

The Role of Nesprin-2 in Transcriptional Regulation

Abstract

Nesprins (Nuclear envelope spectrin-repeat proteins) primarily localize to the nuclear envelope which is a double lipid bilayer surrounding the genetic material in eukaryotes. The nuclear envelope is spanned by LINC (Linker of the Nucleoskeleton and Cytoskeleton) complexes which physically connect the cytoskeleton with the nucleoskeleton. Nesprins together with SUN proteins constitute the core of the LINC complex. While Nesprins provide the connection to main components of the cytoskeleton, SUN proteins maintain the connection to the nucleoskeleton through their interaction with lamins. This connection enables the nucleus to maintain its position and tension within the cell and also to transfer mechanical signals into the nucleus which have an impact on gene expression, a process termed mechanotransduction. Nesprins have also been found to localise to the inner nuclear membrane and inside the nucleus. Furthermore it has been described that Nesprin-2 functions in signaling pathways and participates in the subcellular shuttling of transcription factors. This makes Nesprin-2 an interesting candidate to investigate its role in transcriptional regulation.

Mutations in Lamins and other components of the LINC complex like Nesprins and Emerin cause a broad range of human hereditary diseases, the laminopathies. The mechanisms which lead to the development of these diseases are poorly understood. In a previously performed microarray analysis it was found, that upon C-terminal knock down (KD) of Nesprin-2 in HaCaT cells several genes were up- or down-regulated and especially Histone genes were down-regulated. We could confirm on mRNA level that Histone genes H1E, H2BM, H3J and H4I are down regulated after C- and N-terminal KD of Nesprin-2. Furthermore we could show that Nesprin-2 interacts with RNA polymerase II and promoter regions of Histone genes. However it is unclear if this interaction is direct or indirect. After C-terminal KD of Nesprin-2 in HaCaT cells the number of cells in S-phase increases significantly and DNA synthesis decreases, indicating that Nesprin-2 has a role in maintaining proper conduction of the cell cycle. On protein level we found that C-terminal KD of Nesprin-2 leads to a decreased expression of Histone H1.2 in HaCaT cells. Surprisingly we did not find an influence on nucleosome distribution or increased susceptibility to MNase digestion of DNA after Nesprin-2 KD in HaCaT cells. We could precipitate

Histones from all groups using C- and N-terminal α -Nesprin-2 antibodies and confirmed the interaction of Nesprin-2 and Histone H3 in co-IP experiments. In these experiments we could also precipitate Histone H3 with the Stem-Loop binding protein (SLBP).

Changes in histone gene expression may lead to an altered nucleosome distribution or occupancy which may affect gene expression, DNA replication and repair. Thus our results support the hypothesis that mutations in LINC complex proteins lead to laminopathies by an alteration of gene expression.

Previously we reported the generation of Nesprin-2 Giant KO mice. We tested these mice on a Rotarod to investigate if they show muscle weakness or motor deficits comparable to the symptoms of Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD). EDMD is a major syndrome among laminopathies and has been shown to be caused by mutations in Lamin A/C, Emerin and Nesprin-1 and -2. However no significant difference between Nesprin-2 Giant KO and WT mice could be observed.

Zusammenfassung

Nesprine (Nuclear envelope spectrin-repeat proteins) lokalisieren primär an der Zellkernhülle, die eine Doppellipidmembran ist und in Eukaryonten die DNA vom Zytoplasma trennt. Die Kernhülle wird von sogenannten LINC (Linker of the Nucleoskeleton and Cytoskeleton) Komplexen überbrückt, die das Zytoskelett physisch mit dem Kernskelett (Nukleoskelett) verbinden. Gemeinsam mit SUN Proteinen bilden Nesprine den Kern des LINC Komplexes. Während Nesprine an der äußeren Kernmembran die Verbindung zu Komponenten des Zytoskeletts vermitteln, bilden SUN Proteine über eine Interaktion mit Laminen die Verbindung zum Kernskelett. Diese Verbindung erlaubt es dem Zellkern seine Position und Spannung in der Zelle aufrecht zu erhalten und ermöglicht die Übertragung von mechanischen Signalen in den Zellkern, die einen Einfluss auf die Genexpression haben. Dieser Prozess wird Mechanotransduktion genannt. Nesprine wurden auch an der inneren Kernmembran und im Zellkern gefunden. Außerdem wurde eine Funktion von Nesprin-2 in Signaltransduktionswegen und eine Beteiligung an der subzellulären Überführung von Transkriptionsfaktoren beschrieben.

Mutationen in Laminen und anderen Komponenten des LINC Komplexes wie Nesprinen und Emerin verursachen eine Vielzahl an genetisch verursachten Krankheiten, die Laminopathien. Die Mechanismen, die zur Entwicklung dieser Krankheiten führen sind kaum erforscht.

In einer vorausgegangenen Microarray-Analyse wurde festgestellt, dass nach der Herunterregulierung von C-terminalen Nesprin-2 Isoformen in HaCaT Zellen viele Gene vermehrt oder vermindert transkribiert wurden. Unter den herunterregulierten Genen befanden sich besonders Histone. Auf mRNA Ebene konnten wir bestätigen, dass die Histongene H1E, H2BM, H3J und H4I nach C- sowie N-terminal gerichtetem Knock down von Nesprin-2 herunterreguliert waren. Desweiteren konnten wir eine Interaktion von Nesprin-2 mit RNA Polymerase II und Promoterregionen von Histongen nachweisen. Allerdings ist unklar, ob diese Interaktionen direkt oder indirekt sind. Nach C-terminalem Knock down von Nesprin-2 in HaCaT Zellen nimmt die Anzahl von Zellen in der S-Phase signifikant zu, während die DNA Synthese verringert ist, was darauf hindeutet, dass Nesprin-2 eine Rolle in der Aufrechterhaltung des Zellzyklus spielt. Auf Proteinebene konnten wir nachweisen, dass der C-terminale Knock down von Nesprin-2 zu einer verminderten Expression von Histon H1.2 in HaCaT Zellen führt. Erstaunlicherweise konnten wir aber keinen

Einfluss auf die Nukleosomenverteilung oder eine erhöhte Anfälligkeit der DNA durch einen Verdau mit MNase nach dem Herunterregulieren von Nesprin-2 in HaCaT Zellen feststellen. Mit Antikörpern, die gegen den C- sowie N-Terminus von Nesprin-2 gerichtet waren, konnten wir Histone von allen Gruppen co-präzipitieren und eine Interaktion von Nesprin-2 mit Histon H3 in Co-Immunpräzipitationsexperimenten bestätigen. In diesen Experimenten konnten wir außerdem Histon H3 mit dem Stem-Loop Binding Protein (SLBP) präzipitieren.

Eine veränderte Histon Genexpression kann zu einer Veränderung der Nukleosomen Verteilung führen, die wiederum Einfluss auf die Genexpression sowie DNA-Replikations- und Reparaturmechanismen haben kann. Somit unterstützen unsere Ergebnisse die Hypothese, dass Mutationen in LINC Komplex Proteinen durch eine Veränderung der Genexpression zu Laminopathien führen.

Es wurde bereits eine Generierung von Nesprin-2 Giant Knock out Mäusen veröffentlicht. Wir haben diese Mäuse auf einem "Rotarod" getestet, um zu untersuchen, ob sie Muskelschwächen oder motorische Defizite aufweisen, die mit den Symptomen der Emery-Dreifuss Muskeldystrophie (EDMD) vergleichbar sind. EDMD ist ein häufiges Syndrom unter den Laminopathien, das durch Mutationen in Lamin A/C, Emerin, Nesprin-1 und -2 verursacht wird. Allerdings konnten wir in diesem Test keinen signifikanten Unterschied zwischen Nesprin-2 Knock out und Wildtyp Tieren feststellen.