

Charakterisierung der Interaktion von Nesprin-2 und α -Catenin an der Plasma- und Zellkernmembran

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln



vorgelegt von
Sascha Neumann
aus Köln

Köln, 2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Januar 2006 bis März 2009, unter der Anleitung von Dr. Iakowos Karakesisoglou und Frau Prof. Dr. A. A. Noegel am Institut für Biochemie I der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln, angefertigt.

1. Berichterstatter: Frau Prof. Dr. A. A. Noegel
2. Berichterstatter: Frau Prof. Dr. Sigrun Korsching

Tag der mündlichen Prüfung: 14.05.09

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 DER ZELLKERN UND DIE KERNHÜLLE	3
1.2 NESPRINE UND IHRE ISOFORMEN.....	4
1.3 SUN PROTEINE UND DER LINC KOMPLEX.....	6
1.4 LEM-PROTEINE UND EMERIN.....	8
1.5 ZELL-ZELL-KONTAKTE	9
1.6 α -CATENIN	11
1.7 α -CATENIN IN ZELL-ZELL-KONTAKTEN	12
1.8 β -CATENIN UND DER WNT-SIGNALTRANSDUKTIONSWEG.....	15
1.9 ZIELSETZUNG	20
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 MATERIAL.....	21
2.1.1 <i>Kits</i>	21
2.1.2 <i>Antikörper</i>	22
2.1.3 <i>DNA-Oligonukleotide</i>	23
2.1.4 <i>RNA-Oligonukleotide</i>	24
2.1.5 <i>Vektoren</i>	25
2.1.6 <i>Plasmide</i>	25
2.1.7 <i>Bakterienstämme, Zelllinien und primäre Zellen</i>	28
2.1.8 <i>Mikroskopie</i>	29
2.2 METHODEN	29
2.2.1 <i>Transfektion und Kultivierung von Säugerzellen</i>	29
2.2.2 <i>Fixierung und Permeabilisierung von Säugerzellen</i>	30
2.2.3 <i>Immunfluoreszenz-Analyse</i>	30
2.2.4 <i>Proteinlysate aus Säugerzellen</i>	30
2.2.5 <i>Induktion und Reinigung rekombinanter Proteine</i>	31
2.2.6 <i>GST-(Gluthation-S-Transferase) Bindungsanalyse</i>	32
2.2.7 <i>Immunpräzipitation</i>	33
2.2.8 <i>Zellfraktionierung</i>	33
2.2.9 <i>Färbung von Polyacrylamidgelen</i>	34
2.2.9.1 Coomassie-Blau Färbung.....	34
2.2.9.2 Silberfärbung.....	34
2.2.10 <i>Westernblot</i>	35
3 ERGEBNISSE	36
3.1 CHARAKTERISIERUNG VON NESPRIN-2-SR	36

3.2	IDENTIFIZIERUNG VON α -N-CAT* ALS EIN NEUER INTERAKTIONSPARTNER VON NESPRIN-2-SR	37
3.2.1	Vergleich von α -N-Cat* mit bekannten α -N-Catenin Isoformen.....	38
3.2.2	In vitro-Bestätigung der Interaktion von Nesprin-2-SR und α -N-Cat*.....	40
3.2.3	α -N-Cat* Polypeptide lokalisieren in COS7 Zellen an der Kernmembran.	44
3.3	NESPRIN-2 INTERAGIERT MIT α -N- UND α -E-CATENIN	46
3.3.1	Die C-Termini verschiedener α -Catenine sind hoch homolog.....	46
3.3.2	Nesprin-2-SR und Vollängen α -Catenine interagieren in vitro.....	48
3.3.3	Ektopisch exprimierte Vollängen α -Catenine lokalisieren in COS7 Zellen an der Plasmamembran	49
3.3.4	Nesprin-2 und α -E-Catenin interagieren in vivo.....	51
3.3.5	In Epithelzellen lokalisieren C-terminale α -Catenin Fusionsproteine an der Kernmembran.....	52
3.3.6	Die Lokalisation C-terminaler α -N-Catenin Proteine an der Kernmembran von Epithelzellen ist nicht zelltypspezifisch	56
3.4	NESPRIN-2-SR LOKALISIERT AN DER PLASMAMEMBRAN	57
3.5	ANALYSE DER VERTEILUNG VON ENDOGENEM NESPRIN-2 UND α -CATENIN	59
3.5.1	In der menschlichen Haut lokalisiert Nesprin-2 an der Kern- und α -Catenin an der Plasmamembran	59
3.5.2	Nesprin-2 und α -Catenin lokalisieren in primären humanen Keratinozyten an der Plasma- und Kernmembran.....	61
3.5.3	Lokalisation von Nesprin-2 und α -Catenin in HaCaT Zellen	64
3.5.4	Lokalisation von Nesprin-2 während der Wundheilung in menschlicher Haut.....	66
3.5.5	In der Entwicklung muriner Haut ist α -Catenin nicht an der Kernhülle nachweisbar	67
3.5.6	In migrierenden MDCK-2 Zellen lokalisiert α -Catenin nicht an der Kernmembran	70
3.6	IN VITRO ANALYSE DER LOKALISATIONSEINFLÜSSE ZWISCHEN NESPRIN-2 UND α -CATENIN	72
3.6.1	Lokalisationsstudien in COS7 Zellen	72
3.6.2	Lokalisationsstudien in Epithelzellen	74
3.6.3	Lokalisationsstudien in CloneA Zellen	76
3.7	DIE ROLLE VON α -CATENIN IN DER ORGANISATION DES PERINUKLEÄREN F-AKTINS.....	79
3.7.1	α -Catenin ist in HaCaT Zellen nicht essentiell für die Aufrechterhaltung des perinukleären F-Aktins.....	80
3.7.2	Kernmembranständiges α -Catenin kann Aktin in COS7 Zellen nicht an den Zellkern rekrutieren.....	82
3.8	NESPRIN-2 REGULIERT DIE MENGE DES INTRANUKLEÄREN β -CATENINS	83
3.8.1	Nesprin-2, α -Catenin, Emerin und β -Catenin bilden in vitro einen Proteinkomplex.....	83

3.8.2	<i>Dominant negative Interferenz von Nesprin-2 reduziert die Menge von β-Catenin im Kern</i>	86
3.8.3	<i>RNA-Interferenz von Nesprin-2 bewirkt eine Reduktion von β-Catenin im Kern</i>	87
3.8.4	<i>Modell zur in vitro-Analyse der Einflüsse von Nesprin-2 und α-catenin auf die intranukleäre Menge von β-Catenin</i>	90
4	DISKUSSION	93
4.1	α -N-CAT* - EIN NEUER BINDUNGSPARTNER VON NESPRIN-2	93
4.2	NESPRIN-2 INTERAGIERT MIT α -N-/E-CATENIN	95
4.3	VERTEILUNGSMUSTER VON ENDOGENEM NESPRIN-2 UND α -CATENIN	97
4.3.1	<i>Endogenes Nesprin-2 an der Plasmamembran</i>	98
4.3.2	<i>Endogenes α-Catenin an der Kernhülle</i>	100
4.3.3	<i>Gegenseitige Lokalisationseinflüsse zwischen Nesprin-2 und α-Catenin</i>	102
4.3.4	<i>Rolle von α-Catenin in der Organisation des perinukleären F-Aktins</i>	103
4.3.5	<i>Bedeutung der Nesprin-2 α-Catenin Interaktion in der Regulation der intranukleären Menge von β-Catenin</i>	104
4.3.6	<i>Ereignisse an der Kernhülle beim Transport von β-Catenin in den Zellkern</i>	105
4.3.7	<i>Modell zur Funktion der Nesprin-2 α-Catenin Interaktion</i>	109
	ZUSAMMENFASSUNG	111
	ABSTRACT	113
	LITERATURVERZEICHNIS	115
	ERKLÄRUNG	122
	LEBENS LAUF	123
	DANKSAGUNG	125

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Bp	Basenpaare
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca	circa
cDNA	komplementäre DNA
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
DAPI	4, 6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
De	Dermis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycolbis[2-aminoethylether]-N,N,N,N-tetraessigsäure
Epi	Epidermis
EtOH	Ethanol
Ex	Exon
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Foetales Kälberserum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
HGF	hepatocyte growth factor
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropylthiogalaktosid

kB	kilobasen
kDa	Kilodalton
KM	Kernmembran
Luminol	5-Amino-2,3-Dihydro-1,4-phtalazindion
M	Molar
mAK	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
mM	Millimolar
min	Minuten
Myne	myocyte nuclear envelope protein
μ F	Mikrofarad
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
Nesprin	Nuclear envelope spectrin repeat protein
NUANCE	Nucleus and actin connecting element
OD	Optische Dichte
P	Präzipitate
PA	Perinukleäres Aktin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	phosphate buffered saline
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulphate
sek	Sekunde
shRNA	small hairpin RNA
SR	Spektrinwiederholung
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Ü	Überstände
ü.N.	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 Der Zellkern und die Kernhülle

Prokaryoten und Eukaryoten unterscheiden sich in erster Linie durch die Komplexität ihres Aufbaus. Prokaryotische Zellen sind in der Regel nicht kompartimentiert. Eukaryotische Zellen sind größer und weisen ein hohes Maß an struktureller Organisation auf. Der markanteste Unterschied ist das Fehlen eines Zellkerns bei Prokaryoten, deren DNA frei im Zytoplasma liegt. In Eukaryoten befindet sich der größte Teil des genetischen Materials in einem separaten Kompartiment – dem Zellkern.

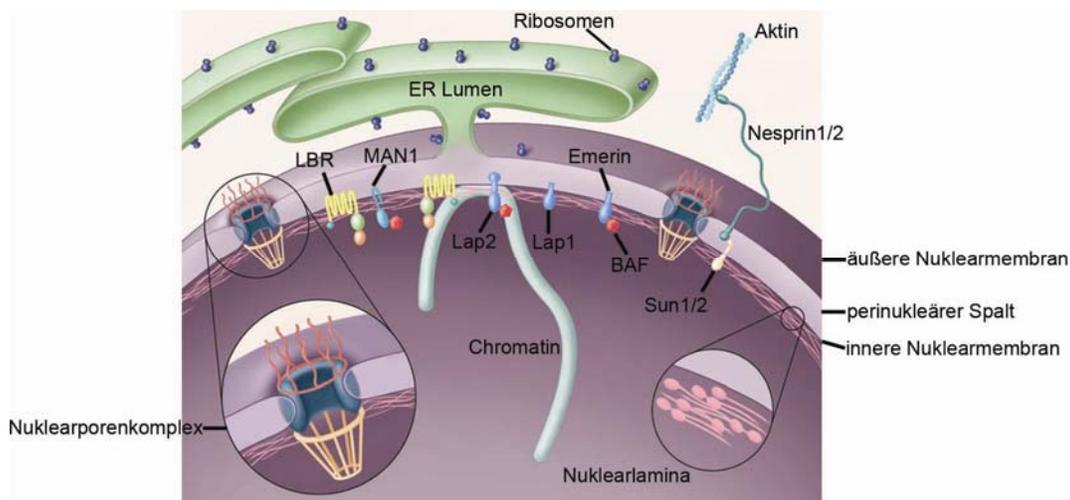


Abb. 1.1: Aufbau der Kernhülle. Die Kernhülle besteht aus einer inneren und äußeren Membran, die durch den perinukleären Spalt getrennt sind. Die äußere Membran geht in das raue endoplasmatische Retikulum über. Die Kontaktstellen zwischen den Membranen sind mit Nukleolus besetzt, die den Transport von Makromolekülen regulieren. Es werden Proteine der inneren- und äußeren Kernmembran unterschieden. Proteine der inneren Membran schaffen eine Verbindung zum Chromatin und den Proteinen der äußeren Kernmembran. Diese wiederum verbinden den Zellkern mit dem Zytoskelett. Lamine bilden ein Netzwerk, das der inneren Membran anliegt und dem Zellkern Stabilität verleiht. Modifiziert nach Stewart et al., 2007.

Der Zellkern wird von einer Doppelmembran umschlossen, die als Kernhülle bezeichnet wird (Abb. 1.1). Sie besteht aus einer inneren und einer äußeren Membran, wobei letztere mit dem rauen endoplasmatischen Retikulum in Verbindung steht. Innere und äußere Membran werden durch den perinukleären Spalt voneinander getrennt, der in Vertebraten eine Breite von

30-50 nm aufweist (Crisp & Burke, 2008). An manchen Stellen gehen die beiden Membranen ineinander über. Diese Verbindungspunkte werden durch Nuklearporenkomplexe besetzt, die den Transport von Makromolekülen über die Kernhülle regulieren. Ionen und Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 40 kDa können frei diffundieren, größere müssen aktiv transportiert werden (D'Angelo & Hetzer, 2008). Proteine der Kernhülle lassen sich in vier Gruppen unterteilen (Anderson und Hetzer, 2008). Die erste Gruppe stellt Komponenten der Nuklearporenkomplexe dar, welche Multiproteinkomplexe mit einem Molekulargewicht von bis zu 125 kDa sind (Hetzer et al., 2005). Die zweite Gruppe sind Proteine der inneren Kernmembran wie z.B. Emerin, MAN1 und Sun, über die eine Verbindung zum Chromatin im Zellkern aufgebaut werden kann. Gleichzeitig binden sie im perinukleären Raum an Proteine der äußeren Nuklearmembran, welche die dritte Gruppe darstellen, die wiederum mit dem Zytoskelett interagiert. Die vierte Gruppe sind Lamine, die ein 20-50 nm dickes Netzwerk bilden und das Stützskelett der Zellkernmembran darstellen und mit Chromatin interagieren.

1.2 Nesprine und ihre Isoformen

Nesprine sind Kernmembran-assoziierte Moleküle, die der Familie der α -Aktinin ähnlichen aktinbindenden Proteine angehören. Sie wurden sowohl an der äußeren als auch an der inneren Kernmembran nachgewiesen (Warren et al., 2005). Die zeitgleiche Entdeckung durch verschiedene Arbeitsgruppen führte zu einer Vielzahl von Namen (Zhen et al., 2002, Padmarkumar et al., 2004, Apel et al., 2000, Zhang et al., 2001, Zhen et al., 2002) wobei sich mittlerweile eine einheitliche Nomenklatur durchgesetzt hat, mit der die Proteine als Nesprine (Nuclear envelope spectrin repeat containing proteins) benannt werden. In Säugetieren wurden bisher vier Nesprine beschrieben, Nesprin-1 (Syne-1, Myne-1, Enaptin), Nesprin-2 (Syne-2, Myne-2, NUANCE), Nesprin-3 (Wilhelmsen et al., 2005) und -4 (Roux et al., 2009), die durch verschiedene Gene kodiert werden. Für Nesprin-1 und -2 wurden eine Vielzahl von Isoformen identifiziert, die sich in Größe und Domänenkomposition unterscheiden. Allein für Nesprin-2 wurden bisher acht Isoformen beschrieben (Abb. 1.2). Die größten

erreichen ein Molekulargewicht von 1,01 MDa für Nesprin-1 und 796 kDa für Nesprin-2, kleinere Isoformen können bis unter 100 kDa groß sein. Nesprin-1 und -2 besitzen einen sehr ähnlichen Aufbau (Warren et al., 2005). Sie bestehen aus zwei N-terminalen Calponin-Homologie-Domänen, die die Bindung an Aktin vermitteln. Am C-Terminus befindet sich eine KASH-Domäne (Klarsicht/ANC-1/Syne-1 homology), die für die Lokalisation an der Kernmembran essentiell ist. Beide Domänen werden durch ein Segment von Spektrinwiederholungen getrennt.

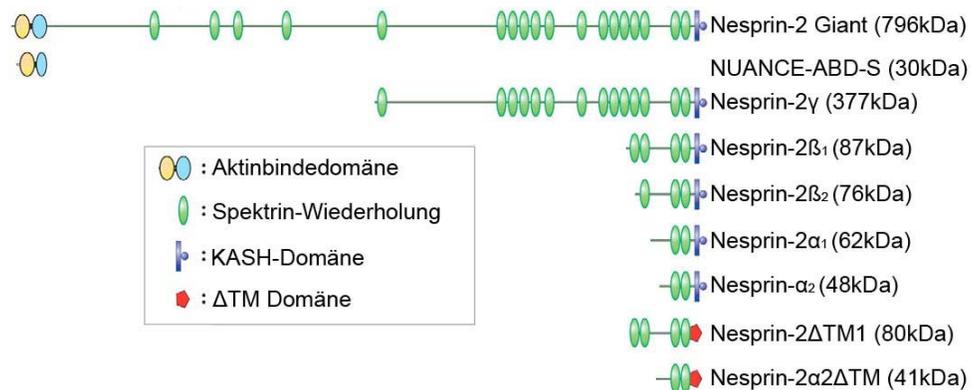


Abb. 1.2: Übersicht über die Nesprin-2 Isoformen. Im N-Terminus befindet sich die Aktinbindedomäne (Calponin-Homologie-Domänen). Der C-Terminus enthält eine Transmembrandomäne und vermittelt die Lokalisation an der Kernmembran (KASH-Domäne). Beide Bereiche werden durch ein Segment von Spektrinwiederholungen getrennt. Die gezeigten Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen, Translations-Initiation und Termination des Nesprin-2-Gens. Modifiziert nach Lücke et al., 2008.

Nesprin-3 (Wilhelmsen et al., 2005) weist eine Änderung im N-terminalen Bereich auf und besitzt an Stelle der Aktin- eine Plektinbindedomäne. Bisher wurden zwei Isoformen beschrieben mit einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa. Nesprin-4 wurde erst kürzlich identifiziert. Die bisherigen Daten weisen auf eine epithelspezifische Expression und Assoziation mit der äußeren Kernmembran hin (Roux et al., 2009). Auf Grund ihres Aufbaus können Nesprine eine Verbindung der Kernhülle mit dem Aktinzytoskelett bzw. über Plektin mit Intermediärfilamenten herstellen (Abb. 1.3).

Nesprin Orthologe wurden in *Dictyostelium discoideum* (Interaptin) (Rivero et al., 1998), *Caenorhabditis elegans* (ANC-1) (Starr & Han, 2002) und *Drosophila melanogaster* (MSP-300) (Volk, 1992, Zhang et al., 2002) beschrieben.

1.3 Sun Proteine und der LINC Komplex

Die Zahl integraler Membranproteine der Kernhülle wird auf ca. 80 geschätzt (Schirmer et al., 2003), wobei sich die innere und die äußere Kernmembran in ihrer Proteinkomposition unterscheiden. Proteine der inneren Kernmembran werden im rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und gelangen über laterale Diffusion zur inneren Kernmembran. Dort werden sie über Interaktionen mit intranukleären Komponenten wie Chromatin und Lamin fest gehalten (Holmer & Worman, 2001). Für Nesprin-2 giant wird dagegen angenommen, dass es eine Komponente der äußeren Kernmembran ist, während die kleineren Isoformen auch an der inneren Kernmembran nachgewiesen werden konnten (Worman & Gundersen, 2006).

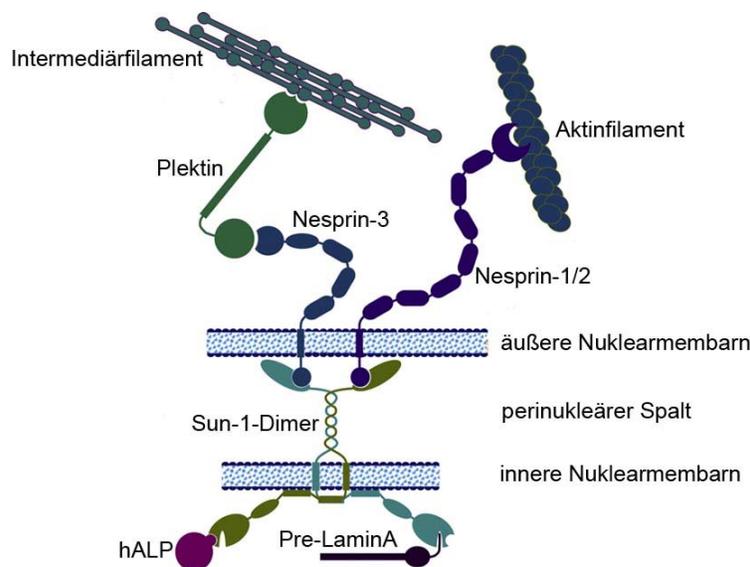


Abb. 1.3 Der LINC Komplex verbindet nukleäre Komponenten mit dem Zytoskelett. Sun Proteine bilden zusammen mit den Nesprinen eine Brücke mit der Komponenten des Kerns mit dem Zytoskelett verbunden werden. Modifiziert nach Crisp & Burke, 2008.

Die Lokalisation von Nesprin-2 giant an der äußeren Kernmembran ist abhängig von Sun-Proteinen (Padmakumar et al., 2005). Im Jahre 1999 identifizierten Malone und Kollegen das Protein UNC-84, das in der Entwicklung von *C. elegans* für die Kernmigration und -positionierung erforderlich ist (Malone et al., 1999). Dieses Protein besitzt einen Homologiebereich mit dem *Schizosaccharomyces pombe* Protein Sad1 (Spindel architecture defective Protein). Der homologe Bereich wurde "SUN"-Domäne genannt (Sad1 und

UNC-84, Malone et al., 1999). Sun-Domänen sind evolutionär konserviert. Die Anzahl an Proteinen mit Sun-Domänen nimmt im Laufe der Evolution zu, wobei in Säugern bisher vier verschiedene Sun-Domänenproteine identifiziert wurden (Sun1, Sun2, Sun3 und SPAG4, Starr & Fischer, 2005). Mitglieder der Sun-Domänen-Familie haben in der Regel mindestens eine Transmembranregion (Tzur et al., 2006) mit der sie in der inneren Kernmembran verankert sind. "Coiled coil"-Domänen ermöglichen eine Oligomerisierung der Sun-Proteine (Lu et al., 2008). Der nukleoplasmatische Bereich der Sun-Proteine kann mit Lamin (Crisp et al., 2006, Haque et al., 2006) und im Falle von Sun1 auch mit der Membran-assoziierten Histon Acetyltransferase hALP interagieren (Chi et al., 2007). Die Sun-Domänen von Sun1 (Crisp et al., 2006) und Sun2 (Padmakumar et al., 2005) ragen in den perinukleären Spalt, und interagieren mit den luminalen Bereichen KASH-Domänen der Nesprine. KASH-Domänen bestehen aus einer Transmembrandomäne und einem bis zu 35 Aminosäuren umfassenden Abschnitt, der in den perinukleären Spalt ragt (Starr & Fischer 2005). Sun-Proteine agieren demzufolge als Bindeglieder zwischen den Nesprinen, die ihrerseits mit dem Zytoskelett verbunden sind, und den nukleären Laminen. Diese Anordnung wird als LINC Komplex (linker of nucleoskeleton and cytoskeleton, Crisp et al., 2006) bezeichnet (Abb. 1.3). Er erklärt die Retention von Proteinen an der äußeren Kernmembran und zeigt die Möglichkeit einer Transduktion von Signalen über das Zytoskelett in den Zellkern auf.

1.4 LEM-Proteine und Emerin

Unter den Proteinen der Kernhülle gibt es drei Familien, die Familien der KASH-, SUN- oder LEM-Domänen Proteine. Die LEM-Domäne umfasst ca. 40 Aminosäuren, der Name setzt sich zusammen aus den Proteinen, in denen sie zuerst beschrieben wurde (LAP2, Emerin, MAN1, Holaksa & Wilson, 2006). Eine Gemeinsamkeit dieser Proteine ist, dass sie mit BAF (Barrier-to-Autointegration Factor) interagieren. BAF ist ein 10 kDa Protein, das im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert. Im Zellkern liegt es im Nukleoplasma und angereichert an der Kernhülle vor (Margalit et al., 2005). BAF ist ein DNA-bindendes Protein und ist unter anderem an der Reorganisation des Zellkerns nach der Mitose (Margalit et al., 2005) und der Regulation der Genexpression beteiligt (Wang et al., 2002). LEM-Domänen-Proteine bilden daher ein Bindeglied, über das die innere Nuklearmembran mit der DNA verbunden wird (Abb. 1.4).

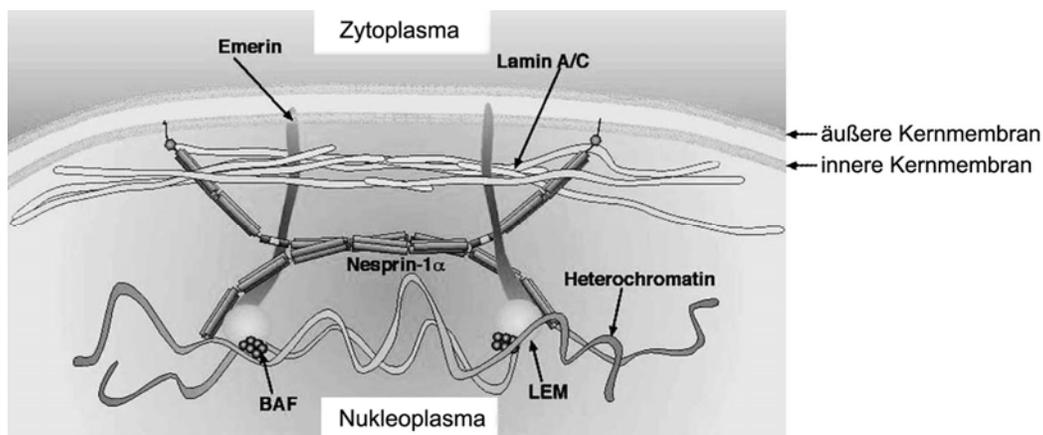


Abb. 1.4: Das LEM-Domänenprotein Emerin verbindet die innere Kernmembran über BAF mit dem Chromatin. Emerin lokalisiert durch seine C-terminal gelegene Transmembrandomäne an der inneren Kernmembran. Am N-Terminus befindet sich die LEM-Domäne, die die Interaktion mit BAF und dem Chromatin vermittelt. Als weiterer Interaktionspartner ist Nesprin-1α gezeigt. Modifiziert nach Mislou et al., 2002.

Emerin ist ein Protein der inneren Kernmembran. Sein Verlust führt zur Ausbildung der X-chromosomalen degenerativen Muskelerkrankung Emery Dreyfuss Muskeldystrophie (EDMD, Bione et al., 1994). Humanes Emerin umfasst 254 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 34 kDa. Es besteht aus der N-terminal gelegenen globulären LEM-Domäne, die in den

nukleoplasmatischen Raum ragt. Am C-Terminus befindet sich eine Transmembrandomäne, gefolgt von einer kurzen Sequenz, die in den perinukleären Spalt ragt. C- und N-Terminus werden durch eine Serin-reiche Sequenz getrennt (Wolff et al., 2001, Abb. 1.4). Neben der BAF-vermittelten Verbindung der Kernhülle mit Chromatin konnte gezeigt werden, dass Emerin mit Lamin (Fairley et al., 1999) und den Nesprinen (-1/-2) interagiert (Mislow et al., 2002, Zhang et al., 2005, Libotte et al., 2005).

1.5 Zell-Zell-Kontakte

Zell-Zell-Kontakte sind essentiell bei der Aufrechterhaltung von Geweben und dienen der Kommunikation zwischen den Zellen. Epitheliale Zellen weisen in ihrem apikalen Bereich eine charakteristische Struktur, den Haftkomplex, auf. Er dient der Verbindung benachbarter Zellen und wurde mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen erstmals genauer beschrieben. Bei den dabei identifizierten Strukturen handelt es sich um *Tight Junctions* (zonula occludens, Verschlusskontakte), *Adherens Junctions* (zonula adhärens, Adhärensverbindungen) und Desmosomen (macula adhärens, Nexus) (Abb. 1.5, Farquhar & Palade, 1963). Durch Adhäsionskontakte kann eine Zelle mit benachbarten Zellen (Abb. 1.5, Adhärenskontakte, Desmosomen) oder mit der Basallamina in Kontakt treten (Abb. 1.5, Hemidesmosom). Durch Verschlusskontakte (Abb. 1.5, *tight junctions*) werden interzelluläre Spalten zwischen Zellen versiegelt. Über die Kommunikationskontakte kann das Zytoplasma benachbarter Zellen direkt miteinander verbunden werden (Abb. 1.5, Kommunikationskontakt, engl. *Gap junction*). Eine charakteristische Gemeinsamkeit interzellulärer Kontakte sind Transmembranproteine. Diese durchspannen die Plasmamembran und verbinden auf der einen Seite die Adhäsionskomplexe über Adaptorproteine mit dem Zytoskelett. Auf der anderen Seite vermitteln sie im Interzellularraum die Bindung zu benachbarten Zellen bzw. zur Basallamina.

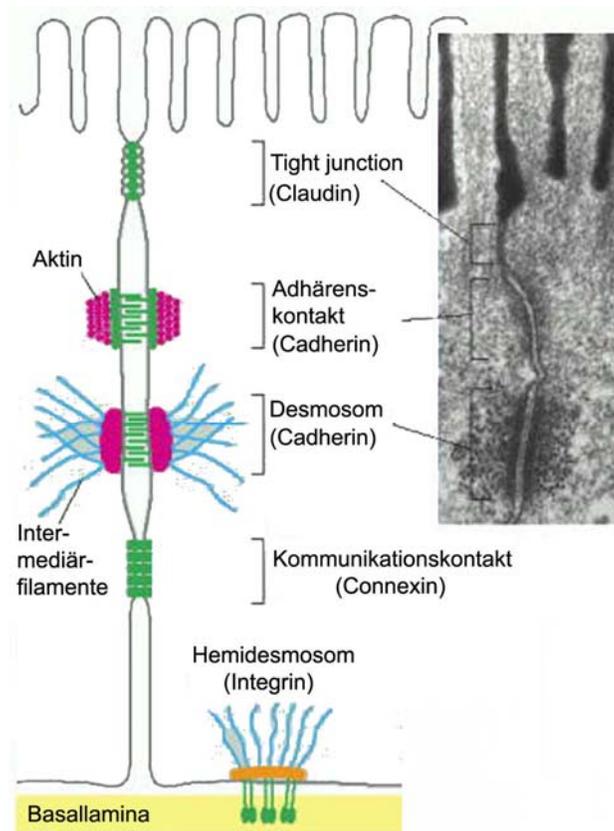


Abb. 1.5 Übersicht über Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte. Die Abbildung zeigt in einer schematischen Darstellung (linke Seite) verschiedene Zell-Zell-Kontakte und elektronenmikroskopische (EM) Aufnahmen einzelner Verbindungsformen (rechte Seite). Die EM-Aufnahme zeigt den von Farquhar & Palade (1963) gezeigten Haftkomplex im apikalen Epithelbereich. Die Zell-Zell-Kontakte sind mit den entsprechenden integralen Membranproteinen angegeben. Modifiziert nach Alberts et al., 2004.

In Epithelzellen sind *Tight Junctions* die am weitesten apikal gelegenen Zell-Zell-Kontakte. Sie lagern sich in einem engen Bereich gürtelförmig um die Zelle und erfüllen dabei zwei Aufgaben. Zum einen verhindern sie durch den engen Verschluss benachbarter Zellen den parazellulären Transport von Wasser und Ionen, wodurch ein geschlossener Raum entsteht. Zum anderen haben sie eine „Zaun-Funktion“, bei der sie die laterale Diffusion von Membranproteinen verhindern. Dadurch wird den Zellen Polarität verliehen und ein apikaler und basolateraler Bereich kann unterschieden werden (Ebnet, 2008, Tsukita et al., 2001). Bei den Transmembranproteinen handelt es sich um Claudin, Occludin und JAM-1. Die Verbindung zum Aktinzytoskelett wird in erster Linie durch die „Zo“- (Zonula occludens Proteine) Adapterproteine übernommen (Niessen, 2007).

Die Adhäsionskontakte stellen die umfangreichste Gruppe dar. Es wird unterschieden zwischen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten. Zell-Zell-Kontakte werden durch Adhärenskontakte bzw. Desmosomen vermittelt. In beiden Fällen dienen Cadherine als Transmembranproteine. Desmosomen sind scheibenförmige Kontaktpunkte, die in erster Linie in Geweben mit starker mechanischer Beanspruchung wie Herzmuskel und Haut vorkommen (Al-Amoudi & Frangakis, 2008). Sie werden über Adapterproteine wie Plakoglobin und Desmoplakin mit den Intermediärfilamenten verbunden (Waschke, 2008). Adhärenskontakte sind in Epithelien ähnlich wie die *Tight Junctions* in Form eines Gürtels, der die ganze Zelle umfasst, organisiert. Als Ankerproteine der Cadherine fungieren hierbei die Catenine (α , β), welche die Verknüpfung an Aktinfilamente vermitteln. Der genaue Aufbau und die Funktion der Catenine wird später diskutiert. Hemidesmosomen verbinden Zellen über Integrine an die Basallamina (Abb. 1.5).

Eine Besonderheit bilden die Kommunikationskontakte (*gap junctions*). Hierbei werden nicht nur die Membranen benachbarter Zellen miteinander verbunden, sondern auch das Zytoplasma. Im Grundaufbau bildet jede Zelle einen halben aus Connexin bestehenden Kanal (Connexon), der in die Plasmamembran eingebettet ist. Connexone benachbarter Zellen werden verbunden, so dass ein vollständiger Kanal entsteht. Kommunikationskontakte dienen daher unter anderem in Epithel- bzw. Herzmuskelzellen der metabolischen bzw. elektrischen Kopplung von Zellen (Shaw et al., 2007).

1.6 α -Catenin

α -Catenin wurde erstmals als Bindungspartner des Zelladhäsionsproteins E-Cadherin identifiziert (Herrenknecht et al., 1991, Nagafuchi et al., 1991). Bis heute wurden drei verschiedene α -Catenine identifiziert α -E-/T-/N-Catenin. Sie werden jeweils durch ein eigenes Gen kodiert und unterscheiden sich bezüglich ihrer Gewebeverteilung, die der Namensgebung zu Grunde liegt. α -E-Catenin wird ubiquitär exprimiert, ist jedoch am stärksten in epithelialen Geweben nachweisbar. Die Expression von α -N-Catenin ist auf neuronale Gewebe begrenzt. α -T-Catenin wird am stärksten in Herz und Hoden (heart & testis)

exprimiert (Kobielka & Fuchs, 2004). Humanes α -E-Catenin wird durch 16 Exone kodiert. Es besteht aus 906 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 102 kDa. Es existieren drei Regionen mit starker Homologie zum aktinbindenden-Protein Vinculin, die als VH1-VH3 bezeichnet werden (Abb. 1.6). Neben der Interaktion mit β -Catenin bei der Ausbildung von Adhärensverbindungen konnten bis heute eine Vielzahl von Interaktionspartnern identifiziert werden, die in erster Linie mit der Organisation des Aktinzytoskeletts in Verbindung stehen (Abb. 1.6).

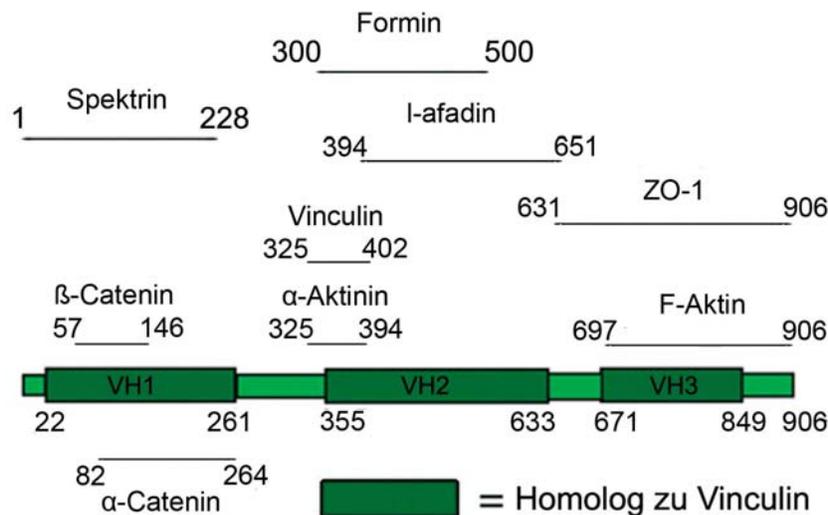


Abb. 1.6 Übersicht der α -Catenin Bindungspartner. Die Abbildung zeigt eine schematische Übersicht über die 906 Aminosäuren umfassende Sequenz von α -Catenin. Die Bereiche mit Sequenzhomologie zu Vinculin sind verdickt dargestellt (VH1-VH3). Die Namen der Bindungspartner sind mit der Angabe des Interaktionsbereiches in der α -Catenin-Sequenz angegeben. Die Interaktion zu β -Catenin wurde im Zusammenhang mit Adhärensverbindungen beschrieben. Die übrigen Bindungspartner stehen im Zusammenhang mit dem Aktinzytoskelett. Darüber hinaus ist bekannt, dass α -Catenin mit sich selbst interagieren kann. Modifiziert nach Pokutta et al., 2008.

1.7 α -Catenin in Zell-Zell-Kontakten

Die Entdeckung von α -Catenin als indirekten Bindungspartner des Zelladhäsionsproteins Cadherin erlaubte erste Rückschlüsse auf eine Beteiligung dieser Proteine bei der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten. Eine genauere Untersuchung von Adhärenskontakten ergab, dass α -Catenin über β -Catenin mit Cadherin verknüpft wird (Abb. 1.7). α -Catenin ist ein Bindungspartner von β -Catenin und Aktin. Auf Grund dieser Eigenschaft wurde

postuliert, dass die Aufgabe von α -Catenin die direkte oder indirekte Verknüpfung des Adhäsionskomplexes mit dem Aktinzytoskelett ist (Abb. 1.7 A, B). Zwar konnten die einzelnen Interaktionen gezeigt werden, ein quarternärer Komplex aus Cadherin, α - β -Catenin und Aktin konnte jedoch bis heute nicht nachgewiesen werden.

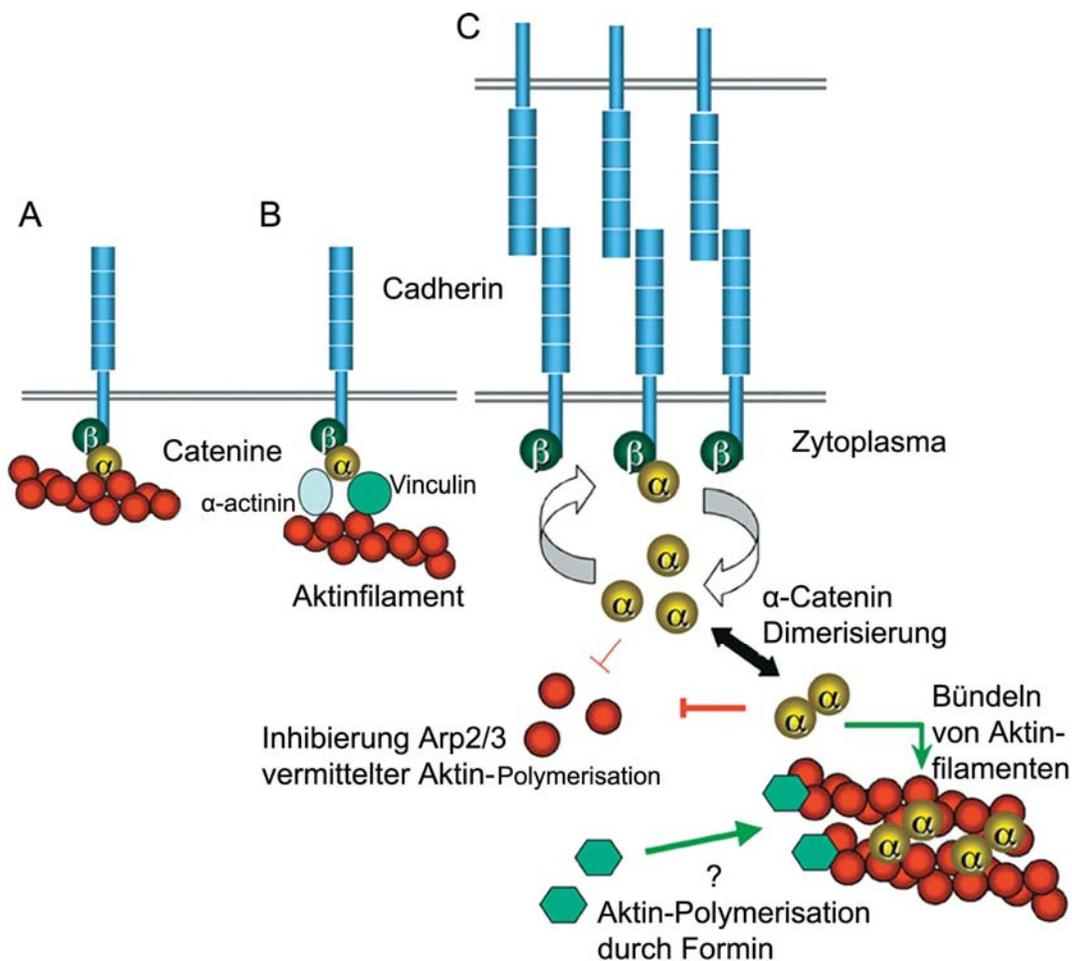


Abb. 1.7 Struktur und Ausbildung von Adhärenzverbindungen. (A+B) Im klassischen Modell der Adhärenzverbindungen werden die Transmembranproteine (Cadherine) direkt (A) über die Catenine (α/β) oder indirekt (B) über die Interaktion mit aktinbindenden Proteinen an das Aktinzytoskelett gebunden. (C) Die Abbildung zeigt das überarbeitete Modell zur Bildung von Adhärenzverbindungen der Arbeitsgruppen um William I. Weis und W. James Nelson, bei dem α -Catenin eine dynamische Rolle bei der Organisation des Aktinzytoskeletts zukommt (nähere Angaben siehe Text). Modifiziert nach Pokutta et al., 2008.

Die Arbeitsgruppen um William I. Weis und W. James Nelson haben das klassische Bild der Adhärenzverbindungen verworfen, indem sie zeigen konnten, dass keine starre Verknüpfung des Adhäsionskomplexes mit dem Aktinzytoskelett vorliegt (Drees et al., 2005 & Yamada et al., 2005). Hierbei wurde zunächst mit Hilfe von Bindungsanalysen nachgewiesen, dass die

Komponenten der Adhärenskontakte (E-Cadherin, α - β -Catenin und Aktin) in vitro nicht in der Lage sind, einen quarternären Proteinkomplex auszubilden. Es konnte lediglich in Übereinstimmung mit vorherigen Arbeiten gezeigt werden, dass E-Cadherin mit α - β -Catenin assoziieren kann (Aberle et al., 1994). Zusätzlich wurde mit Hilfe von FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) Analysen das Diffusionsverhalten der Proteine in vivo an den Zell-Zell-Kontakten untersucht. Hierbei wurde deutlich, dass E-Cadherin, β - und α -Catenin vergleichbare Werte aufweisen. Membrannahes Aktin zeigte hingegen eine größere Dynamik, was ebenfalls gegen eine statische Verknüpfung spricht (Yamada et al., 2005).

Die Polymerisierung von Aktin ist eine treibende Kraft bei der Ausbildung von Lamellopodien, durch die die Zellen sich fortbewegen (Pollard & Borisy, 2003). Sie sind bei der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten für die ersten Kontaktpunkte zwischen zwei Zellen verantwortlich (Vasioukhin et al., 2001). Im Zuge der Ausreifung der Adhärensverbindungen kommt es zu einer Umstrukturierung des dreidimensionalen Aktinnetzwerks in den Lamellopodien zu linearen F-Aktinstrukturen, die gürtelförmig entlang der Zell-Zell-Kontakte organisiert sind. Aktinfilamente spielen damit bei der Etablierung neuer Zell-Zell-Kontakte eine bedeutende Rolle. Zusätzlich sind kortikale Aktinfilamente für die Aufrechterhaltung von Adhärensverbindungen essentiell (Quinlan & Hyatt, 1999). Durch die Analyse der Bindungsverhältnisse in Adhärensverbindungen wurde gezeigt, dass α -Catenin keine starre Verknüpfung mit dem Aktinzytoskelett vermittelt (Gates & Peifer, 2005). Ein Blick auf die bisher beschriebenen Bindungspartner von α -Catenin zeigt, dass es sich in erster Linie um aktinbindende Proteine handelt (Abb. 1.6) und dass α -Catenin bei der Organisation des kortikalen Aktinzytoskeletts eine wichtige Rolle übernimmt (Drees et al., 2005).

Rekombinantes α -E-Catenin liegt in Lösung als Homodimer vor. Die Anwesenheit von β -Catenin bewirkt dessen Dissoziation und die Ausbildung eines Heterodimers (Stöchiometrie 1:1) (Koslov et al., 1997). In vitro-Bindungsanalysen zeigten zusätzlich, dass E-Cadherin mit α - und β -Catenin in einem 1:1:1 Verhältnis im Komplex vorliegt (Kobielka & Fuchs, 2004). Zwischen dem monomeren und dem dimeren α -Catenin bestehen funktionale Unterschiede. Dimeres α -Catenin bindet verglichen mit dem monomeren

Protein bevorzugt an Aktin. Das gegenseitige Ausschließen der Bindungen von α -Catenin zu Aktin bzw. β -Catenin bedeutet, dass α -Catenin in der Lage sein muß, von den Adhärensverbindungen zu dissoziieren. Dies konnte in verschiedenen experimentellen Ansätzen bestätigt werden. α -Catenin Dimere sind außerdem an der Inhibierung der Aktivität von Arp2/3 beteiligt und beeinflussen dadurch die Ausbildung des dreidimensionalen Aktinnetzwerks (Drees et al., 2005).

Auf Grund dieser Daten wurde das Modell der Adhärensverbindungen modifiziert (Abb. 1.7), das ursprünglich von einer statischen Natur der Adhärensverbindungen ausging. Zusätzlich wurde eine Rolle von α -Catenin bei dem Übergang dynamischer Lamellopodien hin zu ausgereiften Zell-Zell-Kontakten postuliert. Nach der Ausbildung der ersten Kontaktpunkte zwischen den Zellen kommt es zu einer Akkumulation von E-Cadherin. Die Bindung von β -Catenin zu E-Cadherin findet bereits am endoplasmatischen Retikulum statt. Von dort aus gelangen die Proteine gemeinsam an die Zellperipherie (Hinck et al., 1994). Zytoplasmatisches α -Catenin wird durch β -Catenin an die Zellperipherie rekrutiert. An den ausreifenden Zell-Zell-Kontakten kommt es zu einem Austausch von gebundenem monomeren α -Catenin und zytosolischen Dimeren. Diese könnten sich an Aktinfilamente anlagern und damit eine Bindung von Arp2/3 verhindern. Dies würde eine Abnahme der Membranaktivität und eine Stabilisierung der Adhärensverbindungen ermöglichen (Pokutta et al. 2008). Die aktinbündelnden Eigenschaften von α -Catenin (Rimm et al., 1995) und dessen Fähigkeit Formin zu rekrutieren (Kobielka et al., 2004), das die Ausbildung linearer Aktinfilamente unterstützt, könnten die Ausreifung der Zell-Zell-Kontakte fördern. Wie die Bindung der Adhärensverbindungen an das Aktinzytoskelett vermittelt wird, kann hiermit allerdings nicht beantwortet werden.

1.8 β -Catenin und der Wnt-Signaltransduktionsweg

β -Catenin ist ein Protein mit dualer Funktion. Einerseits ist es bei der Aufrechterhaltung von Adhärensverbindungen essentiell (Kapitel 1.7), andererseits fungiert es im Wnt-Signalweg als Transkriptionsfaktor. β -Catenin

besitzt an seinem N-Terminus eine regulatorische Region, der ein zentrales Segment mit 12 Armadillo Wiederholungen (Repeats) und eine C-terminal gelegene transaktivierende Region folgt (Abb. 1.8).

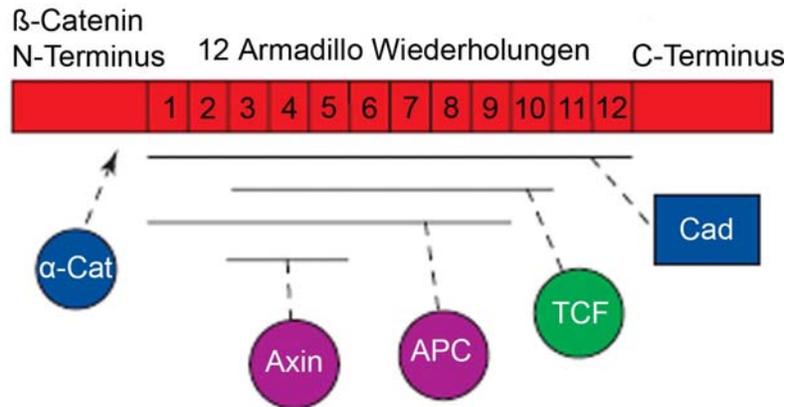


Abb. 1.8 Struktur und Bindungspartner von β -Catenin. Der N-terminale Bereich ist ein regulatorischer Bereich. Im C-Terminus befindet sich eine transaktivierende Region, die für den Wnt-Signalweg von Bedeutung ist. Das mittlere Segment besteht aus 12 Armadillo Wiederholungen (Repeats). Die duale Funktion von β -Catenin wird durch die Farben der Bindungspartner hervorgehoben. Interaktionspartner im Zusammenhang mit Zell-Zell-Kontakten sind blau, Proteine der Signaltransduktion sind lila und grün dargestellt. Abkürzungen: α -Cat: α -Catenin, Cad: Cadherin, APC: adenomatous polyposis coli, TCF: T cell factor. Modifiziert nach Harris & Peifer, 2005.

Wnt-Proteine sind die Liganden der Wnt-Signalwege. 1976 wurde erstmals über das Segment-Polaritätsgen Wingless (*wg*, flügellos) der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* berichtet (Sharma & Chopra, 1976). 1982 wurde das Proto-Onkogen *int-1* (integrator) als Integrationsstelle proviraler DNA des Tumovirus MMTV (Mouse Mammary Tumour Virus) in das murine Genom identifiziert (Nusse & Varmus, 1982). Wenig später wurde berichtet, dass *int-1* ein Sequenzhomolog zum *wg*-Gen ist (Rijsewijk et al., 1987), woraus der Name *wnt* (*wingless*, *int*) hervorging (Nusse et al., 1991). Mitglieder der *wnt*-Familie sind 300 bis 400 Aminosäuren lange Glykoproteine. In Säugern wurden 19 verschiedene Wnt-Gene identifiziert, die sich in 12 Gruppen unterteilen lassen. Wnt-Gene sind schon früh in der Entwicklung der Metazoen nachweisbar. Elf der zwölf *wnt*-Unterfamilien kommen schon bei *Cnidariern* (Nesseltieren) vor. Damit existierte der Wnt-Signalweg bereits in einer breiten Diversität, bevor sich die Cnidarier vor 650 Millionen Jahren von den Bilateriern getrennt haben (Gordon & Nusse, 2006). Der Überbegriff Wnt-Signalweg beschreibt die drei bisher identifizierten Signaltransduktionswege, die auf Grund gleicher Liganden

(Wnt) und Rezeptoren (Frizzled) in einer Gruppe zusammengefasst wurden. Es wird zwischen kanonischen und nicht-kanonischen Signalwegen unterschieden. Das Unterscheidungsmerkmal ist das Protein β -Catenin, welches keine Rolle in den nicht-kanonischen Signalwegen spielt (Abb. 1.9). Der kanonische Wnt-Signalweg (auch kanonischer Wnt/ β -Catenin Signalweg) ist der am besten untersuchteste Vertreter. In allen Fällen findet die Signaltransduktion über die Frizzled Rezeptoren, die über sieben Transmembrandomänen in der Plasmamembran verankert sind, statt. Bisher wurden für Säuger zehn verschiedene Rezeptoren identifiziert (Widelitz, 2005).

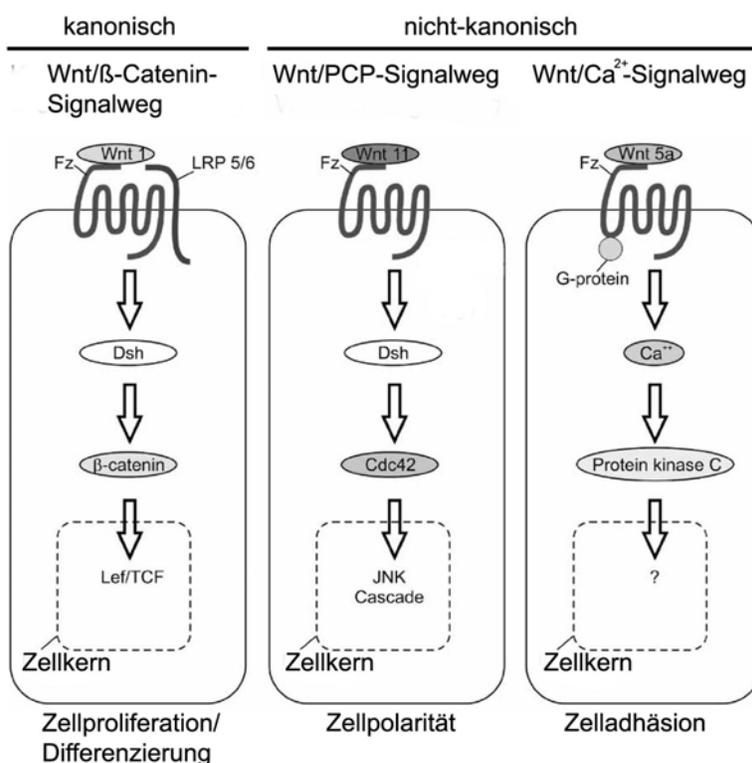


Abb. 1.9 Der Wnt-Signalweg. Bisher wurden drei unterschiedliche Signalwege beschrieben, die in kanonische bzw. nicht-kanonische Signalwege unterteilt werden. Unterscheidungsmerkmal hierbei ist die An- bzw. Abwesenheit von β -Catenin. β -Catenin fungiert im kanonischen Signalweg als Transkriptionsfaktor. Die Aktivierung der nicht-kanonischen Signalwege resultiert in einer Aktivierung der JNK (Jun N-terminal Kinase)-Kaskade (Wnt/PCP-Signalweg) bzw. in einem Anstieg der Kalziumkonzentration mit anschließender Stimulierung kalziumsensitiver Zielproteine wie der Proteinkinase C. Modifiziert nach Widelitz, 2005.

Die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege unterteilen sich in den Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg und den PCP-Signalweg (PCP: *planar cell polarity*). Letzterer wurde entdeckt, als festgestellt wurde, dass eine nicht-kanonische Signalkaskade für den planaren Aufbau der Zellpolarität bei der parallelen Ausrichtung der

Flügelhärchen in *Drosophila* benötigt wird. Ein ähnlicher Phänotyp konnte in Mäusen beobachtet werden, bei denen der Signalweg die Anordnung sensorischer Epithelzellen im Innenohr reguliert (Veeman et al., 2003). Der Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg wurde unter anderem bei Untersuchungen von Xenopus-Embryonen entdeckt. Hier führte eine Überexpression der Wnt-Liganden Wnt5a und Wnt11 zu einer Aktivierung der kalziumsensitiven Kinase Proteinkinase C (Sheldahl et al., 1999). Für den Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg wurde ein Einfluss auf die Zelladhäsion und ein inhibitorischer Effekt auf den kanonischen Wnt-Signalweg beschrieben (Widelitz, 2005).

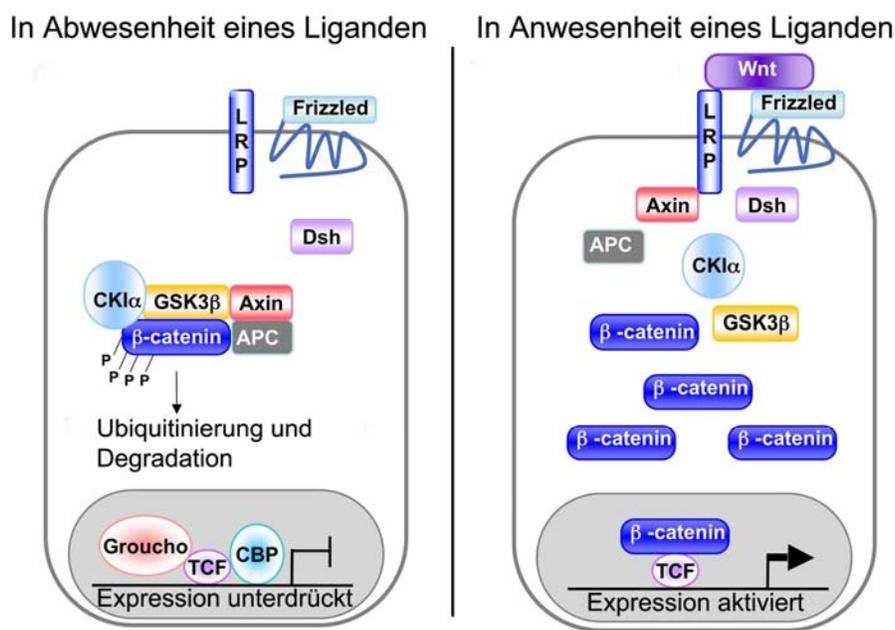


Abb. 1.10 Der kanonische Wnt-Signalweg. Die Abbildung zeigt den kanonischen Wnt-Signalweg in An- (links) bzw. Abwesenheit (rechts) eines Liganden. Zytoplasmatisches β -Catenin wird in Abwesenheit eines Liganden an vier Stellen phosphoryliert und über den Degradationskomplex (CK1: Casein Kinase 1, GSK3 β : Glykogen Synthase Kinase 3 β , Axin, APC: adenomatosis polyposis coli) dem Abbau im Ubiquitin-Proteasom-System zugeführt. Die Transkriptionsfaktoren der Zielgene sind an die DNA gebunden und über Repressoren inaktiviert. In Anwesenheit eines Liganden wird der Degradationskomplex über Dishevelled (Dsh) inaktiviert. β -Catenin akkumuliert im Zytoplasma und gelangt in den Zellkern, wo es über DNA-bindende Transkriptionsfaktoren (TCF: T cell factor) an die DNA rekrutiert und gebunden wird. Modifiziert nach Eisenmann, 2005.

Im kanonischen Wnt-Signalweg spielt β -Catenin eine entscheidende Rolle. In Abwesenheit eines Liganden wird es in Adhärensverbindungen eingebaut. Zytoplasmatisches β -Catenin wird durch einen Degradationskomplex phosphoryliert und mit Hilfe des Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut (Abb. 1.10) (Aberle et al., 1997). Der Degradationskomplex besteht aus CK1

(Caseinkinase 1), der Serin/Threonin Kinase GSK3 β (Glykogen Synthase Kinase 3 β), Axin und APC (adenomatosis polyposis coli). Die Serin und Threonin Aminosäurereste, die durch die Kinasen phosphoryliert werden (Serin 33, 37, 45 & Threonin 41), befinden sich in der regulatorischen Region am N-Terminus des Proteins. Zunächst kommt es zu einer Phosphorylierung von Serin 45 durch CK1, diese ist für die nachfolgende Phosphorylierung der verbleibenden Aminosäurereste durch GSK3 β notwendig (Polakis, 2002). Durch die Phosphorylierungen an den Serinen 33 und 37 wird β -TRCP, einer Ubiquitinligaseuntereinheit erkannt, und für die Degradation im Proteasom markiert. Die Anwesenheit eines Wnt-Liganden aktiviert den Signalweg (Abb. 1.10). Der Ligand bindet an den Frizzled Rezeptor und dessen Korezeptor LRP (lipoprotein receptor-related protein). Das Signal wird auf das Protein Dishevelled übertragen, welches einen inhibitorischen Effekt auf die GSK3 β -Kinase hat. Der Degradationskomplex wird aufgelöst, β -Catenin akkumuliert im Zytoplasma und kann in den Zellkern gelangen. Im Zellkern wird β -Catenin durch LEF/TCF (Lymphoid enhancer factor/ T cell factor proteins) Transkriptionsfaktoren zu den Wnt-Signalweg Zielgenen rekrutiert. β -Catenin weist zwar transkriptionsaktivierende Domänen auf, ist aber nicht in der Lage selber an DNA zu binden. Daher bedarf es der DNA-bindenden Moleküle (Arce et al., 2006). Im inaktiven Wnt-Signalweg liegen LEF/TCF Transkriptionsfaktoren mit Repressoren, wie Groucho und CPB vor.

1.9 Zielsetzung

Nesprine sind Kernmembran-assoziierte Moleküle, deren Funktion in erster Linie der Positionierung und strukturellen Stabilität des Zellkerns zugeordnet wird. Im Vorfeld der Arbeit wurde im Hefe-Zwei-Hybrid System α -N-Cat* als neuer Interaktionspartner von Nesprin-2 identifiziert. Die Besonderheit dieser Interaktion liegt darin, dass α -Catenin ein Protein der Adhärenzonen ist und an der Plasmamembran für die Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt ist.

Ziel der Arbeit ist die Bestätigung und Charakterisierung der Interaktion dieser Proteine, die zwei räumlich getrennten Kompartimenten zugeordnet werden. α -N-Cat* stellt eine neue Isoform von α -N-Catenin dar. Aus diesem Grund sollte geprüft werden, ob die Interaktion zu Nesprin-2 isoformspezifisch ist oder auf weitere α -Catenine übertragen werden kann. Zusätzlich soll in Lokalisationsstudien das subzelluläre Verteilungsmuster der Proteine anhand zellbiologischer Methoden geprüft werden. Außerdem soll mit Hilfe proteinbiochemischer und zellbiologischer Ansätze die biologische Signifikanz der Interaktion aufgedeckt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien der Qualität pro analysis (p.a.) und Enzyme wurden von den Firmen Merck, Fluka bzw. Sigma-Aldrich, Gibco bzw. Invitrogen, Merck, Gerbu, Riedel-de Haën, Serva, Roche, Roth, New England Biolabs (NEB), Amersham oder Fermentas bezogen. Standardlaborgeräte wurden von den Firmen Alpha Innotech, Bio-Rad, MWG-Biotech, neoLab, Sigma, Leica, Olympus, Beckman, Sorvall, Savant, Eppendorf, Heraeus, Hoefer, Abimed, Thermo Scientific, NUNC bzw. von Zeiss bezogen, oder sind an entsprechender Stelle angegeben. Puffer und Lösungen, die im Folgenden nicht angegeben sind, wurden nach Sambrook et al., 2001, übernommen oder in Anlehnung daran modifiziert.

2.1.1 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten, kommerziell erhältlichen Kits wurden nach Herstellerangaben unter Verwendung der angegebenen oder mitgelieferten Hilfsmittel, Chemikalien und Lösungen eingesetzt.

Cell line Nucleofector Kit V	Amaxa/Lonza
High Pure Purification Kit	Roche
pGem-Teasy-Vektor System I	Promega
ChemiGlow West Chemiluminescence Substrate Kit	Alpha Innotech
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche
TA TOPO cloning [®] Kit	Invitrogen
GeneJet [™] PCR Cloning Kit	Fermentas

2.1.2 Antikörper

Die Antikörper wurden gemäß den Angaben der Hersteller verwendet und in PBG (für die Immunfluoreszenz) oder in Blockierungspuffer für den Westernblot eingesetzt.

Primärantikörper:

Anti- α -Catenin (polyklonal aus Kaninchen)	Sigma
Anti- α -Catenin (5, monoklonal aus Maus)	BD Transduction Laboratories
Anti- β -Akin (Ac-74, monoklonal aus Maus)	Sigma
Anti- β -Catenin (6F9, monoklonal aus Maus)	Sigma
Anti-active- β -Catenin (8E7, monoklonal aus Maus)	Millipore
Anti-GAPDH (71.1, monoklonal aus Maus)	Sigma
Anti-GFP (K3-184-2, monoklonal aus Maus)	Schreiner, 2000
Anti-E-Cadherin (monoklonal aus Ratte)	Zymed
Anti-E-Cadherin (HECD-1, monoklonal aus Maus)	Zymed
Anti-Emerin (4G5, monoklonal aus Maus)	Abcam
Anti-LaminB1 (polyklonal aus Kaninchen)	Abcam
Anti-Lap2 (27, monoklonal aus Maus)	BD Transduction Laboratories
Anti-Myc (9E10, monoklonal aus Maus)	Evan et al., 1985
Anti-Nesprin-2 (K1, polyklonal aus Kaninchen)	Libotte et al., 2005
Anti-Nesprin-2 (K20-478, monoklonal aus Maus)	Zhen al., 2002
Anti- β -Tubulin (WA3, monoklonal aus Maus)	Dr. U. Euteneuer

Sekundärantikörper:

Ziege-anti-Maus-IgG, Peroxidase Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, Alexa 568 Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, Alexa 488 Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, CY3 Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Ratte-IgG, Alexa 568 Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Ratte-IgG, Alexa 488 Konjugat	Sigma

2.1.3 DNA-Oligonukleotide

Klonierung:

α Cat*FStart 5' GCGAATTCGACAGCGGCAATGATATC 3'

α Cat*R-42AS 5' TACCCGGGCTATGGAGCCTTCATCTTCCA 3'

α Cat*R-Ex21 5' TACCCGGGCTACTGATCAGCCACAGCACG 3'

α -N-Cat* F : 5' GGAAGCTTCGGACAGCGGCAATGAT 3'

α -N-Cat* R : 5' CCGGTACCCTAGAAGGAATCCATTGCTTTGA 3'

α -N-Cat*-EX18+15 R : 5' TACCCGGGCTATGTGAAGTCTGTCATTTC 3'

aCat Δ Ex14F 5' GCCTCGAGCTGGCAAAGGCCATTGAAA 3'

aCat Δ Ex14R 5' TAGTCGACCTAGAAGGAATCCATTGCT 3'

aNCat1FLgfp2F 5' GCGTCGACGGATGACTTCGGCAACTTCACCTATC 3'

aNCat1FLgfp2R 5' TACCCGGGCTAGAAGGAATCCATTGCTTTGAATT 3'

Nesp2 SR1 F: 5' CCGAATTCGCTTTGAGGACTGGCTCAAG T 3'

Nesp2 SR1 R: 5' GGGTCGACCTACCTCTGGTTGGTGAAATGCCT G 3'

Nesp2 SR2 F: 5' CCGAATTCGAAGAATTTGAGGGCACCAGGG 3'

Nesp2 SR2 R: 5' GGGTCGACCTAGGTGAGCCGCCGGTGGAAAC 3'

Nesp2 SR zw 2-3 F: 5' CCGAATTCTCCTGCACTCCGGGCTTGAA 3'

Nesp2SRzw2-3-R

5' GGGTCGACCTACAAATTTTGTGTTTATTTTGGAGCTTATTGT 3'

Sequenzierung:

aNCatFLseqP1 5' CCCATCTGAAAATTGTGGAAGAGG 3'

aNCatFLseqP2 5' AGAGGATCGTGGCGGAGTGCAA 3'

aNCatFLseqP3 5' CATCACCTCAGTGGATGACTTCC 3'

aNCatFLseqP4 5' GCTGAGCAGGTGGAGATATTC 3'

2.1.4 RNA-Oligonukleotide

a-cat7

5'GATCCGCCAGTCCAGGTGGTGAATTTTTTCAAGAGAAAAATTCACCACCT
GGACTGGTTTTTTTACGCGTG -3'

a-cat7 mu

5'GATCCGCCAGTCCAGCTGGTGAATTTTTTCAAGAGAAAAATTCACCAGCT
GGACTGGTTTTTTTACGCGTG 3'

Die α -Catenin shRNAs wurden in den RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-Vektor kloniert und von Dr. Cara Gottardi zur Verfügung gestellt.

Nesprin-2C2

Nes2CT2s

GAGAAGAAACTCAAACAGTGAAGCTTGACTGTTTGAGTTTCTTCTTTTTT

Nes2CT2as

GATCAAAAAGAGAAGAAACTCAAACAGTCAAGCTTCACTGTTTGAGTTTC
TTCTCCG

Nesprin-2-Kontrolle

Nes2CTcs

ATCTACTCGACGTGAGCGTGAAGCTTGacgctcacgtagatctttt

Nes2CTcas

GATCAAAAATCTACTCGACGTGAGCGTCAAGCTTCacgctcacgtagatcg

Die shRNAs wurden über BseRI und BamHI in pSHAGI kloniert

2.1.5 Vektoren

pGem-Teasy [®]	Promega
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Invitrogen
pGADT-7-Rec (Gal4 AD)	Clontech
pGBKT-7 (Gal4 DNA-BD)	Clontech
pCMV-Myc	Clontech
pEGFP-C2	Clontech
pGEX-4T-1	Amersham
pShaG-1	Paddison et al. (2002)

2.1.6 Plasmide

Im Folgenden wird eine Übersicht der in dieser Arbeit hergestellten oder verwendeten Plasmide gegeben.

pGBKT-7 Nesprin-2-SR (Libotte, 2004):

Das Plasmid kodiert für die C-terminalen Aminosäuren 6146 - 6799 von Nesprin- giant fusioniert an eine Gal4-DNA-Bindedomäne.

pGADT-7-Rec- α -N-Cat* (Schneider, 2005)

Das Plasmid enthält α -N-Cat* verbunden mit einer Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne und wurde bei der Durchmusterung der kommerziell erhältlichen, gehirnspezifischen humanen cDNA-Bank (BD Matchmaker[™] Clontech) im Hefe-Zwei-Hybrid-System identifiziert.

pEGFP-C2 α -N-Cat* (AS: 706-860):

Das Insert aus dem Plasmid der cDNA Durchmusterung (pGBKT7-Rec- α -Catenin, Schneider, 2005) wurde in pEGFP-C2 kloniert (Beijer, 2005). Das Fragment kodiert für 155 Aminosäuren, die den Positionen 706 - 860 des C-Terminus von α -N-Catenin-4 (NCBI Zugriffsnummer: AK295181.1) entsprechen.

pEGFP-C2 α -N-Cat* Δ 42AS (AS: 706-818):

Das PCR-Produkt der Primer α Cat*FStart und α Cat*R-42AS (Template: pEGFP-C2 α -N-Cat*) wurde über EcoR1 und Xma1 in pEGFP-C2 kloniert.

pEGFP-C2 α -N-Cat* Δ Ex18 (AS: 706-730):

Das PCR-Produkt der Primer α Cat*FStart und α Cat*R-Ex21 (Template: pEGFP-C2 α -N-Cat*) wurde über EcoRI und XmaI in pEGFP-C2 kloniert.

pEGFP-C2 α -N-Cat* Δ Ex18/15 (AS: 706-730):

Das PCR-Produkt der Primer α Cat*FStart und α -N-Cat*-EX18+15 R (Template: pEGFP-C2 α -N-Cat*) wurde über EcoRI und XmaI in pEGFP-C2 kloniert.

pEGFP-C1 α -N-Cat* Δ Ex14 (AS: 731-860):

Das PCR-Produkt der Primer aCat Δ Ex14F und aCat Δ Ex14R wurde in pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert und nach einer Restriktionsanalyse mit XhoI und XbaI in pEGFP-C1 kloniert.

pEGFP-C2- α -N-Catenin-1 full length:

Das Insert der Primer aNCat1FLgfp2F und aNCat1FLgfp2R wurde in den pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert. Als Template wurde ein Image Klon (NCBI Zugangsnummer: 6187158) verwendet. Die Sequenzierung zeigte, dass der für die C-terminalen 109 Aminosäuren kodierende Bereich der cDNA fehlt. Nach Restriktionsanalyse des pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektors und des Image Klons mit EcoRV und NotI wurde die fehlende Sequenz ergänzt. pEGFP-C2- α -N-Catenin-1 full length enthält die vollständige cDNA von α -N-Catenin-1 und zusätzlich 922 Nukleotide der 3' untranslatierten Region. Für die Sequenzierung wurden aNCatFLseqP1 - P4 verwendet.

pEGFP-C2- α -N-Catenin-1 N199:

Die, für die N-terminalen 199 Aminosäuren von α -N-Catenin-1 kodierende Nukleotidsequenz wurde nach Restriktionsanalyse von pEGFP-C2- α -N-Catenin-1 full length mit Sall und BamHI in pEGFP-C2 kloniert.

pCDNA3 Myc- α -E-Catenin full length:

Das Konstrukt wurde von Prof. Dr. Carien Niessen, Klinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Köln, zur Verfügung gestellt und kodiert für α -E-Catenin mit einer N-terminalen Myc-Markierung.

pEGFP-C2-SR / pCMV-Myc-SR (Libotte, 2004):

Das Plasmid kodiert für die C-terminalen Aminosäuren 6146 - 6799 von Nesprin giant und umfasst die letzten vier Spektrinwiederholungen.

pGEX-4T-1-Nesprin-2-SR1+2 (Schneider, 2009):

Das Plasmid kodiert für die Aminosäuren 6146 bis 6347 von Nesprin-2 giant.

pGEX-4T-1-Nesprin-2-SR2+3 (Schneider, 2009):

Das Plasmid kodiert für die Aminosäuren 6247 bis 6656 von Nesprin-2 giant.

pGEX-4T-1-Nesprin-2-SR3+4 (Schneider, 2009):

Das Plasmid kodiert für die Aminosäuren 6553 bis 6799 von Nesprin-2 giant.

pGEX-4T-1-Nesprin-2-SR1:

Das PCR-Produkt der Primer Nesp2 SR1 F und Nesp2 SR1 R (Template Nesprin-2-SR) wurde über EcoRI und Sall in pGEX-4T-1 kloniert.

pGEX-4T-1-Nesprin-2-SR2:

Das PCR-Produkt der Primer Nesp2 SR2 F und Nesp2 SR2 R (Template Nesprin-2-SR) wurde über EcoRI und Sall in pGEX-4T-1 kloniert.

pGEX-4T-1-Nesprin-2-SR2-3:

Das PCR-Produkt der Primer Nesp2 SR zw 2-3 F und Nesp2SRzw2-3-R (Template Nesprin-2-SR) wurde über EcoRI und Sall in pGEX-4T-1 kloniert. Es enthält die Sequenz zwischen SR1 und SR2 ohne Spektrinwiederholung.

pcDNA3.1-SpGFP-Sun-1-C (Lu, 2007):

SpGFP-Sun-1-C ist ein Fusionsprotein, bei dem der C-Terminus von Sun-1 (ohne Transmembrandomäne) an GFP fusioniert wurde. Zusätzlich wurde eine

Signalpeptidsequenz von TorsinA ergänzt, die eine Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum und im perinukleären Raum bewirkt.

pcDNA3.1-SpGFP (Lu, 2007):

Das SpGFP Fusionsprotein entspricht dem pcDNA3.1-SpGFP-Sun-1-C Plasmid, wobei der für den C-Terminus von Sun-1 kodierende Bereich fehlt.

2.1.7 Bakterienstämme, Zelllinien und primäre Zellen

Bakterienstämme:

XL2 blue	(Plasmide)
GT116	(shRNAs)

Zelllinien (Name, Organismus, Gewebe):

HaCaT, <i>Homo sapiens</i> , Haut	Boukamp et al., 1998
COS7, <i>Cercopithecus aethiops</i> , Niere	Gluzman et al., 1981
MDCK-2, <i>canis familiaris</i> , Niere	Madin & Darby, 1958
HeLa, <i>Homo sapiens</i> , Gebärmutter	Buehring et al., 2004
CloneA, <i>Homo sapiens</i> , Darm	Dr. Arthur M. Mercurio

Primäre Zellen:

Primäre humane Keratinozyten	Nils Buchstein (AG Dr. med. S. A. Eming, Dermatologie der Universität zu Köln)
------------------------------	---

COS7, HaCaT und MDCK-2 Zellen wurden unter wassergesättigter Atmosphäre und 5% CO₂, bei 37 °C in DME Medium (Dulbecco´s modified Eagle´s medium, D5796, Sigma) mit hohem Glukoseanteil (4,5 g/l) unter Zugabe von 10% FKS (foetales Kälberserum), 2 mM Glutamin, 2 mM Penicillin und 2 mM Streptomycin kultiviert. CloneA Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (R8758, Sigma) mit Zugabe von 10% FKS, 2 mM Penicillin und 2 mM Streptomycin kultiviert. Medien für primäre humane Keratinozyten wurden

von der Klinik für Dermatologie der Universität zu Köln zur Verfügung gestellt und gemäß der Anweisung aus Watt, 1994, angefertigt.

2.1.8 Mikroskopie

Die in dieser Arbeit gezeigten Immunfluoreszenzen wurden mit einer Ausnahme (Abb.3.23), mit dem konfokalen Lasermikroskop Leica CLSM-SP dokumentiert. Für die Epifluoreszenzmikroskopie wurde das Fluoreszenzlichtmikroskop DMR mit der Kamera DC 350 FX der Firma Leica und dem Programm Irfanview für die Aufnahmen verwendet. Die anschließende Bildbearbeitung wurde mit dem Programm Adobe Photoshop CS durchgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Transfektion und Kultivierung von Säugerzellen

COS7 Zellen (5×10^6) wurden in 200 μ l Medium aufgenommen und mit 5-10 μ g hochreiner Plasmid-DNA für 15 Minuten in einer Elektroporationsküvette auf Eis inkubiert und anschließend bei 170 V, 950 μ F mittels Gene-Pulser[®] II (Bio-Rad) elektroporiert. CloneA Zellen wurden mittels FuGene[®]6 Transfektionsreagenz (Roche) und HaCaT, HeLa und MDCK-2 Zellen mit der Amaxa Nucleofector[®] Technologie entsprechend den Angaben der Hersteller transfiziert. shRNAs wurden in HaCaT Zellen zweimal im Abstand von drei Tagen transfiziert und nach der zweiten Transfektion für weitere drei Tage in Kultur gehalten.

Bei der Untersuchung von primären human Keratinozyten unter hohen und niedrigen Kalziumbedingungen wurden die Zellen über Nacht in Medium ohne Zugabe von Kalzium (50 μ M Ca^{2+}) und mit Zugabe von Kalzium auf eine Endkonzentration von 120 mM Ca^{2+} in Kultur gehalten. HaCaT Zellen die, ebenfalls unter verschiedenen Kalziumkonzentrationen beobachtet wurden, wurden über Nacht in DME Medium mit niedriger Kalziumkonzentration (Invitrogen, 21068, mit Zugabe von 70 μ M Kalzium, 2 mM Glutamin, 1 mM Na-Pyruvat und 10% (Chelex (Bio-Rad) behandeltes) FKS) bzw. zur

Differenzierung unter Zugabe einer hohen Kalziumkonzentration (2 mM Ca²⁺) in Kultur gehalten.

Zur Untersuchung der Migration von MDCK-2 Zellen wurden die Zellen ü.N. mit 25 ng/ml HGF (hepatocyte growth factor, H1404, Sigma) in Kultur gehalten.

Bei der Prüfung eines induzierbaren Wnt-Signalweges, wurden COS7 Zellen ü.N. mit den angegebenen Mengen LiCl im Kulturmedium behandelt.

2.2.2 Fixierung und Permeabilisierung von Säugerzellen

Adhärenz wachsende Zellen wurden auf Deckgläschen ausplattiert, einmal mit PBS gewaschen und mit 4% PFA (Paraformaldehyd) fixiert und mit 0,5% Triton-X-100 in PBS (4 min, RT) permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse verwendet. Bei der Fixierung mit Methanol wurden die Zellen 10 Minuten bei -20 °C fixiert. CloneA Zellen wurden in einem Schritt mit 0,1% Triton-X-100 in 4% PFA (10 min) fixiert und permeabilisiert.

2.2.3 Immunfluoreszenz-Analyse

Nach der Fixierung wurden die Zellen für 30 Minuten mit PBG blockiert und anschließend mit Primärantikörpern inkubiert (1 h, RT). Die Zellen wurden daraufhin mit PBS gewaschen (3 x 5 min), mit Sekundärantikörpern und zur Visualisierung der Zellkerne mit DAPI (4, 6-Diamidino-2-phenylindol) bzw. Propidiumjodid inkubiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen (3 x 5 min PBS) und mit Gelvatol eingebettet (Aushärten ü.N. bei RT).

2.2.4 Proteinlysate aus Säugerzellen

Zellen einer bis zu 90% konfluent bewachsenen Kulturschale wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 5 ml PBS mit Inhibitoren (je 1 mM DTT, Benzamidin, EGTA, PMSF oder 1x Proteaseinhibitorcocktail (Sigma)) abgeschabt. Alternativ wurden die Zellen nach dem Waschen durch Trypsinieren von der Schale gelöst. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 1000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in Lysispuffer

(0,2 - 1 ml) gelöst (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40, 0,5% Natriumdesoxycholat). Zur Homogenisierung wurde das Lysat fünfmal durch eine Kanüle (0,4 mm) gezogen. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurde das Lysat mit Ultraschall behandelt (50% konstanter Schall, 10 sek) und für 20 Minuten bei 12.000 rpm abzentrifugiert (4 °C). Die Überstände wurden in 5xSDS-Probenpuffer (2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 4 ml Natriumdodecylsulfat, 500 µl Bromphenolblau (0,1%), 2 ml Glycerin, 1 ml β-Mercaptoethanol) resuspendiert, aufgekocht und bei -20 °C gelagert.

2.2.5 Induktion und Reinigung rekombinanter Proteine

Für die Expression rekombinanter Proteine wurde der XL 2 blue *E. coli* Stamm (Stratagen) verwendet. Übernachtskulturen wurden 1:50 in einem entsprechenden Volumen LB-Medium (500 ml – 2 Liter) mit 100 mg/l Ampicillin verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ 0,6 – 0,8 unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Die Expression rekombinanter Proteine wurde durch Zugabe von IPTG (1 mM) induziert. Die Zellen wurden für weitere vier Stunden inkubiert und anschließend pelletiert (15 min, 6000 rpm). Das Bakterien-Pellet wurde in 25 ml STE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) gewaschen und anschließend in 25 ml STE-Puffer mit Inhibitoren (je 1 mM DTT, Benzamidin, EGTA, PMSF oder 1x Proteaseinhibitorcocktail (Sigma)) resuspendiert. Die Bakterien wurden nach Zugabe von Lysozym (100 µg/ml) im Glaspotter (20 - 25 Wiederholungen) lysiert. Im Anschluss an eine 15 minütige Inkubation und Zugabe von Sarcosyl (Endkonzentration 1,4%) wurden die Bakterien mit Ultraschall behandelt (Amplitude 50%, 2 min) und abzentrifugiert (20 min, 12.000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und mit Triton X-100 (Endkonzentration 1%) versetzt. Die Kopplung an die Glutathion Agarose erfolgte ü.N. bei 4 °C und unter moderatem Schütteln.

Die Glutathion Agarose mit den gekoppelten GST-Fusionsproteinen wurde pelletiert (1 min, 1000 rpm) und anschließend 4 - 6 Mal mit STE-Puffer mit Inhibitoren gewaschen (1 min, 1000 rpm, 4 °C) und für GST-Bindungsanalysen verwendet.

2.2.6 GST-(Glutathion-S-Transferase) Bindungsanalyse

Für die Bindungsanalysen wurde jeweils eine 15 cm Schale COS7 Zellen, die das zu untersuchende GFP- oder Myc-markierte Fusionsprotein exprimieren (Input), in Lysispuffer lysiert (Kapitel 2.2.4) und zunächst zur Reduktion unspezifischer Hintergrundsignale für eine Stunde bei 4 °C mit Glutathion Agarose inkubiert. Die Glutathion Agarose wurde pelletiert (1000 rpm, 1 min, 4 °C), verworfen und die Überstände mit GST-Fusionsproteinen gekoppelt an Glutathion Agarose (Glutathion Sepharose™ 4B (Amersham)) inkubiert. Für die Bindungsanalysen Abb. 3.5, Abb. 3.6 und Abb. 3.12 wurden die GST-Fusionsproteine für zwei Stunden bei RT und moderatem Schütteln mit den Zelllysaten inkubiert. Die Präzipitate wurden anschließend jeweils zweimal mit 1 ml PBS mit Inhibitoren und 1 ml Lysis Puffer mit Inhibitoren gewaschen (1000 rpm, 1 min, 4 °C).

Die Bindungsanalyse in Abb. 3.32 wurde in zwei Inkubationsschritten durchgeführt (Abb. 3.32A). Der erste Inkubationsschritt verlief analog zu den gerade beschriebenen Bindungsanalysen. Für den zweiten Inkubationsschritt wurden COS7 Zelllysate angefertigt, wobei anstelle von Lysispuffer PBS mit 0,075% Nonidet-P40 eingesetzt wurde. Das Detergenz ist für die Aufreinigung des integralen Membranproteins Emerin notwendig. Die Lysate wurden zunächst für eine Stunde bei 4 °C mit Glutathion Agarose inkubiert. Die Glutathion Agarose wurde pelletiert und das Volumen der Lysate vergrößert, um die Detergenzkonzentration zu senken (Endkonzentration 0,032% Nonidet-P40). Die Lysate wurden ü.N. unter moderatem Schütteln mit den Präzipitaten aus dem ersten Inkubationsschritt gekoppelt. Abschließend wurde die Glutathion Agarose wieder pelletiert und viermal PBS mit 0,075% Nonidet-P40 und zweimal mit PBS gewaschen (1 min, 1000 rpm, 4 °C), in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 95 °C aufgekocht. Input, Überstände und Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot analysiert.

2.2.7 Immunpräzipitation

HaCaT Zellen wurden lysiert und zur Reduktion der Hintergrundsignale für eine Stunde mit Protein-A-Sepharose CL-4B (Pharmacia Biotech) inkubiert. Die Protein-A-Sepharose wurde pelletiert (1000 rpm, 1 min, 4 °C) und verworfen. Die Überstände (Input) wurden für die Antigen-Antikörper Kopplung verwendet, wobei jeweils 6 µg eines aufgereinigten Primärantikörpers unter moderatem Schütteln für zwei Stunden (4 °C) eingesetzt wurden. Anschließend wurde jeweils 100 µg Protein-A-Sepharose zu jedem Ansatz gegeben und für weitere zwei Stunden bei 4 °C geschüttelt. Die Protein-A-Sepharose wurde pelletiert und zweimal mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden sie ü.N. mit HaCaT Zelllysaten, die mit PBS angefertigt wurden bei 4 °C unter schütteln inkubiert. Am Folgetag wurden die Präzipitate fünfmal mit PBS gewaschen (1 ml, 1000 rpm, 4 °C). und in 1xSDS-Probenpuffer aufgeköcht. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE, Silberfärbung und Westernblot.

2.2.8 Zellfraktionierung

Die zu fraktionierenden Zellen wurden von einer 15 cm Schale mit Trypsin abgelöst, pelletiert (5 min, 1000 rpm, 4 °C) und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen zur Preäquilibration in einem kleinen Volumen (250-500 µl) hypotonischem Puffer (10 mM HEPES, pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl und 1 x Proteaseinhibitor) resuspendiert und kurz abzentrifugiert (20 sek, 3000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde zügig entfernt und verworfen. Die Zellpellets wurden in hypotonischem Puffer (0,2 – 1 ml) resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellsuspensionen wurden zehnmal durch eine feine Nadel (0,4 mm) gezogen, und 5 Minuten nach Beendigung der 10 minütigen Inkubation auf Eis für 10 Minuten bei 1000 rpm (4 °C) zentrifugiert. Die Pellets (Zellkerne) wurden weitere 4 - 6 Mal mit 1 ml PBS mit Inhibitoren (Sigma) gewaschen (10 min, 1000 rpm, 4 °C). Die Überstände (Zytoplasma) wurden für 20 Minuten bei 12.000 rpm (4 °C) abzentrifugiert. Die Pellets der zytoplasmatischen Fraktionen wurden verworfen und die Überstände in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Kern- und

Zytoplasmafraktionen wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen, 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und im Westernblot analysiert.

2.2.9 Färbung von Polyacrylamidgelen

2.2.9.1 Coomassie-Blau Färbung

Proteinlysate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und für 20 - 30 Minuten mit Färbelösung bei RT geschüttelt (0,1% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau R 250, 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure). Nicht an Proteine gebundene Farbstoffpartikel wurde durch Schütteln in Entfärberlösung (10% (v/v) Ethanol, 7% (v/v) Essigsäure) entfernt.

2.2.9.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist verglichen zur Coomassie-Blau Färbung eine sensitivere Methode zum Nachweis von Proteinen. Hierbei wurden Proteingele zunächst 5 Minuten in Fixierlösung (60 ml 50%ige Azeton-Lösung; 1,5 ml 50%ige Trichloressigsäure und 25 µl 37%ige Formaldehyd-Lösung) geschüttelt und anschließend mehrfach mit Wasser gewaschen (3 x 5 sek, 1 x 5 min, 3 x 5 sek). Daraufhin wurde das Gel für 5 Minuten in 50%igen Azeton behandelt. Nach einer Inkubation mit 100 µl 10%igem Natriumthiosulfat-5-hydrat in 60 ml Wasser wurde das Gel erneut mit Wasser gewaschen (3 x 5 sek) und für 8 Minuten in Silbernitrat-haltiger Imprägnierlösung (0,8 ml 20%ige Silbernitrat Lösung, 0,6 ml 37%ige Formaldehyd-Lösung, in 60 ml Wasser) inkubiert. Das Gel wurde gewaschen (2 x 5 sek Wasser) und mit Entwicklerlösung (1,2 g Na₂CO₃, 25 µl 37%ige Formaldehyd-Lösung, 25 µl 10%ige Natriumthiosulfat-5-hydrat (Na₂S₂O₃ x 5 H₂O) in 60 ml Wasser) behandelt. Die Reaktion wurde nach 20-30 Sekunden mit einer Stopp-Lösung (1%ige Essigsäure) beendet und das Gel erneut mit Wasser gewaschen.

2.2.10 Westernblot

Der Nachweis von Proteinen auf einer Trägermembran erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper. Unspezifische Bindungen wurden nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (BioTraceTMNT Pure Nitrocellulose, Pall) durch eine einstündige Inkubation in Blockierlösung (5% Milchpulver in PBS) abgesättigt. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde bei RT oder ü.N. bei 4 °C mit einem Erstantikörper behandelt. Nach dem Waschen der Membran mit NCP-Puffer (3 x 5 min) erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde bei RT und weitere Waschschrte mit NCP-Puffer (3 x 5 min). Die Immunmarkierung wurde mittels Chemilunineszenz (ECL) angeregt. Die Membran wurde für eine Minute mit ECL-Lösung (1 ml Tris-HCl pH 6,8, 100µl Luminol (0,25 M in DMSO), 47 µl Cumarinsäure (0,09 M in DMSO), 4 µl H₂O₂, mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt) behandelt und danach abgetupft. Anschließend wurden Röntgenfilme mit unterschiedlichen Expositionszeiten (bis zu 30 min) auf die Membran gelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von Nesprin-2-SR

Nesprine sind Kernmembran-assoziierte Moleküle, die der Familie der α -Aktinin-ähnlichen aktinbindenden Proteine angehören (Libotte et al., 2005). In höheren Eukaryoten wurden bisher vier Nesprine beschrieben (Nesprin-1, -2, -3 und -4). Nesprin-1 und -2 sind 1000 bzw. 800 kDa große Proteine. Für beide wurde eine Vielzahl von Isoformen beschrieben, die sich in Größe und Domänenkomposition unterscheiden. Die größten Isoformen besitzen zwei N-terminale Calponin-Homologie-Domänen, die die Bindung an Aktin vermitteln (Zhen et al., 2001, Padmakumar et al., 2004, Galkin et al., 2006). Am C-Terminus befindet sich eine KASH-Domäne (Klarsicht/ANC-1/Syne-1 Homologie), die für die Verankerung in die Kernmembran verantwortlich ist (Starr und Fischer 2005). Beide Domänen werden durch ein Segment von Spektrinwiederholungen getrennt (Abb. 3.1). Dieser Aufbau erlaubt eine der Hauptaufgaben der Nesprine, nämlich die Verankerung des Kerns mit dem Aktinzytoskelett.

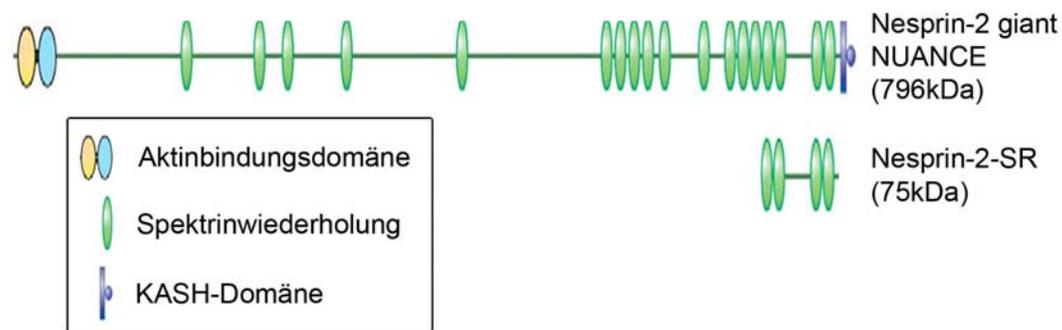


Abb. 3.1: Übersicht der Nesprin-2 giant und Nesprin-2-SR Domänenkomposition. Die größte Nesprin-2 Isoform hat ein Molekulargewicht von 796 kDa und besteht aus einer N-terminalen gepaarten Calponin-Homologie-Domäne, einem langen Segment von Spektrinwiederholungen und einer C-terminalen KASH-Domäne. Nesprin-2-SR hat ein Molekulargewicht von 75 kDa und besteht aus den vier C-terminalen Spektrinwiederholungen vor der KASH-Domäne (Modifiziert nach Lücke et al., 2008).

In Vorarbeiten wurde mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems nach Nesprin-2 Bindungspartnern gesucht (Schneider, 2005). Hierzu wurde ein C-terminales Polypeptid von Nesprin-2 (Nesprin-2-SR) verwendet (Abb. 3.1), das einer

tatsächlich vorkommenden Nesprin-2-Isoform ähnelt (Zhang et al., 2005). Es hat ein Molekulargewicht von 75 kDa und besteht aus den vier C-terminal-gelegenen Spektrinwiederholungen. Eine ektopische Expression von Nesprin-2-SR in COS7 Zellen zeigt, dass neben einer diffusen zytoplasmatischen Verteilung (Abb. 3.2; Pfeilspitzen in A und B) eine gleichmäßige Akkumulation entlang der Kernmembran vorliegt (Abb. 3.2; Sterne in A und B), obwohl Nesprin-2-SR keine KASH-Domäne besitzt (Abb. 3.1).

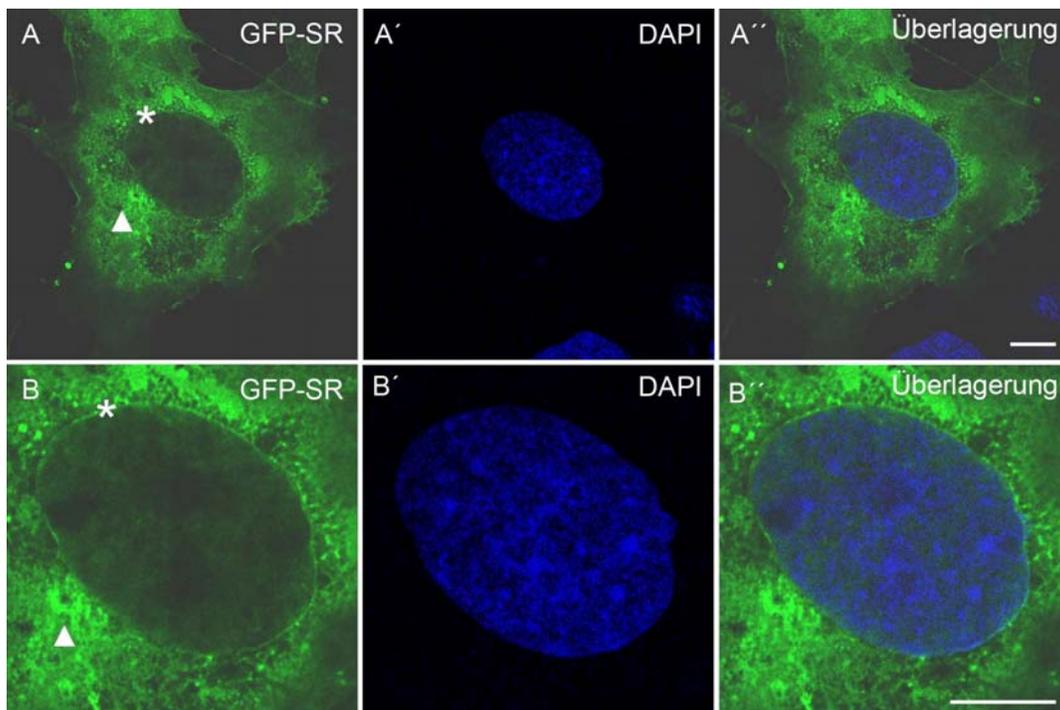


Abb. 3.2: GFP-Nesprin-2-SR lokalisiert in COS7 Zellen im Zytoplasma und entlang der Kernmembran. GFP markiertes Nesprin-2-SR wurde transient in COS7 Zellen exprimiert. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt (A', B'). GFP-Nesprin-2-SR zeigt eine Anreicherung im Zytoplasma (Pfeilspitzen in A und B). Zusätzlich kann eine Akkumulation entlang der Kernmembran beobachtet werden (Sterne in A und B). B-B'' zeigt eine Vergrößerung des Zellkernbereichs der in A-A'' gezeigten Zelle. Größenbalken: 10 μm .

3.2 Identifizierung von α -N-Cat* als ein neuer Interaktionspartner von Nesprin-2-SR

Für die Suche nach neuen Interaktionspartnern mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurde Nesprin-2-SR in einen Expressionsvektor kloniert, der eine Gal4-DNA-Bindedomäne enthält. Zur Identifizierung der neuen Bindungspartner

wurde eine kommerziell erhältliche, gehirnspezifische humane cDNA-Bank (BD Matchmaker™ Clontech) verwendet, welche cDNA-Sequenzen in Verbindung mit der Gal4-Transaktivierungsdomäne enthält. Hierbei konnte ein Fragment des neuronenspezifischen α -N-Catenins, welches von nun an als α -N-Cat* bezeichnet wird, als neuer Interaktionspartner von Nesprin-2-SR identifiziert werden (Abb. 3.3).

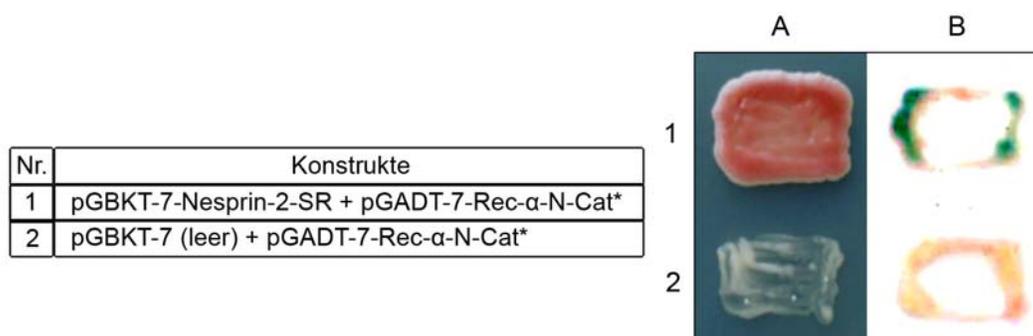


Abb. 3.3: Direkte Interaktion von Nesprin-2 und α -N-Catenin in vivo in der Hefe. (A) Das Nesprin-2-SR Fragment wurde an die Gal4-DNA-Bindedomäne fusioniert (pGBKT-7-Nesprin-2-SR). Das α -N-Cat* Fragment war an die Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert. Y190 Hefen wurden mit beiden Konstrukten transfiziert und auf -Leu, -Trp, -His, +3AT Selektionsplatten ausplattiert. Im Falle der Kotransfektion (1) kann ein Wachstum beobachtet werden. In der Negativkontrolle, bei der an Stelle von Nesprin-2-SR der leere Vektor transfiziert wurde, findet kein Wachstum statt (2). (B) Die Interaktion beider Proteine wurde zusätzlich mit Hilfe eines X-Gal behandelten Filters dokumentiert, bei der die Blaufärbung die Expression der β -Galaktosidase und damit verbunden eine Interaktion der beiden Proteine anzeigt (1), die Negativkontrolle zeigt keine Färbung (2).

3.2.1 Vergleich von α -N-Cat* mit bekannten α -N-Catenin Isoformen

Der erste Schritt zur Charakterisierung des α -N-Cat*-Fragments war ein Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen α -N-Catenin Isoformen. Kurz nach der Entdeckung von α -E-Catenin 1991 (Herrenknecht et al., 1991, Nagafuchi et al., 1991) wurde im Jahre 1993 von Claverie und Kollegen erstmals die neuronenspezifische Form α -N-Catenin identifiziert (Claverie et al., 1993). Bis heute wurden drei Spleißvarianten des für α -N-Catenin codierenden *CTNNA2*-Gens in der Literatur beschrieben (α -N-Catenin-1/-2/-3, Abb. 3.4). Das Gen umfasst 18 Exone und ein alternatives Exon. Die zuerst beschriebenen Isoformen α -N-Catenin-1 und -2 sind einander sehr ähnlich. α -N-Catenin-2 enthält die Information aller 18 Exone und hat ein Molekulargewicht von 113 kDa (953 Aminosäuren, NCBI Zugangsnummer: NM_004389). In α -N-Catenin-1 fehlt der durch Exon Nummer 17 kodierte Bereich. Das Protein hat ein

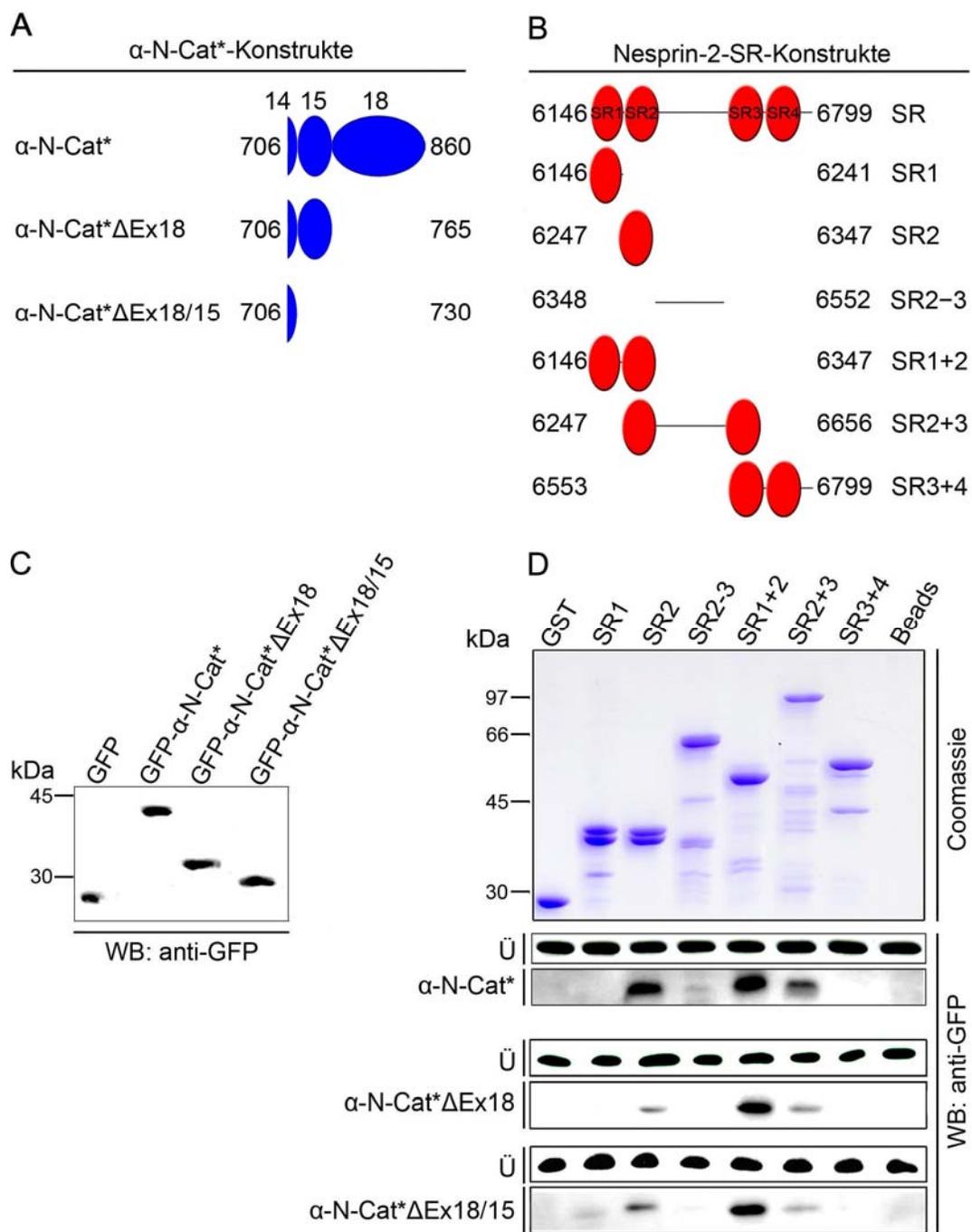
Das in unserer Arbeitsgruppe gefundene α -N-Cat*-Fragment wird durch die Exone 14, 15 und 18 kodiert. Es unterscheidet sich somit von den bisher beschriebenen Isoformen, da im C-terminalen Bereich weder Exon 16 noch Exon 17 translatiert werden und stellt so eine weitere Isoform dar (Abb. 3.4). Die Sequenzen der cDNA-Bank die für die Hefe-Zwei-Hybrid Analyse verwendet wurden sind teilweise unvollständig. Deshalb konnte zunächst keine Aussage über den N-Terminus des Proteins getroffen werden (gestrichelte Linie in Abb. 3.4). Exon 14 ist in α -N-Cat* nicht vollständig vorhanden. Es kodiert für 61 Aminosäuren, von denen in α -N-Cat* die ersten 36 fehlen. Durch eine Sequenzähnlichkeitssuche auf Proteinebene mit Hilfe des „*Basic Local Alignment Search Tools*“ (BLAST) in den Datenbanken des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) konnte die α -N-Cat*-Sequenz als Bestandteil einer bisher in der Literatur nicht charakterisierten Isoform (Zugangsnummer: AK295181.1) identifiziert werden. Mit Ausnahme der ungewöhnlichen Spleißung im 3' gelegenen Sequenzbereich stimmt die Sequenz mit denen von α -N-Catenin-1/-2 überein. Das korrespondierende Protein umfasst 860 Aminosäuren. Entsprechend der Nomenklatur der bekannten Isoformen wird es als α -N-Catenin-4 bezeichnet (Abb. 3.4).

3.2.2 In vitro-Bestätigung der Interaktion von Nesprin-2-SR und α -N-Cat*

Die Interaktion von Nesprin-2-SR und α -N-Cat* wurde mit Hilfe von GST- (Glutathion-S-Transferase) Bindungsanalysen weiter bestätigt und zusätzlich sollten die jeweiligen Interaktionsstellen eingeeengt werden. Hierzu wurden aus dem bereits für die Hefe-Zwei-Hybrid-Untersuchung verwendeten Nesprin-2-SR-Konstrukt verschiedene kleinere GST-markierte Fusionsproteine geschaffen (SR1 38,3 kDa, SR2 38 kDa, SR2-3 48,4 kDa, SR1+2 50,3 kDa, SR2+3 72,2 kDa, SR3+4 50,3 kDa, Abb. 3.5 B). α -N-Cat* und zusätzliche Deletionsvarianten wurden in GFP-Expressionsvektoren kloniert (α -N-Cat* 44 kDa, α -N-Cat* Δ Ex18 33,4 kDa, α -N-Cat* Δ Ex18/15 29,6 kDa, Abb. 3.5 A, C). Die Namen der Konstrukte weisen auf den jeweils deletierten Bereich der cDNA hin. Die GFP-Expressionsvektoren wurden in COS7 Zellen transfiziert, die Proteine transient exprimiert und die Lysate der Zellen mit den jeweiligen GST-

markierten Nesprin-2-SR Polypeptiden inkubiert. GST gekoppelt an Glutathion-Agarose und Glutathion-Agarose wurden als Negativkontrollen verwendet. Die Bindung der GFP-markierten α -N-Cat*-Polypeptide wurde nach einer Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE im Immunblot mit Hilfe eines GFP-spezifischen monoklonalen Antikörpers (mAk K3-184-2) überprüft. Alle verwendeten α -N-Cat*-Fragmente zeigen im Bereich von SR1+2 die intensivsten Signale. Zusätzlich konnten Bindungen an SR2+3 und SR2 nachgewiesen werden. Weitere Versuche zeigten, dass SR2 ausreichend ist für die Interaktion, wenn auch die Bindung schwächer ist als in allen längeren Proteinen (Abb. 3.5D).

Abb. 3.5: Nesprin-2-SR2 interagiert in vitro mit GFP- α -N-Cat* (folgende Seite). (A) Schematische Übersicht der in dieser Bindungsanalyse verwendeten α -N-Cat*-Konstrukte. In der oberen Reihe sind die in der α -N-Cat* cDNA vorhandenen Exone 14, 15 und 18 angegeben. Die daraus abgeleiteten GFP-markierten Proteine basieren auf den Exongrenzen, wobei einmal das vollständige Fragment (α -N-Cat*), eines mit einer Deletion von Exon 18 (α -N-Cat* Δ Ex18) und eines mit einer Deletion der Exone 15 und 18 (α -N-Cat* Δ Ex18/15) verwendet wurde. (B) Schematische Übersicht der Nesprin-2-Konstrukte, die zur Einengung des Bindebereichs von α -N-Cat* verwendet wurden. In der oberen Reihe sind alle vier Spektrinwiederholungen von Nesprin-2-SR dargestellt. Darunter sind die jeweiligen Deletionsvarianten angezeigt. Die an den Seiten der Konstrukte angegebenen Aminosäurepositionen beziehen sich auf Nesprin-2 giant und α -N-Catenin-4 (C) In COS7 Zellen wurden transient die angegebenen GFP-markierten α -N-Cat*-Polypeptide exprimiert. Die Proteine der Zellysate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen übertragen und im Westernblot mit einem GFP-spezifischen Antikörper (mAk K3-184-2) behandelt. Das Laufverhalten der Proteine (siehe Text) entspricht den mit Hilfe des Programms *ExpPASy* – ‘*Compute pi/Mw tool*’ vorhergesagten molekularen Massen. (D) GST-Präzipitation von GFP-markierten α -N-Cat* Proteinen. Die Coomassie-Färbung zeigt die äquivalent eingesetzten Mengen der verschiedenen GST-markierten Nesprin-2-SR Fusionsproteine. GST gekoppelt an Sepharose und Sepharose (Beads) wurden als Negativkontrollen verwendet. Die Westernblotanalyse der Überstände (Ü) zeigt den Einsatz gleicher Proteinmengen. Im Anschluss an eine SDS-PAGE wurden die Westernblots der Präzipitate mit mAk K3-184-2 getestet.



Bei den in Abbildung 3.5 verwendeten α -N-Cat*-Polypeptiden handelt es sich um das vollständige im Hefe-Zwei-Hybrid-Experiment gefundene Fragment und um C-terminale Deletionsvarianten. Alle Proteine interagieren mit Nesprin-2-SR1+2 und in geringerem Ausmaß mit Nesprin-2-SR-2 und Nesprin-2-SR2+3. Daraus kann man schließen, dass der durch Exon 14 kodierte Bereich ausreichend ist, um die Bindung an Nesprin-2-SR zu vermitteln. Zur Überprüfung wurde eine weitere Deletionsvariante von α -N-Cat* kloniert, in der der durch Exon 14 kodierte Bereich fehlt (α -N-Cat* Δ Ex14, Abb. 3.6A) und das Protein wurde in COS7 Zellen exprimiert. Die Lysate der Zellen wurden mit Nesprin-2 gekoppelten GST-Fusionsproteinen inkubiert. Nesprin-2-SR1+2 wurde als Positivkontrolle verwendet. GST gekoppelt an Glutathion-Agarose und Glutathion-Agarose sowie Nesprin-2-SR3+4, für das in den vorherigen Analysen keine Interaktion festgestellt werden konnte, wurden als Negativkontrollen eingesetzt.

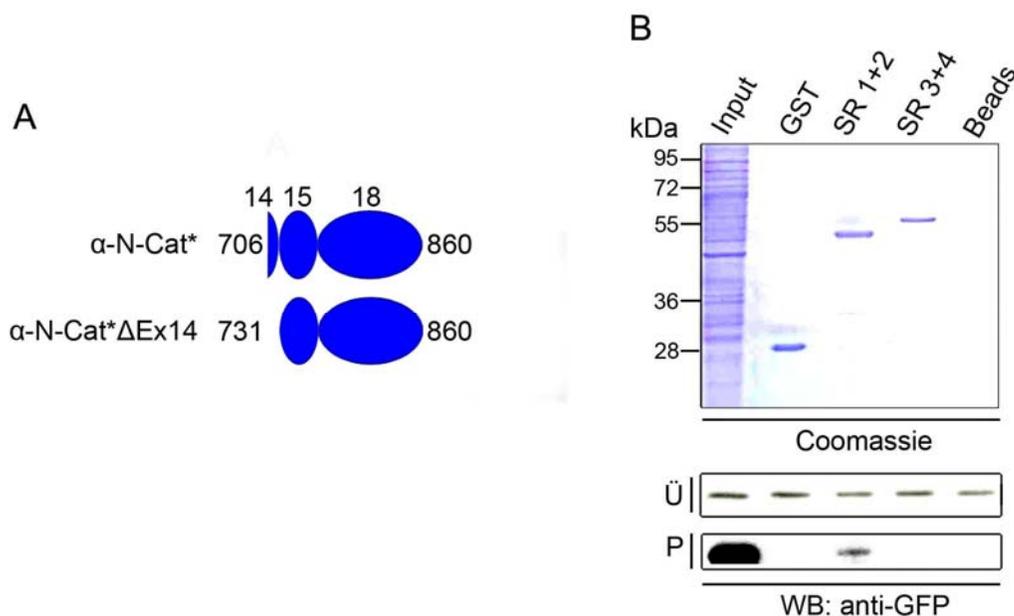


Abb. 3.6: α -N-Cat* Δ Ex14 bindet an Nesprin-2-SR1+2. (A) zeigt das für diese GST-Präzipitation verwendete GFP- α -N-Cat* Δ Ex14 Konstrukt im Vergleich zu α -N-Cat*, in dem der durch Exon 14 kodierte Bereich entfernt wurde. (B) In der Coomassie-Färbung sind die verwendeten GST-Fusionen SR1+2 und SR3+4 gezeigt. GST, Glutathion-Agarose (Beads) und SR3+4 wurden als Negativkontrollen verwendet. Die Auftrennung der Überstände (Ü) und der Präzipitate (P) zeigt im anschließenden Westernblot mit mAk K3-184-2, dass vergleichbare Proteinmengen eingesetzt wurden (Ü) und dass GFP α -N-Cat* Δ Ex14 an SR1+2 bindet (P).

Es zeigte sich, dass eine Deletion von Exon 14 nicht zu einem Verlust der Interaktion führt (Abb. 3.6 B) und dass die Bindestellen von α -N-Cat* an Nesprin-2-SR nicht auf einen kleinen Aminosäurebereich begrenzt werden können, sondern sich über das gesamte α -N-Cat*-Fragment erstrecken.

3.2.3 α -N-Cat* Polypeptide lokalisieren in COS7 Zellen an der Kernmembran.

Die bisherigen Experimente unterstützen eine Nesprin-2-SR - α -N-Cat* Interaktion. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Analysen wurde anschließend die subzelluläre Lokalisation von α -N-Cat* untersucht. Bei einer transienten Expression in COS7 Zellen konnte für GFP- α -N-Cat* eine Verteilung im Zytoplasma und hier eine teilweise filamentäre Färbung als auch eine Lokalisation an der Kernmembran beobachtet werden (Abb. 3.7). Für α -Catenin ist bisher ein Vorkommen in Zell-Zell-Kontakten an der Plasmamembran beschrieben worden (Kobielka et al., 2004).

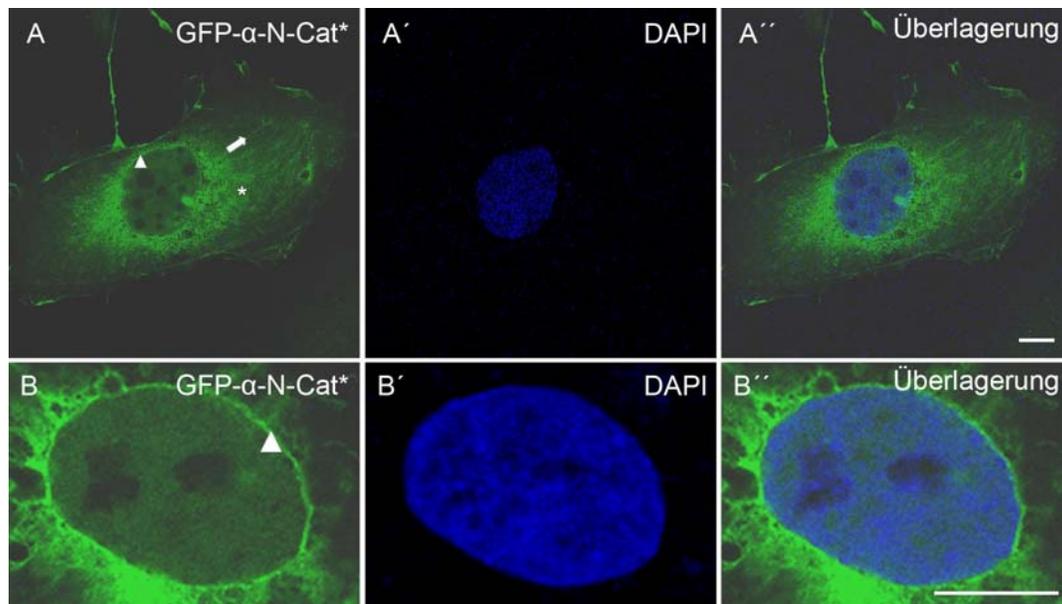


Abb. 3.7: GFP- α -N-Cat* lokalisiert in COS7 Zellen entlang der Kernmembran. GFP- α -N-Cat* wurde transient in COS7 Zellen exprimiert. Es zeigt neben einer zytoplasmatische Verteilung (Stern in A) auch eine Assoziation mit filamentösen Strukturen (Pfeil in A). Zusätzlich ist eine gleichmäßige Akkumulation entlang der Kernmembran zu beobachten (Pfeilkopf in A und B). Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. Größenbalken: 10 μ m.

Für die Deletionsvarianten von α -N-Cat* wurde ebenfalls die für α -Catenin ungewöhnliche Akkumulation entlang der Kernmembran beobachtet (Abb. 3.8).

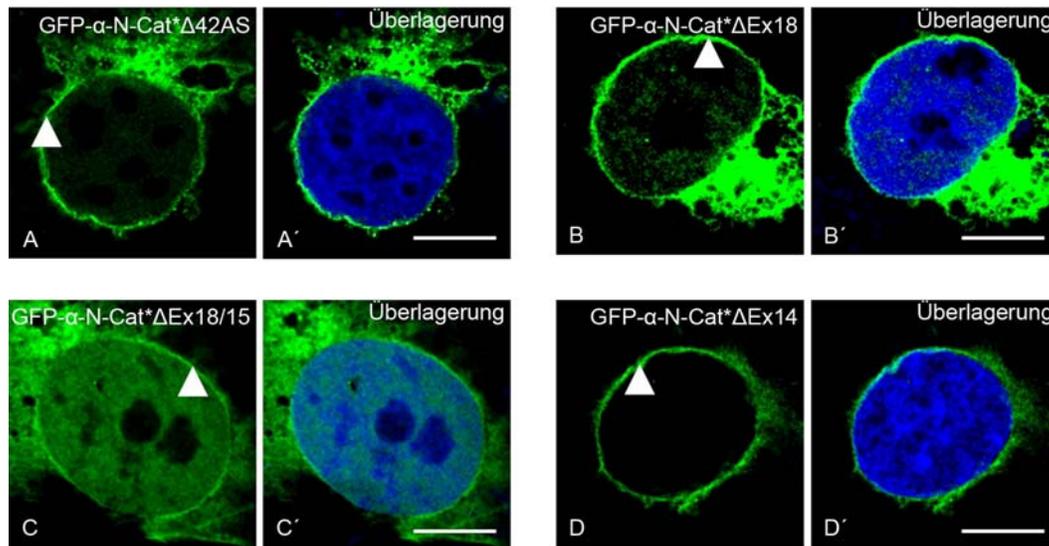


Abb. 3.8: Deletionsvarianten von α -N-Cat* lokalisieren an der Kernmembran in COS7 Zellen. GFP-markierte Fusionsproteine wurden transient in COS7 Zellen exprimiert. Die Namen der Konstrukte weisen auf Deletionen in α -N-Cat* hin. Färbung der DNA mit DAPI. Alle GFP- α -N-Cat*-Fusionsproteine akkumulieren gleichmäßig entlang der Kernmembran. Größenbalken: 10 μ m.

Mit Hilfe statistischer Erhebungen wurde geprüft, wie häufig die verschiedenen GFP-markierten Proteine entlang der Kernmembran akkumulieren. Als Negativkontrolle wurde GFP verwendet. Alle α -N-Cat* Proteine lokalisieren bevorzugt entlang der Kernmembran, so wurde in 93% der GFP- α -N-Cat*Ex14 exprimierenden Zellen und in bis zu 99% der GFP- α -N-Cat* Δ 42As exprimierenden Zellen das Protein an der Kernmembran gefunden (Abb. 3.9). Eine Ausnahme wurde im Falle des GFP- α -N-Cat*Ex18/15 beobachtet. Hier wurde der vergleichsweise geringe Wert von 32,75% ermittelt. In der Mehrzahl der Zellen lokalisierte das Protein im Zellkern. GFP alleine akkumuliert in COS7 Zellen im Zellkern, lagert sich aber nicht an die Kernhülle an.

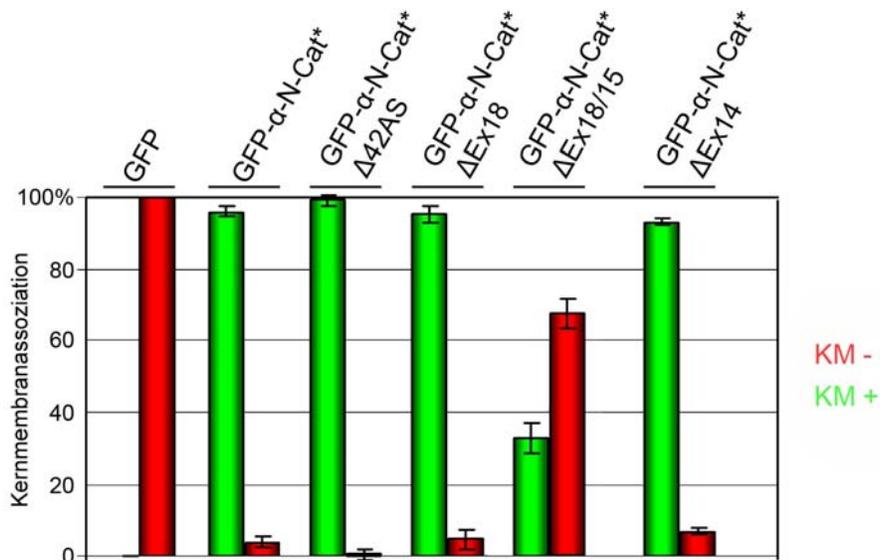


Abb. 3.9: Quantifizierung der Kernmembranassoziation von α -N-Cat*-Proteinen nach Expression in COS7 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus den Zählungen von jeweils vierhundert Zellen. Als Negativkontrolle wurde der leere GFP-Vektor transfiziert. Es sollte geprüft werden, ob in den jeweiligen Zellen eine (grüne Balken, KM +) oder keine (rote Balken, KM-) Assoziation des Fusionsproteins an der Kernmembran beobachtet werden kann. Die Graphen sind jeweils mit Standardabweichungen dargestellt. Für die Negativkontrolle GFP kann keine Anlagerung an die Kernmembran beobachtet werden. Abkürzung: KM: Kernmembran.

3.3 Nesprin-2 interagiert mit α -N- und α -E-Catenin

Durch die vorangegangenen Interaktionsstudien konnte gezeigt werden, dass Nesprin-2-SR mit der neuen α -N-Catenin Spleißvariante α -N-Cat* interagieren kann. Mit Hilfe weiterer Analysen sollte geprüft werden, ob die Interaktion beider Proteine eine Besonderheit dieser neuen Isoform ist, oder ob auch andere α -N-Catenin Isoformen bzw. α -E-Catenin zu einer Interaktion mit Nesprin-2 in der Lage sind.

3.3.1 Die C-Termini verschiedener α -Catenine sind hoch homolog

Im ersten Schritt der Prüfung der Übertragbarkeit der Interaktion von Nesprin-2-SR und α -N-Cat* auf andere α -Catenine wurden die C-terminal gelegenen Aminosäuresequenzen verschiedener α -Catenine mit der von α -N-Cat* verglichen (Abb. 3.10).

einem Alignment mit α -N-Cat* verglichen (Programm: Align, www.ebi.ac.uk/clustalw/, Abb. 3.11). Die Analyse fasst nochmals identische und ähnliche Aminosäuren zusammen. Das Programm gibt zusätzlich Angaben zum prozentualen Anteil an Lücken in der Sequenz, die sich z.B. durch alternativ gespleißte Isoformen ergeben. In der Spalte `Σ identisch + Lücken` sind die prozentualen Angaben beider Kategorien zusammengefasst, so dass sich die Werte in dieser Spalte nur auf die Aminosäuresequenz beziehen. Die Bindungsanalysen (Abb. 3.5, Abb. 3.6) haben gezeigt, dass sich die Bindestelle von α -N-Cat* an Nesprin-2-SR über das gesamte Fragment erstreckt. Es besteht daher die Möglichkeit, dass zur Interaktion befähigte Aminosäurereste auch in alternativ gespleißten Isoformen zugänglich sind. Die zusammengefassten Werte ergeben, dass die Aminosäuresequenzen ohne Berücksichtigung der Lücken zwischen 75,5% bis zu fast 100% identisch sind.

	hs α NCat*			
	identisch	ähnlich	Lücken	Σ identisch + Lücken
hs α NCat1	77	77,5	22,5	99,5
hs α NCat2	62,1	62,5	37,5	99,6
hs α NCat3	77	77,5	22,5	99,5
hs α ECat1	63,5	69,5	22,5	86
hs α ECat2	56,7	62,1	30,8	87,5
hs α TCat	53	61,5	22,5	75,5

Abb. 3.11: Quantifizierung der Sequenzübereinstimmungen verschiedener α -Catenine. Die Tabelle zeigt den prozentualen Anteil identischer/ähnlicher Aminosäuren von α -N-Cat* zum jeweils angegebenen α -Catenin. Zusätzlich wird der prozentuale Anteil an Lücken in den Sequenzen angezeigt. In der rechten Spalte werden die Werte der Lücken addiert, so dass ein Wert entsteht, der sich ausschließlich auf die Übereinstimmung der Aminosäuren bezieht. Abkürzungen: hs α (N,E,T)Cat: *homo sapiens* α -(N-, E-, T-)Catenin. Angabe der Werte in Prozent.

3.3.2 Nesprin-2-SR und Vollängen α -Catenine interagieren in vitro

Um die Interaktion von Nesprin-2-SR mit Vollängenproteinen von α -Catenin zu prüfen, wurden weitere GST-Bindungsanalysen durchgeführt. Hierzu wurde Myc-markiertes Vollängen α -E-Catenin und GFP-markiertes Vollängen α -N-Catenin-1 in Verbindung mit den bereits in den vorherigen Experimenten verwendeten GST-Nesprin-2-SR-Fusionsproteinen eingesetzt. Als Negativkontrollen wurden GST gekoppelt an Glutathion Agarose, Glutathion-Agarose (Beads) und Nesprin-2-SR3+4 eingesetzt. Übereinstimmend mit den

Ergebnissen der vorherigen Bindungsanalysen konnte für die Volllängenproteine von α -E-/N-Catenin eine Interaktion mit Nesprin-2-SR1+2 nachgewiesen werden (Abb. 3.12). Die Interaktion mit dem neuronenspezifischen α -N-Catenin-1 zeigt, dass die Interaktion zu Nesprin-2-SR nicht isoformspezifisch ist. Die Bindung an das ubiquitär vorkommende α -E-Catenin spricht darüber hinaus gegen eine Gewebsspezifität.

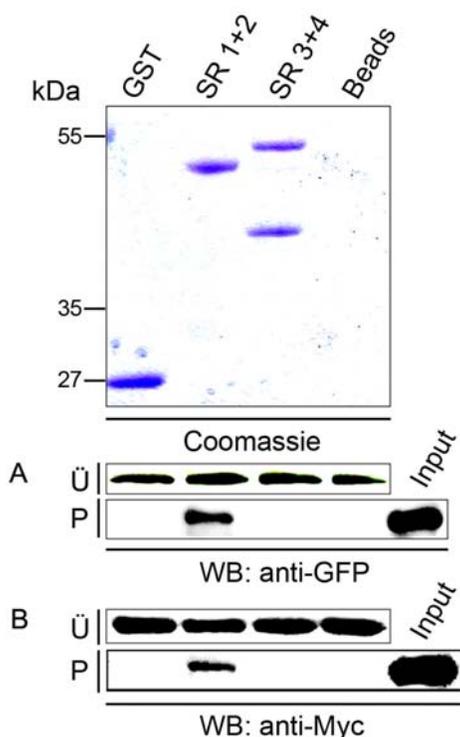


Abb. 3.12: Nesprin-2-SR1+2 interagiert in vitro mit α -E-/N-Catenin. Lysate von COS7 Zellen, die transient Myc-markiertes Volllängen α -E-Catenin bzw. GFP-markiertes Volllängen α -N-Catenin-1 exprimieren, wurden mit GST-Nesprin-2-SR Fusionsproteinen gekoppelt an Glutathion-Agarose inkubiert. GST, Glutathion Agarose (Beads) und Nesprin-2-SR3+4 wurden als Negativkontrollen verwendet. Die GST-Fusionsproteine wurden durch SDS-PAGE (12% Acrylamid) aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blaufärbung visualisiert, um äquivalent eingesetzte Proteinmengen zu überprüfen. Die Überstände und Präzipitate wurden im Westernblot mit GFP- (mAk K3-184-2) bzw. Myc- (mAk 9E10) spezifischen Antikörpern umgesetzt. Nesprin-2-SR1+2 interagiert mit den Volllängenproteinen GFP- α -N-Catenin-1 (A) und Myc- α -E-Catenin (B).

3.3.3 Ektopisch exprimierte Volllängen α -Catenine lokalisieren in COS7 Zellen an der Plasmamembran

COS7 Zellen wurden transient mit dem Volllängenproteinen GFP- α -N-Catenin-1 bzw. Myc- α -E-Catenin transfiziert. In beiden Fällen wurde eine Lokalisation entlang der Kernmembran beobachtet (Sterne in Abb. 3.13A, C), was eine Interaktion mit Nesprin-2 möglich erscheinen lässt.

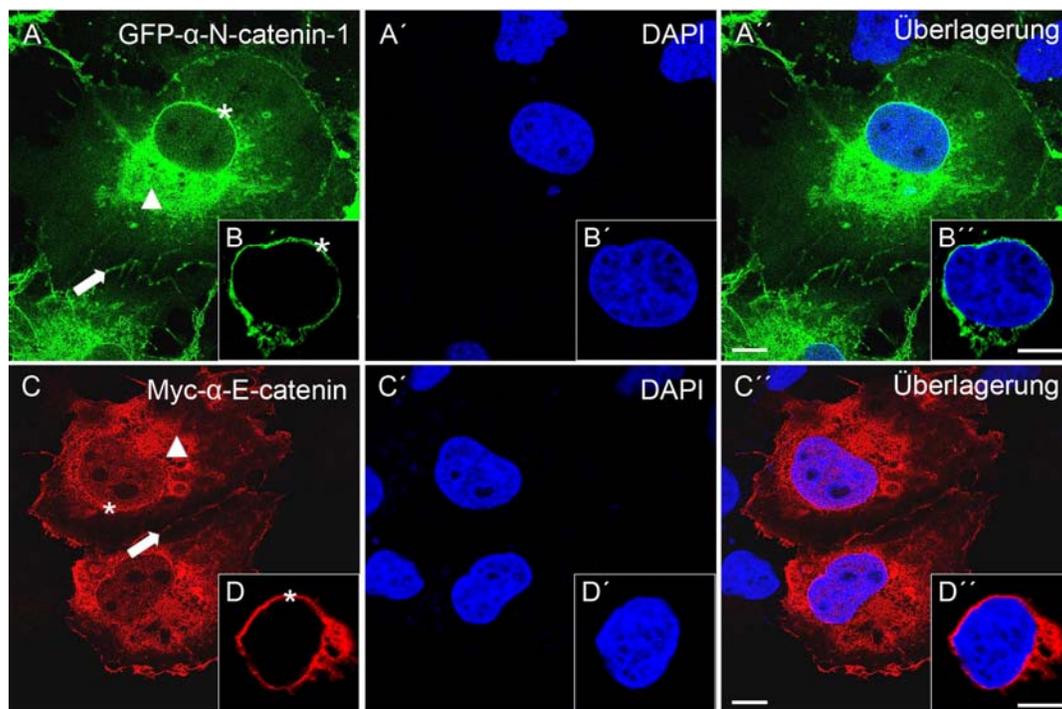


Abb. 3.13: Vollängen GFP- α -N-Catenin-1 und Myc- α -E-Catenin lokalisieren in COS7 Zellen an der Kernmembran. Die jeweiligen Vollängen α -Catenine wurden transient in COS7 Zellen exprimiert. Für die Immunfluoreszenz des Myc-markierten Proteins wurde ein monoklonaler Antikörper (9E10) verwendet. DNA wurde mit DAPI gefärbt. Die Abbildung zeigt jeweils eine Gesamtansicht und eine Kernvergrößerung von GFP- α -Catenin-1 (A - A'' und B - B'') bzw. Myc- α -E-Catenin (C - C'' und D - D'') exprimierenden Zellen. In beiden Fällen kann eine zytoplasmatische Anreicherung (Pfeilkopf in A und C), eine Assoziation mit der Plasmamembran (Pfeil in A und C) und eine Anlagerung entlang der Kernmembran (Stern in A, B, C, D) beobachtet werden. Größenbalken: 10 μ m.

Mit einer statistischen Analyse wurde die Anzahl der COS7 Zellen ermittelt, in denen Vollängen GFP- α -N-Catenin-1 bzw. Myc- α -E-Catenin an der Kernmembran lokalisieren. Vergleichbar zu den Daten, die für die Lokalisation der α -N-Cat*-Fragmente in COS7 erzielt wurden (Abb. 3.9), konnte auch für die Vollängen α -Catenine gezeigt werden, dass sie jeweils zu circa 90% an der Kernmembran lokalisieren (Abb. 3.14).

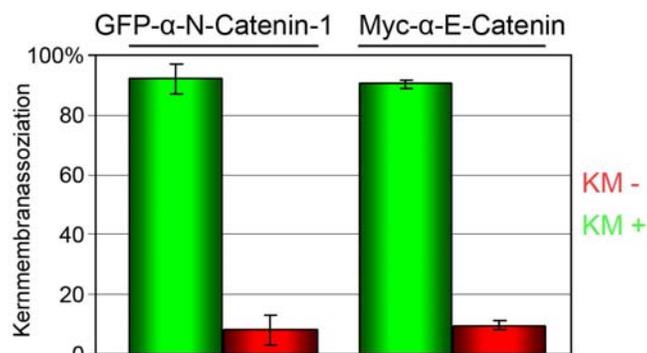


Abb. 3.14: Quantifizierung der Kernmembranassoziation von GFP-α-N-Catenin-1 bzw. Myc-α-E-Catenin in COS7 Zellen. Für die Statistik wurden jeweils 300 Zellen, die transient GFP-α-N-Catenin-1 bzw. Myc-α-E-Catenin exprimieren, analysiert. Zellen, bei denen die zu untersuchenden Fusionsproteine an der Kernmembran lokalisierten, sind mit Hilfe grüner Säulen dargestellt

(KM+), Zellen, bei denen dies nicht zu beobachten war, sind mit roten Säulen dargestellt (KM-). Die Graphen sind jeweils mit Standardabweichungen gezeigt. Beide untersuchten Vollängen α-Catenine lokalisieren zu ca. 90% an der Kernmembran. Abkürzung: KM: Kernmembran.

3.3.4 Nesprin-2 und α-E-Catenin interagieren in vivo

Der Nachweis der Interaktion von Nesprin-2 und α-E-Catenin (Abb. 3.12) ist von großer Bedeutung, da er zeigt, dass es sich nicht um eine gewebsspezifische Interaktion handelt. Im Gegensatz zum neuronenspezifischen α-N-Catenin wird α-E-Catenin ubiquitär exprimiert (Janssens et al., 2001). Um die Bindung von Nesprin-2 an α-E-Catenin in einer in vivo Situation zu prüfen, wurde eine Koimmunpräzipitation durchgeführt. Für diese wurden HaCaT Keratinozyten verwendet. Hierbei handelt es sich um epitheliale, spontan immortalisierte Zellen adulter humaner Haut (Boukamp et al., 1988). Die Zelllinie eignet sich für diese Interaktionsstudien, da bereits in vorherigen Arbeiten gezeigt wurde, dass sie Nesprin-2 exprimieren. Darüber hinaus tendieren die Zellen in der Zellkultur zur Ausbildung eines einschichtigen Zellrasens, bei dem sie untereinander Adhärensverbindungen ausbilden. Im Experiment wurden HaCaT Zellen lysiert und mit dem Nesprin-2 spezifischen polyklonalen Antikörper pAk K1 gekoppelt an Protein-A-Sepharose inkubiert. In diesem Versuch konnte α-E-Catenin koimmunpräzipitiert werden (Abb. 3.15).

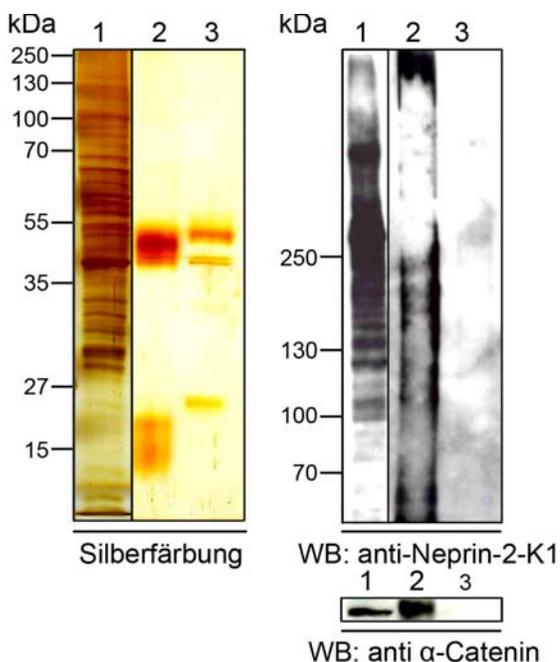


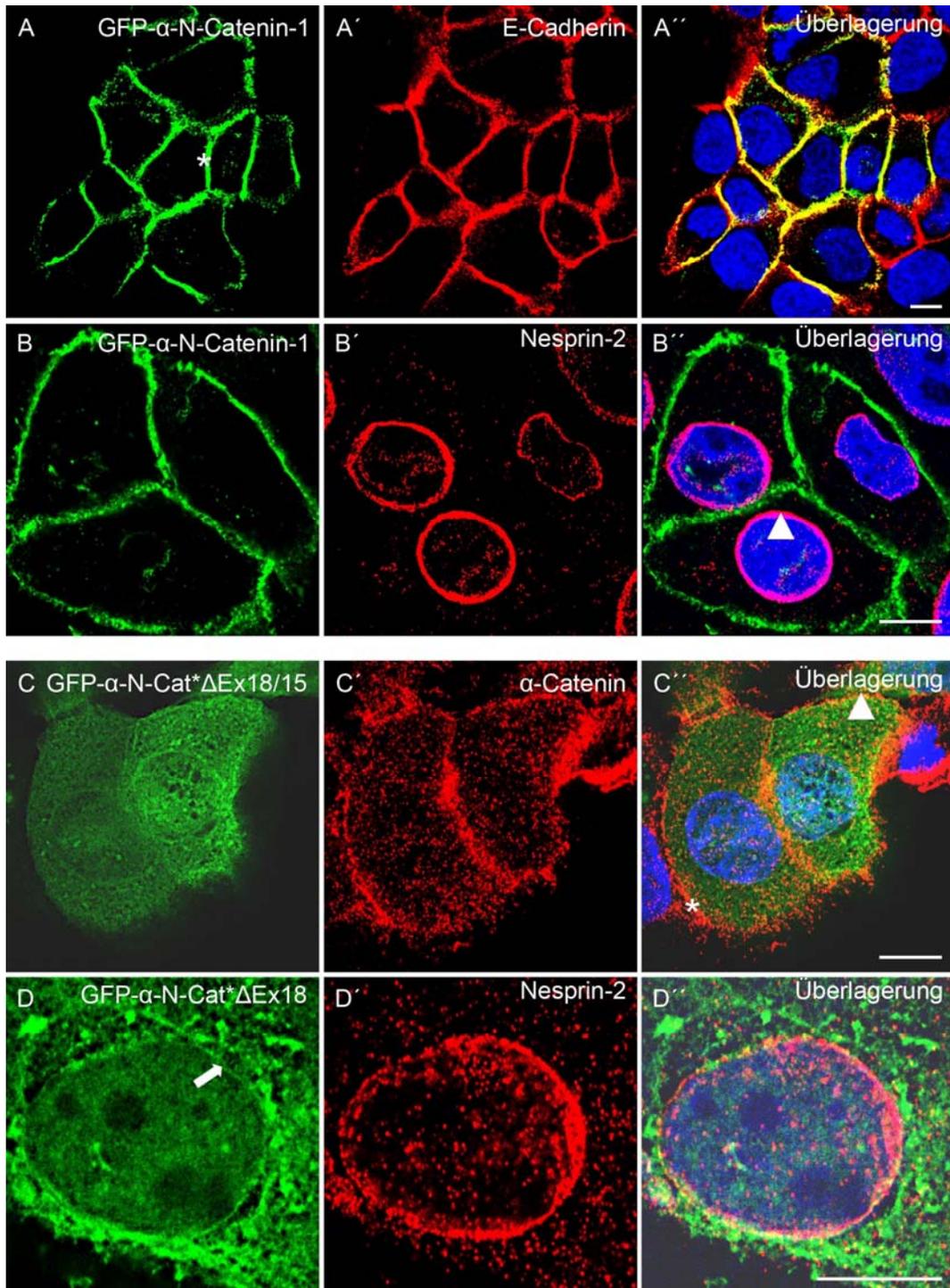
Abb. 3.15: Bestätigung der *in vivo* Nesprin-2 α -Catenin Interaktion. HaCaT Zell-Lysate wurden zusammen mit Protein-A-Sepharose und dem Nesprin-2-spezifischen polyklonalen Antikörper K1 für die Koimmunopräzipitation von α -E-Catenin verwendet. Es sind jeweils die eingesetzten Lysate (1) und die pAk K1-Präzipitate (2) gezeigt. Zur Kontrolle wurde das Experiment parallel mit dem GFP-spezifischen mAk K3-184-2 durchgeführt (3). Die Silberfärbung zeigt, dass vergleichbare Antikörpermengen eingesetzt wurden und im Kontroll-experiment (3) keine Verunreinigungen zu beobachten sind. Eingesetzte Zelllysate und Präzipitate wurden im Westernblot analysiert. Für den Nesprin-2-Nachweis wurde ein 3-15%iges Gradientengel verwendet, wodurch auch die große 800 kDa Bande sichtbar wird. α -Catenin wurde mit einem polyklonalen Antikörper nachgewiesen, der gegen den C-Terminus gerichtet ist.

3.3.5 In Epithelzellen lokalisieren C-terminale α -Catenin Fusionsproteine an der Kernmembran

Mit Ausnahme der Koimmunopräzipitation wurden die bisher gezeigten Bindungsanalysen und Lokalisationsstudien in COS7 Zellen durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie, die 1981 aus Nierengewebe von grünen Meerkatzen (*Ceropithecus aethiops*), einer afrikanischen Affenart, gewonnen wurde. COS7 sind Fibroblasten-ähnliche Zellen, die mit dem SV-40-Virus-T-Antigen stabil transformiert wurden (Gluzman, 1981). α -Catenin ist ein Protein, das besonders für seinen Anteil in der Aufrechterhaltung von Adhärensverbindungen bekannt ist. Adhärensverbindungen werden in der Regel in Epithelzellen beobachtet, wohingegen in Geweben häufig punktförmige Verbindungen gesehen werden. Aus diesem Grund wurden die Lokalisationsstudien auf Epithelzellen ausgeweitet, die zur Ausbildung starker Zell-Zell-Kontakte in der Lage sind. Vollängen α -N-, E-Catenin und α -N-Cat* bzw. dessen Deletionsvarianten wurden transient in HaCaT Zellen (Kapitel 3.3.4) exprimiert und ihre Lokalisation überprüft (Abb. 3.16). Es zeigte sich, dass in diesen Epithelzellen die Vollängenproteine an der Plasmamembran lokalisieren (Stern in Abb. 3.16A), wo sie mit Zell-Zell-Kontaktmarkern wie dem

E-Cadherin kolokalisieren. Eine Akkumulation entlang der Kernmembran konnte nicht beobachtet werden (Pfeilkopf in Abb. 3.16B''). α -N-Cat*-Fragmente hingegen weisen eine zytoplasmatische Anreicherung auf und lokalisieren an der Kernmembran (Pfeil in Abb. 3.16D) und überlagern mit pAk K1. Die Lokalisation an der Plasmamembran ist reduziert (Pfeilkopf in Abb. 3.16C'') oder fehlt völlig (Stern in Abb. 3.16C'').

Abb. 3.16: Vollängen GFP- α -N-Catenin-1 lokalisiert in HaCaT Zellen an der Plasmamembran, α -N-Cat*-Fragmente akkumulieren entlang der Kernmembran (folgende Seite). GFP- α -N-Catenin Fusionsproteine wurden transient in HaCaT Zellen exprimiert. Die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse mit Hilfe eines E-Cadherin spezifischen Antikörpers bestätigt, dass Vollängen GFP- α -N-Catenin-1 an der Plasmamembran lokalisiert (Stern in A). Das einem C-terminalen Sequenzabschnitt von α -N-Catenin entsprechende GFP- α -N-Cat* Δ Ex18/15 Fusionsprotein zeigt nur eine geringe (Pfeilkopf in C'') oder keine (Stern in C') Lokalisation entlang der Plasmamembran. Als Plasmamembranmarker wurde α -Catenin mit einem polyklonalem Antikörper nachgewiesen (C'). Die indirekte Immunfluoreszenz mit dem Nesprin-2 spezifischen pAk K1 (B', D') zeigt, dass für das Vollängen GFP- α -N-Catenin-1 keine (Pfeilkopf in B''), dafür aber für GFP- α -N-Cat* Δ Ex18 (Pfeil in D), eine Lokalisation entlang der Kernmembran nachgewiesen werden kann. Größenbalken: 10 μ m.



Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Analysen wurden statistisch ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass C-terminale α -N-Cat*-Konstrukte in 2% (GFP- α -N-Cat* Δ Ex18/15) bis 11,75% der Zellen (GFP- α -N-Cat* Δ Ex18) entlang der Kernmembran lokalisieren (Abb. 3.17). Die Kontrollen (leerer GFP-Vektor

bzw. endogenes Myc) zeigten genau wie die Volllängenproteine von α -E-/N-Catenin keine Signale entlang der Kernmembran.

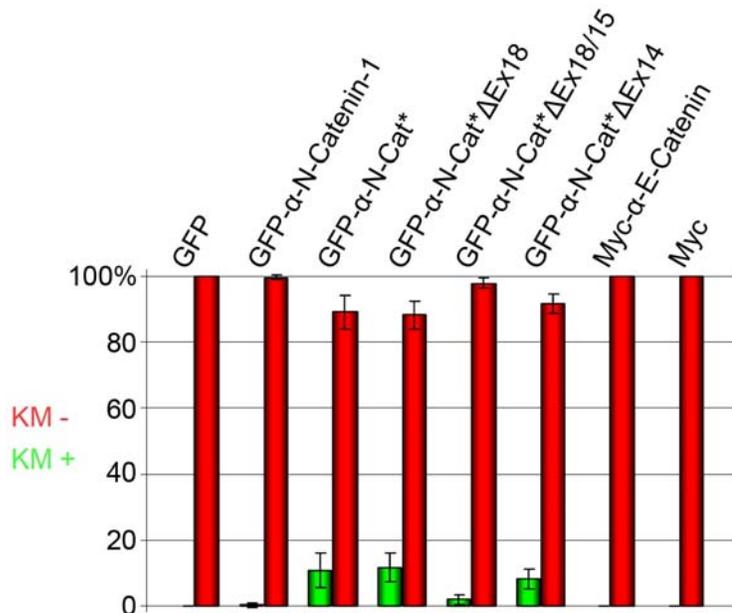


Abb. 3.17: Quantifizierung der Kernmembranassoziation von α -Catenin Fusionsproteinen. In HaCaT Zellen wurden transient Myc- bzw. GFP-markierte Fusionsproteine exprimiert. Es wurden je 300 bis 400 Zellen ausgewertet. Die Mittelwerte der Auszählungen sind als Balken dargestellt. Rote Balken zeigen an, dass es zu keiner Akkumulation an der Kernmembran kam (KM-), grüne Balken bedeuten eine Assoziation entlang der Kernmembran (KM+). Standardabweichungen

sind gezeigt. Negativkontrollen waren GFP oder endogenes Myc. Es zeigte sich, dass nur C-terminale α -N-Cat*-Fragmente in geringem Ausmaß zu einer Lokalisation entlang der Kernmembran befähigt sind.

Hier kann ein grundlegender Unterschied in der Lokalisation von α -Catenin Fusionsproteinen zwischen Zellen, die geringe Zell-Zell-Kontakte ausbilden (COS7 Zellen, Abb. 3.8, Abb. 3.13) und solchen, die feste Kontakte untereinander ausbilden (HaCaT Zellen, Abb. 3.16) festgestellt werden. In COS7 Zellen sind sowohl Volllängen-, als auch Deletionsvarianten an der Zellkernhülle nachweisbar. In HaCaT Zellen lokalisieren nur C-terminale Varianten an der Kernmembran. Daraus lässt sich postulieren, dass α -Catenin in Epithelzellen durch Interaktionen, die nicht am C-Terminus stattfinden, an der Plasmamembran gehalten wird. Der relativ geringe Anteil an Zellen, in denen C-terminale Polypeptide an der Kernhülle nachweisbar sind, lässt außerdem vermuten, dass zusätzliche Interaktionen am C-Terminus von α -Catenin eine Anreicherung an der Kernhülle verhindern. Es besteht die Möglichkeit, dass die Interaktion von Nesprin-2 zu α -Catenin stark reguliert ist und möglicherweise nur während bestimmter Phasen im Leben einer Zelle stattfindet. Das könnte ein Grund dafür sein, dass die Interaktion der Proteine und speziell die Lokalisation von α -Catenin entlang der Kernhülle bisher noch nicht beschrieben wurde.

3.3.6 Die Lokalisation C-terminaler α -N-Catenin Proteine an der Kernmembran von Epithelzellen ist nicht zelltypspezifisch

Zur Beantwortung der Frage, ob die in COS7 und HaCaT Zellen beobachteten Verteilungsmuster zelltypspezifisch sind, wurden α -Catenin Fusionsproteine in HeLa und MDCK-2 Zellen exprimiert. HeLa Zellen sind eine humane Zelllinie, die dem Zervixkarzinom (Gebärmutterhalskrebs) von **Henrietta Lacks** (1951, Baltimore) entnommen wurden. Die verwendeten Zellen weisen eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie auf, und haben eine geringe Tendenz zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten. MDCK-2 Zellen (**Madin-Darby Canine Kidney**) sind Epithelzellen aus der Hundeniere. Diese Linie wurde 1958 von S. H. **Madin** und N. B. **Darby** etabliert. Die Zellen bilden wie HaCaT Zellen Zell-Zell-Kontakte aus. Myc-markiertes Vollängen α -E-Catenin zeigt in HeLa Zellen eine Akkumulation entlang der Kernmembran (Stern in Abb. 3.18A). In MDCK-2 Zellen lokalisiert GFP-markiertes Vollängen α -N-Catenin entlang der Plasmamembran, nicht aber am Zellkern (Pfeilkopf in Abb. 3.18B). α -N-Cat* lokalisiert dagegen an der Kernmembran (Pfeil in Abb. 3.18C). Damit konnten die für COS7 und HaCaT Zellen gezeigten Verteilungsmuster bestätigt werden.

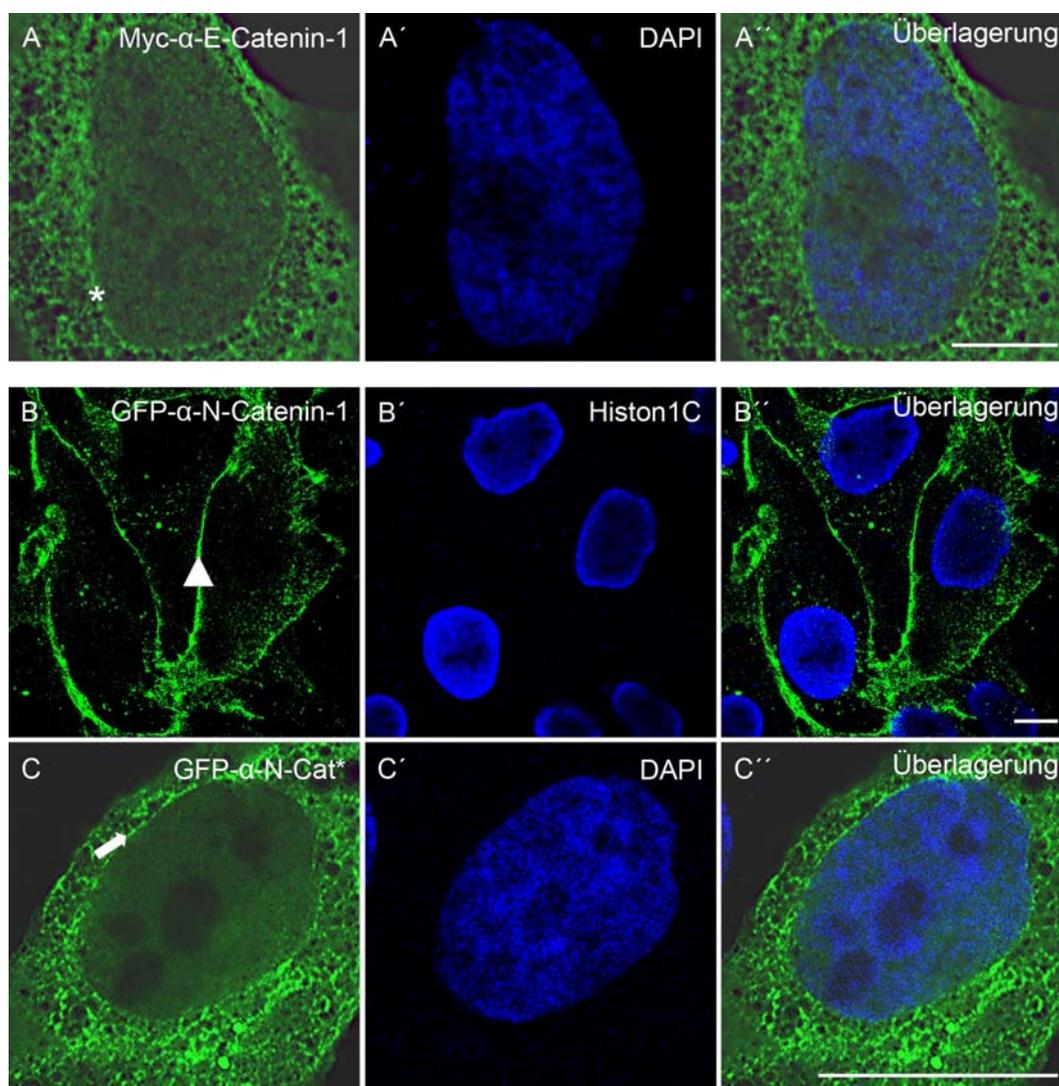


Abb. 3.18: Verteilung **ektopisch exprimierter α -N-Catenin Fusionsproteine in HeLa und MDCK-2 Zellen.** (A-A'') In HeLa Zellen kann eine gleichmäßige Anlagerung von Myc-markierten Vollängen α -E-Catenin entlang der Kernmembran beobachtet (Stern in A). (B-B'') In MDCK-2 Zellen zeigt GFP-markiertes Vollängen α -N-Catenin-1 ausschließlich eine Lokalisation an der Plasmamembran (Pfeilkopf in B). (C-C'') α -N-Cat* akkumuliert an der Kernmembran (Pfeil in C). Färbung der Kerne mit DAPI (A', C') bzw. Histon1C (B'). Größenbalken: 10 μ m.

3.4 Nesprin-2-SR lokalisiert an der Plasmamembran

In den vorausgegangenen Analysen ist eine Interaktion von Nesprin-2-SR mit verschiedenen α -Cateninen mit proteinbiochemischen und zellbiologischen Methoden nachgewiesen worden, wobei wir beobachtet haben, dass ektopisch exprimierte α -Catenin-Fusionsproteine sowohl an der Plasmamembran als auch an der Kernmembran lokalisieren (Abb. 3.16). Zum Nachweis, ob das KASH-

Domänen defiziente Nesprin-2-SR neben seiner Lokalisation entlang der Kernmembran (Stern in Abb. 3.2A, B), auch an der Plasmamembran nachgewiesen werden kann, wurde in MDCK-2 Zellen Myc-markiertes Nesprin-2-SR exprimiert. In der Immunfluoreszenz-Analyse wurde eine Lokalisation an der Plasmamembran (Pfeilkopf in Abb. 3.19A) und eine Kolo­kalisierung mit dem plasmamembranständigen α -Catenin sowie eine Kernmembranfärbung beobachtet (Pfeil in Abb. 3.19A). Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz wurden mit einer statistischen Auswertung unterstützt, die zeigt, dass sich die Lokalisation an der Kern- bzw. Plasmamembran nicht gegenseitig ausschließen (Abb. 3.19B).

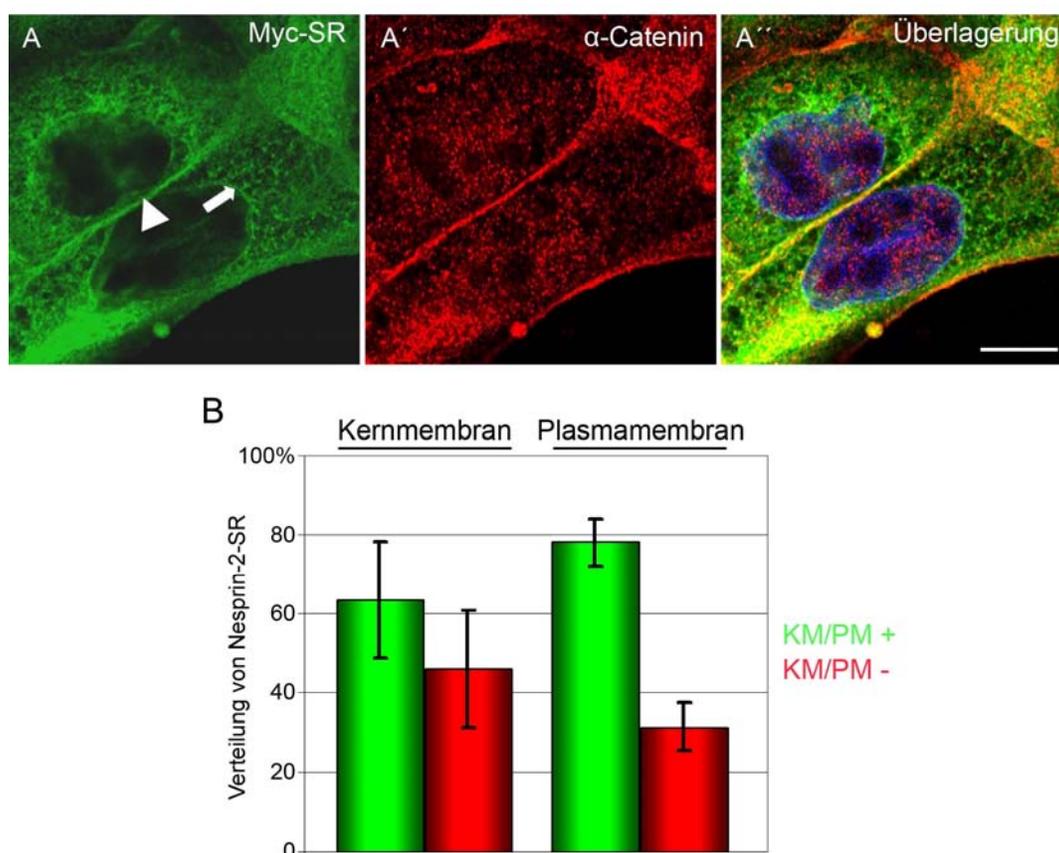


Abb. 3.19: Nesprin-2-SR lokalisiert in MDCK-2 Zellen an der Kernhülle und entlang der Plasmamembran. (A-A'') In MDCK-2 Zellen wurde transient Myc-markiertes Nesprin-2-SR exprimiert. Für die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse wurden der Myc-spezifische mAk 9E10 und ein polyklonaler α -Catenin-Antikörper verwendet. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. Das Fusionsprotein ist an der Plasma- (Pfeilkopf in A) und Zellkernmembran (Pfeil in A) nachweisbar. Größenbalken: 10 μ m. **(B)** Für die statistische Analyse wurde für jede Zelle geprüft, ob Nesprin-2-SR an der Plasmamembran bzw. an der Kernmembran lokalisiert (grüne Balken KM/PM+). Rote Balken (KM/PM-) deuten an, dass in dem jeweilig untersuchten Kompartiment keine Anreicherung beobachtet werden konnte. Es wurden jeweils 300 Zellen analysiert. Nesprin-2-SR lokalisiert an der Plasma- und Kernmembran, wobei sich die Lokalisationen nicht gegenseitig ausschließen.

3.5 Analyse der Verteilung von endogenem Nesprin-2 und α -Catenin

Die bisher gezeigten Lokalisationsstudien wurden mit ektopisch exprimierten Fusionsproteinen durchgeführt. Im Folgenden wurden die Verteilungsmuster der endogenen Proteine untersucht.

3.5.1 In der menschlichen Haut lokalisiert Nesprin-2 an der Kern- und α -Catenin an der Plasmamembran

Die Lokalisation der endogenen Proteine wurde zunächst mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz-Analysen an humaner Haut untersucht. Die hierfür verwendeten Hautschnitte wurden von Dr. med. Sabine A. Eming, Klinik für Dermatologie der Universität zu Köln, zur Verfügung gestellt. Es wurden die Nesprin-2-spezifischen Antikörper pAk K1 und mAk K20-478 verwendet. Das Epitop der polyklonalen Antikörper K1 liegt im C-terminalen Bereich von Nesprin-2 giant, wodurch sowohl die große als auch verschiedene kleinere C-terminale Isoformen detektiert werden können. Die N-terminal gelegene Aktinbindungsdomäne bildet das Epitop des monoklonalen Antikörpers K20-478, durch den in erster Linie die Nesprin-2 giant Isoform erkannt wird (Abb. 3.20A). Beide Nesprin-2-Antikörper zeigen in humaner Haut eine Färbung der Kernhülle (Abb. 3.20, für pAk K1 Pfeilkopf in A, B und für K20-478 Stern in C', D'), nicht jedoch der Plasmamembran (Abb. 3.20, für K1 Überlagerung in A'', B'' und für K20-478 Überlagerung in C'', D''). Polyklonale α -Catenin Antikörper, die gegen die C-terminal gelegenen Aminosäuren 890-901 gerichtet sind, zeigen ausschließlich eine Färbung der Plasmamembran (Abb. 3.20, Pfeil in C, D), nicht jedoch der Kernhülle (Abb. 3.20, Überlagerung in C'', D'').

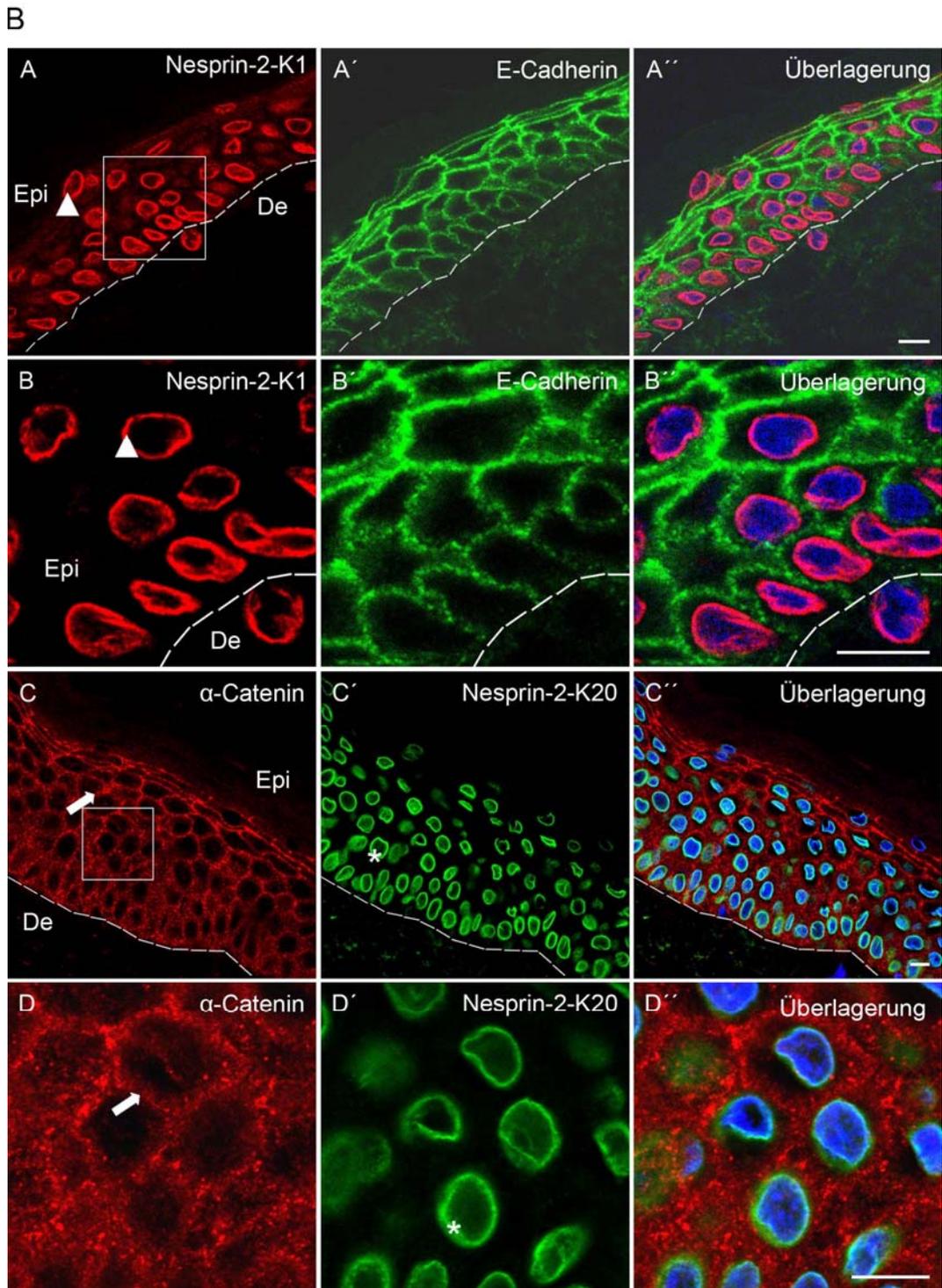


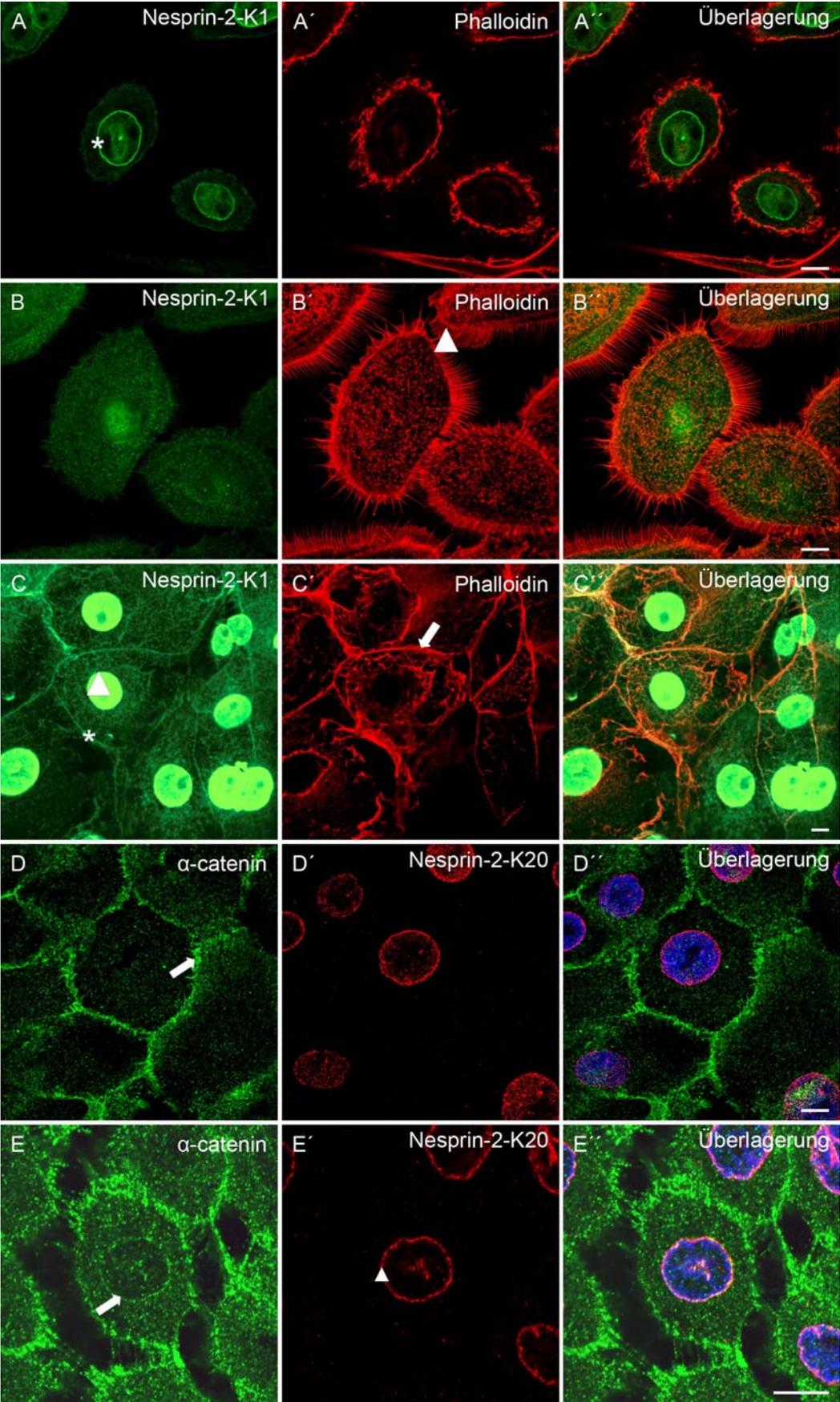
Abb. 3.20 In humaner Haut lokalisiert Nesprin-2 an der Kernhülle und α -Catenin an der Plasmamembran (vorherige Seite). Schnitte humaner Haut wurden mit den Nesprin-2-spezifischen Antikörpern, pAk K1 und mAk K20-478 gefärbt. **(A)** Übersicht über die Lage der Epitope, die von den Antikörpern erkannt werden. pAk K1 kann die große und verschiedene kleinere Isoformen erkennen. mAk K20-478 erkennt primär die große Nesprin-2 giant Isoform. **(B)** Die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse zeigt, dass Nesprin-2 in der Epidermis ausschließlich an der Kernhülle lokalisiert ist (Für K1 Pfeilkopf in A, B, für K20-478 Stern in C', D'). Für Abbildung B und D wurden die in A und C markierten Bereiche vergrößert aufgenommen. Die Färbung der Zell-Zell-Kontakte mit Hilfe eines E-Cadherin- (A', B') bzw. α -Catenin- (C, D) spezifischen Antikörpers zeigt, dass eine Lokalisation an der Plasmamembran für Nesprin-2 nicht nachweisbar ist (Für K1 A'', B'', für K20-478 C'', D''). Die Färbung von α -Catenin mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers zeigt, dass in der Epidermis humaner Haut eine Lokalisation entlang der Plasmamembran (Pfeil in C, D), nicht aber der Kernhülle (C'', D'') beobachtet werden kann. Färbung der Kerne mit DAPI. Die Grenze zwischen Epidermis und Dermis ist als gestrichelte Linie dargestellt. Größenbalken: 10 μ m. Abkürzungen: Epi: Epidermis, De: Dermis.

3.5.2 Nesprin-2 und α -Catenin lokalisieren in primären humanen Keratinozyten an der Plasma- und Kernmembran

Zusätzlich zu den Analysen der Hautschnitte wurden primäre humane Keratinozyten in der indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Die hierbei verwendeten Zellen wurden von Nils Buchstein (Arbeitsgruppe Dr. med. Sabine A. Eming, Klinik für Dermatologie der Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in parallelen Ansätzen unter verschiedenen Kalziumkonzentrationen untersucht. Kalzium ist für die Ausbildung von Adhärensverbindungen essentiell. Die Zellen wurden vor der Fixierung zunächst 24 Stunden bei niedriger (50 μ M Ca^{2+}) bzw. hoher Kalziumkonzentration (120 mM Ca^{2+}) in Kultur gehalten. Die Färbung mit Hilfe des Nesprin-2-spezifischen pAk K1 zeigt unter Kalziumreduktion eine Lokalisation entlang der Kernhülle (Stern in Abb. 3.21A). Phalloidin wurde zur Darstellung der Zellmorphologie verwendet und verdeutlicht, dass die Zell-Zell-Kontakte aufgelöst sind (Pfeilkopf in Abb. 3.21B). In Zellen, die durch die Zugabe von Kalzium zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten in der Lage sind, akkumuliert Nesprin-2 an der Kernmembran (Pfeilkopf in Abb. 3.21C) und entlang der Plasmamembran (Stern in Abb. 3.21C). α -Catenin zeigt bei hoher Kalziumkonzentration eine Anreicherung an der Plasmamembran (Pfeil in Abb. 3.21D). In Zellen, die bedingt durch die Reduktion von Kalzium keine Zell-Zell-Kontakte mehr bilden, kann in einer geringen Anzahl von Zellen eine gleichmäßige Akkumulation des endogenen Proteins entlang der Kernmembran beobachtet werden (Pfeil in Abb. 3.21E). Damit bestätigt sich, dass

Interaktionen an der Plasmamembran, die an der Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt sind, verhindern, dass α -Catenin an den Kern gelangt.

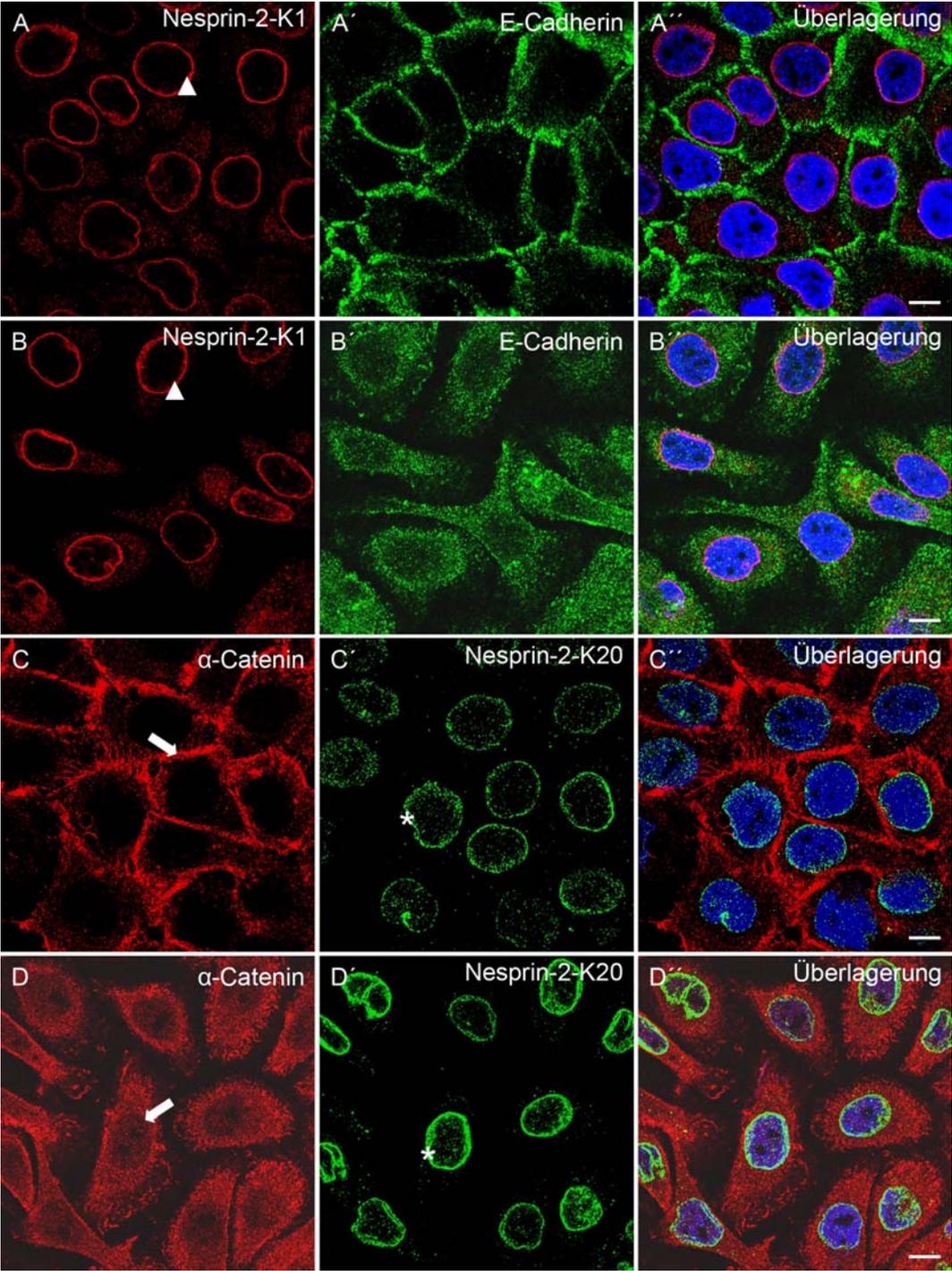
Abb. 3.21: In primären humanen Keratinozyten lokalisieren endogenes Nesprin-2 und α -Catenin an der Kern- und Plasmamembran (folgende Seite). Primäre humane Keratinozyten wurden vor der Fixierung für 24 Stunden bei niedriger (A, B, E) bzw. hoher Kalziumkonzentration (C, D) in Kultur gehalten. Die Reduktion von Kalzium verhindert die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten. Nesprin-2 wurde mit Hilfe von pAk K1 dargestellt. Phalloidin wurde zur Kennzeichnung der Zellmorphologie verwendet. Bei den unter A und B gezeigten Aufnahmen handelt es sich um die selben Zellen, die in verschiedenen Ebenen dokumentiert wurden. Unter niedrigen Kalziumbedingungen kann eine Lokalisation von Nesprin-2 an der Kernhülle nachgewiesen werden (Stern in A). Die Aufnahme auf der Ebene des Phalloidin zeigt, dass die Zellen untereinander nicht in Kontakt stehen (Pfeilkopf in B'). Unter hohen Kalziumbedingungen kommt es zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten (Pfeil in C'). Nesprin-2 lokalisiert unter diesen Bedingungen an der Plasmamembran (Stern in C) und am Zellkern. Das Nesprin-2 Signal am Zellkern ist verglichen mit dem an der Plasmamembran wesentlich stärker und überstrahlt in dieser Aufnahme (Pfeilkopf in C). In Anwesenheit von Kalzium lokalisiert α -Catenin an der Plasmamembran (Pfeil in D). Bei niedriger Kalziumkonzentration kann endogenes α -Catenin in einigen Zellen entlang der Kernmembran nachgewiesen werden, wo es mit Nesprin-2 (mAk K20-478, Pfeilkopf in E') kolokalisiert. Färbung der Kerne mit DAPI. Größenbalken: 10 μ m.



3.5.3 Lokalisation von Nesprin-2 und α -Catenin in HaCaT Zellen

Um zu prüfen, ob die für primäre humane Keratinozyten gezeigten ungewöhnlichen Lokalisationen von Nesprin-2 an der Plasmamembran und von α -Catenin an der Kernmembran in einer Zelllinie nachvollzogen werden können, wurden HaCaT Zellen in Medium mit hohen bzw. niedrigen Kalziumbedingungen in Kultur gehalten. Nesprin-2 lokalisiert sowohl bei hohen (Pfeilkopf in Abb. 3.22A) als auch bei niedrigen Kalziumkonzentrationen (Pfeilkopf in Abb. 3.22B) unverändert an der Kernhülle. Die Kontrollfärbung mit E-Cadherin (Abb. 3.22A') schließt eine Lokalisation an der Plasmamembran aus (Abb. 3.22A''). α -Catenin lokalisiert in HaCaT Zellen in Anwesenheit von Kalzium entlang der Plasmamembran (Pfeil in Abb. 3.22C). Die Immunfärbung der Kernmembran mit mAk K20-478 unterstreicht, dass auch die große Nesprin-2 giant Isoform an der Kernhülle (Stern in Abb. 3.22C', D'), nicht aber an der Plasmamembran (Abb. 3.22C'') nachweisbar ist. Darüber hinaus zeigt dieser Versuch, dass α -Catenin in Anwesenheit von hohen Kalziumkonzentrationen nicht an der Kernmembran nachweisbar ist (Abb. 3.22C''). Auch der Entzug von Kalzium führt nicht zu einer Umlagerung von α -Catenin an die Kernmembran (Pfeil in Abb. 3.22D). Daraus schließen wir, dass es sich bei den in primären humanen Keratinozyten beobachteten ungewöhnlichen Lokalisationen von Nesprin-2 an der Plasmamembran und α -Catenin an der Kernhülle (Abb. 3.21) um zelltypspezifische Verteilungsmuster handelt, die nicht zwischen primären humanen Keratinozyten und einer immortalisierten Zelllinie übertragbar sind.

Abb. 3.22: In HaCaT Zellen lokalisiert endogenes Nesprin-2 an der Kernmembran und α -Catenin an der Plasmamembran (folgende Seite). HaCaT Zellen wurden über Nacht in Medium mit Kalzium (A, C) bzw. unter Kalziumentzug (B, D) in Kultur gehalten. Die Abwesenheit von Kalzium verhindert die Ausbildung von Adhärensverbindungen. Für die Immunfärbung von Nesprin-2 wurden pAk K1 und mAk K20-478 verwendet. In beiden Fällen kann Nesprin-2 an der Kernhülle nachgewiesen werden (für pAk K1 Pfeilkopf in A, B, für mAk K20-478 Stern in C', D'). Eine Kolo­kalisierung mit den membranständigen Proteinen E-Cadherin (A') und α -Catenin (C) entlang von Adhärensverbindungen kann nicht beobachtet werden (für pAk K1 A'', für mAk K20-478 C''). α -Catenin lokalisiert in Anwesenheit von Kalzium an der Plasmamembran (Pfeil in C). Der Entzug von Kalzium bedingt die Auflösung der Plasmamembranassoziation (D). Eine Lokalisation von α -Catenin an der Kernmembran kann weder in An- (C''), noch in Abwesenheit (Pfeil in D) von Kalzium nachgewiesen werden. Färbung der Kerne mit DAPI. Größenbalken: 10 μ m.



3.5.4 Lokalisation von Nesprin-2 während der Wundheilung in menschlicher Haut

In der gesunden menschlichen Haut ist Nesprin-2 ausschließlich an der Kernhülle nachweisbar (Abb. 3.20). In primären humanen Keratinozyten hingegen lokalisiert das Protein zusätzlich an der Plasmamembran (Abb. 3.21). In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden N-terminale Isoformen von Nesprin-2 bei Wundheilungsexperimenten in COS7 Zellen an der Spitze der Führungslamelle migrierender Zellen nachgewiesen (Zhen et al., 2002, Libotte, 2004). Aus diesem Grund wurde die subzelluläre Lokalisation von Nesprin-2 in der menschlichen Wunde untersucht (Abb. 3.23).

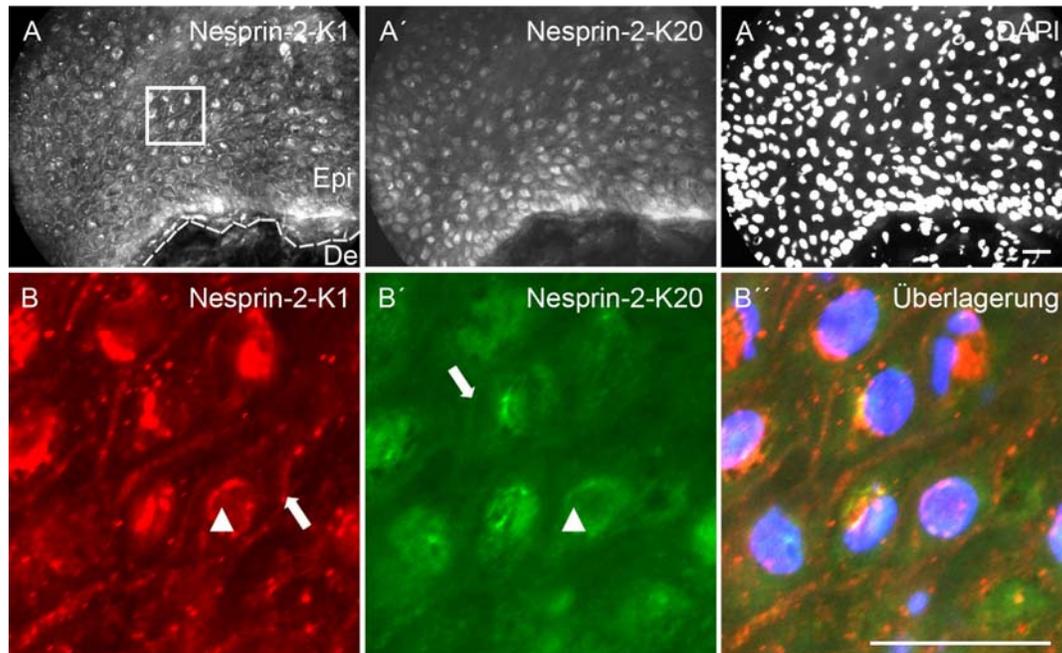


Abb. 3.23: Nesprin-2 lokalisiert in der menschlichen Wunde an der Plasmamembran. Die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse wurde mit pAk K1 und mAk K20-478 durchgeführt. Der in A eingerahmte Bereich ist in B vergrößert dargestellt. Beide Antikörper zeigen eine Färbung der Kernhülle und der Plasmamembran. Die Trennlinie zwischen Dermis und Epidermis ist als gestrichelte Linie dargestellt. Färbung der Kerne mit DAPI. Größenbalken: 20 μ m. Abkürzungen: Epi: Epidermis, De: Dermis.

Erste Untersuchungen menschlicher Wunden weisen für pAk K1 und mAk K20-478 Signale am Zellkern (Pfeilkopf in Abb. 3.23B, B') und an der Plasmamembran (Pfeil in Abb. 3.23B, B') auf. Die intensivere Immunfärbung durch pAk K1 könnte anzeigen, dass dort C-terminale Nesprin-2 Isoformen lokalisieren. Die Daten der menschlichen Haut und der primären humanen

Keratinocyten demonstrieren, dass die Nesprin-2 Lokalisation an der Plasmamembran nicht permanent vorhanden ist, sondern durch Faktoren wie den Differenzierungsstatus der Zellen bzw. deren Dynamik in der Migration reguliert wird.

3.5.5 In der Entwicklung muriner Haut ist α -Catenin nicht an der Kernhülle nachweisbar

Die Untersuchung menschlicher Haut zeigt, dass α -Catenin an der Plasmamembran lokalisiert (Pfeil in Abb. 3.20D). Eine Lokalisation an der Kernmembran kann nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.20D''). In primären humanen Keratinocyten lokalisiert α -Catenin an der Plasmamembran (Pfeil in Abb. 3.21D). Zusätzlich kann unter Kalziumentzug in einigen Zellen eine gleichmäßige Lokalisation des endogenen Proteins entlang der Plasmamembran nachgewiesen werden (Pfeil in 3.21D). α -Catenin wurde in der Literatur bisher nicht in Verbindung mit der Kernmembran gebracht. Im Folgenden wurde weiter geprüft, unter welchen Bedingungen das endogene Protein an der Kernhülle nachweisbar ist. Hierfür wurde murine Haut aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien präpariert.

Die Haut besteht aus drei Bereichen, der Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Dermis) und Unterhaut (Subcutis). Im Laufe der epidermalen Entwicklung kommt es zunächst zur Ausbildung einer einschichtigen Epidermis. Die Zellteilung erfolgt größtenteils lateral. Im Zuge der Stratifizierung nimmt die perpendikulare Zellteilung zu. Lechler und Fuchs konnten zeigen, dass in der embryonalen Entwicklung der Maus am Entwicklungstag 12.5 die Zellteilung in erster Linie lateral und am Entwicklungstag 18.5 hauptsächlich perpendikular verläuft (Lechler & Fuchs, 2005). Um zu prüfen, ob α -Catenin im Zuge der Umlagerung der Polarität von der lateralen hin zur perpendikularen Zellteilung an der Kernmembran lokalisiert, wurden Gefrierschnitte muriner Haut am embryonalen Entwicklungstag 12, 16 und von adulten Tieren untersucht (Abb. 3.24). In den oberen epidermalen Schichten muriner Haut lokalisiert α -Catenin an der Plasmamembran (Stern in Abb. 3.24A). Zellen der enggestaffelten teilungsfähigen Basalzellschicht weisen einen relativ geringen zytoplasmatischen Anteil auf, so dass eine Unterscheidung zwischen Plasma- und

Kernmembranassoziation schwierig ist. An Stellen, an denen eine Lücke zwischen Plasmamembran und Kernhülle zu erkennen ist, wird deutlich, dass α -Catenin nicht an der Kernhülle lokalisiert (Pfeil in Abb. 3.24A). Am Entwicklungstag 16 ist die Epidermis mehrschichtig. α -Catenin lokalisiert sowohl in basal- (Pfeil in Abb. 3.24B) als auch in suprabasal gelegenen Zellen (Stern in Abb. 3.24B) an der Plasmamembran. Eine Lokalisation an der Kernmembran konnte nicht festgestellt werden (Abb. 3.24A''). Am Entwicklungstag 12 ist die Epidermis größtenteils einschichtig. Der zytoplasmatische Anteil in diesen Zellen ist sehr gering. Teilweise sind jedoch Lücken zwischen der Kernfärbung (Abb. 3.24C') und der plasmamembranständigen Färbung (Pfeil in Abb. 3.24C) von α -Catenin zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass das Protein nicht entlang der Kernmembran akkumuliert (Abb. 3.24C'').

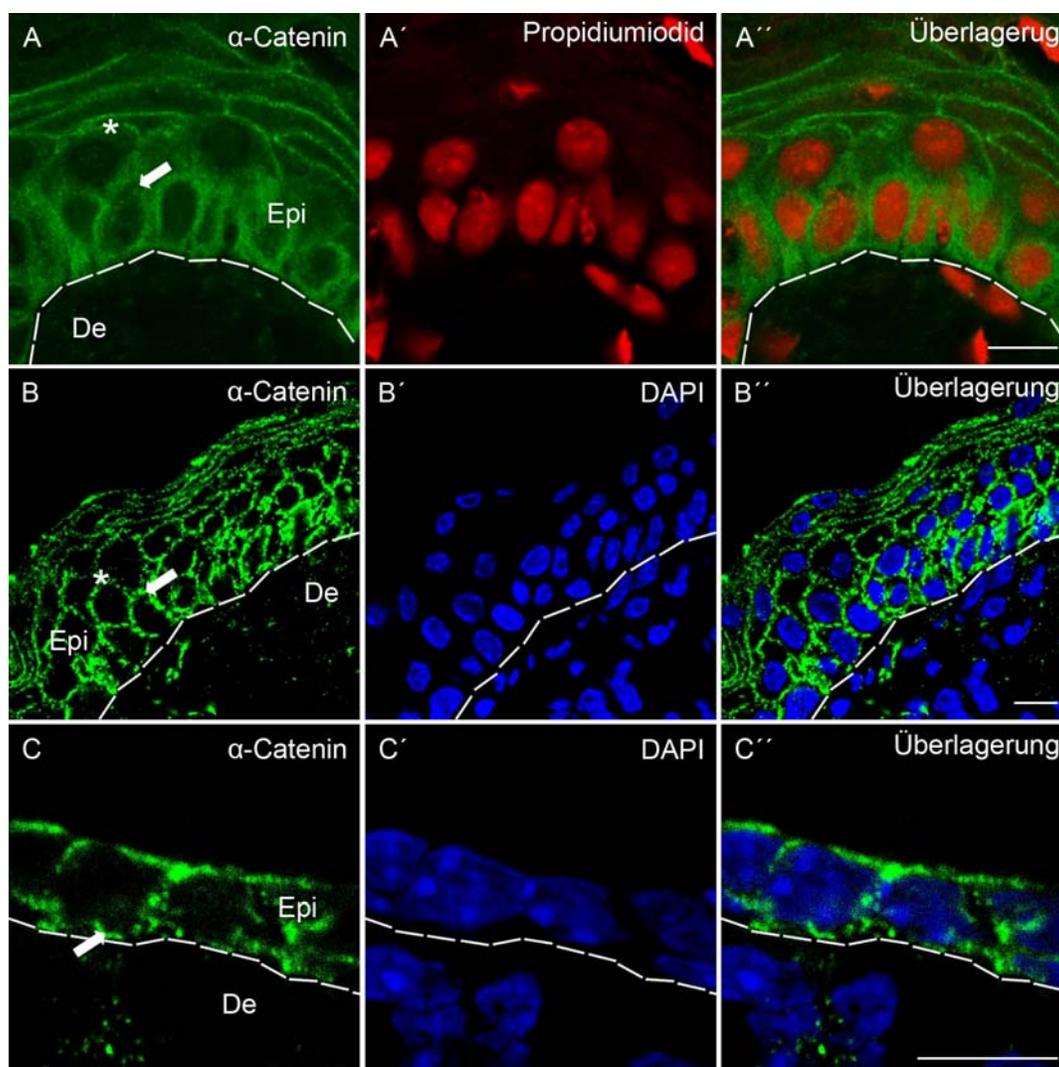


Abb. 3.24: In der Maus lokalisiert α -Catenin bei der Entwicklung epidermaler Hautschichten nicht an der Kernhülle. Murine Haut wurde von verschiedenen embryonalen Entwicklungsstadien präpariert. Für die subzelluläre Lokalisation von α -Catenin wurden polyklonale Primärantikörper verwendet. **(A-A'')** In der adulten Haut lokalisiert das Protein sowohl in der teilungsfähigen Basalzellschicht (Pfeil in A), als auch in suprabasalen Zellen (Stern in A) an der Plasmamembran. **(B-B'')** Am Entwicklungstag 16 kann das gleiche Verteilungsmuster (Pfeil für Basalzellschicht, Stern für suprabasale Zellen) nachgewiesen werden. **(C-C'')** Am Entwicklungstag 12 liegt die Epidermis zum größten Teil einschichtig vor. α -Catenin lokalisiert an der Plasmamembran (Pfeil in C). Eine Lokalisation an der Kernmembran kann nicht beobachtet werden (C''). Die Grenze zwischen Epidermis und Dermis ist als gestrichelte Linie dargestellt. Größenbalken: 10 μ m. Abkürzungen: Epi: Epidermis, De: Dermis.

3.5.6 In migrierenden MDCK-2 Zellen lokalisiert α -Catenin nicht an der Kernmembran

Um zu prüfen, ob α -Catenin während der Migration von Zellen an die Kernhülle umgelagert wird, wurden MDCK-2 Zellen mit HGF (hepatocyte growth factor, auch scatter factor genannt) behandelt. HGF ist ein Wachstumsfaktor, der unter anderem einen starken Einfluss auf die Motilität, Morphologie und Zell-Zell-Kontakte von Epithelzellen hat (Stoker & Gherardi, 1989). MDCK-2 Zellen wurden für 24 Stunden mit HGF behandelt und zunächst mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops untersucht (Abb. 3.25A, B). Die Morphologie zeigt, dass die Zellen auf den Wachstumsfaktor ansprechen. Unbehandelte Zellen weisen eine für Epithelzellen typische Anordnung in Kolonien auf (Abb. 3.25A). In Zellen, die mit HGF behandelt wurden, sind die Zell-Zell-Kontakte aufgelöst, was ein Hinweis für die gesteigerte Migration ist (Abb. 3.25B). Die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse zeigt, dass α -Catenin in unbehandelten Zellen an der Plasmamembran lokalisiert (Pfeil Abb. 3.25C, D). Eine Anlagerung an den Zellkern, der durch einen Histon1C-spezifischen Antikörper gefärbt wurde (Abb. 3.25C', D'), kann nicht beobachtet werden (Abb. 3.25C'', D''). HGF bewirkt die Auflösung von Zell-Zell-Kontakten, was auch zu einem Verlust von α -Catenin an der Plasmamembran führt (Pfeil in Abb. 3.25E, F). Die Markierung der Kerne durch Histon1C (Abb. 3.25E', F') zeigt, dass auch in migrierenden Zellen keine Umlagerung von α -Catenin an die Plasmamembran stattfindet (Abb. 3.25E'', F''). Es kann lediglich eine gesteigerte Tendenz zur zytoplasmatischen, kernnahen Aggregatbildung beobachtet werden (Pfeilkopf in Abb. 3.25E, F).

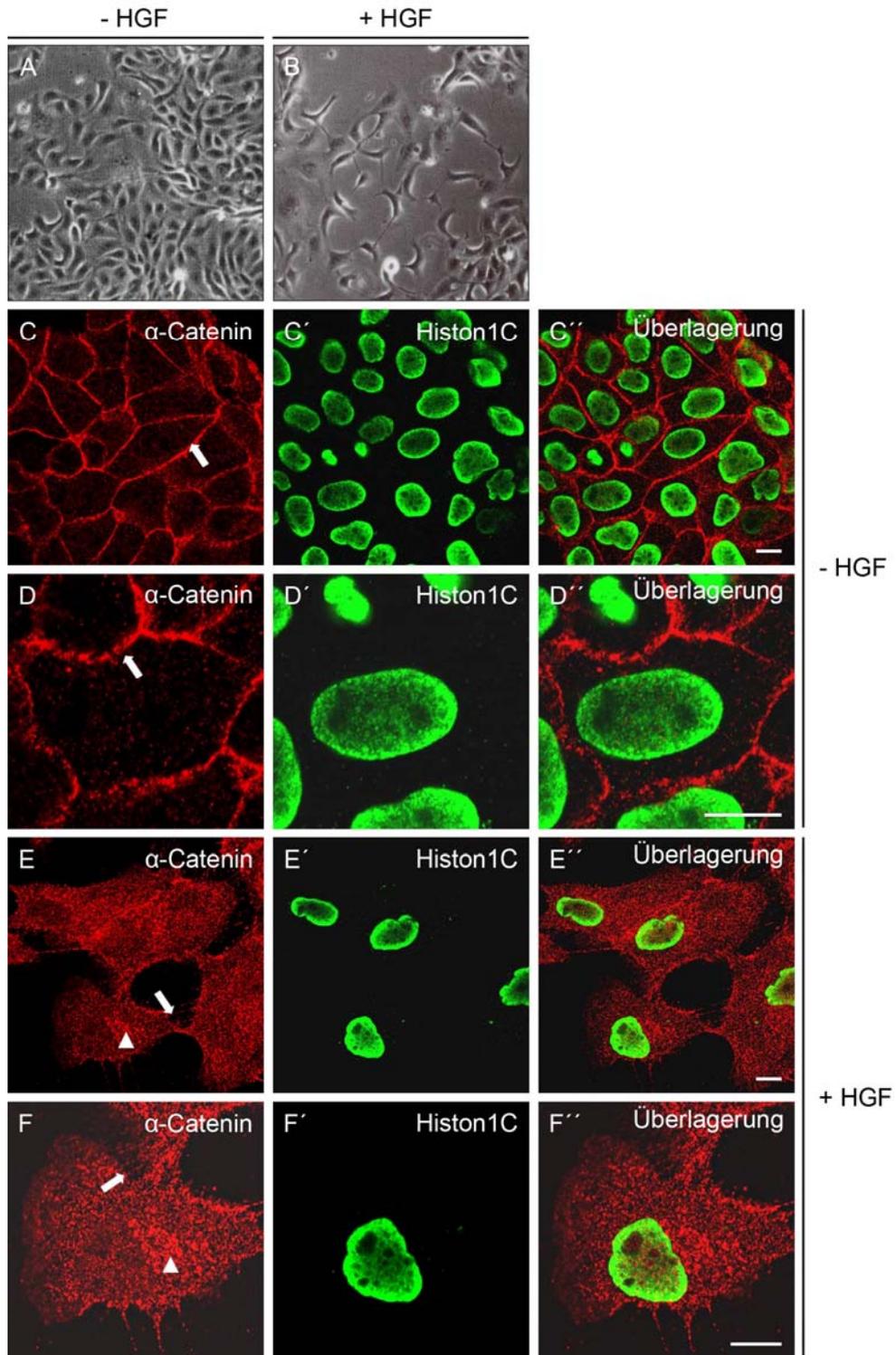


Abb. 3.25: In migrierenden MDCK-2 Zellen lokalisiert α -Catenin nicht an der Kernhülle (vorherige Seite). MDCK-2 Zellen wurden mit dem Wachstumsfaktor HGF behandelt, der die Migration von Zellen induziert. Unbehandelte Zellen zeigen im Durchlichtmikroskop eine geordnete Anordnung in Kolonien (A), in behandelten Zellen sind Zell-Zell-Kontakte aufgelöst (B). Die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse mit Hilfe eines polyklonalen α -Catenin Antikörpers bestätigt, dass das Protein in unbehandelten Zellen an der Plasmamembran lokalisiert (Pfeil in C, D). Die Markierung der Kerne mit einem Histon1C-spezifischen-Antikörper (C', D') verdeutlicht, dass α -Catenin nicht an der Kernhülle lokalisiert (C'', D''). Die HGF-Behandlung von Zellen bewirkt eine Auflösung von Zell-Zell-Kontakten, wodurch α -Catenin nicht mehr an der Plasmamembran akkumuliert (Pfeil in E, F). Es kann eine zytoplasmatische Anreicherung speziell in der Nähe des Kerns beobachtet werden (Pfeilkopf in E, F). Die Anfärbung der Kerne mit Histon1C (E', F') zeigt, dass es zu keiner Lokalisation entlang der Kernmembran kommt (E'', F''). Abbildungen D und F sind Vergrößerungen von Teilbereichen der in C bzw. E gezeigten Zellen. Größenbalken: 10 μ m. Abkürzung: HGF: Hepatocyte Growth Factor.

3.6 In vitro Analyse der Lokalisationseinflüsse zwischen Nesprin-2 und α -Catenin

Die vorangegangenen Lokalisationsstudien deuten auf eine Regulation der Interaktion von Nesprin-2 und α -Catenin hin. Um gegenseitige Lokalisationseinflüsse und die Möglichkeiten der Proteine miteinander in Kontakt zu kommen genauer zu untersuchen, wurden Experimente in verschiedenen Zelllinien durchgeführt.

3.6.1 Lokalisationsstudien in COS7 Zellen

Zur Analyse des Einflusses einer Überexpression bzw. einer dominant negativen Interferenz von Nesprin-2 auf die Lokalisation von ektopisch exprimiertem bzw. endogenem α -Catenin in COS7 Zellen, wurden verschiedene Proteine koexprimiert.

SpGFP-Sun-1-C ist ein Fusionsprotein, bei dem der C-Terminus von Sun-1 (ohne Transmembrandomäne) an GFP fusioniert wurde. Zusätzlich wurde eine Signalpeptidsequenz von TorsinA ergänzt, die eine Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum und im perinukleären Raum bewirkt. Die Anwesenheit von SpGFP-Sun-1-C an der Kernhülle führt zu einer vollständigen Verdrängung von Nesprin-2 (Lu, 2007). Bei gleichzeitiger Expression von SpGFP-Sun-1-C und Myc-markiertem Vollängen α -E-Catenin in COS7 Zellen lokalisiert SpGFP-Sun-1-C an der Kernhülle (Pfeil in Abb. 3.26A) und bewirkt eine Verdrängung von Nesprin-2 (Abb. 3.26A'). Myc-markiertes Vollängen

α -E-Catenin lokalisiert auch in Abwesenheit von Nesprin-2 an der Kernmembran (Pfeil in Abb. 3.26A''). Dies weist darauf hin, dass Nesprin-2 nicht der einzige Bindungspartner von α -Catenin an der Kernhülle ist. Endogenes α -Catenin ist in COS7 Zellen nicht entlang der Kernmembran nachweisbar. Um zu prüfen, ob durch die Überexpression von Nesprin-2-SR, endogenes α -Catenin an die Plasmamembran rekrutiert werden kann, wurde in COS7 Zellen transient GFP-SR exprimiert (Pfeil in Abb. 3.26B) und in der indirekten Immunfluoreszenz-Analyse α -Catenin nachgewiesen. Auch in diesem Fall wurde α -Catenin nicht an die Kernhülle rekrutiert (Abb. 3.26B').

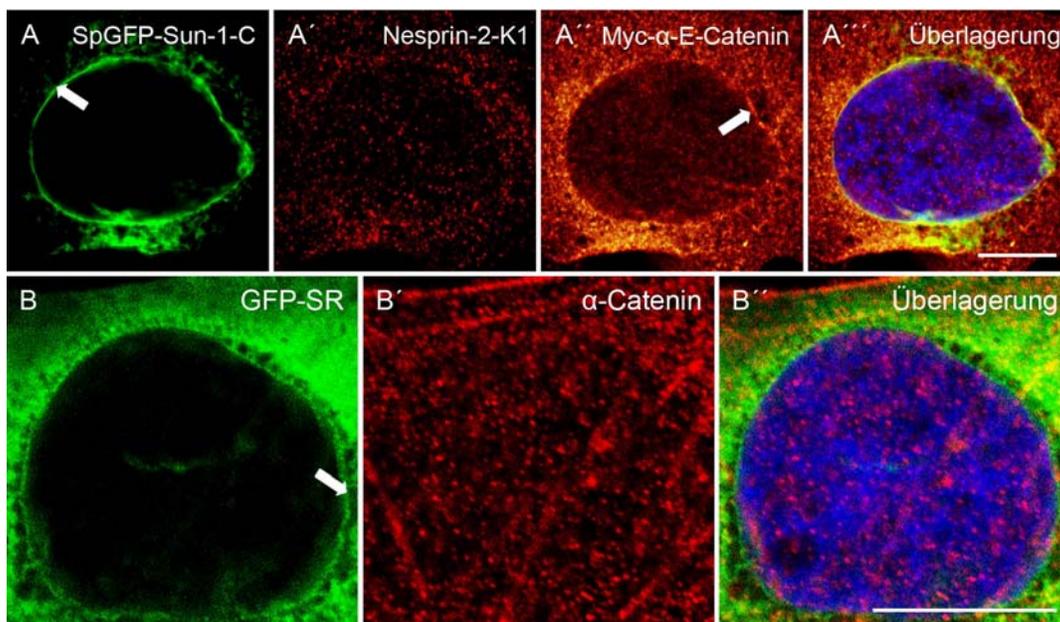


Abb. 3.26 In COS7 Zellen wird endogenes α -Catenin nicht von Nesprin-2 an die Kernmembran rekrutiert oder zusammen mit ihm verdrängt. (A-A''') SpGFP-Sun-1-C (Pfeil in A) und Volllängen Myc- α -E-Catenin (Pfeil A'') wurden transient in COS7 Zellen exprimiert. Nesprin-2 (A') wird durch SpGFP-Sun-1-C (Pfeil in A) von der Kernhülle verdrängt. Für die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse wurden Nesprin-2-spezifische pAk K1 und für Myc der monoklonale Antikörper mAk 9E10 verwendet. Myc- α -E-Catenin bleibt unverändert an der Kernmembran (Pfeil in A''). (B-B'') GFP-SR lokalisiert in COS7 Zellen an der Kernmembran (Pfeil in B). Endogenes α -Catenin nachgewiesen mit einem polyklonalen Antikörper wird nicht an die Plasmamembran rekrutiert (B'). Färbung der DNA mit DAPI. Als Sekundärantikörper wurden Alexa 568 Konjugate und Cy5 verwendet. Größenbalken: 10 μ m.

3.6.2 Lokalisationsstudien in Epithelzellen

Um die gegenseitigen Lokalisationseinflüsse zwischen Nesprin-2 und α -Catenin in Epithelzellen zu untersuchen, wurden in HaCaT Zellen transient verschiedene Proteine exprimiert (Abb. 3.27). Ein verstärktes Vorhandensein von α -Catenin an der Plasmamembran nach Expression von Myc-markiertem Volllänge α -E-Catenin (Pfeil in Abb. 3.27A) führte nicht zu einer Rekrutierung von endogenem Nesprin-2 (Abb. 3.27A''). Überexprimiertes GFP-Nesprin-2-SR kann in HaCaT Zellen an der Plasma- (Pfeil in Abb. 3.27B) und der Kernmembran (Stern in Abb. 3.27B) detektiert werden und koloalisiert an der Plasmamembran mit endogenem α -Catenin (Pfeilkopf in Abb. 3.27B'), während α -Catenin nicht an der Kernhülle nachgewiesen werden kann (Abb. 3.27B'').

In Adhärensverbindungen werden molekulare Komplexe aus E-Cadherin, p120 Catenin, α - und β -Catenin direkt oder indirekt mit dem Aktinzytoskelett verbunden, woran noch eine Reihe von aktinbindenden Proteinen, wie Vinculin, ZO-1 und Formin-1 beteiligt sein können (Gates & Peifer, 2005, Kobiela und Fuchs, 2004, Niessen, 2007). β -Catenin bindet an das Transmembranprotein E-Cadherin und α -Catenin assoziiert über seinen N-terminalen Bereich (Aminosäuren 1-146, Huber et al., 1997) mit β -Catenin. Um zu ermitteln, ob die Überexpression des Bindebereiches eine Dissoziation des endogenen α -Catenin von den Adhärensverbindungen und eine Umlagerung an die Kernmembran bewirkt, wurden die N-terminalen 199 Aminosäuren von α -N-Catenin-1 als GFP-Fusionsprotein exprimiert (GFP- α -N-Cat-1-N-199). Das Protein akkumuliert entlang der Plasmamembran (Pfeil in Abb. 3.27C). Die Überlagerung zeigt, dass die subzelluläre Lokalisation des endogenen α -Catenins in transfizierten Zellen unverändert bleibt und dass keine Umlagerung an die Kernhülle beobachtet werden kann (Abb. 3.27C''). Die Daten unterstützen eine strenge Regulation der Nesprin-2 α -Catenin Interaktion. Da eine Überexpression des einen Proteins das andere nicht in seiner subzellulären Lokalisation beeinflusst ist anzunehmen, dass die Proteine durch weitere Interaktionspartner in ihrem jeweiligen Zellkompartiment gebunden werden.

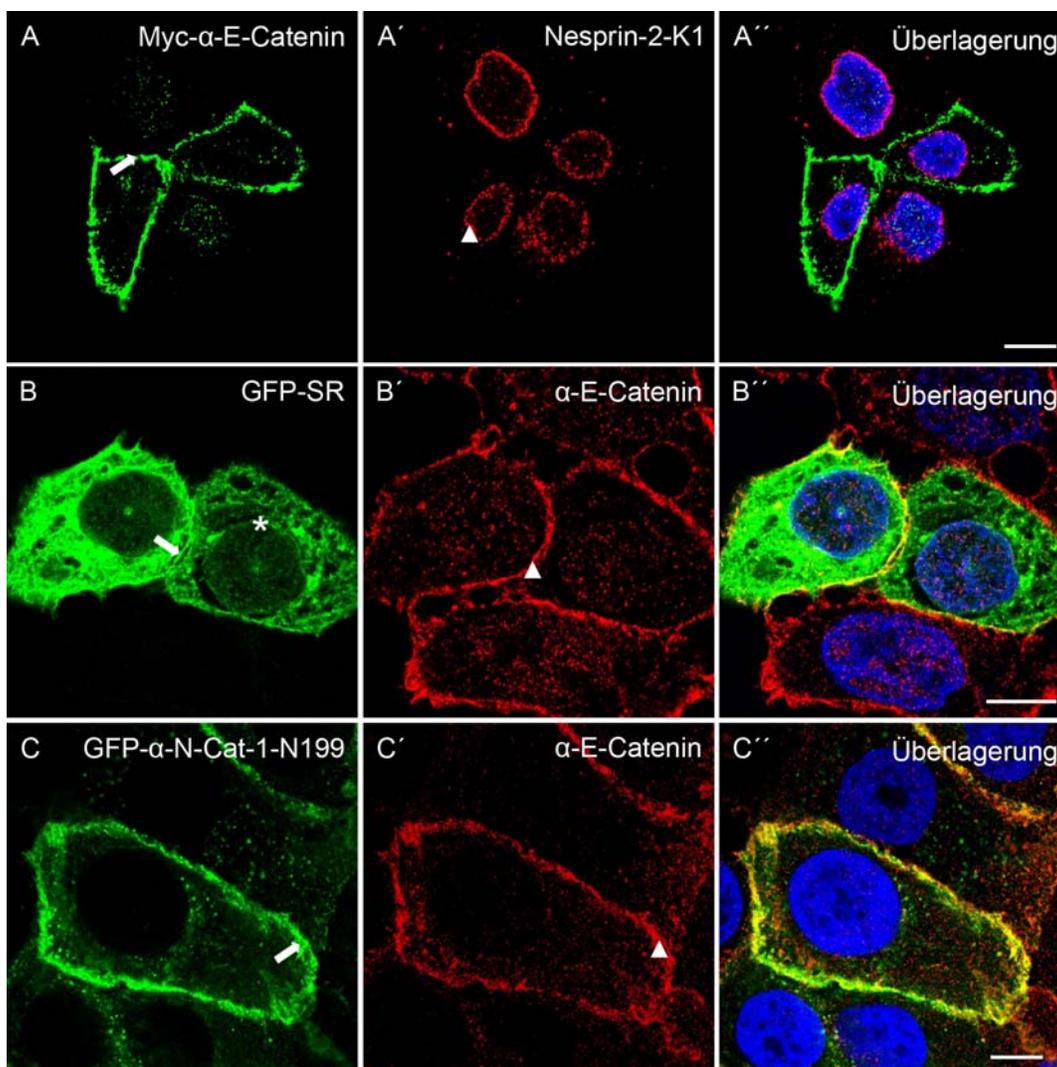


Abb. 3.27: Untersuchung der Einflüsse transient exprimierter α -Catenin und Nesprin-2 Fusionsproteine auf die endogenen Proteine. Myc- bzw. GFP-markierte Fusionsproteine wurden transient in HaCaT Zellen exprimiert und in der indirekten Immunfluoreszenz-Analyse untersucht. **(A-A'')** Myc-markiertes Volllängen α -E-Catenin lokalisiert entlang der Plasmamembran (Pfeil in A). Endogenes Nesprin-2 akkumuliert entlang der Kernhülle (Pfeilkopf in A') und wird nicht an die Plasmamembran rekrutiert (A''). **(B-B'')** Ektopisch exprimiertes Nesprin-2-GFP-SR lokalisiert an der Kern- (Stern in B) und der Plasmamembran (Pfeil in B). An letzterer Position kolokalisiert es mit endogenem α -Catenin (Pfeilkopf in B'). Die Überlagerung zeigt, dass α -Catenin nicht an die Kernhülle rekrutiert wird (B''). **(C-C'')** Der überexprimierte N-Terminus von α -N-Catenin (GFP- α -N-Cat-1-N199), der die Bindestelle von β -Catenin umfasst, lokalisiert an der Plasmamembran (Pfeil in C), wo er mit α -Catenin (Pfeil in C') kolokalisiert. Eine Dissoziation des endogenen α -Catenin von den Adhärensverbindungen mit einer möglichen Umlagerung an die Kernhülle kann nicht beobachtet werden (C''). Als Erstantikörper wurden für Myc mAk 9E10 und für die endogenen Proteine Nesprin-2 pAk K1 und polyklonale α -Catenin Antikörper verwendet. Färbung der Kerne mit DAPI. Größenbalken: 10 μ m.

3.6.3 Lokalisationsstudien in CloneA Zellen

Ektopisch exprimiertes (Abb. 3.19A) als auch endogenes Nesprin-2 (Abb. 3.21C) lokalisieren an der Plasmamembran. Die Frage, ob α -Catenin für diese Lokalisation verantwortlich ist, sollte durch die Verwendung der humanen Dickdarmkarzinom Zelllinie CloneA beantwortet werden. α -Catenin weist in diesen Zellen eine 158 Aminosäurereste große Deletion im N-Terminus auf, wodurch ein verkürztes Protein entsteht. Zusätzlich zu der Deletionsvariante kann ein geringer Anteil des Wildtyp-Proteins nachgewiesen werden. Das Verhältnis von mutiertem und Wildtyp-Protein wird auf 1:100 bis 1:1000 geschätzt. Die Kohäsion zwischen den Zellen ist schwach. Die Expression von Vollängen α -Catenin in diesen Zellen führt zu morphologischen Veränderungen, die mit der Ausbildung solider Zell-Zell-Kontakte einhergehen (Roe et al., 1998). Endogenes Nesprin-2 ist in den CloneA Zellen an der Kernhülle vorhanden (Pfeil in Abb. 3.28A). Die Kofärbung mit Phalloidin (Abb. 3.28A') als Plasmamembranmarker zeigt, dass es nicht an der Plasmamembran vorhanden ist (Abb. 3.28A''). Mit dem verwendeten α -Catenin Antikörper konnte ebenfalls keine Plasmamembran-Assoziation nachgewiesen werden, sondern nur eine diffuse zytosolische Färbung (Pfeilkopf in Abb. 3.28B). Durch das Fehlen von α -Catenin liegen die Zellen nicht im typischen Kopfsteinpflaster-Muster vor, sondern sind lose verbunden mit Lücken zwischen den Zellen (Pfeil in Abb. 3.28B). Ektopisch exprimiertes Vollängen GFP- α -N-Catenin-1 (Pfeil in Abb. 3.28C) und Vollängen Myc-E-Catenin (Daten nicht gezeigt) lokalisieren an der Plasmamembran und überlagern mit E-Cadherin (Abb. 3.28C'). Bei einer Koexpression von Myc-SR (Pfeilkopf in Abb. 3.28E') mit Vollängen GFP- α -N-Catenin-1 (Pfeil in Abb. 3.28E) beobachtet man eine Kolo-kalisation entlang der Plasmamembran. Myc-SR lokalisiert außerdem an der Kernmembran (Abb. 3.28E').

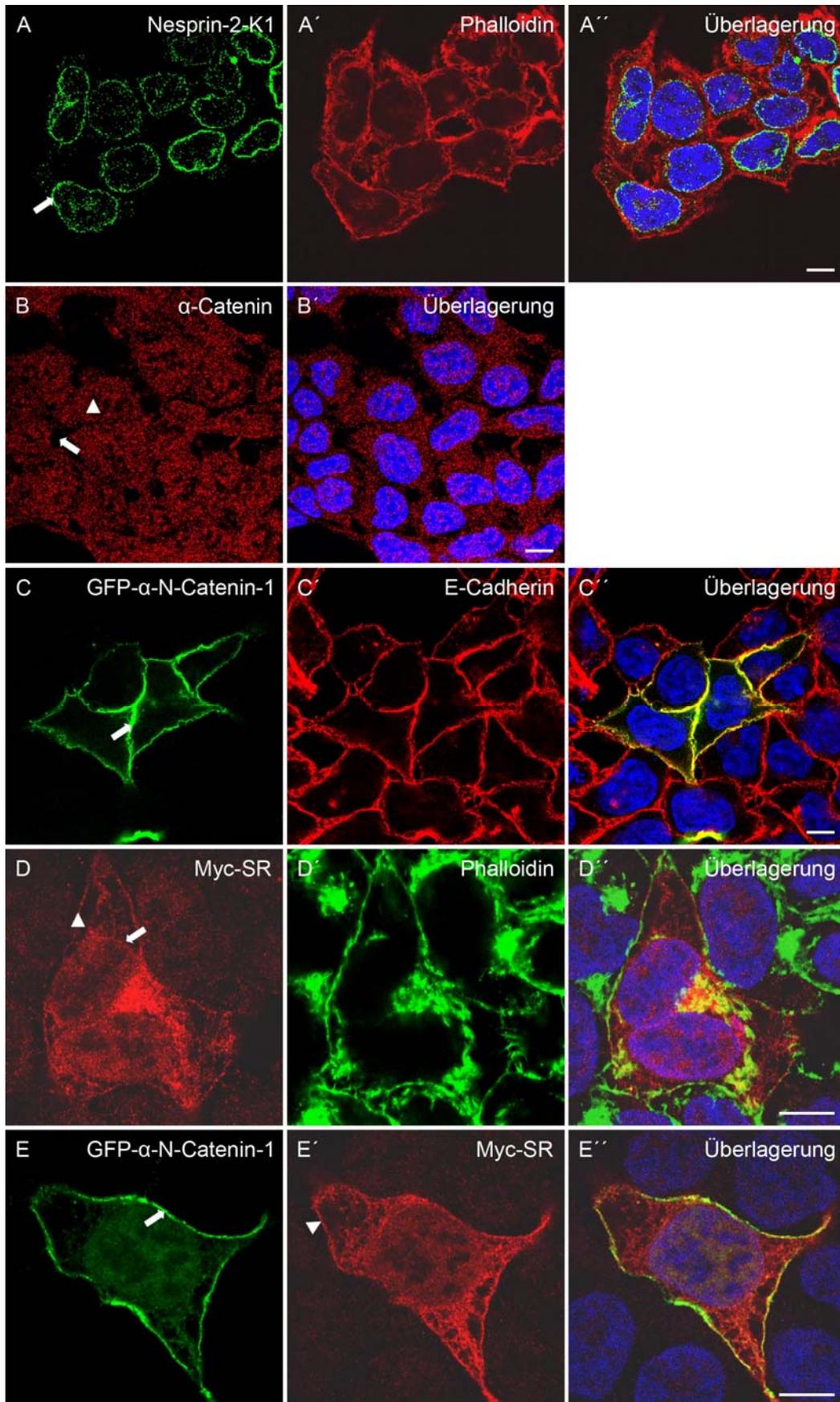


Abb. 3.28 Subzelluläre Lokalisation von Nesprin-2 und α -Catenin in CloneA Zellen (vorherige Seite). (A-A') Endogenes Nesprin-2 lokalisiert an der Kernmembran (Pfeil in A), aber nicht an der Plasmamembran (A'). Phalloidin (A') wurde zur Visualisierung der Zellmorphologie eingesetzt. (B-B') Endogenes α -Catenin ist diffuse verteilt (Pfeilkopf in B). Freie Stellen zwischen den Zellen (Pfeil in B) weisen auf die geringe Zellkohäsion hin. (C-C') Ektopisch exprimiertes Volllängen GFP- α -N-Catenin-1 lokalisiert an der Plasmamembran (Pfeil in C), wo es mit dem Adhärensmarker E-Cadherin (C') kolokalisiert (C'). (D-D') Myc-markiertes Nesprin-2-SR lokalisiert an der Kernmembran (Pfeil in D) und entlang der Plasmamembran (Pfeilkopf in D). (E-E') In kotransfizierten Zellen überlagern Volllängen GFP- α -N-Catenin-1 (Pfeil in E) und Myc-SR (Pfeilkopf in E) an der Plasmamembran. Für die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse wurden die Nesprin-2 spezifischen pAk K1-, polyklonale α -Catenin, sowie E-Cadherin Antikörper verwendet. Zusätzlich wurde FITC- sowie TRITC-markiertes Phalloidin verwendet. Myc wurde mit mAk 9E10 detektiert. Größenbalken: 10 μ m.

In CloneA Zellen lokalisiert ektopisch exprimiertes Nesprin-2-SR entlang der Zell-Zell-Kontakte (Pfeilkopf in Abb. 3.28D). Um den Einfluss der Anwesenheit von verschiedenen Volllängen α -Cateninen auf die Lokalisation des plasmamembranständigen Nesprin-2-SR zu quantifizieren, wurde GFP- bzw. Myc-markiertes Nesprin-2-SR einzeln und zusammen mit Volllängen α -E- bzw. N-Catenin exprimiert. Nesprin-2-SR lokalisiert zu 82% (GFP-SR) bzw. 85% (Myc-SR) an der Plasmamembran. Die Koexpression mit verschiedenen Volllängen α -Cateninen führt zu keiner deutlichen Veränderung in der Anzahl der Zellen mit plasmamembranständiger Nesprin-2-SR Lokalisation. In der Koexpression mit Myc- α -E-Catenin liegt der Wert für GFP-SR bei 87% und im Falle von GFP- α -N-Catenin-1 und Myc-SR bei 86% (Abb. 3.29). Daraus kann man schließen, dass α -Catenin nicht der einzige Faktor ist, der Nesprin-2-SR an der Plasmamembran hält, und dass es keine Unterschiede zwischen α -E- und N-Catenin gibt. Nesprin-2-SR und endogenes Nesprin-2 weisen Unterschiede in der subzellulären Lokalisation auf.

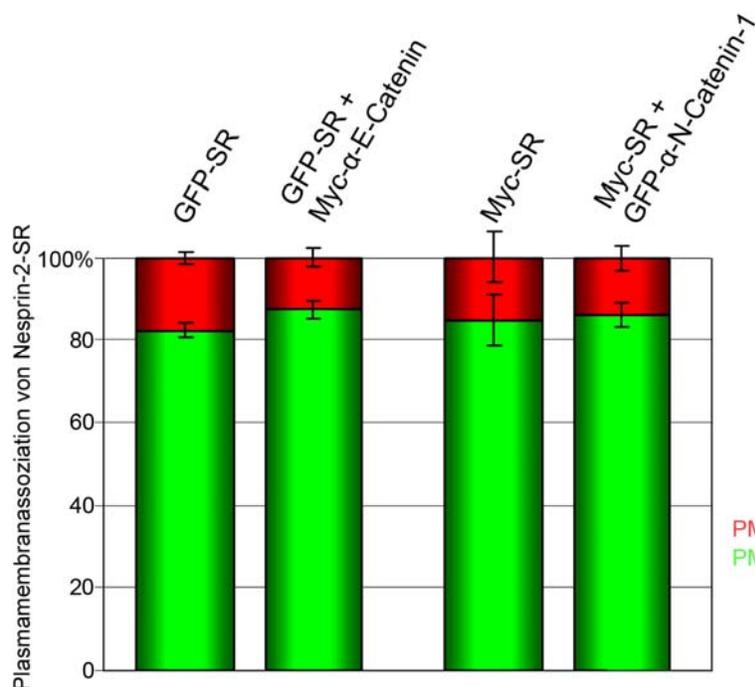


Abb. 3.29: In CloneA Zellen ist α -Catenin nicht allein für die Lokalisation von Nesprin-2-SR an der Plasmamembran verantwortlich. GFP- bzw. Myc-markiertes Nesprin-2-SR wurde transient in CloneA Zellen exprimiert. Die Proteine wurden einzeln und in Koexpressionen mit verschiedenen Vollängen α -Cateninen (GFP- α -N-Catenin-1 bzw. Myc- α -E-Catenin) in Bezug auf ihre Plasmamembranassoziation untersucht. Der grüne Balkenanteil entspricht einer Lokalisation an der Plasmamembran (PM+). Rot zeigt den Anteil der Zellen, bei denen kein Fusionsprotein an den Zell-Zell-Kontakten nachgewiesen werden konnte (PM-). Der prozentuale Anteil von Zellen mit Nesprin-2-SR Fusionsproteinen an der Plasmamembran zeigt zwischen den Einzeldarstellungen (GFP-SR 82%, Myc-SR 85%) und den jeweiligen Koexpressionen keinen deutlichen Unterschied (GFP-SR + Myc- α -E-Catenin (87%), Myc-SR + GFP- α -N-Catenin-1 86%). Es wurden jeweils 300 Zellen ausgewertet. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Abkürzung: PM: Plasmamembran.

3.7 Die Rolle von α -Catenin in der Organisation des perinukleären F-Aktins

Neben seiner lange Zeit bekannten strukturellen Aufgabe bei der Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten mehren sich die Hinweise, dass α -Catenin eine bedeutende Rolle in der Organisation des Aktinzytoskeletts in der Nähe von Adhärensverbindungen spielt (Scott & Yap, 2006). Die in dieser Arbeit gezeigten Daten weisen darauf hin, dass α -Catenin durch die Interaktion mit Nesprin-2 auch eine Funktion an der Kernhülle hat. Um zu prüfen, ob es analog zum Einfluss auf das Aktinzytoskelett an der Plasmamembran eine Rolle bei

der Organisation des perinukleären F-Aktins besitzt, wurden Experimente in HaCaT und COS7 Zellen durchgeführt.

3.7.1 α -Catenin ist in HaCaT Zellen nicht essentiell für die Aufrechterhaltung des perinukleären F-Aktins

Um die Rolle bei der Organisation des perinukleären Aktinringes zu untersuchen, wurde ein *knockdown* von α -Catenin mittels RNA-Interferenz (shRNA, *short hairpin* RNA) in HaCaT Zellen durchgeführt. α -Catenin ist ein essentieller Bestandteil von Adhärensverbindungen. Fehlt es, so liegen Zellen vereinzelt oder mit schwachen Kontakten untereinander vor. Eine Reexpression von α -Catenin führt zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten (Hirano et al., 1992, Inge et al., 2008). Die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse der Kontrollzellen zeigt eine α -Catenin typische Verteilung. Endogenes α -Catenin lokalisiert an der Plasmamembran (Pfeilkopf in Abb. 3.30A). Für die Visualisierung der Zelle und des Aktinzytoskeletts wurde Phalloidin verwendet. Das Aktinzytoskelett durchspannt die Zelle und akkumuliert entlang der Kernhülle (Pfeil in Abb. 3.30A', B'). Der *knockdown* von α -Catenin bedingt die Auflösung von Zell-Zell-Kontakten und kann anhand der morphologischen Veränderungen der Zellen (Abb. 3.30B) im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.30A) belegt werden. Zusätzlich kann im Westernblot die Effizienz der verwendeten shRNAs veranschaulicht werden (Abb. 3.30D). F-Aktin kann in Wildtyp und nach α -Catenin-shRNA Behandlung an der Kernhülle nachgewiesen werden (Pfeil in Abb. 3.30A', B'). Eine Quantifizierung zeigte, dass sowohl im *knockdown*, als auch in der Kontrolle bei nahezu 100% der Zellen F-Aktin am Kern nachweisbar ist und somit ein Einfluss von α -Catenin auf diese Verteilung ausgeschlossen werden kann (Abb. 3.30C).

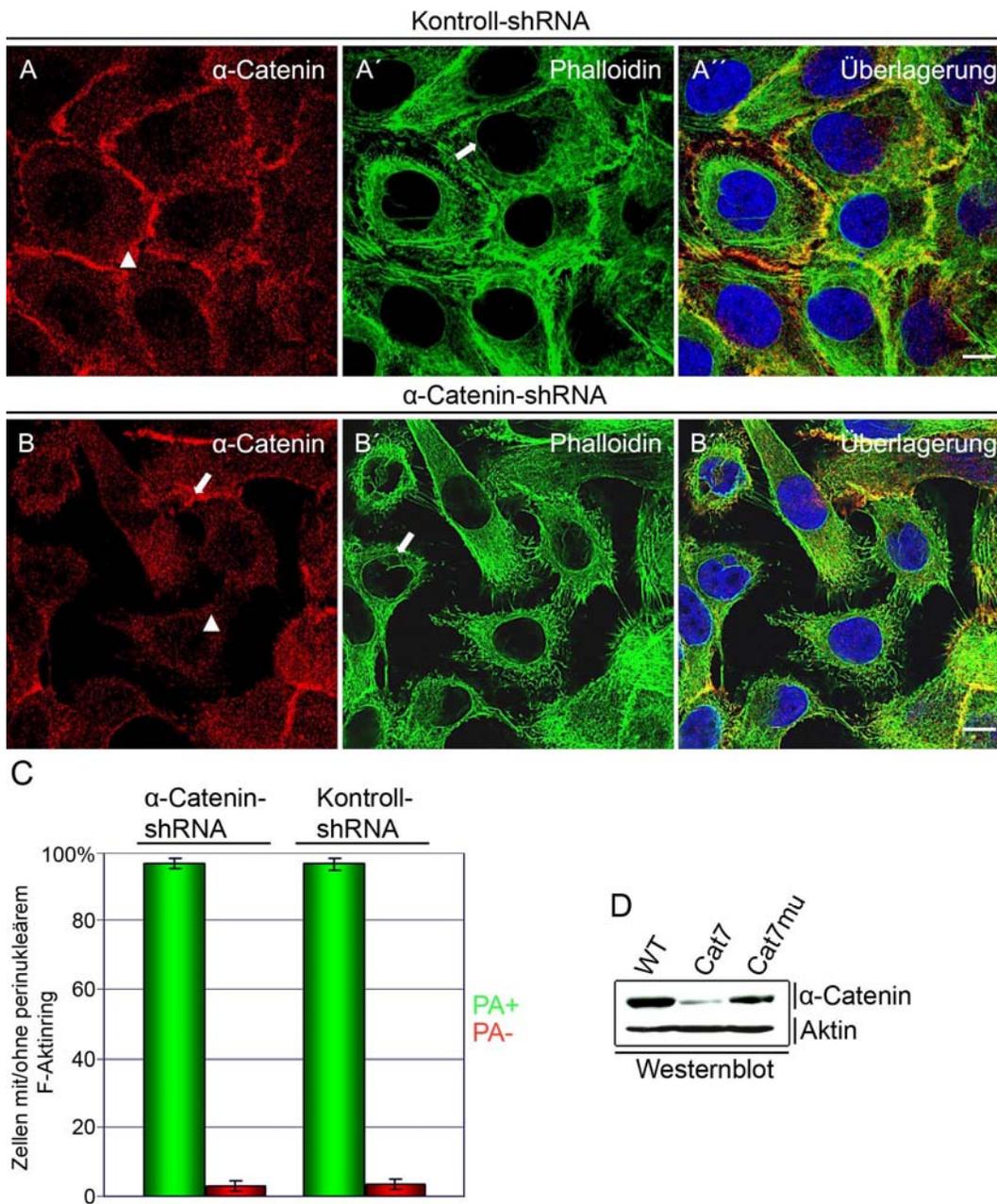


Abb. 3.30: In HaCaT Zellen ist α-Catenin nicht essentiell für die Aufrechterhaltung des perinukleären Aktinringes. (A+B) Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse von Kontroll- und α-Catenin-shRNA behandelten Zellen. Die Immunfärbung von α-Catenin zeigt, dass das Protein in Kontrollzellen an der Plasmamembran lokalisiert (Pfeilkopf in A). In shRNA behandelten Zellen ist das Protein nur an wenigen Zell-Zell-Kontakten nachweisbar (Pfeil in B). Zellen, in denen α-Catenin reduziert ist, liegen durch den Verlust der Adhärensverbindungen vereinzelt vor (Pfeilkopf in B). Das Aktinzytoskelett wurde durch FITC-konjugiertes Phalloidin markiert (A', B'). Perinukleäres Aktin ist in Kontroll- und shRNA-behandelten Zellen nachweisbar (Pfeil in A', B'). Größenbalken: 10 µm. (C) Quantifizierung der Zellen, bei denen ein perinukleärer Aktinring nachweisbar ist. Es wurden jeweils 300 Zellen im Bezug auf eine Lokalisation von F-Aktin entlang der Kernhülle untersucht. Grüne Balken entsprechen Zellen mit (PA+), rote Balken ohne Aktin am Kern (PA-). (D) Westernblot zum Nachweis der Effizienz der verwendeten shRNAs. Untersucht wurden Lysate von Wildtyp HaCaT Zellen (WT) und solchen, die mit α-Catenin-shRNA (Cat7) oder der Kontrolle (Cat7mu) behandelt wurden. Abkürzung: PA: perinukleäres F-Aktin.

3.7.2 Kernmembranständiges α -Catenin kann Aktin in COS7 Zellen nicht an den Zellkern rekrutieren

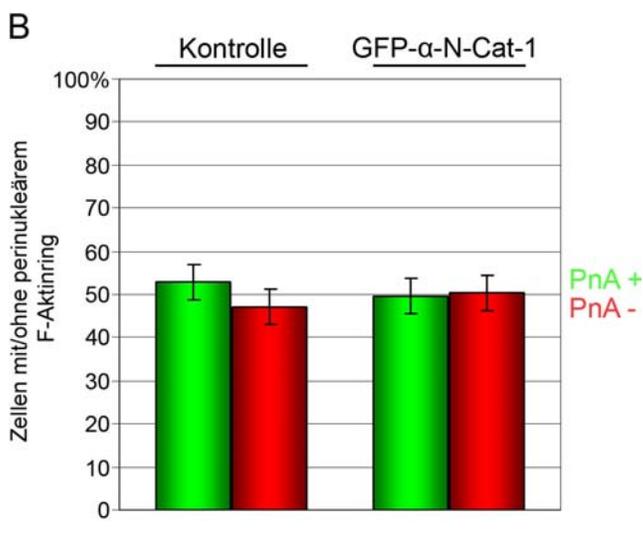
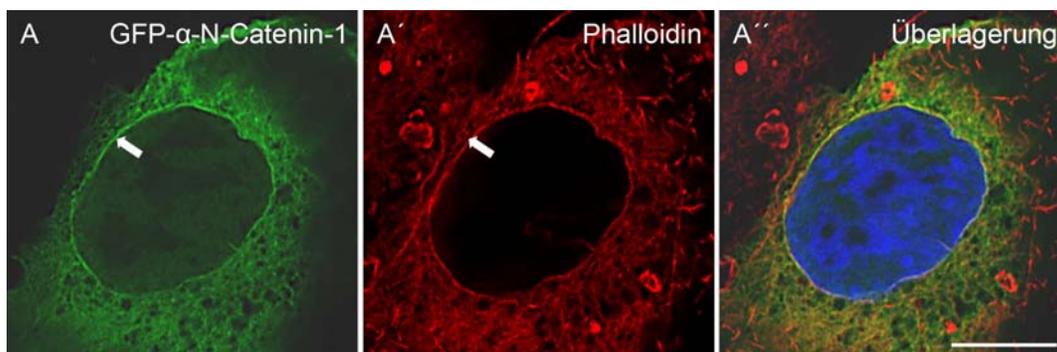


Abb. 3.31: Vollängen GFP- α -N-Catenin-1 kann in COS7 Zellen F-Aktin nicht an die Kernhülle rekrutieren. (A-A'') Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse von Vollängen GFP- α -N-Catenin-1 exprimierenden COS7 Zellen. Das Fusionsprotein akkumuliert entlang der Kernmembran (Pfeil in A). TRITC-konjugiertes Phalloidin wurde zur Darstellung des perinukleären F-Aktinringes verwendet (Pfeil in A'). Die Überlagerung zeigt die Kolokalisation entlang der Kernhülle (A''). Größenbalken: 10 μ m. (B) Statistische Analyse von COS7

Zellen mit Kernmembranassoziiertem F-Aktin. Grüne Balken geben die Lokalisation von F-Aktin am Kern an (PA+). Rote Balken repräsentieren Zellen, in denen F-Aktin am Kern nicht nachweisbar war (PA-). Es wurden jeweils 300 Zellen ausgewertet. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Abkürzungen: GFP- α -N-Cat-1: GFP- α -N-Catenin-1, PnA: Perinukleäres F-Aktin.

In COS7 Zellen lokalisiert ektopisch exprimiertes Vollängen GFP- α -N-Catenin-1 an der Kernhülle (Stern in Abb. 3.13A). In diesen Zellen wird überprüft, ob das Fusionsprotein in der Lage ist, F-Aktin an die Kernmembran zu rekrutieren und damit die Bildung des perinukleären F-Aktinringes zu fördern. F-Aktin wurde mit Hilfe von Phalloidin dargestellt (Pfeil in Abb. 3.31A'). Die Überlagerung mit der GFP-Fluoreszenz verdeutlicht die Kolokalisation entlang der Kernhülle (Abb. 3.31A''). Für eine statistische Bewertung wurde die Anzahl der Zellen mit perinukleärem F-Aktin in Wildtyp und Vollängen GFP- α -N-Catenin-1 exprimierenden Zellen bestimmt (Abb. 3.31B). Die Auswertung mit Hilfe des Student t-Test ergab, dass die Anwesenheit von Vollängen GFP- α -N-Catenin-1

keinen signifikanten Unterschied im Bezug auf die Zahl der Zellen mit perinukleären F-Aktin bewirkt (P 0,23).

3.8 Nesprin-2 reguliert die Menge des intranukleären β -Catenins

Bei der Aufrechterhaltung von Adhärensverbindungen interagiert α -Catenin mit β -Catenin. Neben dieser strukturellen Aufgabe ist β -Catenin essentiell für den Wnt-Signalweg. Nach Aktivierung dieses Signalweges akkumuliert β -Catenin im Zytoplasma, gelangt in den Zellkern und bewirkt dort als Komponente von Transkriptionsfaktoren die Transkription von Zielgenen. Es gibt Hinweise auf einen Einfluss von α -Catenin auf die Regulation der β -Catenin Menge im Kern (Inge et al., 2008). In den folgenden Experimenten haben wir untersucht, ob Nesprin-2 ebenfalls an der Regulation der intranukleären Menge des β -Catenin beteiligt ist.

3.8.1 Nesprin-2, α -Catenin, Emerin und β -Catenin bilden *in vitro* einen Proteinkomplex

Wir haben zunächst geprüft, ob die entsprechenden Proteine untereinander interagieren und zur Bildung eines Proteinkomplexes in der Lage sind. Die Interaktionen einzelner Proteine sind teilweise bereits in der Literatur beschrieben. So kann α -Catenin mit β -Catenin interagieren (Huber et al., 1997) und die Interaktion von Nesprin-2 mit α -Catenin wurde in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt. In die weiteren Untersuchungen wurde Emerin, ebenfalls ein Protein der Kernhülle, einbezogen. Für Emerin wurde von Markiewicz und Kollegen eine direkte Interaktion mit β -Catenin und ein Einfluss auf die Regulation der intrazellulären Menge an β -Catenin gezeigt (Markiewicz et al., 2006). Nesprin-2 und Emerin interagieren ebenfalls miteinander (Libotte et al., 2005, Wheeler et al., 2007). Zum Nachweis des Proteinkomplexes wurde eine GST-Präzipitation durchgeführt. Hierbei wurde GST-Nesprin-2-SR1+2, das den Bindebereich von α -Catenin und Emerin umfasst, verwendet. Als Negativkontrollen wurden GST-Nesprin-2-SR3+4, GST gekoppelt an

Glutathion-Agarose und Glutathion-Agarose (Beads) verwendet. Die Bindungsanalyse wurde in zwei parallelen Ansätzen durchgeführt (Abb. 3.32A). Der erste Ansatz wurde in zwei Inkubationsschritten durchgeführt. Im ersten wurde, analog zu den vorher gezeigten Experimenten (Abb. 3.12), GFP-markiertes Vollängen α -N-Catenin-1 in COS7 Zellen exprimiert. Lysate dieser Zellen (Input 1 Abb. 3.32B) wurden mit den GST-Fusionsproteinen inkubiert. Für den zweiten Inkubationsschritt erfolgte eine Umpufferung und die Zugabe neuer COS7 Zelllysate (Input 2 Abb. 3.32A). Im zweiten Ansatz wurde nur GST-Nesprin-2-SR1+2 verwendet und der erste Inkubationsschritt entfiel (Abb. 3.32B, rechten beiden Spuren). Dies diente dazu einen Überblick über die Anordnung der Proteine im Komplex zu bekommen. Die Analyse der Präzipitate im Immunblot mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern zeigt, dass mit GST-Nesprin-2-SR1+2 das Vollängen GFP- α -N-Catenin-1 und endogenes Emerin und β -Catenin zusammen präzipitieren. Der zweite Ansatz (ohne Vollängen GFP- α -N-Catenin-1) zeigt, dass α -Catenin nicht als Bindeglied zwischen den übrigen Proteinen dient. Als Kontrolle, dass die Bindung zwischen Nesprin-2-SR1+2, β -Catenin und Emerin ohne α -Catenin möglich ist, wurden die Präzipitate auch auf das endogene Protein geprüft, welches im Immunblot nicht nachgewiesen werden konnte. Der relativ geringe Anteil des endogenen α -Catenins wurde in den verschiedenen Waschschritten aus den Präzipitaten entfernt.

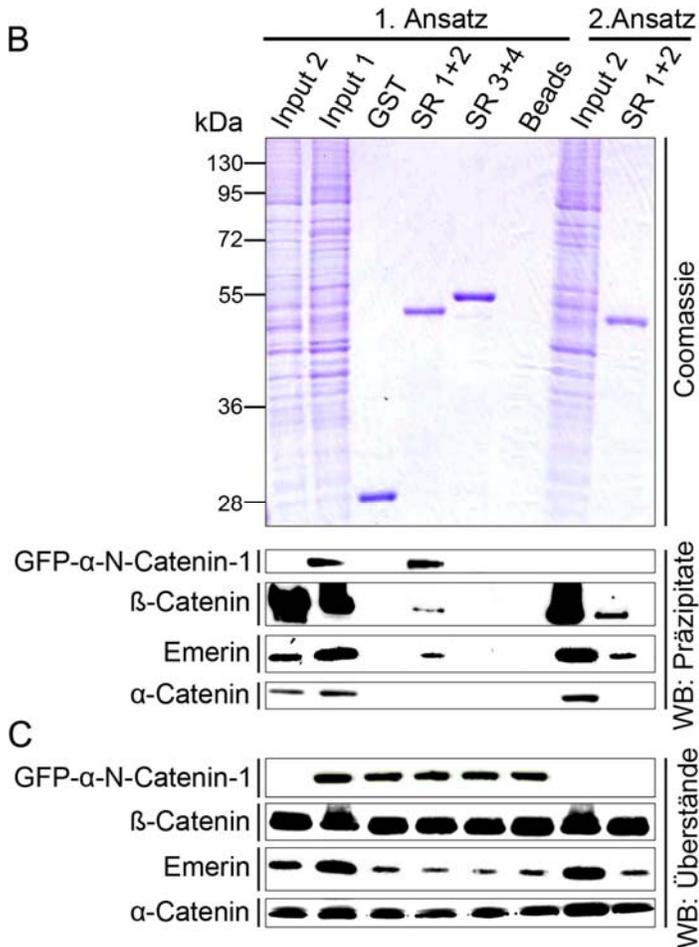
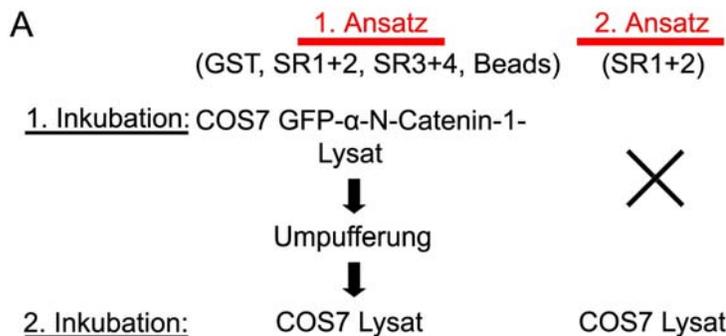


Abb. 3.32: GST-Nesprin-2-SR1+2, Vollängen GFP- α -N-Catenin-1, Emerin und β -Catenin bilden einen Proteinkomplex. (A) Schematische Übersicht der Inkubationsschritte. (B) Zum Nachweis der Komplexbildung wurde eine GST-Präzipitation durchgeführt. GST-Nesprin-2-SR1+2 enthält den Binderegion für Emerin und α -Catenin. GST, GST-Nesprin-2-SR3+4 und Glutathion Agarose (Beads) wurden als Negativkontrollen verwendet. Die Coomassie Blau Färbung zeigt den Einsatz gleicher Proteinmengen. Die Bindungsanalyse (1. Ansatz) wurde in zwei Inkubationsschritten durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die GST-Fusionen mit Lysaten von Vollängen GFP- α -N-Catenin-1 exprimierenden COS7 Zellen inkubiert. Für den zweiten Schritt wurden die Präzipitate umgepuffert und mit Lysaten von Wildtyp COS7 Zellen inkubiert. Die GST-Präzipitation wurde in zwei parallelen Ansätzen durchgeführt. Im zweiten Ansatz (2. Ansatz die äußersten rechten beiden Spuren), wurde nur Nesprin-2-SR1+2 eingesetzt. Dies diente dazu, einen Einblick in die Anordnung der Proteine im Komplex zu bekommen.

Die Westernblot-Analyse der Präzipitate erfolgte mit den spezifischen Antikörpern für GFP (mAk K3-184-2), β -Catenin (Klon 6F9), Emerin (Klon 4G5) und α -Catenin (Klon 5) und zeigt den Proteinkomplex mit GST-Nesprin-2-SR1+2. Im Kontrollexperiment (2. Ansatz, rechten beiden Spuren) wurde nur Wildtyp COS7 Lysat verwendet. (C) Zum Nachweis gleicher Proteinmengen wurden die Überstände der Präzipitate und die eingesetzten Zelllysate (Input) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot analysiert. Abweichungen in den Proteinmengen (Bsp.: Emerin) ergeben sich durch Unterschiede in der Anfertigung der Zelllysate.

3.8.2 Dominant negative Interferenz von Nesprin-2 reduziert die Menge von β -Catenin im Kern

Der Einfluss von Nesprin-2 auf die intranukleäre Menge von β -Catenin wurde in HaCaT Zellen, die transient SpGFP-Sun-1-C exprimieren, überprüft. Wie bereits beschrieben (3.6.1) verdrängt dieses Konstrukt Nesprin-2 von der Kernhülle („dominant negative Interferenz“). Bei SpGFP fehlt der C-Terminus des Sun-Proteins, so dass keine Effekte auf Nesprin-2 ausgeübt werden. β -Catenin kann in zwei Formen vorliegen, die unterschiedlich phosphoryliert sind. Ist der Wnt-Signalweg inaktiv, liegt β -Catenin phosphoryliert vor und wird im Zytoplasma degradiert. In Anwesenheit eines Wnt-Liganden kommt es zu einer Dephosphorylierung, wodurch es nicht mehr degradiert wird, sich im Zytoplasma anreichert und in den Zellkern gelangen kann. Der Antikörper, der für die hier gezeigten Zellfraktionierungen verwendet wurde, erkennt speziell das dephosphorylierte 'aktive' β -Catenin (*active- β -Catenin*, van Noort et al., 2002).

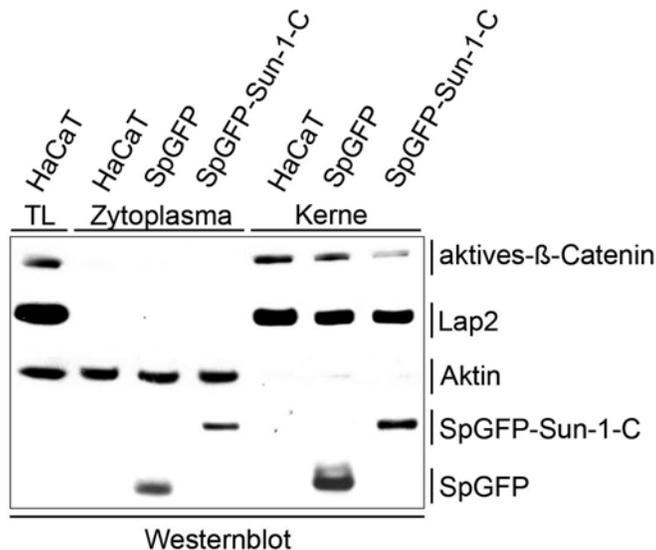


Abb. 3.33: Die Entfernung von Nesprin-2 von der Kernhülle durch das dominant negativ interferierende SpGFP-Sun-1-C reduziert die Menge von β -Catenin im Kern. In HaCaT Zellen scheint der Wnt-Signalweg konstitutiv aktiv zu sein. Aktives- β -Catenin ist in den Totallysaten (linke Spur) und den Zellkernen von Wildtyp Zellen nachweisbar. WT und transient SpGFP bzw. SpGFP-Sun-1-C exprimierende HaCaT Zellen wurden in Zytoplasma- und Kernfraktion aufgetrennt. Zum Nachweis gleicher Proteinmengen wurden die Fraktionen nach der Auftrennung in der SDS-PAGE mit β -Aktin (mAk Ac74) bzw. Lap2 (BD Laboratories) spezifischen Antikörpern umgesetzt. GFP-Fusionsproteine wurden mit dem mAk K3-184-2 nachgewiesen. Der verwendete β -Catenin spezifische Antikörper (anti-active- β -Catenin, Klon 8E7) erkennt speziell die 'aktive' dephosphorylierte Form des Proteins. Abkürzung: TL: Totallysat.

In HaCaT Zellen scheint der Wnt-Signalweg konstitutiv aktiv zu sein, da bereits in Totallysaten und in Zellkernen von unbehandelten Zellen aktives- β -Catenin nachweisbar ist (Abb. 3.33, linke Spur, TL). Um die Menge an β -Catenin im Kern zu bestimmen, wurden HaCaT Zellen (Wildtyp und SpGFP bzw. SpGFP-Sun-1-C exprimierende Zellen) fraktioniert. Hierzu wurden die Kerne vom restlichen Zellmaterial (Zytoplasma) getrennt. Die Fraktionierung zeigt, dass in unbehandelten Zellen aktives- β -Catenin im Kern nachweisbar ist. SpGFP-Sun-1-C transfizierte Zellen weisen im Vergleich zum Wildtyp und der Kontrolle eine Reduktion von aktivem- β -Catenin im Kern auf (Abb. 3.33).

3.8.3 RNA-Interferenz von Nesprin-2 bewirkt eine Reduktion von β -Catenin im Kern.

Die Daten, die mit dem SpGFP-Sun-1-C erzielt wurden, zeigen, dass eine Verdrängung von Nesprin-2 von der Kernhülle zur Reduktion der Menge von β -Catenin im Kern führt. Um zu beweisen, dass der gezeigte Effekt auf der Verdrängung von Nesprin-2 beruht, wurde ein spezifischerer Ansatz gewählt. Die Nesprin-2 Mengen wurden in HaCaT Zellen mittels shRNA, die gegen den C-Terminus gerichtet ist, reduziert. Zellen aus einem Transfektionsansatz wurden aufgeteilt, so dass sowohl Gesamtlysate, als auch eine Fraktionierung in Zytoplasma- und Kernfraktion angefertigt werden konnten. Es wurden unbehandelte Zellen (WT), und Zellen, die mit einer Kontroll-shRNA (Kontrolle) bzw. der Nesprin-2-shRNA (Nes-2-C2) behandelt wurden, verwendet. Die Proteine der Totallysate wurden in einem 3-15%igen Gradientengel aufgetrennt. Der anschließende Immunblot mit pAk K1 zeigt die Reduktion der Nesprin-2 Mengen (Abb. 3.34B). Die Proteine aus den Zellfraktionierungen wurden ebenfalls über SDS-PAGE aufgetrennt und im anschließenden Westernblot mit Antikörpern gegen aktives- β -Catenin (Klon 8E7), LaminB1, Emerin und GAPDH untersucht. LaminB1 und GAPDH zeigen die Auftrennung in Zytoplasma- und Kernfraktion. Aktives- β -Catenin ist in den Zellkernen der Zellen, die mit Nesprin-2-shRNA (Nes-2-C2) behandelt wurden, im Vergleich zum Wildtyp (WT) und der Kontroll-shRNA (Kontrolle) reduziert (Abb. 3.34C). Zusätzlich zeigt der Immunblot, dass gleiche Emerin-Mengen in den Kernfraktionen vorhanden sind. Es ist von Bedeutung, dass dieses Protein unverändert bleibt, da es ebenfalls

ein Regulator der intranukleären β -Catenin-Menge ist. Nesprin-2, β -Catenin, Emerin und α -Catenin sind zur Ausbildung eines Proteinkomplexes befähigt (Kapitel 3.8.1). Da jedes der Proteine einen Einfluss auf die Akkumulation von β -Catenin im Kern hat, sollte mittels indirekter Immunfluoreszenz-Analyse geprüft werden, ob die Reduktion der Nesprin-2 Mengen einen Einfluss auf die verbleibenden Bindungspartner hat (Abb. 3.34D-F). Der *knockdown* von Nesprin-2 kann sowohl mit pAk K1 (Pfeilkopf in Abb. 3.34D), als auch mAk K20-478 (Pfeilkopf in Abb. 3.34F), gezeigt werden. Emerin lokalisiert sowohl in *knockdown* Zellen (Pfeilkopf in Abb. 3.34D') als auch in Zellen, in denen Nesprin-2 nachweisbar ist, entlang der Kernhülle (Pfeil in Abb. 3.34D'). Die Immunfärbung von β -Catenin (Abb. 3.34E') wurde mit einem Erstantikörper durchgeführt, der nicht speziell gegen die aktive, dephosphorylierte Form gerichtet ist. Dieses β -Catenin lokalisiert in *knockdown* Zellen entlang der Zell-Zell-Kontakte (Pfeil in Abb. 3.34E'). Die Lokalisation von α -Catenin an der Plasmamembran wird durch die Nesprin-2 Reduktion ebenfalls nicht verändert (Pfeil in Abb. 3.34F'). So konnte anhand endogener Proteine der Einfluss von Nesprin-2 auf die Regulierung der intranukleären Menge an β -Catenin bestätigt werden.

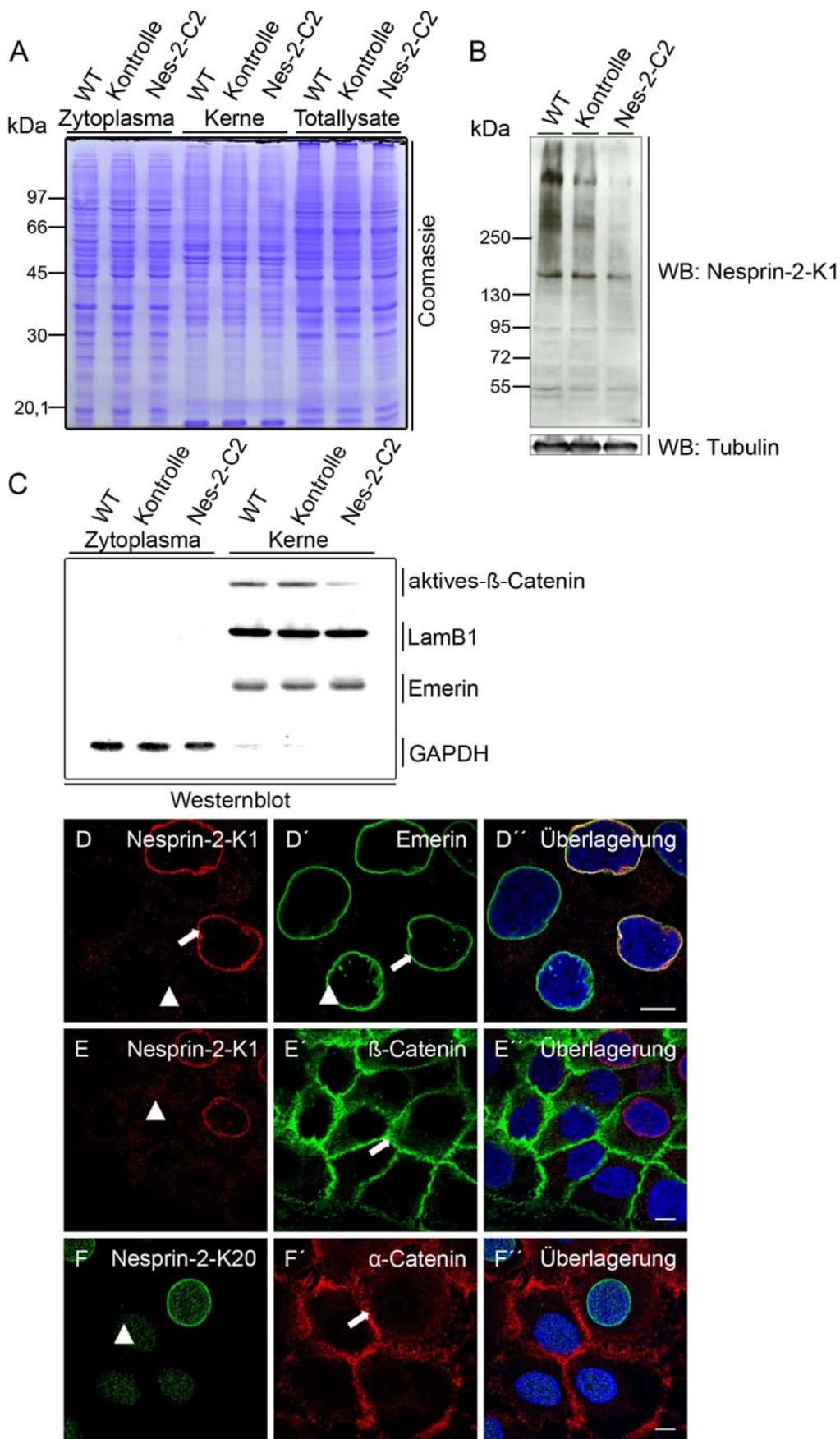


Abb. 3.34 RNA-Interferenz von Nesprin-2 reduziert die intranukleäre Menge von aktivem- β -Catenin (vorherige Seite). Nesprin-2 wurde mittels shRNA, die gegen den C-Terminus gerichtet ist, auf Proteinebene reduziert. Von einem Transfektionsansatz wurden Totallysate und eine Fraktionierung angefertigt. Die Experimente wurden mit Wildtyp HaCaT Zellen (WT), sowie mit Kontroll shRNA (Kontrolle), bzw. Nesprin-2-shRNA (Nes-2-C2) behandelten Zellen durchgeführt. **(A)** Coomassie Blau Färbung zum Nachweis gleicher Proteinmengen **(B)** Zur Bestätigung des Nesprin-2 *knockdowns* wurden Totallysate im 3-15%igen Gradientengel aufgetrennt und im Immunblot mit pAk K1 behandelt. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. **(C)** Der Westernblot der Fraktionierung wurde mit LamB1 (Lamb1, Abcam) und GAPDH (Klon 71.1) zur Markierung von Zytoplasma- und Kernfraktionen umgesetzt. Die Mengen des aktiven β -Catenins (Klon 8E7) ist in der Kernfraktion von Nesprin-2 *knockdown* Zellen reduziert. Emerin (Klon 4G5) ist in äquimolaren Mengen vorhanden. **(D-F)** Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse von Nesprin-2, Emerin, α - und β -Catenin. Diese Proteine können einen Komplex bilden und sind an der Regulation der β -Catenin Menge im Zellkern beteiligt. Nesprin-2 lokalisiert in unbehandelten Zellen an der Kernhülle (Pfeil in D). In *knockdown* Zellen ist sowohl mit mAk K20-478 (Pfeilkopf in F), als auch mit pAk K1 (Pfeilkopf in D) kein Nesprin-2 an der Kernhülle nachweisbar. Emerin lokalisiert in Zellen, in denen Nesprin-2 reduziert ist (Pfeilkopf in D') als auch in Zellen, in denen Nesprin-2 exprimiert wird (Pfeil in D'), entlang der Kernmembran. Der, in der Immunfärbung, verwendete β -Catenin Antikörper (Klon 6F9) erkennt phosphoryliertes und nicht phosphoryliertes Protein (Pfeil in E', plasmamembranständiges β -Catenin). α -Catenin lokalisiert in Nesprin-2 *knockdown* Zellen unverändert an der Plasmamembran (Pfeil in F'). Kerne wurden mit DAPI gefärbt. Größenbalken 10 μ m.

3.8.4 Modell zur in vitro-Analyse der Einflüsse von Nesprin-2 und α -catenin auf die intranukleäre Menge von β -Catenin

α -Catenin hat einen Einfluss auf die Lokalisation von β -Catenin im Kern. Für Nesprin-2 konnte in dieser Arbeit eine vergleichbare Funktion aufgedeckt werden. Um zu untersuchen, ob Nesprin-2 und α -Catenin den Transport von β -Catenin durch die Kernmembran kontrollieren, sollte ein induzierbares System für den Wnt-Signalweg etabliert werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass Komponenten des Degradationskomplexes, der für den Abbau von β -Catenin im Zytoplasma verantwortlich ist, in COS7 Zellen vorhanden sind (Yamamoto et al., 1999). Eine Komponente des Degradationskomplexes ist die Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β). In Abwesenheit eines Wnt-Signals ist dieses Enzym für die Phosphorylierung von β -Catenin und damit für dessen Abbau verantwortlich (Aberle et al., 1997). GSK3 β kann durch die Zugabe von Lithiumchlorid (LiCl) gehemmt werden. Für die folgenden Untersuchungen wurden COS7 Zellen verwendet, die an der Kernmembran lokalisierendes Vollängen GFP- α -N-Catenin-1 und Nesprin-2-SR Fusionsproteine exprimierten, um einen induzierbaren Wnt-Signalweg zu etablieren.

Wildtyp COS7 Zellen wurden über Nacht mit verschiedenen Konzentrationen von LiCl behandelt und die Totallysate mittels Immunblot untersucht. Sowohl

der gegen das aktive- β -Catenin gerichtete (Klon 8E7) als auch der generelle β -Catenin-Antikörper (Klon 6F) zeigen einen Anstieg der β -Catenin-Menge mit zunehmender LiCl-Konzentration (Abb. 3.35A).

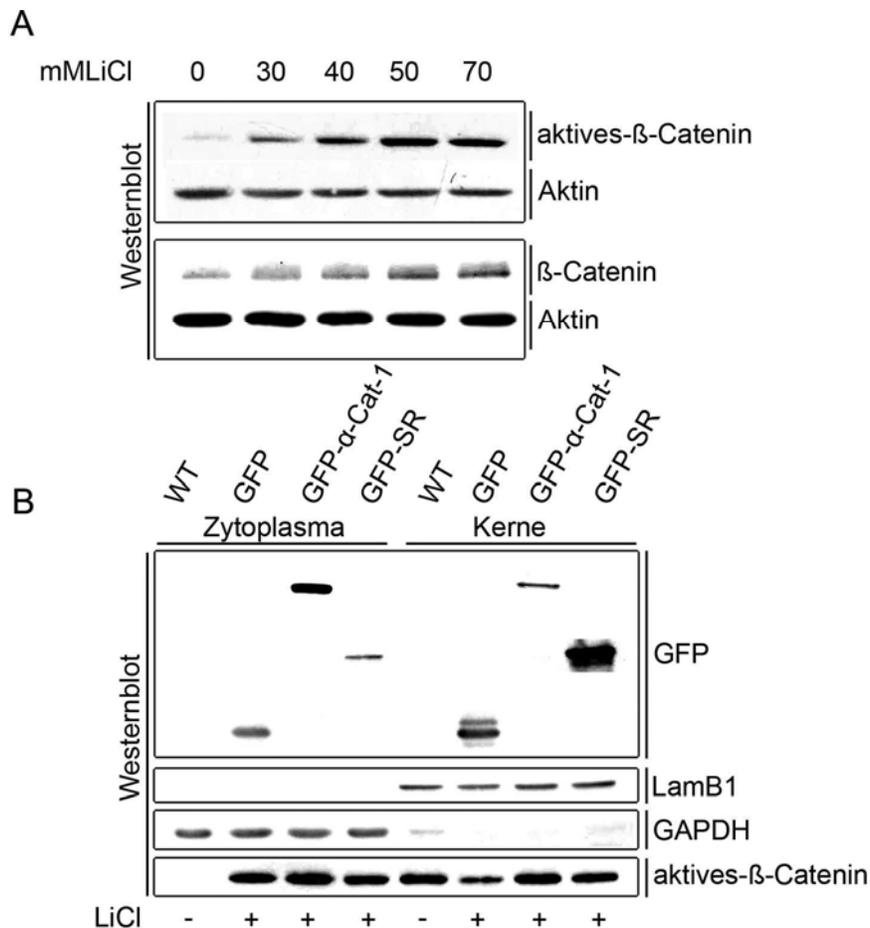


Abb. 3.35 LiCl induziert die Akkumulation von β -Catenin. (A) COS7 Zellen wurden über Nacht mit ansteigenden Konzentrationen von LiCl behandelt. Die Totallysate der Zellen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot analysiert. Die Membranen wurden mit Antikörpern umgesetzt, die gegen aktives- β -Catenin (Klon 8E7) bzw. Gesamt β -Catenin (Klon 6F9) gerichtet sind. (B) GFP-SR, Vollängen GFP- α -N-Catenin-1 und GFP (leerer Vektor) exprimierende COS7 Zellen wurden über Nacht mit 40 mM LiCl behandelt. Für die anschließende Fraktionierung wurden zusätzlich unbehandelte (WT) Zellen verwendet. An- und Abwesenheit von LiCl ist durch + bzw. - markiert. Für die Darstellung der GFP-Fusionsproteine im Immunblot wurde mAk K3-184-2 verwendet. Zytoplasma und Kernfraktion wurden mit GAPDH (Klon 71.1) und LamB1 (LamB1, Abcam) unterschieden.

Um den Einfluss von Kernmembran-assoziiertem Vollängen GFP- α -N-Catenin-1 und GFP-SR auf die Menge an β -Catenin im Kern beurteilen zu können, wurden Zellen, die diese Fusionsproteine exprimieren, mit LiCl behandelt und fraktioniert. Im Zytoplasma ist ein Anstieg der Menge von aktivem- β -Catenin in Anwesenheit von LiCl zu beobachten, während im Kern kein Anstieg zu verzeichnen ist (Abb. 3.35B). Die Konzentration von aktivem- β -

Catenin im Zellkern von unbehandelten Zellen ist vergleichbar mit der nach einer Zugabe von LiCl. Da keine Veränderung des intranukleären aktiven- β -Catenins im Zellkern stattfindet, kann das System nicht zur Untersuchung der Rolle der Proteine bei der Passage der Zellkernmembran verwendet werden.

4 Diskussion

4.1 α -N-Cat* - ein neuer Bindungspartner von Nesprin-2

Nesprin-2 ist ein Protein der Kernmembran, für das mehrere Isoformen identifiziert wurden, die Unterschiede im Molekulargewicht und in der Domänenkomposition aufweisen. Die große, 800 kDa umfassende giant Isoform von Nesprin-2 besitzt zwei N-terminale Calponin-Homologie Domänen, welche die Bindung an Aktin vermitteln. Am C-Terminus befindet sich eine KASH-Domäne (Klarsicht/ANC-1/Syne-1 homology), die für die Verankerung an der Kernhülle verantwortlich ist. Beide Domänen werden durch ein Segment von Spektrinwiederholungen getrennt (Lüke et al., 2008, Abb. 3.1). Das Volllängenprotein Nesprin-2 giant lokalisiert an der äußeren Kernmembran, kleinere Isoformen sind sowohl an der äußeren als auch der inneren Kernmembran beschrieben worden (Warren et al., 2005).

Im Vorfeld der Arbeit wurden mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems neue Bindungspartner von Nesprin-2-SR gesucht (Schneider, 2005). Nesprin-2-SR ähnelt der tatsächlich vorkommenden Isoform Nesprin-2 Δ TM₁ (Zhang et al., 2005). Es beinhaltet die vier C-terminalen Spektrinwiederholungen vor der Transmembrandomäne und besitzt keine KASH- oder Aktinbindungsdomäne. In Fibroblasten (COS7 Zellen, Abb. 3.2) und Epithelzellen (HaCaT Zellen Abb. 3.27, MDCK-2 Zellen Abb. 3.19) lokalisiert es entlang der Kernhülle. Das im Hefe-Zwei-Hybrid-System gefundene α -Catenin-Fragment (α -N-Cat*) konnte dem C-Terminus von α -N-Catenin zugeordnet werden. Bisher wurden in der Literatur drei α -N-Catenin Proteine beschrieben, nämlich α -N-Catenin-1, -2 und -3. Das α -N-Catenin Gen (*CTNNA2*) kodiert für 18 Exone und enthält eine alternative Transkriptionsinitiationsstelle. α -N-Catenin-2 überspannt alle 18 Exone, in α -N-Catenin-1 fehlt der durch Exon 17 kodierte Bereich. α -N-Catenin-3 wurde erst kürzlich beschrieben und wird von einem Translationsinitiationspunkt, der sich zwischen den Exonen sechs und sieben befindet, translatiert (Mexal et al., 2008). Die verbleibende Sequenz stimmt mit

der von α -N-Catenin-1/-2 überein. Das α -N-Cat*-Fragment unterscheidet sich von den bisherigen Isoformen, da sowohl Exon 16 als auch Exon 17 fehlen (Abb. 3.4). Eine Aussage über den N-terminalen Sequenzbereich konnte zunächst nicht getroffen werden, da α -N-Cat* ein partielles cDNA-Produkt war. Eine Sequenzsuche auf Proteinebene in den Datenbanken des NCBI hat α -N-Cat* als Bestandteil einer neuen Isoform identifiziert, die entsprechend der Nomenklatur der übrigen Isoformen als α -N-Catenin-4 bezeichnet wird.

Die Interaktion von Nesprin-2 und α -N-Catenin wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Die Besonderheit dieser Interaktion liegt darin, dass diese Proteine zwei völlig unterschiedlichen Kompartimenten zugeordnet werden. Nesprine (Nesprin-1/-2/-3/-4) sind in erster Linie als Kernmembranproteine bekannt (Zhang et al., 2001, Wilhelmsen et al., 2005, Roux et al., 2009). Nesprine sind am Golgi-Apparat (Gough et al., 2003), dem sarkoplasmatischen Retikulum, Fokalkontakten und Lamellopodien gefunden worden (Zhang et al., 2005). Hierbei wurde den Nesprinen eine Aufgabe bei der Verankerung von Organellen mit dem Zytoskelett zugeschrieben (Warren et al., 2005).

Das neuronenspezifische α -N-Catenin, als auch α -E- und T-Catenin werden in ihrer Lokalisation und Funktion in erster Linie der Plasmamembran bzw. den Adhärensverbindungen zugeordnet (Kobiela & Fuchs, 2004). Nicht zuletzt durch seine Interaktion mit einer Vielzahl von aktinbindenden Proteinen besitzt α -Catenin eine bedeutende Rolle bei der Organisation des Aktinzytoskeletts (Scott & Yap, 2006, Pokutta et al., 2008). Unsere Ergebnisse der Interaktion von Nesprin-2 und α -N-Cat* aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-System konnten mit Hilfe von GST-Präzipitationen bestätigt werden. Hierbei zeigte sich, dass α -N-Cat* die stärkste Affinität zu Nesprin-2-SR1+2 aufweist. Umgekehrt scheinen die Bindestellen von Nesprin-2-SR über das gesamte α -N-Cat*-Fragment verteilt zu sein, da jede α -N-Cat* Deletionsvariante zur Interaktion fähig ist (Abb. 3.5, Abb. 3.6).

Die subzelluläre Lokalisation von α -N-Cat* unterstützt die Interaktion mit Nesprin-2. In COS7 Zellen lokalisiert α -N-Cat* einschließlich aller untersuchten Deletionsvarianten in mehr als 90% der Zellen entlang der Kernhülle (Abb. 3.7, Abb. 3.8). Die Quantifizierung hat ergeben, dass lediglich GFP- α -N-Cat* Δ Ex18/15 vermindert an der Kernhülle nachweisbar ist und bevorzugt im Zellkern vorkommt (Abb. 3.9).

4.2 Nesprin-2 interagiert mit α -N-/E-Catenin

Es gibt drei verschiedene α -Catenine- E, T und N, die durch unterschiedliche Gene kodiert werden. Sie unterscheiden sich in ihren Verteilungsmustern. α -E-Catenin wird ubiquitär exprimiert, am stärksten in epithelialen Geweben, α -T-Catenin kommt in erster Linie in Herz und Hoden vor, kann aber zusätzlich in weiteren Geweben nachgewiesen werden, α -N-Catenin weist die deutlichste Spezifizierung auf und ist nur in neuronalen Geweben nachweisbar (Janssens et al., 2001). Wie bereits diskutiert, stellt α -N-Cat* ein Fragment einer bisher unbekanntenen Isoform dar. Ein Ziel der Arbeit war es zu überprüfen, ob die Interaktion von Nesprin-2 zu α -N-Cat* auf diese spezielle Isoform begrenzt ist oder ob sie für weitere α -N-Catenine bzw. das ubiquitär vorkommende α -E-Catenin bestätigt werden kann.

Sequenzvergleiche zwischen den α -E-/T-/N-Cateninen demonstrieren, dass die Proteine auf Ebene der Aminosäuren ein hohes Maß an Homologie aufweisen. Die Übereinstimmungen liegen zwischen 56 und 76%, wobei die Werte unter Einbeziehung von ähnlichen Aminosäuren auf 70-83% steigen (Kobielak & Fuchs, 2004). α -N-Cat* umfasst 155 Aminosäuren, deren Sequenz dem C-Terminus von α -N-Catenin entspricht. Zum Nachweis der Übertragbarkeit wurden zunächst die C-Termini der verschiedenen α -Catenine und ihrer Isoformen mit der von α -N-Cat* verglichen (Abb. 3.10). Die Auswertung ergab, dass die C-Termini auf Proteinebene zwischen 53 (α -T-Catenin) und 77% (α -N-Catenin-1/-3) identisch sind. Das verwendete Programm bewertet 'Lücken' in der Sequenz negativ, auch wenn diese wie z. B. zwischen α -N-Catenin-1 und -2 auf unterschiedlichem Spleißen beruhen. In diesem Falle fehlt in α -N-Catenin-1 ein Exon, welches in α -N-Catenin-2 translatiert wird. Die verbleibenden Aminosäuren in den Sequenzen unterscheiden sich jedoch nicht.

Die Interaktionsstudien haben ergeben, dass sich der Bindungsbereich von Nesprin-2-SR an α -N-Cat* auf das gesamte Fragment erstreckt (Abb. 3.5, Abb. 3.6). Ausgehend von dieser Beobachtung kann postuliert werden, dass zur Interaktion befähigte Aminosäuren verteilt in der Sequenz vorliegen und dass eine enge räumliche Aneinanderreihung von einzelnen Aminosäuren nicht essentiell ist. Aus diesem Grund wurden die Sequenzvergleiche so erweitert, dass die negativen Bewertungen der Lücken entfallen und reine

Sequenzübereinstimmungen geprüft werden. Dies hat ergeben, dass Übereinstimmungen von 75,5% für α -T-Catenin und 99,6% für α -N-Catenin-2 mit α -N-Cat* vorliegen. GST-Bindungsanalysen haben diese Daten unterstützt und gezeigt, dass sowohl Vollängen GFP- α -N-Catenin-1 als auch Myc- α -E-Catenin mit GST-markierten Nesprin-2-SR1+2 präzipitieren (Abb. 3.12). Somit konnte die Interaktion auf weitere α -Catenine übertragen und eine Isoform- oder Gewebsspezifität der Interaktion ausgeschlossen werden. Ein Einfluss der Proteinfusion (GFP, Myc) auf die Interaktion konnte ebenfalls ausgeschlossen werden.

Der Nachteil dieses Nachweises liegt darin, dass beide Interaktionspartner in überexprimierter bzw. aufgereinigter Form verwendet wurden. Aus diesem Grund wurde die Interaktion in einer Koimmunpräzipitation bestätigt, in der ausschließlich endogene Proteine beteiligt waren (Abb. 3.15). Die Koimmunpräzipitation (Abb. 3.15) wurde an HaCaT Zellen durchgeführt. Hierbei handelt es sich um spontan immortalisierte Epithelzellen adulter, humaner Haut (Boukamp et al., 1988). Diese Keratinozyten bilden in der Zellkultur einen geschlossenen Zellrasen, bei dem die Zellen untereinander Kontakte ausbilden. An der Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte sind Adhärensverbindungen beteiligt, für deren Aufbau α -Catenin essentiell ist (Scott & Yap, 2006). Somit unterscheiden sich HaCaT Zellen von COS7 Zellen, die als Fibroblasten-ähnliche Zellen nur eine geringe Tendenz zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten aufweisen. Die subzelluläre Lokalisation von α -Catenin Fusionsproteinen in HaCaT Zellen unterscheidet sich deutlich von der in COS7 Zellen, in denen alle verwendeten Proteine, sowohl C-terminale Fragmente (Abb. 3.7, Abb. 3.8) als auch Vollängenproteine (Abb. 3.13), eine gleichmäßige Anreicherung an der Kernhülle zeigen. In HaCaT Zellen zeigen nur C-terminale α -N-Cat*-Fragmente eine Lokalisation an der Kernhülle. Das Vollängenprotein α -N-Catenin-1 hingegen weist die bekannte Anreicherung an der Plasmamembran auf (Abb. 3.16) (Janssens et al., 2001, Pokutta et al., 2008, Kobiela & Fuchs, 2004). Hieraus lässt sich schließen, dass Vollängen α -Catenin durch Interaktionen z.B. an der Plasmamembran daran gehindert werden kann, an den Zellkern zu gelangen. Die geringe Zahl an HaCaT Zellen, in denen C-terminale α -Cat*-Fragmente an der Kernhülle akkumulieren (ca. 2-12%, Abb. 3.17), weist darüber hinaus darauf hin, dass zusätzliche

Interaktionen am C-terminus α -Catenin an der Plasmamembran binden. F-Aktin und ZO-1 sind bekannte Interaktionspartner in diesem Bereich (Kapitel 1.6). Beide sind Komponenten von Zell-Zell-Kontakten und könnten eine solche Funktion übernehmen. Die Frage, ob das Verteilungsmuster von α -Catenin Fusionsproteinen in HaCaT und COS7 Zellen zelltypspezifisch ist oder auch in weiteren Zelllinien beobachtet werden kann, wurde in HeLa und MDCK-2 Zellen überprüft, wobei die Resultate aus COS7 und HaCaT Zellen bestätigt werden konnten. HeLa Zellen weisen eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie mit geringer Tendenz zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten auf. Das Volllängenprotein Myc- α -E-Catenin lokalisiert in diesen Zellen an der Kernhülle (Abb. 3.18). Im Gegensatz dazu lokalisieren in MDCK-2 Zellen (Epithelzellen aus der Hundeniere) nur solche rekombinanten Proteine an der Kernhülle, die dem C-Terminus von α -N-Catenin entsprechen, während Volllängen GFP- α -N-Catenin-1 an der Plasmamembran beobachtet wird (Abb. 3.18).

Ausgehend von der Fähigkeit von Nesprin-2 und α -Catenin miteinander zu interagieren, wurde nicht nur die Lokalisation von α -Catenin Fusionsproteinen überprüft, sondern auch die von Nesprin-2-SR, das in verschiedenen Zelllinien an der Kernhülle lokalisiert. In der Epithelzelllinie MDCK-2 lokalisiert Nesprin-2-SR sowohl an der Kern- als auch an der Plasmamembran, wo es mit α -Catenin überlagert (Abb. 3.19). Eine statistische Auswertung bestätigt, dass das Fusionsprotein in beiden Kompartimenten der Zelle nachgewiesen werden kann und dass sich die Lokalisationen nicht gegenseitig ausschließen (Abb. 3.19).

4.3 Verteilungsmuster von endogenem Nesprin-2 und α -Catenin

Die bisher diskutierten Lokalisationsstudien beziehen sich auf Fusionsproteine von Nesprin-2 und α -Catenin. Entscheidend bei der Untersuchung der biologischen Signifikanz einer Interaktion sind jedoch die Verteilungsmuster der endogenen Proteine. Im Folgenden werden verschiedene experimentelle Ansätze diskutiert, die belegen, dass sowohl endogenes Nesprin-2 als auch

α -Catenin entsprechend ihrer Interaktion überlagernd an der Plasmamembran bzw. der Kernmembran nachgewiesen werden können.

4.3.1 Endogenes Nesprin-2 an der Plasmamembran

In Schnitten gesunder menschlicher Haut kann Nesprin-2 mit Hilfe von Antikörpern, die gegen den C- und N-Terminus des Proteins gerichtet sind, an der Kernmembran, nicht aber an der Plasmamembran nachgewiesen werden (Abb. 3.20). Primäre humane Keratinozyten weisen ein anderes Verteilungsmuster auf. Die Zellen wurden unter hohen bzw. niedrigen Kalziumkonzentrationen beobachtet. Kalzium wird für die Aufrechterhaltung von Adhärensverbindungen benötigt (van Roy & Berx, 2008) und eine Reduktion unter 0.08 mM bewirkt in der Zellkultur die Auflösung von Zell-Zell-Kontakten (Vasioukhin & Fuchs, 2001). Nesprin-2 akkumuliert bei hohen- bzw. niedrigen Kalziumkonzentration entlang der Kernhülle. In Zellen, die durch die Gegenwart von Kalzium in Kontakt stehen, kann Nesprin-2 mit dem C-Terminus spezifischen Antikörper, der die große und verschiedene kleinere Isoformen detektiert, entlang der gesamten Plasmamembran nachgewiesen werden. mAk K20-478, der die große Nesprin-2 giant Isoform detektiert, zeigt hier kein Signal. Daraus lässt sich ableiten, dass in primären humanen Keratinozyten nur kleinere Isoformen an die Plasmamembran gelangen (Abb. 3.21).

Bei Untersuchungen an immortalisierten humanen Keratinozyten (HaCaT Zellen) konnten diese Verteilungsmuster nicht bestätigt werden. Hier ist Nesprin-2 im Gegensatz zu den primären humanen Keratinozyten nicht an der Plasmamembran nachweisbar (Abb. 3.22). Die Untersuchung verwundeter, menschlicher Haut hat gezeigt, dass Nesprin-2 an der Plasmamembran akkumuliert (Abb. 3.23). Die verwendeten Antikörper deuten darauf hin, dass sowohl die große wie auch kleinere Isoformen an der Plasmamembran lokalisieren, wobei letztere die stärkeren Signale lieferten. Die Unterschiede in den Ergebnissen lassen ein Verteilungsmuster von Nesprin-2 und dessen Isoformen an der Plasmamembran, das abhängig vom Differenzierungsstatus der Zelle ist, und eine Rolle in der Zellmigration vermuten. Die Daten ergänzen damit vorherige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, in denen gezeigt werden konnte, dass N-terminale Nesprin-2 Isoformen bei der Zellmigration in

Wundheilungsexperimenten von COS7 Zellen am Zellkern und der Spitze der Führungslamelle nachgewiesen werden konnten (Libotte, 2004, Zhen et al., 2002). In einer weiteren Arbeit wurde Nesprin-2 mit Hilfe von Antikörpern, die gegen den N- und C-Terminus des Proteins gerichtet sind, an der Plasmamembran von Fibroblasten humaner Haut beschrieben (Zhang et al., 2005).

Wundheilungsexperimente in COS7 Zellen (Libotte, 2004) und die Untersuchung der primären humanen Keratinozyten (Abb. 3.21) zeigen, dass Nesprin-2 in den Führungslamellen migrierender Zellen und an den Zell-Zell-Kontakten mit Aktin überlagert. Die Interaktion von Nesprin-2 mit α -Catenin könnte daher bei der Organisation von Aktin eine Rolle spielen. Das Aktinzytoskelett migrierender Zellen ist sehr dynamisch und α -Catenin hat eine wichtige Funktion bei dessen Organisation. Lamellopodien migrierender Zellen weisen einen großen Anteil an verzweigten Aktinfilamenten auf, die durch Proteine wie Arp2/3 gebildet werden (Pollard & Borisy, 2003). Die Lamellopodien bilden die ersten Kontaktpunkte zwischen den Zellen. Im Zuge der Etablierung reifer Zell-Zell-Kontakte wird das verzweigte Aktinnetzwerk mit linearen Aktinfasern ersetzt, die unter anderem durch Formine gebildet werden (Pokutta et al., 2008). α -Catenin kann Formin rekrutieren und binden (Kobielak et al., 2004), Arp2/3 inhibieren (Drees et al., 2005) und damit den Übergang von den verzweigten Aktinstrukturen hin zu linearen Aktinfilamenten beeinflussen. Darüber hinaus sind für α -Catenin eine Vielzahl weiterer Interaktionen mit aktinbindenden Proteinen bekannt (Kapitel 1, Abb.1.7). Die Unterschiede in den Färbungen gesunder und verwundeter menschlicher Haut sowie den primären humanen Keratinozyten könnten auf Unterschiede im Differenzierungsstatus von Zellen beruhen oder sie sind darauf zurückzuführen, dass die in Kultur gehaltenen Zellen bzw. in der Wundheilung größeren Umstrukturierungen unterworfen sind als Zellen in einem ausdifferenzierten Gewebe und somit Nesprin-2 an der Plasmamembran nachweisbar ist. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass die Lokalisation von Nesprin-2 an der Plasmamembran gewebespezifisch ist. Nesprin-2 konnte auch am Sakrolemm, der Zellmembran von Muskelzellen, nachgewiesen werden (Zhang et al., 2005, Warren et al., 2005).

4.3.2 Endogenes α -Catenin an der Kernhülle

Analog zu den Lokalisationsstudien von Nesprin-2, die im vorherigen Kapitel diskutiert wurden, wurde auch die subzelluläre Verteilung von endogenem α -Catenin in Geweben und in Zelllinien untersucht. Die Immunfärbung menschlicher Haut stimmt mit dem 'klassischen' Bild von α -Catenin entlang der Zellperipherie überein (Abb. 3.20), wo es für die Aufrechterhaltung von Adhärensverbindungen notwendig ist. Primäre humane Keratinozyten zeigen ein differenzierteres Verteilungsmuster. Hier lokalisiert das Protein in Anwesenheit von Kalzium ebenfalls an der Plasmamembran. Eine Erniedrigung der Kalziumkonzentration verhindert die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und führt zu einer Abnahme von α -Catenin an der Plasmamembran. Zusätzlich kann in einer geringen Anzahl von Zellen das endogene Protein entlang der Kernhülle nachgewiesen werden, wo es mit Nesprin-2 überlagert (Abb. 3.21). Diese Daten unterstützen die vorherigen Beobachtungen in HaCaT Zellen, bei denen Vollängen Fusionsproteine an der Plasmamembran gehalten werden, wohingegen C-terminale Fragmente an die Kernhülle gelangen können (Abb. 3.16). Ausgehend von den Beobachtungen in primären humanen Keratinozyten wurde geprüft, ob die ungewöhnliche Lokalisation an der Kernhülle als genereller Phänotyp nach Kalziumentzug auf HaCaT Zellen übertragen werden kann. Die Immunfärbung der Zellen verdeutlicht, dass dies nicht der Fall ist (Abb. 3.22).

Aus diesem Grund wurde in weiteren experimentellen Ansätzen versucht, endogenes α -Catenin an der Kernhülle nachzuweisen. Eine wichtige Frage für die Bewertung der Lokalisation von α -Catenin entlang der Kernhülle von primären humanen Keratinozyten ist, ob die Auflösung von Zell-Zell-Kontakten, wie sie im Experiment demonstriert wurde, in einer in vivo Situation vorzufinden ist.

Im Gegensatz zum Experiment ist Kalzium, das für die Etablierung und Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten essentiell ist, in den Interzellularräumen der Epidermis humaner Haut in varrierenden Konzentrationen durchgehend vorhanden (Proksch et al., 2008), so dass ein vollständiger Entzug an keiner Stelle vorliegt. Dennoch kommt es in verschiedenen Prozessen innerhalb der Epidermis zur teilweisen Auflösung

bzw. Auflockerung von Zell-Kontakten. Ein Beispiel hierfür ist die Epidermis als ein sich selbsterneuerndes Gewebe mit permanenter Zellmigration. Teilungsfähige adulte Stammzellen der Epidermis befinden sich in der basalen Zellschicht. Post-mitotische Zellen suprabasaler Schichten teilen sich nicht mehr und differenzieren. Das Ziel dieses Differenzierungsweges ist die Ausbildung der toten verhornten Zellen des Stratum Corneum, der obersten Schicht der Epidermis (Fuchs & Raghavan, 2002). Dieser Prozess bedarf der Ablösung der Zellen von der Basalmembran und ihrer Migration in suprabasale Schichten.

Weitere Beispiele, in denen Zell-Zell-Kontakte aufgelockert werden und Zellen aus einem festen Verband auswandern, sind Wundheilungsprozesse und die Tumorgenese (Ebnet, 2008). In den frühen Entwicklungsphasen der Haut kommt es zunächst zur Ausbildung eines einschichtigen Epithels. Die Zellteilungen finden lateral statt. Im Zuge der Stratifizierung kommt es zu einer Umlagerung der Polarität der mitotischen Spindel, in Folge derer sich die Spindel perpendicular zur darunter gelegenen Basalmembran ausrichtet. Eine gezielte Ablation von α -Catenin in der Haut beeinträchtigt die epitheliale Polarität und führt unter anderem zu suprabasalen Mitosen, Effekte, die mit dem Verlust der Polarität und der Kontrolle der Spindelorientierung erklärt werden könnten (Lechler & Fuchs, 2005, Vasioukhin et al., 2001). Zur Prüfung der Frage, ob α -Catenin im Zuge der Spindelumlagerung am Zellkern lokalisiert, wurde die Epidermis der Maus an verschiedenen embryonalen Entwicklungstagen überprüft. α -Catenin konnte hierbei nicht in Assoziation mit der Kernhülle beobachtet werden (Abb. 3.24). Um festzustellen, ob α -Catenin in migrierenden Zellen an der Kernhülle lokalisiert, wurden MDCK-2 Epithelzellen mit HGF (*hepatocyte growth factor*, auch *scatter factor*) behandelt. Dieser Wachstumsfaktor verursacht die Auflösung von Zell-Zell-Kontakten und induziert unter anderem die Migration von Zellen (Stoker & Gherardi, 1989, Singh et al., 2004). Die HGF-Behandlung von MDCK-2 Zellen bewirkt eine Aufhebung der Plasmamembranassoziation von α -Catenin, eine Umlagerung an die Kernhülle konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 3.25).

Die Untersuchungen zeigen, dass endogenes α -Catenin an der Kernhülle nachweisbar ist, können jedoch keine Hinweise auf die biologische Signifikanz geben.

4.3.3 Gegenseitige Lokalisationseinflüsse zwischen Nesprin-2 und α -Catenin

Die bisherigen Daten zeigen ein komplexes Bild der subzellulären Lokalisationen von Nesprin-2 und α -Catenin. Beide Proteine können sowohl endogen wie auch als Fusionsproteine an der Kernhülle und der Plasmamembran nachgewiesen werden, wobei das bekannte Verteilungsmuster mit Nesprin-2 an der Kernhülle und α -Catenin an der Plasmamembran überwiegt. Die genauere Analyse der gegenseitigen Beeinflussung der Lokalisation der beiden Proteine wird im Folgenden diskutiert.

α -Catenin Fusionsproteine lokalisieren in COS7 Zellen an der Kernhülle (Abb. 3.9, Abb. 3.14). Eine Verdrängung von Nesprin-2 mit Hilfe dominant negativer Interferenz geht nicht mit einer Verdrängung von α -Catenin einher, was ein Zeichen dafür ist, dass das Protein über weitere Bindungspartner an der Kernhülle gebunden bleibt (Abb. 3.26). Gleiches gilt für die Lokalisation von Nesprin-2 an der Plasmamembran, für die in CloneA Zellen gezeigt werden konnte, dass sie nicht ausschließlich von α -Catenin bestimmt wird (Abb. 3.28).

Endogenes α -Catenin wird in COS7 Zellen nicht durch Nesprin-2-SR an die Kernhülle rekrutiert bzw. ist in der Immunfärbung nicht detektierbar (Abb. 3.26). Gründe hierfür könnten der relativ geringe Anteil an endogenem α -Catenin in der Fibroblasten ähnlichen Zelllinie COS7 sein. Eine weitere Möglichkeit ist, dass α -Catenin durch andere Interaktionen gebunden wird oder dass das Epitop des C-terminalen α -Catenin Antikörpers durch Interaktionen oder Konformationsänderungen im Protein nicht zugänglich ist. In HaCaT Zellen bewirkt eine Überexpression von Nesprin-2-SR ebenfalls keine Rekrutierung von endogenem α -Catenin an die Kernhülle (Abb. 3.27). Im Gegenzug kann auch eine Überexpression von α -Catenin an der Plasmamembran endogenes Nesprin-2 nicht rekrutieren (Abb. 3.27). Wie bereits diskutiert, besteht die Möglichkeit, dass α -Catenin in erster Linie in den Adhärensverbindungen gebunden wird und dadurch nicht an den Zellkern gelangen kann. Aus diesem Grund wurde der N-Terminus von α -N-Catenin in HaCaT Zellen exprimiert, der die β -Catenin Bindestelle enthält, um zu prüfen, ob das Fusionsprotein das

endogene Protein aus den Adhärensverbindungen verdrängen kann. Die Immunfärbung hat gezeigt, dass dies nicht stattfindet.

Das Fusionsprotein überspannt auch den α -Catenin Dimerisierungsbereich, der mit der Binderegion von β -Catenin überlappt (Pokutta et al., 2008). Möglicherweise wurde α -Catenin aus den Adhärensverbindungen verdrängt. Gelöst von der Bindung an β -Catenin in den Zell-Zell-Kontakten könnte es frei vorliegen, dimerisieren und in dieser Form an Plasmamembran nahes F-Aktin binden (Drees et al., 2005), so dass es nicht für eine Translokation an die Kernhülle zur Verfügung steht und weiterhin an der Plasmamembran lokalisiert. Diese Daten unterstützen die Vermutung, dass α -Catenin durch Interaktionen an der Plasmamembran gehalten wird und dass die Interaktion von Nesprin-2 mit α -Catenin ein hoch regulierter Prozess ist.

4.3.4 Rolle von α -Catenin in der Organisation des perinukleären F-Aktins

Die Rolle von α -Catenin in der Organisation des plasmamembranständigen Aktinzytoskeletts wurde bereits in einer Vielzahl von Veröffentlichungen diskutiert (Scott & Yap, 2006, Kobiela & Fuchs, 2004, Pokutta et al., 2008). Von besonderer Bedeutung war in diesem Zusammenhang der Befund, dass plasmamembrannahes Aktin eine größere Dynamik aufweist als E-Cadherin und α - β -Catenin, was gegen eine starre Verknüpfung des F-Aktins mit den Adhärensverbindungen spricht (Yamada et al., 2005). Hierbei wurde postuliert, dass α -Catenin eher die Rolle eines Organisators als die eines Bindegliedes zum F-Aktin übernimmt (Pokutta et al., 2008). Der Einfluss von α -Catenin auf das perinukleäre F-Aktin wurde in zwei Ansätzen untersucht. In HaCaT Zellen wurde geprüft, ob die Reduktion von α -Catenin einen Einfluss auf die Zahl der Zellen mit F-Aktin an der Kernhülle hat (Abb. 3.30). In COS7 Zellen wurde untersucht, ob kernmembranständiges α -Catenin Fusionsprotein F-Aktin an die Kernhülle rekrutieren kann (Abb. 3.31). In beiden Fällen konnte kein Einfluss von α -Catenin auf F-Aktin festgestellt werden, so dass eine Funktion in der Organisation des perinukleären F-Aktins ausgeschlossen werden kann.

4.3.5 Bedeutung der Nesprin-2 α -Catenin Interaktion in der Regulation der intranukleären Menge von β -Catenin

Die Transkription von Zielgenen im kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg wird durch eine Abfolge von Protein-Protein-Interaktionen und Phosphorylierungsereignissen, in deren Mittelpunkt das β -Catenin steht, bestimmt (Gordon & Nusse, 2006). β -Catenin ist ein Protein mit dualer Funktion. Einerseits ist es an der Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten an Adhärensverbindungen beteiligt (Pokutta & Weis, 2007, Yap et al., 1997), andererseits übernimmt es die zentrale Rolle bei der Signaltransduktion im kanonischen Wnt-Signalweg (Willert & Nusse, 1998, Clevers, 2006). Dieser wurde Ende der 1970er, Anfang der 1980er Jahre entdeckt und ist seither das Ziel einer Vielzahl von Studien (Sharma & Chopra, 1976, Nüsslein & Volhard, 1980, Nusse & Varmus, 1982). Inzwischen konnten viele der beteiligten Komponenten identifiziert werden. Bei der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges kommt es zu einer Inaktivierung eines Degradationskomplexes, durch den β -Catenin im Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut wird (Aberle et al., 1997). Das hat zur Folge, dass β -Catenin im Zytoplasma akkumuliert und in den Zellkern gelangt, wo es Transkriptionsinhibitoren wie Groucho an TCF- (T-Zell-Faktor) Transkriptionsfaktoren ersetzt und die Transkription von Zielgenen ermöglicht (Gordon & Nusse, 2006). Auf dem Weg vom Zytoplasma zu den Zielgenen passiert β -Catenin über Nuklearporenkomplexe die Kernhülle, die eine selektiv permeable Barriere darstellt (Koike et al., 2004).

Die Ereignisse an der Kernhülle gehören zu den am wenigsten verstandenen Prozessen im Wnt-Signalweg (Willert & Nusse, 1998, Clevers, 2006). Im Folgenden werden Experimente diskutiert, die zur Aufklärung dieses Prozesses beitragen können. Es wurde zunächst geprüft, ob integrale Proteine der Kernhülle im Zusammenhang mit β -Catenin beschrieben wurden. Es zeigte sich, dass Emerin ein β -Catenin Bindeprotein ist und an der Regulierung von dessen intranukleärer Menge beteiligt ist (Markiewicz et al., 2006). Die Bindung von Nesprin-2 zu Emerin wurde von mehreren Autoren beschrieben (Libotte et al., 2005; Wheeler et al., 2007), die Interaktion zwischen Nesprin-2 und α -Catenin wurde in dieser Arbeit berichtet (Abb. 3.3, Abb. 3.12, Abb. 3.15). Um

zu prüfen, ob Nesprin-2, Emerin und α -Catenin den Transport von β -Catenin an der Kernmembran beeinflussen, wurde zunächst gezeigt, dass diese Proteine in vitro untereinander einen Komplex ausbilden können (Abb. 3.32).

Da für Emerin (Markiewicz et al., 2006) und α -Catenin (Inge et al., 2008) bereits bekannt ist, dass sie einen Einfluss auf die intranukleäre Menge von β -Catenin haben, haben wir uns auf Nesprin-2 konzentriert. In einem ersten Ansatz haben wir den Einfluss einer Entfernung von Nesprin von der Kernhülle durch das dominant negativ interferierende SPGFP-Sun-1-C auf intranukleäres β -Catenin in HaCaT Zellen überprüft (Abb. 3.33). Hierbei wurden Kontrollzellen und solche, die SPGFP-Sun-1-C oder das Kontrollprotein SPGFP exprimieren, fraktioniert. Die Westernblot-Analyse mit einem β -Catenin Antikörper, der speziell das aktive (unphosphorylierte) β -Catenin erkennt (van Noort et al., 2007) zeigt, dass in Wildtyp HaCaT Zellen aktives β -Catenin im Zellkern vorhanden ist und dass die Verdrängung von Nesprin-2 zu dessen Reduktion führt (Abb. 3.33). Bei einer Reduktion von Nesprin-2 mittels shRNA konnte dieses Ergebnis bestätigen werden (Abb. 3.34).

4.3.6 Ereignisse an der Kernhülle beim Transport von β -Catenin in den Zellkern

Die in den vorangehenden Kapiteln diskutierten Daten bestätigen, dass Proteine innerhalb einer Zelle nicht einer starren räumlichen Zuordnung unterworfen sein müssen, sondern dass sie in verschiedenen Kompartimenten unterschiedliche Funktionen erfüllen können. Ein Beispiel für ein solches Protein ist β -Catenin. An der Plasmamembran übernimmt es eine strukturelle Aufgabe, nämlich die Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten. Im Zellkern fungiert es als Transkriptionsfaktor und ermöglicht die Transkription von Zielgenen des kanonischen Wnt-Signalweges. Mit zunehmender Charakterisierung von α -Catenin wird deutlich, dass es dem β -Catenin in diesem Verhalten ähnelt.

α -Catenin wurde zunächst als Strukturprotein in Adhärensverbindungen beschrieben (Hirano et al., 1992). Neuere Daten weisen jedoch auf weitere regulatorische Einflüsse wie bei der Organisation des Aktinzytoskeletts und in der Signaltransduktion hin (Lien et al., 2006, Pokutta et al., 2008). Wir konnten

demonstrieren, dass α -Catenin neben den Zell-Zell-Kontakten auch an der Kernhülle lokalisiert (Abb. 3.13, Abb. 3.21). Inge und Kollegen konnten zeigen, dass α -Catenin ein Schlüsselregulator der transkriptionellen Aktivität von β -Catenin ist und der Verlust von α -Catenin zu einer Akkumulation von β -Catenin im Zellkern und damit zu einer gesteigerten Zellproliferation führt (Inge et al., 2008). Um die Nesprin-2 - α -Catenin Interaktion in diesen Zusammenhang einordnen zu können, haben wir im Westernblot den Einfluss von Nesprin-2 auf die Menge von β -Catenin im Kern untersucht, wobei wir feststellen konnten, dass eine Reduktion von Nesprin-2 an der Kernhülle zu einer Abnahme der β -Catenin Menge im Zellkern führte. Diese Daten sind in einem Modell zusammengefasst, in das auch Beobachtungen aus den Lokalisationsstudien von α -Catenin einfließen (Abb. 4.1).

In Abwesenheit eines Wnt-Liganden wird β -Catenin im Degradationskomplex phosphoryliert (Clevers, 2006) (Abb. 4.1A). Die Phosphorylierung macht β -Catenin zum Ziel von β TrCP (beta-transducin repeat-containing protein), einer E3 Ubiquitin Ligase, wodurch es zur Polyubiquitinierung und dem Abbau von β -Catenin im Proteasom kommt (Brembeck et al., 2006, Aberle et al., 1997, Winston et al., 1999). β -Catenin bindet an Cadherin an der Plasmamembran, α -Catenin bindet an β -Catenin und verbindet den Adhäsionskomplex mit dem Aktinzytoskelett (Kobielak & Fuchs, 2004). Nesprin-2 und Emerin lokalisieren an der Kernhülle. Nach Bindung eines Liganden (Abb. 4.1C) kommt es zur Inaktivierung des Degradationskomplexes und β -Catenin akkumuliert im Zytoplasma. Es besteht die Möglichkeit, dass es in der Zelle zwei getrennte β -Catenin Mengen gibt, eine die für Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte und eine weitere, die frei im Zytoplasma vorliegt und in die Signaltransduktion involviert ist (Clevers, 2006). Daten aus *C. elegans* bestätigen dies, da hier zwei unterschiedliche β -Catenin Homologe die jeweilige Aufgabe übernehmen (Korswagen et al., 2000). Ausgehend von dieser Beobachtung sollte nur freies β -Catenin für die Wnt-Signaltransduktion verfügbar sein. Dieses könnte einen Heterodimer mit α -Catenin bilden. Endogenes α -Catenin liegt in der Zelle frei als Monomer und Dimer vor (Drees et al., 2005), so dass α - und β -Catenin miteinander interagieren können.

Eine weitere Möglichkeit, wie das im Modell dargestellte α -/ β -Catenin Heterodimer entstehen könnte, ist durch Auflösung der Adhärensverbindungen.

Die Stabilität von Adhärenzverbindungen wird besonders durch Phosphorylierungen von β -Catenin bestimmt. Eine Phosphorylierung von Y654 führt zu einer Schwächung der Bindung von β -Catenin an E-Cadherin (Roura et al., 1999, Piedra et al., 2001). Auf diese Weise könnten sich die α -/ β -Catenine von den Adhärenzonen lösen und an die Kernhülle gelangen, wo sie mit Nesprin-2 und Emerin interagieren. Emerin besitzt eine Rolle bei der Regulierung der intranukleären Menge von β -Catenin (Markiewicz et al., 2006). Die Autoren konnten zeigen, dass Emerin über eine APC-ähnliche Domäne im C-terminalen Bereich vor der Transmembrandomäne (AS 168-186) mit β -Catenin interagiert. Ähnlich wie für APC (Henderson & Fagotto, 2002) wurde hierbei auch für Emerin eine Rolle im Export von β -Catenin vorgeschlagen.

Emerin wurde lange Zeit ausschließlich als integrales Typ-2-Transmembranprotein der inneren Kernmembran beschrieben (Markiewicz et al., 2006). Neuere Arbeiten weisen jedoch darauf hin, dass Emerin auch an der äußeren Kernmembran lokalisiert (Salpingidou et al., 2007). Unveröffentlichte Daten aus unserer Arbeitsgruppe bestätigen dies und weisen Emerin zusätzlich als Protein der KASH-Familie auf mit einer Topologie eines Typ-2-Transmembranproteins, bei dem der N-Terminus, der die β -Catenin-Bindestelle enthält, in das Zytoplasma ragt. Aufgrund dieser Topologie und der gezeigten Bindung von Nesprin-2, Emerin, α - und β -Catenin (Abb. 3.32) könnten Nesprin-2/Emerin eine Andockstelle für den α -/ β -Catenin Komplex an der Kernhülle bilden, wobei Emerin nicht den Transport von β -Catenin in den Zellkern fördern muss, sondern ein an der äußeren Kernhülle lokalisierter Anteil die Bindung von β -Catenin vermittelt. α -Catenin bindet an Nesprin-2. Fehlt Nesprin-2, kommt es zu einer Reduktion von β -Catenin im Kern (Abb. 3.33, Abb. 3.34), weil möglicherweise das α -/ β -Catenin Heterodimer nicht mehr effizient gebunden wird (Abb. 4.1D). Die Dissoziation des α -/ β -Catenin Heterodimers kann durch Phosphorylierung von β -Catenin an Y142 vorangetrieben werden (Brembeck et al., 2004, Brembeck et al., 2006). β -Catenin könnte nach dem Andocken an die Kernhülle in den Zellkern transportiert werden und α -Catenin könnte erneut zytoplasmatisches β -Catenin binden oder zurück zu den Adhärenzonen gelangen.

α -Catenin wurde bisher im Zusammenhang mit dem Wnt-Signalweg als negativer Regulator beschrieben (Hwang et al., 2005, Giannini et al., 2000, Inge

et al., 2008). Diese Rolle könnte es auch in dem vorgelegten Modell einnehmen. α/β -Catenin gelangen als Heterodimer an die Kernhülle und hier könnte ein weiterer Kontrollschritt stattfinden, bevor β -Catenin für den Transport in den Kern freigesetzt wird.

Der Einfluss von Nesprin-2 auf die intranukleäre Menge von β -Catenin wurde in HaCaT Zellen untersucht (Abb. 3.33, Abb. 3.34). In diesen Zellen ist endogenes α -Catenin nicht an der Kernhülle nachweisbar (Abb. 3.27). Die indirekte Immunpräzipitation in HaCaT Zellen bestätigt, dass in diesen Zellen eine Interaktion beider Proteine möglich ist (Abb. 3.15). Die Lokalisationsstudien der α -Catenin Fusionsproteine weisen darauf hin, dass Vollängen Proteine an der Plasmamembran zurückgehalten werden und C-terminale Proteine an die Kernhülle gelangen können (Abb. 3.16), was zu dem Schluss führt, dass die Interaktion zwischen α -Catenin und Nesprin-2 über Interaktionspartner hoch reguliert ist. Es lässt die Annahme zu, dass zwei α -Catenin Mengen in der Zelle vorliegen. Der größte Anteil lokalisiert an der Plasmamembran und an den Zell-Zell-Kontakten. Ein weiterer, kleinerer Anteil kann mit Proteinen der Kernhülle interagieren und gewährleisten, dass β -Catenin in die Zellkernhülle andocken kann. Hierbei muss es sich nicht nur um Nesprin-2 handeln. In COS7 Zellen konnte gezeigt werden, dass Nesprin-2 nicht allein für die Lokalisation von α -Catenin Fusionsproteinen an der Kernhülle verantwortlich ist (Abb. 3.26). Die Vorgänge an der Kernhülle könnten hierbei vergleichsweise schnell ablaufen, so dass es nicht zu einer nachweisbaren Akkumulation von α/β -Catenin an der Kernhülle kommt (Abb. 3.34). Für weitere Untersuchungen der Rolle von Nesprin-2 und α -Catenin beim Andocken bzw. den Transport von β -Catenin über die Kernhülle sollte ein induzierbarer Wnt-Signalweg etabliert werden (Abb. 3.35). Die LiCl-Behandlung von COS7 Zellen führte zu einem Anstieg der intrazellulären, nicht aber der intranukleären Menge von β -Catenin, so dass dieses System für die Fragestellung nicht verwendet werden kann.

4.3.7 Modell zur Funktion der Nesprin-2 α -Catenin Interaktion

Die in den vorangegangenen Kapiteln diskutierten Daten werden in einem Modell zusammengefasst, in dem Funktionen für Nesprin-2 an der Plasmamembran und α -Catenin an der Kernhülle vorgeschlagen werden (Abb. 4.1). Nesprin-2, zusammen mit weiteren integralen Membranproteinen wie Emerin, lokalisiert an der Kernhülle. α - β -Catenine lokalisieren in Abwesenheit eines Wnt-Liganden an der Plasmamembran. Zytoplasmatisches β -Catenin wird im Degradationskomplex phosphoryliert, was zum Abbau im Proteasom führt (Abb. 4.1A).

Wundheilungsexperimente der menschlichen Haut (Abb. 3.23), Differenzierungsstudien in primären humanen Keratinozyten (Abb. 3.21) und Lokalisationsstudien von Nesprin-2-SR Fusionsproteinen (Abb. 3.2, Abb. 3.19, Abb. 3.28) weisen auf eine Funktion von Nesprin-2 an der Plasmamembran hin (Kapitel 4.3.1). Auf Grund der Funktion von α -Catenin bei der Organisation des Aktinzytoskeletts und der Kollokalisierung von Nesprin-2 mit F-Aktin Strukturen an der Plasmamembran kann eine Beteiligung an diesen Prozessen vermutet werden. Die Lokalisation von α -Catenin an der Kernhülle scheint über Bindungspartner der Adhärensverbindungen reguliert zu werden (Kapitel 4.2, 4.3.2). Wird α -Catenin nicht an den Adhärensverbindungen gehalten, kann es an der Kernhülle nachgewiesen werden (Abb. 3.13, Abb. 3.21) (Abb. 4.1B).

Die Anwesenheit eines Wnt-Liganden inhibiert den Degradationskomplex und fördert die Akkumulation von β -Catenin im Zellkern (Abb. 4.1C). Der Nachweis eines Proteinkomplexes aus Nesprin-2, Emerin und α - β -Catenin (Abb. 3.32) unterstützt die Vermutung, dass die Interaktionen von Nesprin-2 und α -Catenin, sowie der von Emerin und β -Catenin an der Kernhülle, β -Catenin an der Kernhülle halten, woraufhin es in den Zellkern gelangen kann. Nesprin-2 und Emerin bilden hier eine Plattform, an die ein Heterodimer aus α - β -Catenin andocken könnte (Kapitel 4.3.6). Fehlt Nesprin-2, ist die β -Catenin Menge im Zellkern reduziert (Abb. 3.33, Abb. 3.34) (Abb. 4.1D). Die Ursache könnte sein, dass das α - β -Catenin Heterodimer durch das Fehlen von Nesprin-2 und seiner Interaktion mit α -Catenin nicht mehr effizient gebunden wird und dass dadurch der Transport von β -Catenin in den Zellkern gehemmt wird.

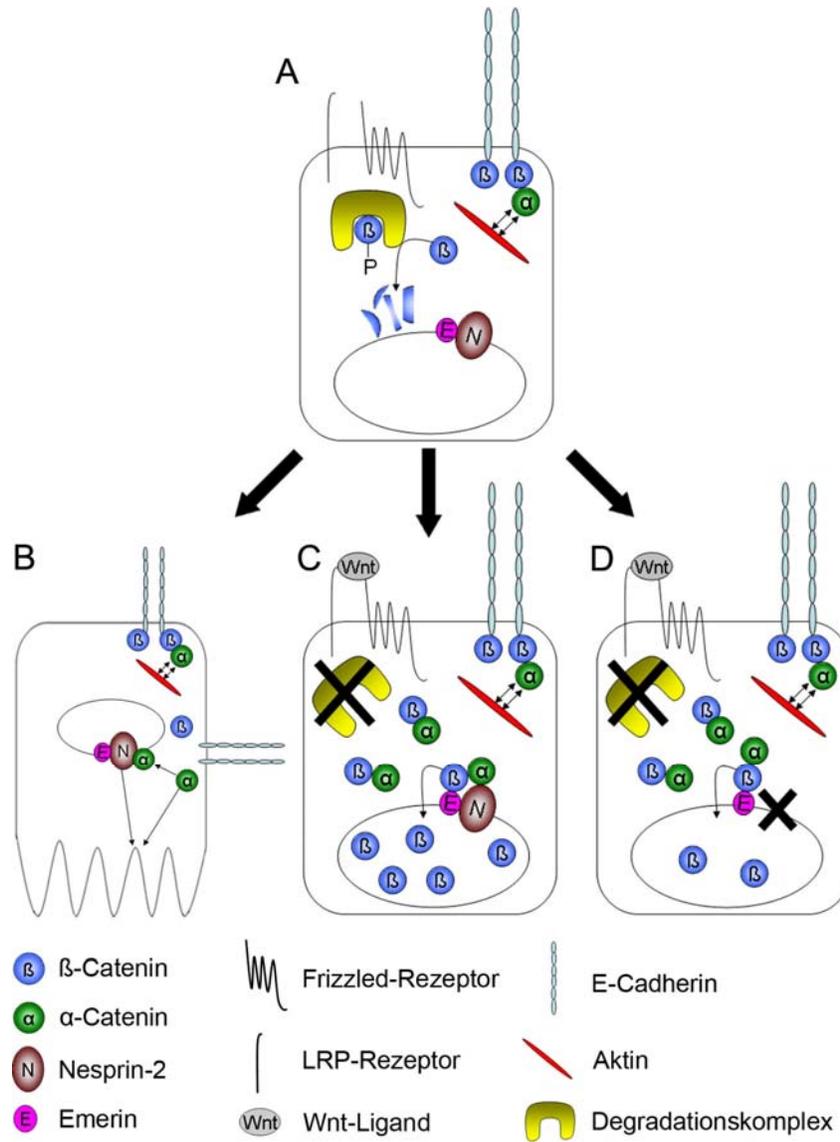


Abb. 4.1 Modell zur Funktion der Nesprin-2 α-Catenin Interaktion. (A) Zeigt eine Zelle mit inaktivem Wnt-Signalweg, in der Nesprin-2 und Emerin am Zellkern lokalisiert sind und α-/β-Catenin an Adhärenzverbindungen gebunden ist. Zytosolisches β-Catenin wird im Degradationskomplex phosphoryliert und für den Abbau markiert. (B) In der Zellmigration oder der Differenzierung von Keratinozyten kommt es zur Umlagerung von Nesprin-2 an die Plasmamembran. Die Auflösung oder Abwesenheit von Adhärenzverbindungen ermöglicht die Lokalisierung von α-Catenin an der Kernhülle. (C) Die Inaktivierung des Degradationskomplexes durch die Anwesenheit von Wnt-Liganden fördert die Akkumulation von zytoplasmatischem β-Catenin. Dies könnte mit monomerem α-Catenin einen Heterodimer bilden, der durch Nesprin-2 und Emerin an der Kernhülle gehalten wird. Nach Dissoziation des Komplexes gelangt β-Catenin in den Zellkern und α-Catenin kann zytoplasmatisches β-Catenin binden oder wieder zu den Adhärenzstellen gelangen. (D) Fehlt Nesprin-2, könnte dies die Effizienz der Bindung des α-/β-Catenin Heterodimers senken, so dass weniger β-Catenin in den Zellkern gelangt.

Zusammenfassung

Nesprine sind Kernmembran-assoziierte Moleküle, von denen bisher vier Formen (Nesprin-1, -2, -3, -4) identifiziert wurden. Sie haben eine strukturelle Funktion bei der Positionierung des Zellkerns und seiner Verknüpfung mit dem Zytoskelett. α -N-Cat*, das dem N-Terminus einer neuen Isoform des neuronenspezifischen α -N-Catenins entspricht (α -N-Catenin-4), wurde im Vorfeld dieser Arbeit mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems als neuer Interaktionspartner von Nesprin-2 identifiziert. α -Catenin ist ein Protein, das an Adhärensverbindungen lokalisiert und essentiell für deren Aufrechterhaltung ist. Bisher wurden α -E-/T-/N-Catenin identifiziert, die teilweise gewebsspezifisch exprimiert und durch unterschiedliche Gene kodiert werden. Die Interaktion beider Proteine konnte zusätzlich biochemisch verifiziert werden. Darüber hinaus konnten wir demonstrieren, dass auch α -N-Catenin-1 und α -E-Catenin zur Interaktion befähigt sind, wodurch gezeigt werden konnte, dass die Interaktion von Nesprin-2 mit α -Catenin nicht isoform- oder gewebsspezifisch ist.

In Lokalisationsstudien konnten wir eine für α -Catenin bisher nicht beschriebene Akkumulation an der Kernhülle zeigen. In Zellen mit einer Fibroblasten-ähnlichen Morphologie lokalisieren sowohl Vollängen- als auch C-terminale Fusionsproteine an der Kernhülle. In Keratinozyten sind Vollängenproteine an der Plasmamembran und C-terminale Polypeptide an der Kernhülle zu finden. Untersuchungen an endogenem α -Catenin in primären humanen Keratinozyten bestätigen dieses Verteilungsmuster. Es kann daher vermutet werden, dass α -Catenin durch Interaktionen an der Plasmamembran gehalten wird und die Interaktion zu Nesprin-2 hoch reguliert abläuft. In Übereinstimmung mit früheren Studien haben wir Nesprin-2 an der Plasmamembran nachgewiesen und zwar nur in Zellen und Geweben, die massiven strukturellen und morphologischen Umstrukturierungen unterworfen sind und somit eine Funktion von Nesprin-2 in diesen Prozessen nahelegen.

Zusätzlich zur Interaktion von Nesprin-2 und α -Catenin konnten wir einen Proteinkomplex bestehend aus Nesprin-2, α -/ β -Catenin und Emerin nachweisen. Diese Studie liefert damit weitere Hinweise darauf, dass Proteine

der Zellkern- und Plasmamembran miteinander interagieren und stellt ein Bindeglied zwischen diesen Kompartimenten vor. β -Catenin ist ein Protein mit dualer Funktion in Adhärensverbindungen und im Wnt-Signalweg. Die Aktivierung des Signalwegs bewirkt eine Akkumulierung von β -Catenin im Zytoplasma und eine Umlagerung in den Zellkern. Emerin ist ein integrales Membranprotein der Zellkernhülle und bindet β -Catenin. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen ein Modell zu, in dem α -/ β -Catenin als Heterodimer an die Zellkernhülle gelangen, wo sie an Nesprin-2 und Emerin binden und, einen Proteinkomplex ausbilden, aus dem β -Catenin in den Zellkern entlassen werden kann und so eine zusätzliche Ebene der Regulation einführt. Ferner zeigen die hier beschriebenen Experimente, dass Nesprin-2 an der Regulierung der intranukleären Menge an β -Catenin beteiligt ist. Ist es nicht vorhanden, so ist die Menge an β -Catenin im Kern reduziert.

Abstract

Nesprins are nuclear membrane associated proteins. So far, four different Nesprins (-1, -2, -3, -4) have been identified. They have well characterised functions in positioning of the nucleus and linking it to the cytoskeleton. Previously, α -N-Cat* which represents a novel isoform (α -N-Catenin-4) of the neuron specific α -N-Catenin was identified as a novel binding partner of Nesprin-2 in the Yeast-two-hybrid system in our group. α -N-Catenin is a protein that localizes to adherens junctions and is essential for their maintainance. It belongs to a family of proteins, α -E-/T- and N-Catenin which are encoded by different genes and show in part a tissue specific distribution. The interaction of Nesprin-2 and α -N-Catenin was confirmed using biochemical methods. Furthermore, we could also demonstrate that α -N-Catenin-1 and α -E-Catenin exhibit similar properties indicating, that the interaction of Nesprin-2 with α -Catenin is not isform or tissue specific. In localisation studies we discovered an accumulation of α -Catenin at the nuclear envelope that has not been described until now. In cells exhibiting a fibroblast like morphology both full length and C-terminal fusion proteins localise to the nuclear envelope. In keratinocytes full length proteins are present at the plasma membrane whereas c-terminal peptides are detected at the nuclear envelope. Studies of the distribution of endogenous α -Catenin in primary human kertinocytes corroborate this distribution pattern. From these results it can be assumed that α -Catenin is restricted to the plasma membrane and that the interaction with Nesprin-2 occurs in a highly regulated manner. According to previous data we could confirm a Nesprin-2 localisation at the plasma membrane particularly in tissues and cells that are exposed to complex structural and morphological reorganisations which suggests a role for Nesprin-2 in these processes.

In addition to the interaction of Nesprin-2 and α -Catenin we could provide evidence for a protein complex consisting of Nesprin-2, α -/ β -Catenin and Emerin. This study provides further evidence for the interaction of nuclear envelope and plasma membrane associated proteins and represents a link between these compartments.

β -Catenin is a protein with functions in adherens junctions and the Wnt-signalling pathway. Activating the signalling pathway triggers an accumulation of β -Catenin in the cytoplasm followed by a translocation into the nucleus. Emerin is an integral membrane bound protein of the nuclear envelope that also binds to β -Catenin. Results of the present work form the basis for a model in which heterodimeric α -/ β -Catenin might reach the nuclear envelope where it could bind to Nesprin-2 and Emerin, respectively, forming the above described protein complex followed by a release of β -Catenin into the nucleus. Moreover, the experiments shown here reveal that Nesprin-2 participates in the regulation of the intranuclear amount of β -Catenin. If it is not available, the amount of β -Catenin inside the nucleus is reduced.

Literaturverzeichnis

- Aberle, H., A. Bauer, et al.** (1997). "beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway." *Embo J* 16(13): 3797-804.
- Aberle, H., S. Butz, et al.** (1994). "Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins." *J Cell Sci* 107 (Pt 12): 3655-63.
- Al-Amoudi, A. and A. S. Frangakis** (2008). "Structural studies on desmosomes." *Biochem Soc Trans* 36(Pt 2): 181-7.
- Apel, E. D., R. M. Lewis, et al.** (2000). "Syne-1, a dystrophin- and Klarsicht-related protein associated with synaptic nuclei at the neuromuscular junction." *J Biol Chem* 275(41): 31986-95.
- Arce, L., N. N. Yokoyama, et al.** (2006). "Diversity of LEF/TCF action in development and disease." *Oncogene* 25(57): 7492-504.
- Bione, S., E. Maestrini, et al.** (1994). "Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy." *Nat Genet* 8(4): 323-7.
- Boukamp, P., R. T. Petrussevska, et al.** (1988). "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line." *J Cell Biol* 106(3): 761-71.
- Brembeck, F. H., M. Rosario, et al.** (2006). "Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin." *Curr Opin Genet Dev* 16(1): 51-9.
- Buehring, G. C., E. A. Eby, et al.** (2004). "Cell line cross-contamination: how aware are Mammalian cell culturists of the problem and how to monitor it?" *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 40(7): 211-5.
- Claverie, J. M., J. P. Hardelin, et al.** (1993). "Characterization and chromosomal assignment of a human cDNA encoding a protein related to the murine 102-kDa cadherin-associated protein (alpha-catenin)." *Genomics* 15(1): 13-20.
- Clevers, H.** (2006). "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease." *Cell* 127(3): 469-80.
- Crisp, M. and B. Burke** (2008). "The nuclear envelope as an integrator of nuclear and cytoplasmic architecture." *FEBS Lett* 582(14): 2023-32.
- Crisp, M., Q. Liu, et al.** (2006). "Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex." *J Cell Biol* 172(1): 41-53.
- D'Angelo, M. A. and M. W. Hetzer** (2008). "Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes." *Trends Cell Biol* 18(10): 456-66.
- Drees, F., S. Pokutta, et al.** (2005). "Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly." *Cell* 123(5): 903-15.
- Ebnet, K.** (2008). "Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions." *Histochem Cell Biol* 130(1): 1-20.
- Eisenmann, D. M.** (2005). "Wnt signaling." *WormBook*: 1-17.
- Evan, G. I., G. K. Lewis, et al.** (1985). "Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product." *Mol Cell Biol* 5(12): 3610-6.

- Fairley**, E. A., J. Kendrick-Jones, et al. (1999). "The Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype arises from aberrant targeting and binding of emerin at the inner nuclear membrane." *J Cell Sci* 112 (Pt 15): 2571-82.
- Farquhar**, M. G. and G. E. Palade (1963). "Junctional complexes in various epithelia." *J Cell Biol* 17: 375-412.
- Fuchs**, E. and S. Raghavan (2002). "Getting under the skin of epidermal morphogenesis." *Nat Rev Genet* 3(3): 199-209.
- Galkin**, V. E., A. Orlova, et al. (2006). "The CH-domain of calponin does not determine the modes of calponin binding to F-actin." *J Mol Biol* 359(2): 478-85.
- Gates**, J. and M. Peifer (2005). "Can 1000 reviews be wrong? Actin, alpha-Catenin, and adherens junctions." *Cell* 123(5): 769-72.
- Giannini**, A. L., M. Vivanco, et al. (2000). "alpha-catenin inhibits beta-catenin signaling by preventing formation of a beta-catenin*T-cell factor*DNA complex." *J Biol Chem* 275(29): 21883-8.
- Gluzman**, Y. (1981). "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." *Cell* 23(1): 175-82.
- Gordon**, M. D. and R. Nusse (2006). "Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors." *J Biol Chem* 281(32): 22429-33.
- Gough**, L. L., J. Fan, et al. (2003). "Golgi localization of Syne-1." *Mol Biol Cell* 14(6): 2410-24.
- Haque**, F., D. J. Lloyd, et al. (2006). "SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton." *Mol Cell Biol* 26(10): 3738-51.
- Harris**, T. J. and M. Peifer (2005). "Decisions, decisions: beta-catenin chooses between adhesion and transcription." *Trends Cell Biol* 15(5): 234-7.
- Henderson**, B. R. and F. Fagotto (2002). "The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport." *EMBO Rep* 3(9): 834-9.
- Herrenknecht**, K., M. Ozawa, et al. (1991). "The uvomorulin-anchorage protein alpha catenin is a vinculin homologue." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(20): 9156-60.
- Hetzer**, M. W., T. C. Walther, et al. (2005). "Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery." *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 347-80.
- Hinck**, L., I. S. Nathke, et al. (1994). "Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly." *J Cell Biol* 125(6): 1327-40.
- Hirano**, S., N. Kimoto, et al. (1992). "Identification of a neural alpha-catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization." *Cell* 70(2): 293-301.
- Holmer**, L. and H. J. Worman (2001). "Inner nuclear membrane proteins: functions and targeting." *Cell Mol Life Sci* 58(12-13): 1741-7.
- Huber**, O., M. Krohn, et al. (1997). "A specific domain in alpha-catenin mediates binding to beta-catenin or plakoglobin." *J Cell Sci* 110 (Pt 15): 1759-65.

- Hwang**, S. G., S. S. Yu, et al. (2005). "Regulation of beta-catenin signaling and maintenance of chondrocyte differentiation by ubiquitin-independent proteasomal degradation of alpha-catenin." *J Biol Chem* 280(13): 12758-65.
- Inge**, L. J., S. A. Rajasekaran, et al. (2008). "alpha-Catenin overrides Src-dependent activation of beta-catenin oncogenic signaling." *Mol Cancer Ther* 7(6): 1386-97.
- Janssens**, B., S. Goossens, et al. (2001). "alphaT-catenin: a novel tissue-specific beta-catenin-binding protein mediating strong cell-cell adhesion." *J Cell Sci* 114(Pt 17): 3177-88.
- Kimelman**, D. and W. Xu (2006). "beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective." *Oncogene* 25(57): 7482-91.
- Kobielak**, A. and E. Fuchs (2004). "Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(8): 614-25.
- Kobielak**, A., H. A. Pasolli, et al. (2004). "Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables." *Nat Cell Biol* 6(1): 21-30.
- Koike**, M., S. Kose, et al. (2004). "beta-Catenin shows an overlapping sequence requirement but distinct molecular interactions for its bidirectional passage through nuclear pores." *J Biol Chem* 279(32): 34038-47.
- Koslov**, E. R., P. Maupin, et al. (1997). "Alpha-catenin can form asymmetric homodimeric complexes and/or heterodimeric complexes with beta-catenin." *J Biol Chem* 272(43): 27301-6.
- Lechler**, T. and E. Fuchs (2005). "Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin." *Nature* 437(7056): 275-80.
- Libotte**, T. (2004). Charakterisierung von NUANCE, einem Protein der α -Aktinin Superfamilie. Dissertation, Universität zu Köln.
- Libotte**, T., H. Zaim, et al. (2005). "Lamin A/C-dependent localization of Nesprin-2, a giant scaffold at the nuclear envelope." *Mol Biol Cell* 16(7): 3411-24.
- Lien**, W. H., O. Klezovitch, et al. (2006). "alphaE-catenin controls cerebral cortical size by regulating the hedgehog signaling pathway." *Science* 311(5767): 1609-12.
- Lu**, W. (2007). Sun proteins in higher eukaryotes, "structural bridges" connecting the nuclear interior with the cytoskeleton, Dissertation, Universität zu Köln.
- Lu**, W., J. Gotzmann, et al. (2008). "Sun1 forms immobile macromolecular assemblies at the nuclear envelope." *Biochim Biophys Acta* 1783(12): 2415-26.
- Luke**, Y., H. Zaim, et al. (2008). "Nesprin-2 Giant (NUANCE) maintains nuclear envelope architecture and composition in skin." *J Cell Sci* 121(Pt 11): 1887-98.
- Madin**, S. H. and N. B. Darby, Jr. (1958). "Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin." *Proc Soc Exp Biol Med* 98(3): 574-6.
- Malone**, C. J., W. D. Fixsen, et al. (1999). "UNC-84 localizes to the nuclear envelope and is required for nuclear migration and anchoring during *C. elegans* development." *Development* 126(14): 3171-81.
- Margalit**, A., M. Segura-Totten, et al. (2005). "Barrier-to-autointegration factor is required to segregate and enclose chromosomes within the nuclear envelope and assemble the nuclear lamina." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(9): 3290-5.

- Markiewicz**, E., K. Tilgner, et al. (2006). "The inner nuclear membrane protein emerin regulates beta-catenin activity by restricting its accumulation in the nucleus." *Embo J* 25(14): 3275-85.
- Mexal**, S., R. Berger, et al. (2008). "Regulation of a novel alphaN-catenin splice variant in schizophrenic smokers." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B(6): 759-68.
- Mislow**, J. M., J. M. Holaska, et al. (2002). "Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro." *FEBS Lett* 525(1-3): 135-40.
- Mislow**, J. M., M. S. Kim, et al. (2002). "Myne-1, a spectrin repeat transmembrane protein of the myocyte inner nuclear membrane, interacts with lamin A/C." *J Cell Sci* 115(Pt 1): 61-70.
- Nagafuchi**, A., M. Takeichi, et al. (1991). "The 102 kd cadherin-associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression." *Cell* 65(5): 849-57.
- Niessen**, C. M. (2007). "Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function." *J Invest Dermatol* 127(11): 2525-32.
- Nusse**, R., A. Brown, et al. (1991). "A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family." *Cell* 64(2): 231.
- Nusse**, R. and H. E. Varmus (1982). "Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome." *Cell* 31(1): 99-109.
- Nusslein-Volhard**, C. and E. Wieschaus (1980). "Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*." *Nature* 287(5785): 795-801.
- Padmakumar**, V. C., S. Abraham, et al. (2004). "Enaptin, a giant actin-binding protein, is an element of the nuclear membrane and the actin cytoskeleton." *Exp Cell Res* 295(2): 330-9.
- Padmakumar**, V. C., T. Libotte, et al. (2005). "The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope." *J Cell Sci* 118(Pt 15): 3419-30.
- Piedra**, J., D. Martinez, et al. (2001). "Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation." *J Biol Chem* 276(23): 20436-43.
- Pokutta**, S., F. Drees, et al. (2008). "Biochemical and structural analysis of alpha-catenin in cell-cell contacts." *Biochem Soc Trans* 36(Pt 2): 141-7.
- Pokutta**, S. and W. I. Weis (2007). "Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts." *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 237-61.
- Polakis**, P. (2002). "Casein kinase 1: a Wnt'er of disconnect." *Curr Biol* 12(14): R499-R501.
- Pollard**, T. D. and G. G. Borisy (2003). "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments." *Cell* 112(4): 453-65.
- Quinlan**, M. P. and J. L. Hyatt (1999). "Establishment of the circumferential actin filament network is a prerequisite for localization of the cadherin-catenin complex in epithelial cells." *Cell Growth Differ* 10(12): 839-54.
- Rijsewijk**, F., M. Schuermann, et al. (1987). "The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless." *Cell* 50(4): 649-57.
- Rimm**, D. L., P. Kebriaei, et al. (1994). "Molecular cloning reveals alternative splice forms of human alpha(E)-catenin." *Biochem Biophys Res Commun* 203(3): 1691-9.

- Rimm, D. L., E. R. Koslov, et al. (1995).** "Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(19): 8813-7.
- Rivero, F., A. Kuspa, et al. (1998).** "Interaptin, an actin-binding protein of the alpha-actinin superfamily in *Dictyostelium discoideum*, is developmentally and cAMP-regulated and associates with intracellular membrane compartments." *J Cell Biol* 142(3): 735-50.
- Roe, S., E. R. Koslov, et al. (1998).** "A mutation in alpha-catenin disrupts adhesion in clone A cells without perturbing its actin and beta-catenin binding activity." *Cell Adhes Commun* 5(4): 283-96.
- Roura, S., S. Miravet, et al. (1999).** "Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation." *J Biol Chem* 274(51): 36734-40.
- Roux, K. J., M. L. Crisp, et al. (2009).** "Nesprin 4 is an outer nuclear membrane protein that can induce kinesin-mediated cell polarization." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Salpingidou, G., A. Smertenko, et al. (2007).** "A novel role for the nuclear membrane protein emerin in association of the centrosome to the outer nuclear membrane." *J Cell Biol* 178(6): 897-904.
- Sambrook, J., J. David, et al. (2001).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
- Schirmer, E. C., L. Florens, et al. (2003).** "Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics." *Science* 301(5638): 1380-2.
- Schneider, M (2005),** Ermittlung neuer NUANCE und Enaptin bindender Proteine mittels des Zwei-Hybris-Systems. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Scott, J. A. and A. S. Yap (2006).** "Cinderella no longer: alpha-catenin steps out of cadherin's shadow." *J Cell Sci* 119(Pt 22): 4599-605.
- Sharma, R. P. and V. L. Chopra (1976).** "Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*." *Dev Biol* 48(2): 461-5.
- Shaw, R. M., A. J. Fay, et al. (2007).** "Microtubule plus-end-tracking proteins target gap junctions directly from the cell interior to adherens junctions." *Cell* 128(3): 547-60.
- Sheldahl, L. C., M. Park, et al. (1999).** "Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner." *Curr Biol* 9(13): 695-8.
- Singh, A. B., T. Tsukada, et al. (2004).** "Membrane-associated HB-EGF modulates HGF-induced cellular responses in MDCK cells." *J Cell Sci* 117(Pt 8): 1365-79.
- Starr, D. A. and J. A. Fischer (2005).** "KASH 'n Karry: the KASH domain family of cargo-specific cytoskeletal adaptor proteins." *Bioessays* 27(11): 1136-46.
- Starr, D. A. and M. Han (2002).** "Role of ANC-1 in tethering nuclei to the actin cytoskeleton." *Science* 298(5592): 406-9.
- Stewart, C. L., K. J. Roux, et al. (2007).** "Blurring the boundary: the nuclear envelope extends its reach." *Science* 318(5855): 1408-12.
- Stoker, M. and E. Gherardi (1989).** "Scatter factor and other regulators of cell mobility." *Br Med Bull* 45(2): 481-91.

- Tsukita**, S., M. Furuse, et al. (2001). "Multifunctional strands in tight junctions." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(4): 285-93.
- Tzur**, Y. B., K. L. Wilson, et al. (2006). "SUN-domain proteins: 'Velcro' that links the nucleoskeleton to the cytoskeleton." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(10): 782-8.
- van Noort**, M., J. Meeldijk, et al. (2002). "Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin." *J Biol Chem* 277(20): 17901-5.
- van Noort**, M., F. Weerkamp, et al. (2007). "Wnt signaling and phosphorylation status of beta-catenin: importance of the correct antibody tools." *Blood* 110(7): 2778-9.
- van Roy**, F. and G. Berx (2008). "The cell-cell adhesion molecule E-cadherin." *Cell Mol Life Sci* 65(23): 3756-88.
- Vasioukhin**, V., C. Bauer, et al. (2001). "Hyperproliferation and defects in epithelial polarity upon conditional ablation of alpha-catenin in skin." *Cell* 104(4): 605-17.
- Vasioukhin**, V. and E. Fuchs (2001). "Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia." *Curr Opin Cell Biol* 13(1): 76-84.
- Veeman**, M. T., J. D. Axelrod, et al. (2003). "A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling." *Dev Cell* 5(3): 367-77.
- Volk**, T. (1992). "A new member of the spectrin superfamily may participate in the formation of embryonic muscle attachments in *Drosophila*." *Development* 116(3): 721-30.
- Wang**, X., S. Xu, et al. (2002). "Barrier to autointegration factor interacts with the cone-rod homeobox and represses its transactivation function." *J Biol Chem* 277(45): 43288-300.
- Warren**, D. T., Q. Zhang, et al. (2005). "Nesprins: intracellular scaffolds that maintain cell architecture and coordinate cell function?" *Expert Rev Mol Med* 7(11): 1-15.
- Waschke**, J. (2008). "The desmosome and pemphigus." *Histochem Cell Biol* 130(1): 21-54.
- Watt**, F. M. (1994), Cultivation of Human Epidermal Keratinocytes with a 3T3 Feeder Layer. Aus: *Cell Biology: A Laboratory Handbook*.
- Wheeler**, M. A., J. D. Davies, et al. (2007). "Distinct functional domains in nesprin-1alpha and nesprin-2beta bind directly to emerin and both interactions are disrupted in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy." *Exp Cell Res* 313(13): 2845-57.
- Widelitz**, R. (2005). "Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: recent progress." *Growth Factors* 23(2): 111-6.
- Wilhelmsen**, K., S. H. Litjens, et al. (2005). "Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin." *J Cell Biol* 171(5): 799-810.
- Willert**, K. and K. A. Jones (2006). "Wnt signaling: is the party in the nucleus?" *Genes Dev* 20(11): 1394-404.
- Willert**, K. and R. Nusse (1998). "Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling." *Curr Opin Genet Dev* 8(1): 95-102.
- Winston**, J. T., P. Strack, et al. (1999). "The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in I κ B α and beta-catenin and stimulates I κ B α ubiquitination in vitro." *Genes Dev* 13(3): 270-83.

- Wolff**, N., B. Gilquin, et al. (2001). "Structural analysis of emerin, an inner nuclear membrane protein mutated in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy." *FEBS Lett* 501(2-3): 171-6.
- Worman**, H. J. and G. G. Gundersen (2006). "Here come the SUNs: a nucleocytoskeletal missing link." *Trends Cell Biol* 16(2): 67-9.
- Yamada**, S., S. Pokutta, et al. (2005). "Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex." *Cell* 123(5): 889-901.
- Yamamoto**, H., S. Kishida, et al. (1999). "Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3beta regulates its stability." *J Biol Chem* 274(16): 10681-4.
- Yap**, A. S., W. M. Brieher, et al. (1997). "Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions." *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 119-46.
- Zhang**, Q., C. Ragnauth, et al. (2002). "The nesprins are giant actin-binding proteins, orthologous to *Drosophila melanogaster* muscle protein MSP-300." *Genomics* 80(5): 473-81.
- Zhang**, Q., C. D. Ragnauth, et al. (2005). "Nesprin-2 is a multi-isomeric protein that binds lamin and emerin at the nuclear envelope and forms a subcellular network in skeletal muscle." *J Cell Sci* 118(Pt 4): 673-87.
- Zhang**, Q., J. N. Skepper, et al. (2001). "Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues." *J Cell Sci* 114(Pt 24): 4485-98.
- Zhen**, Y. Y., T. Libotte, et al. (2002). "NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton." *J Cell Sci* 115(Pt 15): 3207-22.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken in 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 Prof. Dr. Angelika A. Noegel und Dr. Iakowos Karakesisoglou betreut worden.

Köln, im April 2010

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name, Vorname: Neumann, Sascha Alexander
Geburtsdatum und -ort: 03.10.1979, Köln
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1986 - 1990 Hans-Christian-Andersen Grundschule,
Leverkusen
1990 - 1999 Lise-Meitner-Gymnasium, Leverkusen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

1999 - 2000 Werkstatt für Behinderte,
Leverkusen/Rhein-Berg E.V., Bürrig

Hochschulbildung:

WS 00/01 - WS 05/06 Biologie/Diplom
März - Dez. 2005 Diplomarbeit am Institut für Biochemie II der
Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
Betreuer: Prof. Dr. Mats Paulsson
Arbeitsgruppe: Dr. Markus Plomann
Thema: Etablierung und Charakterisierung
induzierbarer Huntingtin Fibroblastenlinien
Seit Januar 2006 Promotion am Institut für Biochemie I der
Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
Betreuer: Prof. Dr. A. A. Noegel
Arbeitsgruppe: Dr. Iakowos Karakesisoglou
Thema: Charakterisierung der Interaktion
von Nesprin-2 und α -Catenin an der Plasma-
und Zellkernmembran

Veröffentlichungen:

Nesprin-2 giant safeguards nuclear envelope architecture in *LMNA* S143F progeria cells

Sebastian Kandert, Yvonne Lüke, Tobias Kleinhenz, **Sascha Neumann**, Wenshu Lu, Verena M. Jaeger, Martina Munck, Manfred Wehnert, Clemens R. Müller, Zhongjun Zhou, Angelika A. Noegel, Marie-Christine Dabauvalle and Iakowos Karakesisoglou (2007)

Human Molecular Genetics, 16, 2944-2959

Yvonne Lüke, Hafida Zaim, Iakowos Karakesisoglou, Verena M. Jaeger, Lorenz Sellin, Wenshu Lu, Maria Schneider, **Sascha Neumann**, Asa Beijer, Martina Munck, V. C. Padmakumar, Joachim Gloy, Gerd Walz and Angelika A. Noegel
Nesprin-2 Giant (NUANCE) maintains nuclear envelope architecture and composition in skin (2008)

Journal of Cell Science, 121, 1887-1898

Danksagung

Ich möchte mich an erster Stelle bei Frau Prof. Dr. A. A. Noegel für die Gelegenheit bedanken, an ihrem Institut meine Dissertation anfertigen zu können. Zudem bedanke ich mich für die ständige Diskussionsbereitschaft und Hilfestellungen.

Frau Prof. Dr. Sigrun Korsching danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Dissertation und Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Meinem Gruppenleiter Dr. Iakowos Karakesisoglou danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und seine Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt meiner Arbeitsgruppe mit Wenshu, Åsa, Yvonne, Verena und Ria für den gemeinsam zurückgelegten Weg.

Außerdem möchte ich mich bei Martina, Rosi, Rolf, Maria und Berthold für die große fachliche Kompetenz und die Bereitschaft zur Unterstützung bei den größeren und kleineren Problemen im Laboralltag bedanken.

Bei Sonja, Bärbel, Brigitte, Oliver und Christina bedanke ich mich für ihre Unterstützungen, die die Arbeit im Labor erleichtert haben.

Ein herzlicher Dank gilt Georgia und Eva, für ihr offenes Ohr und die humorvolle Art und Weise den Alltag zusammen zu meistern.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei allen Kollegen im Institut, Martin, Linlin, Francisco, Kristina, Marion, Jessica, Christoph, Margit, Kalle, Raphael, Karthikeyan, Charles, Surayya, Ludwig, Lorna, Jan, Rashmi, Tanja, Vivek, Mary, Dörte, Stefan, Andrea, Ireen, Anke, Annika, Thomas, Dominic, Gudrun und Budi für die Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Der bedeutenste und liebevollste Dank gilt meiner Familie und Jule.