

Charakterisierung von NUANCE, einem Protein
der α -Aktinin Superfamilie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Thorsten Libotte
aus Bonn

Köln 2004

Für meine Frau Thi Ha und Tochter Yasmin.

*„Im Wald, zwei Wege boten sich mir dar.
Und ich nahm den, der weniger betreten war.
Und das veränderte mein Leben.“*

aus dem Film: Der Club der toten Dichter

© 1989 Touchstone Pictures

INHALT

INHALT	1
Abkürzungen	5
1 EINLEITUNG	8
1.1 Das Cytoskelett.....	8
1.1.1 Das Aktin-Cytoskelett.....	9
1.1.2 Das Intermediärfilament-Cytoskelett	10
1.2 Aktin-bindende Proteine der α -Aktinin Superfamilie.....	10
1.3 Pathologische Auswirkungen von Mutationen von Proteinen der α -Aktinin Superfamilie	11
1.4 Der Zellkern	12
1.5 Proteine der Kernmembran.....	13
1.5.1 Lamin A/C	13
1.5.2 NUANCE, Enaptin und deren Isoformen.....	14
1.6 Pathologische Auswirkungen durch Mutationen von Proteinen der Kern-Lamina	15
1.7 Ziel der Arbeit.....	16
2 MATERIAL & METHODEN	17
2.1 Material	17
2.1.1 Labormaterial	17
2.1.2 Geräte	18
2.1.3 Kits	19
2.1.4 Puffer und andere Lösungen.....	19
2.1.5 Chemikalien und Reagenzien	21
2.1.6 Enzyme, Antikörper und Inhibitoren	24
2.1.7 Oligonukleotide	26
2.1.8 Vektoren.....	28
2.1.9 Plasmide	28
2.1.10 Bakterienstämme, Hefestämme, Zell-Linien	33
2.1.11 Kultur-Medien	34
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	36
2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	36

2.2.2	Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mikromaßstab gemäß Macherey-Nagel..	37
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
2.2.4	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	39
2.2.5	DNA-Agarosegelelektrophorese	39
2.2.6	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
2.2.7	<i>In vitro</i> -Rekombination von DNA.....	41
2.2.8	Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Säugetierzellen gemäß Qiagen.....	43
2.2.9	Reverse Transkriptase-Reaktion.....	43
2.2.10	RNA-Agarose-Gelelektrophorese	44
2.2.11	Northernblot, alkalischer Transfer (RNA-Kapillar-Transfer).....	44
2.2.12	Radioaktive Markierung von RNA-Proben	45
2.2.13	Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden	46
2.2.14	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	47
2.2.15	<i>E. coli</i> -Dauerkulturen	48
2.3	Proteinchemische und immunologische Techniken	48
2.3.1	Induktion und Extraktion rekombinanter Proteine	48
2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	49
2.3.3	Reinigung rekombinanter Proteine nach Qiagen (pQE-System).....	49
2.3.4	Reinigung rekombinanter Proteine mit dem pGEX-4T-1 Expressionssystem	50
2.3.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	51
2.3.6	Färbung von Polyacrylamidgelen.....	52
2.3.7	Übertragung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Westernblot)	53
2.3.8	Färbung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen	55
2.3.9	Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose.....	55
2.3.10	Entfernung der Antikörper nach Immundetektion	56
2.3.11	Aufreinigung von IgG aus Hybridoma-Kulturüberständen.....	56
2.3.12	Fraktionierung von COS7-Zellen in Membran-, Kern- und Cytosol-Fraktion..	57
2.3.13	Aktin-Bindungs Analyse.....	58
2.3.14	Aktin-Polymerisations Analyse („Actin polymerization assay“)	59
2.3.15	Proteinbindungsanalyse <i>in vitro</i>	60
2.4.	Zellbiologische Methoden	61
2.4.1	Kultur von Säugerzellen	61
2.4.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	62
2.4.3	Fluoreszenzmikroskopie	62

2.4.4	Transfektion von Säugetierzellen.....	63
2.5.	Methoden zum „Yeast Two-Hybrid“-System	64
2.5.1	Transformation von Hefezellen	64
2.5.2	β -Galaktosidasetest der Leu ⁺ /Trp ⁺ und His ⁺ Hefekolonien.....	65
3	ERGEBNISSE.....	66
3.1	Klonierung der humanen NUANCE cDNA	66
3.1.1	Vervollständigung der cDNA durch PCR.....	66
3.1.2	Vollständige Exon-Intron Organisation des humanen NUANCE Gens.....	67
3.1.2	Struktureller Aufbau des NUANCE Proteins	68
3.2	Nachweis einer großen NUANCE Isoform	70
3.2.1	Westernblotanalyse.....	70
3.2.2	Northernblotanalyse.....	71
3.3	Subzelluläre Lokalisierung des NUANCE Proteins	72
3.3.1	Lokalisierung von NUANCE in der Zellkern-Membran	72
3.3.2	Subzelluläre Fraktionierung	73
3.3.3	NUANCE ko-lokalisiert nicht mit Proteinen des Kernporenkomplexes.....	74
3.3.4	NUANCE ist auf der äußeren Zellkernmembran lokalisiert	75
3.3.5	NUANCE ko-lokalisiert mit einem Nucleoli-Marker	76
3.3.6	Umverteilung von NUANCE bei der Zell-Migration	77
3.4	NUANCE bindet F-Aktin <i>in vitro</i>	77
3.4.1	Aktin-Bindungs Analyse	77
3.4.2	Beeinflussung der Aktin-Polymerisation durch NUANCE.....	78
3.4.3	Bestimmung der Affinität der ABD von NUANCE zu F-Aktin.....	79
3.5	NUANCE bindet Lamin A/C <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	80
3.5.1	NUANCE und Lamin A interagieren miteinander im „Yeast Two-Hybrid“- System.....	80
3.5.2	Proteinbindungsanalyse von C-terminalen NUANCE-Fusionsproteinen mit COS7-Zell-Lysaten.....	81
3.5.3	Proteinbindungsanalyse von Lamin A und NUANCE auf einer Nitrocellulosemembran	82
3.5.4	Interaktion von Lamin C-Fusionsproteinen mit NUANCE.....	83
3.5.5	Dominant-negative Interferenz des Lamin A/C-Netzwerks in COS7-Zellen ...	85
3.5.6	Knockdown von Lamin A/C mit RNAi in A431-Zellen.....	86
3.6	Expression von C-terminalen GFP-Fusionsproteinen in Säugerzellen.....	88

3.6.1	Erzeugung C-terminaler GFP-Fusionsproteine	88
3.6.2	Lokalisation der GFP-Fusionsproteine GFP-Cterm1, GFP-Cterm3, GFP-Cterm5 und GFP-Cterm6 in COS7-Zellen.....	89
3.6.3	Verteilung von F-Aktin und Lamin A/C in GFP-Cterm1 transfizierten COS7-Zellen	91
3.6.4	Änderung der Zellkernmorphologie in GFP-Cterm1 transfizierten Zellen.....	92
3.6.5	Der Prolin-reiche Teil des C-Terminus ist wichtig für die Lokalisierung von NUANCE in der Kernmembran und der Interaktion mit dem Kernmembranprotein SUN1/UNC84	94
3.7	Der C-terminale Teil von NUANCE interagiert mit Emerin	95
3.7.1	Die dominant-negativen GFP-Fusionsproteine Cterm1 und Cterm6 beeinflussen die Verteilung von Emerin.....	95
3.7.2	RNAi von NUANCE beeinflusst die Verteilung von Emerin.....	96
3.8	Verteilung des NUANCE Proteins während des Zell-Zyklus	97
4	DISKUSSION.....	100
4.1	NUANCE, ein gigantisches Protein der α -Aktinin Superfamilie.....	100
4.2	Subzelluläre Charakterisierung von NUANCE	102
4.3	NUANCE bindet F-Aktin <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	103
4.4	NUANCE bindet Lamin A/C <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	104
4.5	C-terminale NUANCE-Fragmente verdrängen endogenes NUANCE aus der Zellkernmembran und binden an SUN1/UNC84	105
4.6	NUANCE interagiert mit Emerin.....	107
4.7	NUANCE während der Zellteilung.....	108
4.8	Struktur- und Interaktionsmodell von NUANCE	109
4.9	Perspektiven	110
5	ZUSAMMENFASSUNG	112
6	ABSTRACT	114
7	LITERATUR.....	115
	Erklärung	127
	Lebenslauf.....	128
	Danksagung	129

Abkürzungen

³² P	radioaktives Phosphoratom
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABD	Aktin-Bindungs-Domäne
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	zirka
cDNA	komplementäre DNA (durch reverse Transkription von mRNA)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
°C	Grad Celsius
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
d. h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DTT	Dithiothreitol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycolbis[2-aminoethylether]-N,N,N,N-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fa.	Firma

g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanin
GFP	grün fluoreszierendes Protein (engl.: „green fluorescent protein“)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
IgG	Immunglobulin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
Luminol	5-Amino-2,3-Dihydro-1,4-Phtalazindion
M	Molar
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

pAb	polyklonaler Antikörper
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	interferierende RNA
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur, reverse Transkriptase
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
siRNA	kleine interferierende RNA (engl.: „small interfering RNA“)
Std	Stunde(n)
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMD	Transmembran-Domäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Uracil, Unit(s)
ÜK	Übernachtskultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indazol- β -D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

1.1 Das Cytoskelett

Die komplexen Bewegungsmuster heutiger Zellen sind eine der beeindruckendsten Folgen der Evolution. Die ersten Zellen waren wahrscheinlich unbeweglich und die intrazelluläre Verteilung der Stoffwechselprodukte erfolgte mittels Diffusion. Erst mit der Entwicklung von größeren und spezialisierten Zellen erfolgte der Aufbau eines zellulären Struktur- und Bewegungsapparates, der für die Stabilität der Zelle, die gerichtete Verteilung der Moleküle innerhalb der Zelle und die aktive Bewegung der Zelle an andere Orte zuständig war und ist.

Zellen können Bewegungen grundsätzlich auf zwei verschiedene Weisen ausführen. Der erste Mechanismus wird durch Motorproteine, die Energie aus der Hydrolyse von ATP zu ADP und anorganischem Phosphat gewinnen, gewährleistet. Dabei werden Schreit- oder Gleitbewegung entlang organisierter Bündel von Mikrotubuli oder Mikrofilamenten ausgeführt. Der zweite Mechanismus, der vor allen Dingen bei Änderung der Zellgestalt zum Tragen kommt, erfolgt durch den ebenfalls energieabhängigen Prozess der Polymerisation und verschiedenartige Zusammenlagerungen von Mikrotubuli oder Mikrofilamenten.

Die meisten Zellen des Körpers sind jedoch nicht mobil, sondern an einen Ort innerhalb des Organismus gebunden. Auch diese Zellen sind zu beträchtlichen morphologischen Veränderungen fähig. Als Beispiele sind zu nennen: Die Kontraktion von Muskelzellen, die Ausstülpung von Axonen, die Trennung der Chromosomen und die Einschnürung des Zellkörpers bei der Mitose.

An allen Bewegungen der Zelle ist das Cytoskelett beteiligt. Das Cytoskelett ist ein Netz aus Fasern, welches den Innenraum aller eukaryotischen Zellen durchzieht. Es besteht aus drei Faser-Systemen, den Mikrotubuli mit einem Durchmesser von 24 nm, den Intermediärfilamenten mit einem Durchmesser von 10 nm und den Mikrofilamenten mit einem Durchmesser von 7 nm, und verleiht unter anderem der Zelle ihre Gestalt. Mikrotubuli und Mikrofilamente binden und hydrolysieren GTP bzw. ATP, Intermediärfilamenten konnte bisher keine Nukleotid-bindende Aktivität zugeordnet werden. Aktin, aus dem die Mikrofilamente aufgebaut sind, ist in allen eukaryotischen Zellen vorhanden (Poglazov, 1983).

1.1.1 Das Aktin-Cytoskelett

Aktin ist ein ATP-bindendes Protein, das entweder als Monomer (G-Aktin) oder als filamentäre Form (F-Aktin) vorliegen kann. Das monomere, globuläre, 43 kD schwere G-Aktin polymerisiert zu F-Aktin, und bildet Filamente von 7-9 nm Durchmesser. Die Bildung dieses helikalen Polymers erfolgt über nicht-kovalente Bindungen mit Hilfe von ATP/ADP und Ionen. Mikrofilamente können *in vitro* spontan oder in Anwesenheit mono- oder divalenter Kationen wie K^+ , Ca^{2+} oder Mg^{2+} polymerisieren (Engel et al., 1977; Rouayrenc & Travers, 1981). Dabei bewirkt die Bindung der Kationen an globuläres Aktin eine Konformationsänderung des Proteins, welche die Filamentbildung ermöglicht. Geschwindigkeitsbestimmend ist dabei die Bildung von Aktin-Trimeren, der Beginn der Nukleation. Die beiden Enden des F-Aktins weisen Unterschiede auf und man unterscheidet ein schnell wachsendes Plus-Ende sowie ein langsamer wachsendes Minus-Ende. Weiter entwickelte eukaryotischen Zellen besitzen mehrere Aktin-Gene, wobei Aktin in drei unterschiedlichen Isoformen (α , β , γ) auftritt. α -Aktine sind hauptsächlich in Muskelzellen, β - und γ -Aktine hauptsächlich in Nicht-Muskelzellen vorhanden (Whalen et al., 1976).

Die einzelnen Aktinfilamente bilden mit Hilfe Aktin-bindender Proteine ihrerseits wieder komplexe Strukturen wie Faserbündel, Netzwerke und gelartige Matrices. Färbungen des Aktins mittels Fluoreszenzfarbstoffen (z. B. mit TRITC- oder FITC-Phalloidin) zeigen ein dreidimensionales Aktin-Cytoskelett innerhalb der Zelle. In den Filopodien erkennt man parallel angeordnete Mikrofilamente, Lamellipodien weisen eher radial ausgebreitete Netzstrukturen auf, der Leitsaum supraplasmalemmale Aktinfaserbündel und die gesamte Zelle zeigt Stressfasern, die diese häufig komplett durchziehen (Anderson, 1977; Wood & Martin, 2002). Die dynamischen Strukturen der Lamellipodien in Keratinocyten bilden sich in einer Größenordnung von Minuten unter Mitwirkung des Aktin-Cytoskeletts und dessen Umbau (Libotte et al., 2001). Wichtige zusätzliche Faktoren für den Aufbau und die Anordnung von Aktinnetzwerken, die Längenregulation der Mikrofilamente, verschiedenartige Vernetzungsfunktionen oder auch Fragmentierungseigenschaften und Blockieren von Filamentenden werden von sogenannten Aktin-bindenden Proteinen reguliert. Der Arp2/3-Komplex initiiert die Nukleation von Aktin-Monomeren, Profilin und Thymosin β_4 binden Aktin-Monomere, Myosin II kann für eine Kontraktion des F-Aktinnetzwerks sorgen, Gelsolin fragmentiert einzelne Filamente und bleibt am Plus-

Ende als Capping-Protein gebunden und Filamin kann Aktinfilamente parallel ausrichten (Shizuta et al., 1976; Yin et al., 1981; dos Remedios et al., 2003).

1.1.2 Das Intermediärfilament-Cytoskelett

Die Proteine des Intermediärfilament-Systems lassen sich in fünf Familien unterteilen. Dazu gehören die sauren und basischen Keratine (Cytokeratine), Neurofilamente, Lamine und eine heterogene Familie, die aus Desmin, Vimentin, Peripherin und dem fibrillären sauren Gliaprotein besteht. Alle zu diesen fünf Familien gehörigen Proteine weisen gemeinsame Strukturmerkmale auf. Sie besitzen einen zentralen 40 nm langen α -helikalen Abschnitt, der von N-terminalen und C-terminalen Domänen flankiert wird und durch Bildung von Doppelhelizes aus den Monomeren Protofilamente bildet. Intermediärfilamente sind aus mehreren Protofilamenten zusammengesetzt und an der mechanischen Stabilisierung der Zelle beteiligt. Die meisten Intermediärfilamente sind cytoplasmatisch, aber Lamine finden sich ausschließlich im Zellkern, wo sie der Stabilisierung und Versteifung der Kernmembran dienen (Lammerding et al., 2004). Bisher konnten Intermediärfilamente ausschließlich in höheren Eukaryoten nachgewiesen werden, in Pflanzen, Hefe, *D. discoideum* und Protozoen sind sie nicht nachgewiesen (Hutchison, 2002).

1.2 Aktin-bindende Proteine der α -Aktinin Superfamilie

Proteine der α -Aktinin Superfamilie besitzen zwei Calponin-homologe Domänen, können Aktinfilamente in Bündeln oder Netzwerken organisieren und an die Plasmamembran binden (Matsudaira, 1994). Die modulare Organisation dieser Proteine erlaubt die Bildung von sehr langen Proteinen (Puius et al., 1998). Diese riesigen Proteine können in zwei Familien unterteilt werden, nämlich Plakine und Spektrine. Plakine bestehen aus drei strukturell unterschiedlichen Domänen, einer N-terminalen Plakin-Domäne, einer coiled-coil Region und einer C-terminalen Domäne, die aus Plektin-Domänen besteht (Ruhrberg & Watt, 1997). Spektrine sind durch Spektrin-Domänen gekennzeichnet (Pascual et al., 1997). Zu den großen Proteinen der Familie der Plakine gehören Plektin (Wiche, 1998) und Dystonin (Brown et al., 1995), zu den Spektrinen Dystrophin (Ahn & Kunkel, 1993), Utrophin (Tinsley et al., 1992) und Spektrin. Mit der Entdeckung der noch größeren Proteine BPAG1, MACF1

und ihrer Isoformen war die klare Trennung der zwei Familien nicht mehr gegeben, da diese beiden Proteine der Plakin-Familie auch Spektrin-Domänen besitzen (Sun et al., 2000; Fuchs & Karakesisoglou, 2001). Diese Proteine stellen vermutlich Proteine dar, die alle Komponenten des Cytoskeletts, Mikrofilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente, miteinander verbinden können. Sie werden auch Spektriplakine genannt (Roper et al., 2002).

Im Gegensatz zu den Plakinen und Spektrinen besitzt Calmin außer einer Aktin-Bindungs-Domäne vom α -Aktinin Typ keine dieser anderen charakteristischen Strukturen (Ishisaki et al., 2001). Calmin wird jedoch durch eine C-terminale Transmembran-Domäne in intrazellulären Membranen festgehalten und war bis vor kurzem das einzige Protein der α -Aktinin Superfamilie dieser Art.

Mit der Entdeckung von Enaptin (Braune, 2001) und NUANCE (Zhen, 2001) wurden zwei Proteine der α -Aktinin Superfamilie gefunden, die eine N-terminale Aktin-Bindungs-Domäne, eine zentrale coiled-coil Region mit Spektrin-Domänen und eine C-terminale Transmembran-Domäne besitzen (Zhang et al. 2001; Zhen et al., 2002). Interessanterweise sind diese beiden Proteine in einem ungewöhnlichen Zell-Kompartiment zu finden, nämlich in der Zellkernmembran.

1.3 Pathologische Auswirkungen von Mutationen von Proteinen der α -Aktinin Superfamilie

Bei Untersuchungen einer tödlichen, geschlechtsgebundenen, degenerativen Muskelerkrankung wurde das große Protein Dystrophin (426 kDa) entdeckt, das der Erkrankung ihren Namen gab, Duchennesche Muskeldystrophie (DMD). Ausgehend von dem allgemeinen Erscheinungsbild der Muskeldystrophie gibt es mittlerweile viele Varianten der DMD (Campbell, 1995). Dystrophin verbindet das kortikale Aktinnetzwerk direkt mit der extrazellulären Matrix (Carlson, 1998). Es verknüpft die Mikrofilamente zu einem Netzwerk und verankert dieses Netzwerk an einen Glykoprotein-Komplex an der inneren Seite der Plasmamembran. Dieser Komplex ist wiederum extrazellulär an Komponenten der extrazellulären Matrix (z. B. Laminin) gebunden. Dystrophin stabilisiert das kortikale Aktin-Cytoskelett der Muskelzelle, deren Membran der mechanischen Belastung mehrerer aufeinanderfolgender Kontraktionen nicht gewachsen wäre.

Spektrin bildet ein Membranskelett, das es den Erythrocyten ermöglicht, starken Scherkräften standzuhalten. Dabei vernetzt Ankyrin die Spektrin-Ketten

untereinander und das Protein 4.1 bindet das Spektrin durch Interaktion mit Glycophorin an die Innenseite der Erythrocytenmembran. Ein genetischer Defekt des Spektrins bei Mäusen führt zu einer hämolytischen Anämie. Die Erythrocyten sind morphologisch nicht mehr bikonkav, sondern kugelig, instabil und verlieren spontan Membranvesikel (Tse & Lux, 1999).

Die physiologische Relevanz des Plektins wurde an „Knockout“-Mäusen gezeigt. Diese Mäuse leiden an einer Abart der Muskeldystrophie, die mit einer Blasenbildung der Haut (*Epidermolysis bullosa simplex*) einhergeht (McLean et al., 1996; Smith et al., 1996). Diese Auswirkungen gehen offensichtlich auf die Fragilität der Zellen zurück, die mechanischem Stress ausgesetzt sind (Lionel et al., 2001). In Muskelzellen verbindet Plektin wahrscheinlich die Mikrofilamente mit den Intermediärfilamenten, in Keratinocyten die Intermediärfilamente mit der Plasmamembran (McLean et al., 1996; Smith et al., 1996).

Dystonia musculorum wird durch eine Mutation im BPAG1/Dystonin Gen hervorgerufen (Brown et al., 1995). Dabei spielt das Protein in der Myelinisierung von Schwannschen Zellen und deren Organisation des Cytoskeletts eine entscheidende Rolle (Bernier et al., 1998). In Muskelzellen interagiert Dystonin mit Mikrofilamenten und Intermediärfilamenten und ist wie Dystrophin für die Integrität und Aufrechterhaltung des Cytoskeletts zuständig (Dalpe et al., 1998; Dalpe et al., 1999). MACF1, ein Mitglied der Spektraplaklin Familie, ist mitverantwortlich für die Mikrotubuli-Dynamik sowie die Verbindung von Mikrotubuli mit Mikrofilamenten. Die homozygoten „Knockout“-Mäuse sterben früh in ihrer embryonalen Entwicklung (Kodama et al., 2003).

1.4 Der Zellkern

In der belebten Natur gibt es zwei Arten von Zellen: die prokaryotischen Zellen ohne Zellkern und die eukaryotischen Zellen mit Zellkern. Der Zellkern der eukaryotischen Zellen wird von einer äußeren und inneren Kernmembran begrenzt. Die äußere Kernmembran geht in das endoplasmatische Retikulum über, die Innenseite der Kernmembran ist mit Laminen ausgekleidet, die dem Zellkern Festigkeit verleihen und Teile der Kern-DNA binden können. Der Stoffaustausch des Nukleoplasmas mit dem Cytosol wird über sogenannte Kernporenkomplexe gewährleistet, die auch die innere mit der äußeren Kernmembran verbinden. Der Kern ist das Organell in dem

DNA-Replikation und Transkription stattfinden. Im Gegensatz dazu findet die Translation hauptsächlich im Cytoplasma statt (Burke & Ellenberg, 2002).

1.5 Proteine der Kernmembran

Die Proteine der Kernmembran werden in zwei Klassen eingeteilt, integrale Membranproteine und periphere Proteine der Kernmembran. Zu den peripheren Proteinen zählen die Lamine, Intermediärfilamente, die die Kernlamina bilden. Lamin B wird in allen somatischen Zellen exprimiert, dagegen fehlen Lamin A/C in undifferenzierten Zellen oder Krebszellen (Worman & Courvalin, 2000). Ein anderes peripheres Kernmembranprotein ist Otefin, das in der inneren Kernmembran von *D. melanogaster* identifiziert wurde (Padan et al., 1990).

Zu den integralen Proteinen der Kernmembran zählen der Lamin B-Rezeptor (LBR), die Lamina-assoziierten Polypeptide 1 (LAP1) und 2 (LAP2), Emerin, MAN1, UNC84, RFBP und Nurim (Worman & Courvalin, 2000; Georgatos, 2001; Mattout-Drubezki & Gruenbaum, 2003) sowie deren Isoformen. Dazu kommen die neu entdeckten Proteine Enaptin und NUANCE und ihre Isoformen (Zhang et al., 2001; Zhen et al., 2002). LAP1, LAP2, Emerin, MAN1, Enaptin und NUANCE besitzen eine Transmembran-Domäne, Nurim, UNC84 und RFBP besitzen mehrere (Worman & Courvalin, 2000; Zhang et al., 2001; Zhen et al., 2002). Die N-terminalen Bereiche von LAP1, LAP2, Emerin und MAN1 ragen in das Nucleoplasma und können mit Laminen und/oder Chromatin interagieren (Worman & Courvalin, 2000). Kürzlich wurde gezeigt, dass auch Enaptin mit Lamin A *in vitro* interagiert (Mislow, et al., 2002).

1.5.1 Lamin A/C

Lamine vom A-Typ werden in differenzierten Zellen exprimiert, besitzen einen neutralen isoelektrischen Punkt (IP) und ihre funktionale Einheit ist, wie bei allen Intermediärfilamenten, ein Dimer (Mattout-Drubezki & Gruenbaum, 2003). Dabei können fast alle Lamine untereinander heterologe Dimere bilden (Ye & Wormann, 1995). Im Gegensatz zu anderen Intermediärfilamenten besitzen die Lamine einen zusätzlichen 42 Aminosäuren langen Rest innerhalb der coiled-coil Region und ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) am C-Terminus (Herrmann & Foisner, 2003). Lamin A/C kann direkt an DNA binden wie *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden konnte

(Mattout-Drubezki & Gruenbaum, 2003). Zu Beginn des Zellzyklus werden Lamin A/C von CDK1 phosphoryliert. Dies führt zu ihrer Depolymerisation, Solubilisierung und Verteilung im Cytoplasma (Mattout-Drubezki & Gruenbaum, 2003).

Lamin A und C haben die ersten 566 Aminosäuren gemein, Lamin A unterscheidet sich durch 98 zusätzliche Aminosäuren, Lamin C durch 6 zusätzliche Aminosäuren (Lin & Worman, 1993). Lamin A entsteht aus Prä-Lamin A, von dem die letzten 18 Aminosäuren proteolytisch abgespalten werden, Lamin C entsteht durch alternatives Spleißen der Lamin A/C-RNA (Lin & Worman, 1993). Prä-Lamin A enthält, im Gegensatz zu Lamin C, eine sogenannte CAAX-Box, die farnesyliert wird und wichtig für die proteolytische Spaltung sowie die anschließende Lokalisation von Lamin A in der nukleären Membran ist (Lin & Worman, 1993). Die Lokalisation von Lamin C scheint hingegen von der Lokalisation und Interaktion von Lamin A abhängig zu sein (Hutchison, 2002).

1.5.2 NUANCE, Enaptin und deren Isoformen

NUANCE (Nesprin2) und Enaptin (Nesprin1) wurden 2001 zum ersten Mal von Zhen und Braune als Aktin-bindende Proteine vom α -Aktinin-Typ beschrieben (Zhen, 2001; Braune, 2001). Andere Forschergruppen untersuchten hauptsächlich C-terminale Isoformen von Enaptin und NUANCE (Mislow et al., 2001; Zhang et al., 2001; Mislow et al., 2002; Zhang et al., 2002). Sie zeigten, dass der konservierte C-terminale Bereich mit der Transmembran-Domäne für die Lokalisation in der inneren Kernmembran verantwortlich ist und Lamin A/C ko-immunpräzipitieren kann (Zhang et al., 2001; Mislow et al., 2001). Ein Jahr später wurde eine direkte Bindung von Nesprin1 α mit Lamin A und Emerin *in vitro* bestätigt (Mislow et al., 2002). Für Isoformen von Enaptin wurde gezeigt, dass diese mit sich selbst oder mit dem Golgi-Netzwerk interagieren können (Mislow et al., 2002; Gough et al., 2003). NUANCE und Enaptin besitzen orthologe Proteine in *D. discoideum* (Interaptin) in *D. melanogaster* (MSP300) und *C. elegans* (ANC1) (Zhang et al., 2002). Mutationen in ANC1 beeinflussen die Lokalisierung von Zellkernen und Mitochondrien in *C. elegans* (Starr & Han, 2002). ANC1 ist ein Protein, dessen eigene nukleäre Lokalisation von UNC84 und Ce-Lamin abhängt (Malone et al., 1999; Lee et al., 2002).

1.6 Pathologische Auswirkungen durch Mutationen von Proteinen der Kern-Lamina

Mittlerweile sind acht Krankheiten bekannt, die auf Mutationen innerhalb des Lamin A/C-Gens zurückzuführen sind (Novelli & D'Apice, 2003). Zu diesen sogenannten Laminopathien zählen die Emery-Dreifuss muskuläre Dystrophie, die autosomal rezessive axonale Charcot-Maire-Tooth Krankheit (AR-CMT2), die erweiterte Kardiomyopathie vom Typ 1A (CMD1A), die familiäre partielle Lipodystrophie vom Dunnigan Typ (FPLD), das Hutchinson-Gilford Progeria Syndrom (HGPS), die Muskuläre Dystrophie mit atrioventrikulären Leitungsstörungen (LGMD1B), die mandibuloacrale Dysplasie (MAD) und eine Lipoatrophie mit Insulin-resistenter Diabetes, Leukomelanodermis, Leber Steatosis und Kardiomyopathie (LIRLLC). EDMD ist eine muskuläre Dystrophie, die zuerst durch Mutationen im Emerin Gen gefunden wurde. Die Patienten zeigen schon während der frühen Kindheit kontrahierte Achilles- und Ellbogensehnen sowie Muskelschwäche. Herzrhythmusstörungen und Kardiomyopathie bis zum Herzstillstand können ebenfalls als Folgen auftreten (Mounkes et al., 2003). AR-CMT2 kann zu einer Demyelinisierung der Axone oder direkten Schädigung des Axons führen (Maidment & Ellis, 2002). Die FPLD ist durch einen Fettverlust in den Gliedern, aber einer vermehrten Fetteinlagerung im Schulter- und Nackenbereich gekennzeichnet (Mounkes et al., 2003). Beim HGPS altern die Patienten zehnmals so schnell wie normal (Novelli & D'Apice, 2003). Die Auswirkungen von LGMD1B sind anfangs nicht so verheerend wie bei der EDMD, allerdings treten im späteren Lebensverlauf Herzprobleme auf (Mounkes et al., 2003). Die MAD verursacht Osteolyse, Kiefer- und Nasenmissbildung, steife Gelenke sowie Hautschwund (Novelli & D'Apice, 2003).

Es existieren drei verschiedene Hypothesen, warum Veränderungen von Lamin A/C zu diesen Krankheiten führen können: die strukturelle, die regulatorische und die ER Hypothese (Novelli & D'Apice, 2003; Worman & Courvalin, 2004). Die erste Hypothese beruht auf einer Fragilität des Zellkerns durch eine Schwächung der strukturellen Integrität. Die zweite Hypothese beruht auf einer veränderten Transkription durch die Wechselwirkungen zwischen Laminen und Chromatin. Die dritte Hypothese beruht auf einer Anhäufung von Proteinen der inneren Zellkernmembran im ER und einer darauf folgenden Veränderung der Expression und posttranslationalen Verarbeitung von neusynthetisierten Proteinen im ER.

1.7 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die *in vivo* Funktionen von NUANCE sowie seine Verbindungen zum Aktin-Cytoskelett und Zellkern zu beschreiben. Dazu sollen die einzelnen funktionellen Domänen und speziell die Aktin-Bindungs-Domäne, die hoch konservierte Transmembran-Domäne, die Kernlokalisierungssignale und die Spektrin-Domänen *in vitro* und *in vivo* gezielt untersucht werden. Die *in vitro* Untersuchungen umschließen die weitere Charakterisierung der Aktin-Bindungs-Domäne in F-Aktin-Sedimentationsexperimenten. In den *in vivo* Untersuchungen sollen C-terminale Teilfragmente von NUANCE in Zell-Linien exprimiert werden und ihre Lokalisation und ihr Einfluss auf die Cytoskelett-Netzwerke getestet werden. Das Auffinden von Interaktionspartnern speziell an der Zellkernmembran erfolgt durch gerichteten Einsatz des „Yeast Two-Hybrid“-Systems. *In vitro* Untersuchungen sollen die Bindung von NUANCE und der Interaktionspartner charakterisieren. Um Funktionen des Proteins *in vivo* (Zellkultur) aufklären zu können, wird die Technik der Gensuppression durch RNAi angewandt werden. Durch darauf folgende Immunfluoreszenzaufnahmen können Veränderungen der Interaktionspartner von NUANCE sichtbar gemacht und eventuell mit Krankheiten in Verbindung gebracht werden. Der Einfluss auf den Prozess der Zellteilung wird in diesem Zusammenhang ebenfalls untersucht.

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Labormaterial

Chromatographiesäulen	BioRad
Corexröhrchen, 15 ml und 50 ml	Corex
Deckgläschen, Ø12 mm, Ø18 mm	Assistent
Einfrierröhrchen, 1 ml	Nunc
Einweg-Pipetten, 5 ml, 10 ml und 25 ml	Greiner
Einweg-Pipettenspitzen	Greiner
Elektroporationsküvette	BioRad
Gewebekulturflaschen, 25 cm ² , 75 cm ² und 175 cm ²	Nunc
Hybridisierungsröhrchen	Hybaid
Immobilon™ -P Transfermembran	Millipore
Kanülen	Terumo, Microlance
6-Loch Platte	Nunc
96-Loch Platte	Biozym
3MM Filterpapier	Whatman
Nitrocellulose Transfermembran	Schleicher und Schuell
Objektträger	Assistent
Parafilm	American National Can
Pasteurpipetten, 145 mm und 230 mm Brand	Volec
PCR Reaktionsgefäße, 0,2 ml	Biozym
Petrischalen, Typ 3003	Falcon
Petrischalen, Ø 90 mm, Ø 120 mm	Greiner
Pipetten 1-2 µl, 1-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl	Gilson
Plastikküvette	Greiner
Quarzküvette Infracil	Hellma
15 ml Röhrchen, Typ 2095	Falcon
50 ml Röhrchen, Typ 2070	Falcon
Reaktionsgefäße, 0,5 ml, 1,5 ml und 2,2 ml	Sarstedt
Röntgenfilm X-omat AR-5, 18 x 24 mm	Kodak
Spritzen, 1 ml	Terumo

Sterilfilter, 0,2 µm und 0,45 µm	Gelman Science
Zeta-Probe® Transfermembran	BioRad

2.1.2 Geräte

Blotkammer Trans-Blot SD	BioRad
Crosslinker UVC 500	Hoefer
Eismaschine	Ziegra
Elektroporationsgerät, Typ Gene-Pulser	BioRad
Fluorocan Ascent FI	Labsystems
Heizblock, Digi-Block® JR	neoLab
Hybridisierungsöfen	Hybaid
CO ₂ -Inkubator, BBD 6220, BB 6220	Heraeus Instruments
Inkubator, Mikrobiologischer	Heraeus Instruments
Inkubator, Hefe	LTE Scientific
Inkubator mit Schüttler	Kuehner
Kühlschränke	Liebherr
Kühlzentrifuge 1K15	Sigma
Laser Scan Mikroskop	Leica
Lichtmikroskop, IX70, CK2	Olympus
Lichtmikroskop, DMR	Leica
Magnetrührer, IKA Combimag RCT	Janke & Kunkel
Mikrowelle	Samsung
PCR-Maschine	MWG-Biotech
Peristaltikpumpe P1	Pharmacia Biotech
pH-Meter pH526	WTW
Plattengießmaschine	Technomat
Rotoren Typ JA-10	Beckman
Rotor Typ JA-25.50	Beckman
Rotor Typ SLA-1500	Sorvall
Rotor Typ SLA-3000	Sorvall
Rotor SS-34	Sorvall
Rotor TLA 45	Beckman
Rüttler Lab-Shaker	GFL
Spannungsverstärker Power Pac 200 und 300	Bio-Rad

Speedvac concentrator DNA 110	Savant
Spektralphotometer, Typ Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech
Sterilbank Hera Safe	Heraeus
Thermomixer	Eppendorf
Tiefkühlschränke/-truhen (-20 °C)	Liebherr, Siemens
Tiefstkühltruhen (-80 °C)	Nunc
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
Tischzentrifuge 1-15	Sigma
Ultraschallgerät UP200S	Dr. Hielscher GmbH
Ultrazentrifuge Optima TLX	Beckman
UV-Auflichtmonitor TFS-35 M	Faust
UV-Transilluminator	MWG-Biotech
Vortex Reax top	Heidolph
Waage SBA42	Scaltec
Wasserbäder	GFL
Zentrifuge Beckman Avanti J25	Beckman
Zentrifuge Sorvall RC 5C plus	Sorvall

2.1.3 Kits

Advantage [®] 2 PCR Kit	Clontech
ECL Advance [™] Western Blotting Detection Kit	Amersham
Mouse Mab Isotyping Test Kit	SANBIO
Nucleobond AX 100 und 500	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract 2 in 1	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plus	Macherey-Nagel
pGEM-Teasy-Vector System I	Promega
RNeasy [®] Mini Kit (50)	Qiagen
TA TOPO cloning [®] Kit	Invitrogen
ZERO blunt TOPO cloning [®] Kit	Invitrogen

2.1.4 Puffer und andere Lösungen

Puffer und Lösungen, die hier nicht verzeichnet sind, werden unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

10 x NCP-Puffer (pH 8,0):

12,1 g Tris/HCl, pH 8,0

87,0 g NaCl

5 ml Tween 20

2,0 g Natriumazid

mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.

PBG (pH 7,4):

0,5 % Rinderserumalbumin

0,1 % Fischgelatine

in 1 x PBS.

PBS (pH 7,2):

10 mM KCl

10 mM NaCl

16 mM Na₂HPO₄

32 mM KH₂PO₄

Phosphatpuffer:

s. Tabelle 2.1.

20 x SSC:

3 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat

TBS-Puffer (pH 7,8):

6,05 g Tris

0,58 g NaCl

0,203 g MgCl₂

mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.

TE-Puffer (pH 8,0):

10 mM Tris/HCl, pH 8,0

1 mM EDTA, pH 8,0

50 x Tris/Acetatpuffer (pH 8,0):

242 g Tris

57,1 ml 16,6 M Eisessig

100 ml 0,5 M EDTA-Lösung

mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.

Tabelle 2.1 Herstellung von Phosphatpuffer

pH	Volumen 1 M Na ₂ HPO ₄ [ml]	Volumen 1 M NaH ₂ PO ₄ [ml]
6,0	12,0	88,0
6,2	17,8	82,2
6,4	25,5	74,5
6,6	35,2	64,8
6,8	46,3	53,7
7,0	57,7	42,3
7,2	68,4	31,6
7,4	77,4	22,6
7,6	84,5	15,5
7,8	89,6	10,4
8,0	93,2	6,8

2.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid (Protogel: 30:0,8 AA/Bis-AA)	National Diagnostics
Agar-Agar (BRC-RG)	Biomatic
Agarose (Elektrophoresis Grade)	Biozym
5-Amino-2,3-Dihydro-1,4-Phtalazindion (Luminol)	Sigma
Aminosäuren	Sigma
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Adenosin-5'-triphosphat	Gerbu
Azeton	Riedel-de Haen
Bacto-Agar, Bacto-Pepton, Bacto-Trypton	Difco
5-Brom-4-chlor-3-indazol-β-D-galactopyranosid (X-gal)	Roth
Bromphenolblau, Natriumsalz	Serva
BSA (Rinderserumalbumin)	Roth
Calciumchlorid-dihydrat	Merck
Chloroform	Riedel-de Haen
Colchicin	Fluka
Coomassie-Brillant-Blau R250	Serva
p-Cumarsäure	Fluka
4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma

Digitonin	Sigma
Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Gerbu
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ethylenglycolbis[2-aminoethylether]- N,N,N,N-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma
Essigsäure 98-100 %	Riedel-de Haen
Ethanol	Riedel-de Haen
Ethidiumbromid	Sigma
FBS	Sigma
Formaldehyd	Sigma
Formamid	Merck
Glutathione Sepharose™ 4B	Amersham
Glycerin (Glycerol)	Riedel-de Haen
Glycin	Degussa
Harnstoff	Gerbu
Heringssperma	Roche
Imidazol	Merck
Isopropanol	Merck
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Loewe Biochemica
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure (HEPES)	Biomol
Kaliumacetat	Fluka
Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydrogentriphosphat	Merck
Lithiumacetat	Sigma
Magnesiumchlorid	Fluka
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Riedel-de Haen
Milchpulver	Humana Milchunion eG
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck

Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Fluka
Natriumcitrat	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat-dihydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Riedel-de Haen
Natriumthiosulfat-5-hydrat	Riedel-de Haen
Ni-NTA-Sepharose	Pharmacia
Nukleotide	Roche, Sigma
Oligofectamin™	Invitrogen
Phalloidin (FITC/TRITC)	Sigma
Phenol	Roth
Phosphorsäure	Merck
1,4-Piperazindiethansulfonsäure (PIPES)	Sigma
Polyethylenglycol 4000 (PEG)	Merck
Ponceau-S Konzentrat	Sigma
Protein-A-Sepharose CL-4B	Pharmacia Biotech
Salzsäure 32 %ig	Fluka
Sephadex G50	Pharmacia
Silbernitrat	Riedel-de Haen
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
Thrombin	Amersham
Trichloressigsäure	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Fluka, Riedel-de Haen
Triton X-100 (Octylphenylpoly(ethylenglykolether))	Merck
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan-monolaurat)	Roth
Wasserstoffperoxid (30 %ige Lösung)	Merck
Yeast Nitrogen Base	Difco
<u>Radioaktive Chemikalien:</u>	
Uridin 5'-[α - ³² P]-triphosphat 10 mCi/ml	Amersham

Alle übrigen nicht aufgeführten Chemikalien in p.A. Qualität wurden von den Firmen Fluka, Merck, Roth, Serva, Sigma, und Riedel-de Haen bezogen.

2.1.6 Enzyme, Antikörper und Inhibitoren

2.1.6.1 Enzyme für die Molekularbiologie

Alkalische Phosphatase	Roche
Desoxyribonuklease (DNase I)	Sigma
Lysozym	Sigma
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega
T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs
Pfu Turbo [®] -DNA-Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonukleasen und Puffer	Amersham, Boehringer, Bibco-BRL, Life Technologies, New England Biolabs, Roche
SP6 RNA-Polymerase	Roche
Ribonuklease A (RNase)	Sigma
T4-DNA-Ligase	Life Technologies
Taq-DNA-Polymerase	Roche

2.1.6.2 Antikörper

Primäre Antikörper:

anti-Annexin A7 Antikörper (mAk 203-80)	Selbert et al., 1995
anti- β -Tubulin Antikörper	nicht veröffentlicht
anti-Emerin Antikörper	Novacastra Laboratories
anti-GFP Antikörper (mAk K3-184-2)	Schreiner, 2000
anti-GST Antikörper	Amersham
anti-Lamin A/C Antikörper (JOL2)	Chemicon
anti-Lamin A/C Antikörper (polyklonal)	Cell Signaling Technology
anti-Lamin B Antikörper (LN43)	F. Ramaekers & J. Broers

anti-LAP2 β Antikörper	BD Biosciences
anti-NUANCE Antikörper (mAk K20-478-4)	Zhen et al., 2002
anti-NUANCE Antikörper (mAk K49-260-1)	diese Arbeit
anti-NUANCE Antikörper (pAb K1)	diese Arbeit
anti-Kernporenkomplex Antikörper (Nup358)	E. Coutavas & G. Blobel
anti-Nucleolus Antikörper (NO38/B23)	M. Schmidt-Zachmann
anti-Protein-Disulfid-Isomerase Antikörper (PDI)	M. Plomann

Sekundäre Antikörper:

Maus-anti-Ziege/Schaf-IgG, Peroxidase-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Kaninchen-IgG Alexa 568-Konjugat	Molecular Probes
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, FITC-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, TRITC-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, Alexa 488-Konjugat	Molecular Probes
Ziege-anti-Maus-IgG, Cy3-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, Cy5-Konjugat	Chemicon
Ziege-anti-Maus-IgG, FITC-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, Peroxidase-Konjugat	Sigma

Die Antikörper wurden gemäß der Angaben der Hersteller in PBS verdünnt. Hybridomaüberstände wurden unverdünnt eingesetzt.

2.1.6.3 Inhibitoren

Inhibitoren:

Benzamidin	Sigma
Complete-Mini [®] Inhibitoren Cocktail, EDTA-frei	Roche
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Merck
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Ribonuklease-Inhibitor (RNasin)	Promega

Antibiotika:

Ampicillin	Grünenthal
Kanamycin	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Biochrom

2.1.7 Oligonukleotide**2.1.7.1 DNA-Oligonukleotide (Sigma)**

CT 5'1 GAA TTC GAA GAA GAC TAC AGC TGC ACT
(EcoRI-Schnittstelle)

CT 3'1 GTC GAC CCC ATT GGT GTA CCT CAG CAT
(Sall-Schnittstelle)

CT 3'2 GTC GAC CTA TGT GGG GGG TGG CCC ATT
(Sall-Schnittstelle)

GAP 5'8 CTG CCA GGC AGA GAG AAG CAG GCC AC

GAP 5'9 GAG GAC TTA CGG AAT CAA TAC C

GAP 5'10 CAT CAG CGC TTC AGG AGG AGG CTG

GAP 3'3 CCA CAG CCC CTG AGC TTT CAG GAA CAT TC

GAP 3'4 CCT CTG TGG TGG CTG CCT C

GAP 3'5 CAT GGA CTG TCC AAG AAC TGT CTC C

GAP 3'9 GGT ATT GAT TCC GTA AGT CCT C

GAP 3'10 CAG CCT CCT CCT GAA GCG CTG ATG

HE 5'1 GAC CAT GAG CTC CAC AGG CTG CAA GCT C

HE 5'4 GTG GCA TGT TCC CGA CAG CCC TTC

HE 5'7 CTG AAG CAG AGC TGG AAA TG

HE 5'8 CGC TTT GAG GAC TGG CTC AAG TC

HE 3'1 GGG TTG TGG GAG TCG ATC CAG GAC ACT GG

HE 3'5 CAG CCA AGT AGT GAT GGC GCT GAT ATC AG

HE 3'6 CTT GAG AGG AAG GAG CGC T

KI2 5' GAT CCC CTT TGG ACA ATT ATC CTG CAT TCA AGA GA T GCA GGA
TAA TTG TCC AAA TTT TTG GAA A

(BglIII-Schnittstelle)

KI2 3' AGC TTT TCC AAA AAT TTG GAC AAT TAT CCT GCA TCT CTT GAA TGC
AGG ATA ATT GTC CAA AGG G

(HindIII-Schnittstelle)

LamA 5'1 GAA TTC ATG GAG ACC CCG TCC CAG CGG C

(EcoRI-Schnittstelle)

LamA 3'1 GTC GAC CAG GTC ACC CTC CTT CTT GGT ATT G

(Sall-Schnittstelle)

SR 5'1 GGA CCT GCA GCT GAC CAA CGT GGA GC

TL 5'1 GGA ATT CAC AGA AGG CGA GGA GGA GAC AG

(EcoRI-Schnittstelle)

TL 5'2 GGA ATT CGG CAG CCC TAC CCC TGC

(EcoRI-Schnittstelle)

TL 3'1 CGG GAT CCC TAT GTG GGG GGT GGC C

(BamHI-Schnittstelle)

TL 3'2 CGG GAT CCT AGC CCA TTG GTG TAC CTC AGC AT

(BamHI-Schnittstelle)

TL 3'3 CGG GAT CCT AGG AGG AGG GCA GCA GG

(BamHI-Schnittstelle)

2.1.7.2 RNA-Oligonukleotide (Dharmacon)

Lamin A/C spezifischer RNA-Dimer:

CUG GAC UUC CAG AAG AAC A dT dT

dT dT GAC CUG AAG GUC UUC UUG U

Die Ziel-Sequenz für RNAi von humanem Lamin A/C entspricht den Basen 608-626.

2.1.8 Vektoren

pCR [®] -2.1-TOPO [®]	Invitrogen
pCR [®] -BLUNT II-TOPO [®]	Invitrogen
pEGFP-C1,-C2	Clontech
pGADT7 (GAL4 AD)	Clontech
pGBKT7 (GAL4 DNA-BD)	Clontech
pGem-Teasy [®]	Promega
pGEX-4T-1	Amersham
pSUPER	OligoEngine

2.1.9 Plasmide

pEGFP-C1-ABD-CT

Dieses Plasmid entstand durch Verdau von pEGFP-C1 GFP-NUA^{Δ460-6641} mit der Restriktionsendonuklease PstI und anschließender Re-Ligation. Dieses Plasmid kodiert für ein GFP-Fusionsprotein mit den Aminosäuren 1-283 des N-terminalen Teils, der Aktin-Bindungs-Domäne, und den Aminosäuren 6.838-6.883 des C-terminalen Bereichs von NUANCE, der die Transmembran-Domäne enthält.

pEGFP-C1-Cterm5

Das PCR-Produkt der Primer TL 5'2 und TL 3'2 wurde erst in pGem-Teasy[®] ligiert. Danach wurde das Plasmid mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI geschnitten, um das Insert in den EcoRI-BamHI geschnittenen pEGFP-C1 Vektor zu ligieren. Das GFP-Fusionsprotein enthält die Aminosäuren 6.833-6.879 des C-terminalen Bereichs von NUANCE, der die Transmembran-Domäne und den lumenalen Teil ohne die letzten vier Aminosäuren enthält.

pEGFP-C1-Cterm6

Das PCR-Produkt der Primer TL 5'2 und TL 3'1 wurde erst in pGem-Teasy[®] ligiert. Danach wurde das Plasmid mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI geschnitten, um das Insert in den EcoRI-BamHI geschnittenen pEGFP-C1 Vektor zu ligieren. Das GFP-Fusionsprotein enthält die Aminosäuren 6.833-6.883 des C-terminalen Bereichs von NUANCE, der die Transmembran-Domäne und den lumenalen Teil enthält.

pEGFP-C1-LaminB1 Δ 2+ (Ellis et al., 1997; Vaughan et al., 2001)

Dieses Plasmid kodiert für ein GFP-Fusionsprotein einer dominant-negativen Lamin B-Form, welche die Aminosäuren 34-420 enthält und in der Lage ist, endogenes Lamin B sowie endogenes Lamin A/C umzuverteilen.

pEGFP-C1-NUA ^{Δ 460-6641} (Zhen et al., 2002)

Dieses Plasmid kodiert für ein GFP-Fusionsprotein mit den Aminosäuren 1-459 des N-terminalen Bereichs, der Aktin-Bindungs-Domäne sowie den ersten beiden Spektrin-Domänen, und den Aminosäuren 6.642-6.883 des C-terminalen Bereichs von NUANCE, der die Transmembran-Domäne sowie die zwei vorhergehenden Spektrin-Domänen enthält.

pEGFP-C2-Cterm1 (Zhen et al., 2002)

Dieses Plasmid kodiert für ein GFP-Fusionsprotein mit den Aminosäuren 6.570-6.883 des C-terminalen Bereichs von NUANCE, der die letzten zwei Spektrin-Domänen und die Transmembran-Domäne enthält.

pEGFP-C2-Cterm3

Das PCR-Produkt der Primer TL 5'1 und TL 3'1 wurde erst in pGem-Teasy[®] ligiert. Danach wurde das Plasmid mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI geschnitten, um das Insert in den EcoRI-BamHI geschnittenen pEGFP-C2 Vektor zu ligieren. Das GFP-Fusionsprotein enthält die Aminosäuren 6.806-6.883 des C-terminalen Bereichs von NUANCE, der die vollständige *Klarsicht*-Domäne enthält.

pEGFP-C2-SR

Das PCR-Produkt der Primer HE 5'8 und HE 3'6 wurde in pCR[®]-BLUNT II-TOPO[®] ligiert. Danach wurde das Plasmid mit der Restriktionsendonuklease EcoRI geschnitten, um das Insert in den EcoRI geschnittenen pEGFP-C2 Vektor zu ligieren. Eine Deletion von drei Basen im PCR-Produkt führte zu einem vorzeitigen Stopp-Kodon, so dass das GFP-Fusionsprotein die Aminosäuren 6.146-6.799 des C-terminalen Bereichs von NUANCE enthält, der die letzten vier Spektrin-Domänen repräsentiert.

pEGFP-C2-UNC84 (V.C. Padmakumar)

Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein des UNC84 Proteins (*M. musculus*). Das GFP-Fusionsprotein enthält die Aminosäuren 431-913 des C-terminalen Bereichs von UNC84.

pGAD24-Lamin A (Ye & Worman, 1995)

Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein mit der Aktivierungsdomäne für das „Yeast Two-Hybrid“-System, das den vollständigen Teil des humanen Lamin A beinhaltet.

pGADT7 GAD-SR

Das PCR-Produkt der Primer HE 5'8 und HE 3'6 wurde in pCR[®]-BLUNT II-TOPO[®] ligiert. Danach wurde das Plasmid mit der Restriktionsendonuklease EcoRI geschnitten, um das Insert in den EcoRI geschnittenen pGADT7 Vektor zu ligieren. Eine Deletion von drei Basen im PCR-Produkt führte zu einem vorzeitigen Stopp-Kodon, so dass das Fusionsprotein mit der Aktivierungsdomäne für das „Yeast Two-Hybrid“-System die Aminosäuren 6.146-6.799 des C-terminalen Bereichs von NUANCE enthält, der die letzten vier Spektrin-Domänen repräsentiert.

pGBKT7-SR

Das PCR-Produkt der Primer HE 5'8 und HE 3'6 wurde in pCR[®]-BLUNT II-TOPO[®] ligiert. Danach wurde das Plasmid mit der Restriktionsendonuklease EcoRI geschnitten, um das Insert in den EcoRI geschnittenen pGBKT7 Vektor zu ligieren. Eine Deletion von drei Basen im PCR-Produkt führte zu einem vorzeitigen Stopp-Kodon, so dass das Fusionsprotein mit der Bindungsdomäne für das „Yeast Two-Hybrid“-System die Aminosäuren 6.146-6.799 des C-terminalen Bereichs von NUANCE enthält, der die letzten vier Spektrin-Domänen repräsentiert.

pGBT9-Lamin A (Ye & Worman, 1995)

Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein mit der Bindungsdomäne für das „Yeast Two-Hybrid“-System, das den vollständigen Teil des humanen Lamin A enthält.

pGem-Teasy[®] GAP 5'8/GAP 3'3

Das PCR-Produkt der Primer GAP 5'8 und GAP 3'3 wurde in pGem-Teasy[®] ligiert. Das Plasmid diente dazu die NUANCE cDNA zu vervollständigen und enthält die Basenpaare 7.332-10.854.

pGem-Teasy[®] HE 5'1/HE 3'1

Das PCR-Produkt der Primer HE 5'1 und HE 3'1 wurde in pGem-Teasy[®] ligiert. Das Plasmid diente dazu die NUANCE cDNA zu vervollständigen und enthält die Basenpaare 15.006-16.586.

pGem-Teasy[®] HE 5'7/HE 3'6

Das PCR-Produkt der Primer HE 5'7 und HE 3'6 wurde in pGem-Teasy[®] ligiert. Das Plasmid diente dazu eine radioaktive Probe für eine Northernblotanalyse zu generieren und enthält die Basenpaare 19.918-20.698.

pGEX-4T-1-coil1B Δ (Dreuillet et al., 2002)

Dieses Plasmid kodiert für ein GST-Fusionsprotein mit den Aminosäuren 128-218 des humanen Lamin A/C.

pGEX-4T-1-coil2 (Dreuillet et al., 2002)

Dieses Plasmid kodiert für ein GST-Fusionsprotein mit den Aminosäuren 243-387 des humanen Lamin A/C.

pGEX-4T-1- Δ lamin C (Dreuillet et al., 2002)

Dieses Plasmid kodiert für ein GST-Fusionsprotein mit den Aminosäuren 128-572 des humanen Lamin C.

pGEX-4T-1-tail (Dreuillet et al., 2002)

Dieses Plasmid kodiert für ein GST-Fusionsprotein mit den Aminosäuren 384-566 des humanen Lamin A/C.

pGEX-4T-1-K1 (R. Müller)

Dieses Plasmid kodiert für ein GST-Fusionsprotein mit den Aminosäuren 6.546-6.796 von NUANCE und wurde ursprünglich dafür verwendet, einen monoklonalen

Antikörper gegen den C-terminalen Bereich von NUANCE herzustellen (mAk 49-260-1). Dieses Protein beinhaltet die letzten beiden Spektrin-Domänen von NUANCE.

pGEX-4T-1-N-LUM

Das PCR-Produkt der Primer CT 5'1 und CT 3'1 wurde in den pCR[®]-2.1-TOPO[®] ligiert. Danach wurde das Plasmid mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und Sall geschnitten, um das Insert in den EcoRI-Sall geschnittenen pGEX-4T-1 Vektor zu ligieren. Das GST-Fusionsprotein enthält die Aminosäuren 6.854-6.879, d.h. den lumenalen Teil, ohne die Aminosäurenabfolge PPPT von NUANCE.

pGEX-4T-1-E-LUMP

Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein mit dem lumenalen Bereich des Enaptin Proteins (*M. musculus*). Das GFP-Fusionsprotein enthält die letzten 30 Aminosäuren des C-terminalen Bereichs von Enaptin.

pGEX-4T-1-N-LUMP

Das PCR-Produkt der Primer CT 5'1 und CT 3'2 wurde in pCR[®]-2.1-TOPO[®] ligiert. Danach wurde das Plasmid mit den Restriktionsendonuklease EcoRI und Sall geschnitten, um das Insert in den EcoRI-Sall geschnittenen pGEX-4T-1 Vektor zu ligieren. Das GST-Fusionsprotein enthält die Aminosäuren 6.854-6.883, d.h. den lumenalen Teil von NUANCE.

pGEX-4T-1-N-term/Lamin A

Das PCR-Produkt der Primer LamA 5'1 und LamA 3'1 wurde in pCR[®]-2.1-TOPO[®] ligiert. Danach wurde das Plasmid mit den Restriktionsendonuklease EcoRI und Sall geschnitten, um das Insert in den EcoRI-Sall geschnittenen pGEX-4T-1 Vektor zu ligieren. Das GST-Fusionsprotein enthält die Aminosäuren 1-127 vom N-terminalen Bereich des humanen Lamin A/C.

pGEX-4T-1-SR

Das PCR-Produkt der Primer HE 5'8 und HE 3'6 wurde in pCR[®]-BLUNT II-TOPO[®] ligiert. Danach wurde das Plasmid mit der Restriktionsendonuklease EcoRI geschnitten, um das Insert in den EcoRI geschnittenen pGEX-4T-1 Vektor zu ligieren. Eine Deletion von drei Basen im PCR-Produkt führte zu einem vorzeitigen

Stopp-Kodon, so dass das GST-Fusionsprotein die Aminosäuren 6.146-6.799 des C-terminalen Bereichs von NUANCE enthält, der die letzten vier Spektrin-Domänen repräsentiert.

pQE-30-6xHis-ABD (Zhen et al., 2002)

Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein mit einem Sextett von Histidinen vor den Aminosäuren 1-296 des N-terminalen Bereichs, der Aktin-Bindungs-Domäne, von NUANCE.

pSUPER-K2

Die beiden Oligonukleotide KI2 5' und KI2 3' wurden mit Wasser soweit verdünnt, dass sie eine Konzentration von 0,05 µM aufwiesen. Dann erfolgte die Primer-Hybridisierung (Annealing) mit anschließender Phosphorylierung des Oligonukleotid-Dimers. Für die Ligation wurden 2 µl der hybridisierten und phosphorylierten Oligonukleotide eingesetzt. Die Ligation erfolgte mit einem mit BglIII und HindIII geschnittenen pSUPER-Vektor. Die Ziel-Sequenz für RNAi von NUANCE wird durch die Basen 595-613 repräsentiert und liegt in der Aktin-Bindungs-Domäne. Die Zielsequenz ist für humane Zellen, Maus-Zellen und COS7-Zellen identisch.

2.1.10 Bakterienstämme, Hefestämme, Zell-Linien

Bakterienstämme:

E. coli DH5α

Hanahan, 1983

E. coli M15

Rüther, 1982

Hefestämme:

Y190

Harper et al., 1993

Zell-Linien (Name, Organismus, Gewebe):

A431, *Homo sapiens*, Epidermis

BL60, *Homo sapiens*, Lymphom

COS7, *Cercopithecus aethiops*, Niere

HEK293, *Homo sapiens*, Niere

2.1.11 Kultur-Medien

2.1.11.1 Kultur-Medien für Bakterien

Die verwendeten Medien (pH 7,4) werden mit deionisiertem Wasser angesetzt und bei 120 °C autoklaviert. Antibiotika (100 mg/l Ampicillin oder 50 mg/l Kanamycin) werden nach Abkühlen des Mediums hinzugegeben. Für die Herstellung von Agarplatten werden den Medien 0,9 % (w/v) Agar-Agar und bei Bedarf 100 mg/l Ampicillin oder 50 mg/l Kanamycin zugesetzt. Für die Blau/Weiß-Selektion von *E. coli*-Transformanten werden die fertigen Platten jeweils mit 50 µl 0,1 M IPTG-Lösung und 20 µl X-gal-Lösung (2 % in DMF) bestrichen.

LB-Flüssig-Medium:

10 g Bacto-Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
auf 1 l mit Wasser auffüllen.

SOC-Medium:

20 g Bacto-Trypton
5 g Hefeextrakt
0,5 g NaCl
20 mM Glucose
auf 1 l mit Wasser auffüllen.

2.1.11.2 Kultur-Medien für Hefestämme

YEPD-Medium:

20 g Difco Pepton
10 g Hefeextrakt
auf 1 l mit Wasser auffüllen.

YEPD-Agarplatten:

20 g Difco Pepton
10 g Hefeextrakt

18 g Agar-Agar
auf 1 l mit Wasser auffüllen.

100 x Adeninlösung:

200 mg Adenin in 100 ml Wasser mit etwas HCl lösen und steril filtrieren.

100 x Tyrosinlösung:

300 mg Tyrosin in 100 ml Wasser mit etwas NaOH lösen und steril filtrieren.

100 x Histidinlösung:

200 mg Histidin in 100 ml Wasser lösen und steril filtrieren.

100 x Leucinlösung:

1000 mg Leucin in 100 ml Wasser lösen und steril filtrieren.

100 x Tryptophanlösung:

200 mg Tryptophan in 100 ml Wasser lösen und steril filtrieren.

100 x Uracillösung:

200 mg Uracil in 100 ml Wasser unter Erwärmen lösen und steril filtrieren.

1 M 3-Amino-1,2,4-triazollösung:

8,4 g 3-Amino-1,2,4-triazol in 100 ml Wasser lösen, einmal filtrieren und Filtrat steril filtrieren.

10 x Aminosäurelösung:

300 mg Isoleucin

1500 mg Valin

200 mg Arginin

300 mg Lysin

200 mg Methionin

500 mg Phenylalanin

2000 mg Threonin

mit Wasser auf 1 l auffüllen und steril filtrieren.

20 %ige Glucoselösung:

200 g Glucose mit 1 l Wasser auffüllen und steril filtrieren.

Tabelle 2.2 Zusammensetzung der Selektionsplatten für das „Yeast Two-Hybrid“-System

	SD/-Leu	SD/-Trp	SD/-Leu/-Trp	SD/-His/-Leu/-Trp/+3-AT
Yeast Nitrogen Base [g]	6,7	6,7	6,7	6,7
Agar-Agar [g]	20	20	20	20
Wasser [ml]	750	750	770	745
20 %ige Glucoselösung [ml]	100	100	100	100
10 x Aminosäurelösung [ml]	100	100	100	100
100 x Adenin [ml]	10	10	10	10
100 x Tyrosin [ml]	10	10	10	10
100 x Uracil [ml]	10	10	10	10
100 x Histidin [ml]	10	10	10	-
100 x Leucin [ml]	-	10	-	-
100 x Tryptophan [ml]	10	-	-	-
3-AT-Lösung [ml]	-	-	-	25

Die Zusammensetzung der Hefe-Selektionsmedien und Hefe-Agarplatten ist in Tabelle 2.2 angegeben. Nach der Zugabe von Yeast Nitrogen Base, Agar-Agar und Wasser wurde die Mischung zunächst autoklaviert. Die Zugabe der restlichen Stocklösungen erfolgte nach Abkühlung auf 55 °C.

2.1.11.3 Kultur-Medien für Säugetierzellen

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, D5796)	Sigma
Opti-MEM	Gibco
RPMI-Medium	Gibco

Für die Weiterführung der Zellkultur-Linien A431, COS7 und HEK293 wurde DME Medium mit 10 % FBS, 2 mM Glutamin, 2 mM Penicillin und 2 mM Streptomycin benutzt. Für die Weiterführung der Zellkultur-Linie BL60 wurde RPMI Medium mit 10 % FBS, 2 mM Glutamin, 2 mM Penicillin und 2 mM Streptomycin benutzt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* ist eine abgewandelte Form der kommerziellen Aufreinigung gemäß Machery-Nagel (2.2.2). Hierzu werden 1 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt, abzentrifugiert. Das Pellet wird dabei in 150 µl der Lösung Puffer I (15 mM

Tris, pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert. Danach werden 150 µl der Lösung Puffer II (0,2 N NaOH, 1 % SDS) hinzugegeben, drei- bis fünfmal geschüttelt und 5 min bei RT inkubiert. Infolge der SDS- und Alkalibehandlung werden bei diesem Reaktionsschritt die Zellmembranen zerstört. Nach Zugabe von 150 µl Lösung Puffer III (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) werden Proteine, chromosomale DNA und andere Zellbestandteile gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 18.000 x g wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß mit 1 ml Ethanol (96 %) überführt. Die durch Ethanolzugabe gefällte Plasmid-DNA wird für 10 min bei 18.000 x g pelletiert. Nach einem Waschschrift mit Ethanol (70 %) wird die Plasmid-DNA im „Speedvac concentrator“ getrocknet, in 10-20 µl Wasser aufgelöst und mit 2 µl RNase (10 mg/ml) behandelt.

2.2.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mikromaßstab gemäß Macherey-Nagel

Um bis zu 40 µg saubere Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen zu gewinnen (z.B. Proben für eine Sequenzanalyse), wurde das „NucleoSpin Plus“-Kit von der Firma Macherey-Nagel benutzt. Hierzu wurden 5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt, abzentrifugiert. Das Pellet wird dabei in 250 µl der Lösung A1, die RNase enthält, resuspendiert. Danach werden 250 µl der Lösung A2 hinzugegeben, drei- bis fünfmal geschüttelt und 5 min bei RT inkubiert. Infolge der SDS- und Alkalibehandlung werden bei diesem Reaktionsschritt die Zellmembranen zerstört und die RNA durch die RNase verdaut. Nach Zugabe von 300 µl Lösung A3 wird die Reaktionsmischung 5 min auf Eis inkubiert. Dadurch werden Proteine, chromosomale DNA und andere Zellbestandteile gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C wird der Überstand auf eine NucleoSpin-Säule gegeben. Es wird 1 min bei 18.000 x g zentrifugiert, wobei die Plasmid-DNA an das Säulenmaterial bindet. Anschließend wird die Säule mit 500 µl Puffer AW und dann mit 600 µl Puffer A4 gewaschen. Danach wird noch einmal zentrifugiert, um Ethanolreste des Puffers A4 zu entfernen. Zur Elution werden schließlich 30 µl Lösung AE auf die Säule gegeben, 1 min bei RT inkubiert und dann 1 min bei 18.000 x g abzentrifugiert. Für größere Mengen sauberer Plasmid-DNA wurde das „NucleoBond AX 100-Kit“ benutzt. Dieses Kit arbeitet nach dem gleichen Prinzip, ermöglicht aber die Aufreinigung von bis zu 100 µg Plasmid-DNA aus einer 30 ml Bakterienübernachtskultur.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR kann bei Wahl geeigneter Oligonukleotide für eine *in vitro*-Amplifikation von DNA-Abschnitten verwendet werden (Saiki et al., 1985). Dazu werden eine doppelsträngige DNA-Vorlage (template-DNA) und zwei begrenzende Oligonukleotide (Primer) einer kontinuierlich aufeinanderfolgenden Reihe von Denaturierungen, Primer-Hybridisierungen (Annealing) und DNA-Polymerisierungen (Elongation) in Anwesenheit von Desoxyribonukleotiden und thermostabiler *Taq*-DNA-Polymerase (Chien et al., 1976) ausgesetzt. Die Oligonukleotide haben unter Umständen an den Enden einen Überhang von nicht hybridisierenden Nukleotiden, mit deren Hilfe z. B. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen, eingeführt werden können. Um die template-DNA zu Beginn der Reaktion vollständig zu denaturieren, wurde eine initiale Denaturierung von 5 min bei 94 °C gewählt. Für den letzten Zyklus wurde eine Elongationsdauer von 10 min benutzt, um vollständig polymerisierte Endprodukte zu erhalten. Die Annealing-Temperatur (T_H) eines bestimmten Oligonukleotids wurde anhand seiner Basenzusammensetzung folgendermaßen abgeschätzt (Suggs et al., 1981): $T_H = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T) - 2$.

Mit einem programmierbaren „Thermocycler“ werden die Zyklen automatisch gesteuert. Die Reaktionsparameter (Temperaturen, Zeiten) wurden den jeweiligen Bedingungen angepasst.

Standard-PCR-Programm:

I. Initiale Denaturierung: 94 °C, 5 min

II. Temperaturzyklus (25-35 Zyklen):

- Denaturierung (94 °C, 1 min)
- Primer-Annealing (x °C, abhängig vom Primer-Paar, 30 sek)
- Primer-Extension/DNA-Elongation (72 °C, y sek, abhängig von der zu amplifizierenden Länge der DNA)

III. Terminale Verlängerung: 72 °C, 10 min

IV. Kühlung auf 4 °C

Reaktionsansatz:

x µl template-DNA (100 ng cDNA, 100 ng Plasmid-DNA)

1 µl Oligonukleotid A (10 pmol/ml)

1 µl Oligonukleotid B (10 pmol/ml)
1 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM)
5 µl 10 x PCR -Puffer (100 mM Tris/HCl (pH 8,3); 500 mM KCl; 20 mM MgCl₂)
1 µl *Taq*-Polymerase (3-4 U)
mit Wasser auf 50 µl auffüllen.

2.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von DNA und RNA in wässriger Lösung wurde spektralphotometrisch bei 260 bzw. 280 nm mit Wasser als Referenz bestimmt. Eine OD von 1 entspricht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA, bzw. 40 µg/ml RNA. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ergibt sich folgende Beziehung:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = E_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Grad der Verunreinigung mit Proteinen und Phenolen lässt sich mit Hilfe des Quotienten OD_{260}/OD_{280} abschätzen. Beträgt der Wert des Quotienten 1,8 oder mehr, kann die DNA- bzw. RNA-haltige Lösung als rein angesehen werden. Zusätzlich war es möglich die jeweiligen Konzentrationen von Plasmid-DNA und RNA in einer Agarose-Gelelektrophorese abzuschätzen. Sie wurden durch Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und ermöglichten so eine Abschätzung der Menge durch Vergleich mit bekannten Konzentrationen. Isolierte RNA wird bei -80 °C, Plasmid-DNA wird bei -20 °C gelagert.

2.2.5 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten erfolgt aufgrund der vom Molekulargewicht abhängigen Laufgeschwindigkeit in einer Agarosegel-Matrix. Je nach Verwendung und Auftrennungsziel wurden 0,7-2,5 %ige Gele in TAE-Puffer verwendet. Zur Herstellung eines Agarosegels wurde die Agarose im Puffer aufgekocht, mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,1 µg/ml) und nach Abkühlung auf einen Gelträger verschiedener Größe (7,5 cm x 8 cm, 11,5 cm x 14 cm, 12,5 cm x 19 cm) mit Taschenformer gegossen. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und in die Probenaschen geladen. Die

DNA-Auftrennung erfolgte in TAE-Puffer horizontal in Flachbett-Gelapparaturen. In Abhängigkeit von der Gelgröße, Laufdauer und Auftrennungseffizienz wurde eine Spannung von 20 V bis 100 V angelegt. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde die DNA mit einem Transilluminator ($\lambda = 302 \text{ nm}$) sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte durch Fotografieren unter UV-Licht mit einem Videodokumentationsgerät. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte jeweils im Vergleich mit einem geeigneten Größenstandard.

5 x Probenpuffer:

30 % Glycerol

0,25 % Bromphenolblau

in TE-Puffer.

1 kb DNA Leiter (Life Technologies):

12216; 11198; 10180; 9162; 8144; 7126; 6108; 5090; 4072; 3054; 2036; 1636; 1018; 506; 396; 344; 298; 220; 201; 154; 134; 75 bp

2.2.6 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zunächst wurde die mit Restriktionsendonukleasen behandelte DNA im TAE-Agarosegel ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die zu isolierende Bande wurde unter UV-Licht aus dem Agarosegel geschnitten. Das Gelstück wurde in ein 0,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt, dessen Boden vorher mit einer Kanüle durchstoßen und mit silanisierter Glaswolle gefüllt wurde. Dieses Gefäß wurde in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gestellt, in dem durch Zentrifugation für 8 min bei 5.000 x g das DNA-Eluat des Gelstücks aufgefangen wurde. Die so eluierte DNA wurde dann mit dem zweifachen Volumen 96 %igen Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,0) bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt (2 Std), 10 min bei 16.000 x g und $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ pelletiert. Abschließend wurde die DNA mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 10–20 μl TE-Puffer aufgenommen. Alternativ erfolgte die Elution mit dem „NucleoSpin Extract 2 in 1“-Kit der Firma Macherey-Nagel. Dabei wurde die Bande des gewünschten DNA-Fragments mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorfggefäß gegeben. Zu je 100 mg Agarosegel wurden jeweils 300 μl Puffer NT 1 pipettiert. Die Probe wurde 10 min auf $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt, zwischendurch geschüttelt und anschließend auf eine NucleoSpin-Säule

geladen. Diese wurde für 1 min bei 6.000 x g abzentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es folgten 2 Waschschrte mit je 600 µl und 200 µl Puffer NT3 und Zentrifugation für 1 min bei 10.000 x g. Nach erneuter Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit ohne Zugabe des Puffers NT3 wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt. Anschließend erfolgte die Elution mit 30 µl Puffer NE.

2.2.7 *In vitro*-Rekombination von DNA

2.2.7.1 *Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen*

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte jeweils in dem vom Hersteller angegebenen Puffersystem und unter den empfohlenen Temperaturbedingungen. Pro µg DNA wurden 2 bis 10 U eingesetzt. Plasmid-DNA wurde 2 bis 4 Std verdaut. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mit Hilfe eines Agarosegels kontrolliert.

2.2.7.2 *Dephosphorylierung der 5'-Enden von linearisierten Vektoren*

Zur Verhinderung der Re-Ligation eines linearisierten Vektors, der nur mit einer Restriktionsendonuklease verdaut wurde, wurden die 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase entfernt. Dafür wurden in einem 20 µl Ansatz 1-2 µg linearisierte Vektor-DNA mit 1 U alkalischer Phosphatase in CIP-Puffer 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Dephosphorylierungsreaktion wurde durch zehnmünütige Inkubation bei 65 °C gestoppt.

10 x CIP-Puffer:

0,5 M Tris/HCl (pH 8,5)

10 mM MgCl₂

2.2.7.3 *Ligation von Vektor- und DNA-Fragmenten*

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Ligation von DNA-Fragmenten und entsprechend hydrolysierter Vektor-DNA durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden. Im Falle kohäsiver Enden wurde das zu klonierende Fragment in mindestens fünffachem molarem Überschuss zum Vektor eingesetzt. Dafür wurden in einem 10 µl Ansatz 1-2 µg Gesamt-DNA mit 1 U T4-DNA-Ligase in Ligations-Puffer in der Regel über Nacht bei ca. 8 °C inkubiert.

10 x Ligations-Puffer:

660 mM Tris/HCl (pH 7,5)

50 mM MgCl₂

50 mM DTT

10 mM ATP

2.2.7.4 Primer-Hybridisierung

Die beiden Oligonukleotide wurden mit Wasser soweit verdünnt, dass sie eine Konzentration von 0,05 µM aufwiesen. Der Ansatz wurde in der PCR-Maschine für 4 min bei 95 °C und dann 10 min bei 70 °C inkubiert. Danach wurde der Reaktionsansatz langsam auf 4 °C mit einer Geschwindigkeit von 0,1 °C/sek abgekühlt.

Primer-Hybridisierung (Annealing):

1 µl Oligonukleotid 1

1 µl Oligonukleotid 2

48 µl Annealing-Puffer

Annealing-Puffer:

100 mM KAc

30 mM HEPES/KOH (pH 7,4)

2 mM MgAc

2.2.7.5 Phosphorylierung der 5'-Enden von Primer-Dimeren

Der Reaktionsansatz der beiden hybridisierten Primer wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Polynukleotidkinase wurde anschließend bei 70 °C (10 min) inaktiviert.

Reaktionsansatz:

2 µl der Primer-Hybridisierungs-Reaktion

1 µl T4 Polynukleotidkinase

1 µl 1 mM ATP

1 µl T4 Polynukleotidkinase-Puffer

5 µl Wasser

2.2.8 Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Säugetierzellen gemäß Qiagen

Zum Schutz vor RNasen wurden während der Arbeit stets Handschuhe getragen. Außerdem wurden nur sterile Plastikgefäße und Pipetten sowie autoklavierte Lösungen verwendet. Um bis zu 35 µg saubere Gesamt-RNA aus Säugetierzellen zu gewinnen, wird das von der Firma Qiagen angebotene „RNeasy“-Kit benutzt. Für eine Northernblotanalyse wurden die Zellen einer 70-80 %ig konfluenten Gewebekulturflasche geerntet. Das Zell-Pellet wurde in 600 µl RLT-Puffer, der Zellen aufschließt und gleichzeitig RNasen inhibiert, resuspendiert. Das Zell-Lysat wurde daraufhin mit einer im Durchmesser 0,9 mm großen Nadel und einer 1 ml Einwegspritze homogenisiert. Nach Zugabe von 600 µl 70 %igem Ethanol, wurde die Lösung auf die RNeasy-Säulen gegeben und bei 8.000 x g für 15 sek zentrifugiert. Nach mehrmaligen Waschschrritten (700 µl RW1-Puffer und 2 x 500 µl RPE-Puffer) wurde die Säule durch zweiminütige Zentrifugation bei 8.000 x g getrocknet. Die Elution der Gesamt-RNA erfolgte mit 30-50 µl RNase-freiem Wasser bei 8.000 x g für 1 min. Die RNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.9 Reverse Transkriptase-Reaktion

Die reverse Transkriptase (RT) ist ein Enzym, das RNA in DNA umschreiben kann. In dieser Arbeit wurde für die RT-Reaktion Gesamt-RNA eingesetzt. Für die Umschreibung in cDNA wurden randomisierte Hexanukleotide (p(dN)₆) gewählt, die während der Reaktion an beliebigen Stellen der RNA binden und so die Synthese vieler cDNA-Stränge ermöglichen. Für die RT-Reaktion wurden 500-1.000 ng Gesamt-RNA eingesetzt und nach dem folgenden Protokoll in cDNA umgeschrieben:

0,5 µl 10 mM dNTP-Mix

1 µl 50 µM p(dN)₆

0,5 µl M-MLV-Transkriptase

2 µl 5 x RT-Puffer

0,5 µl RNasin (40 U/µl)

500-1.000 ng Gesamt-RNA

mit Wasser auf 10 µl auffüllen.

1 Std Inkubation bei 37 °C.

2.2.10 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Vor jeder RNA-Gelelektrophorese wurden die Gelträger, Taschenformer sowie die Gelkammern mit 1 %igem SDS inkubiert. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurden 0,7 %ige Agarosegele verwendet, die durch Erhitzen von 1,4 g Agarose in 20 ml 10 x MOPS-Puffer (pH 8,0) und 148 ml DEPC-Wasser sowie durch Zugabe von 32 ml 37 %iger Formaldehydlösung nach Abkühlung auf 60 °C, hergestellt wurden. Es wurden 20 µg RNA je Spur aufgetrennt. Die RNA wurde vorher durch Zugabe von 1/3 Volumen RNA-Puffer und fünf Minuten Inkubation bei 68 °C denaturiert. Nach Zugabe von RNA-Ladungspuffer wurde die RNA in die Probenaschen geladen. Die RNA-Auftrennung erfolgte horizontal in Flachbett-Gelapparaturen mit MOPS-Laufpuffer (pH 7,0) und einer Spannung von 20 V über Nacht. Solche aufgetrennte RNA wurden zum Transfer auf Membranen verwendet.

10 x MOPS-Puffer (pH 7,0/8,0):

41,9 g MOPS

16,7 ml 3 M Natriumacetatlösung

20 ml 0,5 M EDTA-Lösung

mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.

Proben-Denaturierungs-Puffer:

50 µl 10 x MOPS (pH 8,0)

83 µl Formaldehyd

250 µl Formamid

RNA-Ladungspuffer:

50 % (w/v) Saccharose

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

2.2.11 Northernblot, alkalischer Transfer (RNA-Kapillar-Transfer)

Durch eine Northernblotanalyse lässt sich das RNA-Produkt eines Gens nachweisen. Unter dieser Methode versteht man den Transfer von RNA auf eine Nylonmembran, die zuvor nach ihrer Größe in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt wurde. Nach Beendigung des Gellaufs wurde das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel zur

späteren Größenbestimmung der Signale mit einem Lineal unter UV-Licht fotografiert. Der Transfer der RNA erfolgte mittels Kapillarkräften über einen Zeitraum von ca. 8 Std. Dafür wurde das Gel auf eine Brücke aus zwei Lagen 3MM Whatman Papier gelegt, die in Kontakt mit dem Transfer-Puffer (50 mM NaOH) Reservoir stand. Das Gel wurde mit einer zunächst mit Wasser angefeuchteten Nylonmembran (Zeta-Probe[®]), zwei weiteren Lagen 3MM Papier und einem ca. 10 cm hohen Stapel Saugpapier überschichtet und zur Verstärkung der kapillaren Sogwirkung mit einem Gewicht beschwert. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran kurz in 2 x SSC-Puffer gewaschen und 2 x im UV-Quervernetzer mit UV-Licht bestrahlt. Bis zur Hybridisierung wurden die Blots trocken bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.12 Radioaktive Markierung von RNA-Proben

Die zur Markierung verwendete RNA wird aus linearisierten Plasmiden und anschließender Transkription gewonnen. Zuvor muss die Plasmid DNA sauber, d.h. ohne RNasen und Proteine, aufgereinigt werden. Dazu wird die Plasmid DNA gemäß Machery und Nagel (2.2.2) aufgereinigt und in 80 µl Wasser resuspendiert. Die Elution wird mit 10 µl des 10 x Proteinase K-Puffers, 10 µl 5 %iger SDS-Lösung sowie Proteinase K (100 µg/ml Endkonzentration) versetzt. Dieser Reaktionsansatz wird für 1 Std bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Phenol und 100 µl Chloroform wird die Lösung kräftig gemischt und bei 10.000 x g für 5 min abzentrifugiert. Danach wird die obere Phase des Gemisches abgenommen und die Plasmid DNA in dem doppelten Volumen 96 %igen Ethanol gefällt. Nach nochmaligem Waschen mit 70 %igem Ethanol wird die Plasmid-DNA in RNase-freiem TE-Puffer gelöst. Die Konzentration der DNA sollte nach diesem Schritt ungefähr 1 µg/µl betragen. Danach wird das Plasmid mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten, die einmal im Vektor direkt vor dem Insert schneidet und einen 5'-Überhang generiert. Das Insert sollte eine Länge von 700 Basenpaaren besitzen und so kloniert worden sein, dass der kodierende Strang mit der korrekten Orientierung vor dem SP6 Promotor liegt. Das linearisierte Plasmid wird wiederum mit einem Phenol/Chloroform Gemisch behandelt und in RNase-freiem Wasser gelöst. Der Reaktionsansatz für die radioaktive Markierung mit Uridin 5'-[α-³²P]-triphosphat wird für 90 min bei 37 °C inkubiert. Nach zehnmütiger Inkubation bei 65 °C wird 1 µl RNase-freie DNase I (1 µg/µl) dem Reaktionsgemisch hinzugegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem DNA-Verdau wird die

RNA bei 95 °C für 5 min denaturiert. Nicht eingebaute Nukleotide werden danach durch Zentrifugation (3.000 UpM, 2 min) über eine 1 ml Sephadex G-50-Säule in TE-Puffer abgetrennt.

Sephadex G-50-Säule:

30 g Sephadex G-50 werden in 250 ml TE-Puffer (pH 8,0) gegeben. Am nächsten Tag wird der Überstand dekantiert und durch das gleiche Volumen frischen TE-Puffers ersetzt. Die Suspension wird autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt. Zur Präparation einer Chromatographiesäule wird Sephadex G-50 in eine 1 ml Einwegspritze, deren Auslassöffnung mit einem Pfropfen silanisierter Glaswolle verschlossen wurde, gegeben. Durch zweiminütige Zentrifugation bei 3.000 UpM wird der Puffer abgetrennt und die Säule fest gepackt. Insgesamt verwendet man so viel Sephadex G-50, bis das Volumen der gepackten Säule 0,9 ml beträgt. Die Säule wird sofort verwendet.

10 x Proteinase K-Puffer:

500 mM NaCl

100 mM Tris/HCl (pH 8,0)

50 mM EDTA (pH 8,0)

Reaktionsansatz:

8 µl Plasmid (0,5 µg in RNase-freiem Wasser)

2 µl rNTPs (5 mM)

2 µl 10 x Transkriptions-Puffer

5 µl Uridin 5'-[α-³²P]-triphosphat

1 µl RNase-Inhibitor (10 U)

2 µl SP6 RNA-Polymerase (10 U)

2.2.13 Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden

Die Nylonmembran wurde in einer Hybridisierungsröhre für 1 Std mit 10-20 ml Hybridisierungs-Puffer bei 65 °C vorhybridisiert. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Probe zur Hybridisierungslösung erfolgte die Hybridisierung über Nacht bei 65 °C. Danach wurde die radioaktive Probe abgegossen und die Membran zweimal für 30-60 min bei 65 °C mit Waschpuffer gewaschen. Nach dem Trocknen

wurde die Membran in Polyethylen-Folie eingepackt und ein Röntgenfilm in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie bei -80°C exponiert.

Hybridisierungs-Puffer:

0.25 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2)
7 % SDS

Waschpuffer:

20 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,2)
5 % SDS

2.2.14 Transformation von *E. coli*-Zellen

2.2.14.1 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Die hier angeführte Methode entspricht im wesentlichen der von Inoue et al. (1990) beschriebenen Methode. Eine Übernachtskultur von DH5 α -Zellen wird in 250 ml LB-Medium bei 18°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 angezogen. Die Kultur wird für 10 min auf Eis inkubiert und danach 10 min bei $2.500 \times g$ und 4°C pelettiert. Das Zell-Pellet wird in 80 ml eiskaltem Transformations-Puffer in einem Eisbad resuspendiert, um danach wieder abzentrifugiert zu werden. Das Zell-Pellet wird daraufhin in 20 ml eiskaltem Transformations-Puffer resuspendiert und mit 1,5 ml DMSO (7 % Endkonzentration) versetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 10 min im Eisbad werden Aliquots von 100 μl in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

Transformations-Puffer:

10 mM PIPES
15 mM CaCl₂
250 mM KCl

Nach pH-Einstellung auf 6,7 mit KOH und der Zugabe von MnCl₂ (55 mM Endkonzentration) wird die Lösung sterilfiltriert und kann bei 4°C gelagert werden.

2.2.14.2 Transformation von chemokompetenten *E.coli*-Zellen

Ein Aliquot der chemokompetenten *E. coli*-Zellen wird auf Eis angetaut und mit 0,1-0,5 µg Plasmid-DNA oder eines Ligationsansatzes versetzt. Nach dreißigminütiger Inkubation auf Eis werden die Zellen für 30 sek auf 42 °C erhitzt und sofort danach wieder für 2 min auf Eis gekühlt. Danach werden die Zellen mit 1 ml SOC-Medium versetzt und für 1 Std bei 37 °C inkubiert. Aliquots von 100 und 500 µl werden auf entsprechende Selektionsagarplatten ausplattiert.

2.2.15 *E. coli*-Dauerkulturen

Wichtige Transformanten werden als Dauerkultur konserviert. Dazu wurden diese als Übernachtskultur in LB-Selektions-Medium angezogen und mit 25 % Glycerol bei -80 °C aufbewahrt.

2.3 Proteinchemische und immunologische Techniken

2.3.1 Induktion und Extraktion rekombinanter Proteine

Für die Expression rekombinanter Proteine unter der Kontrolle des durch IPTG induzierbaren $\Phi T7p$ -Promotors wurden die *E. coli*-Stämme DH5 α und M15 verwendet. Übernachtskulturen der entsprechenden Transformanten wurden 1:100 in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin verdünnt, und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 unter Schütteln (250 UpM) inkubiert. Die Expression rekombinanter Proteine wurde zu diesem Zeitpunkt durch Zugabe von 1,0 mM IPTG (Endkonzentration) induziert, die Zellen wurden anschließend weitere 4 Std bei 37 °C geschüttelt und nach der Ernte durch Zentrifugation (10.000 x g, 10 min) in Lysis-Puffer resuspendiert. Hier ist zu unterscheiden, ob das pQE- oder pGEX-4T-Expressionssystem verwendet wurde. Das Produkt der Expression mit dem pQE-System ist das in den Vektor klonierte Protein in Fusion mit einem „6His-Tag“. Dieser ermöglicht die affinitätschromatographische Reinigung des Proteins mit Ni-NTA-Sepharose. Bei Verwendung des Vektors pGEX-4T ist das exprimierte Protein mit Glutathion-S-Transferase fusioniert, um die Reinigung mit Glutathion-Sepharose zu ermöglichen.

2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden unter Verwendung des Bradford-Reagenz nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Sowohl für die Probe als auch für den Standard wurden für jeden Ansatz 100 µl Proteinlösung eingesetzt. Anschließend wurde 1 ml Bradford-Reagenz hinzugegeben. Nach 5 min wurde die Extinktion bei 595 nm im Photometer gemessen. Die Proteinkonzentration wurde durch Vergleich der Extinktionswerte mit BSA-Standards (1-20 µg) ermittelt.

2.3.3 Reinigung rekombinanter Proteine nach Qiagen (pQE-System)

Das Pellet wurde in 4 ml Lysis-Puffer/g Feuchtgewicht Bakterien resuspendiert und die Zellen danach durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen (37 °C im Wasserbad) lysiert. Nach sechsmaliger Ultraschallbehandlung für jeweils zehn Sekunden wurde das Lysat für 30 min bei 10.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Zu 4 ml des Überstands wurde 1 ml einer mit Lysis-Puffer äquilibrierten 50 %igen Ni-NTA-Sepharose gegeben und eine Stunde bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde eine Minute bei 1.000 x g und 4 °C abzentrifugiert und die Sepharose fünfmal mit dem doppelten Volumen Wasch-Puffer gewaschen. Danach wurde fünfmal mit 1 ml Elutions-Puffer eluiert, wobei nach jeder Pufferzugabe fünf Minuten inkubiert wurde. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.3.5) analysiert.

Lysis-Puffer:

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

mit NaOH auf pH 8,0 einstellen.

Wasch-Puffer:

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

20 mM Imidazol

mit NaOH auf pH 8,0 einstellen.

Elutions-Puffer:50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

250 mM Imidazol

mit NaOH auf pH 8,0 einstellen.

2.3.4 Reinigung rekombinanter Proteine mit dem pGEX-4T-1 Expressionssystem

Das Zell-Pellet einer 50 ml Bakterienkultur wurde in 5 ml Puffer Lysis-Puffer resuspendiert. Nach fünfzehnminütiger Inkubation auf Eis wurde das Lysat mit DTT (5 mM Endkonzentration), Benzamidin (1 mM Endkonzentration), PMSF (1 mM Endkonzentration) und Sarcosyl (1,5 % Endkonzentration) versetzt. Danach wurde die Lösung für 1 min mit Ultraschall behandelt und 15 min bei 18.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit Triton X-100 (2-4 % Endkonzentration) versetzt. Der Überstand wurde zu 100 µl mit PBS äquilibrierter Glutathion-Agarose-Matrix gegeben und 1 Std bei 4 °C geschüttelt. Nach einminütiger Zentrifugation bei 10.000 x g wurde mehrmals mit PBS gewaschen. Um GST-Fusionsproteine von der Glutathion-Agarose-Matrix zu trennen, erfolgte eine Elution mit 1 ml Elutions-Puffer. Um das Fusionsprotein im Überstand ohne die Glutathion-S-Transferase zu erhalten, wurde das an die Glutathion-Agarose-Matrix gebundene Fusionsprotein direkt mit 10 U Thrombin in 1 ml PBS gespalten. Die gereinigten Fusionsproteine wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.3.5) analysiert.

Lysis-Puffer:

10 mM Tris (pH 8,0)

150 mM NaCl

1 mM EDTA (pH 8,0)

1 % Triton X-100

100 µg/ml Lysozym

Elutions-Puffer:

250 mM Tris (pH 8,0)

20 mM reduziertes Glutathion

2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Größenaufftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE wurde unter denaturierenden Bedingungen in 10-15 %igen Trenngelen (Tab. 2.3) oder 3-15 %igen Gradientengelen (Tab. 2.4 und Tab. 2.5) durchgeführt. Die aufzutrennenden Proteinlösungen wurden je nach Bedarf mit unterschiedlichen Mengen 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und fünf Minuten bei 95 °C inkubiert. In der Regel wurden 10-20 µl Proteinlösung in jede Probestasche geladen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung zwischen 100 und 120 V in 1 x SDS-PAGE-Laufpuffer. Als Größenstandard wurde ein Gemisch definierter Proteingrößen verwendet.

5 x SDS-Probenpuffer:

2,5 ml 1 M Tris/HCl (pH 6,5)
 4,0 ml 10 % Natriumdodecylsulfat
 2,0 ml Glycerin
 1,0 ml β-Mercaptoethanol
 200 µl 10 % Bromphenolblau

10 x SDS-PAGE-Laufpuffer:

0,25 M Tris
 1,9 M Glycin
 1 % Natriumdodecylsulfat

Molekülmassenstandards:

LMW-Marker (Pharmacia): 94; 67; 43; 30; 20,1; 14,4 kDa

HMW-Marker (Pharmacia): 212; 170; 116; 76; 53 kDa

Prestained-Marker (BioRad): 250; 150; 100; 75; 50; 37; 25; 15; 10 kDa

Tabelle 2.3 Lösungen zur Herstellung von 12 Minigelen für SDS-Page

	10 % SDS-Trenngel	12 % SDS-Trenngel	15 % SDS-Trenngel	Sammelgel (5 %)
Acrylamid (30 %)	20 ml	24 ml	30 ml	4 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	15,1 ml	15,1 ml	15,1 ml	-
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	-	-	-	2,4 ml
10 %ige SDS-Lösung	670 µl	670 µl	670 µl	270 µl
dH ₂ O	24,25 ml	20,25 ml	14,25 ml	17,13 ml
TEMED	23 µl	23 µl	23 µl	20 µl
10 % APS	240 µl	240 µl	240 µl	360 µl

Tabelle 2.4 Stocklösungen für Gradientengele

	3 % SDS-Trenngel	15 % SDS-Trenngel	Sammelgel (4 %)
Acrylamid (30 %)	11,2 ml	64,4 ml	12,3 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	40,8 ml	40,8 ml	-
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	-	-	11,1 ml
10 %ige SDS-Lösung	1,2 ml	1,2 ml	900 µl
dH₂O	64,4 ml	11,2 ml	66,9 ml

Tabelle 2.5 Zusammensetzung eines Gradientengels für Hoeffer SE 260 (1,5 mm Dicke)

	3 % SDS-Trenngel	15 % SDS-Trenngel	Sammelgel (4 %)
Stocklösung pro Gel	4,5 ml	4,5 ml	3,0 ml
TEMED	8 µl	8 µl	16 µl
10 % APS	15 µl	15 µl	30 µl

2.3.6 Färbung von Polyacrylamidgelen

2.3.6.1 Färbung mit Coomassie-Blau

Zur Färbung der aufgetrennten Proteine wurden SDS-Gele 20 min in Färbelösung geschüttelt. Die nicht an Proteine gebundenen Farbstoffpartikel wurden durch Schütteln in Entfärberlösung entfernt.

Färbelösung:

0,1 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau R 250

50 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure

Danach wird die Färbelösung filtriert.

Entfärbelösung:

10 % (v/v) Ethanol

7 % (v/v) Essigsäure

2.3.6.2 Silberfärbung

Für eine Färbung der aufgetrennten Proteine mit einer sensitiveren Methode als 2.3.6.1 wurde die Silberfärbung benutzt. Dazu wurden SDS-Gele 5 min in Fixierungs-Lösung geschüttelt. Nach mehrmaligem Waschen in Wasser (3 x 5 sek, 1 x 5 min, 3 x 5 sek) wurde das Gel in 50 %igem Azeton für 5 min inkubiert. Nach Behandlung mit 100 µl 10 %igem Natriumthiosulfat-5-hydrat in 60 ml Wasser wurde das Gel mit Wasser gewaschen (3 x 5 sek) und für 8 min in Imprägnier-Lösung geschüttelt.

Danach wurde das Gel nochmals gewaschen (2 x 5 sek) und mit Entwickler-Lösung behandelt. Die Reaktion wurde nach 20-30 sek mit der Stopp-Lösung abgestoppt und das Gel mit Wasser abgespült.

Fixierungs-Lösung:

60 ml 50 %ige Azeton-Lösung
1,5 ml 50 %ige Trichloressigsäure
25 µl 37 %ige Formaldehyd-Lösung

Imprägnier-Lösung:

0,8 ml 20 %ige Silbernitrat-Lösung
0,6 ml 37 %ige Formaldehyd-Lösung
in 60 ml Wasser.

Entwickler-Lösung:

1,2 g NaCO₃
25 µl 37 %ige Formaldehyd-Lösung
25 µl 10 %ige Natriumthiosulfat-5-hydrat (Na₂S₂O₃ x 5 H₂O)
in 60 ml Wasser.

Stopp-Lösung:

1 %ige Essigsäure

2.3.7 Übertragung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Westernblot)

2.3.7.1 Transfer auf Nitrocellulosemembranen im Halbtrocken-Verfahren

Proteine mit einem Molekulargewicht unter 150 kDa wurden mit dem Semi-Dry-Transfer-Verfahren (Halbtrocken-Transfer) auf Membranen übertragen. Dazu wird das Gel auf eine mit Anodenpuffer II befeuchtete Nitrocellulosemembran überführt und auf zwei mit Anodenpuffer II getränkte 3 MM Whatman-Filterpapiere gelegt. Auf die Anode wird ein in Anodenpuffer I getränktes 3 MM Whatman-Filterpapier gelegt. Der Stapel mit dem Gel wird luftblasenfrei auf das Filterpapier auf der Anode der Blotkammer gelegt. Der Stapel wird mit zwei weiteren, in Kathodenpuffer getränkten

3 MM Whatman-Filterpapieren überschichtet. Dann wird die Kammer mit der Kathode verschlossen und der Transfer über 30-45 min bei 10 V durchgeführt.

Anodenpuffer I:

300 mM Tris/HCl (pH 10,4)
0,05 % Natriumdodecylsulfat
10 % Methanol

Anodenpuffer II:

25 mM Tris/HCl (pH 10,4)
0,05 % Natriumdodecylsulfat
10 % Methanol

Kathodenpuffer:

40 mM Aminocaprylsäure
25 mM Tris/HCl (pH 9,4)
0,05 % Natriumdodecylsulfat
10 % Methanol

2.3.7.2 Transfer auf Nitrocellulosemembranen im Nassverfahren

Besonders für große Proteine (>150 kDa) ist das Semi-Dry-Verfahren (2.3.7.1) nicht sehr effizient. Daher werden größere Proteine wie NUANCE im Nassverfahren transferiert. Auf eine aus einem Drahtnetz bestehende Anode werden zwei mit Transferpuffer getränkte 3 MM Whatman-Filterpapiere gelegt. Darauf werden die PVDF-Membran (Immobilon™-P Transfermembran) und das Proteingel luftblasenfrei aufgezogen. Das Gel wird mit zwei weiteren 3 MM Whatman-Filterpapieren abgedeckt und mit der Kathode zusammengedrückt. Um eine gleichmäßige Druckverteilung zwischen Membran und Gel zu gewährleisten, wird unmittelbar an den Elektroden je ein Schwamm mit eingebunden. Der Transfer erfolgt in einer mit Transferpuffer gefüllten Blotkammer über drei Tage bei 4 °C und 20 V. Nach dem Transfer wird die Membran für 10 sek mit Methanol behandelt und danach an der Luft getrocknet. Die Membran kann nach Trocknung sofort verwendet oder bei -20 °C gelagert werden.

Transferpuffer:

25 mM Tris

192 mM Glycin

2.3.8 Färbung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen

Nach erfolgtem Blot werden die Proteine reversibel mit Ponceau-S-Farbstoff gefärbt. Dies soll einerseits die Kontrolle über die Effizienz des Blottens gewährleisten, andererseits auch die Möglichkeit bieten, den Molekülgrößenmarker zu kennzeichnen. Die Membran wird dazu für 1-5 min in Ponceau-Färbelösung (1:20 in Wasser verdünnt) gelegt und geschüttelt. Anschließend wird sie kurz unter fließendem Wasser abgespült. Sobald Proteinbanden sichtbar werden, werden die Banden des Molekülgrößenmarkers mit Bleistift dauerhaft markiert. Die vollständige Entfärbung der Membran erfolgt durch NCP-Puffer oder Block-Puffer in 2.3.9.

2.3.9 Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose

Die Nitrocellulosemembran wurde nach dem Protein-Transfer für 1 Std mit Block-Puffer abgesättigt, bevor sie mit Hybridomaüberständen (1:1 verdünnt mit Block-Puffer) oder aufgereinigten Antikörpern (gelöst in Block-Puffer) für mindestens 1 Std bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran mit Waschpuffer gewaschen (fünfmal für 5 min). Danach erfolgte die Inkubation der Membran für 1 Std mit einem sekundären Antikörper, der an Peroxidase gekoppelt war. Anschließend wurden nicht gebundene Antikörper durch 3 x 5 min Waschen mit Waschpuffer entfernt. Die Immunmarkierung wurde mit Hilfe von Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Dabei oxidiert die am sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase Luminol, was zu einer Lichtreaktion bei 430 nm führt. Dies verursacht eine Schwärzung des Röntgenfilms. Die Membran wurde kurz in der Luminollösung inkubiert und ein Röntgenfilm für 5 sek bis 30 min exponiert.

Block-Puffer (PVDF-Membran):

5 % Milchpulver

0,05 % Tween

in PBS.

Block-Puffer (Nitrocellulose-Membran):

1 % Milchpulver in NCP-Puffer

Waschpuffer (PVDF-Membran):

0,05 % Tween

in PBS.

Waschpuffer (Nitrocellulose-Membran):

NCP-Puffer

Luminollösung:

2 ml 1 M Tris/HCl (pH 8,0)

200 µl 3-Aminonaphtylhydrazid (0,25 M in DMSO)

89 µl p-Cumarsäure (0,1 M in DMSO)

18 ml Wasser

6,1 µl 30 %ige H₂O₂-Lösung

2.3.10 Entfernung der Antikörper nach Immundetektion

Durch diese Methode werden primäre und sekundäre Antikörper von einer zuvor zur Immundetektion verwendeten Westernblotmembran entfernt. Dafür wurde die Membran 30 min bei 50 °C im Stripping-Puffer geschüttelt und anschließend mehrmals mit NCP-Puffer ausgiebig gewaschen. Die Membran steht nun für eine erneute Immunmarkierung und Detektion von Proteinen (2.3.9) zur Verfügung.

Stripping-Puffer:

100 mM β-Mercaptoethanol

2 % Natriumdodecylsulfat

62,5 mM Tris/HCl (pH 6,7)

2.3.11 Aufreinigung von IgG aus Hybridoma-Kulturüberständen

Zur Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Kulturüberständen der Antikörperproduzierenden Hybridomazellen wird der Überstand unter ständigem Rühren bei 4 °C auf eine mit Protein A-Sepharose (1 ml Protein-A-Sepharose CL4B) beladene

Säule gegeben. Das Eluat wird aufgefangen und erneut auf die Säule aufgetragen. Man lässt das Eluat über Nacht über die Säule zirkulieren. Am nächsten Tag wird die Säule mit Waschpuffer so lange gewaschen, bis das Eluat eine OD_{280} von unter 0,1 aufweist. Dann werden die Antikörper mit Elutions-Puffer eluiert, wobei jede Fraktion sofort mit einer Spatelspitze Natriumcarbonat neutralisiert wird. Die Fraktionen mit einer OD_{280} zwischen 0,5 und 1 werden ebenso gepoolt, wie die mit einer OD_{280} größer als 1. Fraktionen, die weniger Protein enthalten, werden verworfen. Die aufgereinigten und konzentrierten Antikörper werden daraufhin gegen TBS dialysiert.

Waschpuffer:

0,2 % Natriumazid
in PBS.

Elutions-Puffer:

0,2 M Glycin (pH 2,7)

2.3.12 Fraktionierung von COS7-Zellen in Membran-, Kern- und Cytosol-Fraktion

COS7-Zellen in einer 10 cm Kulturschale (70-80 % konfluent) wurden abgeschabt, bei 1.000 x g abzentrifugiert, in PBS gewaschen und danach in 400 µl Homogenisations-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden sie mit Ultraschall (7 Stöße) aufgeschlossen. Das Homogenat wurde bei 1.000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde wiederum in 400 µl Homogenisations-Puffer aufgenommen, mit SDS-Probenpuffer (2.3.5) versetzt und als Kernfraktion markiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei 100.000 x g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand nach der Ultrazentrifugation wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen und als cytoplasmatische Fraktion markiert. Das Pellet wurde in 400 µl Homogenisations-Puffer aufgenommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt und als Membranfraktion markiert.

Homogenisations-Puffer:

10 mM HEPES (pH 7,5)
1,5 mM $MgCl_2$
1,5 mM KCl

0,5 mM DTT

0,2 mM PMSF

sowie 1 Tablette Complete-Mini[®] Inhibitoren Cocktail auf 10 ml.

2.3.13 Aktin-Bindungs Analyse

Zuerst wird das Fusionsprotein, das für die Aktin-Bindungs Analyse verwendet wird, unter nativen Bedingungen aufgereinigt (2.3.3 und 2.3.4). 1-2 ml Elutionsfraktionen, die das Fusionsprotein enthalten, werden über Nacht gegen F-Puffer dialysiert. Für den Versuch werden drei Ansätze benötigt:

Kontrolle 1 (Aktin): 2,5-10 μ M G-Aktin in F-Puffer

Kontrolle 2 (Fusionsprotein): dialysiertes Fusionsprotein in F-Puffer

Versuch: 2,5-10 μ M G-Aktin und dialysiertes Fusionsprotein in F-Puffer

Normalerweise beträgt das Endvolumen 50-100 μ l. Alle drei Versuchsansätze werden nun für 1 Std bei Raumtemperatur inkubiert.

Aktin-Bindungs Test („High-speed spin down assay“):

Die Versuchsansätze werden bei 125.000 x g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände werden vorsichtig abgenommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C aufgeköcht. Die Pellets werden im ursprünglichen Volumen (50-100 μ l) PBS aufgenommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C aufgeköcht. Danach werden gleiche Mengen der Versuchsansätze (Überstände und Pellets) auf ein PAA-Gel aufgetragen und mit Hilfe einer SDS-PAGE (2.3.5) aufgetrennt. Danach wird das SDS-Gel in Coomassie-Blau (2.3.6.1) gefärbt. Polymerisiertes Aktin sollte unter diesen Bedingungen im Pellet, das native Fusionsprotein sollte im Überstand zu finden sein (Kontrollen). Wenn das Fusionsprotein eine Aktin-Bindungs Aktivität besitzt, sollten Aktin und das Fusionsprotein im Pellet zu finden sein.

Aktin-Bündelungs Test („Low-speed spin down assay“):

Die Versuchsansätze werden bei 20.000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände werden vorsichtig abgenommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C aufgeköcht. Die Pellets werden im ursprünglichen Volumen (50-100 μ l) PBS aufgenommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C aufgeköcht. Danach

werden gleiche Mengen der Versuchsansätze (Überstände und Pellets) auf ein PAA-Gel aufgetragen und mit Hilfe einer SDS-PAGE (2.3.5) aufgetrennt. Danach wird das SDS-Gel in Coomassie-Blau (2.3.6.1) gefärbt. Polymerisiertes Aktin sollte unter diesen Bedingungen wie das native Fusionsprotein im Überstand zu finden sein (Kontrollen). Wenn das Fusionsprotein eine Aktin-Bündelungs Aktivität besitzt, sollten Aktin und das Fusionsprotein gemeinsam pelletieren.

1 x F-Puffer:

2 mM MgCl₂

100 mM KCl

1 mM EGTA

20mM Imidazol

auf pH 7,0 einstellen.

2.3.14 Aktin-Polymerisations Analyse („Actin polymerization assay“)

Für diesen Versuch wird natives Fusionsprotein in G-Puffer (2.3.3 und 2.3.4) und fluoreszenzmarkiertes G-Aktin benötigt. Um den Einfluss des Fusionsproteins auf die Polymerisierung von Aktin zu untersuchen, muss zuerst das Fusionsprotein unter nativen Bedingungen aufgereinigt werden. 1-2 ml Elutionen, die das Fusionsprotein beinhalten, werden über Nacht gegen G-Puffer dialysiert. Für den Versuch werden mindestens zwei Ansätze benötigt:

Kontrolle (Aktin): 8 µM mit N-(1-Pyrenyl)iodoacetamid markiertes G-Aktin in G-Puffer

Versuch: 8 µM G-Aktin und (2-8 µM) dialysiertes Fusionsprotein

200 µl der Versuchsansätze werden in die Löcher einer Hartschalen 96-Loch-Platte gegeben. Die Polymerisation von Aktin wird durch Zugabe von MgCl₂ (2 mM Endkonzentration) und KCl (100 mM Endkonzentration) gestartet. Das Fluorimeter (Fluoroscan Ascent FI) regt mit einer Wellenlänge von 365 nm an und misst die Emission bei einer Wellenlänge von 410 nm alle 30 sek für 20 min. Durch die Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin wird die Pyren-Aktin-Fluoreszenz erhöht (Kouyama & Mihashi, 1981; Korenbaum et al., 1998).

1 x G-Puffer:

0,5 mM Tris/HCl (pH 7,6)

0,5 mM ATP

0,1 mM CaCl₂

0,5 mM DTT

2.3.15 Proteinbindungsanalyse *in vitro***2.3.15.1 Proteinbindungsanalyse auf einer Nitrocellulosemembran („Blot-overlay assay“)**

Für Proteinbindungsanalysen wurden Gesamtzellproteinmischungen von *E. coli*-Zellen (induziert/nicht induziert) durch SDS-PAGE (2.3.5) aufgetrennt und durch Transfer auf Nitrocellulosemembranen (2.3.7) übertragen. Die Membran wurde 1 Std mit 5 % Milchpulver in NCP-Puffer abgesättigt und anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem Gesamt-Zell-Lysat des zu testenden Fusionsproteins (ohne Aufreinigung) inkubiert. Während dieser Inkubationszeit soll das Fusionsprotein jeweils an seine auf der Membran immobilisierten Bindungspartner binden. Anschließend wurde dreimal je 5 min mit NCP-Puffer gewaschen. Danach wurden die Membran für 1 Std mit einem Antikörper inkubiert, der gegen das zu testende Fusionsprotein gerichtet ist. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde die Membran mit einem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörper für 1 Std inkubiert. Die Analyse erfolgte, wie bei der Immunmarkierung beschrieben (2.3.9), durch Oxidation von Luminol, wobei die Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm dokumentiert wurde.

2.3.15.2 Proteinbindungsanalysen von Fusionsprotein mit COS7-Zell-Lysat

Für die Proteinbindungsanalyse wurden die Zellen einer Zellkulturschale (10 cm) mit einem konfluenten Rasen von COS7-Zellen abgeschabt und 15 min auf Eis in Lysis-Puffer inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation des Lysats bei 100.000 x g für 30 min bei 4 °C. Der Überstand mit den cytosolischen Proteinen wurde über Nacht mit den aufgereinigten und an die Glutathion-Agarose-Matrix gebundenen Fusionsproteinen auf einem Roller bei 4 °C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurde die Glutathion-Agarose-Matrix in 30-50 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 95 °C erhitzt. Die Überstände wurden separat mit SDS-

Probenpuffer behandelt. Glutathion-Agarose-Matrix und Überstände wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt (2.3.5) und durch Immunmarkierung (2.3.9) analysiert.

Lysis-Puffer:

50 mM Tris/HCl (pH 7,5)

150 mM NaCl

1 % Triton X-100

sowie 1 Tablette Complete-Mini[®] Inhibitoren Cocktail auf 10 ml.

2.3.15.3 Proteinbindungsanalysen von Fusionsproteinen

Für die Proteinbindungsanalyse zwischen löslichen GST-Fusionsproteinen wurden die beiden zu testenden Proteine aufgereinigt (2.3.4). Eines der Proteine wurde mit Thrombin von der Glutathion-S-Transferase gespalten, das andere Protein wurde an der Glutathion-Agarose-Matrix belassen. Die Mengen beider Proteine wurden semiquantitativ auf einem SDS-Gel abgeschätzt. Beide Proteinlösungen wurden über Nacht bei 4 °C auf einem Roller inkubiert. Danach wurde die Glutathion-Agarose-Matrix bei 10.000 x g abzentrifugiert und mehrmals mit PBS gewaschen. Die Pellets wurden in 30-50 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 95 °C erhitzt. Die Überstände wurden separat mit SDS-Probenpuffer behandelt. Glutathion-Agarose-Matrix und Überstände wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt (2.3.5) und durch Coomassie-Färbung (2.3.6.1), Silberfärbung (2.3.6.2) oder Immunmarkierung (2.3.9) analysiert.

2.4. Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultur von Säugerzellen

Säugerzellen wurden in Zellkulturschalen im Brutschrank bei Wasser gesättigter Atmosphäre und 5 % CO₂ bei 37 °C mit modifiziertem DME-Kulturmedium kultiviert. Die Zellen wurden alle 2 bis 3 Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit 1 ml/100 mm Schale 0,05 % Trypsin/EDTA abgelöst (ca. 3 min bei 37 °C). Die Zellen wurden 1:10 in DMEM/FBS verdünnt und ausplattiert.

2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

10^7 Zellen wurden in Einfriermedium aufgenommen. Das Einfrieren von Zellen in Kryo-Röhrchen erfolgte bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder in flüssigem Stickstoff. Aufgetaut wurden die Zellen zügig bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen sofort in DMEM Medium gegeben.

Einfriermedium:

70 % DMEM

20 % FCS

10 % DMSO

2.4.3 Fluoreszenzmikroskopie

2.4.3.1 Fixieren und Permeabilisieren von Säugetierzellen

Auf Deckgläschen ausgesäte Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 ml 3 % Paraformaldehyd in PBS für 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellen wurden danach mit 0,5 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Eine teilweise Permeabilisierung wurde mit 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Digitonin in DMSO für 5 min auf Eis durchgeführt. Diese Behandlung macht die Plasmamembran durchlässig, lässt aber die Kernmembran intakt. Danach wurden die Deckgläschen 3 x mit PBS gewaschen und konnten für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden.

2.4.3.2 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe dieser Methode lässt sich die intrazelluläre Verteilung bestimmter Proteine in fixierten Zellen nachweisen. Dabei wurden spezifische Proteine mit ihren korrespondierenden Antikörpern markiert. Der Nachweis erfolgte dann indirekt, indem der erste Antikörper mit einem fluoreszierenden zweiten Antikörper markiert wurde, der bei Anregung mit bestimmten Wellenlängen eine sichtbare Fluoreszenz verursacht. Fixierte und permeabilisierte Zellen wurden mit primärem Antikörper für 60 min bei Raumtemperatur oder $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht inkubiert und anschließend 3 x für 5 min mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit sekundärem Antikörper für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 x für 5 min mit PBS

gewaschen. Die Zellen wurden dann in Gelvatol eingebettet und zum Aushärten über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Gelvatol:

20 g Gelvatol in 80 ml PBS,
40 ml Glycerin zugeben, 16 Std rühren,
15 min bei 12.000 x g zentrifugieren,
25 ng/ml DABCO zum Überstand geben,
aliquotiert in Spritzen bei -20 °C lagern.

2.4.3.3 Konfokale Lasermikroskopie

Für die normale Fluoreszenzmikroskopie wurde das Fluoreszenzlichtmikroskop DMR der Fa. Leica benutzt. Für die konfokale Lasermikroskopie wurde das von der Fa. Leica entwickelte CLSM-SP Mikroskop benutzt, das optische Schnittebenen durch die Präparate erlaubt. Das Gerät ist mit einem Krypton- und einem Argonlaser ausgestattet und ermöglicht elektronische Anregung bei unterschiedlichen Wellenlängen. Die Daten werden mit dem begleitenden Bildverarbeitungssystem der Fa. Leica weiterverarbeitet.

2.4.4 Transfektion von Säugetierzellen

2.4.4.1 Transiente Transfektion von Säugetierzellen durch Elektroporation

10^8 Zellen wurden in 200 µl DMEM aufgenommen und 20 µg hochreine Plasmid DNA hinzugegeben. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und dann bei 975 µF und 300 V elektroporiert. Die Zellen wurden dann 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml DMEM aufgenommen, in eine 10 cm Zellkulturschale gegeben und im Brutschrank kultiviert.

2.4.4.2 Transfektion von Säugetierzellen mit Oligofectamin™

Die zu transfizierenden Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in eine 6-Loch Platte ausgesät, so dass die Zellen bei Beginn der Transfektion zu 20-30 % konfluent waren. Am nächsten Tag wurden die Zellen einmal mit Opti-MEM gewaschen und danach in 1 ml Opti-MEM für 30 min inkubiert. Parallel wurde der

Transfektionsansatz vorbereitet. Dazu wurden 6 µl siRNA einer 20 µM Lösung in 100 µl Opti-MEM und 6 µl Oligofectamin in 24 µl Opti-MEM gelöst und für 7 bis 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden beide Lösungen vorsichtig durch langsames Pipettieren gemischt und für 20 bis 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 64 µl Opti-MEM wurden die gesamten 200 µl in ein Loch der 6-Loch Platte gegeben und für 4 Std im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit fand die Transfektion mit Hilfe des Oligofectamins statt. Danach wurde das Opti-MEM abgesaugt und durch 3 ml frisches DMEM ersetzt. Die Zellen wurden 1 bis 3 Tage später fixiert und für die Immunfluoreszenz oder als Proteinhomogenat aufgearbeitet.

2.5. Methoden zum „Yeast Two-Hybrid“-System

2.5.1 Transformation von Hefezellen

2.5.1.1 Herstellung kompetenter Hefezellen

30 ml YEPD-Medium wurde mit einer Y190-Übernachtkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,2-0,3 angeimpft und 3 Std bei 230 UpM und 30 °C geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1.000 x g, 5 min bei RT), das Sediment in 50 ml Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 µl 1 x TE/LiAc-Puffer aufgenommen.

10 x LiAc-Puffer:

1 M Lithiumacetat (pH 7,5)

10 x TE-Puffer:

0,1 M Tris-HCl (pH 7,5)

10 mM EDTA

2.5.1.2 Transformation der kompetenten Hefezellen

Der Transformationsansatz bestand jeweils aus 100 µl kompetenter Y190-Hefezellen mit 2 x 1 µg der zu testenden Plasmide und 0,1 mg Heringssperma-DNA. Nach Zugabe von 600 µl frisch hergestellter, steriler PEG/LiAc-Lösung wurde der Reaktionsansatz kurz gemischt und 30 min bei 30 °C unter Schütteln (200 UpM) inkubiert. Anschließend wurden 70 µl DMSO hinzugegeben und die Zellen 15 min in

einem Wasserbad auf 42 °C erhitzt. Nachdem die Zellen kurz auf Eis abgekühlt wurden, wurde die Suspension für 5 min bei 1.000 x g und Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Hefe-Pellet wurde in 0,5 ml TE-Puffer aufgenommen und auf SD/-Trp-, SD/-Leu-, SD/-Leu/-Trp- und SD/-His/-Leu/-Trp/+3-AT-Selektionsagarplatten (Tab. 2.1.2) ausplattiert. Die Platten wurden 3 bis 10 Tage bei 30 °C inkubiert.

PEG/LiAc-Lösung:

8 ml 50 % PEG 4000-Lösung

1 ml 10 x TE-Puffer

1 ml 10 x LiAc-Lösung

2.5.2 β-Galaktosidasetest der Leu⁺/Trp⁺ und His⁺ Hefekolonien

Von den Agarplatten mit Leu⁺/Trp⁺ und His⁺-Hefeklonen wurden Filterabzüge mit Nitrocellulosefiltern gemacht (Schneider et al., 1996). Die Position des Filters auf der Platte wurde markiert und der Filter für zehn Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht. Dadurch wird die Zellmembran der Hefen permeabilisiert, so dass sie Flüssigkeiten aufnehmen. Anschließend wurde der Filter bei Raumtemperatur aufgetaut und mit der Kolonienseite nach oben auf einen mit Z-Puffer/X-Gal-Lösung angefeuchtetes Filterpapier gelegt. Die Filter wurden bei 30 °C inkubiert und in regelmäßigen Abständen (12-16 h) auf Blaufärbung der Hefekolonien hin kontrolliert.

Z-Puffer (pH 7,0):

10,69 g Na₂HPO₄ x 7 H₂O

5,5 g NaH₂PO₄ x 2 H₂O

0,75 g KCl

0,246 g MgSO₄ x 7 H₂O

mit Wasser auf 1 l auffüllen.

Z-Puffer/X-Gal-Lösung:

100 ml Z-Puffer (pH 7,0)

0,27 ml β-Mercaptoethanol

1,67 ml X-Gal-Lösung (20 mg/ml in DMF)

3 ERGEBNISSE

3.1 Klonierung der humanen NUANCE cDNA

3.1.1 Vervollständigung der cDNA durch PCR

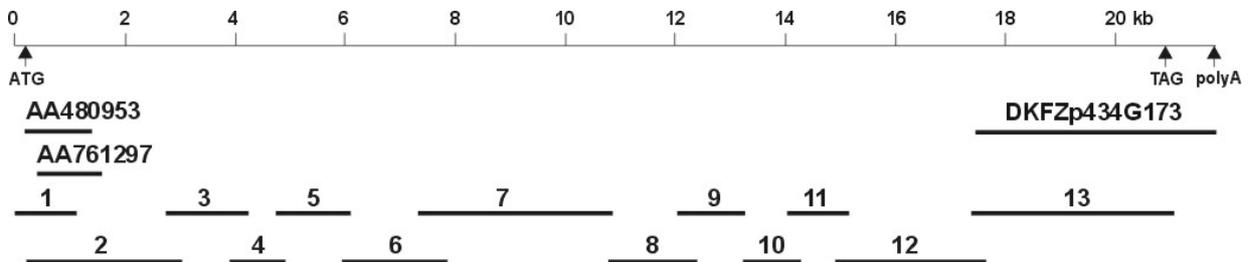


Abbildung 3.1 Erstellung der humanen NUANCE cDNA

Die 21,8 kb große cDNA von NUANCE wurde aus 13 überlappenden cDNA-Abschnitten aus der mRNA von BL60-Zellen ermittelt.

Zu Beginn der Dissertation war die vollständige cDNA von NUANCE noch nicht bekannt (Zhen, 2001). Zhen hatte mit Hilfe von RACE-PCRs, RT-PCRs, normalen PCRs und Datenbankvergleichen mit Sequenzen des humanen Genom Projekts die cDNA für NUANCE bis auf die Teilstücke 7 und 12 (Abb. 3.1) erschlossen und ursprünglich eine Basenzahl von 19.163 bp errechnet. Es wurde vermutet, dass es sich bei der NUANCE cDNA um eine große (> 20 kb), durchgängige cDNA handelte, doch der letzte Beweis fehlte. Durch geeignete Primerauswahl konnten beide fehlenden Stücke mit Hilfe von konventionellen PCRs (mit cDNA Matrize von BL60-Zellen) ergänzt werden. Das PCR-Produkt der Primer GAP 5'8 und GAP 3'3 wurde in pGem-Teasy[®] ligiert und repräsentiert die Basenpaare 7.332-10.854 (Abb. 3.1 Teilstück 7). Das Teilstück 12 wurde mit den PCR-Primern HE 5'1 und HE 3'1 amplifiziert in pGem-Teasy[®] kloniert und repräsentiert die Basenpaare 15.006-16.586 (Abb. 3.1). Durch Sequenzierung der Plasmide sowie Vergleichen bestehender Sequenzen aus Datenbanken konnte die vollständige cDNA von NUANCE aufgeklärt werden. Abb. 3.1 zeigt die vollständig erschlossene cDNA von NUANCE bestehend aus den bereits bekannten EST-Klonen AA480953, AA761297, DKFZp434G173 (Zugriffsnummer AL080133) und den durch PCR ermittelten Bereichen. Das Start-Kodon ATG befindet sich an den Positionen 213-215, das Stopp-Kodon TAG an den Positionen 20.862-20.864 der cDNA (Zugriffsnummer AF435011). Insgesamt besitzt die vollständige cDNA 21.794 Basenpaare.

3.1.2 Vollständige Exon-Intron Organisation des humanen NUANCE Gens

Tabelle 3.1 Exon-Intron Organisation des humanen NUANCE Gens

Exon	5' Splice Donor	5' Splice Akzeptor	Exon-größe	Intron-größe	Exon	5' Splice Donor	5' Splice Akzeptor	Exon-größe	Intron-größe
1a	AGCCCG	CCCCGG/gtaaga	170	228	59	ttctag/GATGTG	GGGGAG/gtaagc	121	1.168
1	GCCAAG	CGGACG/gtgggt	161	55.963	60	attaag/GTCATA	TTAAAG/gtaagc	183	2.300
2	tttcag/TTCACT	TGCAAG/gtaatt	130	31.386	61	ttatag/GTAGTC	CTACAG/gtatgt	132	4.463
3	tgatag/CTGAAC	GCCAGG/gtaagc	62	1.018	62	acacag/GGAGAA	CGGAAG/gtgggt	198	600
4	ctgcag/CACACT	CAGTTG/gtaaga	96	94	63	tttcag/TTGAAC	AGCGAT/gtaagg	75	3.110
5	tcacag/CCTCGG	CGATCA/gtaagt	78	88	64	tgatag/AATGGA	TGTTCA/gtaagt	123	5.435
6	ttccag/ATTAAG	TTTCAT/gtaagt	93	7.686	65	ttacag/GAAGCA	GAAGAG/gtaagt	117	5.743
7	ccttag/ATTGAG	CGCCAC/gtaagt	182	4.718	66	tcttag/GGCACC	TGCCAG/gtaaga	231	5.855
8	tgatag/CTATGA	CAGAAG/gtaaag	197	1.514	67	tcctag/GCTATG	GATCAG/gtaaaa	183	1.317
8a	aaccag/CTTACA	GACCAG/gtgact	82	5.012	68	ttgcag/CATCCT	CAACAG/gtaatt	135	959
9	ttgcag/ATGTGG	GCTCAG/gtatgt	101	2.273	69	ttacag/GTTCTG	TGCAAG/gtaaaa	122	152
10	atacag/GGAAAG	TATAAT/gtaagt	102	3.708	70	caaaag/CAACCA	CCTCAG/gtcagt	142	2.651
11	ttgcag/AGCCTG	CACCAG/gtgact	138	8.616	71	aaatag/GTTTCC	ACACAG/gtagaa	132	1.066
12	tttcag/ATTAAT	TTCAAG/gtggga	165	1.117	72	attcag/GAAAAA	TACGAG/gtaagg	153	118
13	tttcag/AGCCTG	AAGACG/gtgtgt	113	834	73	ctccag/ACGCTG	TACCAG/gtatga	210	1.644
14	ttccag/AATCAA	TGGCAT/gtaagc	163	1.639	74	ttacag/AATGAA	CTTCAG/gtaatc	102	1.228
15	ttccag/AAATTT	ATTTGG/gtaaag	79	247	75	acttag/AAAGCA	TTAGAG/gtatgc	120	146
16	ttgtag/CTGGAG	AAAGAG/gtattt	189	1.457	76	tttcag/GATGTA	CACAAG/gtgaga	201	2.016
17	atgtag/GTACCC	CAACTT/gtaagt	165	942	77	tcataag/GTTTTT	TTGCAG/gtatgt	174	1.630
18	gtatag/GAAATG	ATAAAG/gtaaaa	150	2.569	78	ctctag/AAATGG	TACCAG/gtatgt	132	3.586
19	ttgtag/GCTGGA	TTGAAG/gtatgt	162	4.793	79	tattag/CAAATA	GCTCAG/gtcagc	197	2.037
20	taatag/CATCTT	GTCCAG/gtctct	159	372	80	tgtag/TTATAA	TTTTTT/gtaagt	133	1.367
21	ttcaag/ATCAAT	CACAAG/gtggga	174	2.718	81	ctttag/GAGTTT	CACCAG/gtaagt	183	418
22	ttttag/GAAGCA	TGGGAG/gtaaga	135	1.074	82	ttacag/CTCAA	CACAAG/gtaatt	147	1.683
23	ttgtag/TCTCTT	CATGAG/gtaca	159	1.744	83	ttttag/GAGTTT	AGAAAAG/gtgggt	177	2.119
24	aattag/GCCTGC	AAACGA/gttagt	212	142	84	acttag/ATACAA	TGTCAG/gtgagg	156	6.639
25	ttctag/GGGGAC	GAAAAAG/gtgta	91	827	85	ttccag/GATATA	ACTCAG/gtacta	153	5.908
26	ccttag/GCAATG	AGAGAG/gtaaac	110	585	86	gtctag/GTCAAT	CTTCAG/gtaaat	171	456
27	gcccag/GTATGA	CTACAG/gtaatt	127	1.520	87	tcttag/TCTCTG	TAAAAAG/gtatgc	131	2.629
28	atctag/GTCATA	TACCAG/gtaaaa	158	1.114	88	tgacag/GTGGAC	ATAAAG/gtgggt	205	1.125
29	aaccag/AATGGA	TAAAGG/gtaagt	148	626	89	ctgcag/GAGCTG	TTTGAG/gtccat	180	1.703
30	ttttag/AATATC	ACATCG/gtaagt	611	3.704	90	ttctag/TTTGTT	TTCTCT/gtattg	126	1.822
31	atcaag/GAAAAA	CGAATG/gtaagg	180	2.743	91	aaatag/AATCAT	CTGCAG/gttaga	155	107
32	tcttag/TCTTGA	GCAGAG/gtgagt	151	6.356	92	ttgtag/TGAGCT	TATAAG/gtaaac	145	1.237
33	ttacag/ATTGAA	CTTGAT/gtaagt	159	963	93	atacag/ATGTTA	GAACAG/gtgagc	95	1.256
34	tggtag/ATAAAT	CTGAAG/gtaatt	162	2.235	94	ccccag/ACCAGA	CTGAAG/gtagtg	235	5.491
35	ttttag/GAAGAA	TTGCAG/gtaaga	102	1.221	95	tcttag/AATAAA	GTAGAG/gtaaac	195	2.219
36	tttcag/GTCATG	CTAGAG/gtgcta	201	341	96	aaatag/ACCTGG	ATTAAG/gtatgt	126	8.940
37	atttag/GAGATA	TGAATG/gtgagt	172	722	97	atgcag/GAACTA	TTAAGG/gtaagt	156	1.970
38	ctgcag/ATCAAT	CTTTTCT/gtaaga	113	1.383	98	ttgcag/GTGGCC	CAGAAG/gtaagg	159	1.422
39	ctgaag/GATTTC	ACTGAG/gtagga	203	452	99	tgccag/GACTGC	ATCAAG/gtaaga	167	13.563
40	ttttag/ACTCCA	AAAGAG/gtatag	120	98	100	gtgtag/GGTGAA	CAGCAG/gtggga	163	5.794
41	ttacag/GGAACA	ATCAAG/gtata	292	1.157	101	tcacag/GATCTA	CATGAA/gtaaga	188	482
42	attcag/GAAATC	CTAAGG/gtaaag	152	753	102	catcag/AATCGA	TTTGAG/gtaaac	151	363
43	atttag/CCATCA	CTGCAG/gtgagg	310	2.101	103	atgcag/GCCTTT	CTCAGG/gtgagc	183	1.86
44	ttttag/GATTCT	CTGCAG/gtacta	165	976	104	ttgcag/CATTTT	CTGAAT/gtgagg	138	712
45	ttgtag/GAACTA	AACAAG/gtaagt	342	16.797	105	caacag/GGCTTC	ACTCCG/gtacgg	195	1.188
46	tttcag/GATTCA	ATAGAG/gtatgg	156	1.455	106	gtttag/GGCTTG	TGTCAG/gtaaca	277	1.777
47	ttttag/AAATTA	TAAAGT/gtaagt	266	1.682	106a	tttcag/ATGTAG	GAAAGC/gtcttc	61	
48	ttctag/AGGACC	CGCACA/gtaagt	2.101	2.286	107	tttcag/GTAAAT	CCCTAT/gtaagt	140	2.010
49	cactag/AATGTC	AGAAAG/gtaatc	323	2.287	108	ttctag/GGAAAG	AGTCAG/gtactg	115	695
50	cactag/GTATCT	CCAAAG/gtaata	145	5.466	109	ttccag/GTGCTT	CTGCAG/gtgagt	203	1.026
51	cttaag/GCCTTG	GAAGAA/gtgagt	219	4.994	110	tggtag/GAGATA	TGCCAG/gtacgc	201	938
52	aattag/ATTGAA	CAACAA/gtaaga	266	3.058	111	tttaag/GACTTC	CTAATG/gtaagt	129	1.484
53	ttttag/GCTTCT	TTTGAG/gtaagt	169	1.658	111a	ttccag/GGCTCT	CTAATG/gtaagt	171	1.484
54	ttttag/GAGCTT	GAGAAG/gtaata	156	2.505	112	tttcag/CAACTG	ACCCAG/gtgagt	192	1.080
55	tcacag/ATTAGC	CAAAAG/gtaaaa	141	1.849	113	tttcag/AACCCA	GCAAAG/gtaaga	84	448
56	gaacag/AAAATG	AATAAG/gtatgg	183	754	114	accag/CAGTTC	GAGCAG/gtaacg	50	273
57	ttccag/GCCACA	GTGCAG/gtaagt	137	6.096	115	tgccag/GGTCCC	GCTTCT	1.114	
58	atctag/ATGGCT	GCTGAT/gtaagt	186	1.717					

Das NUANCE Gen liegt auf Chromosom 14 (14q22.1-q22.3) des menschlichen Genoms und umfasst mehr als 373 kb mit 115 Exons. Introns nehmen mehr als 94 % des gesamten Gens ein. Ungefähr 6 kb hinter dem NUANCE Gen liegt das Gen für den Östrogen-Rezeptor2. Die Exon-Intron Übergänge des NUANCE Gens sind

konsistent mit der Konsensus-Sequenz 5'-GT...AG-3' (Breathnach & Chambon, 1981). Zusätzliche Exons 1a (EST-Klon BI026470), 8a (EST-Klon AF435010), 106a (EST-Klon AB023228) und 111a (EST-Klon AL117404) deuten darauf hin, dass zusätzliche Isoformen des NUANCE Proteins existieren. Tab. 3.1 stellt die Exon-Intron Organisation tabellarisch, Abb. 3.2 graphisch dar.

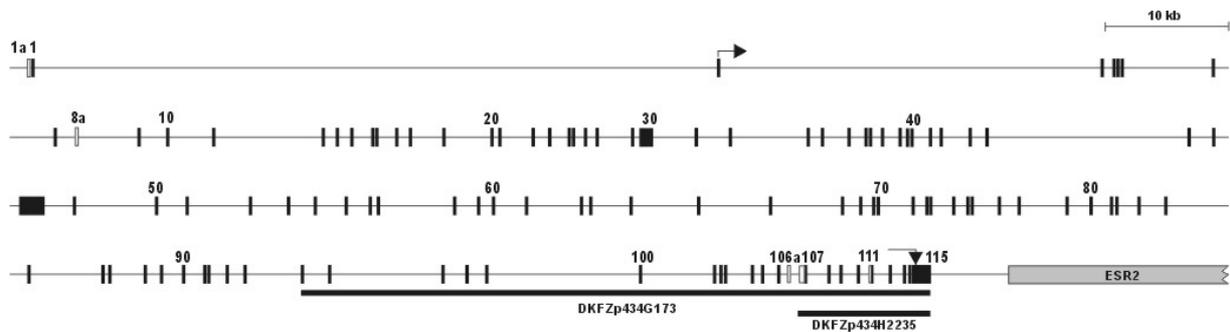


Abbildung 3.2 Exon-Intron Organisation des humanen NUANCE Gens

Introns sind als Linien, Exons als ausgefüllte Rechtecke repräsentiert. Zusätzliche Exons (1a, 8a, 106a, 111a) sind durch leere Rechtecke repräsentiert. Start- und Stopp-Kodon sind durch abgewinkelte Pfeile dargestellt. Das Östrogen-Rezeptor2 Gen liegt hinter dem NUANCE Gen. Genomische Sequenzen der Klone DKFZp434G173 und DKFZp434H2235 sind durch dicke Linien angezeigt. Balken 10 kb.

3.1.2 Struktureller Aufbau des NUANCE Proteins

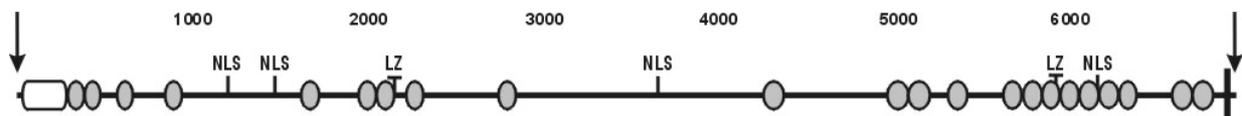


Abbildung 3.3 Aufbau des NUANCE Proteins

Die Aktin-Bindungs-Domäne (ABD) wird am N-Terminus durch eine leere Box, die Spektrin-Domänen durch graue Ovale und die Transmembran-Domäne durch einen schwarzen Balken am C-Terminus repräsentiert. Die Positionen von potentiellen nukleären Lokalisationssignalen (NLS) und Leucin-Zippern (LZ) sind ebenfalls eingezeichnet. Die Pfeile kennzeichnen den Anfang und das Ende des Proteins.

Das NUANCE Gen kodiert für ein Protein mit 6883 Aminosäuren und einer Masse von 796 kDa. In diesem Protein können drei unterschiedliche Domänen mit den Programmen SMART und TMHMM (<http://www.expasy.ch>) identifiziert werden (Abb. 3.3). Der N-terminale Teil des Proteins enthält eine Aktin-Bindungs-Domäne (ABD), die aus zwei Calponin-homologen Domänen (CHD) zusammengesetzt ist. Im Anschluss an die ABD befindet sich ein langer α -helikaler Abschnitt, der vier nukleäre Lokalisationssignale (Aminosäuren 1.188-1.205, 1.464-1.467, 3.629-3.645

und 6.115-6.132) sowie zwei Leucin-Zipper (Aminosäuren 2.127-2.148 und 5.008-5.029) und 22 Spektrin-Domänen enthält. Der C-terminale Teil des Proteins besteht aus einer einzelnen Transmembran-Domäne vom Typ II.

3.1.3.1 Die Aktin-Bindungs-Domäne von NUANCE

Vergleicht man die ABD von NUANCE (Aminosäuren 1-255), so besitzt diese eine beträchtliche Homologie zu ABDs, die in den vor kurzem beschriebenen Proteinen Enaptin (Braune, 2001) und Calmin (Ishisaki et al., 2001) zu finden sind. Dabei unterscheiden sich die drei ABDs von den herkömmlichen ABDs durch eine 30 Aminosäuren lange Insertion zwischen den beiden CHDs (Abb.3.4). NUANCE und Enaptin teilen sich 49 % identische Aminosäuren während NUANCE und Calmin zueinander 45 % identisch sind. Die phylogenetische Analyse dieser drei mit den herkömmlichen ABDs durch die Programme ClustalW und TreeView (<http://www.expasy.ch>) schlägt eine eigene Familie innerhalb der α -Aktinin Superfamilie vor (Abb. 3.5).

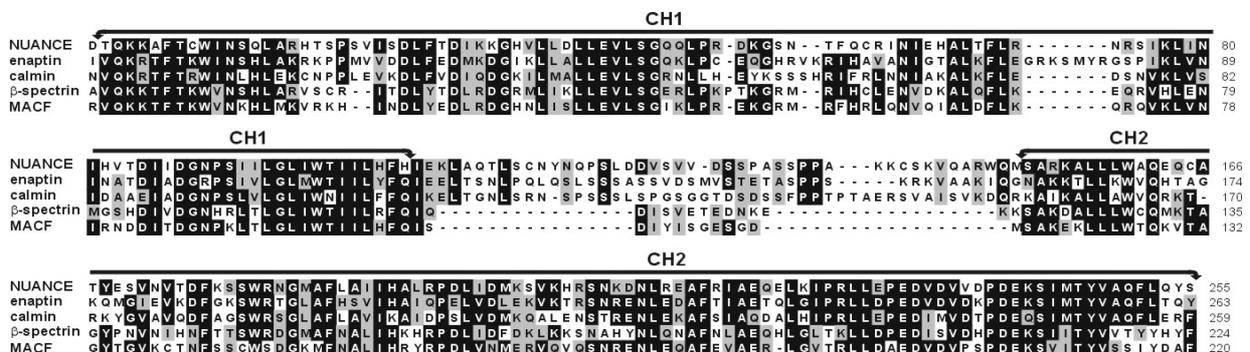


Abbildung 3.4 Vergleich von Aktin-Bindungs-Domänen (ABD) verschiedener Proteine

Vergleich der ABDs von NUANCE, Enaptin (AAN03486), Calmin (BAB59010), β -Spektrin (AAA60580) und MACF (AAD32244). NUANCE, Enaptin und Calmin besitzen im Gegensatz zu β -Spektrin und MACF einen Serin-reichen Abschnitt zwischen den Calponin-homologen Domänen.

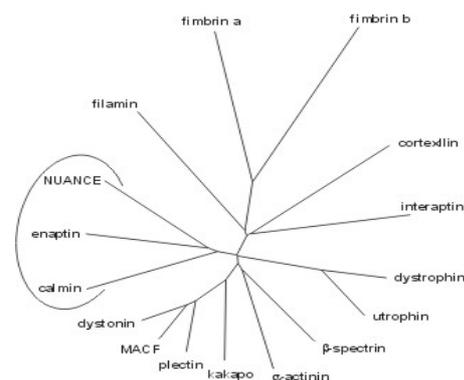


Abbildung 3.5 Phylogenetische Analyse der ABDs von NUANCE und anderen Proteinen der α -Aktinin Superfamilie

Proteine der α -Aktinin Superfamilie: α -Aktinin, β -Spektrin, Calmin, Cortexillin, Dystonin, Dystrophin, Enaptin, Filamin, Fimbrin, Interaptin, kakapo, MACF, NUANCE, Plektin und Utophin. Die Namen der Proteine sind in der Abb. in englischer Sprache dargestellt.

3.1.3.2 Die Klarsicht-Domäne von NUANCE

Der C-Terminus enthält eine 78 Aminosäuren lange Region, die aus einem Hals („Neck“), einer Transmembran-Domäne (TMD) und dem C-terminalen Bereich des Proteins besteht. Dieser gesamte Bereich ist hoch konserviert (Abb. 3.6) und wurde zum ersten Mal bei dem *D. melanogaster Klarsicht* Protein entdeckt, das in nukleäre Migration und Positionierung des Zellkerns involviert ist (Apel et al., 2000; Mosley-Bishop et al., 1999). Deshalb wird dieser gesamte C-terminale Teil auch als *Klarsicht*-Domäne bezeichnet.

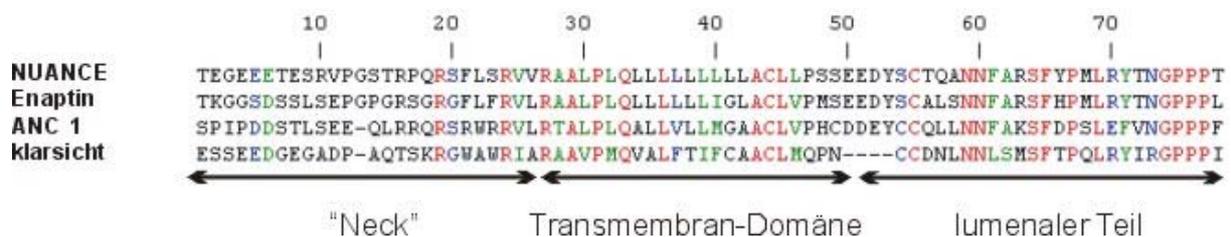


Abbildung 3.6 Vergleich der Klarsicht-Domänen verschiedener Proteine

Vergleich der *Klarsicht*-Domänen von NUANCE, Enaptin, ANC1 und *Klarsicht*. Enaptin (AAN03486), *C. elegans* ANC1 (Q9N4M4), *D. melanogaster Klarsicht* (AAD43129). Diese sogenannte *Klarsicht*-Domäne besteht aus einem Hals („Neck“), einer hydrophoben Transmembran-Domäne und einem lumenalen Teil, der bei allen Proteinen mit drei Prolinen und einer zusätzlichen Aminosäure endet.

3.2 Nachweis einer großen NUANCE Isoform

3.2.1 Westernblotanalyse

Um zu zeigen, dass NUANCE in der Form eines riesigen Proteins von 800 kDa wirklich exprimiert ist, wurde das Protein in COS7- und HEK293-Zellen mit Hilfe von verschiedenen Antikörpern im Westernblot nachgewiesen. Dafür standen mAk K20-478-4, mAk K49-260-1 und pAb K1 zur Verfügung. mAk K20-478-4 ist gegen die ABD des NUANCE Proteins gerichtet, mAk K49-260-1 und die polyklonalen α -NUANCE Antikörper sind gegen die letzten beiden Spektrin-Domänen des NUANCE Proteins gerichtet. Für die Generierung der C-terminalen Antikörper wurde das Fusionsprotein GST-K1 (Aminosäuren 6.546-6.796) als Antigen eingesetzt. Alle Antikörper detektieren in COS7- und HEK293-Zellen ein ungefähr 800 kDa großes Protein (Abb. 3.7).

3.2.2 Northernblotanalyse

Um die NUANCE-mRNA nachzuweisen wurde aus HEK293-Zellen Gesamt-RNA isoliert, die RNA in einem 0,7 %igen Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und unter alkalischen Bedingungen auf eine Zeta-Probe® Membran transferiert. Der Northernblot wurde daraufhin mit einer radioaktiv markierten RNA-Probe, die den Basen 19.918-20.698 der NUANCE cDNA entsprechen, hybridisiert. Es konnte eine einzige Bande detektiert werden. Durch Größenvergleich der Bande mit der rRNA ließ sich eine ungefähre Größe von 21 kb abschätzen (Abb. 3.7 D). Die Belichtungszeit betrug 4 Wochen.

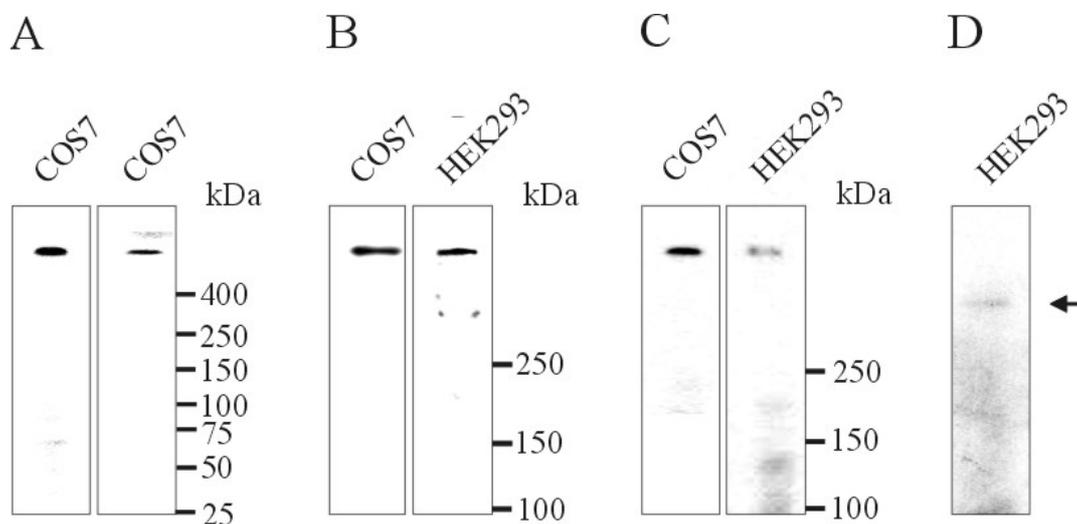


Abbildung 3.7 Nachweis der 800 kDa großen NUANCE Proteins in COS7 und HEK293-Zellen

(A) Westernblotanalyse von COS7-Zell-Lysaten mit mAk K20-478-4 (links) und mAk K49-260-1 (rechts). mAk K20-478-4 ist gegen die ABD des NUANCE Proteins, mAk K49-260-1 ist gegen die letzten beiden Spektrin-Domänen des NUANCE Proteins gerichtet. (B) Westernblotanalyse von COS7- und HEK293-Zell-Lysaten mit pAb K1. (C) Westernblotanalyse von COS7- und HEK293-Zell-Lysaten mit mAk K20-478-4. (D) Northernblotanalyse von HEK293-Gesamt-RNA mit einer radioaktiv markierten RNA-Probe. Der Pfeil zeigt auf die einzige Bande, die auf diesem Blot detektiert werden konnte. (A-C) Gesamtzellhomogenate von COS7- und HEK293-Zellen wurden in 3-15 %igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und einer Westernblotanalyse unterzogen. Die Detektion der monoklonalen Antikörper erfolgte mit einem sekundären α -Maus Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz. Die Detektion des polyklonalen Antikörpers erfolgte mit einem sekundären α -Kaninchen Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz. (D) Nachweis der NUANCE-mRNA in einem 0,7 %igen Agarosegel. Der Blot wurde mit der RNA-Probe des pGem-Teasy® HE 5'7/HE 3'6 Plasmids (Basen 19.918-20.698 der NUANCE cDNA) hybridisiert. (Die Immundetektion durch pAb K1 wurde mit freundlicher Unterstützung von H. Zaim durchgeführt).

3.3 Subzelluläre Lokalisierung des NUANCE Proteins

3.3.1 Lokalisierung von NUANCE in der Zellkern-Membran

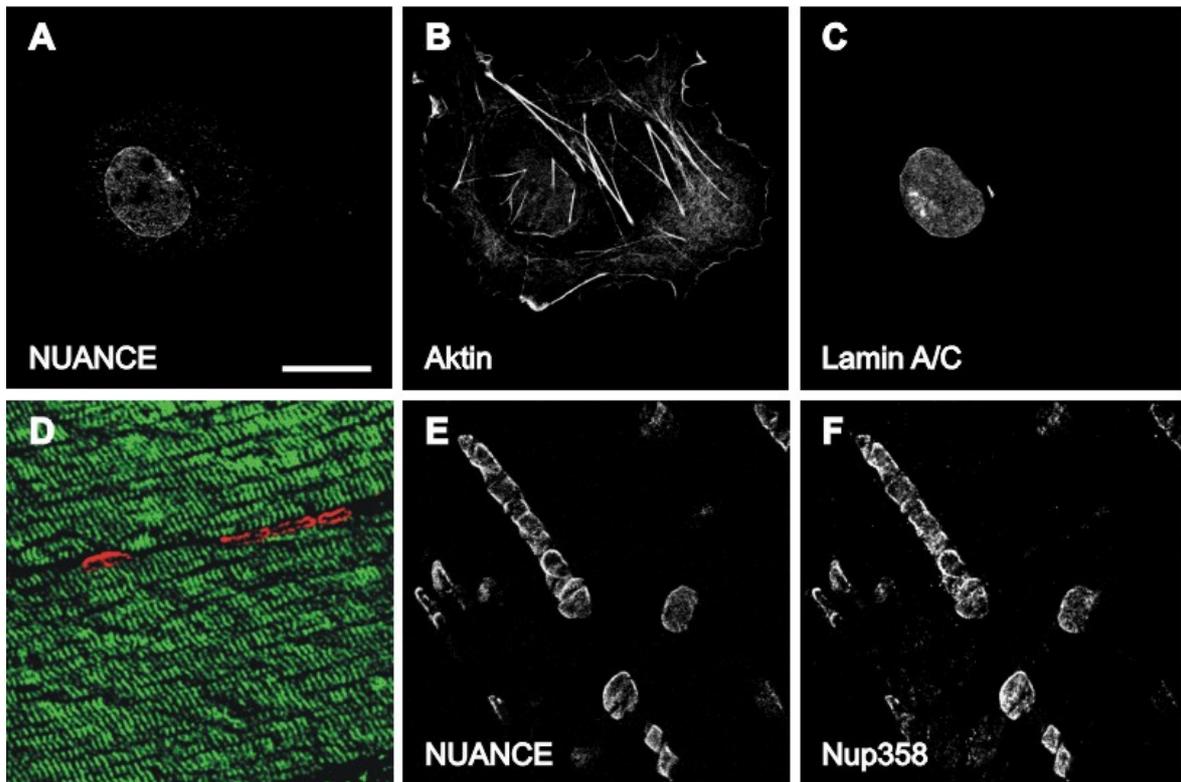


Abbildung 3.8 Nukleäre Lokalisierung des NUANCE Proteins in COS7-Zellen (A-C) und Muskelgewebe (D-F)

(A) NUANCE Färbung durch pAb K1 (sekundärer Antikörper α -Kaninchen TRITC-Konjugat), (B) Aktinfärbung durch FITC-Phalloidin, (C) Lamin A/C Färbung durch monoklonalen α -Lamin A/C Antikörper (JOL2) (sekundärer Antikörper α -Maus Cy5-Konjugat). (D-F) Schnitt durch humanen quergestreiften Muskel. (D) F-Aktinfärbung durch FITC-Phalloidin (grün), NUANCE Färbung (rot) durch mAk K49-260-1 (sekundärer Antikörper α -Maus Cy3-Konjugat). (E) NUANCE Färbung durch mAk K49-260-1 (sekundärer Antikörper α -Maus Cy3-Konjugat). (F) Färbung der Kernporenkomplexe mit α -Nup358 Antikörper (sekundärer Antikörper α -Kaninchen FITC-Konjugat). Die Zellen sowie der humane Muskelquerschnitt wurden mit 3 % PFA fixiert und mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. Die Bilder wurden mit dem konfokalen Laser Scan Mikroskop aufgenommen. Balken 25 μ m.

Mit Hilfe von mAk K20-478-4 wurde gezeigt, dass NUANCE in der Zellkernmembran lokalisiert ist (Zhen, 2001). Immunfluoreszenzanalysen mit den neu generierten mono- und polyklonalen α -NUANCE Antikörpern, die gegen den C-Terminus gerichtet sind, zeigen dieselbe Färbung wie mAk K20-478-4 in COS7-Zellen. Abb. 3.8 A-C zeigt eine Zelle, deren Kernmembran durch pAb K1 (Abb. 3.8 A), das Aktin-Cytoskelett durch FITC-Phalloidin (Abb. 3.8 B) und die Kernmembran durch einen α -Lamin A/C Antikörper (JOL2) gefärbt wurde. Eine zusätzliche DNA-Färbung durch DAPI wurde ebenfalls durchgeführt (nicht gezeigt). Abb. 3.8 D zeigt einen humanen Muskelquerschnitt, der mit mAk K49-260-1 und FITC-Phalloidin gefärbt wurde. Die

Zellkerne, deren Membran NUANCE-positiv ist, befinden sich zwischen dicht gepackten Abschnitten von Aktinfilamenten. Um nachzuweisen, dass es sich tatsächlich um Zellkerne handelt, wurde ein weiterer Muskelschnitt mit mAk K49-260-1 und Nup358, einem Protein des Kernporenkomplexes, gefärbt und eine übereinstimmende Lokalisation festgestellt (Abb. 3.8 E, F).

3.3.2 Subzelluläre Fraktionierung

Durch Immunfluoreszenzaufnahmen wurde gezeigt, dass NUANCE hauptsächlich in der Kernmembran von Säugerzellen zu finden ist. Diese Lokalisation wurde auch durch biochemische Methoden bestätigt. Dazu wurden COS7-Zellen lysiert und durch differentielle Zentrifugation in eine cytosolische, eine membranäre und eine nukleäre Fraktion aufgeteilt (2.3.12). Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden in einem 3-15 %igen SDS-PAA-Gradientengel aufgetrennt und einer Westernblotanalyse mit dem α -NUANCE Antikörper mAk K20-478-4 unterzogen (Abb. 3.9). Der Antikörper erkennt ein Protein von ungefähr 800 kDa in der Kernfraktion, während die weiteren Banden wahrscheinlich Abbauprodukte sind. In der Membranfraktion ist ein schwaches Signal zu erkennen. Die cytosolische Fraktion ist frei vom NUANCE Protein. Zur Überprüfung der subzellulären Fraktionierung wurde der Blot mit α -Lamin B (LN43) und α -Annexin A7 (mAk K203-80) Antikörpern geprobt. Lamin B ist ein Protein der Kernlamina, Annexin A7 ist vor allem im Cytosol lokalisiert. Beide Proteine sind nach der subzellulären Fraktionierung in den entsprechenden Fraktionen zu finden.

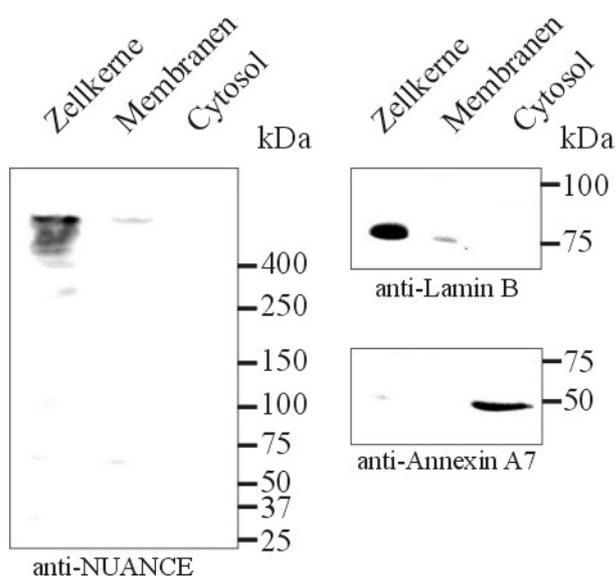


Abbildung 3.9 Subzelluläre Fraktionierung von COS7-Zellen

Westernblotanalyse von cytosolischer, membranärer und nukleärer Fraktion von COS7-Zellen. NUANCE wurde mit α -NUANCE Antikörper mAk K20-478-4 nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde die Verteilung des Kernproteins Lamin B und des cytosolischen Proteins Annexin A7 mit entsprechenden Antikörpern (LN43, mAk 203-80) nachgewiesen. Die Proteine wurden in einem 3-15 %igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären α -Maus Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz. (Immunodetektion durch α -Lamin B Antikörper mit freundlicher Unterstützung von M. Munck).

3.3.3 NUANCE ko-lokalisiert nicht mit Proteinen des Kernporenkomplexes

In weiteren Verlauf der Arbeit sollte die Lokalisation von NUANCE im Zellkern genauer untersucht werden. Für ein Transmembranprotein des Zellkerns gibt es die Möglichkeit der Verankerung in der inneren und/oder äußeren Kernmembran. Die Färbungen durch den N-terminalen monoklonalen α -NUANCE Antikörper (mAk K20-478-4) zeigen in der Aufsicht der Zellkernmembran eine punktförmige Verteilung (Abb. 3.10 A). Die Lokalisation ist der von Kernporenkomplexen ähnlich wie der Vergleich mit der Verteilung des α -Nup358 Antikörpers zeigt (Abb. 3.10 B). Nup358 ist eines von mehr als 50 Proteinen des Kernporenkomplexes, das auf der äußeren Kernmembran lokalisiert ist (Yokoyama et al., 1995; Wilken et al., 1995; Yang et al., 1998). Die Frage war nun, ob NUANCE als strukturelles Protein eventuell an Proteinen des Kernporenkomplexes (NPK) assoziiert ist, die auf der cytosolischen Seite liegen. Die Überlagerung der beiden Färbungen zeigt nur eine zufällige Überlappung der beiden Fluoreszenzsignale und somit keine Ko-Lokalisierung von NUANCE und Nup358 (Abb. 3.10).

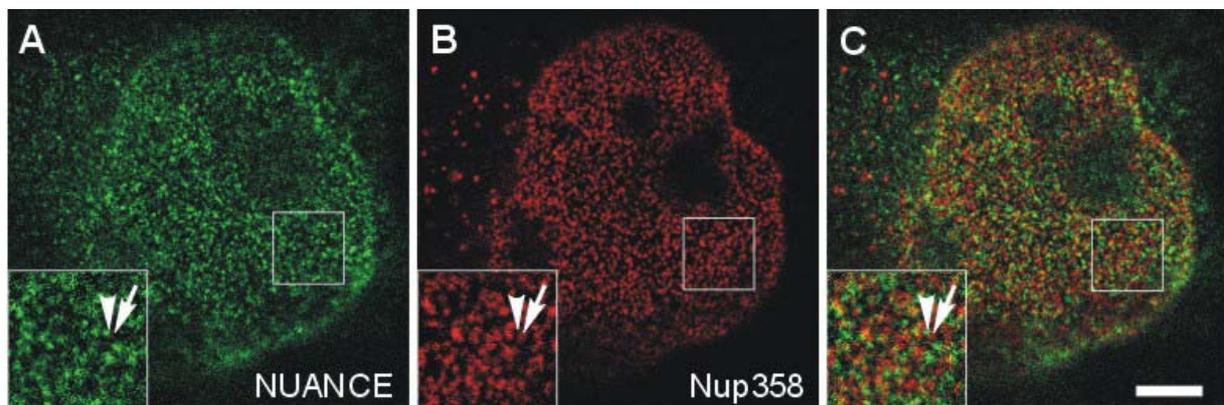


Abbildung 3.10 Lokalisierung des NUANCE Proteins und Proteinen des Kernporenkomplexes in COS7-Zellen

(A) Färbung durch mAk K20-478-4 (sekundärer Antikörper α -Maus Alexa 488-Konjugat), (B) Nup358 Färbung (sekundärer Antikörper α -Kaninchen Alexa 568-Konjugat) und (C) die korrespondierende Überlagerung. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt deutlich, dass NUANCE (Pfeilspitze) und Nup358 (Pfeil) nicht ko-lokalisiert sind und die gelben Überlappungen nur zufällig bedingt sind (C). Die Zellen wurden mit 3 % PFA fixiert und mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. Die Bilder wurden mit dem konfokalen Laser Scan Mikroskop aufgenommen. Balken 5 μ m.

3.3.4 NUANCE ist auf der äußeren Zellkernmembran lokalisiert

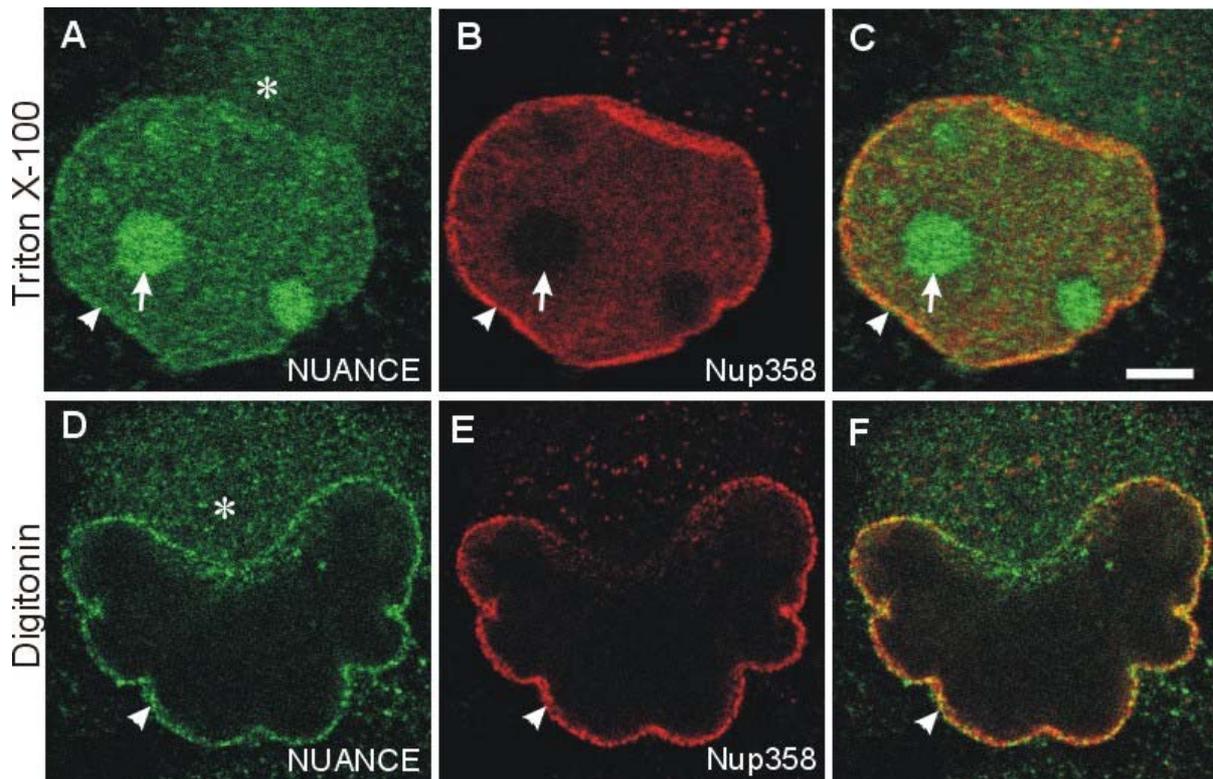


Abbildung 3.11 NUANCE ist in der äußeren Kernmembran lokalisiert

(A, D) Färbung von COS7-Zellen mit α -NUANCE mAk K20-478-4 (sekundärer Antikörper α -Maus Alexa 488-Konjugat), (B, E) Nup358 Färbung (sekundärer Antikörper α -Kaninchen Alexa 568-Konjugat) und (C, F) die korrespondierenden Überlagerungen. (A-C) Triton X-100 permeabilisierte Zelle, (D-F) Digitonin permeabilisierte Zelle. Die Pfeilspitzen (A-F) zeigen eine Färbung der Kernmembran in Triton X-100 und Digitonin behandelten Zellen. Der Pfeil (A-C) zeigt eine NUANCE-positive intranukleäre Färbung nach Triton X-100 Behandlung. Des Weiteren erkennt man eine cytoplasmatische NUANCE Färbung (A, D), die immer an einer Seite des Kerns lokalisiert ist (Stern). Die Zellen wurden mit 3 % PFA fixiert und mit 0,5 % Triton X-100 oder 40 μ g/ml Digitonin permeabilisiert. Die Bilder wurden mit dem konfokalen Laser Scan Mikroskop aufgenommen. Balken 5 μ m.

Ein weiterer Ansatz zu klären, ob sich NUANCE auf der äußeren oder inneren Kernmembran befindet, bestand darin, Immunfluoreszenzen von COS7-Zellen zu vergleichen, die einerseits mit Triton X-100 und andererseits mit Digitonin permeabilisiert wurden. Digitonin permeabilisiert nur die Plasmamembran und lässt die intrazellulären Membranen wie die Kernmembran intakt (Adams et al., 1990). Deshalb kann der Antikörper nur die Antigene auf der äußeren Kernmembran erreichen, aber nicht die Proteine im Inneren des Zellkerns oder der inneren Kernmembran. Triton X-100 hingegen permeabilisiert alle Membranen, auch die beiden Kernmembranen. Die Zellen wurden nach Fixierung mit 3 %igem PFA gar nicht permeabilisiert oder nach der Fixierung mit Triton X-100 oder mit Digitonin behandelt. Danach wurden die Zellen mit mAk K20-478-4, α -Nup358 Antikörper oder

dem α -Lamin B Antikörper (LN43) inkubiert. Nicht permeabilisierte Zellen zeigen keine Färbung (nicht gezeigt). Triton X-100 permeabilisierte Zellen detektieren NUANCE, Nup358 (Abb. 3.11 A-C) und Lamin B (nicht gezeigt). Digitonin permeabilisierte Zellen detektieren NUANCE und das auf der cytosolischen Seite liegende Nup358 (Abb. 3.11 D-F), jedoch nicht Lamin B (nicht gezeigt). Die Schlussfolgerung dieses Experimentes lautet, dass NUANCE auf der äußeren Kernmembran nachgewiesen werden kann. Eine Aussage über eine Lokalisierung in der inneren Kernmembran konnte zu diesem Zeitpunkt noch nicht gemacht werden.

3.3.5 NUANCE ko-lokalisiert mit einem Nucleoli-Marker

In Triton X-100 permeabilisierten Zellen beobachtet man häufig nach Färbung mit mAk K20-478-4 eine intranukleäre NUANCE Färbung in Form kleiner, runder Nucleoli-ähnlicher Strukturen (Abb. 3.11 A-C und Abb. 3.12). Diese Strukturen wurden mit einem α -Nucleolus Antikörper (NO38) als Nucleoli identifiziert. Die Überlagerung der beiden Färbungen zeigt eine NUANCE Lokalisation im Nucleolus (Abb. 3.12).

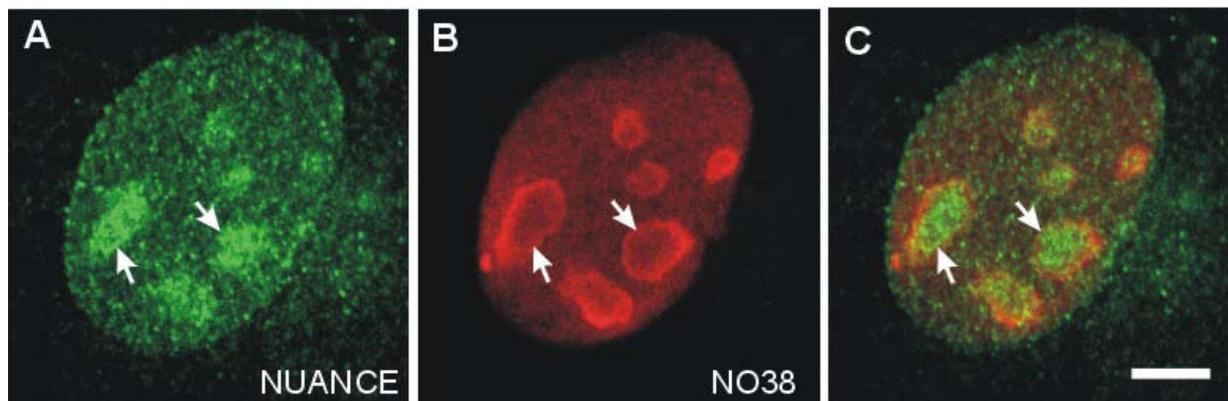


Abbildung 3.12 Triton X-100 permeabilisierte COS7-Zellen weisen eine intranukleäre NUANCE Färbung auf

(A) Färbung von COS7-Zellen durch mAk K20-478-4 (sekundärer Antikörper α -Maus Alexa 488-Konjugat), (B) Färbung durch α -Nucleolus Antikörper NO38 (sekundärer Antikörper α -Kaninchen Alexa 568-Konjugat) und (C) die korrespondierende Überlagerung. Die Pfeile weisen auf die Ko-Lokalisation von NUANCE und den Nucleoli. Die Zellen wurden mit 3 % PFA fixiert und mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. Die Bilder wurden mit dem konfokalen Laser Scan Mikroskop aufgenommen. Balken 5 μ m (mit freundlicher Unterstützung von E. Korenbaum).

3.3.6 Umverteilung von NUANCE bei der Zell-Migration

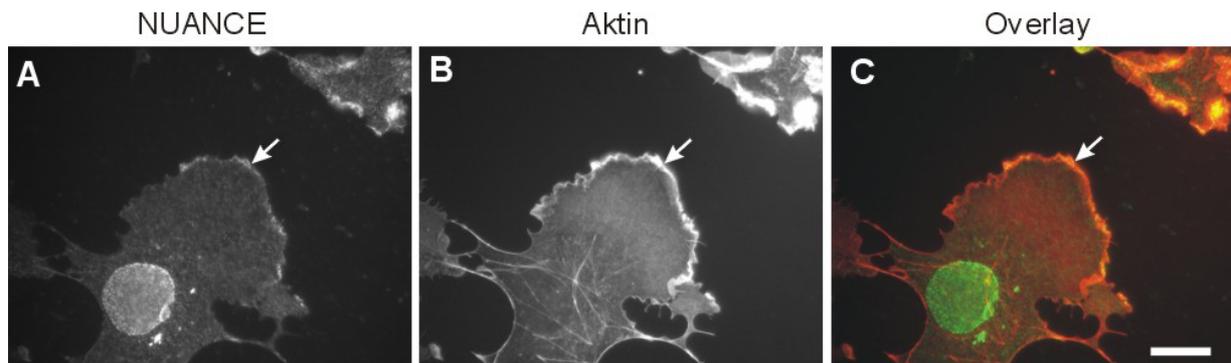


Abbildung 3.13 COS7-Zellen im „Wundheilungs-Test“

COS7-Zellen wurden durch Verletzung stimuliert, sich zu polarisieren und Führungslamellen auszubilden. (A) NUANCE Färbung durch mAk K20-478-4 (sekundärer Antikörper α -Maus FITC-Konjugat), (B) Aktinfärbung durch TRITC-Phalloidin und (C) die korrespondierende Überlagerung (NUANCE, grün; Aktin, rot). Der Pfeil zeigt eine deutliche Ko-Lokalisation beider Proteine an der Front der Führungslamelle. Die Zellen wurden mit 3 % PFA fixiert und mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. Die Bilder wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop (Leica) aufgenommen. Balken 20 μ m.

Im Rahmen von Stimulationsexperimenten wurde ein sogenannter „Wundheilungs-Test“ durchgeführt. Dabei wurde eine konfluente Schicht von COS7-Zellen mit einer Pipettenspitze „verletzt“ und die Zellen nach 6 Std mit 3 % PFA fixiert. Die entstandenen Lücken im Monolayer stimulieren die Zellen, indem sie sich polarisieren und eine Führungslamelle bilden. Innerhalb der Front dieser Führungslamelle konnte man eine zusätzliche NUANCE-positive Struktur erkennen (Abb. 3.13 A). Diese Färbung erfolgt im Bereich des supraplasmalemmalen kortikalen Aktinnetzwerks in der Spitze der Führungslamelle (Abb. 3.13 C).

3.4 NUANCE bindet F-Aktin *in vitro*

3.4.1 Aktin-Bindungs Analyse

Die Wundheilungs-Experimente zeigten, dass NUANCE *in vivo* mit F-Aktin ko-lokalisiert. Ein GFP-Fusionsprotein mit der ABD von NUANCE ko-lokalisierte ebenfalls deutlich mit F-Aktin *in vivo* (Zhen, 2001). Die Aktin-Bindung durch die ABD von NUANCE wurde *in vitro* in einem F-Aktin-Ko-Sedimentationsversuch getestet (2.3.13). Das Ergebnis des Versuchs (Zentrifugation bei 125.000 x g; „High-speed spin down assay“) ist in Abb. 3.14 A dargestellt. Polymerisiertes Aktin pelletiert unter den verwendeten Bedingungen, das rekombinante ABD-Fusionsprotein (6xHis-ABD) befindet sich unter den gleichen Bedingungen hauptsächlich im Überstand. Im

Versuchsansatz, in dem beide Proteine zugegeben sind, zeigt sich jedoch, dass 6xHis-ABD mit F-Aktin sedimentieren kann. Der Aktin-Bündelungs Test (Zentrifugation bei 20.000 x g; „Low-speed spin down assay“) ist in Abb. 3.14 B dargestellt. Polymerisiertes Aktin sowie das Fusionsprotein 6xHis-ABD befinden sich im Überstand. Der Versuchsansatz, in dem beide Proteine zugegen sind, zeigt jedoch, dass F-Aktin mit 6xHis-ABD sedimentieren kann, was auf eine Bündelung der Aktinfilamente durch die ABD von NUANCE schließen lässt.

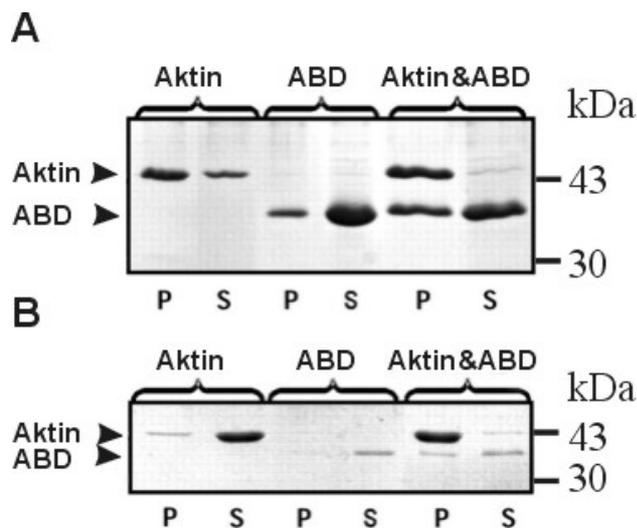


Abbildung 3.14 F-Aktin-Bindung von 6xHis-ABD *in vitro*

(A) „High-speed spin down assay“: Ko-Sedimentation von 2,5 μM Aktin und 10 μM 6xHis-ABD durch Ultrazentrifugation (125.000 x g). (B) „Low-speed spin down assay“: Ko-Sedimentation von 2,5 μM Aktin und 6xHis-ABD durch Zentrifugation bei 20.000 x g. (A, B) Die Positionen von Aktin und 6xHis-ABD sind am linken Rand der Gele angezeigt. Pellet (P), Überstand (S). Die Proben wurden in einem 12 %igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie gefärbt.

3.4.2 Beeinflussung der Aktin-Polymerisation durch NUANCE

Aktin-bindende Proteine besitzen häufig die Fähigkeit, die Polymerisation von G- nach F-Aktin zu beeinflussen. Um dies festzustellen, wird eine Lösung von Pyren-markiertem Aktin mit MgCl_2 (2 mM Endkonzentration) und KCl (100 mM Endkonzentration) versetzt (2.3.14). Durch die Zugabe der Ionen wird die Polymerisation des F-Aktins gestartet. Die Polymerisation von G- nach F-Aktin wird durch die ca. 20 x erhöhte Pyren-Aktin-Fluoreszenz-Emission gemessen. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abb. 3.15 dargestellt. Die Aktin-Polymerisation ohne 6xHis-ABD (0 μM) dient als Kontrolle. Steigende Konzentrationen (2-8 μM) des Fusionsproteins beeinflussen die Polymerisationsrate und lassen die Polymerisation von Aktin schneller ablaufen. Dabei erreicht der Versuchsansatz mit einer Konzentration von 8 μM 6xHis-ABD fast doppelt so schnell das Sättigungsmaximum wie die Kontrolle.

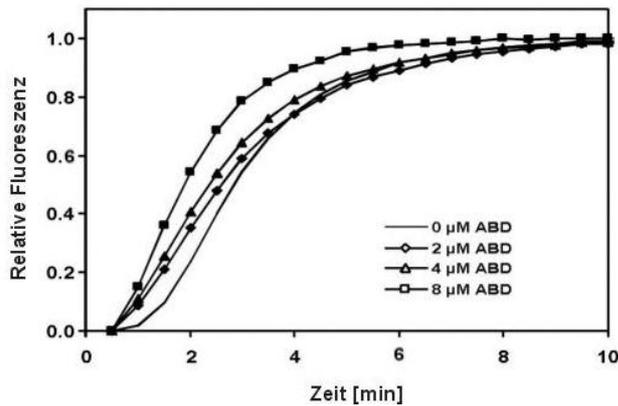


Abbildung 3.15 Beeinflussung der Aktin-Polymerisation durch 6xHis-ABD *in vitro*

6xHis-ABD wurde in verschiedenen Konzentrationen (0-8 μM) mit 8 μM Pyrenmarkiertem Aktin inkubiert. Die Polymerisationsrate lässt sich durch die emittierte Fluoreszenz messen. Die x-Achse ist die Zeitachse (min), die y-Achse stellt die relative Fluoreszenz dar.

3.4.3 Bestimmung der Affinität der ABD von NUANCE zu F-Aktin

Um die Dissoziationskonstante K_d von 6xHis-ABD und F-Aktin zu bestimmen, wurden Bindungsanalysen mit verschiedenen Konzentrationen von Aktin und 6xHis-ABD durchgeführt (Abb. 3.14 A). Die Pellets und Überstände von 12 unabhängigen Experimenten wurden in SDS-PAA-Gelen aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt und anschließend densitometrisch ausgewertet (Mengenbestimmung). Mit Hilfe der Werte und der in (1) gezeigten Formel konnte die Dissoziationskonstante K_d bestimmt werden. Abb. 3.16 zeigt einen Graph, in dem das freie 6xHis-ABD gegen das Verhältnis des gebundenen 6xHis-ABD zu Aktin aufgetragen ist (leere Kreise). Mit Hilfe einer nicht linearen Regression konnte die theoretisch beste Kurve ermittelt werden (durchgehende Linie). Die ermittelte Dissoziationskonstante von 6xHis-ABD zu Aktin ($K_d = 3,8 \pm 1 \mu\text{M}$) ist höher als die Dissoziationskonstanten korrespondierender Domänen, wie z.B. von Dystrophin ($K_d 44 \mu\text{M}$; Way et al, 1992), Utrophin ($K_d 19 \mu\text{M}$; Winder et al., 1995) und liegt in derselben Größenordnung wie die von Enaptin ($K_d 5,7 \mu\text{M}$; Braune, 2001). Die Sättigung des Verhältnisses bei hohen 6xHis-ABD Konzentrationen zeigt ein molares Verhältnis von einem 6xHis-ABD zu einem Aktin-Monomer.

$$(1) \quad K_d = \frac{[A][N]}{[AN]}$$

K_d = Dissoziationskonstante

$[A]$ = Aktin Konzentration

$[N]$ = 6xHis-ABD Konzentration

$[AN]$ = Konzentration der beiden gebundenen Proteine (Aktin/6xHis-ABD)

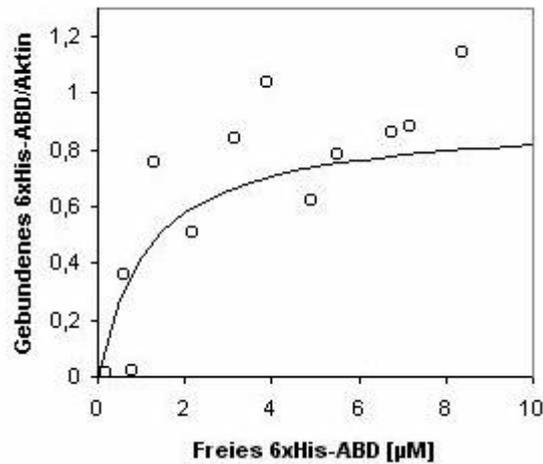


Abbildung 3.16 Affinität der ABD von NUANCE zu F-Aktin

Die x-Achse gibt die Konzentration des freien Fusionsproteins 6xHis-ABD wieder, die y-Achse stellt das Verhältnis von gebundenem Fusionsprotein zu Aktin dar. Die 12 unabhängigen Experimente sind als leere Kreise dargestellt, die dazu korrespondierende nicht lineare Regression ist als durchgehende Linie dargestellt.

3.5 NUANCE bindet Lamin A/C *in vitro* und *in vivo*

3.5.1 NUANCE und Lamin A interagieren miteinander im „Yeast Two-Hybrid“-System

Enaptin ist ein Protein, das NUANCE in seiner strukturellen Organisation sehr ähnlich ist. Es besitzt eine ABD (Abb. 3.4), einen langen helikalen aus Spektrin-Domänen bestehenden Teil und eine Transmembran-Domäne (Abb. 3.6). Mislow et al. (2002) zeigten für eine Isoform von Enaptin (Nesprin1 α), dass die letzten drei Spektrin-Domänen vor der TMD für eine Lamin A/C-Bindung *in vitro* verantwortlich sind. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der beiden Proteine auf Aminosäureebene (45 %) kann man annehmen, dass NUANCE ebenfalls mit Lamin A/C interagiert. In einem ersten Versuch wurde die direkte Interaktion der beiden Proteine *in vivo* im „Yeast Two-Hybrid“-System getestet. Dafür wurden die vier Plasmide pGADT7-SR, pGBKT7-SR, pGAD24-Lamin A und pGBT9-Lamin A eingesetzt, die für Fusionsproteine mit Aktivierungsdomäne (GAD) und Bindungsdomäne (GBK und GBT) des *LacZ* Reporter Gens kodieren. SR enthält die letzten vier Spektrin-Domänen des NUANCE-Proteins ohne die TMD (Abb. 3.17 A; Aminosäuren 6.146-6.799; 46 % Identität und 59 % Homologie zu Enaptin). Lamin A wurde als vollständiges Protein exprimiert. Die Versuche wurden im Hefestamm Y190 durchgeführt. Je zwei Plasmide wurden in die Hefezellen ko-transformiert. Nachdem die Ko-Transformation von zwei Plasmiden durch positive Kolonien auf SD/-Leu/-Trp-Platten verifiziert wurde, wurden diese Kolonien einem β -Galaktosidasetest (2.5.2)

unterzogen (Tab. 3.2). Zusätzlich wurden positive Kolonien auf SD/-His/-Leu/-Trp/+3-AT ausgestrichen, für 1 Woche bei 30 °C inkubiert und danach ebenso einem β -Galaktosidasetest unterzogen (Tab. 3.2). Als Negativ-Kontrolle konnte eine Selbstaktivierung der Proteine GAD-SR und GBK-SR im „Yeast Two-Hybrid“-System nicht nachgewiesen werden. Die Positiv-Kontrolle GAD-Lamin A und GBT-Lamin A wurde nach 16 Std durch eine leichte Blaufärbung – eine Aktivierung des *LacZ* Reporter Gens – verifiziert. Die Interaktion von GAD-SR mit GBT-Lamin A und GBK-SR mit GAD-Lamin A konnte ebenfalls nach 16 Std durch eine leichte Blaufärbung festgestellt werden. Dieser Versuch erbrachte einen ersten Hinweis auf eine direkte Interaktion von Lamin A mit den letzten vier Spektrin-Domänen des NUANCE Proteins.

Tabelle 3.2 Ergebnisse des β -Galaktosidasetest der Leu⁺/Trp⁺ und His⁺ Hefekolonien im „Two-Hybrid“-System

	SD/-Leu/-Trp	SD/-His/-Leu/-Trp/+3-AT
GAD-SR/GBK-SR (Negativ- Kontrolle)	-	-
GBT-Lamin A/GAD-Lamin A (Positiv-Kontrolle)	+	+
GAD-SR/GBT-Lamin A	+	+
GBK-SR/GAD-Lamin A	+	+

+++ bezeichnet eine starke Blaufärbung, + bezeichnet eine schwache Blaufärbung, - bezeichnet keine Blaufärbung

3.5.2 Proteinbindungsanalyse von C-terminalen NUANCE-Fusionsproteinen mit COS7-Zell-Lysaten

Um die Ergebnisse aus 3.5.1 zu verifizieren, wurde eine Proteinbindungsanalyse mit dem GST-Fusionsprotein GST-SR (Abb. 3.17 A; Aminosäuren 6.546-6.796) und COS7-Zell-Lysat durchgeführt. Das Fusionsprotein GST-K1 (s. 3.2.1; Aminosäuren 6.546-6.796) wurde ebenfalls in der Proteinbindungsanalyse eingesetzt. Der α -NUANCE Antikörper mAk K49-260-1 wurde in diesem Experiment für die Immundetektion der NUANCE-Fusionsproteine in dem Westernblot eingesetzt. COS7-Zellen wurden lysiert, die Lysate mit den beiden Fusionsproteinen GST-SR und GST-K1 über Nacht inkubiert, die Pellets der beiden an Glutathion-Agarose-Matrix gekoppelten Fusionsproteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membran geblottet (2.3.15.2). Zuerst wurde gezeigt, dass für diesen Versuch gleiche Mengen der beiden Fusionsproteine GST-SR und GST-K1 eingesetzt wurden (Abb. 3.17 B). Danach wurde der Blot mit monoklonalen Antikörpern gegen α -Lamin A/C (JOL2) und α -Emerin inkubiert (Abb. 3.17 C). Dabei

zeigte sich, dass GST-SR sowohl Lamin A/C als auch Emerin präzipitieren konnte. Zum Vergleich sind die Reaktionen der Antikörper mit dem COS7-Gesamtzellhomogenat gezeigt.

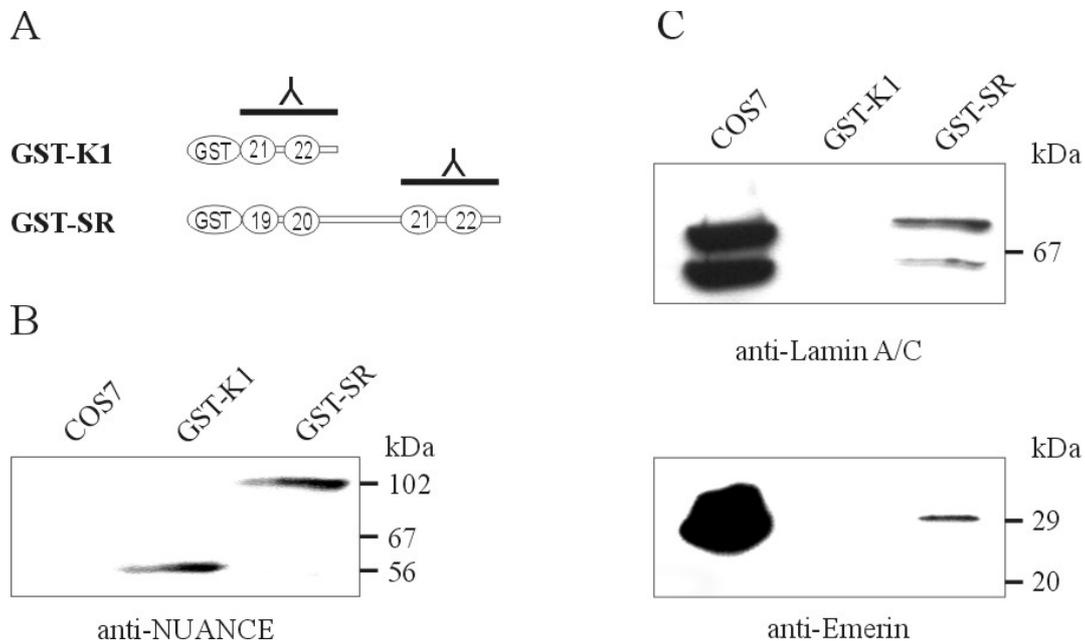


Abbildung 3.17 GST-„Pull-down“ von Lamin A/C und Emerin durch ein C-terminales NUANCE Fragment

(A) Schematische Übersicht der Fusionsproteine für den „Pull-down“-Test. GST-K1 enthält die letzten beiden Spektrin-Domänen, wohingegen GST-SR die letzten vier Spektrin-Domänen des NUANCE Proteins repräsentiert. Das Epitop des α -NUANCE Antikörpers mAk K49-260-1 ist als umgekehrtes Y angezeigt. (B) Die Immundetektion durch den α -NUANCE Antikörper zeigt einen Einsatz gleicher Mengen von Fusionsproteinen. (C) Derselbe Westernblot wurde mit monoklonalen α -Lamin A/C (JOL2) und α -Emerin Antikörpern inkubiert. (B, C) Westernblot eines 10 %igen SDS-PAA-Gels. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären α -Maus Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz.

3.5.3 Proteinbindungsanalyse von Lamin A und NUANCE auf einer Nitrocellulosemembran

Um eine direkte Bindung von NUANCE und Lamin A zu zeigen, wurde ein „Blot-overlay“-Test durchgeführt (2.3.15.1). Dafür wurde rekombinantes GST-Lamin A in *E. coli* exprimiert. Als Nachweis für eine korrekte Proteinexpression wurde das GST-Fusionsprotein zunächst mit einem monoklonalen α -Lamin A/C Antikörper (JOL2) nachgewiesen (Abb. 3.18 A). GST-Lamin A ist nicht löslich und lässt sich nicht aufreinigen. Deshalb wurde für die Bindungsanalyse GST, nicht induziertes *E. coli*-Zell-Lysat sowie *E. coli*-Zell-Lysat mit rekombinantem GST-Lamin A in gleichen Mengen aufgetragen, durch SDS-PAGE getrennt (Abb. 3.18 B) und mit Coomassie gefärbt. Ein anderes Gel wurde mit den gleichen Mengen beladen und auf

Nitrocellulose geblottet. Der Blot wurde dann mit rekombinantem GST-SR Protein inkubiert und GST-SR anschließend durch Immundetektion mit dem α -NUANCE Antikörper mAk K49-260-1 nachgewiesen. Das GST-SR Fusionsprotein bindet an GST-Lamin A und nicht unspezifisch an GST oder an Proteine des *E. coli*-Zell-Lysats (Abb. 3.18 C).

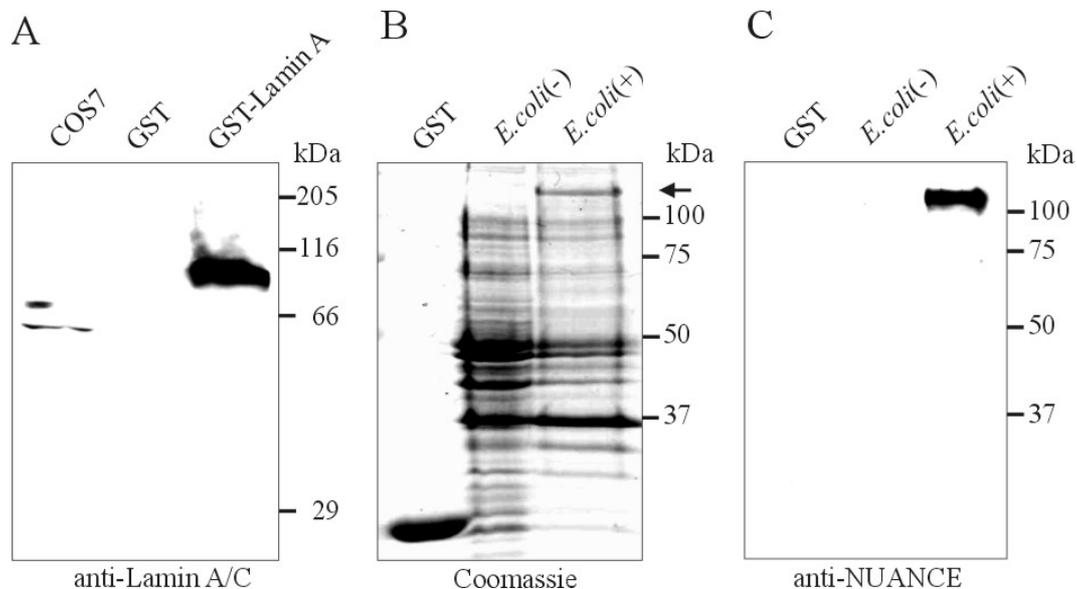


Abbildung 3.18 „Blot-overlay“-Test und direkte Interaktion von NUANCE und Lamin A *in vitro*
(A) Immundetektion von endogenem Lamin A/C in COS7-Zellen und rekombinantem GST-Lamin A durch monoklonalen α -Lamin A/C Antikörper (JOL2). **(B)** Coomassie Färbung der Proteine, die mit SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Neben GST wurden nicht induzierte (-) und mit IPTG induzierte GST-Lamin A exprimierende (+) *E. coli*-Zell-Lysate in gleichen Mengen aufgetragen. Das Fusionsprotein ist durch einen Pfeil markiert. **(C)** Ein parallel laufendes Gel wurde geblottet und für einen „Blot-overlay“-Test mit rekombinantem GST-SR benutzt. Die Immundetektion des gebundenen GST-SR Proteins erfolgte mit dem mAk K49-260-1. **(A,C)** Westernblots 10 %iger SDS-PAA-Gele. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären α -Maus Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz. **(B)** Auftrennung der Proteine in einem 10 %igen SDS-PAA-Gel mit anschließender Coomassie Färbung.

3.5.4 Interaktion von Lamin C-Fusionsproteinen mit NUANCE

Das Lamin A Gen kodiert für vier Proteine, Lamin A, Lamin C, Lamin A Δ 10 und das Hoden-spezifische Lamin C2, die durch alternatives Splicing gebildet werden (Hutchison, 2002). Lamin A und C unterscheiden sich darin, dass Lamin A einen zusätzlichen 90 Aminosäuren langen C-terminalen Bereich besitzt. Die weitere Analyse sollte klären, ob und in welchen Regionen Lamin C an NUANCE bindet oder ob NUANCE nur spezifisch an Lamin A binden kann. Dafür wurden verschiedene GST-Lamin C-Fusionsproteine getestet und einer Proteinbindungsanalyse mit SR unterzogen. SR wurde aus GST-SR durch Thrombin-Spaltung gewonnen (2.3.15.3).

Die Lamin C-Fragmente, die für die Bindungsanalyse eingesetzt wurden, sind schematisch in Abb. 3.19 wiedergegeben: N-term/Lamin A (Aminosäuren 1-127), coil1B Δ (Aminosäuren 128-218), coil2 (Aminosäuren 243-387), tail (Aminosäuren 384-566) und Δ lamin C (128-572). Um auszuschließen, dass SR mit GST interagiert wurde der Versuch zusätzlich mit aufgereinigtem GST Protein durchgeführt. Die Überstände und Pellets der Versuchsansätze wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt, um den gleichen Mengeneinsatz der sechs verschiedenen Fusionsproteine zu verifizieren (Abb. 3.20 oben). Da SR in der Coomassie Färbung nur schwach zu erkennen war, wurde anschließend eine Silberfärbung des Gels vorgenommen (Abb. 3.20 unten). Nur die Fusionsproteine coil2, tail und Δ lamin C waren in der Lage SR zu ko-präzipitieren, wohingegen GST, N-term/Lamin A und coil1B Δ dazu nicht in der Lage waren (Abb. 3.20 unten). Dabei wurde eine sehr hohe Affinität des tail-Fragments zu NUANCE beobachtet, welches das SR Protein vollständig ko-präzipitiert. Δ lamin C, das die Bereiche von coil2 und tail enthält, besitzt eine verminderte Bindung an das SR-Protein. Die Ergebnisse zeigen, dass NUANCE mit Lamin A und Lamin C in einem gemeinsamen Bereich (zweiter Bereich der coiled-coil Region und globulärer C-terminaler Bereich; Aminosäuren 242-574) interagiert.

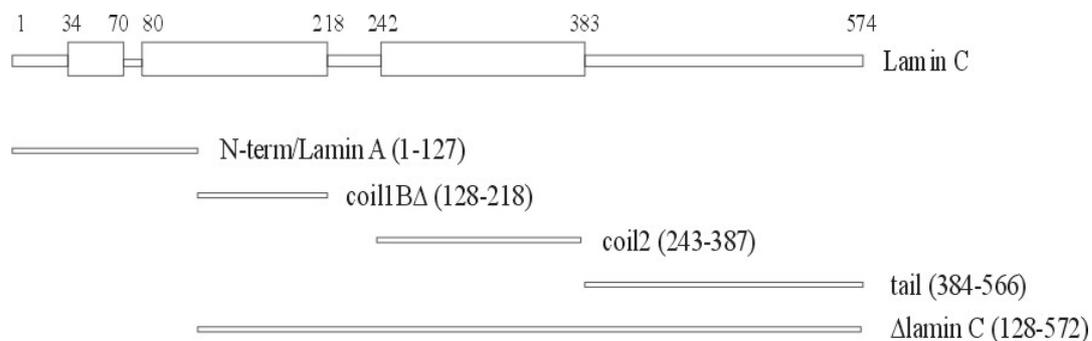


Abbildung 3.19 Übersicht der GST-Lamin C-Fusionsproteine für die Proteinbindungsanalyse

Einsatz von Fragmenten des Lamin C Proteins in einer Proteinbindungsanalyse. N-term/Lamin A (Aminosäuren 1-127), coil1B Δ (Aminosäuren 128-218), coil2 (Aminosäuren 243-387), tail (Aminosäuren 384-566) und Δ lamin C (Aminosäuren 128-572).

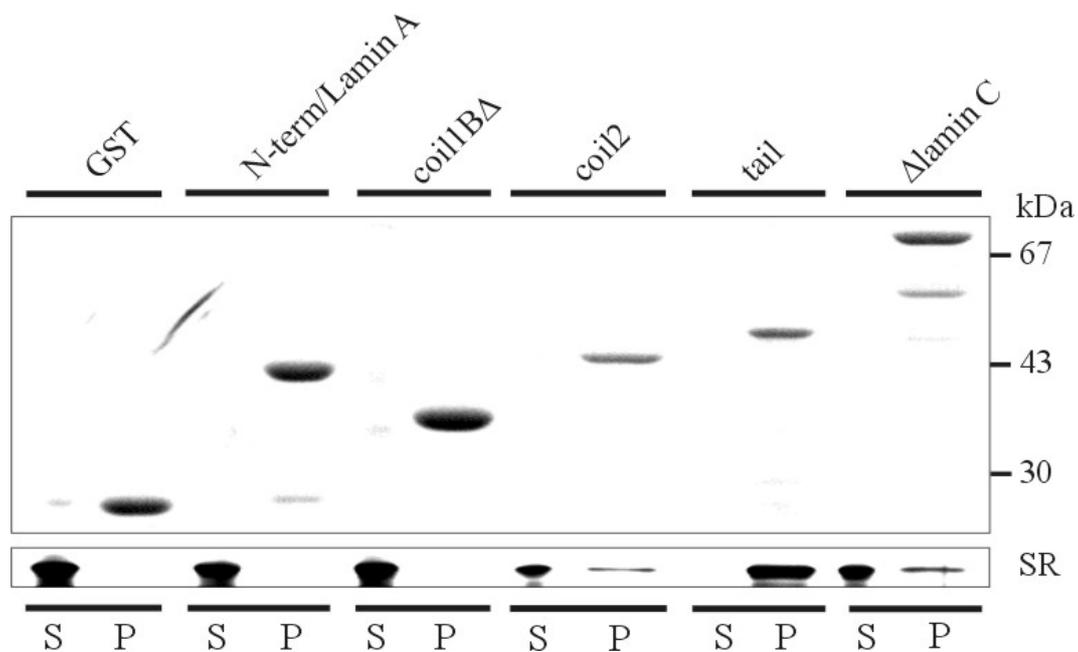


Abbildung 3.20 Lamin C bindet NUANCE *in vitro*

GST-Lamin C-Fusionsproteine (schematische Darstellung in Abb. 3.19) wurden an Glutathion-Agarose-Matrix gekoppelt und mit dem rekombinanten NUANCE SR Protein inkubiert. Die Versuchsansätze wurden zentrifugiert und in Überstand (S) und Pellet (P) aufgeteilt. Die Lysate wurden mit einem 10 %igen PAA-Gel durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie (oben) gefärbt, um den gleichen Mengeneinsatz der Proteine zu zeigen. Um das NUANCE SR Protein darzustellen, wurde das Gel anschließend mit Silber gefärbt (unten).

3.5.5 Dominant-negative Interferenz des Lamin A/C-Netzwerks in COS7-Zellen

Die bisherigen Experimente zeigten, dass NUANCE und Lamin A/C *in vitro* interagieren und im „Yeast Two-Hybrid“-System *in vivo* eine Bindung eingehen. Dieser Nachweis ist jedoch nicht ausreichend. Die folgenden Experimente sollten die Interaktion der beiden Proteine *in vivo* bestätigen. Die Experimente beruhen auf der Umverteilung von endogenem Lamin A/C in COS7-Zellen durch die Expression eines dominant-negativen GFP-Lamin B-Proteins (GFP-LaminB1 Δ 2+). Dieses GFP-Fusionsprotein lokalisiert nicht in der Kernlamina sondern sammelt sich in vielen kleinen Arealen innerhalb des Zellkerns an (Abb. 3.21 B; Ellis et al., 1997). Da die beiden Intermediärfilamente Lamin A/C und Lamin B Heterodimere bilden, besitzt GFP-LaminB1 Δ 2+ das Potential, endogenes Lamin A/C zu binden und umzuverteilen. Ein geringer Anteil von Lamin A/C bleibt an der intakten Membran zurück, der größte Anteil jedoch findet sich im Inneren des Zellkerns an den GFP gefärbten Arealen (Abb. 3.21 C). Eine ähnliche Umverteilung konnte für das NUANCE Protein beobachtet werden. In den transfizierten Zellen ist es ebenfalls in die GFP-LaminB1 Δ 2+ gefärbten Bereiche umverteilt und nur noch in geringem Maß in der Kernmembran zu finden (Abb. 3.21 F-H).

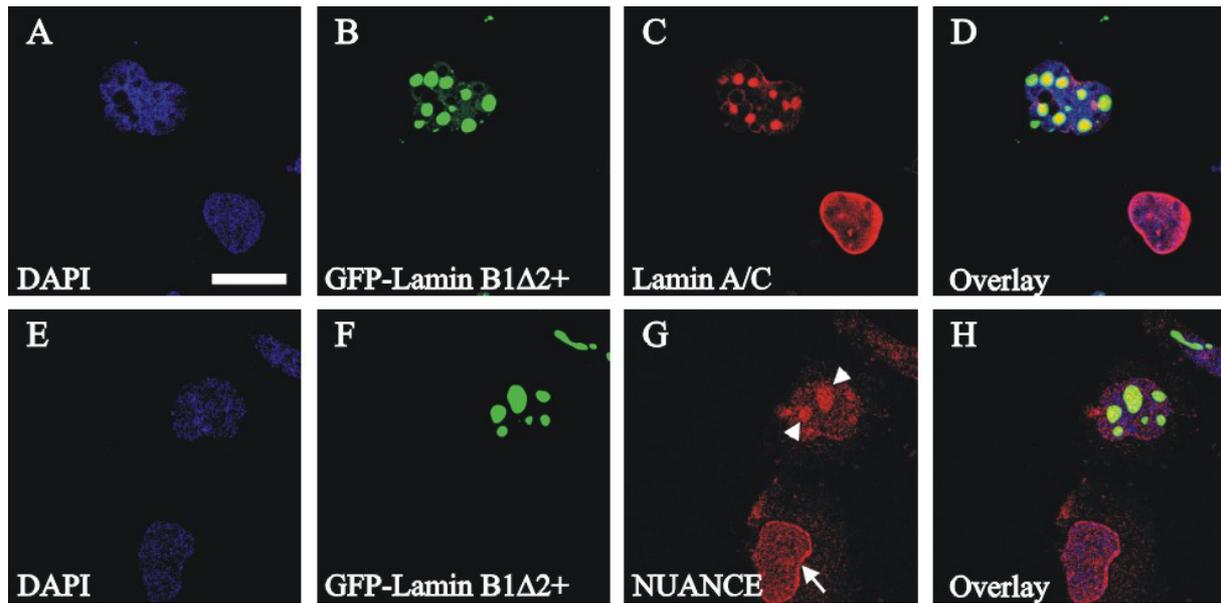


Abbildung 3.21 Umlagerung von NUANCE in EGFP-Lamin B1 Δ 2+ exprimierenden COS7-Zellen
 COS7-Zellen wurden mit pEGFP-Lamin B1 Δ 2+ transfiziert, das für ein dominant-negatives Lamin B-Fusionsprotein kodiert, welches in der Lage ist, endogenes Lamin A/C zu binden und umzuverteilen. Lamin A/C ist normalerweise an der Kernmembran lokalisiert (**C**, nicht transfizierte Zelle), in transfizierten Zellen jedoch innerhalb der GFP-positiven Areale (**B**, **C**). Die Umverteilung von Lamin A/C hat zur Folge, dass NUANCE ebenfalls nicht mehr nur ausschließlich an der Kernmembran lokalisiert ist (**G**, nicht transfizierte Zelle, Pfeil), sondern sich vor allem innerhalb der GFP-positiven Areale anreichert (**G**, Pfeilspitzen). (**A**, **E**) DAPI Färbung, (**B**, **F**) zeigt die intranukleäre Lokalisation des GFP-Fusionsproteins in transfizierten Zellen, (**C**) Färbung durch monoklonalen α -Lamin A/C Antikörper (JOL2) (sekundärer Antikörper α -Maus Cy3-Konjugat), (**G**) NUANCE Lokalisation mit mAk K20-478-4 (sekundärer Antikörper α -Maus Cy3-Konjugat) und (**D**, **H**) korrespondierende Überlagerungen. Die Zellen wurden mit 3 % PFA fixiert und mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. Die Bilder wurden mit dem konfokalen Laser Scan Mikroskop aufgenommen. Balken 25 μ m.

3.5.6 Knockdown von Lamin A/C mit RNAi in A431-Zellen

In diesem Experiment wurde mit Hilfe von RNAi die Expression von Lamin A/C in A431-Zellen verringert. Dieses Experiment ist das klassische Experiment von Harborth et al. und wurde wie beschrieben durchgeführt (Harborth et al., 2001). A431-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in 6-Loch Platten kultiviert, am nächsten Tag mit Opti-MEM gewaschen, 30 min in Opti-MEM kultiviert und mit 12 μ l 20 μ M siRNA pro Loch mit Hilfe von OligofectaminTM transfiziert. Der Lamin A/C spezifische RNA-Dimer enthält die Basen 608-626 des humanen Lamin A/C. Die Zellen wurden nach 72 Std geerntet, lysiert und die Proteine in einem SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Dabei wurde die Reduktion der Lamin A/C-Mengen gegenüber der A431-Kontrolle getestet (Abb. 3.23). Die Zell-Linie A431 exprimiert weniger Lamin A als Lamin C. Ein Teil der Zellen wurde fixiert und mit polyklonalem α -Lamin A/C, α -

Emerin und α -NUANCE Antikörper mAk K20-478-4 gefärbt. Der Nachweis der Verringerung der Proteinexpression konnte somit auch mikroskopisch verifiziert werden, wobei sich herausstellte, dass die visuelle Analyse differenzierter ist, weil Unterschiede der Expression von Lamin A/C in den Zellen festzustellen sind (Abb. 3.22 B, F). Lamin A/C interagiert mit Emerin und eine Reduktion von Lamin A/C beeinflusst die Emerin Lokalisation (Holt et al., 2003). Als Kontrolle für die Reduzierung von Lamin A/C wurden transfizierte A431-Zellen mit α -Emerin Antikörper gefärbt. Eine deutlich schwächere Färbung von Emerin in der Zellkernmembran sowie eine zusätzliche Färbung von vesikulären Strukturen in Kern-nahen Bereichen konnte beobachtet werden (Abb. 3.22 C). Nachdem Effekte des „Knockdown“ deutlich identifiziert werden konnten, wurden die Zellen mit NUANCE Antikörper mAk K20-478-4 gefärbt. Dabei zeigte sich, dass sich NUANCE ähnlich verhält. In A431-Zellen, in denen Lamin A/C nicht exprimiert wird, erkennt man eine schwache bzw. gar keine nukleäre NUANCE Färbung (Abb. 3.22 G).

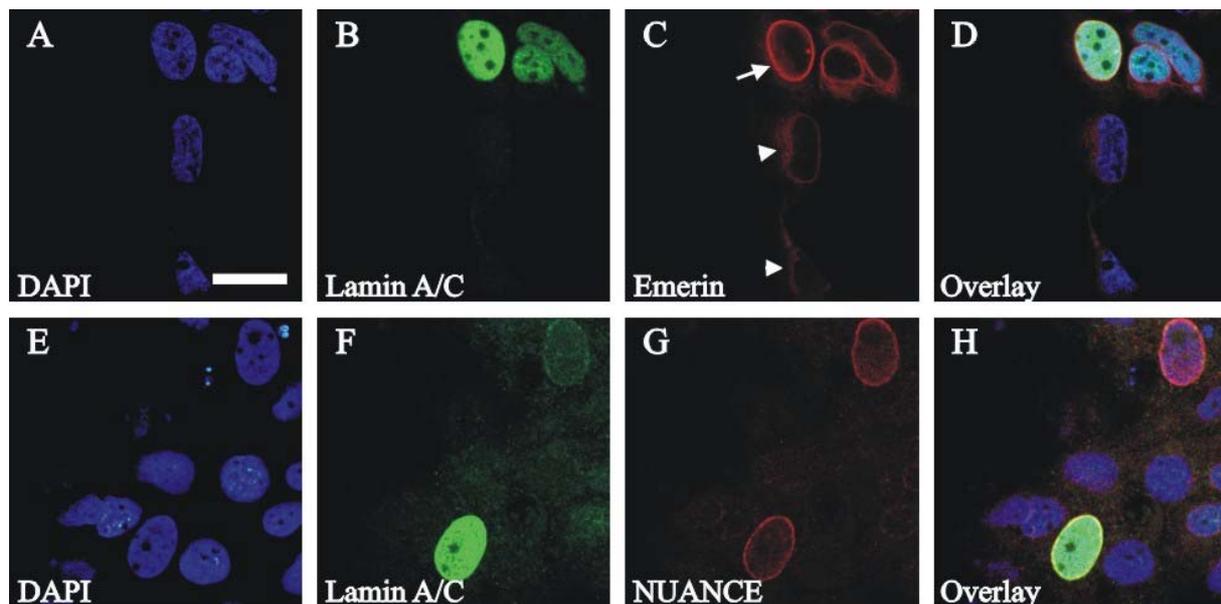


Abbildung 3.22 „Knockdown“ von Lamin A/C in A431-Zellen mit Hilfe von RNAi

In Lamin A/C-positiven Zellen ist Emerin an der Kernmembran lokalisiert (C, Pfeil). Transient transfizierte Zellen haben keine Lamin A/C Färbung (B), in diesen Zellen ist die Emerin Färbung deutlich schwächer (C, Pfeilspitzen). Die NUANCE Färbung ist in Lamin A/C-defizienten Zellen diffus bzw. gar nicht mehr vorhanden (G). (A, E) DAPI Färbung, (B, F) Färbung durch polyklonalen α -Lamin A/C Antikörper (sekundärer Antikörper α -Kaninchen FITC-Konjugat), (C) Färbung durch α -Emerin Antikörper (sekundärer Antikörper α -Maus Cy3-Konjugat), (G) NUANCE Färbung mit mAk K20-478-4 (sekundärer Antikörper α -Maus Cy3-Konjugat), (D, H) korrespondierende Überlagerungen. Die Zellen wurden mit 3 % PFA fixiert und mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. Die Bilder wurden mit dem konfokalen Laser Scan Mikroskop aufgenommen. Balken 25 μ m.

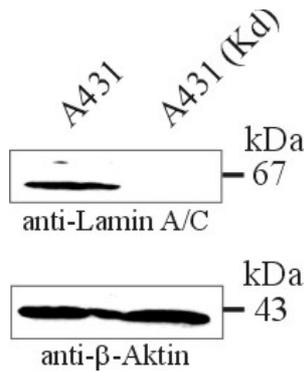


Abbildung 3.23 „Knockdown“ von Lamin A/C in A431-Zellen mit Hilfe von RNAi

Lamin A/C spezifische RNA-Dimere (Basen 608-626 des humanen Lamin A/C) wurden mit Hilfe von Oligofectamin™ in A431-Zellen gebracht. Nach 72 Std wurden die transfizierten Zellen sowie unbehandelte Zellen lysiert und die Gesamtzellhomogenate durch SDS-PAGE aufgetrennt. Eine Verringerung der Lamin A/C-Expression in transfizierten (Kd) gegenüber unbehandelten A431-Zellen konnte festgestellt werden. Die Immundetektion von β -Aktin zeigt den Einsatz gleicher Mengen von Zell-Lysat. Westernblot eines 10 %igen SDS-PAA-Gels. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären α -Maus Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz.

3.6 Expression von C-terminalen GFP-Fusionsproteinen in Säugerzellen

3.6.1 Erzeugung C-terminaler GFP-Fusionsproteine

A



B

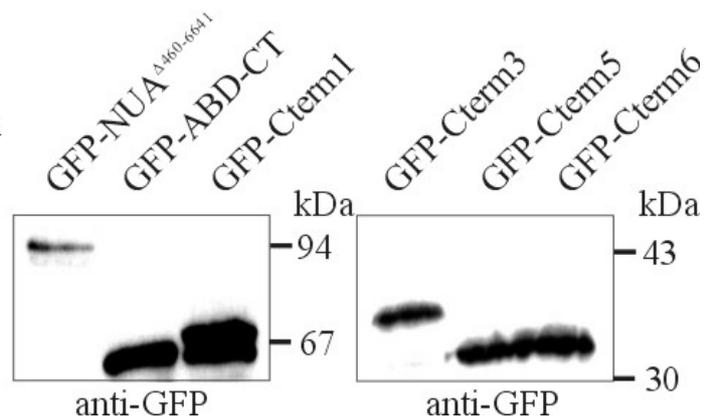


Abbildung 3.24 Erzeugung C-terminaler GFP-Fusionsproteine

(A) Schematische Übersicht der C-terminalen GFP-Fusionsproteine. Die Aktin-Bindungs-Domäne ist durch ein Oval (ABD) gekennzeichnet, die definierten Spektrin-Domänen innerhalb des NUANCE Proteins durch nummerierte Ovale, die Transmembran-Domäne (TMD) durch einen schwarzen Balken und der Prolin-reiche Abschnitt PPPT durch einen kleinen Kreis mit einem P. (B) Nachweis der Expression der verschiedenen GFP-Fusionsproteine. COS7-Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert, nach einem Tag geerntet und die Zell-Lysate durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Immundetektion der GFP-Fusionsproteine erfolgte durch α -GFP Antikörper (mAk K3-184-2). Westernblot eines 12 %igen SDS-PAA-Gels. Die Bindung der primären Antikörper wurde mit einem sekundären α -Maus Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz nachgewiesen.

Ergebnisse aus den Arbeiten von Zhen et al. (2002) haben gezeigt, dass C-terminale GFP-Fusionsproteine, die die *Klarsicht*-Domäne (Abb. 3.6) enthalten, an der Kernmembran lokalisieren und endogenes NUANCE verdrängen können. GFP-Fusionsproteine mit Spektrin-Domänen lokalisieren dagegen an cytoplasmatischen Membranen (Zhen et al., 2002). Um die *Klarsicht*-Domäne sowie den Einfluss der

Spektrin-Domänen, genauer untersuchen zu können, wurden verschiedene GFP-Fusionsproteine erzeugt (Abb. 3.24 A) und für die folgenden Experimente verwendet. GFP-NUA^{Δ460-6641} ist eine Protein-Chimäre aus der N-terminalen ABD, den folgenden zwei Spektrin-Domänen, den beiden vorletzten Spektrin-Domänen und der *Klarsicht*-Domäne (Aminosäuren 1-459 und 6.642-6.883). GFP-ABD-CT besteht nur aus der ABD und der TMD ohne Spektrin-Domänen (Aminosäuren 1-283 und 6.838-6.883). Diese beiden Fusionsproteine waren an der Kern- und Plasmamembran in COS7-Zellen lokalisiert und wiesen in ihrer Lokalisation keine Unterschiede auf (Zhen et al., 2002). Für die Untersuchung der *Klarsicht*-Domäne wurden die Fusionsproteine GFP-Cterm1 (Aminosäuren 6.570-6.883), GFP-Cterm3 (Aminosäuren 6.806-6.883), GFP-Cterm5 (Aminosäuren: 6.833-6.879) und GFP-Cterm6 (Aminosäuren 6.833-6.883) erzeugt. GFP-Cterm1 besteht aus den beiden vorletzten Spektrin-Domänen und der *Klarsicht*-Domäne. GFP-Cterm3 besteht aus der vollständigen *Klarsicht*-Domäne. GFP-Cterm5 enthält die TMD und den lumenalen Bereich des NUANCE Proteins ohne den Prolin-reichen Abschnitt PPPT, GFP-Cterm6 besteht aus der TMD und dem vollständigen lumenalen Bereich des NUANCE Proteins. Die Expression aller GFP-Fusionsproteine wurde durch Westernblotanalyse von Zell-Lysaten transfizierter COS7-Zellen überprüft (Abb. 3.24 B).

3.6.2 Lokalisation der GFP-Fusionsproteine GFP-Cterm1, GFP-Cterm3, GFP-Cterm5 und GFP-Cterm6 in COS7-Zellen

Zhen et al. (2002) zeigten, dass GFP-Cterm1 in der Zellkernmembran lokalisiert ist. Um die Region einzuengen, die für eine korrekte Lokalisation des Proteins innerhalb der Kernmembran wichtig ist, wurden COS7-Zellen mit den Plasmiden pEGFP-Cterm1, pEGFP-Cterm3, pEGFP-Cterm5 und pEGFP-Cterm6 transfiziert, am folgenden Tag fixiert und mit α -NUANCE Antikörper mAk K20-478-4 gefärbt. Die GFP-Proteine GFP-Cterm1, GFP-Cterm3 und GFP-Cterm6 sind bei moderater Expression ausschließlich an der Kernmembran lokalisiert (Abb. 3.25 B, F, J). Dabei zeigte sich, dass diese GFP-Fusionsproteine das Potential besitzen, endogenes NUANCE aus der Kernmembran zu verdrängen (Abb. 3.25 C, G, K). In stark exprimierenden COS7-Zellen lokalisieren die GFP-Fusionsproteine GFP-Cterm1 (Abb. 3.26), GFP-Cterm3 (nicht gezeigt) und GFP-Cterm6 (nicht gezeigt) zusätzlich auch in Kern-nahen Bereichen. Dieser Bereich wurde in pEGFP-Cterm1 transfizierten COS7-Zellen als endoplasmatisches Retikulum mit Hilfe eines α -

Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) spezifischen Markers identifiziert (Abb. 3.26 I-L). Die äußere Zellkernmembran geht in das ER über, deshalb könnten in stark exprimierenden Zellen die GFP-Fusionsproteine in das ER gedrängt werden.

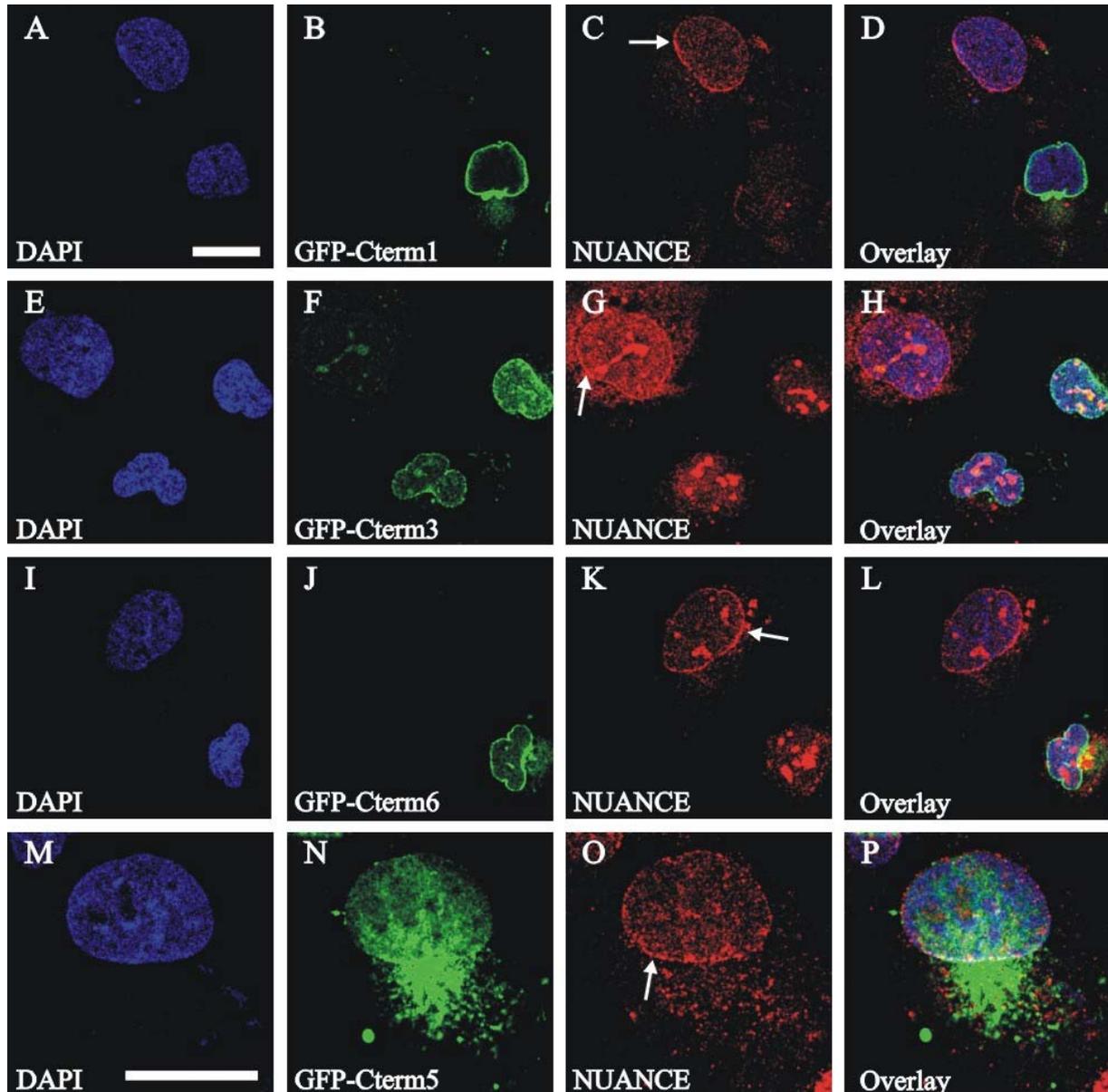


Abbildung 3.25 Endogenes NUANCE wird von GFP-Cterm1, GFP-Cerm3 und GFP-Cterm6 verdrängt

COS7-Zellen wurden mit den Plasmiden pEGFP-Cterm1, pEGFP-Cterm3, pEGFP-Cterm5 und pEGFP-Cterm6 transfiziert, am folgenden Tag fixiert und gefärbt. Alle Fusionsproteine (B, F, J), die eine TMD und den vollständigen lumenalen Bereich des NUANCE Proteins besitzen, sind in der Lage das endogene NUANCE von seinem Platz in der Kernmembran zu verdrängen (C, G, K). Das Prolinreiche Ende dieser Proteine scheint für die Verdrängung wichtig zu sein, da ein Konstrukt ohne PPPT (N) nicht mehr in der Lage ist, das endogene NUANCE Protein zu verdrängen (O, Pfeil). (A, E, I, M) DAPI Färbung, (B, F, J, N) Färbung der GFP-Fusionsproteine, (C, G, K, O) NUANCE Färbung mit α -NUANCE Antikörper mAk K20-478-4 (sekundärer Antikörper α -Maus Cy3-Konjugat), (D, H, L, P) korrespondierende Überlagerungen. Die Kernmembranfärbung von NUANCE ist durch Pfeile angezeigt (C, G, K, O). Die Zellen wurden mit 3 % PFA fixiert und mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. Die Bilder wurden mit dem konfokalen Laser Scan Mikroskop aufgenommen. Balken 25 μ m.

GFP-Cterm5 ist nicht ausschließlich an der Kernmembran lokalisiert, sondern zusätzlich innerhalb der Zelle zu finden (Abb. 3.25 N). Des Weiteren ist GFP-Cterm5, dem die vier endständigen Aminosäuren PPPT fehlen, nicht mehr in der Lage, NUANCE aus der Kernmembran zu verdrängen (Abb. 3.25 O).

3.6.3 Verteilung von F-Aktin und Lamin A/C in GFP-Cterm1 transfizierten COS7-Zellen

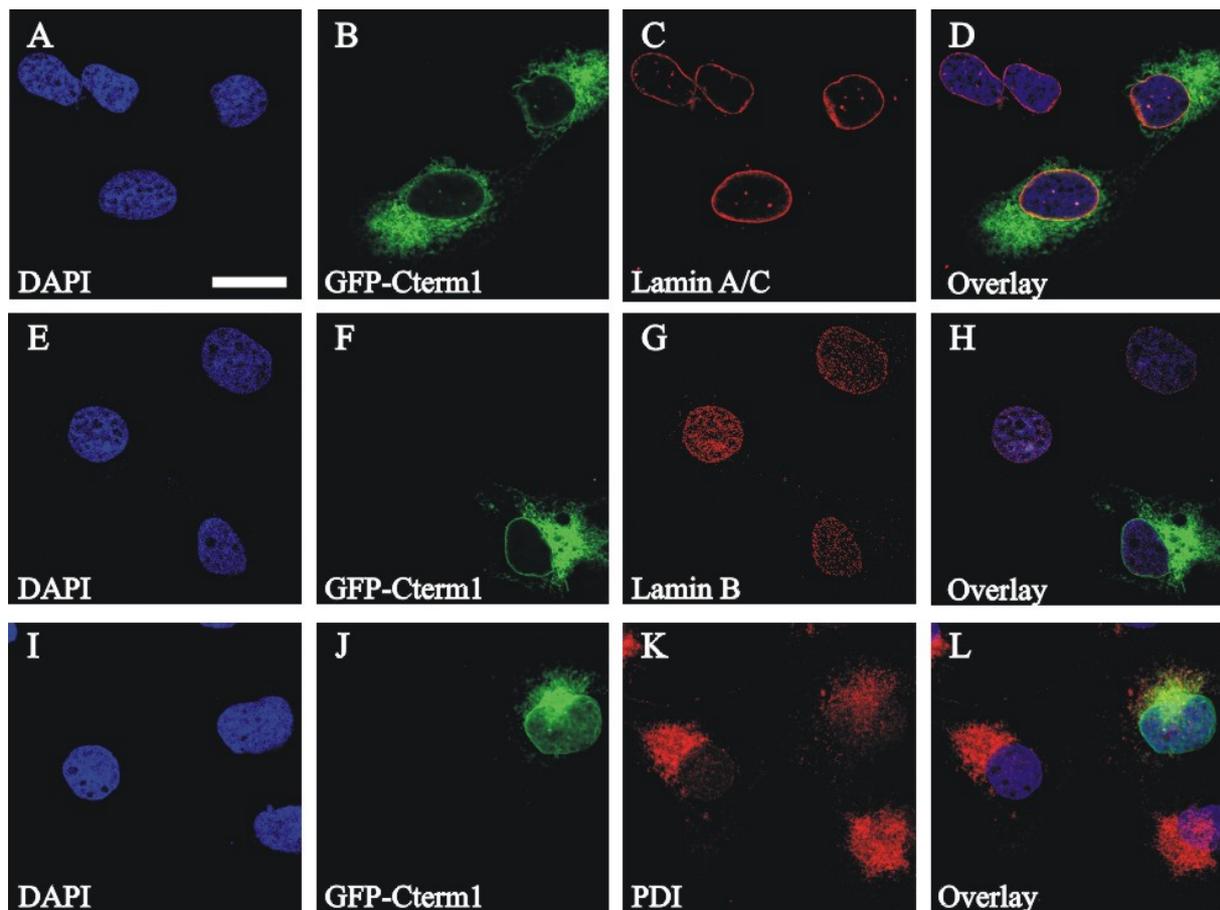


Abbildung 3.26 GFP-Cterm1 beeinflusst die Lamin A/C und Lamin B Verteilung nicht

COS7-Zellen wurden mit pEGFP-Cterm1 transfiziert, nach einem Tag fixiert und gefärbt. Eine Überexpression von GFP-Cterm1 hat auf die Verteilung von Lamin A/C (C) und Lamin B (G) keinen Einfluss. In stark exprimierenden Zellen wird das GFP-Fusionsprotein nicht in der Kernmembran gehalten, sondern diffundiert in das endoplasmatische Retikulum (ER). Als Marker für das ER dient Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), das durch das GFP-Fusionsprotein teilweise verdrängt wird (K, L). (A, E, I) DAPI Färbung, (B, F, J) zeigt die nukleäre Färbung der Membran durch das GFP-Fusionsprotein, (C) Färbung mit monoklonalem α -Lamin A/C Antikörper (JOL2) (sekundärer Antikörper α -Maus Cy3-Konjugat), (G) Färbung mit α -Lamin B Antikörper (LN43) (sekundärer Antikörper α -Maus Cy3-Konjugat), (K) Färbung mit α -PDI Antikörper (sekundärer Antikörper α -Kaninchen TRITC-Konjugat), (D, H, L) korrespondierende Überlagerungen. Die Zellen wurden mit 3 % PFA fixiert und mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. Die Bilder wurden mit dem konfokalen Laser Scan Mikroskop aufgenommen. Balken 25 μ m.

Um zu testen, ob die Verdrängung des endogenen NUANCE Proteins aus der Kernmembran einen Einfluss auf seine Interaktionspartner F-Aktin und Lamin A/C hat, wurden mit pEGFP-Cterm1 transfizierte COS7-Zellen durch FITC-Phalloidin oder α -Lamin A/C Antikörper (JOL2) gefärbt. Die F-Aktin Färbung in transfizierten COS7-Zellen unterschied sich nicht von den Kontrollen (nicht gezeigt). Im Rahmen von Stimulationsexperimenten wurde ein „Wundheilungs-Test“ an transfizierten COS7-Zellen durchgeführt. Dabei konnte keine Umorganisation des Aktin-Cytoskeletts oder eine absonderliche Kernlokalisierung festgestellt werden. Die Verteilung der Kernproteine Lamin A/C und Lamin B war ebenfalls unbeeinflusst (Abb. 3.26 A-D, E-H).

3.6.4 Änderung der Zellkernmorphologie in GFP-Cterm1 transfizierten Zellen

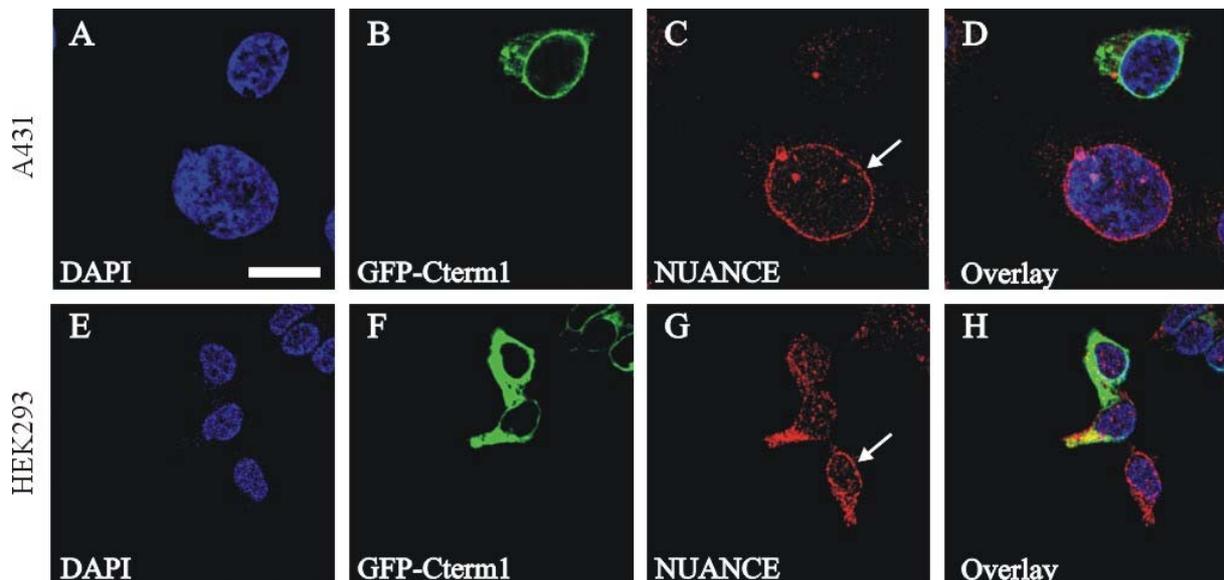


Abbildung 3.27 Dominant-negativer Effekt von GFP-Cterm1 in A431- und HEK293-Zellen

(A-D) A431- und (E-H) HEK293-Zellen wurden mit pEGFP-Cterm1 transfiziert, nach einem Tag fixiert und gefärbt. Auch in diesen beiden Zell-Linien wird das endogene NUANCE Protein vom GFP-Fusionsprotein verdrängt (C, G). Nicht transfizierte Zellen weisen eine NUANCE Färbung in der Kernmembran auf (C, G, Pfeile). (A, E) DAPI Färbung, (B, F) Färbung durch GFP-Cterm1, (C, G) NUANCE Färbung durch N-terminalen α -NUANCE Antikörper (mAk K20-478-4) (sekundärer Antikörper α -Maus Cy3-Konjugat), (D, H) korrespondierende Überlagerungen. Die Zellen wurden mit 3 % PFA fixiert und mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. Die Bilder wurden mit dem konfokalen Laser Scan Mikroskop aufgenommen. Balken 25 μ m.

Mikroskopische Untersuchungen von pEGFP-Cterm1 transfizierten COS7-Zellen ließen vermuten, dass sich die Zellkerngröße in transfizierten Zellen vermindert hat. Da COS7-Zellen in Kultur extrem unterschiedlich geformte Zellkerne besitzen, waren diese für eine statistische Untersuchung der Zellkerngröße nicht geeignet. A431-

sowie HEK293-Zellen besitzen relativ gleichmäßig geformte Zellkerne, so dass diese untereinander vergleichbar sind. Beide Zell-Linien besitzen das NUANCE Protein und auch das dominant-negative GFP-Cterm1 verdrängt das endogene NUANCE aus der Kernmembran in diesen Zell-Linien (Abb. 3.27). Für die Messung der Zellkerngröße wurden die Zellen mit pEGFP-Cterm1 transfiziert, nach einem Tag fixiert und mit DAPI gefärbt. Die Zellkerngröße von 50 transfizierten und 50 nicht transfizierten Zellen wurde in A431 und HEK293 durch Messung der DAPI-positiven Fläche bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden prozentual errechnet (Abb. 3.28) und ein statistischer Vergleich der Kontrollzellen und der transfizierten Zellen durchgeführt. Dabei ergab sich eine statistisch signifikante Verringerung der Zellkerngröße in transfizierten Zellen um 13 % in A431- und 29 % in HEK293-Zellen (t-Test, $p < 0,05$).

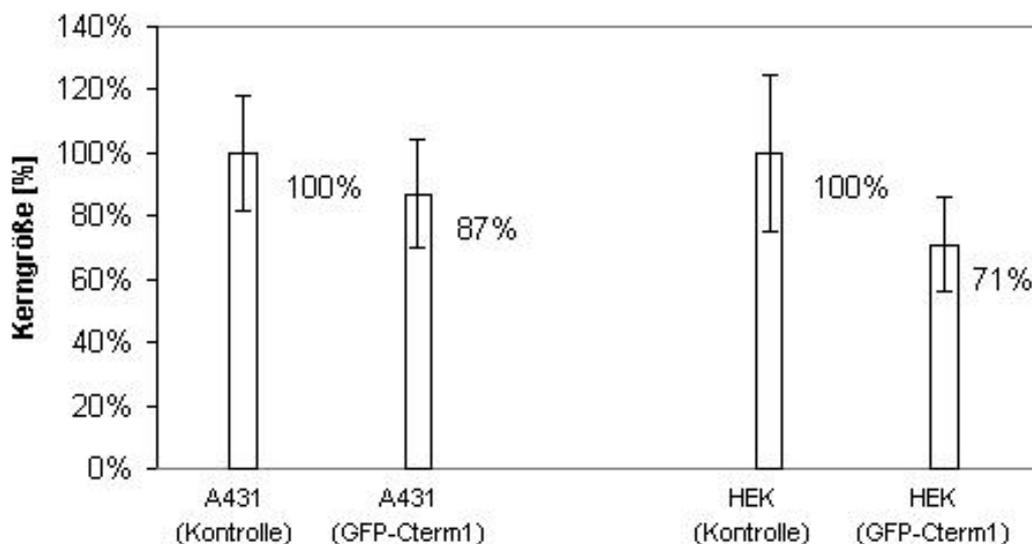


Abbildung 3.28 Die Größe des Zellkerns nimmt in GFP-Cterm1 transfizierten Zellen ab

A341- und HEK293-Zellen wurden mit pEGFP-Cterm1 transfiziert, nach einem Tag mit 3 % PFA fixiert und mit DAPI gefärbt. Für jeden Versuchsansatz (A431-Zellen mit GFP-Cterm1 transfiziert/nicht transfiziert, HEK293-Zellen mit GFP-Cterm1 transfiziert/nicht transfiziert) wurden 50 Zellen fotografiert und ihre Zellkerngröße mit Hilfe einer Software gemessen. Aus den Werten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung prozentual berechnet und graphisch dargestellt. Die Zellkerngröße in transfizierten Zellen A413- und HEK293-Zellen ist signifikant kleiner als in den Kontrollzellen (t-Test, $p < 0,05$).

3.6.5 Der Prolin-reiche Teil des C-Terminus ist wichtig für die Lokalisierung von NUANCE in der Kernmembran und der Interaktion mit dem Kernmembranprotein SUN1/UNC84

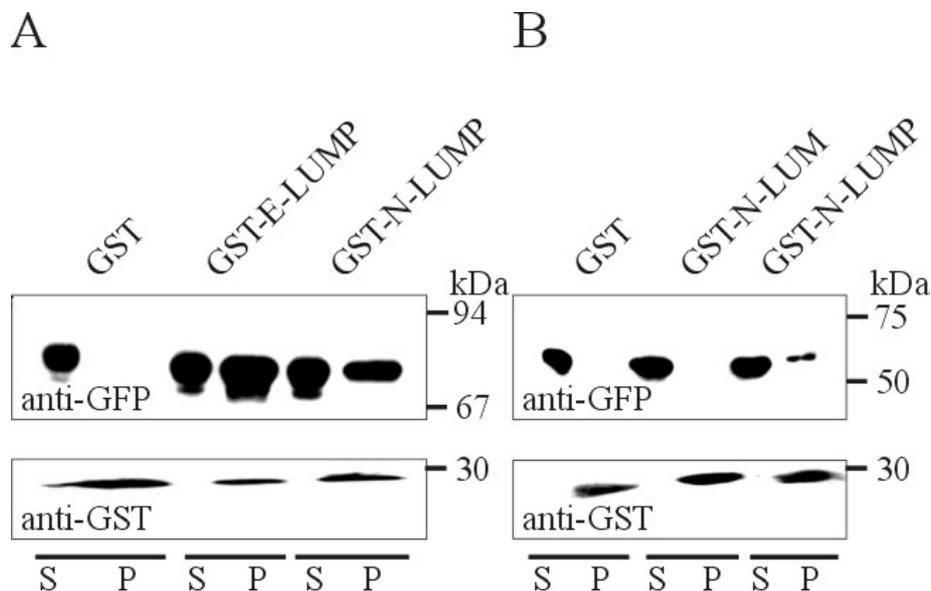


Abbildung 3.29 GST-„Pull-down“ von GFP-UNC84 durch lumenale Fragmente von NUANCE und Enaptin

COS7-Zellen wurden mit pEGFP-UNC84 transient transfiziert. COS7-Zell-Lysate wurden daraufhin mit an Glutathion-Agarose-Matrix gebundenen GST-Fusionsproteinen GST, GST-E-LUMP (lumenaler Bereich Enaptins), GST-N-LUMP (lumenaler Bereich des NUANCE Proteins) und GST-N-LUM (lumenaler Bereich des NUANCE Proteins ohne den Prolin-reichen Teil PPPT) über Nacht inkubiert. Die Versuchsansätze wurden zentrifugiert und in Pellet und Überstand aufgeteilt. Die Proteinfractionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und einer Westernblotanalyse unterzogen. (**A**, oben) Die lumenalen Fragmente von NUANCE (GST-N-LUMP) und Enaptin (GST-E-LUMP) sind in der Lage an GFP-UNC84 zu binden. Dabei spielt das Prolin-reiche Ende eine entscheidende Rolle, da das GST-Fusionsprotein ohne PPPT (GST-N-LUM) GFP-UNC84 nicht mehr effektiv binden kann (**B**, oben). Die Immundetektion von GST zeigt den Einsatz gleicher Mengen von GST-Fusionsprotein. (**A**, **B**, unten). (**A**, **B**) Westernblots 10 %iger SDS-PAA-Gele. Die Immundetektion von GFP-UNC84 erfolgte durch α -GFP Antikörper mAk K3-184-2, die Immundetektion von GST durch α -GST Antikörper. Die Detektion des α -GFP Antikörper erfolgte mit einem sekundären α -Maus Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz. Die Detektion des α -GST Antikörper erfolgte mit einem sekundären α -Ziege/Schaf Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz.

Die Ergebnisse aus Abb. 3.25 haben gezeigt, dass der Prolin-reiche lumenale Teil von NUANCE wichtig für die Kernmembran-Lokalisierung ist. Um dies auch biochemisch zu bestätigen, wurde eine Proteinbindungsanalyse *in vitro* durchgeführt. Analysen in *C. elegans* haben das Protein UNC84 als einen möglichen Bindungspartner von ANC1, einem NUANCE-homologen Protein, identifiziert (Starr & Han, 2003). UNC84 besteht aus einem N-terminalen nucleoplasmatischen Bereich, drei Transmembran-Domänen und einem C-terminalen Bereich, der im Lumen zwischen der inneren und äußeren Kernmembran lokalisiert ist. UNC84 orthologe

Proteine gibt es auch in *M. musculus*. Wir haben den C-terminalen lumenalen Teil des orthologen Maus UNC84 Proteins (SUN1), als GFP-Fusionsprotein in COS7-Zellen exprimiert. Zell-Lysate wurden mit GST, dem lumenalen Fragment des Enaptin Proteins (GST-E-LUMP) und dem lumenalen Fragment des NUANCE Proteins (GST-N-LUMP) inkubiert und die Fusionsproteine mit Glutathion-Agarose präzipitiert. Die Überstände und Pellets der drei Versuchsansätze wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit α -GFP Antikörper (mAk K3-184-2) inkubiert, um das GFP-UNC84 Protein zu detektieren (Abb. 3.29 A). GFP-UNC84 findet sich in allen Überständen sowie im Pellet von GST-E-LUMP und GST-N-LUMP. Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass NUANCE und Enaptin eine direkte Assoziation mit SUN1/UNC84 eingehen.

Ein weiteres Experiment sollte die Frage klären, ob der Prolin-reiche Teil des NUANCE Proteins wichtig für die Bindung an SUN1/UNC84 ist. Dafür wurden die Zell-Lysate diesmal mit GST, dem lumenalen Fragment des NUANCE Proteins (GST-N-LUMP) und dem lumenalen Fragment des NUANCE Proteins ohne PPPT (GST-N-LUM) inkubiert. Die Überstände und Pellets der drei Versuchsansätze wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit α -GFP Antikörper (mAk K3-184-2) inkubiert, um das GFP-UNC84 Protein zu detektieren (Abb. 3.29 B). GFP-UNC84 findet sich in allen Überständen sowie im Pellet von GST-N-LUMP. Im Pellet von GST und GST-N-LUM konnte kein GFP-UNC84 Protein detektiert werden. Dies bestätigte, dass der Prolin-reiche Teil des NUANCE Proteins für die Assoziation an SUN1/UNC84 wichtig ist.

3.7 Der C-terminale Teil von NUANCE interagiert mit Emerin

3.7.1 Die dominant-negativen GFP-Fusionsproteine Cterm1 und Cterm6 beeinflussen die Verteilung von Emerin

Im Rahmen der Untersuchung des dominant-negativen Effektes von GFP-Cterm1 auf die Verteilung von NUANCE zeigte sich, dass stark GFP-Cterm1 exprimierende Zellen eine leicht veränderte Emerin Färbung aufwiesen. In transfizierten COS7-Zellen war Emerin nicht mehr nur an der Kernmembran lokalisiert, sondern auch in kleinen vesikulären Strukturen im Inneren der Zelle (Abb. 3.30 C, Pfeilspitzen). GFP-Cterm6 dagegen, das nur aus der TMD und dem lumenalem Teil besteht, verdrängt Emerin komplett aus der Kernmembran, so dass es nur noch in Kern-nahen

Bereichen vorhanden ist (Abb. 3.30 G, Pfeilspitzen). Beide Fusionsproteine verdrängen endogenes NUANCE, lokalisieren statt seiner in der Kernmembran (Abb. 3.25 C, K) und haben einen ähnlichen Effekt wie ein „Knockdown“ von NUANCE. Der Unterschied zwischen den beiden Fusionsproteinen ist das Vorhandensein der letzten zwei Spektrin-Domänen in GFP-Cterm1. Diese beiden Spektrin-Domänen scheinen demnach wichtig für die Bindung von GFP-Cterm1 und Emerin zu sein und halten das Protein in der Zellkernmembran.

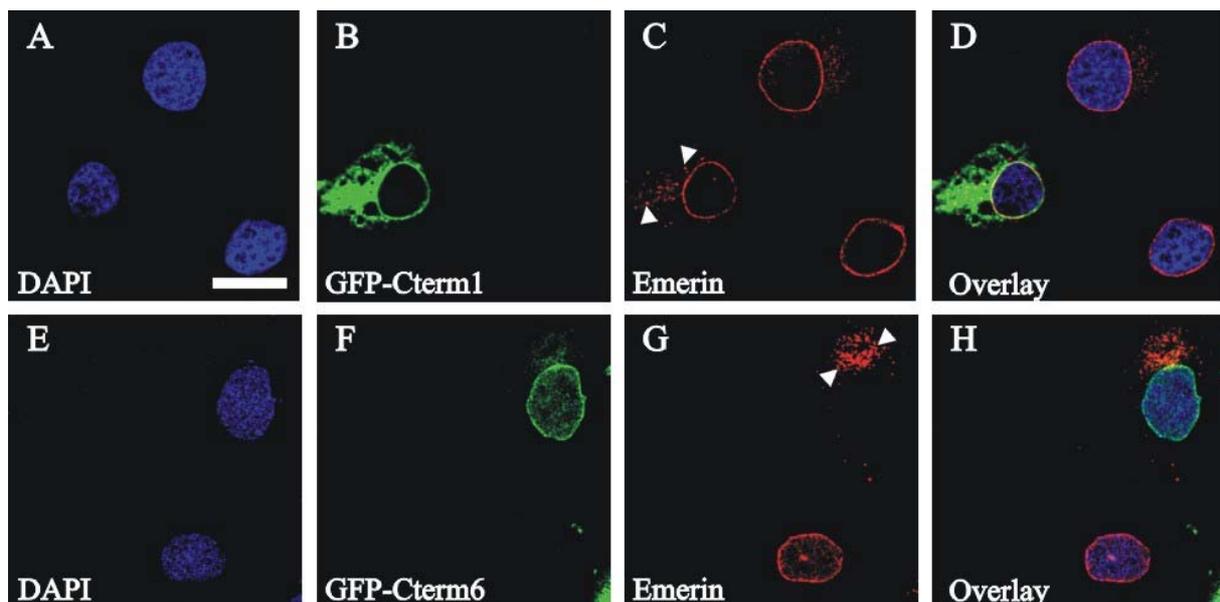


Abbildung 3.30 Einfluss von GFP-Cterm1 und GFP-Cterm6 auf die Verteilung von Emerin

COS7-Zellen wurden mit pEGFP-Cterm1 und pEGFP-Cterm6 transfiziert, nach einem Tag fixiert und gefärbt. Die Überexpression von GFP-Cterm1 hat Einfluss auf die Verteilung von Emerin. Das Protein ist nicht mehr nur an der Kernmembran, sondern auch in kleinen vesikulären Strukturen außerhalb des Kerns anzutreffen (C, Pfeilspitzen). Die Expression von GFP-Cterm6 hat einen stärkeren Einfluss auf die Umverteilung von Emerin als GFP-Cterm1. Durch GFP-Cterm6 wird fast das gesamte Protein von der Kernmembran verdrängt und außerhalb des Kerns sind viele vesikuläre Emerin-positive Strukturen zu erkennen (G, Pfeilspitzen). (A, E) DAPI Färbung, (B, F) GFP-Fusionsproteine GFP-Cterm1 und GFP-Cterm6, (C, G) Emerin Färbung durch α -Emerin Antikörper (sekundärer Antikörper α -Maus Cy3-Konjugat), (D, H) korrespondierende Überlagerungen. Die Zellen wurden mit 3 % PFA fixiert und mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. Die Bilder wurden mit dem konfokalen Laser Scan Mikroskop aufgenommen. Balken 25 μ m.

3.7.2 RNAi von NUANCE beeinflusst die Verteilung von Emerin

Der gezielte „Knockdown“ eines Proteins auf Zellebene – *in vivo* durch RNAi – eröffnet für die Zellbiologie neue Möglichkeiten. Mit Hilfe eines Plasmids (pSUPER-K2; Basen 595-613 der NUANCE cDNA) konnte die NUANCE Expression in COS7-Zellen gezielt herunter reguliert werden. Dazu wurden COS7-Zellen mit dem Plasmid pSUPER-K2 transfiziert, nach zwei Tagen fixiert, mit α -NUANCE Antikörper mAk

K20-478-4 und α -Emerin Antikörper gefärbt. Die mikroskopische Überprüfung des „Knockdowns“ zeigt deutlich eine fehlende Kernmembranlokalisierung von NUANCE (Abb. 3.31 B, F). Die Kerne scheinen deformiert (Abb. 3.31 A, E), aber intakt, da die Lamin A/C Verteilung wenig beeinflusst ist (Abb. 3.31 C). Die verminderte Expression von NUANCE hat einen Einfluss auf die Emerin Verteilung und zeigt keine Zellkernmembranlokalisierung sondern eine vesikuläre Färbung im Cytosol (Abb. 3.31 G).

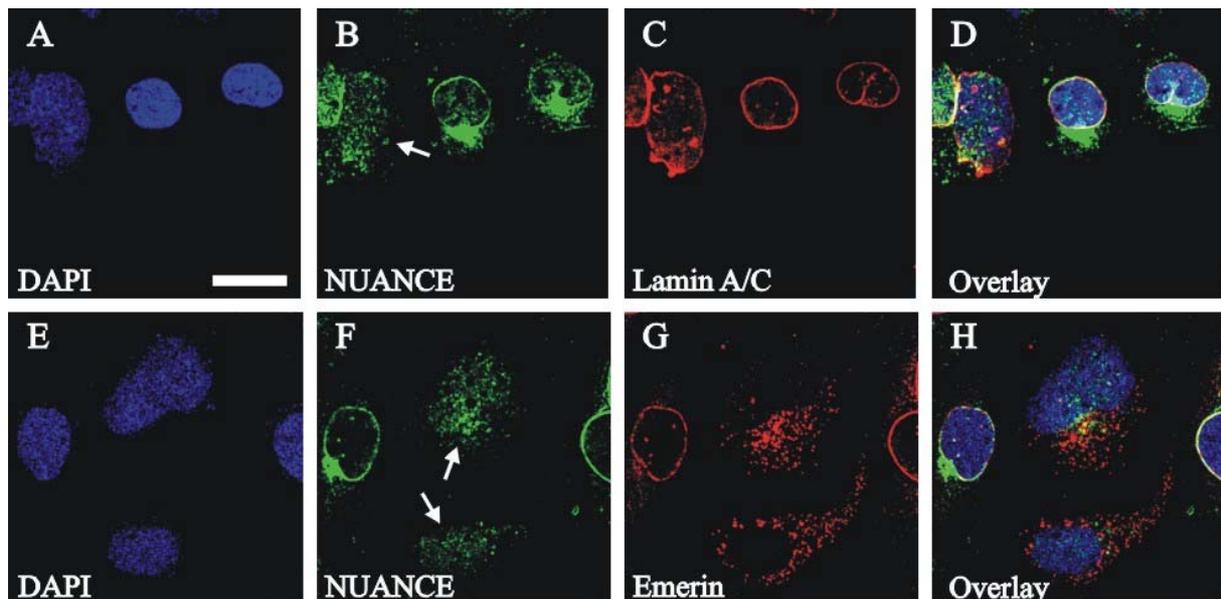


Abbildung 3.31 „Knockdown“ von NUANCE in COS7-Zellen

COS7-Zellen wurden mit pSUPER-K2 transfiziert, nach zwei Tagen fixiert und gefärbt. In NUANCE-positiven Zellen ist die Emerin Färbung deutlich in der nukleären Membran zu sehen (G). Transfizierte Zellen haben keine NUANCE Färbung in der nukleären Membran (B, F, Pfeile), die Emerin Färbung ist diffus und nicht mehr nur in der Zellkernmembran (G). Die Lamin A/C Färbung ist in NUANCE-defizienten Zellen nicht beeinträchtigt, jedoch sehen die Kerne deformiert aus (C). (A, E) DAPI Färbung, (B, F) NUANCE Färbung durch α -NUANCE pAb K1 (sekundärer Antikörper α -Kaninchen FITC-Konjugat), (C) Lamin A/C Färbung durch α -Lamin A/C Antikörper (JOL2) (sekundärer Antikörper α -Maus Cy3-Konjugat) (G) Emerin Färbung durch α -Emerin Antikörper (sekundärer Antikörper α -Maus Cy3-Konjugat), (D, H) korrespondierende Überlagerungen. Die Zellen wurden mit 3 % PFA fixiert und mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. Die Bilder wurden mit dem konfokalen Laser Scan Mikroskop aufgenommen. Balken 25 μ m.

3.8 Verteilung des NUANCE Proteins während des Zell-Zyklus

Als Protein der Kernmembran stellte sich die Frage, was mit NUANCE während der Mitose passiert. Während der Mitose wird die Kernmembran aufgelöst und ihre Proteine über das ER und eventuell vesikuläre Strukturen verteilt (Yang et al., 1997). COS7-Zellen besitzen in Kultur normalerweise eine hohe Variabilität der Zell- und Zellkernform, was einen Vergleich ihrer Morphologie erschwert. Dafür sind ihre

Zellkerne (15-20 μm) im Gegensatz zu A431- und HEK293-Zellen fast doppelt so groß (Vergleiche Abb. 3.27). Da sich die Zellen während der Zellteilung meist abrunden und so die sichtbare Fläche in der Aufsicht verringern, war es wichtig, Zellen mit großen Zellkernen für dieses Experiment zu nehmen. Nach Standardisierung der Synchronisation mit 50 ng/ml Nocodazol im Kulturmedium über Nacht wurden die Zellen am darauf folgenden Tag mit frischem Medium gewaschen und nach 90 min fixiert. Danach wurden die Zellen mit DAPI und durch α -NUANCE Antikörper mAk K20-478-4 gefärbt.

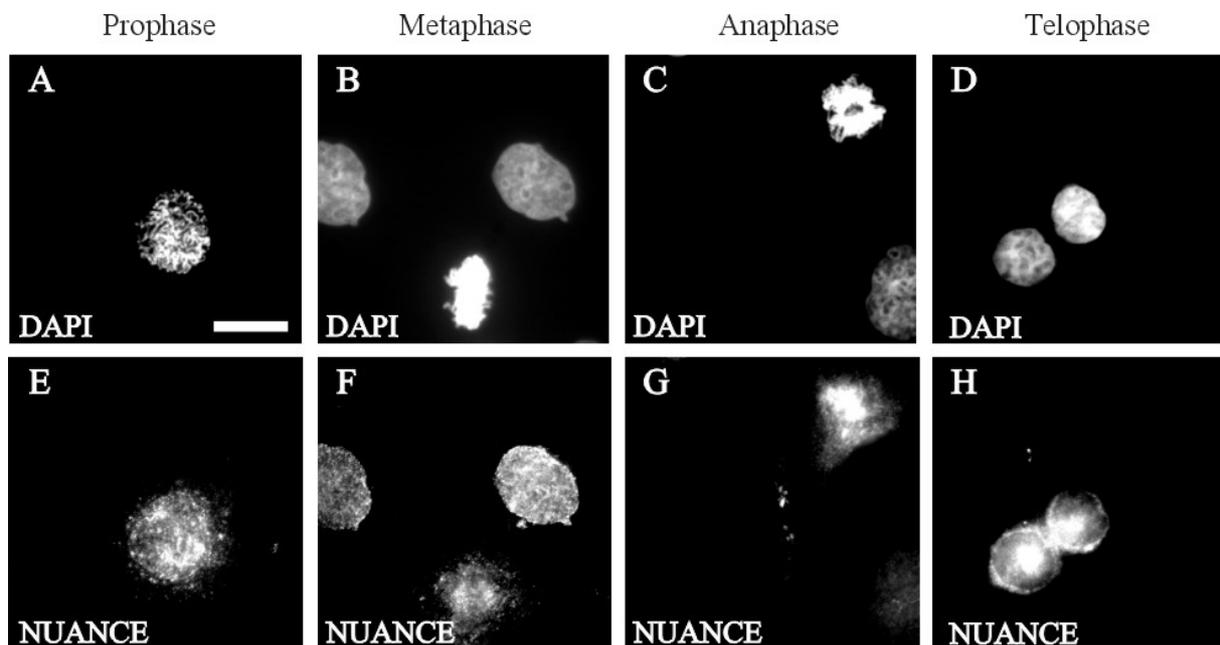


Abbildung 3.32 NUANCE Verteilung während des Zell-Zyklus

COS7-Zellen wurden über Nacht in Medium mit 50 ng/ml Nocodazol behandelt. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und durch frisches Medium ohne Nocodazol ersetzt. Nach 90 min wurden die Zellen fixiert und mit DAPI (A-D) und dem N-terminalen α -NUANCE Antikörper (mAk K20-478-49) (E-H) gefärbt (sekundärer Antikörper α -Maus Cy3-Konjugat). Verschiedene Phasen des Zell-Zyklus konnten durch DAPI Färbung verifiziert werden. In der Prophase (A, E) beginnt sich die Kernmembran aufzulösen. NUANCE befindet sich noch an einigen Membranfragmenten (E). In der Meta- und Anaphase (B, F, C, G) ist die NUANCE Färbung diffus (F, G). In der Telophase (D, H) bilden sich die Kernmembranen um die beiden Tochterkerne. NUANCE re-lokalisiert wieder in den neu entstehenden Membranen (H). Die Zellen wurden mit 3 % PFA fixiert und mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. Die Bilder wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop (Leica) aufgenommen. Balken 20 μm .

Durch die Verteilung der Chromosomen kann Rückschluss auf die jeweilige Zellteilungsphase geschlossen werden. Es konnten verhältnismäßig viele Kerne in der Prophase identifiziert werden, in der sich die Kernmembran langsam auflöst. NUANCE kann in dieser Phase an einigen Membranfragmenten identifiziert werden, die Färbung deutet aber eine Verteilung des Proteins in der gesamten Zelle an (Abb.

3.32 E). Insgesamt konnten sehr wenig eindeutig identifizierbare Zellen in der Meta-, Ana- oder Telophase gefunden werden. In der Meta- und Anaphase scheint NUANCE jedoch über die gesamte Zelle verteilt zu sein (Abb. 3.32 F, G). Bei Einsatz der Telophase, wenn sich die neuen Kernmembranen um die beiden Tochterkerne zu bilden beginnen, kann wieder eine Kernfärbung des NUANCE Proteins wahrgenommen werden (Abb. 3.32 H).

4 DISKUSSION

4.1 NUANCE, ein gigantisches Protein der α -Aktinin Superfamilie

Nach Vervollständigung der humanen NUANCE cDNA auf 21.794 Basenpaare und Computeranalysen bezüglich der Proteinstruktur ergab sich eine Vorstellung der Ausmaße und funktionellen Bereiche des 6883 Aminosäuren langen und ~800 kDa schweren NUANCE Proteins. Das NUANCE Gen auf Chromosom 14 mit seinen 115 Exons ist ein sehr komplexes Gen, das für weit mehr Isoformen kodieren könnte als bisher bekannt. Eine N-terminale kurze Isoform (ABD-S) sowie C-terminale kurze Isoformen (Nesprin2 α , 2 β und 2 γ) sind bisher identifiziert worden (Zhang et al., 2001; Zhen et al., 2002). Das Enaptin Gen auf Chromosom 6, das für ein Protein mit den gleichen strukturellen Bereichen wie NUANCE kodiert, ist ebenfalls ein sehr komplexes Gen, das für mehrere Isoformen kodiert (Zhang et al., 2001; Padmakumar et al., 2004). Überraschenderweise liegt hinter dem Enaptin Gen das Gen für den Östrogen-Rezeptor1, ähnlich wie das Gen vom Östrogen-Rezeptor2 hinter dem NUANCE Gen liegt. Dieser Umstand könnte auf eine Duplikation der beiden großen Genabschnitte während der Evolution hindeuten.

Die orthologen Proteine von NUANCE und Enaptin in *D. discoideum* (Interaptin), *C. elegans* (ANC1) und *D. melanogaster* (MSP300) enthalten ebenfalls eine ABD, eine coiled-coil Region im mittleren Bereich des Proteins und eine C-terminale TMD (Zhang et al., 2002). Dies deutet darauf hin, dass die Ursprünge von NUANCE und Enaptin bis zur sozialen Amöbe *D. discoideum* zurückgehen.

Informationen der N-terminalen ABD aus früheren Untersuchungen wurden verwertet und weitergehend analysiert (Zhen, 2001; Zhen et al., 2002). Dies bezieht sich vor allem auf die ABD vom α -Aktinin Typ. Sie wurde auf Aminosäureebene mit anderen Proteinen der α -Aktinin Superfamilie verglichen (Abb. 3.4, Abb. 3.5). Dabei zeigte sich, dass NUANCE, Enaptin und Calmin bezüglich ihrer ABD einen zusätzlichen Serin-reichen Bereich zwischen den beiden Calponin-homologen Domänen besitzen und eine eigene Unterfamilie der α -Aktinine bilden. Der Serin-reiche Bereich könnte durch Phosphorylierung einen regulatorischen Einfluss auf die Stärke der F-Aktin Bindung während verschiedener Ereignisse wie z. B. der Zellmigration oder -teilung ausüben.

Das Vorhandensein einer einzelnen C-terminalen TMD unterscheidet NUANCE, Enaptin und Calmin ebenfalls von anderen Mitgliedern der α -Aktinin Superfamilie. Im

Gegensatz zu Calmin, das in intrazellulären Membranen zu finden ist, sind NUANCE und Enaptin, die in der Zellkernmembran zu finden sind, durch das Vorhandensein einer hoch konservierten C-terminalen *Klarsicht*-Domäne gekennzeichnet (Ishisaki et al., 2001; Zhen, 2001; Zhang et al., 2001; Zhen et al., 2002; Padmakumar et al., 2004; Abb. 3.25). Das *Klarsicht*-Protein von *D. melanogaster* ist für einen regulierten Lipidtransport im sich entwickelnden Embryo und für nukleäre Migration im Auge zuständig (Mosley-Bishop et al., 1999). Auffällig im C-terminalen Bereich der *Klarsicht*-Domäne sind die endständigen Proline. Die *Klarsicht*-Domäne mit einer TMD vom Typ II unterscheidet NUANCE und Enaptin von anderen integralen Proteinen der Kernmembran wie z.B. Emerin, dem Lamin B-Rezeptor, LAP1 oder LAP2.

NUANCE und Enaptin unterscheiden sich von Calmin durch einen zentralen Bereich mit einer großen Anzahl von Spektrin-Domänen. Die Spektrin-Domänen im mittleren Bereich des Proteins wurden in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Erste Experimente zeigten jedoch, dass die Spektrin-Domänen für die Verankerung und Stabilisierung von NUANCE an Membranen wichtig zu sein scheinen. C-terminale NUANCE-Fragmente, die Spektrin-Domänen aber keine TMD enthalten, lassen sich an inneren Zellmembranen finden (Zhen et al., 2002). Für eine Isoform von Enaptin (Syne1C) wurde gezeigt, dass sie spezifisch mit dem Golgi-Netzwerk interagiert (Gough et al., 2003). Protein 4.1R ist ein Strukturprotein, das in Erythrocyten die Aktin-Spektrin-Komplexe an der Plasmamembran verankern kann. Neuere Untersuchungen zeigten, dass Proteine der 4.1 Familie nicht nur ausschließlich an der Plasmamembran, sondern auch in intrazellulären Membranen wie der Zellkernmembran zu finden sind (Krauss et al., 2002; Krauss et al., 2003). Die Stabilisierung von NUANCE an der Zellkernmembran durch seine Spektrin-Domänen könnte ähnlich wie bei den Proteinen der 4.1 Familie in den Erythrocyten gewährleistet werden.

Eine weitere Stabilisierung des Proteins an der Zellkernmembran könnte durch Di- oder Oligomerisierung gewährleistet werden. Mislow et al. (2002) zeigten, dass die Spektrin-Domänen 3 und 5 von Nesprin1 α mit sich selbst interagieren können. Im NUANCE Protein wären dies die C-terminalen Spektrin-Domänen 18 und 20. Auch Leucin-Zipper könnten in eine Oligomerisierung involviert sein und NUANCE in einem Netzwerk um die Zellkernmembran organisieren.

NUANCE und Enaptin sind Proteine der α -Aktinin Superfamilie, die als erste das Potential zeigen, das Aktin-Cytoskelett mit dem Zellkern zu verbinden. Die Stabilisierung des Zellkerns durch das Aktin-Cytoskelett innerhalb der Zelle sowie die gerichtete Bewegung von Zellkernen könnte durch diese beiden Proteine gewährleistet werden.

4.2 Subzelluläre Charakterisierung von NUANCE

Zhang et al. (2001) zeigten, dass NUANCE und Enaptin zahlreiche C-terminale Isoformen besitzen. Bislang fehlte jedoch der Beweis, dass die NUANCE cDNA für ein durchgängiges Protein mit einer N-terminalen ABD und einer C-terminalen TMD kodiert. Westernblotanalysen mit mAk K20-478-4, mAk K49-260-1 und pAb K1 wiesen NUANCE in COS7-, HEK293- (Abb. 3.7) und A431-Gesamtzellhomogenaten (nicht gezeigt) nach. COS7- und HEK293-Zellen enthalten keine nachweisbaren C-terminalen Isoformen, sondern ergeben in Westernblotanalysen eine einzige Bande von ~800 kDa. Auch die Northernblotanalyse von HEK293-Gesamt-RNA mit einer C-terminalen Sonde zeigt eine einzige Bande von ~21 kb (Abb. 3.7). Da COS7-Zellen nur eine große NUANCE Isoform enthalten und die Zellkernmembran in Immunfluoreszenzaufnahmen deutlich gefärbt wird, wurde hauptsächlich diese Zell-Linie für weitere Experimente genutzt.

Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen, dass NUANCE in COS7-Zellen hauptsächlich an der Zellkernmembran lokalisiert ist. Zusätzliche NUANCE-positive Bereiche nahe des Zellkerns, innerhalb des Kerns im Nucleoplasma und in den Nucleoli konnten ebenfalls detektiert werden (Abb. 3.10-3.12). Nucleoli sind die Orte der ribosomalen Biogenese sowie für die Prozessierung und den Export von mRNA und tRNA verantwortlich (Schneiter et al., 1995; Bertrand et al., 1998). Die Ko-Lokalisierung von NUANCE und einem Nucleoli-Marker (NO38) zeigt, dass NUANCE in die ribosomale Biogenese oder in die Organisation und Stabilisierung der Nucleoli-Matrix involviert sein könnte. Zudem könnte NUANCE mit Proteinen des Arp2/3-Komplexes und Aktin Bestandteil einer nukleären Matrix sein.

Durch selektive Permeabilisierung von COS7-Zellen mit Digitonin und Triton X-100 konnte NUANCE definitiv auf der äußeren Kernmembran nachgewiesen werden (Abb. 3.11). Um nachzuweisen, dass sich NUANCE auch in der inneren Kernmembran finden lässt, wurden die monoklonalen Antikörper in der Elektronenmikroskopie eingesetzt. Beide Antikörper ließen sich jedoch nicht

zufriedenstellend nachweisen. Im Verlauf der Arbeit, konnte eine Interaktion von NUANCE mit Lamin A/C, einem Protein der inneren Kernlamina, *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. Die Färbung des Nucleoplasmas, der Nucleoli sowie die Bindung an Lamin A/C lassen die Schlussfolgerung zu, dass NUANCE auch auf der inneren Zellkernmembranseite zu finden ist.

Die NUANCE-positive Färbung in der Führungslamelle von stimulierten COS7-Zellen (Abb. 3.13) ko-lokalisiert mit dem subplasmalem Aktin-Cytoskelett. Die dynamische Umlagerung des Aktin-Cytoskeletts während der Lamellipodienbildung wird unter anderem durch Ras und Rac induziert (Hall, 1998). Die Lokalisation und eine posttranslationale Modifikation von NUANCE könnten ebenfalls von Ras, Rac oder von ihnen modifizierten Proteinen abhängen. Der cytosolische Bereich von NUANCE könnte phosphoryliert oder proteolytisch von der TMD abgespalten werden. Eine Vorhersage von Phosphorylierungen für die Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin innerhalb des Proteins mit dem Programm NetPhos (Bloom et al., 1999) ergab für NUANCE insgesamt 361 potentielle Phosphorylierungsstellen (Serin: 246, Threonin: 72, Tyrosin: 43). Eine Vorhersage von proteolytischen Spaltungen innerhalb des Proteins mit dem Programm PeptideCutter (<http://www.expasy.ch>) ergab interessanterweise eine mögliche Spaltung nach Aminosäure 6783, d. h. vor der *Klarsicht*-Domäne, durch die Caspasen 3 und 7. Die Caspasen 3 und 7 besitzen eine ähnliche Proteinstruktur und ähnliche Substratspezifität (Denault & Salveson, 2003). Sie haben eine teilweise nukleäre Lokalisation und besitzen die Möglichkeit Spektrine proteolytisch zu spalten (Shikama et al., 2001; Rotter et al., 2004).

4.3 NUANCE bindet F-Aktin *in vitro* und *in vivo*

Zhen et al. (2002) zeigten, dass GFP-Fusionsproteine der ABD mit Stressfasern des Aktin-Cytoskeletts ko-lokalisieren. GFP-ABD-S, eine N-terminale Isoform von NUANCE, die eine unvollständige ABD enthält, ko-lokalisiert außerdem mit Proteinen der Fokal-Kontakte (Zhen et al., 2002). Latrunculin A ist eine Droge, die eine Depolymerisation von F-Aktin zur Folge hat (Yarmola et al., 2000). COS7-Zellen, die mit 1 μM dieser Droge behandelt werden, zeigen schon nach 15 min einen Abbau des intrazellulären Aktin-Cytoskeletts. Der Zellkern wird dabei kleiner und NUANCE findet sich in Aktin-positiven „Wolken“ nahe dem Zellkern (Zhen et al., 2002). Durch eine *in vitro* Aktin-Bindungs Analyse konnten die *in vivo* Daten bestätigt werden.

NUANCE 6xHis-ABD bindet an F-Aktin, besitzt das Potential F-Aktin zu bündeln, beschleunigt die Aktin-Polymerisation und besitzt ein Bindungsverhältnis von einem 6xHis-ABD zu einem Aktin-Monomer (Abb. 3.14-3.16). Eine Überexpression von GFP-NUA^{Δ460-6643} zeigt *in vivo* eine Akkumulation von F-Aktin um den Zellkern (Zhen et al., 2002). NUANCE als Strukturprotein könnte somit *in vivo* an der äußeren Zellkernmembran F-Aktin rekrutieren, bündeln und eine äußere Aktin-Hülle (Rosenblum & Shivers, 2000) des Zellkerns stabilisieren.

4.4 NUANCE bindet Lamin A/C *in vitro* und *in vivo*

Mislow et al. (2002) zeigten, dass die letzten drei Spektrin-Domänen von Enaptin mit Lamin A/C interagieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die letzten vier Spektrin-Domänen von NUANCE mit einer gemeinsamen Region von Lamin A und C (Aminosäuren 243-566) *in vitro* interagieren. Lamin A/C ko-präzipitiert mit GST-SR aus COS7-Zell-Lysaten, GST-SR bindet an Lamin A in einem „Blot-overlay“-Test und die Lamin C-Fragmente coil2, tail und Δlamin C ko-sedimentieren mit SR (Abb. 3.17-Abb. 3.20). Das tail-Fragment besitzt von den drei Fusionsproteinen die höchste Affinität zu SR. Überraschenderweise hat Δlamin C, das auch das tail-Fragment enthält, eine geringere Affinität zu SR als das tail-Fragment alleine. Dies könnte auf eine inkorrekte Faltung des Fusionsproteins zurückzuführen sein. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist durch das Dimerisierungspotential der Lamine gegeben. Δlamin C enthält Bereiche der α-helikalen Region und könnte deshalb in Lösung mit sich selbst interagieren und mit SR um die Bindungsstelle konkurrieren.

Der Einsatz des „Yeast Two-Hybrid“-Systems zeigte, dass die letzten vier Spektrin-Domänen mit dem humanen Lamin A *in vivo* interagieren (Tab. 3.2). Die Kontrollreaktion, eine Interaktion von Lamin A mit sich selbst, sowie der eigentliche Versuchsansatz ergaben jedoch nur eine schwache Blaufärbung im β-Galaktosidasetest der Leu⁺/Trp⁺ und His⁺ Hefekolonien. Das „Yeast Two-Hybrid“-System ist nicht absolut zuverlässig. Es gibt die Möglichkeiten von falsch-positiven Interaktionen, d. h. die beiden Proteine interagieren im „Yeast Two-Hybrid“-System, *in vivo* jedoch nicht, oder falsch-negativen Interaktionen, d. h. die Proteine interagieren nicht im „Yeast Two-Hybrid“-System, aber *in vivo*. Weitere Nachweise einer Lamin A/C-NUANCE-Interaktion wurde *in vivo* durchgeführt. Eine Umverteilung des endogenen Lamin A/C von der Zellkernmembran in intranukleäre Areale durch Expression eines dominant-negativen GFP-Lamin B-Proteins in COS7-Zellen

beeinflusst die NUANCE Lokalisation *in vivo* (Abb. 3.21). Färbungen mit mAk K20-478-4 α -NUANCE Antikörpern zeigen eine schwache Färbung der Zellkernmembran und eine starke Färbung innerhalb der Lamin A/C-positiven intranukleären Bereiche. Es ist anzunehmen, dass NUANCE-positive Areale in der Nähe der inneren Zellkernmembran liegen, da NUANCE eine TMD besitzt. Der cytosolische bzw. nucleoplasmatische Teil des NUANCE Proteins könnte aber auch proteolytisch von der TMD abgespalten werden. Der „Knockdown“ von Lamin A/C zieht eine Umverteilung von endogenem NUANCE nach sich (Abb. 3.22). Die NUANCE-Färbung mit mAk K20-478-4 ist allerdings sehr schwach und die Frage, ob NUANCE im Inneren der Zelle diffus verteilt oder abgebaut wird, muss noch geklärt werden. Mutationen des Lamin A/C Proteins haben Einfluss auf die Enaptin-Isoform Nesprin1 α , die nicht mehr länger in der Zellkernmembran lokalisiert ist (Muchir et al., 2003). Zwischen den Aminosäuren 243-566 von Lamin A/C, dem Interaktionsbereich mit NUANCE, liegen 34 bekannte potentielle Mutationen, die zu Laminopathien führen (Novelli & D'Apice, 2003). Es ist denkbar, dass Mutationen im Lamin A/C Gen die Bindung der beiden Proteine in diesem Bereich beeinflussen könnten. Es könnte zu einer Miss-Lokalisierung von NUANCE und somit zu einer Destabilisierung des Zellkerns führen. Auf der anderen Seite könnten Mutationen in NUANCE pathologische Auswirkungen haben und einen gewissen Prozentsatz an Laminopathien verursachen.

4.5 C-terminale NUANCE-Fragmente verdrängen endogenes NUANCE aus der Zellkernmembran und binden an SUN1/UNC84

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es, außer einer direkten Interaktion mit Lamin A/C, einen zusätzlichen Mechanismus der Kernmembranlokalisation von NUANCE geben muss. Die Fusionsproteine GFP-Cterm3, welches die gesamte *Klarsicht*-Domäne enthält, und GFP-Cterm6, welches die TMD und den lumenalen Teil enthält, sind in der Zellkernmembran lokalisiert und können endogenes NUANCE verdrängen (Abb. 3.25). Dabei ist nicht klar, ob NUANCE in das ER abgedrängt oder abgebaut wird. Beide Fusionsproteine können nicht direkt an Lamin A/C binden. GFP-Cterm5 unterscheidet sich von GFP-Cterm6 durch das Fehlen der letzten vier Aminosäuren, ist in der Kernmembran sowie in inneren Membranen lokalisiert und kann endogenes NUANCE nicht verdrängen (Abb. 3.25). Dieses Experiment deutet

auf eine Interaktion von NUANCE mit einem oder mehreren anderen Proteinen innerhalb des Lumens der beiden Zellkernmembranen hin. Interessanterweise existieren endogene C-terminale Isoformen von NUANCE (Nesprin2 α , 2 β , 2 γ), die ebenfalls das Potential hätten NUANCE zu verdrängen (Zhang et al., 2001). Bisher konnte noch nicht geklärt werden, ob NUANCE und diese C-terminalen Isoformen parallel in den selben Zellen/Geweben vorkommen. Falls dies der Fall wäre, könnten diese C-terminalen Isoformen die Bindung von NUANCE an der Zellkernmembran beeinflussen und regulieren.

Das dominant-negative Fusionsprotein GFP-Cterm1 hat keinen Einfluss auf die Lamin A oder B Verteilung. Lamin B wird durch den Lamin B-Rezeptor an der inneren Kernmembran gehalten. Lamin A besitzt eine CAAX-Box, die das Protein an der inneren Kernmembran verankert. Lamin A kann zusätzlich DNA und andere Proteine wie z. B. Lamin B binden, die auf diese Weise zur Stabilisierung der Kernlamina beitragen. Allerdings bot der dominant-negative Effekt von GFP-Cterm1 die Möglichkeit, Rückschlüsse auf die Funktion von NUANCE zu erhalten. Durch eine statistische Auswertung konnte gezeigt werden, dass die Zellkerne in transfizierten HEK293- und A431-Zellen signifikant kleiner sind (Abb. 3.28). Diese Beobachtung kann mit den vorherigen Latrunculin A-Experimenten in Zusammenhang gebracht werden (Zhen et al., 2002). Dort wurde das Aktin-Cytoskelett, d. h. die Aktin-NUANCE Bindung, zerstört. Die Zellkerne bekamen Einfaltungen, wurden kleiner und wiesen eine unregelmäßige Form auf. Auch die Abwesenheit von Lamin A/C führt zu deformierten und fragilen Zellkernen, deren Cytoskelett-Zugfestigkeit beeinflusst ist (Lammerding et al., 2004). Die Daten untermauern die potentielle Funktion von NUANCE als Organisator eines Aktin-Netzwerkes an der äußeren Zellkernmembran, das für Form und Stabilität verantwortlich ist. Die Unterschiede der Größenabnahme in den beiden Zell-Linien HEK293 und A431 hängen eventuell von den Geweben oder unterschiedlichen Expressionsraten von NUANCE ab.

Bisher sind hauptsächlich Mikrotubuli und Mikrotubuli-assoziierte Proteine mit einer nukleären Migration in Verbindung gebracht worden (Morris, 2003). Experimente in *C. elegans* haben jedoch gezeigt, dass nukleäre Migration und Verankerung auch das Aktin-Cytoskelett benötigen. Mutationen in ANC1, einem NUANCE Ortholog in *C. elegans*, beeinflussen die Lokalisierung von Mitochondrien und dem Zellkern (Starr & Han, 2002). ANC1 besitzt wie NUANCE eine *Klarsicht*-Domäne (Abb. 3.6) und wird abhängig von UNC84, einem integralen Membranprotein, und Ce-Lamin in der

Zellkernmembran lokalisiert (Malone et al., 1999; Lee et al., 2002). Da die gesamte *Klarsicht*-Domäne hochkonserviert ist, sollte auch das Gegenstück, ein Protein innerhalb des Lumens mit Bindungsstelle für Proteine, die eine *Klarsicht*-Domäne enthalten, eine konservierte Aminosäuresequenz aufweisen. Wir haben deshalb eine Bindungsanalyse vom lumenalen Bereich des NUANCE Proteins mit einem C-terminalen orthologen Maus UNC84-Fusionsprotein (SUN1) durchgeführt. Der lumenale Bereich des NUANCE Proteins kann mit GFP-UNC84 aus COS7-Zell-Lysat ko-präzipitieren (Abb. 3.29). Eine Deletion der letzten vier Aminosäuren hat zur Folge, dass die beiden Proteine nicht mehr aneinander binden. Diese Beobachtung ist mit den Verdrängungsexperimenten der dominant-negativen GFP-Fusionsproteine konsistent (Abb. 3.25). GFP-Cterm5 kann endogenes NUANCE nicht mehr aus der Zellkernmembran, d. h. von der Bindungsstelle an SUN1/UNC84, verdrängen. Der Prolin-reiche Rest ist in allen Proteinen, die eine *Klarsicht*-Domäne enthalten, vorhanden. Ob nur der Prolin-reiche Rest oder auch andere Aminosäuren des lumenalen Teils für die Bindung an SUN1/UNC84 essentiell sind, muss durch weitere Experimente gezeigt werden.

4.6 NUANCE interagiert mit Emerin

Mislow et al. (2002) zeigten, dass die letzten sieben Spektrin-Domänen von Enaptin mit Emerin interagieren. Ein erster Hinweis auf eine Interaktion von NUANCE und Emerin ergab der GST-„Pull-down“ von Emerin mit SR, den letzten vier Spektrin-Domänen von NUANCE, aus COS7-Zell-Lysaten (Abb. 3.17). Es ist jedoch nicht klar, ob diese Interaktion eine direkte oder eine indirekte, z. B. durch Emerin-assoziiertes Lamin A/C, ist. Überraschenderweise zeigten die Fusionsproteine GFP-Cterm1 und GFP-Cterm6, die NUANCE aus der Zellkernmembran verdrängen, eine Umverteilung von endogenem Emerin (Abb. 3.30). Emerin findet sich in mit pEGFP-Cterm1 transfizierten COS7-Zellen hauptsächlich an der Zellkernmembran und vereinzelt in kleinen vesikulären Strukturen außerhalb der Zellkernmembran. GFP-Cterm6 besitzt das Potential, Emerin komplett aus der Zellkernmembran zu verdrängen. Dieses Experiment zeigt, dass NUANCE bzw. die letzten beiden Spektrin-Domänen von NUANCE *in vivo* mit Emerin interagieren und es in der Zellkernmembran halten können. Dies widerspricht dem GST-„Pull-down“, in dem GST-K1 mit den letzten beiden Spektrin-Domänen nicht in der Lage ist, mit Emerin zu ko-präzipitieren. Emerin ist ein integrales Membranprotein mit einer TMD. In COS7-Zell-Lysat in dem

die Membranproteine mit 1 % Triton X-100 solubilisiert wurden, könnten die hydrophoben Aminosäurereste der TMD von Emerin eine andere Faltung als *in vivo* einnehmen. Zudem könnte das Protein präzipitieren und nach einer Zentrifugation von 100.000 x g nur in geringem Maße im Überstand zu finden sein. Eine Bindung mit K1 könnte so erschwert und nicht nachgewiesen werden. Weitere Proteinbindungsanalysen *in vitro* mit Einschränkung der Bindungsregion, die auch eine direkte Interaktion der beiden Proteine zeigen würden, sind notwendig.

Vaughan et al. (2001) zeigten, dass die Lokalisation von Emerin Lamin A/C-abhängig ist und Emerin bevorzugt mit Lamin C interagiert. Eine Verringerung von Lamin A/C in A431-Zellen, hat eine Umverteilung von Emerin zur Folge (Abb. 3.23), was mit bisherigen Forschungsergebnissen konsistent ist (Harborth et al., 2001). Die Verdrängung von Emerin mit einem dominant-negativen NUANCE Fusionsprotein sowie der „Knockdown“ von NUANCE (Abb. 3.31) weisen jedoch darauf hin, dass die Lokalisation von Emerin hauptsächlich von NUANCE abhängt. Dies ist ein neuer und unerwarteter Befund. Die endogene NUANCE Lokalisation hängt wiederum von Lamin A/C und SUN1/UNC84 ab. Ähnlich wie Dystrophin über die Plasmamembran das intrazelluläre Aktin-Cytoskelett mit der extrazellulären Matrix verbinden kann, könnte NUANCE das intrazelluläre Aktin-Cytoskelett über die Zellkernmembranen mit der nukleären Matrix verbinden. NUANCE als struktureller Organisator hätte somit enorme Wichtigkeit und Mutationen im Protein könnten ähnlich wie bei Dystrophin zu muskulärer Dystrophie oder Laminopathien führen.

4.7 NUANCE während der Zellteilung

NUANCE verhält sich während der Zellteilung ähnlich wie andere Proteine der Zellkernmembran. Lamin A/C, Emerin, der Lamin B-Rezeptor und Proteinen des Kernporenkomplexes werden während der Auflösung der Zellkernmembran diffus in der gesamten Zelle verteilt (Ellenberg et al., 1997; Haraguchi et al., 2000; Fairley et al., 2002). Die Beobachtung, dass NUANCE in der Telophase wieder in der sich bildenden Zellkernmembran lokalisiert, ist mit diesen Daten konsistent. Lamin A/C als peripheres Membranprotein wird während der Mitose phosphoryliert und dadurch solubilisiert (Mattout-Drubezki & Gruenbaum, 2003). Derzeit existieren mehrere Hypothesen zum Schicksal der integralen Membranproteine während der Mitose. Frühere Experimente ergaben, dass die Zellkernmembran während der Mitose in tubuläre und vesikuläre Strukturen zu zerfallen scheint (Robbins & Gonatas, 1964;

Zeligs & Wollman, 1979). Die integralen Membranproteine müssten ebenso in diesen Bereichen zu finden sein. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass z. B. der Lamin B-Rezeptor zu Beginn des Zellzyklus in die Membranen des ER diffundiert und während der Mitose dort lokalisiert bleibt (Ellenberg et al., 1997). NUANCE in der äußeren Kernmembran könnte aufgrund seiner TMD ebenso im ER zu finden sein. NUANCE in der inneren Kernmembran könnte nach Wegfall der Lamin A/C Bindung und Auflösung der Kernporenkomplexe mit Emerin in die Membranen des ER diffundieren. Weiterführende Experimente, Immunfluoreszenzstudien und Videomikroskopie von unterschiedlichen Kernproteinen sowie ER-Markern während der Mitose, könnten diese Hypothese für NUANCE bestätigen.

4.8 Struktur- und Interaktionsmodell von NUANCE

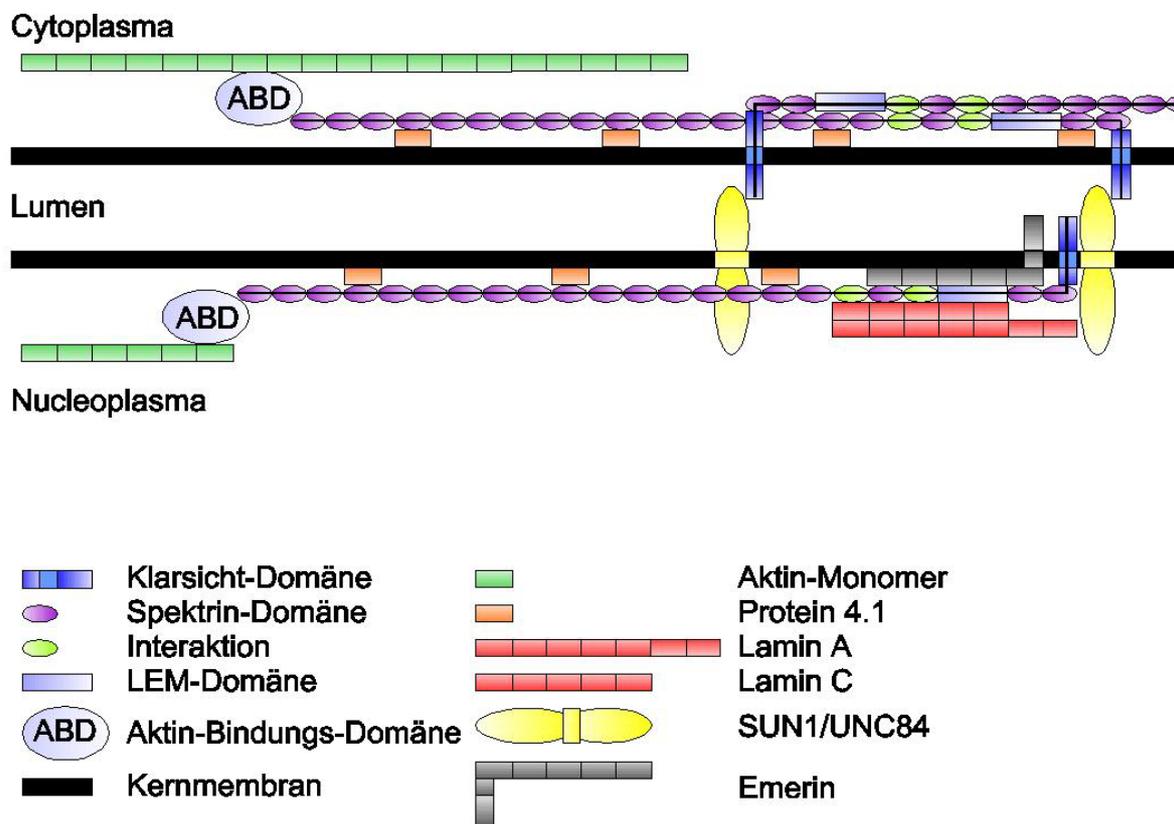


Abbildung 4.1 Strukturmodell der NUANCE Interaktionen

Die Daten dieser und vorheriger Arbeiten zu NUANCE und zusätzliche Informationen von Nesprin1 α (Mislow et al., 2002) ergeben ein Struktur- und Interaktionsmodell (Abb. 4.1). NUANCE ist in der inneren und äußeren Zellkernmembran über eine *Klarsicht*-Domäne verankert. Die *Klarsicht*-Domäne interagiert im lumenalen Bereich

mit SUN1/UNC84, einem integralen Membranprotein der inneren Kernmembran. NUANCE besitzt eine parallele Orientierung zu den Kernmembranen. Auf der inneren und äußeren Seite interagieren die Spektrin-Domänen mit Proteinen der Bande 4.1 Familie, die NUANCE an der Zellkernmembran stabilisieren. Eine zusätzliche Interaktion der Spektrin-Domänen 18 und 20 sorgt für eine weitere Stabilisierung. Auf der cytosolischen Seite organisiert die ABD von NUANCE das Aktin-Cytoskelett in Bündeln und Netzwerken um den gesamten Zellkern. Auf der nucleoplasmatischen Seite interagieren Lamin A und C mit den C-terminalen Spektrin-Domänen 19 und 20. Emerin bindet über eine kooperative Bindung an die letzten beiden Spektrin-Domänen und Lamin A/C. Zusammen mit nukleärem Aktin und Laminen wird die innere Zellkernmembran ausgekleidet und stabilisiert.

4.9 Perspektiven

Es stehen nun mehrere Plasmide zur Verfügung, die eine weitere Charakterisierung von NUANCE in der Zukunft unterstützen werden. Exzellente Werkzeuge sind die Plasmide pEGFP-Cterm1, pEGFP-Cterm6 und pSUPER-K2. Die Verdrängung der endogenen Proteine NUANCE und Enaptin, sowie der „Knockdown“ von NUANCE in transfizierten Zellen könnte mittels Videomikroskopie untersucht werden. Dies kann z. B. bei der Zellmigration Rückschlüsse auf die Zellkernlokalisierung bei Abwesenheit von NUANCE und Enaptin ergeben. Weitere funktionelle Aspekte von NUANCE in vielzelligen Systemen z. B. bei der humanen Epidermis- oder Muskeldifferenzierung könnten ebenfalls mit Hilfe dieser Plasmide untersucht werden. Essentiell ist eine Bestätigung der Interaktion von Emerin und NUANCE *in vitro* und *in vivo*. Potentielle Interaktionspartner von NUANCE wie z. B. Protein 4.1 oder Proteine des Arp2/3-Komplexes sollten in Zukunft untersucht werden. Eine Verteilung der zahlreichen Isoformen in verschiedenen Geweben und subzellulären Kompartimenten während der embryonalen Entwicklung und in adulten Mäusen könnte neue Erkenntnisse über die Funktion von NUANCE während der Differenzierung und Kernmigration ergeben. Die Generierung einer „Knockout“-Maus kann ebenfalls weitere Erkenntnisse über die Funktion von NUANCE liefern. Allerdings dürfte es äußerst schwierig sein, einen kompletten „Knockout“ dieses Proteins zu erhalten, da das NUANCE Gen 115 Exons und daraus resultierend zahlreiche N- und C-terminale Isoformen enthält. Obwohl das homologe Enaptin eine andere Gewebeverteilung besitzt (Zhang et al., 2001; Padmakumar et al., 2004), könnte Enaptin trotzdem einen Wegfall von NUANCE

ausgleichen, so dass kein Effekt festzustellen wäre. Gerade wegen seiner Größe bleibt es jedoch ein ehrgeiziges Unterfangen, die Funktion von NUANCE als strukturellem Organisator der Zellkernmembran und des Aktin-Cytoskeletts aufzuklären.

5 ZUSAMMENFASSUNG

NUANCE ist ein Protein der α -Aktinin Superfamilie, das eine Aktin-Bindungs-Domäne, 22 Spektrin-Domänen und eine Transmembran-Domäne enthält. Das NUANCE Gen erstreckt sich über eine Länge von 373 kb auf dem humanen Chromosom 14. Die cDNA ist 21,8 kb lang und kodiert für ein Protein mit einer Masse von 789 kDa. Durch selektive Permeabilisierungstechniken und Immunfluoreszenzstudien auf subzellulärer Ebene konnte gezeigt werden, dass NUANCE auf der äußeren Kernmembran, im Nucleoplasma und in kern-nahen Bereichen lokalisiert ist. Eine Untersuchung der Aktin-Bindungs-Domäne offenbarte, dass NUANCE F-Aktin *in vitro* binden kann. Dabei zeigte das Fusionsprotein 6xHis-ABD eine Bündelungsaktivität und eine Steigerung der Polymerisationsrate von F-Aktin. Die ermittelte Dissoziationskonstante $K_d = 3,8 \pm 1 \mu\text{M}$ von 6xHis-ABD zu F-Aktin liegt in derselben Größenordnung wie die des nahe verwandten Proteins Enaptin. Durch den Einsatz des „Yeast Two-Hybrid“-Systems konnte eine direkte Interaktion von NUANCE und Lamin A festgestellt werden. Ferner war NUANCE nach einem „Knockdown“ von Lamin A/C mit Hilfe von RNAi nicht mehr in der Kernmembran lokalisiert. Eine Zerstörung des Lamin A/C Netzwerks durch eine dominant-negative GFP-Lamin B-Form hatte ebenfalls eine Miss-Lokalisation von NUANCE zur Folge. Bindungsanalysen zeigten eine direkte Interaktion von NUANCE mit einem gemeinsamen Bereich von Lamin A und C. Aus diesen Ergebnissen schließen wir, dass NUANCE mit Lamin A/C auch *in vivo* interagieren kann.

Eine Untersuchung der hoch konservierten *Klarsicht*-Domäne mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen zeigte, dass diese Domäne für eine Kernmembranlokalisation ausreichend ist und die Fusionsproteine endogenes NUANCE verdrängen können. Bindungsanalysen des lumenalen Bereichs von NUANCE und SUN1/UNC84 zeigten eine direkte Interaktion der beiden Proteine. Eine Miss-Lokalisation von Emerin konnte durch einen „Knockdown“ von NUANCE mit Hilfe von RNAi gezeigt werden. Die Expression von C-terminalen GFP-Fusionsproteinen, die nur die Transmembran-Domäne und den lumenalen Bereich enthalten, hatte ebenfalls eine Miss-Lokalisation von Emerin zur Folge. NUANCE gehört mit Enaptin zu den ersten Proteinen der α -Aktinin Superfamilie, die die potentielle Fähigkeit besitzt, das Aktin-Cytoskelett mit dem Zellkern zu verbinden und aufgrund ihrer Interaktionen mit Emerin, Lamin A/C und SUN1/UNC84 eine Organisatorrolle am Zellkern übernehmen

können. Die Interaktionen mit Lamin A/C und Emerin lassen vermuten, dass Mutationen innerhalb des NUANCE Proteins für Muskeldystrophien und Laminopathien verantwortlich sein könnten.

6 ABSTRACT

NUANCE was identified as a protein with an α -actinin-like actin binding domain, 22 spectrin repeats and a transmembrane domain which is embedded in a so called *klarsicht* domain. A human 21 kb cDNA of NUANCE spreads over 373 kb on chromosome 14q22.1-q22.3 and predicts a protein of 798 kDa. At the subcellular level NUANCE is present predominantly at the nuclear membrane, in the nucleoplasm and in the vicinity of the nucleus in the cytoplasm. NUANCE binds F-actin *in vivo* and *in vitro*. The fusion protein 6xHis-ABD containing the actin binding domain shows actin bundling and actin polymerization activity. The dissociation constant $K_d = 3,8 \pm 1 \mu\text{M}$ of NUANCE is similar to the one of the closely related enaptin. Yeast two hybrid analysis shows a direct interaction with lamin A. Selective disruption of the lamin A/C network in COS7 cells using a dominant negative lamin B mutant resulted in the redistribution of NUANCE. Furthermore, the siRNA knockdown of lamins A/C in keratinocytes caused the dispersal of NUANCE from the nuclear envelope. Using biochemical techniques, we demonstrate that NUANCE binds directly to a C-terminal common region of lamins A/C implicating that NUANCE is also localised in the inner nuclear membrane. Experiments regarding the *klarsicht* domain of NUANCE show that this domain is sufficient for proper localisation and guidance to the nuclear envelope. GFP fusion proteins containing the *klarsicht* domain localise at the nuclear envelope, are able to displace endogenous NUANCE and cause a significant shrinkage of the nucleus. Using binding assays, we show that the luminal part of NUANCE and the nuclear envelope protein SUN1/UNC84 are interacting directly. Expression of dominant negative NUANCE constructs or NUANCE knockdown with RNAi in COS7 cells revealed that the presence of NUANCE at the nuclear envelope is necessary for the proper localization of emerin. Thus, NUANCE and enaptin are the first α -actinin related proteins that have the potential to link the microfilament system with the nucleus. The data imply a scaffolding function of NUANCE at the nuclear membrane and suggest a potential involvement of this protein in muscular dystrophies.

7 LITERATUR

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

Ahn, A.H. & Kunkel, L.M. (1993). The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat. Genet.* **3**, 283-291.

Anderson, R.A. (1977). Actin filaments in normal and migrating corneal epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **16** (2), 161-166.

Apel, E.D., Lewis, R.M., Grady, R.M. & Sanes, J.R. (2000). Syne-1, a dystrophin- and Klarsicht-related protein associated with synaptic nuclei at the neuromuscular junction. *J. Biol. Chem.* **275**, 31986-31995.

Bernier, G., De Repentigny, Y., Mathieu, M., David, S. & Kothary, R. (1998). Dystonin is an essential component of the Schwann cell cytoskeleton at the time of myelination. *Dev.* **125** (11), 2135-2148.

Bertrand, E., Houser-Scott, F., Kendall, A., Singer, R.H. & Engelke, D. (1998). Nucleolar localization of early tRNA processing. *Genes Dev.* **12**, 2463-2468.

Blom, N., Gammeltoft, S. & Brunak, S. (1999). Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* **294** (5), 1351-1362.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-54.

Braune, S. (2001). Identifizierung und Charakterisierung von Enaptin, einem neuen Protein vom α -Aktinin Typ. Dissertation. Universität zu Köln.

Breathnach, R. & Chambone, P. (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev. Biochem.* **50**, 349-383.

Brown, A., Bernier, G., Mathieu, M., Rossant, J. & Kothary, R. (1995). The mouse dystonia musculorum gene is a neural isoform of bullous pemphigoid antigen 1. *Nat. Genet.* **10**, 301-306.

Burke, B. & Ellenberg, J. (2002). Remodelling the walls of the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 487-497.

Campbell, K.P. (1995). Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* **80**, 675-679.

Carlson C.G. (1998). The dystrophinopathies: an alternative to the structural hypothesis. *Neurobiol. Dis.* **5** (1), 3-15.

Chien, A., Edgar, D.B. & Trela, J.M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* **127**, 1550-7.

Denault, J.B. & Salveson G.S. (2003). Human caspase-7 activity and regulation by its N-terminal peptide. *J. Biol. Chem.* **278** (36), 34042-34050.

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

Ishisaki, Z., Takaishi, M., Furuta, I. & Huh, N. (2001). Calmin, a protein with calponin homology and transmembranen domains expressed in maturing spermatogenic cells. *Genomics* **74**, 172-179.

Dalpe, G., Leclerc, N., Vallee, A., Messer, A., Mathieu, M., De Repentigny, Y. & Kothary, R. (1998). Dystonin Is Essential for Maintaining Neuronal Cytoskeleton Organization. *Mol. Cell. Neurosci.* **10** (5/6), 243-57.

Dalpe, G., Mathieu, M., Comtois, A., Zhu, E., Wasiak, S., De Repentigny, Y., Leclerc, N. & Kothary, R. (1999). Dystonin-deficient mice exhibit an intrinsic muscle weakness and an instability of skeletal muscle cytoarchitecture. *Dev. Biol.* **210** (2), 367-380.

Ellenberg, J., Siggia, E.D., Moreira, J.E., Smith, C.L., Presley, J.F., Worman, H.J. & Lippincott-Schwartz, J. (1997). Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J. Cell Biol.* **138** (6), 1193-1206.

Ellis, D.J., Jenkins, H., Whitfield, W.G.F. & Hutchison, C.J. (1997). GST-lamin fusion proteins act as dominant negative mutants in *Xenopus* egg extract and reveal the function of the lamina in DNA replication. *J. Cell Sci.* **110**, 2507-2518.

Engel, J., Fasold, H., Hulla, F.W., Waechter, F. & Wegner, A. (1977). The polymerization reaction of muscle actin. *Mol. Cell Biochem.* **18** (1), 3-13.

Fairley, E.A.L., Riddell, A., Ellis, J.A. & Kendrick-Jones, J. (2002). The cell cycle dependent mislocalisation of emerin may contribute to the Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype. *J. Cell Sci.* **115**, 341-354.

Fuchs, E. & Karakesisoglou, I. (2001). Bridging cytoskeletal intersections. *Genes Dev.* **15**, 1-14.

Georgatos, S.D. (2001). The inner nuclear membrane: simple, or very complex? *EMBO J.* **20** (12), 2989-2994.

Gough, L.L., Fan, J., Chu, S., Winnick, S. & Beck, K.A. (2003). Golgi localization of syne-1. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2410-2424.

Hall, A. (1998). Rho GTPases and the cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.

Haraguchi, T., Koujin, T., Hayakawa, T., Kaneda, T., Tsutsumi, C., Imamoto, N., Akazawa, C., Sukegawa, J., Yoneda, Y. & Hiraoka, Y. (2000). Live fluorescence imaging analysis reveals early recruitment of emerin, LBR, RanBP2 and Nup153 to reforming functional nuclear envelopes. *J. Cell Sci.* **113**, 779-794.

Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G 1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816.

Harborth, J., Elbashir, S.M., Bechert, K., Tuschl, T. & Weber, K. (2001). Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J. Cell Sci.* **114**, 4557-4565.

Herrmann, H. & Foisner, R. (2003). Intermediate filaments: novel assembly models and exciting new functions for nuclear lamins. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 1607-1612.

Holt, I., Östlund, C., Stewart, C.L., Nguyen, T.M., Worman, H.J. & Morris, G.E. (2003). Effect of pathogenic mis-sense mutations in lamin A on its interaction with emerin in vivo. *J. Cell Sci.* **116**, 3027-3035.

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

Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.

Ishisaki, Z., Takaishi, M., Furuta, I. & Huh, N. (2001). Calmin, a protein with calponin homology and transmembrane domains expressed in maturing spermatogenic cells. *Genomics* **74**, 172-179.

Kodama, A., Karakesisoglou, I., Wong, E., Vaezi, A. & Fuchs, E. (2003). ACF7: an essential integrator of microtubule dynamics. *Cell* **115**, 343-354.

Korenbaum, E., Nordberg, P., BJORKEGREN-SJOGREN, C., SCHUTT, C.E., LINDBERG, U. & KARLSSON, R. (1998). The role of profilin in actin polymerization and nucleotide exchange. *Biochemistry* **37** (26), 9274-83.

Kouyama, T. & Mihashi, M. (1981). Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin. *Eur. J. Biochem.* **114**, 33-8.

Krauss, S.W., Heald, R., Lee, G., Nunomura, W., Gimm, J.A., Mohandas, N. & Chasis, J.A. (2002). Two distinct domains of protein 4.1 critical for assembly of functional nuclei in vitro. *J. Biol. Chem.* **277** (46), 44339-44346.

Krauss, S.W., Chen, C., Penman, S. & Heald, R. (2003). Nuclear actin and protein 4.1: essential interactions during nuclear assembly in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100** (19), 10752-10757.

Lammerding, J., Schulze, P.C., Takahashi, T., Kozlov, S., Sullivan, T., Kamm, R.D., Stewart, C.L. & Lee, R.T. (2004). Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J. Clin. Invest.* **113**, 370-378.

Lee, K.K., Starr, D., Cohen, M., Liu, J., Han, M., Wilson, K.L. & Gruenbaum, Y. (2002). Lamin-dependent localization of UNC-84, a protein required for nuclear migration in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* **13**, 892-901.

Libotte, T., Kaiser, H.-W., Alt, W. & Bretschneider, T. (2001). Polarity, protrusion-retraction dynamics and their interplay during keratinocyte cell migration. *Exp. Cell Res.* **270**, 129-137.

Lin, F. & Worman, H.J. (1993). Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J. Biol. Chem.* **268** (22), 16321-16326.

Lionel, F., Geerts, D., Kuikman, I., Koster, J., Kramer, D. & Sonnenberg, A. (2001). The interaction of plectin with actin: evidence for cross-linking of actin filaments by dimerization of the actin binding domain of plectin. *J. Cell Sci.* **114**, 2065-2076.

Maidment, S.L. & Ellis, J.A. (2002). Muscular dystrophies, dilated cardiomyopathy, lipodystrophy, and neuropathy: the nuclear connection. *Expert Rev. Mol. Med.* Jul 30, 1-21.

Malone, C.J., Fixsen, W.D., Horvitz, H.R. & Han, M. (1999). UNC-84 localizes to the nuclear envelope and is required for nuclear migration and anchoring during *C. elegans* development. *Development* **126**, 3171-3181.

Matsudaira, P. (1994). Actin crosslinking proteins at the leading edge. *Semin. Cell Biol.* **5**, 165-174.

Mattout-Drubetzki, A. & Gruenbaum, Y. (2003). Dynamic interactions of nuclear lamina proteins with chromatin and transcriptional machinery. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 2053-2063.

McLean, W.H.I., Pulkkinen, L., Smith, F.J.D., Rugg, E.L., Lane, E.B., Bullrich, F., Burgeson, R.E., Amano, S., Hudson, D.L., Owaribe, K. et al. (1996). Loss of plectin causes epidermolysis bullosa with muscular dystrophy: cDNA cloning and genomic organization. *Genes Dev.* **10**, 1724-1735.

Mislow, J.M.K., Kim, M.S., Davis, D.B. & McNally, E.M. (2001). Myne-1, a spectrin repeat transmembrane protein of the myocyte inner nuclear membrane, interacts with lamin A/C. *J. Cell Sci.* **115**, 61-70.

Mislow, J.M.K., Holaska, J.M., Kim, M.S., Lee, K.K., Segura-Totten, M., Wilson, K.L. & McNally, E.M. (2002). Nesprin-1 α self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro. *FEBS Lett.* **525**, 135-140.

Morris, N.R. (2003). Nuclear positioning: the means is at the ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 54-59.

Mosley-Bishop, K.L., Li, Q., Patterson, L. & Fisher, J.A. (1999). Molecular analysis of the klarsicht gene and its role in nuclear migration within differentiating cells of the *Drosophila* eye. *Curr. Biol.* **9**, 1211-1220.

Mounkes, L., Kozlov, S., Burke, B. & Stewart, C.L. (2003). The laminopathies: nuclear structure meets disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 223-230.

Muchir, A., van Engelen, B.G., Lammens, M., Mislow, J.M., McNally, E., Schwarz, K. & Bonne, G. (2003). Nuclear envelope alterations in fibroblasts from LGMD1B patients carrying nonsense Y259X heterozygous or homozygous mutation in lamin A/C gene. *Exp. Cell Res.* **291**, 352-362.

Novelli, G. & D'Apice, M.R. (2003). The strange case of the 'lumper' lamin A/C gene and human premature ageing. *Trends Mol. Med.* **9** (9), 370-375.

Padan, R., Nainudel-Epszteyn, S., Goitein, R., Fainsod, A. & Gruenbaum, Y. (1990). Isolation and characterization of the *Drosophila* nuclear envelope otefin cDNA. *J. Biol. Chem.* **265** (14), 7808-7813.

Padmakumar, V.C., Abraham, S., Braune, S., Noegel, A.A., Tunggal, B., Karakesisoglou, I. & Korenbaum, E. (2004). Enaptin, a giant actin-binding protein, is an element of the nuclear membrane and the actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.*, im Druck.

Pascual, J., Castresana, J. & Sarastre M. (1997). Evolution of the spectrin repeat, *Bioessays* **19**, 811-817.

Poglazov, B.F. (1983). Actin and coordination of metabolic processes. *Biochem. Int.* **6** (6), 757-765.

Puius, Y.A., Mahoney, N.M. & Almo, S.C. (1998). The modular structure of actin-regulatory proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 23-34.

dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A. & Nosworthy, N.J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* **83** (2), 433-473.

Robbins, E. & Gonatas, N.K. (1964). The ultrastructure of a mammalian cell during the mitotic cell cycle. *J. Cell Biol.* **21**, 429-463.

Roper, K., Gregory, S.L. & Brown, N.H. (2002). The 'spectraplakins': cytoskeletal giants with characteristics of both spectrin and plakin families. *J. Cell Sci.* **115**, 4215-4225.

Rosenblum, M.D. & Shivers, R.R. (2000). 'Rings' of F-actin form around the nucleus in cultured human MCF7 adenocarcinoma cells upon exposure to both taxol and taxotere. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **125** (1), 121-131.

Rotter, B., Kroviarski, Y., Nicolas, G., Dhermy, D. & Lecomte, M.C. (2004). Alpha II-spectrin is an in vitro target for caspase-2, and its cleavage is regulated by calmodulin binding. *Biochem. J.* **378**, 161-168.

Rouayrenc, J.F. & Travers, F. (1981). The first step in the polymerisation of actin. *Eur. J. Biochem.* **116** (1), 73-77.

Rüther, U. (1982). pUR250 allows rapid chemical sequencing of both DNA strands of its inserts. *Nucleic Acids Res.* **10**, 5765-5772

Ruhrberg, C. & Watt, F. (1997). The plakin family: versatile organizers of cytoskeletal architecture. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 392-397.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-4.

Schneider, S., Buchert, M. & Hovens, C.M. (1996). An in vitro assay of β -galactosidase from yeast. *BioTechniques* **20**, 960-962.

Schneiter, R., Kadowaki, T. & Tartakoff, A.M. (1995). mRNA transport in yeast: time to reinvestigate the functions of the nucleolus. *Mol. Biol. Cell* **6**, 357-370.

Schreiner, T. (2000). Untersuchungen zur in vivo Funktion von Comitin einem Aktin bindenden Membranprotein aus *Dictyostelium discoideum*. Dissertation. Universität zu Köln.

Selbert, S., P. Fischer, D. Pongratz, Stewart, M. & Noegel, A.A. (1995). Expression and localization of annexin VII (synexin) in muscle cells. *J. Cell Sci.* **108**, 85-95.

Shikama, Y.U.M., Miyashita, T. & Yamada, M. (2001). Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of eight GFP-tagged apoptosis-related caspases. *Exp. Cell. Res.* **264** (2), 315-325.

Shizuta, Y., Shizuta, H., Gallo, M., Davies, P. & Pastan, I. (1976). Purification and properties of filamin, and actin binding protein from chicken gizzard. *Biol. Chem.* **251** (21), 6562-6567.

Smith, F.J.D., Eady, R.A.J., Leigh, I.M., McMillan, J.R., Rugg, E.L., Kelsell, D.P., Bryant, S.P., Spurr, N.K., Geddes, J.F., Kirtschig, G. et al. (1996). Plectin deficiency results in muscular dystrophy with epidermis bullosa. *Nat. Genet.* **13**, 450-457.

Starr, D.A., & Han, M. (2002). Role of ANC-1 in tethering nuclei to the actin cytoskeleton. *Science* **298**, 406-409.

Starr, D.A. & Han, M. (2003). ANChors away: an actin based mechanism of nuclear positioning. *J. Cell Sci.* **116**, 211-216.

Suggs, S.V., Hirose, T., Miyake, T., Kawashima, E.H., Johnson, M.J., Itakura, K. & W.R.B. (1981). Use of synthetic oligodesoxy-ribonucleotides for the isolation of specified cloned DNA sequences using purified genes. *In* Developmental Biology. D. D. Brown and C. F. Fox, editors, Academic Press NY. 683-693.

Sun, D., Leung, C.L. & Liem R.K.H. (2000). Characterization of the microtubule binding domain of microtubule actin crosslinking factor (MACF): identification of a novel group of microtubule associated proteins. *J. Cell Sci.* **114**, 161-172.

Tinsley, J.M., Blake, D.J., Roche, A., Fairbrother, U., Riss, J., Byth, B.C., Knight, A.E., Kendrick-Jones, J., Suthers, G.K., Love D.R. et al. (1992). Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* **360**, 591-593.

Tse, W.T. & Lux, S.E. (1999). Red blood cell membrane disorders. *Br. J. Haematol.* **104** (1), 2-13.

Vaughan, O.A., Alvarez-Reyes, M., Bridger, J.M., Broers, J.L.V., Ramaekers, F.C.S., Wehnert, M., Morris, G.E., Whitfield, W.G.F. & Hutchison, C.J. (2001). Both emerin and lamin C depend on lamin A for localization at the nuclear envelope. *J. Cell Sci.* **114**, 2577-2590.

Way, M., Pope, B., Cross, R.A., Kendrick-Jones, J. & Weeds, A.G. (1992). Expression of the N-terminal domain of dystrophin in *E. coli* and demonstration of binding to F-actin. *FEBS Lett.* **301**, 243-245.

Whalen, R.G., Butler-Browne, G.S. & Gros, F. (1976). Protein synthesis and actin heterogeneity in calf muscle cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73** (6), 2018-2022.

Wiche, G. (1998). Domain structure and transcript diversity of plectin. *Biol. Bull.* **194**, 381-383.

Wilken, N., Senecal, J.L., Scheer, U. & Dabauvalle, M.C. (1995). Localization of the Ran-GTP binding protein RanBP2 at the cytoplasmic side of the nuclear pore complex. *Eur. J. Cell Biol.* **68**, 211-219.

Winder, S.J., Hemmings, L., Maciver, S.K., Bolton, S.J., Tinsley, J.M. Davies, K.E., Critchley, D.R. & Kendrick-Jones, J. (1995). Utrophin actin binding domain: analysis of actin binding and cellular targeting. *J. Cell Sci.* **108**, 63-71.

Wood, W. & Martin, P. (2002). Structures in focus--filopodia. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34** (7), 726-730.

Worman, H.J. & Courvalin J.-C. (2000). The inner nuclear membrane. *J. Membrane Biol.* **177**, 1-11.

Worman, H.J. & Courvalin J.-C. (2004). How do mutations in lamins A and C cause disease? *J. Clin Invest.* **113** (3), 349-351.

Yang, L., Guan, T. & Gerace, L. (1997). Integral membrane proteins of the nuclear envelope are dispersed throughout the endoplasmic reticulum during mitosis. *J. Cell Biol.* **137** (6), 1199-1210.

Yang, Q., Rout, M.P. & Akey, C.W. (1998). Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol. Cell.* **1**, 223-234.

Yarmola, E.G., Somasundaram, T., Boring, T.A., Spector, I. & Bubb, M.R. (2000). Actin-latrunculin A structure and function. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. *J. Biol. Chem.* **275**, 28120-28127.

Ye, Q. & Worman, H.J. (1995). Protein-protein interaction between human nuclear lamins expressed in yeast. *Exp. Cell Res.* **219**, 292-298.

Yin, H.L., Albrecht, J.H. & Fattoum, A. (1981). Identification of gelsolin, a Ca²⁺-dependent regulatory protein of actin gel-sol transformation, and its intracellular distribution in a variety of cells and tissues. *J. Cell Biol.* **91**, 901-906.

Yokoyama, N., Hayashi, N., Seki, T., Pante, N., Ohba, T., Nishii, K., Kuma, K., Hayashida, T., Miyata, T., Aebi, U. & Nishimoto, T. (1995). A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4. *Nature* **376**, 184-188.

Zeligs, J.D. & Wollman, S.H. (1979). Mitosis in rat thyroid epithelial cells in vivo. *J. Ultrastruct. Res.* **66**, 53-77.

Zhang, Q., Skepper, J.N., Yang, F., Davies, J.D., Hegyi, L., Roberts, R.G., Weissberg, P.L., Ellis, J.A. & Shannahan, C.M. (2001). Nesprins: a novel family of

spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *J. Cell Sci.* **114**, 4485-4498.

Zhang, Q., Ragnauth, C., Greener, M.J., Shannahan, C.M. & Roberts, R.G. (2002). The Nesprins are giant actin-binding proteins, orthologous to *Drosophila melanogaster* muscle protein MSP-300. *Genomics* **80** (5), 473-481.

Zhen, Y.-Y. (2001). Identifizierung und Charakterisierung von NUANCE, einem neuen Protein vom α -Aktinin Typ. Dissertation. Universität zu Köln.

Zhen, Y.-Y., Libotte, T., Munck, M., Noegel, A.A. & Korenbaum, E. (2002). NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **115**, 3207-3222.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Prof. Dr. A. A. Noegel betreut worden.

Köln, im April 2004

Teilpublikationen:

T. Libotte, H. Zaim, S. Abraham, V.C. Padmakumar, M. Munck, A.A. Noegel & I. Karakesisoglou (2004). Lamin A/C dependent localization of NUANCE, a giant actin binding protein of the nuclear envelope. *J. Biol. Chem.* eingereicht.

Y.-Y. Zhen, T. Libotte, M. Munck, A.A. Noegel & E. Korenbaum (2002): NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **115**, 3207-3222.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Thorsten Libotte
Geburtsdatum: 20.07.1972
Geburtsort: Bonn

Schulausbildung

1978-1991 Abschluss: Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife am Städtischen Gymnasium am Petersberg in Königswinter

Wehrdienst

1991-1992

Hochschulstudium, Promotion

Oktober 1992-Mai 1999 Studium der Biologie und Informatik an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms Universität in Bonn

Oktober 1994 Diplom-Vorprüfung in Biologie

Mai 1998 Diplom-Vorprüfung in Informatik

Mai 1999 Diplomprüfung in Biologie mit den Schwerpunkten Theoretische Biologie, Mikrobiologie und Informatik

Mai 1999-Mai 2000 Diplomarbeit mit dem Thema „Motilitätsanalyse humaner epidermaler Keratinocyten auf Fibronectin“

Mai 1999-März 2001 Studentische/Wissenschaftliche Hilfskraft der Abteilung Theoretische Biologie

Seit April 2001 Praktische Durchführung der Dissertation bei Frau Prof. Dr. A. A. Noegel am Institut für Biochemie I der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln mit dem Ziel der Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln mit dem Thema „Charakterisierung von NUANCE, einem Protein der α -Aktinin Superfamilie“

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. A. A. Noegel für die Gelegenheit an ihrem renommierten Institut meine Dissertation anfertigen zu dürfen.

Ich danke den Herren Prof. Dr. S. Roth und Prof. Dr. J. Brüning für die freundliche Übernahme der jeweiligen Koreferate.

Besonderer Dank gilt meinen engagierten Betreuern Dr. E. Korenbaum und Dr. I. Karakesisoglou, die mich immer mit ihrem herausragenden Wissen und ihrer Kollegialität unterstützten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Herzlichen Dank der Abteilung „Biochemie I“, die eine hilfsbereite und humorvolle Arbeitsatmosphäre bot.

Besonderer Dank gilt Frau M. Munck, ihrer fachlichen Kompetenz, ihrer Hilfsbereitschaft und ihrer Unterstützung innerhalb und außerhalb des Labors.

Ich danke auch Herrn Dr. Y.-Y. Zhen, der mich in kurzer Zeit sehr viele Dinge lehrte.

Ein liebevoller Dank an meine Eltern, die mich in allen Lebenslagen vorbehaltlos unterstützt haben.