

# Analyse von Nesprin-2 defizienten Mäuse

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



vorgelegt von  
**Hafida Zaim**  
aus  
Kénitra, Marokko

Köln, 2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2003 bis Februar 2006, unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. A. A. Noegel am Biochemischen Institut I der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln, angefertigt.

Berichterstatter:

Frau Prof. Dr. A. A. Noegel  
Herr Prof. Dr. S. Roth

Tag der mündlichen Prüfung: 13. 02. 2005

Für meine Familie

## Inhaltverzeichnis

Inhaltverzeichnis .....	4
Abkürzungen .....	7
1 Einleitung .....	9
<b>1.1 Das Zytoskelett</b> .....	9
<b>1.2 Das Aktinzytoskelett</b> .....	9
<b>1.3 Aktinbindende Proteine</b> .....	10
<b>1.4 Pathologische Auswirkungen von Mutationen in aktinbindenden Proteinen</b> .....	11
<b>1.5 Zellkern und Zellkernmembran</b> .....	12
<b>1.6 Kernproteine</b> .....	13
1.6.1    Kernlamina .....	13
1.6.2    Kernmembranproteine.....	14
<b>1.7 Nesprine und deren Isoformen</b> .....	15
<b>1.8 Ziel der Arbeit</b> .....	18
2 Material und Methoden .....	19
<b>2.1 Material</b> .....	19
2.1.1    Labormaterial .....	19
2.1.2    Geräte .....	20
2.1.3    Kits .....	21
2.1.4    Puffer und andere Lösungen.....	22
2.1.5    Chemikalien und Reagenzien.....	24
2.1.6    Enzyme, Antikörper und Inhibitoren.....	26
2.1.7    Oligonukleotide (Sigma) .....	28
2.1.8    Vektoren .....	29
2.1.9    Plasmide .....	29
2.1.10   Bakterienstämme, Hefestämme, Zell-Linien .....	30
2.1.11   Kultur-Medien .....	30
<b>2.2 Molekularbiologische Methoden</b> .....	32
2.2.1    Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	32
2.2.2    Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mikromaßstab gemäß Macherey-Nagel .....	33
2.2.3    Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33
2.2.4    Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	34
2.2.5    DNA-Agarosegelelektrophorese .....	35
2.2.6    Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	36
2.2.7    DNA Sequenzierung .....	36
2.2.8    Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien (Laird, 1991).....	37
2.2.9    Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit dem Stratagene Prime It II ® Kit..	37
.....	37
2.2.10   Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden für Nylonmembranen nach	
Southern-Blot .....	38
2.2.11 <i>In vitro</i> -Rekombination von DNA .....	38



2.2.12	Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Säugetierzellen gemäß Qiagen .....	40
2.2.13	Reverse Transkriptase-Reaktion.....	41
2.2.14	RNA-Agarose-Gelelektrophorese .....	41
2.2.15	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen .....	42
2.2.16	<i>E. coli</i> -Dauerkulturen .....	43
<b>2.3</b>	<b>Proteinchemische Techniken.....</b>	<b>43</b>
2.3.1	Induktion und Extraktion rekombinanter Proteine .....	43
2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	44
2.3.3	Reinigung rekombinanter Proteine mit dem pGEX-4T-1 Expressionssystem.....	44
2.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
2.3.5	Färbung von Polyacrylamidgelen.....	47
2.3.6	Übertragung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Westernblot).....	48
2.3.7	Färbung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen.....	50
2.3.8	Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose .....	50
2.3.9	Entfernung der Antikörper nach Immundetektion .....	51
2.3.10	Aufreinigung von IgG aus Hybridoma-Kulturüberständen mit Protein-A-Sepharose CL4B.....	51
2.3.11	Aufreinigung des Polyklonalen Antikörpers Nesprin-2-K1 durch Affinität Chromatographie mit CNBr-Sepharose .....	52
2.3.12	Fraktionierung von COS7-Zellen in Membran-, Kern- und Zytosol-Fraktion .....	53
2.3.13	Proteinbindungsanalysen von Fusionsproteinen .....	53
2.3.14	Herstellung monoklonaler Antikörper .....	54
<b>2.4</b>	<b>Immunhistologische Methoden:.....</b>	<b>58</b>
2.4.1	Präparation von Gefrier- und Paraffinschnitten .....	58
<b>2.5</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>59</b>
2.5.1	Isolierung von primären dermalen Keratinozyten und Fibroblasten aus neugeborenen Mäuse.....	59
2.5.2	Kultur von Säugerzellen.....	60
2.5.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	60
2.5.4	Wundheilungsexperimente.....	60
2.5.5	Fluoreszenzmikroskopie.....	61
2.5.6	Transfektion von Säugetierzellen.....	62
2.5.7	Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	62
3.	Ergebnisse .....	64
<b>3.1</b>	<b>Herstellung, Aufreinigung und Charakterisierung des polyklonalen Antikörpers</b>	
<b>pAbK1.....</b>		<b>64</b>
3.1.1	Expression und Aufreinigung von GST-K1 .....	65
3.1.2	Herstellung und Aufreinigung von polyklonalen Antikörpern gegen Nesprin-2... 66	
3.1.3	Charakterisierung der polyklonalen Nesprin-2 Antikörper.....	67
<b>3.2</b>	<b>Nesprin-2 ist in der äußeren und inneren Kernmembran lokalisiert.....</b>	<b>69</b>
<b>3.3</b>	<b>Die Nesprin-2 Lokalisierung in Fibroblasten ist Lamin A/C abhängig .....</b>	<b>70</b>
3.3.1	Nesprin-2 bindet an Lamin A/C und an Emerin .....	70
3.3.2	Nesprin-2 ist nicht am Kern in Lamin A/C <i>Knock-out</i> Zellen lokalisiert .....	71
3.3.3	Lamin C ist ausreichend für Nesprin-2 Lokalisierung in der Kernmembran.....	72

---

<b>3.4. Analyse der Nesprin-2-ABD defizienten Mauslinie</b> .....	73
3.4.1 Das Nesprin-2 Gen .....	74
3.4.2 Die <i>Knock-out</i> Strategie .....	75
3.4.3 Genotypisierung der Nesprin-2 defizienten Mauslinie .....	76
3.4.4 Herstellung und Charakterisierung eines monoklonalen Nesprin-2 Antikörpers der gegen die ABD gerichtet ist .....	79
3.4.5 Untersuchung der Gewebe der Nesprin-2 (-/-) Maus .....	82
<b>3.5 Analyse der <i>Knock-out</i> Fibroblasten</b> .....	89
3.5.1 Untersuchung der Nesprin-2 <i>Knock-out</i> Fibroblasten im Vergleich zum Wildtyp	89
3.5.2 Wachstumskurve und Zellzyklusanalyse der Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten .....	95
3.5.3 Wundheilungsexperiment.....	98
4. Diskussion .....	102
<b>4.1 Nesprin-2 Isoformen haben unterschiedliche Gewebeverteilungen</b> .....	102
<b>4.2 Die Lokalisation von Nesprin-2 am Kern ist Lamin A/C abhängig</b> .....	103
<b>4.3 Subzelluläre Lokalisierung und mögliche Funktionen von Nesprin-2 Isoformen</b> .....	104
<b>4.4 Analyse der Nesprin-2 <i>Knock-out</i> Mäuse</b> .....	106
5. Zusammenfassung .....	110
6. Abstract .....	111
7. Literatur .....	112
Erklärung .....	119
Lebenlauf.....	120
Dankesagungen .....	121

## Abkürzungen

32

P	radioaktives Phosphoratom
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABD	Aktin-Bindungs-Domäne
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	zirka
cDNA	komplementäre DNA
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
C°	Grad Celsius
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
d. h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DTT	Dithiothreitol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycolbis[2-aminoethylether]-N,N,N,N-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanin
GFP	grün fluoreszierendes Protein (engl.: „green fluorescent protein“)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
IgG	Immunglobulin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
Luminol	5-Amino-2,3-Dihydro-1,4-Phtalazindion
M	Molar

---

mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
M. musculus	Mus musculus
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pAb	polyklonaler Antikörper
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	interferierende RNA
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur, reverse Transkriptase
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
Std	Stunde(n)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMD	Transmembran-Domäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Uracil, Unit(s)
ÜK	Übernachtskultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indazol-β-D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Zytoskelett

Die Fähigkeit, die zahlreichen Komponenten im Zellinneren zu organisieren, verschiedene Formen anzunehmen und koordinierte Bewegungen durchzuführen, verdankt die Eukaryontenzelle ihrem Zytoskelett. Das Zytoskelett ist ein dynamisches Netzwerk von filamentösen Strukturen, das den Zellen neben mechanischer Stabilität und Form die Fähigkeit zu vielen bewegungsabhängigen Prozessen verleiht; dazu gehören der Transport von Organellen von einem Platz zum anderen, die Aufteilung der Chromosomen auf die zwei Tochterzellen in der Mitose und die Abschnürung der Tierzellen bei der Zellteilung (Lyass *et al.*, 1988). Das Zytoskelett besteht aus einem Gerüst von drei Proteinfilamenttypen, die anhand ihrer Komponenten und Größe kategorisiert werden in:

**Aktinfilamente:** (auch Mikrofilamente genannt) Sind helikale Polymere aus dem Protein Aktin. Sie bilden flexible Strukturen mit einem Durchmesser von etwa 7 nm, die in vielfältigen linearen Bündeln, zweidimensionalen Netzwerken und dreidimensionalen Gelen organisiert sind.

**Intermediärfilamente:** Sind seilartige Fasern mit einem Durchmesser von ungefähr 10 nm. Sie setzen sich aus den Intermediärfilamentproteinen zusammen, die eine große und heterogene Familie bilden.

**Mikrotubuli:** Sind röhrenförmig und bestehen aus dem Protein Tubulin. Sie haben einen Durchmesser von 25 nm und sind steifer als Aktin- und die Intermediärfilamente. Sie sind lang und gerade; üblicherweise ist eines ihrer Enden an einem einzelnen Mikrotubuliorganisierenden Zentrum befestigt, dem so genannten Zentrosom.

## 1.2 Das Aktinzytoskelett

In Muskelzellen bilden Aktin- und Myosinfilamente die spezialisierte Einheit der Krafterzeugung, das Sarkomer. Unter Energieverbrauch können Aktinfilamente und Myosinfilamente aneinander vorbeigleiten, was zur Kontraktion des Muskels führt (Huxley, 1969). In Nichtmuskelzellen bilden die Aktinfilamente keine permanente Struktur, sie unterliegen vielmehr einem dynamischen Auf- und Abbau. *In vitro* können Mikrofilamente (F-Aktin) unter ATP Verbrauch, in Anwesenheit von mono- oder divalenten Kationen wie Kalium- oder Magnesiumionen aus monomerem Aktin polymerisieren (Rouayrenc and Travers,

1981; Teunissen *et al.*, 2003). Die Bindung der Ionen an Aktinmonomere führt zu einer Konformationsänderung, die die Bildung der Filamente ermöglicht. Bildung und Dynamik eines Aktinfilaments wird durch die Prozesse der Nukleation und Polymerisation bzw. Depolymerisation bestimmt. In einer Nukleationsphase lagern sich mehrere Aktinmonomere zu einem Trimer zusammen. Die Nukleationsphase ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Polymerisation. Aktinfilamente sind gerichtet, es existiert jeweils ein schnell wachsendes (+) und ein langsam wachsendes Ende (-). Aktinanlagerung kann an beiden Enden, allerdings in unterschiedlichen Raten stattfinden. Bei der so genannten kritischen G-Aktin Konzentration polymerisiert G-Aktin zu F-Aktin.

Die Konzentration von Aktin in Nichtmuskelzellen beträgt etwa 100  $\mu\text{M}$ , ein Wert der weit über der kritischen Konzentration für die Aktinpolymerisation liegt. Diese Konzentration und das Ionenmilieu der Zelle sollten für eine vollständige Vorlage des Aktins als F-Aktin sorgen (Zigmond, 1989). Dies ist jedoch nicht der Fall und nur ungefähr die Hälfte davon liegt in polymerer Form vor. Deshalb wurde vorgeschlagen, dass das meiste G-Aktin in der Zelle an Proteine gebunden vorliegt, um die kritische Konzentration beizubehalten (Carlier and Pantaloni, 1997). Die Aktinpolymerisation in der Zelle unterliegt somit einer weiteren Regulation. Diese Regulation wird, zum Teil Stimulusabhängig, von einer großen Anzahl von G- und F-Aktin bindenden Proteinen bewerkstelligt. Der Arp2/3-Komplex initiiert die Nukleation von Aktin-Monomeren, Profilin und Thymosin  $\beta_4$  binden Aktin-Monomere, Myosin II kann für eine Kontraktion des F-Aktinnetzwerks sorgen, Gelsolin fragmentiert einzelne Filamente und bleibt am Plus-Ende als Capping-Protein gebunden und Filamin kann Aktinfilamente parallel ausrichten (Shizuta *et al.*, 1976; Yin *et al.*, 1981; dos Remedios *et al.*, 2003).

### 1.3 Aktinbindende Proteine

Aktin bindende Proteine lassen sich nach ihrer Funktion in Gruppen einteilen.

- a. Proteine wie  $\alpha$ -Aktinin und Fascin verursachen eine Vernetzung von Aktinfilamenten zu Strukturen höherer Ordnung.
- b. Motorproteine wie Myosine gleiten unter Energieverbrauch an Aktinfilamenten entlang (Kreis und eds, 1993).

- c. Proteine, die die Aktinpolymerisation regulieren wie die Proteine des Arp2/3 Komplexes, Cap Z aus den Z-Banden der Muskelzellen (Casella *et al.*, 1986) und Cap32/34 aus *D. discoideum* (Eddy *et al.*, 1996).
- d. Proteine wie Interaptin (Rivero *et al.*, 1998) und Comitin (Weiner *et al.*, 1993) sorgen für eine Verbindung von Aktinfilamenten mit zellulären Membranen (Eichinger *et al.*, 1999).
- e. Eine weitere Klasse von Proteinen bindet G-Aktin. Beispiele hierfür sind Profiline, Thymosin und Proteine der WASP Familie (Wiskott-Aldrich Syndrom Protein Familie).

Proteine der  $\alpha$ -Aktinin Superfamilie besitzen zwei Calponin-homologe Domänen (ABD) am N-terminus und können Aktinfilamente in Bündeln oder Netzwerken organisieren und an die Plasmamembran binden (Matsudaira, 1994). Die modulare Organisation der Mitglieder dieser Familie erlaubt die Bildung von sehr langen Proteinen (Puius *et al.*, 1998). Zu dieser Superfamilie gehören Spektrine, Fimbrine/Plastine, Dystrophine und die Filamin Proteinfamilie (Hartwig, 1995). Fimbrine sind die einfachsten Proteine der Superfamilie. Sie sind modulare Proteine und haben am N-terminus eine Calmodulin ähnliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsdomäne gefolgt von einer aktinbindenden Domäne (Schuler *et al.*, 1994). Mit der Entdeckung von Interaptin in *D. dictyostelium*, ANC1 in *C. elegans* und Nesprin-1 und Nesprin-2 in Säugetieren wurden neue Mitglieder der  $\alpha$ -Aktinin Superfamilie gefunden, die das Aktinzytoskelett mit dem Kern verbinden (Rivero *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2001, Mislow *et al.*, 2002; Starr and Han, 2002; Zhen *et al.*, 2002; Padmakumar *et al.*, 2004).

#### **1.4 Pathologische Auswirkungen von Mutationen in aktinbindenden Proteinen**

Die Duchennesche Muskeldystrophie (DMD) ist eine der häufigsten Erbkrankheiten. Sie trifft einen von etwa 3.500 neugeborenen Jungen. Bei Untersuchungen dieser Krankheit wurde das große  $\alpha$ -Aktinin Superfamilienmitglied Dystrophin (426 kDa) entdeckt. DMD wird von Mutationen und Schädigungen des Dystrophin-Gens verursacht mit der Konsequenz, dass das Protein Dystrophin gar nicht oder nur in Spuren in Muskelzellen vorhanden ist (Ahn and Kunkel, 1993). Dystrophin verknüpft die Aktinfilamente zu einem Netzwerk und verankert dieses Netzwerk an einen Glykoprotein-Komplex an der inneren Seite der Plasmamembran von Muskelzellen. DMD Patienten haben kein funktionelles Dystrophin, so dass die Muskelzellmembran nicht vom Aktinzytoskelett abgestützt ist und bei Stress und Muskelkontraktionen schnell beschädigt wird.

In Erythrozyten bilden Spektrinmoleküle zusammen mit einem kleinen Anzahl von Aktinmolekülen ein Netzwerk aus, das die Plasmamembran unterstützt und für den Erhalt der Zellform verantwortlich ist. Bei Mäusen und Menschen mit genetisch bedingten Anomalien in der Spektrinstruktur kann man die Bedeutung dieses Netzwerk ermessen. Es kommt zu einer Anämie, außerdem sind Spektrin-defiziente Erythrozyten nicht mehr abgeflacht sondern eher kugelförmig und ungewöhnlich zerbrechlich (Tse and Lux, 1999). Spherozytose, Elliptozytose und Pyropoikilozytose sind eine Gruppe von menschlichen Krankheiten, die durch Abwesenheit oder Fehlfunktion von Spektrin und andere Proteinen, die das Aktinzytoskelett an der Erythrozytenplasmamembran verankern, verursacht werden (Palek, 1987).

Plektin und BPAG-1/dystonin spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung und Integrität des Zytoskeletts in unterschiedlichen Zelltypen (Dalpe *et al.*, 1998; Eriksson *et al.*, 2003). Mutationen im Maus BPAG-1/Dystonin Gen rufen den Dystonia musculorum - Phänotyp hervor. Dieses Phänotyp ist erst zwischen Tag 7 und 10 nach der Geburt sichtbar und zeigt einen progressiven Verlust der Extremitätenkoordinierung. BPAG-1/Dystonin-*Knock-out* Mäuse zeigen neuromuskuläre Abnormalitäten und Defekte in der Myelinisierung der Schwannschen Zellen. Plektin defiziente Mäuse zeigen eine schwere Blasenbildung in der Haut verursacht durch Degenerierung von Keratinozyten. Diese Mäuse sterben zwei bis drei Tage nach der Geburt (Andra *et al.*, 1997). Mutationen im menschlichen Plektin-Gen verursachen eine Krankheit namens Epidermolysis bullosa simplex. Es handelt sich um eine Krankheit mit fragiler Haut, die spontan oder nach leichtem Trauma zur Bildung von Blasen und Erosionen neigt (Venables *et al.*, 2001).

MACF, ein Mitglied der Spektraplakin Familie, ist mitverantwortlich für die Mikrotubuli-Dynamik sowie die Verbindung von Mikrotubuli mit Mikrofilamenten. Die homozygoten Knockout-Mäuse sterben früh in ihrer embryonalen Entwicklung (Kodama *et al.*, 2003) .

## 1.5 Zellkern und Zellkernmembran

Der Zellkern kann als Informations- und Steuerzentrum der Zelle verstanden werden. Der Zellkern ist ein wesentliches Organell der eukaryotischen Zelle. Vom Zellplasma ist der Kern durch eine Doppelmembran abgegrenzt. In ihm liegt das Erbgut der Zelle in Form von Desoxyribonukleinsäure (DNA) vor. Zellkerne finden sich in allen Zellen, außer den roten



Blutkörperchen (Erythrozyten) und Blutplättchen (Thrombozyten) und in der Regel besitzen alle Zellen nur einen Kern.

Die Zellkernmembran (Kernhülle, Karyolemma oder Nucleolemma) grenzt den Zellkern gegen das umliegende Zytoplasma ab. Die Kernmembran ist aus einer äußeren Membran (Dicke ca. 7 nm; Phospholipiddoppelschicht) gefolgt vom perinukleären Raum mit einer Weite von 20 bis 100 nm und der inneren Membran aufgebaut. Knapp von innen an die innere Kernmembran angelagert findet sich die zum Kerngerüst zählende Kernlamina. Diese besteht aus den Intermediärfilamenten Typ V: Lamin A, C, B1 und B2, die an den Lamin-B Rezeptor, ein Protein der inneren Kernmembran gebunden und untereinander vernetzt sind. In scheibenförmigen Arealen sind die innere und die äußere Kernmembran miteinander ringförmig verbunden, wodurch die Kernporen entstehen. Durch die in der Kernhülle enthaltenen Kernporen findet der Stoffaustausch mit dem Zytoplasma statt: Regulatorische Proteine gelangen aus dem Zytoplasma in den Zellkern, Transkriptionsprodukte wie die mRNA werden zur Proteinsynthese, die an den Ribosomen des Zytoplasmas stattfindet, aus dem Kern in das Plasma exportiert. Die Kernmembran entsteht aus dem endoplasmatischem Retikulum, was man bei ihrer Neusynthese in der Telophase einer Mitose erkennen kann. Sie zerfällt im Übergang der Prophase zur Metaphase in der Mitose in kleine Membranbläschen, die endoplasmatischem Retikulum entsprechen. An einigen Stellen lässt sich die Fortsetzung des perinukleären Raumes in den Innenraum des rauen endoplasmatischen Retikulums (RER) erkennen. Ebenso setzt sich die äußere, mit Ribosomen besetzte Kernmembran in die Membranen des RER fort. Die innere Kernmembran hat eine andere Zusammensetzung als die äußere Kernmembran. Sie besitzt keine eingelagerten Ribosomen, wohl aber eingelagerte Proteine wie den Lamin-B Rezeptor, LAP-Proteine und Emerin (Worman, 2004).

## **1.6 Kernproteine**

### **1.6.1 Kernlamina**

Die Lamine, Intermediärfilamente Typ V, sind die Hauptkomponenten der Kernlamina. Ähnlich zu den anderen Intermediärfilamenten haben Lamine eine kurze N-terminale Domäne gefolgt von einer  $\alpha$ -helikalen Rod-Domäne und einer langen globulären Domäne. Im Gegensatz zu anderen Intermediärfilamenten besitzen die Lamine einen zusätzlichen 42 Aminosäuren langen Rest

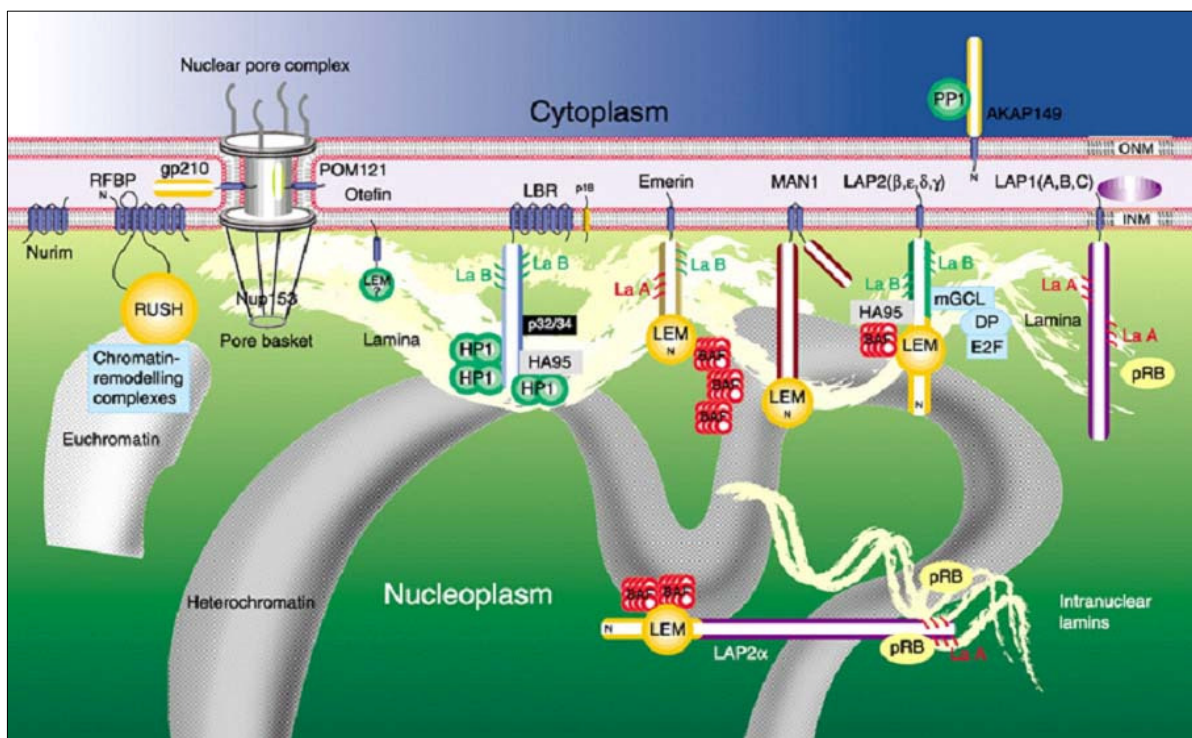
innerhalb der coiled-coil Region und ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) am C-Terminus (Shultz *et al.*, 2003). Lamine werden in zwei Typen eingeteilt, Typ A: Lamin A und C, die Spleißprodukte des *LmnA* Gens, und Typ B: Lamin B1 und B2, die von zwei unterschiedlichen Genen kodiert werden. Während Lamin A und C nur in differenzierten Zellen zu finden sind, sind B1 und B2 Lamine im Kern aller somatischen Zellen vorhanden (Spann *et al.*, 2002; Worman and Courvalin, 2004). Lamin A und C haben die ersten 566 Aminosäuren gemein, Lamin A besitzt 98 zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus, Lamin C sechs zusätzliche Aminosäuren (Lin and Worman, 1993). Lamin A entsteht aus Prä-Lamin A, von dem die letzten 18 Aminosäuren proteolytisch abgespalten werden, Lamin C entsteht durch alternatives Spleißen der Lamin A/C-RNA (Lin and Worman, 1993). Prä-Lamin A enthält im Gegensatz zu Lamin C eine sogenannte CAAX-Box, die farnesyliert wird und wichtig für die proteolytische Spaltung sowie die anschließende Lokalisierung von Lamin A in der Kernmembran ist (Lin and Worman, 1993). Die Lokalisierung von Lamin C scheint hingegen von der Lokalisierung und Interaktion von Lamin A abhängig zu sein (Hutchison, 2002).

Lamin A/C kann direkt an DNA binden wie *in vivo* und *in vitro* Versuche gezeigt werden konnte (Mattout-Drubezki and Gruenbaum, 2003). Die Kernlamina spielt eine sehr wichtige Rolle in den unterschiedlichen Kernfunktionen (Holmer and Worman, 2001). Dazu gehört die Aufrechterhaltung der Kernform (Lenz-Bohme *et al.*, 1997; Schirmer *et al.*, 2001), Chromatin Ankerung (Gant *et al.*, 1999), die DNA-Replikation (Jenkins *et al.*, 1995; Goldman *et al.*, 2002; Gruenbaum *et al.*, 2003) und die Transkription (Spann *et al.*, 2002). Aktuelle Studien haben gezeigt, dass Mutationen in Lamin A/C eine große Anzahl von Krankheiten verursachen, deren klinische Ausprägung sehr variabel ist. Sie erstreckt sich von Herz-, Skelettmuskeldystrophien wie zB. Emery-Dreifuss muskuläre Dystrophie und partieller Lipodystrophie (FPLD) bis zu neuronalen Krankheiten und vorzeitiger Alterung wie beim Hutchinson-Gilford Progeria Syndrom (HGPS) (Mounkes *et al.*, 2003b).

### 1.6.2 Kernmembranproteine

Lamine und ihre assoziierten Kernmembranproteine bilden die Kernlamina (Abb. 1.1). Es wurden 18 bis 20 unterschiedliche Proteine einschließlich der Spleissvarianten aus mehreren Organismen beschrieben (Burke and Stewart, 2002). Die Mehrheit dieser Proteine besitzt eine große nukleoplasmatische Domäne, die mit der Kernlamina und/oder Chromatin interagiert.

Eine bekannte Kernmembranproteingruppe ist die LEM-Proteingruppe. LEM steht für Lap2 (lamina associated polypeptide), Emerin und MAN1. Diese drei Proteine besitzen ein gemeinsames konserviertes Motiv von 43 Aminosäuren, das mit einem kleinen Chromatinbindenden Brückenprotein namens BAF interagiert (Zheng *et al.*, 2000). Zu den Proteinen der Kernmembran zählen zusätzlich der Lamin B-Rezeptor (LBR), UNC84, RFBP und Nurim (Polioudaki *et al.*, 2001; Mattout-Drubezki and Gruenbaum, 2003; Worman and Courvalin, 2004). Dazu kommen Nesprine und ihre Isoformen (Zhang *et al.*, 2001; Zhen *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005). LEM-Proteine bzw. Nesprin-1 und -2 (auch Enaptin und NUANCE genannt) besitzen eine Transmembran-Domäne, Nurim, SUN und RFBP besitzen mehrere (Worman and Courvalin, 2004). Kürzlich wurde gezeigt, dass Nesprin-1 und Nesprin-2 mit Lamin A/C und Emerin *in vivo* und *in vitro* interagieren (Mislow *et al.*, 2002; Libotte *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005).



**Abb. 1.1 Vorgeschlagene Organisation der Kernmembranproteine, Kernlamina und Chromatin**  
 OMN: Äussere Kernmembran, IMN: Innere Kernmembran; Cytoplasma: Zytoplasma (aus:)

## 1.7 Nesprine und deren Isoformen

Es war bis vor kurzem bekannt, dass nur Mikrotubuli und dessen assoziierten Proteine in der Kernmigration involviert sind (Wilkinson *et al.*, 2003). Allerdings haben Studien am *C. elegans*

Protein ANC-1 zeigt, dass das Aktinzytoskelett ebenso an diesem Prozess beteiligt ist. Diese Untersuchungen haben außerdem gezeigt, dass Mutationen in ANC1 Defekte in der Kern- und Mitochondrien-Positionierung in *C. elegans* verursachen (Lee *et al.*, 2002). ANC-1 ist ein großes Dystrophin ähnliches Aktin bindendes Protein, das in der Kernmembran lokalisiert ist (Malone *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2002).

Nesprin-1 und -2 sind Vertebraten Orthologe von ANC1 und sind von zwei komplexen Genen kodiert. Beide Gene kodieren für mehrere Isoformen, die sich in ihrer Länge, Struktur und Lokalisierung unterscheiden (Zhang *et al.*, 2001, 2002; Padmakumar *et al.*, 2004). Das Nesprin-2 Gen befindet sich auf dem Chromosom 14 des menschlichen Genoms und ist mit seinen 115 Exons, die für mehrere Isoformen kodieren, ein sehr komplexes Gen. Nesprin-1 ist sehr ähnlich zu Nesprin-2 und ein weiteres Mitglied der  $\alpha$ -Actinin Familie. Das Nesprin-1 Gen liegt auf Chromosom 6 und kodiert für ein 1000 kDa Protein mit den gleichen strukturellen Bereichen wie Nesprin-2. Dieses Gen ist ebenfalls ein sehr komplexes Gen, das für mehrere Isoformen kodiert (Zhang *et al.*, 2001; Padmakumar *et al.*, 2004).

Nesprinisoformen wurden von verschiedenen Forschergruppen unterschiedlich genannt. Die kleinen C-terminalen Isoformen von Nesprin-1 sind auch als syne-1 und myne-1 bekannt (Apel *et al.* 2000; Zhang *et al.*, 2001; Mislow *et al.*, 2002a), die von Nesprin-2 syne-2 bzw. myne-2 (Zhang *et al.*, 2002). Die großen Nesprin-1 (1000 kDa) und Nesprin-2 (800 kDa) Isoformen wurden in unsere Arbeitsgruppe 2001 zum ersten Mal beschrieben (Zhen, 2001; Braune, 2001) und wurden als Enaptin (Padmakumar *et al.*, 2004) bzw. NUANCE (Zhen *et al.*, 2001) bezeichnet. Diese großen Isoformen bestehen aus einer Aktinbindedomäne (ABD) am N-Terminus, einer folgenden zentralen Region, die eine große Anzahl von Spektrin Domänen enthält, und einer Transmembrandomäne (TMD) am C-Terminus (Klarsicht Domäne) gefolgt von einem aus 30 Aminosäuren bestehenden perinukleären Teil. Eine direkte Bindung von den Nesprinen an Emerin und LaminA/C ist bekannt (Mislow *et al.*, 2002).

Anders als bei vielen aktinbindenden Proteinen der  $\alpha$ -Aktinin Familie zeigte sich, dass die zwei Calponin Homologie Domänen (CH1, CH2) der ABD der Nesprinproteine von einem Serinreichen Bereich getrennt sind und damit eine eigene Unterfamilie der  $\alpha$ -Aktinine bilden. Der Serinreiche Bereich könnte durch Phosphorylierung einen regulatorischen Einfluss auf die Bindungsaffinität des F-Aktin während verschiedener Prozesse wie z. B. der Zellmigration oder Zellteilung ausüben. Nesprin-2 und Nesprin-1 Orthologe von *D. discoideum* (Interaptin) (Rivero *et al.*, 1998), *C. elegans* (ANC1) und *D. melanogaster* (MSP300) enthalten ebenfalls eine ABD,

einen  $\alpha$ -helikalen Abschnitt im mittleren Bereich des Proteins und eine C-terminale TMD (Zhang *et al.*, 2002). Der C-terminalen Teil von Nesprinen und deren Orthologen ist sehr konserviert und wird KLS, Klarsicht Domäne oder KASH Domäne genannt. KASH steht für Klarsicht/ANC/Syne-1 homology. Die KASH Domäne besteht aus ca. 35 AS und ist für die Lokalisierung an der Kernmembran verantwortlich. Das Klarsicht-Protein von *D. melanogaster* ist für einen regulierten embryonalen Lipidtransport und für die Kernmigration im Auge zuständig (Mosley-Bishop *et al.*, 1999). Die KASH-Domäne unterscheidet Nesprin-1 und Nesprin-2 von anderen integralen Proteinen der Kernmembran wie z.B. Emerin, dem Lamin B-Rezeptor, LAP1 oder LAP2. Vor kurzem wurden andere Proteine, die eine KASH-Domäne besitzen identifiziert, wie z.B. UNC83 in *C.elegans* und C14orf49 beim Menschen (Lee *et al.*, 2002). Weitere Proteine wie *C. elegans* ZYG-12 and *S. pombe* Kms1p besitzen ebenfalls eine KASH-Domäne, allerdings mit einer geringeren Ähnlichkeit zu der KASH Domäne von Nesprin-2. Die KASH Proteine verbinden den Kern mit unterschiedlichen Netzwerken innerhalb der Zelle. ANC-1, MSP-300 und beide Nesprine sind für die Verankerung des Kerns zum Aktinzytoskelett verantwortlich, Klarsicht und ZYG-12 verbinden ihn zum Zentrosom (Malone *et al.*, 1999; Mosley-Bishop *et al.*, 1999) und Nesprin-1 zum Golgi-Netzwerk und zu Signaltransduktionskomplexen (Gough *et al.*, 2003).

Mit der Entdeckung von Nesprin-1 und Nesprin-2 in Säugetieren, ANC1 in *C. elegans*, MSP-300 in *D. melanogaster*, und Interaptin in *D. discoideum* wurde eine neue Proteinfamilie entdeckt, die den Zellkern mit dem Aktinzytoskelett verbindet (Rivero *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Mislow *et al.*, 2002; Zhen *et al.*, 2002; Padmakumar *et al.*, 2004).

## 1.8 Ziel der Arbeit

Nesprin-2 gehört zur Familie der Spektrine und wurde 2001 beschrieben. Es wird von einer 21 kb langen cDNA codiert. Das Protein hat eine Masse von 789 kDa (6899 AS) und besitzt am N-Terminus eine Aktinbindendedomäne (ABD), eine aus 22 Spektrin Domänen folgende zentrale Region und eine Transmembrandomäne (TMD) am C-terminus gefolgt von einem aus 30 Aminosäuren bestehenden perinukleären Teil. Immunfluoreszenzaufnahmen mit monoklonalen Nesprin-2 Antikörpern zeigen, dass das Protein hauptsächlich in der Kernmembran lokalisiert ist. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die *in vivo* Funktionen von Nesprin-2 sowie seine Assoziation zum Aktinzytoskelett und Zellkernproteinen zu untersuchen. Da Mutationen in Lamin A/C neuromuskuläre Krankheiten verursachen, sollte die Bindung von Nesprin-2 zu diesem Kernprotein näher erforscht werden. Um die Funktionen von Nesprin-2 Isoformen *in vivo* aufklären zu können, und dessen eventuelle Verbindung mit Krankheiten sichtbar zu machen, wurde eine Nesprin-2 defiziente Mausmutante analysiert. Dafür sollten immunhistochemische Methoden an Gefrier- und Parafinschnitten der Nesprin-2 *Knock-out* Mausgewebe bzw. Wildtypmausgewebe verwendet werden. Ebenfalls sollte eine Westernblot Analyse an diesen Geweben durchgeführt werden. Außerdem war die Verteilung der Isoformen von Nesprin-2 in unterschiedlichen Mausorganen festzustellen. Dafür mussten im Rahmen dieser Arbeit neue Antikörper hergestellt werden, die gegen die zwei wichtigsten Domänen des Proteins gerichtet sind. Dies waren polyklonale Antikörper, die gegen die letzten zwei Spektrin Domänen am C-terminalen Teil des Proteins gerichtet sind, und monoklonale Antikörper gegen die aktinbindende Domäne des Proteins.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Labormaterial

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

---

Röntgenfilm X-omat AR-5, 18 x 24 mm	Kodak
Spritzen, 1 ml	Terumo
Sterilfilter, 0,2 µm und 0,45 µm	Gelman Science
Zeta-Probe <sup>®</sup> Transfermembran	BioRad

### 2.1.2 Geräte

Amaya Nucleofector	Amaya
Blotkammer Trans-Blot SD	BioRad
Crosslinker UVC 500	Hofer
Eismaschine	Ziegra
Elektroporationsgerät, Typ Gene-Pulser	BioRad
Fluoroscant Ascent FI	Labsystems
Heizblock, Digi-Block <sup>®</sup> JR	neoLab
Hybridisierungsöfen	Hybaid
CO <sub>2</sub> -Inkubator, BBD 6220, BB 6220	Heraeus Instruments
Inkubator, Mikrobiologischer	Heraeus Instruments
Inkubator mit Schüttler	Kuehner
Kühlschränke	Liebherr
Kühlzentrifuge 1K15	Sigma
Laser Scan Mikroskop	Leica
Lichtmikroskop, IX70, CK2	Olympus
Lichtmikroskop, DMR	Leica
Magnetrührer, IKA Combimag RCT	Janke & Kunkel
Mikrowelle	Samsung
PCR-Maschine	MWG-Biotech
Peristaltikpumpe P1	Pharmacia Biotech
pH-Meter pH526	WTW
Plattengießmaschine	Technomat
Rotoren Typ JA-10	Beckman
Rotor Typ JA-25.50	Beckman
Rotor Typ SLA-1500	Sorvall



Rotor Typ SLA-3000	Sorvall
Rotor SS-34	Sorvall
Rotor TLA 45	Beckman
Rüttler Lab-Shaker	GFL
Spannungsverstärker Power Pac 200 und 300	Bio-Rad
Speedvac concentrator DNA 110	Savant
Spektralphotometer, Typ Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech
Sterilbank Hera Safe	Heraeus
Thermomixer	Eppendorf
Tiefkühlschränke/-truhen (-20°C)	Liebherr, Siemens
Tiefstühltruhen (-80°C)	Nunc
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
Tischzentrifuge 1-15	Sigma
Ultraschallgerät UP200S	Dr. Hielscher GmbH
Ultrazentrifuge Optima TLX	Beckman
UV-Auflichtmonitor TFS-35 M	Faust
UV-Transilluminator	MWG-Biotech
Vortex Reax top	Heidolph
Waage SBA42	Scaltec
Wasserbäder	GFL
Zentrifuge Beckman Avanti J25	Beckman
Zentrifuge Sorvall RC 5C plus	Sorvall

### 2.1.3 Kits

Advantage <sup>®</sup> 2 PCR Kit	Clontech
Detecting mouse primary antibodies on mouse tissue (M.O.M)	LINARIS
ECL Advance <sup>™</sup> Westernblotting Detection Kit	Amersham
Mouse Mab Isotyping Test Kit	SANBIO
Nucleobond AX 100 und 500	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract 2 in 1	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plus	Macherey-Nagel

pGEM-Teasy-Vector System I	Promega
RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit (50)	Qiagen
TA TOPO cloning <sup>®</sup> Kit	Invitrogen
ZERO blunt TOPO cloning <sup>®</sup> Kit	Invitrogen
Cell Line Nucleofector Kit V	Amaxa

#### 2.1.4 Puffer und andere Lösungen

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

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

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

87,0 g NaCl

5 ml Tween 20

2,0 g Natriumazid

mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.

##### PBG (pH 7,4):

0,5 % Rinderserumalbumin

0,1 % Fischgelatine

in 1 x PBS.

##### PBS (pH 7,2):

10 mM KCl

10 mM NaCl

16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

32 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

##### Phosphatpuffer:

s. Tabelle 2.1.

##### 20 x SSC:

3 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat

TBS-Puffer (pH 7,8):

6,05 g Tris

0,58 g NaCl

0,203 g MgCl<sub>2</sub>

mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.

TE-Puffer (pH 8,0):

10 mM Tris/HCl, pH 8,0

1 mM EDTA

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

242 g Tris

57,1 ml 16,6 M Eisessig

100 ml 0,5 M EDTA-Lösung

mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.

Tabelle 2.1 Herstellung von Phosphatpuffer

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

**2.1.5 Chemikalien und Reagenzien**

Acrylamid (Protogel: 30:0,8 AA/Bis-AA)	National Diagnostics
Agar-Agar (BRC-RG)	Biomatic
Agarose (Elektrophoresis Grade)	Biozym
5-Amino-2,3-Dihydro-1,4-Phthalazindion (Luminol)	Sigma
Aminosäuren	Sigma
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Adenosin-5'-triphosphat	Gerbu
Azeton	Riedel-de Haen
Bacto-Agar, Bacto-Pepton, Bacto-Trypton	Difco
5-Brom-4-chlor-3-indazol- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-gal)	Roth
Bromphenolblau, Natriumsalz	Serva
BSA (Rinderserumalbumin)	Roth
Calciumchlorid-dihydrat	Merck
Chloroform	Riedel-de Haen
Coomassie-Brillant-Blau R250	Serva
p-Cumarsäure	Fluka
4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma
Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Gerbu
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ethylenglycolbis(2-aminoethylether)- N,N,N,N-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma
Essigsäure 98-100 %	Riedel-de Haen
Ethanol	Riedel-de Haen
Ethidiumbromid	Sigma
FBS	Sigma
Formaldehyd	Sigma
Formamid	Merck
Glutathione Sepharose <sup>™</sup> 4B	Amersham
Glycerin (Glycerol)	Riedel-de Haen

---

Glycin	Degussa
Harnstoff	Gerbu
Lachssperma	Roche
Imidazol	Merck
Isopropanol	Merck
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Loewe Biochemica
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure (HEPES)	Biomol
Kaliumacetat	Fluka
Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydrogentriphosphat	Merck
Lithiumacetat	Sigma
Magnesiumchlorid	Fluka
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Riedel-de Haen
Milchpulver	Humana Milchunion eG
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Fluka
Natriumcitrat	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat-dihydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Riedel-de Haen
Natriumthiosulfat-5-hydrat	Riedel-de Haen
Ni-NTA-Sepharose	Pharmacia
Nukleotide	Roche, Sigma
Oligofectamin <sup>™</sup>	Invitrogen
Phalloidin (FITC/TRITC)	Sigma
Phenol	Roth

Phosphorsäure	Merck
1,4-Piperazindiethansulfonsäure (PIPES)	Sigma
Polyethylenglycol 4000 (PEG)	Merck
Ponceau-S Konzentrat	Sigma
Protein-A-Sepharose CL-4B	Pharmacia Biotech
Salzsäure 32 %ig	Fluka
Sephadex G50	Pharmacia
Silbernitrat	Riedel-de Haen
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
Thrombin	Amersham
Trichloressigsäure	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Fluka, Riedel-de Haen
Triton X-100 (Octylphenylpoly(ethylenglykolether))	Merck
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan-monolaurat)	Roth
Wasserstoffperoxid (30 %ige Lösung)	Merck

### Radioaktive Chemikalien

$\alpha$ - <sup>32</sup> P-desoxyadenosine-5'-triphosphate (10 mCi/ml)	Amersham
--	----------

## **2.1.6 Enzyme, Antikörper und Inhibitoren**

### ***2.1.6.1 Enzyme für die Molekularbiologie***

Alkalische Phosphatase	Roche
Desoxyribonuklease (DNase I)	Sigma
Lysozym	Sigma
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega
T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs
Pfu Turbo <sup>®</sup> -DNA-Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonukleasen und Puffer	Amersham, Boehringer, Gibco-BRL, Life Technologies, New England Biolabs, Roche
SP6 RNA-Polymerase	Roche

Ribonuklease A (RNase)	Sigma
T4-DNA-Ligase	Life Technologies
Taq-DNA-Polymerase	Roche

### 2.1.6.2 Antikörper

#### Primäre Antikörper:

anti- $\beta$ -Tubulin Antikörper (monoklonal aus Maus)	nicht veröffentlicht
anti-Emerin Antikörper (monoklonal aus Maus)	Novacastra Laboratories
anti-GFP mAk K3-184-2 (monoklonal aus Maus)	Schreiner, 2000
anti-GST Antikörper (polyclonal aus Kaninchen)	Amersham
anti-Lamin A/C Antikörper (JOL2) (monoklonal aus Maus)	Chemicon
anti-Lamin A/C Antikörper (polyclonal aus Kaninchen)	Cell Signaling Technology
anti-Lamin B Antikörper (LN43) (polyclonal aus Kaninchen)	F. Ramaekers & J. Broers
anti-LAP2 $\beta$ Antikörper (monoklonal aus Maus)	BD Biosciences
anti-Nesprin-2 (mAk K20-478-4) (monoklonal aus Maus)	Zhen et al., 2002
anti-Nesprin-2 (mAk K49-260-1) (monoklonal aus Maus)	Libotte et al., 2005
anti-Nesprin-2 (pAb K1) (polyclonal aus Kaninchen)	diese Arbeit
anti-Nesprin-2 (mAk. K56-286-2) (monoklonal aus Maus)	diese Arbeit
anti-Kernporenkomplex (Nup358) (monoklonal aus Maus)	E. Coutavas & G. Blobel
anti-Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) (polyclonal aus Kaninchen)	M. Plomann

#### Sekundäre Antikörper:

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

Ziege-anti-Maus-IgG, Peroxidase-Konjugat Sigma

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

### 2.1.6.3 Inhibitoren

#### Inhibitoren:

Benzamidin	Sigma
Complete-Mini <sup>®</sup> Inhibitoren Cocktail, EDTA-frei	Roche
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Merck
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Ribonuklease-Inhibitor (RNAsin)	Promega

#### Antibiotika:

Ampicillin	Grünenthal
Kanamycin	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Biochrom

### 2.1.7 Oligonukleotide (Sigma)

<b>ABD-F1</b>	CCA CGG AAG ATG GAG AGG GTT TC
<b>ABD-R1</b>	GGA CTT GAG GCA GGA GAT GAG TC
<b>CT-R1</b>	CAT GAG TCA AAA GCT CAG GC
<b>CT-F1</b>	CTC AGA CAA GAT GTC CTT CTG
<b>tm-Xho-F</b>	CTC GAG GGC AGC CCT ACC CCT GC
<b>tm-Hind-R</b>	CGA AGC TTC TAT GTG GGG GGT GGC C
<b>AK-mABD-F</b>	GGA TCC GCT CAG GAG CAG TGT GCC
<b>AK-mABD-R</b>	GAA TTG TCA TTC ACA GAG CTT GTG G
<b>K14-HA-NU-Xbal</b>	TGC TCT AGA GCA TCC GGT GGA TCC CTA TG
<b>K14-HA-NU-Sacl</b>	C GAG CTC GAT ATC GCC GCC ACC
<b>K14- NU-seq</b>	GGT GAC CTT GCC ATG CCG GTG
<b>5'-Trans_NU-HA</b>	GAT ATC GCC GCC ACC ATG TAC CCA TAC GAC GTC CCA
<b>3'Trans_NU-HA</b>	GAC TAC GCT GCA GCC CTA CCC CTG C
<b>TL 5'1</b>	GAT ATC ACG CGT TAA GAT AC
<b>TL 3'1</b>	GGA ATT CAC AGA AGG CGA GGA GGA GAC AG
<b>HE 5'8</b>	CGG GAT CCC TAT GTG GGG GGT GGC C
	CGC TTT GAG GAC TGG CTC AAG TC



<b>HE 3'6</b>	CTT GAG AGG AAG GAG CGC T
<b>P13</b>	ATC ACA CCT GCA GAT TCA CAG G
<b>P14</b>	CTT ACT CTG TAA TCC AGT CTG
<b>P18</b>	TGT CTG CCT ACA TGT TAC TAT GGT C
<b>NEO</b>	TGC GAG GCC AGA GGC CAC TTG TGT AGC

### 2.1.8 Vektoren

pCR <sup>®</sup> -2.1-TOPO <sup>®</sup>	Invitrogen
pCR <sup>®</sup> -BLUNT II-TOPO <sup>®</sup>	Invitrogen
pEGFP-C1,-C2	Clontech
pGem-Teasy <sup>®</sup>	Promega
pGEX-4T-1	Amersham

### 2.1.9 Plasmide

#### pEGFP-C1-Cterm6

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

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

Dieses Plasmid kodiert für ein GFP-Fusionsprotein mit den Aminosäuren 6.570-6.883 des C-terminalen Bereichs von Nesprin-2, der die letzten zwei Spektrin-Domänen und die Transmembran-Domäne enthält.

#### pEGFP-C2-SR

Das PCR-Produkt der Primer HE 5'8 und HE 3'6 wurde in pCR<sup>®</sup>-BLUNT II-TOPO<sup>®</sup> ligiert. Danach wurde das Plasmid mit der Restriktionsendonuklease EcoRI geschnitten, um das Insert in den EcoRI geschnittenen pEGFP-C2 Vektor zu ligieren. Eine Deletion von drei Basen im PCR-Produkt führte zu einem vorzeitigen Stopp-Kodon, so dass das GFP-Fusionsprotein die

Aminosäuren 6.146-6.799 des C-terminalen Bereichs von Nesprin-2 enthält, der die letzten vier Spektrin-Domänen repräsentiert.

#### pGEX-4T-1-K1 (R. Müller)

Dieses Plasmid kodiert für ein GST-Fusionsprotein mit den Aminosäuren 6.546-6.796 von Nesprin-2 und wurde ursprünglich dafür verwendet, einen monoklonalen Antikörper gegen den C-terminalen Bereich von Nesprin-2 herzustellen (mAk 49-260-1). Dieses Protein beinhaltet die letzten beiden Spektrin-Domänen von Nesprin-2.

### **2.1.10 Bakterienstämme, Hefestämme, Zell-Linien**

#### Bakterienstämme:

*E. coli* DH5 $\alpha$

Hanahan, 1983

*E. coli* M15

Rüther, 1982

Xl 1-blue

#### Zelllinien (Name, Organismus, Gewebe):

HaCaT, *Homo sapiens*, Epidermis

Pam212, *Mus musculus*, Epidermis

COS7, *Cercopithecus aethiops*, Niere

HEK293, *Homo sapiens*, Niere

MEF-LmnA KO, *Mus musculus*, embryonale Fibroblasten

### **2.1.11 Kultur-Medien**

#### **2.1.11.1 Kultur-Medien für Bakterien**

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

LB-Flüssig-Medium:

10 g Bacto-Trypton

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

auf 1 l mit Wasser auffüllen.

SOC-Medium:

20 g Bacto-Trypton

5 g Hefeextrakt

0,5 g NaCl

20 mM Glucose

auf 1 l mit Wasser auffüllen.

**2.1.11.2 Kultur-Medien für Säugetierzellen**

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, D5796) Sigma

Opti-MEM Gibco

RPMI 1640-Medium Gibco

**Hybridoma Zellen Medien:**

Normales Medium: 500 ml RPMI 1640 (Biochrom)  
 55 ml *foetal calf serum*, Hitze inaktiviert (FCS)  
 11 ml Kanamyzin, 5 mg/ml  
 6ml 1mM  $\beta$ -mercaptoethanol.

3x HAT Medium: 572 ml normales Medium  
 36 ml 50x HAT *suplement* (Biochrom)

1x HAT Medium 572 ml normales Medium  
 12 ml 50x HAT *suplement* (Biochrom)

1x HT Medium 572 ml normales Medium  
 12 ml 50x HT *suplement* (Biochrom)

Einfriermedium: 80 ml Normales Medium  
 10 ml *foetal calf serum*, Hitze inaktiviert (FCS)  
 10 ml DMSO, hybri-max (Sigma)

**Medium für primäre Keratinozyten**

350 ml DMEM Medium

110 ml Ham's F12

500 µl EGF

500 µl Insulin

50 ml 5mg/ml -hydrocortisone

5 µl Cholera toxin ( $10^{-5}$ M)

10 ml Penicilin/Streptomycin

50 ml FCS

500 µl Adenin ( $1,8 \cdot 10^{-5}$ M)

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

**2.2 Molekularbiologische Methoden****2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* ist eine abgewandelte Form der kommerziellen Aufreinigung gemäß Machery-Nagel (2.2.2). Hierzu werden 1 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthält, abzentrifugiert. Das Pellet wird dabei in 150 µl der Lösung Puffer I (15 mM Tris, pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert. Danach werden 150 µl der Lösung Puffer II (0,2 N NaOH, 1 % SDS) hinzugegeben, drei- bis fünfmal geschüttelt und 5 min bei RT inkubiert. Infolge der SDS- und Alkalibehandlung werden bei diesem Reaktionsschritt die Zellmembranen zerstört. Nach Zugabe von 150 µl Lösung Puffer III (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) werden Proteine, chromosomale DNA und andere Zellbestandteile gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 18.000 x g wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß mit 1 ml Ethanol (96 %) überführt. Die durch Ethanolzugabe gefällte Plasmid-DNA wird für 10 min bei 18.000 x g pelletiert. Nach einem Waschschriff mit Ethanol (70 %) wird die Plasmid-DNA im „Speedvac concentrator“ getrocknet, in 10 mM Tris/HCl aufgelöst.

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

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

### 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

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

Temperatur ( $T_H$ ) eines bestimmten Oligonukleotids wurde anhand seiner Basenzusammensetzung folgendermaßen abgeschätzt (Suggs *et al.*, 1981):  $T_H = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T) - 2$ .

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

#### Standard-PCR-Programm:

I. Initiale Denaturierung: 94°C, 5 min

II. Temperaturzyklus (25-35 Zyklen):

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

III. Terminale Verlängerung: 72°C, 10 min

IV. Kühlung auf 4°C

#### Reaktionsansatz:

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

1 µl Oligonukleotid A (10 pmol/ml)

1 µl Oligonukleotid B (10 pmol/ml)

1 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM)

5 µl 10 x PCR -Puffer (100 mM Tris/HCl (pH 8,3); 500 mM KCl; 20 mM MgCl<sub>2</sub>)

1 µl *Taq*-Polymerase (3-4 U)

mit Wasser auf 50 µl auffüllen.

#### **2.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA**

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

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

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

### 2.2.5 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten erfolgt aufgrund der vom Molekulargewicht abhängigen Laufgeschwindigkeit in einer Agarosegel-Matrix. Je nach Verwendung und Auftrennungsziel wurden 0,7-2,5 %ige Gele in TAE-Puffer verwendet. Zur Herstellung eines Agarosegels wurde die Agarose im Puffer aufgekocht, mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration  $0,1 \mu\text{g/ml}$ ) und nach Abkühlung auf einen Gelträger verschiedener Größe (7,5 cm x 8 cm, 11,5 cm x 14 cm, 12,5 cm x 19 cm) mit Taschenformer gegossen. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und in die Probenaschen geladen. Die DNA-Auftrennung erfolgte in TAE-Puffer horizontal in Flachbett-Gelapparaturen. In Abhängigkeit von der Gelgröße, Laufdauer und Auftrennungseffizienz wurde eine Spannung von 20 V bis 100 V angelegt. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde die DNA mit einem Transilluminator ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte durch Fotografieren unter UV-Licht mit einem Videodokumentationsgerät. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte jeweils im Vergleich mit einem geeigneten Größenstandard.

#### 5 x Probenpuffer:

30 % Glycerol

0,25 % Bromphenolblau

in TE-Puffer.

#### 1 kb DNA Leiter (Life Technologies):

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

### **2.2.6 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Zunächst wurde die mit Restriktionsendonukleasen behandelte DNA im TAE-Agarosegel ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die zu isolierende Bande wurde unter UV-Licht aus dem Agarosegel geschnitten. Das Gelstück wurde in ein 0,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt, dessen Boden vorher mit einer Kanüle durchstoßen und mit silanisierter Glaswolle gefüllt wurde. Dieses Gefäß wurde in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gestellt, in dem durch Zentrifugation für 8 min bei 5.000 x g das DNA-Eluat des Gelstücks aufgefangen wurde. Die so eluierte DNA wurde dann mit dem zweifachen Volumen 96 %igen Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,0) bei -20°C gefällt (2 Std), 10 min bei 16.000 x g und 4°C pelletiert. Abschließend wurde die DNA mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 10–20 µl TE-Puffer aufgenommen. Alternativ erfolgte die Elution mit dem „NucleoSpin Extract 2 in 1“-Kit der Firma Macherey-Nagel. Dabei wurde die Bande des gewünschten DNA-Fragments mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Zu je 100 mg Agarosegel wurden jeweils 300 µl Puffer NT 1 pipettiert. Die Probe wurde 10 min auf 50°C erwärmt, zwischendurch geschüttelt und anschließend auf eine NucleoSpin-Säule geladen. Diese wurde für 1 min bei 6.000 x g abzentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es folgten 2 Waschschrte mit je 600 µl und 200 µl Puffer NT3 und Zentrifugation für 1 min bei 10.000 x g. Nach erneuter Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit ohne Zugabe des Puffers NT3 wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt. Anschließend

### **2.2.7 DNA Sequenzierung**

DNA-Sequenzierungen wurden beim ZMMK-ServiceLabor in Auftrag gegeben. Für die Sequenzreaktion wurden entweder universelle Plasmid- oder interne Insert-spezifische Primer und ca. 300 ng Plasmid-DNA in Kombination mit dem *Abi Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Perkin Elmer Applied Biosystems) verwendet. Die Reaktionsprodukte wurden mit einem *Abi Prism 377 Automated Sequencer* (Perkin Elmer Applied Biosystems) analysiert.



### 2.2.8 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien (Laird, 1991)

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde genomische DNA aus den Schwanzspitzen verwendet. Dazu wurden 0,5-1 cm lange Schwanzspitzen mit 500 µl TENES-Puffer übernacht bei 55 °C im Thermoschüttler inkubiert. Die Proteine wurden durch Zugabe von 150 µl 6M NaCl gefällt. Die Proben wurden danach für 5 min abzentrifugiert. Zu den Überstand wurden 500µl 100% Ethanol und mit 200 µl 70 %Ethanol gewaschen. Danach wurden die Proben kurz getrocknet und mit 100 µl 100 mM Tris resuspendiert. Die Analyse der genomischen DNA Erfolgte mittels Southernblot. Von dieser DNA-Präparation wurden 15 µl für den Restriktionsverdau und die daran anschließende Southernblot Analyse eingesetzt.

#### TENES-Puffer :

50 mM Tris/HCl pH 7,4

100 mM EDTA

400 mM NaCl

0,5 % SDS

10 ml Proteinase K 20mg/ml

### 2.2.9 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit dem Stratagene Prime It II ® Kit

Die zur Markierung verwendete DNA wurde mit Restriktionsenzymen aus Plasmiden geschnitten. Es wurden ungefähr 25ng DNA mit Wasser zu einem Endvolumen von 24µl aufgefüllt und mit 10µl „random oligo nucleotide primer“ versetzt. Die Sonde wurde fünf Minuten auf 95°C erhitzt, zwei Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend mit 10µl 5x Primer-Puffer, 5µl  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP (50µCi) und 2U Klenow-Enzym versetzt. Der Reaktionsansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Zentrifugation bei 3.000x g für zwei Minuten über eine 1ml Sephadex G-50-Säule in Wasser abgetrennt. Die radioaktiv markierte Probe wurde vor ihrem Einsatz in der Southern-Blot-Analyse bei 100°C für fünf Minuten denaturiert fünf Minuten auf Eis abgekühlt und danach mit 20 ml Hybridisierungspuffer gemischt.

### **2.2.10 Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden für Nylonmembranen nach Southern-Blot**

Die Nylonmembran wurde in einer Glashybridisierungsröhre für eine Stunde mit 20 ml Hybridisierungspuffer bei 65° C in einem Röhrenofen vorhybridisiert. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der radioaktiven Sonde an die Membran wurde während der Vorhybridisierung 100µl denaturiertem Heringssperma DNA (10mg/ml; Sigma) zur Lösung gegeben. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Probe zur Vorhybridisierungslösung erfolgte die Hybridisierung Übernacht bei 65 °C. Danach wurde die radioaktive Probe abgegossen und die Membran zweimal kurz mit Waschpuffer behandelt. Anschließend wurde zweimal eine halbe Stunde bei 65 °C mit Waschpuffer gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die Membran in Polyethylen-Folie verpackt und ein Röntgenfilm in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie bei -80°C exponiert.

#### Hybridisierungspuffer (20ml):

7 ml 20% SDS  
10 ml 1M NaHPO<sub>4</sub> Phosphatpuffer (pH 7,2)  
40 µl 500 mM EDTA  
2 ml H<sub>2</sub>O  
1 ml Heringssperma (10mg/ml)  
0,2g BSA

#### Waschpuffer:

2% SSC  
0,1% SDS

### **2.2.11 *In vitro*-Rekombination von DNA**

#### ***2.2. 11.1 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen***

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

### **2.2. 11.2 Dephosphorylierung der 5'-Enden von linearisierten Vektoren**

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

#### 10 x CIP-Puffer:

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

10 mM MgCl<sub>2</sub>

### **2.2. 11.3 Ligation von Vektor- und DNA-Fragmenten**

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

#### 10 x Ligations-Puffer:

660 mM Tris/HCl (pH 7,5)

50 mM MgCl<sub>2</sub>

50 mM DTT

10 mM ATP

### **2.2. 11.4 Primer-Hybridisierung**

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

Primer-Hybridisierung (Annealing):

1 µl Oligonukleotid 1  
1 µl Oligonukleotid 2  
48 µl Annealing-Puffer

Annealing-Puffer:

100 mM KAc  
30 mM HEPES/KOH (pH 7,4)  
2 mM MgAc

**2.2. 11.5 Phosphorylierung der 5'-Enden von Primer-Dimeren**

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

Reaktionsansatz:

2 µl der Primer-Hybridisierungs-Reaktion  
1 µl T4 Polynukleotidkinase  
1 µl 1 mM ATP  
1 µl T4 Polynukleotidkinase-Puffer  
5 µl Wasser

**2.2.12 Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Säugetierzellen gemäß Qiagen**

Zum Schutz vor RNasen wurden während der Arbeit stets Handschuhe getragen. Außerdem wurden nur sterile Plastikgefäße und Pipetten sowie autoklavierte Lösungen verwendet. Um bis zu 35 µg saubere Gesamt-RNA aus Säugetierzellen zu gewinnen, wird das von der Firma Qiagen angebotene „RNeasy“-Kit benutzt. Für eine Northernblotanalyse wurden die Zellen einer 70-80 %ig konfluenten Gewebekulturflasche geerntet. Das Zell-Pellet wurde in 600 µl RLT-Puffer, der Zellen aufschließt und gleichzeitig RNasen inhibiert, resuspendiert. Das Zell-Lysat wurde daraufhin mit einer im Durchmesser 0,9 mm großen Nadel und einer 1 ml Einwegspritze

homogenisiert. Nach Zugabe von 600  $\mu$ l 70 %igem Ethanol, wurde die Lösung auf die RNeasy-Säulen gegeben und bei 8.000 x g für 15 sek zentrifugiert. Nach mehrmaligen Waschschritten (700  $\mu$ l RW1-Puffer und 2 x 500  $\mu$ l RPE-Puffer) wurde die Säule durch zweiminütige Zentrifugation bei 8.000 x g getrocknet. Die Elution der Gesamt-RNA erfolgte mit 30-50  $\mu$ l RNase-freiem Wasser bei 8.000 x g für 1 min. Die RNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.2.13 Reverse Transkriptase-Reaktion

Die reverse Transkriptase (RT) ist ein Enzym, das RNA in DNA umschreiben kann. In dieser Arbeit wurde für die RT-Reaktion Gesamt-RNA eingesetzt. Für die Umschreibung in cDNA wurden randomisierte Hexanukleotide ( $p(dN)_6$ ) gewählt, die während der Reaktion an beliebigen Stellen der RNA binden und so die Synthese vieler cDNA-Stränge ermöglichen. Für die RT-Reaktion wurden 500-1.000 ng Gesamt-RNA eingesetzt und nach dem folgenden Protokoll in cDNA umgeschrieben:

0,5  $\mu$ l 10 mM dNTP-Mix

1  $\mu$ l 50  $\mu$ M  $p(dN)_6$

0,5  $\mu$ l M-MLV-Transkriptase

2  $\mu$ l 5 x RT-Puffer

0,5  $\mu$ l RNAsin (40 U/ $\mu$ l)

500-1.000 ng Gesamt-RNA

mit Wasser auf 10  $\mu$ l auffüllen.

1 Std Inkubation bei 37°C.

### 2.2.14 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Vor jeder RNA-Gelelektrophorese wurden die Gelträger, Taschenformer sowie die Gelkammern mit 1 %igem SDS inkubiert. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurden 0,7 %ige Agarosegele verwendet, die durch Erhitzen von 1,4 g Agarose in 20 ml 10 x MOPS-Puffer (pH 8,0) und 148 ml DEPC-Wasser sowie durch Zugabe von 32 ml 37 %iger Formaldehydlösung nach Abkühlung auf 60°C, hergestellt wurden. Es wurden 20  $\mu$ g RNA je Spur aufgetrennt. Die RNA wurde vorher

durch Zugabe von 1/3 Volumen RNA-Puffer und fünf Minuten Inkubation bei 68°C denaturiert. Nach Zugabe von RNA-Ladungspuffer wurde die RNA in die Probentaschen geladen. Die RNA-Auftrennung erfolgte horizontal in Flachbett-Gelapparaturen mit MOPS-Laufpuffer (pH 7,0) und einer Spannung von 20V über Nacht. Solche aufgetrennte RNA wurden zum Transfer auf Membranen verwendet.

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

41,9 g MOPS

16,7 ml 3 M Natriumacetatlösung

20 ml 0,5 M EDTA-Lösung

mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.

Proben-Denaturierungs-Puffer:

50 µl 10 x MOPS (pH 8,0)

83 µl Formaldehyd

250 µl Formamid

RNA-Ladungspuffer:

50 % (w/v) Saccharose

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

### **2.2.15 Transformation von *E. coli*-Zellen**

#### **2.2. 15.1 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen**

Die hier angeführte Methode entspricht im Wesentlichen der von (Inoue *et al.*, 1990) beschriebenen Methode. Eine Übernachtskultur von DH5α-Zellen wird in 250 ml LB-Medium bei 18°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 angezogen. Die Kultur wird für 10 min auf Eis inkubiert und danach 10 min bei 2.500 x g und 4°C pelletiert. Das Zell-Pellet wird in 80 ml eiskaltem Transformations-Puffer in einem Eisbad resuspendiert, um danach wieder abzentrifugiert zu werden. Das Zell-Pellet wird daraufhin in 20 ml eiskaltem Transformations-Puffer resuspendiert und mit 1,5 ml DMSO (7 % Endkonzentration) versetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 10 min im Eisbad werden Aliquots von 100 µl in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

Transformations-Puffer:

10 mM PIPES

15 mM CaCl<sub>2</sub>

250 mM KCl

Nach pH-Einstellung auf 6,7 mit KOH und der Zugabe von MnCl<sub>2</sub> (55 mM Endkonzentration) wird die Lösung sterilfiltriert und kann bei 4°C gelagert werden.

**2.2. 15.2 Transformation von chemokompetenten *E. coli*-Zellen**

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

**2.2.16 *E. coli*-Dauerkulturen**

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

**2.3 Proteinchemische Techniken****2.3.1 Induktion und Extraktion rekombinanter Proteine**

Für die Expression rekombinanter Proteine unter der Kontrolle des durch IPTG induzierbaren T7p-Promotors wurden die *E. coli*-Stämme XL1-Blue, DH5α und M15 verwendet. Übernachtskulturen der entsprechenden Transformanten wurden 1:100 in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin verdünnt, und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 unter Schütteln (250 UpM) inkubiert. Die Expression rekombinanter Proteine wurde zu diesem Zeitpunkt durch Zugabe von 1,0 mM IPTG (Endkonzentration) induziert, die Zellen wurden anschließend weitere 4 Std bei 37°C geschüttelt und nach der Ernte durch Zentrifugation (10.000 x g, 10 min) in Lysis-Puffer

resuspendiert. Hier ist zu unterscheiden, ob das pQE- oder pGEX-4T-Expressionssystem verwendet wurde. Das Produkt der Expression mit dem pQE-System ist das in den Vektor klonierte Protein in Fusion mit einem „6His-Tag“. Dieser ermöglicht die affinitätschromatographische Reinigung des Proteins mit Ni-NTA-Sepharose. Bei Verwendung des Vektors pGEX-4T ist das exprimierte Protein mit Glutathion-S-Transferase fusioniert, um die Reinigung mit Glutathion-Sepharose zu ermöglichen.

### **2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

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

### **2.3.3 Reinigung rekombinanter Proteine mit dem pGEX-4T-1 Expressionssystem**

Das Zell-Pellet einer 50 ml Bakterienkultur wurde in 5 ml Puffer Lysis-Puffer resuspendiert. Nach fünfzehnminütiger Inkubation auf Eis wurde das Lysat mit DTT (5 mM Endkonzentration), Benzamidin (1 mM Endkonzentration), PMSF (1 mM Endkonzentration) und Sarcosyl (1,5 % Endkonzentration) versetzt. Danach wurde die Lösung für 1 min mit Ultraschall behandelt und 15 min bei 18.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit Triton X-100 (2-4 % Endkonzentration) versetzt. Der Überstand wurde zu 100 µl mit PBS äquilibrierter Glutathion-Agarose-Matrix gegeben und 1 Std bei 4°C geschüttelt. Nach einminütiger Zentrifugation bei 10.000 x g wurde mehrmals mit PBS gewaschen. Um GST-Fusionsproteine von der Glutathion-Agarose-Matrix zu trennen, erfolgte eine Elution mit 1 ml Elutions-Puffer. Um das Fusionsprotein im Überstand ohne die Glutathion-S-Transferase zu erhalten, wurde das an die Glutathion-Agarose-Matrix gebundene Fusionsprotein direkt mit 10 U Thrombin in 1 ml PBS gespalten. Die gereinigten Fusionsproteine wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.3.4) analysiert.



Lysis-Puffer:

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)

150 mM NaCl

1 mM EDTA

1 % Triton X-100

100 µg/ml Lysozym

Elutions-Puffer:

250 mM Tris (pH 8,0)

20 mM reduziertes Glutathion

**2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

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

5 x SDS-Probenpuffer:

2,5 ml 1 M Tris/HCl (pH 6,5)

4,0 ml 10 % Natriumdodecylsulfat

2,0 ml Glycerin

1,0 ml β-Mercaptoethanol

200 µl 10 % Bromphenolblau

10 x SDS-PAGE-Laufpuffer:

0,25 M Tris

1,9 M Glycin

1 % Natriumdodecylsulfat

Molekülmassenstandards:

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

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

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

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

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

**Tabelle 2.4 Stocklösungen für Gradientengele**

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

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

	<b>3 % SDS-Trenngel</b>	<b>15 % SDS-Trenngel</b>	<b>Sammelgel (4 %)</b>
--	-------------------------	--------------------------	------------------------

<b>Stocklösung pro Gel</b>	4,5 ml	4,5 ml	3,0 ml
<b>TEMED</b>	8 $\mu$ l	8 $\mu$ l	16 $\mu$ l
<b>10 % APS</b>	15 $\mu$ l	15 $\mu$ l	30 $\mu$ l

### 2.3.5 Färbung von Polyacrylamidgelen

#### 2.3.5.1 Färbung mit Coomassie-Blau

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

##### Färbelösung:

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

50 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure

Danach wird die Färbelösung filtriert.

##### Entfärberlösung:

10 % (v/v) Ethanol

7 % (v/v) Essigsäure

#### 2.3.5.2 Silberfärbung

Für eine Färbung der aufgetrennten Proteine mit einer sensitiveren Methode als 2.3.6.1 wurde die Silberfärbung benutzt. Dazu wurden SDS-Gele 5 min in Fixierungs-Lösung geschüttelt. Nach mehrmaligem Waschen in Wasser (3 x 5 sek, 1 x 5 min, 3 x 5 sek) wurde das Gel in 50 %igem Azeton für 5 min inkubiert. Nach Behandlung mit 100  $\mu$ l 10 %igem Natriumthiosulfat-5-hydrat in 60 ml Wasser wurde das Gel mit Wasser gewaschen (3 x 5 sek) und für 8 min in Imprägnier-Lösung geschüttelt. Danach wurde das Gel nochmals gewaschen (2 x 5 sek) und mit Entwickler-Lösung behandelt. Die Reaktion wurde nach 20-30 sek mit der Stopp-Lösung abgestoppt und das Gel mit Wasser abgespült.

Fixierungs-Lösung:

60 ml 50 %ige Azeton-Lösung

1,5 ml 50 %ige Trichloressigsäure

25 µl 37 %ige Formaldehyd-Lösung

Imprägnier-Lösung:

0,8 ml 20 %ige Silbernitrat-Lösung

0,6 ml 37 %ige Formaldehyd-Lösung

in 60 ml Wasser.

Entwickler-Lösung:

1,2 g NaCO<sub>3</sub>

25 µl 37 %ige Formaldehyd-Lösung

25 µl 10 %ige Natriumthiosulfat-5-hydrat (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O)

in 60 ml Wasser.

Stopp-Lösung:

1 %ige Essigsäure

**2.3.6 Übertragung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Westernblot)*****2.3.6.1 Transfer auf Nitrocellulosemembranen im Halbtrocken-Verfahren***

Proteine mit einem Molekulargewicht unter 150 kDa wurden mit dem Semi-Dry-Transfer-Verfahren (Halbtrocken-Transfer) auf Membranen übertragen. Dazu wird das Gel auf eine mit Anodenpuffer II befeuchtete Nitrocellulosemembran überführt und auf zwei mit Anodenpuffer II getränkte 3 MM Whatman-Filterpapiere gelegt. Auf die Anode wird ein in Anodenpuffer I getränktes 3 MM Whatman-Filterpapier gelegt. Der Stapel mit dem Gel wird luftblasenfrei auf das Filterpapier auf der Anode der Blotkammer gelegt. Der Stapel wird mit zwei weiteren, in Kathodenpuffer getränkten 3 MM Whatman-Filterpapieren überschichtet. Dann wird die Kammer mit der Kathode verschlossen und der Transfer über 30-45 min bei 10 V durchgeführt.

Anodenpuffer I:

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

Anodenpuffer II:

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

Kathodenpuffer:

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

**2.3.6.2 Transfer auf Nitrocellulosemembranen im Nassverfahren**

Besonders für große Proteine (>150 kDa) ist das Semi-Dry-Verfahren (2.3.7.1) nicht sehr effizient. Daher werden größere Proteine wie Nesprin-2 im Nassverfahren transferiert. Auf eine aus einem Drahtnetz bestehende Anode werden zwei mit Transferpuffer getränkte 3 MM Whatman-Filterpapiere gelegt. Darauf werden die PVDF-Membran (Immobilon™-P Transfermembran) und das Proteingel luftblasenfrei aufgezogen. Das Gel wird mit zwei weiteren 3 MM Whatman-Filterpapieren abgedeckt und mit der Kathode zusammengedrückt. Um eine gleichmäßige Druckverteilung zwischen Membran und Gel zu gewährleisten, wird unmittelbar an den Elektroden je ein Schwamm mit eingebunden. Der Transfer erfolgt in einer mit Transferpuffer gefüllten Blotkammer über drei Tage bei 4 °C und 20 V. Nach dem Transfer wird die Membran für 10 sek mit Methanol behandelt und danach an der Luft getrocknet. Die Membran kann nach Trocknung sofort verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

Transferpuffer:

25 mM Tris  
192 mM Glycin

10% SDS

20% Ethanol

### **2.3.7 Färbung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen**

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

### **2.3.8 Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose**

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

#### Block-Puffer

5 % Milchpulver

0,05 % Tween

in PBS

#### Waschpuffer

0,1 % Tween in 1x PBS

Luminollösung:

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

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

89 µl p-Cumarsäure (0,1 M in DMSO)

18 ml Wasser

6,1 µl 30 %ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung

### **2.3.9 Entfernung der Antikörper nach Immundetektion**

Durch diese Methode werden primäre und sekundäre Antikörper von einer zuvor zur Immundetektion verwendeten Westernblotmembran entfernt. Dafür wurde die Membran zwei Mal 5 min bei Raumtemperatur im Stripping-Puffer geschüttelt und anschließend mehrmals mit NCP-Puffer ausgiebig gewaschen. Die Membran steht nun für eine erneute Immunmarkierung und Detektion von Proteinen (2.3.8) zur Verfügung.

Stripping-Puffer:

0,2 M NaOH

### **2.3.10 Aufreinigung von IgG aus Hybridoma-Kulturüberständen mit Protein-A-Sepharose CL4B**

Zur Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Kulturüberständen der Antikörperproduzierenden Hybridomazellen wird der Überstand unter ständigem Rühren bei 4°C auf eine mit Protein A-Sepharose (1 ml Protein-A-Sepharose CL4B) beladene Säule gegeben. Das Eluat wird aufgefangen und erneut auf die Säule aufgetragen. Man lässt das Eluat über Nacht über die Säule zirkulieren. Am nächsten Tag wird die Säule mit Waschpuffer so lange gewaschen, bis das Eluat eine OD<sub>280</sub> von unter 0,1 aufweist. Dann werden die Antikörper mit Elutions-Puffer eluiert, wobei jede Fraktion sofort mit einer Spatelspitze Natriumcarbonat neutralisiert wird. Die Fraktionen mit einer OD<sub>280</sub> zwischen 0,5 und 1 werden ebenso vereinigt wie die mit einer OD<sub>280</sub> größer als 1. Fraktionen, die weniger Protein enthalten, werden verworfen. Die aufgereinigten und konzentrierten Antikörper werden daraufhin gegen PBS dialysiert.

Waschpuffer:

0,2 % Natriumazid

in PBS

Elutions-Puffer:

0,2 M Glycin (pH 2,7)

**2.3.11 Aufreinigung des Polyklonalen Antikörpers Nesprin-2-K1 durch Affinität Chromatographie mit CNBr-Sepharose**

Zur Aktivierung der CNBr-Beads, wurden 280 mg abgewogen und mit 100 ml 1mM HCL gewaschen. Zunächst wurden sie 2 Mal mit Dialyse-Puffer equilibriert. Das mit Thrombin gesplante K1-Protein wurde nach 3 Tage Dialyse mit der Dialyse-Puffer zu den Beads zugegeben und Übernacht bei 4°C rotieren lassen. Die Beads wurden danach abzentrifugiert und 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 1 M Glycin blockiert. Dann wurden sie abwechselnd mit Sauerem und basischen Puffer gewaschen, um die ungebundene Antikörper zu entfernen. Die an K1 protein gebundene Beads wurden in einer Chromatographiesäule gepackt und an einer Pumpe angeschlossen. Das Antikörperserum wurde 1:2 mit 1x PBS verdünnt und Übernacht durch die CNBr-K1-Säule gelaufen. Am nächsten Tag wurde die Säule 4 Mal mit kaltem 1x PBS gewaschen, dann mit 8 Mal 1 ml Elutionspuffer eluiert. Die gereinigten Antikörper Fraktionen wurden Sofort mit 300 µl 0.5 M Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> neutralisiert. Die Konzentrationen der einzelnen Fraktionen wurden bei 280 nm im Photometer bestimmt. Schließlich wurden die Antikörperfraktionen gepoolt und gegen 1x PBS dialysiert.

Saurer Puffer: 0,2 M Glycin (pH: 2,7)Basischer Puffer: 1x PBSElutionpuffer:

0,2 M Glycin (pH: 2,7)



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

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

#### Homogenisations-Puffer:

10 mM HEPES (pH 7,5)

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

1,5 mM KCl

0,5 mM DTT

0,2 mM PMSF

sowie 1 Tablette Complete-Mini<sup>®</sup> Inhibitoren Cocktail auf 10 ml.

### 2.3.13 Proteinbindungsanalysen von Fusionsproteinen

Für die Proteinbindungsanalyse zwischen löslichen GST-Fusionsproteinen wurden die beiden zu testenden Proteine aufgereinigt (2.3.3). Eines der Proteine wurde mit Thrombin von der Glutathion-S-Transferase gespalten, das andere Protein wurde an der Glutathion-Agarose-Matrix belassen. Die Mengen beider Proteine wurden semiquantitativ auf einem SDS-Gel abgeschätzt. Beide Proteinlösungen wurden über Nacht bei 4°C auf einem Roller inkubiert. Danach wurde die Glutathion-Agarose-Matrix bei 10.000 x g abzentrifugiert und mehrmals mit PBS gewaschen. Die Pellets wurden in 30-50 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 95°C erhitzt. Die Überstände wurden separat mit SDS-Probenpuffer behandelt. Glutathion-Agarose-Matrix und Überstände wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt (2.3.4) und durch Coomassie-Färbung (2.3.5.1), Silberfärbung (2.3.5.2) oder Immunmarkierung (2.3.8) analysiert.

### **2.3.14 Herstellung monoklonaler Antikörper**

#### ***2.3.14.1 Immunisierung von Mäusen***

Zur Immunisierung wurden 2 Balb/C Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden mit gereinigtem Maus Nesprin-2-ABDII immunisiert (20 µg). Bei der Immunisierung der Mäuse wurde Immune Easy Mouse Adjuvant der Firma Quiagen benutzt. Die Maus wurde dreimal im Abstand von jeweils drei Wochen mit ca. 100µg Antigen immunisiert. Bei beiden Mäusen fand die letzte Injektion vier Tage vor der Fusion der Milzzellen statt.

#### ***2.3.14.2 Fusion***

Durch die Fusion von Milzzellen (B-Lymphozyten) mit Myelomazellen erhält man sogenannte Hybridomazellen (Kohler and Milstein, 1976). Diese vereinigen die Eigenschaften der Ausgangszellen in sich, nämlich Antikörperproduktion (B-Lymphozyten) und Teilungsfähigkeit (Myelomazellen). Um auf diese Hybridomazellen selektionieren zu können, werden Myelomazelllinien zur Fusion verwendet, die keine Hypoxanthin-phosphoribosyltransferase (HPRT) besitzen. Diese Zellen sterben in einem Medium ab, das mit Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin supplementiert ist. Da auch Milzzellen nicht in der Lage sind, in Kultur zu überleben, werden in diesem Medium nur die Fusionsprodukte beider Zellarten wachsen können. Die Milzzelle steuert das Enzym HPRT bei, so dass die Purinsynthese über Hypoxanthin ablaufen kann. Die de novo Synthese ist durch Aminopterin blockiert. Die Myelomazelle ihrerseits bringt die Teilungsfähigkeit in die Fusion ein. Die Hybridomazelle kann sich somit vermehren. Die Milzen der beiden immunisierten Mäuse wurden unter sterilen Bedingungen herauspräpariert und in jeweils 5ml kaltem RPMI 1640-Medium (Gibco) aufgenommen. Die Milzen wurden mit Skalpell und Pinzette zerkleinert, vom Fettgewebe befreit und mit einem Glashomogenisator vorsichtig in Einzelzellen zerlegt. Diese Zellsuspensionen wurden anschließend durch je eine mit Kunstfaserwolle gestopfte Spritze filtriert, um gröbere Bestandteile abzutrennen. Die Zellen wurden zweimal in kaltem, serumfreiem RPMI-Medium gewaschen (Beckman, 1500 UpM, 5 min, 4°C), anschließend in je 5 ml RPMIoH (RPMI-Medium ohne HEPES-Puffer) aufgenommen und auf Eis gestellt. In allen Fällen wurde die Milz der Mäuse in zwei Hälften aufgeteilt, die dann mit zwei unterschiedlichen Myelomastämmen

(Stamm x63-Ag8.6538 und Stamm PAIB<sub>3</sub>ag81) fusioniert wurden. Für jede Fusion wurden die Zellen einer halben Milz (ca.  $5 \times 10^7$  Zellen) in 5 ml RPMIoH-Medium und  $2,5 \times 10^7$  Myelomazellen in 5 ml RPMIoH-Medium zusammengegeben. Dieser Ansatz wurde zentrifugiert (Beckman, 1500 UpM, 5 min, 4°C) und das Pellet möglichst gut trocken gesaugt. Das Pellet wurde mit der Spitze einer zugeschmolzenen Pateurpipette ausgebreitet, 0,5ml PEG 4000 (PEG solution ready to use, Sigma) zugegeben und genau eine Minute im 37°C Wasserbad inkubiert. Nach einer einminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 10ml RPMIoH-Medium unter leichtem Schütteln des Röhrchens im Wasserbad tropfenweise zupipettiert. Nach 10minütiger Inkubation auf Eis wurden die fusionierten Zellen abzentrifugiert, das Sediment in 125ml Normalmedium aufgenommen und auf 10 Costarplatten verteilt (0,5ml pro Loch). In jedes dieser Löcher waren am Vortag 0,5 ml einer Makrophagensuspension pipettiert worden. Die Platten wurden bei 37°C, 5%CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. 24 Stunden nach der Fusion wurden in jedes Loch 0,5 ml eines dreifach konzentrierten HAT-Selektionsmediums zugegeben. Das Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt, wobei nach 14 Tagen HAT-Medium durch HT-Medium ersetzt und nach weiteren zwei Wochen die Selektion beendet wurde.

Normalmedium:

500 ml RPMI 1640 mit Hepes und Glutamin

55 ml fötales Kälberserum

5,5 ml 200 mM L-Glutamin

5,5 ml Kanamycinlösung (Gibco)

5,5 ml einer frischen  $10^{-3}$  M  $\beta$ -Mercaptoethanollösung

3x HAT-Medium:

571,5 ml Normalmedium

16,5 ml HAT-Stocklösung

16,5 ml Aminopterinstocklösung

1x HAT-Medium:

571,5ml Normalmedium

5,5ml HAT-Stocklösung

5,5ml Aminopterinstocklösung

1x HAT-Medium:

571.5 ml Normalmedium

5,5 ml HAT-Stocklösung

HAT-Stocklösung:

$1,0 \times 10^{-2}$  M Hypoxanthin

$1,6 \times 10^{-3}$  M Thymidin

Aminopterin-Stocklösung:

$4 \times 10^{-5}$  M Aminopterin

Alle zugesetzten Lösungen wurden steril filtriert.

Makrophagensuspension:

Zur Isolierung von Makrophagen wurden ca. 10ml Normalmedium unter sterilen Bedingungen in die Bauchhöhle einer durch Genickdislokation getöteten Maus injiziert. Die 10 ml Medium wurden wieder entnommen und der Vorgang noch zweimal wiederholt. Die Makrophagen wurden anschließend abzentrifugiert (Beckman, 1000 UpM ohne Bremse, 5 min, 4°C) und zweimal mit Normalmedium gewaschen. Die Makrophagen wurden in 125 ml Normalmedium aufgenommen, dabei wurden für eine Fusion mit PAIB<sub>3</sub>ag81-Zellen Makrophagen von sechs Mäusen und für eine Fusion mit x63-Ag8.6538-Zellen Makrophagen von 10 Mäusen verwendet. Zum Klonieren wurden Makrophagen von einer Maus in 10 ml Normalmedium aufgenommen.

### ***2.3.14.3 Test der Überstände***

Die Überstände der einzelnen Vertiefungen wurden getestet, sobald Klone im Mikroskop sichtbar wurden und sich das Medium gelblich verfärbte. Die Antikörpermenge im Überstand ist dann hoch genug, um detektiert zu werden. Als erster Test wurde ein Enzymimmunoassay der einzelnen Überstände durchgeführt. Dazu wurden 100 µl der Überstände eine Stunde in mit je 1 µg gereinigtem Antigen beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Ziege-anti-Maus Antikörper eingesetzt. Als Substrat diente p-Nitrophenyl-phosphat (Sigma Fast Tabletten, Sigma). Diese farblose Substanz wird durch die Phosphatasereaktion in gelbes p-Nitrophenol umgewandelt. Nach einer halben Stunde Reaktionsdauer wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405nm gemessen. Überstände, die zu einer Extinktion größer als 0,15 führten, wurden im Immunoblot getestet. Dafür wurden

Nitrozellulosestreifen, auf die im SDS-Gel aufgetrenntes Gesamtproteinextrakt von CAP1- oder CAP2-Polypeptid exprimierenden *E. coli* Zellen aufgetrennt worden war, mit je 0,5 ml der Überstände überschichtet. Die Teststreifen wurden über Nacht mit den Überständen inkubiert, 3x 10 Minuten mit NCP-Puffer gewaschen und mit an alkalische Phosphatase gekoppeltem Ziegenanti-Maus Antikörper eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Streifen wieder in NCP-Puffer gewaschen und dann 5 min in 0,1 M Natriumcarbonatpuffer, pH 10,2, inkubiert, um das für die Enzymreaktion erforderliche alkalische Milieu herzustellen. Danach wurden die Filter 10min in einer Lösung des Substrats BCIP (BCIP/NBT Farbwentwicklersubstrat, Promega) geschwenkt und die Reaktion durch Überführen in Wasser gestoppt. Zellen von Überständen, die in diesem Test eine Bande korrekter Größe aufwiesen, wurden kloniert.

#### **2.3.14.4 Klonierung**

Zur Klonierung wurden die Zellen aufgewirbelt und mit Normalmedium verdünnt. Aus dieser Suspension wurden dann mit einer ausgezogenen Pasteurpipette kleine Tropfen in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Unter dem Mikroskop wurde festgestellt, welches der Löcher nur eine Zelle enthielt. Diese Vertiefungen wurden dann mit einer Makrophagensuspension in Normalmedium aufgefüllt und im Brutschrank ca. 10 Tage inkubiert. Danach erfolgte ein erneuter Test der Einzelklone im Immunoblot. Klone, die ein positives Signal zeigten, wurden zunächst auf Costarplatten überimpft und anschließend in Gewebekulturflaschen überführt. Hierzu wurden zunächst 5 ml, dann 15 ml und 50ml Kulturen angezogen. Die 50 ml Kulturen wurden zum Sammeln der Hybridomaüberstände verwendet (3 x wöchentlich). Die Zellen wurden hierbei durch Zentrifugation abgetrennt (Beckman, 1000 UpM, 5 min, 4°C) und die Überstände bei 4°C oder -20°C aufbewahrt.

#### **2.3.14.5 Konservierung der Hybridomaklone**

Zur Konservierung der einzelnen Klone wurden die Zellen einer dichtgewachsenen 50 ml Kultur geerntet und in 5ml eiskaltem Einfriermedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf sechs Einfrierröhrchen (2,2 ml, Nunc) verteilt, die auf Eis gehalten wurden. Die Ampullen wurden dann in ein isolierendes Styroporbehältnis gestellt und für mindestens 24 Stunden in einer -80°C Gefriertruhe aufbewahrt. Das Styroporgefäß sorgt dabei für ein genügend langsames

Absinken der Temperatur in der Zellsuspension. Nach mindestens einem Tag konnten die Zellen in ein Aufbewahrungsgefäß im Stickstofftank überführt werden.

Für die erneute Kultivierung eines eingefrorenen Hybridomaklons wurde eine Ampulle zügig im 37°C Wasserbad aufgetaut und der Inhalt in 10ml Normalmedium überführt. Nach Zentrifugation (1000 UpM, 5 min, 4°C) wurde das Medium abgegossen die Zellen in 1ml Normalmedium aufgenommen und in einer Vertiefung einer Costarplatte im Brutschrank inkubiert.

## **2.4 Immunhistologische Methoden:**

### **2.4.1 Präparation von Gefrier- und Paraffinschnitten**

Wildtyp und ABD-Nesprin-2 defiziente Mäuse wurden durch Äther/Chloroform (im Verhältnis 1:1) betäubt und getötet. Anschließend wurden Haut, Niere und Gehirn entnommen und für Gefrierschnitte in Tissue-Tek-Einbettlösung (Sakura) auf Trockeneis oder in Stickstoffdampf eingefroren. Die Blöckchen wurden bei -80 °C gelagert. Für Paraffinschnitte wurden die Organe für ca. eine Stunde in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert, 15 min in PBS gewaschen und über Nacht in 70 % Ethanol bei 4 °C inkubiert. Die Paraffineinbettung erfolgte mit einem Einbettautomaten (Citadell 1000, Shandon) mit folgendem Programm: jeweils 1 h 70 %, 80 %, 90 %, 96% Ethanol, 3 x 2 h 100 % Ethanol und 3 x 1,5 h Xylol, 2 h Paraffin Nr. 3, 3 h Paraffin Nr. 6. Zur endgültigen Einbettung wurden die Gehirne in Einwegplastik-Cubes mit flüssigem Paraffin überführt, ausgerichtet und zur Aushärtung auf eine Kühlplatte gestellt. Die Lagerung der Blöckchen erfolgte bei 4 °C.

Die Anfertigung von Gefrierschnitten erfolgte bei einer Temperatur von ca. -18 °C in einem Kryostat (Leica). Dabei Schnitte mit einer Dicke von 7 µm erstellt. Die Schnitte wurden auf Objektträger (Shannon) überführt und bei -20 °C gelagert.

Von in Paraffin eingebetteten Organen wurden ebenfalls Schnitte angefertigt. Hierzu wurde ein Mikrotom (Microtom GmbH) verwendet. Die 6 µm dicken Schnitte wurden zum Strecken in ein 40 °C warmes Wasserbad und anschließend auf Objektträger (Shannon) überführt. Zum Trocknen wurden die Objektträger über Nacht auf eine Heizplatte (37 °C) gelegt. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur gelagert.

#### 4 % Paraformaldehyd:

400 ml ddH<sub>2</sub>O auf 60 °C erwärmen  
20 g Paraformaldehyd einrühren  
1 N NaOH zugeben bis die Lösung wieder klar ist  
50 ml 10 x PBS zugeben  
pH-Wert mit HCl auf 7,4 einstellen  
auf 500 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen  
Aliquots bei -20 °C lagern

## 2.5 Zellbiologische Methoden

### 2.5.1 Isolierung von primären dermalen Keratinozyten und Fibroblasten aus neugeborenen Mäuse

Ein Tag alte Mäuse wurde der Kopf, die Extremitäten und der Schwanz abgetrennt und 30 min auf Eis gestellt. Die Mäusekörper wurden zwei Minuten in  $\beta$ -Isodona eingetaucht, zwei Mal kurz in PBS gewaschen, zwei Minuten in 70% Ethanol desinfiziert und wieder in 1 x PBS gewaschen. Danach wurde die komplette Haut entnommen und mit der Dermis nach unten auf 2 ml 1x Trypsin / 0,02% EDTA in einer 3 cm Schale (Nunc) gestreckt. Anschließend wurden die Schalen für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Trypsinbehandlung konnte man mit Hilfe einer Pinzette Die Epidermis von der Dermis abziehen.

Für die Isolierung der primären Keratinozyten wurde die Epidermis mit zwei sterilen Skalpellern in winzigen Stücke zerkleinert, in 1,5 ml Eppendorf Gefäße eingeführt und für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt, dann für eine Minute bei 900rpm abzentrifugiert. Die Überstände wurden in 6 cm Schalen auf Feederzellen ausplattiert. Dazu wurden 3T3 Fibroblasten als Feederzellen verwendet. 3T3 Fibroblasten wurden bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert und mit Mitomycin (10  $\mu$ g / ml) 2 Stunden bei 37°C inkubiert, dann mit 1 x PBS gewaschen. Um die Differenzierung der Keratinozyten zu verhindern, wurden sie in einem speziellen Medium mit niedrigem Gehalt an Calcium, kultiviert. Die Zellen wurden zweimal in der Woche mit frischen Feederzellen gefüttert und das Medium dreimal in der Woche gewechselt. Die ersten Keratinozytenkolonien wurden erst nach drei Wochen beobachtet.

Für die Isolierung der primären Fibroblasten wurde die Dermis wie oben beschrieben zerkleinert und in einem 15 ml Gefäß (Falcon) mit 2 ml 400U / ml Kollagenase eingeführt. Die Gefäße wurden eine Stunde bei 37°C ganz langsam gerührt und dann auf Schalen mit DMEM-Medium

(Glukose 4500 mg / ml von Gibco) ausplattiert. Die aus der Dermis gewonnenen Fibroblasten konnten am nächsten Tag für Experimente verwendet.

### 2.5.2 Kultur von Säugerzellen

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

### 2.5.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

10<sup>7</sup> Zellen wurden in Einfriermedium aufgenommen. Das Einfrieren von Zellen in Kryoröhrchen erfolgte bei -70°C oder in flüssigem Stickstoff. Aufgetaut wurden die Zellen zügig bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen sofort in DMEM Medium gegeben.

#### Einfriermedium:

70 % DMEM

20 % FCS

10 % DMSO

### 2.5.4 Wundheilungsexperimente

Nesprin-2-ABD *Knock-out* primäre dermale Fibroblasten und Wild type Fibroblasten wurden bis zum Erreichen der Konfluenz auf Deckgläschen in 24-Lochplatten kultiviert. Mit einer Gelben Spitze wurde ein Schnitt in die Zellschicht gemacht. Anschließend wurde sofort mit PBS gewaschen und die Zellen mit frischem vorgewärmtem Medium versorgt. Die Zellen wurden danach in die 37°C Kammer am Mikroskop (Leica) gestellt. Nach der Vergrößerungseinstellung und dem Fokussieren, wurde die Wunde 24 Stunden Lang alle 10 Minuten fotografiert. Die aufgenommenen Bilder wurden in Gif-Datei konvertiert und in dem Software *moviegear* zu einer Animation verarbeitet.



## 2.5.5 Fluoreszenzmikroskopie

### 2.5.5.1 Fixieren und Permeabilisieren von Säugetierzellen

Auf Deckgläschen ausgesäte Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden entweder mit Methanol fixiert und permeabilisiert oder mit 1 ml 3 % Paraformaldehyd in PBS für 5 min bei Raumtemperatur fixiert dann mit 0,5 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert für 10 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Deckgläschen 3 x mit PBS gewaschen und konnten für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden.

### 2.5.5.2 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

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

#### Gelvatol:

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

### 2.5.5.3 Konfokale Lasermikroskopie

Für die normale Fluoreszenzmikroskopie wurde das Fluoreszenzlichtmikroskop DMR der Fa. Leica benutzt. Für die konfokale Lasermikroskopie wurde das von der Fa. Leica entwickelte CLSM-SP Mikroskop benutzt, das optische Schnittebenen durch die Präparate erlaubt. Das Gerät

ist mit einem Krypton- und einem Argonlaser ausgestattet und ermöglicht elektronische Anregung bei unterschiedlichen Wellenlängen. Die Daten werden mit dem begleitenden Bildverarbeitungssystem der Fa. Leica weiterverarbeitet.

## **2.5.6 Transfektion von Säugetierzellen**

### ***2.5.6.1 Transiente Transfektion von Säugetierzellen durch Elektroporation***

$5 \times 10^6$  Zellen wurden in 200  $\mu$ l DMEM aufgenommen und 10  $\mu$ g hochreine Plasmid DNA hinzugegeben. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und dann bei 975  $\mu$ F und 300 V elektroporiert. Die Zellen wurden dann 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml DMEM aufgenommen, in eine 10 cm Zellkulturschale gegeben und im Brutschrank kultiviert.

### ***2.5.6.2 Transfektion von Säugetierzellen mit Oligofectamin<sup>TM</sup>***

Die zu transfizierenden Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in eine 6-Loch Platte ausgesät, so dass die Zellen bei Beginn der Transfektion zu 20-30 % konfluent waren. Am nächsten Tag wurden die Zellen einmal mit Opti-MEM gewaschen und danach in 1 ml Opti-MEM für 30 min inkubiert. Parallel wurde der Transfektionsansatz vorbereitet. Dazu wurden 10  $\mu$ l Plasmid einer 1 mg/ml Lösung in 100  $\mu$ l Opti-MEM und 6  $\mu$ l Oligofectamin in 24  $\mu$ l Opti-MEM gelöst und für 7 bis 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden beide Lösungen vorsichtig durch langsames Pipettieren gemischt und für 20 bis 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 64  $\mu$ l Opti-MEM wurden die gesamten 200  $\mu$ l in ein Loch der 6-Loch Platte gegeben und für 4 Std im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit fand die Transfektion mit Hilfe des Oligofectamins statt. Danach wurde das Opti-MEM abgesaugt und durch 3 ml frisches DMEM ersetzt. Die Zellen wurden 1 bis 3 Tage später fixiert und für die Immunfluoreszenz oder als Proteinhomogenat aufgearbeitet.

## **2.5.7 Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)**

FACS steht für **F**luorescence **a**ctivated **c**ell **s**orting Die allgemeine Bezeichnung ist Durchflusszytometrie. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der von optischen Signalen

seitens der Zelle, wenn diese einen  $\mu$  passiert. Hierbei werden in einer Lösung befindliche durch eine  $\mu$  gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Die Zelle emittiert dabei Streulicht woraus man unterschiedliche Eigenschaften der Zelle ableiten kann. Das Streulicht wird durch Zellgröße, die Struktur der Zellwand sowie intrazelluläre Bestandteile beeinflusst. Die Zellen können damit in unterschiedliche Fraktionen sortiert und gezählt werden.  $5 \cdot 10^6$  Zellen wurden trypsiniert und zwei Mal mit PBS gewaschen. Dann wurden sie mit 1,2 ml PBS resuspendiert, dazu wurden 3 ml 95% Ethanol zugegeben und kräftig gemischt. Die Zellen wurden mit 70% Ethanol 30 min fixiert, Überstand verwerfen, in 1ml Detergenzlösung resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur Schütteln. Dann wurden 5ml DAPI-Färbelösung dazu gegeben resuspendiert und bei Raumtemperatur bis zur Messung aufbewahrt. Schließlich konnten die Zellen in dem FACS-Gerät auf Zellzyklus Phasen sortiert.

#### Detergenzlösung

100 ml bidestilliertes Wasser

1,2 g Zitronensäure

0,5 g Tween 20.

#### DAPI-Färbelösung

100 ml Bidestilliertes Wasser

7,1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0.4 mol/l)

0,2 mg DAPI

dunkel aufbewahren.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Herstellung, Aufreinigung und Charakterisierung des polyklonalen Antikörpers pAbK1

Das Nesprin-2 Gen ist ein sehr komplexes Gen, das für mehrere Isoformen kodiert, die sich in ihrem Aufbau und ihrer molekularen Masse enorm unterscheiden (Abb. 3.1). Die größte Isoform hat eine Masse von 789 kDa (6899 aa) und besitzt am N-Terminus die Aktin-bindende Domäne ABD, eine aus 22 Spektrin-Domänen folgende zentrale Region und eine Transmembrandomäne (TMD) am C-Terminus, gefolgt von einem aus 30 Aminosäuren bestehenden perinukleären Teil. Die weiteren drei C-terminalen Isoformen Nesprin-2 $\alpha$  (61 kDa), -2 $\beta$  (87 kDa) und -2 $\gamma$  (377 kDa) besitzen eine unterschiedliche Anzahl an Spektrin-Domänen, die Transmembrandomäne und den perinukleären Teil. Eine 30 kDa kleine ABD-Isoform wurde ebenfalls identifiziert (Abb. 3.1).

Zur Proteinanalyse wurden bereits zwei monoklonale Antikörper gegen das humane Nesprin-2 hergestellt, mAb K20-478 gegen die ABD und mAb K49-260 gegen die zwei letzten Spektrin-Domänen im C-terminalen Bereich (Abb. 3.1). Beide Antikörper erkennen eine 800 kDa Bande bei Westernblotanalysen von COS7 Zell-Lysaten. Die immunzytochemische Analyse an COS7 Zellen zeigte, dass beide Antikörper eine Färbung um den Kern herum liefern. Zusätzlich haben Zhen *et al.* (2002) mittels selektiver Permeabilisierung durch Digitonin gezeigt, dass mAb K20-478 die äußere Kernmembran färbt. Die Präsenz vom Nesprin Protein im Kern konnte nicht ausgeschlossen werden.

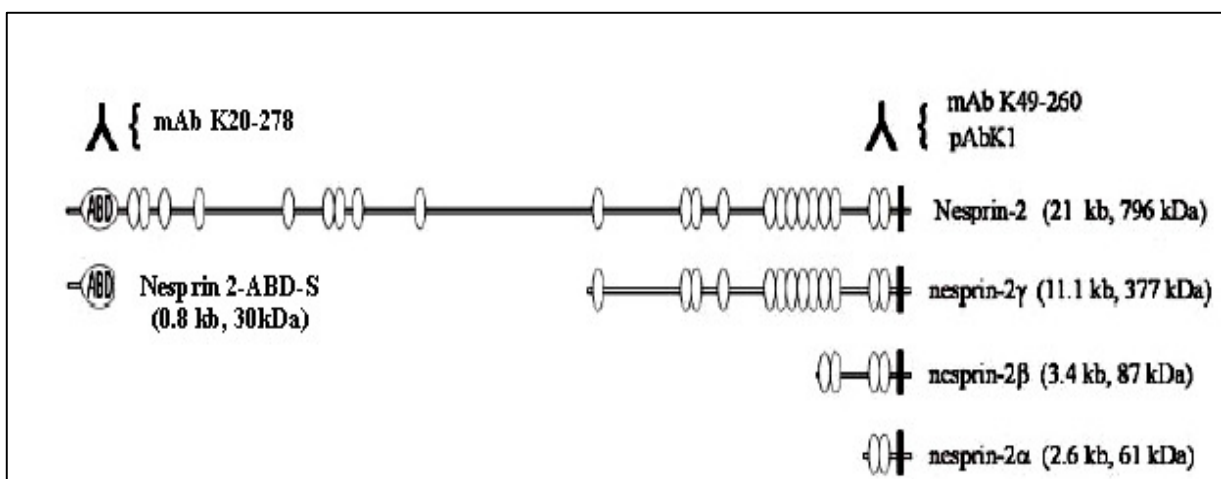
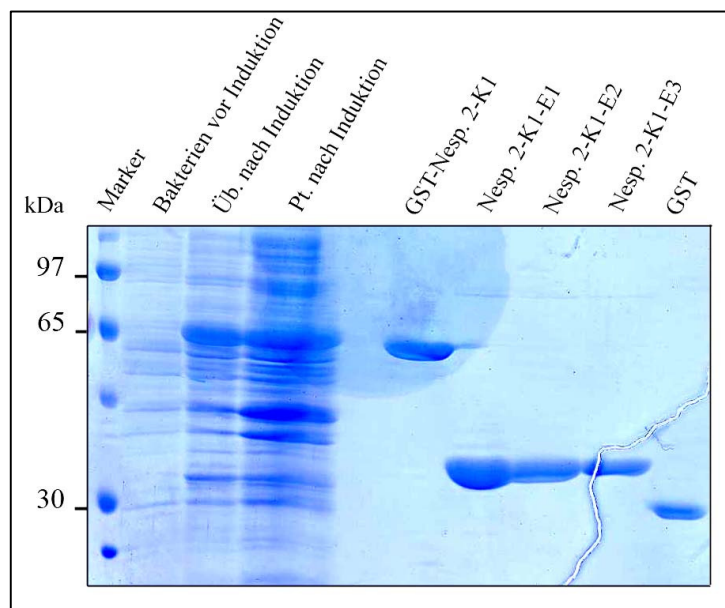


Abb. 3.1 Struktureller Aufbau von Nesprin-2 und dessen unterschiedlichen Spleißformen.

Nesprin-2 besteht aus einer Aktinbindungsdomäne (Ovale mit der Bezeichnung ABD), zweiundzwanzig Spektrin-Domänen (kleine Ovale) und die Transmembrandomäne (TMD) am C-Terminus (schwarze Balken). Die Epitope für die Antikörper sind mit einem umgedrehten Y präsentiert.

### 3.1.1 Expression und Aufreinigung von GST-K1

Um eine detaillierte biochemische und zellbiologische Analyse der C-terminalen Nesprin-2 Isoformen zu ermöglichen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein dritter Antikörper hergestellt (pAbK1). Sowohl der polyklonale pAbK1 als auch der mAb K49-260 sind gegen die letzten zwei Spektrin-Domänen des Proteins gerichtet. Dafür wurde ein Fragment (K1) des humanen Gens mit dem GST Gen fusioniert (Vector pGEX4T1), das für die Aminosäuren 6546 bis 6796 kodiert, die die letzten zwei Spektrin-Domänen umfassen. Das rekombinante Protein wurde in *E. coli* XL1-Blue als lösliches Protein exprimiert und konnte an eine Glutathion-Agarose-Matrix gebunden und der Nesprin-2-Anteil anschliessend mit Thrombin abgespalten werden (Abb. 3.2).

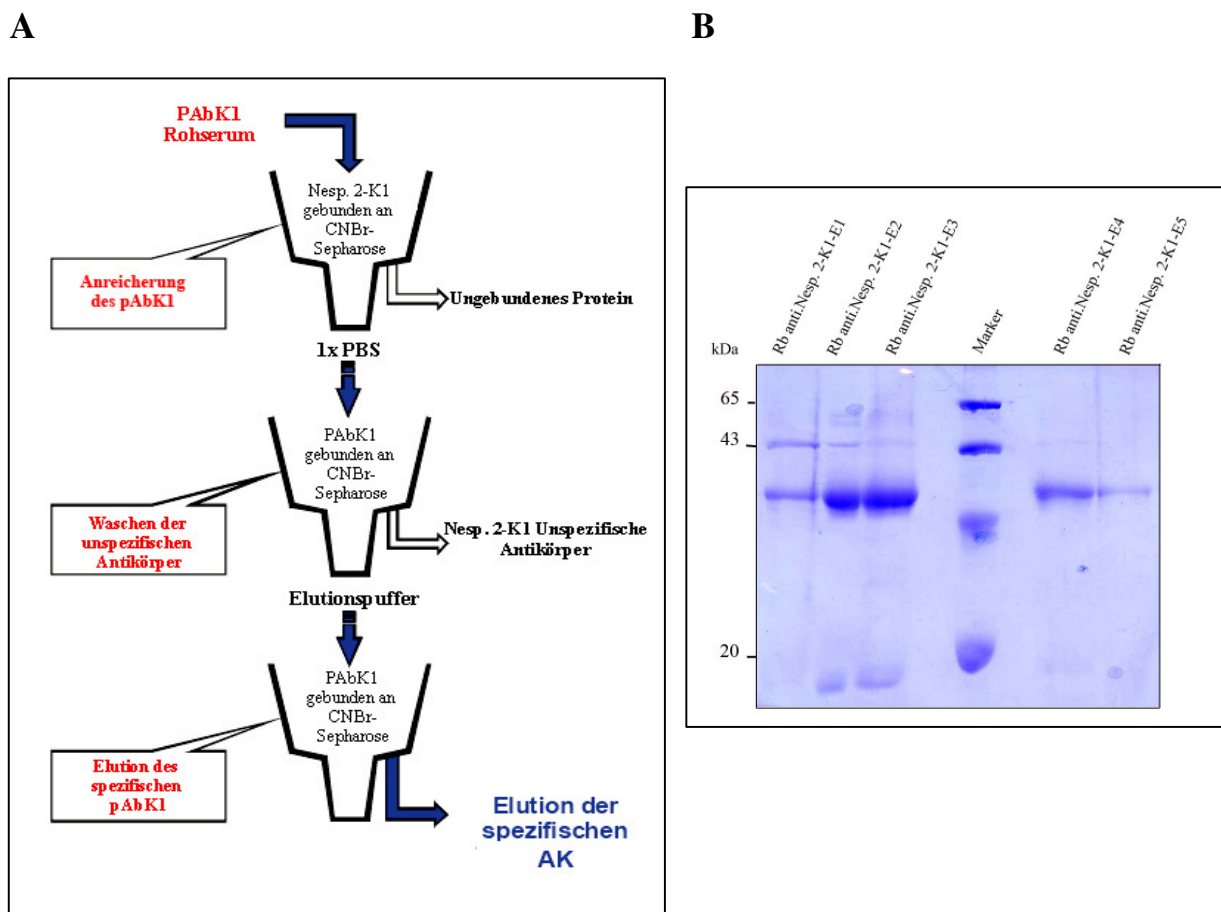


**Abb. 3.2 Expression und Aufreinigung des Nesprin-2 K1 Polypeptids.**

Die Abbildung zeigt ein mit Coomassie-Blue gefärbtes 12% SDS-Polyacrylamid Gel. Das Fusionsprotein GST-K1 wurde in *E. coli* XL1-Blue Zellen exprimiert und die Proteinexpression wurde für 4 Stunden mit 1 mM IPTG induziert. Nach der Zellyse wurde die Überstand- und Pellet-Fraktion durch Zentrifugation gewonnen. Der Überstand wurde für 30 min bei Raumtemperatur mit GST-Beads behandelt. Das an GST Beads gebundene Fusionsprotein GST-Nespr. 2-K1 wurde mit Thrombin über Nacht bei Raumtemperatur geschnitten. Dadurch wurden drei K1 Elutionen gewonnen, Nespr. 2-K1-E1, -E2, -E3. GST als Kontrolle wurde ebenfalls aufgetragen.

### 3.1.2 Herstellung und Aufreinigung von polyklonalen Antikörpern gegen Nesprin-2

Zur Immunisierung von Kaninchen wurde das Nesprin-2 K1 Polypeptid in einer Konzentration von 500  $\mu\text{g}$  an die Firma Pineda (Berlin) geschickt. Seren vom 60. bzw. 90. Tag nach der Immunisierung wurden in Immunfluoreszenzanalysen an COS7 Zellen getestet. Dafür wurden die Seren am Polypeptid K1 affinitätsgereinigt (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3** Affinitätsreinigung des pAbK1 Antikörpers

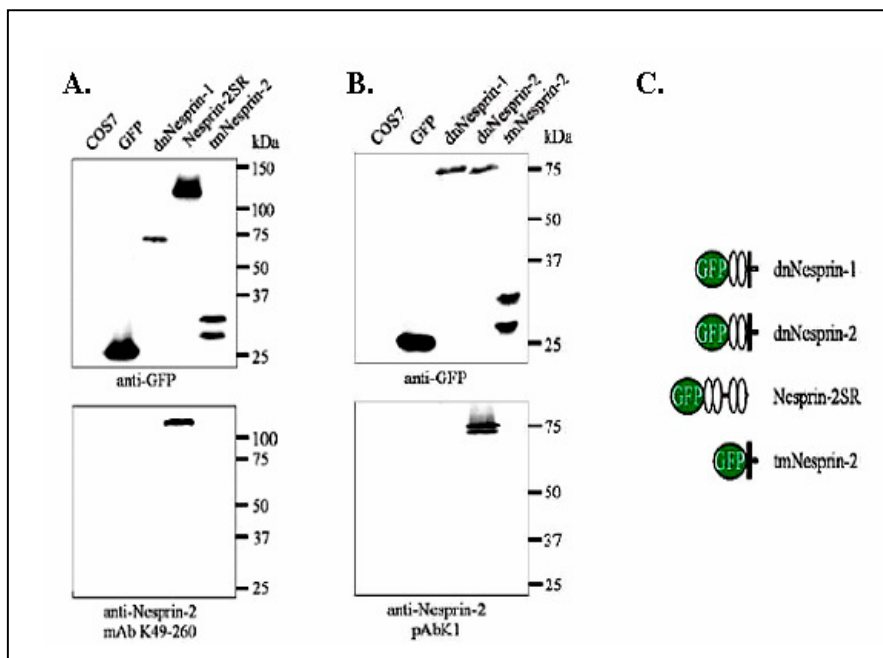
(A) Flussdiagramm zur Affinitätsreinigung der pAbK1 Antikörper. Das Nesprin-2 K1 Polypeptid wurde an die Cyanbromid-Sepharose gekoppelt und mit dem pAbK1 Rohserum inkubiert. Die gegen das K1-Polypeptid gerichteten Antikörper binden an die Säule, während die nicht-spezifischen Antikörper mit 1 x PBS abgewaschen wurden. Die gebundenen Antikörper wurden schließlich mit Glycinpuffer in fünf Schritten eluiert. (B). 5  $\mu\text{l}$  jeder der Fraktionen wurden auf einem 12% igen SDS-Polyacrylamid Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blue sichtbar gemacht.

### 3.1.3 Charakterisierung der polyklonalen Nesprin-2 Antikörper

#### 3.1.3.1 Spezifitätsuntersuchungen des pAbK1

Zur Charakterisierung von pAbK1 und um eine mögliche Kreuzreaktion des Antikörpers mit dem verwandten Nesprin-1 auszuschließen, wurden COS7 Zellen mit Vektoren, die für verschiedene GFP-Fusionsproteine kodieren, transfiziert. Diese Fusionsproteine enthalten C-terminale Fragmente von Nesprin-1 und Nesprin-2, wobei dnNesprin-1 und dnNesprin-2 aus den letzten Spektrin-Domänen, der TMD und dem perinukleären Teil bestehen, Nesprin-2SR enthält die vier letzten Spektrin-Domänen, tmNesprin-2 enthält die TMD und den perinukleäre Teil des Nesprin-2 (Abb. 3.4 C). Die Zellen wurden am Tag nach der Transfektion geerntet und die Zellhomogenate in einem 12%igen SDS-Polyacrylamid Gel aufgetrennt. Als Kontrolle wurden Lysate von COS7 Zellen und von GFP exprimierenden Zellen aufgetrennt.

Die GFP-Fusionsproteine wurden von einem GFP erkannt (Abb. 3.4 A, B). pAbK1 erkannte spezifisch das Fusionsprotein dnNesprin-2 (Abb. 3.4 B), Das gleiche Fusionsprotein wurde von mAb K49-260 erkannt (Abb. 3.4 A), während dnNesprin-1 von keinem der beiden Antikörper detektiert wurde. Dies schließt eine Kreuzreaktivität des pAbK1 mit Nesprin-1 aus.



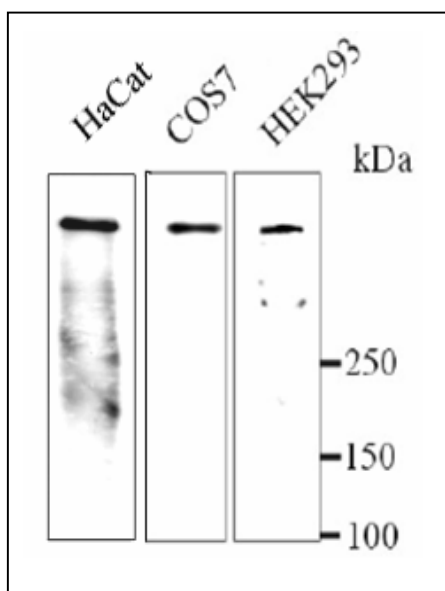
**Abb. 3.4 Spezifität des pAbK1**

COS7 Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die die Expression von C-terminalen Nesprin-2 bzw. Nesprin-1 GFP-Fusionsproteinen erlaubten. Die Proteinlysate wurden in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. In Westernblotanalysen wurde die Spezifität des pAbK1 (B) im Vergleich zu mAb K-49-260 (A) überprüft. Die Detektion der GFP-Fusionsproteine erfolgte durch anti-GFP Antikörper. Die Detektion der primären Antikörpern

erfolgte mit einem sekundären  $\alpha$ -Maus- bzw.  $\alpha$ -Kaninchen Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz. (C) Schematische Darstellung der C-terminalen GFP-Fusionsproteine. Die Spektrin-Domänen sind durch Ovale gekennzeichnet und die Transmembrandomäne durch einen schwarzen Balken.

### 3.1.3.2 Westernblotanalyse und Immunfluoreszenzen an unterschiedlichen Zelllinien mit pAbK1

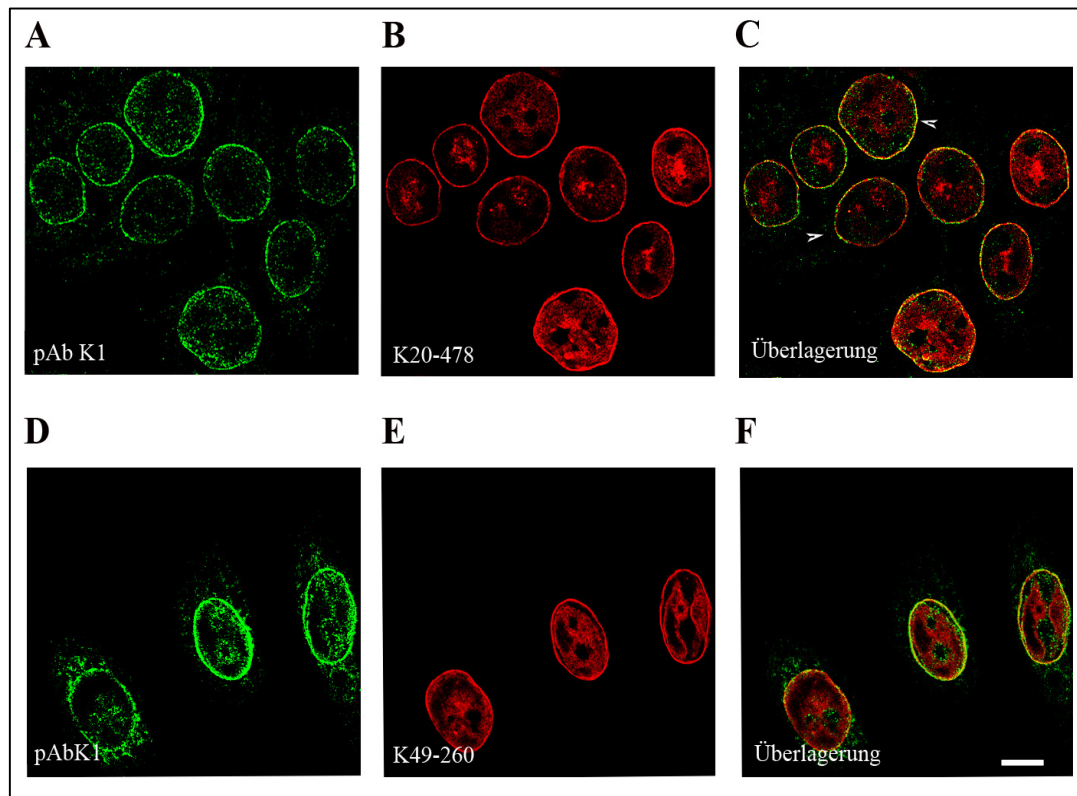
Zunächst wurde die Detektion des endogenen Nesprin-2 mit Hilfe des pAbK1 untersucht. Dafür wurden Westernblotanalysen von COS7, HaCaT und HEK293 Zelllysaten durchgeführt. Desweiteren wurden Immunfluoreszenzen an HaCaT Zellen angefertigt. pAbK1 erkannte ein Protein von 800 kDa in den drei Zelllinien (Abb. 3.5). In Immunfluoreszenzanalysen an HaCaT Zellen erkannte pAbK1 ähnliche Strukturen wie die monoklonalen Antikörper mAb K-20-478 und mAb K-49-260 und färbte die Kernmembran sehr stark an (Abb. 3.6).



**Abb. 3.5 Westernblotanalyse mit pAbK1**

Proteinlysate aus den Zelllinien HaCaT, COS7 und HEK297 wurden in einem SDS-Polyacrylamid-Gradientengel (3-10%) getrennt und auf eine PVDF-Membran überführt und mit pAbK1 (1:1000) inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären  $\alpha$ -Kaninchen Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz. In allen Lysaten konnte die große Nesprin-2 Isoform bei 800 kDa nachgewiesen werden.





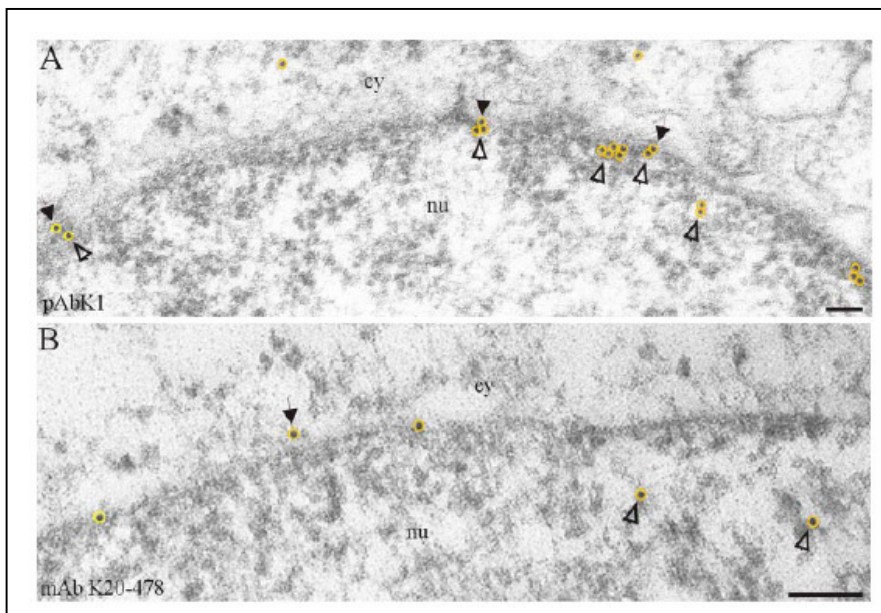
**Abb. 3.6 Nesprin-2 Detektion mit pAbK1 in HaCaT Zellen.**

HaCaT Zellen wurden mit 3% PFA fixiert und mit pAbK1 (A, D), K20-478 (B) und K49-260 (E) gefärbt. Bild (C) zeigt, dass pAbK1 und K20-478 die Kernmembranen der Zellen erkennen und dass deren Färbungen sich überlagern und nicht von einander unterscheiden. Zusätzlich haben pAbK1 und K49-260 ein identisches Färbungsmuster in HaCaT Zellen (F). Die Detektion der primären Antikörpern erfolgte mit einem sekundären  $\alpha$ -Maus Cy3 bzw.  $\alpha$  Kaninchen FITC. Balken, 25  $\mu$ m.

### 3.2 Nesprin-2 ist in der äußeren und inneren Kernmembran lokalisiert

Durch Immunfluoreszenzaufnahmen und biochemische Methoden wurde bereits gezeigt, dass Nesprin-2 hauptsächlich in der Kernmembran von Säugerzellen lokalisiert ist. Weitere Experimente bestätigten die Lokalisierung dieses Proteins in der äußeren Kernmembran (Zhen *et al.*, 2002). Die Bindung von Nesprin-2 an Proteine der inneren Kernmembran wie Lamin A/C und Emerin weist auf seine Anwesenheit auch im Inneren des Kerns hin (Libotte *et al.*, 2005). Um dies zu bestätigen, wurde die Lokalisierung des Proteins mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Dabei wurden alle drei verfügbaren Nesprin-2 Antikörpern verwendet. Wegen der guten Zellkernmorphologie und ihrer starken Nesprin-2 Expression wurden HaCaT Zellen für dieses Experiment ausgewählt. Abb. 3.7 zeigt eine Verteilung der Goldpartikel im Bereich der Kernmembran nach Inkubation mit den N-terminus spezifischen mAb K20-478 und den C-Terminus spezifischen pAbK1 Antikörpern. Eine besonders intensive Goldpartikel Anreicherung

wurde mit pAbK1 beobachtet (Abb. 3.7 A). Nesprin-2 konnte sowohl an der inneren (Abb. 3.7 A, leere Pfeile) als auch an der äußeren Kernmembran (Abb. 3.7 A, schwarze Pfeile) nachgewiesen werden. Ein ähnliches Verteilungsmuster wurde mit den monoklonalen Antikörpern gegen den N-Terminus (Abb. 3.7 B) und den C-Terminus (nicht gezeigt) beobachtet. Eine quantitative Analyse der Goldpartikel zeigte, dass die Mehrheit der Goldpartikel sich auf der inneren Seite des Kerns befindet.



**Abb. 3.7 Elektronenmikroskopische (EM) Untersuchung von Nesprin-2 in HaCaT Zellen.**

Die EM Untersuchung wurde mit dem polyklonalen pAbK1 (A) und mit mAb K20-478 (B) durchgeführt, die N-terminale oder C-terminale Bereiche des Proteins erkennen. Beide Antikörper erkannten sowohl nukleäres (leere Pfeile) als auch zytoplasmatisches (leere Pfeile) Nesprin-2. Die Goldpartikel sind mit gelben Kreisen markiert. Nu, Kern; cy, Zytoplasma. Balken, 100 nm.

### 3.3 Die Nesprin-2 Lokalisierung in Fibroblasten ist Lamin A/C abhängig

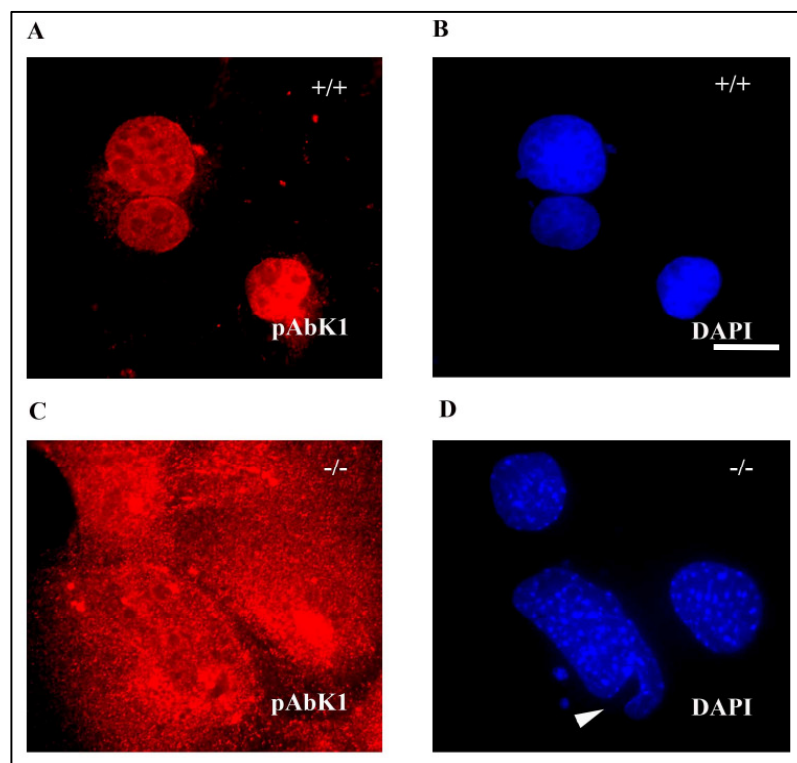
#### 3.3.1 Nesprin-2 bindet an Lamin A/C und an Emerin

Libotte *et al.* (2005) zeigten, dass ein C-terminales Nesprin-2 Segment direkt mit Lamin A/C und Emerin assoziieren kann. Um die Bindung zu Lamin A/C genauer zu untersuchen, wurden COS7 Zellen mit dem mutierten Fusionsprotein *Xenopus* GFP-LaminB1 $\Delta$ 2+ transfiziert. Dieses Fusionsprotein kann endogenes Lamin A binden und umverteilen. Dabei wird Lamin A aus der Kernlamina verdrängt und bildet im Inneren des Zellkerns kleine Aggregate. In den transfizierten Zellen war Nesprin-2 ebenfalls in die mit GFP-LaminB1 $\Delta$ 2+ gefärbten Bereiche umverteilt und nur noch in geringem Maß an der Kernmembran zu finden (Libotte *et al.*, 2005). Dies deutet

darauf hin, dass die Nesprin-2 Lokalisierung an der Kernmembran Lamin A/C abhängig ist. Für die Lokalisierung von ANC1, dem Nesprin-2 Orthologen in *C. elegans*, an der Kernmembran ist die Anwesenheit von Lamin A notwendig (Lee *et al.*, 2002).

### 3.3.2 Nesprin-2 ist nicht am Kern in Lamin A/C *Knock-out* Zellen lokalisiert

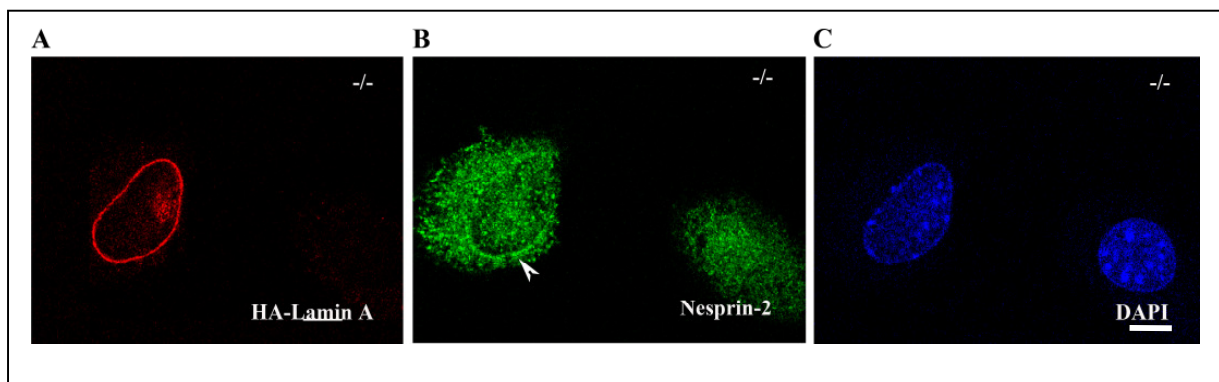
Um die Interaktion von Lamin A/C und Nesprin-2 näher zu untersuchen, wurde die Nesprin-2 Verteilung in LaminA/C *Knock-out* (KO) Fibroblasten analysiert. Lamin A/C KO-Fibroblasten zeigen dramatische Kerndefekte (Abb. 3.8 D, Pfeile). In diesen Zellen konnte eine Misslokalisierung mehrerer Kernmembranproteine, wie z.B. Emerin, beobachtet werden. In Wildtyp Fibroblasten konnte mit pAbK1 die typische Nesprin-2 Kernmembranfärbung beobachtet werden. In den Lamin A/C KO-Fibroblasten dagegen ist eine Umverteilung des endogenen Nesprin-2 aus der Kernmembran in das Zytoplasma deutlich zu erkennen (Abb. 3.8 C, D). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Lokalisierung von Nesprin-2 an der Kernmembran von Lamin A/C abhängig ist.



**Abb. 3.8 Verteilung von Nesprin-2 in Lamin A/C *Knock-out* fibroblasten** (A, B) In Wildtyp Fibroblasten ist Nesprin-2 am Kern konzentriert, bei den Lamin A/C- *Knock-out* Fibroblasten eine Umverteilung des Nesprin-2 in das Zytoplasma deutlich erkennbar (C, D). Primärer Antikörper, pAbK1,

sekundärer Antikörper  $\alpha$ -Kaninchen Alexa 568-Konjugat Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. Balken, 10  $\mu$ m.

Um nachzuweisen, dass die Umverteilung von Nesprin-2 Lamin A/C abhängig ist, wurden *Knock-out* Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das für ein mit einem HA-Epitop versehenes Lamin A kodiert. Das sollte zu einer Reetablierung der originalen Nesprin-2 Verteilung führen. In den transfizierten Zellen konnte jedoch nur eine partielle Relokalisierung des Nesprin-2 an die Kernmembran beobachtet werden. Der größte Anteil von Nesprin-2 befindet sich nach wie vor im zytoplasmatischen Bereich (Abb. 3.9 B).



**Abb. 3.9 Nesprin-2 Relokalisierung an der Kernmembran in den Lamin A/C *Knock-out* Fibroblasten durch die Expression eines HA-Lamin A Fusionsprotein.**

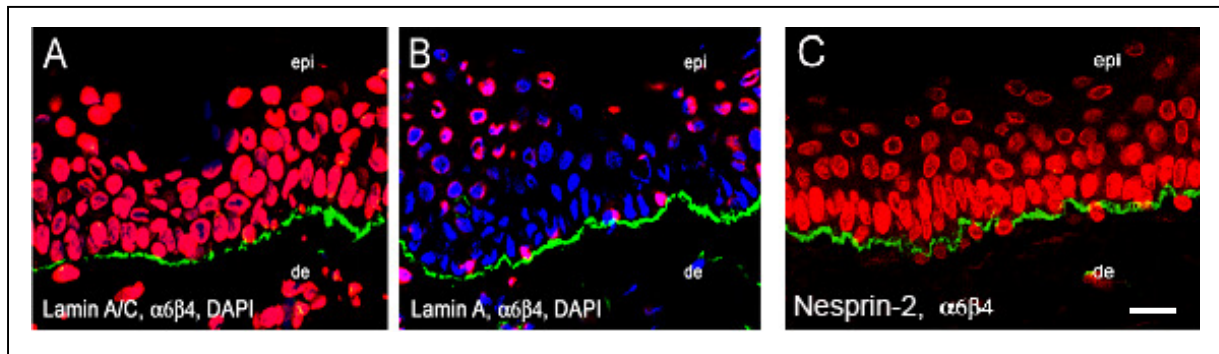
Lamin A/C *Knock-out* Fibroblasten wurden mit einem Plasmid transfiziert, das die Expression eines HA-markierten Lamin A ermöglicht. HA-Lamin A wurde mit einem HA-Antikörper aus Ratte sichtbar gemacht (A). In (B) ist die Nesprin-2 Färbung mit dem pAbK1 gezeigt. Eine partielle Relokalisierung des Nesprin-2 an die Kernmembran der HA-Lamin A exprimierenden Zelle ist deutlich erkennbar (Pfeile). Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit den sekundären Antikörpern  $\alpha$ -Ratte Alexa 568-Konjugat bzw.  $\alpha$ -Kaninchen FITC Konjugat. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. Balken, 10  $\mu$ m.

### 3.3.3 Lamin C ist ausreichend für Nesprin-2 Lokalisierung in der Kernmembran

Um weitere Einblicke in die molekularen Zusammenhänge zwischen Nesprin-2 und lamin A/C zu erhalten, wurde die Haut immunhistochemisch untersucht. Der Aufbau der Haut zeigt eine Unterteilung in drei verschiedene Schichten: Epidermis, Dermis sowie Subcutis. In der Epidermis sind Laminproteine unterschiedlich exprimiert. Während Lamin C in allen Schichten der Epidermis einschließlich der basalen Schicht vorkommt, ist Lamin A nur in den dermalen Fibroblasten und in der oberen Schicht der Epidermis vorhanden (Venables *et al.*, 2001). Um die Lokalisierung von Nesprin-2 in Abhängigkeit von den Lamin A oder Lamin C Isoformen zu testen, haben wir die Nesprin-2 Expression in menschlichen Hautgefrierschnitten mittels Immunfluoreszenz mit Lamin A/C, Lamin A und Nesprin-2 spezifischen Antikörpern analysiert.

Lamin C ist in allen Schichten der Epidermis und in der basalen Schicht vorhanden (Abb. 3.10 A), Lamin A dagegen nur in wenigen suprabasalen Zellen der Epidermis (Abb. 3.10 B). Nesprin-2 zeigte das gleiche Verteilungsmuster wie Lamin C. Es ist an der Kernmembran von allen epidermalen Zellen einschließlich der basalen Schicht vorhanden (Abb. 3.10 C). Eine schwache Nesprin-2 Kern Färbung konnte zusätzlich auch in den dermalen Fibroblasten beobachtet werden.

Die Verteilung von Nesprin-2 in der Epidermis lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Abwesenheit von Lamin A in der basalen Schicht keinen Einfluss auf die Nesprin-2 Expression hat und dass die Anwesenheit von Lamin C ausreichend ist, um eine Kernmembranlokalisierung von Nesprin-2 zu gewährleisten (Abb. 3.10).



**Abb. 3.10 Lamin C ist ausreichend, um eine Kernmembranlokalisierung von Nesprin-2 zu gewährleisten.**

Ein menschlicher Hautschnitt wurde mit Paraformaldehyd fixiert und mit drei unterschiedlichen Antikörpern gefärbt. In (A) ist Lamin A/C mit dem Maus-Jol-2 Antikörper gefärbt. Die Färbung ist in allen epidermalen Schichten einschließlich der basalen Schicht und der dermalen Fibroblasten zu sehen. Dagegen ist Lamin A nur in wenigen suprabasalen Zellen anwesend (B). Nesprin-2 wurde mit mAk K20-478 sichtbar gemacht. Eine deutliche Kernmembranfärbung in allen Epidermisschichten wurde beobachtet (C). Das gleiche Verteilungsmuster konnte auch anhand von Lamin C beobachtet werden. Integrin  $\alpha6\beta4$  wurde mit dem Ratte anti- $\alpha6\beta4$  gefärbt. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären  $\alpha$ -Maus-Cy3 bzw.  $\alpha$  Ratte-FITC-Konjugat. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (blau). Balken, 200  $\mu\text{m}$ .

### 3.4. Analyse der Nesprin-2-ABD defizienten Mauslinie

Zur Funktionsuntersuchung von Nesprin-2 wurde bereits eine Nesprin-2 ABD defiziente Mauslinie 1999 bei der Arbeitsgruppe Walz in Freiburg generiert. Das Ziel war, das vollständige Nesprin-2 Gen zu inaktivieren. Dies sollte durch die Rekombination eines *Knock-out*-Vektors, bei dem die Exons zwei, drei und vier durch eine Neomycin-Resistenz-Kassette ersetzt worden sind, erreicht werden.



### 3.4.1 Das Nesprin-2 Gen

Durch Sequenzierung von amplifizierten PCR-Produkten sowie aus Vergleichen bestehender Sequenzen aus Datenbanken konnte die vollständige Nesprin-2 cDNA aufgeklärt werden (Zhen *et al.*, 2002). Das Nesprin-2 Gen liegt auf Chromosom 14 des menschlichen Genoms und auf Chromosom 12 des Mausgenoms und umfasst mehr als 373 kb mit 115 Exons. Introns nehmen mehr als 94 % des gesamten Gens ein.

<p><b>Exon 1</b>  <b>ATG</b> GCC GCT AGC CCT GTG CTG CCC ACG GAA GAT GGA GAG GGT TTC TTG GGC ATT GAT GAT            CTA CAC TTT TCA CTG CAA <b>G GT</b></p> <p><b>Exon 2</b>  <b>AG CT</b> GAG CAG GAG GAC ACT CAG AAG AAA ACC TTC ACC TGC TGG ATA AAC TCA CAG CTG            GCA AAG <b>GT</b></p> <p><b>Exon 3</b>  <b>AG</b> CAC ACA CCT CCC TCA GTT GTA TCT GAC TTA TTC GCA GAC ATC AAG AAG GGG CAT GTC            CTC CTG GAC CTG TTG GAA GTC CTC TCG GGA CAG CAG TTG <b>GT</b></p> <p><b>Exon 4</b>  <b>AG</b> CCT CGG GAT AAA GGA TCT AAT ACA TTC CAG TGC AGA ATC AAC ATA GAA CAT GCC CTG            ACA TTC CTG AAA AAC AGA TCT <b>GT</b></p> <p><b>Exon 5</b>  <b>AG</b> ATC AAG CTA ATA AAT ATC CAT GTT GCT GAC ATT GTA GAA GGA AAC CCG TCC ATT ATC            CTT GGC CTG ATC TGG ACC ATC ATC CTG CAC TTT CAT <b>GT</b></p> <p><b>Exon 6</b>  <b>AG</b> ATT GAG AAG CTC GCT CAG ACT CTG TCT TGC GAT TAC AAT CAA CCT TCA CCG GAG GTT            GTG AGC GTG GCT GCC TCA TCT CCT ACC TCA AGT CCT CCC ACT AAG AAG TGC TCC AAG GCT            CAA GCT CAG GCA AGA TGG CAG TGG TCT GCC AAG AAG GCT CTT CTG CAG TGG GCT CAG GAG            CAG TGT GCC <b>AG GT</b></p> <p><b>Exon 7</b>  <b>AG G</b> TCT GAG TCT GTC AAT GTG ACA GAT TTT AAG TCA AGC TGG AGA AAT GGG ATG GCT TTT            TTG GCT GTC ATT CAT GCC TTG C GA CCA GAC CTG ATT GAC ATG GAC AGC ATG AGG CAC AGA            TCC AAC AAA GAC AAT CTG AAA GAG GCC TTC AGG ATC GCA GAA CAT GAG CTG AAG ATC CCC            AAA TTG CTG GAA CCA GAA <b>G GT</b></p> <p><b>Exon 8</b>  <b>AG AT</b> GTA GAT GTC GTG AAT CCT GAT GAG AAG TCC ATC ATG ACT TAC GTG GCG CAG TTC CTG            AAG TAT TCG AAG GAT GCG CCT GGC CCC GGG GAT TCC ACA CAG GTA TGT <b>C GT</b></p> <p><b>Exon 9</b>  <b>AG GG</b> ATG CTC TGG TCT GGC TAA CTC TGC AAG AGA AGA GAT TCC AGA AGA TGC TGA AGG            ACT CAG CAA GTG AGA CCT ACT GTA ACA AGT ATC ATG TGA <b>GT</b></p>
--

Abb. 3.11 Auflistung der Sequenzen der ersten neun Exons des murinen Nesprin-2 Gens, die für die ABD kodieren.

Grau: Startkodon, rot, Exon-Intron Übergänge, gelb, Kodons an den Exongrenzen

Die Exon-Intron Übergänge des Nesprin-2 Gens besitzen die Konsensus-Sequenz 5'-GT...AG-3'. Das Start-Kodon ATG befindet sich in dem zweiten Exon. Die ABD des Nesprin-2 Proteins besteht aus 253 AS und wird von Exon 3 bis einschließlich Exon 9 kodiert (Abb. 3.11) (Zhen *et al.*, 2002). Die ABD von Nesprin-2 besitzt eine beträchtliche Homologie zu ABDs, die in den vor

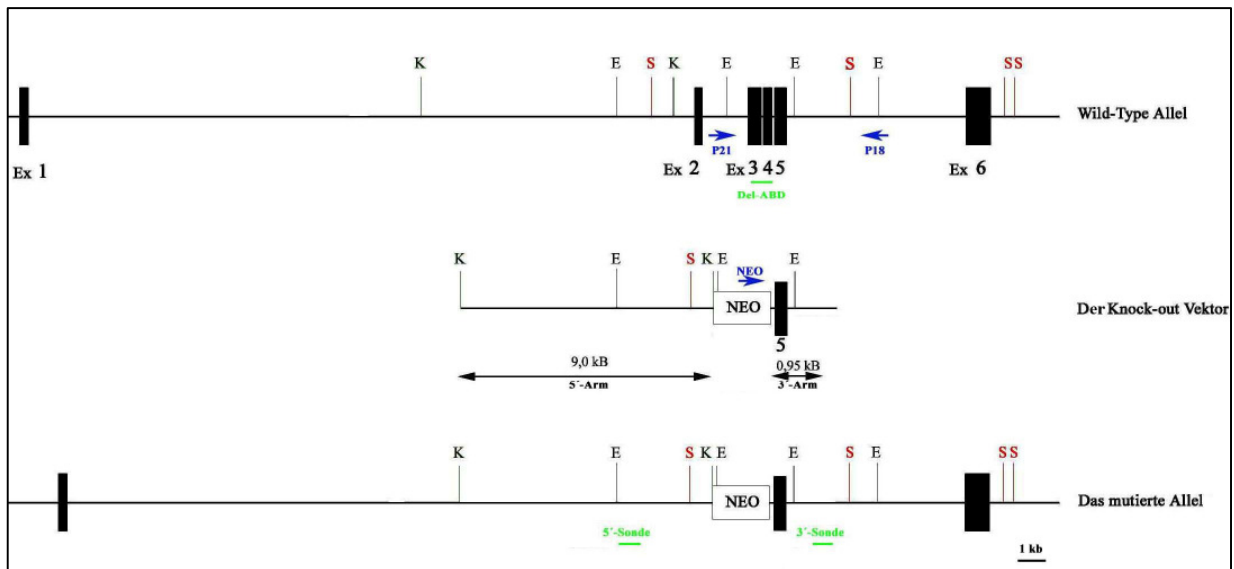
kurz beschriebenen Proteinen Nesprin-1 (Enaptin) (Braune, 2001) und Calmin (Ishisaki *et al.*, 2001) zu finden sind. Dabei unterscheiden sich die drei ABDs von den herkömmlichen ABDs durch eine 30 Aminosäuren lange Insertion zwischen den beiden CH Domänen.

Es wird vermutet, dass Nesprin-2 für die Kern Verankerung bzw. Positionierung in der Zelle verantwortlich ist. Für die Ausübung dieser Funktion spielt die ABD eine entscheidende Rolle. Bei der Generierung der Nesprin-2 *Knock-out* Maus Zelllinie wurde angenommen, dass, wenn die ABD als potentiell funktionelle Domäne zerstört wird, das Protein nicht mehr seine Funktionen ausüben kann.

### 3.4.2 Die *Knock-out* Strategie

Anhand von Sequenzanalysen des Nesprin-2 Gens wurde eine Strategie zur Inaktivierung dieses Gen entwickelt. Dies sollte durch Zerstörung der für die ABD kodierenden Exons erfolgen. Es wurde durch Sequenzanalyse festgestellt, dass selbst durch alternatives Spleißen zwischen Exon 1 und Exon 5 das Leseraster nicht wiederhergestellt werden kann. Die Inaktivierung des Gens sollte dann durch Deletion der Exons 2, 3 und 4, die durch eine Neomycin-Kassette ausgetauscht werden sollten, erzielt werden. Das Leseraster in Exon 1 endet mit der ersten Base eines Kodons. Um ein durchgehendes Leseraster zu erhalten, müsste das nächste Exon mit den 2 letzten Basen eines Kodons beginnen. Das würde nach der Deletion der Exons 2, 3 und 4 erst in Exon 8 der Fall sein. Exon 3, 4, 5 und 6 beginnen mit vollständigen Kodons und Exon 7 beginnt mit der letzten Base eines Kodons (Abb. 3.11). Eine Zerstörung bzw. Verschiebung des Leserasters in Exon 1 führt so entweder zur vollständigen Inaktivierung von Nesprin-2, oder durch alternatives Spleißen von Exon 1 an Exon 8 zur Generierung eines unvollständigen Proteins, bei dem aber die ABD fehlt.

Der 5'Arm des *Knock-out* Vektors ist ungefähr 9 kb und wurde aus der genomischen DNA mit dem Enzyme KpnI rausgeschnitten und isoliert. Der 3'Arm ist 950 bp groß und wurde mittels PCR amplifiziert. Dafür wurde der sense Primer P13 und der antisense Primer P14 verwendet. P13 befindet sich in dem vierten Intron und P14 in dem fünften Intron. Schließlich wurden beide Arme in einer Neomycin-Kassette kloniert (Abb. 3.10).



**Abb. 3.10: Schematische Darstellung der Nesprin-2 Knock-out Strategie.**

Dargestellt sind der genomische Bereich mit den ersten sechs Exons (Ex, schwarze horizontale Balken) des Nesprin-2 Gens, der verwendete *Knock-out*-Vektors und das mutierte Allel. Der *Knock-out* Vektor besteht aus einem 9 kb *KpnI* Fragment (5'-Arm) einer Neomycin-Kassette, dem fünften Exon des Gens und dem 3'-Arm (0,95 kb). Alle zur Klonierung des Vektors und Genotypisierung der Mäuse relevanten Restriktionsenzymstellen sind ebenso dargestellt. *KpnI* (K): Schnittstellen des 5' Arms; *EcoRI* (E): Genotypisierung mit der 5'-Sonde und Del-ABD; *SacI* (S): Genotypisierung mit der 3'-Sonde. Die, für die Genotypisierung mittels PCR verwendeten Primer P18, P21 und NEO sind mit blauen Pfeilen dargestellt. Die Sonden sind in grün präsentiert: 5'-Sonde im 5'-Arm; 3'-Sonde außerhalb des 3'-Arms und die Del-ABD-Sonde, die die Exons drei und vier beinhaltet.

### 3.4.3 Genotypisierung der Nesprin-2 defizienten Mauslinie

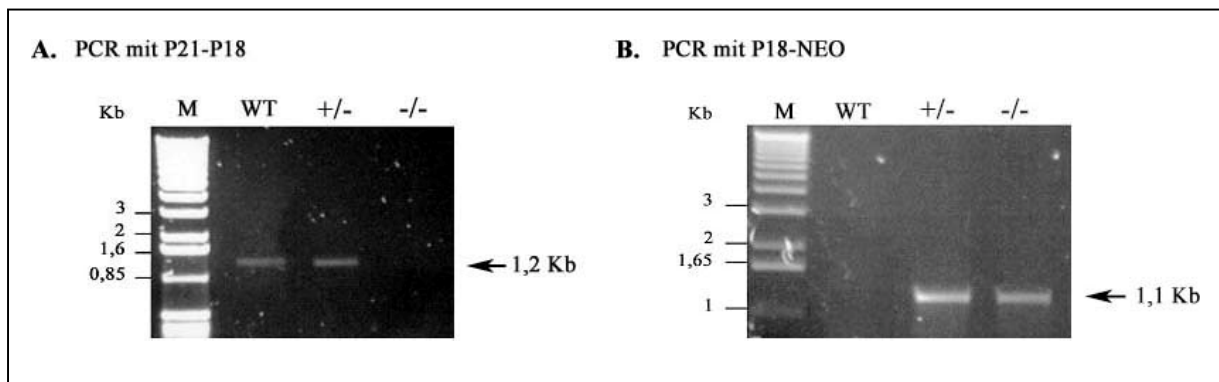
Zur Analyse der defizienten Mäuse wurden ein Paar homozygote und ein Paar heterozygote Mäuse an unser Labor geschickt. Vor der Verpaarung der Mäuse wurden sie mittels PCR genotypisiert und ihr Genotyp bestätigt. Aufgrund des fortgeschrittenen Alters wurde bei der Verpaarung der Mäuse festgestellt, dass mit Ausnahme des homozygoten Männchens, alle übrigen Tiere nicht mehr fertil waren. Daraufhin wurde das homozygote Männchen mit einem Wildtyp Weibchen verpaart, dann wurden heterozygote Nachkommen miteinander verpaart, um homozygote Tiere zu bekommen. Die Genotypisierung der Tiere erfolgte durch Restriktionsverdau der genomischen DNA mit *EcoRI* bzw. *SacI* und einer anschließenden Southernblotanalyse mit der 5'-, 3'- und der Del-ABD-Sonde.

#### 3.4.3.1 Genotypisierung mittels PCR

Um Wildtyp, heterozygote und Nesprin-2 defiziente Mäuse voneinander unterscheiden zu können, wurden PCRs mit drei unterschiedlichen Primern durchgeführt. Abbildung 3.10 zeigt die



Position der Primer. P21 ist zwischen Exon zwei und Exon drei platziert, P18 ist zwischen Exon fünf und Exon sechs platziert und der NEO Primer befindet sich in der Neomycin-Kassette. Der sense Primer P21 wurde so gewählt, dass mit dem antisense Primer P18 bei Heterozygoten und beim Wildtyp ein PCR-Produkt von 1,2 kb entsteht (Abb. 3.11 -A). Mit dem sense Primer NEO und dem antisense Primer P18 entsteht nur bei Heterozygoten und Homozygoten Mäusen ein PCR Produkt mit einer Größe von ungefähr 1,2 kb (Abb. 3.11 B).



**Abb. 3.11 Genotypisierung der Nesprin-2 defizienten Mäuse anhand von Schwanzspitzen-Biopsien mittels PCR.**

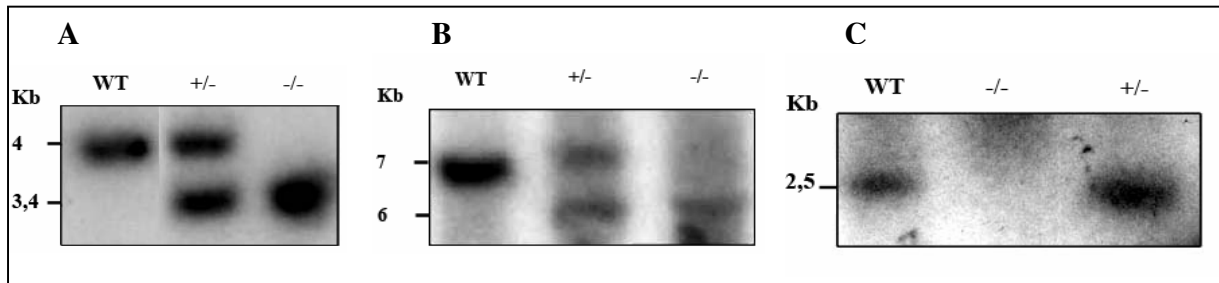
Die PCR wurde mit zwei Paar Primern P21/P18 und P18/NEO an DNA aus Schwanzspitzen von Wildtyp, Heterozygoten und Homozygoten durchgeführt. Anschließend wurden die amplifizierten Fragmente in einem 0,7% igen Gel aufgetrennt. Bei dem Reaktionsansatz mit dem Paar P21 und P18 entsteht ein Produkt von 1,2 kb bei Wildtyp und bei heterozygoten Mäusen (A). Da die Wildtyp DNA keine Neomycin-Kassette besitzt, ergab die PCR mit dem Primerpaar NEO/P18 ein Produkt von 1,1 kb nur bei den heterozygoten und homozygoten Mäusen (B).

### 3.4.3.2 Genotypisierung mittels Southernblotanalyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt drei Sonden erstellt, die bei der Genotypisierung der Mäuse mittels Southernblotanalyse verwendet werden sollten. Die 5'-Sonde ist 460 bp lang und befindet sich im 5'-Arm des *Knock-out-Vectors*, die 3'-Sonde umfasst 570 bp und ist 1800 bp stromabwärts von Exon 5 lokalisiert und die Del-ABD Probe ist 495 bp groß und umfasst Exon 3 und 55 bp des Exon 4 (Abb. 3.10).

In Southernblotanalysen von EcoRI geschnittener DNA lässt sich mit der 5'-Sonde (siehe Abb. 3.10) das Wildtyp- (4 kb) vom mutierten Allel (3,4 kb) unterscheiden (Abb. 3.12 A). Die Del-ABD Sonde erkennt ein 2,5 kb Fragment in der DNA von Wildtyp und heterozygoten Mäusen. Bei den homozygoten Tieren liefert diese Sonde kein Signal (Abb. 3.12 C). Dies zeigt, dass die Exons 2, 3 und 4 tatsächlich deletiert worden sind.

Die mit SacI geschnittene DNA wurde mit der 3'-Sonde hybridisiert. Diese Sonde liefert beim Wildtyp-Allel eine 7 kb Bande und beim mutierten Allel eine 6 kb Bande (Abb. 3.12 B)

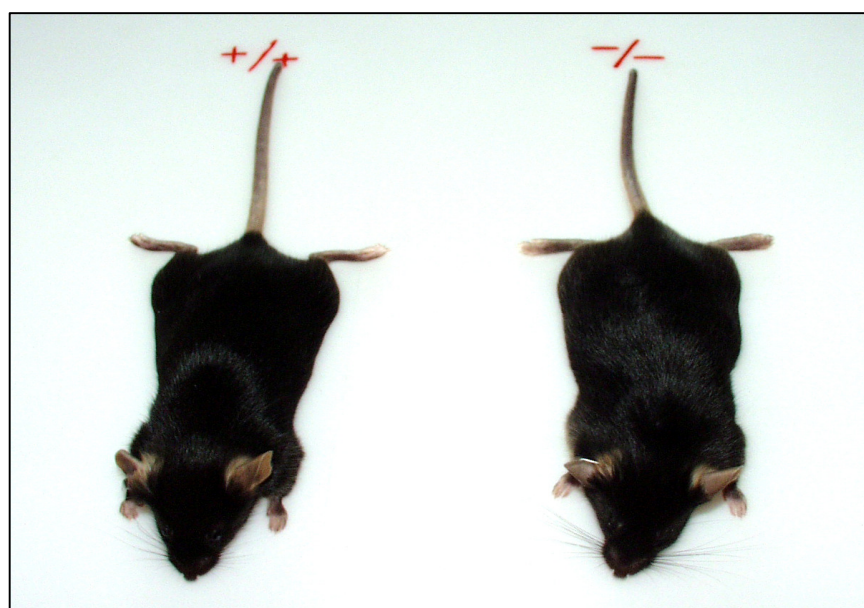


**Abb. 3.12 Genotypisierung der Nesprin-2 defizienten Mäuse mittels Southernblotanalyse.**

Die aus Schwanzspitzen-Biopsien gewonnene DNA wurde mit EcoRI und SacI geschnitten und in 0.7% igen Agarose Gelen aufgetrennt und auf Nylonmembranen transferiert. Danach wurden die Membranen mit den entsprechenden Sonden hybridisiert. Die 5'-Sonde erkennt eine 4 Kb Bande beim Wildtyp und eine 3,4 Kb Bande beim mutierten Allel (A). Die 3'-Sonde erkennt eine 7 Kb Bande beim Wildtyp und beim mutierten Allel eine 6 Kb Bande (B). Die Del-ABD Sonde liefert ein Signal von 2,5 Kb beim Wildtyp und bei den heterozygoten und kein Signal bei den homozygoten Mäusen (C). WT: Wildtyp; +/-: Heterozygot; -/-: Homozygot.

### 3.4.3.3 Eigenschaften der Nesprin-2 defizienten Maus

Die Nesprin-2 defizienten Mäuse (Nesprin-2 (-/-)) sind lebensfähig, fertil und zeigen keine erkennbaren Abnormalitäten gegenüber Wildtyp-Tieren. Adulte Nesprin-2 (-/-) Mäuse zeigten gegenüber ihren gleichgeschlechtlichen Geschwistertieren keine Unterschiede in Körpergröße und Form (Abb. 3.13). Nesprin-2 (-/-) Tiere besitzen wie die Kontrolltiere eine intakte Sinneswahrnehmung und keine motorischen Auffälligkeiten.



**Abb. 3.13 Äußeres Erscheinungsbild einer Wildtyp und einer Nesp.-2-ABD<sup>(-/-)</sup> Maus.**

Gezeigt sind zwei 9 Wochen alte männliche Geschwistertiere. Die Nesp<sup>rin-2</sup><sup>(-/-)</sup> zeigt gegenüber dem Geschwistertier keine Unterschiede in Körpergröße und Form.

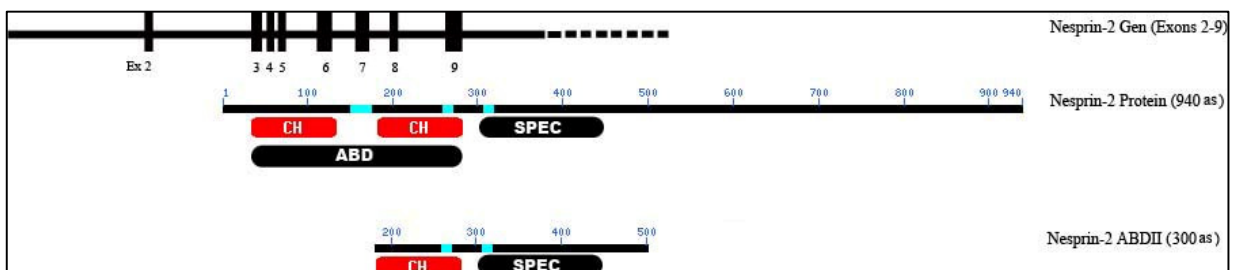
### 3.4.4 Herstellung und Charakterisierung eines monoklonalen Nesprin-2 Antikörpers der gegen die ABD gerichtet ist

Im Labor existierten bereits zwei Nesprin-2 spezifische monoklonale Antikörper. Einer ist gegen die ABD von humanem Nesprin-2 erzeugt worden (K20-478) und ein zweiter gegen den C-terminalen Teil des Proteins (K49-260). Diese Antikörper sind Spezies-spezifisch und erkennen nur die humanen Antigene.

Um Reagenzien für die weitergehende Untersuchungen der *Knock-out* Maus zu erhalten, wurde ein spezifischer monoklonaler Antikörper gegen ein rekombinantes Maus Nesprin-2-ABD Protein hergestellt (GST-Nesprin-2-ABDII).

#### 3.4.4.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung von GST-Nesprin-2-ABDII (Maus)

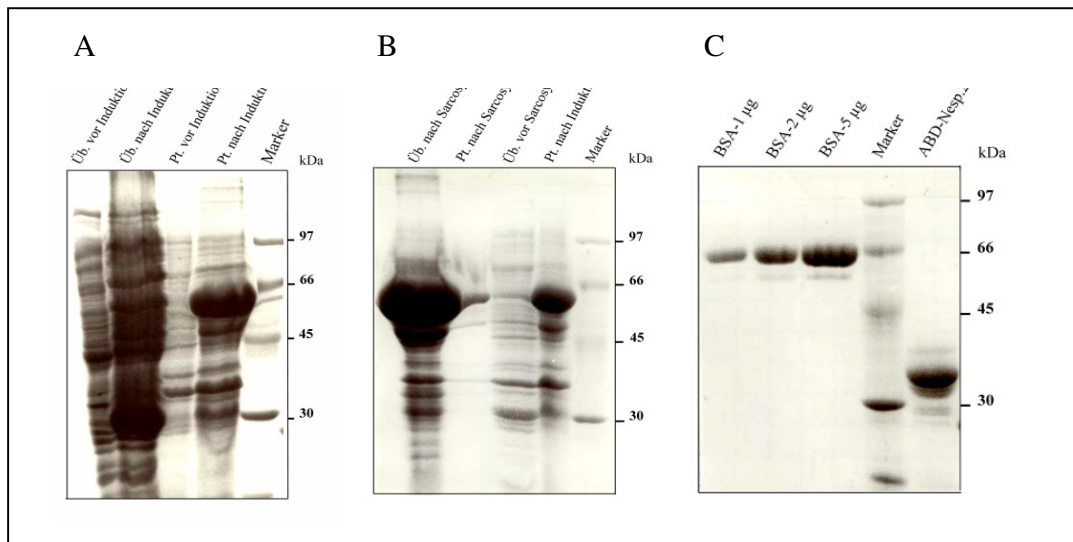
Die Aktinbindedomäne von Nesprin-2 und Nesprin-1 besteht aus zwei Calponin-homologen Domänen (CHD), die untereinander zu 49% identisch sind. Um eine Kreuzreaktion der neu hergestellten Antikörper mit dem homologen Protein Nesprin-1 zu vermeiden, wurde eine Region ausgewählt, die weniger homolog mit Nesprin-1 war. Das ausgewählte Epitop besteht aus der zweiten CHD und den darauf folgenden 210 Aminosäuren (Abb. 3.14).



**Abb. 3.14 Schematische Darstellung von Nesprin-2-ABDII.**

Die ABD des Nesprin-2 wird von Exon drei bis einschließlich Exon neun des Gens kodiert. Um zu vermeiden, dass der Antikörper mit dem verwandten Protein Nesprin-1 kreuzreagiert, wurde eine Region mit geringerer Homologie für die Generierung eines rekombinanten Proteins als Antigen gewählt. Das Antigen beinhaltet die zweite CHD und die darauffolgenden 210 Aminosäuren (Nesprin-2 ABDII). ABD: Aktinbindungsdomäne; CH: Calponin-Homologie-Domäne; SPEC: Spektrin-Homologie-Domäne; Ex: Exon. Exons sind mit einem schwarzen Balken dargestellt. as: Aminosäure.

Das Protein wurde als GST-Fusionsprotein in *E. coli* XL1-Blue Zellen exprimiert und konnte nach Sarkosylbehandlung aus dem Zellpellet isoliert werden. Das gereinigte und vom GST-Anteil abgespaltenen Nesprin-2 ABDII Polypeptid hat die erwartete Grösse von ungefähr 34 kDa (Abb. 3.15 C).



**Abb. 3.15 Aufreinigung und Isolierung der Nesprin-2-ABD-II.**

Das Plasmid pGEX4T-1-Nesprin-2 ABDII wurde in *E. coli* XL1blue transformiert und die Expression mit 0,1 mM IPTG bei 37°C induziert. Proben vor und nach Induktion wurden entnommen und die Proteine in einem 12% igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Blue gefärbt (A). Da sich das Fusionsprotein in der unlöslichen Fraktion (Pellet) befand, wurde diese Fraktion mit Sarkosyl behandelt und anschließend abzentrifugiert. Aus dem entstandenen Pellet und den Überstand wurden Proben entnommen und in einem 12% igen Gel aufgetrennt. Eine Probe von dem vorherigen Pellet nach IPTG Induktion wurde ebenfalls als positive Kontrolle aufgetragen (B). Nach der Behandlung mit Sarkosyl befand sich das Fusionsprotein in der löslichen Fraktion (B). Aus dieser Fraktion wurde das GST-Nesprin-2 ABDII mit Hilfe von GST-Beads isoliert und von GST mit Thrombin geschnitten. Zur Konzentrationsabschätzung wurden 10 µl der Nesprin-2 ABDII Lösung und drei unterschiedlichen BSA Konzentrationen (1, 2 und 5µg) in einem 12% igen SDS-PA-Gel aufgetrennt (C). Üb: Überstand; Pt: Pellet.

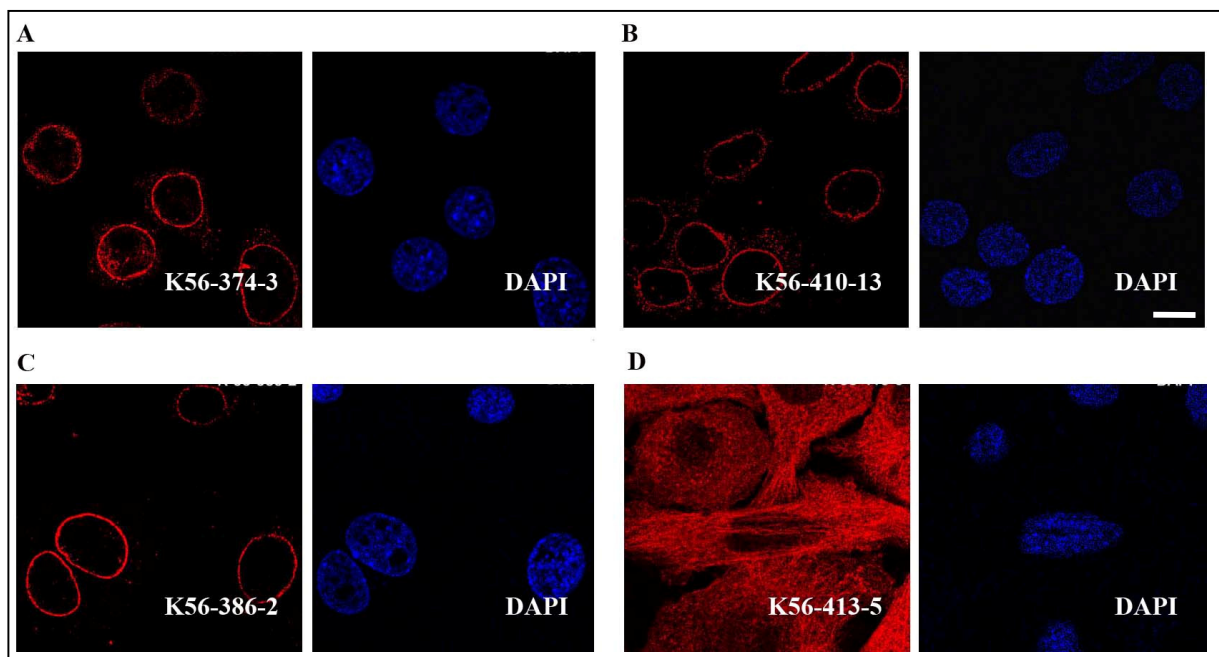
#### 3.4.4.2 Herstellung und Charakterisierung des Antikörpers gegen murines Nesprin-2-ABDII

Zur Immunisierung wurden Mäuse mit dem gereinigten Maus Nesprin-2 ABDII immunisiert (siehe 2.3.13). Es wurden insgesamt acht Hybridomazelllinien isoliert, deren Überstände im Westernblot eine Immunreaktion gegen rekombinantes Nesprin-2-ABDII zeigten.

Auf Grund der starken Expression von Nesprin-2 in Keratinozyten, wurde die Pam212 Maus Zelllinie für die weitere Charakterisierung der monoklonalen Antikörper benützt. Zunächst wurde eine immunozytochemische Analyse mit den Antikörpern durchgeführt. Nur drei der acht Antikörper zeigten eine deutliche Kernmembranfärbung (Abb. 3.17 A-C). Die übrigen Klone haben eine Aktinfilament ähnliche Färbung gezeigt (Abb. 3.17 C). Um die Spezifität der

Antikörper weiter zu untersuchen und um insbesondere die Erkennung von endogenem Nesprin-2 zu testen, wurde eine Westernblotanalyse an Pam212-Proteinlysaten durchgeführt. Nur K56-374-3 und K56-386-2 haben die 800 kDa Bande des Nesprin-2 Proteins erkannt (Abb. 3.18 A; B Pfeile). K56-374-3 erkannte auch das mit dem pAbK1 aus Pam212-Zellen immunpräzipitierte Protein (Abb. 3.18 C), was als Hinweis gewertet wurde, dass beide Antikörper, das gleiche Protein erkennen.

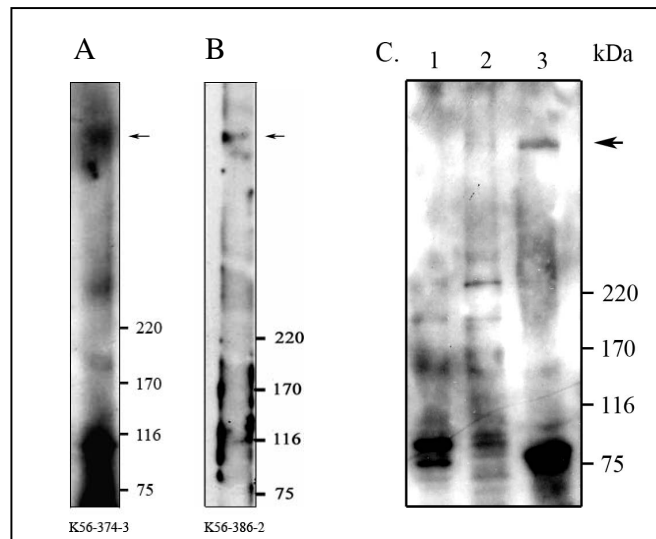
Um eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit der ABD von Nesprin-1 auszuschließen, wurde ein Hautschnitt mit K56-386-3 und einem polyklonalen Nesprin-1 spezifischen Antikörper gleichzeitig gefärbt. In der Haut sind Nesprin-1 und Nesprin-2 unterschiedlich verteilt. Während Nesprin-1 hauptsächlich an der Peripherie der Zellen lokalisiert ist, befindet sich Nesprin-2 an der Kernmembran. Abb. 3.19 C zeigt, dass keine Überlagerung zwischen den zwei Färbungen festzustellen ist. K56-386-2 zeigt eine starke Kernmembranfärbung in allen Epidermisschichten (Abb. 3.19 A), während der Nesprin-1 Antikörper die Peripherie der Zellen stark färben (Abb. 3.19 B).



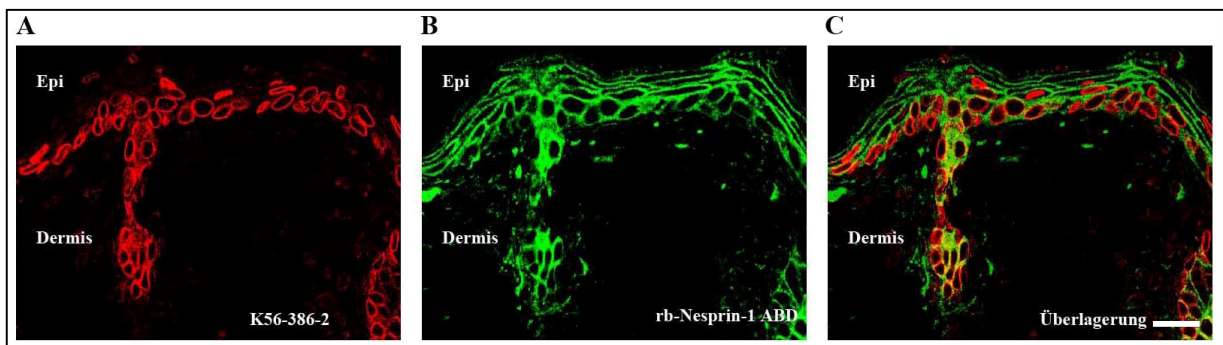
**Abb. 3.17 Spezifitätskontrolle der monoklonalen Antikörper K56-374-3, K56-386-2, K56-10-13; K56-413-5 mittels Immunfluoreszenz an Pam212 Keratinozyten.**

(A) Färbung mit K56-374-3. (B). Färbung mit K56-386-2. (C) Färbung mit K56-410-13 (D) Färbung mit K56-413-5. In A, B und C wurde eine Nesprin-2 typische Färbung beobachtet (Kernmembranfärbung). In D ist eine zytoskelettartige Struktur von K56-413-5 erkannt worden. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären  $\alpha$ -Maus-Cy3. DNA wurde mit DAPI gefärbt. Balken, 25  $\mu$ m.





**Abb. 3.18 Detektion von Nesprin-2 in Zellhomogenaten von PAM212.** Pam212-Proteinlysate wurden in einem SDS-Polyacrylamid Gradientengel (3-10%) aufgetrennt, auf eine PVDF Membrane transferiert und mit K65-374-3 (A) bzw. K56-386-2 (B) getestet. C. Immunpräzipitation mit pABK1 an PAM212 Zellen und Detektion des präzipitierten Proteins mit K56-374-3. Spur 1, Gesamtzelllysat von Pam212 Zellen. 2, Kontrollfraktion, Zelllysat präzipitiert mit den Sepharose A-Beads. 3, Pam212 Zelllysat. Immunpräzipitation mit pAbK1. Inkubation war mit mit mAb K56-374-3. Die Pfeile zeigen auf die 800 kDa Nesprin-2 Bande.



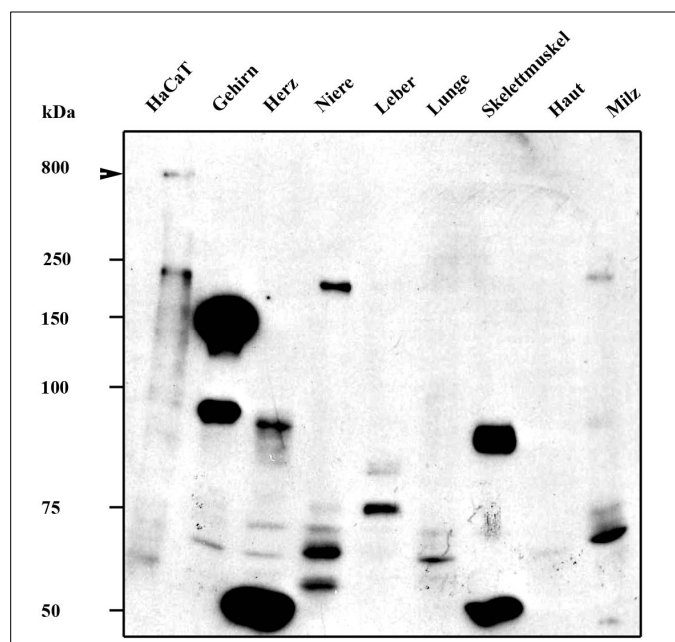
**Abb. 3.19 K56-386-2 zeigt keine Kreuzreaktion mit Nesprin-1 in der Haut.**

Ein Maus-Hautschnitt wurde mit Paraformaldehyd fixiert und mit K56-386-2 und einem Nesprin-1 spezifischen Antikörper gefärbt. K56-386-2 zeigt das typische Nesprin-2 Färbungsmuster in allen Epidermisschichten einschließlich der basalen Schicht der Haut (A). Der Nesprin-1 spezifische Antikörper erkennt die Peripherie der Zellen (B). Eine Überlagerung der beiden Bilder zeigt keine Kolokalisation (C). Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit den sekundären Antikörpern  $\alpha$ -Maus-Cy3 bzw.  $\alpha$ -Kaninchen-FITC. Balken, 200 $\mu$ m.

### 3.4.5 Untersuchung der Gewebe der Nesprin-2 (-/-) Maus

Nesprine sind in fast allen Geweben der Maus nachweisbar. Interessanterweise gibt es in vielen Geweben Unterschiede nicht nur in der Lokalisierung von Nesprin-2 verglichen mit Nesprin-1,

sondern auch in ihrer Abundanz. Nesprin-1 ist im Skelettmuskel und im Gehirn stark exprimiert, wobei Cerebellum, Cerebrum und Hippocampus die intensivste Färbung zeigen (Abraham, Dissertation 2004). Westernblotanalysen an Mausgeweben mit pAbK1 haben gezeigt, dass Nesprin-2 mehrere Isoformen besitzt. Diese Isoformen haben unterschiedliche Grössen und variieren stark in ihrer Expression in den verschiedenen Geweben. Im Gehirn wurden zwei Isoformen detektiert, die eine molekulare Masse von 150 und ca. 95 kDa aufweisen. Im Herzen und Skelettmuskel konnte eine 95 kDa und eine 50 kDa Bande erkannt werden, wobei die 95 kDa Bande mehr abundant im Skelettmuskel ist. In der Niere und Milz wurde eine 200 kDa Bande detektiert, in der Leber und Lunge konnte jeweils nur ein Protein von 75 bzw. 60 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3.20). Die Westernblotanalyse von den Hautproben war nicht erfolgreich. Eine Immundetektion von Nesprin-2 giant war aber in der Keratinozyten Zelllinie HaCaT möglich. Diese Ergebnisse und immunhistochemische Daten (Abb. 3.19), die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigen eine starke Expression von Nesprin-2 in der Haut.



**Abb. 3.20 Verteilung von pAbK1-positiven Proteinen in Geweben der Haut.**

Nach Isolierung von Mausgeweben wurden daraus Proteinlysate hergestellt und in gleicher Menge in einem Gradienten SDS-Polyacrylamidgel (3-10%) aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Immundetektion mit pAbK1 (sekundärer Antikörper  $\alpha$ -Kaninchen Peroxidase Konjugat). HaCaT Proteinlysate wurden als Positivkontrolle verwendet. pAbK1 detektierte mehrere Proteine, die auf die Anwesenheit von gewebespezifischen

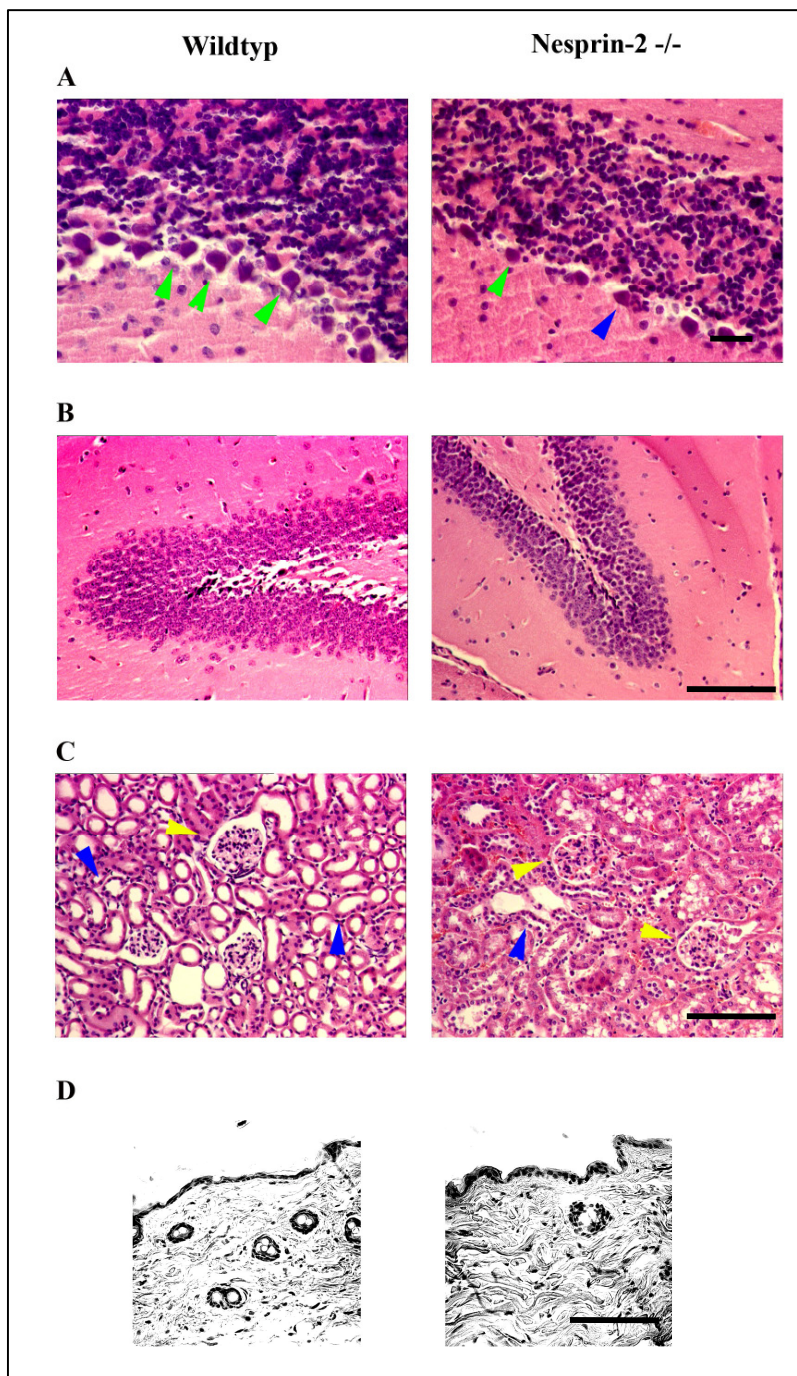
Nesprin-2 Isoformen deutet. Nur im HACaT-Lysat konnte die große Nesprin-2 Isoform detektiert werden. Im Gehirn wurden zwei Proteine von 150 und 95 kDa detektiert. In Herz und Skelettmuskel wurden 95 kDa und 50 kDa Proteine erkannt. Die 95 kDa Form ist prominenter beim Skelettmuskel. In der Niere und Milz wurde eine 200 kDa Form detektiert. In der Leber und Lunge konnte nur ein Protein detektiert werden von 75 bzw. 60 kDa.

Die Nesprin-2 (-/-) Mäusen weisen keine nennenswerten Abnormalitäten in ihrer Anatomie und ihrem Verhalten auf. Zur histologischen und immunhistologischen Untersuchungen der defizienten Mäuse wurden drei Gewebe ausgewählt, Gehirn, Haut und Niere. Dafür wurden die drei Gewebe den Wildtyp- und den Nesprin-2 (-/-) -Mäusen entnommen und Paraffin- und Gefrierschnitte hergestellt.

#### ***3.4.5.1 Hämatoxylin -Eosin Färbung***

Um einen ersten Eindruck von der Morphologie der inneren Organe der Nesprin-2 (-/-)-Mäuse zu gewinnen, wurden Paraffinschnitte mit Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung) gefärbt. Die HE-Färbung ist eine Übersichtsfärbung, die Zellkerne und zytoplasmatische Bestandteile darstellt. Die Schnitte wurden auf histologische Defekte hin untersucht. Im Gehirn wurden bestimmte Zonen wie Cerebellum (Purkinje Zellen, Abb. 3.21 A, grüne Pfeile) und Hippocampus (Abb. 3.21 A), genauestens untersucht. Wie die Abb. 3.21 zeigt, ist kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante zu erkennen.





**Abb. 3.21 Histologische Untersuchungen der Nesprin-2<sup>-/-</sup> Gewebe im Vergleich zu Wildtyp.**

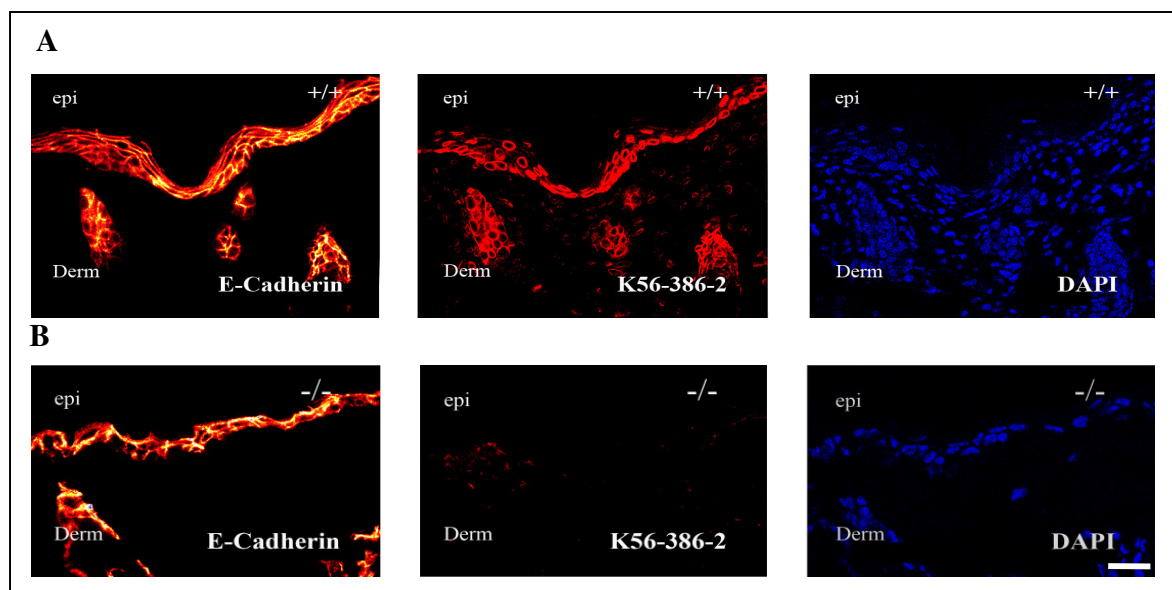
Parrafinschnitte aus *Knock-out* und Wildtyp Gewebe wurden mit Hematoxylin-Eosin gefärbt. **(A)** Im Cerebellum der beiden Tiere wurden die Purkinje-Zellen (grüne Pfeile) bzw. die granuläre Schicht untersucht, jedoch konnte kein Unterschied gesehen werden. **(B)** Es wurden ebenso im Hippocampus keine histologischen Abnormalitäten festgestellt werden. **(C)** In der Niere wurden Glomeruli (gelbe Pfeile) und die distalen und proximalen Tubuli (blaue Pfeile) untersucht. **(D)** HE-Färbung an Haut-Paraffinschnitten. In allen untersuchten Geweben konnten keine histologischen Defekte detektiert werden. Balken, 200 µm

### 3.4.5.2 Immunhistochemische Analyse an Nesprin-2(-/-) defizienten Mäusen

Für die Immunhistochemie wurden ebenfalls Haut, Niere und Gehirn ausgewählt. Dafür wurden die Gefrierschnitte eingesetzt.

#### 3.4.5.2.1 Immunhistochemische analyse an Nesprin-2 (-/-)-Haut

Die Hautschnitte wurden mit K56-386-2, einem E-Cadherin spezifischen Antikörper und DAPI gefärbt. K56-386-2 färbt beim Wildtyp alle Schichten der Epidermis einschließlich der basalen Schicht. Haarwurzeln in der Dermis wurden auch gefärbt. E-Cadherin wurde als Kontrolle verwendet, um die Zellperipherie zu färben. In der Nesprin-2 (-/-)-Haut konnte keine Färbung mit K56-386-2 festgestellt werden (Abb. 3.22 B), ein Hinweis auf das Fehlen des entsprechenden Epitops. Im Gegensatz dazu konnte mit pAbK1, der gegen den C-Terminus von Nesprin-2 gerichtet ist, eine deutliche Färbung in der Haut der Mausmutante festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dies weist daraufhin, dass die C-terminalen Isoformen von Nesprin-2 (Abb. 3.1) in der Nesprin-2 (-/-)-Maus weiterhin exprimiert werden (Daten nicht gezeigt).

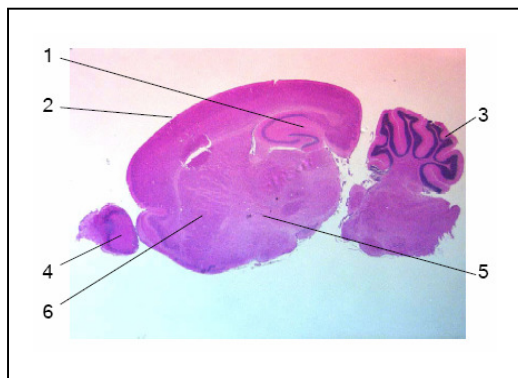


**Abb. 3.22 Färbung von Hautgefrierschnitten in der Nesprin-2(-/-)-Maus im Vergleich zum Wildtyp.**

Immunfluoreszenz mit K56-386-2 an gefrorenen Hautschnitten einer adulten Wildtyp- und Nesprin-2(-/-) -Maus. Dieser Antikörper färbt bei der Wildtyphaut die Kernmembran in allen Schichten der Epidermis (epi) einschließlich der basalen Schicht und die Haarwurzeln in der Dermis (derm) (A). Bei der Haut der Nesprin-2(-/-) Maus ist keine Färbung zu sehen (B). Die Schnitte sind 7µm dick. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (blau). Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären α-Maus-Cy3 bzw. α-Kaninchen-FITC. Die Schnitte sind 7µm dick. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (blau). Blken, 200 µm

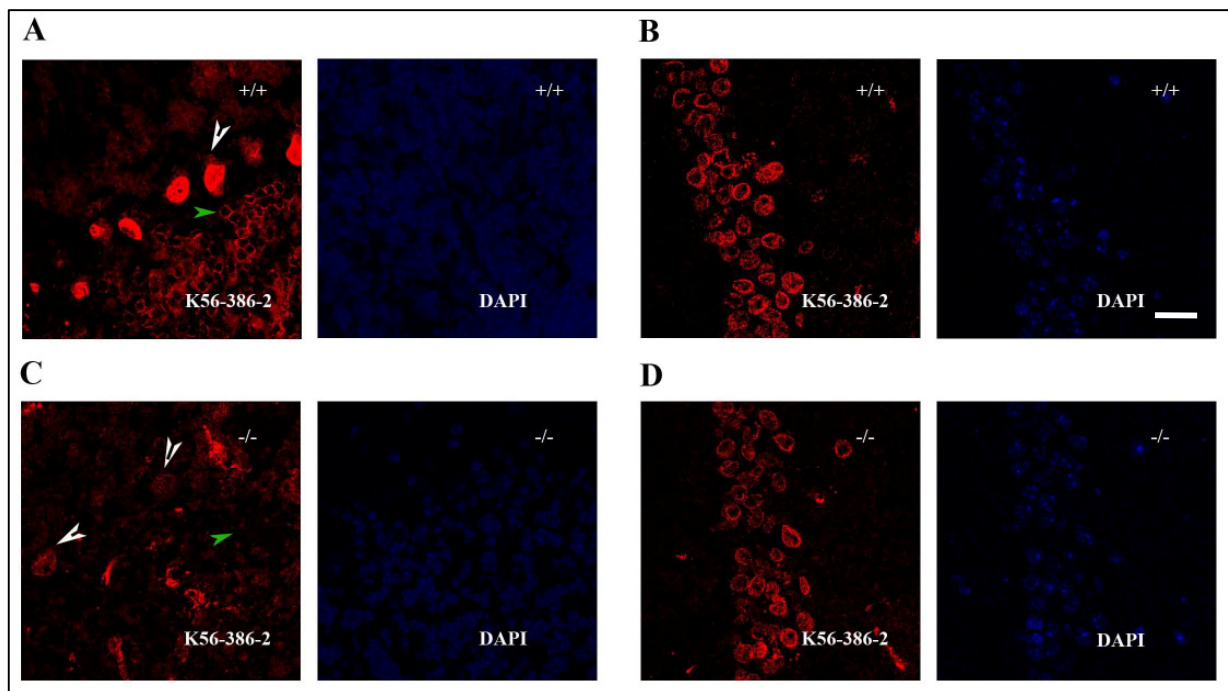
### 3.4.5.2.2 Immunhistochemische Analyse an Nesprin-2 (-/-)-Gehirn

Anhand der bereits existierenden Daten über die Nesprin-1 Verteilung im Gehirn wurden drei Gehirnregionen für diese Analyse ausgewählt: Cerebellum, Cerebrum und Hippocampus (Abb. 3.23). Bei Nesprin-1 wurde zwar auch eine starke Färbung der Purkinje-Zellen festgestellt, aber die granuläre Schicht war Nesprin-1 negativ (Abraham, 2004). Die Verteilung des Nesprin-2 Proteins im Wildtyp- und im Nesprin-2 (-/-)-Gehirn wurde in Gefrierschnitten analysiert. Beim Wildtyp-Cerebellum wurde eine sehr starke Färbung der Kernmembran und im Kerninneren der Purkinje Zellen beobachtet (Abb. 3.24 A, weiße Pfeile). In der granulären Schicht wurde nur die Kernmembran der Zellen gefärbt (Abb. 3.24 A, grüne Pfeile). Überraschenderweise wurde eine schwache Färbung mit dem K56-386-2 im Cerebellum der Nesprin-2 (-/-)-Maus festgestellt. In den Purkinje Zellen konnte eine schwache Färbung im Inneren des Kerns gesehen werden (Abb. 3.24 B, weiße Pfeile), eine Färbung der granulären Schicht konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 3.24 B, grüne Pfeile). Im Hippocampus konnte kein Unterschied festgestellt zwischen Wildtyp und Nesprin-2 (-/-) (Abb. 3.24 C, D) festgestellt werden.



**Abb. 3.23 H-E Färbung eines sagittalen Gehirnschnittes einer 20 Tage alten Maus.**

- 1) Hippocampusformation
- 2) *Cortex cerebri*
- 3) *Cerebellum*
- 4) *Bulbus olfactorius*
- 5) *Capsula interna*
- 6) Striatum



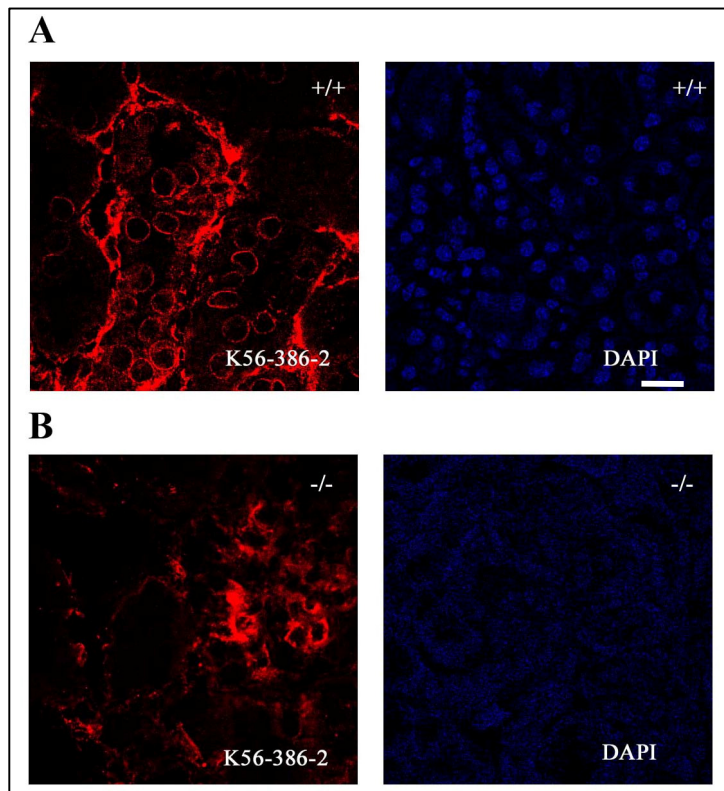
**Abb. 3.24 Immunhistochemische Analyse mit dem K56-386-2 an Gehirnschnitten eines Gehirns einer Wildtyp und Nesprin-2 (-/-)-Maus**

Gefrorene Gehirnschnitte aus Nesprin-2 (-/-)- und Wildtyp-Maus wurden mit PFA fixiert und mit dem K56-386-2 gefärbt. Eine starke Expression konnte im Cerebellum und Purkinje Zellen von Wildtyp Mäusen detektiert werden, in den Purkinje Zellen (A. weiße Pfeile) und in der granulären Schicht (A. grüne Pfeile). Im Hippocampus wurde das typische Nesprin-2 Färbungsmuster der Kernmembran beobachtet (B). In den Nesprin-2<sup>(-/-)</sup> Gehirnschnitten war eine K56-386-2 Reaktivität vorhanden. Im Cerebellum sind die Purkinje Zellen (B. weiße Pfeile) und die granuläre Schicht schwach gefärbt (B. grüne Pfeile). In Hippocampus dagegen konnte kein Unterschied zum Wildtyp gesehen werden (D). Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit dem sekundären Antikörper  $\alpha$ -Maus-Cy3. Die Schnitte sind 7  $\mu$ m dick. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (blau). Balken, 100  $\mu$ m.

### 3.4.5.2.3 Immunhistochemische analyse an Nesprin-2 (-/-)-Niere

Für die Analyse der Nesprin-2 (-/-)-Mausniere wurden ebenfalls gefrorene Schnitte verwendet. Die Fixierung erfolgte mit PFA. Aus Westernblotanalysen von COS7 Zelllysaten (einer Nierenzelllinie) mit den N- und C-Terminus spezifischen Antikörpern war anzunehmen, dass in der Niere nur die 800 kDa Nesprin-2 Isoform exprimiert wird (Zhen *et al.*, 2002). Bei dem Wildtyp-Nierenschnitt wurde eine Nesprin-2 Färbung in den Glomeruli, proximalen und distalen Tubulis beobachtet (Abb. 3.25 A). Bei der Nesprin-2(-/-)-Mausniere dagegen konnte kein Signal detektiert werden (Abb. 3.25 B).





**Abb. 3.25 Verteilung des Nesprin-2 Proteins in der Mausniere.** Nierengefrierschnitte aus Nesprin-2 (-/-)- und Wildtyp-Maus wurden mit PFA fixiert und mit K56-386-2 gefärbt. In der Wildtyp-Niere war die Färbung von Nesprin-2 in den Glomeruli, proximalen und distalen Tubuli kräftig (A). In der Nesprin-2 (-/-)-Mausniere konnte keine Färbung beobachtet werden (B). Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (blau). Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären  $\alpha$ -Maus-Cy3. Die Schnitte sind 7  $\mu\text{m}$  dick. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (blau). Balken, 100 $\mu\text{m}$ .

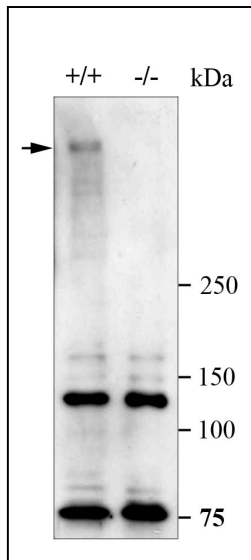
### 3.5 Analyse der *Knock-out* Fibroblasten

#### 3.5.1 Untersuchung der Nesprin-2 *Knock-out* Fibroblasten im Vergleich zum Wildtyp

##### 3.5.1.1 Eigenschaften der Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten

Zunächst wurde eine Nesprin-2 *Knock-out* Analyse auf der Zellbiologieebene durchgeführt. Dafür wurden primäre dermale Fibroblasten aus neugeborenen Nesprin-2 (-/-) und Wildtyp Mäusen isoliert. Die Haut der neugeborenen Mäuse wurde isoliert und so präpariert, dass die Epidermis von der Dermis getrennt wurde. Aus der Dermis wurden die Fibroblasten gewonnen (siehe 2.5.1). In einer Westernblotanalyse an den Lysaten der Nesprin-2 (-/-) und Wildtyp Fibroblasten erkannte pAbK1 im Wildtyp drei Proteine von 800, 130 und 75 kDa (Abb. 3.26

+/+). Für Nesprin-2 (-/-) konnte die 800 kDa Isoform nicht detektiert werden (Abb. 3.26 -/-) die 130 und 75 kDa Proteine waren unverändert vorhanden. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass in den Nesprin-2 (-/-) Mäusen die große 800 kDa Nesprin-2 Isoform nicht exprimiert wird.

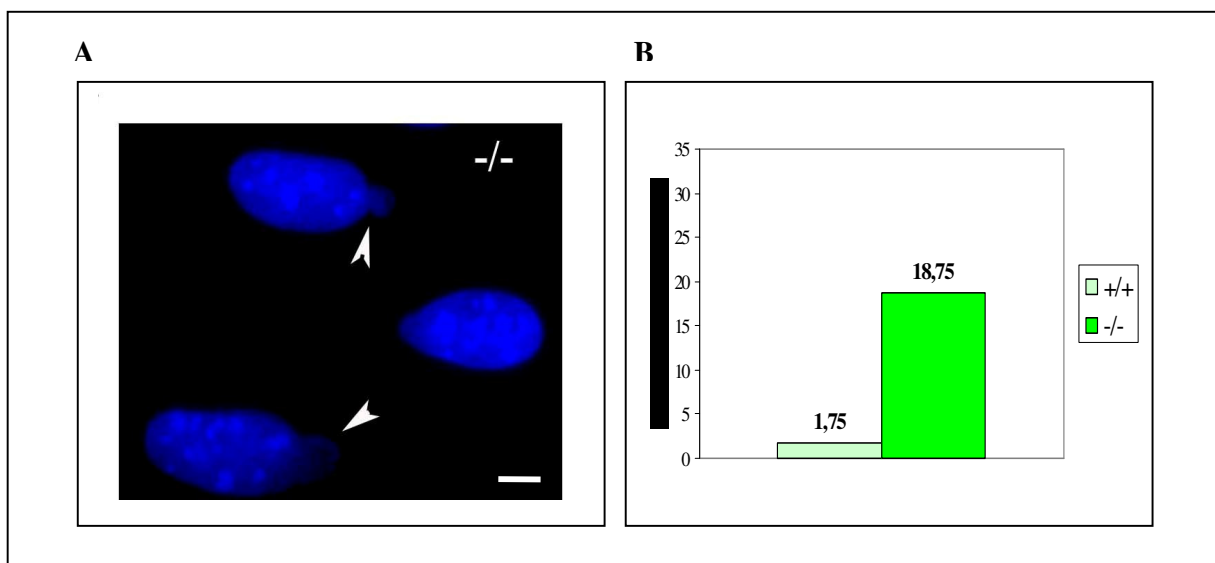


**Abb. 3.26 Westernblotanalyse an Homogenaten von Nesprin-2 (-/-) und Wildtyp Fibroblasten.**

Nesprin-2 (-/-) und Wildtyp Fibroblastenlysate wurden in einem 3-10% SDS-Polyacrylamid getrennt und auf PVDF Membranen überführt. Die Immundetektion erfolgte mit pAbK1, der gegen den C-Terminus gerichtet ist. Beim Wildtyp wurden drei Nesprin-2 spezifische Signale erkannt: 800 (schwarze Pfeile), 130 und 75 kDa (+/+). Bei den Nesprin-2 (-/-) konnte die 800 kDa Isoform nicht detektiert werden (Abb. 3.24 -/-). -/-, Nesprin-2 (-/-) fibroblasten; +/+, Wildtyp Fibroblasten.

Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären  $\alpha$ -Maus-Peroxidase Konjugat. Die Schnitte sind 7  $\mu$ m dick. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (blau).

Zunächst wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät, PFA fixiert und mit DAPI gefärbt. In der DAPI-Färbung wurden Zellkerndeformationen in den Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten in Form von kugelförmigen Ausbuchtungen des Kerns beobachtet (Abb. 3.27 A). In einer quantitativen Analyse wiesen in den Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten 18,75% Kerndeformationen aufweisen. Bei den Wildtyp Fibroblasten dagegen waren nur in 1,75% der Zellen die Kerne deformiert (Abb. 3.27 B).

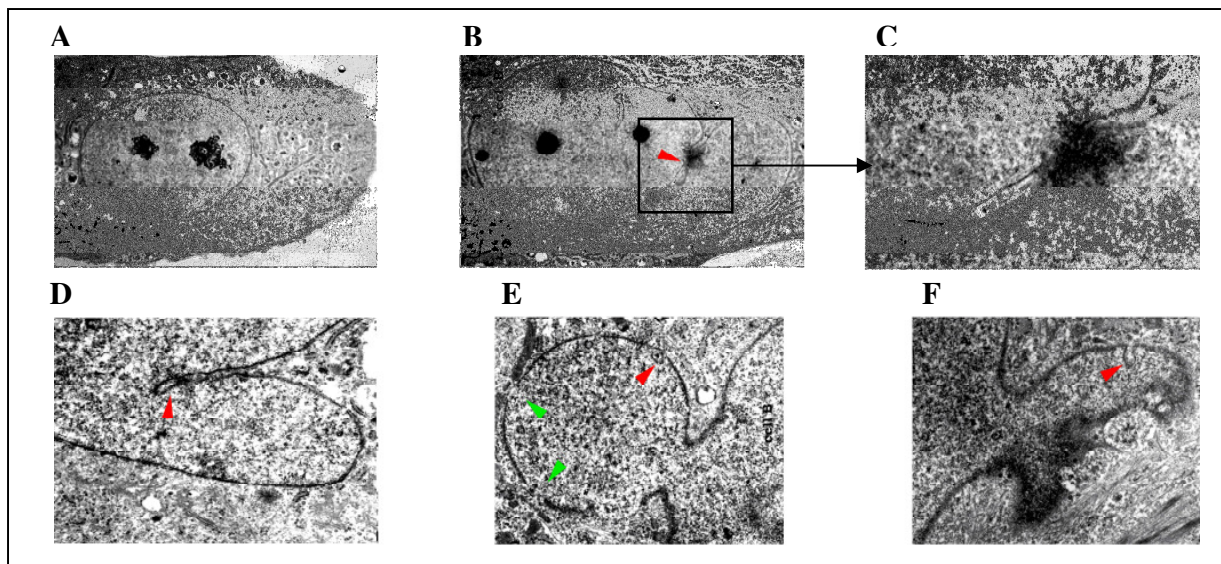


**Abb. 3.27 Zellkerndeformationen in dermalen Fibroblasten.**

Dermale Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten wurden isoliert und mit PFA fixiert. (A) Die DAPI-Färbung an diesen Zellen zeigte kugelförmige Ausbuchtung des Zellkerns (weiße Pfeile). (B) Die graphische Darstellung zeigt die quantitative Analyse von Zellkerndeformationen in Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten im Vergleich zu Wildtyp Fibroblasten. Unter dem Mikroskop wurden 500 Zellen gewählt und davon die Zellen mit Kerndeformationen gezählt. Während bei den Wildtyp Zellen 1,75% deformierte Kerne gefunden wurden, weisen bei den Nesprin-2 (-/-)Fibroblasten 18,75% Kerndeformationen auf. +/+, Wildtyp Fibroblasten; -/-, Nesprin-2 *Knock-out* Fibroblasten. Balken, 10 µm.

**3.5.1.2 Elektronenmikroskopische Analyse**

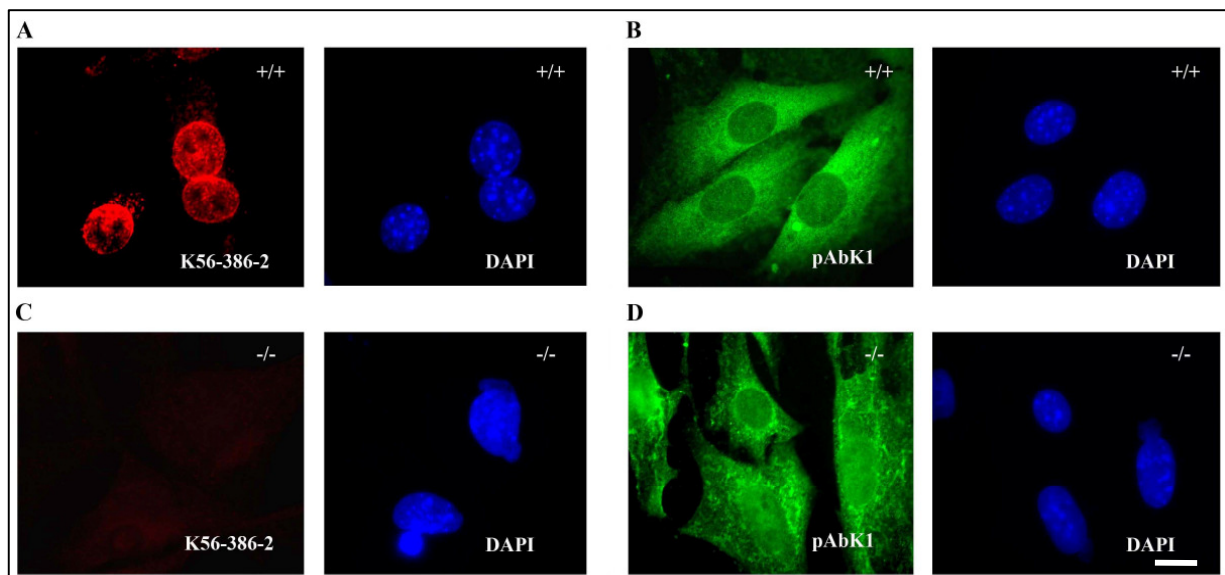
Um einen besseren Einblick in den strukturellen Hintergrund der Kerndeformationen zu erzielen, haben wir die Mutanten mittels Elektronenmikroskopie analysiert (Zusammenarbeit mit Dr. U. Euteneuer, Institut für Zellbiologie, LMU München). In Wildtyp Fibroblasten ist die Form des Kerns rund und regelmässig und die Kernmembran kontinuierlich (Abb. 3.28 A). Bei den Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten dagegen wurde häufig eine Diskontinuität der Kernmembranen in den beobachteten Regionen mit Kerndeformationen (Abb. 3.28) festgestellt (Abb. 3.28, grüne Pfeile). Zusätzlich wurden Kernmembraneinbuchtungen beobachtet (Abb. 3.28, rote Pfeile).

**Abb. 3.28 Elektronenmikroskopische Analyse an Nesprin-2 (-/-)und Wildtyp Fibroblasten**

Nesprin-2 (-/-) und Wildtyp Fibroblasten wurden fixiert und einer elektronenmikroskopischen Analyse unterzogen. Es wurden Kernmembrandeformation bei den *Knock-out* Zellen festgestellt. Diese Deformationen sind eine Art kugelförmige und ovale Fortsetzung der Kernmembran. In diesen Ausbuchtungen wurde eine Diskontinuität der Kernmembran beobachtet (E, grüne Pfeile). Ebenso wurden an diesen Stellen zusätzliche kleine Kernmembraneinbuchtungen, die sich in Richtung Kerninneres befinden (B, E, F, rote Pfeile), beobachtet.

### 3.5.2.3 Immunfluoreszenzanalysen an den Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten

Um festzustellen, ob der Verlust der großen Nesprin-2 Isoform Auswirkungen auf andere zytoplasmatische als auch Kernmembran Komponenten hatte, wurden die *Knock-out* Fibroblasten mit unterschiedlichen Antikörpern gefärbt. Die Zellen wurden fixiert und zuerst mit Nesprin-2 Antikörpern gefärbt. In den Wildtyp Zellen färbt K-56-386-2 die Kernmembran (Abb. 3.29 A), in den *Knock-out* Zellen wurde keine Färbung beobachtet (Abb. 3.29 C). pAbK1 dagegen ergab bei beiden Zellarten das typische Kernmembranfärbungsmuster des Nesprin-2 Proteins (Abb. 3.29 B, D). Dies ist eine zusätzliche Bestätigung, dass die C-terminalen Isoformen von Nesprin-2 in der *Knock-out* Maus exprimiert werden.



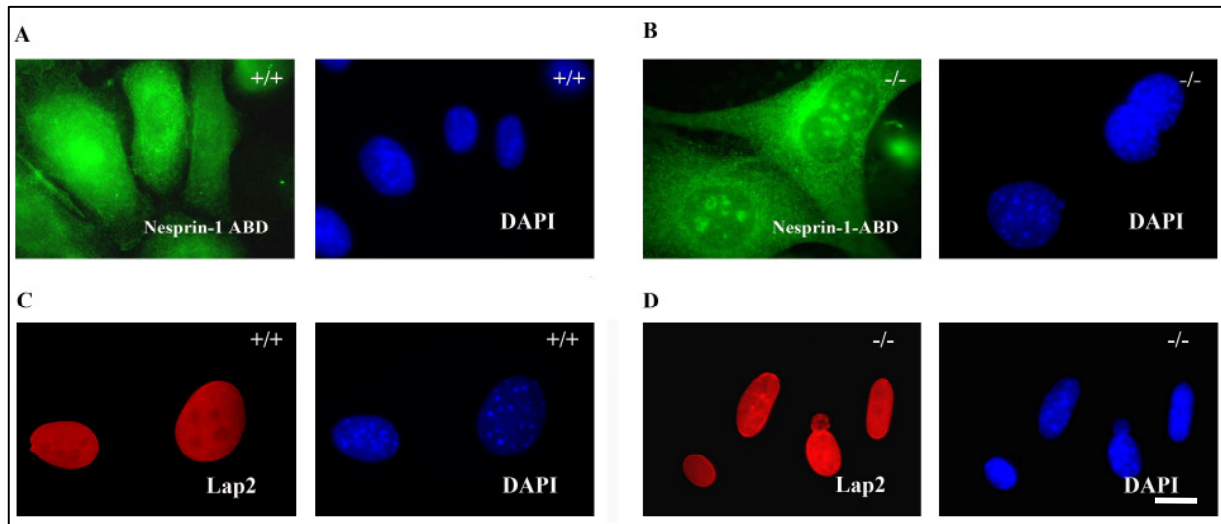
**Abb. 3.29** Vorkommen der N- bzw. C-terminalen Isoformen von Nesprin-2 in Wildtyp und *Knock-out* Fibroblasten.

Zellen wurden auf Deckgläschen gebracht, mit PFA fixiert und mit K56-386-2 bzw. pAbK1 gefärbt. In den Wildtyp Zellen erkannte K-56-386-2 die Kernmembran (A), in den *Knock-out* Zellen wurde keine Färbung beobachtet (C). pAbK1 dagegen färbte bei beiden Zellarten die Kernmembran und das Zytosol (-B, -D). Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit den sekundären Antikörpern  $\alpha$ -Maus-Cy3 bzw.  $\alpha$ -Kaninchen-FITC. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (blau). Balken, 25  $\mu$ m

Da Nesprin-1 und Nesprin-2 homologe Proteine sind und sich in der Struktur und ihrer Primärsequenz sehr ähneln, ist es möglich, dass sie eventuell redundante Funktionen aufweisen. Um zu überprüfen, ob die Nesprin-1 vermehrt exprimiert wird in den Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten, wurden die *Knock-out* Zellen mit einem polyklonalen Nesprin-1 spezifischen Antikörper gefärbt, der gegen die ABD des Proteins gerichtet ist. Es konnte jedoch kein Unterschied festgestellt werden zwischen der Nesprin-1 Verteilung in den *Knock-out* Zellen im



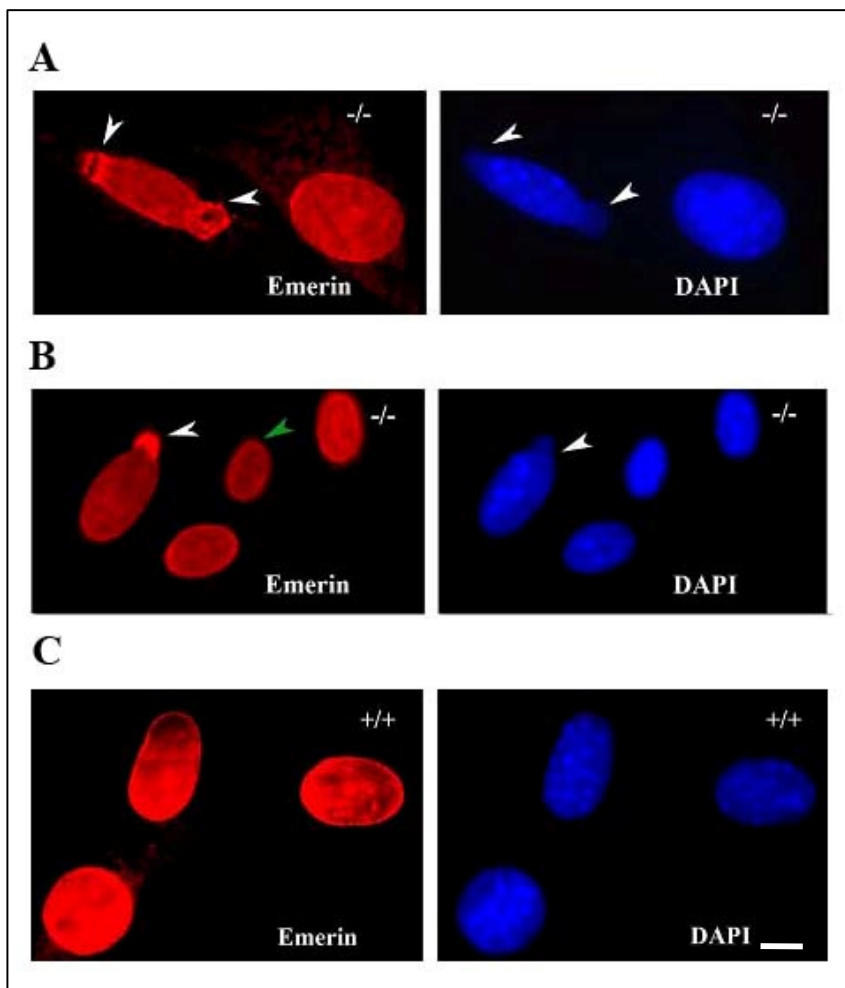
Vergleich zu Wildtyp (Daten nicht gezeigt). LAP2, ein Protein der inneren Kernmembran, zeigt in beiden Zelllinien eine vergleichbare Verteilung und ist im Kern und an der Kernmembran nachweisbar. (Abb. 3.30 C, D).



**Abb. 3.30 Verteilung von Nesprin-1 und LAP2 in Nesprin-2 (-/-) und Wildtyp Fibroblasten.**

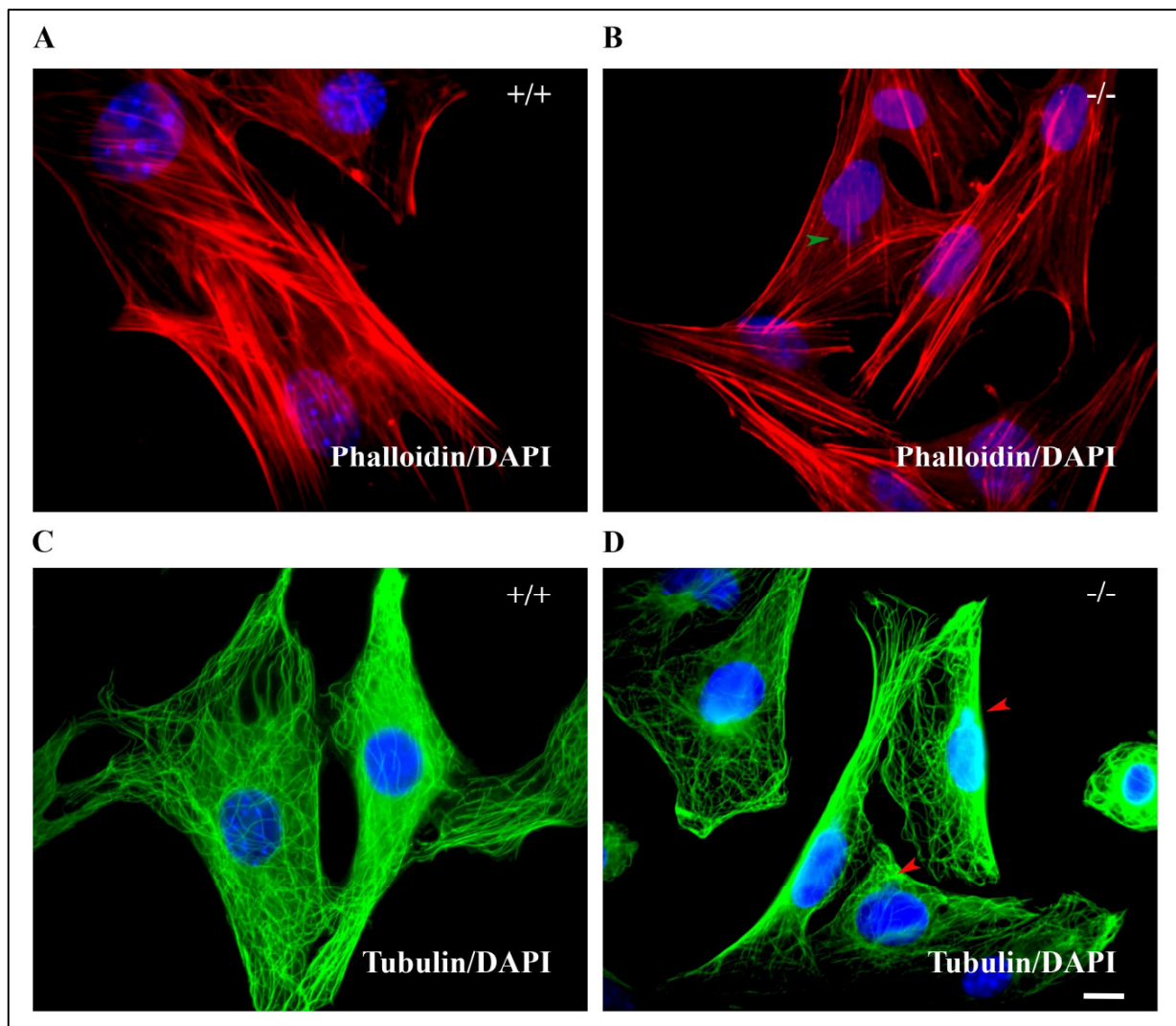
Nesprin-2 (-/-) und Wildtyp Fibroblasten wurden mit polyklonalen Antikörpern, die gegen die ABD von Nesprin-1 erzeugt wurden (Nesprin-1 ABD) (A, B) oder einem LAP2 spezifischen monoklonalen Antikörper (C, D) gefärbt. Die Nesprin-1 Färbung war in beiden Zelllinien vergleichbar. Nesprin-1 war im Zellkern und im Zytoplasma lokalisiert. Die LAP2 Verteilung war ebenfalls vergleichbar. Die primären Antikörpern wurden mit den sekundären Antikörpern  $\alpha$ -Maus-Cy3 bzw.  $\alpha$ -Kaninchen-FITC detektiert. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (blau). -/-, Nesprin-2 (-/-) und +/+, wildtyp Fibroblasten. Balken, 25  $\mu$ m.

Die Expression eines dominant negativen Nesprin-2 Polypeptids (GFP-tm) in COS7 Zellen hat gezeigt, dass der damit verbundene Verlust von Nesprin-2 eine Verdrängung von Emerin verursacht, einer Komponente der inneren Kernmembran (Libotte *et al.*, 2005). Deshalb wurde auch die Emerinverteilung analysiert. In den Wildtyp Zellen ist Emerin an der Kernmembran und im Kerninneren vorhanden (Abb. 3.31, grüne Pfeile), bei den Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten wurde in den Zellen mit deformierten Kernen eine Emerinanreicherung in den Kernausbuchtungen festgestellt (Abb. 3.31, weiße Pfeile). Die Aktin und Tubulinfärbung war in beiden Zelllinien gleich (Abb. 3.32).



**Abb 3.31 Emerinverteilung in den Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten.**

Nesprin-2 (-/-) und Wildtyp Fibroblasten wurden mit PFA fixiert und mit einem Emerin spezifischen monoklonalen Antikörper gefärbt. In Wildtyp Fibroblasten ist Emerin an der Kernmembran und im Kerninneren vorhanden (C), bei den Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten wurde bei den Zellen, die Kerndeformationen aufweisen, eine Anlagerung des Proteins in den Kernausbuchtungen festgestellt (A, B, weiße Pfeile). Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit den sekundären Antikörpern  $\alpha$ -Maus-Cy3. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. Balken, 10  $\mu$ m.



**Abb. 3.32 Verteilung der Aktinfilamente und Mikrotubuli in den Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten.**

Nesprin-2 (-/-) und Wildtyp Fibroblasten wurden mit PFA fixiert und mit TRITC-Phalloidin oder einem monoklonalen anti-Tubulin Antikörper (W3A) gefärbt (sekundärer Antikörper,  $\alpha$ -Maus FITC-Konjugat). Die Verteilung der Filamentsysteme ist vergleichbar. (A) Aktinfärbung, (B) Tubulinfärbung. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. -/-, Nesprin-2 (-/-) und +/+, Wildtyp Fibroblasten. Die Pfeilspitzen weisen auf abnorme Zellkerne. Balken, 25  $\mu$ m.

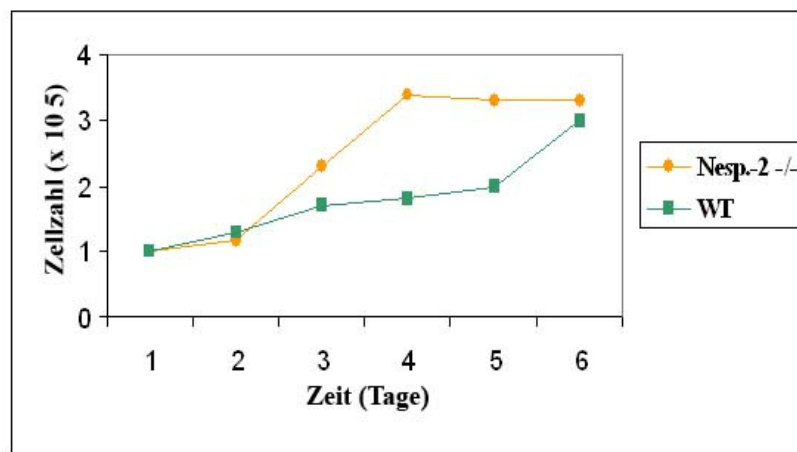
### 3.5.2 Wachstumskurve und Zellzyklusanalyse der Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten

Zellwachstum und Zellzyklus setzen das Zusammenspiel verschiedener zellulärer Vorgänge in Gang. Das Aktin-Zytoskelett ist dabei einer ständigen Reorganisation unterworfen. Die Mutation eines aktinbindenden Proteins oder dessen Ausschaltung könnte daher zu einer Veränderung des Wachstums und einer Störung des Zellzyklusprozesses führen. Zur Überprüfung, ob die beobachteten Kerndeformationen bei den Nesprin-2 -/- Fibroblasten einen Einfluss auf das Zellwachstum und den Zellzyklusverlauf haben, wurde eine Wachstumskurve erstellt bzw. eine

Zellsortierung der unterschiedlichen Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie durchgeführt.

### 3.5.2.1 Wachstumskurve

Knock-out Zellen und Kontrollzellen wurden gezählt und mit einer Ausgangszahl von  $10^5$  auf 6-Loch Kulturschalen verteilt. Sechs Tage lang wurde die Zellzahl bestimmt und die gezählten Werte in einer Kurve dargestellt (Abb. 3.33). Die *Knock-out* Fibroblasten zeigten in den ersten Tagen ein den Kontrollzellen vergleichbares Wachstum, jedoch wurde ab dem dritten Tag eine Zunahme der Wachstumsgewindigkeit beobachtet (Abb. 3.33).

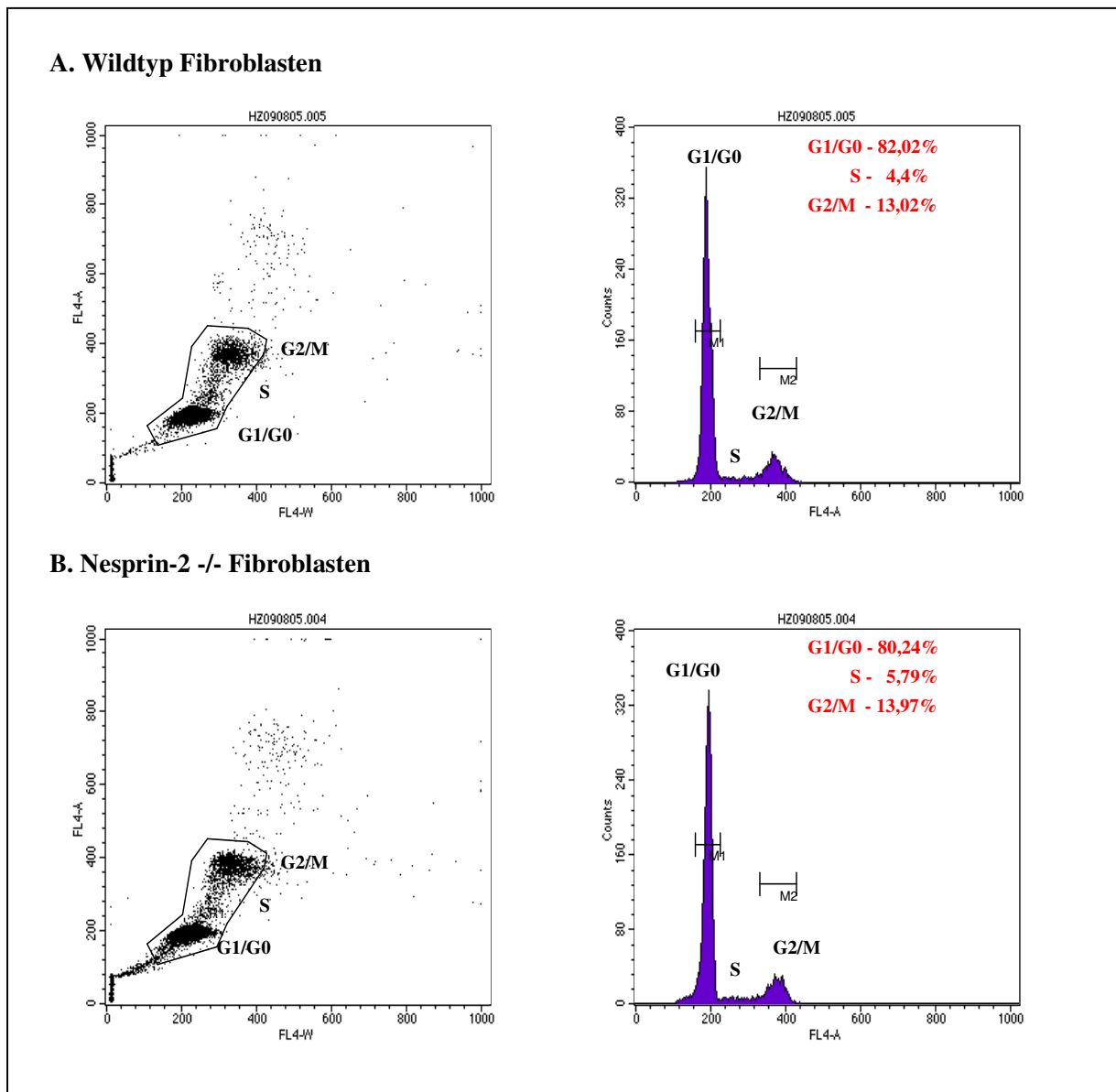


**Abb. 3.33 Wachstumskurve der Nesprin-2 (-/-) und Wildtyp Fibroblasten**  
*Knock-out* Zellen und Kontrollzellen wurden gezählt und mit einer Ausgangszahl von  $10^5$  Zellen auf 6-Lochplatten ausgebracht. Täglich wurde die Zellzahl der Zellen bestimmt. Schließlich wurden die Werte in einer Kurve dargestellt. Die Zellzahl beider Zellarten stiegen bis zum zweiten Tag gleich an, aber danach war das Wachstum der *Knock-out* Zellen schneller als die Wildtyp Zellen. Insgesamt wurde das Experiment dreimal durchgeführt; gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. Nesp-2 -/-, Nesprin-2 *Knock-out* Fibroblasten; WT, Wildtyp.

### 3.5.2.2 Zellzyklusanalyse

Die DNA von Nesprin-2 -/- und Wildtyp Fibroblasten wurde mit DAPI gefärbt. Die DAPI Fluoreszenz ist proportional zur DNA-Menge der Zellen und kann mittels der Durchflusszytometrie durch das FACS-Gerät (*fluorescence-activated cell sorter*) gemessen werden. Die Zellen wurden in drei Phasen sortiert: 1. Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Phase, deren DNA noch nicht repliziert ist. 2. Zellen in der G<sub>2</sub>/M Phase, deren DNA repliziert worden ist und die somit die doppelte Menge an DNA besitzen. 3. Zellen in der S-Phase, die über eine mittlere Menge an DNA verfügen. Das Fluoreszenzintensitätsdiagramm der Zellen zeigt verschiedene

Stufen, anhand derer man zwischen drei Zellpopulationen unterscheiden konnte. Die obere Zellpopulation mit der höheren Fluoreszenz zeigt die Zellen in der G2/M- Phase. Die mittlere Zellpopulation mit der mittleren Fluoreszenzintensität zeigt die Zellen in der S-Phase und die untere Zellpopulation mit der niedrigen Fluoreszenz zeigt die Zellen in der G1/G0 Phase. Im zweiten Diagramm wurde die Zahl der Nesprin-2  $-/-$  bzw. Wildtyp Fibroblasten in jeder Zellzyklusphase in Bezug auf deren Fluoreszenz dargestellt. Bei beiden Zelltypen zeigten die Peaks, dass sich mehr Zellen in der G1/G0 Phase (82,02% bei den Wildtyp (A) und 80,24% bei den Nesprin-2  $-/-$  (B)) befinden als in der G2/M (13,02% bei den Wildtyp und 13,97%), was daraufhin deutet, dass die G1/G0 länger dauert als die G2/M. Die statistische Analyse zeigte jedoch kein Unterschied zwischen Wildtyp und Nesprin-2  $-/-$ .



**Abb. 3.34 Zellzyklusanalyse der Nesprin-2 <sup>-/-</sup> bzw. Wildtyp Fibroblasten mittels Durchflusszytometrie.**

Nesprin-2 <sup>-/-</sup> und Wildtyp Fibroblasten wurden trypsiniert, fixiert und die DNA mit dem fluoreszierenden Farbstoff DAPI gefärbt, wobei die Fluoreszenzintensität proportional zur DNA-Menge ist. Danach wurden die Zellen anhand ihrer Fluoreszenz nach Zellzyklusphasen in einem FACS-Gerät sortiert. Die Abbildung zeigt insgesamt zwei Auswertungsdiagramme der Nesprin-2 <sup>-/-</sup> Fibroblasten im Vergleich zum Wildtyp. Das erste Diagramm zeigt die Fluoreszenzintensität der Zellen (**A, B** links). In dem zweiten Diagramm wurde die Zahl der Zellen in jeder Phase des Zellzyklus (**A, B**, rechts) dargestellt. Das Fluoreszenzintensitätsdiagramm der Zellen zeigt verschiedene Stufen anhand derer man zwischen drei Zellpopulationen unterscheiden konnte. Die obere Zellpopulation mit der höheren Fluoreszenz zeigt die Zellen in der G2/M-Phase. Die mittlere Zellpopulation mit der mittleren Fluoreszenzintensität zeigt die Zellen in der S-Phase und die untere Zellpopulation mit der niedrigen Fluoreszenz zeigt die Zellen in der G1/G0 Phase. Im zweiten Diagramm wurde die Zahl der Nesprin-2 <sup>-/-</sup> bzw. Wildtyp Fibroblasten in jeder Zellzyklusphase in Bezug auf deren Fluoreszenz dargestellt. Für beide Zelltypen zeigte sich, dass sich mehr Zellen in der G1/G0 Phase (82,02% bei den Wildtyp (**A**) und 80,24% bei den Nesprin-2 <sup>-/-</sup> (**B**)) befinden als in der G2/M Phase (13,02% bei den Wildtyp und 13,97%), was daraufhin deutet, dass die G1/G0 Phase länger dauert als die G2/M Phase. Die statistische Analyse zeigte jedoch keinen Unterschied zwischen Wildtyp und Nesprin-2 <sup>-/-</sup> Zellen. *FL-4A/W*, DAPI Fluoreszenz; *counts*, Zellzahl x 1000.

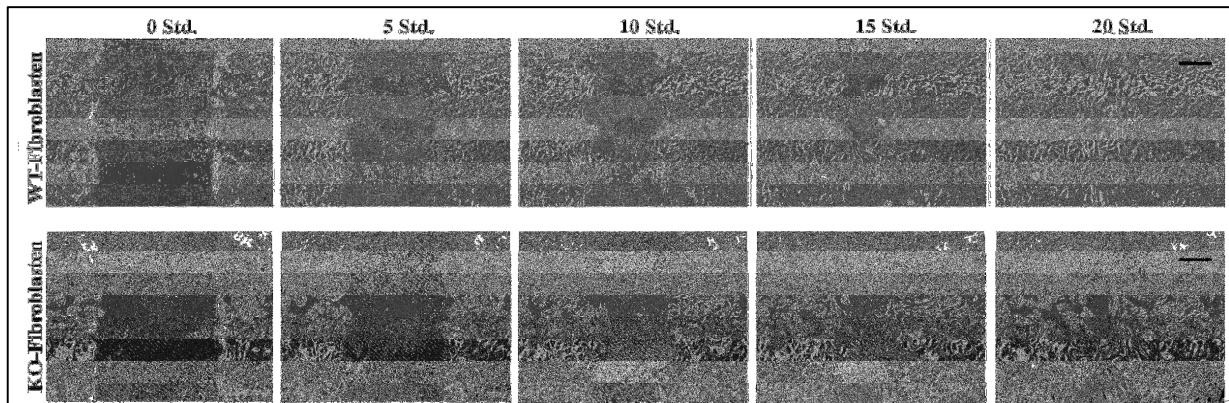
### 3.5.3 Wundheilungsexperiment

#### 3.5.3.1 Mikroskopische Analyse an lebenden Zellen

Nach der Identifizierung der Kerndeformationen in den *Knock-out* Fibroblasten und dem Befund, dass diese Deformationen keinerlei Einfluss auf das Zellwachstum und die Zellteilung dieser Zellen haben, sollte geprüft werden, ob diese Deformationen einen Einfluss auf die Beweglichkeit der Zellen haben. Dazu wurde ein Wundheilungsexperiment durchgeführt. Im Wundheilungsexperiment wird die Situation am Wundrand einer Verletzung simuliert. Um eine Wunde wieder zu verschließen, proliferieren die Zellen am Wundrand und wandern von dort in die Wunde ein. In der Kulturschale wird diese Situation durch einen „Schnitt“ in einer konfluenten Zellschicht simuliert. Die hier verwendeten Fibroblasten migrieren von den „Wundrändern“ in das Zentrum des „Schnitts“.

Dermale Fibroblasten der Nesprin-2-ABD *Knock-out* und Wildtyp Mäuse wurden bis zum Erreichen der Konfluenz auf Deckgläschen in 24-Lochplatten kultiviert. Mit einer gelben Pipettenspitze wurde ein Schnitt in die Zellschicht gemacht. Anschließend wurden die Zellen sofort gewaschen und mit frischem vorgewärmtem Medium versorgt. Die Zellen wurden danach in eine 37°C warme Kammer am Mikroskop gestellt. Die Wunde wurde 24 Stunden lang alle 10 Minuten fotografiert. Abb. 3.35 zeigt Fotos 5, 10, 15 und 20 Stunden nach der Schaffung der Wunde. Während bei den Nesprin-2 (<sup>-/-</sup>) Fibroblasten eine deutliche Verzögerung des Heilungsprozesses beobachtet wurde (Abb. 3.35, 20 Std unten), war bei den Wildtyp Zellen die Wunde nach 20 Stunden komplett zugewachsen (Abb. 3.35, 20 Std oben).



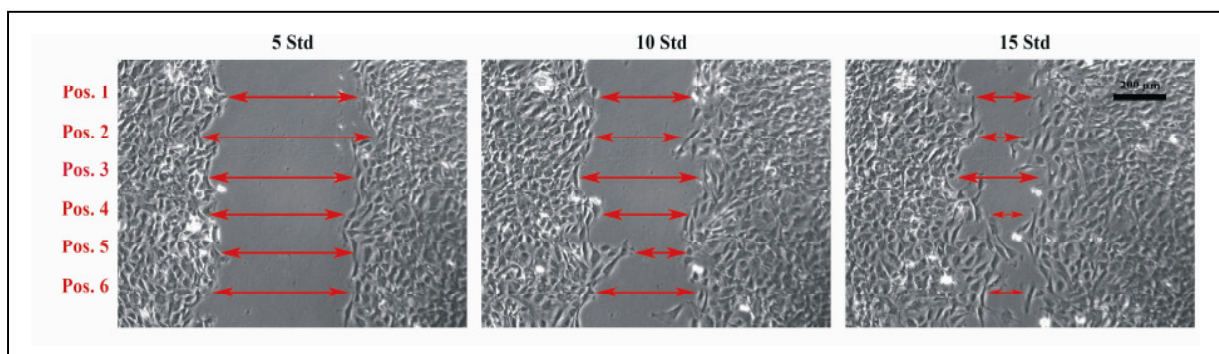


**Abb. 3.35 Verlauf der Wundheilung bei Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten.**

Dermale Fibroblasten von Nesprin-2-ABD *Knock-out* und Wildtyp Mäusen wurden bis zum Erreichen der Konfluenz auf Deckgläschen in 24-Lochplatten kultiviert. Mit einer gelben Spitze wurde ein Schnitt in die Zellschicht vorgenommen. Die Zellen wurden danach in die 37°C Kammer am Mikroskop (Leica) gestellt und über 20 Stunden beobachtet und ihre Bewegung dokumentiert. Dargestellt sind Aufnahmen vom Zeitpunkt 0, 5, 10, 15 und 20 Stunden. Während die Wunde bei den Wildtyp Fibroblasten schon nach 20 Stunden geschlossen war, war bei den *Knock-out* Fibroblasten der Wundschluss noch nicht vollständig. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. Insgesamt wurde es dreimal durchgeführt. Std, Stunden; WT, Wildtyp; KO, Nesprin-2 *Knock-out*; Schwarzer Balken, 200 µm.

### 3.5.3.2 Statistische Auswertung des Wundheilungsexperiments

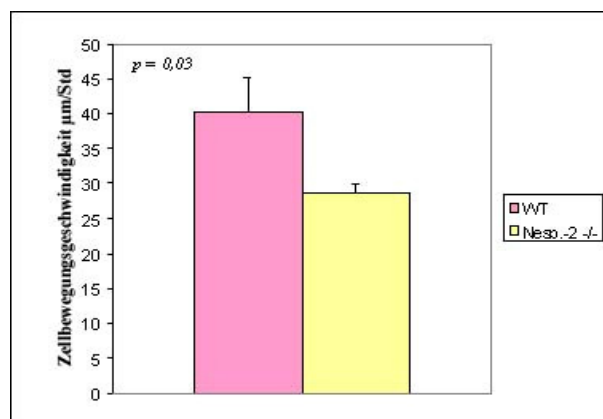
Nach der beobachteten Verzögerung des Heilungsprozesses der Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten erfolgte eine statistische Analyse, um festzustellen, ob diese Verzögerung statistisch signifikant ist. Dafür wurden Bilder zum Zeitpunkt 5, 10 und 15 Stunden nach dem Zufügen der Wunde verwendet. Ziel war es, die Bewegungsgeschwindigkeit der Zellen zu messen, mit der sie in die Wunde migrieren. Dies wurde durch die Messung der Wundgröße in Abständen von fünf Stunden erreicht. Dafür wurde das aufgenommene Bild fünf Stunden nach Zufügen der Wunde an sechs unterschiedlichen, zufällig festgelegten Positionen gemessen. Nach fünf und zehn Stunden wurde sie in den selben Positionen erneut gemessen. So konnte bei jeder Position festgestellt werden, um wieviele µm pro Stunde sich die Zellen bewegten. (Tabelle 3.1, Abb. 3.36)



**Abb. 3.36 Auswertungsbeispiel des Wundheilungsexperiments.**

Dargestellt ist ein Auswertungsbeispiel des Wundheilungsexperiments. Drei Fotos einer Probe, die 5, 10 und 15 Stunden nach Zufügen der Wunde aufgenommen wurden, wurden ausgewählt. Die Wunde wurde auf dem aufgenommenen Bild in sechs unterschiedlichen, zufällig festgelegten Positionen gemessen. Nach fünf und zehn Stunden wurde die Wunde in den selben Positionen erneut gemessen. So konnte bei jeder Position festgestellt werden, um wieviel  $\mu\text{m}$  pro Stunde sich die Zellen bewegten, um die Wunde zu schließen. Std, Stunden; Pos., Position; Balken, 200  $\mu\text{m}$

Das Experiment wurde für Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten und für die Kontrollzellen dreimal durchgeführt. Die gemessenen Werte wurden in der Tabelle 3.1 eingetragen. Zuerst wurden die Wunden in  $\text{cm}/\text{Std}$  gemessen, dann in  $\mu\text{m}/\text{Std}$  umgerechnet (7 cm entsprach 200  $\mu\text{m}$ ). Schließlich wurde ein Mittelwert je Zellart von den drei Proben errechnet. Wildtyp Zellen haben sich 40  $\mu\text{m}/\text{Std}$  mit einer Standardabweichung von 4,9  $\mu\text{m}/\text{Std}$  bewegt, um die Wunde zu schließen. Die Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten bewegten sich 29  $\mu\text{m}/\text{Std}$  mit einer Standardabweichung von 1,2  $\mu\text{m}/\text{Std}$  (Abb. 3.29). Dies bestätigt die oben beobachtete Verzögerung der Wundschließung bei den Mutanten Fibroblasten (Abb. 3.28). Die in der Tabelle 3.1 präsentierten Werte wurden zunächst in einer graphischen Darstellung zusammengefasst (Abb. 3.29). Die statistische Signifikanz des beobachteten Phänotyps wurde bei der Berechnung des  $p$ -Wertes der gemessenen Zellgeschwindigkeiten beider Zellarten deutlich gemacht. Für die  $p$ -Wert Berechnung wurden die Mittelwerte der Zellgeschwindigkeit verwendet. Der errechnete  $p$ -Wert beträgt 0,03. Dies zeigt eine hohe statistische Signifikanz der errechneten Zellbewegungsgeschwindigkeit zur Schließung der Wunde an.

**Abb. 3.37 Signifikanz der errechneten Bewegungsgeschwindigkeiten der Nesprin-2 -/- und Wildtyp Fibroblasten bei der Wundheilung.**

Diese graphische Darstellung fasst die Werte aus Tabelle 3.1 zusammen. Wildtyp Zellen haben sich mit 40  $\mu\text{m}/\text{Std}$  mit einer Standardabweichung von 4,9  $\mu\text{m}/\text{Std}$  bewegt, um die Wunde zu schließen. Die Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten bewegten sich mit 29  $\mu\text{m}/\text{Std}$  mit einer Standardabweichung



von 1,2  $\mu\text{m}/\text{Std}$ . Die Signifikanz des beobachteten Phänotyps wurde bei der Berechnung des  $p$ -Wertes mittels eines  $t$ -Tests für verbundene Stichproben der gemessenen Zellgeschwindigkeiten beider Zellarten deutlich gemacht. Für die  $p$ -Wert Berechnung wurden die Mittelwerte der Zellgeschwindigkeit verwendet. Das ausgewählte Alpha beträgt 0,05. Der errechnete  $p$ -Wert beträgt 0,03 ( $< \text{Alpha}=0,05$ ). Dies zeigt eine hohe statistische Signifikanz der errechneten Zellbewegungsgeschwindigkeit zur Schließung der Wunde.

	-/- Fibroblasten-2			-/- Fibroblasten-3			-/- Fibroblasten-4		
	5h	10h	15h	5h	10h	15h	5h	10h	15h
Wundengröße (mm) pos. 1	15	7	5	17,5	15,1	12,5	20,4	15	12
Wundengröße (mm) pos. 2	14	9	6,5	17,5	14	8	20	16,8	14
Wundengröße (mm) pos. 3	15	9	6,5	20,5	15	8,7	22	16,3	8
Wundengröße (mm) pos. 4	12,2	7	0	17	12	8	18,2	13,5	7,5
Wundengröße (mm) pos. 5	14	7	0	18,5	14	8	21	19	12,5
Wundengröße (mm) pos. 6	10,5	6	0	20,5	13	8,7	20,8	13	8
Mittelwert (mm)	13,5	7,5	3	18,58	13,85	8,98	20,4	15,6	10,3
Mittelwert ( $\mu\text{m}$ ) (7mm=200 $\mu\text{m}$ )	384	214,3	86	531	396	257	582,9	446	295,2
Zellgeschwindigkeit ( $\mu\text{m}/5 \text{ Std}$ )		170	129		135,2	139		137,14	150,5
Zellgeschwindigkeit ( $\mu\text{m}/\text{Std}$ )		34	25,7		27,05	27,81		27,43	30,1
Zellgeschwindigkeit ( $\mu\text{m}/\text{Std}$ ) Mittelwert	<b>30</b>			<b>27</b>			<b>29</b>		
<b>Wundengröße (<math>\mu\text{m}/\text{Std}</math>)</b>	<b>29</b>								
	+/- Fibroblasten-1			+/- Fibroblasten-2			+/- Fibroblasten-3		
	5h	10h	15h	5h	10h	15h	5h	10h	15h
Wundengröße (mm) pos. 1	21	12,5	3,5	17,5	10,5	4,5	17,5	8,5	3
Wundengröße (mm) pos. 2	18,8	10	3	17	11	6,3	14,5	9	3
Wundengröße (mm) pos. 3	16,5	7	0	17	10	6	17,3	12,8	5
Wundengröße (mm) pos. 4	16,5	9	3	18	11,8	3	17,8	10	6
Wundengröße (mm) pos. 5	17	7,3	0	17	11	5	15,4	11	0
Wundengröße (mm) pos. 6	16	9	0	19	10,5	3,5	16,5	10	2
Mittelwert (mm)	17,6	9,13	1,58	17,6	10,8	4,7	16,5	10,2	3,17
Mittelwert ( $\mu\text{m}$ ) (7mm=200 $\mu\text{m}$ )	504	261,0	45	502	309	135	471	292	90
Zellgeschwindigkeit ( $\mu\text{m}/5 \text{ Std}$ )		242,9	216		193,8	173,8		180	201
Zellgeschwindigkeit ( $\mu\text{m}/\text{Std}$ )		48,57	43,1		38,76	34,8		35,90	40,29
Zellgeschwindigkeit ( $\mu\text{m}/\text{Std}$ ) Mittelwert	<b>46</b>			<b>37</b>			<b>38</b>		
<b>Wundengröße (<math>\mu\text{m}/\text{Std}</math>)</b>	<b>40</b>								

Tabelle 3.1 Auswertung des Wundheilungsexperiments

## 4. Diskussion

### 4.1 Nesprin-2 Isoformen haben unterschiedliche Gewebeverteilungen

Die größte Isoform von Nesprin-2 (Nesprin-2 giant) hat ein Molekulargewicht von 800 kDa und besteht aus 6883 Aminosäuren. Nesprin-2 giant ist ein Transmembranprotein vom Typ II und besitzt mindestens drei unterschiedliche Domänen. Im N-terminalen Teil des Proteins enthält es eine Aktinbindungsdomäne (ABD), die aus zwei Calponin-homologen Domänen (CH) zusammengesetzt ist, im Anschluss an die ABD befindet sich ein langer  $\alpha$ -helikaler Abschnitt, der vier nukleäre Lokalisationssignale sowie zwei Leucin-Zipper und 22 Spektrin-Domänen enthält. Der C-terminale Teil des Proteins besteht aus einer einzelnen Transmembrandomäne. Eine N-terminale kurze Isoform (ABD-S) sowie C-terminale kurze Isoformen (Nesprin-2 $\alpha$ , 2 $\beta$  und 2 $\gamma$ ) sind bisher identifiziert worden.

Um eine detaillierte Untersuchung des Nesprin-2 Expressionsprofils durchführen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich zu den bereits existierenden monoklonalen Antikörpern, zwei neu Antikörper hergestellt. Der polyklonale Antikörper pAbK1 ist gegen die letzten zwei Spektrin-Domänen gerichtet, der monoklonale Antikörper K56-386-2 wurde gegen die zweite CH-Domäne und die darauffolgenden 200 Aminosäuren gerichtet. Der Einsatz dieser Antikörper hat gezeigt, dass das Nesprin-2 Gen sehr komplex ist, und mit unterschiedlichen Isoformen in den meisten Geweben vertreten ist. Immunhistochemische Analysen mit K56-386-2 an Nesprin-2 *Knock-out* Geweben lassen vermuten, dass in der Niere nur die grosse Nesprin-2 Isoform vorhanden ist. Westernblotanalyse mit den N- und C-Terminus-spezifischen Nesprin-2 Antikörpern an COS7 Zellen, einer Nieren Zelllinie, bestätigten diese Ergebnisse (Zhen *et al.*, 2001). Zusätzlich wurden Westernblotanalysen an muriner Haut, Niere, Leber, Herz, Lunge, Milz und Skelettmuskel durchgeführt. Diese Gewebe exprimieren unterschiedliche kurze C-terminale Isoformen. Vergleichbare Daten wurden von Zhang *et al.* (2005) veröffentlicht. In der Haut wurde eine sehr starke Expression von N- und von C-terminalen Nesprin-2 Isoformen in allen Epidermisschichten beobachtet. Auch wurde in diesem Organ für Nesprin-1 und Nesprin-2 eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisierung festgestellt. Während Nesprin-1 an der Zellperipherie zu finden ist, weist Nesprin-2 eine deutliche Kernmembran Lokalisierung auf.

Unsere Daten und die Resultate aus anderen Arbeitsgruppen sind ein Hinweis dafür, dass das Nesprin-2 Gen sehr komplex ist und für viel mehr Isoformen kodiert als bis jetzt angenommen wurde.

#### **4.2 Die Lokalisation von Nesprin-2 am Kern ist Lamin A/C abhängig**

Libotte *et al.* (2005) zeigten, dass der C-Terminus von Nesprin-2 *in vitro* und *in vivo* an Lamin A/C und Emerin bindet. Diese Daten stimmen mit weiteren *in vitro* Experimenten überein in denen gezeigt wurde, dass Nesprin-1 ebenfalls mit Emerin und Lamin A interagiert (Mislow *et al.*, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch Untersuchungen an Lamin A/C *Knock-out* (KO) Fibroblasten festgestellt, dass die Nesprin-2 Lokalisierung in der Kernmembran Lamin A/C abhängig ist. Durch immunzytochemische Analysen wurde eine Nesprin-2 Umverteilung ins Zytoplasma in diesen Zellen festgestellt. Die Richtigkeit unserer Ergebnisse wurde durch Überexpression des HA-Lamin A Fusionsproteins in diesen Zellen bestätigt. Durch die Expression von Lamin A wurde ähnlich wie im Wildtyp Nesprin-2 wieder am Kern der transfizierten Mutanten lokalisiert (Abb. 3.9). Diese Ergebnisse unterstützen die Daten von Libotte *et al.* (2005) in denen eine Nesprin-2 Abhängigkeit von Lamin A/C gezeigt wurde. Die Expression des auf Lamin A/C dominant negativ wirkenden Proteins *Xenopus* GFP-LaminB1 $\Delta$ 2 in COS7 Zellen führte zu einer Umverteilung von Lamin A. In den transfizierten Zellen lag Lamin A in kleinen intranukleären Aggregate vor und in diesen fand sich ebenfalls Nesprin-2.

Um diese Nesprin-2 Abhängigkeit von Lamin A/C einer der beiden Lamin Isoformen zuzuordnen, wurde die Verteilung von Nesprin-2 in der Haut untersucht. In der Haut sind Lamin Proteine unterschiedlich exprimiert. Während Lamin C in allen Schichten der Haut einschliesslich der basalen Schicht vorkommt, ist Lamin A nur in den dermalen Fibroblasten und in der oberen Schicht der Epidermis vorhanden (Venables *et al.*, 2001). Nesprin-2 ist dagegen in allen Schichten der Haut nachweisbar und die Abwesenheit von Lamin A in der basalen Schicht hat keinen Einfluss auf die Nesprin-2 Expression (Abb. 3.10). Wir schliessen daraus, dass Lamin C ausreichend ist für eine normale Nesprin-2 Lokalisierung an der Kernmembran. Ähnliche Ergebnisse wurden von (Zhang *et al.*, 2005) für SW13 Zellen gezeigt, denen Lamin A fehlt. Für Nesprin-1 wurde ebenfalls eine Lamin A/C Lokalisierungsabhängigkeit festgestellt. In humanen Fibroblasten mit der homozygoten missense Lamin A/C Mutation Y259X wurde eine

Umverteilung von Nesprin1 $\alpha$  und Emerin beobachtet. Die Überexpression von Lamin C in diesen Zellen war ausreichend, um eine normale Verankerung beider Proteine in der Kernmembran zu erhalten (Muchir *et al.*, 2003). Die Abhängigkeitsbeziehung von Lamin A/C und den Nesprinen scheint in der Evolution konserviert zu sein und wurde ebenso in *C. elegans* beschrieben. Für die ANC1 und UNC84 Lokalisierung an der Kernmembran ist die Anwesenheit von Lamin A notwendig (Lee *et al.*, 2002). ANC1 ist der Nesprin-2 Ortholog in *C. elegans*. UNC84 ist eine Komponente der inneren Kernmembran. Für *C. elegans* wurde ein Brückenmodell vorgeschlagen, bei dem ANC1, das Protein der äußeren Kernmembran, durch eine strukturelle Brücke, die aus UNC84 und anderen assoziierten Proteinen besteht, mit der Kernlamina interagiert (Lee *et al.*, 2002).

Die Daten von Libotte *et al.* (2005) lassen die Vermutung zu, dass Lamin A/C Mutationen die Lokalisierung und die Funktion von Nesprin-2 negativ beeinflussen. Zwischen den Aminosäuren 243-566 von Lamin A/C, dem Interaktionsbereich mit Nesprin-2, liegen 34 bekannte potentielle Mutationen, die zu Laminopathien führen (Burke and Stewart, 2002; Hutchison, 2002; Novelli *et al.*, 2002; Worman and Courvalin, 2004). Laminopathien sind Krankheiten, die Störungen in unterschiedlichen Geweben hervorrufen wie z.B. im Skelettmuskel. Interessanterweise sind die Nesprin-1 und Nesprin-2 Isoformen im Skelettmuskel stark exprimiert. Genetische Daten von *D. melanogaster* zeigten, dass das Nesprin Ortholog MSP 300 eine sehr wichtige Rolle bei der embryonalen Muskelmorphogenese spielt (Rosenberg-Hason *et al.*, 1996).

Mutationen in Lamin A/C können demzufolge die Bindung an Nesprine schwächen, was den Funktionsverlust dieser Proteine zur Folge haben könnte. Jedoch sind weitere Experimente nötig, um die Beteiligung der Nesprine in Laminopathien zu bestätigen. Durch eine Analyse der Nesprin-2 Lokalisation in den entsprechenden Mutanten kann möglicherweise auch die Bindestelle des Nesprin-2 an Lamin A/C weitreingeengt werden.

### **4.3 Subzelluläre Lokalisierung und mögliche Funktionen von Nesprin-2 Isoformen**

KASH Proteine können den Kern mit den drei verschiedenen zytoplasmatischen Netzwerken, dem Aktinzytoskelett, mit dem Zentrosom und mit dem Golgiapparat verbinden: Diese Verbindung lässt vermuten, dass die KASH Proteine an der äußeren Kernmembran lokalisiert

sind (Lee *et al.*, 2002). Die Interaktion von Nesprin mit den inneren Kernmembranproteinen Lamin A/C und Emerin war ein Hinweis darauf, dass diese Proteine ebenfalls in der inneren Kernmembran lokalisiert sind (Mislow *et al.*, 2002; Libotte *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). Der Nachweis hierfür erfolgte durch immunelektronenmikroskopische Untersuchungen mit den verschiedenen Antikörpern, die die Lokalisation des Proteins an der inneren und äusseren Kernmembran und im Zellkern bestätigten.

Unklar ist, wie riesige Proteine wie Nesprin-2 in den Zellkern gelangen, da normalerweise Proteine, die größer sind als 60 kDa, die Kernporen nicht passieren können (Soullam and Worman, 1995; Pante and Kann, 2002). Eine Möglichkeit ist, dass dies während der Mitose passiert, da sich zu diesem Zeitpunkt bei vielen eukaryontischen Zellen der Zellkern auflöst.

Bei Zhang *et al.* (2005) wurden ähnliche Ergebnisse durch elektronenmikroskopische und immunhistochemische Analysen an Myoblasten und Myotuben erzielt. Zusätzlich wurde gezeigt, dass bestimmte Nesprin-2 Isoformen in den Mitochondrien, im endoplasmatischen Reticulum (ER), in der Plasmamembran und im sarkoplasmatischen Retikulum (SR) vorhanden sind. Diese Daten sind ein weiterer Hinweis dafür, dass das Nesprin-2 Gen sehr komplex ist. Ausserdem wird vermutet, dass das Gen für viel mehr Isoformen kodiert als bisher angenommen. Aktuelle Daten über das verwandte Klarsicht Protein in *D. melanogaster*, das mit den Nesprinen die C-terminale KASH-Domäne gemeinsam hat, haben gezeigt, dass das Klarsicht Gen für mindestens drei Isoformen kodiert, die unterschiedliche Lokalisationen und Funktionen aufweisen (Guo *et al.*, 2005). Die Klarsicht  $\alpha$ -Isoform, die durch die KASH Domäne an der Kernmembran lokalisiert ist, spielt eine Rolle bei der Kernmigration in den Photorezeptoren im Auge. Die  $\beta$ -Isoform wird durch die LD-Domäne an Lipidtröpfchen (Lipidbläschen) verankert und koordiniert so den Lipidtransport in *D. melanogaster*.

Ähnlich wie das Klarsicht Protein könnten die Nesprin-2 Isoformen je nach Lokalisierungsort verschiedene Funktionen ausüben. Die Isoformen, die in der Kernmembran und im Kern lokalisiert sind, können eventuell bei der Organisation und bei der Stabilitätserhaltung des Kerns durch dessen Verankerung an das Aktinzytoskelett eine wichtige Rolle spielen. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit bei der Analyse der Nesprin-2 *Knock-out* Fibroblasten, bei denen die grosse Nesprin-2 Isoform fehlt, festgestellt. In diesen Zellen wurden Kernmembrandeformationen

bzw. diskontinuitäten beobachtet, was auf einer verringerte Stabilität der Kernmembran hindeutet.

Manche Spektrinproteine interagieren spezifisch mit Organellen im Zellinneren und vernetzen sie mit dem Zytoskelett (Winder *et al.*, 1995; De Matteis and Morrow, 2000). Die Nesprin-2 Isoformen, die an den Mitochondrien und am ER verteilt sind, könnten durch ähnliche Mechanismen diese beiden Organellen mit dem Aktinzytoskelett vernetzen. Unsere Analysen zeigten, dass sich auch im Kerninneren sowohl ABD- als auch C-terminale Nesprin-2 Isoformen befinden. Die ABD-Isoformen könnten nukleäres Aktin binden, für das mittlerweile bewiesen ist, dass es eine Rolle bei der Chromatin-Organisation, der Transkription und dem RNA-Transport spielt (Rando *et al.*, 2000; Pederson and Aebi, 2002; Echevarria *et al.*, 2003; Shumaker *et al.*, 2003).

Die starke Expression von Nesprin-2 im SR lässt vermuten, dass Isoformen des Proteins Organellen wie das SR und die Mitochondrien mit dem Kern oder den Sarkomeren verbinden könnten. Andere Isoformen könnten diese Organellen mit dem Aktinzytoskelett oder der Plasmamembran vernetzen. Ausserdem könnte Nesprin-2 eine strukturelle Rolle bei Muskeldifferenzierung spielen (Zhang *et al.*, 2005).

#### **4.4 Analyse der Nesprin-2 *Knock-out* Mäuse**

Zur Funktionsuntersuchung von Nesprin-2 wurde eine Nesprin-2 ABD defiziente Mauslinie 1999 in der Arbeitsgruppe Walz in Freiburg generiert, die Nesprin-2 als Interaktionspartner von Polycystin, einem Kationenkanal. Durch die Rekombination des *Knock-out*-Vektors, bei dem die Exons zwei, drei und vier durch eine Neomycin-Resistenz-Kassette ersetzt worden sind, sollte das Gen vollständig inaktiviert werden. Die *Knock-out* Strategie wurde so gewählt, dass selbst durch alternatives Spleißen zwischen dem Exon eins und Exon fünf das Leseraster nicht wieder hergestellt werden kann. Nesprin-2 defizienten Mäuse (Nesprin-2 *(-/-)*) sind lebensfähig, fertil und zeigen keine erkennbaren Abnormalitäten gegenüber Wildtyp-Tieren. Adulte Nesprin-2 *(-/-)* Mäuse zeigen gegenüber ihren gleichgeschlechtlichen Geschwistertieren keine Unterschiede in Körpergröße und Form. Die *Knock-outs* haben verglichen mit den Kontrolltieren eine ähnliche Sinneswahrnehmung und zeigen keine motorischen Auffälligkeiten. Die ersten Analysen an diesen Mäusen wurden an Haut, Niere und Gehirn durchgeführt. Durch Verwendung von

Antikörpern, die gegen den N- und C-Terminus von Nesprin-2 gerichtet sind, wurde festgestellt, dass die C-terminalen Isoformen des Proteins noch exprimiert werden. Diese Resultate wurden in Westernblotanalysen an Homogeaten von Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten bestätigt. Dies bedeutet, dass das Nesprin-2 Gen nur partiell inaktiviert wurde, so dass nur die die ABD-enthaltenden Isoformen einschließlich der großen Isoform deletiert worden sind. Während in Haut und Niere keine Färbung mit K56-386-2 zu sehen war, konnte in manchen Gehirnregionen wie dem Hippocampus eine normale Verteilung von Nesprin-2 beobachtet werden.

K56-386-2 wurde gegen ein Protein generiert, das die CH2 Domäne der Nesprin-2 ABD und die darauffolgenden 200 Aminosäuren enthält. Die positiven Signale im Hippocampus könnten durch die Expression von Isoformen erklärt werden, die Aminosäuresequenzen enthalten, die sich an die ABD anschließen. Eine ausführliche Analyse des Nesprin-2 Gens deutet daraufhin, dass durch alternatives Spleißen Exon eins und Exon acht kombinieren können. Dadurch könnten Isoformen generiert werden, die einen Teil des Bereichs umfassen, der im für die Immunisierung verwendeten Protein vorhanden war.

Mikroskopische Analysen an dermalen Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten haben gezeigt, dass die Kerne dieser Zellen Deformationen aufweisen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten kugelförmige Ein- und Ausbuchtungen der Kernmembran. Zusätzlich wurden Diskontinuitäten der Kernmembran in diesen Ein- und Ausbuchtungen festgestellt. Dies deutet auf eine Instabilität der Kernmembran in diesen Zellen hin und bestätigt die Bedeutung von Nesprin-2 in der Aufrechterhaltung der Kernarchitektur und bei der Kernmembranstabilität. Nesprin-1 dagegen scheint diese Rolle nicht zu besitzen. Dies wurde bei der Analyse von transgenen Mäusen festgestellt (Apel *et al.*, 2000). In den Muskelzellen dieser Mäuse ist Nesprin-1 (Syne 1) durch die Überexpression eines dominant negativ wirkenden Proteins nicht vorhanden. In den Muskelzellen dieser Mäuse wurden keine Kerndeformationen beobachtet.

Weitere Komponenten der Kernmembran sind in den Nesprin-2 (-/-) nicht beeinflusst durch den Verlust des Proteins und weisen einer normale Verteilung auf. Bemerkenswert ist dies für Emerin. Emerin ist ein Protein der inneren Kernmembran und ist in der Lage mit sich selbst und mit anderen Kernproteinen wie Lamin A/C Interaktionen einzugehen (Bengtsson and Wilson, 2004). Libotte *et al.* (2005) zeigten, dass Nesprin-2 Emerin an der Kernmembran stabilisiert durch eine Interaktion der letzten zwei Spektrin-Domänen von Nesprin-2 mit Emerin. Die

Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten weisen eine normale Emerin Verteilung auf. Dies deutet daraufhin, dass das Fehlen der grossen Nesprin-2 Isoform keine Einwirkung auf die Emerinverteilung hat und dass die Stabilität dieses Proteins an der Kernmembran durch die C-terminalen Isoformen, die die Emerinbindungsdomänen enthalten, gewährleistet wird.

Überraschenderweise haben die Kerndeformationen in den *Knock-out* Fibroblasten keinen Einfluss auf das Zellwachstum und die Zellteilung. Dagegen lässt die reduzierte Zellmigration in Wundheilungsexperimenten auf eine Rolle von Nesprin-2 bei der Zellbewegung schliessen.

*C. elegans* und *D. melanogaster* lassen als einzige einen Einblick in die Funktion der Nesprine zu. Eine Inaktivierung des ANC1 Gen in *C. elegans* zerstört die regelmäßigen Abstände der Kerne in den mehrkernigen Zellen (Hedgecock and Thomson, 1982). Eine Mißlokalisierung von Mitochondrien wurde ebenfalls in den Zellen mit ANC1 Mutationen beobachtet (Lee *et al.*, 2002). Diese ANC1 Kernverankerungsdefekte haben aber keine drastischen Effekte auf die *C. elegans* Tiere. Dagegen sind Mutationen im *Drosophila melanogaster* MSP-300 Protein letal. Die Embryonen sterben aufgrund von Defekten in der Muskelmorphogenese (Rosenberg-Hasson *et al.*, 1996).

Für Säugertiere wurde bis jetzt kein Nesprin *Knock-out* Model veröffentlicht. Nesprin-2 spielt eine entscheidende Rolle in wichtigen Prozessen innerhalb des Kerns durch seine Bindung an LaminA/C und durch die Stabilisierung von Emerin in der inneren Kernmembran (Libotte *et al.*, 2005). Dies und die oben genannten Daten aus *D. melanogaster* und *C. elegans* lassen vermuten, dass eine Nesprin-2 *Knock-out* Maus Defekte in unterschiedlichen Geweben aufweisen könnte. Es bleibt jedoch äußerst schwierig, einen kompletten *Knock-out* des Nesprin-2 Proteins zu generieren, da das Gen 115 Exons besitzt und eine enorme Vielfalt an Isoformen besitzt. Zusätzlich ist bei so einem riesigen Gen nicht klar, ob diese Isoformen Produkte durch alternatives Spleißen sind und/oder ob sie durch alternative Promotoren in den Introns reguliert werden. Obwohl das homologe Nesprin-1 eine andere Gewebeverteilung hat (Apel *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001; Padmakumar *et al.*, 2004) und andere Funktionen auszuüben scheint (Apel *et al.*, 2000; Gough *et al.*, 2003; Fan and Beck, 2004; Pare *et al.*, 2005), könnte Nesprin-1 die Abwesenheit von Nesprin-2 ausgleichen. Außerdem gibt es zahlreiche Isoformen, die einen Teil der Nesprin-2 Funktionen übernehmen können. Gerade wegen seiner Größe bleibt es jedoch ein



ehrgeiziges Unterfangen die vollständige Funktion von Nesprin-2 als struktureller Organisator der Zellkernmembran und des Aktin-zytoskeletts aufzuklären.

Lamin A/C *Knock-out* Mäuse entwickeln muskuläre Dystrophien ab der vierten Lebenswoche, dann sterben sie in der achten Woche nach der Geburt. Bei embryonalen Fibroblasten dieser Mäuse wurden Kerndeformationen beobachtet in Form von kugelförmigen Ausbuchtungen der Kernmembran (Sullivan *et al.*, 1999). Außerdem konnte in den Zellen von Muskeldystrophie Patienten sowie bei Progerie Patienten ebenfalls Kerndeformationen festgestellt werden (Eriksson *et al.*, 2003; Reichart *et al.*, 2004). Ähnliche Deformationen wurden bei Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten beobachtet. Dies ist ein Hinweis für eine mögliche Beteiligung von Nesprin-2 in Laminopathien. Durch die Lamin A/C Abwesenheit bzw. Punktmutationen könnte die Interaktion von Lamin A/C mit wichtigen Kernproteinen wie z.B. den Nesprinen gestört werden. Dies könnte zu einer Destabilisierung der Kernmembran führen und in Kerndeformationen resultieren.

Ein anderer Hinweis für die mögliche Nesprin-2 Beteiligung in Laminopathien ist seine Ähnlichkeit mit Dystrophin. Dystrophin und der mit ihm assoziierte Dystrophin-Glycoprotein Komplex (DGC) sind Proteine, die das Aktinzytoskelett mit der extrazellulären Matrix verbinden. Mutationen in diesen Komponenten verursachen Muskeldystrophien vom Typ Duchenne beim Menschen (Burke, 2001). Dystrophin und Nesprin-2 sind stark exprimiert in Muskel, sind riesig, binden Aktin und besitzen Spektrin-Domänen und können intrazelluläre Organelle mit der Plasmamembran verbinden (Djinovic-Carugo *et al.*, 2002; Gimona *et al.*, 2002; Ostlund and Worman, 2003). Eine kontinuierliche Verbindung vom Zellkern zur Plasmamembran ist gut vorstellbar, bei der Nesprin-2 die Verbindung zum Zellkern und zum Zellkerninneren herstellt, im Zytoplasma an Aktinfilamente bindet, die wiederum von Dystrophin gebunden und mit der Plasmamembran und schliesslich der extrazellulären Matrix über den Dystroglykankomplex verbunden sind. Interessanterweise hat man bei Patienten mit Muskeldystrophien auch eine inkorrekte Lokalisierung von Kern und Mitochondrien beobachtet (Burke *et al.*, 2001; Mounkes *et al.*, 2003a).

## 5. Zusammenfassung

Nesprin-1 and Nesprin-2 (auch Enaptin and NUANCE genannt) sind Mitglieder der  $\alpha$ -aktinin Superfamilie, die sich durch eine Aktin-bindende Domäne, einen elongierten Bereich mit Spektrindomänen und eine C-terminale Transmembranregion auszeichnen, mit der sie in der Kernmembran verankert sind. Sie sind riesige Proteine und gehen viele Interaktionen mit anderen Proteinen ein, unter anderem den Kernkomponenten Lamin A/C und Emerin.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Nesprin-2 Lokalisation am und im Zellkern mit Hilfe von neu etablierten Antikörpern gezeigt und neue Isoformen bestätigt. Die Nesprin-2 Lokalisation am Zellkern ist LaminA/C abhängig, wobei Lamin C ausreicht, um diese Lokalisierung zu stabilisieren. Nesprin-2 (-/-) Mäuse sind charakterisiert worden und der Defekt im Gen ist aufgeklärt worden. Diesen Mäusen fehlen Isoformen, denen die Aktin-bindende Domäne fehlt, u. a. die längste Isoform, die vom Nesprin-2 Gen kodiert wird, während C-terminale Isoformen vom Gendefekt nicht berührt sind. Die Mäuse zeigen keine offensichtlichen Defekte. Jedoch weisen Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten Kerndeformationen auf in Form von kugelförmigen Ein- und Ausbuchtungen sowie Diskontinuitäten der Kernmembran. Ähnliche Kerndeformationen wurden in Zellen von Patienten beobachtet, die an Laminopathien leiden. In Wundheilungsexperimenten wurde eine erhebliche Beeinträchtigung bei den Nesprin-2 (-/-) Fibroblasten beobachtet. Sie waren nicht in der Lage eine Wunde in der gleichen Zeit zu schliessen wie Wildtyp Fibroblasten. Unsere Resultate deuten auf eine Instabilität der Kernmembran in diesen Zellen hin und bestätigen die Bedeutung der grossen Nesprin-2 Isoform bei der Aufrechterhaltung der Kernmembranstabilität, Kernarchitektur und Zellbeweglichkeit. Nesprin-2 ist somit ein neuer Kandidat für die Auslösung von Laminopathien und Muskeldystrophien des Menschen.

## 6. Abstract

The vertebrate proteins Nesprin-1 and Nesprin-2 (also referred to as Enaptin and NUANCE) together with ANC-1 of *Caenorhabditis elegans* and MSP-300 of *Drosophila melanogaster* belong to a novel family of alpha-actinin type actin-binding proteins residing at the nuclear membrane. Nesprin-2 is a new lamin- and emerin-binding protein of the nuclear envelope.

Polyclonal and monoclonal antibodies generated against the C-terminus and N-terminus respectively showed that nesprin-2 isoforms located in the outer and inner nuclear membrane, in the cytoplasm as well as within the nucleus. We demonstrate also that nesprin-2 isoforms are expressed in a wide range of tissues. Our studies also indicate that the nuclear envelope localization of nesprin-2 depends on lamin A/C and the expression of lamin C is sufficient for a proper localization of nesprin-2. This is underlined by our findings in fibroblast cells of Lamin A/C Knock-out mice where we observed an altered distribution of nesprin-2. In order to reveal the functions of nesprin-2 and its link to human disease, we analysed nesprin-2 Knock-out mice which do not express the ABD-isoforms of the protein. These mice do not show any phenotype but at the cellular level we observed nuclear deformation in form of blebs und disruptions of the nuclear envelope. Similar deformations were observed in laminopathies patient cells. Furthermore, a wound healing experiments showed a defect in the motility of these cells. These results propose a role of nesprin-2-ABD isoforms in maintaining of nuclear membrane stability and nuclear architecture as well as cell motility. The Data suggest a potential involvement of this multi-isomeric protein in human diseases.

## 7. Literatur

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

Andra, K., Lassmann, H., Bittner, R., Shorny, S., Fassler, R., Propst, F., and Wiche, G. (1997). Targeted inactivation of plectin reveals essential function in maintaining the integrity of skin, muscle, and heart cytoarchitecture. *Genes Dev* 11, 3143-3156.

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

Bengtsson, L., and Wilson, K.L. (2004). Multiple and surprising new functions for emerin, a nuclear membrane protein. *Curr Opin Cell Biol* 16, 73-79.

Burke, B. (2001). The nuclear envelope: filling in gaps. *Nat Cell Biol* 3, E273-274.

Burke, B., Mounkes, L.C., and Stewart, C.L. (2001). The nuclear envelope in muscular dystrophy and cardiovascular diseases. *Traffic* 2, 675-683.

Burke, B., and Stewart, C.L. (2002). Life at the edge: the nuclear envelope and human disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 575-585.

Carlier, M.F., and Pantaloni, D. (1997). Control of actin dynamics in cell motility. *J Mol Biol* 269, 459-467.

Casella, J.F., Maack, D.J., and Lin, S. (1986). Purification and initial characterization of a protein from skeletal muscle that caps the barbed ends of actin filaments. *J Biol Chem* 261, 10915-10921.

Chien, A., Edgar, D.B., and Trela, J.M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127, 1550-1557.

Dalpe, G., Leclerc, N., Vallee, A., Messer, A., Mathieu, M., De Repentigny, Y., and Kothary, R. (1998). Dystonin is essential for maintaining neuronal cytoskeleton organization. *Mol Cell Neurosci* 10, 243-257.

De Matteis, M.A., and Morrow, J.S. (2000). Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *J Cell Sci* 113 ( Pt 13), 2331-2343.

Djinovic-Carugo, K., Gautel, M., Ylanne, J., and Young, P. (2002). The spectrin repeat: a structural platform for cytoskeletal protein assemblies. *FEBS Lett* 513, 119-123.

- dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A., and Nosworthy, N.J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* 83, 433-473.
- Echevarria, W., Leite, M.F., Guerra, M.T., Zipfel, W.R., and Nathanson, M.H. (2003). Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* 5, 440-446.
- Eddy, R.J., Han, J., Sauterer, R.A., and Condeelis, J.S. (1996). A major agonist-regulated capping activity in *Dictyostelium* is due to the capping protein, cap32/34. *Biochim Biophys Acta* 1314, 247-259.
- Eichinger, L., Lee, S.S., and Schleicher, M. (1999). *Dictyostelium* as model system for studies of the actin cytoskeleton by molecular genetics. *Microsc Res Tech* 47, 124-134.
- Eriksson, M., Brown, W.T., Gordon, L.B., Glynn, M.W., Singer, J., Scott, L., Erdos, M.R., Robbins, C.M., Moses, T.Y., Berglund, P., Dutra, A., Pak, E., Durkin, S., Csoka, A.B., Boehnke, M., Glover, T.W., and Collins, F.S. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423, 293-298.
- Fan, J., and Beck, K.A. (2004). A role for the spectrin superfamily member Syne-1 and kinesin II in cytokinesis. *J Cell Sci* 117, 619-629.
- Gant, T.M., Harris, C.A., and Wilson, K.L. (1999). Roles of LAP2 proteins in nuclear assembly and DNA replication: truncated LAP2beta proteins alter lamina assembly, envelope formation, nuclear size, and DNA replication efficiency in *Xenopus laevis* extracts. *J Cell Biol* 144, 1083-1096.
- Gimona, M., Djinovic-Carugo, K., Kranewitter, W.J., and Winder, S.J. (2002). Functional plasticity of CH domains. *FEBS Lett* 513, 98-106.
- Goldman, R.D., Gruenbaum, Y., Moir, R.D., Shumaker, D.K., and Spann, T.P. (2002). Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev* 16, 533-547.
- Gough, L.L., Fan, J., Chu, S., Winnick, S., and Beck, K.A. (2003). Golgi localization of Syne-1. *Mol Biol Cell* 14, 2410-2424.
- Gruenbaum, Y., Goldman, R.D., Meyuhas, R., Mills, E., Margalit, A., Fridkin, A., Dayani, Y., Prokocimer, M., and Enosh, A. (2003). The nuclear lamina and its functions in the nucleus. *Int Rev Cytol* 226, 1-62.
- Hartwig, J.H. (1995). Actin-binding proteins. 1: Spectrin super family. *Protein Profile* 2, 703-800.

- Hedgecock, E.M., and Thomson, J.N. (1982). A gene required for nuclear and mitochondrial attachment in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 30, 321-330.
- Holmer, L., and Worman, H.J. (2001). Inner nuclear membrane proteins: functions and targeting. *Cell Mol Life Sci* 58, 1741-1747.
- Hutchison, C.J. (2002). Lamins: building blocks or regulators of gene expression? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 848-858.
- Huxley, H.E. (1969). The mechanism of muscular contraction. *Science* 164, 1356-1365.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Jenkins, H., Whitfield, W.G., Goldberg, M.W., Allen, T.D., and Hutchison, C.J. (1995). Evidence for the direct involvement of lamins in the assembly of a replication competent nucleus. *Acta Biochim Pol* 42, 133-143.
- Kodama, A., Karakesisoglou, I., Wong, E., Vaezi, A., and Fuchs, E. (2003). ACF7: an essential integrator of microtubule dynamics. *Cell* 115, 343-354.
- Kohler, G., and Milstein, C. (1976). Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol* 6, 511-519.
- Lee, K.K., Starr, D., Cohen, M., Liu, J., Han, M., Wilson, K.L., and Gruenbaum, Y. (2002). Lamin-dependent localization of UNC-84, a protein required for nuclear migration in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 13, 892-901.
- Lenz-Bohme, B., Wismar, J., Fuchs, S., Reifegerste, R., Buchner, E., Betz, H., and Schmitt, B. (1997). Insertional mutation of the *Drosophila* nuclear lamin Dm0 gene results in defective nuclear envelopes, clustering of nuclear pore complexes, and accumulation of annulate lamellae. *J Cell Biol* 137, 1001-1016.
- Libotte, T., Zaim, H., Abraham, S., Padmakumar, V.C., Schneider, M., Lu, W., Munck, M., Hutchison, C., Wehnert, M., Fahrenkrog, B., Sauder, U., Aebi, U., Noegel, A.A., and Karakesisoglou, I. (2005). Lamin A/C-dependent localization of Nesprin-2, a giant scaffold at the nuclear envelope. *Mol Biol Cell* 16, 3411-3424.
- Lin, F., and Worman, H.J. (1993). Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem* 268, 16321-16326.
- Lyass, L.A., Bershadsky, A.D., Vasiliev, J.M., and Gelfand, I.M. (1988). Microtubule-dependent effect of phorbol ester on the contractility of cytoskeleton of cultured fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 9538-9541.

- Malone, C.J., Fixsen, W.D., Horvitz, H.R., and Han, M. (1999). UNC-84 localizes to the nuclear envelope and is required for nuclear migration and anchoring during *C. elegans* development. *Development* 126, 3171-3181.
- Matsudaira, P. (1994). Actin crosslinking proteins at the leading edge. *Semin Cell Biol* 5, 165-174.
- Mattout-Drubezki, A., and Gruenbaum, Y. (2003). Dynamic interactions of nuclear lamina proteins with chromatin and transcriptional machinery. *Cell Mol Life Sci* 60, 2053-2063.
- Mislow, J.M., Holaska, J.M., Kim, M.S., Lee, K.K., Segura-Totten, M., Wilson, K.L., and McNally, E.M. (2002). Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro. *FEBS Lett* 525, 135-140.
- Mosley-Bishop, K.L., Li, Q., Patterson, L., and Fischer, J.A. (1999). Molecular analysis of the *klarsicht* gene and its role in nuclear migration within differentiating cells of the *Drosophila* eye. *Curr Biol* 9, 1211-1220.
- Mounkes, L., Kozlov, S., Burke, B., and Stewart, C.L. (2003a). The laminopathies: nuclear structure meets disease. *Curr Opin Genet Dev* 13, 223-230.
- Mounkes, L.C., Kozlov, S., Hernandez, L., Sullivan, T., and Stewart, C.L. (2003b). A progeroid syndrome in mice is caused by defects in A-type lamins. *Nature* 423, 298-301.
- Muchir, A., van Engelen, B.G., Lammens, M., Mislow, J.M., McNally, E., Schwartz, K., and Bonne, G. (2003). Nuclear envelope alterations in fibroblasts from LGMD1B patients carrying nonsense Y259X heterozygous or homozygous mutation in lamin A/C gene. *Exp Cell Res* 291, 352-362.
- Novelli, G., Muchir, A., Sangiuolo, F., Helbling-Leclerc, A., D'Apice, M.R., Massart, C., Capon, F., Sbraccia, P., Federici, M., Lauro, R., Tudisco, C., Pallotta, R., Scarano, G., Dallapiccola, B., Merlini, L., and Bonne, G. (2002). Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C. *Am J Hum Genet* 71, 426-431.
- Ostlund, C., and Worman, H.J. (2003). Nuclear envelope proteins and neuromuscular diseases. *Muscle Nerve* 27, 393-406.
- Padmakumar, V.C., Abraham, S., Braune, S., Noegel, A.A., Tunggal, B., Karakesisoglou, I., and Korenbaum, E. (2004). Enaptin, a giant actin-binding protein, is an element of the nuclear membrane and the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* 295, 330-339.
- Palek, J. (1987). Hereditary elliptocytosis, spherocytosis and related disorders: consequences of a deficiency or a mutation of membrane skeletal proteins. *Blood Rev* 1, 147-168.

- Pante, N., and Kann, M. (2002). Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell* *13*, 425-434.
- Pare, G.C., Easlick, J.L., Mislow, J.M., McNally, E.M., and Kapiloff, M.S. (2005). Nesprin-1alpha contributes to the targeting of mAKAP to the cardiac myocyte nuclear envelope. *Exp Cell Res* *303*, 388-399.
- Pederson, T., and Aebi, U. (2002). Actin in the nucleus: what form and what for? *J Struct Biol* *140*, 3-9.
- Polioudaki, H., Kourmouli, N., Drosou, V., Bakou, A., Theodoropoulos, P.A., Singh, P.B., Giannakouros, T., and Georgatos, S.D. (2001). Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO Rep* *2*, 920-925.
- Puius, Y.A., Mahoney, N.M., and Almo, S.C. (1998). The modular structure of actin-regulatory proteins. *Curr Opin Cell Biol* *10*, 23-34.
- Rando, O.J., Zhao, K., and Crabtree, G.R. (2000). Searching for a function for nuclear actin. *Trends Cell Biol* *10*, 92-97.
- Reichart, B., Klafke, R., Dreger, C., Kruger, E., Motsch, I., Ewald, A., Schafer, J., Reichmann, H., Muller, C.R., and Dabauvalle, M.C. (2004). Expression and localization of nuclear proteins in autosomal-dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy with LMNA R377H mutation. *BMC Cell Biol* *5*, 12.
- Rivero, F., Kuspa, A., Brokamp, R., Matzner, M., and Noegel, A.A. (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*, 735-750.
- Rouayrenc, J.F., and Travers, F. (1981). The first step in the polymerisation of actin. *Eur J Biochem* *116*, 73-77.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* *230*, 1350-1354.
- Schirmer, E.C., Guan, T., and Gerace, L. (2001). Involvement of the lamin rod domain in heterotypic lamin interactions important for nuclear organization. *J Cell Biol* *153*, 479-489.
- Schuler, E., Lin, F., and Worman, H.J. (1994). Characterization of the human gene encoding LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *J Biol Chem* *269*, 11312-11317.



- Shizuta, Y., Shizuta, H., Gallo, M., Davies, P., and Pastan, I. (1976). Purification and properties of filamin, and actin binding protein from chicken gizzard. *J Biol Chem* *251*, 6562-6567.
- Shultz, L.D., Lyons, B.L., Burzenski, L.M., Gott, B., Samuels, R., Schweitzer, P.A., Dreger, C., Herrmann, H., Kalscheuer, V., Olins, A.L., Olins, D.E., Sperling, K., and Hoffmann, K. (2003). Mutations at the mouse ichthyosis locus are within the lamin B receptor gene: a single gene model for human Pelger-Huet anomaly. *Hum Mol Genet* *12*, 61-69.
- Shumaker, D.K., Kuczmarski, E.R., and Goldman, R.D. (2003). The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions. *Curr Opin Cell Biol* *15*, 358-366.
- Soullam, B., and Worman, H.J. (1995). Signals and structural features involved in integral membrane protein targeting to the inner nuclear membrane. *J Cell Biol* *130*, 15-27.
- Spann, T.P., Goldman, A.E., Wang, C., Huang, S., and Goldman, R.D. (2002). Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *J Cell Biol* *156*, 603-608.
- Suggs, S.V., Wallace, R.B., Hirose, T., Kawashima, E.H., and Itakura, K. (1981). Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *78*, 6613-6617.
- Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Bhatt, H., Anver, M., Bhat, N., Nagashima, K., Stewart, C.L., and Burke, B. (1999). Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol* *147*, 913-920.
- Teunissen, L.L., Notermans, N.C., Franssen, H., Van Engelen, B.G., Baas, F., and Wokke, J.H. (2003). Disease course of Charcot-Marie-Tooth disease type 2: a 5-year follow-up study. *Arch Neurol* *60*, 823-828.
- Tse, W.T., and Lux, S.E. (1999). Red blood cell membrane disorders. *Br J Haematol* *104*, 2-13.
- Venables, R.S., McLean, S., Luny, D., Moteleb, E., Morley, S., Quinlan, R.A., Lane, E.B., and Hutchison, C.J. (2001). Expression of individual lamins in basal cell carcinomas of the skin. *Br J Cancer* *84*, 512-519.
- Weiner, O.H., Murphy, J., Griffiths, G., Schleicher, M., and Noegel, A.A. (1993). The actin-binding protein comitin (p24) is a component of the Golgi apparatus. *J Cell Biol* *123*, 23-34.
- Wilkinson, F.L., Holaska, J.M., Zhang, Z., Sharma, A., Manilal, S., Holt, I., Stamm, S., Wilson, K.L., and Morris, G.E. (2003). Emerin interacts in vitro with the splicing-associated factor, YT521-B. *Eur J Biochem* *270*, 2459-2466.
- Winder, S.J., Gibson, T.J., and Kendrick-Jones, J. (1995). Dystrophin and utrophin: the missing links! *FEBS Lett* *369*, 27-33.

Worman, H.J. (2004). Nuclear envelope proteins and human disease. *Symp Soc Exp Biol*, 41-55.

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

Yin, H.L., Albrecht, J.H., and Fattoum, A. (1981). Identification of gelsolin, a Ca<sup>2+</sup>-dependent regulatory protein of actin gel-sol transformation, and its intracellular distribution in a variety of cells and tissues. *J Cell Biol* 91, 901-906.

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

Zhang, Q., Ragnauth, C.D., Skepper, J.N., Worth, N.F., Warren, D.T., Roberts, R.G., Weissberg, P.L., Ellis, J.A., and Shanahan, C.M. (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, 673-687.

Zhang, Q., Skepper, J.N., Yang, F., Davies, J.D., Hegyi, L., Roberts, R.G., Weissberg, P.L., Ellis, J.A., and Shanahan, C.M. (2001). Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *J Cell Sci* 114, 4485-4498.

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

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

Zigmond, S.H. (1989). Chemotactic response of neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1, 451-453.

## Erklärung

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

Köln, im Dezember 2005

### Teilpublikationen:

Libotte, T., Zaim, H., Abraham, S., Padmakumar, V.C., Schneider, M., Lu, W., Munck, M., Hutchison, C., Wehnert, M., Fahrenkrog, B., Sauder, U., Aebi, U., Noegel, A.A., and Karakesisoglou, I. (2005). Lamin A/C-dependent localization of Nesprin-2, a giant scaffold at the nuclear envelope. *Mol Biol Cell* 16, 3411-3424.

Padmakumar, V.C., Libotte, T., Lu, W., Zaim, H., Abraham, S., Noegel, A.A., Gotzmann, J., Foisner, R., and Karakesisoglou, I. (2005). The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J Cell Sci* 118, 3419-3430.

## Lebenslauf

Vorname	Hafida
Geburtsort	Taza; Marokko
Nationalität	marokkanisch
Familienstand	verheiratet

## Ausbildung

1980 - 1985	Grundschule
1985 - 1992	Gymnasium
Juni 1996	Abitur (Baccalauréat sciences experimentales) in Lycée Abderrahman Nacer. Kénitra; Marokko
1992 - 1996	Studium der Biologie an der Universität Ibn Tofail. Kénitra; Marokko
Juni 1996	Abschlussdiplom: Licence és Sciences.
Oktober 1997	Einreise nach Deutschland
1998	Deutschkurs an der Universität zu Köln
1999 - 2002	Hauptstudium der Biologie an der Universität zu Köln
November 2002	Diplom in Fachrichtung Biologie (Hauptfach Genetik)
Dezember 2002	Promotion im Institut für Biochemie I der medizinischen Fakultät in Köln

<b>Sprachen</b>	Arabisch; Französisch; Deutsch und Englisch
-----------------	---

## Dankesagungen

*Ich möchte mich in erster Linie bei Prof. A. A. Noegel für die Gelegenheit an ihrem renommierten Institut meine Dissertation anfertigen zu dürfen, für ihre Hilfestellung bei der Korrektur dieser Arbeit und für ihre ständige Diskussionsbereitschaft*

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

*Heraushebend möchte ich vor allem Dr. Akis Karakesisoglou, für die tolle freundschaftliche und fachliche Betreuung und Anregungen zu meiner Arbeit.*

*Weiterhin danke ich die liebe Martina Munck für die Einarbeitung und ihre Fachliche und persönliche Hilfsbereitschaft sowie die moralische Unterstützung.*

*Ein ganz besonderen Dank an Georgia Vlahou, die jeder Zeit bereit war, mir mit der deutschen Sprache zu helfen und mich zu motivieren. Dann bedanke ich mich bei Thorsten Libotte, Sabu Abraham, Padmakumar, Deen, Yogikala prabhau, Wenshu, Ria Schneider, Jessica Berthold und Soraya für die tolle Zeit im Institut.*

*Weiterer bedanke ich mich bei Berthold Gassen, Maria Stumpf und Rolf Müller für die freundliche und fachliche Beratung.*

*Danke an meinem lieben Bruder Redi, denn ohne ihn hätte ich es nicht geschafft. Ich bedanke mich ebenfalls bei meinem Mann, der mich immer unterstützt und motiviert hat.*

*Für die moralische Unterstützung bedanke ich mich herzlich bei Christel Zaim für die vielen Anrufe und Motivation.*

*An dieser Stelle sei auch allen anderen Kollegen und Kolleginnen des Instituts für das angenehme Arbeitsklima gedankt.*