et al. 2002). 2002 wurden von A. Garg einige Mutationen beschrieben, die einen sehr komplexen Phänotyp hervorrufen und die als Multisystemdystrophie-Syndrome bezeichnet werden. Dies zeigt letztendlich, dass Laminopathien viele Organsysteme in Kombination betreffen können, auch wenn (je nach Mutationsort) ein Merkmal klinisch dominiert und andere subklinisch verborgen bleiben.

Ferner können durch Lamin A-Defekte auch zelluläre Alterungsprozesse beschleunigt werden. Solche Veränderungen sind Kernmerkmale von Progeriesyndromen. Neben dem **Hutchinson-Gilford Progerie-Syndrom** (HGPS; s. 2.3.2) und der **Restriktiven Dermopathie** (RD; s. 2.3.3), die sich im frühen Kindesalter bzw. schon bei Geburt manifestieren tritt das **Werner-Syndrom** (WS, Progeria adulatorum) recht spät auf. Bei dieser Progerieform sind die Kinder in der ersten Lebensdekade unauffällig, erst innerhalb der zweiten Dekade zeigen sich Wachstumsretardierung, vorzeitiger Katarakt, Hautatrophie, Typ II Diabetes, Osteoporose, Arteriosklerose und eine Prädisposition für Neoplasien. Patienten mit WS haben eine durchschnittliche Lebenserwartung von 47 Jahren. Lebensbegrenzend sind hier vor allem kardiovaskuläre Erkrankungen und Neoplasien. Für das WS sind verschiedene Mutationen im *LMNA*-Gen verantwortlich die zu leicht unterschiedlichen Ausprägungen dieser Krankheit führen können. Darüber hinaus sind auch bei der MAD Zeichen der vorzeitigen Alterung bekannt, die ebenfalls durch bestimmte Mutationen ausgelöst werden (s. Abb. 2-4).

Für die vorliegende Arbeit waren von besonderer Bedeutung die zur Progerie führenden Laminopathien Hutchinson-Gilford Progerie-Syndrom (HGPS) und die Restriktive Dermopathie (RD). Sie werden deshalb im Folgenden detaillierter beschrieben.

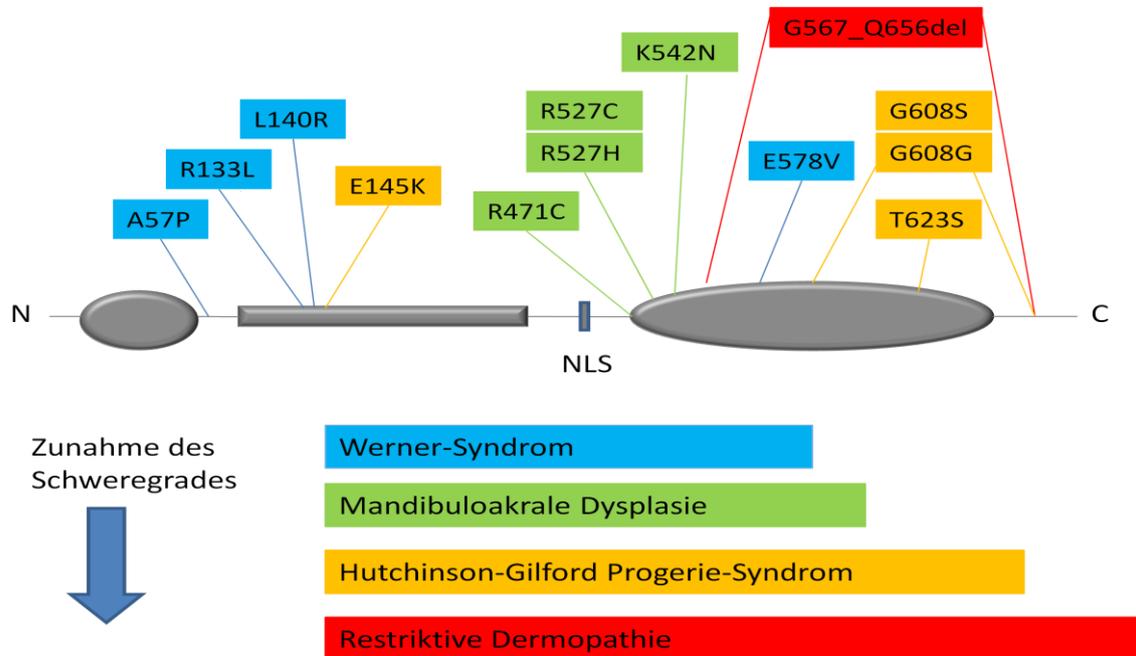


Abb. 2-4 (abgewandelt nach Liu et al. 2008): Mutationen im humanen Prälamina A, die mit einem verstärkten Alterungsprozess einhergehen. Sie können je nach Qualität und Quantität der Progredienz in verschiedene Gruppen eingeteilt werden: Werner-Syndrom (Progeria adultorum) (Chen et al. 2003); Mandibulo-akrale Dysplasie (Novelli et al. 2002); Hutchinson-Gilford Progerie-Syndrom (Eriksson et al. 2003, De Sandre et al. 2003); restriktive Dermopathie (Navarro et al. 2004).

### 2.3.2 Hutchinson - Gilford Progerie - Syndrom (HGPS)



Abb. 2-5: 11-jähriges Mädchen mit HGPS-typischem Erscheinungsbild (Quelle: MSC official website)

Beim HGPS handelt es sich wohl um das bekannteste Progerie-Syndrom. Es wurde erstmals 1886 von Jonathan Hutchinson beschrieben. Im Gegensatz zu dem medialen Bekanntheitsgrad der sogenannten *Greisenkinder* steht die Inzidenz des Krankheitsbildes von ca. 1:8000.000. Zur Zeit sind weltweit etwa 50 Fälle bekannt. Zeichen des vorzeitigen Alterns sind die faltig-pergamentartige Haut, graues Kopfhaar mit Glatzenbildung, osteoporotische und arthrotische Veränderungen. Konträr zeigen

der vorzeitige Wachstumsstillstand mit proportioniertem Zwergwuchs und Akromikrie, die Permanenz des Milchgebisses und die Genitalhypoplasie die eingeschränkte körperliche Entwicklung der Betroffenen. Die durchschnittliche Lebenserwartung eines Erkrankten beträgt ca. 13 Jahre und wird meist durch kardiovaskuläre Erkrankungen begrenzt.

Als Ursache dieses Phänotyps kommen sowohl *de novo* als auch autosomal-dominant vererbte Mutationen wie K542N (Exon 10) in Betracht. Die heterozygote *de novo* Mutation G608G stellt mit ca. 75% die häufigste Ursache des HGPS dar. Diese verursacht eine zusätzliche *Splice*-Stelle im Exon 11, die zu einer Deletion von 150 Nukleotiden und damit zu einer Verkürzung des als Progerin bezeichneten Proteins um 50 Aminosäuren führt (Eriksson et al. 2003, De Sandre-Giovannoli et al. 2003). Zu den HGPS-verursachenden heterozygoten *de novo* Mutationen zählen auch die Substitutionen G608S und T623S (Eriksson et al. 2003, Cao und Hegele 2003), V607V (Moulson et al. 2007), E145K (Eriksson et al. 2003) und S143F (Kirscher et al. 2005). Ferner konnten bei einer 28 Jahre alten Patientin kombinierte heterozygote Mutationen (R471C und R527C) gefunden werden, deren Ursprung (*de novo* vs. hereditär) jedoch aufgrund fehlender elterlicher DNA-Proben unklar blieb (Cao und Hegele 2003). Die homozygote Mutation K542N wurde bei 4 betroffenen, blutsverwandten Personen in Nordindien entdeckt und ist somit ein Beispiel für eine hereditäre Progerie. Die klinischen Übergänge zwischen HGPS und MAD sind fließend, sie werden auch teilweise als eine Krankheitsentität mit unterschiedlicher Ausprägung betrachtet (Plasilova et al. 2004). Bei den G608G/S, V607V und T623S Mutationen kommt es infolge der Deletionen (50 bzw. 35 Aminosäuren) zu Störungen der Prälamina A-Prozessierung (posttranslat. Modifikationen, s. 2.1.2 und Abb. 2-2), mit der Konsequenz, dass eine permanent farnesylierte Prälamina A-Deletionsmutante generiert und in die Kernlamina eingebaut wird. Die unterschiedlichen HGPS-verursachenden Mutationen verursachen eine Dymorphie der Zellkerne (Lobulationen), welche *in vitro* durch Farnesyltransferaseinhibitoren verringert werden kann (Glynn und Glover 2005, Capell et al. 2005).

Der Schweregrad des HGPS korreliert mit der Expressionshöhe von Progerin (Moulson et al. 2007). In klassischen HGPS-Zellen generiert das mutierte *LMNA*-Allel 40% aller *LMNA*-spezifischen Transkripte, während das Wildtyp-Transkript dem Wildtyp-Allel (53%) bzw. dem mutierten Allel (7%) entstammen (Reddel und Weiss 2004). Manche *LMNA*-Mutationen zeichnen sich durch eine höhere Progerin-

Expression aus und verursachen schwerere Form des HGPS (z.B. die V607V-Mutante - Moulson et al. 2007).

Neben der nukleären Dysmorphie assoziieren mit der Progerin-Expression weitere zelluläre/nukleäre Defekte. Hierzu zählen u.a. die Verdickung der Lamina, der periphere Verlust von Heterochromatin und die Dyslokation der Kernporenkomplexe (Eriksson et al. 2003, Goldman et al. 2004). Ergänzend ist diesbezüglich zu erwähnen, dass die Expression von Progerin einen dominant negativen Akkumulationseffekt auf den Zellkern ausübt, der mit zellulärem Alter steigt (Goldman et al. 2004). So zeigen kultivierte HGPS-Fibroblasten hoher Passagenzahl häufig dysmorphe Zellkerne, während Zellen niedriger Passagenzahl hinsichtlich ihrer Zellkerne morphologisch unauffällig erscheinen. Ferner verursacht Progerin eine Störung der Segregation der A- und B-Typ Lamine in ihre Homopolymere (Delbarre et al. 2006) bzw. den Zusammenbruch des für den nukleären Proteintransport wichtigen Ran-Gradienten (Kelley et al. 2011). Ebenso lässt sich eine reduzierte Assoziation zwischen Progerin und SUN-Proteinen des LINC-Komplexes beobachten, die aber nicht mit einer Dyslokation der selbigen einhergeht (Haque et al. 2009). Desweiteren wirkt Progerin auf bestimmte Gene transkriptionsreduzierend (Csoka et al. 2004) und inhibierend auf die zelluläre Proliferation (Goldman et al. 2004). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Progerin-exprimierende HGPS-Zellen eine Phase der Hyperproliferation durchlaufen und einer frühzeitigen Seneszenz unterliegen (Bridger und Kill 2004). Ferner konnten in der Vergangenheit eine abnormale Segregation der Chromosomen, ein verzögerter Eintritt in die Zytokinese sowie Binukleationen nachgewiesen werden (Cao et al. 2007, Dechat et al. 2007, Goldman et al. 2004, Scaffidi und Misteli 2005, Dahl et al. 2006). Auch die Integrität der DNA ist gestört (Liu et al. 2005). Dies zeigte sich durch (a) eine reduzierte Rekrutierung von Proteinen (53BP1 und Rad51), die an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt sind, (b) einer Anhäufung fehlerhafter DNA und (c) einer erhöhten Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Substanzen (vgl. 2.2.2 *DNA-Reparatur und Telomere*).

Progerin wirkt auch schädigend auf adulte mesenchymale Stammzellen (Scaffidi und Misteli 2008). Unter dem Einfluss von Progerin unterliegen diese einer sporadischen und unspezifischen Differenzierung. Progerin trägt somit möglicherweise zu einer Verarmung des Stammzellpools bei, Umstände, die vorzeitiges Altern begünstigen.

### 2.3.3 Restriktive Dermopathie (RD)



Abb. 2-6: Neugeborenes mit RD  
(Navarro et al. 2004)

Bei der RD, die auch als Hyperkeratose-Kontraktur-Syndrom bezeichnet wird, handelt es sich ähnlich dem HGPS um eine sehr seltene Form der Progerie. Die Erkrankung ist charakterisiert durch intrauterine Hyperkeratose mit straffer, unelastischer und durchscheinender Haut. Die Neugeborenen leiden unter kontrakturbedingten Bewegungseinschränkungen und haben eine charakteristische Fazies mit fixierter Gesichtsmorphe und einen o-förmig geöffneten Mund. Ein weiteres Charakteristikum ist die intrauterine Wachstumsretardierung mit pulmonaler Hypoplasie. Die Lebensspanne ist meist auf die ersten Lebenswochen beschränkt (Groß et al. 1999). Erst seit 2004 ist bekannt, dass einige Erkrankungen auf eine dominante *LMNA*-Neumutation zurückzuführen sind, während die Mehrzahl durch heterozygote *ZMPSTE24*-Mutationen verursacht werden. Die *LMNA*-assoziierte Mutation c.1968+1G>A induziert eine 90 Aminosäuren umfassende Deletion innerhalb der Schwanz-Domäne des Prälamins A-Moleküls ( $\Delta$ G567 bis N656 - Navarro et al. 2004). Der deletierte Bereich umfasst das Exon 11 und wie beim Progerin die Prozessierungsstelle der Endoprotease *ZMPSTE24*. Infolge der Deletion entsteht wieder eine permanent farnesylierte Prälamins A-Deletionsmutante. Der zweite Pathomechanismus liegt in einer Mutation des *ZMPSTE24*-Gens. In den von uns untersuchten Fibroblasten (s. 4.4 und 4.6) handelte es sich um eine homozygote c.1085\_1086insT *ZMPSTE24*-Mutation. Im Gegensatz zu der *LMNA*-bedingten RD kommt es hier zur Bildung eines intakten, d.h. nicht trunkierten permanent farnesylierten Prälamins A-Moleküls (Young et al. 2006).

## 2.4 Proteintransport durch den Kernporenkomplex

### 2.4.1 Der Kernporenkomplex

Der Kernporenkomplex (nuclear pore complex - NPC) setzt sich in Vertebraten mit einer molekularen Größe von ca. 125 MDa aus ca. 50 verschiedenen Nukleoporinen (Nups) zusammen (Yang et al. 1998). Viele der Nukleoporine, sie verteilen sich

sowohl symmetrisch als auch asymmetrisch über den NPC, zeichnen sich durch FG (Phenylalanin-Glycin)-reiche Domänen aus, die in der Interaktion mit nukleozytoplasmatischen Transportrezeptoren (Importine - siehe unten) eine wichtige Rolle spielen (Görlich und Kutay 1999, Conti und Izaurralde 2001). Strukturell zeigen NPCs einen symmetrischen Aufbau, bestehend aus einem zytoplasmatischen und einem nukleären Ring zwischen denen sich acht Speichen spannen (*central framework/spoke complex* oder Speichen-Ring-System). Vom zytoplasmatischen Ring projizieren 8 unregelmäßig geformte Filamente in das Zytoplasma, während auf der nukleoplasmatischen Seite der nukleäre Ring über 8 Filamente mit einem distal gelegenen Ring verbunden ist. In ihrer Gesamtheit wird die in den Zellkern hereinragende Struktur als der/die nukleäre Korb/Korbstruktur (*nuclear basket/fish-trap*) bezeichnet. An der engsten Stelle misst das Speichen-Ring-System 45 nm im Durchmesser (Pante und Kann 2002). Der NPC ist über die integralen Membranproteine gp120 (Greber und Gerace 1992) und POM121 (Soderqvist und Hallberg 1994) in der Porenmembran verankert. Die Kernporen repräsentieren Kanäle, die eine Diffusion von kleinen Molekülen wie Ionen oder kleinen Proteinen bzw. einen aktiven Transport von Makromolekülen (Proteine mit einem Molekulargewicht größer 40-60 kDa im Allgemeinen und Nukleinsäuren) in bzw. aus dem Zellkern erlauben.

#### 2.4.2 Die Kernlokalisationssequenz

Nukleärer Proteintransport wurde erstmals an Nukleoplasmin und dem grossen Tumor-Antigen (T-Ag) des Simian Virus 40 (SV40) gezeigt. Beide enthalten eine sogenannte Kernlokalisationssequenz (*nuclear localization sequence/NLS*). Diese ermöglicht den rezeptorvermittelten Transport in den Zellkern und besteht aus einer Anhäufung von Aminosäuren mit basischen Seitengruppen (insbesondere Lysin und Arginin).

Nukleoplasmin stellt ein Beispiel für ein karyophiles Protein dar, dessen Kernimport mittels einer sogenannten zweigeteilten (bipartalen/*bipartite*) NLS (bpNLS) erfolgt. So trägt die bpNLS die Sequenz KRPAATKKAGQAKKKK, wobei die basischen Aminosäuren durch eine variable Region von 10 Aminosäuren getrennt sind (Dingwall et al. 1982, Robbins et al. 1991). Das SV40 T-Ag enthält hingegen eine ungeteilte (*monopartite/monopartiale*) NLS, die aus einem Heptapeptid mit der Sequenz PKKKRKV besteht (Kalderon et al. 1984, Lanford und Butel 1984).

Signalsequenzen dieser Art sind sehr häufig und hochkonserviert und werden als klassische NLSs bezeichnet. Neben solchen NLSs gibt es Proteine, die NLSs komplexerer Struktur aufweisen. Diese NLSs enthalten ebenfalls Anreicherungen positiv geladener Aminosäuren (z.B. die Histonproteine H2A, H2B, H3, H4 - Mosammaparast et al. 2001, 2002, Mülhauser 2001 und die ribosomalen Proteinen rpS7, rpL5, rpL23a - Jäckel et al. 1998) oder wechseln sich wie beim Hefe-Transkriptionsrepressor  $\text{Ma}\alpha 2$  mit polaren Aminosäuren ab (Hall et al. 1990). Die relativ große NLS des Ribonukleoproteins hnRNP A1 (*heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1* - Michael et al. 1995, Pollard et al. 1996) besteht aus einem Abschnitt aus 38 Aminosäuren (M9-Domäne) und ist reich an Glyzin und aromatischen Aminosäuren. Als ein zwischen Zellkern und Zytoplasma *shuttelndes* Protein besitzt hnRNP A1 neben der NLS auch eine Exportsequenz (*nuclear export sequence* - NES). Interessanterweise überlappen sich beide Sequenzen und lassen sich nicht unabhängig von einander isolieren. Ein weiteres *shuttelndes* Protein ist das HIV-1-Rev-Protein (Meyer und Malim 1994, Meyer et al. 1996, Stauber et al. 1995, Wolff et al. 1995). Es ist für den Export von viraler, intronhaltiger, ungespleißter RNA verantwortlich. Kernimport- und Kernexportsequenzen liegen hier nicht überlappend nebeneinander. Manche Proteine besitzen mehrere voneinander getrennte NLSs, die oft nur in ihrer Gesamtheit zu einer vollständigen nukleären Lokalisation ihres Proteins führen (Mukaigawa et al. 1991). In solchen Fällen zeigt sich, dass eine NLS notwendig aber nicht ausreichend ist um eine effiziente Kernlokalisierung des betreffenden Proteins zu gewährleisten.

Hinsichtlich der Rezeptorerkennung gibt es zwei Typen von NLSs. Solche, die von nur einem Rezeptortyp erkannt werden, während andere sich promiskuitiv verhalten und von mehreren Rezeptoren gebunden werden (s. 2.4.3).

### **2.4.3 Importine und Exportine**

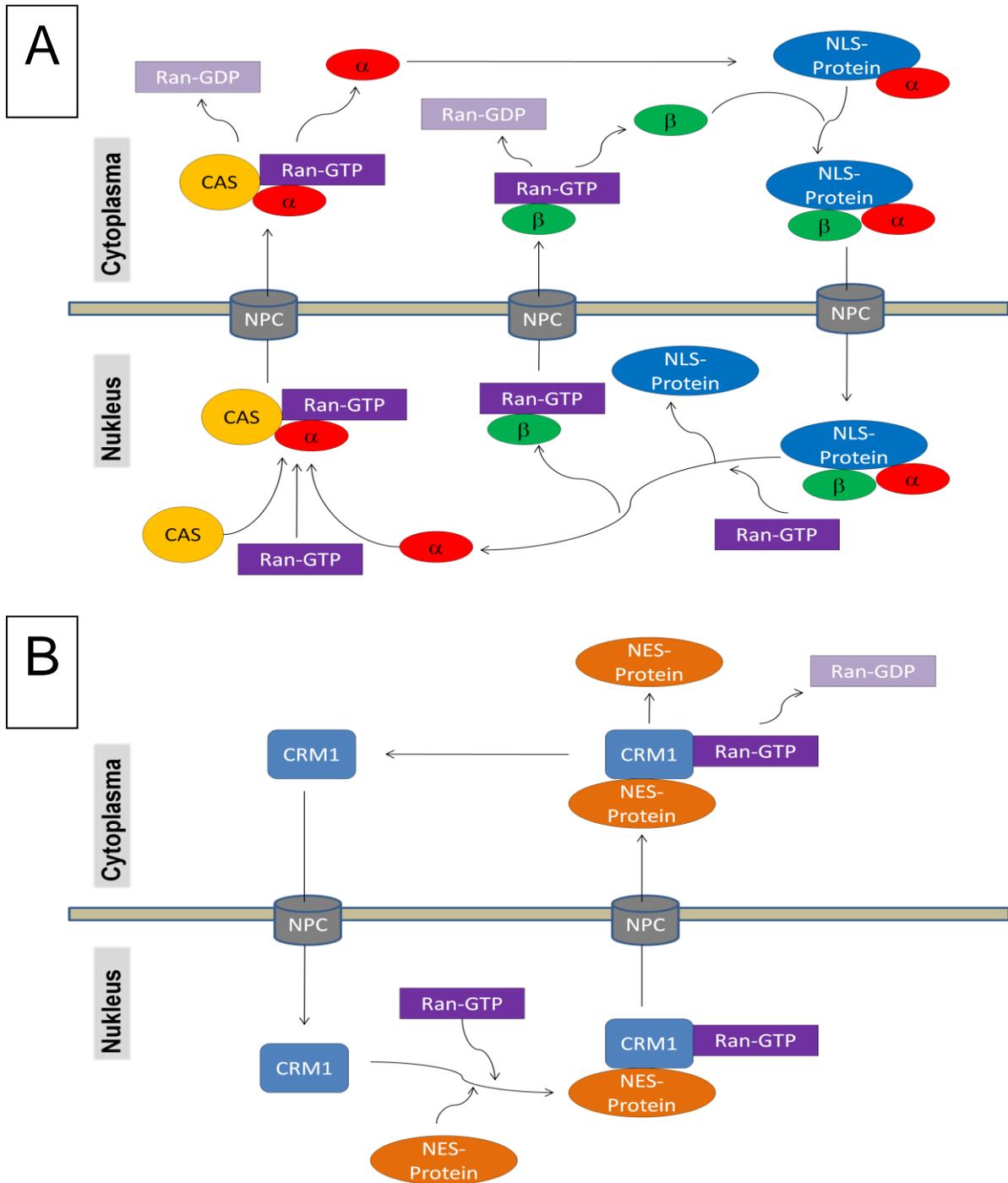
Der aktive Transport der meisten karyophilen Proteine, ribosomalen Untereinheiten und RNA wird durch eine grosse Familie von Transportfaktoren ermöglicht, die kollektiv als Karyopherine bezeichnet werden (Radu et al. 1995). Die meisten Karyopherine ermöglichen entweder den Import oder den Export und werden daher als Importine (vgl. Abb. 2-7: A) bzw. Exportine (vgl. Abb. 2-7: B) bezeichnet (Nakielny und Dreyfuss 1999, Görlich und Kutay 1999). Die meisten Importine und Exportine gehören zur Familie der Importin  $\beta$ -Proteine, von denen in höheren Eukaryonten

insgesamt 21 existieren (Görlich und Kutay 1999). Dagegen umfasst die Familie der Importin  $\alpha$ -Proteine in humanen Zellen mindestens 6 Mitglieder, die sich auf 3 phylogenetische Gruppen ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$ ) aufteilen (Goldfarb et al. 2004). Beim klassischen Kernimport erfolgt die Bindung eines klassischen NLS-tragenden Proteins an die Importin  $\beta$ -Proteine indirekt über das Adaptermolekül Importin $\alpha$ . Ansonsten gelangen karyophile Proteine unabhängig von Mitgliedern der Importin  $\alpha$ -Familie direkt durch die Bindung ihrer NLS an Importin  $\beta$  in den Zellkern (Kotera et al. 2005, Nitahara-Kasahara et al. 2007). Andererseits gibt es Proteine, die komplett unabhängig von Importinen in den Zellkern translozieren können, da sie direkt mit Nukleoporinen des NPCs interagieren (Fagotto et al. 1998, Matsubayashi et al. 2001).

Zu den Exportrezeptoren zählt das Exportin CRM1/Exportin-1, welches Proteine mit leucinreichen, hydrophoben NESs erkennt und diese aus dem Zellkern heraus transportiert (Hood und Silver 1999). Hydrophobe NESs wurden in zahlreichen Transkriptionsfaktoren und Regulatoren des Zellzyklus, im HIV-1-Rev-Protein und im Proteinkinase A-Inhibitor, bei dem es erstmals beschrieben wurde, gefunden (Fischer et al. 1995). Neben Crm1 ist das Exportin CAS (*cellular apoptosis susceptibility*) zu nennen. Es ist für den Export von Importin  $\alpha$  zuständig (Kutay et al. 1997) und damit essentiell für die Aufrechterhaltung Importin  $\alpha$ -abhängiger Transportprozesse, sowie Exportin-t, das für den Transport von t-RNA ins Zytoplasma zuständig ist (Kutay et al. 1998, Arts et al. 1998). Neben der strikten Trennung zwischen den als Importin oder Exportin fungierenden Karyopherinen gibt es auch den Fall, dass ein Karyopherin sowohl als Importin als auch Exportin aktiv ist (Importin 13 - Mingot et al. 2001). Neben dem Kerntransport von Proteinen sollte auch der Kernexport von snRNA (*small nuclear RNA*) und rRNA (*ribosomaler RNA*) durch CRM1, tRNA (*transfer RNA*) durch Exportin-t und miRNA (*micro RNA*) durch Exportin 5 erwähnt werden (Köhler und Hurt 2007). Der mRNA-Export dagegen erfolgt Karyopherin-unabhängig durch den TAP/NXF1-p15/NXT1 Komplex (Köhler und Hurt 2007). Ebenfalls Karyopherin-unabhängig erfolgt der Kernimport von RanGDP durch NTF2 (*nuclear transport factor2* - Smith et al. 1998, Ribbeck et al. 1998).

#### 2.4.4 Das RanGTPase-System

Die Energie und Direktionalität des nukleozytoplasmatischen Proteintransportes wird durch das RanGTPase-System gewährleistet (vgl. Abb. 2-7). Der Aktivitätszustand des Systems wird neben den Importinen zusätzlich von regulatorischen/akzessorischen Proteinen wie beispielsweise RCC1 (*regulator of chromosome condensation 1*, ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor - Bischoff und Ponstingl 1991), RanGAP (*RanGTPase activating protein* - Melchior und Gerace 1998, Moore 1999), NTF2 (Paschal und Gerace 1995) sowie dem RanBP1 (*Ran binding protein1* - Bischoff und Görlich 1997) beeinflusst. Entscheidend für die Direktionalität ist ein RanGTP-Gradient über der Zellkernmembran, der durch die asymmetrische Verteilung genannter regulatorischer Faktoren generiert wird. Bei RanGAP, RanBP1 und RanBP2 handelt es sich vorwiegend um zytoplasmatische Proteine, welche für eine erhöhte RanGDP-Konzentration im Zytoplasma verantwortlich sind (Melchior und Gerace 1998, Moore 1999). Hingegen ist RCC1 nukleär lokalisiert und fördert die Bildung von RanGTP im Zellkern (Bischoff und Ponstingl 1991). RanGTP bewirkt durch die Bindung an Importin  $\beta$  eine Konformationsänderung und damit die nukleäre Dissoziation des Importkomplexes bestehend aus Importin  $\alpha$  (falls als Adaptorprotein vorhanden), Importin  $\beta$  und Substrat (Lee et al. 2005). Die Konformationsänderung durch RanGTP hat noch einen weiteren wichtigen Effekt, es löst die Bindung von Importin  $\beta$  an NUP153, ein Protein des NPCs (Shah et al. 1998). Anschließend kommt es zur Rezirkulation der Importine zurück in das Zytoplasma. Importin  $\beta$  bleibt an RanGTP gebunden, um die erneute Bindung an Importin  $\alpha$  zu verhindern und wird schließlich auch in dieser gebundenen Form exportiert (Moore 1999). Importin  $\alpha$  gelangt über das Exportin CAS zurück auf die zytoplasmatische Seite (Kutay et al. 1997). Im Gegensatz zu Importrezeptoren binden Exportrezeptoren (s.o.) karyophile Proteine nur im Komplex mit RanGTP, während die Hydrolyse zu RanGDP im Zytoplasma die Dissoziation dieses Komplexes bewirkt (Moore 1999). Insgesamt gewährleistet die erhöhte zytoplasmatische Konzentration von RanGDP die bevorzugte Bildung von Importkomplexen, während eine höhere nukleäre Konzentration von RanGTP die Bildung von Exportkomplexen fördert und gleichzeitig die Dissoziation der Importkomplexe bewirkt.



**Abb. 2-7:A** (Importzyklus eines NLS-Proteins): Importin  $\alpha$  (rot) bindet ein NLS-Protein und formiert einen Komplex. Dieser bindet an Importin  $\beta$  (grün) und wird schließlich durch den NPC in den Kern transloziert. Im Nukleoplasma wird das NLS-Protein durch RanGTP (violett) dissoziiert. Importin  $\beta$  und RanGTP rezirkulieren über den NPC ins Zytoplasma, wo RanGTP zu RanGDP hydrolysiert wird. Importin  $\alpha$  rezirkuliert mit Hilfe des Exportins CAS (gelb), wozu eine erneute Komplexbildung mit RanGTP notwendig ist.

**B** (Exportzyklus eines NES-Proteins): Kargos mit einer NES binden an CRM1 und RanGTP bevor sie aus dem Zellkern transportiert werden. Im Zytoplasma bedingt die Hydrolyse von RanGTP die Dissoziation des Komplexes. CRM1 rezirkuliert in den Zellkern, wo es sich erneut mit einem NES-Protein und RanGTP assoziiert, um den Prozess von neuem zu durchlaufen.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Materialien**

##### **3.1.1 Geräte**

Fluoreszenz-Mikroskop Axioskop 2 Mot Plus	Carl Zeiss, Hamburg
Fluoreszenzgeber XBO 75W HBO 100W	Sutter Instruments Co., USA
Konfokales Laserscanningmikroskop Zeiss LSM 510	Carl Zeiss, Hamburg
Konfokales Laserscanningmikroskop Leica SP5	Leica, Wetzlar
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Photometer LKB Biochrom Ultraspec II	Pharmacia Biosystems, Freiburg
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, Dreieich
Schüttler Unimax 2010	Heidolph, Schwabach
Tiefkühlschrank UF 85-300 S	Colora, Frankfurt
Tischzentrifuge Biofuge A (Rotor 1378)	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Typ 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Typ 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Digitalkamera Powershot A75	Canon, Tokio
Autoklav	Varioklav, Oberschleißheim
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Feinwaage AB 104	METTLER TOLDEO GmbH, Gießen
Elektrophoresekammern für Polyacrylamid-Minigele	Noras, Würzburg
Gelkammern	GIBCO BRL, Keutz
Thermoblock	Liebisch, Bielefeld
Heißwasserbad	Haake Messtechnik, Karlsruhe
Vortex-Gerät	Bender & Hobein AG, Zürich

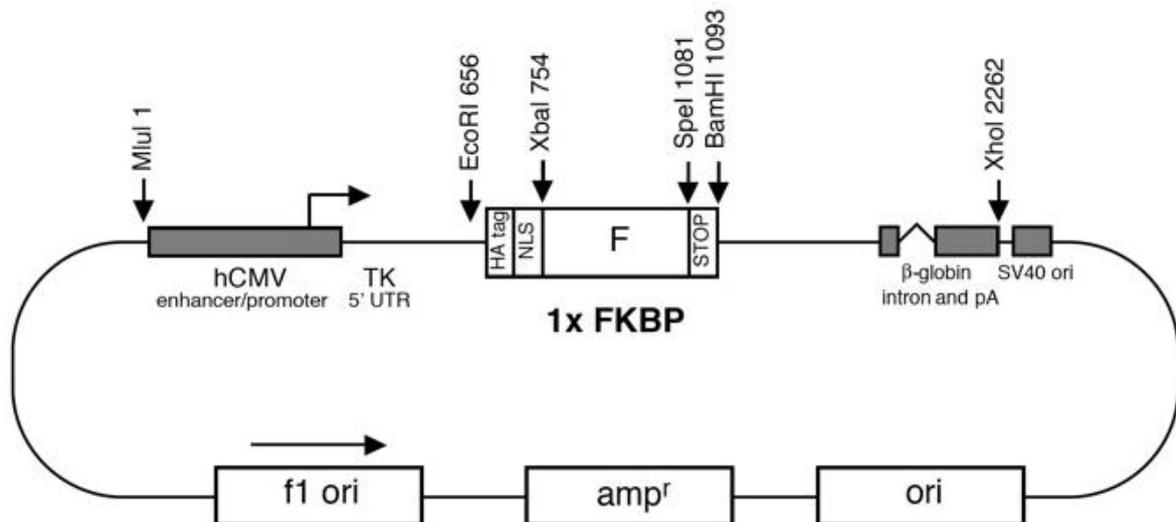
##### **3.1.2 Oligonukleotide**

Oligonukleotide wurden bei *MWGBiotech* synthetisiert und vor Einsatz (für DNA-Amplifikationen und DNA-Sequenzierungen) in deionisiertem H<sub>2</sub>O entsprechend der Herstellerangaben solubilisiert. Die Kennzeichnung der eingesetzten Oligonukleotid-Kombinationen im Ergebnisteil erfolgt durch mit „\*“ markierten Nummern entsprechend folgender Tabelle:

	Name	Oligonukleotid (5' – 3' – Richtung)
1*	GFP-FKBP-InFusion-FW	GAGAAAGGTGTCTAGAGCCAGCAAAGGAGAAGAAC
2*	GFP-FKBP-InFusion-RV	CCTGCACTCCTCTAGATTTGTAGAGCTCATCCATGCC
3*	DsRed-FRB-InFusion-FW	CACCATGGCTTCTAGGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACT CTTGATGA CAACACCGAGGACGTCATCAAGG
4*	DsRed-FRB-InFusion-RV	GCCAGAGGATTCTAGGTCTAGATCCGGTGGATCCCGG
5*	InFusion-LaA-FW	GGAATCAGATCTCGAGAGACCCCGTCCCAGCGG
6*	InFusion-LaA-RV	GAAGCTTGAGCTCGAGATTACATGATGCTGCAGTTCTGG
7*	DsRedMono-FW	ACCGTGGTGGAGCAGTACG
8*	LaA-DsRedEpi 945	GAAGCAGCTGGCAGCCAAGG
9*	pC <sub>4</sub> EN-F1E-RV	CAAGCATCCCGGTGTAGTGC
10*	DsRedmKan-FRB-FW	GAAGCTTGAGCTCGATCAGTAGCCATACTTGTTCAT
11*	DsRedmKan-FRB-RV	GCCAGAGGATTCTAGAGTAGCCATACTTGTTCATTAGG

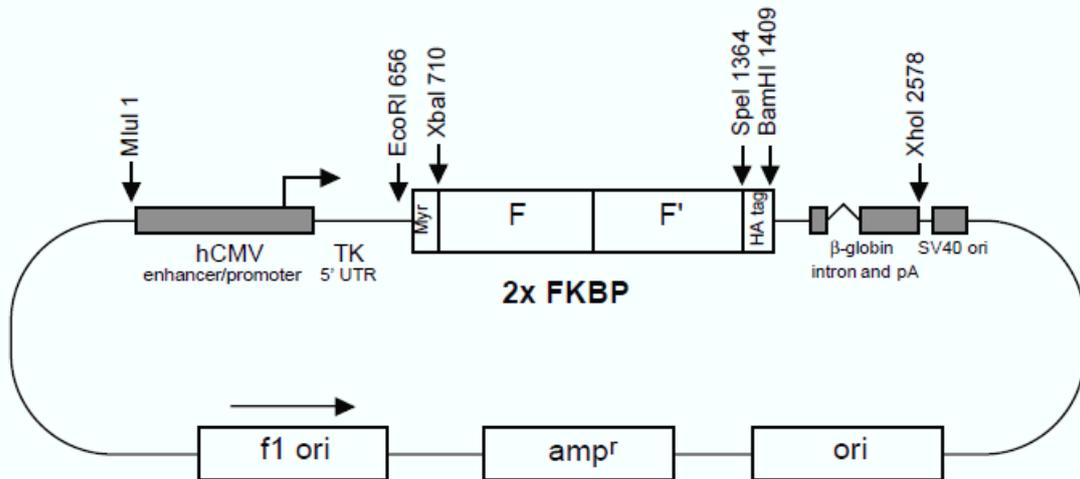
### 3.1.3 Vektoren

#### 3.1.3.1 pC<sub>4</sub>EN – F1E (ARIAD Pharmaceuticals)



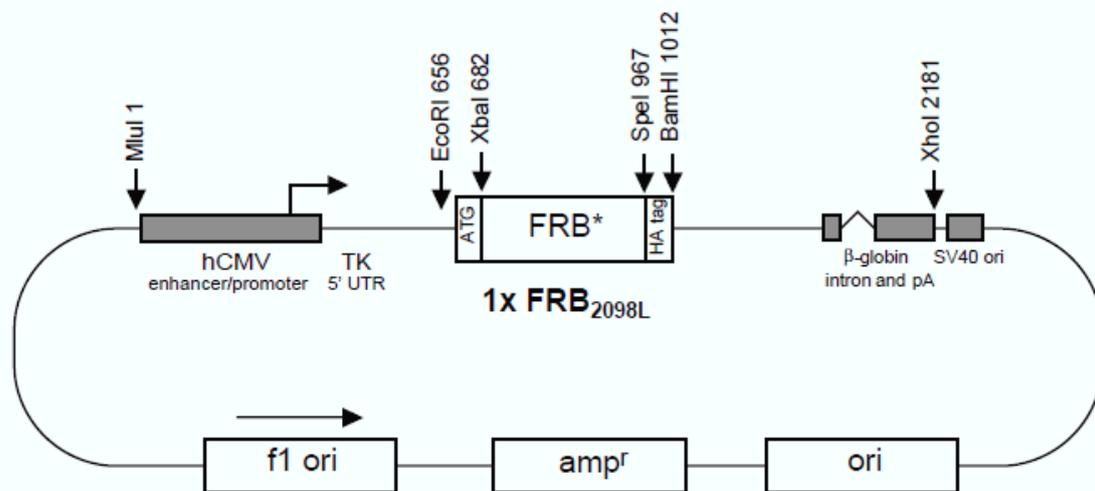
**Abb. 3-1:** Die Plasmidkarte zeigt den Vektor pC<sub>4</sub>EN-F1E. Er dient als Ausgangsvektor zur Expression eines Multidomänenproteins. So kodiert die cDNA für ein HA (Hämagglutinin)-Tag, eine NLS (nukleäre Lokalisationssequenz) und eine Heterodimerisierungsdomäne (FKBP-Domäne - im Folgendem nur mit FKBP abgekürzt). Die cDNA-Expression erfolgt unter der Kontrolle des humanen CMV (Cytomegalievirus)-Promotors. Die NLS entspricht der NLS des *large T-Antigens* des Simian Virus 40. Die FKBP-Domäne entstammt der 104 AS langen Rapamycin-bindenden Domäne des humanen Proteins FKBP12 (**FK605 binding protein12**). 5'-terminal der NLS- und FKBP-cDNAs befindet sich eine *Xba I* Schnittstelle. Der FKBP-cDNA folgt 3'-terminal ein STOP-Codon, welches von *Spe I* und *BamH I* Schnittstellen flankiert wird. Die Schnittstellen *Xba I*, *Spe I* und *BamH I* stehen für cDNA-Insertionen zur Verfügung.

### 3.1.3.2 pC<sub>4</sub>EM – F2E (ARIAD Pharmaceuticals)



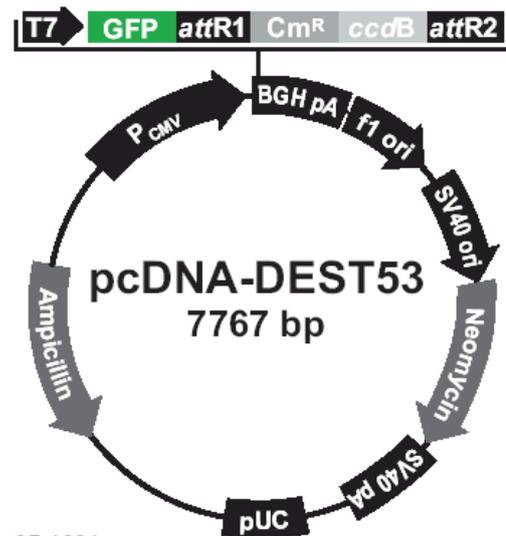
**Abb.3-2:** Die Plasmidkarte zeigt den Vektor pC<sub>4</sub>EM-F2E. Die cDNA kodiert für ein Myristoylierungssignal (Myr) und HA-Tag sowie für zwei hintereinander geschaltete Heterodimerisierungsdomänen (2x FKBP). Der Vektor pC<sub>4</sub>EM-F2E diente ausschließlich der Isolierung der 2x FKBP-cDNA.

### 3.1.3.3 pC<sub>4</sub> – R<sub>H</sub>E (ARIAD Pharmaceuticals)



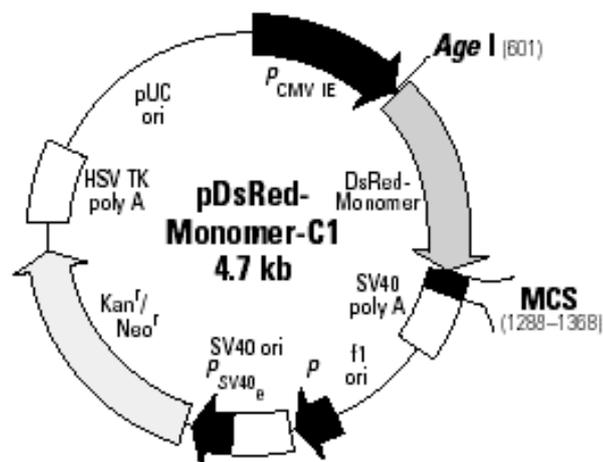
**Abb.3-3:** Die Plasmidkarte zeigt den Vektor pC<sub>4</sub>R-R<sub>H</sub>E. Der Vektor eignet sich für die Expression von Fusionsproteinen, die über die Heterodimerisierungsdomäne FRB\* verfügen. FRB\* ist eine von FRB (entspricht einer 93 AS langen Rapamycin bindenden Sequenz des humanen Proteins FRAP (**F**KBP-12-**r**apamycin**a**ssociated **p**rotein)) punktmutierte Version, die eine verbesserte Spezifität gegenüber dem Rapamycin-Analogen AP21967 aufweist (siehe 3.2.1). Wie alle ARIAD-Vektoren enthält auch hier das Fusionsprotein einen carboxyterminalen HA-Tag. Für cDNA-Insertionen stehen Xba I- und Spe I-spezifische Schnittstellen zur Verfügung.

### 3.1.3.4 pcDNA-DEST53 (*Invitrogen*)



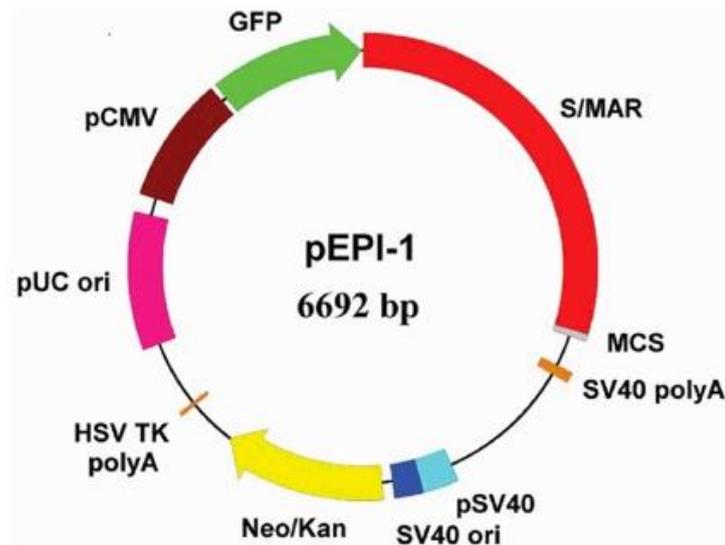
**Abb.3-4:** Der von *Invitrogen* als *Gateway Destination Vector* vertriebene Vektor pcDNA-DEST53 (Abk.: pDest53) besitzt eine für *cycle 3* GFP kodierende cDNA (Cramer et al. 1996). Es handelt sich dabei um ein, gegenüber dem natürlichen GFP aus *Aequorea victoria*, 45fach stärker grün fluoreszierendes Protein. Der Vektor wurde als Expressionsvektor für trunkierte Prälamins A-Mutanten (s. 4.7), sowie als Matrize zur Amplifikation der GFP-cDNA verwendet (s.4.1.2.1 und Klonierungsschemata/Anhang).

### 3.1.3.5 pDsRed-Monomer-C1 (*Clontech*)



**Abb.3-5:** Die Plasmidkarte zeigt den Vektor pDsRed Monomer-C1. Er enthält von Base 601-1288 die für das rot fluoreszierende Protein DsRed-Monomer kodierende cDNA. Es handelt sich um ein an 45 Stellen verändertes monomeres Protein des eigentlich als Tetramer vorliegenden DsRed aus *Discosoma species*. Die für DsRed kodierende cDNA wird von einer singulären *Age I*-Schnittstelle und einer *multiple cloning site* (MCS) flankiert. Der Vektor wurde für die Herstellung der pDsRed- (s. 4.1.1.1) und pEPI-DsRed- (s. 4.1.1.2) Expressionsvektoren verwendet.

### 3.1.3.6 pEpi – 1 (zur Verfügung gestellt von Prof. H J Lipps – Witten/Herdecke)



**Abb.3-6:** Die Plasmidkarte zeigt den Expressionsvektor pEpi-1. Der Vektor leitet sich von dem kommerziell erhältlichen Plasmid pGFP-C1 (*Invitrogen*) durch die Insertion einer sog. S/MAR (*scaffold/matrix attached region*) Domäne ab. Die S/MAR-Domäne stammt aus der 5'-Region des humanen Interferon- $\beta$ -Gen-Elements und erlaubt die stabile episomale Replikation des Vektors durch dessen Assoziierung mit der Kernmatrix (Piechaczek et al. 1998, Jenke et al. 2002). Die *multiple cloning site* (MCS) des Ausgangsvektors wurde durch die Klonierung der S/MAR-cDNA in zwei Teile geteilt, so dass beidseits die Möglichkeit zur Insertion einer cDNA besteht. Der Vektor wurde für die Herstellung der pEPI-DsRed-Expressionsvektoren verwendet (s. 4.1.1.2).

### 3.1.3.7 Zur Verfügung gestellte Expressionsplasmide

Einige Vektoren wurden zur Verfügung gestellt und kamen unverändert zum Einsatz:

- I) pRev-GFP (Prof. E. Henderson)
- II) pGFP-NLS (Priv.-Doz. Dr. S. Hübner)
- III) pdGFP-M9 (Prof. R. Kehlenbach)
- IV) pDest53- $\Delta$ HR-PräLaA (Priv.-Doz. Dr. S. Hübner)
- V) pDest53- $\Delta$ HR-PräLaA R482L (Priv.-Doz. Dr. S. Hübner)
- VI) pDest53- $\Delta$ HR-PräLaA R527P (Priv.-Doz. Dr. S. Hübner)
- VII) pNLS-CFP-FKBP<sub>3x</sub> (Priv.-Doz. Dr. S. Hübner)

### 3.1.4 Chemikalien

Hersteller	Chemikalie
ARIAD	AP21967 (Rapamycin – Analogon)
SigmaAldrich	Ethidiumbromid, Agarose, Glycerol, Natriumacetat, Paraformaldehyd, N – Propylgallat, Triton X – 100, Magermilchpulver, Acrylamid, Natriumdodecylsulfat, Ammoniumpersulfat, Tetramethylethyldiamin, Amidoschwarz, Methanol, Eisessig, Ameisensäure, Trichloressigsäure, Essigsäure, Tris, Natrium EDTA, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumdihydrogenphosphat, Tween20, Bromphenolblau, Glycerin, Mercaptoethanol, Mevinolin (Lovastatin), Leptomycin B, Cycloheximid, DAPI, Immersionsöl, Antibiotika (Kanamycin, Ampicillin, Gentamycin, Penicillin, Trypsin, fetales Kälberserum, DMEM (+/- Phenolrot)

### 3.1.5 Molekularbiologische Materialien

Chemikalie / Kit	Hersteller
Fermentas Five – Buffer – System ( <i>Xba I</i> , <i>Spe I</i> , <i>Age I</i> , <i>Sma I</i> , <i>Xho I</i> , <i>EcoR V</i> )	Fermentas
6x MassRuler™ DNA Loading Dye	Fermentas
Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder/Lambda DNA/Eco91I Marker (702-8453 bp)	Fermentas
T4 – Ligase	Fermentas
Nitrocellulose	Schleicher und Schüll
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
Anti – HA	Roche
goat– anti– rabbit POX Zweitantikörper	Dianova
In – Fusion™ Dry – Down PCR Cloning Kit	Clontech Laboratories
Wizard Plus SV Minipreps	Promega
Wizard SV Gel and PCR Clean– Up	Promega
iProof High – Fidelity DNA Polymerase	Bio-Rad Laboratories
Effectene Transfection Reagent	Quiagen
Lipofectamine 2000 Transfection Reagent	Invitrogen
Metafectene	Biontex
TransIT – LT1 Transfection Reagent	Mirus
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare

### 3.1.6 Bakterienstämme

DH5 alpha™ kompetente Zellen	Invitrogen
DH10B™ kompetente Zellen	Invitrogen

### 3.1.7 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
TAE	2 M Tris; 0,05 M NaEDTA; 1 M Essigsäure; pH 8,5
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 12 mM Phosphat; pH 7,2
PBS Tween	PBS + 0,05% Tween 20
Laemmli Sample Puffer	Bromphenolblau 100 mg; Glycerin 3,5 ml; SDS 1,5 g; 1 M Tris 3,2 ml; Mercaptoethanol 2,5 ml; pH 6,8

### 3.1.8 Zellen und Materialien für die Zellkultur

Neben HeLa-Zellen kamen primäre humane Hautfibroblasten zum Einsatz (wurden freundlicherweise von Prof. M Wehnert, Greifswald zur Verfügung gestellt). Diese entstammten von zwei gesunden Spendern (Wildtyp) sowie von einer Patientin mit dem Krankheitsbild einer Restriktiven Dermopathie (RD). Pathogenetisch handelt es sich um eine letale Genodermatose, die durch eine homozygote c.1085\_1086insA Mutation im ZMPSTE24-Gen verursacht wird. In allen Studien hatten die RD-Fibroblasten eine niedrigere Passagezahl als die Kontrollfibroblasten.

Als Medium diente DMEM. Phenolrot freies DMEM wurde bei Untersuchungen an lebenden Zellen verwendet (s. 4.4). Beide Medien wurden vor Gebrauch mit fötalem Kälberserum (10% für HeLa-Zellen, 20% für humane Hautfibroblasten) und den Antibiotika Penicillin und Streptogramin (50 Einheiten pro ml) versetzt.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Grundlagen der induzierbaren Heterodimerisation

Zur Darstellung nukleär-zytoplasmatischer Transportvorgänge wurde, basierend auf dem ARGENT™ *Regulated Heterodimerization Kit 2.0* von ARIAD, ein System fluoreszierender Heterodimere generiert, mittels dem ein induzierbarer Proteinexport möglich war.

Die induzierbare Assoziation der Heterodimere beruhte auf der unabhängigen Bindung des humanen Proteins FKBP12 (**FK605 binding protein12**) und FRAP/mTOR (**FKBP-12-rapamycin associated protein/mammalian Target of Rapamycin**, ein Mitglied der Phosphoinositidkinasen) an Rapamycin, einem Zellzyklus-Inhibitor. Das Kit bietet hierfür Vektoren zur Expression der Rapamycin-bindenden Domänen FKBP (aus FKBP12) und FRB\* (aus FRAP, s.u.) (s. 3.1.3.1-3). Als Heterodimerisierer diente ein Rapamycin-Analogon, AP21967, welches im Gegensatz zu Rapamycin keinen Einfluß auf den Zellzyklus ausübt, da es nicht an endogenes FRAP bindet. Die Bindung von FRAP an Rapamycin erfolgt durch die sogenannte FRB\*-Domäne, welche 93 AS umfasst. In dem verwendeten Expressionsvektor pC<sub>4</sub>-R<sub>H</sub>E (s. 3.1.3.2) ist die FRB\*-Domäne punktmutiert (T2098L, FRB\*). Hierdurch wird die selektive Bindung an AP21967 gewährleistet.

Die Klonierungen (s. 4.1.2.1-3) der für die Heterodimerisierung geeigneten Expressionsvektoren erfolgten ausgehend von den ARIAD-Vektoren pC<sub>4</sub>EN-F1E (s. 3.1.3.1) und pC<sub>4</sub>R-R<sub>H</sub>E (s. 3.1.3.2).

### 3.2.2 Polymerase - Ketten - Reaktion (PCR)

Alle PCR-Amplifikationen wurden mit dem *iProof High-Fidelity DNA Polymerase-Kit* durchgeführt. Dieses enthält die HF-Polymerase, einen für die Polymerase optimierten Puffer, einen 10 mM dNTP-Mix, sowie 50 mM MgCl<sub>2</sub> als Stabilisator. Alle Reaktionen fanden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl statt. Als Matrize wurden jeweils ca. 100 ng Vektor-DNA zugesetzt. Ferner lagen jeweils 30 pmol von beiden (FW/RV) Primern im Reaktionsansatz vor. Die PCR wurde in einem Thermocycler (s. 3.1.1) mit folgender Programmierung durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	98°C	30s	
Denaturierung:	98°C	} 10s	30 Zyklen
Primer – <i>Annealing</i> :	50°C		
Elongation:	72°C		
Abschließende Elongation:	72°C	7 Minuten	
	4°C	unbegrenzt bis zur Weiterverwendung	

Anschließend wurden der Reaktionsansatz mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese analysiert (s. 3.2.10).

### 3.2.3 *In-Fusion*<sup>TM</sup>-Reaktion

Mit Hilfe des *In-Fusion*<sup>TM</sup> *Dry-Down PCR Cloning Kits* konnten die durch PCR amplifizierte DNA-Fragmente direkt in zuvor linearisierte Vektoren inseriert werden. Die zugrunde liegende Reaktion basiert auf einem Enzym, das eine Homologie von 15 Bp sowohl an den Enden des linearisierten Vektors als auch an denen des Amplifikats erkennt und dadurch Vektor und Amplifikat infolge einer Rekombination miteinander verbindet. Aus diesem Grund wurden für die Amplifikation Primer mit einem Überhang von 15 Bp (homolog den Vektorenden) benötigt. Die resultierenden Amplifikate wurden zusammen mit den linearisierten Vektoren gemäß Herstellerprotokoll im Mengenverhältnis von 2 (Insert): 1 (Vektor) in einem Reaktionsansatz vermischt. Die weiteren Inkubationsschritte erfolgten ebenfalls gemäß den Empfehlungen der Firma *Clontech*.

### 3.2.4 T4 - Ligase - Reaktion

Bei der Konstruktion einiger Plasmide (pEPI-DsRed-präLaA/Δ50/Δ90, s. 4.1.1.2; pNLS-GFP-FKBP<sub>3x</sub>, s. 4.1.2.2) wurde neben der *In-Fusion*<sup>TM</sup>-Reaktion auch die klassische T4-Ligase-Reaktion verwendet. Nach Gewinnung der cDNA durch Restriktion wurde diese im Verhältnis von 3:1 mit dem entsprechend vorbereiteten

Vektor (100 ng; pEPI-1, pNLS-GFP-FKBP<sub>1x</sub>) vermischt und gemäß Herstellerprotokoll mit 1 µl T4-Ligase (3 Units/µl) bei 16°C im Wasserbad über Nacht inkubiert (15 µl Gesamtvolumen). Am nächsten Morgen wurden mit 3 µl des Reaktionsansatzes direkt kompetente Bakterien transformiert (s. 3.2.7).

### 3.2.5 Schneiden von DNA (Restriktion)

Zum *Fragmentieren/Linearisieren* von Expressionsvektoren wurde das *Fermentas-Five-Buffer-System* mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (s. 3.1.5) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die erfolgreiche Restriktion wurde mittels analytischer Agarosegelelektrophorese überprüft. Zur Größenbestimmung anfallender DNA-Fragmente wurde je nach erwarteter Fragmentgröße der Größenmarker *DNA-Ladder FastRuler™ HighRange* bzw. *LowRange* von *Fermentas* verwendet. Als Referenz wurde der unbehandelte Vektor (in *supercoiled* Form) eingesetzt.

### 3.2.6 DNA - Sequenzierung

Alle neu klonierten Vektoren wurden mittels entsprechender Primer bei *MWG Biotech (Value Read Service in Tubes)* durch die *Sanger-Sequenzierung* verifiziert. Hierzu wurde 1 µg DNA getrocknet und entsprechend versendet. Dabei wurden sowohl selbst *designte* Primer, als auch *MWG-Standardprimer* verwendet.

### 3.2.7 Transformation

*DHT10B* bzw. *DH5-alpha* kompetente Bakterien wurden nach einem Hitzeschockprotokoll (basierend auf Sambrook et al. 1974) transformiert. Plasmid DNA (~100ng) und 30 µl kompetente Zellen wurden zusammengegeben und für 30 min auf Eis inkubiert, gefolgt von einem Hitzeschock bei 42°C für 90 sek. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis wurde 1 ml LB-Medium dazugegeben und der Transformationsansatz für eine weitere 1 h bei 37°C inkubiert. Daran anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (1 min bei 3000 rpm), der Überstand bis auf 100 µl verworfen, das Bakteriensediment in den verbliebenen 100 µl resuspendiert und auf eine Kulturplatte (mit entsprechendem Antibiotikum – siehe Tabelle unten) ausplattiert.

Nach 24 h wurden gewachsene Kolonien durch eine Übernachtkultur vermehrt und daran anschließend Plasmid-DNA für analytische Zwecke isoliert.

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitslösung
Ampicilin	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml

### 3.2.8 Anlegen von bakteriellen Langzeitkulturen (Glycerolstocks)

2 ml einer bakteriellen Übernachtskultur wurden 1 Minute bei 10.000 U zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 1 ml einer Mischung aus 20% Glycerol und 80% LB-Medium resuspendiert. Der so gewonnene Glycerolstock wurde anschließend bei -80°C tiefgefroren.

### 3.2.9 DNA - Aufreinigung

#### 3.2.9.1 DNA - Präparation aus bakteriellen Übernachtskulturen

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe bakterieller Übernachtskulturen vermehrt und am nächsten Morgen durch Affinitätschromatographie (*Wizard Plus SV Miniprep-Kits*, Promega gemäß Herstellerprotokoll) isoliert. Die bakteriellen Übernachtskulturen wurden durch das Übertragen von Plasmid-enthaltenden Bakterien aus einem Glycerolstock oder einer Kulturplatte mit Hilfe einer sterilen Impföse in 5 ml LB-Medium hergestellt. Das entsprechende Antibiotikum wurde zugesetzt und die Kultur 16 h schüttelnd/drehend bei 37°C inkubiert.

#### 3.2.9.2 DNA - Präparation aus Agarosegelen

Mit Restriktionsenzymen behandelte Vektoren und PCR-Amplifikate wurden nach Gelelektrophorese und Ethidiumbromidanfärbung unter UV-Bestrahlung aus dem Gel isoliert und mit dem *Wizard SV Gel* und *PCR Clean-Up Kit* von Promega aufgereinigt.

#### 3.2.9.3 DNA - Fällung mit Natriumacetat

Pufferinkompatibilitäten im *Fermentas-Five-Buffer-System* machten in Folgeschritten der DNA-Verarbeitung (z.B. Mehrfachrestriktionen) den Zwischenschritt der Natriumacetat-Fällung notwendig. Hierzu wurde zum Restriktionsansatz 1/9 des Volumens an Natriumacetat (3 M, pH 5,2) zugegeben und zusammen mit dem 2,5 fachen des Volumens an Ethanol p.a. dieser über Nacht bei -20°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Ansatz bei 13.000 g 30 Minuten zentrifugiert und das

dabei entstehende Sediment zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Sediment in deionisiertem H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **3.2.10 Gelelektrophorese**

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA wurden Agarosegele unterschiedlicher Dichte und entsprechendem Größenmarker verwendet. Für PCR-Fragmente und kleinere Restriktionsprodukte (< 500 Bp) wurden 1,5%ige Agarosegele verwendet. Als Größenmarker diente die Gene Ruler™ 100 bp DNA-Ladder (0,5 µg/µl). Für Plasmid-DNA sowie restringierte oder rekombinierte Vektoren wurden 0,8%ige Agarosegele verwendet. Als Größenmarker diente hier der Lambda DNA/Eco911 Marker (702-8453 bp) (0,5 µg/µl). DNA-Lösungen wurden vor dem Auftrag mit dem 6X MassRuler™ DNA Loading Dye versetzt. Die Trennung erfolgte in einer Elektrophoresekammer mit TAE (Zusammensetzung s. 3.1.7) als Laufpuffer bei 80 V. Anschließend wurde das Gel für 10 Minuten in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml H<sub>2</sub>O) inkubiert und anschließend unter UV-Licht fotografiert.

### **3.2.11 Photometrische DNA - Messung**

Mit einem Photometer wurde der Nukleinsäuregehalt in wässrigen Lösungen bei 260 nm, sowie der Proteingehalt von Zelllysaten bei 620 nm bestimmt (vgl. 3.2.16). Als Richtwert für die Konzentrationsbestimmung für doppelsträngige DNA galt: 1 OD (260 nm) entspricht 50 µg/ml. Gemessen wurde gegen Wasser oder TE-Puffer in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm.

### **3.2.12 Transfektion**

Um exogene Proteine in kultivierten Zellen zu bilden wurden diese bei ~ 50 - 80% Konfluenz mit der gewünschten Plasmid-DNA transfektiert. Dabei wurden die Zellen stets am Vortag so gesplittet, dass 16-24 h später eine Transfektion bei etwa diesem Konfluenzniveau möglich war. HeLa-Zellen wurden stets mit *Effectene* (Quiagen) gemäß den Herstellerangaben transfektiert. Primäre Hautfibroblasten wurden mit *Effectene* (Quiagen), *Lipofectamine* (Invitrogen), *Metafectene* (Biontex) und *TransIT LT1* (Mirus) jeweils laut Herstellerprotokoll transfektiert.

### **3.2.13 Zellkultur**

Die unter 3.1.8 beschriebenen Zellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit als adhärente Kultur, meist auf Deckgläschen (unbehandelt) im

Kulturgefäß, gehalten. Vor jedem Arbeitsschritt (d.h. Mediumwechsel, Splitten, Transfektion) wurden die Zellen mit vorgewärmten PBS gewaschen. Medien wurden ebenfalls auf 37°C vorgewärmt. Zum Splitten wurden die Zellen 3 Minuten mit Trypsin (bodenbedeckt) bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von FCS-haltigem DMEM wurde die Trypsinierung beendet. Das Ablösen der Zellen vom Kulturgefäß, sowie der Konfluenzgrad der Zellen wurde bei 100-facher Vergrößerung lichtmikroskopisch beurteilt (*Olympus MT-3* Inversmikroskop).

#### **3.2.14 Zellfixation**

Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden auf Deckgläschen wachsende Zellen (HeLa-Zellen und primäre Fibroblasten 16-24 h post Transfektion) nach einmaliger PBS-Waschung mit 4% Formaldehyd (in PBS) für 10 Minuten fixiert und nach dreifacher PBS-Waschung mit N-Propylgallat auf Objektträgern eingedeckelt. Die Lagerung der so behandelten Zellen erfolgte unter Lichtausschluss bei 4°C.

#### **3.2.15 Western Blot - Analyse**

Für die *Western Blot*-Analyse exprimierter Fusionsproteine wurden transfizierte HeLa-Zellen nach 16-24h in *Laemmli Sample-Puffer* aufgelöst. Um die in den Proben enthaltene chromosomale DNA zu scheren, wurde das Lysat wiederholt durch eine 23 gauge-Kanüle passagiert und die Proben daran anschließend für 10 Minuten bei 13000 U/Min zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Protein-haltige Überstand zur weiteren Verwendung abpipettiert. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Amidoschwarz-Methode (s. 3.2.16) bestimmt. Je 10 µg des Proteinextrakts wurden nun in einer SDS-PAGE (10%) bei 80 - 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Vor dem Auftragen wurden die Proteine für fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Zum Größenabgleich wurde der Proteinmarker *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* mit aufgetragen. Nach der SDS-PAGE wurde der *Blot-Stapel*, bestehend aus 3x Filterpapier/ Nitrozellulosemembran/ Polyacrylamidgel (Trenngel)/ 3x Filterpapier, aufgebaut. Hierzu wurden zuvor alle Filterpapiere und auch die Nitrozellulosemembran mit Transferpuffer getränkt. Der Stapel wurde zwischen die Graphitplatten der Blot-Apparatur positioniert und der Proteintransfer bei einer Stromstärke von 42 Milliampere für 1,5 Stunden durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine auf der Nitrozellulosemembran durch eine *Ponceau*-Färbung sichtbar gemacht. Hierzu

wurde die Membran in der *Ponceau*-Lösung für wenige Minuten inkubiert und daran anschließend zur Sichtbarmachung der Proteinbanden mit Aqua dest. entfärbt.

Für die Antikörperinkubation wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h in PBS mit 5% Magermilchpulver behandelt und anschließend mit dem Erstantikörper (Anti-HA 1:1000 in PBS/5% Magermilch) über Nacht bei 4°C und 20 Umdrehungen/Minute inkubiert. Die Nitrozellulosemembran wurde am nächsten Morgen 3 x 10 Minuten in PBS *Tween* (0,05 %) gewaschen und anschließend für 1 h mit dem Zweitantikörper (garbPOX 1:3000 in PBS *Tween*) inkubiert. Nach erneuter Waschung mit PBS *Tween* erfolgte die Entwicklung des Blots in einer Dunkelkammer mit Hilfe der *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Methode unter Verwendung des *Amersham Hyperfilm ECL*. Zur Digitalisierung wurde der *Blot* eingescannt.

Transferpuffer (1 l): 25 mM Tris/HCl; 192 mM Glycerin; 0,1 % SDS; 20 % Methanol ad 1 l mit Aqua dest.

Ponceau S Lösung: 2 g Ponceau S; 30 g Trichloressigsäure; 30 g Sulfansalizylat mit Aqua dest. ad 100 ml.

### **3.2.16 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit Amidoschwarz**

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen in *Laemmli Sample* - Puffer wurde die Amidoschwarzmethode eingesetzt. Als Eichprotein diente *bovines* Serumalbumin in verschiedenen Konzentrationen. Jeweils 2 x 5 µl der Eichlösung und Proteinprobe wurden auf eine Zelluloseazetatfolie aufgetragen und getrocknet. Anschließend wurde die Folie mit einer Färbelösung (500 ml: 2,5 g Amidoschwarz, 225 ml Methanol, 225 ml Aqua dest., 50 ml Eisessig) für 10 min schüttelnd inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in einer Entfärbelösung (500 ml: 237,5 ml Methanol, 237,5 ml Aqua dest, 25 ml Eisessig) wurde die Folie getrocknet, die sichtbaren Proteinspuren ausgeschnitten, diese in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Auflöselösung (100 ml: 80 ml Ameisensäure, 10 ml Essigsäure, 10 g Trichloressigsäure) versetzt. Die Ansätze wurden für 30 min in einem 50°C Wasserbad inkubiert. Die Proteinbestimmung erfolgte spektralphotometrisch bei 620 nm in einem Photometer.

#### Proteinstandard:

Proteinstandard BSA P7656 (1,93 mg BSA; *Sigma-Aldrich*), Lyophilisat in 490 µl Probenpuffer lösen; Anfertigung einer Verdünnungsreihe mit den Endkonzentrationen: 40; 20; 10; 5; 2,5 und 1,25 µg/10µl.

### **3.2.17 Fluoreszenzmikroskopie**

#### **3.2.17.1 Phänotypkontrolle**

Die Begutachtung transfektierter Zellen wurde mit einem *ZEISS Axioskop 2 Mot Plus* bei 400 und 600facher Vergrößerung vorgenommen. Bei 600facher Vergrößerung kam hier, sowie bei allen folgenden Anwendungen (630fach, s. u.) Immersionsöl mit einem Brechungsindex von 1,4 zum Einsatz.

#### **3.2.17.2 Mikroskopie fixierter Zellen**

Alle Bilder zur quantitativen  $F_{nc}$ -Analyse wurden mit einem *ZEISS LSM 510* konfokalen Mikroskop (invers) in Verbindung mit einem *Argon-Gas-Laser* zur Anregung grün fluoreszierender Proteine (488 nm-Linie) und einem *Helium-Neon-Gas-Laser* zur Anregung rot fluoreszierender Proteine (633 nm-Linie) aufgenommen. Alle Aufnahmen erfolgten bei 630facher Vergrößerung.

#### **3.2.17.3 Lebendzellmikroskopie**

Lebendzellbeobachtungen wurde mit einem *Leica SP5* konfokalen Mikroskop (invers), ausgerüstet mit einem *Argon-Gas-Laser*, durchgeführt. Die Anwendungen wurden möglich durch Verwendung der *Leica Application Suite Advanced Fluorescence* Software in Verbindung mit einer *DMI6000* Objektträgervorrichtung (*Leica Micro Systems*), welche die gleichzeitige Beobachtung mehrerer Positionen auf dem gesamten Präparat erlaubte. Zusätzlich wurde eine Objektivheizung (37°C) verwendet, um Temperatureffekte auf die einstündigen Beobachtungen zu minimieren. Die Experimente und Aufnahmen erfolgten bei 630facher Vergrößerung.

#### Versuchsablauf (vgl. 4.4):

Hierzu wurden Zellen auf 24 mm Deckgläschen kultiviert und 16-24 h vor Analyse mit dem Vektor pRev-GFP transfektiert. Diese Deckgläschen wurden in eigens entworfenen Kammern auf dem vorgeheizten Objektisch fixiert. 1 ml 37°C vorgewärmtes Phenolrot-freies DMEM wurde hinzugegeben und grün fluoreszierende (Rev-GFP-exprimierende) Zellen aufgesucht, digital markiert und als Zeitpunkt  $t = 0$  fotografiert. Nun wurde Leptomycin B (Konzentration: 1  $\mu$ M) zugegeben und die zuvor markierten Zellen alle vier Minuten über einen Zeitraum von 1 h digitalisiert.

### 3.2.18 Relative Fluoreszenzintensitätsbestimmungen

Der  $F_{n/c}$  wurde mit Hilfe der *ImageJ* Software (Version 1.34s - NIH) und dem *Microsoft* Tabellenkalkulationsprogramm *Excel* bestimmt. Hierzu wurde die durchschnittliche Fluoreszenz innerhalb des Zellkerns, des Zytoplasmas und außerhalb der Zellen (Hintergrund) innerhalb von neun kreisförmigen Arealen gemessen. Diese Messwerte wurden anschließend für die jeweiligen Kompartimente gemittelt und schließlich der  $F_{n/c}$  mittels der Formel  $(F_n - F_b) / (F_c - F_b)$  berechnet. (n = nucleus; c = cytoplasm; b = background).

### 3.2.19 Statistische Methoden

Um Daten auf ihre statistische Signifikanz zu überprüfen, wurde der *Student's t-test* (unpaarig, zweiseitig) angewendet. Dabei kam das *InStat 2.01 software package* (Graphpad Software) zum Einsatz (Hu und Jans 1999).

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Klonierungen**

#### **4.1.1 Herstellung von Expressionsvektoren, die für Prälamina A (PräLaA) und die Progerie - verursachenden Deletionsmutanten PräLaA $\Delta$ 50 und PräLaA $\Delta$ 90 kodieren**

##### **4.1.1.1 pDsRed - abgeleitete Expressionsvektoren**

Um mögliche morphologische Veränderungen von HeLa-Zellen durch die Expression von rot fluoreszierenden PräLaA-Mutanten (d.h. die HGPS und RD verursachenden Mutanten PräLaA $\Delta$ 50 bzw. PräLaA $\Delta$ 90) untersuchen zu können, wurden die entsprechenden cDNAs in Gegenwart der Primer 5\*, 6\* und der Vektoren pDEST53-LaA, pDEST53-HGPS (Hübner et al. 2006b) bzw. pDEST53-RD (Busch et al. 2009a) amplifiziert und diese in den mit *Xho I* linearisierten Vektor pDsRed-Monomer C1 (s. 3.1.3.5) durch *In-Fusion* inseriert. Die so generierten Vektoren (pDsRed-PräLaA/-PräLaA $\Delta$ 50/-PräLaA $\Delta$ 90) wurden mit den Primern 7\* und 8\* sequenziert und für fehlerfrei befunden (Klonierungsschema s. Anhang I).

##### **4.1.1.2 pEPI- DsRed - abgeleitete Expressionsvektoren**

Neben der Verwendung von pDsRed-Monomer C1 als Expressionsvektor, wurde der Gateway kompatible Vektor pEPI-DESTC (Ghildyal et al. 2005) eingesetzt. Dieser basiert auf dem episomal replizierenden Vektor pEPI-1 (Piechaczek et al. 1999). Durch die *S/MAR* (*scaffold/matrix attachment region*) aus der 5'-Region des humanen *Interferon- $\beta$* -Gens (Bode et al. 1992) ist dieser Vektor in der Lage, ohne die Beteiligung transaktiv wirksamer viraler Faktoren, episomal über mehrere hundert Generationen zu replizieren (Piechaczek et al. 1999). Diese Eigenschaft ist darauf zurückzuführen, dass pEPI-1 infolge einer Interaktion des Vektors mit dem Kernmatrixprotein *SAF-A* (*scaffold attachmentfactor A*) (Jenke et al. 2002) stabil mit Metaphase-Chromosomen assoziiert (Baiker et al. 2000). Aus diesem Vektor wurde mittels *Age I*- und *EcoR V*-Restriktion die GFP-cDNA und die Gateway-Kassette (*ccdB*- siehe Anhang II) deletiert. Parallel dazu wurde aus dem unter 3.1.3.5 beschriebenen Vektor pDsRed-Monomer C1 mittels *Age I*- und *Sma I*-Restriktion die für DsRed kodierende cDNA isoliert. Die DsRed-cDNA wurde daran anschließend durch eine T4-Ligation in den vorbereiteten pEPI-1-Vektor inseriert. Der so

entstandene Vektor (pEPI-DsRed) wurde mit dem Primer 7\* sequenziert und für mutationsfrei befunden.

Für die Insertion der PräLaA-/PräLaA $\Delta$ 50-/PräLaA $\Delta$ 90-cDNAs wurde pEPI-DsRed durch eine *Xho* I-Restriktion geöffnet und daran anschließend mit den entsprechenden cDNAs mittels einer *InFusion*-Reaktion fusioniert. Zur Generierung der cDNAs dienten in einer PCR die Primer 5\* und 6\* (s. 3.1.2) und als Matrize PräLaA-/PräLaA $\Delta$ 50-/ (Hübner et al. 2006b) PräLaA $\Delta$ 90-cDNA (Busch et al. 2009a) enthaltende pDEST53-Vektoren (Sequenzen s. Abb. 4-1). Die neuen Vektoren (pEPI-DsRed-PräLaA, pEPI-DsRed-PräLaA $\Delta$ 50 und pEPI-DsRed-PräLaA $\Delta$ 90) wurden mit den Primern 7\* und 8\* sequenziert und als korrekt befunden (Klonierungsschema s. Anhang II u. III). Diese Expressionsvektoren wurde in Zusammenarbeit mit Albert Busch im Rahmen seiner Promotion kloniert.

```
ATGAGAGACCCCGTCCCAGCGGGCGGCCACCCGCAGCGGGGGCGCAGGCCAGCTCCACTCCGCTGTCGCCCACCCGCA
TCACCCGGCTGCAGGAGAAGGAGGACCTGCAGGAGCTCAATGATCGCTTGGCGGTCTACATCGACCGTGTGCGCTC
GCTGGAAACGGAGAACGCAGGGCTGCGCCTTCGCATCACCGAGTCTGAAGAGGTGGTCAGCCGCGAGGTGTCCGGC
ATCAAGGCCGCTACGAGGCCGAGCTCGGGGATGCCCGCAAGACCCCTTGACTCAGTAGCCAAGGAGCGCGCCCGCC
TGCAGCTGGAGCTGAGCAAAGTGCCTGAGGAGTTTAAGGAGCTGAAAGCGCGCAATACCAAGAAGGAGGGTGACCT
GATAGCTGCTCAGGCTCGGCTGAAGGACCTGGAGGCTCTGCTGAACTCCAAGGAGGCCGCACTGAGCACTGCTCTC
AGTGAGAAGCGCACGCTGGAGGGCGAGCTGCATGATCTGCGGGGCCAGGTGGCCAAGCTTGAGGCAGCCCTAGGTG
AGGCCAAGAAGCAACTTCAGGATGAGATGCTGCGGGGGTGGATGCTGAGAACAGGCTGCAGACCATGAAGGAGGA
ACTGGACTTCCAGAAGAACATCTACAGTGAGGAGCTGCGTGAGACCAAGCGCCGTCATGAGACCCGACTGGTGAG
ATTGACAATGGGAAGCAGCGTGAGTTTGAGAGCCGGCTGGCGGATGCGCTGCAGGAAGCTGCGGGCCAGCATGAGG
ACCAGGTGGAGCAGTATAAGAAGGAGCTGGAGAAGACTTATTCTGCCAAGCTGGACAATGCCAGGCAGTCTGCTGA
GAGGAACAGCAACCTGGTGGGGGCTGCCACAGGAGCTGCAGCAGTCCGCGCATCCGCATCGACAGCCTCTCTGCC
CAGCTCAGCCAGCTCCAGAAGCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCGAAGCTTCGAGACCTGGAGGACTCACTGGCCCGTG
AGCGGGACACCAGCCGGCGGCTGCTGGCGGAAAAGGAGCGGGAGATGGCCGAGATGCGGGCAAGGATGCAGCAGCA
GCTGGACGAGTACCAGGAGCTTCTGGACATCAAGCTGGCCCTGGACATGGAGATCCACGCTACC GCAAGCTCTTG
GAGGGCGAGGAGGAGAGGCTACGCCTGTCCCCAGCCCTACCTCGCAGCGCAGCCGTGGCCGTGCTTCTCTCACT
CATCCCAGACACAGGGTGGGGGCAGCGTCACCAAAAAGCGCAAACCTGGAGTCCACTGAGAGCCGACGAGCTTCTC
ACAGCACGCACGCACTAGCGGGCGCGTGGCCGTGGAGGAGGTGGATGAGGAGGGCAAGTTTGTCCGGCTGCGCAAC
AAGTCCAATGAGGACCAGTCCATGGGCAATTGGCAGATCAAGCGCCAGAATGGAGATGATCCCTTGCTGACTTACC
GGTCCCACCAAAGTTCACCCCTGAAGGCTGGGCAGGTGGTGACGATCTGGGCTGCAGGAGCTGGGGCCACCCACAG
CCCCCTACCAGCCTGGTGTGGAAGGCACAGAACACCTGGGGCTGCGGGAACAGCCTGCGTACGGCTCTCATCAAC
TCCACTGGGGAAGAAGTGGCCATGCGCAAGCTGGTGCCTCAGTGACTGTGGTTGAGGACGACGAGGATGAGGATG
GAGATGACCTGCTCCATCACCACCACGGCTCCACTGCAGCAGCTCGGGGGACCCCGCTGAGTACAACCTGCGCTC
GCGCACCGTGCTGTGCGGGACCTGCGGGCAGCCTGCCGACAAGGCATCTGCCAGCGGCTCAGGAGCCAGGTTGGGC
GGACCCATCTCTCTGGCTCTTCTGCCTCCAGTGTACGGTCACTCGCAGCTACCGCAGTGTGGGGGCGAGTGGGG
GTGGCAGCTTCGGGGACAATCTGGTCACCCGCTCTACCTCTGGGCAACTCCAGCCCCGAACCAGAGCCCCCA
GAACTGCAGCATCATGTAA
```

**Abb. 4-1:** Gezeigt ist die cDNA Sequenz des humanen PräLaA Moleküls (664 AS). Startcodon (ATG) und Stopcodon (TAA) sind jeweils grün markiert. Bei der um 50 AS verkürzten HGPS-verursachenden Mutante fehlen 150 Nukleotide (rot) nahe dem 3'-Ende. Weitere 120 Nukleotide, also insgesamt 90 AS, fehlen der RD-verursachenden Mutante (blau + rot).

## **4.1.2 Plasmide zur Expression heterodimerisierbarer Multidomänenproteine**

### **4.1.2.1 Herstellung des Heterodimerisierungsvektors pNLS - GFP - FKBP<sub>1x</sub>**

Mit Hilfe der Primer 1\* und 2\* (s. 3.1.2) wurde die GFP-cDNA des Vektors pDest53 amplifiziert und mit Hilfe einer *In-Fusion*-Reaktion (s. 3.2.3) in den mit *Xba I* restringierten Vektor pC<sub>4</sub>EN-F1E (s. 3.1.3.1) zwischen die NLS- und FKBP-cDNA kloniert. Der als pNLS-GFP-FKBP<sub>1x</sub> bezeichnete Vektor wurde mit Hilfe des Primers *CMV forward* (MWG Biotech-standard primer) sequenziert (Klonierungsschema s. Anhang IV). Dieser Expressionvektor wurde in Zusammenarbeit mit A. Busch im Rahmen seiner Promotion kloniert.

### **4.1.2.2 Herstellung des Heterodimerisierungsvektors pNLS - GFP - FKBP<sub>3x</sub>**

Ausgehend vom Vektor pC<sub>4</sub>EM-F2E (s. 3.1.3.2) wurde die FKBP<sub>2x</sub>-cDNA mittels *Xba I* und *Spe I* isoliert und in den mit *Xba I* geöffneten Expressionsvektor pNLS-GFP-FKBP<sub>1x</sub> inseriert. Die Insertion erfolgte mit Hilfe der klassischen Ligation (s. 3.2.4). Der als pNLS-GFP-FKBP<sub>3x</sub> bezeichnete Vektor wurde mit Hilfe des Primers *CMV forward* (MWG Biotech-standard primer) sequenziert (Klonierungsschema s. Anhang V).

### **4.1.2.3 Herstellung des Heterodimerisierungsvektors pDsRed-mKanΔNLSFRB\***

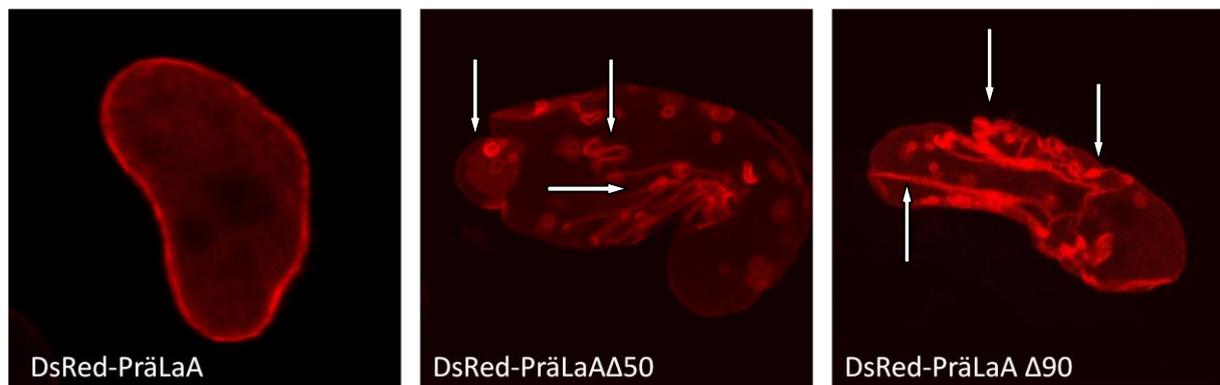
Der die FRB\*-cDNA enthaltende Vektor pC<sub>4</sub>-R<sub>H</sub>E (s. 3.1.3.3) wurde mittels *Xba I* 5'-terminal der FRB\*-Domäne geöffnet und in einer *In-Fusion*-Reaktion (s. 3.2.3) mit der für die DsRed-MonoC1-mKanΔNLS kodierende cDNA fusioniert. Zur Generierung der DsRed-MonoC1-mKanΔNLS-cDNA dienten in einer PCR (s. 3.2.2) die Primer 10\* und 11\* und der gleichnamige Vektor (von Priv.-Doz. Dr. S. Hübner zur Verfügung gestellt). Der als pDsRed-mKanΔNLS-FRB\* bezeichnete Vektor wurde mit dem Primer *CMV forward* (MWG Biotech-standard primer) sequenziert (Klonierungsschema s. Anhang VI).

## **4.2 Morphologische Veränderungen des Zellkerns nach ektopter Prälamins A Δ90 - Expression und Reversibilität der Zellkerndysmorphie durch Lovastatin**

### **4.2.1 Untersuchungen zum Einfluß der ektopten Expression von Prälamins A Δ90 auf die Morphologie von Zellkernen humaner Zellen**

Nukleäre Dysmorphien sind charakteristische Kennzeichen von Zellen, die bestimmte Prälamins A-Mutanten exprimieren. Frühere Studien beschrieben solche

Veränderungen bereits an HGPS- und RD-Fibroblasten (Navarro et al. 2004, Goldmann et al. 2004, Toth et al. 2005) sowie PräLaA $\Delta$ 50-exprimierenden HeLa Zellen (Goldmann et al. 2004). Es sollte daher untersucht werden, ob auch die ektope Expression der RD-verursachenden Mutante (d.h. PräLaA $\Delta$ 90) zu ähnlichen nukleären Dysmorphien führt. Daher wurden vor dem Hintergrund der stark unterschiedlichen klinischen Manifestationen (intrauteriner Tod bei RD vs. Tod im durchschnittlichen Alter von 13 Jahren bei HGPS) HeLa-Zellen mit den Expressionsvektoren pDsRed-PräLaA, pDsRed-PräLaA $\Delta$ 50 und pDsRed-PräLaA $\Delta$ 90 (s. 4.1.1.1) transfiziert. DsRed-PräLaA $\Delta$ 50- und DsRed-PräLaA $\Delta$ 90-exprimierende HeLa Zellen zeigten in typischer Weise veränderte Zellkerne (s. Abb. 4-2). Diese Kerndysmorphien manifestierten sich als Herniationen/Lappenbildungen der Kernhülle (Goldman et al. 2004, Glynn und Glover 2005, Mallampalli et al. 2005, Busch et al. 2009a, Hübner et al. 2006a). Ebenso konnte man Fehllokalisationen der Mutanten innerhalb intranukleärer strang-/punktartiger Aggregate beobachten (Bechert et al. 2003, Hübner et al. 2006b). Ein deutlicher Unterschied im Schweregrad der Kerndysmorphie konnte zwischen PräLaA $\Delta$ 50- und PräLaA $\Delta$ 90-exprimierenden HeLa-Zellen nicht beobachtet werden (siehe Abb. 4-2). Die korrekte Expression der genannten Konstrukte wurde durch eine *Western Blot*-Analyse von Zellextrakten entsprechender Zellen dokumentiert (s. Abb. 4-4).



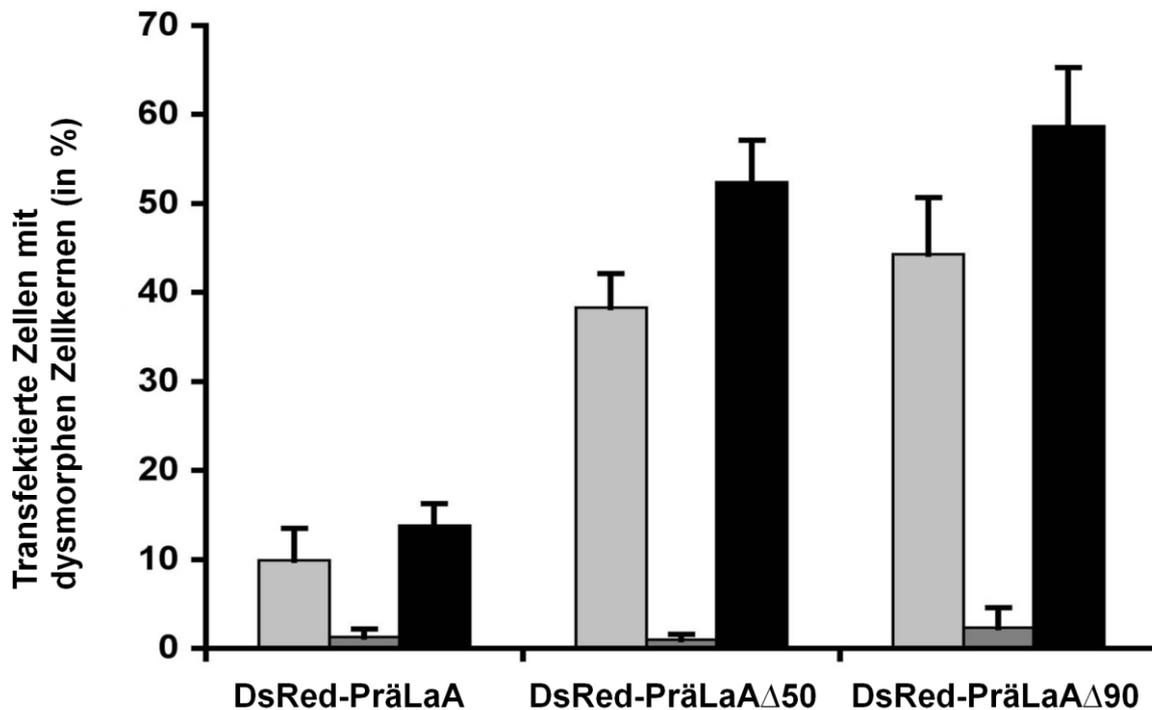
**Abb. 4-2:** Repräsentative CLSM-Bilder von DsRed-PräLaA, DsRed-PräLaA $\Delta$ 50 und DsRed-PräLaA $\Delta$ 90-exprimierenden HeLa-Zellen 16h nach Transfektion. Dargestellt ist der Zellkern. Gegenüber der mit pDsRed-PräLaA transfektierten Zelle, sie zeigt eine homogene Laminafluoreszenz, sind die pDsRed-PräLaA $\Delta$ 50 und pDsRed-PräLaA $\Delta$ 90 transfektierten Zellen dadurch gekennzeichnet, dass der Zellkern stark dysmorph erscheint und die Laminafluoreszenz stark inhomogen wirkt. Die weißen Pfeile zeigen Lappenbildungen/Herniationen des Zellkerns sowie strang-/punktförmige intranukleäre Aggregationen.

#### 4.2.2 Quantifizierung von Prälamina A $\Delta 90$ - induzierten Zellkerndysmorphien in Gegenwart und Abwesenheit von Lovastatin

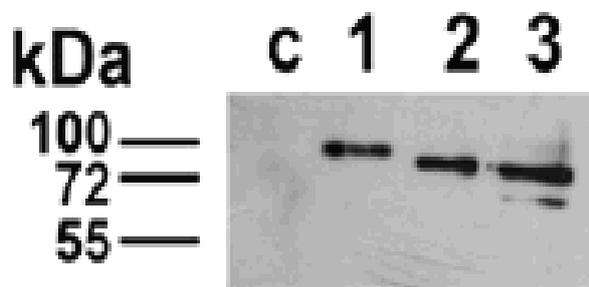
Zusätzlich zu den qualitativ-morphologischen Beobachtungen (s. Abb. 4-2) erfolgte eine Quantifizierung der durch die Expression der PräLaA-Mutanten verursachten nukleären Dysmorphien. In diesen Untersuchungen wurden die von pEPI abgeleiteten Konstrukte (s. 4.1.1.2) verwendet. Dabei zeigten mit pEPI-DsRed-PräLaA $\Delta 50$ - und pEPI-DsRed-PräLaA $\Delta 90$ -transfizierte HeLa-Zellen erwartungsgemäß eine deutlich höhere Neigung dysmorphe Zellkerne zu bilden ( $38.3\% \pm 4$  bzw.  $44.3\% \pm 6$ , s. Abb. 4-3) als solche, die mit pEPI-DsRed-PräLaA transfiziert wurden ( $9.9\% \pm 4$ ).

Auch Expressionsstudien an humanen Hautfibroblasten führten zu ähnlichen Ergebnissen. Der Anteil transfizierter Zellen mit nukleärer Dysmorphie betrug bei DsRed-PräLaA-exprimierenden Fibroblasten nur  $13.8\% \pm 2.5$ , während diese bei DsRed-PräLaA $\Delta 50$ - bzw. DsRed-PräLaA $\Delta 90$ -exprimierenden Zellen bei  $58.7\% \pm 6.6$  bzw.  $52.4\% \pm 4.7$  lag (s. Abb. 4-3). Trotz der deutlich unterschiedlichen Krankheitsverläufe beider Mutanten konnten für DsRed-PräLaA $\Delta 50$ - und DsRed-PräLaA $\Delta 90$ -exprimierende HeLa-Zellen/Fibroblasten quantitativ sowie qualitativ keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der nukleären Dysmorphie festgestellt werden.

Mit dem Einsatz von Lovastatin wurde bereits eine Reversibilität der nukleären Dysmorphie, bedingt durch die Umverteilung der Mutanten in intranukleäre Aggregate, für HGPS- (Yang et al. 2005, Glynn et al. 2005, Capell et al. 2005) und RD-Zellen (Toth et al. 2005) beschrieben. Um herauszufinden ob die Expression der Mutanten DsRed-PräLaA $\Delta 50$  und DsRed-PräLaA $\Delta 90$  in HeLa-Zellen ähnliche Ergebnisse erzielen, wurden HeLa-Zellen parallel zur Transfektion mit Lovastatin ( $25\mu\text{M}$ ) behandelt. Der Lovastatin-Effekt auf die PräLaA-Prozessierung wurde durch *Western Blot*-Analysen von Extrakten entsprechend transfizierter HeLa-Zellen mit einem PräLaA-spezifischen Antikörper untersucht. In allen Fällen ließ sich eine signifikante Expression des endogenen PräLaA-Moleküls beobachten (Daten nicht gezeigt). Weniger als 3% der DsRed-PräLaA- ( $1\% \pm 0.6$ ), DsRed-PräLaA $\Delta 50$ - ( $2.3\% \pm 2.3$ ) und DsRed-PräLaA $\Delta 90$ - ( $1.3\% \pm 0.9$ ) exprimierenden HeLa-Zellen hatten infolge der Anwendung von Lovastatin deformierte Zellkerne (s. Abb. 4-3).



**Abb. 4-3:** Infolge der Expression von DsRed-PräLaA $\Delta$ 50 oder DsRed-PräLaA $\Delta$ 90 konnte ein vermehrtes Auftreten morphologischer Alterationen der Kernhülle transfektierter HeLa-Zellen (hellgraue Säulen) und Hautfibroblasten (schwarze Säulen) beobachtet werden. Die Behandlung der HeLa-Zellen mit Lovastatin (25 $\mu$ M) während des Transfektionsprozesses konnte den durch DsRed-PräLaA $\Delta$ 50 und DsRed-PräLaA $\Delta$ 90 verursachten dysmorphen Phänotyp drastisch reduzieren (dunkelgraue Säulen). Die Ordinate repräsentiert die durchschnittliche Prozentzahl von transfektierten Zellen mit dysmorphen Zellkernen.



**Abb. 4-4:** Die Expression von DsRed-PräLaA (1), DsRed-PräLaA $\Delta$ 50 (2) oder DsRed-PräLaA $\Delta$ 90 (3) wurde durch eine *Western Blot*-Analyse von Zellextrakten der jeweiligen transfektierten HeLa-Zellen und einem gegen DsRed gerichteten polyklonalen Antikörper nachgewiesen. Zellextrakte von nicht transfektierten HeLa-Zellen (c) dienen als Kontrolle.

#### 4.3 Einfluß der Expression von Prälamina A - Deletionsmutanten auf den nukleären Import karyophiler Proteine in HeLa-Zellen

Bis zum heutigen Zeitpunkt besteht großes Unverständnis, warum Mutationen im *LMNA*-Gen verschiedene Gewebe-spezifische bzw. systemische Laminopathien verursachen. Bisher entwickelte Hypothesen bieten diesbezüglich nur eine unbefriedigende Hilfestellung, da sie nur Teilaspekte der mannigfaltigen Pathologien im Stande sind zu erklären. So sieht das *Strukturmodell* die Stabilität der Kernlamina und damit des Zellkerns/der Zelle durch bestimmte *LMNA*-Genmutationen geschwächt. Ein solches Modell eignet sich daher Laminopathien zu erklären, die mit Muskeldystrophien einhergehen. Das *Genexpressionsmodell* basiert auf der Annahme, dass *LMNA*-Mutanten Wechselwirkungen zwischen der Kernlamina und Chromatin/Chromatin-assoziierten Proteinen/Transkriptionsfaktoren beeinträchtigen, sodass es zu einer Beeinflussung Zelltyp-spezifischer Genexpressionen/Signaltransduktionskaskaden kommt. Solche gestörten Wechselwirkungen, wie sie für Lamin A/C, dem Retinoblastoma-Protein (Rb) und Lap2 $\alpha$  beschrieben wurden, können so zu Veränderungen des Zellzyklus bzw. Beeinträchtigungen von Differenzierungsprozessen führen. Schließlich sieht die *ER-Retentionshypothese* die Ursache von Laminopathien in einer Störung von Wechselwirkungen zwischen bestimmten Lamin A/C-Mutanten und INM-lokalisierenden Proteinen. Diese resultieren in einer Diffusion solcher immobiler INM-Proteine über die ONM zum ER, einhergehend mit einem entsprechenden Funktionsverlust oder einer Fehlfunktion dieser Proteine.

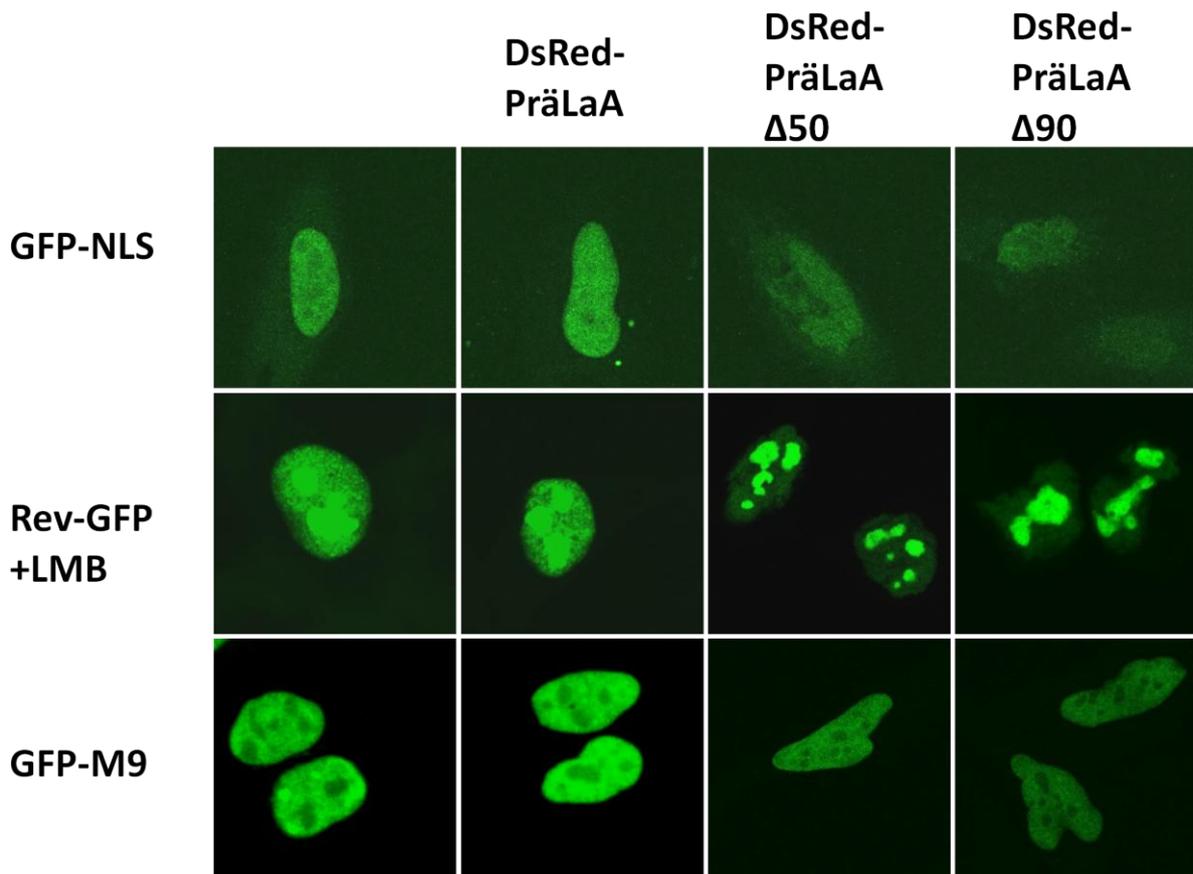
Basierend auf der Wechselwirkung der Kernlamina mit dem NPC und dem Auftreten von Kerndysmorphien und Aggregationen der NPC in Zellen von HGPS-Patienten stellt sich die Frage, welchen Einfluss die HGPS- und RD-verursachenden Laminopathien auf den Kerntransport haben. Es wurden daher Versuche durchgeführt, die die Effekte einer Expression von PräLaA $\Delta$ 50 und PräLaA $\Delta$ 90 auf nukleäre Transportprozesse untersuchen sollten. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit den Konstrukten pEPI-DsRed-PräLaA, pEPI-DsRed $\Delta$ 50 bzw. pEPI-DsRed $\Delta$ 90 transfiziert und in solchen Zellen die subzelluläre Lokalisation koexprimierter karyophiler GFP-tragender Proteine mit Hilfe der *CLSM* (*confocal-laser-scanning-microscopy*) und einer daran anschließenden Fn/c-Analyse quantifiziert (*CLSM*-Bilder s. Abb. 4-5).

Als karyophile Proteine dienen die Fusionsproteine GFP-NLS, GFP-M9 (Hutten und Kehlenbach 2006) und Rev-GFP (Henderson und Percipalle 1997). Während die NLS des Fusionsproteins GFP-NLS von Importin  $\alpha$  über den Importin  $\alpha/\beta$ 1-Komplex gebunden wird (Rexach und Blobel 1995, Görlich et al. 1996), interagiert die NLS der Fusionsproteine Rev-GFP und GFP-M9 direkt mit Mitgliedern der Importin  $\beta$ -Familie, d.h. Importin  $\beta$ 1 (Rev-GFP - Henderson und Percipalle 1997, Henderson und Eleftheriou 2000) bzw. Importin  $\beta$ 2/Transportin (GFP-M9 - Nakielny et al. 1996, Pollard et al. 1996) (s.Tab. 4-1).

16h nach Transfektion wurden von solch doppeltransfizierten und fixierten HeLa-Zellen digitale CLSM-Bilder aufgenommen und die subzelluläre Verteilung der GFP-Proteine quantitativ ausgewertet. Um Aussagen über die Effizienz der nukleären Akkumulation treffen zu können, wurden Fn/c-Werte der GFP-Fluoreszenzen DsRed-PräLaA $\Delta$ 50/ $\Delta$ 90-exprimierenden HeLa-Zellen bestimmt, die sich durch einen dysmorphen Zellkern auszeichneten. Als Referenz dienten Fn/c-Bestimmungen von PräLaA-exprimierenden HeLa-Zellen, die einen normomorphen, d.h. ovalen Zellkern zeigten. Parallel zur Doppeltransfektion wurde eine Einfachtransfektion mit dem jeweils zu untersuchenden GFP-Protein durchgeführt, um eventuelle Auswirkungen einer gesteigerten Expression der Fusionsproteine auf den Kerntransport berücksichtigen zu können.

Für GFP-NLS zeigte sich sowohl in einfachtransfektierten (Fn/c  $\sim$ 11) als auch in DsRed-PräLaA-koexprimierenden Zellen (Fn/c $\sim$ 12) eine vergleichbar starke nukleäre Akkumulation. Hingegen waren die GFP-NLS-Akkumulationen von DsRed-PräLaA $\Delta$ 50- (Fn/c  $\sim$ 7) bzw. DsRed-PräLaA $\Delta$ 90- (Fn/c  $\sim$ 5) exprimierenden HeLa-Zellen signifikant um  $>$ 30% reduziert (s. Abb. 4-6A; Zusammenfassung aller Ergebnisse in Tab. 4-2). Ähnliches zeigte sich für das Fusionsprotein GFP-M9, das in An- (Fn/c  $\sim$ 25) und Abwesenheit (Fn/c  $\sim$ 22) von DsRed-PräLaA im Zellkern vergleichbar effizient akkumulierte, jedoch waren auch hier die Fn/c-Werte der Laminmutanten-exprimierenden HeLa-Zellen deutlich geringer (DsRed-PräLaA $\Delta$ 50: Fn/c  $\sim$ 16; DsRed-PräLaA $\Delta$ 90: Fn/c  $\sim$ 17) (s. Abb. 4-6B). Im Falle von Rev-GFP (enthält neben der NLS auch eine NES) wurden GFP-Fluoreszenzmessungen an LMB-behandelten (1 $\mu$ M, 6h post Transfektion) HeLa-Zellen durchgeführt. Auf diese Weise wurde der durch CRM1-vermittelte nukleäre Export inhibiert (Fornerod et al. 1997), sodass selektiv der Import von Rev-GFP quantifiziert werden konnte. Bei den

einfachtransfiziertem (Fn/c ~28) und den DsRed-PräLaA- (Fn/c ~29) exprimierenden Zellen zeigte sich nach LMB-Behandlung eine starke nukleäre Akkumulation von Rev-GFP, wohingegen der Fn/c von Rev-GFP in PräLaA $\Delta$ 50-exprimierenden Zellen (Fn/c ~19) signifikant (>30%) reduziert war. Die RD-verursachende Mutante zeigte sogar eine um weitere 11% verringerte nukleoplasmatische Anreicherung von Rev-GFP (Fn/c ~16) (s. Abb.4-6C).



**Abb.4-5:** CLSM-Bilder von transfizierten HeLa-Zellen, die jeweils die subzelluläre Lokalisation der verschiedenen GFP-Fusionsproteine in Ab- und Anwesenheit der entsprechenden DsRed-PräLaA-Fusionsproteine zeigen.

GFP-Fusionsprotein	NLS-Rezeptor	NES-Rezeptor
<b>GFP-M9</b> <i>hnRNP A1</i> (AA 203 – 305, enthält M9-Domäne)	Importin $\beta$ 2 (Transportin)	

<b>GFP-NLS</b> NLS des SV40-Tag	Importin $\alpha$ /Importin $\beta$ 1	
<b>Rev-GFP</b> (retrovirales RNA-Transportprotein)	Importin $\beta$ 1	CRM1

**Tab. 4-1:** Die untersuchten karyophilen Proteine unterscheiden sich aufgrund differenter NLSs in der Bindungsfähigkeit an NLS-Rezeptoren. Während der Import von M9-GFP und Rev-GFP über die direkte Bindung der NLS an Mitglieder der Importin  $\beta$ -Familie erfolgt, wird bei GFP-NLS die Bindung an Importin  $\beta$  über das Adaptermolekül Importin  $\alpha$  vermittelt. Die GFP-Proteine M9 und Rev enthalten neben ihrer NLS zusätzlich auch eine NES. Der nukleäre Export von GFP-Rev wird dabei durch den Exportrezeptor Crm1 vermittelt (Fornerod et al. 1997). Dieser kann mit LMB (Fornerod et al. 1997) durch direkte Bindung an CRM1 (Kudo et al. 1998) inhibiert werden.

DsRed-Fusionsprotein	GFP-Fusionsprotein <sup>a</sup>	mittlerer Fn/c <sup>b</sup>
	GFP-NLS GFP-M9 Rev-GFP <sup>c</sup>	11.0 $\pm$ 1.0 (3,176) 22.1 $\pm$ 1.0 (4,167) 28.0 $\pm$ 1.4 (3,117)
PräLaA	GFP-NLS GFP-M9 Rev-GFP <sup>c</sup>	11.7 $\pm$ 1.1 (3,144) 24.6 $\pm$ 0.7 (4,245) 28.8 $\pm$ 1.2 (3,190)
PräLaA $\Delta$ 50	GFP-NLS GFP-M9 Rev-GFP <sup>c</sup>	7.1 $\pm$ 0.9 (3,126) 16.3 $\pm$ 0.8 (4,129) 19.1 $\pm$ 1.2 (3,138)
PräLaA $\Delta$ 90	GFP-NLS GFP-M9 Rev-GFP <sup>c</sup>	5.3 $\pm$ 0.7 (3,120) 16.5 $\pm$ 0.8 (4,157) 16.2 $\pm$ 1.0 (3,143)

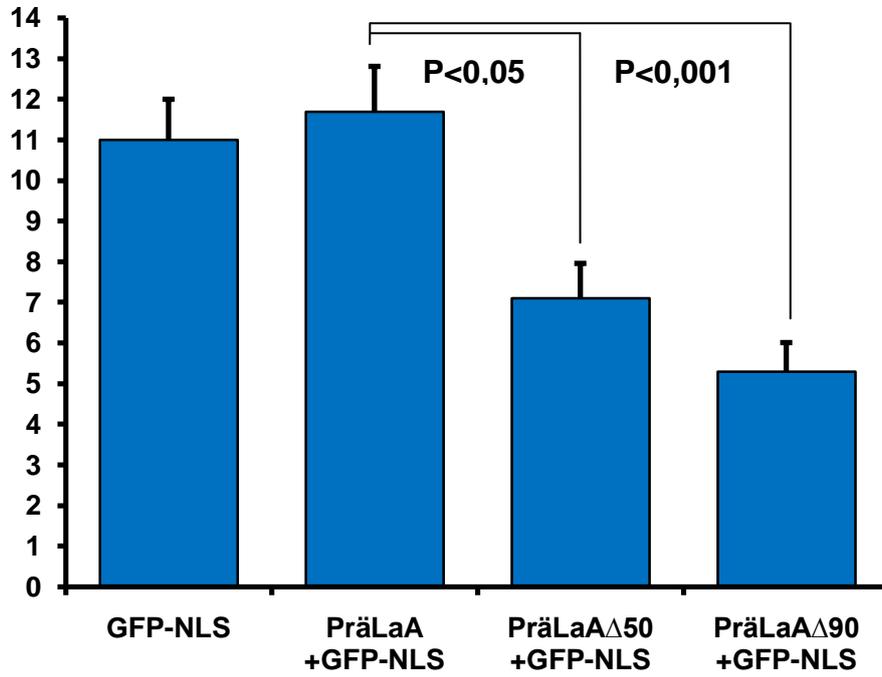
**Tab. 4-2:** <sup>a</sup>GFP-Fusionsproteine mit unterschiedlichen NLSs und deren Kernimportaktivität in PräLaA- bzw. PräLaA-Mutanten ( $\Delta$ 50/ $\Delta$ 90) koexprimierenden HeLa-Zellen. Ergänzend sind die Ergebnisse der Einfachtransfektionen mit den jeweiligen GFP-Fusionsproteinen angegeben.

<sup>b</sup> Die Effizienz der nukleären Akkumulation wird als mittlerer Fn/c  $\pm$  Standardfehler angegeben. In Klammern ist die Anzahl unabhängiger Versuche bzw. analysierter transfektierter Zellen vermerkt. Die Fn/c-Werte wurden mit Hilfe quantitativer Fluoreszenzmessungen bestimmt.

<sup>c</sup> Inhibition des CRM1-vermittelten Exports von Rev-GFP durch Behandlung der HeLa-Zellen mit LMB (1 $\mu$ M, 6h) 16h nach Transfektion.

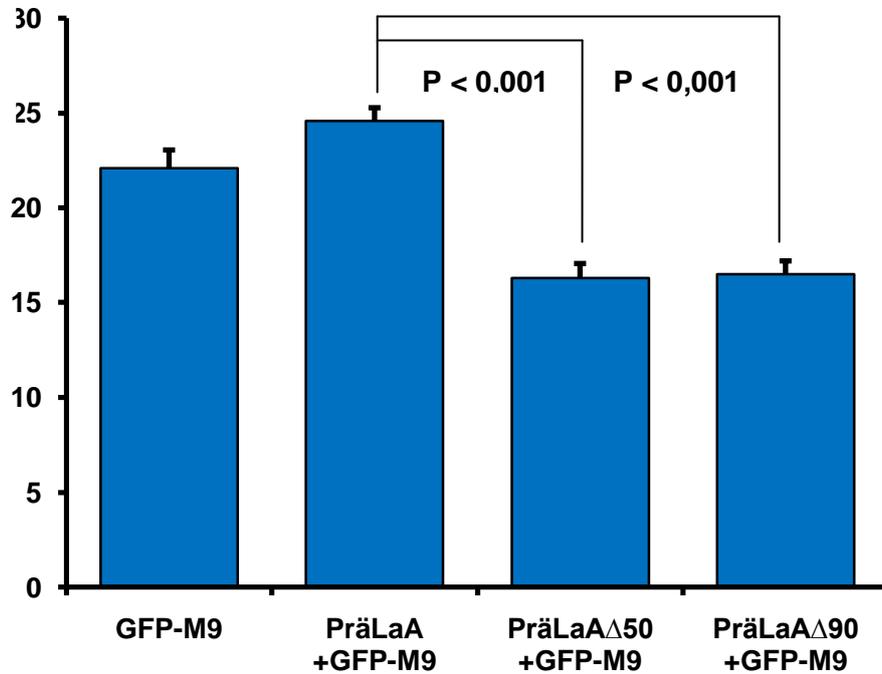
Mittlerer  
Fn/c  
(GFP-NLS)

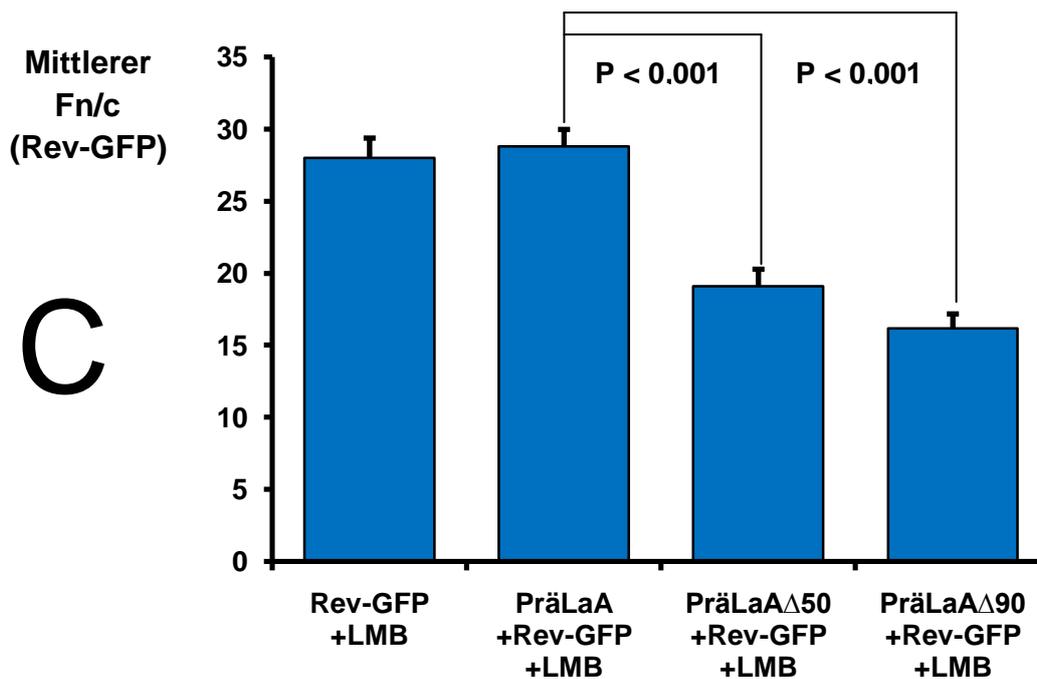
A



Mittlerer  
Fn/c  
(GFP-M9)

B



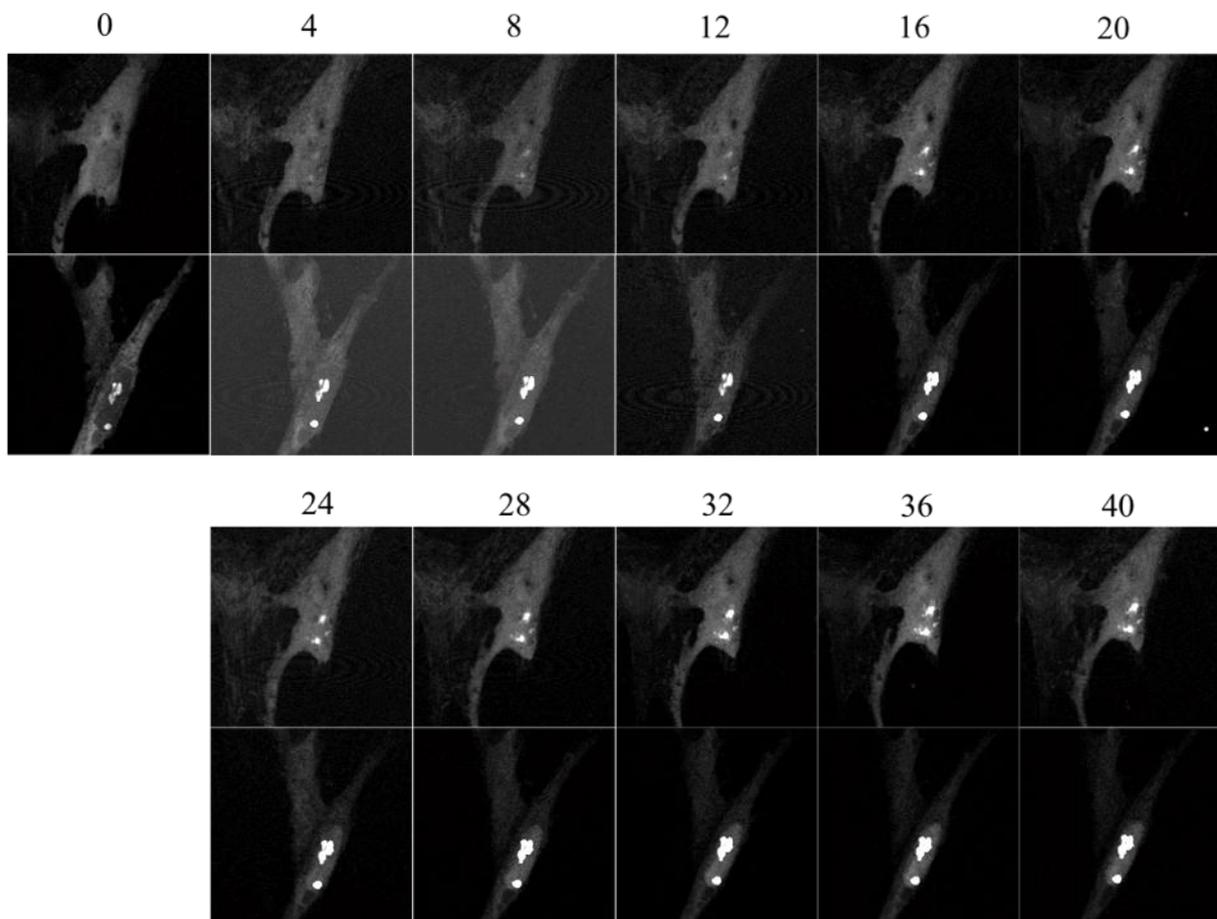


**Abb.4-6:** Die Effizienz der nukleären Akkumulation der GFP-Fusionsproteine (GFP-NLS (A), GFP-M9 (B), Rev-GFP + LMB (C)) wurde unabhängig (Einfachtransfektion) bzw. abhängig von der Koexpression der Fusionsproteine PräLaA, PräLaA $\Delta$ 50 und PräLaA $\Delta$ 90 (Doppeltransfektion) bestimmt. Die CLSM-Bilder wurden einer quantitativen Fn/c-Analyse unterzogen. Die Ergebnisse sind als mittlerer Fn/c  $\pm$  Standardfehler angegeben. Signifikante Unterschiede ( $p$ -Werte > 0,05) sind für die jeweiligen GFP-Fusionsproteine zwischen der Referenz (PräLaA-exprimierende Zellen mit normomorphen Zellkernen) und PräLaA $\Delta$ 50/ $\Delta$ 90-exprimierenden Zellen (Zellen mit dysomorphen Zellkernen) angegeben.

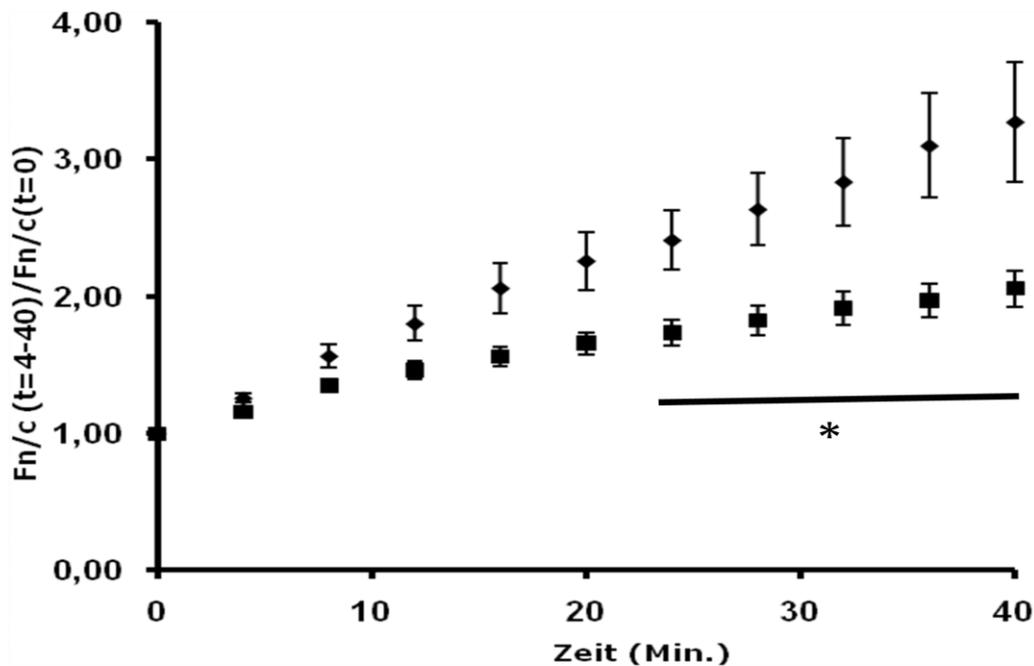
#### 4.4 Quantifizierung der LMB - abhängigen Importkinetik von Rev-GFP in humanen Wildtyp- und ZMPSTE24<sup>-/-</sup> - Fibroblasten

Zusätzlich zu dem bereits erwähnten *Rev-GFP-Proteinassay* in HeLa-Zellen (s. 4.3) wurden Kernimportmessungen von Rev-GFP in Gegenwart von LMB in RD- (homozygote c.1085\_1086insT Mutation im ZMPSTE24-Gen) und Wildtyp-Fibroblasten mit Hilfe der Lebendzellmikroskopie (s. 3.2.17.3) durchgeführt. Rev-GFP besitzt sowohl eine NLS als auch eine NES und ist somit in der Lage aktiv zwischen Zellkern und Zytoplasma zu pendeln. Hierzu wurden die subzellulären Fluoreszenzverteilungen von ausgewählten Zellen 16h nach Transfektion mit Hilfe der CLSM digitalisiert (to). Daran anschließend erfolgte die Zugabe von LMB (1 $\mu$ M). In 4 minütigen Abständen wurden nun erneut CLSM-Digitalisierungen von selbigen Zellen über einen Zeitraum von 40 min vorgenommen (s. Abb.4-7). Für die Auswertung wurde die Fn/c-Zunahme nach LMB-Zugabe zugrunde gelegt. Hierfür

wurden die entsprechenden Fn/c-Werte (t=4-40) durch den jeweiligen Fn/c zum Zeitpunkt t=0 (entspricht dem Fn/c vor LMB-Zugabe) geteilt. Während die Fn/c-Zunahme in Wildtyp-Fibroblasten linear verlief, zeigten ZMPSTE24<sup>-/-</sup>-Fibroblasten eine nicht lineare Zunahme der Fn/c-Werte. 40 Minuten nach LMB-Zunahme erbrachte die Messung von Wildtyp-Fibroblasten eine mittlere Fn/c-Zunahme um den Faktor  $3.3 \pm 0.44$  gegenüber dem Ausgangswert (t=0; Fn/c =1), während ZMPSTE24<sup>-/-</sup>-Fibroblasten eine LMB-abhängige Fn/c-Zunahme für GFP-Rev um einen Faktor von nur  $2.1 \pm 0.13$  zeigten. Statistisch signifikante Unterschiede der Fn/c-Werte zwischen Wildtyp- und ZMPSTE24<sup>-/-</sup>-Fibroblasten ließen sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen schon 24 Minuten nach LMB-Zugabe beobachten ( $p < 0.05$ ; s. Abb. 4-7/8 und Tab. 4-3).



**Abb.4-7:** CLSM-Bilder aus der Lebendzellmikroskopie jeweils eines Rev-GFP-exprimierenden ZMPSTE24<sup>-/-</sup>- (obere Bilderreihe) und Wildtyp-Fibroblasten (untere Bilderreihe). Die markierten Zellen wurden zum Zeitpunkt t=0 (0) und nach Zugabe von LMB (1  $\mu$ M) über einen Zeitraum von 40 Minuten aufgenommen. Die Abstände betragen jeweils 4 Minuten (4 bis 40). Die ausgewählten ZMPSTE24<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Fibroblasten sind zu den entsprechenden Zeitpunkten einander gegenübergestellt. Erkennbar ist in ZMPSTE24<sup>-/-</sup>-Fibroblasten gegenüber Wildtyp-Fibroblasten die geringer ausgeprägte nukleäre Akkumulation des Fusionsproteins über die Zeit.



**Abb. 4-8:** LMB-abhängige Kinetik des Kernimports des Fusionsproteins Rev-GFP in Wildtyp- und ZMPSTE24<sup>-/-</sup>-Fibroblasten. Ausgewählte Rev-GFP exprimierende Zellen wurden markiert und mit Hilfe der CLSM digitalisiert (t=0). Nach Zugabe von LMB (1µM) wurden weitere Bilddigitalisierungen selbiger Zellen in Abständen von 4 Minuten (über einen Zeitraum von 40 min) durchgeführt. Als Maß der Kernimportkinetik diente der Quotient aus mittlerem Fn/c zum Zeitpunkt t=4-40 und mittlerem Fn/c zum Zeitpunkt t=0 (d.h. vor LMB-Zugabe). Ab 24 min post LMB-Zugabe (\*) unterschieden sich die Importkinetiken von GFP-Rev in Wildtyp- (obere Reihe) und ZMPSTE24<sup>-/-</sup>-Fibroblasten (untere Reihe) statistisch signifikant (p < 0.05). Insgesamt wurde 23 Zellen pro Zelllinie ausgewertet.

Zeit (Minuten)	Wildtyp-Fibroblasten mittlerer Fn/c-Quotient (t <sub>4-40</sub> /t <sub>0</sub> )	RD-Fibroblasten mittlerer Fn/c-Quotient (t <sub>4-40</sub> /t <sub>0</sub> )
0	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00
4	1,26 ±0,04	1,16 ±0,02
8	1,56 ±0,08	1,35 ±0,05
12	1,80 ±0,13	1,46 ±0,60
16	2,06 ±0,19	1,56 ±0,07
20	2,26 ±0,21	1,66 ±0,08
24	2,41 ±0,21	1,73 ±0,10
28	2,64 ±0,26	1,82 ±0,11
32	2,84 ±0,32	1,91 ±0,12
36	3,10 ±0,38	1,97 ±0,12
40	3,27 ±0,44	2,05 ±0,13

**Tab. 4-3:** Zusammenfassung der gemittelten Fn/c-Quotienten (t<sub>4-40</sub>/t<sub>0</sub>) von Rev-GFP-exprimierenden Wildtyp-/ZMPSTE24<sup>-/-</sup>(RD)-Fibroblasten zu verschiedenen Zeitpunkten nach LMB-Zugabe (1µM). 24 Minuten nach LMB-Zugabe ist ein signifikanter Unterschied der Importkinetiken zu verzeichnen. Insgesamt wurden 23 Zellen pro Zelllinie ausgewertet.

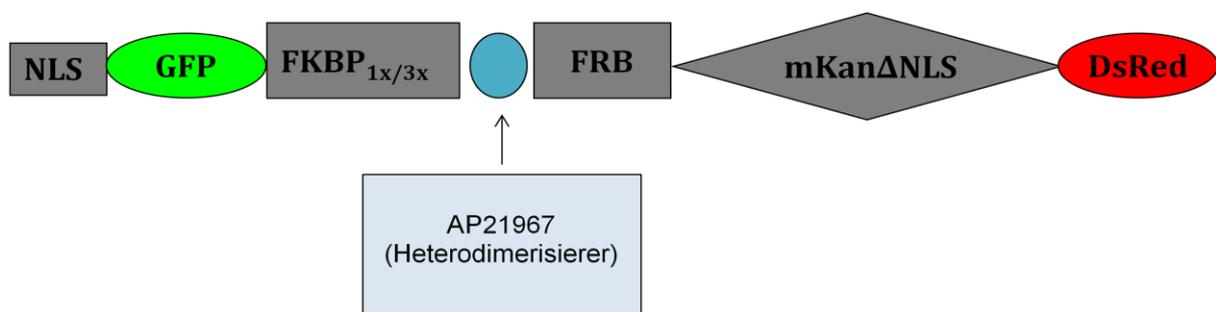
#### 4.5 Etablierung eines neuen *Kernproteinimportassays* durch AP21967-induzierte Proteinheterodimerisierung

Um den Kernimport quantitativ untersuchen zu können, wurde, basierend auf dem *ARGENT™ Regulated Heterodimerization Kit 2.0* der Firma ARIAD, ein System fluoreszierender Heterodimere generiert, mittels derer ein durch Heterodimerisierung induzierbarer Proteinimport möglich ist (*Heterodimerisierungs-Importassay*, vgl. 3.2.1). Als Heterodimerisierer diente das Rapamycin-Analogon AP21967, welches im Gegensatz zu Rapamycin, den natürlichen Zellzyklus nicht beeinflusst. Bei den Fusionsproteinen (s. Abb. 4-9) handelte es sich um die Kernimport kompetenten Fusionsproteine GFP-NLS-FKBP<sub>1x</sub> und GFP-NLS-FKBP<sub>3x</sub> sowie das hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisierende Fusionsprotein DsRed-mKanΔNLS-FRB\*. In Abwesenheit von AP21967 konnte für DsRed-mKanΔNLS-FRB\* in HeLa-Zellen ein mittlerer Fn/c-Wert von  $\sim 0,5 \pm 0,06$  16h nach Transfektion gemessen werden (t=0) (s. Abb. 4-10/11). Dagegen änderte sich in Gegenwart des Heterodimerisierers die subzelluläre Lokalisation von DsRed-mKanΔNLS-FRB\* in GFP-NLS-FKBP<sub>1x</sub>- bzw. GFP-NLS-FKBP<sub>3x</sub>-koexprimierenden Zellen sowohl zeitlich als auch AP21967-konzentrationsabhängig. So wurde bei einer Konzentration von 0,25μM AP21967 eine beginnende Zunahme der DsRed-Fluoreszenz im Zellkern beobachtet (Fn/c: 2h nach Zugabe  $\sim 1 \pm 0,084$ ; 6h nach Zugabe  $\sim 2,2 \pm 0,15$ ). Durch die Erhöhung der AP21967-Konzentration auf 0,5μM konnte dieser Effekt weiter verstärkt werden. Analysen ergaben hier einen Anstieg der mittleren Fn/c-Werte um  $\sim 20\%$  2h ( $\sim 1,24 \pm 0,10$ ) und um  $\sim 45\%$  6h ( $\sim 3,2 \pm 0,3$ ) nach Zugabe des Heterodimerisierers. Die Verlängerung der Inkubation auf 24h ließ den Fn/c-Wert der DsRed-Fluoreszenz noch weiter ansteigen (Fn/c-Werte  $\sim 3,1 \pm 0,33$  bei 0,25μM und über 4 bei 0,5μM AP21967; s. Abb.4-11A). Ferner führte die Verwendung eines Import-Kargomoleküls mit 3 FKBP-Domänen (GFP-NLS-FKBP<sub>3x</sub>) zu einer noch effizienteren nukleären Akkumulation des Fusionsproteins (Fn/c-Werte bei 0,5μM AP21967 von  $2,7 \pm 0,2$  nach 2h und von  $9,0 \pm 0,9$  nach 6h AP21967-Inkubation; s. Abb.4-11B). Durch die Erhöhung der AP21967-Konzentration auf 1μM konnte bei den hier verwendeten HeLa-Zellen keine weitere Erhöhung der Transporteffizienz erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

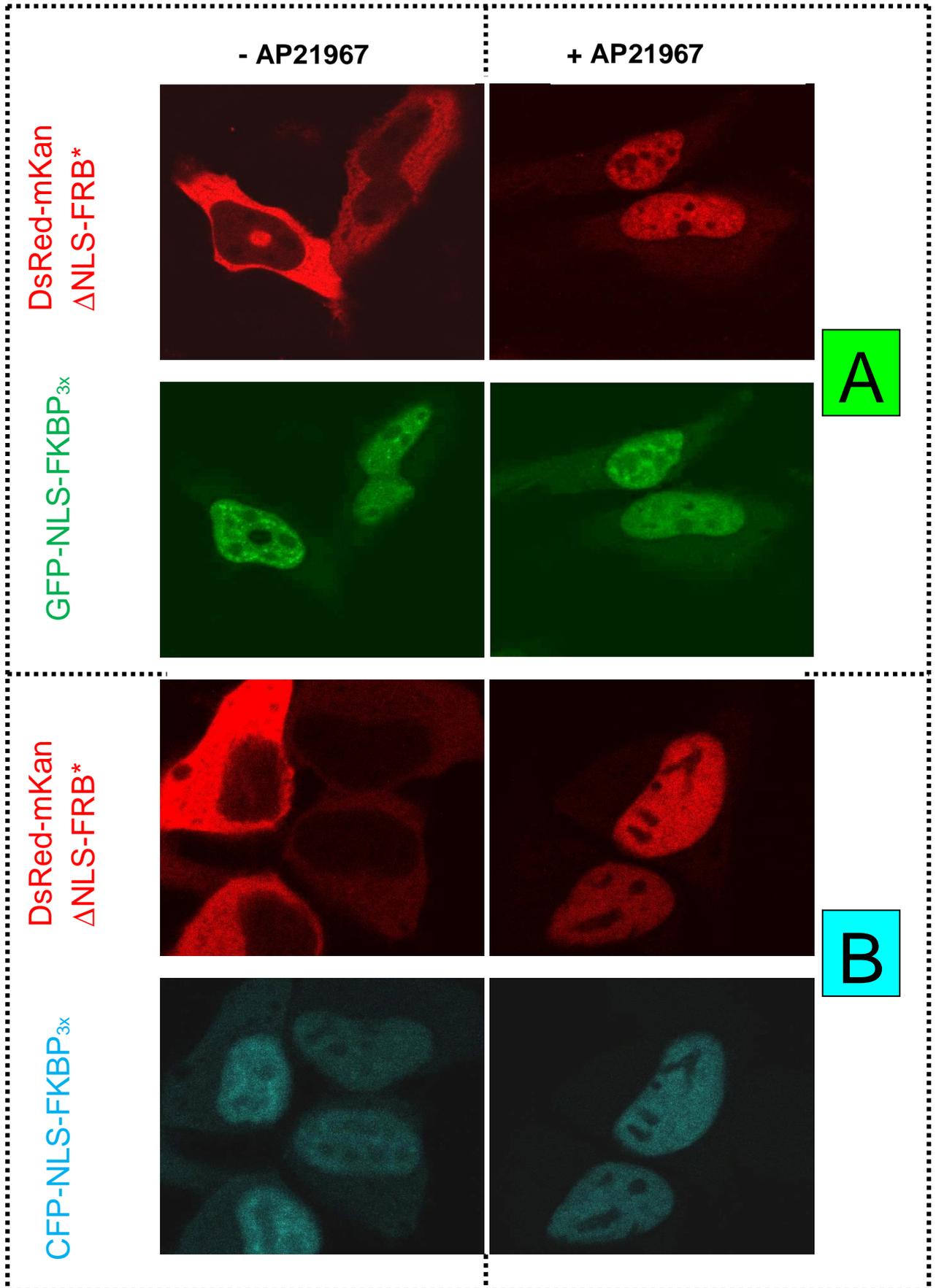
Fn/c-Messungen ohne Heterodimerisierer erbrachten ähnliche Werte für DsRed-mKanΔNLS-FRB\* in GFP-NLS-FKBP<sub>3x</sub>-exprimierenden wie für DsRed-mKanΔNLS-FRB\* in GFP-NLS-FKBP<sub>1x</sub>-exprimierenden Zellen (vgl. Abb. 4-11 A u. B). Aufgrund

der notwendigen Inkubationszeiten (ca. 6h mit AP21967), um größere Veränderungen der subzellulären Lokalisation des DsRed-Fusionsproteins zu erzielen, machten Fokus-Drift und Zellbewegungen Messungen von Importkinetiken unpraktikabel.

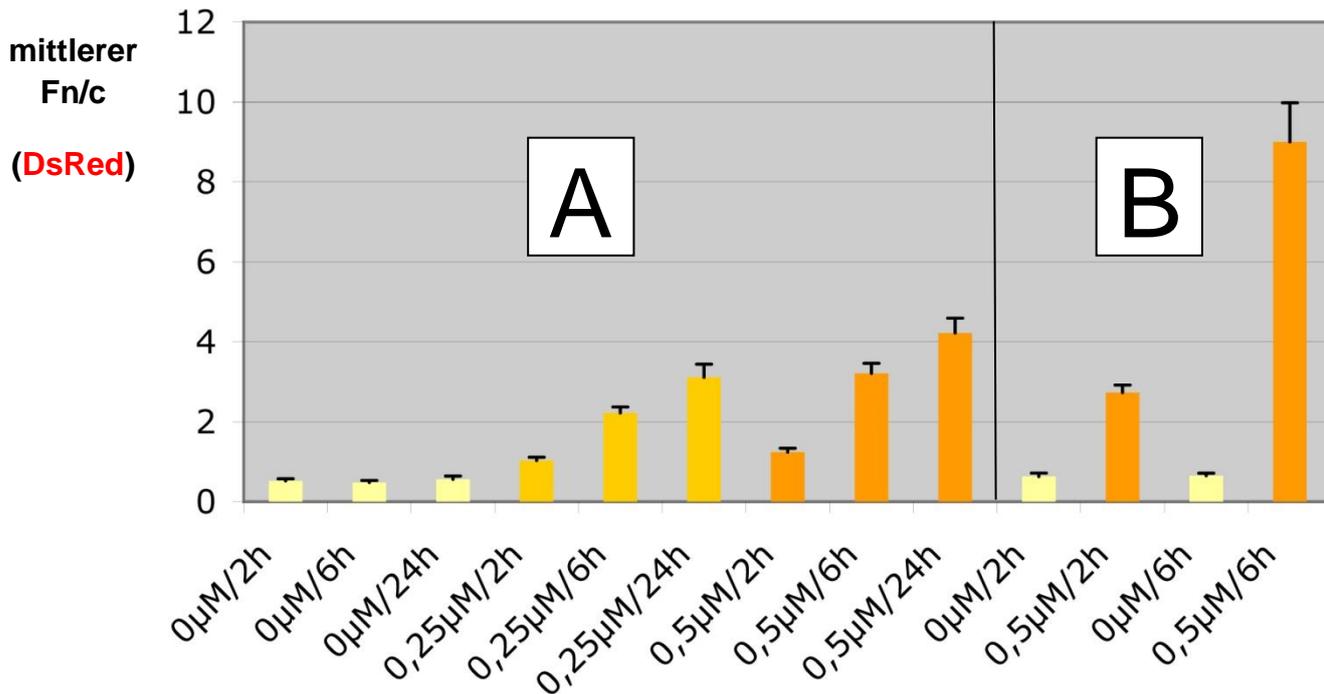
Ferner wurde der *Heterodimerisierungs-Importassay* auch für ein Cyanfluoreszierendes NLS-FKBP<sub>3x</sub>-Konstrukt (NLS-CFP-FKBP<sub>3x</sub>, Priv.-Doz. Dr. Hübner) etabliert (s. Abb. 4-10B). Hintergrund hierfür war ein angestrebter *Tri-color-Heterodimerisierungs-Importassay* mit GFP-markierten HGPS/RD-verursachenden Laminmutanten, DsRed-mKanΔNLS-FRB\* und NLS-CFP-FKBP<sub>3x</sub>, um das Prinzip des AP21967-induzierten, NLS-abhängigen Kerntransports in HeLa-Zellen untersuchen zu können, die Laminmutanten exprimieren. Da keine ausreichenden Transfektionseffizienzen erzielt wurden, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt. Zukünftige Untersuchungen könnten diese Einschränkung durch Verwendung multicistronischer Expressionskonstrukte umgehen.



**Abb.4-9:** Schematische Darstellung der Fusionsproteine I (NLS-GFP-FKBP<sub>1x</sub>), II (NLS-GFP-FKBP<sub>3x</sub>) und III (DsRed-mKanΔNLS-FRB). Durch die Zugabe von AP21967 kommt es zu einer Heterodimerisierung zwischen I und III sowie II und III.



**Abb.4-10:** Subzelluläre Lokalisation koexprimierter Fusionsproteine (DsRed-mKan $\Delta$ NLS-FRB\* und GFP-NLS-FKBP<sub>3x</sub> (A) bzw. CFP-NLS-FKBP<sub>3x</sub> (B)) in Abwesenheit (-) und Gegenwart (+) des Heterodimerisierer AP21967 (0,5 $\mu$ M/6h) 16h post Transfektion.

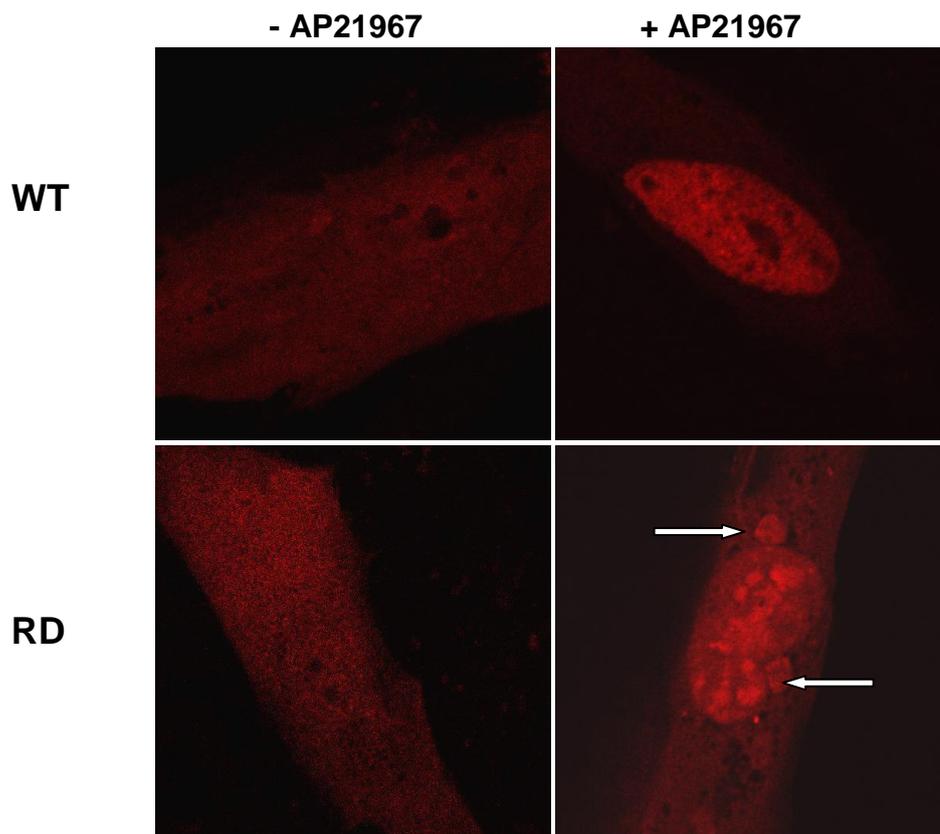


**Abb.4-11:** DsRed-mKan $\Delta$ NLS-FRB\* und GFP-NLS-FKBP1x (A) bzw. DsRed-mKan $\Delta$ NLS-FRB\* und GFP-NLS-FKBP<sub>3x</sub> (B) koexprimierende HeLa-Zellen wurden für 2h, 6h und 24h in Gegenwart (0,25 und 0,5 $\mu$ M) und Abwesenheit des Heterodimerisierers AP21967 16h post Transfektion inkubiert. Solche Zellen wurden schließlich fixiert und mit Hilfe der CLSM digitalisiert. Daran anschließend wurden quantitative Fn/c-Analysen der DsRed-Fluoreszenz durchgeführt. Veränderungen der subzellulären DsRed-Fluoreszenz zeigten dabei einen von AP21967 Zeit-/Konzentrations-abhängigen Effekt. Auch die Anzahl der FKBP-Domänen wirkte sich auf die Effizienz des AP21967-induzierten Proteinkernimports aus. Die Ergebnisse sind als mittlerer Fn/c  $\pm$  Standardfehler angegeben.

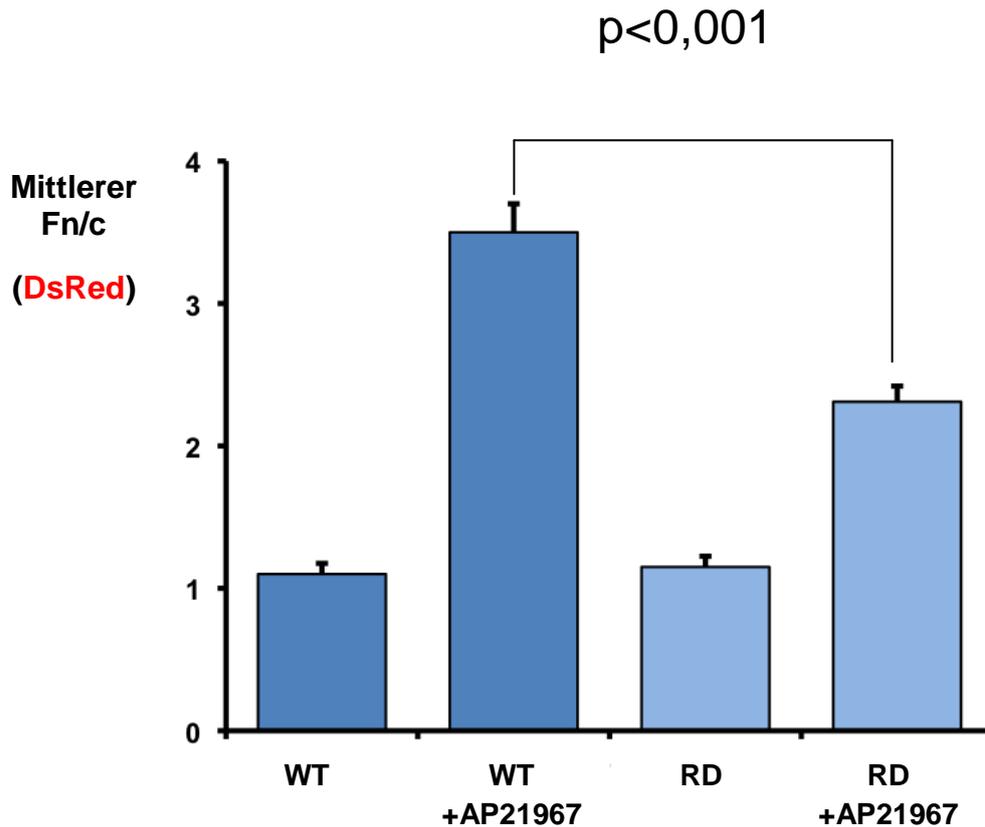
#### 4.6 AP21967 - induzierter Kernproteinimport in Wildtyp- und ZMPSTE24<sup>-/-</sup>-Fibroblasten

Der *Heterodimerisierungs-Importassay* (s. 3.2.1 und 4.5) sollte auch auf Hautfibroblasten eines Patienten mit Restriktiver Dermopathie (RD) bzw. auf Fibroblasten zweier gesunder Kontrollpersonen (Wildtyp) angewendet werden. Die Fibroblasten (ZMPSTE24<sup>-/-</sup>- bzw. RD-Fibroblasten) der erkrankten Person tragen die bereits erwähnte homozygote c.1085\_1086insT Mutation im ZMPSTE24-Gen, die zur Bildung eines permanent farnesylierten Prälamins A-Moleküls führt (vgl. 3.1.8/2.3.3; freundlicherweise von Prof. M Wehnert, Greifswald zur Verfügung gestellt). Die Zellen wurden 16h nach Doppeltransfektion (pNLS-GFP-FKBP<sub>3x</sub> und pDsRed-mKan $\Delta$ NLS-FRB\*) mit dem Heterodimerisierer AP21967 für 6h inkubiert und anschließend einer CLSM (s. Abb.4-12) mit daran anschließender Bildanalyse

(Fn/c-Analyse) unterzogen. Hierbei wurde die Fn/c-Änderung der DsRed-Fluoreszenz zwischen ZMPSTE24<sup>-/-</sup>-Fibroblasten und Wildtyp-Fibroblasten verglichen. Initiale Experimente zeigten eine stark nukleäre DsRed-Fluoreszenz bei einer AP21967-Konzentration von 0,5µM (Daten nicht gezeigt). Jedoch konnte bei den verwendeten Fibroblasten (im Gegensatz zu HeLa-Zellen, s. 4.5) die nukleäre DsRed-Fluoreszenz durch eine Erhöhung der AP21967-Konzentration auf 1µM weiter gesteigert werden, weshalb für alle weiteren Versuche selbige Konzentration gewählt wurde. Es wurde eine signifikant niedrigere nukleäre Akkumulation der DsRed-Fluoreszenz in ZMPSTE24<sup>-/-</sup> gegenüber Wildtyp-Fibroblasten, mit einem mehr als 30% reduzierten Fn/c-Wert (Fn/c ~2,3 ±0,1 vs. ~3,5 ±0,2), beobachtet. Hingegen zeigte sich die subzelluläre Verteilung der DsRed-Fluoreszenz in doppeltransfektierten Wildtyp- und ZMPSTE24<sup>-/-</sup>-Fibroblasten bei Abwesenheit von AP21967 nicht signifikant unterschiedlich (Fn/c ~1,1 ±0,1 vs. ~1,2 ±0,1) (Ergebnisse vgl. Abb. 4-13 und Tab.4-4).



**Abb.4-12:** CLSM-Bilder von GFP-NLS-FKBP<sub>3x</sub>- und DsRed-mKanΔNLS-FRB\*-koexprimierenden Fibroblasten vor und nach Inkubation mit AP21967 (6h, 1µM). Die Bilder zeigen die DsRed-Fluoreszenz von DsRed-mKanΔNLS-FRB\*. Man beachte die nukleäre Akkumulation der DsRed-Fluoreszenz durch AP21967-Zugabe. Neben dem (im Vergleich zum Wildtyp (WT)) AP21967-abhängigen geringeren Fn/c zeigt der ZMPSTE24<sup>-/-</sup>-Fibroblast (RD) die für diese Zellen typischen Zellkerndysmorphien (weiße Pfeile).



**Abb.4-13:** Effizienz der nukleären Akkumulation von DsRed-mKanΔNLS-FRB\* vor und nach Inkubation von GFP-NLS-FKBP<sub>3x</sub>-koexprimierenden ZMPSTE24<sup>-/-</sup>(RD)- bzw. Wildtyp (WT)-Fibroblasten 16h post Transfektion mit AP21967 (1μM/6h). Die Fn/c-Analyse der AP21967-abhängigen DsRed-Fluoreszenz ergab zwischen den Wildtyp- und ZMPSTE24<sup>-/-</sup>-Fibroblasten einen signifikanten Unterschied ( $p > 0,001$ ).

DsRed-Fusionsprotein	GFP-Fusionsprotein	mittlerer Fn/c <sup>a</sup>
DsRed-mKanΔNLS-FRB* <b>Wildtyp ohne AP21967</b>	GFP-NLS-FKBP <sub>3x</sub> <b>Wildtyp ohne AP21967</b>	1,1 ±0,1 (4, 76)
DsRed-mKanΔNLS-FRB* <b>Wildtyp mit AP21967</b>	GFP-NLS-FKBP <sub>3x</sub> <b>Wildtyp mit AP21967</b>	3,5 ±0,2 (4, 115)
DsRed-mKanΔNLS-FRB* <b>RD ohne AP21967</b>	GFP-NLS-FKBP <sub>3x</sub> <b>RD ohne AP21967</b>	1,2 ±0,1 (4, 82)
DsRed-mKanΔNLS-FRB* <b>RD mit AP21967</b>	GFP-NLS-FKBP <sub>3x</sub> <b>RD mit AP21967</b>	2,3 ±0,1 (4, 100)

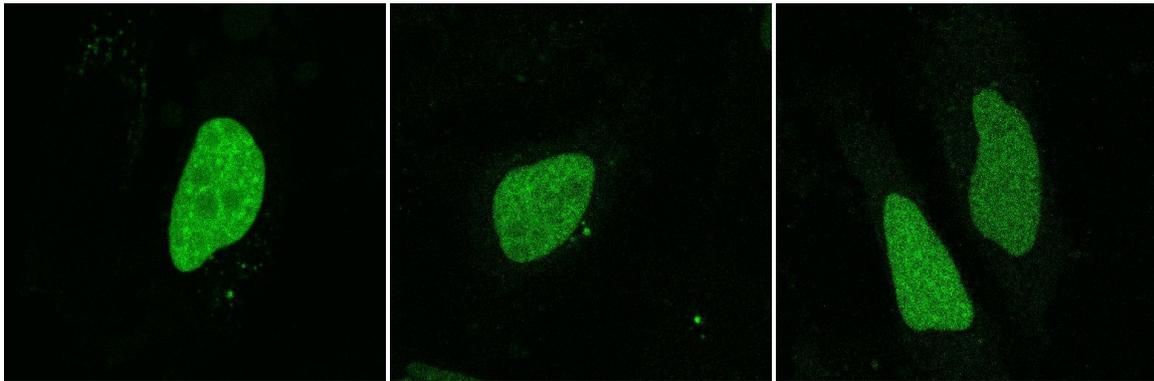
**Tab. 4-4:** Abb. 4-14: Tabellarische Darstellung der Effizienz der nukleären Akkumulation von DsRed-mKanΔNLS-FRB\* in Abhängigkeit von AP21967 in GFP-NLS-FKBP<sub>3x</sub>-koexprimierenden Wildtyp<sup>-/-</sup> ZMPSTE24<sup>-/-</sup> (RD)-Fibroblasten.

<sup>a</sup> Die Effizienz der nukleären Akkumulation wird als mittlerer Fn/c ± Standardfehler angegeben. In Klammern ist die Anzahl unabhängiger Versuche bzw. analysierter transfektierter Zellen angegeben.

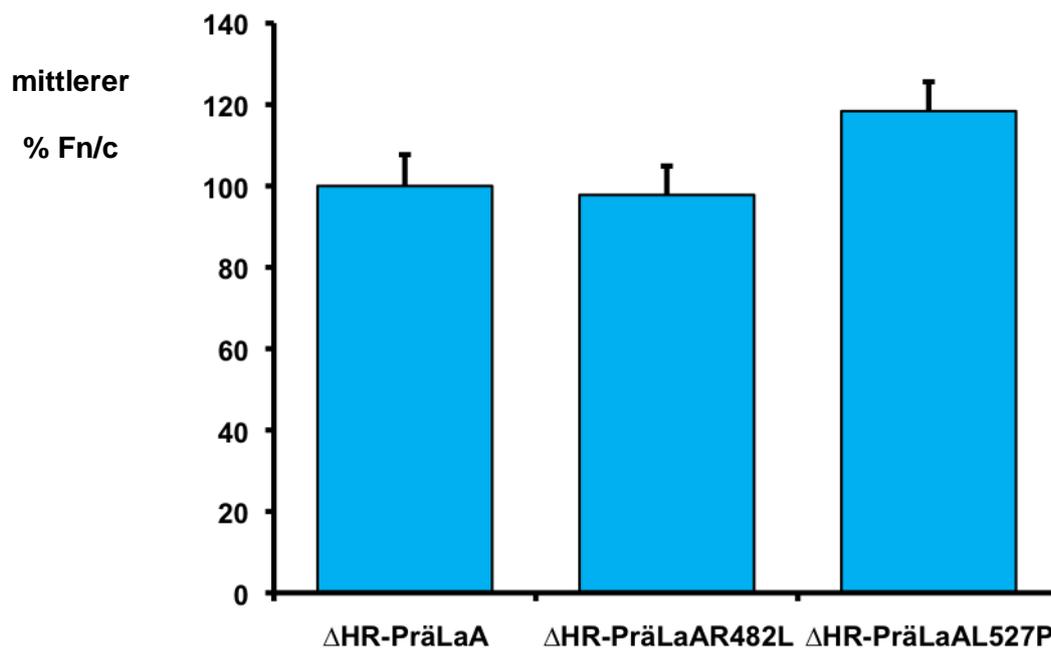
#### 4.7 Untersuchungen zur subzelluläre Lokalisation trunkierter Prälamina A - Mutanten in HeLa - Zellen

Um mögliche Unterschiede hinsichtlich der nukleären Akkumulation Laminopathie-verursachender Prälamina A (PräLaA)-Mutanten untersuchen zu können, wurden HeLa-Zellen mit Konstrukten (pDest53- $\Delta$ HR-PräLaA, pDest53- $\Delta$ HR-PräLaAR482L, pDest53- $\Delta$ HR-PräLaAL527P; zur Verfügung gestellt von Priv.-Doz. Dr. S. Hübner) transfiziert, die ausschließlich für die NLS-enhaltende Schwanz-Domäne (AS 386-664) des Prälamina A-Moleküls kodieren (sog.  $\Delta$ H(ead)R(od)-Deletionsmutanten). Infolge der aminoterminalen Deletion zeichneten sich die kernimportkompetenten Deletionsmutanten durch eine fehlende Inkorporation in die Kernlamina aus. Stattdessen zeigten diese eine diffuse subzelluläre Verteilung (s. Abb. 4-14). Hierdurch konnte mit Hilfe der CLSM und digitalen Bildanalyse eine quantitative Fn/c-Bestimmung der GFP-Fluoreszenz durchgeführt werden. Die gemittelten Fn/c-Werte dienen erneut als Maß für die Effizienz des Kernimportes der jeweiligen Deletionsmutante 16h post Transfektion. Mit der Wildtyp-Deletionsmutante  $\Delta$ HR-PräLaA parallel durchgeführte Fn/c-Bestimmungen (dem arithmetischen Mittel wurde der Wert 100% zugeordnet) dienen dem Vergleich.

Die folgenden Deletionsmutanten wurden untersucht:  $\Delta$ HR-PräLaAR482L (Schwanz-Domäne der partiellen familiären Lipodystrophie-verursachenden Mutante R482L) und  $\Delta$ HR-PräLaAL527P (Schwanz-Domäne der Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie-verursachenden Mutante L527P). Beide Mutationen lokalisieren innerhalb der Ig-ähnlichen Domäne (AS 411-553) und befinden sich carboxyterminal der NLS. Gegenüber  $\Delta$ HR-PräLaA (%Fn/c = 100) ergaben die Fn/c-Analysen sowohl für  $\Delta$ HR-PräLaAR482L (99,8  $\pm$ 2,7) als auch für  $\Delta$ HR-PräLaAL527P (109,7  $\pm$ 2,9) keine signifikanten Unterschiede. Abb. 4-15 zeigt eine graphische Darstellung der Ergebnisse. Versuchsdetails sind in der Tab. 4-5 angegeben. Die korrekte Expression der Deletionsmutanten wurde mit Hilfe einer *Western Blot*-Analyse und entsprechenden HeLa-Extrakten überprüft (s. Abb.4-16).



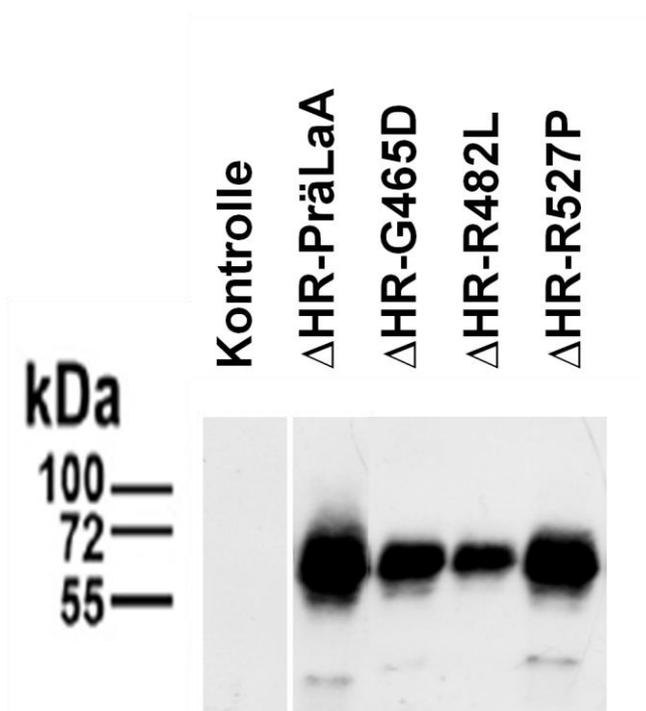
**Abb. 4-14:** Repräsentative CLSM-Bilder von HeLa-Zellen, welche die GFP-Fusionsproteine (von links nach rechts)  $\Delta$ HR-PräLaA (Wildtyp),  $\Delta$ HR-PräLaAR482L und  $\Delta$ HR-PräLaAL527P exprimieren (16h nach Transfektion).



**Abb. 4-15:** Quantitative Fn/c-Analyse digitaler CLSM-Bilder von fixierten,  $\Delta$ HR-PräLaA- (Wildtyp),  $\Delta$ HR-PräLaAR482L- und  $\Delta$ HR-PräLaAL527P-exprimierenden HeLa-Zellen 16h post Transfektion. Die Ergebnisse wurden als relative Fn/c-Werte (% Fn/c) angegeben. Hierzu wurde dem gemittelten Fn/c-Wert von  $\Delta$ HR-PräLaA der Wert 100 zugeordnet.

GFP-Fusionsprotein	% Fn/c
$\Delta$ HR-PräLaA	100
$\Delta$ HR-PräLaAR482L	99,8 $\pm$ 2,7 (4; 475)
$\Delta$ HR-PräLaAR527P	109,7 $\pm$ 2,9 (5; 431)

**Tab. 4-5:** Tabellarische Darstellung der gemittelten relativen Fn/c-Werte (% Fn/c), Standardfehler, Anzahl der Experimente und Gesamtzahl untersuchter Zellen.



**Abb. 4-16:** *Western Blot*-Analyse von Zellextrakten, die von  $\Delta$ HR-PräLaA-,  $\Delta$ HR-PräLaAG465D- (Extrakt von Priv.-Doz. Dr. S. Hübner zur Verfügung gestellt),  $\Delta$ HR-PräLaAR482L- bzw.  $\Delta$ HR-PräLaAR527P-exprimierenden HeLa-Zellen gewonnen wurden. Als Erstantikörper diente ein anti-GFP-Antikörper (1:100). Ein Zellextrakt von nicht transfizierten HeLa-Zellen diente als Kontrolle. Die *Western Blot*-Analyse entstammt einem Polyacrylamidgel. G465D (partielle familiäre Lipodystrophie-verursachende Mutante)

## **5. Diskussion**

### **5.1 Allgemeine Diskussion**

Mutationen im *LMNA*-Gen wurden erstmalig vor mehr als einer Dekade mit einer menschlichen Erkrankung in Verbindung gebracht, nämlich mit der autosomal-dominanten Form der Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (Bonne et al. 1999). Seitdem steigt die Anzahl von Erkrankungen unterschiedlicher Organsysteme stetig, die sich auf Mutationen des *LMNA*-Gens zurückführen lassen (s. 2.3.1). Jedoch bleibt es weitestgehend unklar warum *LMNA*-Mutationen so spezifische Manifestationen vereinen. In den letzten Jahren rückte dabei die Erforschung der Progerien in den Fokus der Wissenschaft. Man erhofft sich über diese Erkrankungen ein genaueres Bild über Mechanismen und Faktoren der Zellalterung zu erhalten. Bisher existieren jedoch nur hypothetische Erklärungsansätze über mögliche Ursachen des rasanten Alterungsprozesses bei Progerien. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es den Kernproteinimport als einen möglichen Baustein im Pathomechanismus bestimmter Progerie-assoziiertes *LMNA*-Mutationen zu untersuchen.

Anstoß den Kernproteinimport an Progerie-Zellen quantitativ zu untersuchen gaben, neben den bekannten morphologischen Kernveränderungen (s. 5.3.1 und 4.2.1), vorausgegangene Studien bezüglich der Veränderungen rund um den NPC und seiner Bestandteile (Nukleoporine). So wurde gezeigt, dass HGPS-Fibroblasten ein *Clustering* der NPC's zeigen (Eriksson et al. 2003, Goldman et al. 2004). Ferner gibt es einige Untersuchungen über die Lokalisation verschiedener Nukleoporine in Progerie-Zellen. So konnten in HGPS-Zellen mit Hilfe des Nup62-, Nup153-, Nup155-, Nup214- und Nup358-bindenden Antikörpers MAb414 intra- und transnukleäre Strukturen markiert werden (McClintock et al. 2006). Nup62 befindet sich nahe der mittleren Ebene des NPC und spielt eine entscheidende Rolle im Transportprozess durch den NPC (Pante et al. 1995, Starr et al. 1990, Kita et al. 1993, Hu et al. 1996, Dabauvalle et al. 1990). Untersuchungen mit einem monoklonalem Antikörper gegen Nup62 zeigten die Abwesenheit von Nup62 in den Herniationen/Lobulationen der Kernmembran von DsRed-Prälamina A  $\Delta 50/\Delta 90$ -exprimierenden HeLa-Zellen. In diesen Versuchsreihen konnte man auch ähnliches für Crm1-GFP beobachten, während GFP-Nup153 nicht nur im Bereich der Kernhülle (wie Nup62 und Crm1) sondern auch innerhalb der intra- und transnukleäre

Strukturen mit DsRed-Prälamin A  $\Delta 50/\Delta 90$  kolokalisierte (Busch et al. 2009a). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Nup153 auch mit nicht Progerie-assoziierten Prälamin A-Mutanten wie R527P (Bechert et al. 2003) sowie mit N195K und R386K (Hübner et al. 2006b) in nukleären Aggregaten kolokalisiert. Nup153 und Nup88 sind Nukleoporine, für die direkte Interaktionen mit Laminen bislang nachgewiesen werden konnten (Lenz-Böhme et al. 1997, Lussi et al. 2011, Al-Haboubi T. – Dissertation 2009). Nup153 befindet sich im *nuclear basket* und hat eine große Bedeutung für die Architektur des NPCs. Nup153 kann ferner als ein sehr dynamisches Protein (Daigle et al. 2001) mit Schlüsselfunktionen für Kernimport- und Kernexportprozesse bezeichnet werden (Bastos et al. 1996).

## 5.2 Quantifizierung von Kernproteinimportvorgängen

Um verschiedene Proteintransportwege über die Zellkernmembran bezüglich subzellulären Lokalisationssignalen, Regulationsmechanismen, Kargomolekül-Kernimport/exportrezeptor-Interaktionen und Transportkinetiken im Speziellen studieren zu können, wurden in der Vergangenheit verschiedene Methoden entwickelt. In erster Linie wurden hierzu die zu untersuchenden Zellen mit dem für das zu untersuchende Kargomolekül kodierenden Expressionsplasmid transfiziert und daran anschließend fixiert. Dabei ermöglicht die **Confocal-Laser-Scanning-Microscopy (CLSM)** nicht nur die qualitative Auswertung (wie bei der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie) sondern auch die quantitative Auswertung der subzellulären Lokalisation des betreffenden Proteins. Auf diese Weise kann das Fließgleichgewicht eines Kargomoleküls zwischen verschiedenen Kompartimenten quantitativ bestimmt werden (Lam et al. 1999, Lam et al. 2002) (s. 4.3 - GFP-M9 und GFP-NLS; s. 4.7 - trunkierte Prälamin A Mutanten). Die Visualisierung des Proteins und damit auch dessen quantitative Messung können prinzipiell entweder durch die indirekte Immunfluoreszenz oder auch durch biofluoreszente Proteine (z.B. GFP und DsRed) erfolgen. Solche Analysen des nukleozytoplasmatischen Proteintransportes geben somit Hinweise auf die Fähigkeit eines Zelltyps ein bestimmtes Protein in einem Kompartiment, wie dem Zellkern, zu akkumulieren. Bei sogenannten *shuttelnden*, mit NLS- und NES-ausgestatteten, Proteinen (wie dem Rev-Protein) lassen sich Kernimport und -export nicht voneinander getrennt beurteilen. Eine Möglichkeit dieser Versuchsanordnung eine differenziertere Aussagekraft zu

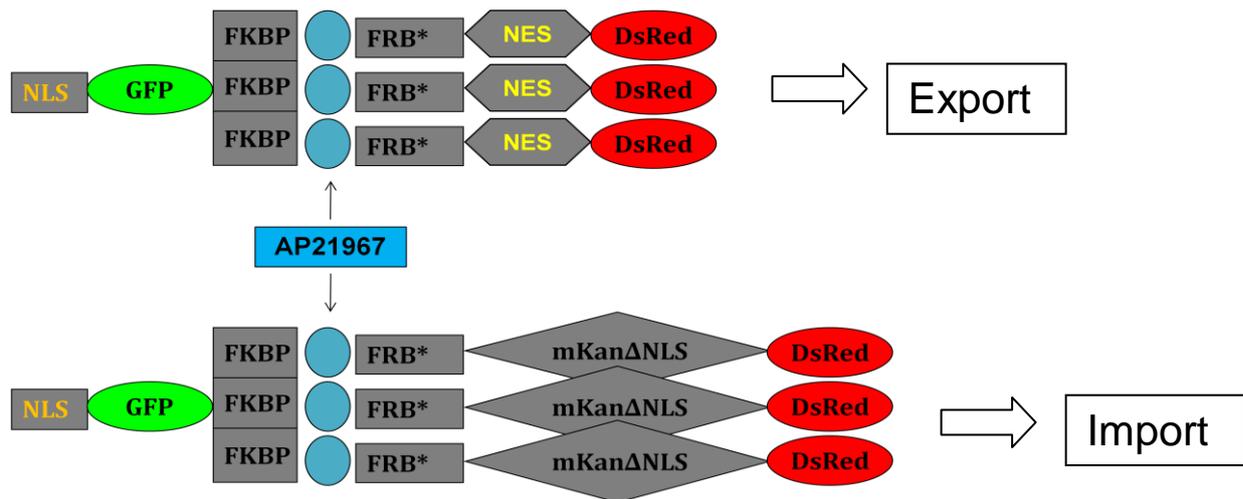
verleihen besteht darin eine Transportrichtung künstlich auszuschalten. So wurde es möglich durch die LMB-vermittelte Inhibierung des Exportrezeptors Crm1 (Fornerod et al. 1997) den nukleären Import von Rev-GFP näher zu beurteilen (s. 4.3). Aufgrund der ausgeprägten und schnellen Wirkung von LMB eignete sich dieses Prinzip auch für die Lebendzellmikroskopie, welche die Erstellung einer Importkinetik für Rev-GFP in ZMPSTE24<sup>-/-</sup>-Fibroblasten ermöglichte (s. 4.4).

Eine weitere prinzipiell mögliche Herangehensweise zur Quantifizierung des Kernproteinimports basiert auf der Behandlung adhärenter Zellen mit dem Detergens Digitonin, das die Zytoplasmamembran, jedoch nicht die Kernhülle, selektiv permeabilisiert. Aufgrund der damit einhergehenden Depletion zytoplasmatischer Transportfaktoren ist für die Wiederherstellung des Kernproteinimports die Zugabe u.a. von entsprechenden Importinen und RanGTP notwendig, um die subzelluläre Verteilung fluoreszenzmarkierter Kargoproteine quantitativ erfassen zu können (Adam et al. 1990, Adam E. und Adam S. 1994). Eine Modifikation dieser Methode stellt die selektive, mechanische Permeabilisierung der Zytoplasmamembran dar (Jans et al. 1991). Diesen Methoden ist allerdings gemeinsam, dass chemische (Digitonin) oder mechanische Kräfte auf die Zelle einwirken. Alternativ können Kargomoleküle mit Hilfe der Mikroinjektion in die Zellen eingebracht werden. Ein Ansatz um Zellen mit nicht invasiven Vorgehensweisen auf möglichst physiologische Weise zu untersuchen ist die induzierte Heterodimerisierung von exprimierten Fusionsproteinen. In den ersten Studien zu dieser Thematik wurde die Reaktion des humanen FKBP12-Proteins mit Rapamycin (Bierer et al. 1990, Dumont et al. 1990) und dessen anschließende Verknüpfung mit einer Bindedomäne (FRB\*) von FRAP/mTor (*FKBP-12 and rapamycin-associated protein/mammalian target of rapamycin*) (Chen et al. 1995) ausgenutzt, um durch induzierten Export die NES des Transkriptionsfaktors NF-ATc zu identifizieren (Klemm et al. 1997). Da es sich jedoch bei Rapamycin um einen potenten Inhibitor des Zellwachstums handelt versuchte man im Folgenden die damit einhergehenden negativen Effekte durch die Herstellung von Rapamycin-Analoga auszuschalten (Bayle et al. 2006). Das von uns verwendete ARGENT™ *Regulated Heterodimerization Kit 2.0* von ARIAD beinhaltet eine mutierte FRB-Domäne (T2098L; FRB\*), welche die Spezifität der Bindung von AP21967 (ein Rapamycin-Analogon) mit exogen exprimierten FKBP12-/Frb\*-enthaltenden Heterodimeren gegenüber endogenen FKBP12- und FRAP-Proteinen

garantiert. Es handelt sich hierbei also um ein geeignetes System Importkinetiken unter nahezu physiologischen Bedingungen durchzuführen.

In den verschiedenen Versuchsreihen des von uns entwickelten *Heterodimerisierungs-Importassay* (s. 4.5) ließ sich die Importeffizienz des Kargomoleküls (DsRed-Fusionsprotein) sowohl durch Erhöhung der Konzentration des Heterodimerisierers (AP21967) als auch durch Verwendung eines Fusionsproteins mit drei FKBP-Bindedomänen (NLS-GFP-FKBP<sub>3x</sub>) steigern. Leider erlaubten selbst diese Optimierungen nicht (aufgrund von Fokusdrift und Zellbewegungen) quantitative Importstudien an lebenden Zellen durchzuführen. Bei einem hierfür praktikablen Zeitfenster von ca. 1h waren die  $F_{n/c}$ -Veränderungen in HeLa-Zellen zu minimal, weshalb auf weiterführende kinetische Untersuchungen verzichtet werden mußte. Jedoch konnte dieses Prinzip erfolgreich auf ZMPSTE24<sup>-/-</sup> Fibroblasten im Sinne einer quantitativen  $F_{n/c}$ -Analyse 16h post Transfektion angewendet werden (s. 4.6).

Unter Verwendung des *ARGENT™ Regulated Heterodimerization Kit 2.0* von ARIAD konnte bereits auch ein System zum induzierbaren Kernproteinexport etabliert werden (Busch A. - Dissertation 2012). Diese Studien zeigten eine (verglichen mit dem *Heterodimerisierungs-Importassay*) wesentlich deutlichere Änderung des  $F_{n/c}$  in gleicher Zeit ( $\Delta F_{n/c}$  der GFP-Fluoreszenz  $\sim 5,5$ ;  $F_{n/c}(t_0) \sim 6 \Rightarrow F_{n/c}(t_{1h}) \sim 0,5$ ). Dies könnte in der vergleichsweise höheren molekularen Anzahl der transportvermittelnden Sequenzen der AP21967-dimerisierten Proteine gründen (3 NES des Exportkargos vs. 1 NLS des Importkargos, s. Abb. 5-1).



**Abb.5-1:** Vergleich der Fusionsproteine im *Exportassay* (oben, Busch A. - Dissertation 2012) und *Importassay* (unten). Dargestellt ist die molekulare Anzahl der Transportsequenzen. So enthält das zu exportierende Heteromer 3 Export- (NES) und 1 Importsequenz (NLS), während das zu importierende Heteromer nur eine Importsequenz (NLS) enthält.

### 5.3 Nukleäre Veränderungen und Kernproteinimport bei Progeriezellen

#### 5.3.1 Effekte der ektopten Prälamins A $\Delta 50/\Delta 90$ - Expression auf die Zellkernmorphologie kultivierter HeLa - Zellen

Die unter 4.2.1 beschriebenen Transfektionsstudien zeigen, dass die 16 stündige Expression von DsRed-Prälamins A (PräLaA)  $\Delta 50/\Delta 90$  in HeLa-Zellen zur Ausbildung typischer, dysformer Zellkerne führt. Zu den Kernveränderungen zählen hierbei sowohl Herniationen/Lappenbildungen der Kernhülle (Goldman et al. 2004, Glynn und Glover 2005, Mallampalli et al. 2005, Busch et al. 2009a, Hübner et al. 2006a) als auch die Bildung von intra-/transnukleären strang-/punktartigen Aggregaten (Bechert et al. 2003, Hübner et al. 2006b). Nukleäre Dysmorphien wurden bereits in der Vergangenheit für HGPS- und RD-Fibroblasten (Navarro et al. 2004, Goldmann et al. 2004, Toth et al. 2005) sowie für GFP-HGPS-exprimierende, kultivierte Zellen (Goldmann et al. 2004) beschrieben.

In der Quantifizierung (s. 4.2.2) zeigte sich ein deutlich höherer Anteil dysmorpher Kerne bei den DsRed-PräLaA $\Delta 50/\Delta 90$ -exprimierenden (38.3%  $\pm 4$  und 44.3%  $\pm 6$ ) als bei DsRed-PräLaA-exprimierenden HeLa-Zellen (9.9%  $\pm 4$ ). Ähnliche Ergebnisse erbrachte die Untersuchung von DsRed-PräLaA $\Delta 50/\Delta 90$ -exprimierenden humanen Fibroblasten (PräLaA: 13.8%  $\pm 2.5$ ; PräLaA $\Delta 50$ : 58.7%  $\pm 6.6$ ; PräLaA $\Delta 90$ : 52.4%  $\pm 4.7$ ).

Allerdings ist festzustellen, dass sich trotz der deutlich unterschiedlichen Krankheitsverläufe beider Mutanten quantitativ (sowie qualitativ) keine signifikanten Unterschiede *in vitro* ergaben. Vor diesem Hintergrund sind Studien von Bridger et al. (2004) und Goldmann et al. (2004) zu erwähnen. HGPS-Fibroblasten hoher Passagezahl zeigten hier einen signifikant höheren Anteil an dysformen Zellkernen als HGPS-Fibroblasten niedriger Passagezahl, was auf eine Akkumulation von Progerin über die Zeit und damit auch auf einen konzentrationsbedingten Effekt dieser Deletionsmutante auf nukleäre Strukturen hindeutet. Demnach könnte die 16 stündige Inkubationszeit nach Transfektion mit entsprechenden Konstrukten zu gering sein um signifikante Unterschiede zwischen den beiden Deletionsmutanten (PräLaA $\Delta$ 50 bzw.  $\Delta$ 90) zu messen. Untersuchungen von Hübner et al. (2006b) zeigten innerhalb einer Beobachtungszeit von 24h bis maximal 96h keinen signifikanten, zeitabhängigen Anstieg der Anzahl dysmorpher Zellkerne bei GFP-PräLaA $\Delta$ 50-exprimierenden HeLa-Zellen.

Für eine mögliche Erhöhung der nukleären Dysmorphie mit der Expressionsdauer spricht der Vergleich der unter 4.2.2 erläuterten quantitativen Beobachtungen mit Immunfluoreszenzuntersuchungen von Busch A. (Dissertation 2012). RD-Fibroblasten zeigten hier mit 72% einen noch höheren Anteil dysmorpher Kerne als Wildtyp-Fibroblasten (14%).

### **5.3.2 Reversibilität nukleärer Dysmorphien durch Farnesyltransferaseinhibitoren**

In den Untersuchungen ließ sich die für HGPS-Fibroblasten (Yang et al. 2005, Glynn et al. 2005, Capell et al. 2005) und RD-Fibroblasten (Toth et al. 2005) beschriebene Reversibilität morphologischer Kernveränderungen durch die Behandlung mit dem Farnesyltransferaseinhibitoren (FTI - hier Lovastatin) auch an DsRed-PräLaA  $\Delta$ 50/ $\Delta$ 90-exprimierenden Fibroblasten sowie HeLa-Zellen zeigen. Signifikante Unterschiede zwischen den Deletionsmutanten ( $\Delta$ 50 bzw.  $\Delta$ 90) ergaben sich hierbei nicht.

Auch *in vivo* ließen sich bereits positive FTI-Effekte nachweisen. So konnte in einem HGPS-Mausmodell durch den Einsatz von FTI's eine Verzögerung des Beginns sowie der Progression kardiovaskulärer Schäden gezeigt werden (Capell et al. 2008). Ebenso wurde eine Verlängerung der Lebenspanne von HGPS- und RD-

Mäusen durch die Behandlung mit FTI's beobachtet (Young et al. 2006). Die therapeutische Anwendung von FTI's bei Patienten erfolgt innerhalb von Studien seit März 2009. Mögliche Effekte sind aktuell noch nicht zu beurteilen. Erste Ergebnisse zeugen jedoch von der Verträglichkeit von FTI's für den menschlichen Organismus.

### **5.3.3 Veränderungen des nukleären Proteinimports in Prälamina A $\Delta 50/\Delta 90$ - exprimierenden HeLa - Zellen und ZMPSTE24<sup>-/-</sup> - Fibroblasten**

Die Ergebnisse der Untersuchungen deuten darauf hin, dass die bereits ausführlich beschriebenen nukleären Veränderungen von Progeriezellen einen negativen Effekt auf den nukleären Import haben. In verschiedenen Versuchsanordnungen wurden hierzu nukleäre Importaktivitäten ausgewählter karyophiler Proteine in ZMPSTE24<sup>-/-</sup>-Fibroblasten (s. 4.4 und 4.6) und PräLaA $\Delta 50/\Delta 90$ -exprimierenden HeLa-Zellen (s. 4.3) untersucht und mit den jeweiligen Wildtyp-Fibroblasten bzw. PräLaA-exprimierenden HeLa-Zellen verglichen. Hierbei zeigte sich in allen „Progerie-Zellen“ eine verminderte nukleäre Akkumulation (s. 4.3 und 4.6) bzw. eine veränderte Importkinetik (s. 4.4) der verwendeten karyophilen Fusionsproteine. Die LMB-abhängige Importkinetik von Rev-GFP in ZMPSTE24<sup>-/-</sup>-Fibroblasten zeigte schon nach 24min signifikante Unterschiede gegenüber der Rev-GFP-Importkinetik in Wildtyp-Fibroblasten. Analog zu den morphologischen Veränderungen (s. 4.2.1 und 5.3.1) konnte zwischen den PräLaA $\Delta 50/\Delta 90$ -exprimierenden Zellen ebenfalls kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Kernimporteffizienz festgestellt werden.

In den Studien wurden (wie bereits in 4.3 erläutert) zwei unterschiedliche Importwege an PräLaA $\Delta 50/\Delta 90$ -exprimierenden HeLa-Zellen untersucht. Ein Importweg wird über die direkte Bindung des Kargos (GFP-M9 und Rev-GFP) an Mitglieder der Importin  $\beta$ -Familie vermittelt (Importin  $\beta 1$  und Importin  $\beta 2$  - Nakielny et al. 1996, Pollard et al. 1996, Henderson und Percipalle 1997, Henderson und Eleftheriou 2000), der andere benötigt zwischen Kargo (GFP-NLS) und Importin  $\beta 1$  ein Adaptermolekül (Importin  $\alpha$  - klassischer Import; Rexach und Blobel 1995, Görlich et al. 1996). Da beide Proteinimportwege nicht signifikante Unterschiede hinsichtlich der subzellulären Kargo-Verteilung in den PräLaA $\Delta 50/\Delta 90$ -exprimierenden Zellen (s. 4.3) erbrachten und ähnliche Ergebnisse auch in ZMPSTE24<sup>-/-</sup>-Fibroblasten erzielt wurden, ist folglich zu vermuten, dass nicht selektiv bestimmte Importwege betroffen sind sondern, dass eher unspezifische, durch diverse Veränderungen rund um den

Kernporenkomplex erklärbare, Strukturveränderungen bzw. Lokalisationsveränderungen relevanter Nukleoporine die reduzierten Importeffizienzen bedingen. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass Expressionen Laminopathie-verursachender Prälamins A-Mutanten Dyslokalisationen von Nukleoporinen bzw. NPC-assoziierten Proteinen verursachen (Kelley et al. 2011, Dialynas et al. 2012).

#### **5.3.4 Prälamins A - exprimierende HeLa - Zellen**

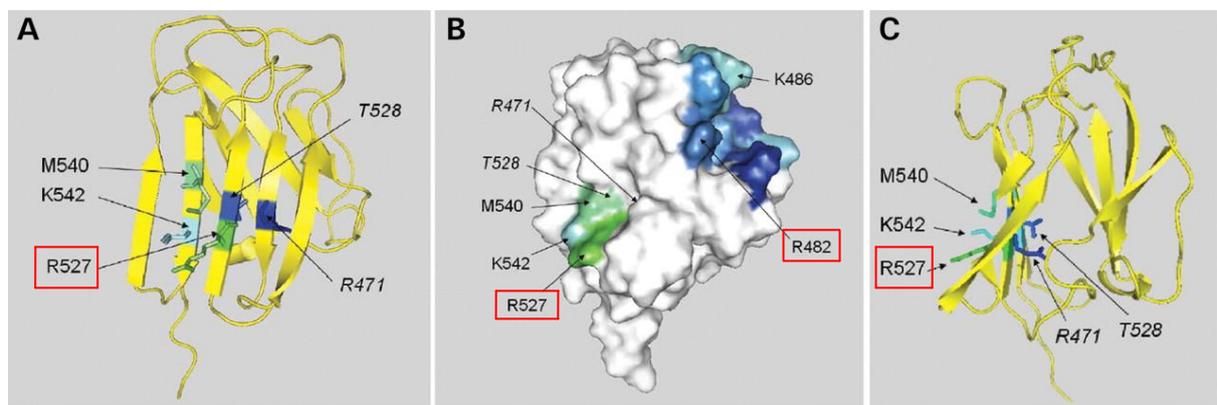
Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass sich PräLaA $\Delta$ 50/ $\Delta$ 90-exprimierende HeLa-Zellen hinsichtlich zyt nukleärer Proteinimportprozesse als Progerie-Modellzellen eignen. So zeigen sie vergleichbar zu ZMPSTE24<sup>-/-</sup>-Fibroblasten neben morphologischen Kernveränderungen auch Veränderungen des Kernimports karyophiler Proteine. Die Überexpression von PräLaA dagegen scheint dabei für die Effizienz nukleärer Kernimportprozesses von untergeordneter Bedeutung zu sein. So wurden an Rev-GFP-, GFP-M9- und GFP-NLS-exprimierenden HeLa-Zellen vergleichbare Fn/c-Werte gemessen wie an PräLaA-koexprimierenden Zellen.

#### **5.4 Subzelluläre Lokalisation trunkierter Prälamins A - Mutanten in HeLa - Zellen**

Um ihre zahlreichen zellulären Funktionen (s. 2.2.2) wahrnehmen zu können ist ein effizienter nukleärer Import von Laminen notwendig. Um dies zu gewährleisten tragen Lamine eine SV40 T-Ag-ähnliche und somit eine für Importin  $\alpha$  typische NLS, die sich innerhalb der Schwanz-Domäne (AS 386 – 664) befindet (Löwinger und McKeon 1988) (Aufbau eines Prälamins A-Monomers s. 2.1.2). Der Kernimport karyophiler Proteine ist verschiedenen regulatorischen Mechanismen, d.h. verschiedenen Arten der Modulation der NLS-Erkennung durch Importine, unterworfen. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass Mutationen entweder innerhalb oder benachbart zur NLS den effizienten Kernimport vieler Kargo-Moleküle verringern können (Jans und Hübner 1996). Dies konnte beispielsweise für die NLS-Mutante R419C nachgewiesen werden und ebenso für die carboxyterminal der Ig-ähnlichen Domäne lokalisierten Deletionen der HGPS- und RD-verursachenden Prälamins A-Mutanten (Priv.-Doz. Dr. S. Hübner, unveröffentlicht). Tatsächlich verursacht die 50 Aminosäuren umfassende Deletion innerhalb des

Progerinmoleküls eine erhöhte Kompaktheit der Schwanz-Domäne (Qin et al. 2011) - ein Umstand, der infolge einer damit assoziierten reduzierten NLS-Importin  $\alpha$ -Wechselwirkung die reduzierte Importaktivität des Prälamins A $\Delta$ 50-Moleküls erklären könnte.

In dieser Arbeit wurde die nukleozytoplasmatische Lokalisation der Prälamins A-Mutanten R482L und L527P mit Prälamins A verglichen. Hierbei wurden Deletionsmutanten verwendet, denen die Kopf- ( $\Delta$ H - head) und auch die Stab-Domäne ( $\Delta$ R - rod) fehlten, um subzelluläre Fluoreszenzmessungen durchführen zu können, da solchermaßen trunkierte Moleküle ihren karyophilen Charakter beibehielten, aber inkompetent waren in die Kernlamina eingebaut zu werden. Beide Punktmutationen befinden sich innerhalb der Ig-ähnlichen Domäne (AS 411–553) der Schwanz-Domäne. In der dreidimensionalen, aus  $\beta$ -Faltblättern bestehenden Struktur sind die AS-Reste an Position 482 und 527 nach außen gerichtet (s. Abb.5-2) (Verstraeten et al. 2006). Es wurde daher vermutet, dass aufgrund der Lokalisation Mutationen der Aminosäuren R482 und L527 möglicherweise Konformationsänderungen innerhalb der Ig-ähnlichen Domäne bzw. der Schwanz-Domäne induzieren, die sich schließlich auf die Kernimporteigenschaften des Gesamtmoleküls positiv oder negativ auswirken. Für beide Mutanten ergaben sich gegenüber der Deletionsmutante Prälamins A keinerlei signifikante Unterschiede bezüglich der relativen Fn/c-Werte ( $\Delta$ HR-PräLaAR482L – Fn/c(%):  $99,8 \pm 2,7$ ;  $\Delta$ HR-PräLaAR527P – Fn/c(%):  $109,7 \pm 2,9$  versus  $\Delta$ HR-PräLaA – Fn/c(%): 100).



**Abb. 5-2 (A-C)** (abgewandelt nach Verstraeten et al. 2006): Durch NMR-Spektroskopie erstellte dreidimensionale Struktur der Ig-ähnlichen Domäne (AS 411–553) von A-Typ Laminen. Dargestellt sind potentielle, mit Laminopathien assoziierte Mutationsorte. Darunter befinden sich auch (rot markiert) die Aminosäuren an Position 527 und 482, deren Reste in Richtung Zytoplasma ausgerichtet sind.

## **6. Literatur**

Adam E., Adam S. (1994): Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope. *J Cell Biol*, 125:547-555.

Adam S., Marr R., Gerace L. (1990): Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J Cell Biol*, 111:807-816.

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

Akhtar A. und Gasser S. M. (2007): The nuclear envelope and transcriptional control. *Nature Rev Genet*, 8: 507-517

Al-Haboubi T., Shumaker D., Köser J., Wehnert M., Fahrenkrog B (2011): Distinct association of the nuclear pore protein Nup153 with A- and B-type lamins. *Nucleus*, 2(5): 500-9.

Al-Haboubi T. – Dissertation (2009): Characterisation of the molecular links between the nuclear pore complex and the nuclear lamins and reconstitution of the xenopus oocyte lamin assembly in vitro.

ARIAD Pharmaceutical, Inc., 26 Landsdowne St, Cambridge, MA, 02139

Arts G. J., Kürsten S., Romby P., Ehresmann B., Mattaj I. W. (1998): The role of exportin-t in selective nuclear export of mature tRNAs. *EMBO J*, 17(24): 7430-7441.

Bakay M., Wang Z., Melcon G., Schiltz L., Xuan J., Zhao P., Sartorelli V., Seo J., Pegoraro E., Angelini C., Shneiderman B., Escolar D. (2006): Nuclear envelope dystrophies show a transcriptional fingerprint suggesting disruption of Rb-MyoD pathways in muscle regeneration. *Brain*, 129(4):996-1013.

Baricheva E., Berrios M., Bogachev S., Borisevich I., Lapik E., Sharakhov I., Stuurman N., Fisher P. (1996): DNA from *Drosophila melanogaster* beta-heterochromatin binds specifically to nuclear lamins in vitro and the nuclear envelope in situ. *Gene*, 171: 171-176.

Barr M. L., Bertram E. G. (1949): A Morphological Distinction between Neurones of the Male and Female, and the Behaviour of the Nucleolar Satellite during Accelerated Nucleoprotein Synthesis. *Nature*, 163 (4148): 676-7.

Barrowman J., Hamblet C., George C.M., Michaelis S. (2008): Analysis of prelamin A biogenesis reveals the nucleus to be a CaaX processing compartment. *Mol Biol Cell*, 19(12): 5398-408.

Bastos R., Lin A., Enarson M., Burke B. (1996): Targeting and function in mRNA export of nuclear pore complex protein Nup153, *J Cell Biol*, 134: 1141-1156.

- Bayle J., Grimley J., Stankunas K., Gestwicki J., Wandless T., Crabtree G. (2006): Rapamycin analogs with differential binding specificity permit orthogonal control of protein activity. *Chem Biol*, 13: 99-107.
- Bechert K., Lagos-Quintana M., Harborth J., Weber K., Osborn M. (2003): Effects of expressing lamin A mutant protein causing Emery-Dreifuss muscular dystrophy and familial partial lipodystrophy in HeLa cells. *Exp Cell Res*, 286(1): 75-86
- Benavente R., Krohne G. (1986): Involvement of nuclear lamins in postmitotic reorganization of chromatin as demonstrated by microinjection of lamin antibodies. *J Cell Biol*, 103(5):1847-54.
- Benson E., Lee S., Aaronson S. (2010): Role of progerin-induced telomere dysfunction in HGPS premature cellular senescence. *J Cell Sci*, 123: 2605-2612
- Bierer B., Mattila P., Standaert R., Herzenberg L., Burakoff S., Crabtree G., (1990): Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by alternative complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:9231-9235.
- Bischoff F. R., Görlich D. (1997): RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin  $\beta$ -related nuclear transport factors, *FEBS Lett*, 419: 249-254.
- Bischoff F. R., Ponstingl H. (1991): Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature*, 354: 80-82.
- 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. (1999): Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature Genet*, 21:285-8.
- Bridger J., Kill I. (2004): Aging of Hutchinson-Gilford progeria syndrome fibroblasts is characterised by hyperproliferation and increased apoptosis. *Exp Gerontol*, 39(5): 717-24.
- Broers J.L., Machiels B.M., van Eys G.J., Kuijpers H.J., Manders E.M., van Driel R., Ramaekers F.C. (1999): Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. *J Cell Sci*, 112: 3463-3475.
- Broers J.L., Ramaekers F.C., Bonne G., Yaou R.B., Hutchison C.J. (2006): Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev*, 86: 967-1008.
- Burke B., Gerace L. (1986): A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *Cell*, Feb 28, 44(4): 639-52
- Busch A. – Dissertation (2012): Prälamina A und Progerie – verursachende Mutanten im Kontext nukleärer Transportprozesse, der Kernlaminaintegrität und CaaX – Prozessierung.

Busch A., Kiel T., Heupel W.M., Wehnert M., Hübner S. (2009a): Nuclear protein import is reduced in cells expressing nuclear envelopathy-causing lamin A mutants. *Exp Cell Res.* 315(14): 2373-85.

Busch A., Kiel T., Hübner S. (2009b): Quantification of nuclear protein transport using induced heterodimerization. *Traffic.* 10(9): 1221-7.

Cai M., Huang Y., Ghirlando R., Wilson K.L., Craigie R., Clore, G.M. (2001): Solution structure of the constant region of nuclear envelope protein LAP2 reveals two LEM-domain structures: one binds BAF and the other binds DNA. *EMBO J*, 20: 4399-4407.

Cao K., Capell B.C., Erdos M.R., Djabali K., Collins F.S. (2007): A lamin A protein isoform overexpressed in Hutchinson- Gilford progeria syndrome interferes with mitosis in progeria and normal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 4949-4954.

Capell B., Erdos M., Madigan J., Fiordalisi J., Varga R., Conneely K., Gordon L., Der C.J., Cox A.D., Collins F. (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.

Capell B., Olive M., Erdos M., Cao K., Faddah D., Tavares U., Conneely K., Qu X., San H., Ganesh S., Chen X. (2008): A farnesyltransferase inhibitor prevents both the onset and late progression of cardiovascular disease in a progeria mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(41):15902-7.

Claussen M., Rudt F., Pieler T. (1999): Functional modules in ribosomal protein L5 for ribonucleoprotein complex formation and nucleocytoplasmic transport. *J. Biol. Chem.* 274(48): 33951-33955.

Chang S., Multani AS., Cabrera NG., (2004): Essential role of limiting telomeres in the pathogenesis of Werner syndrome. *Nature Genetics*, 36: 877-82.

Chen J., Zheng X., Brown E., Schreiber S. (1995): Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92:4947–4951.

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. und Oshima J. (2003): LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. *Lancet* 362: 440-445.

Conti E, Izaurralde E. (2001): Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr Opin Cell Biol*, 13(3):310-9.

Corrigan D.P., Kuszczak D., Rusinol A.E., Thewke D.P., Hrycyna C.A., Michaelis S., Sinensky M.S. (2005): Prelamin A endoproteolytic processing in vitro by recombinant Zmpste24. *Biochem. J.* 387: 129–138.

Cramer A., Whitehorn E., Tate E., Stemmer WP. (1996): Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol.* 14(3):315-9

Crisp M, Liu Q, Roux K, Rattner JB, Shanahan C, Burke B, Stahl PD, Hodzic D. (2006): Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol.*, 172(1):41-53.

Croft J.A., Bridger J.M., Boyle S., Perry P., Teague P., Bickmore W.A. (1999): Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J. Cell Biol.* 145: 1119–1131.

Csoka A., English S., Simkevich C., Ginzinger D., Butte A., Schatten G., Rothman F., Sedivy J. (2004): Genome-scale expression profiling of Hutchinson-Gilford progeria syndrome reveals widespread transcriptional misregulation leading to mesodermal/mesenchymal defects and accelerated atherosclerosis. *Aging Cell*, 3: 235-43.

Dabauvalle M.C., Loos K., Scheer U. (1990): Identification of a soluble precursor complex essential for nuclear pore assembly in vitro. *Chromosoma*, 100: 56-66.

D'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, (2003): A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 426: 194-8.

Dahl K., Scaffidi P., Islam M. (2006): Distinct structural and mechanical properties of the nuclear lamina in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc. Natl Acad Sci.*, 103:10271–6.

Daigle N., Beaudouin J., Hartnell L., Imreh G., Hallberg E., Lippincott-Schwartz J., Ellenberg J. (2001): Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells. *J Cell Biol* 154: 71-84.

Dechat T., Gotzmann J., Stockinger A., Harris C.A., Talle M.A., Siekierka J.J., Foisner, R. (1998): Detergent-salt resistance of LAP2 alpha in interphase nuclei and phosphorylation-dependent association with chromosomes early in nuclear assembly implies functions in nuclear structure dynamics. *EMBO J*, 17: 4887-4902.

Dechat T., Vlcek S., 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.

Dechat T., Shimi T., Adam S.A., Rusinol A.E., Andres D.A., Spielmann H.P., Sinensky M.S., Goldman R.D. (2007): Alterations in mitosis and cell cycle progression caused by a mutant lamin A known to accelerate human aging. *Proc Natl Acad Sci*, 104: 4955-4960.

Dechat T., Pflieger K., Sengupta K. (2008): Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin (Review); *Genes Dev*, 22: 832-853

Decostre V., Ben Yaou R., Bonne G. (2005): Laminopathies affecting skeletal and cardiac muscles: clinical and pathophysiological aspects. *Acta Myol*, 24: 104-109.

Delbarre E., Tramier M., Coppey-Moisan M., Gaillard C., Courvalin J.C., Buendia B. (2006): The truncated prelamin A in Hutchinson-Gilford progeria syndrome alters segregation of A-type and B-type lamin homopolymers. *Hum Mol Genet*, 15(7):1113-22.

De Sandre-Giovannoli, A., Chaouch M., Kozlov S., Vallat J.-M., Tazir M., Kassouri N., Szepietowski P., Hammadouche T., Vandenberghe A., Stewart C.L., Grid D., Lévy N. (2002): Homozygous Defects in LMNA, Encoding Lamin A/C Nuclear-Envelope Proteins, Cause Autosomal Recessive Axonal Neuropathy in Human (Charcot-Marie-Tooth Disorder Type 2) and Mouse. *Am J Hum Genet*,70:726-36.

De Sandre-Giovannoli A., Bernard R., Cau P., Navarro C., Amiel J.,Boccaccio I., Lyonnet S., Stewart C.L., Munnich A., Le Merrer M., Levy N. (2003). Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300: 2055.

Dialynas G., Flannery K., Zirbel L., Nagy P., Mathews K., Moore S., Wallrath L. (2012): LMNA variants cause cytoplasmic distribution of nuclear pore proteins in *Drosophila* and human muscle. *Hum Mol Genet*, 21(7):1544-56

Ding S., Shen C. (2008): Model of human aging: Recent findings on Werner's and Hutchinson-Gilford progeria syndromes.*Clin Interv Aging*, 3(3):431-44. Review.

Dingwall C., Sharnick S. U., Laskey, R. A. (1982): A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. *Cell*, 30: 449-458.

Dessev G., Iovcheva-Dessev C., Bischoff J.R., Beach D., Goldman R. (1991): A complex containing p34cdc2 and cyclin B phosphorylates the nuclear lamin and disassembles nuclei of clam oocytes in vitro. *J Cell Biol*, 112:523-33.

Dhe-Paganon S., Werner E.D., Chi Y.I., Shoelson S.E. (2002): Structure of the Globular Tail of Nuclear Lamin. *J Biol Chem*, 144:225-40.

Dorner D., Vlcek S., Foeger N., Gajewski A., Makolm C., Gotzmann J., Hutchison C., Foisner R. (2006): Lamina-associated polypeptide 2alpha regulates cell cycle progression and differentiation via the retinoblastoma-E2F pathway. *J Cell Biol*, 173(1):83-93.

Dreuillet C., Tillit J., Kress M., Ernoult-Lange M. (2002): In vivo and in vitro interaction between human transcription factor MOK2 and nuclear lamin A/C. *Nucleic Acids Res*, 30(21):4634-42.

Dreuillet C., Harper M., Tillit J., Kress M., Ernoult-Lange M. (2008): Mislocalization of human transcription factor MOK2 in the presence of pathogenic mutations of lamin A/C. *Biol Cell*, 100(1):51-61.

Du X., Shen J., Kugan N. (2004): Telomere shortening exposes functions for the Werner and Bloom syndrome genes in mice. *Mol Cell Biol*, 24: 8437-46.

Duband-Goulet I., Courvalin J. C. (2000): Inner nuclear membrane protein LBR preferentially interacts with DNA secondary structures and nucleosomal linker. *Biochem*, 39: 6483-6488.

Dumont F., Melino M., Staruch M., Koprak S., Fischer P., Sigal N. (1990): The immunosuppressive macrolides FK-506 and rapamycin act as reciprocal antagonists in murine T cells. *J Immunol*, 144: 1418-1424.

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. (2003): Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423: 293-298.

Fagotto F., Glück U., Gumbiner BM. (1998): Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Curr Biol*, 8(4):181-90.

Fatkin D., MacRae C., Sasaki T., Wolff M.R., Porcu M., Frenneaux M., Atherton J., Vidaillet H.J. Jr., Spudich S. (1999): Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med*, 341:1715-24.

Favreau C., Dubosclard E., Östlund C., Vigouroux C., Capeau J., Wehnert M., Higuier D., Worman H. J., Courvalin J.-C., 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.

Fields A.P. und Thompson L.J. (1995): The regulation of mitotic nuclear envelope breakdown: A role for multiple lamin kinases. *Prog. Cell Cycle Res*, 1: 271-286.

Fischer U., Huber J., Boelens W. C., Mattaj I. W., Luhrmann R. (1995): The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell*, 82: 475-483.

Fischer-Vize J., Mosley K. (1994): Marbles mutants: uncoupling cell determination and nuclear migration in the developing *Drosophila* eye. *Development*, 120(9):2609-18.

Fisher D.Z., Chaudhary N., Blobel G. (1986): cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc Nat Acad Sci*, 83:6450-4.

Foisner R., Gerace L. (1993): Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell* 73: 1267-1279.

Fornerod M., Ohno M., Yoshida M., Mattaj I. W. (1997): CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* Vol. 90, S. 1051-1060.

Franke W., Scheer U, Krohne G, Jarasch ED (1981): The nuclear envelope and the architecture of the nuclear periphery. *J. Cell Biol*, 91: 39-50.

Fukuchi K., Katsuya T., Sugimoto K., Kuremura M., Kim H.D., Li L. und Ogihara T. (2004): LMNA mutation in a 45 year old Japanese subject with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *J Med Genet*, 41: e67.

Fukuda M., Asano S., Nakamura T., Adachi M., Yoshida M., Yanagida M., Nishida E. (1997): CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* 390: 308-311.

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., Hotta Y. (1993): cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *EMBO J*, 12:97-106

Furukawa K., Inagaki H., Hotta Y. (1994): Identification and Cloning of an mRNA Coding for a Germ Cell-Specific A-Type Lamin in Mice. *Exp Cell Res*, 212:426-30.

Garg A., Speckman R.A., Bowcock A.M. (2002): Multisystem Dystrophy Syndrome Due to Novel Missense Mutations in the Amino-Terminal Head and Alpha-Helical Rod Domains of the Lamin A/C Gene. *Am J Med*, 112:549-55.

Geisler N., Weber K. (1982): The amino acid sequence of chicken muscle desmin provides a common structural model for intermediate filament proteins. *EMBO J*, 1:1649-56.

Gerace L., Burke B. (1988): Functional organization of the nuclear envelope. *Annu Rev Cell Biol*, 4: 335-374.

Gerace L., Blobel G. (1980): The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell*, 19: 277-287.

Glynn M.W., Glover T.W. (2005): Incomplete processing of mutant lamin A in Hutchinson-Gilford progeria leads to nuclear abnormalities, which are reversed by farnesyltransferase inhibition. *Hum Mol Genet*, 14: 2959-2969.

Görlich D., Pante N., Kutay U., U. Aebi U., Bischoff F.R. (1996): Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J*, 15: 5584-5594.

Görlich D., Kutay U.; (1999): Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15: 607-60. Review.

Goldberg M., Harel A., Brandeis M., Rechsteiner T., Richmond T.J., Weiss A.M., Gruenbaum Y. (1999): The tail domain of lamin Dm0 binds histones H2A and H2B. *Proc Natl Acad Sci*, 96: 2852-2857.

Goldfarb D. S., Corbet, A. H., Mason D. A., Harreman M. T., Adam S. A. (2004): Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol*, 14: 505-514.

Goldman R., Shumaker D., Erdos M. (2004): Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci*, 101: 8963-8.

Greber U., Gerace L. (1992): Nuclear protein import is inhibited by an antibody to a luminal epitope of a nuclear pore complex glycoprotein. *J Cell Biol*, 116(1):15-30.

Groß C., Haußerl., von der Wense A., Langner C., Simoens W., Bau O., Rompel R., Meyer W. und Rüschoff J. (1999): Restriktive Dermopathie. *Pathologie* 20: 365-370.

Gruenbaum Y., Goldman R. D., Meyuhass R., Mills E., Margalit A., Fridkin A., Dayani Y., Prokocimer M. und Enosh A. (2003): The nuclear lamina and its functions in the nucleus. *Int Rev Cyt.* 226: 1-62.

Gruenbaum Y., Margalit A., Goldman R., Shumaker D., Wilson K. (2005): The nuclear lamina comes of age. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(1):21-31.

Gruber J., Lampe T., Osborn M., 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.

Guelen L., Pagie L., Brasset E., Meuleman W., Faza M.B., Talhout W., Eussen B.H., de Klein A., Wessels L., de Laat W., van Steensel B. (2008) Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature*, 453: 948-951.

Hall M. N., Craik C., Hiraoka Y. (1990): Homeodomain of yeast repressor alpha 2 contains a nuclear localization signal. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87(18): 6954-6958.

Haque F., Lloyd D., Smallwood D., Dent C., Shanahan C., Fry A., Trembath R., Shackleton S. (2006): SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. *Mol Cell Biol*, 26(10):3738-51.

Harborth J., Elbashir S.M., Bechert K., Tuschl T., Weber K. (2002): Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci*, 114:4557-65.

Harris C.A., Andryuk P.J., Cline S.W., Mathew S., Siekierka J.J., 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.

Heald R., McKeon F. (1990): Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* 61:579-89.

Henderson B.R., Percipalle P. (1997): Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localization signal mediates specific binding to human importin-beta. *J Mol Biol*, 274: 693–707.

Henderson B.R., Eleftheriou A. (2000): A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals, *Exp Cell Res*, 256: 213-224.

Hennekes H., Nigg E. (1994): The role of isoprenylation in membrane attachment of nuclear lamins. *J Cell Sci*, 107: 1019-1029.

Hodzic D.M., Yeater D.B., Bengtsson L., Otto H., Stahl P.D. (2004): Sun2 is a novel mammalian inner nuclear membrane protein. *J Biol Chem*, 279(24):25805-12.

Hoger T.H., Krohne G., Kleinschmidt J.A. (1991): Interaction of *Xenopus* lamins A and LII with chromatin in vitro mediated by a sequence element in the carboxyterminal domain. *Exp Cell Res*, 197: 280-289.

Hood J.K., Silver P. A. (1999): In or out? Regulating nuclear transport. *Curr Opin Cell Biol*, 11(2): 241-247.

Horn H., Vousden K. (2007): Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene*, 26:1306-16.

Hu T., Guan T., Gerace L. (1996): Molecular and functional characterization of the p62 complex, an assembly of nuclear pore complex glycoproteins. *J Cell Biol*, 134: 589–601.

Hu W, Jans DA (1999): Efficiency of importin alpha/beta-mediated nuclear localization sequence recognition and nuclear import. Differential role of NTF2. *J Biol Chem* 274:15820-15827

Huang S., Risques R., Martin G., Rabinovitch P., Oshima J. (2008): Accelerated telomere shortening and replicative senescence in human fibroblasts overexpressing mutant and wild-type lamin A. *Exp Cell Res*, 314(1):82-91.

Hübner S., Eam J.E., Hübner A., Jans D. (2006a): Laminopathy-inducing lamin A mutants can induce redistribution of lamin binding proteins into nuclear aggregates. *Exp Cell Res*, 312:171-183

Hübner S., Eam J., Wagstaff K., Jans D. (2006b): Quantitative analysis of localization and nuclear aggregate formation induced by GFP-lamin A mutant proteins in living HeLa cells. *J Cell Biochem*, 98(4):810-26.

Hübner S., Jans D., Xiao C., John A., Drenckhahn D. (2002): Signal- and importin-dependent nuclear targeting of the kidney anion exchanger 1-binding protein kanadapin. *Biochem J*, 361:287-296.

Hutchison C.J. (2002): Lamins: building blocks or regulators of gene expression? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 848-858.

Hutten S., Kehlenbach R.H., (2006): Nup214 is required for CRM1-dependent nuclear protein export in vivo. *Mol Cell Biol*, 26: 6772-6785.

Jans D.A. und Hübner S. (1996): Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. *Physiol Rev*, 76: 651-685.

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

Ishimura A., Ng J., Taira M., Young S., Osada S. (2006): Man1, an inner nuclear membrane protein, regulates vascular remodeling by modulating transforming growth factor  $\beta$  signalling. *Development*, 133: 3919-3928

Isobe K., Gohara R., Ueda T., Takasaki Y., Ando S. (2007): The last twenty residues in the head domain of mouse lamin A contain important structural elements for formation of head-to-tail polymers in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 1252-1259.

Jäkel S., Görlich D. (1998): Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *EMBO J*, 17: 4491-4502.

Jans D., Ackermann M., Bischoff J., Beach D., Peters R. (1991): p34cdc2-mediated phosphorylation at T124 inhibits nuclear import of SV-40 T antigen proteins. *J Cell Biol*, 115:1203–1212.

Jans D., Xiao C., Lam M. (2000): Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *Bioessays*, 22: 532-544.

Jenke B., Fetzer C., Stehle I., Jönsson F., Fackelmayer F., Conradt H., Bode J., Lipps H. (2002): An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein SAF – A in vivo. *EMBO reports* 3(4):349-354

Jenkins H., Hölman T., Lyon C., Lane B., Stick R., Hutchison C. (1993): Nuclei that lack a lamina accumulate karyophilic proteins and assemble a nuclear matrix. *J Cell Sci*, 106 (Pt 1):275-85.

Kalderon D., Roberts B. L., Richardson W. D., Smith A. E. (1984, a): A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* Vol, 39: 499-509.

Kalderon D., Smith A.E. (1984, b): In vitro mutagenesis of a putative DNA binding domain of SV40 large-T. *Virology*, 139(1):109-37.

Keller C., Hyrien O., Knippers R., Krude T. (2002): Site-specific and temporally controlled initiation of DNA replication in a human cell-free system. *Nucleic Acids Res*, 30: 2114–2123.

Kelley J., Datta S., Snow C., Chatterjee M., Ni L., Spencer A., Yang C., Cubeñas-Potts C., Matunis M., Paschal B. (2011): The defective nuclear lamina in Hutchinson-progeria syndrome disrupts the nucleocytoplasmic Ran gradient and inhibits nuclear localization of Ubc9. *Mol Cell Biol*, 31(16):3378-95.

Kita K., Omata S., Horigome T. (1993): Purification and characterization of a nuclear pore glycoprotein complex containing p62, *J Biochem*, 113: 377-382.

Klemm J., Beals C., Crabtree G. (1997): Rapid targeting of nuclear proteins to the cytoplasm. *Curr Biol*, 7:638–644.

Kotera I, Sekimoto T, Miyamoto Y, Saiwaki T, Nagoshi E, Sakagami H, Kondo H, Yoneda Y. (2005): Importin alpha transports CaMKIV to the nucleus without utilizing importin beta. *EMBO J*, 24(5):942-51.

Köhler A, Hurt E. (2007): Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(10):761-73.

Krimm I., Östlund C., Gilquin B., Couprie J., Hossenlopp P., Mornon J.-P., Bonne G. (2002): The Ig-like Structure of the C-Terminal Domain of Lamin A/C, Mutated in Muscular Dystrophies, Cardiomyopathy, and Partial Lipodystrophy. *Structure*, 10:811-23.

Kudlow B., Stanfel M., Burtner C., Johnston E., Kennedy B. (2008): Suppression of proliferative defects associated with processing-defective lamin A mutants by hTERT or inactivation of p53. *Mol Biol Cell*, 19(12):5238-48.

Kudo N., Wolff B., Sekimoto T. (1998): Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res*, 242: 540-547.

Kumaran R., Muralikrishna B., Parnaik V. (2002): Lamin A/C speckles mediate spatial organization of splicing factor compartments and RNA polymerase II transcription. *J Cell Biol*. 159(5):783-93

Kutay U., Bischoff F. R., Kostka S., Kraft R., Görlich D. (1997): Export of importin  $\alpha$  from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* Vol, 90: 1061-1071.

Kutay U., Lipowsky G., Izaurralde E., Bischoff F. R., Schwarzmaier P., Hartmann E., Görlich D. (1998): Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor. *Mol Cell*, 1(3): 359-369.

La Cour T., Gupta R., Rapacki K., Skriver K., Poulsen F.M., Brunak, S. (2003): NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals. *Nucleic Acids Res*, 31: 393-396.

Laguri C., Gilquin B., Wolff N., Romi-Lebrun R., Curchay K., Callebaut I., Worman H.J., Zinn-Justin S. (2001): Structural characterization of the LEM motif common to three human inner nuclear membrane proteins. *Structure*, 9: 503-511.

Lam M., Briggs L., Hu W., Martin T., Gillespie M., Jans D. (1999): Importin beta recognizes parathyroid hormone-related protein with high affinity and mediates its nuclear import in the absence of importin alpha. *J Biol Chem*, 274:7391-7398.

Lam M., Thomas R., Loveland K., Schilders S., Gu M., Martin T., Gillespie M., Jans D. (2002): Nuclear transport of parathyroid hormone(PTH)-related protein is dependent on microtubules. *Mol Endocrinol*, 16:390-401.

Lanford R. E., Butel J. S. (1984): Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell* Vol, 37: 801-813.

Lee S. J., Matsuura Y., Liu S. M., Stewart, M. (2005): Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP. *Nature*,435: 693-696

Lenz-Böhme B., Wismar J., Fuchs S., Reifegerste R., Buchner E., Betz H., Schmitt B. (1997): Insertional mutation of the *Drosophila* nuclear lamin Dm0 gene results in defective nuclear envelope, clustering of nuclear pore complexes, and accumulation of annulate lamellae. *J Cell Biol*, 137:1001-16.

Liu B., Zhou Z. (2008): Lamin A/C, laminopathies and premature ageing. *Histology and Histopathology*, 23: 747-763

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. (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., Gruenbaum Y. (2003): MAN1 and emerin have overlapping function(s) essential for chromosome segregation and cell division in *Caenorhabditiselegans*. *Proc Natl Acad Sci*100: 4598-4603.

Loewinger L., McKeon F. (1988): Mutations in the nuclear lamin proteins resulting in their aberrant assembly in the cytoplasm. *EMBO J*, 7: 2301–2309.

Lopez-Soler R., Moir R., Spann T., Stick R., Goldman R. (2001): A role for nuclear lamins in nuclear envelope assembly. *Cell Biol*, 154(1):61-70.

Luderus M.E., de Graaf A., Mattia E., den Blaauwen J.L., Grande M.A., de Jong L., und van Driel R. (1992): Binding of matrix attachment regions to lamin B1. *Cell* 70(6): 949-959.

Luderus M.E., den Blaauwen J.L., de Smit O.J., Compton D.A. und 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.

Lussi Y.C., Hügi I., Laurell E., Kutay U., Fahrenkrog B. (2011): The nucleoporin Nup88 is interacting with nuclear lamin A. *Mol Biol Cell*, 22(7):1080-90.

Ly D., Lockhart D., Lerner R., Schultz P. (2000): Mitotic misregulation and human aging. *Science*, 287:2486–92.

Macara I. (2001): Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:570-594.

Machiels B.M., Zorenc A., Endert J.M., Kuijpers H., van Eys G., Ramaekers F., Broers J. (1996): An Alternative Splicing Product of the Lamin A/C Gene Lacks Exon 10. *J Biol Chem*, 271:9249-53.

Mallampalli M.P., Huyer G., Bendale P., Gelb M.H., 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., Misner L., Le Bot N., Tsai M., Campbell J., Ahringer J., White J. (2003): The *C. elegans* hook protein, ZYG-12, mediates the essential attachment between the centrosome and nucleus. *Cell*, 115(7):825-36.

Mansharamani M., Wilson KL. (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(14):13863-70.

Margalit A., Neufeld E., Feinstein N., Wilson K., Podbilewicz B. und Gruenbaum Y. (2007): Barrier to autointegration factor blocks premature cell fusion and maintains adult muscle integrity in *C. elegans*. *J Cell Biol*, 178:661-673.

Mariappan I., Gurung R., Thanumalayan S., Parnaik V. (2007): Identification of cyclin D3 as a new interaction partner of lamin A/C. *Biochem Biophys Res Commun*, 355(4):981-5.

Martin L., Crimando C., 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.

Matsubayashi Y, Fukuda M, Nishida E. (2001): Evidence for existence of a nuclear pore complex-mediated, cytosol-independent pathway of nuclear translocation of ERK MAP kinase in permeabilized cells. *J Biol Chem*, 276(45):41755-60.

Mattout A., Goldberg M., Tzur Y., Margalit A., 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.

McClintock D., Gordon L., Djabali K.(2006): Hutchinson–Gilford progeria mutant lamin A primarily targets human vascular cells as detected by an anti-Lamin A G608G antibody, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 2154–2159.

McKeon F.D., Kirschner M.W., Caput D. (1986): Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature*, 319:463-8.

Meier I. (2001): The plant nuclear envelope. *Cell Mol Life Sci*, 58: 1774–1780.

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

- Melcer S., Gruenbaum Y., Krohne G. (2007): Invertebrate lamins. *Exp Cell Res*, 313: 2157–2166.
- Melchior F., Gerace L. (1998): Two-way trafficking with Ran. *Trends Cell Biol*, 8(5): 175-179.
- Meyer B., Malim M. (1994): The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev*, 8(13):1538-47.
- Meyer B., Meinkoth J., Malim M. (1996): Nuclear transport of human immunodeficiency virus type 1, visna virus, and equine infectious anemia virus Rev proteins: identification of a family of transferable nuclear export signals. *J Virol*, 70(4):2350-9.
- Michael W. M., Choi M., Dreyfuss G. (1995): A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell* 83: 415-422.
- Mingot J., Kostka S., Kraft R., Hartmann E., Görlich D. (2001): Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *EMBO J*, 20(14):3685-94.
- Misteli T. (2007): Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell*, 128; 787–800
- Moir R., Montag-Lowy M., 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., Lopez-Soler R. I., Yoon M., Goldman A. E., Khuon S., Goldman R. D.(2000): The dynamics of the nuclear lamins during the cell cycle – relationship between structure and function. *J Struct Biol*, 129: 324-334.
- Montes de Oca R., Lee K.K., Wilson K.L. (2005): Binding of barrier to autointegration factor (BAF) to histone H3 and selected linker histones including H1.1. *J. Biol. Chem.* 280: 42252–42262.
- Moore M. S. (1999): Ran and nuclear transport. *J Biol Chem*.273: 22857-22860.
- Mosammamaparast N., Guo Y., Shabanowitz J., Hunt D. F., Pemberton L. F. (2002): Pathways mediating the nuclear import of histones H3 and H4 in yeast. *J Biol Chem*, 277: 862-868.
- Mosammamaparast N., Jackson K. R., Guo Y., Brame C.J., Shabanowitz J., Hunt D. F., Pemberton L. F.(2001):Nuclear import of histone H2A and H2B is mediated by a network of karyopherins. *J Cell Biol*,153: 251-262.
- Mühlhauser P., Müller E. C., Otto A., Kutay U. (2001):Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones. *EMBO Rep*, 2: 690-696.
- Mukaigawa J., Nayak D. P. (1991): Two signals mediate nuclear localization of

influenza virus (AWSN/33) polymerase basic protein 2. *J Virol* Vol, 65(1):245-253.

Naetar N., Foisner R. (2009): Lamin complexes in the nuclear interior control progenitor cell proliferation and tissue homeostasis. *Cell Cycle*, 8(10):1488-93.

Nakielny S., Siomi M.C., Siomi H., Michael W.M., Pollard V., Dreyfuss G.(1996): Transportin: nuclear transport receptor of a novel nuclear protein import pathway, *Exp Cell Res*, 229: 261–266.

Nakielny S. und Dreyfuss G. (1999): Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* 99(7): 677-690.

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. und 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.

Newport J., Wilson K., Dunphy W. (1990): A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly. *J Cell Biol*, 111(6 Pt 1):2247-59.

Nitahara-Kasahara Y., Kamata M., Yamamoto T., Zhang X., Miyamoto Y., Muneta K., Iijima S., Yoneda Y., Tsunetsugu-Yokota Y., Aida Y. (2007): Novel nuclear import of Vpr promoted by importin alpha is crucial for human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages. *J Virol*, 81(10):5284-93.

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.

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

Ozaki T., Saijo M., Murakami K., Enomoto H., Taya Y., Sakiyama S. (1994): Complex formation between lamin A and the retinoblastoma gene product: identification of the domain on lamin A required for its interaction. *Oncogene*, 9: 2649-2653.

Paddy M.R., Belmont A.S., Saumweber H., Agard D.A., 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.

Pante N., Aebi U. (1995): Toward a molecular understanding of the structure and function of the nuclear pore complex. *Int Rev Cytol*, 162B: 225–255.

Panté N., Kann M. (2002): Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell*, 13(2):425-34.

Paschal B. M., Gerace L. (1995): Identification of NTF2, a cytosolic factor for nuclear import that interacts with nuclear pore protein p62. *J Cell Biol*, 129: 925-937.

Pendas A.M., Zhou Z., Cadinanos J., Freije J.M., Wang J., Hultenby K., Astudillo A., Wernerson A., Rodriguez F., Tryggvason K. (2002): Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet*, 31: 94–99.

Peter M., Nakagawa J., Dorree M., Labbe J.C., Nigg E.A. (1990): In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 61(4):591-602.

Pickersgill H., Kalverda B., de Wit E., Talhout W., Fornerod M., van Steensel B. (2006): Characterization of the *Drosophila melanogaster* genome at the nuclear lamina. *Nat Genet*, 38: 1005–1014.

Piechaczek C., Fetzer C., Baiker A., Bode J., Lipps HJ. (1998): A vector based on the SV40 origin of replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO cells. *Nucl Acids Research*, 27(2):426-28

Plasilova M., Chattopadhyay C., Pal P., Schaub N. A., Buechner S. A., Mueller H., Miny P., Ghosh A., Heinemann K. (2004): Homozygous missense mutation in the lamin A/C gene causes autosomal recessive Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *J Med Genet*, 41: 609-614.

Polioudaki H., Kourmouli N., Drosou V., Bakou A., Theodoropoulos P.A., Singh P.B., Giannakouros T., Georgatos S.D. (2001): Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO Rep*, 2(10): 920-5.

Pollard V. M., Michael W. M., Nakielny S., Siomi M. C., Wang F., Dreyfuss G., (1996): A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell* 86: 985-994.

Qin Z., Kalinowski A., Dahl K., Buehler M. (2011): Structure and stability of the lamin A tail domain and HGPS mutant. *J Struct Biol*, 175(3):425-33

Radu A., Blobel G., Moore M. S. (1995): Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 1769-1773

Rexach M., Blobel G. (1995): Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell* 83: 683–692.

Riemer D., Wang J., Zimek A., Swalla B.J., Weber K. (2000): Tunicates have unusual nuclear lamins with a large deletion in the carboxyterminal tail domain. *Gene* 255: 317-325.

Ribbeck K, Lipowsky G, Kent HM, Stewart M, Görlich D. (1998): NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J*, 17(22):6587-98.

- Robbins J., Dilworth S. M., Laskey R. A., Dingwall C. (1991): Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64(3): 615-623.
- Rosenberg-Hasson Y., Renert-Pasca M., Volk T. (1996): A *Drosophila* dystrophin-related protein, MSP-300, is required for embryonic muscle morphogenesis. *Mech Dev*, 60(1):83-94.
- Rout M. P., Blobel G., Aitchison J. D. (1997): A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell*, 89: 715-725.
- Rusinol A.E., Sinensky M.S. (2006): Farnesylated lamins, progeroid syndromes and farnesyl transferase inhibitors. *J. Cell Sci.* 119: 3265–3272.
- Rzepecki R., Bogachev S.S., Kokoza E., Stuurman N., Fisher P.A. (1998): In vivo association of lamins with nucleic acids in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci* 111: 121–129.
- Sambrook J., Pollack R. (1974): Basic methodology for cell culture-cell transformation. *Methods Enzymol*, 32(B):583-92.
- Sasseville A.M., Raymond Y. (1995): Lamin A precursor is localized to intranuclear foci. *J Cell Sci*, 108: 273–285.
- Scaffidi P., Misteli T. (2005): Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med*, 11:440–5.
- Schirmer E.C., Guan T., Gerace L. (2001): Involvement of the lamin rod domain in heterotypic lamin interactions important for nuclear organization. *J Cell Biol*, 153:479–489.
- Schmidt M., Krohne G. (1995): In vivo assembly kinetics of fluorescently labeled *Xenopus* lamin A mutants. *Eur. J. Cell Biol.* 68: 345–354.
- Schumacher J., Reichenzeller M., Kempf T., Schnolzer M., Herrmann H. (2006): Identification of a novel, highly variable amino-terminal amino acid sequence element in the nuclear intermediate filament protein lamin B(2) from higher vertebrates. *FEBS Lett.* 580: 6211–6216.
- Segura-Totten M., Kowalski A., Craigie R. und Wilson K. (2002): Barrier-to-autointegration factor: major roles in chromatin decondensation and nuclear assembly. *J Cell Biol*, 158:475-485.
- Shackelton S., Lloyd D.J., Jackson S., Evans R., Niermeijer M.F., Singh B.M., Schmidt H. (2000): LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nature Genet*, 24:153-6.
- Shah S., Tugendreich S., Forbes D. (1998): Major binding sites for the nuclear import receptor are the internal nucleoporin Nup153 and the adjacent nuclear filament protein Tpr. *J Cell Biol*, 141: 31-49.

Shoeman, R.L., Traub P. (1990): The in vitro DNA-binding properties of purified nuclear lamin proteins and vimentin. *J Biol Chem*, 265: 9055–9061.

Shumaker D.K., Lopez-Soler R.I., Adam S.A., Herrmann H., Moir R.D., Spann T.P., Goldman R.D. (2005): Functions and dysfunctions of the nuclear lamin Ig-fold domain in nuclear assembly, growth, and Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci*, 102: 15494-15499.

Smith A, Brownawell A, Macara IG. (1998): Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2. *Curr Biol*, 8(25):1403-6.

Smythe C., Jenkins H., Hutchison C. (2000): Incorporation of the nuclear pore basket protein nup153 into nuclear pore structures is dependent upon lamina assembly: evidence from cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *EMBO J*, 19(15):3918-31.

Söderqvist H, Hallberg E. (1994): The large C-terminal region of the integral pore membrane protein, POM121, is facing the nuclear pore complex. *Eur J Cell Biol*, 64(1):186-91.

Spann T. P., Moir R. D., Goldman A. E., Stick R. und Goldman R. D. (1997): Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *J Cell Biol*, 136: 1201-1212.

Spann T., Goldman A., Wang C., Huang S., Goldman R. (2002): Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *J Cell Biol*, 156(4):603-8.

Stade K., Ford C.S., Guthrie C., Weis K. (1997): Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor, *Cell*, 90: 1041–1050.

Starr C.M., Hanover J.A. (1990): Glycosylation of nuclear pore protein p62. Reticulocyte lysate catalyzes O-linked N-acetylglucosamine addition in vitro, *J Biol Chem*, 265 6868–6873.

Starr D., Han M. (2002): Role of ANC-1 in tethering nuclei to the actin cytoskeleton. *Science*, 298(5592):406-9.

Stauber R., Gaitanaris G., Pavlakis G. (1995): Analysis of trafficking of Rev and transdominant Rev proteins in living cells using green fluorescent protein fusions: transdominant Rev blocks the export of Rev from the nucleus to the cytoplasm. *Virology*, 213(2):439-49.

Stephen G., Young M., Shao H. Yang und Loren G. Fong (2006): Prelamin A Farnesylation and Progeroid Syndromes. *J Biol Chem* 281(52): 39741–39745.

Stierle V., Couprie J., Ostlund C., Krimm I., Zinn-Justin S., Hossenlopp P., Worman H.J., Courvalin J.C., 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., Schumacher J., Burkhard P., Aebi U., 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, Aebi U (1998): Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol*, 122: 42-66.

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

Taddei A., Hediger F., Neumann F. R. und Gasser S. M. (2004): The function of nuclear architecture: a genetic approach. *Annu Rev Genet*, 38: 305–345

Taniura H., Glass C., Gerace L. (1995): A chromatin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones. *J Cell Biol*, 131(1):33-44.

Taylor P.W. (2005): Isaacs' syndrome (autoimmune neuromyotonia) in a patient with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 32: 757-758.

Thompson L.J., Bollen M., und Fields A.P. (1997): Identification of protein phosphatase 1 as a mitotic lamin phosphatase. *J Biol Chem*, 272: 29693–29697.

Toth J.I., Yang S.H., Qiao X., Beigneux A.P., Gelb M.H., Moulson C.L., Miner J.H., Young S.G., Fong L.G., (2005): Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear shape in fibroblasts from humans with progeroid syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 12873–12878.

Truant R. und Cullen B.R. (1999): The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol Cell Biol*, 19: 1210-1217.

Verstraeten V.L., Broers J.L., Ramaekers F.C., van Steensel M.A. (2007): The nuclear envelope, a key structure in cellular integrity and gene expression. *Curr. Med Chem*, 14: 1231–1248.

Vousden K., Lane D. (2007): p53 in health and disease. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 8:275–83.

Welte MA, Gross SP, Postner M, Block SM, Wieschaus EF.(1998): Developmental regulation of vesicle transport in *Drosophila* embryos: forces and kinetics. *Cell*, 92(4):547-57.

Wolff B., Cohen G., Hauber J., Meshcheryakova D., Rabeck C. (1995): Nucleocytoplasmic transport of the Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 is dependent on the activation domain of the protein. *Exp Cell Res*, 217(1):31-41.

Worman H.J., Evans C.D., Blobel G. (1990): The lamin B receptor of the nuclear envelope inner membrane: A polytopic protein with eight potential transmembrane domains. *J Cell Biol* 111: 1535–1542.

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., 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.

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

Ye Q. und 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.

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

Young S., Meta M., Yang S., Fong L. (2006): Prelamin A farnesylation and progeroid syndromes. *J Biol Chem*, 281(52):39741-5.

Zhao K., Harel A., Stuurman N., Guedalia D., 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(1-2):161-4.

Zheng R., Ghirlando R., Lee M.S., Mizuuchi K., Krause M., Craigie R. (2000): Barrier-to-autointegration factor (BAF) bridges DNA in a discrete, higher-order nucleoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci*, 97(16): 8997–9002.

## **7. Abkürzungen**

Abb.	Abbildung
Amp	Ampizillin
AS	Aminosäure(n)
BAF	<i>Barrier-to-autointegration-factor</i>
bp	Basenpaare
CAS	<i>cellular apoptosis susceptibility</i>
cDNA	copy DNA (komplementäre DNA)
CFP	cyan fluoreszierendes Protein
CLSM	<i>confocal laser scanning microscopy</i>
CMV	Cytomegalievirus
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DsRed	rot fluoreszierendes Protein drFP583 (aus <i>Discosoma</i> )
EDMD	Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACE1	<i>Farnesylated-proteins converting enzyme 1</i>
FKBP	<i>FK506-binding protein</i>
FRAP	<i>FKBP-12-rapamycin associated protein</i>
FTI	Farnesyltransferaseinhibitor
FW	<i>forward</i> (Primer)
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HA	Hämagglutinin
HGPS	Hutchinson-Gilford Progerie-Syndrom
lcmt	<i>Isoprenylcystein-carboxyl-methyltransferase</i>

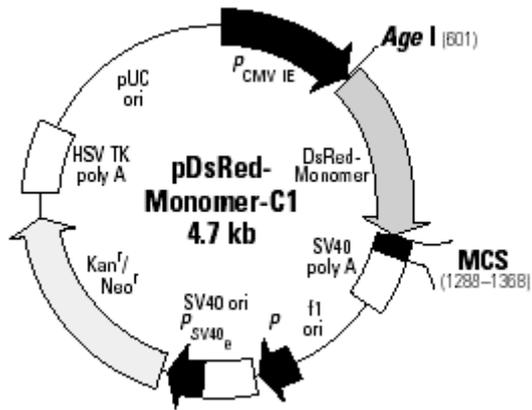
INM	<i>inner nuclearmembrane</i> (innere Kernmembran)
Kan	Kanamyzin
LaA	Lamin A
LAP	Lamin-assoziiertes Polypeptid
LB	Luria Bertoni-Medium
LBR	Lamin B-Rezeptor
LMB	Leptomycin B
LMNA	A-Typ Lamin-Gen
l	Liter
min	Minute
M	Mol/l
m	milli
MAD	Mandibulo-akrale Dysplasie
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
mKan $\Delta$ NLS	<i>mouse</i> Kanadaptin mit deletierter NLS
n	Nano
NES	<i>nuclear export sequence</i> (Kernexportsignal)
NLS	<i>nuclear localisation sequence</i> (Kernlokalisationssequenz)
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NPC	<i>nuclear pore complex</i> (Kernporenkomplex)
NPG	N-Propylgallat
NTF2	<i>nuclear transport factor 2</i>
Nup	Nukleoporin
ONM	<i>outer nuclear membrane</i> (äußere Kernmembran)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat- <i>Buffed</i> Saline (Phosphat-Salzpuffer)
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)

PräLaA	Prälamin A
PräLaA $\Delta$ 50	HGPS-verursachende Prälamin A-Mutante (Progerin)
PräLaA $\Delta$ 90	RD-verursachende Prälamin A-Mutante
p...PräLaA	Expressionsvektor, der die Prälamin A-kodierende cDNA enthält
p...PräLaA $\Delta$ 50	Expressionsvektor, der die HGPS-verursachende Prälamin A $\Delta$ 50-kodierende cDNA enthält
p...PräLaA $\Delta$ 90	Expressionsvektor, der die RD-verursachende Prälamin A $\Delta$ 90-kodierende cDNA enthält
RanBP1	<i>Ran binding protein 1</i>
RanGAP	<i>RanGTPase activating protein</i>
Rce1	<i>Ras-converting enzyme 1</i>
RD	Restriktive Dermopathie
rER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
REV	Retrovirales (HIV) Transportprotein für RNA
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RV	<i>reversed</i> (Primer)
s	Sekunde
SREBP-1	<i>Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1</i>
SV 40	<i>Simian Virus 40</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA Puffer
T-Ag	Tumor-Antigen
WS	Werner-Syndrom
WT	Wildtyp
$\mu$	mikro
ZMPSTE24	Zink-Metalloprotease Ste24

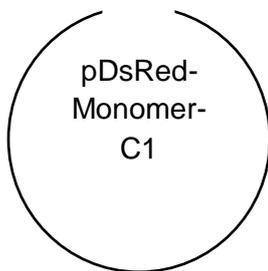
## 8. Anhang



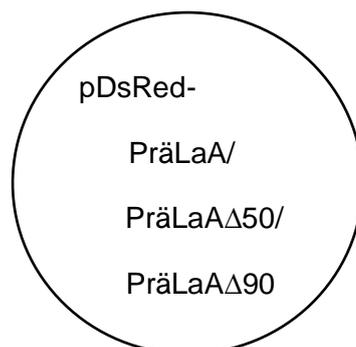
### Klonierung der Expressionsvektoren pDsRed-PräLaA/-PräLaA $\Delta$ 50 /-PräLaA $\Delta$ 90



Linearisierung des Vektors  
pDsRed-Monomer-C1 mit *Xho*I

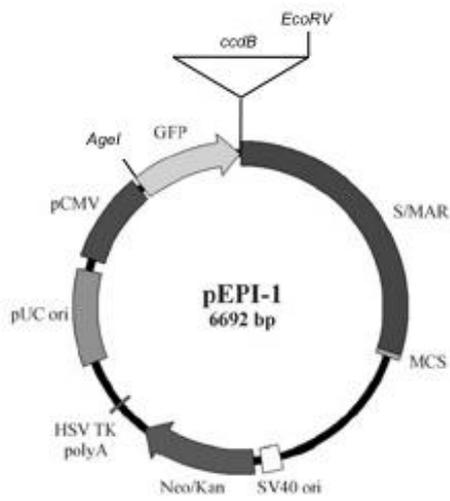


*InFusion*-Reaktion

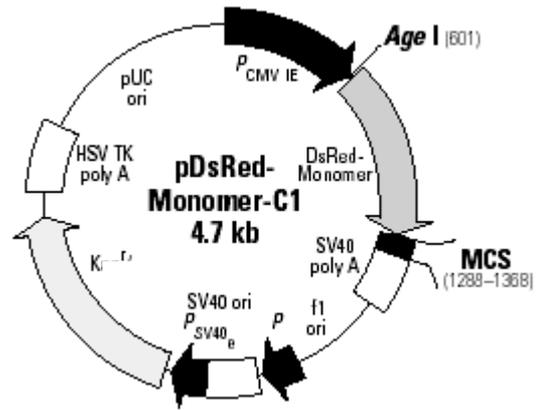
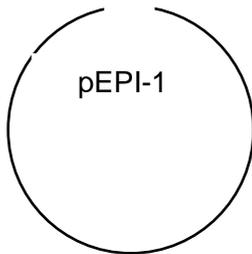


## II

### Klonierung des Expressionsvektors pEPI-DsRed



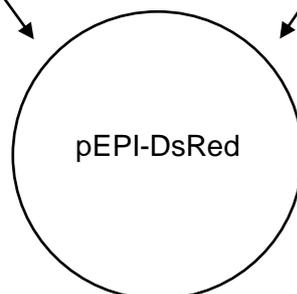
*Age I*- und *EcoR V*-Restriktion: Deletion des GFP-*ccdB*-cDNA Fragmentes



*Age I*- und *Sma I*-Restriktion: Isolierung der DsRed-cDNA

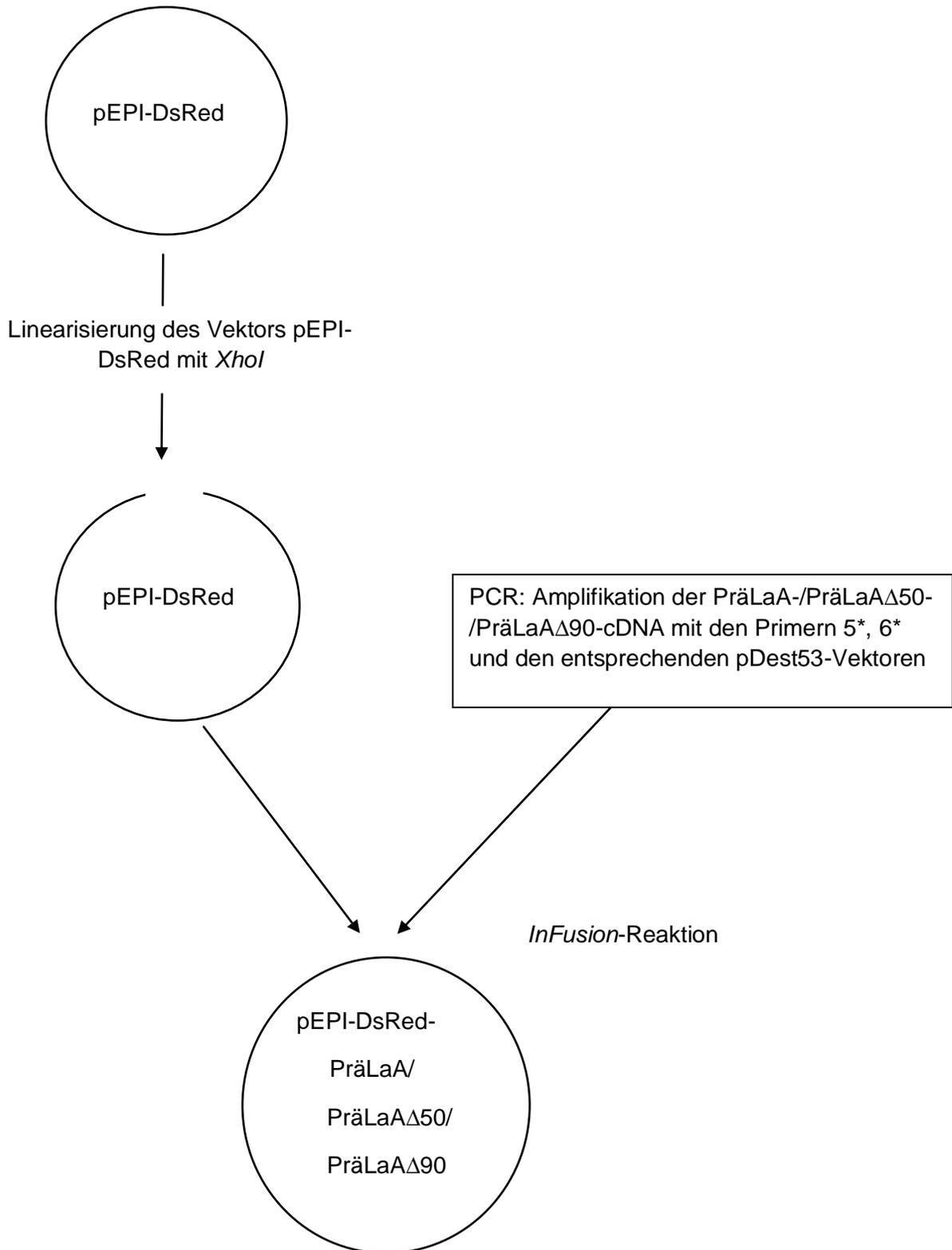
DsRed-cDNA

T4-Ligation



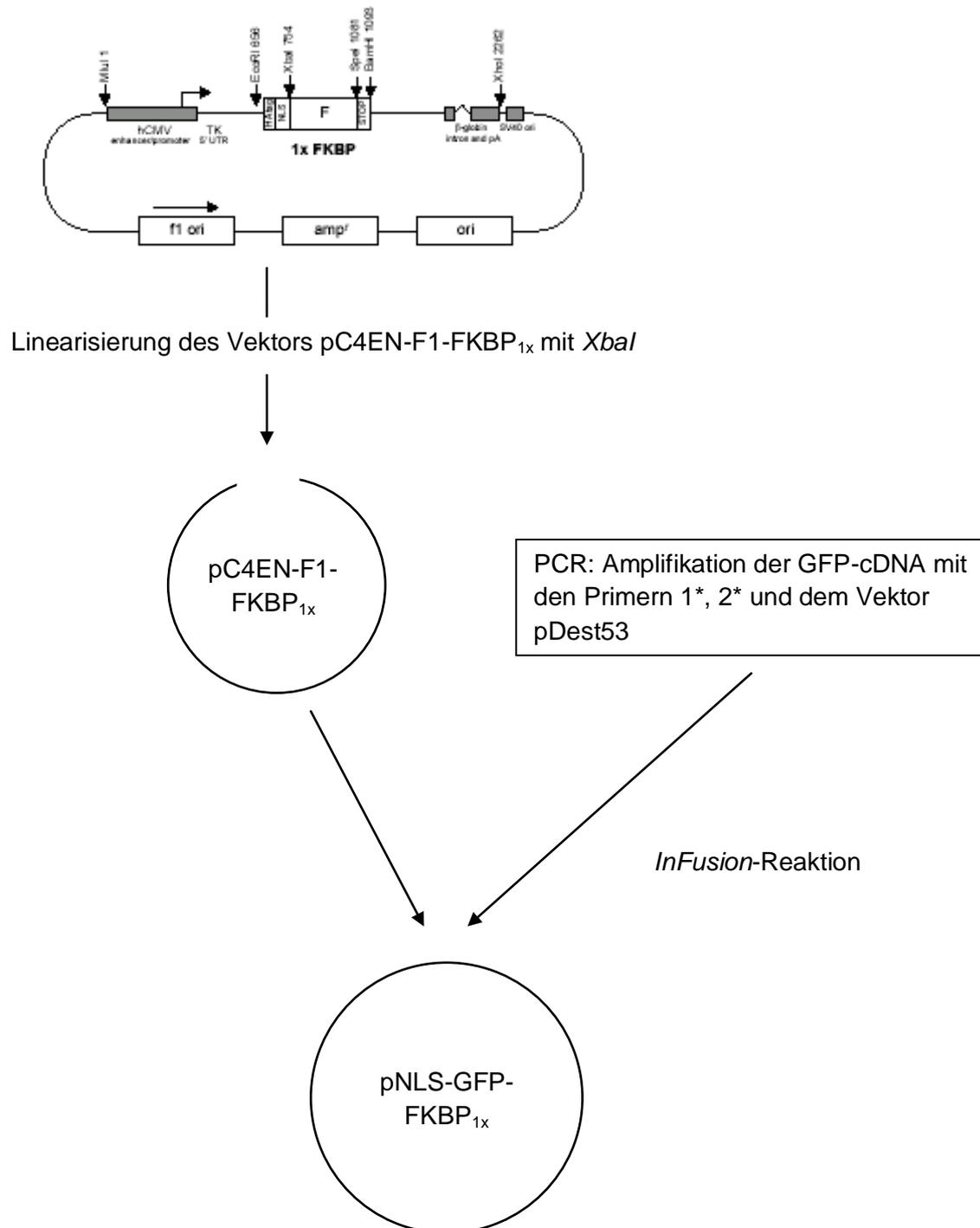
### III

#### Klonierung der Expressionsvektoren pEPI-DsRed-PräLaA/-PräLaA $\Delta$ 50/-PräLaA $\Delta$ 90



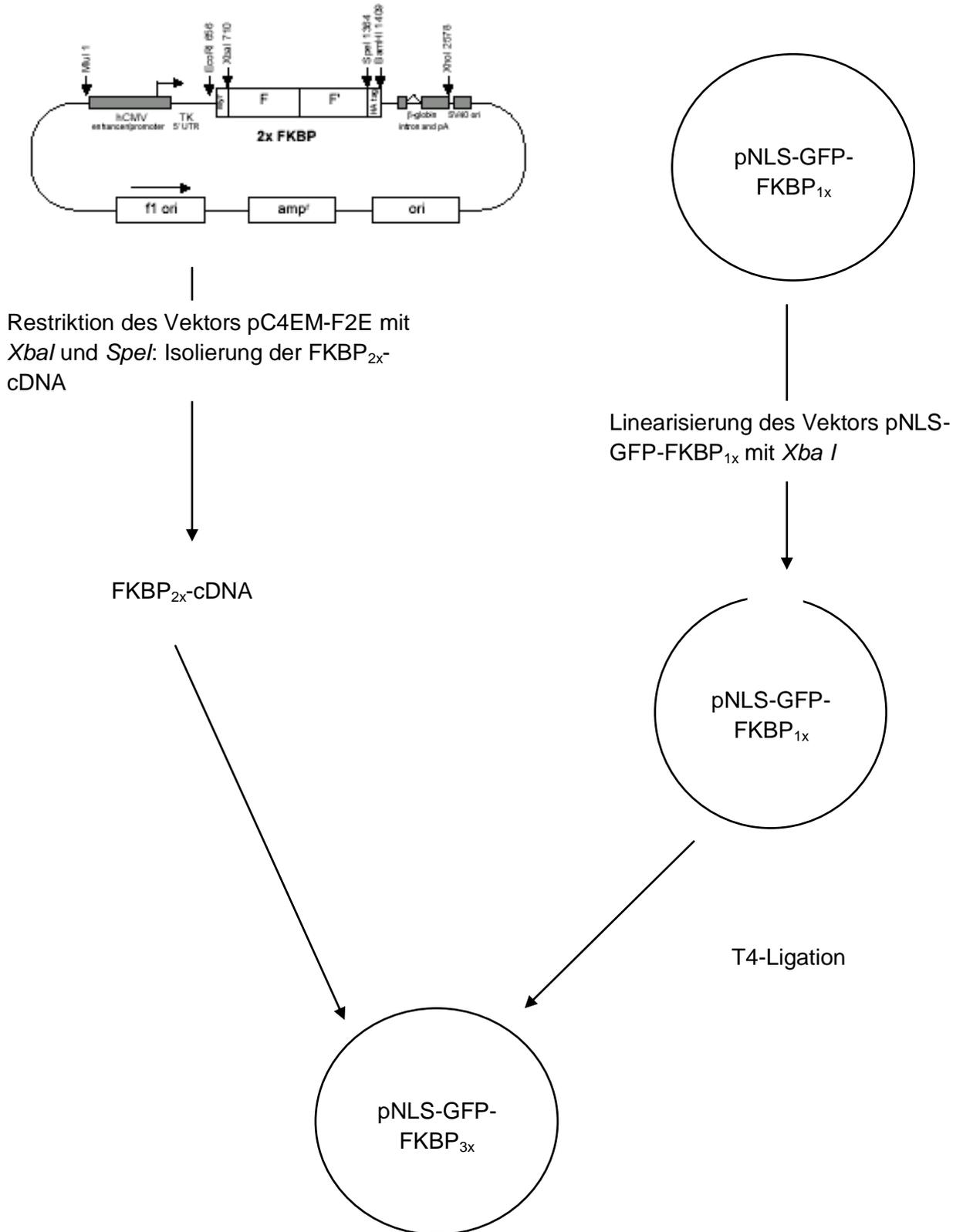
# IV

## Klonierung des Expressionsvektors pNLS-GFP-FKBP<sub>1x</sub>



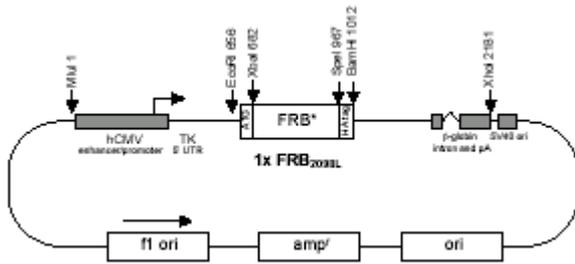
# V

## Klonierung des Expressionsvektors pNLS-GFP-FKBP<sub>3x</sub>

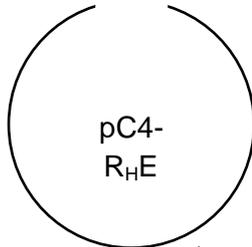


# VI

## Klonierung des Expressionsvektors pDsRed-mKan $\Delta$ NLS-FRB



Linearisierung des Vektors pC<sub>4</sub>-R<sub>H</sub>E mit *Xba* I



PCR: Amplifikation der DsRed-mKan $\Delta$ NLS-cDNA mit den Primern 10\*, 11\* und dem Vektor pDsRed-MonoC1-mKan $\Delta$ NLS

*InFusion*-Reaktion

