

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. D. Drenckhahn

*Prälamina A und Progerie – verursachende Mutanten
im Kontext nukleärer Transportprozesse,
der Kernlaminaintegrität und CaaX – Prozessierung*

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von

Albert Franz Jakob Busch

Referent: Priv.-Doz. Dr. S. Hübner

Koreferent: Prof. Dr. E. Conzelmann

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung :

25.06.2012

Der Promovend ist Arzt

**Gewidmet dem persönlichen Streben Spuren zu hinterlassen,
verbunden mit der Hoffnung –
die wichtigen Schritte nicht aus den Augen zu verlieren**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Die Lamine

1.1.1.	Vom Kern zur Kernlamina	S. 1
1.1.2.	Vom Gen zum Protein	S. 1
1.1.3.	Vom Protein zum Protein	S. 2
1.1.4.	Vom Protein zur Funktion	S. 3
1.1.4.1.	Bildung der Kernlamina	S. 3
1.1.4.2.	Integrität der Kernlamina	S. 4
1.1.4.3.	Interaktion mit dem Kernporenkomplex	S. 4
1.1.4.4.	Interaktion mit der Außenwelt	S. 4

1.2. Kerntransport

1.2.1.	Kerntransport im Allgemeinen	S. 6
1.2.2.	CRM1 – vermittelter Kernexport	S. 6
1.2.3.	Ran – GTPase als Antrieb	S. 8
1.2.4.	Ran – unabhängiger Transport	S. 8

1.3. Laminopathien

1.3.1.	Einteilung und Pathogenesemodelle	S. 8
1.3.2.	Primäre Laminopathien	S. 9
1.3.2.1.	B – Typ Laminopathien	S. 9
1.3.2.2.	A – Typ Laminopathien	S. 9
1.3.2.2.1.	Hutchison – Gilford Progerie Syndrom	S. 9
1.3.3.	Sekundäre Laminopathien	S. 11
1.3.3.1.	Restriktive Dermopathie	S. 11

1.4. Fragestellung der Arbeit

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1.	Oligonukleotide	S. 14
2.1.2.	Chemikalien	S. 14
2.1.3.	Molekularbiologische Materialien	S. 14
2.1.4.	Kits und Kitbestandteile	S. 15
2.1.5.	Reaktionspuffer, SDS – PAGE und Reaktionslösungen	S. 15
2.1.6.	Material für Zellkultur	S. 15

2.2. Methoden

2.2.1.	Polymerase – Kettenreaktion	S. 16
2.2.2.	“InFusion“ – Reaktion	S. 16
2.2.3.	T4 – Ligase – Reaktion	S. 16
2.2.4.	Restriktion	S. 16
2.2.5.	DNA – Sequenzierung	S. 17
2.2.6.	Transformation	S. 17
2.2.7.	Anlegen von Glycerinkulturen	S. 17
2.2.8.	DNA – Isolierung	S. 17

2.2.8.1.	Isolierung von Plasmid – DNA aus bakteriellen Übernachtskulturen	S. 17
2.2.8.2.	DNA – Präparation aus Agarosegel	S. 17
2.2.8.3.	DNA – Fällung mit Natriumacetat	S. 18
2.2.9.	Gelelektrophorese	S. 18
2.2.10.	Photometrische Messung	S. 18
2.2.11.	Transfektion	S. 18
2.2.12.	Zellkultur	S. 19
2.2.13.	Zellfixation	S. 19
2.2.14.	DAPI – Färbung	S. 19
2.2.15.	SDS – Polyacrylamid – Gelelektrophorese und Western Blot	S. 19
2.2.16.	Amidoschwarzmethode	S. 20
2.2.17.	Fluoreszenzmikroskopie	S. 20
2.2.17.1.	Phänotypkontrolle und DAPI – Untersuchungen	S. 20
2.2.17.2.	Mikroskopie fixierter Zellen	S. 20
2.2.17.3.	Lebendzellmikroskopie	S. 21
2.2.18.	F _{N/C} – Bestimmung	S. 22
2.2.19.	Thermischer Stress für transfektierte HeLa – Zellen	S. 22
2.2.20.	Statistische Methoden	S. 23

3. Ergebnisse

3.1. Nukleärer Export in HeLa – Zellen

3.1.1.	Klonierungen: Induzierbarer Kerntransport mittels Heterodimerisation	S. 23
3.1.2.	Expression des induzierbaren Exportsystems	S. 24
3.1.3.	AP21967 – induzierter Kernexport	S. 26
3.1.4.	Dynamik des nukleären Exportes	S. 28

3.2. Nukleärer Export in humanen Fibroblasten S. 30

3.3. Bedeutung der Farnesylierung für die Prozessierung von Prälamina A S. 33

3.4. DsRed – Prälamina A/– Prälamina A Δ 50 und – Prälamina Δ 90 in HeLa

3.4.1.	Klonierung von pEpi – DsRed – Expressionsvektoren	S. 34
3.4.2.	Expression von DsRed – Prälamina – Fusionsproteinen	S. 35
3.4.3.	Untersuchungen zur lateralen Dynamik der DsRed – Prälamina A, A Δ 50 und A Δ 90 in der Kernlamina	S. 36
3.4.4.	GFP – β – Galaktosidase in DsRed – Prälamina A, DsRed – Prälamina A Δ 50 und DsRed – Prälamina A Δ 90 exprimierenden HeLa – Zellen unter thermischem Stress	S. 39

4. Diskussion

4.1.	Nukleärer Proteinexport in HeLa – Zellen	S. 41
4.2.	Nukleärer Proteinexport in humanen Fibroblasten	S. 43
4.3.	Prälamina A – Prozessierung unter Mevinolin	S. 44
4.4.	Laterale Dynamik von DsRed – Laminen	S. 45
4.5.	Integrität der Zellkernhülle bei thermischem Stress	S. 46

5. Zusammenfassung S. 48

6. Anhang

6.1. Expressionsvektoren

6.1.1.	pC ₄ EN – F1 (ARIAD Pharmaceuticals)	S. 49
6.1.2.	pC ₄ EM – F2E (ARIAD Pharmaceuticals)	S. 49
6.1.3.	pC ₄ – R _H E (ARIAD Pharmaceuticals)	S. 50
6.1.4.	pDest53 (Invitrogen)	S. 50
6.1.5.	DsRed – Monomer – C1 (Clontech)	S. 51
6.1.6.	pEpi – 1	S. 52

6.2. Literaturverzeichnis S. 53

6.3. Abkürzungsverzeichnis S. 63

6.4. Abbildungsverzeichnis S. 66

1. Einleitung

1.1. Die Lamine

1.1.1. Vom Kern zur Kernlamina

Ein abgegrenzter Zellkern als eigenes Zellorganell stellt den fundamentalen Unterschied im Bauplan zwischen Prokaryoten und Eukaryoten dar. Diese Abgrenzung wird gebildet durch eine Phospholipiddoppelschicht, welche sowohl viele der einzelnen Zellorganellen, als auch die Zelle als Ganzes umgibt. 1966 beschrieb Don Fawcett zum ersten Mal eine „fibröse Schicht“ unterhalb der Kernmembran, die in Zukunft bei der Betrachtung von Funktionen des Zellkerns und dem Austausch zwischen Zytoplasma und Nukleoplasma in Betracht gezogen werden sollte [1]. Bereits 1974 konnte Günter Blobel auf den fundamentalen strukturellen Zusammenhang zwischen dieser fibrösen Schicht, heute unter dem Namen Kernlamina bekannt und dem Kernporenkomplex hinweisen [2]. Den Aufbau der Kernlamina aus Proteinpolymeren der Klasse der Intermediärfilamente (IF) konnte schließlich 1986 Ueli Aebi zeigen [3]. Seit diesen frühen Meilensteinen vervielfacht sich das Wissen um die Kernlamina, ihre Bestandteile sowie funktionelle Bedeutung stetig.

1.1.2. Vom Gen zum Protein

Heute sind im menschlichen Genom drei Gene bekannt, die für insgesamt sieben Proteine aus der Familie der Lamine kodieren. Es handelt sich um die Gene *LMNA*, *LMNB1* und *LMNB2* [4]. Alle sieben Proteine weisen spezifische Strukturmerkmale der Intermediärfilamente auf und bilden die Familie der TypV – IF [5, 6]. In der Tertiärstruktur gleichen sich alle IF respektive einer N – terminalen *head* – und C – terminalen *tail* – Domäne. Dazwischen liegen vier α – helikale *coiled – coil* Domänen (*rod domains*), verbunden durch drei *linker regions* (s. Abb. 1-1). Den Typ V – IF ist darüber hinaus eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) innerhalb der *tail* – Domäne gemeinsam. Mit Ausnahme von Lamin C enden alle Lamine mit dem sog. CaaX Motiv, der Abfolge aus Cystein, zwei aliphatischen und einer beliebigen Aminosäure [7]. Dieses Motiv ist entscheidend für die weitere Prozessierung der Proteine.

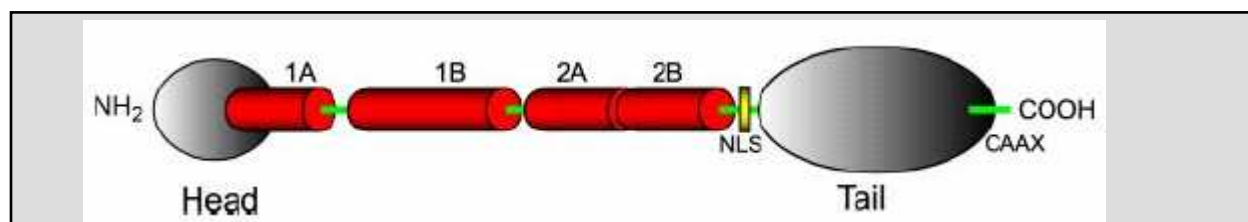


Abb.1-1: Struktur der Prälamine: (nach Broers et al. 2006) Die Struktur der Prälamine mit globulärer *head*- bzw. *tail* – Domäne, vier *rod* – Domänen (1A/B, 2A/B), den evolutionär konservierten Linkerregionen (grün), sowie der spezifischen NLS zu Beginn der *tail* – Domäne und dem C – terminalen *CaaX* – Motiv.

Die Translationsprodukte von *LMNA* bezeichnet man als Typ A – Lamine mit einem Molekulargewicht von 65 – 70 kDa, die sich während der Mitose frei im Zytoplasma bewegen. Typ B – Lamine werden von *LMNB1/2* kodiert, sind etwas schwerer (70 – 75 kDa) und bleiben während der Zellteilung an Kernmembranbausteinen gebunden [8].

Gen	GeneID	Lokus	Protein	Expression
<i>LMNA</i>	4000	1q21.1-21.3	Lamin A	somatisch
			Lamin C	somatisch
			Lamin A Δ 10	Tumor (Kolon/Lunge)
			Lamin C2	*
<i>LMNB1</i>	4001	5q23.3-31.1	Lamin B1	universell
<i>LMNB2</i>	84823	19p13.3	Lamin B2	universell
			Lamin B3	*

* bisher nur im Keimepithel von Mäusen nachgewiesen [7, 10, 11]

1.1.3. Vom Protein zum Protein

Von besonderer Bedeutung für die korrekte Funktion und Lokalisation der Lamine ist ihre Prozessierung. Entscheidendes Strukturmerkmal hierfür ist das C – terminale *CaaX* – Motiv, wodurch Lamin C von dieser Prozessierung ausgeschlossen bleibt.

Nach vollständiger Translation liegt zunächst ein Prälamina – Molekül vor, welches in einem ersten Schritt durch die humane Farnesyltransferase an der Schwefelgruppe des C – terminalen Cysteins des *CaaX* – Motivs farnesyliert wird [12, 13]. Von diesem werden nun die letzten drei AS (*aaX*) abgespalten. Dies geschieht durch die beiden Metalloproteinasen *ZMPSTE24* (*FACE – 1*) und *RCE1*, wobei über das Zusammenspiel bzw. die Notwendigkeit beider Enzyme noch Unklarheit herrscht [14]. Zuletzt wird das mittlerweile C – terminale Cystein an seiner Carboxyl – Gruppe durch eine Methyltransferase (*ICMT*) methyliert.

Während B – Lamine mit der Translokation in die Kernlamina und der Methylierung ihre endgültige Position und Form erreicht haben, wird Lamin A erneut zum Substrat für *ZMPSTE24*. 15 AS aminoterminal des prozessierten C – Terminus (18 AS vom C – Terminus des ursprünglichen Prälamina A entfernt) befindet sich eine weitere Schnittstelle, an der das bisher aufwendig prozessierte Ende komplett abgeschnitten wird [15] (s. Abb.1-2).

Alle nötigen Prozessierungsschritte können scheinbar sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern stattfinden, wobei über deren genaue subzelluläre Lokalisation weiterhin Unklarheit herrscht [16]. Der initialen Farnesylierung kommt eine entscheidende Bedeutung zu, da aus einem zunächst hydrophilen Protein mittels eines C15 – Farnesylkörpers ein Membran – assoziierbares Protein wird, das nun mit den ebenfalls membranständigen Prozessierungspartnern Farnesyltransferase, *ZMPSTE24*, *RCE1* und *ICMT* wechselwirken kann. Für alle

beteiligten Proteine wurde sowohl eine Assoziation mit dem endoplasmatischen Retikulum, als auch mit dem Chromatin bzw. der Kernmembran nachgewiesen [13, 17, 18].

Neben diesen einmaligen posttranslationalen Modifikationen, werden während der Mitose Stadien der Phosphorylierung und Dephosphorylierung durchlaufen, um eine korrekte Kernteilung und – neubildung zu gewährleisten. Die Lamine besitzen hierzu Zielsequenzen für Cyclin – abhängige – Kinasen (*Cdk*). Im phosphorylierten Zustand während der Mitose bleiben die B – Lamine dabei an die Kernmembran gebunden, während Lamin A, wohl aufgrund des fehlenden Farnesylankers, frei ins Zytoplasma dissoziiert [7, 19].

Für Lamin C konnten Alsheimer et al. eine Myristoilierung an der Methylgruppe eines Glycinrestes am N – Terminus zeigen, die für die Translokation in die Kernmembran unerlässlich ist [20].

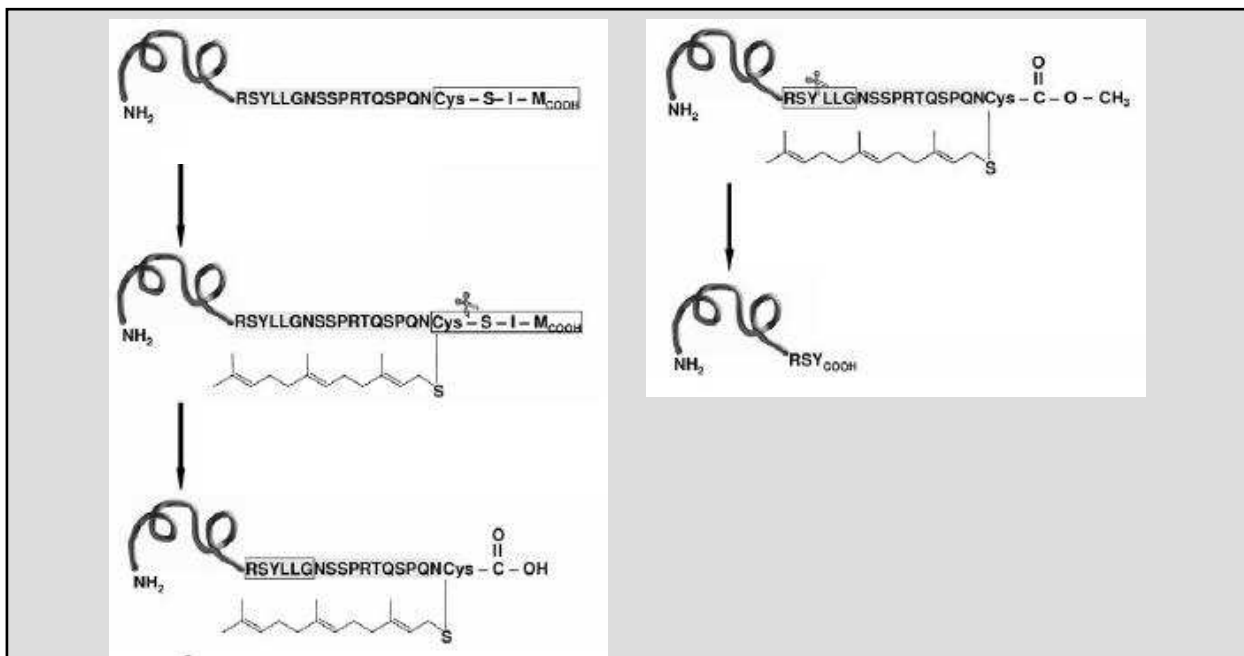


Abb.1-2: Prälamina A – Prozessierung: (modifiziert nach Rusiñol et al. 2006) Die Prozessierungsschritte von Prälamina A und B – Prälaminen umfassen S – Farnesylierung, O – Methylierung und Deletion der drei terminalen AS. Bei Prälamina A wird anschließend 15 AS oberhalb der Farnesylierungsstelle das gesamte prozessierte Ende deletiert.

1.1.4. Vom Protein zur Funktion

1.1.4.1. Bildung der Kernlamina

Durch Assoziation einzelner Proteinmonomere zu Homo – oder Heterodimeren, die sich zu Tetrameren und schließlich polymeren Intermediärfilamenten aneinanderlagern, erfolgt die Bildung der Kernlamina in mehreren Stufen. Entscheidend hierfür sind die aus der Tertiärstruktur resultierenden Partialladungen. Die globuläre *head* – Domäne sowie das C – terminale Ende der *rod* – Domäne besitzen jeweils eine positive Partialladung. Am

Carboxylende besitzt die globuläre *tail* – Domäne eine Immunglobulin (Ig) – ähnliche Struktur, bei der alle Ladung tragenden AS nahe der Oberfläche liegen und damit eine elektrische Interaktion mit der Umgebung ermöglichen [7].

Die über die *rod* – Domänen assoziierten Homodimere interagieren *head – to – tail* (antiparallel) mit einem weiteren Homodimer zu Protofilamenten und bilden schließlich die 10 nm dicken Filamente der Kernlamina. Dabei ist nicht sicher geklärt, ob nur spezifische Lamintypen miteinander reagieren oder auch gemischte Protofilamente vorkommen [21, 22]. Unter allen Laminen findet jedoch ein kontinuierlicher Filament – Umsatz statt [23].

1.1.4.2. Integrität der Kernlamina

Mikrotubuli, Aktinfilamente und IF bilden im Zusammenspiel mit nukleärem Aktin und den Laminen als intranukleäre IF das Zytoskelett bzw. Nukleoskelett. Die Kernlamina trägt dabei fundamental zu den mechanischen Eigenschaften des Kerns bzw. der Zelle bei. Hierbei spielt Lamin B1 die entscheidende Rolle für den strukturellen Zusammenhalt der Kernlamina, während die Typ A – Lamine für mechanische Festigkeit gegenüber äußeren Einflüssen und zellulärem Stress sorgen. So nimmt mit steigendem Gehalt an dysfunktionalen Laminen die mechanische Stabilität des Zellkerns ab [24, 25].

1.1.4.3. Interaktion mit dem Kernporenkomplex

Blobel et al. konnten bereits 1974 zeigen, dass nach Lyse aller membranösen Kernhüllenanteile die Kernporenkomplexe (KPK) ihre Struktur und übliche Lokalisation beibehielten und schlossen dabei auf die Funktion der Kernlamina als Stütze für die KPK [2]. In siRNA – *knockdown* Experimenten konnte die Abhängigkeit der physiologischen KPK – Verteilung von der Lamin A/C – Expression gezeigt werden [26]. Besonders wichtig scheint die in *C. elegans*, *D. melanogaster* und *Homo sapiens* gezeigte Wechselwirkung zwischen beiden Lamin – Typen und NUP153, einem integralen Bestandteil der Kernpore, zu sein. Aberrierende Lamine führen demnach zu einer Fehlpositionierung des KPK [27 – 30] sowie einer Störung der gesamten nukleären Architektur. Diese Clusterbildung von KPK bei zunehmendem Gehalt an dysfunktionellem Lamin A wurde von Goldman et al. an humanen Progerie – Zellen bestätigt (s. 1.3.1.) [30].

1.1.4.4. Interaktion mit der Außenwelt

Interaktionen zwischen Laminen beider Klassen (A/B) mit transmembranären Proteinen der Kernmembran oder Lamina – assoziierten Proteine sind von großer Bedeutung [31]. Sie verknüpfen nicht nur Kernmembran und Kernlamina, sondern sind darüber hinaus auch

involviert in die Organisation des Chromatins, der Regulation transmembranöser Signalkaskaden und der Verbindung des Kerngerüsts mit dem zytoskeletalen Filamentsystem und damit der extrazellulären Matrix (s. Abb. 1-3). So assoziieren Proteine der Familie der Lamina – assoziierten Proteine (LAP) entweder direkt oder über spezifische Linker – Proteine (z.B. BAF, HA – 95) mit dem Chromatin [32]. Als Verbindungsglied zwischen Zytoskelett und Kernskelett fungieren Integrine, Nesprine sowie SUN – Proteine [31]. Die Verknüpfung von zytoplasmatischen und nukleoplasmatischen Strukturproteinen, wie Mikrotubuli, Aktinfilamente oder IF, ist dabei entscheidend für die Mechanotransduktion physikalischer Stimuli in biochemische Signale [33, 34]. Bione et al. entdeckten 1994 ein Lamin – bindendes Protein, Emerin, dessen Mutation zur Emery – Dreyfuss Muskeldystrophie (*EDMD*) (OMIM 310300) führt und stellten damit die Verbindung zwischen der Mutation eines Lamin – bindenden Proteins, und dessen Bedeutung für die Pathophysiologie her [35] (s. 1.3.1.). Neben diesen, v. a. in der Kernperipherie stattfindenden Interaktionen wird einem intra – nukleären Komplex aus Lamin A, LAP2 α und Retinoblastom (Rb) – Protein eine Bedeutung für die Kontrolle des Zellzyklus zugeschrieben [31]. Weitere Proteine mit beschriebenen Lamin – Bindungseigenschaften bedürfen noch einer genaueren Charakterisierung [22].

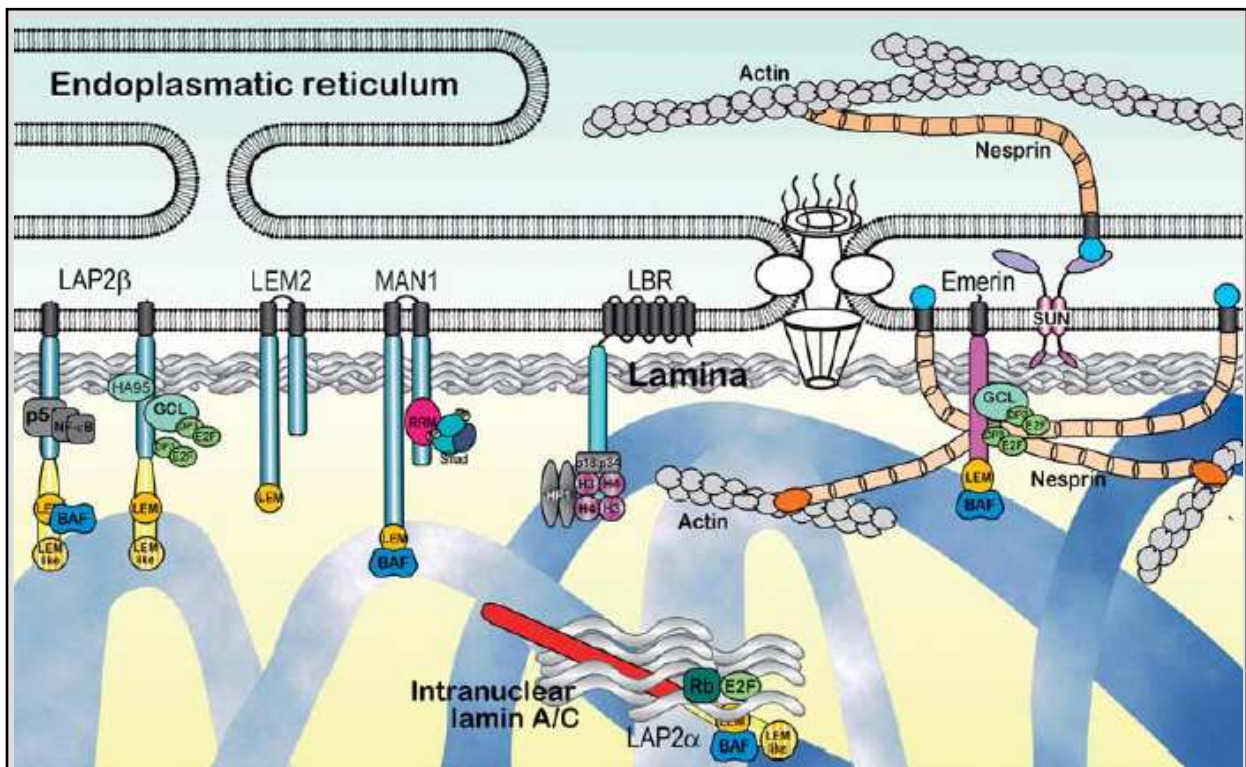


Abb.1-3: Lamin – Protein – Interaktionen: (nach Wagner und Krohne 2007) Das Bild zeigt die zahlreichen Protein – Protein – Interaktionen der Kernlamina. Dabei stehen die integralen Membranproteine der inneren Kernmembran im Vordergrund. Über Nesprine und SUN – Proteine erfolgt eine Kopplung an das zytoplasmatische Zellskelett. In intranukleärer Lokalisation wirkt Lamin A zusammen mit Rb als Regulator des Zellzyklus. (Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis)

1.2. Der Kerntransport

1.2.1. Kerntransport im Allgemeinen

Mit Ausnahme des Parvovirus MVM, der sein Genom mittels Zerstörung der Kernmembran in den Zellkern einschleust [36], ist bei Säugetieren ein Austausch über die Kernhülle hinweg nur über vordefinierte Öffnungen, die KPK, möglich.

Dies sind beim Menschen hochmolekulare (~ 125 MDa) Proteinkomplexe, die in ungleichmäßiger Verteilung die Kernhülle unterbrechen und so den Austausch zwischen Zyto- und Nukleoplasma gewährleisten. Ihre Anzahl variiert Zellzyklus – abhängig [139]. Tausende Kopien einer bisher noch nicht genau bekannten Anzahl ($\sim 30 - 50$) von Proteinen, den sog. Nukleoporinen (Nups), bilden einerseits die korbartige Struktur (s. Abb. 1-3) die sich mit Ausläufern in beide Plasmata erstreckt und nehmen darüber hinaus über mobile Untereinheiten als aktive Vermittler am nukleären Transport teil [37, 38]. Durch die so gebildete Pore können Ionen und Polypeptide bis zu einer Größe von etwa 40 – 60 kDa bzw. mit einem Durchmesser bis zu 9 nm entlang ihrem Gradienten frei diffundieren. Alles was darüber hinaus die Kernhülle passieren muss, Proteine, RNA und ribosomale Untereinheiten wird über Proteine der Karyopherin – β – Superfamilie mit Hilfe des universellen nukleären Import-/Exportsystems verschickt (s. 1.2.2.) [39]. Um dabei die korrekte subzelluläre Verteilung zu gewährleisten, verfügen viele Proteine über spezifische Lokalisationssequenzen. Im Falle des Transportes aus dem Zellkern heraus spricht man von nukleären Exportsequenzen (*nuclear export sequence* – NES), in entgegengesetzter Richtung von nukleären Importsequenzen (*nuclear localisation sequence* – NLS) (s. 1.1.2.). In beiden Fällen werden diese Sequenzen mit dem jeweiligen Karyopherin, z.B. *Importin β* oder *CRM1 (Exportin – 1)*, direkt oder mittels Hilfsproteinen (*Importin α*) komplexiert und können daraufhin den KPK passieren (s. Abb. 1-4) [44]. Für den nukleären Import konnte eine Transportrate von bis zu 1000 Ereignissen pro Sekunde pro KPK gezeigt werden [45].

1.2.2. CRM1 – vermittelter Kernexport

Die erste als NES entdeckte und seitdem häufig in der Molekularbiologie verwendete NES stammt aus einem Hüllprotein des HI – Virus (bekannt als *HIV – Rev – NES*). Seitdem wurden viele ähnliche, jeweils um die zehn AS lange Sequenzen entdeckt, denen eine Häufung der verzweigt-kettigen AS Leucin (L) gemeinsam ist [43]. Als Beispiel sei *HIV – Rev – NES* genannt: **LPPLERLTL** (Ein – Buchstaben – Code der AS). Trägt ein Protein eine solche NES, kommt es im Zellkern zur Assoziation mit *CRM1*, und daraufhin zur Komplexierung mit *RanGTP*. Interaktionen des Karyopherinkomplexes mit Phenylalanin (F) – Glycin (G) –

Singularitäten, den sog. *FG – repeats*, der Nukleopore an der Innenseite des KPK lösen eine Konformationsänderung der Nups aus, wodurch der Exportkomplex auf die andere Seite verbracht wird [44, 38] (s. Abb. 1-4).

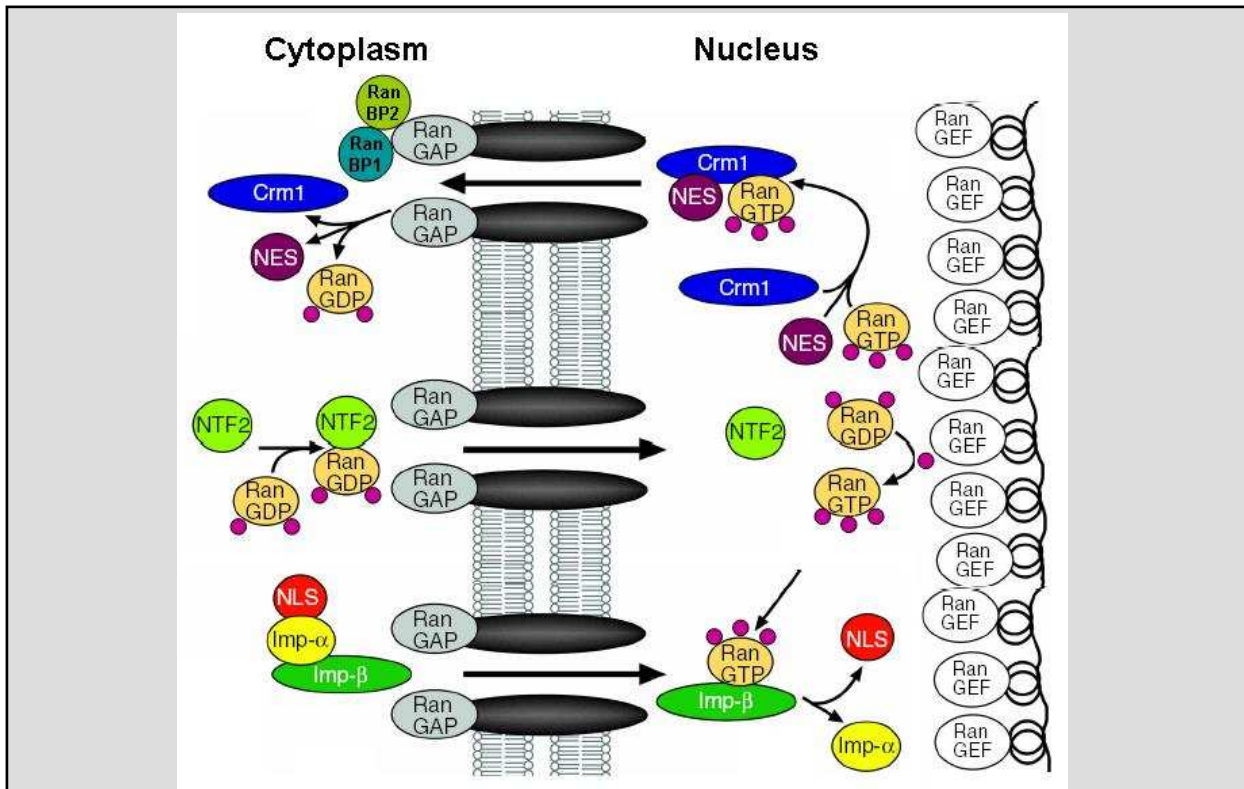


Abb.1-4: Schematische Darstellung nukleärer Transportprozesse: (modifiziert nach Pemberton und Paschal 2005) Subzelluläre Lokalisation aller am Proteinexport und – Import sowie dem Ran – Zyklus beteiligten Reaktionspartner. Der GDP/GTP – Austausch erfolgt mittels intranukleärem, Chromatin – assoziiertem *RanGEF*, die Pyrophosphat-Hydrolyse mittels *RanGAP* und *RanBP 1/2* an der Außenseite des KPK. Bildung und Dissoziation des *CRM1/NES* – Komplexes für den nukleären Export. Bildung und Dissoziation des *Importin β/NLS* – Komplexes mittels des Hilfsproteins *Importin α*. (Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis)

1.2.3. Ran – GTPase als Antrieb

Der Energielieferant für nukleäre Transportvorgänge ist die Ras – ähnliche GTPase Ran. Da Ran selbst nur eine geringe intrinsische Triphosphat – Hydrolyse-/Austausch – Aktivität [40] besitzt, ist es auf das Zusammenspiel mit regulatorischen Proteinen auf beiden Seiten der Kernmembran angewiesen. Das zytosolisch an den KPK assoziierte Protein *RanGAP* sorgt für die Hydrolyse des GTP, während das Chromatin – gebundene Protein *RanGEF* (*RCC1*), für den Austausch des Diphosphats gegen ein Triphosphat sorgt (s. Abb. 1-4). Für die korrekte Funktion von *RanGAP* ist die Assoziation mit zwei Hilfsfaktoren, *RanBP1* und *RanBP2* (*Nup358*), unerlässlich. Auf diesem Weg bildet sich ein Gradient zwischen *RanGDP* überwiegend im Zytoplasma und *RanGTP* überwiegend im Nucleoplasma [41]. Das

Triphosphat vermittelt hier einerseits die Dissoziation des Importkomplexes, andererseits die Assoziation des Exportkomplexes. Schließlich entsteht ein Fließgleichgewicht zwischen *RanGTP* von intra – nach extranukleär und mittels des Transportfaktors *NTF2* (*p10*) nicht Karyopherin – abhängig zurücktransportiertem *RanGDP* (s. 1.2.4.) [140]. Es darf davon ausgegangen werden, dass die für den nukleären Import gezeigte Abhängigkeit von Temperatur und Energiegehalt der Zelle auch für den Export gilt [42].

1.2.4. Ran – unabhängiger Transport

Neben dem von β – Karyopherinen vermittelten und *Ran* – abhängigen Export von Proteinen, t – RNA und mikroRNA [39], spielt beim Export von mRNA ein der Karyopherin – Superfamilie strukturell nicht verwandtes Adaptorprotein eine Rolle. Nach nukleärer Prozessierung (*splicing* und *5' – capping*) der mRNA wird diese vom Exportfaktor *TAP* (*NXF1*) gebunden und über den mit *NTF2* (s. 1.2.3.) strukturell verwandten Transportfaktor *NXT1* (*p15*) durch die Kernpore transportiert [44, 46]. *NTF2* und *NXT1* interagieren dabei jeweils über schwache elektrische Wechselwirkung mit den *FG – repeats* der Nukleoporine [47, 140].

1.3. Laminopathien

1.3.1. Einteilung und Pathogenesemodelle

Als Laminopathien bezeichnete man zunächst Pathologien, denen eine Veränderung der für die nukleäre Morphologie verantwortlichen Kernlamina gemeinsam ist. Es handelt sich um eine äußerst heterogene Gruppe von Krankheiten, die man basierend auf den betroffenen Geweben und damit klinischem Phänotyp in vier Gruppen unterteilen kann. Man unterscheidet Symptomenkomplexe um die quer gestreifte Muskulatur, die peripheren Nerven und das Fettgewebe sowie systemische Erkrankungen mit protrahiertem Alterungsprozess und multiplen degenerativen Gewebeaffektionen [7, 48].

Vielen hundert gesicherten Mutationen in einer Vielzahl beteiligter Genlozi stehen einige wenige Modellvorstellungen zur Pathogenese der Laminopathien gegenüber. In Kongruenz mit der Bedeutung der Lamine für die Integrität der Kernlamina (s. 1.1.4.2.) wurde das Stress – Hypervulnerabilitäts – Modell formuliert [7, 48, 53]. Zellkerne mit funktionell veränderten Laminen können weniger mechanischem Stress standhalten, als im Normalfall, was eine Erklärung für die Symptome Herz – und Muskelschwäche (s. 1.3.2.2.) darstellen könnte [54]. Darüber hinaus zeigen diese Zellen eine größere Anfälligkeit für DNA – Doppelstrangbrüche.

Das Gen – Expressions – Modell beruht auf den unterschiedlichen, den Zellzyklus und die Transkription betreffenden Interaktionen der Lamine mit ihren Bindungspartner (s. 1.1.4.4.). So schwächen *LMNA* – Mutationen sowohl die direkte Interaktion von Laminen mit Transkriptionsfaktoren (z.B. *SREBP1*), als auch die indirekte, *LAP2 α /Rb* – vermittelte (z.B. Transkriptionsfaktor *E2F*) [55, 141].

1.3.2. Primäre Laminopathien

Als primäre Laminopathien bezeichnet man alle Krankheiten die ihre Ursache in einer Veränderung von einem der drei Lamingene haben. Dabei wird ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad einer Krankheit und dem Abstand der betreffenden Mutation vom 5' – Ende des Genes vermutet [48].

Über selektive Lamin C – Laminopathien ist bisher nichts bekannt.

1.3.2.1. B – Typ Laminopathien

Bislang wurden nur zwei Krankheitsbilder mit Veränderungen der B – Typ Lamine in Verbindung gebracht. Während früher ein Zusammenhang zwischen Lamin B2 – Veränderungen und Leukämie vermutet wurde [49], konnten Padiath et al. 2006 [50] zeigen, dass eine Duplikation von *LMNB1* im Menschen zu Leukodystrophie beim Erwachsenen (*ADLD*) (OMIM 169500), einer der Multiplen Sklerose ähnlichen Erkrankung, führen kann. Im selben Genlokus gibt es jedoch noch zwei weitere Mutationen bei dieser Krankheit [51]. *LMNB2* – Punktmutationen wurden bei einer Reihe von Patienten mit Erworbener Partieller Lipodystrophie (*APL*) (OMIM 608709), einer komplexen Körperfettverteilungsstörung, häufig mit Glomerulonephritiden kombiniert, gefunden [52].

1.3.2.2. A – Typ Laminopathien

Die *Intermediate Filament Database* [56] nennt für den Genlokus 1q21.2 (*LMNA*) 27 assoziierte Krankheiten. Die Zahl der dafür verantwortlichen Mutationen innerhalb des Genes beläuft sich auf etwa das Zehnfache [48]. Es handelt sich um eine heterogene Krankheitsgruppe, deren Spektrum sich von kardiologischen (z.B. Kardiomyopathie, OMIM 115200) über neurologische (z.B. axonale Charcot – Marie – Tooth Krankheit, OMIM 605588) bis zu endokrinen (z.B. Typ A Insulin – Resistenz Syndrom, OMIM 608056) Pathologien erstreckt. Zwei Vertreter der systemischen und damit schwerwiegendsten Ausprägung sind die Hutchison – Gilford Progerie (HGPS) (OMIM 176670) und die Restriktive Dermopathie (RD) (OMIM 275210), deren Charakteristika respektive der Kernlamina Gegenstand dieser Promotionsarbeit sind.

1.3.2.2.1. Hutchison – Gilford Progerie Syndrom

Wenn auch nicht unter diesem Namen, so kennt man doch gemeinhin Patienten, die an dieser Form der Progerie, wenngleich auch mit einer geschätzten Inzidenz von 1 : 4 – 8 Mio. Neugeborenen sehr selten, leiden [7, 60]. Sie sind uns als vorzeitig gealterte Kleinkinder bekannt, die auf ebenso eindrucksvolle, wie erschreckende Weise augenscheinlich die Bürden des Alters mit der Unbeschwertheit der Kindlichkeit verbinden.

Seinen Namen trägt das Syndrom nach den beiden Erstbeschreibern Jonathan Hutchison [57] und Hastings Gilford [58], die den Phänotyp um die vorletzte Jahrhundertwende beschrieben. Die meisten Patienten erscheinen bei ihrer Geburt zunächst normal, beginnen jedoch innerhalb des ersten Lebensjahres charakteristische Merkmale zu entwickeln, denen sie ihr greisenhaftes Aussehen verdanken: Abfall von Größen – und Gewichtsperzentile, sklerodermiforme Haut, Orangenhaut, Pigmentstörungen, verringerter Anteil an subkutanem Fett, prominente oberflächliche Kopfvenen, Haarausfall, Gelenkkontrakturen, typische Gesichtsanormalitäten (prominente Stirn und Augen, Mikrognathie, dünne Lippen, breite Nase) sowie akrale Osteolysen, dünne Rippen und Defekte in der Klavikulabildung [59 – 61]. Die geistige Entwicklung bleibt altersgemäß. Die Kinder sterben im Mittel mit 13,5 Jahren an Herzinfarkt, Herzschwäche oder weiteren artherosklerotischen Ereignissen, die ihrem Wesen nach typischen Alterserscheinungen des erwachsenen Menschen entsprechen [59, 62].

Nachdem der Phänotyp seit über 100 Jahren bekannt war, konnten 2003 unabhängig voneinander Eriksson et al. [63] und de Sandre – Giovannoli et al. [64] die Ursache auf eine *LMNA* – Mutation zurückführen. Dabei fanden sie in 80% der betroffenen Fälle die stumme Punktmutation c.1824C>T (p.Gly608Gly) als ursächlich, bei der im Codon 608 ein Cytosin gegen ein Thymin ausgetauscht wird (eine Bestätigung erfolgte im gleichen Jahr durch Cao H. et al. [65]). Heute geht man davon aus, dass die spezifische Mutation G608G für etwa 60% aller HGPS – Fälle verantwortlich ist. Sie führt zur Offenlegung einer verborgenen Splice – Stelle in Exon 11, die zur Expression eines um 50 AS verkürzten Prälamins, Progerin (HGPS – Lamin) genannt, führt. Progerin besitzt das *CaaX* – Motiv, jedoch nicht mehr die zweite Prozessierungsstelle für *ZMPSTE24* (s. 1.1.3.). Neben G608G wurde eine Vielzahl von Mutationen gesichert, welche, in meist nur einzelnen Fällen, zum HGPS – Phänotyp führen [48]. Zumeist handelt es sich dabei um *de novo* Punktmutationen. Eine Heredität konnte für die meisten, darunter auch für G608G, ausgeschlossen werden.

Diese Mutationen auf genetischer Ebene führen zu verkürzten, dysfunktionellen Proteinen. Es kommt zu nukleären Ausbuchtungen (s. Abb. 1-5), Verdickung der Lamina, Reorganisation der KPK und verschlechterten mechanischen Eigenschaften (s. 1.1.4.2.). Während Prälamins A in

gesunden Zellen fast vollständig prozessiert wird, kommt es in HGPS – Zellen zur Anhäufung von Progerin intranukleär und in der Kernlamina. Dabei konnte eine Abhängigkeit vom Alter der Zellen, daraus resultierender Menge an Progerin und dem Phänotyp gezeigt werden [30, 63, 66]. Obwohl im mutierten Allel neben der Präprogerin – mRNA auch Prälamina A – mRNA, etwa im Verhältnis 40:60, transkribiert wird, scheinen die Folgen, auf Proteinebene nicht kompensiert werden zu können [67]. Dies konnte im Umkehrschluss durch Experimente verifiziert werden, in denen der HGPS – ähnliche Kernphänotyp von *ZMPSTE24*^{-/-} *LMNA*^{+/+} Mäusen nach Reduzierung der Prälamina A – Konzentration (*ZMPSTE24*^{-/-} *LMNA*^{+/-}), zumindest morphologisch reversibel war. Korrespondierende Ergebnisse lieferte *ZMPSTE24* – silencing mittels siRNA in humanen Zellen [69, 70]. Außerdem wurde mehrfach die Reversibilität des nukleären Phänotyps affektierter Zellen durch Einsatz von Farnesyltransferaseinhibitoren gezeigt [71, 72]. Neben dieser direkten Toxizität unprozessierter Lamina konnte die Fehllokalisierung Lamin – bindender Proteine für viele HGPS – Mutationen gezeigt werden [30, 68].

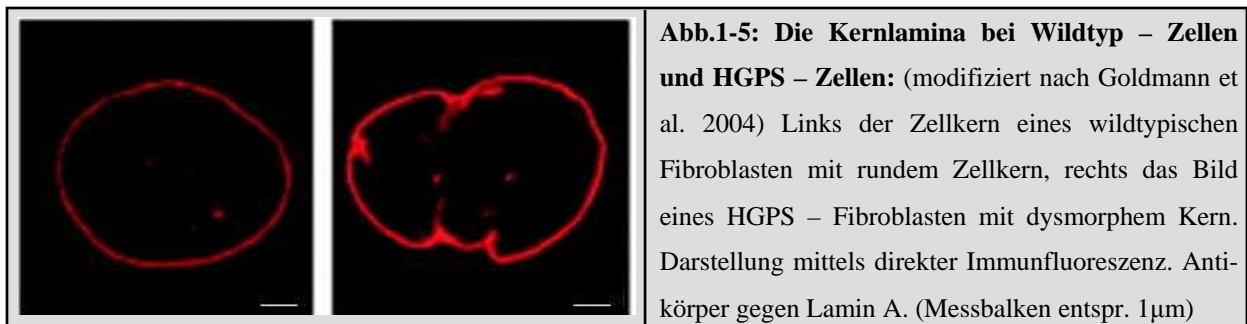


Abb.1-5: Die Kernlamina bei Wildtyp – Zellen und HGPS – Zellen: (modifiziert nach Goldmann et al. 2004) Links der Zellkern eines wildtypischen Fibroblasten mit rundem Zellkern, rechts das Bild eines HGPS – Fibroblasten mit dysmorphem Kern. Darstellung mittels direkter Immunfluoreszenz. Antikörper gegen Lamin A. (Messbalken entspr. 1µm)

1.3.3. Sekundäre Laminopathien

Als sekundäre Laminopathien bezeichnet man alle Krankheiten, die ihre Ursache nicht in einer Mutation in einem der drei Lamingene, aber in einer gestörten Prälamina – Prozessierung bzw. in einer fehlerhaften Lamin – Protein – Interaktion, aufgrund einer Mutation des entsprechenden Proteins haben. Ein Beispiel für letzteres ist die X – chromosomale Version der Emery – Dreyfuss – Muskeldystrophie, der eine Mutation im Emerin – Gen (s. 1.1.4.4.) zugrunde liegt. Umgekehrt gibt es aber auch *LMNA* – Mutationen, die zu *EDMD* führen (OMIM 310300) [48], und damit als primäre Laminopathie gelten.

Als Beispiel für eine gestörte Prälamina – Prozessierung dient die Restriktive Dermopathie, die in der Mehrzahl der Fälle aus einer Mutation im *FACE – 1* Gen (*ZMPSTE24*) resultiert, jedoch, ähnlich wie die *EDMD*, auch als primäre Laminopathie vorkommt (OMIM 275210).

1.3.3.1. Restriktive Dermopathie

1986 wurde von Witt et al. zum ersten Mal der Name Restriktive Dermopathie in den medizinischen Sprachgebrauch eingeführt, um eine seltene Entität einer fetalen Dermopathie zu beschreiben [73]. Der englische Alternativname *tight skin contracture syndrome* kann als Epitaph des klinischen Erscheinungsbildes gesehen werden, bei dem die Haut zu eng für den Körper zu sein scheint. Die meisten Patienten sterben ungeboren oder kurz nach der Geburt (bisher maximal 120 Tage) an progressivem Lungenversagen. Häufig ist vorgeburtlich im Ultraschall die sog. *fetal akinesia or hypokinesia deformation sequence (FADS)* bedingt durch die eingeschränkte Bewegungs – und Entwicklungsfreiheit des Fötus zu beobachten. Die zumeist Frühgeborenen bieten einen eindrucksvollen klinischen Phänotyp mit schuppigen, fibrosierenden Hautanomalitäten, dysmorphem Gesicht, Gelenkkontrakturen, ossären Defiziten und histologisch auffällig verändertem Kollagen [74 – 76].

Bei der Suche nach verantwortlichen Genen waren 2004 Navarro et al. [77] erfolgreich und konnten die Krankheit sowohl als sekundäre Laminopathie aufgrund einer Insertionsmutation im *FACE – 1* Gen (c.1085_1086insT) (s. 1.1.3.), als auch als primäre Laminopathie mit einer Inversionsmutation an der Splicestelle zwischen Exon und Intron 11 (IVS11+1G>A) im *LMNA* – Gen identifizieren. Darüber hinaus wurden weitere, seltenere Mutationen in diesen beiden Genen beschrieben [78, 79].

Die *LMNA* – Mutation führt ähnlich wie bei HGPS zu alternativem Spleißen, bei dem das gesamte elfte Exon (270 Basenpaare) übersprungen wird. Die resultierende mRNA kodiert für ein um 90 AS kürzeres Prälamina A dem große Teile der *tail* – Domäne fehlen, das *CaaX* – Motiv jedoch erhalten bleibt (s. 1.3.2.2.1.).

Die Insertionsmutante im *FACE – 1* – Gen führt zu einer Verschiebung im Leseraster, die in einem verkürzten und funktionsunfähigen Enzym (Zink – Metalloproteinase) resultiert. Die c.1085_1086insT Mutation folgt dabei einem autosomal rezessiven Erbgang mit Eltern und Geschwistern als asymptomatischen Trägern. Erkrankte können dabei homozygot oder gemischt heterozygot für die beschriebenen Mutationen sein. Da für die Proteinase *ZMPSTE24* Prälamina A das einzig bekannte Substrat darstellt resultieren sowohl die primäre, als auch die sekundäre Variante in einer Anhäufung von zwar farnesyliertem, jedoch nicht fertig prozessiertem, Prälamina A im Zellkern [78, 80]. Die Beobachtungen sind dabei sehr ähnlich denen bei HGPS. So kommt es ebenfalls zu Ausstülpungen der Kernlamina und Verklumpung von Laminen beider Typen zu intranukleären Aggregaten. Die Unterschiede zwischen RD und HGPS respektive klinischem Phänotyp und Mortalität sind Gegenstand aktueller Forschung.

1.4. Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten Laminopathie – verursachende, trunkierte Lamine, insbesondere HGPS– und RD – Lamin A, im Vergleich zum Wildtyp – Lamin A hinsichtlich ihres Einflusses auf den nukleären Proteinexport untersucht werden. Dazu sollte ein System heterodimerisierender Proteindomänen so modifiziert werden, dass erstmals nukleäre Transportvorgänge in Echtzeit mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden können.

Darüber hinaus sollten die trunkierten Lamine respektive ihrer Lokalisation, Beweglichkeit und ihrem Verhalten bei Veränderung der äußeren Einflüsse auf eine Zelle charakterisiert und dem Wildtyp – Protein in Zellkulturmodellen gegenübergestellt werden.

Ergänzend sollte die Rolle einer Inhibierung der initialen Prozessierung von Prälamina A in dessen Kernlokalisierung mittels Zugabe eines Farnesyltransferaseinhibitors überprüft.

Dem Vergleich von RD – Lamin A mit dem Wildtyp sollte dabei besondere Bedeutung zukommen, da in der wissenschaftlichen Praxis bisher vor allem eine Fokussierung auf HGPS stattfand.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden selbst entworfen und bei MWG Biotech synthetisiert (Rehydrierung vor Verwendung mit deionisiertem H₂O erfolgte nach Herstellerangaben). Die Oligonukleotide wurden als PCR – Primer sowie zu Sequenzierungen verwendet. Daneben wurde der von MWG Biotech zur Verfügung gestellte Standard – Primer CMV – FW verwendet. (Kennzeichnung der Primer im Folgenden mit * gekennzeichnete Nummer)

	Name	Oligonukleotid (5' – 3' – Richtung)
1*	GFP-InFusion-FW	GAGAAAGGTGTCTAGAGCCAGCAAAGGAGAAGAAC
2*	GFP-InFusion-REV	CCTGCACTCCTCTAGATTTGTAGAGCTCATCCATGCC
3*	pEpi-Dsred-FW	CACCATGGCTTCTAGGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTT GATGACAACACCGAGGACGTCATCAAGG
4*	pEpi-DsRed-REV	GCCAGAGGATTCTAGGTCTAGATCCGGTGGATCCCGG
5*	InFusion-pEPI-FW	GGACTCAGATCTCGAGAGACCCCGTCCCAGCGG
6*	InFusion-pEPI-REV	GAAGCTTGAGCTCGAGATTACATGATGCTGCAGTTCTGG
7*	DsRedMono-FW	ACCGTGGTGGAGCAGTACG
8*	LaA-Position945	GAAGCAGCTGGCAGCCAAGG
9*	pC ₄ EN-F1E-REV	CTTCCCATTCTAAACAACACC
10*	CMV-FW	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG

2.1.2. 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, NaEDTA, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, DiNatriumhydrogenphosphat, Kalium-DiHydrogenphosphat, Tween® 20, Bromphenolblau, Glycerin, Mercaptoethanol, Mevinolin, Leptomycin B, Cycloheximid, DAPI, Immersionsöl, NN'-Methylenbisacrylamid, Antibiotika (Kanamycin, Ampicillin, Gentamycin, Penicillin, Streptogramin), Trypsin, fötales Kälberserum, Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) +/- Phenolrot, Luminol, H ₂ O ₂ , pCA, DMSO

2.1.3. Molekularbiologische Materialien

Chemikalie	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>Eco</i> RV)	Fermentas
6X MassRuler™ DNA Loading Dye	Fermentas
DNA– Ladder FastRuler™ HighRange & LowRange	Fermentas
T4-Ligase	Fermentas
Nitrocellulose	Schleicher und Schüll
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
DH5α und DH10B kompetente Zellen	Invitrogen
BSA Protein Standard	SigmaAldrich
Erstantikörper <i>Anti HA</i>	Roche
Zweitantikörper <i>goat anti rabbit POX</i>	Dianova

2.1.4. Kits und Kitbestandteile

Kit oder Kitbestandteil	Hersteller
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

2.1.5. Reaktionspuffer, SDS – PAGE und Reaktionslösungen

	Zusammensetzung
TAE	2 M Tris; 0,05 M NaEDTA; 1 M Essigsäure; (pH 8,5)
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM KH ₂ PO ₄ ; (pH 7,2)
PBS Tween	s. o. + 0,05% Tween® 20
Transfer – Puffer	25 mM Tris/HCl; 192 mM Glycerin; 0,1 % SDS; 20 % Methanol ad 1 l mit Aqua dest.
Laemmli – 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)
Probenpuffer (SDS)	200 mg Bromphenolblau, 5 M Glycerin; 0,21 M SDS; 0,19 M Tris; (pH 6,9)
SDS – Sammelgel 5%	3,1 ml H ₂ O; 0,6 ml 30% Acrylamid; 1,3 ml Tris (pH 8,8); 50 µl 10% SDS; 15 µl APS; 7,5 µl TEMED;
SDS – Trenngel 10%	4,05 ml H ₂ O; 3,35 ml 30% Acrylamid; 2,5 ml Tris (pH 8,8); 0,1 ml 10% SDS; 30 µl APS; 15 µl TEMED
ECL1	0,5 ml Luminol; 0,22 ml pCA; 5 ml Tris – HCl (pH 8,5) ; ad 50 ml Aqua dest.
ECL2	32 µl 30% H ₂ O ₂ ; 5 ml Tris – HCl (pH 8,5); ad 50 ml Aqua dest.
Luminol – Stammlsg	250 mM Luminol in DMSO
ADS – Färbelösung	2,5 g Amidoschwarz; 225 ml Methanol; 225 ml Aqua dest.; 50 ml Eisessig
ADS – Entfärbelösung	237,5 ml Methanol; 237,5 ml Aqua dest.; 25 ml Eisessig
ADS – Lyselösung	80 ml Ameisensäure; 10 ml Eisessig; 10 g Trichloressigsäure

2.1.6. Material für Zellkultur

Neben den bekannten HeLa – Zellen kamen humane Fibroblasten einer Primärkultur zum Einsatz (zur Verfügung gestellt von Prof. M. Wehnert, Greifswald [89]). Diese stammten von einem gesunden Spender (Wildtyp) und einem von Restriktiver Dermopathie (RD), im Sinne einer sekundären Laminopathie, Betroffenen. Als Medium dienten DMEM sowie Phenolrot – freies DMEM, für die Lebendzellbeobachtung. Beide Medien wurden mit fötalem Kälberserum (10% für HeLa – Zellen, 20% für humane Fibroblasten) als Nährlösung und den Antibiotika Penicillin und Streptomycin (je 0,6%) versetzt.

2.2. Methoden

2.2.1. Polymerase – Kettenreaktion

Alle PCR – Amplifikationen wurden mit dem *iProof High – Fidelity (HF) DNA Polymerase – Kit* durchgeführt. Dieses enthält die *HF – Polymerase*, einen entsprechenden Puffer, 10 mM dNTP – Mix und 50 mM MgCl₂ als Stabilisator. Alle Reaktionen wurden in 50 µl – Ansätzen durchgeführt. Als PCR – Vorlage wurde jeweils 1 µg cDNA zugesetzt. Beide Primer lagen im Reaktionsansatz 0,6 µM vor. Die *HF – Polymerase* wurde stets zuletzt hinzu gegeben. Zur Amplifikation der cDNA wurde in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) folgendes Programm benutzt:

Initiale Denaturierung:	98°C	30 sek	
Denaturierung:	98°C	10 sek	} 30 Zyklen
Primer – Annealing:	50°C	30 sek	
Elongation:	72°C	30 sek	
Abschließende Elongation:	72°C	10 min	
bis zur Weiterverwendung	4°C	unbegrenzt	

Anschließend analytische Gelelektrophorese des Reaktionsansatzes (s. 2.2.9.).

2.2.2. “InFusion“ – Reaktion

Restringierter Vektor und PCR – Amplifikat wurden gemäß dem Herstellerprotokoll in einem gebrauchsfertigen „InFusion“ – Reaktionsgefäß zusammengebracht (s. 2.1.4.). Um die korrekte „InFusion“ – Reaktion zu gewährleisten enthielten die Amplifikate auf beiden Seiten des DNA – Doppelstranges jeweils 15 Nukleotide komplementär zu den Restriktionsstellen des Zielvektors. Dies wurde beim Design der Primer entsprechend berücksichtigt (s. 2.1.1.). Anschließend erfolgte die Reaktion nach Herstellerangaben bevor der Reaktionsansatz zur Transformation kompetenter *E.coli* Bakterien eingesetzt wurde (s. 2.2.6.).

2.2.3. T4 – Ligase – Reaktion

100 ng Vektor und cDNA – Insert (bei einem Vektor : Insert Verhältnis von 1:3) wurden mit T4 – Ligase bei 16°C im Wasserbad über Nacht inkubiert. 16 Stunden danach wurde der Reaktionsansatz zur Transformation kompetenter *E.coli* DHT10B oder *E.coli* DH5α Bakterien verwendet (s. 2.2.6.).

2.2.4. Restriktion

Für Ligationsexperimente wurden Expressionsvektoren gemäß den Herstellerangaben mit entsprechenden Restriktionsenzymen inkubiert und gewünschte DNA – Fragmente mit Hilfe der präparativen Agarosegelelektrophorese isoliert (s. 2.2.8.2.). Die erfolgreiche Restriktion

wurde zuvor mittels analytischer Agarosegelelektrophorese in Gegenwart eines DNA – Größenmarkers (s. 2.1.3.) und einer Negativkontrolle (unbehandelter Vektor) überprüft.

2.2.5. DNA – Sequenzierung

Alle neu klonierten Vektoren wurden mittels entsprechender Primer bei MWG Biotech mit Hilfe der Kettenabbruch – Synthese nach Sanger sequenziert (*Value Read Service in Tubes*). 1 µg DNA wurde hierzu getrocknet und entsprechend versendet.

2.2.6. Transformation

Rekombinante Vektoren wurden durch die Transformation in *E.coli* DHT10B oder *E.coli* DH5α kompetente Bakterien und anschließender Inkubation auf einer entsprechend mit Antibiotika – versetzten Kulturplatte über Nacht bei 37°C vermehrt. Gewachsene Klone wurden anschließend in 5 ml Antibiotika – versetztem LB – Medium als Übernachtskultur bei 37°C inkubiert. Diese dienten der Plasmid – Isolierung (s. 2.2.8.1.) und der Herstellung von Glycerinkulturen zur Langzeitlagerung.

2.2.7. Anlegen von Glycerinkulturen

2 ml einer Übernachtskultur oder abgeschabte Kolonien einer Kulturplatte in 2 ml LB-Medium wurden 1 min bei 10.000 g zentrifugiert (Biofuge13, HeraeusSepatech). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml einer Mischung aus 20% Glycerol und 80% LB – Medium resuspendiert und die so hergestellte Bakteriensuspension bei –80°C gelagert.

2.2.8. DNA – Isolierung

2.2.8.1. Isolierung von Plasmid – DNA aus bakteriellen Übernachtskulturen

Bakterien aus Glycerinkulturen oder von Kulturplatten wurde in 5 ml Antibiotika – versetztem LB – Medium über Nacht bei 37°C mit 50 U/min inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte die Isolierung der Plasmid – DNA mit Hilfe des *Wizard Plus SV Miniprep – Kits* von Promega gemäß Herstellerprotokoll.

2.2.8.2. DNA – Präparation aus Agarosegel

Mit Restriktionsenzymen behandelte Vektoren und PCR – Amplifikate wurden nach Agarosegelelektrophorese unter UV – Licht (UV – Transilluminator Chroma 43, Vetter GmbH) aus dem Gel isoliert und mit dem *Wizard SV Gel and PCR Clean – Up Kit* von Promega nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.8.3. DNA – Fällung mit Natriumacetat

Pufferinkompatibilitäten im *Fermentas – Five – Buffer – System* machten den Zwischenschritt der Natriumacetat – Fällung nach der ersten Restriktion notwendig. Hierzu wurde zum Restriktionsansatz nach der erforderlichen Inkubation 1/9 des Volumens an 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und das 2,5 fache des Volumens an Ethanol *p.a.* zugegeben und der Ansatz über Nacht bei –20°C inkubiert. Am nächstem Morgen erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 g für 30 min bei –4°C . Das so entstandene DNA – Pellet wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde die DNA in deionisiertem H₂O resuspendiert.

2.2.9. Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA wurden Agarose – Gele unterschiedlicher Dichte (0,8% oder 1,5% Agarose in TAE – Puffer, je nach Größe der Plasmide und durch PCR oder Restriktion gewonnenen DNA – Fragmente) verwendet. Als Größenmarker dienten der *DNA – Ladder FastRuler™ High – Range* (500 – 10000 Bp) bzw. *DNA – Ladder FastRuler™ Low – Range* (50 – 1500 Bp). Als Pipettierhilfe wurde die aufzutragende DNA mit *6X MassRuler™ DNA Loading Dye* versetzt. Die Trennung erfolgte in einer Elektrophorese – Kammer mit TAE – Puffer bei 80V. Anschließend wurde das Gel für 10 min im Ethidiumbromidbad (1 µg/ml H₂O) inkubiert und anschließend unter UV – Licht fotografiert.

2.2.10. Photometrische Messung

Mit einem Photometer (SmartSpec PLUS, BIORAD) wurde der Nukleinsäuregehalt von wässrigen Lösungen nach DNA – Isolation, Vektor – Restriktion und PCR – Amplifikation bei 260 nm sowie der Proteingehalt von Zelllysaten bei 620 nm gegen Standard (*Aqua dest.*), gemessen. Die Konzentrationsberechnung erfolgte nach dem Lambert – Beer – Gesetz (Glasküvette 1 x 1 cm).

2.2.11. Transfektion

Um exogene Proteine in kultivierten Zellen zu exprimieren wurden diese bei ~ 80% Konfluenz mit der gewünschten Plasmid – DNA transfektiert. Dabei wurden die Zellen stets am Vortag so gesplittet, dass 24 h später eine Transfektion bei etwa diesem Konfluenzniveau möglich war.

HeLa – Zellen wurden stets mit *Effectene®* (Quiagen) gemäß den Herstellerangaben transfektiert, primäre Fibroblasten dagegen mit *Effectene®* (Quiagen), *Lipofectamine®* (Invitrogen), *Metafectene®* (Biontex) oder *TransIT LTI®* (Mirus) entsprechend Herstellerprotokoll.

2.2.12. Zellkultur

Die unter 2.1.7. beschriebenen Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit als Boden – adhärente Kultur, auf unbehandelten Deckgläschen im Kulturgefäß, inkubiert. Vor jedem Arbeitsschritt (Mediumwechsel, Splitten, Transfektion) wurden die Zellen mehrmals mit 37°C warmem *PBS* gewaschen. Zum Splitten wurden die Zellen 3 min mit Trypsin inkubiert und dieses anschließend mit fötales Kälberserum – enthaltendem DMEM inaktiviert. Trypsin und DMEM wurden zuvor auf 37°C vorgewärmt. Die korrekte Lösung der Zellen vom Kulturgefäß sowie der Konfluenzgrad der Zellen wurde bei 40facher Vergrößerung lichtmikroskopisch beurteilt (MT – 3 Inversmikroskop, Olympus).

2.2.13. Zellfixation

Zur Betrachtung unter dem Mikroskop wurden die auf Deckgläschen wachsenden Zellen (HeLa – Zellen und primäre Fibroblasten) nach ihrer Behandlung entsprechend des jeweiligen Versuchsprotokolles dreimalig mit *PBS* gewaschen und anschließend mit 4% Formaldehyd in *PBS* für 10 min fixiert. Nach erneuter dreifacher *PBS* – Waschung wurden die fixierten Zellen mit N – Propylgallat auf Objektträger aufgebracht. Die Lagerung der so präparierten Zellen erfolgte unter Lichtausschluss bei 4°C.

2.2.14. DAPI – Färbung

Zur Darstellung von DNA als Indikator der Kernmorphologie wurden primäre Fibroblasten auf Deckgläschen wie oben beschrieben fixiert und anschließend zur Permeabilisierung 5 min mit 0,1% Triton X-100 inkubiert. Danach wurde für 10 min mit einer 1:3000 *DAPI* – Lösung (20 mg/ml H₂O) gefärbt und anschließend fünf Mal mit *PBS* gewaschen. Die Deckgläschen wurden ebenfalls mit N – Propylgallat auf Objektträger aufgebracht.

2.2.15. SDS – Polyacrylamid – Gelelektrophorese und Western Blot

Für die Western Blot – Analyse von Fusionsproteinen wurden HeLa – Zellen 16 nach Transfektion in Laemmli – Puffer aufgelöst und daran anschließend die Proteinkonzentration der Zelllysate durch die Amidoschwarz – Methode (s. 2.2.16.) bestimmt. Je 10 µg Protein wurden nun in einer SDS – PAGE bei 80 – 120 V separiert. Vor dem Auftragen wurden die Zellextrakte für 5 min bei 95°C denaturiert. Zum Größenabgleich wurde der Proteinmarker *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* mit aufgetragen. Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurden die Proteine bei 42 mA für 90 min in Transferpuffer (s. 2.1.5.) auf Nitrocellulosefolie transferiert. Diese wurde für 1 h in *PBS* mit 5% Magermilchpulver geblockt. Nun erfolgte eine Inkubation mit dem Erstantikörper (Anti – Hämagglutinin 1:1000 in *PBS*/5% Magermilch)

über Nacht bei 4°C und 20 U/min. Am nächsten Morgen wurde die Nitrocellulosefolie 3 x 10 min in *PBS tween* (0,05%) gewaschen und anschließend für 1 h mit dem Zweitantikörper (*garbPOX – goat anti rabbit peroxidase* 1:3000 in *PBS*) inkubiert. Nach erneuter *PBS tween* – Waschung erfolgte die Entwicklung des Blots in einer Dunkelkammer. Dazu wurde die Nitrocellulosefolie für 1 min in der *ECL* – Reagenz inkubiert (Mischungsverhältnis *ECL1/ECL2* 1:1 s. 2.1.5.) und anschließend in einer Entwicklungskassette mit dem dem *Amersham Hyperfilm ECL* 1 min entwickelt. Zur Digitalisierung wurde der Blot eingescannt.

2.2.16. Amidoschwarzmethode

Um die Proteinkonzentration in Zelllysaten zuverlässig bestimmen zu können, wurden diese mit Hilfe der Amidoschwarzmethode (ADS) gegen einen BSA Protein Standard (s. 2.1.3.) gemessen [142]. Je 10 µl Probe und Standard wurden auf Filterpapier aufgebracht, getrocknet und für 10 min mit Amidoschwarz gefärbt. Anschließend wurde der Filter wieder entfärbt und getrocknet. Die einzelnen Abschnitte des Filters wurden nun getrennt und in Plastikreaktionsgefäße für 30 min bei 50°C in 1 ml der Lyselösung aufgelöst (alle Lsg. s. 2.1.5.). Abschließend folgte die photometrische Messung bei 620 nm gegen den Leerwert und die Extrapolation des Proteingehaltes der Probe aus der Eichkurve.

2.2.17. Fluoreszenzmikroskopie

2.2.17.1. Phänotypkontrolle und DAPI – Untersuchungen

Die initiale Beurteilung der subzellulären Verteilung exprimierter GFP-/DsRed – Fusionsproteine und die Zellkernanalyse mit Hilfe der DAPI – Färbung wurden mit einem ZEISS Axioskop 2 Mot Plus bei 400 – oder 630 – facher Vergrößerung vorgenommen. Zur Digitalisierung von Okularausschnitten enthielt das Mikroskop eine SPOT Kamera und eine Softwareausstattung mit SPOT RD V3.5 (beides Digital Image Inc.). Beim Mikroskopieren mit > 400 – facher Vergrößerung wurde Immersionsöl mit einem Brechungsindex von 1,4 verwendet.

2.2.17.2. Mikroskopie fixierter Zellen

Neben optischer Fluoreszenzmikroskopie wurden transfektierte Zellen zur $F_{N/C}$ – Analyse mit Hilfe der konfokalen Laser – Scanning – Mikroskopie aufgenommen (CLSM – *confocal laser scanning microscopy*). Hierzu wurde ein inverses ZEISS LSM 510 konfokales Mikroskop in Verbindung mit einem Argon – Laser zur Anregung grün fluoreszierender Proteine (488 nm – Linie) und einem Helium – Neon – Laser zur Anregung rot fluoreszierender Proteine (633 nm

– Linie) eingesetzt. Alle Aufnahmen erfolgten bei 630facher Vergrößerung unter Verwendung von Immersionsöl (Brechungsindex 1,4).

2.2.17.3. Lebendzellmikroskopie

Lebendzellbeobachtungen wurden mit einem inversen Leica SP5 konfokalen Mikroskop, ausgerüstet mit einem Argon – Laser und einem DPSS (*diode pumped solid state*) – Laser, durchgeführt. Die Anwendungen wurden möglich durch Verwendung der *Leica Application Suite Advanced Fluorescence* (LAS AF) Software in Verbindung mit einer DMI6000 Objektträger Vorrichtung (Leica Micro Systems), welche die Beobachtung mehrerer Positionen auf dem gesamten Präparat erlaubt. Zusätzlich wurde eine Objektivheizung (37°C) verwendet, um Temperatureffekte auf die Langzeitbeobachtungen zu minimieren. Die Experimente und Aufnahmen erfolgten bei 630facher Vergrößerung, ebenfalls unter Verwendung von Immersionsöl (Brechungsindex 1,4).

Lebendzellmikroskopie für Untersuchungen zur Proteinexportkinetik:

Hierzu wurden Zellen auf unbehandelten 24 mm Deckgläschen kultiviert und 16 h vor Analyse mit den Heterodimerisationsvektoren (s. 3.1.1.) transfektiert. Die Deckgläschen wurden in eigens dafür entworfenen Kammern (Jens Günther, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Würzburg) fixiert und auf dem vorgeheizten Objektisch positioniert. 1 ml 37°C vorgewärmtes Phenolrot – freies DMEM wurde zugegeben und entsprechende, beide Proteine exprimierende Zellen aufgesucht, digital markiert und als Zeitpunkt $t = 0$ fotografiert. Nun wurde der Heterodimerisierer AP21967 zugegeben und die zuvor markierten Zellen 30 – mal alle 2 min für eine Bildaufnahme mit beiden Lasern gescannt. Die Aufnahme erfolgte in zwei Kanälen, sodass eine subzelluläre $F_{N/C}$ – Analyse beider Fusionsproteine durchgeführt werden konnte.

FRAP – Untersuchungen zur Diffusionsgeschwindigkeit exprimierter Prälamina A – Mutanten:

FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) – Analysen erfolgten mit Hilfe einer speziellen Leica Software (*FRAP – tools*, LAS AF). Hierzu wurden HeLa – Zellen mit den pEpi – Vektoren (s. 3.4.1.) transfektiert und 16 h später nach oben beschriebener Methode dem Experiment zugeführt. Dies erfolgte in einer beliebig wählbaren $2 \times 5 \mu\text{m}$ großen *region of interest* (ROI) durch Bleichen mit den Linien 561 nm (DPSS), 488 nm, 514 nm (Argon) der beiden Laser mit jeweils 100% Intensität. Bilder konnten bei diesen Einstellungen mit maximal 4,8 Hz aufgenommen werden, sodass nach einem initialen Scan zum Zeitpunkt $t = 0$ und drei Scans bei voller Intensität (Bleichen), das erste Bild also wieder nach 0,615 s aufgenommen werden konnte. Nun wurden sequentiell zehn Bilder im Abstand von jeweils 0,205 s und 60 Bilder im Abstand von 0,5 s, insgesamt also 70 Bilder über einen Zeitraum von etwa 33 s nach

dem Bleichen, gescannt. Die 71 Bilder wurden in einem Stapel zusammengefasst und mittels *ImageJ* (s. 2.2.18.) analysiert. Ein signifikanter Fluoreszenzverlust aufgrund der häufigen Scans wurde nicht gemessen, sodass die Analyse in der *region of interest* mathematisch lediglich mit der Fluoreszenz im Hintergrund korrigiert werden musste.

2.2.18. $F_{N/C}$ – Bestimmung

Der $F_{N/C}$ (Fluoreszenz im Kern/Fluoreszenz im Zytoplasma) wurde mit Hilfe von *ImageJ Version 1.34s* (NIH) und Excel (Microsoft) bestimmt. Dazu wurde an drei Punkten im Zellkern, an drei Punkten im Zytoplasma sowie an drei Punkten außerhalb der Zelle, d.h. im Hintergrund, die Fluoreszenz gemessen. Diese Messwerte wurden anschließend mit Hilfe eines Excel *macrosheets* gemittelt und anhand der Formel $(F_N - F_B) / (F_C - F_B)$ der $F_{N/C}$ berechnet. (N = *nucleus*; C = *cytoplasm*; B = *background*). Bei allen im folgenden Ergebnisteil genannten $F_{N/C}$ – Werten handelt es sich also stets um mittlere Werte.

2.2.19. Thermischer Stress für transfektierte HeLa – Zellen

Thermischer Stress für HeLa – Zellen wurde gemäß der 2005 von Sánchez et al. [83] vorgestellten Methode appliziert. Dabei diente ein GFP – β – Galaktosidase – Fusionsprotein als Indikator für die Stabilität der Kernhülle (zur Verfügung gestellt von T. Stamminger [84]). Hierzu wurden Zellen 16 h post Transfektion (einfach oder doppelt transfektiert – s.3.3.4.) 30 min thermischem Stress durch Zugabe von DMEM (vortemperiert auf 37°C, 45°C, 48°C, 51°C und 55°C) und einer Inkubation in einem gleichtemperierten Inkubator ausgesetzt. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel und eine weitere Inkubation der Zellen bei 37°C für 30 min, bevor sie fixiert und einer $F_{N/C}$ – Messung zugeführt wurden.

2.2.20. Statistische Methoden

Zur Analyse statistischer Signifikanzen unterschiedlicher Versuchsreihen wurde mit Hilfe von *OriginPro7.5* (OriginLab) ein *two – sample – t – test* (*Student t – test*) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Nukleärer Export in HeLa – Zellen

3.1.1. Klonierungen: Induzierbarer Kerntransport mittels Heterodimerisation

Zur *in vivo* (Lebendzellbeobachtung) und *in vitro* (Mikroskopie fixierter Zellen) (s. 2.2.17.) Darstellung des nukleären Exports wurde, basierend auf dem *ARGENT™ Regulated Heterodimerization Kit 2.0* von ARIAD [81], ein System fluoreszierender Heterodimere generiert, mittels derer induzierbarer Proteinexport möglich war.

Die induzierbare Assoziation beider Heterodimere beruht auf der Interaktion der humanen Proteine FKBP12 (*FK605 binding protein*) und FRAP (*mTOR/FKBP12 Rapamycin-associated protein*) mit Rapamycin, einem Zellzyklus – Inhibitor. Das Kit bietet hierfür Vektoren zur Expression der Rapamycin – bindenden Domänen FKBP (aus FKBP12) und FRB* (aus FRAP) (s. 6.1.1.-3.). Als Heterodimerisierer dient das Rapamycin – Analogon AP21967, welches im Gegensatz zu Rapamycin, den natürlichen Zellzyklus nicht beeinflusst, da es nur die mutierte FRB* – Domäne binden kann.

Um die drei verwandten Fusionsproteine zur Darstellung des nukleären Proteinexports mittels Fluoreszenzmikroskopie nach AP21967 Zugabe zu erhalten, wurden die Originalvektoren in folgender Art und Weise verändert (Vektorkarten s. Anhang 6.1.):

I) Fusionsprotein NLS – GFP – FKBP_{1x}:

Mit Hilfe der Primer 1* und 2* wurde die GFP – cDNA aus dem Vektor pDest53 amplifiziert und in einer „InFusion“ – Reaktion in den mit *XbaI* geschnittenen Vektor pC₄EN – F1 zwischen die NLS– und FKBP – Domäne inseriert. Gelelektrophoretisch wurde ein entsprechender GFP – cDNA enthaltender pC₄EN – F1 Klon ausgewählt, mit Hilfe des Primers 10* sequenziert und als pNLS – GFP – FKBP_{1x} benannt (Dieser Expressionsektor wurde in Zusammenarbeit mit Tilman Kiel im Rahmen seiner Promotion kloniert).



II) Fusionsprotein NLS – GFP – FKBP_{3x}:

Aus dem Vektor pC₄EM – F2E wurde die für die Doppel – FKBP – Domäne kodierende cDNA mittels *XbaI* und *SpeI* Verdau herausgeschnitten, aus einem präparativen Agarosegel (0.8%)

isoliert und in den mit *XbaI* geöffneten Expressionsvektor pNLS – GFP – FKBP_{1x} inseriert. Die *XbaI*- und *SpeI* – spezifischen Überhänge sind zueinander kompatibel. Die Ligation erfolgte mit Hilfe der konventionellen T4 – Ligase – Reaktion. Ein entsprechender, FKBP_{2x} – cDNA – enthaltender, pNLS – GFP – FKBP_{1x} Klon wurde ausgewählt, als pNLS – GFP – FKBP_{3x} bezeichnet und schließlich mit dem Primer 2* sequenziert.



Abb.3-2: NLS – GFP – FKBP_{3x}: Das Fusionsprotein beginnt wie NLS – GFP – FKBP_{1x} mit der NLS. Hier folgen dem GFP jedoch drei FKBP – Domänen.

III) Fusionsprotein NES – DsRed – FRB*:

Der die FRB* – cDNA enthaltende Vektor pC₄ – R_HE wurde mittels *XbaI* zwischen Startcodon und FRB* – Domäne geöffnet. Mit den Primern 3* und 4* wurde in einer PCR DsRed aus DsRed – MonoC1 amplifiziert. Der *forward* – Primer 3* kodiert dabei auch die HIV – Rev – NES (LPPLERLTL – s.1.2.2.). Amplifikat und restringierter Vektor wurden in einer „InFusion“ – Reaktion miteinander rekombiniert. Entsprechend einer analytischen Gelelektrophorese wurde ein DsRed – cDNA enthaltender Klon ausgewählt, mit Hilfe des Primers 10* sequenziert und als pNES – DsRed – FRB* benannt.

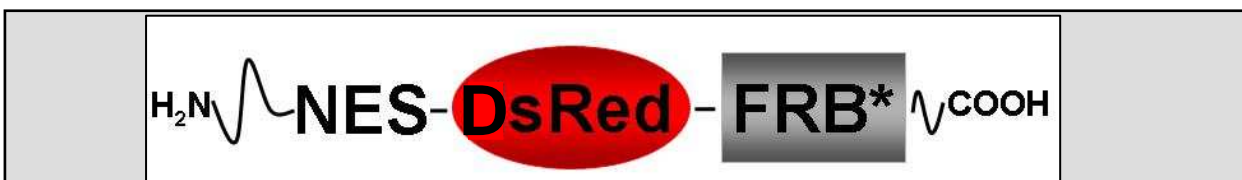
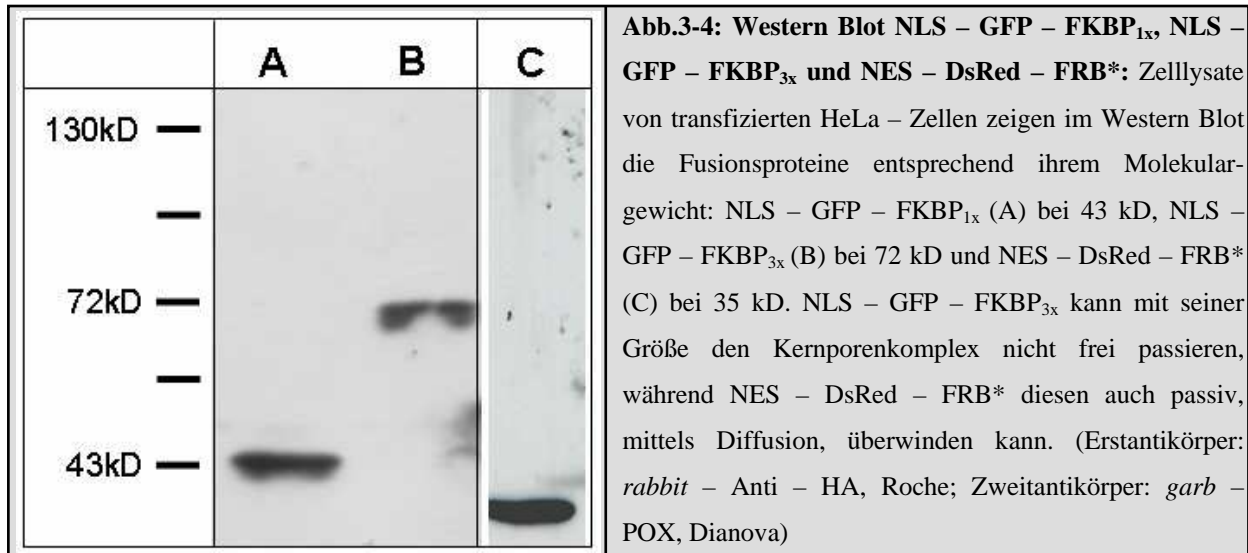


Abb.3-3: NES – DsRed – FRB*: Das Fusionsprotein enthält die nukleäre Exportsequenz NES des HIV Proteins Rev, gefolgt von der DsRed- und FRB*- Domäne.

3.1.2. Expression des induzierbaren Exportsystems

Zur Charakterisierung des nukleären Exportes in HeLa – Zellen wurden diese mit den unter 3.1.1. beschriebenen Expressionsvektoren transfektiert und die entsprechenden Fusionsproteine 16 h exprimiert (s. Abb. 3-4).



In Abwesenheit des Heterodimerisierers AP21967 sind NLS – GFP – FKBP_{1x} und NLS – GFP – FKBP_{3x} erwartungsgemäß stark nukleär lokalisiert ($F_{N/C} = 4,36 \pm 0,13$ bzw. $5,57 \pm 0,13$), während NES – DsRed – FRB* aufgrund der NES stärker zytoplasmatisch lokalisiert ist ($F_{N/C} = 0,66 \pm 0,02$) (s. Abb. 3-5 u. 3-6). Dies gilt auch bei Doppelsexpression eines der beiden grün fluoreszierenden mit dem rot fluoreszierenden Fusionsprotein.

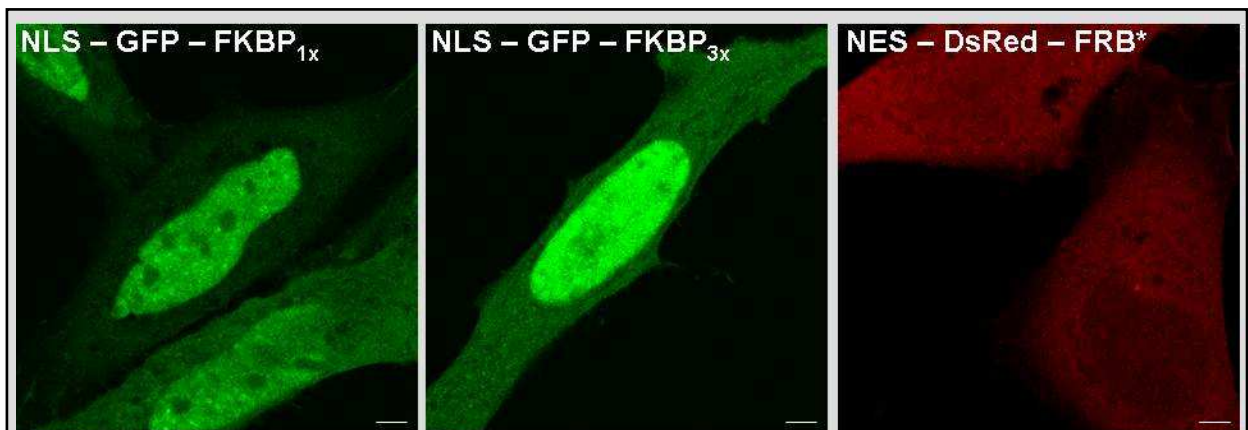
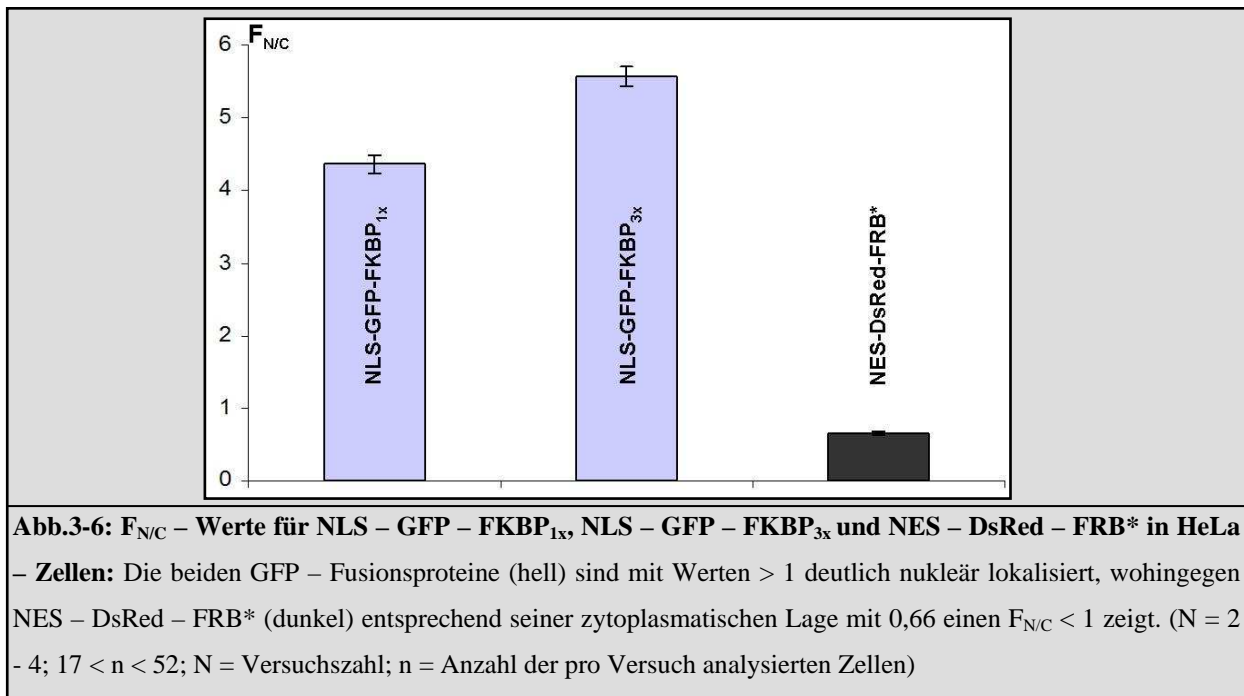


Abb.3-5: Subzelluläre Lokalisation von NLS – GFP – FKBP_{1x}, NLS – GFP – FKBP_{3x} und NES – DsRed – FRB* in HeLa – Zellen: Beide NLS – enthaltenden Fusionsproteine weisen eine höhere Fluoreszenz im Zellkern auf. Dagegen ist NES – DsRed – FRB* eher zytoplasmatisch lokalisiert. (630x Vergrößerung; Messbalken 1µm)

Da NLS – GFP – FKBP_{3x} aufgrund seiner Größe effizienter im Zellkern lokalisierte als das nur mit einer FKBP – Domäne versehene Fusionsprotein NLS – GFP – FKBP_{1x} und damit Änderungen der $F_{N/C}$ – Werte nach Induktion des Kernexports deutlicher ausfallen sollten, wurden alle Heterodimerisierungsversuche mit dem FKBP_{3x} – Fusionsprotein durchgeführt.



3.1.3. AP21967 – induzierter Kernexport

Zur Messung des nukleären Proteinexportes wurden HeLa – Zellen mit den Expressionsvektoren pNLS – GFP – FKBP_{3x} und pNE – DsRed – FRB* transfektiert und der Kernexport 16 h post Transfektion durch Zugabe des Heterodimerisierers AP21967 induziert.

Die Substanz wurde nach dreimaliger Spülung der HeLa – Zellen mit *PBS* direkt dem Medium zugegeben. Assoziierten beide Proteine mittels ihrer FKBP – und FRB* – Domänen über AP21967, bildete sich ein Proteinkomplex, der sowohl Import–, als auch Exportaktivität besaß. Aufgrund der 3fach FKBP – Domänen – Ausstattung von NLS – GFP – FKBP_{3x} (es können pro NLS – GFP – FKBP_{3x} maximal 3 NES – DsRed – FRB* binden) überwiegte der aktive CRM1/NES – vermittelte Kernexport des Komplexes und es kam zu einer Veränderung der von NLS – GFP – FKBP_{3x} – verursachten Grünfluoreszenz von ursprünglich $F_{N/C} > 1$ (vor AP21967 – Zugabe) auf $F_{N/C} < 1$ (post AP21967 – Zugabe) (s. Abb. 3-7).

Der $F_{N/C}$ für das grün fluoreszierende NLS – GFP – FKBP_{3x} sank dabei von $5,57 \pm 0,13$ auf $0,40 \pm 0,02$ binnen 60 min nach Zugabe von AP21967. Während weiterer 60 min änderte sich der $F_{N/C}$ nur noch wenig ($F_{N/C} = 0,36 \pm 0,03$). NES – DsRed – FRB* verhielt sich entsprechend und änderte seinen $F_{N/C}$ von $0,66 \pm 0,02$ auf $0,31 \pm 0,02$ nach 60 bzw. $0,24 \pm 0,02$ nach 120 min (s. Abb. 3-8). Die gewählten Konzentrationen von AP21967 (laut Herstellerangaben bis zu $1\mu\text{M}$ möglich) blieben dabei ohne signifikanten Einfluss auf die Veränderung des $F_{N/C}$. Jeweils eine Stunde nach Zugabe von AP21967 lag der $F_{N/C}$ für die Konzentration von $0,5\mu\text{M}$ bei $0,38 \pm 0,04$ bzw. $0,40 \pm 0,02$ für $1\mu\text{M}$. Da jedoch bei der höheren Konzentration eine größere

Anzahl an Zellen den beschriebenen Export zeigen, wurde eine AP21967 – Konzentration von 1 μM bei allen im Folgenden beschriebenen Versuchsansätzen verwendet.

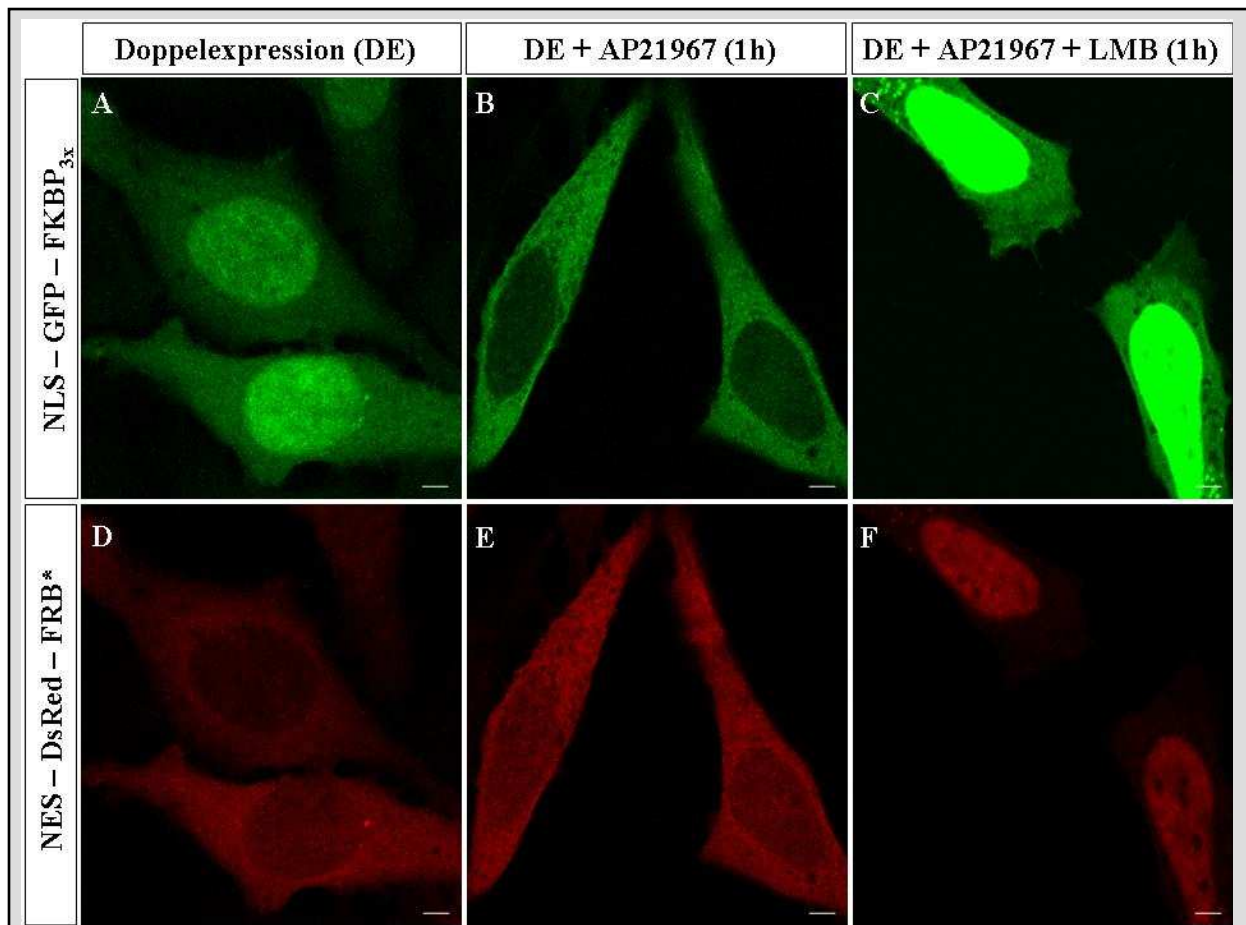


Abb.3-7: Subzelluläre Lokalisation von NLS – GFP – FKBP_{3x} (A – C) und NES – DsRed – FRB* (D – F) unter drei Bedingungen: A, D Doppelexpression (DE) beider Proteine ohne Zugabe des Heterodimerisierers und 1 h nach Zugabe in der Endkonzentration von 1 μM (**B, E**); beide Fusionsproteine erfuhren dadurch eine Verlagerung von intra – nach extranukleär, was einer Verringerung des $F_{\text{N/C}}$ entsprach. Zusätzliche Gabe (**C, F**) von 100 nM Leptomycin B (LMB) verhinderte den CRM1 – vermittelten Export. Dem entsprach die Anreicherung beider Heterodimere intranukleär und eine Erhöhung des $F_{\text{N/C}}$. (630x Vergrößerung; Messbalken entspricht 1 μm)

Der durch CRM1/NES – DsRed – FRB* Interaktion vermittelte Export kann mit Leptomycin B (LMB), einem Pilzgift aus *Streptomyces spp.*, selektiv blockiert werden [85]. So ergaben $F_{\text{N/C}}$ – Bestimmungen nach AP21967 – Zugabe (1 μM) und in Gegenwart von LMB (100 nM) eine Arretierung des Exportprozesses mit konsekutiver nukleärer Anreicherung des Komplexes infolge der noch verbleibenden Importaktivität (s. Abb. 3-7). Der $F_{\text{N/C}}$ stieg dabei zeitabhängig für die Grünfluoreszenz von $5,57 \pm 0,13$ auf $9,90 \pm 0,76$ bzw. $12,47 \pm 0,67$ nach 1 bzw. 2 h und für die DsRed – Fluoreszenz von $0,66 \pm 0,02$ auf $19,16 \pm 2,99$ bzw. $24,97 \pm 2,40$ nach 1 bzw. 2 h (s. Abb. 3-8).

Um eine Beeinflussung der Transportvorgänge, durch während der Messzeit neu synthetisierte Proteine, auszuschließen, wurde zu den oben beschriebenen Versuchsansätzen zeitgleich mit AP21967 und LMB noch Cycloheximid, ein Protein – Biosynthese – Hemmstoff aus *Streptomyces griseus* (100 nM), zugesetzt.

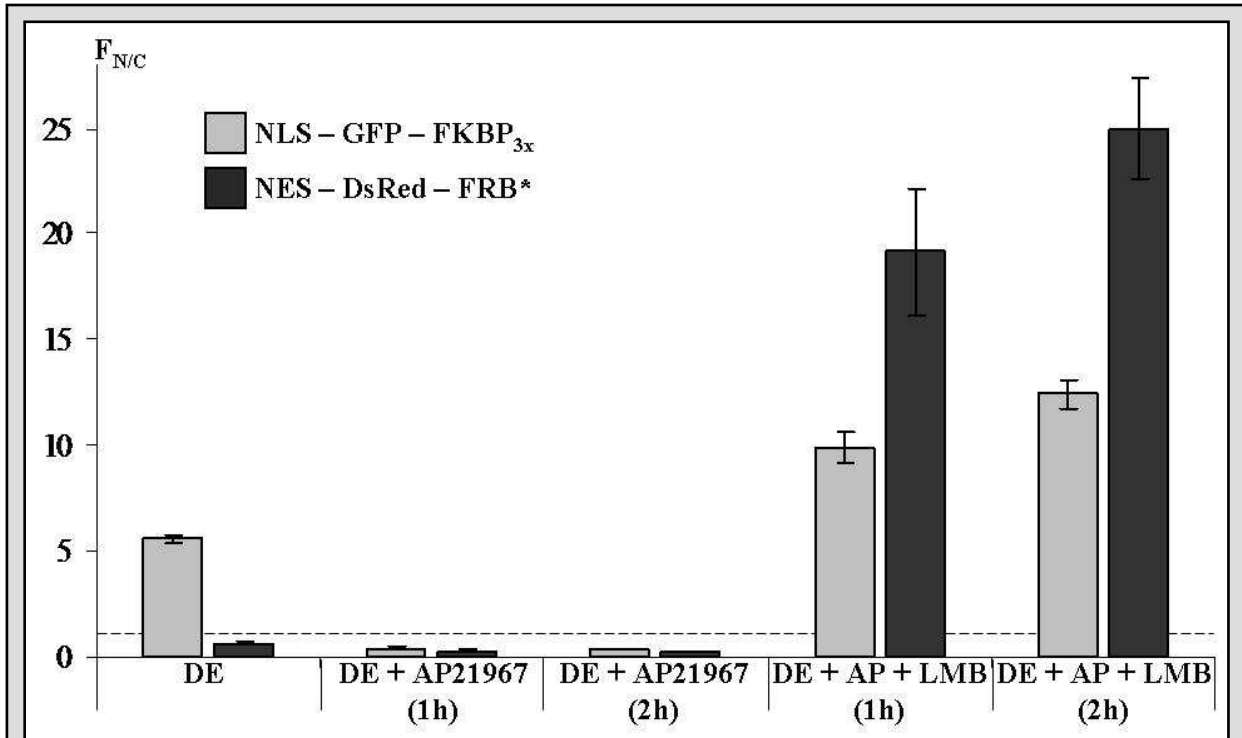


Abb.3-8: $F_{N/C}$ – Werte für NLS – GFP – FKBP_{3x} (hell) und NES – DsRed – FRB* (dunkel) unter AP21967–, LMB – und Cycloheximid – Zugabe: Doppelexpression (DE) vor Zugabe sowie 1 und 2 h nach Zugabe des Heterodimerisierers AP21967 (1 μ M). Außerdem 1 und 2 h nach Zugabe sowohl des Heterodimerisierers, als auch des CRM1 – Inhibitors Leptomycin B (LMB – 100 nM). Es zeigt sich eine zeitabhängige Ab- bzw. Zunahme des $F_{N/C}$ der Grünfluoreszenz, also eine Veränderung der Proteinlokalisierung von NLS – GFP – FKBP_{3x} von intra- nach extranukleär (gestrichelte Linie entspricht einem $F_{N/C}$ von 1), je nachdem, ob die Bedingungen aktiven Export induzieren (nur AP21967) oder diesen blockieren (AP21967 + LMB). (2 < N < 4; 17 < n < 52)

3.1.4. Dynamik des nukleären Exportes

Um den nukleären Export von NLS – GFP – FKBP_{3x} in HeLa – Zellen zeitlich auflösen zu können, wurden Zellen, welche beide Fusionsproteine exprimierten, der unter 2.2.17.3. beschriebenen *in vivo* – Analyse zugeführt.

Dadurch konnte erstmals ein nukleärer Exportvorgang in Echtzeit analysiert werden (s. Abb. 3-9) und die Kinetik des Crm1 – vermittelten Exports von NLS – GFP – FKBP_{3x} bestimmt werden. Der $F_{N/C}$ folgte der Exponentialfunktion $F_{N/C}(t) = F_{N/C \max} * e^{-t/t_{1/2}}$ mit $t_{1/2} = 9,6$ min. Nach 30 min waren fast 90% des NLS – GFP – FKBP_{3x} – Proteins infolge der AP21967 – induzierten Komplexbildung mit NES – DsRed – FRB* vom Zellkern ins Zytoplasma transportiert (s. Abb. 3-10).

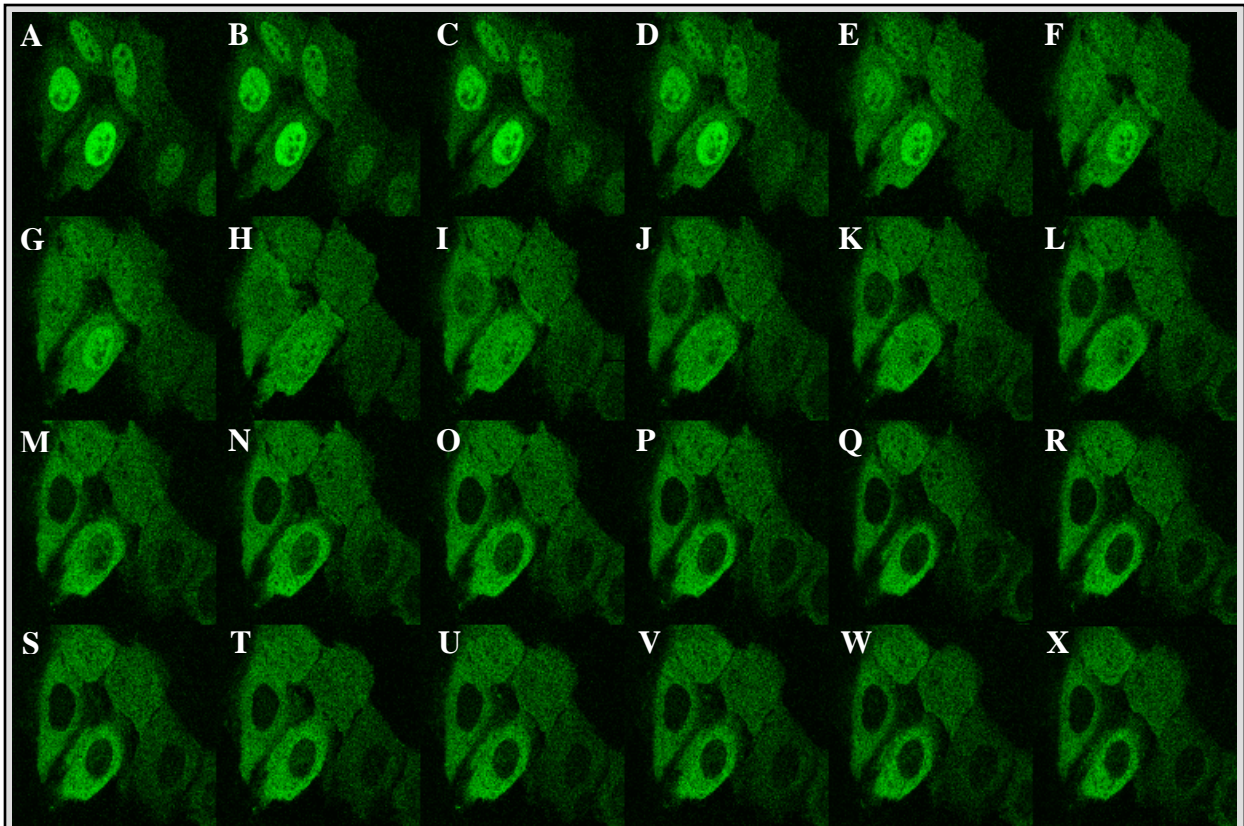


Abb.3-9: CLSM – Bilder des Nukleären Exports von NLS – GFP – FKBP_{3x} zeitlich aufgelöst: 24 Bilder im Abstand von je 2 min (A = ohne AP21967, B-X = mit AP21967 - 1µM) zeigen den nukleären Export von NLS – GFP – FKBP_{3x}. Bei allen beobachteten Zellen des Bildausschnitts nimmt die Fluoreszenz im Zellkern zu Gunsten der Fluoreszenz im Zytoplasma ab, gleichbedeutend einer $F_{N/C}$ – Veränderung von > 1 nach < 1 . (630x Vergrößerung, der Bildausschnitt misst 60 x 60 µm)

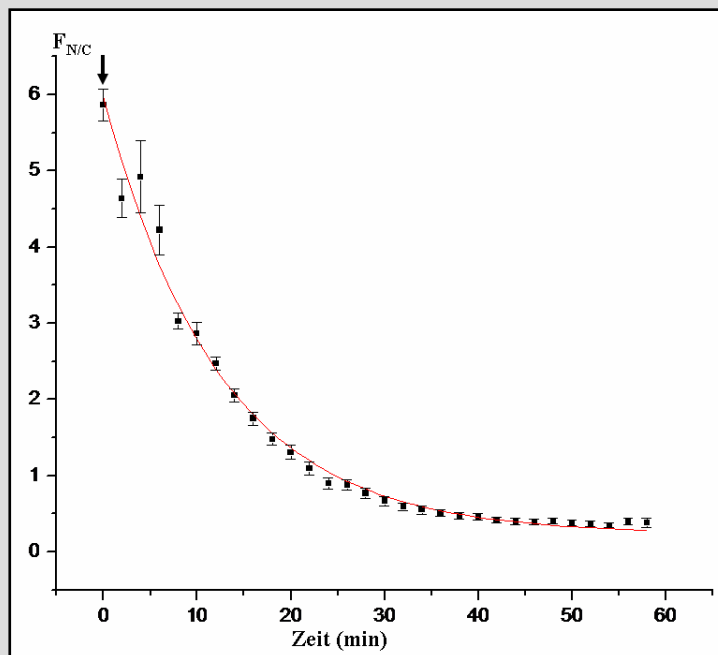


Abb.3-10: Graphische Darstellung des $F_{N/C}$ von NLS – GFP – FKBP_{3x} nach Zugabe von AP21967 in Abhängigkeit der Zeit: Zugabe des Heterodimerisierers (Pfeil - 1µM) induziert den nukleären Export von NLS – GFP – FKBP_{3x}. (N = 4; 6 < n < 13)

3.2. Nukleärer Export in humanen Fibroblasten

Neben HeLa – Zellen wurde der nukleäre Export mittels des gleichen Versuchssystems auch in menschlichen Fibroblasten untersucht. Uns standen dafür die unter 2.1.6. beschriebenen Wildtyp– sowie RD – Fibroblasten als Primärkultur zur Verfügung (s.Abb. 3-11).

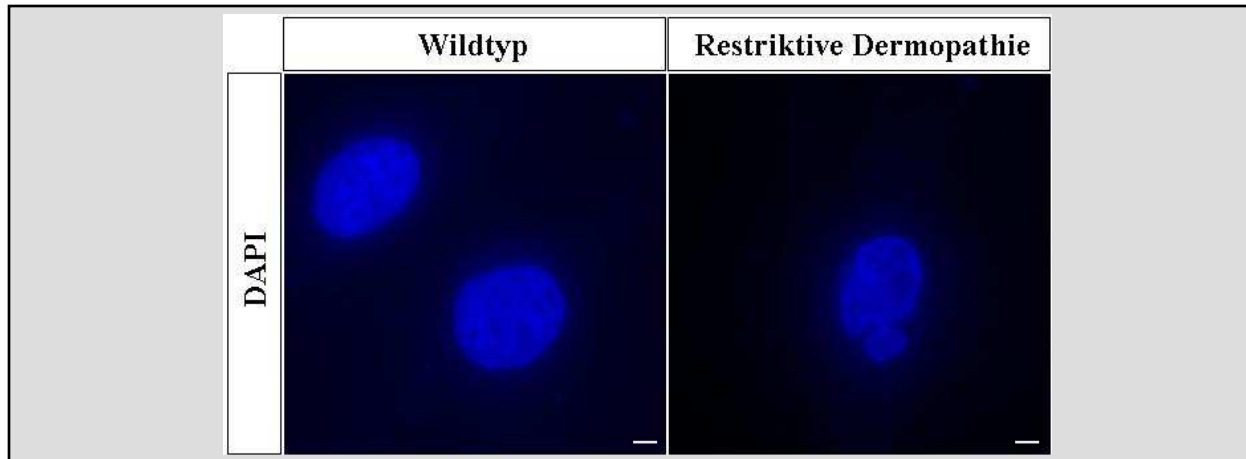


Abb.3-11: DAPI – Färbungen der Wildtyp – Fibroblasten und der RD – Fibroblasten: Die Morphologie des RD – Zellkerns erscheint gegenüber den Kernen der Wildtyp – Zellen aufgrund der gestörten Prälamina A – Prozessierung dysmorph. (630x Vergrößerung; Messbalken entspricht 1µm)

Diese wurden mit den Expressionsvektoren pNLS – GFP – FKBP_{3x} und pNES – DsRed – FRB* doppeltransfiziert. Dabei entsprach die subzelluläre Verteilung der Fusionsproteine der Wildtyp – Linie und der RD – Linie, der unter 3.1.2. für HeLa – Zellen Beschriebenen (s. Abb. 3-12). Die $F_{N/C}$ – Werte für NLS – GFP – FKBP_{3x} lagen für die Wildtyp – Fibroblasten bei $4,04 \pm 0,30$, während dieser für die RD – Linie $4,32 \pm 0,36$ betrug. Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei HeLa – Zellen war der $F_{N/C}$ für NES – DsRed – FRB* in den Fibroblasten leicht > 1 . Er betrug für die Wildtyp – Linie $1,42 \pm 0,07$. Der gleiche Effekt zeigte sich in der RD – Linie mit $1,43 \pm 0,06$ (s. Abb. 3-13).

Eine Stunde nach Induktion des Exports (AP21967 – 1 µM) sank der $F_{N/C}$ für beide Fusionsproteine in beiden Zelllinien erwartungsgemäß ab. Dabei zeigte sich für NLS – GFP – FKBP_{3x} jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp – Zellen ($F_{N/C} = 0,37 \pm 0,04$) und RD – Zellen ($F_{N/C} = 0,38 \pm 0,03$). Auch NES – DsRed – FRB* verhielt sich für beide Zelllinien ähnlich ($0,49 \pm 0,07$ bzw. $0,40 \pm 0,03$). Es konnte damit unter den gegebenen Umständen kein signifikanter Unterschied im nukleären Export von NLS – GFP – FKBP_{3x} zwischen gesunden Fibroblasten und RD – Fibroblasten festgestellt werden.

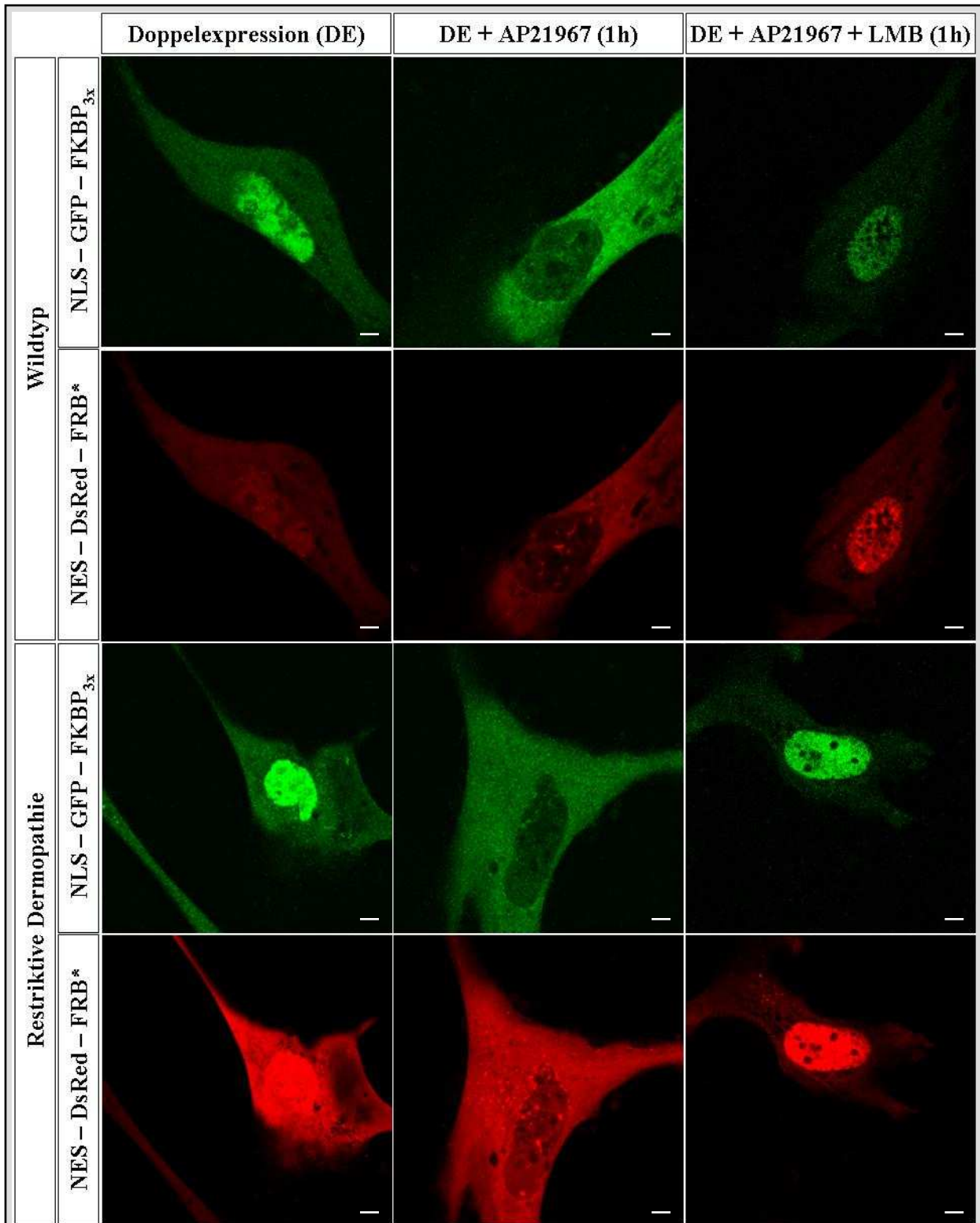


Abb.3-12: CLSM – Bilder der subzellulären Lokalisation von NLS – GFP – FKBP_{3x} und NES – DsRed – FRB* in Wildtyp- und RD – Fibroblasten mit/ohne AP21967 und mit/ohne LMB: Bei Doppelexpression ohne Heterodimerisierer findet sich NLS – GFP – FKBP_{3x} vorwiegend nukleär lokalisiert, während NES – DsRed – FRB* sich etwa gleichmäßig im Zyto- und Nukleoplasma verteilt. 1 h nach Induktion des nukleären Proteinexportes mittels AP21967 finden sich beide Fusionsproteine vorwiegend zytosolisch und entsprechen damit den unter 3.1.2. beschriebenen subzellulären Verteilungen der Fusionsproteine in HeLa – Zellen. In beiden Zelllinien kommt es ebenfalls zu einer starken nukleären Anreicherung beider Fusionsproteine bei selektiver Inhibierung des CRM1/NES – Proteinexportes mittels LMB. (630x Vergrößerung, Messbalken entspricht 1 µm)

Auch 30 min nach Induktion des Exports mittels AP21967 zeigten Wildtyp- und RD - Zellen keinen signifikanten Unterschied im $F_{N/C}$ für NLS - GFP - FKBP_{3x}. Er betrug $0,34 \pm 0,06$ für Wildtyp - Fibroblasten und $0,24 \pm 0,05$ für RD (s. Abb. 3-13). Da die $F_{N/C}$ - Werte nach 30 min weitgehend dem Wert nach 60 min entsprechen, kann eine ähnliche Exportkinetik, wie die unter 3.1.4. für HeLa - Zellen beschriebene, angenommen werden.

Zugabe von Leptomycin B (100 nM) zum Heterodimerisierungsansatz zeigte auch hier den zu erwartenden Anstieg des $F_{N/C}$ aufgrund der Inhibierung des Exportkomplexes, mit einem $F_{N/C}$ von $5,30 \pm 0,13$ (Wildtyp - Fibroblasten) und $5,81 \pm 0,68$ (RD - Fibroblasten) für NLS - GFP - FKBP_{3x} bzw. $3,29 \pm 0,03$ (Wildtyp - Fibroblasten) und $3,64 \pm 0,77$ (RD - Fibroblasten) für NES - DsRed - FRB* (s. Abb. 3-12).

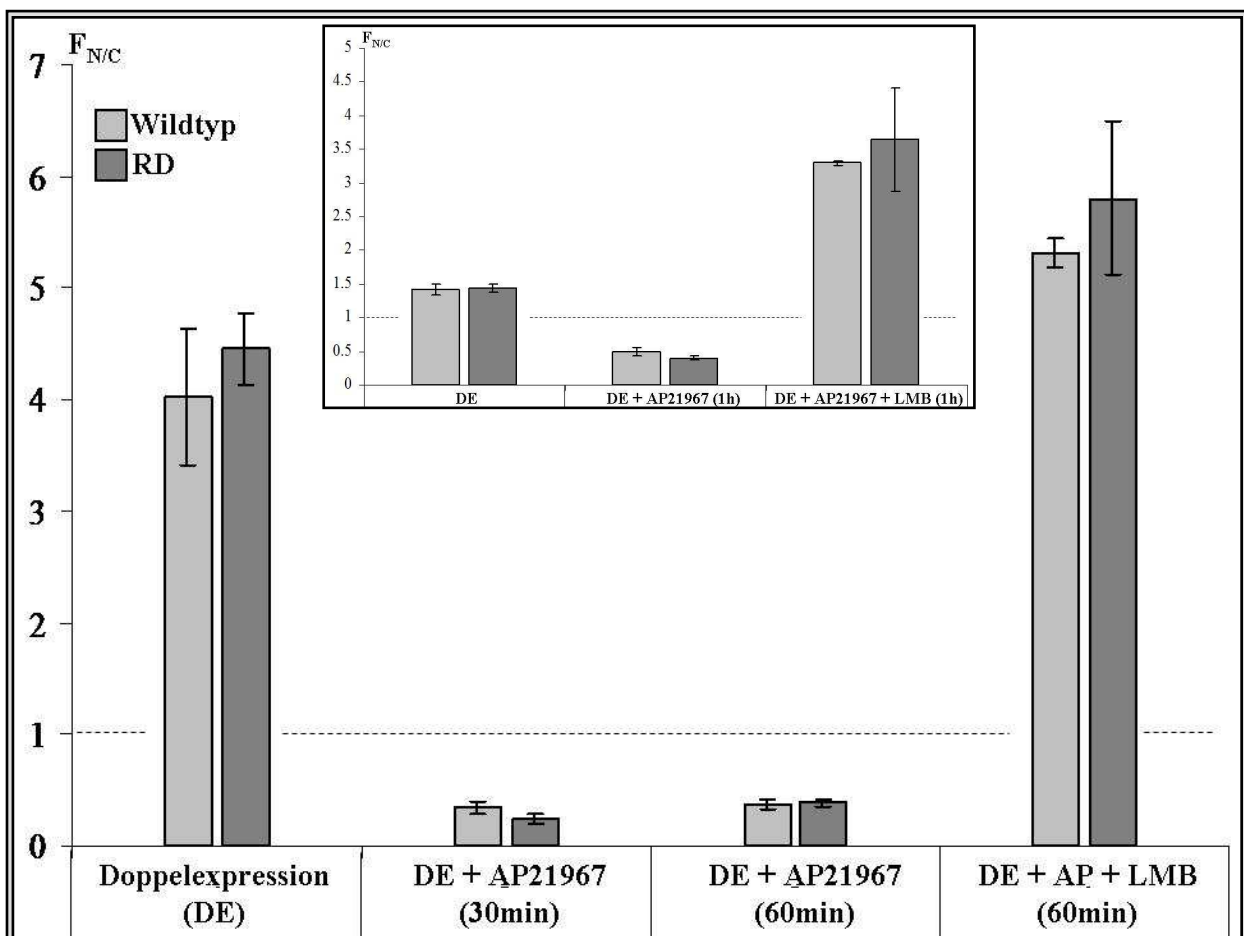


Abb.3-13: $F_{N/C}$ - Werte für NLS - GFP - FKBP_{3x} (großes Fenster) und NES - DsRed - FRB* (kleines Fenster) in Wildtyp- und RD - Fibroblasten vor sowie 30 und 60 min nach Zugabe von AP21967 oder AP21967 + LMB: Im großen Diagramm ist der Verlauf des $F_{N/C}$ für das Detektor - Protein NLS - GFP - FKBP_{3x} ersichtlich, während der Einschub die entsprechenden Daten für NES - DsRed - FRB* zeigt. Der Export ist 30 min nach AP21967 - Zugabe größtenteils abgeschlossen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp - Fibroblasten und RD - Fibroblasten. Durch die Blockade des CRM1 - vermittelten Exportes von NES - DsRed - FRB* durch Zugabe von Leptomycin B (LMB) kommt es zu einem erwartungsgemäßen Anstieg der $F_{N/C}$ beider Fusionsproteine. ($4 < N < 6$; $10 < n < 23$)

3.3. Bedeutung der Farnesylierung für die Prozessierung von Prälamina A

Um den Einfluss einer Inhibierung der Farnesylierung, als initialen Schritt der Prälamina A – Prozessierung, auf die Kernlokalisierung von Prälamina A im Vergleich mit Lamin A zu untersuchen wurden in HeLa – Zellen N – terminal trunkeerte Prälamina A– und Lamin A – Proteine exprimiert und ihre Kernlokalisierung quantitativ mittels $F_{N/C}$ – Messung bestimmt. Die Deletionsmutanten wurden als GFP – Fusionsproteine exprimiert und enthielten die Lamin A – NLS sowie die *tail* – Domäne, ihnen fehlte jedoch die komplette *head* (H) – und *rod* (R) – Domäne ($\Delta AS 1-385 = \Delta HR$) (s. Abb.1-1) und damit die Voraussetzung zur Filamentbildung und zur Inkorporation in die Kernlamina (s. Abb. 3-14).

Die Farnesylierung wurde indirekt durch Zugabe des Farnesyltransferaseinhibitors Mevinolin (Lovastatin, aus *Asp. terreus*), einem HMG – CoA – Reduktase – Inhibitor, verhindert. Mögliche unspezifische Einflüsse von Mevinolin auf den Kernimport wurden durch den Einsatz des von einer Prozessierung unabhängigen Fusionsproteins GFP – NLS (zur Verfügung gestellt von PD Dr. S. Hübner, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Würzburg) berücksichtigt. Dieses enthält die NLS des SV40 T – Antigens [68], einer der NLS des Prälamina A sehr ähnlichen Kernlokalisationssequenz.

Die als GFP – ΔHR – Prälamina A und GFP – ΔHR – Lamin A (entspricht der fertig prozessierten *tail* – Domäne) bezeichneten Fusionsproteine zeigten, ebenso wie die Negativkontrolle, eine diffuse Kernakkumulation.

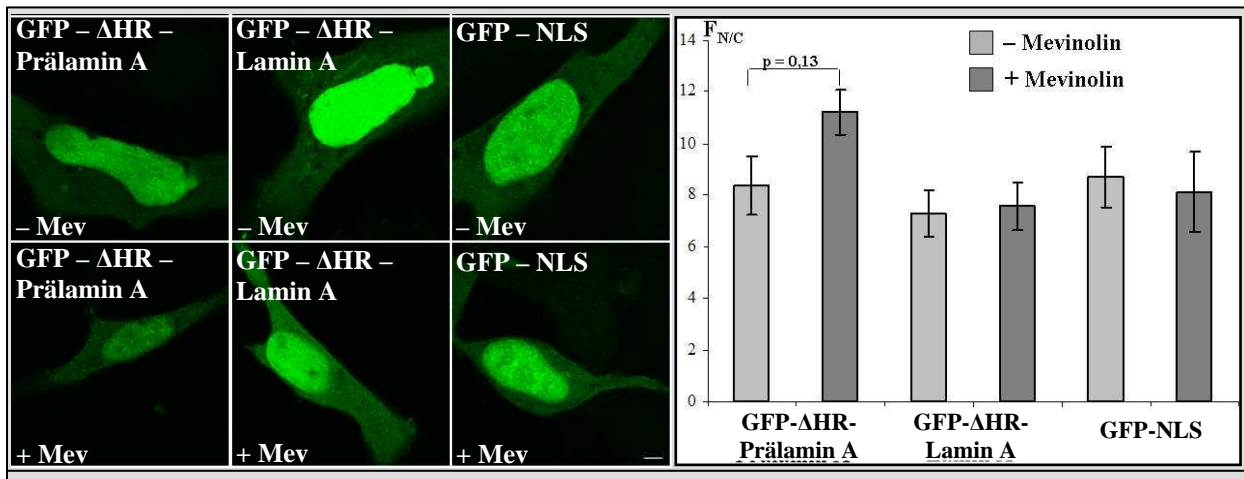
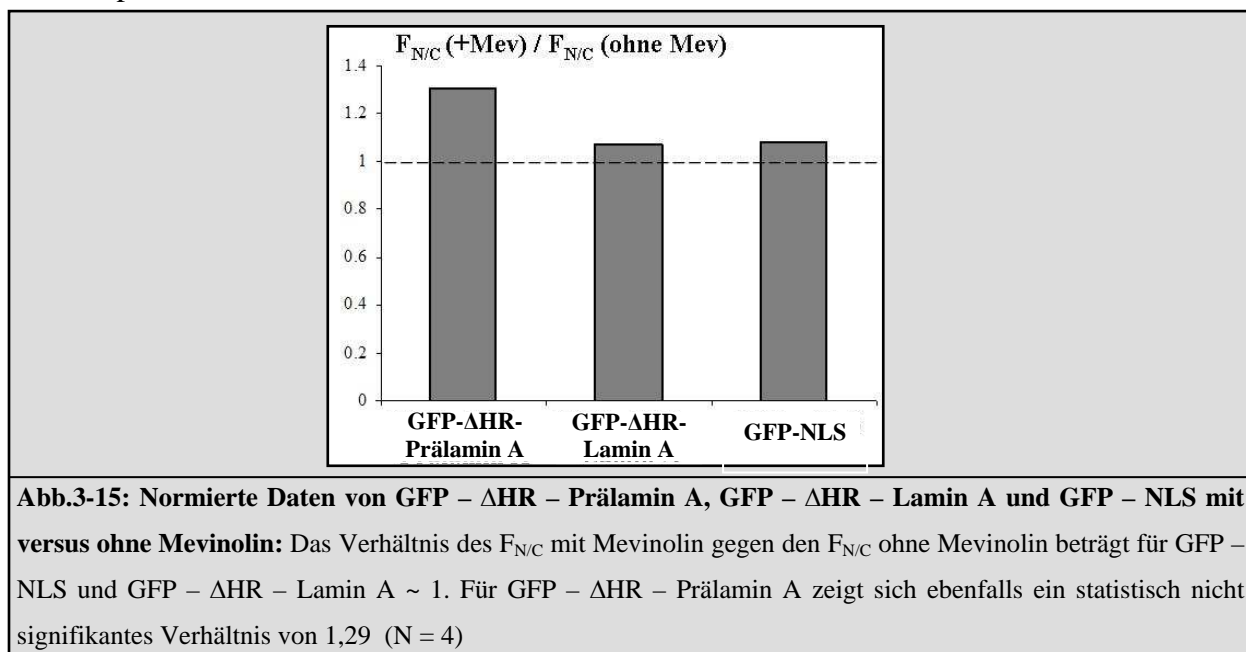


Abb.3-14: CLSM – Bilder und $F_{N/C}$ – Messungen zur subzellulären Lokalisation von GFP – ΔHR – Prälamina A, GFP – ΔHR – Lamin A und GFP – NLS: Gezeigt ist die subzelluläre Lokalisation der drei Deletionsmutanten GFP – ΔHR – Prälamina A, GFP – ΔHR – Lamin A und GFP – NLS ohne (hell) und mit (dunkel) Zugabe von Mevinolin (25 μM) in HeLa – Zellen sowie die entsprechenden $F_{N/C}$ – Werte. (630x Vergrößerung; Messbalken entspricht 1 μm) (N = 4; 40 < n < 53)

$F_{N/C}$ – Messungen ohne und 16 h nach Zugabe von Mevinolin (25 μ M) ergaben keine Mevinolin – Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation von Δ HR Prälamina A. So lagen die $F_{N/C}$ – Werte bei Mevinolin – Zugabe mit $\sim 11 \pm 1,0$ nicht signifikant höher als ohne ($\sim 8 \pm 1,29$). Die Fusionsproteine GFP – Δ HR Lamin A und GFP – NLS im Sinne einer spezifischen bzw. allgemeinen Kontrolle zeigten unter den gleichen Versuchsbedingungen erwartungsgemäß ebenfalls keine Mevinolin – abhängigen Unterschiede in der subzellulären Verteilung. Betrachtet man das Verhältnis der Fusionsprotein – spezifischen $F_{N/C}$ – Werte mit und ohne Mevinolin, so ergibt sich im Falle von GFP – Δ HR Prälamina A ein Verhältniswert von $\sim 1,3$ (wenn auch statistisch nicht signifikant) gegenüber Werten von ~ 1 für die Fusionsproteine GFP – Δ HR Lamin A und GFP – NLS.



3.4. DsRed – Prälamina A/– Prälamina A Δ 50 und – Prälamina Δ 90 in HeLa

3.4.1. Klonierung von pEpi – DsRed – Expressionsvektoren

Zur Expression verschiedener rot – fluoreszierender Prälamina A – Versionen diente der episomal replizierende pEpi – Vektor. Dabei wurde nicht die Originalversion des unter 6.1.6. beschriebenen pEpi – 1 – Vektors benutzt, sondern eine zuvor für die Anwendung der „Gateway“ – Technologie (Invitrogen) kompatibel gemachte Version des Originals [88]. Aus diesem Vektor wurden mittels *AgeI* – und *EcoRV* – Restriktion die GFP – cDNA und die *ccdB* – Kassetten (*Gateway* – Domäne) herausgeschnitten. Aus DsRed – MonoC1 wurde mittels *AgeI* – und *SmaI* – Restriktion die DsRed – cDNA herausgeschnitten. Die Auftrennung und Präparation des Vektors und der DsRed – cDNA erfolgte jeweils aus präparativen Agarosegelen. Letzteres Insertionsstück wurde anschließend durch eine T4 – Ligation in den

restringierten pEpi – Vektor inseriert. Ein Putativklon wurde gelelektrophoretisch entsprechend der zu erwartenden korrekten Größe ausgewählt, sequenziert (Primer 7*) und pEpi – DsRed genannt.

Dieser wurde nun zwischen der DsRed – cDNA und der S/MAR – Sequenz durch eine *XhoI* – Restriktion geöffnet und mittels einer „InFusion“ – Reaktion mit entsprechenden cDNAs (kodieren für Prälamina A sowie die HGPS bzw. RD verursachenden Prälamina A Deletionsmutanten) ligiert. Als PCR – Vorlage dienten geeignete pDEST – Vektoren [68, 135]. Die eingesetzten Primer 5* und 6* konnten aufgrund der 5' – und 3' – Homologie der drei Prälamina A – cDNAs (s. Abb. 3-16) für alle drei PCR – Amplifikationen verwendet werden. Die als pEpi – DsRed – PräLaA, pEpi – DsRed – PräLaA Δ50 und pEpi – DsRed – PräLaA Δ90 genannten Vektoren wurden mit den Primern 7* und 8* sequenziert. (Alle drei Expressionsvektoren wurden in Zusammenarbeit mit Tilman Kiel im Rahmen seiner Promotion kloniert.)

```

ATGAGACCCCGCCAGCGGCGGCCACCCGCAGCGGGGCGCAGGCCAGCTCCACTCCGCTGTGCGCCACCCGCATCACCCGG
CTGCAGGAGAAGGAGGACCTGCAGGAGCTCAATGATCGCTTGGCGGTCTACATCGACCGTGTGCGCTCGCTGGAACGGAGAA
CGCAGGGCTGCGCCTTCGCATCACCGAGTCTGAAGAGGTGGTCAGCCGCGAGGTGTCCGGCATCAAGGCCCGCTACGAGGCCG
AGCTCGGGGATGCCCCGAAGACCCTTGACTCAGTAGCCAAGGAGCGCGCCCGCTGCAGCTGGAGCTGAGCAAAGTGCCTGAG
GAGTTTAAGGAGCTGAAAGCGCGCAATACCAAGAAGGAGGGTGACCTGATAGCTGCTCAGGCTCGGCTGAAGGACCTGGAGGC
TCTGCTGAAGTCCAAGGAGGCCGCACTGAGCACTGCTCTCAGTGAGAAGCGCACGCTGGAGGGCGAGCTGCATGATCTGCGGG
GCCAGGTGGCCAAAGCTTGAGGCGAGCCCTAGGTGAGGCCAAGAAGCAACTTCAGGATGAGATGCTGCGGGCGGGTGGATGCTGAG
AACAGGCTGCAGACCATGAAGGAGGAAGTGGACTTCCAGAAGAACATCTACAGTGAGGAGCTGCGTGAGACCAAGCGCCGTCA
TGAGACCCGACTGGTGGAGATTGACAATGGGAAGCAGCGTGAGTTTGAAGAGCGGCTGGCGGATGCGCTGCAGGAAGTGCAGGG
CCCAGCATGAGGACCAGGTGGAGCAGTATAAGAAGGAGCTGGAGAAGACTTATTCTGCCAAGCTGGACAATGCCAGGCAGTCT
CTGCAGGAAACAGCAACCTGGTGGGGCTGCCACGAGGAGCTGCAGAGTCGCGCATCCGCATCGACAGCCCTCTCTGCCCA
GCTCAGCCAGCTCCAGAAGCAGCTGGCAGCCAAGGAGGCGAAGCTTCGAGACTGGAGGACTCACTGGCCCGTGAGCGGGACA
CCAGCCGGCGGCTGTGGCGGAAAAGGAGCGGGAGATGGCCGAGATGCGGGCAAGGATGCAGCAGCAGCTGGACGAGTACCAG
GAGCTTCTGGACATCAAGCTGGCCCTGGACATGGAGATCCACGCCTACCCGCAAGCTCTTGAGGGCGAGGAGGAGAGGCTACG
CCTGTCCCCCAGCCCTACCTCGCAGCGCAGCCGTGGCCGTGCTCCTCTCACTCATCCAGACACAGGGTGGGGGCGAGCAGTCA
CCAAAAAGCGCAACTGGAGTCCACTGAGAGCCGAGCAGCTTCTCACAGCACGCACGCACTAGCGGGCGCGTGGCCGTGGAG
GAGGTGGATGAGGAGGGCAAGTTTGTCCGGCTGCGCAACAAGTCCAATGAGGACCAGTCCATGGGCAATTGGCAGATCAAGCG
CCAGAATGGAGATGATCCCTTGCTGACTTACCGGTTCCCACCAAAGTTACCCTGAAGGCTGGGCAGGTGGTGACGATCTGGG
CTGCAGGAGCTGGGGCCACCCACAGCCCCCTACCGACTGGTGTGGAAGGCACAGAACACCTGGGGCTGGGGGAACAGCCTG
CGTACGGCTCTCATCAACTCCACTGGGGAAGAAGTGGCCATGCGCAAGCTGGTGCCTCAGTACTGTGGTTGAGGACGACGA
GGATGAGGATGGAGATGACCTGCTCCATCACCACCACGGCTCCCACTGCAGCAGCTCGGGGGACCCCGCTGAGTACAACCTGC
GCTCGCGCACCGTGCTGTGCGGGACCTGCGGGCAGCCTGCCGACAAGGCATCTGCCAGCGGCTCAGGAGCCAGGTTGGGCGGA
CCATCTCCTTGGCTCTTCTGCTCCTCAGTGTCAAGCTCACTCGCAGTACCAGCAGTGTGGGGGGCAGTGGGGGTGGCAGCTT
CGGGGACAATCTGGTCAACCGCTCTACCTCCTGGGCAACTCCAGCCCCGAACCCAGAGCCCCAGAAGTGCAGCATCATGT
AA

```

Abb.3-16: cDNA Sequenz des humanen Prälamina A: Sie kodiert für 664 Aminosäuren (AS). Startcodon (ATG) und Stopcodon (TAA) sind grün markiert. Bei der um 50 AS verkürzten HGPS verursachenden Prälamina A Mutante (auch Progerin genannt) fehlen 150 Nukleotide (rot) nahe dem 3' – Ende. Weitere 120 Nukleotide, also insgesamt 90 AS, fehlen bei der RD verursachenden Prälamina A Mutante (blau + rot).

3.4.2. Expression von DsRed – Prälamina – Fusionsproteinen

HeLa – Zellen, die mit den Expressionsvektoren pEpi – DsRed – Prälamina A/ Prälamina A Δ50/ Prälamina A Δ90 transfiziert wurden, zeigten 16 h post Transfektion eine rot fluoreszierende Kernlamina. Dabei zeigten DsRed – Prälamina A exprimierende Zellen eine phänotypisch intakte Kernlamina von gleichmäßig rundem bzw. ovalem Aussehen (s. Abb. 3-17A).

Für das Prälamina A $\Delta 50$ – Protein sind die Veränderungen den unter 1.3.2.2.1. für Progerin beschriebenen Dysmorphien analog. So kam es zu Invaginationen und Blasenbildung der Kernmembran sowie in geringem Maße zur Bildung intra- und transnukleärer Aggregate (s. Abb. 3-17B). Noch auffälliger war der Phänotyp der Kernlamina nach Expression von Prälamina A $\Delta 90$. Hier summierten sich die bei Progerin beobachteten Veränderungen zu geschrumpften, blasigen Kernen mit vielfältigen nukleären Einschlüssen (s. Abb. 3-17C).

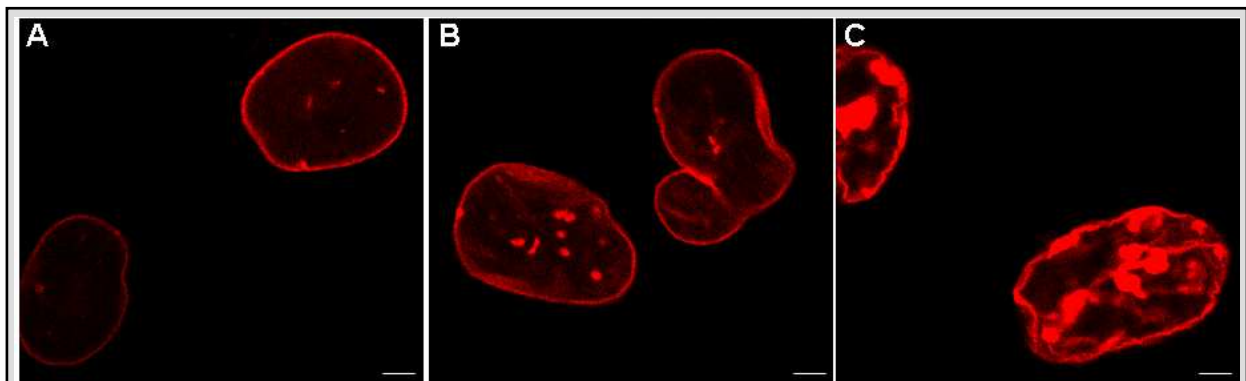


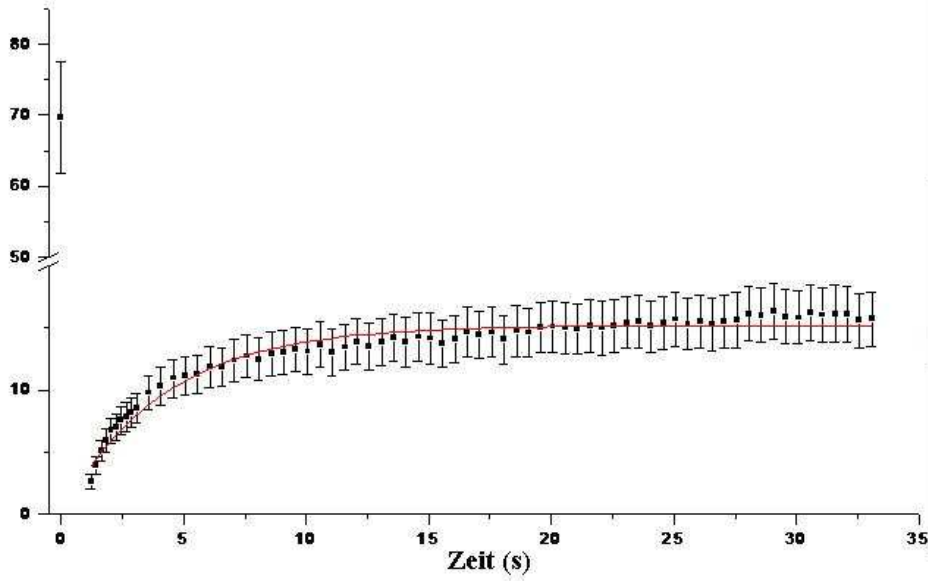
Abb.3-17: CLSM – Bilder von DsRed –Prälamina A/Prälamina A $\Delta 50$ /Prälamina A $\Delta 90$ – exprimierenden HeLa – Zellen: (A) Morphologisch unauffällige Kerne nach Expression von DsRed – Prälamina A. Kerndysmorphien zeigten sich nach Expression von DsRed – Prälamina A $\Delta 50$ (B) und DsRed – Prälamina A $\Delta 90$ (C) in Form blasiger Veränderungen der Kernlamina bzw. des Zellkerns und Bildung intra-/transnukleärer Aggregate. Eine stärkere Ausprägung der Kerndysmorphien konnte in DsRed – Prälamina A $\Delta 90$ – exprimierenden Zellen gegenüber DsRed – Prälamina A $\Delta 50$ exprimierenden beobachtet werden. (630x Vergrößerung; Messbalken entspricht 1 μ m)

3.4.3. Untersuchungen zur lateralen Dynamik der DsRed – Prälamine A, A $\Delta 50$ und A $\Delta 90$ in der Kernlamina

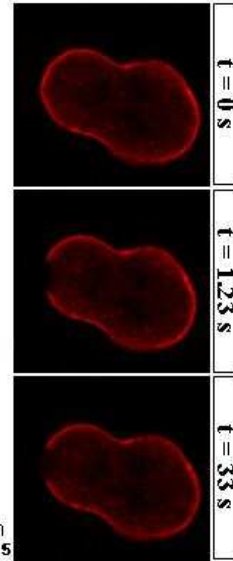
Mittels FRAP – Analyse wurde die Mobilität der HGPS und RD verursachenden Prälamina A – Mutanten im Vergleich zu Prälamina A im Bereich der Kernlamina untersucht. Hierfür wurden ausgewählte Zellen nach initialem „Bleichen“ für 33 sek. beobachtet. Längere FRAP – Analysen waren aufgrund von Zellbewegungen und damit einhergehendem Verlust der Fokusebene nicht möglich.

Für alle drei Fusionsproteine zeigte sich eine schnelle Erholung der Fluoreszenz in der *region of interest* (ROI) von ungefähr 20% gegenüber dem Ausgangswert innerhalb von 15 sek nach dem „Bleichen“, gefolgt von einer Plateauphase, in der nur noch eine langsamere Erholung der Fluoreszenz detektiert werden konnte. Die FRAP – Kinetik wurde mit Hilfe einer einfach exponentiellen Funktion der Form $f(x) = a * (1 - b^x)$ beschrieben, wobei a dem Wert des erreichten Plateaus entspricht und b dem Wert der Fluoreszenz zum Zeitpunkt $t = 1.23$ sek (erstes CLSM – Bild nach dem Bleichen) entsprach (s. Abb. 3-18).

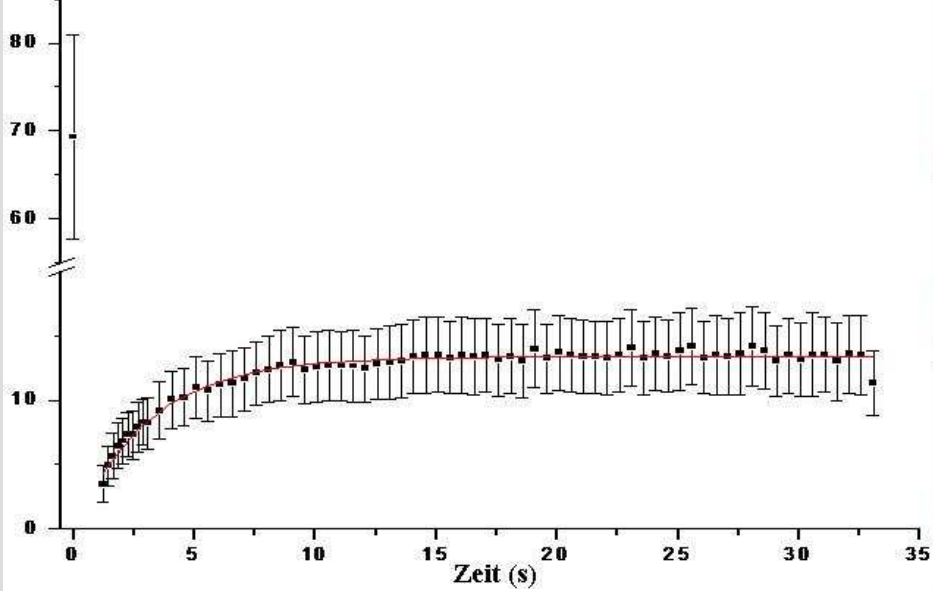
Fluoreszenz in ROI



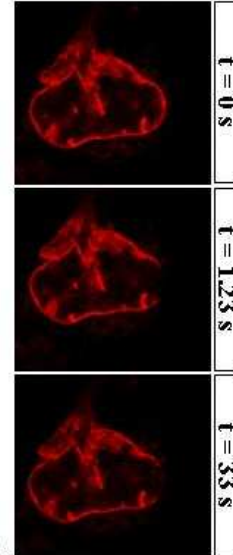
DsRed-Prälam A



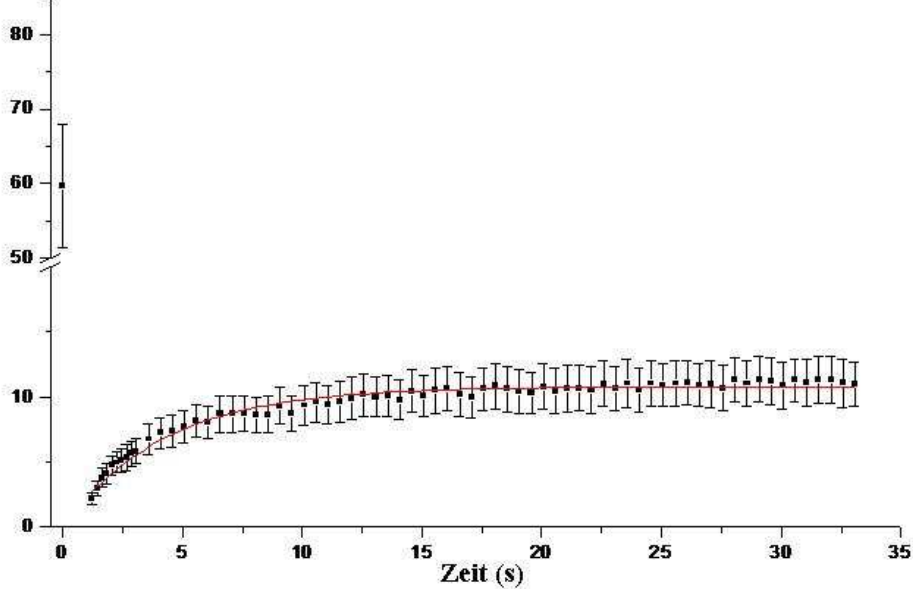
Fluoreszenz in ROI



DsRed-Prälam AΔ50



Fluoreszenz in ROI



DsRed-Prälam AΔ90

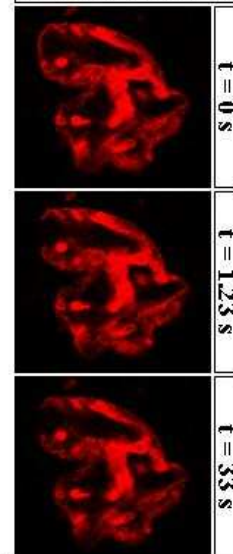


Abb.3-18: FRAP – Analysen und CLSM – Bilder der Proteine DsRed – Prälamina A, DsRed – Prälamina A $\Delta 50$ und DsRed – Prälamina A $\Delta 90$ in HeLa – Zellen: Die FRAP – Kinetik folgte der Funktion $f(x) = a * (1 - b^x)$, wobei a dem Wert des Plateaus entspricht und b dem ersten Messwert nach dem Bleichen ($t = 1.23$ sek). Dazugehörige CLSM – Bilder entsprechen den Zeitpunkten $t = 0$ (Bild vor Fluoreszenzauslöschung), $t = 1.23$ sek (erstes Bild nach dem Bleichen) und $t = 33.015$ sek (letztes Bild post Bleichen) und zeigen die Kontinuitätsunterbrechung der Kernlamina im ROI. (N = 3; $5 < n < 13$)

Normiert man die Messungen gegen den Ausgangspunkt vor dem Bleichen ($t = 0$), so zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Bereich des Plateaus zwischen DsRed – Prälamina A und den Mutanten DsRed – Prälamina A $\Delta 50$ und DsRed – Prälamina A $\Delta 90$. Folgte DsRed – Prälamina A $\Delta 50$ zu Beginn seiner Erholungsphase eher dem Wildtyp – Protein, erreichte es nicht dessen Plateau (d.h. 20 % der Ausgangsfluoreszenz) sondern wie auch DsRed – Prälamina A $\Delta 90$ nur etwa 16 % der Ausgangsfluoreszenz (s. Abb. 3-19).

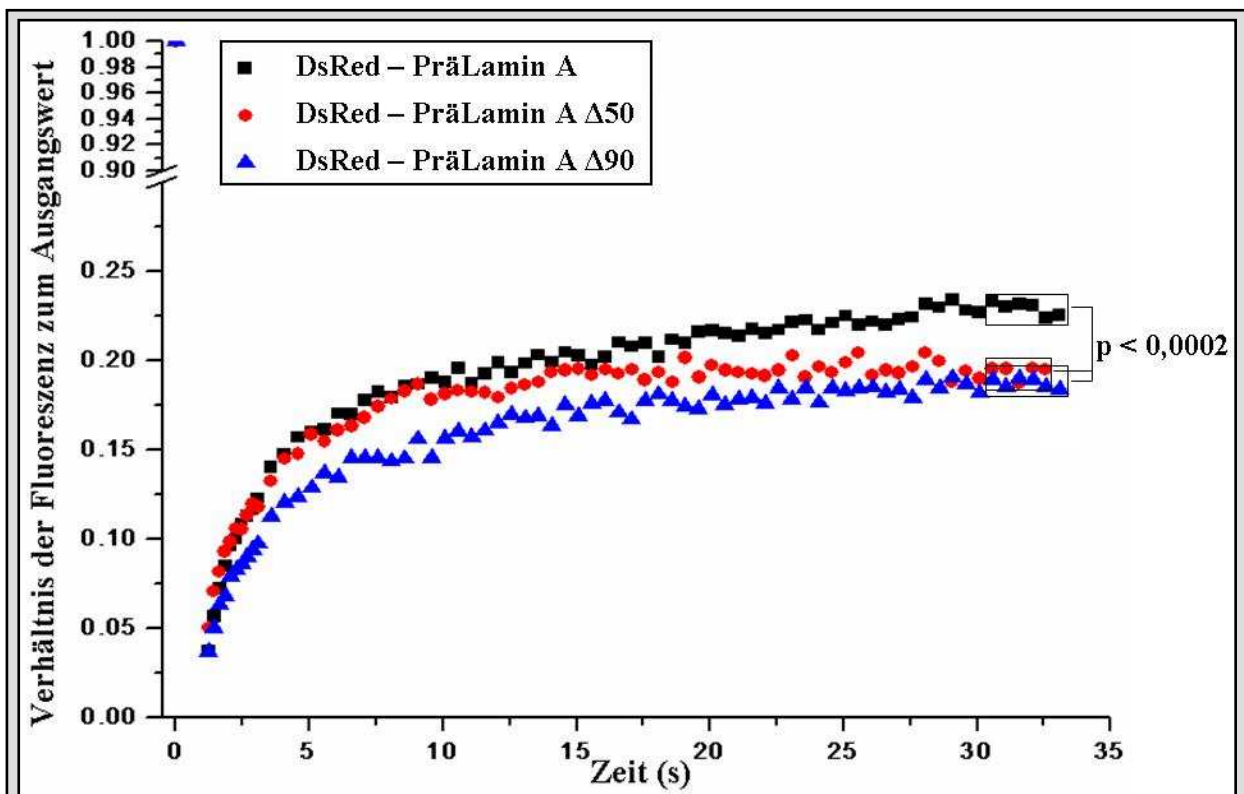


Abb.3-19: FRAP – Analyse zum Diffusionsverhalten der Fusionsproteine DsRed – Prälamina A, DsRed – Prälamina A $\Delta 50$ und DsRed – Prälamina A $\Delta 90$ innerhalb der Kernlamina von HeLa – Zellen: Graphischer Verlauf der Fluoreszenzintensität abhängig von der Zeit dargestellt als normierte Intensitätserholung gegenüber $t = 0$ sek. Die Kinetiken sind dabei für DsRed – Prälamina A und DsRed – Prälamina A $\Delta 50$ zu Beginn identisch, trennen sich jedoch bei ~ 15 sek. Die erreichten Plateaus unterscheiden sich höchst signifikant ($p < 0,0002$) zwischen Prälamina A und den beiden trunkierten Proteinen. DsRed – Prälamina A erholt sich binnen 33 sek zu etwa 22%, während die Fusionsproteine DsRed – Prälamina A $\Delta 50$ und DsRed – Prälamina A $\Delta 90$ nur circa 16% ihres Ausgangswertes erreichen. (N = 3; $5 < n < 13$)

3.4.4. GFP – β – Galaktosidase in DsRed – Prälamin A, DsRed – Prälamin A Δ 50 und DsRed – Prälamin A Δ 90 exprimierenden HeLa – Zellen unter thermischem Stress

Aufgrund der durch die Expression von DsRed – Prälamin A Δ 50 und DsRed – Prälamin A Δ 90 induzierten Kerndysmorphie sollte in solchen Zellen die Integrität der Kernhülle unter thermischen Stressbedingungen untersucht werden. Als Reporterprotein diente das Fusionsprotein GFP – β – Galaktosidase, ein Homotetramer (> 500 kDa), welches aufgrund seiner Größe nicht in der Lage ist die Kernhülle bzw. die KPK unter physiologischen Bedingungen mittels Diffusion zu passieren (s. Abb. 3-20).

Inkubiert wurde jeweils für 30 min durch Zugabe von entsprechend vorgeheiztem Medium und Lagerung in einem Inkubator gleicher Temperatur. Anschließend erfolgte bei allen Versuchsansätzen eine Nachinkubation von 30 min unter physiologischen Bedingungen (37°C).

Für HeLa – Zellen, welche nur GFP – β – Galaktosidase exprimierten, ergab die Quantifizierung der subzellulären Lokalisation der Grünfluoreszenz bei 37°C einen $F_{\text{N/C}}$ von $0,30 \pm 0,014$. Ein ähnlicher Wert wurde auch bei einer 30 – minütigen Inkubation bei 48°C gemessen ($F_{\text{N/C}} = 0,33 \pm 0,016$). Erst bei 55°C zeigte sich ein Anstieg des $F_{\text{N/C}}$ (zunehmende intranukleäre Lokalisation des Indikatorproteins – $F_{\text{N/C}} = 1,3 \pm 0,06$) und somit ein Einfluss auf die Stabilität der Kernhülle (s. Abb. 3-21).

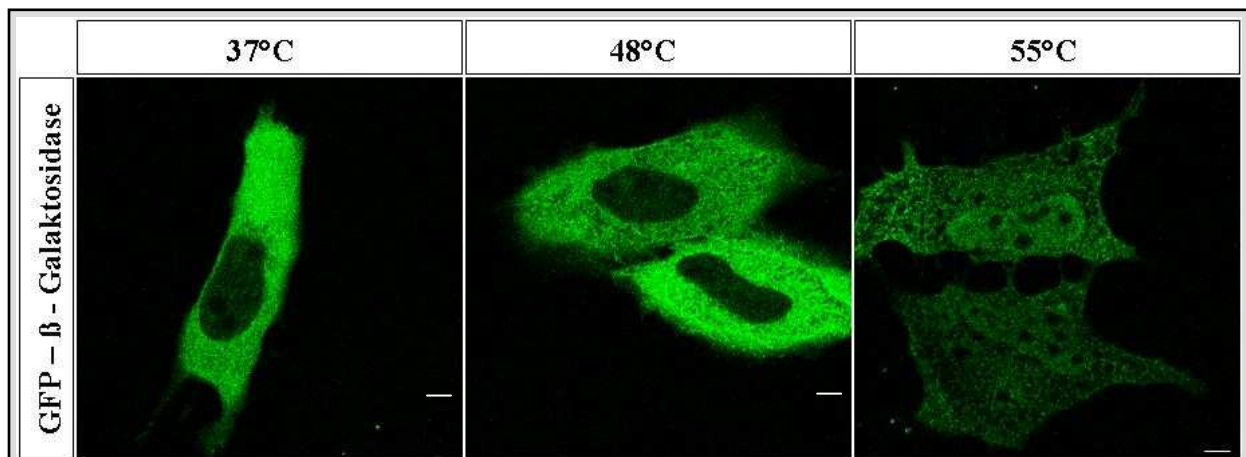


Abb.3-20: GFP – β – Galaktosidase in HeLa – Zellen bei 37°C , 48°C und 55°C : GFP – β – Galaktosidase ist bei 37°C ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert. Während eine Erwärmung auf 48°C den $F_{\text{N/C}}$ nicht verändert, ist die Integrität der Kernhülle bei 55°C so stark vermindert, dass GFP – β – Galaktosidase in den Zellkern gelangen kann. (630x Vergrößerung; Messbalken entspricht $1\mu\text{m}$)

Daran anschließend wurde der Einfluss der Expression der Fusionsproteine DsRed – Prälamin A, DsRed – Prälamin A Δ 50 und DsRed – Prälamin A Δ 90 auf die subzelluläre Verteilung von GFP – β – Galaktosidase bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Insgesamt ergaben sich

im Bereich zwischen 37°C und 51°C keine Unterschiede hinsichtlich der subzellulären Verteilung der Grünfluoreszenz infolge der durch DsRed – Prälamina $\Delta 50$ oder DsRed – Prälamina $\Delta 90$ induzierten Kernmorphien im Vergleich zu HeLa – Zellen, welche nur GFP – β – Galaktosidase oder zusätzlich DsRed – Prälamina A exprimierten. In allen Zellen lagen die $F_{N/C}$ – Werte zwischen 0,23 und 0,32 (alle SD < 0,012). Da bei einem 55°C Temperaturschock nur einzelne Zellen in ihrer Gesamtintegrität intakt blieben, wurden Messungen ausschließlich im Temperaturbereich bis 51°C durchgeführt.

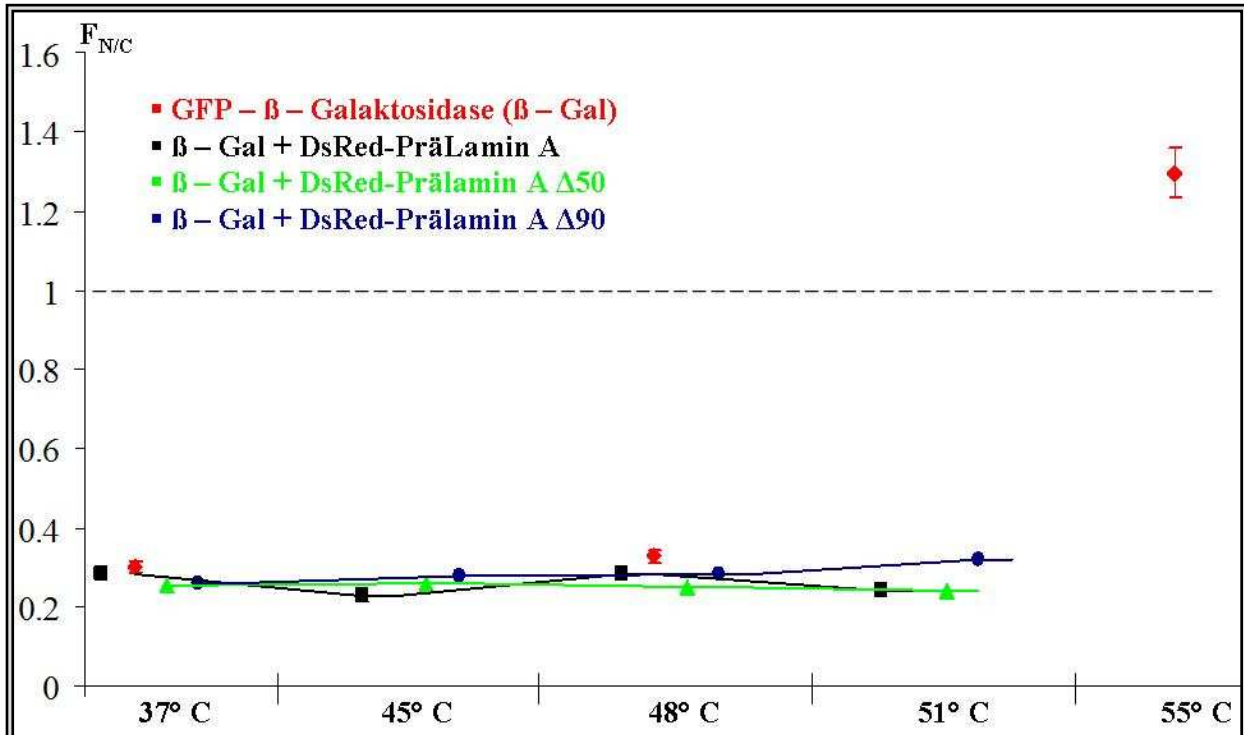


Abb.3-21: $F_{N/C}$ – Werte für GFP – β – Galaktosidase bei verschiedenen Temperaturen in GFP – β – Galaktosidase alleine (rot) oder zusammen mit Prälamina A bzw. den Prälamina A Varianten exprimierenden HeLa – Zellen: In HeLa – Zellen, die GFP – β – Galaktosidase alleine exprimierten lag der $F_{N/C}$ – Wert bei 37°C und 48°C mit 0,3 und 0,33 (SD 0,014 bzw. 0,016) deutlich unter 1 (gestrichelte Linie), stieg jedoch nach der Inkubation der Zellen bei einer Temperatur von 55°C über 1 ($F_{N/C} = 1,3 \pm 0,06$). In Koexpressionsversuchen änderte sich die subzelluläre Lokalisation von GFP – β – Galaktosidase trotz Gegenwart von DsRed – Prälamina A $\Delta 50$ (grün) oder DsRed – Prälamina A $\Delta 90$ (blau) bei den gewählten Temperaturen nicht. Die Koexpression von DsRed – Prälamina A (schwarz) diente der Kontrolle. Eine funktionelle Desintegration der Kernhülle infolge der Expression der Prälamina A – Mutanten konnte somit nicht festgestellt werden. (Standardabweichungen < 0,012 graphisch nicht auflösbar; N = 4; 25 < n < 43; gleitende Durchschnittslinien)

4. Diskussion

4.1. Nukleärer Proteinexport in HeLa – Zellen

Die Quantifizierung intrazellulärer Transportkinetiken ausgewählter Proteine mit Hilfe der induzierten Protein – Heterodimerisierung, wie in dieser Arbeit beschrieben, ist absolut neu und stellt eine wenig invasive, zeitsparende Alternative zur Messung der Import-/Exportkinetik NLS- und NES – enthaltender Moleküle direkt mittels Fluoreszenzmikroskopie dar. Es kommen dabei neben den Fluorophoren v.a. speziesspezifische Proteindomänen zum Einsatz (FRB*, FKBP, NES, NLS), die in dieser Form auch im physiologischen Zellhaushalt eine Rolle spielen. Bisherige Techniken zur Untersuchung und Quantifizierung von subzellulärem Transport, wie beispielsweise Mikroinjektion fluoreszierender oder radioaktiver Tracer, selektive Membranpermeabilisierung mit Digitonin oder durch mechanische Perforation [45, 91], stellen, neben hohem Material – und Zeitaufwand, außerdem einen unnatürlicheren Eingriff in die Physiologie der zu untersuchenden Zelle dar, als die Transfektion von Expressionsvektoren und subsidiäre Messung der Lokalisation fluoreszierender Expressionsproteine [92]. Protein – Dimerisation wurde zur Transportinduktion bereits bei der Untersuchung von Transkriptionsfaktoren angewendet [90]. Alternativ zu diesen vor allem qualitativen Untersuchungen zum Proteintransport, aber dafür technisch aufwendiger, sind Kernimportanalysen mit Hilfe von FRAP (*Fluorescence recovery after photobleaching*) und FLIP (*Fluorescence loss in photobleaching*). Beide Methoden ermöglichen es kinetische Aspekte des Kernimports zu untersuchen [93, 132]. Die FRAP – Technik setzt dazu eine gewisse zytoplasmatische Lokalisation des zu untersuchenden Proteins voraus. Untersuchungen zum nukleären Export von Proteinen im Speziellen gestalten sich insgesamt schwieriger. So standen bisher nur der Heterokaryon – Assay [133] zur Verfügung, der jedoch keine kinetische Untersuchung des Proteinexports erlaubt bzw. die apparativ aufwendigere nukleäre Mikroinjektionstechnik Fluorophor – markierter Proteine [134].

Neben der Einzeldarstellung der beiden Fusionsproteine NLS – GFP – FKBP_{3x} und NES – DsRed – FRB* scheiterte die Darstellung des mittels AP21967 fusionierten Heterodimers im Western Blot möglicherweise aufgrund zu schwacher AP2967 – vermittelter Wechselwirkungen der FKBP/FRB* – Domänen oder zu stark denaturierenden Versuchsbedingungen im SDS – Gel. Auch die Zugabe eines Proteinquervernetzlers (MBA) vor Zellyse brachte nicht das erhoffte Ergebnis. Eventuell wäre eine Darstellung nach Auftrennung im nativen Gel möglich.

Während beide Fusionsproteine bei Einzeltransfektion und Doppeltransfektion ohne Heterodimerisierung respektive ihrer Lokalisation erwartungsgemäß der Aktivität ihrer Zielsequenz, NLS oder NES, folgten, schien bei Koexpression und Zugabe von AP21967, die NES – vermittelte Exportaktivität des Fusionsproteins NES – DsRed – FRB* die subzelluläre Lokalisation des gebildeten Komplexes zu bestimmen (s. Abb. 3-7). Es wurde bereits gezeigt, dass die SV40 T – Ag – NLS im Zusammenspiel mit anderen subzellulären Lokalisationssequenzen funktionell unbedeutend werden kann, diese jedoch auch selbst dominieren kann [94, 95]. Der hier beobachtete Effekt scheint nur durch die hierarchisch höhere Funktionalität der HIV – Rev – NES gegenüber der SV40 T – Ag – NLS erklärbar zu sein, was durch die beobachtete Umkehr der Transportrichtung (Import statt Export) des NLS/NES – Komplexes unter Blockade des CRM1 – abhängigen Exportes mit Leptomycin B bestätigt wurde (s. 3.1.3.). Die Überlegenheit der NES – vermittelten Exportaktivität gegenüber der NLS – vermittelten Importaktivität des Komplexes NES – DsRed – FRB*/NLS – GFP – FKBP_{1x} wurde zusätzlich bei Komplexbildung mit NLS – GFP – FKBP_{3x} verifiziert.

Die Tatsache, dass NLS – GFP – FKBP_{3x} mit $5,6 \pm 0,13$ einen höheren $F_{N/C}$ aufwies, als NLS – GFP – FKBP_{1x} mit $4,4 \pm 0,13$ mag zunächst verwundern, handelt es sich doch um das größere Protein (s. Abb. 3-4), wird jedoch verständlich, berücksichtigt man neben dem aktiven NLS – abhängigen Transport auch den möglichen Anteil einer passiven Diffusion aufgrund geringerer Größe des entsprechenden Proteins durch den KPK [96]. Voraussetzung für die Untersuchung AP21967 – induzierter Kernexport – Prozesse in verschiedenen Zellsystemen, ist die uneingeschränkte Diffusion des Fusionsproteins NES – DsRed – FRB* in den Zellkern, um quantitativ vergleichbare Komplexbildungen beider Dimerisationspartner im Zellkern zu gewährleisten.

Da viele Reaktionen in der Natur einer Sättigungskinetik im Sinne einer exponentiellen Funktion folgen, wie z. B. der radioaktive Zerfall oder der enzymatische Umsatz bei ausreichendem Substratangebot, überrascht es nicht, dass auch die in dieser Arbeit zum ersten Mal vorgestellte Dynamik des nukleären Proteinexportes einer solchen Kurve folgte. Nicht untersucht wurde der Einfluss von ATP – Depletion oder Temperaturveränderungen auf diese Kinetik. Da der Exportprozess, genau wie der NLS – Import, Ran – GTP – abhängig ist, müsste die Verminderung des zellulären Energiegehaltes zu einer Veränderung der Kurve und damit einer Verifizierung des angenommenen Transportvorganges führen [97, 98]. Für den nukleären Proteinimport von GFP – markierten Karyopherinen konnte mittels Zellpermeabilisierung bereits eine exponentielle Kinetik gezeigt werden [45].

4.2. Nukleärer Proteinexport in humanen Fibroblasten

Ihrem Namen nach stellt die Restriktive Dermopathie eine Krankheit in erster Linie der Haut dar, sodass bei Untersuchungen zu ihrer Pathogenese v.a. Fibroblasten zum Einsatz kommen [99]. Auf Grund der relativ einfachen Aquise aus Hautbiopsien und Kultivierung *in vitro* sind sie ein hervorragendes Modellsystem zur Erforschung der Restriktiven Dermopathie sowie anderer Pathologien, die mit mutierten Laminen bzw. mutierten Lamin – assoziierten Proteinen einhergehen, obgleich deren Expression von Gewebe zu Gewebe stark variiert, so dass Ergebnisse aus Beobachtungen in Fibroblastenkulturen nicht beliebig verallgemeinert werden können [100].

Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von NES – DsRed – FRB* ergaben $F_{N/C}$ – Werte, die prinzipiell denen entsprachen, die auch in HeLa – Zellen ermittelt wurden. Allerdings lag der $F_{N/C}$ – Wert für NES – DsRed – FRB* in Fibroblasten knapp >1 , wohingegen er in HeLa – Zellen deutlich <1 lag. Dies mag an speziellen Eigenschaften der Fibroblasten liegen, z.B. einem weniger restriktiven KPK oder unterschiedlicher Exportaktivität respektive der verwendeten NES. In Gegenwart von AP21967 änderte sich das Szenario. So fiel in Wildtyp– und RD – Fibroblasten, konkordant zu den Ergebnissen in HeLa – Zellen, entsprechend der überwiegenden Exportaktivität des Komplexes der $F_{N/C}$ für die Rotfluoreszenz deutlich <1 . Die Blockade des CRM1 – abhängigen Proteinexportes durch Zugabe von LMB ließ den $F_{N/C}$ beider Fluoreszenzen erwartungsgemäß >1 ansteigen.

Betrachtet man die subzelluläre Lokalisation von NLS – GFP – FKBP_{3x}, so zeigten Wildtyp– und RD – Fibroblasten ähnliche $F_{N/C}$ – Werte ($4,04 \pm 0,3$ bzw. $4,32 \pm 0,4$). Dies könnte den speziellen Eigenschaften des Fusionsproteins geschuldet sein, da z.B. GFP – NLS, ein Fusionsprotein mit stärker karyophiler NLS in RD – Fibroblasten einen geringeren $F_{N/C}$ aufwies als in Wildtyp – Fibroblasten. In beiden primären Zelllinien zeigte es jedoch einen um den Faktor 2 stärkeren Zellkernimport als NLS – GFP – FKBP_{3x} [122]. Die verstärkte Karyophilie von GFP – NLS ist dabei bedingt durch eine spezielle aminoterminal Flankierung der enthaltenen NLS durch weitere AS [143].

In Gegenwart des Heterodimerisierers kam es wie in HeLa – Zellen zu einer Verlagerung der nukleären Grünfluoreszenz ins Zytoplasma, wobei zwischen Wildtyp– und RD – Fibroblasten kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte, sodass der CRM1 – vermittelte Proteinexport in beiden Zelllinien unter den gegebenen Bedingungen mit vergleichbarer Effizienz und ähnlicher Kinetik (s. 3.2.) zu erfolgen scheint. Kinetische Untersuchungen zum AP21967 – induzierten Export von NLS – GFP – FKBP_{3x} in NES – DsRed – FRB*– koexprimierenden Fibroblasten wären wünschenswert, um diese Ergebnisse zu verifizieren,

jedoch machten Zellbewegungen der Fibroblasten eine solche *in vivo* – Analyse über einen längeren Messzeitraum nicht möglich.

4.3. Prälamina A – Prozessierung unter Mevinolin

Der Untersuchung des Einflusses von Farnesyltransferaseinhibitoren (FTI) auf die subzelluläre Lokalisation von Prälamina A kommt eine verstärkte Bedeutung zu, da sie gegenwärtig als extern applizierbare Therapeutika gegen verschiedene Laminopathien zur Diskussion stehen.

Seit eine Anhäufung von nicht fertig prozessiertem Prälamina A bzw. Progerin, als verantwortlich für viele der beobachteten Veränderungen in HGPS – Zellen identifiziert wurde, liegt der Gedanke nahe einen kurativen Ansatz über dessen Reduzierung zu verfolgen. So kamen beispielsweise Morpholinos oder shRNA zum Einsatz, um die verantwortliche kryptische Splice Stelle (s. 1.3.2.2.1.) zu maskieren bzw. die Transkription der Prälamina A $\Delta 50$ – mRNA zu verhindern [108, 109]. Die weitaus größte Aufmerksamkeit haben jedoch verschiedene FTI erfahren, ein Begriff unter dem in der Literatur Substanzen zur Inhibition von Syntheseschritten des Farnesylyls, wie zum Beispiel Statine, oder auch direkte Inhibitoren der Farnesyltransferase zusammengefasst werden, die teilweise in anderer Funktion, wie z.B. Chemotherapie, bereits Anwendung beim Menschen finden [110 – 112]. In der Forschung sind sie seit längerem zur Blockierung von *ras* – Onkogenen im Sinne der Tumorthherapie bekannt, wo sie ebenfalls über eine Farnesylierungsblockierung wirken und finden nun seit 2005 auch bei Progerin – bedingten Laminopathien Anwendung [113]. Mevinolin (Lovastatin) ist ein solches Statin, welches vielfach experimentell zur Inhibition der Prälamina A – Prozessierung durch Eingriff in den Isoprenylhaushalt verwendet wird [114, 121].

Leider wird bei den meisten Untersuchungen nur die Reversion der nukleären Dysmorphie als Erfolgskriterium angesehen, obwohl Untersuchungen zeigten, dass sich eine Normalisierung auch respektive Protein – und Genexpressionsmuster sowie Heterochromatinorganisation demonstrieren lässt [108, 114, 115]. HGPS – Modellmäuse zeigten neben den subzellulären Veränderungen auch funktional ein verlängertes Überleben, einen geringeren Gewichtsverlust und eine Besserung der bei HGPS entscheidenden kardiovaskulär bedingten Probleme, wie Herzinfarkt und Schlaganfall [116 – 118]. Seit 2008 laufen in den USA klinische Studien zum Einsatz von FTI bei diagnostisch gesicherter Hutchinson – Gilford Progerie beim Menschen [119]. Eine mögliche Übertragung der Anwendung auf RD – Patienten dürfte jedoch weitaus schwerer fallen, da diese zumeist, falls überhaupt diagnostiziert, bereits intrauterin versterben [120].

Da die Prälamina A – Prozessierung sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern stattfinden kann, sollte der Einfluss einer Inhibierung der Farnesylierung am *CaaX* – Motiv von Prälamina A auf dessen Import in den Zellkern untersucht werden [17]. Die Voraussetzung zur quantitativen Messung dieses Transportvorganges war durch die flächige Lokalisation der Prälamina A – Deletionsmutante GFP – Δ HR – Prälamina A gegeben (s. 3.3.). Um den Einfluss von Mevinolin selbst sowie Effekte durch die damit einhergehende Verarmung an Farnesyl- bzw. Geranylpyrophosphat auf den nukleären Proteinimport auszuschließen, wurden die Fusionsproteine GFP – NLS und GFP – Δ HR – Lamin A verwendet, welche hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation unter den gegebenen Versuchsbedingungen keinen Mevinolin – spezifischen Effekt erkennen ließen.

Für GFP – Δ HR – Prälamina A zeigte sich, dass dessen nukleäre Akkumulation nicht Mevinolin – abhängig erfolgte (s. Abb.3-15). Ergänzende subzelluläre Lokalisationsstudien mit Prälamina A – Mutanten, welchen die Prozessierungsrelevante SH – Gruppe am Cystein des *CaaX* – Motivs fehlt (z.B. C661S oder MSIM) wären zur Verifizierung der Ergebnisse zum Mevinolin – abhängigen Import von Prälamina A empfehlenswert [123, 136,].

4.4. Laterale Dynamik von DsRed – Laminen

Zur Untersuchung intrazellulärer dynamischer Vorgänge *in vivo*, stellt die FRAP – Technik ein akzeptiertes und einfach zu handhabendes Verfahren dar [101, 102]. Hierzu stehen als Kenngrößen, neben der rein graphischen Darstellung auf Basis gemessener Fluoreszenzen im ausgebleichten Areal, Bestimmungen der Diffusions- und Bindungskoeffizienten zur Verfügung. Darüber hinaus ist eine Trennung verschieden schneller Fluoreszenzerholungen und damit eine Aussage über die Mobilität beteiligter Proteine möglich [103]. Für Lamine ist aufgrund ihrer speziellen Lokalisation und einer deshalb nur schwer exakt einzugrenzenden *region of interest* meist nur die erstgenannte Darstellung der Fluoreszenz möglich, während die beiden anderen Maße flächenhaft lokalisierten Proteinen vorbehalten bleiben [104].

Bisherige FRAP – Untersuchungen an Lamin A, Progerin, Lamin B1, Lamin C und Lamin – assoziierten Proteinen zeigten beispielsweise deren mechanische Verlinkung mit den KPK oder die unter 1.1.2. beschriebenen Eigenschaften der A-/B – Lamine während der Mitose [105, 137].

Die Fusionsproteine DsRed – Prälamina A, DsRed – Prälamina A Δ 50 und DsRed – Prälamina A Δ 90 zeigten im FRAP einen biphasischen Verlauf mit einer signifikant geringeren Erholung für die beiden trunkierten Proteine im Vergleich zum Wildtyp über den Beobachtungszeitraum von 33 sek bis zum Erreichen des Plateaus (s. 3.4.3.). Dabei scheint DsRed – Prälamina A Δ 90 von

Beginn an einer eigenen Dynamik zu folgen, während DsRed – Prälamina A $\Delta 50$ sich zunächst ähnlich wie das Wildtyp – Protein verhält, bevor seine Erholungsgeschwindigkeit signifikant nachlässt (s. Abb. 3-19). Die verminderte Beweglichkeit ist möglicherweise auf eine veränderte Sekundärstruktur infolge der Deletion zurückzuführen, aber auch die durch die Deletion der zweiten Prozessierungsstelle bedingte konstitutive Farnesylierung und damit einhergehende dauerhafte Lipophilie tragen sicherlich dazu bei, dass sich die Prälamina A – Deletionsmutanten durch eine reduzierte Diffusion innerhalb der Kernlamina auszeichnen.

Die Daten sind konkordant zu 2006 von Dahl et al. vorgestellten Ergebnissen insofern, dass die FRAP – Untersuchungen einen signifikanten Unterschied zwischen der Mobilität von Prälamina A und Prälamina A $\Delta 50$ (GFP – markiert) in HeLa – Zellen zeigten. Sie beobachteten Zellen über 60 sek, beschreiben jedoch ebenfalls ein Plateau in der Fluoreszenzerholung nach 30 sek. In humanen HGPS – Zellen steht diese reduzierte Dynamik von Prälamina A $\Delta 50$ in Einklang mit dem Vorliegen einer elektronenmikroskopisch sichtbar verdickten Kernlamina [30]. Neben der Mobilitätsreduzierung für Prälamina A $\Delta 50$ zeigte die FRAP – Analyse nun erstmals auch für das nochmals um 40 AS verkürzte, RD – verursachende Prälamina A $\Delta 90$ eine Reduzierung der Mobilität. Neben diesen Deletionsmutanten bewirken auch verschiedene, mit leichteren klinischen Phänotypen assoziierte Prälamina A – Punktmutationen eine Abnahme deren Laminmobilität [138]. Demgegenüber stehen FRAP – Untersuchungen an mutierten A-/Ce – Laminen (Lamin aus *C. elegans*) ohne signifikante Unterschiede in der Fluoreszenzerholung im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp [107, 138].

4.5. Integrität der Zellkernhülle bei thermischem Stress

Wie unter 1.1.4.2. vorgestellt, sind die Laminae bzw. ihr modularer Aufbau entscheidend für die Intaktheit der Kernlamina bzw. der Zellkernhülle. Da die veränderten Prälaminae bei HGPS und RD dieser Funktion nicht mehr nachkommen, wurde die Antwort auf eine Erhöhung der Umgebungstemperatur und damit auf thermischen Stress untersucht.

Thermischer Stress hat verschiedene Wirkungen auf kultivierte Zellen. Veränderungen bis 47°C bestehen dabei z.B. in einer Clusterbildung nukleärer Matrixproteine als Stressantwort, wobei die Kernlamina intakt bleibt [83, 124]. Der „Unversehrtheit“ der Kernlamina unter solchen Bedingungen könnte dabei einer *heat – shock – protein* – Funktion der B – Lamina zugrunde liegen, deren Expression hoch reguliert wird, sobald Zellen thermischem Stress ausgesetzt werden [125 - 128].

Unter verschiedenen thermischen Stressbedingungen (45°C, 48°C und 51°C) wurde keine Veränderung der subzellulären Verteilung von GFP – β – Galaktosidase als nichtkaryophilem,

ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiertem, Reporterprotein bei Einzelexpression sowie Koexpression mit DsRed – Prälamina A und DsRed – Prälamina A $\Delta 50$ bzw. $\Delta 90$ in HeLa – Zellen beobachtet (s. Abb. 3-21). Damit stehen unsere Ergebnisse in Konkordanz zu solchen, die von Sanchez et al. [83] gezeigt wurden. Auch hier kam es erst bei 55°C zu einem Eintritt des Reporterproteins in den Zellkern. Gleiches wurde hier neben thermischem Stress auch für oxidativen Stress gezeigt. Ein gewisser Widerspruch ergibt sich zu Ergebnissen von Paradisi et al. [129], wo in Fibroblastenkulturen eines HGPS – Patienten eine Zunahme der Zahl dysmorpher Kerne bei thermischem Stress ab 45°C beobachtet wurde. Inwieweit diese Beobachtung auch auf HeLa – Zellen übertragbar ist, die HGPS-/RD – verursachende Prälamina A – Mutanten exprimieren wurde nicht untersucht. Frühere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Expression solcher Mutanten in 37°C inkubierten HeLa – Zellen per se eine Zunahme der Zahl von Zellen mit Kerndysmorphie bedingt [135]. Wie groß die Rolle der endogenen Lamin A – Produktion neben den exogen zugeführten trunkierten Laminen (via Expressionsvektoren) auf die Stabilität der Kernlamina ist, wurde nicht differenziert [130]. Insgesamt betrachtet zeigen solche Versuche, dass die strukturelle Intaktheit von Prälamina A bei der thermischen Stresstoleranz von Zellen eine wichtige Rolle zu spielen scheint.

Da das verwendete Reporterprotein GFP – β – Galaktosidase (physiologischerweise als Homotetramer vorliegend) mit seinem Molekulargewicht von ~500 kDa zu groß ist um durch Diffusion in den Zellkern zu gelangen, würde die Verwendung eines kleineren aber hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisierenden und damit sensitiveren Reporters die Beobachtung eines Unterschiedes hinsichtlich einer erhöhten unspezifischen KPK – Durchgängigkeit zwischen Prälamina A und Prälamina A $\Delta 50/90$ exprimierenden Zellen ermöglichen.

5. Zusammenfassung

Zur Charakterisierung nukleärer Proteinexportvorgänge wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal ein System heterodimerisierender Fusionsproteine auf Basis des kommerziell verfügbaren ARGENT™ *Regulated Heterodimerization Kit 2.0* von ARIAD verwendet. Die Expressionsvektoren wurden so verändert, dass ein CRM1 – vermittelter Proteinexport über die Zellkernhülle mittels Fluoreszenzmikroskopie in HeLa – Zellen und humanen Fibroblasten *live* oder nach Fixation dargestellt werden konnte. Der Export folgte in HeLa – zellen einer exponentiellen Kinetik, $F_{N/C}$ – Bestimmungen zwischen Wildtyp – und RD (Restriktive Dermopathie) – Fibroblasten ergaben keinen Unterschied im Proteinexport.

Eine Inhibition der initialen *CaaX* – Prozessierung von trunkiertem Prälamina A (Δ *head/rod*) durch Mevinolin ergab keine signifikante Akkumulationsveränderung des trunkierten Prälamins im Zellkern. Ergänzende subzelluläre Lokalisationsstudien unter Zuhilfenahme ausgewählter *CaaX* – Mutanten, um die gezeigte Unabhängigkeit der *CaaX* – Prozessierung zu verifizieren, stehen noch aus.

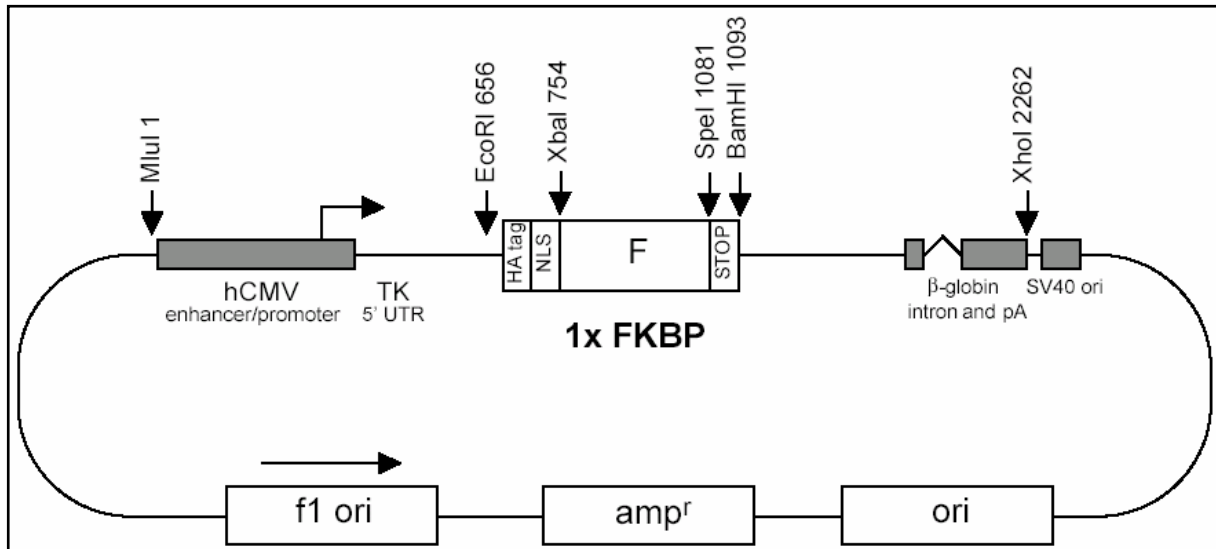
FRAP – Untersuchungen in HeLa – Zellen zeigten für die episomal exprimierte trunkierte Fusionsproteine DsRed – Prälamina A Δ 50 und DsRed – Prälamina A Δ 90 keinen Unterschied in der lateralen Mobilität. Gegenüber dem Wildtyp – DsRed – Prälamina A ist die Beweglichkeit jedoch signifikant reduziert.

Bei der Applikation von thermischem Stress (37°C – 51°C) auf Prälamina A, Prälamina A Δ 50 oder Prälamina A Δ 90 exprimierende HeLa – Zellen, konnte keine Veränderung hinsichtlich der subzellulären Verteilung des zusätzlich koexprimierten Markerproteins GFP – β – Galaktosidase im Sinne nukleärer Schrankenstörung festgestellt werden. Somit scheint die Kernhülle trotz der zu Zellkerndysmorphien und KPK – Fehllokalisationen führenden Prälamina A – Mutanten hinsichtlich ihrer Schrankenfunktion intakt zu bleiben.

6. Anhang

6.1. Expressionsvektoren

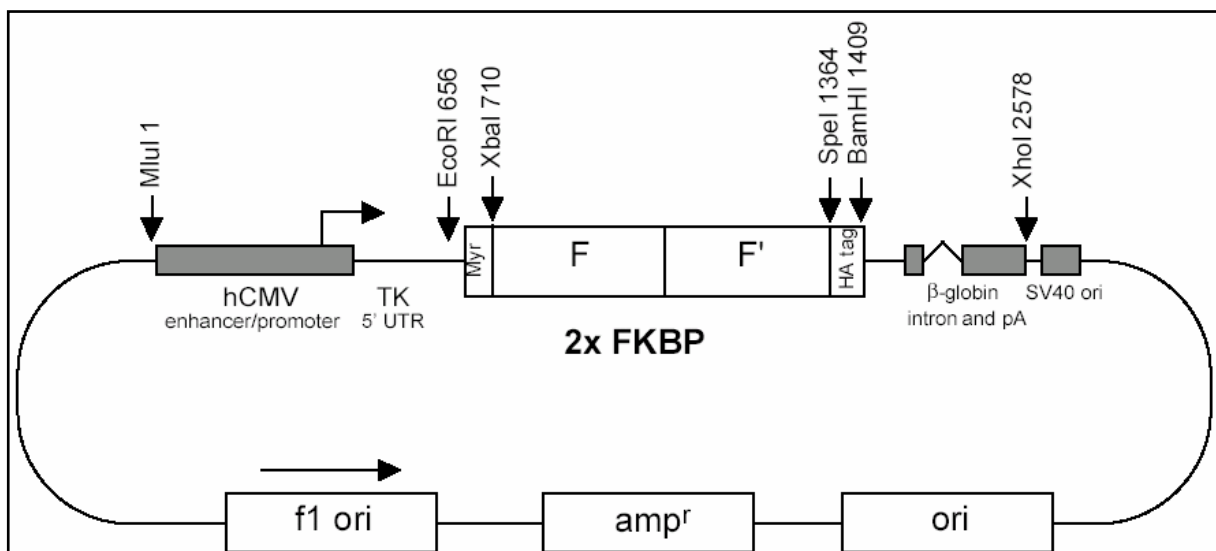
6.1.1. pC₄EN – F1 (ARIAD Pharmaceuticals)



FKBP_{1x} – Expressionsvektor des ARGENT™ Regulated Heterodimerization Kit 2.0:

Der Vektor enthält cDNAs, die für das Hämagglutinin (HA) – Epitop, eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) und eine Heterodimerisierungsdomäne (FKBP) kodieren. Die Expression kontrolliert der humane CMV – Promotor. Die NLS entspricht der NLS aus dem *SV40 T – Ag*. Die FKBP – Domäne ist die 104 AS lange Rapamycin – bindende Domäne aus dem humanen Protein FKBP12. Zwischen der NLS– und der FKBP – cDNA liegt eine *XbaI* Schnittstelle, zwischen der FKBP – cDNA und dem STOP – Codon eine *SpeI* Schnittstelle. (5410 Bp)

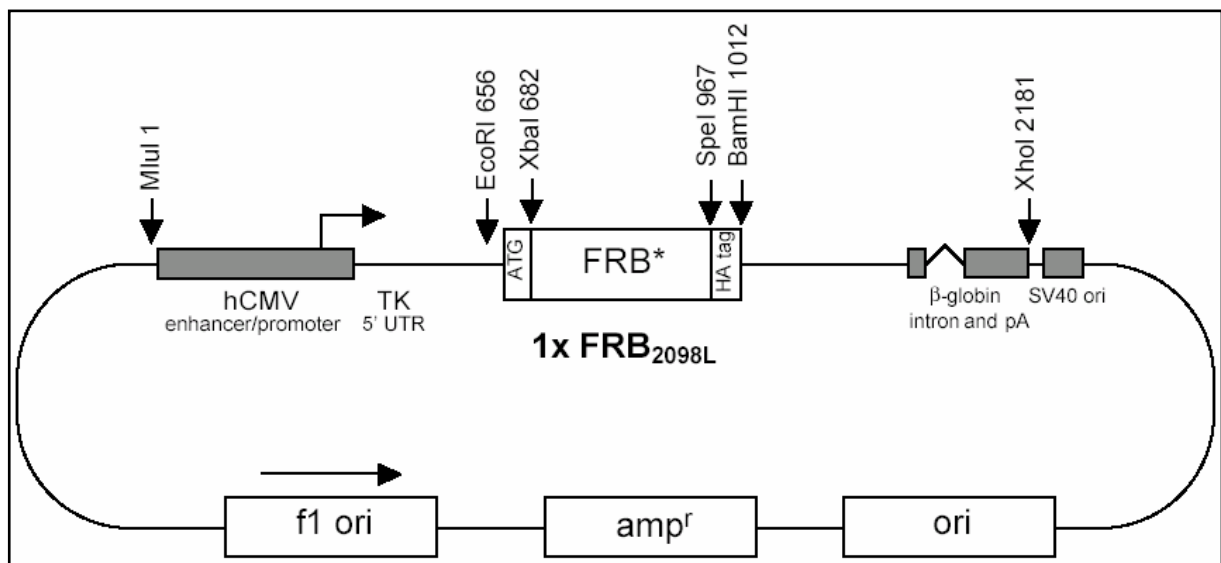
6.1.2. pC₄EM – F2E (ARIAD Pharmaceuticals)



FKBP_{2x} – Expressionsvektor des ARGENT™ Regulated Heterodimerization Kit 2.0:

Der Vektor kodiert unter der Kontrolle des humanen CMV – Promotors für ein Multidomänenprotein, dass ein Myristoylierungssignal, zweimal in Folge die FKBP – Domäne und ein HA – Epitop enthält. Die FKBP – Doppelkopie wird von einer *Xba*I Schnittstelle am 5' – Ende und einer *Spe*I Schnittstelle am 3' – Ende flankiert. Der Vektor wurde für die Isolierung der FKBP_{2x} – cDNA verwendet. (5726 Bp)

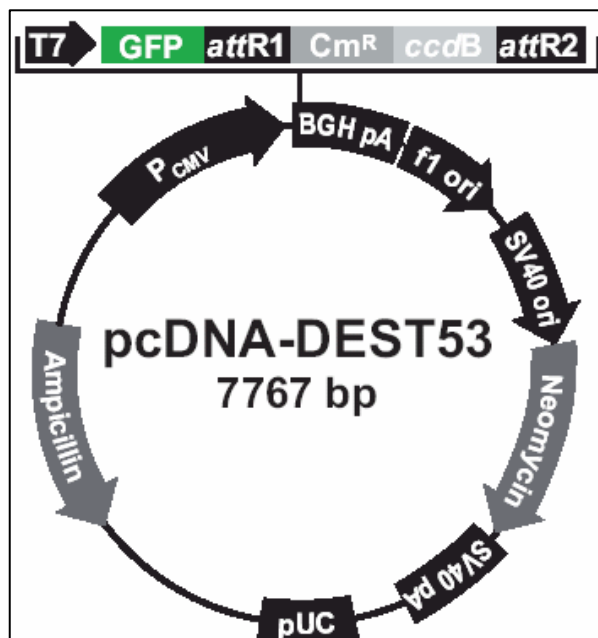
6.1.3. pC₄ – R_HE (ARIAD Pharmaceuticals)



FRB* – Expressionsvektor des ARGENT™ Regulated Heterodimerization Kit 2.0:

Der Vektor kodiert für die mutierte FRB* – Domäne aus FRAP (*mTOR/FKBP12 Rapamycin-associated protein*) mit C – terminalem HA – Epitop. Die Mutation T2098L gewährleistet die spezifische Wechselwirkung mit AP21967. Die FRB* – cDNA wird ebenfalls von *Xba*I und *Spe*I Schnittstellen flankiert.

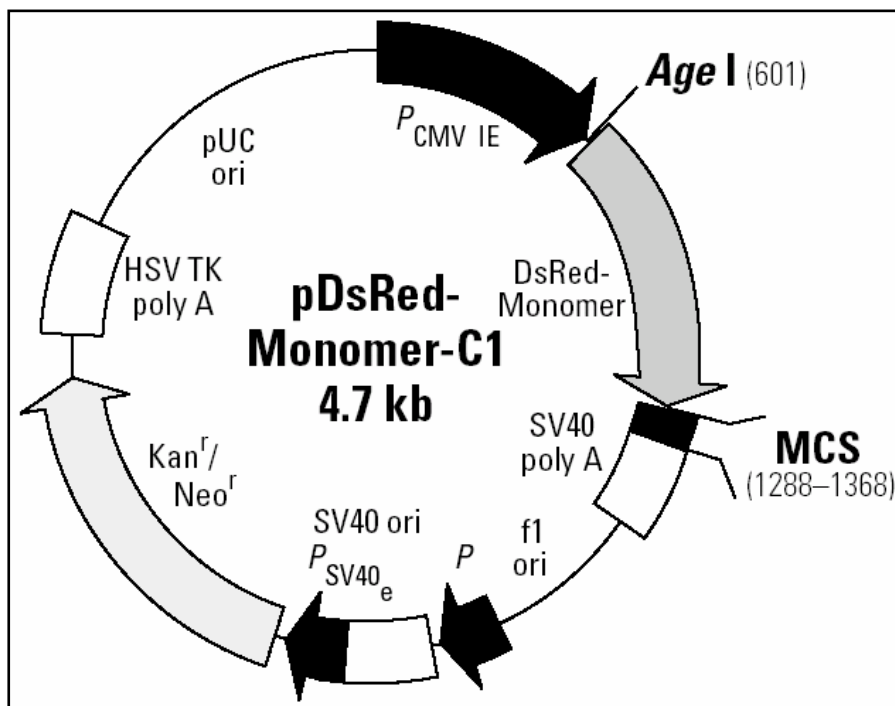
6.1.4. pDest53 (Invitrogen)



pDest53 „Gateway Destination Vector“:

Der Vektor besitzt von Base 905 – 1621 das „*cycle 3 GFP*“ beschrieben von Cramer et al. [82]. Es handelt sich dabei um ein, gegenüber dem natürlichen GFP aus *Aequorea victoria*, 45fach stärker fluoreszierendes Protein. Der Vektor wurde für die Expression der Prälamina A – *tail* – Mutanten (s. 3.4.) sowie als PCR – Vorlage zur Amplifikation der GFP – cDNA verwendet. (7767 Bp)

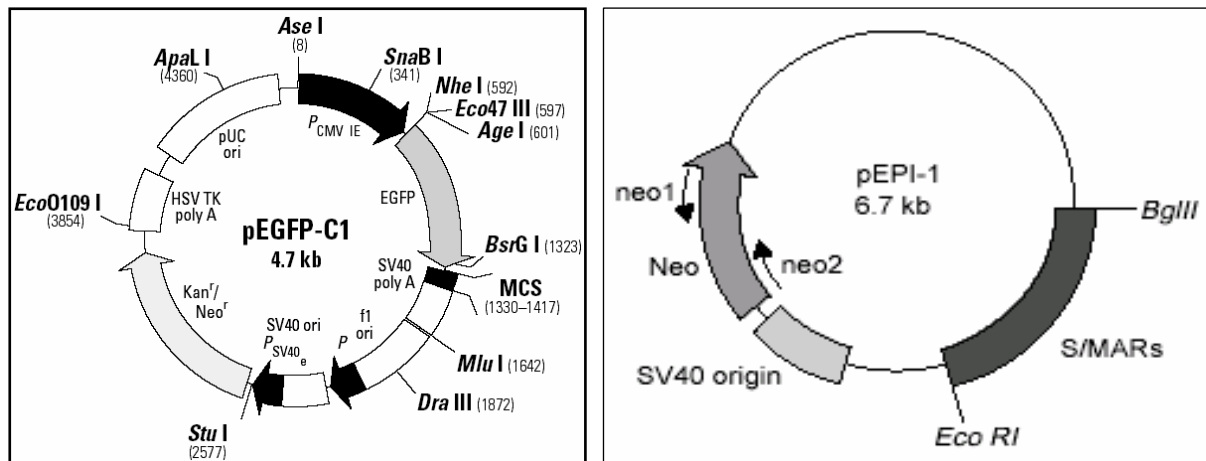
6.1.5. pDsRed – Monomer – C1 (Clontech)



pDsRed – Monomer – Expressionsvektor:

Der Vektor enthält die cDNA für das rot – fluoreszierende Protein DsRed – Monomer. Es handelt sich um ein an 45 Stellen mutiertes monomeres Protein des eigentlich als Tetramer vorliegenden DsRed aus *Discosoma sp.* [131]. Die Fluorophor – Sequenz ist flankiert von einer AgeI Schnittstelle und einer multiplen Klonierungsstelle (MCS – multiple cloning site), die u.a. eine XhoI und eine SmaI Schnittstelle enthält. Der Vektor wurde als PCR – Vorlage für die Generierung der NES – DsRed – cDNA verwendet sowie die Isolierung der DsRed – cDNA. (4700 Bp)

6.1.6. pEpi – 1 (zur Verfügung gestellt von Prof. H J Lipps – Witten/Herdecke) [86, 87]



pEGFP – C1 – Expressionsvektor (links) und schematische Darstellung der in die Multiple Klonierungsstelle (MCS) integrierten S/MAR Domäne beim pEPI – Expressionsvektor (rechts):

Beim pEPI – 1 Vektor wurde in den kommerziell verfügbaren pGFP – C1 Vektor (Invitrogen) eine sog. S/MAR (*scaffold/matrix attached region*) Domäne eingefügt. Dadurch wird die episomale Replikation und mitotische Stabilität des Vektors durch Assoziierung mit der Kernmatrix gewährleistet [86, 87]. Bei pEPI – 1 bestehen also beidseits der S/MAR – Insertionsstelle Möglichkeiten zum Restriktionsverdau.

6.2. Literaturverzeichnis

- [1] Fawcett D W (1966) “*On the occurrence of a fibrous lamina on the inner aspect of the nuclear envelope in certain cells of vertebrates*” Am J Anat 119:1 129-145
- [2] Aaronson R P et al. (1974) “*On the attachment of the nuclear pore complex*” J Cell Biology 62:746-754
- [3] Aebi U et al. (1986) “*The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments*” Nature 323:560-564
- [4] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=search&term=lamin+human>
- [5] McKeon F D et al.(1986) “*Homology in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins*” Nature 319:463-468
- [6] Mattout A et al. (2006) “*Nuclear lamins, disease and aging*“ Curr Opin Cell Biol 18(3):335-41
- [7] Broers J L V et al.(2006) “*Nuclear Lamins : Laminopathies and their role in Premature Aging*” Physiol Rev 86:967-1008
- [8] Gerace L et al. (1978) “*Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution.*“ J Cell Biol 79:546-566
- [9] Machiels B M et al. (1996) “*An alternative Splicing Product of the Lamin A/C Gene lacks Exon 10*” J Biol Chem 271(16):9249-9253
- [10] Furukawa K et al. (1994) “*Identification and Cloning of an mRNA Coding for a Germ-line specific A-type Lamin in mice*” Exp Cell Res 212(2):426-430
- [11] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=4000&ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum
- [12] Omer CA et al. (1993) “*Characterization of recombinant human farnesyl-protein transferase: cloning, expression, farnesyl diphosphate binding, and functional homology with yeast prenyl-protein transferases*” Biochemistry 19(32):5167-76
- [13] Sinensky M et al. (1994) “*The processing pathway of prelamin A*” J Cell Sci 107:61-67
- [14] Bergo M O et al. (2002) “*ZMPSTE24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect*” PNAS 99(20):13049-13054
- [15] Young S G et al. (2006) “*Prelamin A Farnesylation and Progeroid Syndromes*” JBC 281(52):39741-45

- [16] Young S G et al. (2005) "*Prelamin A, Zmpste24, misshapen cell nuclei and progeria – new evidence suggesting that protein farnesylation could be important for disease pathogenesis*" J Lipid Res 46:2531-58
- [17] Barrowman J et al. (2008) "*Analysis of prelamin A biogenesis reveals the nucleus to be a CaaX processing compartment*" Mol Biol Cell 19(12):5398-408
- [18] Wright LP et al. (2006) "*Thematic Review Series: lipid posttranslational modifications. CaaX modification and membrane targeting of Ras*" J Lipid Res 47(5):883-91
- [19] Glomset J A (1990) "*Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor*" Trends Biochem Sci 15:139-142
- [20] Alsheimer M et al. (2000) "*Meiotic lamin C: The unique amino-terminal hexapeptide GNAEGR is essential for nuclear envelope association.*" PNAS 97(24):13120-25
- [21] Parnaik V K (2008) "*Role of nuclear lamins in nuclear organization, cellular signaling and inherited diseases*" Int Rev Cell Mol Biol 266:157-207
- [22] Stuurman N et al. (1998) "*Nuclear Lamins: Their Structure, Assembly and Interactions*" J Struct Biol 122:42-66
- [23] Goldman R D et al. (2002) "*Nuclear Lamins: building blocks of nuclear architecture*" Genes Dev 16:533-547
- [24] Broers J L V (2004) "*Decreased mechanical stiffness in LMNA -/- cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies*" Hum Mol Gen 13(21):2567-2580
- [25] Lammerding J (2006) "*Lamins A and C but not Lamin B1 regulate nuclear mechanics*" J Biol Chem 281(35):25768-80
- [26] Maeshima K et al. (2006) "*Cell-cycle-dependent dynamics of nuclear pores: pore-free islands and lamins*" J Cell Science 119:4442-4451
- [27] Lenz-Bohme B et al. (1997) "*Insertional mutation of the Drosophila nuclear lamin Dm0 gene results in defective nuclear envelopes, clustering of nuclear pore complexes and accumulation of annulate lamellae*" J Cell Biol 137:1001-16
- [28] Liu J et al. (2000) "*Essential roles for C. elegans lamin genes in nuclear organization, cell cycle progression and spatial organization of the nuclear pore complex*" Mol Biol Cell 11:3937-47
- [29] Smythe C et al. (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 19:3918-31

- [30] Goldman et al. (2004) "Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchison-Guilford progeria syndrome" PNAS 101(24):8963-68
- [31] Wagner N and Krohne G (2007) „LEM-Domain Proteins: New Insights into Lamin-interacting proteins“ Int Rev Cyt 261:1-48
- [32] Zastrow M S et al. (2004) "Proteins that bind A-type lamins: integrating isolated cues" J Cell Science 117:979-987
- [33] Ingber DE (1993) "Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton" J Cell Sci 104:613-627
- [34] Ingber DE (1997) "Integrins, tensegrity and mechanotransduction" Gravit Space Biol Bull 10(2):49-55
- [35] Bione S et al. (1994) "Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreyfuss muscular dystrophy" Nat Genet 8:323-327
- [36] Cohen S et al. (2006) "Parvoviral nuclear import: bypassing the host nuclear-transport machinery" J Gen Virol 87:3209-13
- [37] Alber F et al. (2007) "The molecular architecture of the nuclear pore complex" Nature 450:695-672
- [38] Fahrenkrog B et al (2003) "The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond" Nat Rev Mol Cell Biol 4(10):757-66
- [39] Pemberton L F and Paschal B M (2005) "Mechanisms of Receptor-mediated Nuclear Import and Nuclear Export" Traffic 6:187-198
- [40] Yoneda Y (2000) "Nucleocytoplasmic protein traffic and its significance to cell function" Genes to Cells 5:777-787
- [41] Jomon J (2006) "Ran at a glance" J Cell Science 119:3481-84
- [42] Breeuwer M et al. (1990) "Facilitated Nuclear Transport of Histone H1 and Other Small Nucleophilic Proteins" Cell 60:999-1008
- [43] Kutay U et al. (2005) "Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak" TRENDS in Biol 15(3):121-24
- [44] Cook A et al. (2007) "Structural Biology of Nucleocytoplasmic Transport" Annu Rev Biochem 76:647-71
- [45] Ribbeck K et al. (2001) "Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes" EMBO J 20(6):1320-30
- [46] Hurt J A et al. (2008) "mRNA nuclear export and human disease" Dis Model Mech 1(2-3):103-108

- [47] **Stewart M (2000)** “*Insights into the Molecular Mechanism of Nuclear Trafficking Using Nuclear Transport Factor 2 (NTF2)*” *Cell Struct Funct* 25:217-225
- [48] **Liu B and Zhou Z (2008)** “*Lamin A/C, laminopathies and premature aging*” *Histol Histopathol* 23:747-763
- [49] **Meier R et al. (1997)** “*Differential Phosphorylation of Lamin B2 in normal and leukemic cells*” *Leuk Res* 21(9):841-7
- [50] **Padiath Q S et al. (2006)** “*Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy*” *Nature Gen* 38(10) :1114-24
- [51] **Meijer I A et al. (2008)** “*A novel duplication confirms the involvement of 5q23.2 in Autosomal Dominant Leukodystrophy*” *Arch Neur* 65(11):1496-1501
- [52] **Hegele R A (2006)** “*Sequencing of the Reannotated LMNB2 Gene reveals Novel Mutations in Patients with Acquired Partial Lipodystrophy*” *Am J Human Gen* 79:383-390
- [53] **Herrmann H (2007)** “*Intermediate Filaments: from cell architecture to nanomechanics*” *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7):562-73
- [54] **Dahl K N (2006)** “*Distinct structural und mechanical properties if the nuclear lamina in Hutchison-Guilford progeria syndrome*” *PNAS* 103(27):10271-76
- [55] **Lloyd D L (2002)** “*A Novel Interaction between Lamin A and SREBP1:implication for partial lipodystrophy and other laminopathies*” *Hum Mol Genet* 11(7):769-777
- [56] **Szeverenyi I et al. (2008)** “*The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases.*” *Hum. Mutat.* 29(3):351-360
- [57] **Hutchison J (1886)** “*Case of congenital absence of hair, with atrophic condition of the skin and its appendages, in a boy whose mother had been almost wholly bald from alopecia areata from the age of six*” *Lancet*I:923
- [58] **Gilford H (1904)** “*Ateleiosis and progeria: continuous youth and premature old age*” *Brit Med J* 2:914-918
- [59] **Rankin J et al. (2006)** “*The laminopathies: a clinical review*” *Clin Genet* 70:261-274
- [60] **Mazereeuw-Hautier J et al. (2007)** “*Hutchison-Gilford progeria syndrome: clinical findings in three patients carrying the G608G mutation in LMNA and review of the literature*” *Paed Derm* 156:1308-1314
- [61] **DeBusk F (1972)** “*The Hutchison-Gilford progeria syndrome: Report of 4 cases and review of the literature*” *J Pedia* 80(4):697-724
- [62] **Baker P B et al. (1981)** “*Cardiovascular abnormalities in progeria. Case report and review of the literature*” *Arch Pathol Lab Med* 105(7):384-6

- [63] Eriksson M et al. (2003) “*Recurrent de novo point mutation in lamin A cause Hutchison-Gilford Progeria syndrome*” *Nature* 423:293-299
- [64] de Sandre-Giovannoli A et al. (2003) “*Lamin A Truncation in Hutchison-Gilford Progeria*” *Science* 300:2055
- [65] Cao H. et al. (2003) “*LMNA is mutated in Hutchison-Gilford progeria but not in Wiedemann-Rautenstrauch progeroid syndrome*” *J Hum Genet.* 48:271-274
- [66] Dahl KN et al. (2006) “*Distinct structural and mechanical properties of the nuclear lamina in Hutchison-Gilford progeria syndrome*” *PNAS* 103(27):10271-10276
- [67] Reddel CJ et al. (2004) “*Lamin A expression levels are unperturbed at the normal and mutant alleles but display partial splice site selection in Hutchison-Gilford progeria syndrome*” *J Med Genet* 41:715-717
- [68] Huebner S et al. (2006) “*Quantitative Analysis of Localization and Nuclear Aggregate Formation Induced by GFP-Lamin A Mutant Proteins in Living HeLa-Cells*” *J Cell Biochem* 98:810-826
- [69] Fong L G et al. (2004) “*Heterozygosity for Lmna deficiency eliminates the progeria-like phenotypes in Zmpste24-deficient mice*” *PNAS* 101(52):18111-18116
- [70] Gruber J et al. (2005) “*RNAi of FACE1 protease results in growth inhibition of human cells expressing lamin A: implications for Hutchison-Gilford progeria syndrome*” *J Cell Science* 118:689-696
- [71] Capell B C et al. (2005) “*Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchison-Gilford progeria syndrome*” *PNAS* 102(36):12879-84
- [72] Rusiñol A E et al. (2006) “*Farnesylated lamins, progeroid syndromes and farnesyl transferase inhibitor*” *J Cell Science* 119:3265-3272
- [73] Witt D R et al. (1986) “*Restrictive Dermopathy: a newly recognized autosomal recessive skin dysplasia*” *Am J Med Genet* 24(4):631-48
- [74] Chiang M C et al. (2008) “*Restrictive Dermopathy: report of one case and the metabolic and post-mortem findings*” *Turk J Pediatr* 50(5):492-4
- [75] Feldman-Leidner N et al. (2008) “*Restrictive Dermopathy: two- and three-dimensional sonographic findings*” *Ultrasound Obstet Gynecol* 32(6):840-2
- [76] Wesche W A et al. (2001) “*Restrictive Dermopathy: report of a case and review of the literature*” *J Cutan Pathol* 28(4):211-8
- [77] Navarro C L et al. (2004) “*Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) defects cause nuclear disorganization and identify restrictive dermatopathy as a lethal neonatal dermatopathy*” *Hum Mol Genet* 13(20):2493-503

- [78] Levy N et al. (2005) “Defective prelamin A processing resulting from LMNA or ZMPSTE24 mutations as the cause of restrictive dermopathy” Arch Dermatol 141(11):1473-4
- [79] Navarro C L et al. (2005) “Loss of ZMPSTE24 (FACE-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and accumulation of Lamin A precursor” Hum Mol Genet 14(11):1503-13
- [80] Moulson C L et al. (2005) “Homozygous and compound heterozygous mutations in ZMPSTE24 cause the laminopathy restrictive dermopathy” J Invest Dermatol. 125(5):913-919
- [81] ARIAD Pharmaceutical, Inc., 26 Landsdowne St, Cambridge, MA, 02139
- [82] Cramer A et al. (1996) “Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling” Nat Biotechnol. 14(3):315-9
- [83] Sánchez L et al. (2005) “Monitoring the of Nuclear Envelopes in Interphase Cells with GFP- β -Galactosidase” J Biomol Tech 16(3):235-239
- [84] Stamminger T et al. (1999) “Mapping of nuclear localization signals by simultaneous fusion to green fluorescent protein and to beta-galactosidase” Biotechniques 26(5):858-62
- [85] Nishi K et al. (1994) “Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression” J Biol Chem. 269(9):6320-4
- [86] Piechaczek C et al. (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
- [87] Jenke C B H et al. (2002) “An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein SAF-A in vivo” EMBO reports 3(4):349-354
- [88] Ghildyal R et al. (2005) “Nuclear Import of the Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Is Mediated By Importin β 1 Independent of Importin α ” Biochemistry 44:12887-895
- [89] Lattanzi G et al. (2007) “Pre-Lamin A processing is linked to heterochromatin organization” J Cell Biochem 102(5):1149-59
- [90] Koester M et al. (1999) “Dynamic redistribution of STAT1 protein by in IFN signaling visualized by GFP fusion proteins” Eur J Biochem 260:137-144
- [91] Miyamoto K et al. (2008) “Reversible membrane permeabilization of mammalian cells treated with digitonin and its use for inducing nuclear reprogramming by Xenopus egg extracts” Cloning Stem Cells 10(4):535-42
- [92] Jans D A et al. (1996) “Regulation of Protein Transport to the Nucleus: Central Role of Phosphorylation” Physiological Reviews 76:651-685
- [93] Lam MH et al. (2002) “Nuclear transport of parathyroid hormone (PTH) related protein is dependent on microtubules” Mol Endocrinol 16(2):390-401

- [94] Garcia – Bustos J et al. (1991) “Nuclear Protein Localization” Biochim. Biophys. Acta 1071:83-101
- [95] Wen W et al. (1995) “Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus” Cell 82:463-73
- [96] Wang R et al. (2007) “The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa” FEBS Letters 581:3164-3170
- [97] Schwoebel E D et al. (2002) “The mechanism of inhibition of Ran-dependent nuclear transport by cellular ATP depletion” J Cell Biol 157(6):963-74
- [98] Calapez A et al. (2002) “The intranuclear mobility of messenger RNA binding proteins is ATP dependent and temperature sensitive” JCB 159(5):795-805
- [99] Paige D G et al. (1992) “Restrictive Dermopathy: a disorder of fibroblasts” Br J Dermatol 127(6):630-4
- [100] Bonne G et al. (2003) “The laminopathy saga” Rev Neurol 37(8):772-4
- [101] Lippincott-Schwartz J et al. (2001) “Studying protein dynamics in living cells” Nature Rev Mol Cell Biol 2:444-456
- [102] Goodwin J S et al. (2005) “Photobleaching approaches to investigate diffusional mobility and trafficking of Ras in living cells” Methods 37:154-164
- [103] Lippincott-Schwartz J et al. (2003) “Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells” Imaging in Cell Biology Sept2003:7-12
- [104] Hinow P et al. (2006) “The DNA Binding Activity of p53 Displays Reaction-Diffusion Kinetics” Biophysical Journal 91:330-342
- [105] Moir R D et al. (2000) “Nuclear Lamins A and B1: Different Pathways of Assembly during Nuclear Envelope Formation in Living Cells” JCB 151(6):1155-1168
- [106] Dahl K N et al. (2006) “Distinct structural and mechanical properties of the nuclear lamina in Hutchison-Gilford progeria syndrome” PNAS 103(27):10271-10276
- [107] Wiesel N et al. (2008) “Laminopathic mutations interfere with the assembly, localization, and dynamics of nuclear lamins” PNAS 105(1):180-185
- [108] Scaffidi P et al. (2005) “Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchison-Gilford Progeria Syndrome” Nat Med 11(4):440-445
- [109] Huang S et al. (2005) “Correction of cellular phenotypes of Hutchison-Gilford Progeria cells by RNA interference” Hum Genet 118:444-450
- [110] Pereira S et al. (2008) “HGPS and related premature aging disorders: From genomic identification to the first therapeutic approaches” Mech of Ageing & Dev 129:449-459

- [111] **Kurzrock R et al. (2002)** “*Clinical development of farnesyltransferase inhibitors in leukemias and myelodysplastic syndrome*“ *Semin Hematol* 39:20-24
- [112] **Hahn SM et al. (2002)** “*A Phase I trial of the farnesyltransferase inhibitor L-778, 123 and radiotherapy for locally advanced lung and head and neck cancer*” *Clin Cancer Res* 8(5):1065-72
- [113] **Sousa S F et al.** “*Farnesyltransferase Inhibitors: A Detailed Chemical View on an Elusive Biological Problem*” *Current Medicinal Chemistry* 15(15):1478-1492
- [114] **Glynn M W et al. (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(20):2959-2969
- [115] **Columbaro M et al. (2005)** “*Rescue of heterochromatin organization in Hutchinson-Gilford progeria by drug treatment*” *CMLS* 62(22):2669-2678
- [116] **Mallampalli M P et al. (2005)** “*Inhibiting farnesylation reverses the nuclear morphology defect in HeLa cell model for Hutchinson-Gilford progeria syndrome*” *PNAS* 102(40):14416-14421
- [117] **Capell B C et al. (2008)** “*A farnesyltransferase inhibitor prevents both the onset and late progression of cardiovascular disease in a progeria mouse model*” *PNAS* 105(41):15902-15907
- [118] **Yang S H et al. (2007)** “*Treatment with a farnesyltransferase inhibitor improves survival in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation*” *Biochim et Biophys Acta* 1781:36-39
- [119] www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=progeria
- [120] **Morais P et al. (2008)** “*Restrictive Dermopathy – a lethal congenital laminopathy. Case report and review of the literature*” *Eur J Pediatr* (Epub)
- [121] **Beck LA et al. (1990)** “*Isoprenylation is required for the processing of the lamin A precursor*” *J Cell Biol* 110:1489-99
- [122] Promotionsarbeit von Tilman Kiel, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Würzburg (einsehbar unter OPUS Würzburg)
- [123] **Hennekes H et al. (2010)** “*The role of isoprenylation in membrane attachment of nuclear lamins. A single point mutation prevents proteolytic cleavage of the lamin A precursor and confers membrane binding proteins*” *J Cell Sci* 107(4):1019-29
- [124] **de Graaf A et al. (1992)** “*Heat shock-induced redistribution of a 160kDa nuclear matrix protein*” *Exp Cell Res* 202(2):243-51

- [125] Tkach J M et al. (2008) “Nucleocytoplasmic Trafficking of the Molecular Chaperone Hsp104 in Unstressed and Heat-Shocked cells” *Traffic* 9:39-56
- [126] Falloon E A et al. (2002) “Reversible changes in the nuclear lamina induced by hyperthermia” *J Cell Biochem* 86(3):451-60
- [127] Zhu W – G et al. (1999) “Heat-induced modulation of lamin B content in two different cell lines” *J Cellular Biochem* 75(4):620-628
- [128] Dynlacht J R et al. (1998) “Lamin B is a prompt heat shock protein” *J Cell Physiol* 178(1):28-34
- [129] Paradisi M et al. (2005) “Dermal fibroblasts in Hutchison-Gilford progeria syndrome with the lamin A G608G mutation have dysmorphic nuclei and are hypersensitive to heat stress” *BMC Cell Biology* 6(27)
- [130] Ileng Kumaran R et al. (2002) “Lamin A/C speckles mediate spatial organization of splicing factor compartments and RNA polymerase II transcription” *J Cell Biol* 159(5):783-793
- [131] Matz MV et al. (1999) “Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species” *Nature Biotech* 17:969-973
- [132] Roth DM et al. (2007) “A microtubule – facilitated nuclear import pathway for cancer regulatory proteins” *Traffic* 8:673-686
- [133] Cáceres JF et al. (1998) “A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm” *Genes Dev* 12(1):55-66
- [134] Efthymiadis A et al. (1998) “A novel system to quantitate nuclear – cytoplasmic flux in vivo: kinetics of signal – dependent nuclear protein export” *Arch Biochem Biophys* 355(2):254-61
- [135] Busch A et al. (2009) “Nuclear protein import is reduced in cells expressing nuclear envelopathy – causing lamin A mutants” *Exp Cell res* 315(14):2373-85
- [136] Holtz D et al. (1989) “The CaaX motif of lamin A functions in conjunction with the nuclear localization signal to target assembly to the nuclear envelope” *Cell* 59(6):969-77
- [137] Daigle N et al. (2001) “Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells” *JCB* 154(1):71-84
- [138] Gilchrist S et al. (2004) “Altered protein dynamics of disease-associated lamin A mutants” *BMC Cell Biol* 5(1):46
- [139] Winey M et al. (1997) “Nuclear pore complex number and distribution throughout the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle by three-dimensional reconstruction from electron micrographs of nuclear envelopes” *Mol Biol Cell* 8(11):2119-32

- [140] **Smith A et al. (1998)** “*Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2*”
Curr Biol 8(25):1403-6
- [141] **Dorner D et al. (2006)** “*Lamina-associated polypeptide 2alpha regulates cell cycle progression and differentiation via the retinoblastoma-E2F pathway*” J Cell Biol 173(1):83-93
- [142] **Dieckmann-Schuppert A et al. (1997)** “*A simple assay for quantification of protein in tissue sections, cell cultures, and cell homogenates and of protein immobilizes on solid surfacess*” Cell Tissue Res 288(1):119-26
- [143] **Huebner S et al. (1997)** “*The protein kinase CK2 site (Ser111/112) enhances recognition of the simian virus 40 large T-antigen nuclear localization sequence by importin*” J Biol Chem 272(27):17191-5
- [144] **Kilic F et al. (1997)** “*In vitro assay and characterization of the farnesyl-dependent prelamina A endoprotease*” J Biol Chem 272(8):5298-304

6.3. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADLD	<i>Adult – onset autosomal dominant leukodystrophy</i>
ADS	Amidoschwarzmethode
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin – Triphosphat
BAF	<i>Barrier to autointegration factor</i>
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C661S	Prälamin A – Substitutionsmutante (Serin statt Cystein an Position 661)
ca.	cirka
CdK	<i>cyklin – dependent – kinase</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
CLSM	<i>confocal laser scanning microscopy</i>
CMV	Cytomegalievirus
CRM1	<i>chromosomal region maintenance 1</i>
DAPI	<i>4',6 – diamidino – 2 – phenylindole</i>
dest.	destilliert
dNTP	<i>desoxy nucleotide triphosphate</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
E2F	Familie eukaryoter Transkriptionsfaktoren
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EMD	Emery – Dreyfuss Muskeldystrophie
FACE1	<i>farnesylated protein converting enzyme 1</i>
FADS	<i>fetal akinesia or hypokinesia deformation sequence</i>
FKBP	<i>FK605 binding protein</i>
FLIP	<i>fluorescence loss in photobleach</i>
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleach</i>
FTI	Farnesyltransferaseinhibitor
garb	<i>goat anti rabbit</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GTP	Guanosiltriphosphat

GDP	Guanosildiphosphat
h	Stunde („hour“)
HA	Hämagglutinin
HMG-CoA	Hydroxy – Methyl – Glutaryl – CoEnzym A
HGPS	Hutchison – Guilford Progerie Syndrom
ICMT	<i>iso carboxy – methyl transferase</i>
IF	Intermediärfilamente
Ig	Immunglobulin
KPK	Kernporenkomplex
LAP2 β	<i>Lamin associated protein 2β</i>
LBR	Lamin B Rezeptor
LEM	40 AS homologe Domäne von LAP2, Emerin, MA
Lsg	Lösung
MAN1	<i>LEM domain containing 3</i>
MBA	N,N – Methylenbisacrylamid
Mio	Million
min	Minute
mRNA	<i>messenger – RNA (ribo nucleotide acid)</i>
MSIM	Prälamin A – Mutante mit den AS MSIM C – terminal (Wilytyp: CSIM)
MVM	<i>minute virus of mice</i>
NES	<i>nuclear export sequence</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NLS	<i>nuclear localization sequence</i>
NTF2	<i>nuclear transport factor 2</i>
Nup	Nukleoporin
NXF1	<i>nuclear RNA export factor 1</i>
NXT1	<i>NTF2-like export factor 1</i>
PAGE	<i>poly acryl amide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>phosphate buffer system</i>
pCA	<i>p – coumaric acid</i>
RanBP1/2	<i>Ran – binding protein 1/2</i>
RanGAP	<i>Ran – GTPase activating protein</i>
RanGEF	<i>Ran – Guanoside exchange factor</i>
Rb	Retinoblastomprotein

RCC1	<i>regulator of chromosome condensation 1</i>
RCE1	<i>Ras converting enzyme</i>
RD	Restriktive Dermopathie
s.	siehe
sek	Sekunde(n)
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SH	Thiol – Gruppe
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small inhibiting RNA</i>
sog.	so genannt
spp.	mehrere nicht einzeln zu nennende Spezies einer Gattung
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
t-RNA	<i>transfer-RNA</i>
TEMED	NNN'N' – Tetramethylethylenediamine
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehung pro min.
v. a.	vor allem
vgl.	Vergleiche
z.B.	zum Beispiel
ZMPSTE24	<i>Zinc Metalloproteinase homologous to STE24 in S. cerevisiae</i>

6.4. Abbildungsverzeichnis

Abb.1-1:	Struktur der Prälamine	S. 1
Abb.1-2:	Prälamina A – Prozessierung	S. 3
Abb.1-3:	Lamina – Protein – Interaktion	S. 5
Abb.1-4:	Schematische Darstellung nukleärer Transportprozesse	S. 7
Abb.1-5:	Die Kernlamina bei Wildtyp Zellen und HGPS – Zellen	S. 11
Abb.3-1:	NLS – GFP – FKBP _{1x}	S. 23
Abb.3-2:	NLS – GFP – FKBP _{3x}	S. 24
Abb.3-3:	NES – DsRed – FRB*	S. 24
Abb.3-4:	Western Blot NLS – GFP – FKBP _{1x} , NLS – GFP – FKBP _{3x} und NES – DsRed – FRB*	S. 25
Abb.3-5:	Subzelluläre Lokalisation von NLS – GFP – FKBP _{1x} , NLS – GFP – FKBP _{3x} und NES – DsRed – FRB* in HeLa – Zellen	S. 25
Abb.3-6:	F _{N/C} – Werte für NLS – GFP – FKBP _{1x} , NLS – GFP – FKBP _{3x} und NES – DsRed – FRB* in HeLa – Zellen	S. 26
Abb.3-7:	Subzelluläre Lokalisation von NLS – GFP – FKBP _{3x} und NES – DsRed – FRB* unter drei Bedingungen	S. 27
Abb.3-8:	F _{N/C} – Werte für NLS – GFP – FKBP _{3x} und NES – DsRed – FRB* unter AP21967–, LMB – und Cycloheximid – Zugabe	S. 28
Abb.3-9:	CLSM – Bilder des nukleären Exports von NLS – GFP – FKBP _{3x} zeitlich aufgelöst	S. 29
Abb.3-10:	Graphische Darstellung des F _{N/C} von NLS – GFP – FKBP _{3x} nach Zugabe von AP21967 in Abhängigkeit der Zeit	S. 29
Abb.3-11:	DAPI – Färbungen der Wildtyp – Fibroblasten und der RD – Fibroblasten	S. 30
Abb.3-12:	CLSM – Bilder der subzellulären Lokalisation von NLS – GFP – FKBP _{3x} und NES – DsRed – FRB* in Wildtyp– und RD – Fibroblasten mit/ohne AP21967 und mit/ohne LMB	S. 31
Abb.3-13:	F _{N/C} – Werte für NLS – GFP – FKBP _{3x} und NES – DsRed – FRB* in Wildtyp– und RD – Fibroblasten vor sowie 30 und 60 min nach Zugabe von AP21967 oder AP21967 + LMB	S. 33

Abb.3-14:	CLSM – Bilder und $F_{N/C}$ – Messungen zur subzellulären Lokalisation von GFP – Δ HR – Prälamin A, GFP – Δ HR – Lamin A und GFP – NLS	S. 33
Abb.3-15:	Normierte Daten von GFP – Δ HR – Prälamin A, GFP – Δ HR – Lamin A und GFP – NLS mit versus ohne Mevinolin	S. 34
Abb.3-16:	cDNA Sequenz des humanen Prälamin A	S. 35
Abb.3-17:	CLSM – Bilder von DsRed –Prälamin A/Prälamin A Δ 50/Prälamin A Δ 90 – exprimierenden HeLa – Zellen	S. 36
Abb.3-18:	FRAP – Analysen und CLSM – Bilder der Proteine DsRed – Prälamin A, DsRed – Prälamin A Δ 50 und DsRed – Prälamin A Δ 90 in HeLa – Zellen	S. 37
Abb.3-19:	FRAP – Analyse zum Diffusionsverhalten der Fusionsproteine DsRed – Prälamin A, DsRed – Prälamin A Δ 50 und DsRed – Prälamin A Δ 90 innerhalb der Kernlamina von HeLa – Zellen	S. 38
Abb.3-20:	GFP – β – Galaktosidase in HeLa – Zellen bei 37°C, 48°C und 55°C	S. 39
Abb.3-21:	$F_{N/C}$ – Werte für GFP – β – Galaktosidase bei verschiedenen Temperaturen in GFP – β – Galaktosidase alleine (rot) oder zusammen mit Prälamin A bzw. den Prälamin A Varianten exprimierenden HeLa – Zellen	S. 40

Danksagung

PD Dr. Stefan Hübner, der mir über die vier Jahre dieser Promotion hinweg ein fachlich und menschlich kompetenter Betreuer und Freund war und mich in allen Belangen, auch abseits dieser Arbeit, stets wohlwollend unterstützt hat.

Professor Dr. Detlev Drenckhahn, der mir durch die gesamte Zeit meines Studiums mit einem offenen Ohr und vielen guten Ratschlägen unterstützend zur Seite stand.

Dr. Wolfgang – Moritz Heupel, der trotz jungen Alters akademische Kompetenz und persönliche Integrität wie kein zweiter auf sich vereint und ohne den vieles nicht möglich gewesen wäre („see one, do one, teach one“).

Julia Hartmann und **Elisabeth Busch** für persönliche Unterstützung bei der Realisierung vieler Vorhaben und Ziele.

Tilman Kiel, der mir als Laborpartner und Freund in allen Belangen zu Hilfe kam.

Heike Arthen, Tanja Reimer, Lisa Berberich und **Nadja Niedermeier** für tatkräftige Unterstützung und lustige Stunden.

Jens Günther für Konstruktion und Bau der FRAP – Kammern.

Professor Dr. M. Wehnert für die Bereitstellung der humanen Fibroblasten – Kulturen.

Professor Dr. G. Harms und **Maik Friedrich** für die Unterstützung am Leica SP5.

Den **Steuerzahlern** der Bundesrepublik Deutschland indirekt für die BAFöG – Unterstützung während drei Jahren meines Studiums.

Der **Studienstiftung des Deutschen Volkes** für die Unterstützung während weiterer drei Jahre.

