

**Charakterisierung der Nesprin-2 Giant Funktionen  
bei der Kernmembranarchitektur  
und in Laminopathien**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

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



vorgelegt von

**Yvonne Lüke**

aus Mönchengladbach

Köln, 2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2005 bis April 2008, 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:      04.07.08

**Für meine Familie**

**INHALT**

<b>INHALT</b> .....	<b>4</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>10</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1. Der Zellkern und die Kernhülle</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2. Die Lamine</b> .....	<b>14</b>
1.2.1. Laminisotypen .....	<b>14</b>
1.2.2. Molekulare Struktur der Lamine .....	<b>16</b>
<b>1.2.3. Prozessierung von Prälamins A</b> .....	<b>17</b>
<b>1.3. Integrale Proteine der inneren Kernmembran</b> .....	<b>18</b>
1.3.1. Proteine der LEM-Domäne-Familie.....	<b>19</b>
1.3.2. Die Nesprine und deren Isoformen .....	<b>21</b>
<b>1.4. Laminopathien</b> .....	<b>25</b>
1.4.1. Primäre Laminopathien .....	<b>26</b>
1.4.1.1. Erkrankungen mit spezifischer Beteiligung der gestreiften Muskulatur .....	<b>26</b>
1.4.1.2. Erkrankungen mit Beteiligung des peripheren Nervensystems .....	<b>26</b>
1.4.1.3. Partielle Lipodystrophien.....	<b>27</b>
1.4.1.4. Systemische Laminopathien: Progerie-Syndrome .....	<b>27</b>
1.4.1.4.1. Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom.....	<b>27</b>
1.4.1.4.2. Atypisches Werner-Syndrom .....	<b>28</b>
1.4.1.4.3. Mandibuloakrale Dysplasie .....	<b>29</b>
1.4.1.4.4. Restriktive Dermopathie .....	<b>29</b>
1.4.1.5. Systemische Laminopathien .....	<b>29</b>
<b>1.5. Ziel der Arbeit</b> .....	<b>31</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>32</b>
<b>2.1. Material</b> .....	<b>32</b>
2.1.1. Labormaterial .....	<b>32</b>
2.1.2. Geräte .....	<b>33</b>
2.1.3. Kits .....	<b>34</b>
2.1.4. Puffer und Lösungen.....	<b>34</b>
2.1.5. Chemikalien und Reagenzien .....	<b>35</b>
2.1.6. Enzyme, Antikörper und Inhibitoren .....	<b>37</b>
2.1.6.1. Enzyme für die Molekularbiologie .....	<b>37</b>

---

2.1.6.2. Antikörper.....	38
2.1.6.3. Inhibitoren .....	39
2.1.7. Oligonukleotide .....	40
2.1.7.1. DNA-Oligonukleotide .....	40
2.1.7.2. RNA-Oligonukleotide .....	40
2.1.8. Vektoren.....	40
2.1.9. Plasmide .....	40
2.1.10. Bakterienstämme, Zell-Linien und primäre Zellen.....	41
2.1.11. Kultur-Medien.....	41
2.1.11.1. Kultur-Medien für Bakterien .....	41
2.1.11.2. Kultur-Medien für Säugetierzellen.....	42
<b>2.2. Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>43</b>
2.2.1. Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	43
2.2.2. Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mikromaßstab gemäß Macherey-Nagel.....	43
2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	44
2.2.4. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	45
2.2.5. DNA-Agarosegelelektrophorese .....	46
2.2.6. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	46
2.2.7. DNA-Sequenzierung .....	47
2.2.8. Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien (Laird, 1991).....	47
2.2.9. Phenol/Chloroform-Aufreinigung von DNA .....	48
2.2.10. Alkalischer Transfer der DNA für Southernblot (Olszewska und Jones, 1988).....	49
2.2.11. Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit dem Stratagene Prime It II <sup>®</sup> Kit.....	49
2.2.12. Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden im Southernblot.....	50
2.2.13. <i>In vitro</i> Rekombination von DNA.....	51
2.2.13.1. Hydrolytische Spaltung der DNA durch Restriktionsendonukleasen ...	51
2.2.13.2. Dephosphorylierung der 5' Enden von linearisierten Vektoren .....	51
2.2.13.3. Ligation von Vektor- und DNA-Fragmenten.....	51
2.2.13.4. Primer-Hybridisierung für RNAi Konstrukte.....	52
2.2.13.5. Phosphorylierung der 5' Enden der Primer-Dimere .....	52
2.2.14. Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugetierzellen mit einem Qiagen Kit .....	53
2.2.15. Reverse Transkriptase-Reaktion .....	53

---

2.2.16.	RNA-Agarose-Gelelektrophorese (Lehrach et al., 1977) .....	54
2.2.17.	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen .....	54
2.2.17.1.	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	54
2.2.17.2.	Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	55
2.2.18.	<i>E. coli</i> -Dauerkulturen .....	55
2.2.19.	Aufreinigung von DNA für die Mikroinjektion.....	55
2.2.20.	siRNA knock down Strategie .....	56
<b>2.3.</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b> .....	<b>57</b>
2.3.1.	Proteinlysate aus Zellen.....	57
2.3.2.	Proteinlysate aus Geweben .....	57
2.3.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	58
2.3.4.	Färbung von Polyacrylamidgelen.....	59
2.3.4.1.	Färbung von Coomassie-Blau.....	59
2.3.4.2.	Silberfärbung (Blum et al., 1987) .....	60
2.3.5.	Übertragung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Westernblot) nach Towbin (1979).....	61
2.3.5.1.	Transfer auf Nitrocellulosemembranen im Halbtrocken-Verfahren .....	61
2.3.5.2.	Transfer auf Nitrocellulosemembranen im Nassverfahren.....	61
2.3.6.	Färbung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen.....	62
2.3.7.	Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose .....	62
2.3.8.	Entfernung der Antikörper nach Immundetektion.....	63
2.3.9.	Immunpräzipitation.....	64
2.3.10.	Sequentielle Salzextraktion.....	65
<b>2.4.</b>	<b>Immunhistologische Methoden</b> .....	<b>65</b>
2.4.1.	Präparation von Gefrierschnitten .....	65
<b>2.5.</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>66</b>
2.5.1.	Isolierung primärer Keratinozyten und Fibroblasten aus neugeborenen Mäusen .....	66
2.5.2.	Kultur von Säugerzellen.....	67
2.5.3.	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	67
2.5.4.	Fluoreszenzmikroskopie .....	67
2.5.4.1.	Fixieren und Permeabilisieren von Säugetierzellen .....	67
2.5.4.2.	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie.....	67
2.5.5.	Wundheilungsexperimente .....	68
2.5.6.	BrdU-Inkorporation.....	68
2.5.6.1.	BrdU-Inkorporation in primäre Fibroblasten .....	68
2.5.6.2.	<i>In vivo</i> BrdU-Inkorporation .....	69

---

2.5.7.	Transfektion von Säugetierzellen.....	69
2.5.7.1.	Transiente Transfektion von Säugetierzellen durch Elektroporation.....	69
<b>2.6.</b>	<b>Morphometrische Analyse .....</b>	<b>69</b>
2.6.1.	Bestimmung des nukleären Kontur-Verhältnisses .....	69
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>71</b>
<b>3.1.</b>	<b>Charakterisierung von <i>LMNA</i> S143F Fibroblasten .....</b>	<b>71</b>
3.1.1.	Schematische Darstellung der Namen und Positionen von <i>LMNA</i> Mutationen in progeroiden Erkrankungen.....	71
3.1.2.	Morphologische Defekte in Zellkernen von <i>LMNA</i> S143F Fibroblasten .....	72
3.1.3.	Abnormale Lokalisation und Expression der Proteine der LEM-Domäne-Familie in <i>LMNA</i> S143F Fibroblasten .....	75
3.1.4.	Die <i>LMNA</i> S143F Mutation beeinflusst die Lokalisation der Nesprin-2 Proteine .....	77
3.1.5.	Nesprin-2 Giant exprimierende <i>LMNA</i> S143F Fibroblasten besitzen eine normale Zellkernmorphologie .....	79
3.1.5.1.	Nesprin-2 Giant defiziente Fibroblasten besitzen deformierte Zellkerne .....	79
3.1.5.2.	Die Expression von Nesprin-2 Giant ist reduziert in <i>LMNA</i> S143F Fibroblasten .....	81
3.1.5.3.	Nukleäre morphometrische Analyse von <i>LMNA</i> S143F Fibroblasten ...	82
3.1.6.	Ektopische Expression von <i>LMNA</i> S143F induziert den für die Patientenfibroblasten charakteristischen Phänotyp .....	84
3.1.6.1.	Expression von <i>LMNA</i> S143F-GFP induziert zeitabhängige nukleäre Deformationen nur in Zelllinien mit geringem Nesprin-2 Giant Niveau.....	84
3.1.7.	Expression von <i>LMNA</i> S143F-GFP in Nesprin-2 Giant KO Fibroblasten erhöht Anzahl und Schwere der nukleären Deformationen .....	87
3.1.8.	Nesprin-2 Giant exprimierende <i>LMNA</i> G608G und ZMPSTE24 KO Fibroblasten besitzen eine normale Zellkernmorphologie .....	89
3.1.9.	Lamin A zeigt eine reduzierte Löslichkeit in <i>LMNA</i> S143F Fibroblasten .....	91
3.1.10.	Einsatz eines Protein-Farnesyltransferase-Inhibitors führt zu einer Verbesserung des nukleären Phänotyps .....	91
<b>3.2.</b>	<b>Charakterisierung einer Nesprin-2 Giant defizienten Maus .....</b>	<b>94</b>

---

3.2.1.	Identifizierung des reaktiven Epitops eines mausspezifischen Nesprin-2 ABD Antikörpers (mAb K56-386).....	95
3.2.2.	Charakterisierung des mAb K56-386 .....	96
3.2.3.	Die Expression der C-terminalen Nesprin-2 Isoformen ist verändert in Geweben von Nesprin-2 Giant defizienten Mäusen.....	98
3.2.4.	Nesprin-2 Giant abhängige Lokalisation der C-terminalen Isoformen	101
3.2.5.	Nesprin-2 Giant beeinflusst die Dicke der Epidermis und die Morphologie der Kerne in der Epidermis.....	103
3.2.5.1.	Epidermale Proliferation und Differenzierung ist unverändert in der Nesprin-2 Giant KO Maus .....	103
3.2.5.2.	Nesprin-2 Giant beeinflusst die Größe und Morphologie der Kerne in der Epidermis .....	104
3.2.5.3.	Mislokalisierung der Proteine der LEM-Domäne-Familie in Nesprin-2 Giant defizienten Keratinozyten.....	107
3.2.6.	Nesprin-2 Giant Silencing in humanen Keratinozyten beeinflusst die nukleäre Morphologie und Nesprin-2 C-terminale Isoformen.....	109
3.2.7.	Nesprin-2 Giant beeinflusst die Zusammensetzung der Kernhülle in Fibroblasten .....	111
3.2.7.1.	Kerndeformationen in Nesprin-2 Giant defizienten primären Fibroblasten .....	111
3.2.7.2.	Mislokalisierung nukleärer Proteine in Nesprin-2 Giant defizienten Fibroblasten .....	113
3.2.8.	Generierung der Nesprin-2 $\Delta$ ABD Isoform in KO Zellen durch alternative Translationsinitiation.....	114
3.2.9.	Nesprin-2 Giant beeinflusst die Polarisation von Fibroblasten.....	117
3.2.10.	Nesprin-2 Giant beeinflusst die Proliferation.....	119
<b>3.3.</b>	<b>Generierung einer transgenen dominant negativen Nesprin-2 Maus .....</b>	<b>120</b>
3.3.1.	Herstellung des dominant negativen Konstruktes für die Mikroinjektion .....	120
3.3.2.	Makroskopische Analyse der transgenen dn Nesprin-2 Maus.....	120
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>123</b>
4.1.	Einfluss der <i>LMNA</i> S143F Mutation auf die Integrität der Lamina .....	123
4.1.1.	<i>LMNA</i> S143F Fibroblasten weisen nukleäre Deformationen auf .....	123
4.1.2.	Einfluss der <i>LMNA</i> S143F Mutation auf die Assemblierung und Dynamik der Lamina .....	124

---

4.1.3.	Akkumulation eines farnesylierten Progerin ist nicht die alleinige Ursache für die Entstehung des progeroiden Phänotyps .....	125
<b>4.2.</b>	<b>Einfluss der <i>LMNA</i> S143F Mutation auf die Lokalisation und Funktion von Proteinen der LEM-Domäne-Familie .....</b>	<b>126</b>
<b>4.3.</b>	<b>Beteiligung des Nesprin-2 Giant Proteins an der Integrität des Zellkerns .....</b>	<b>129</b>
4.3.1.	Die Nesprine und deren potentielle Bedeutung in Laminopathien.....	129
4.3.2.	Nesprin-2 Giant Abhängigkeit der kleinen C-terminalen Nesprin-2 Isoformen .....	130
4.3.3.	Nesprin-2 Giant übt eine strukturelle Funktion bei der Stabilisierung der Kernarchitektur aus.....	132
4.3.3.1.	Abwesenheit der Nesprin-2 Giant Isoform induziert Kern-Deformationen .....	132
4.3.3.2.	Eine starke Nesprin-2 Giant Expression wirkt Kerndeformationen Entgegen.....	133
4.3.3.3.	Verlust von Nesprin-2 Giant führt zu einer Vergrößerung der Zellkerne .....	134
4.3.3.4.	Generierung einer Nesprin-2 $\Delta$ ABD Isoform in KO Zellen durch alternative Translationsinitiation.....	135
4.3.4.	Das strukturelle Gleichgewicht zwischen Laminen und Nesprin-2 Giant bestimmt die Integrität des Zellkerns.....	136
<b>4.4.</b>	<b>Mislokalisierung nukleärer Proteine in Nesprin-2 Giant defizienten Zellen .....</b>	<b>138</b>
<b>4.5.</b>	<b>Nesprin-2 Giant beeinflusst die Polarisation von Fibroblasten....</b>	<b>139</b>
<b>4.6.</b>	<b>Beteiligung von Nesprin-2 bei skelettmuskelspezifischen Erkrankungen.....</b>	<b>141</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>144</b>
<b>6.</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>146</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>147</b>
	<b>Erklärung .....</b>	<b>170</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>171</b>
	<b>Danksagungen .....</b>	<b>172</b>

**Abkürzungen**

$^{32}\text{P}$	radioaktives Phosphoratom
A	Adenin
ABD	Aktin-Bindungs-Domäne
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycolbis[2-aminoethylether]- N,N,N,N-tetraessigsäure
E.R.	Endoplasmatisches Retikulum
G	Guanin
GFP	grün fluoreszierendes Protein (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

---

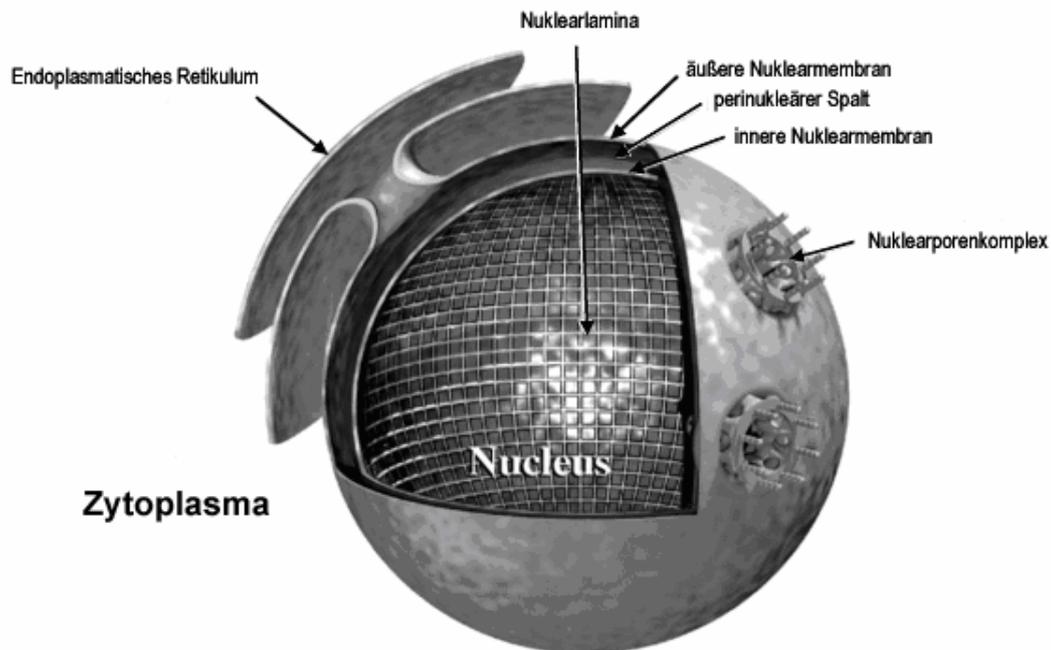
KO	knock out
Luminol	5-Amino-2,3-Dihydro-1,4-Phtalazindion
M	Molar
mA	Milliampere
mAb	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
mM	Millimolar
MOPS	Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
$\mu\text{F}$	Mikrofarad
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Natriumchloridlösung
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pAb	polyklonaler Antikörper
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
T	Thymin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Uracil

ÜK	Übernacht-Kultur
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

## 1. Einleitung

### 1.1. Der Zellkern und die Kernhülle

Eukaryotische Zellen besitzen einen Zellkern, der ca. 10 % des Zellvolumens ausmacht. Er besitzt als wichtiges Zellkompartiment das Hauptgenom der Zelle und ist u.a. Ort der DNA- und RNA-Synthese, der RNA-Prozessierung und der Ribosomenbildung. Während der Interphase des Zellzyklus sind die nukleären und zytoplasmatischen Kompartimente eukaryotischer Zellen durch die Zellkernhülle voneinander getrennt. Sie besteht aus zwei Membranen, den Kernporenkomplexen und der Kernlamina. Die Kernhülle lässt sich in eine äußere und eine innere Kernmembran differenzieren, die den perinukleären Raum mit einer Breite von 30 bis 100 nm umschließen (Gerace and Burke, 1988; Broers et al., 2006). Die äußere Kernmembran geht in das endoplasmatische Retikulum über und ist mit Ribosomen besetzt. Die innere Kernmembran ist in Bezug auf die Phospholipidmobilität und Lipidzusammensetzung der äußeren Kernmembran sehr ähnlich (Schindler et al., 1985), strukturell und funktionell unterscheidet sie sich jedoch. So enthält sie integrale und membranassoziierte Proteine, die Bindestellen für die Lamina und das Chromatin zur Verfügung stellen. Innere und äußere Kernmembran gehen an den Kernporenkomplexen ineinander über. Hier findet der selektive bidirektionale Transport von Makromolekülen zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern statt, während kleine Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa die Kernporen weitestgehend ungehindert passieren können. Die Kernlamina befindet sich unterhalb der inneren Kernmembran und stellt ein dünnes (20-50 nm) filamentöses Netzwerk aus Laminpolymeren und laminbindenden Proteinen dar (Dwyer & Blobel, 1976). Die Lamine verleihen der Kernhülle mechanische Stabilität (Newport et al., 1990) und sind an verschiedenen funktionellen Aufgaben des Zellkerns beteiligt wie z.B. an der postmitotischen Reorganisation des Kerns einschließlich der Chromatinkondensation und DNA-Replikation (Hutchison et al., 1994; Stuurman et al., 1998; Moir et al., 2000b; Lopez-Soler et al., 2001) sowie an apoptotischen Vorgängen (Goldman et al., 2002).



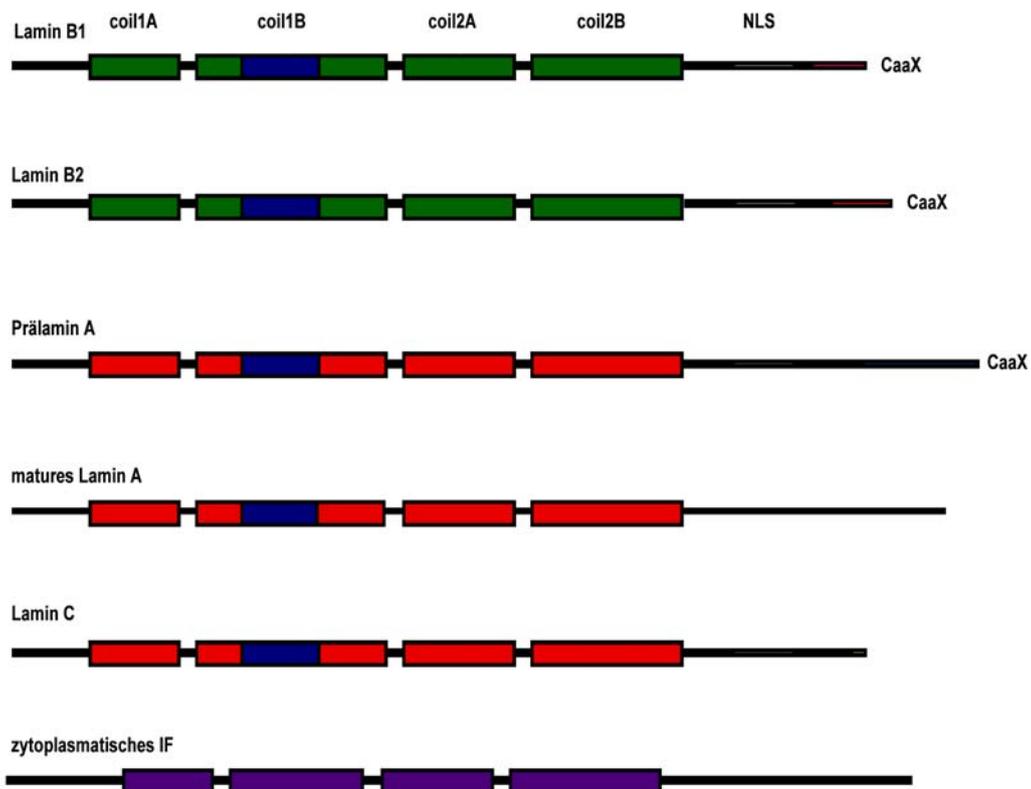
**Abbildung 1.1.: Schematische Representation der Zellkernhülle eukaryotischer Zellen** (adaptiert aus Stuurman et al., 1998).

## 1.2. Die Lamine

### 1.2.1. Laminisotypen

Die nukleären Lamine gehören zur Familie der Typ V Intermediärfilamentproteine und besitzen ein Molekulargewicht zwischen 60 und 80 kDa. Lamine werden aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung und biochemischen Eigenschaften in A-Typ und B-Typ Lamine klassifiziert. A-Typ Lamine besitzen einen neutralen isoelektrischen Punkt, während der von B-Typ Laminen im sauren Bereich liegt (Gerace and Burke, 1988; Nigg, 1989). Die A-Typ Lamine bilden in der Mitose lösliche Oligomere, während die B-Typ Lamine mit Membranen assoziiert bleiben. Die Membranbindung der B-Typ Lamine erfolgt dabei über das farnesylierte und carboxymethylierte Cystein des CaaX Motivs, welches bei den A-Typ Laminen entweder während der Reifung proteolytisch entfernt wird (Lamin A) bzw. von Anfang an fehlt (Lamin C) (Holtz et al., 1989; Krohne et al., 1989; Kitten and Nigg, 1991). In Vertebraten wurden drei verschiedene Lamingene (*LMNA*, *LMNB1* und *LMNB2*) gefunden, die für sieben verschiedene Proteine codieren. Die A-Typ Lamine A, Lam A $\Delta$ 10, C und C2 sind alternativ gespleißte Produkte eines

einzigsten Gens (*LMNA*) (Fisher et al., 1986; McKeon et al., 1986; Furukawa et al., 1994), welches aus 12 Exons besteht und auf Chromosom 1q21.1-21.3 lokalisiert ist (Lin and Worman, 1993). Das *LMNB1* Gen (Chromosom 5q23.3-q31.1) codiert für das Protein Lamin B1 (Lin and Worman, 1995), während das *LMNB2* Gen (Chromosom 19p13.3) für die Lamine B2 und B3 codiert (Biamonti et al., 1992; Furukawa und Hotta, 1993). Alle Vertebratenzellen exprimieren mindestens ein B-Typ Lamin, wobei gezeigt wurde, dass die Expression essentiell für die Integrität des Nukleus, für das Überleben der Zellen und die normale Entwicklung ist (Lenz-Bohme et al., 1997; Liu et al., 2000; Harborth et al., 2001; Vergnes et al., 2004). Die A-Typ Lamine A, A $\Delta$ 10 und C werden dagegen entwicklungspezifisch reguliert und in differenzierten Zellen exprimiert (Rober et al., 1989; Machiels et al., 1996). Die Lamine C2 und B3 sind Keimbahn-spezifisch (Furukawa und Hotta, 1993; Furukawa et al., 1994; Alsheimer et al., 1999).

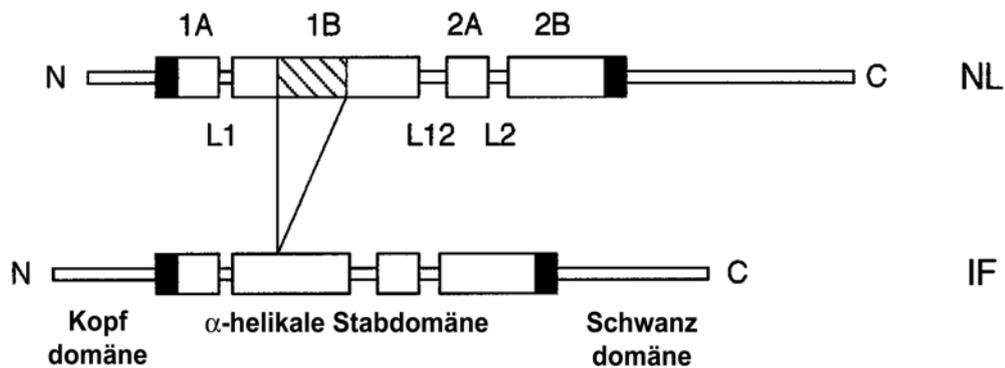


**Abbildung 1.2.: Schematische Darstellung der Laminisotypen in somatischen Zellen.**  $\alpha$ -helikale coiled-coil Domänen werden dargestellt durch farbige Boxen. B-Typ Lamine erscheinen in grün, A-Typ Lamine in rot. Die blaue Box innerhalb von coil 1b markiert den Bereich, der spezifisch für nukleäre Lamine ist. NLS: nukleäres Lokalisationssignal; CaaX: Motiv für die posttranslationale Modifizierung. Zum Vergleich ist ein zytoplasmatisches Intermediärfilament gezeigt: die zentrale Stabdomäne ist durch das Fehlen der Heptadwiederholungen in coil 1b kürzer, die Kopfdomäne ist länger und der Schwanzdomäne fehlt die NLS und das CaaX Motiv (adaptiert aus Hutchison et al., 2001).

### 1.2.2. Molekulare Struktur der Lamine

Die Lamine setzen sich aus drei strukturellen Domänen zusammen: einer zentralen  $\alpha$ -helikalen Stabdomäne, einer kurzen globulären aminoterminalen Kopfdomäne und einer langen globulären carboxyterminalen Schwanzdomäne. Die globuläre Kopfdomäne der Lamine ist stark positiv geladen; dies gilt ebenso für den carboxyterminalen Teil der Stabdomäne, so dass beide Regionen wichtige Komponenten für Protein-Protein-Interaktionen darstellen. Der Kern der carboxyterminalen globulären Domäne besteht aus hydrophoben Aminosäureresten, während an der Oberfläche vorwiegend geladene Reste vorhanden sind, die eine Interaktion mit anderen Proteinen und DNA erlauben. Die helikale Stabdomäne wird in die Subdomänen 1A, 1B, 2A und 2B unterteilt, wobei die Subdomäne 1B 42 zusätzliche Aminosäurereste aufweist, die spezifisch für die nukleären Lamine sind (Fisher et al., 1986; McKeon et al., 1986). Die  $\alpha$ -helikale Stabdomäne besteht aus Heptadwiederholungen (a,b,c,d,e,f und g) mit hydrophoben Aminosäuren an erster (a) und vierter Stelle (d). Die Positionen e und g weisen geladene Aminosäurereste auf, während die übrigen Positionen polar sind. Die daraus entstehende  $\alpha$ -helikale Struktur besitzt einen hydrophoben Saum an der Oberfläche flankiert durch geladene Aminosäurereste, so dass diese Struktur in der Lage ist, eine weitere  $\alpha$ -Helix zu binden. Die Bindung dieser beiden  $\alpha$ -Helices erfolgt in einer parallelen, nicht versetzten Weise, so dass die hydrophoben Seitenketten beider Helices miteinander interagieren können, während die hydrophilen Aminosäurereste nach außen in die wässrige Umgebung weisen. Als Folge dieser Anlagerung entsteht die typische coiled-coil Struktur der zentralen Stabdomäne (McKeon, 1987). Die Stabdomäne ist ebenfalls wichtig für die longitudinale Zusammenlagerung der eben beschriebenen Homodimere und ist flankiert von Phosphorylierungsstellen, die während der Mitose phosphoryliert werden und somit zur Depolymerisation der Lamine und zur Auflösung der Lamina führen (Heald and McKeon, 1990; Peter et al., 1990). Die carboxyterminale Domäne enthält ein Kernlokalisierungssignal (NLS), sowie ein für die Interaktion mit der Kernmembran wichtiges Tetrapeptid (CaaX; C = Cystein, a = aliphatische Aminosäure, X = S, M, C, A, Q, L). Während oder unmittelbar nach der Translation bilden die Lamine Homodimere durch head-to-tail-Anlagerung aus (Krohne et al., 1987 und 1998) und gelangen, während

sie bestimmte Modifikationen unterlaufen, an die innere Kernmembran. Die Homodimere bilden durch laterale Anlagerung antiparallele Protofilamente aus, die sich zu höhergeordneten filamentösen Strukturen zusammenlagern (Stuurman et al., 1998; Strelkov et al., 2004).

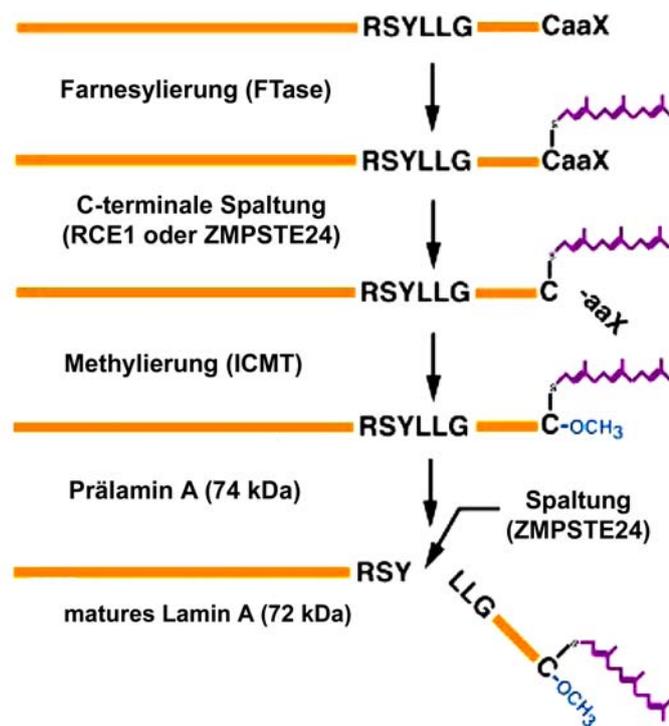


**Abbildung 1.3.:** Schematische Struktur der nukleären Lamine (oben) und zytoplasmatischen Intermediärfilamente (unten). Die  $\alpha$ -helikalen Stabdomänen werden flankiert durch eine globuläre nicht-helikale Kopf- und Schwanzdomäne. Die helikalen Segmente (1A, 1B, 2A und 2B), die in der Lage sind, zweisträngige  $\alpha$ -helikale coiled coil Strukturen auszubilden, werden durch die flexiblen Linkerregionen L1, L12 und L2 voneinander getrennt. Im Gegensatz zu zytoplasmatischen Intermediärfilament-proteinen besitzen die nukleären Lamine zusätzliche Heptadwiederholungen in der coil 1B (adaptiert aus Stuurman et al., 1998).

### 1.2.3. Prozessierung von Prälamina A

Prälamina A wird als Vorläufermolekül von Lamin A gebildet und muss sich, bevor es in die Lamina inkorporiert wird, bestimmten Modifikationen unterziehen. Wie auch Lamin B besitzt das Prälamina A ein CaaX Motiv am Carboxyterminus, das im Verlauf der Prozessierung verschiedene Modifikationsschritte durchläuft. Der erste Schritt besteht in der Addition eines Farnesyllipidrestes an die Thiolgruppe des carboxyterminalen Cysteins durch das zytosolische Enzym Farnesyltransferase (FTase). Daraufhin wird in einem zweiten Schritt das -aaX entweder durch ZMPSTE24 oder RCE1 proteolytisch abgespalten (Bergo et al., 2002, Corrigan et al., 2005). Der dritte Modifikationsschritt besteht in der Methylierung des freiliegenden Cysteins durch ICMT, einer Methyltransferase des endoplasmatischen Retikulums (Clarke et al., 1988, Dai et al., 1998). Die Isoprenylierung und Methylierung des carboxyterminalen Cysteinrestes ist verantwortlich für die Lokalisation des Lamin A und der B-Typ Lamine an die innere Kernmembran. Lamin A jedoch unterläuft eine weitere endoproteolytische Spaltung durch ZMPSTE24, so

dass 15 Aminosäuren einschließlich des carboxyterminalen Cysteinrestes entfernt werden (Weber et al., 1989; Beck et al., 1990; Corrigan et al., 2005). Durch diese zweite endoproteolytische Spaltung und Freisetzung des isoprenylierten Cysteinrestes wird das mature Lamin A aus dem Prälamina A freigesetzt, während Lamin B isoprenyliert bleibt. Das Vorhandensein bzw. Fehlen dieser Gruppe bedingt die unterschiedliche Löslichkeit von Lamin B und Lamin A während der Mitose.



**Abbildung 1.4.: Prozessierung von Prälamina A.** Prälamina A durchläuft am CaaX Motiv mehrere Modifikationsschritte, die zu der Freisetzung des maturated Lamin A durch Abspaltung eines ca 2 kDa farnesylierten Peptids führen (adaptiert aus Young et al., 2006).

### 1.3. Integrale Proteine der inneren Kernmembran

Die ersten integralen Membranproteine der inneren Kernmembran wurden durch ihre Fähigkeit an Laminae bzw. die Lamina zu binden, isoliert. Neuere Studien, die u.a. auf der Proteomanalyse (Schirmer et al., 2003) und der positionellen Klonierung (Bione et al., 1994) beruhen, weisen darauf hin, dass bis zu 80 verschiedene integrale Membranproteine in Säugetieren existieren. Durch ihre Vielfältigkeit und ihre Interaktionen mit Laminen, Chromatin und weiteren Kernkomponenten tragen sie bedeutend zur Organisation, Funktion und Struktur der Kernhülle, der Kernmatrix und des Chromatins bei. Zu den mittlerweile detailliert analysierten integralen Membranproteinen gehören der

Lamin B Rezeptor (LBR), Lamina-assoziierte Proteine 1 und 2, Emerin, MAN1, Nurim und UNC-84 (Holmer und Worman, 2001). Diese Proteine werden an Ribosomen synthetisiert, die an das Endoplasmatische Retikulum (E.R.) gebunden sind, und gelangen durch laterale Diffusion in die innere Kernmembran, wo sie durch Interaktionen mit anderen Kernhüllenkomponenten verankert werden (Blobel, 1980; Smith und Blobel, 1993; Furukawa et al., 1995; Soullam und Worman, 1993 und 1995; Ellenberg et al., 1997; Östlund et al., 1999; Tsuchiya et al., 1999).

### 1.3.1. Proteine der LEM-Domäne-Familie

Die LEM-Domäne ist ein Strukturmotiv, das aus etwa 43 Aminosäuren besteht und nach den Proteinen benannt ist, in denen es erstmals beschrieben wurde (LAP2 – Emerin – MAN1; Lin et al.; 2000). Die hochkonservierte aminoterminal Domäne weist in den nukleoplasmatischen Raum und vermittelt dort über das hochkonservierte BAF (barrier-to-autointegration) Protein eine Bindung an das periphere Chromatin (Furukawa, 1999; Cai et al., 2001). Das BAF Protein hat neben seiner strukturellen Rolle ebenso wichtige Funktionen bei der Repression der Genexpression, indem es transkriptionale Aktivatoren inhibieren kann (Holaska et al., 2003).

**Die Lamin-assoziierten Proteine (LAPs)** LAP1A, LAP1B, LAP1C und LAP2 wurden erstmals in Fraktionen der Kernmembran von Rattenleberkernen beschrieben (Foisner and Gerace; 1993). LAP1A, LAP1B und LAP1C weisen eine nahe Verwandtschaft auf und stellen alternative Spleißprodukte des gleichen Gens dar (Harris et al., 1995; Berger et al., 1996). Bei den fünf alternativ gespleißten LAP2 Isoformen (LAP2 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ ) handelt es sich mit Ausnahme von LAP2 $\alpha$  um integrale Membranproteine des Typ II, die eine gemeinsame carboxyterminale Transmembrandomäne und eine variable aminoterminal nukleoplasmatische Domäne aufweisen (Harris et al., 1995). Die membranassoziierten LAP2 Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$  binden vorwiegend an B-Typ Lamine (Yang et al., 1997; Gant et al., 1999). LAP2 $\alpha$  besitzt anstelle einer Transmembrandomäne eine lange spezifische carboxyterminale Domäne. Es weist eine nukleoplasmatische Lokalisierung unter Aussparung des Nukleolus

auf (Dechat et al., 1998) und bindet an A-Typ-Lamine. Die LAP2 Proteine werden wie andere Proteine der inneren Kernmembran auch während der Mitose phosphoryliert, wodurch sie ihre Verankerung an der Kernhülle verlieren und an Membranen des E.R. gebunden im Zytoplasma verteilt sind (Yang et al., 1997). Eine Ausnahme stellt LAP2 $\alpha$  dar, welches sich während der Metaphase in einem löslichen, cytoplasmatischen Pool befindet (Dechat et al., 1998).

**Emerin** besteht als integrales Protein der inneren Kernhülle aus einer nukleoplasmatischen, Serin-reichen aminoterminalen Domäne, einer Transmembrandomäne und einer sehr kurzen carboxyterminalen Domäne im perinukleären Bereich. Es konnte eine direkte Bindung des Proteins an Lamine nachgewiesen werden, wobei die Bindung an Lamin B1 weniger stark ist als an Lamin A/C (Fairley et al., 1999; Clements et al., 2000). In Lamin A/C knock-out Mäusen wird eine Fehllokalisierung des Emerins im E.R. beobachtet (Sullivan et al., 1999), was auf eine Abhängigkeit des Emerins von Lamin A bezüglich seiner Verankerung in der Kernhülle schließen lässt. Emerin wurde 1994 erstmals als ein 34 kDa Protein beschrieben, das durch das auf dem humanen X-Chromosom positionierte *EMD* (*STA*) Gen codiert wird. Durch Mutation dieses Gens wird die Muskelerkrankung Emery Dreyfuss Muskeldystrophie (EDMD) ausgelöst.

**MAN 1** ist ein ca. 82 kDa großes Protein der inneren Kernmembran, bestehend aus einer aminoterminalen Domäne, gefolgt von zwei hydrophoben Segmenten und einem carboxyterminalen Schwanz (Lin et al., 2000). Der N-terminale Bereich des Proteins interagiert mit Lamin A und Emerin *in vitro*. Der C-Terminus interagiert mit transkriptionalen Regulatoren wie Btf und GCL (Mansharamani et al., 2005) und mit R-Smads, Komponenten des TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor) Signalweges (Hellemans et al., 2004; Lin et al., 2005). MAN 1 spielt eine wichtige Rolle in frühen Entwicklungsstadien, wo es an der Laminbindung, Chromosomensegregation und Zellteilung beteiligt ist.

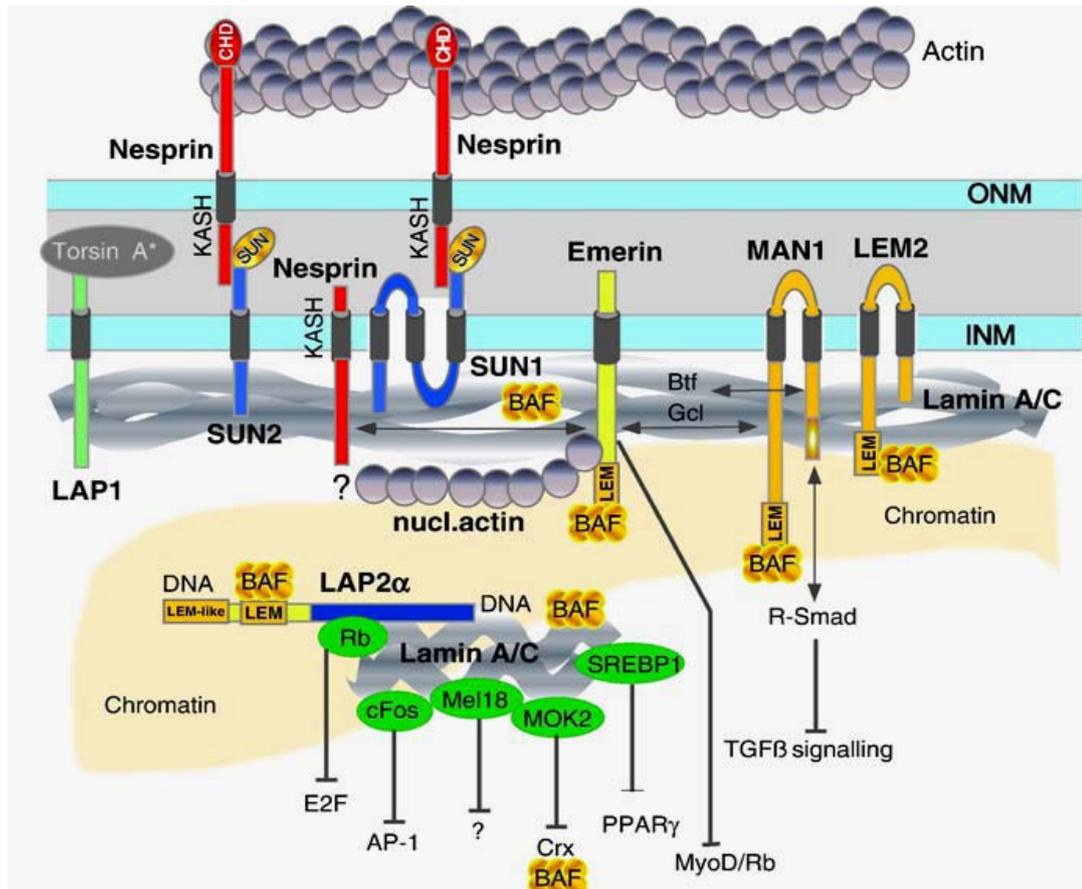


Abbildung 1.5.: Strukturelle Organisation der Kernmembran und deren integrale und nukleoplasmatische assoziierte Proteine sowie ihre potentielle Rolle bei der Chromatinorganisation und Genregulation (Vlcek et al., 2007).

### 1.3.2. Die Nesprine und deren Isoformen

Die in Vertebraten gefundenen Proteine Nesprin-1 und Nesprin-2 sowie deren orthologe Proteine MSP-300 aus *Drosophila melanogaster* und ANC-1 aus *Caenorhabditis elegans* gehören zur Familie der Aktin-bindenden Proteine des  $\alpha$ -Aktinin-Typs. Diese Proteine sind aufgebaut aus einer N-terminalen Aktin-bindenden Domäne (ABD) des  $\alpha$ -Aktinin-Typs, gefolgt von einer Stabdomäne mit einer großen Anzahl von Spektrinwiederholungen und einer Transmembrandomäne (KASH-Domäne) am C-Terminus. Die ABD-Domäne besteht aus zwei Calponin-Homologie (CH) Domänen, die in der Lage sind, filamentöses Aktin zu binden (Gimona et al., 2002). Die ABD-Domänen der Nesprine (Zhen et al., 2002) sowie die des Proteins Calmin (Ishisaki et al., 2001) unterscheiden sich jedoch von den herkömmlichen ABDs der Aktinbindenden Proteine des  $\alpha$ -Aktinin-Typs insofern, dass die beiden CH-Domänen durch eine 30 Aminosäuren lange Serin-reiche Linkerregion

voneinander getrennt sind, so dass eine eigene Familie innerhalb der  $\alpha$ -Aktinin Superfamilie postuliert wird. Der Serin-reiche Bereich könnte durch Phosphorylierung einen regulatorischen Einfluß auf die Bindungsaffinität von F-Aktin während verschiedener Prozesse wie u.a. der Migration von Zellen ausüben (Libotte et al., 2005). Die KASH-Domäne (**K**larsicht/**A**NC/**S**yne-1 **h**omology) besteht aus ca 35 Aminosäuren und stellt einen hochkonservierten Bereich innerhalb dieser Proteine dar. Sie ist verantwortlich für die Lokalisierung der Proteine an die Kernmembran.

Das Anc-1 Protein aus *C. elegans* ist ein großes Dystrophin-ähnliches Aktin bindendes Protein, das das Aktinzytoskelett mit der äußeren Kernmembran verknüpft. Mutationen in diesem Protein führen zu einer fehlerhaften Positionierung des Zellkerns und der Mitochondrien (Starr and Han, 2002), so dass deutlich wird, dass nicht nur Mikrotubuli und deren assoziierte Proteine in die Kernmigration involviert sind.

MSP-300 aus *D. melanogaster* lokalisiert an den Z-Linien der Muskeln, wird für die embryonale Muskelmorphogenese benötigt und das mutierte Protein verursacht einen Muskeldefekt (Rosenberg-Hasson et al., 1996; Volk, 1992; Zhang et al., 2002). Desweiteren spielt es eine wichtige Rolle bei der Aktin-abhängigen Verankerung des Nukleus während des zytoplasmatischen Transports (Yu et al., 2006).

Das Klarsicht-Protein von *D. melanogaster* verfügt ebenfalls über eine KASH-Domäne, besitzt jedoch keine weiteren Gemeinsamkeiten mit den oben genannten Proteinen. Es ist für einen regulierten embryonalen Lipidtransport entlang der Mikrotubuli und für die Kernmigration im Auge verantwortlich (Mosley-Bishop et al., 1999).

Nesprinisoformen wurden von verschiedenen Forschergruppen unterschiedlich benannt (syne-1, myne-1 für Nesprin-1; syne-2 und myne-2 für Nesprin-2) (Apel et al., 2000; Zhang et al., 2001, Mislow et al., 2002a), mittlerweile ist jedoch eine einheitliche Nomenklatur festgelegt und die Proteine werden als Nesprine (Nuclear envelope spectrin repet containing

proteins) bezeichnet. Das Nesprin-1 Protein, ursprünglich Syne-1 Protein genannt, wurde erstmals im „Yeast two Hybrid screen“ als Bindungspartner des MuSK Proteins, einer Tyrosinkinase an der postsynaptischen Membran von Muskelzellen, identifiziert (Apel et al., 2000). Das Nesprin-2 Protein (ebenso wie das Nesprin-1 Protein) wurde im Rahmen eines Screens nach Differenzierungsmarkern für vaskuläre glatte Muskelzellen (vascular smooth muscle cell; VSMC) detektiert (Zhang et al., 2001). Die Gene für die Proteine Nesprin-1 und Nesprin-2 sind sehr komplex und kodieren für mehrere Isoformen, die sich erheblich in ihrer Länge, Struktur und Lokalisierung innerhalb der Zelle unterscheiden (Zhang et al., 2001 und 2002; Zhen et al., 2002; Padmakumar et al., 2004). Das humane Gen für Nesprin-1 ist auf dem Chromosom 6q25 lokalisiert, das für Nesprin-2 auf Chromosom 14q22.1-23.3.

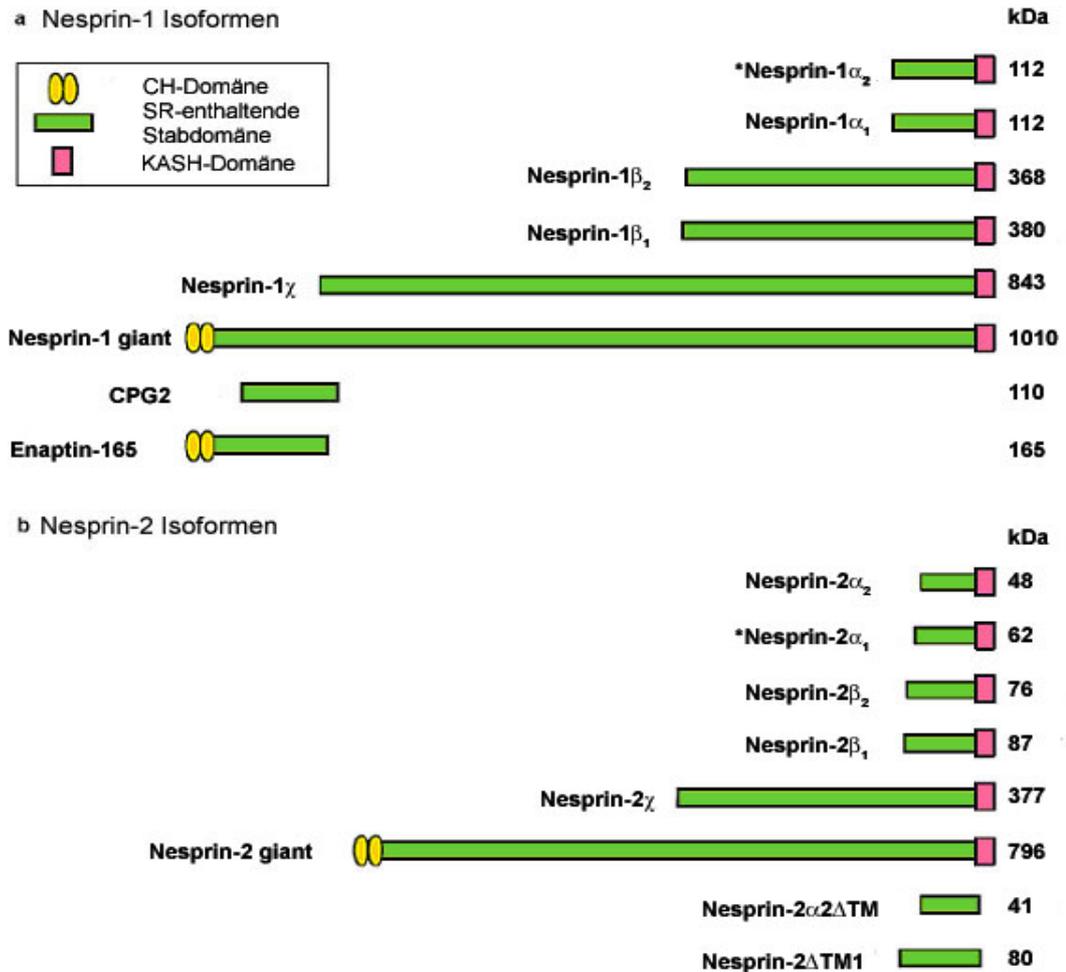
Bislang sind für Nesprin-1 acht verschiedene Isoformen bekannt. Dazu gehört das in unserer Arbeitsgruppe erstmals beschriebene 1001,4 kDa Protein Enaptin (Padmakumar et al., 2004), das auch Nesprin-1 Giant genannt wird. Die bislang bekannten weiteren Isoformen (Nesprin-1 $\alpha_1$ , Nesprin-1 $\alpha_2$ , Nesprin-1 $\beta_1$ , Nesprin-1 $\beta_2$ , Nesprin-1 $\chi$ , CPG2 und Enaptin-165) sind kleiner und verschiedene Isoformen variieren in ihrer Gewebsspezifität und subzellulären Lokalisierung (Zhang et al., 2001; Warren et al., 2005). So können Nesprin-1 Isoformen u.a. an F-Aktin-reichen Strukturen, an der Plasmamembran, Mitochondrien und im Nukleoplasma lokalisiert werden.

Das Nesprin-2 Protein besitzt ebenfalls acht bekannte Isoformen, wobei es sich bei der größten Isoform um das 796 kDa Protein Nesprin-2 Giant (auch NUANCE; Zhen et al., 2002) handelt. Weitere Isoformen sind das Nesprin-2 $\alpha_1$ , Nesprin-2 $\alpha_2$ , Nesprin-2 $\beta_1$ , Nesprin-2 $\beta_2$  und Nesprin-2 $\chi$ , die sich dadurch auszeichnen, dass sie zwar über die C-terminale KASH-Domäne, nicht jedoch über die N-terminale ABD-Domäne verfügen. Die Isoformen Nesprin-2 $\alpha_2\Delta$ TM und Nesprin-2 $\Delta$ TM1 bestehen nur aus der aus Spektrinwiederholungen bestehenden Stabdomäne.

Nesprin-2 ist sowohl an der äußeren (Zhen et al., 2002) als auch an der inneren Kernmembran lokalisiert (Libotte et al., 2005). Ebenso wurde auch

eine Lokalisation in verschiedenen zytoplasmatischen Kompartimenten wie Mitochondrien, dem Golgi-Apparat, dem sarkoplasmatischen Retikulum und Muskelsarkomeren beschrieben (Zhang et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass Nesprin-2 *in vivo* und *in vitro* an der inneren Kernmembran mit Lamin A/C und Emerin interagiert, wobei die Lokalisation von Nesprin-2 Lamin A/C abhängig ist. Die Lokalisation von Emerin an der inneren Kernmembran ist von Nesprin-2 abhängig; so konnte in RNAi-Studien gezeigt werden, dass der knock down von Nesprin-2 zu einer Umverteilung von Emerin in das E.R. führt (Libotte et al., 2005). Durch die Bindung der Nesprine an Lamin A/C und Emerin wird das Nukleoskelett und die innere Kernmembran mittels des sogenannten LINC Komplexes über den perinukleären Spalt hinweg mit der äußeren Kernmembran und des Zytoskeletts verbunden (Tzur et al., 2006).

Seit kurzem ist bekannt, dass neben Nesprin-1 und Nesprin-2 auch zwei Nesprin-3 Isoformen (Nesprin-3 $\alpha$  und Nesprin-3 $\beta$ ) existieren (Wilhelmsen et al., 2005). Im Gegensatz zu den beiden großen Nesprin-1 und -2 Isoformen besitzen die Nesprin-3 Isoformen jedoch keine N-terminale ABD-Domäne und sind somit nicht in der Lage, eine Bindung zu F-Aktin einzugehen. Diese Proteine sind über ihre KASH-Domäne in der äußeren Kernmembran verankert und für Nesprin-3 $\beta$  ist eine Bindung an Plektin, einem Mitglied der Plakin-Familie, bekannt. Durch seine Fähigkeit, an Plektin zu binden, kann eine Vernetzung zum Intermediärfilamentsystem geschaffen werden.



**Abbildung 1.6.: Domänenstruktur der verschiedenen Nesprin-1 und Nesprin-2 Isoformen, die durch alternative Initiation und Transkriptionstermination entstehen. \*, muskelspezifische Isoformen Nesprin-1 $\alpha_2$  und Nesprin-2 $\alpha_1$  (adaptiert aus Warren et al., 2005).**

### 1.4. Laminopathien

Die Laminopathien stellen eine Gruppe genetischer Erkrankungen dar, die dadurch geprägt sind, dass Mutationen des gleichen Gens zu einer Vielzahl gewebsspezifischer Erkrankungen mit unterschiedlicher phänotypischer Ausprägung führen. So sind mittlerweile über 211 Mutationen bekannt, die 10 verschiedene Erkrankungen verursachen. Die Laminopathien lassen sich in die primären und sekundären Laminopathien unterteilen; die primären Laminopathien entstehen durch Mutationen im *LMNA* Gen, die sekundären Laminopathien entstehen durch Mutationen im *FACE-1* Gen, das für das Enzym ZMPSTE24 codiert, welches an der Prozessierung von Prälamina A zu maturem Lamin A beteiligt ist (siehe Abb.1.2.3.).

### **1.4.1. Primäre Laminopathien**

Die primären Laminopathien lassen sich in fünf Gruppen einteilen, die entweder spezifisch einzelne Gewebe betreffen oder bei denen es sich um Fälle handelt (sog. systemische Laminopathien), bei denen die phänotypische Ausprägung mehrere Gewebe betrifft.

#### **1.4.1.1. Erkrankungen mit spezifischer Beteiligung der gestreiften Muskulatur**

60-70% der Fälle, die mit einer Mutation im *LMNA* Gen in Zusammenhang gebracht werden können, weisen eine Beteiligung der gestreiften Muskeln auf. Dazu gehört die Emery-Dreyfuss Muskeldystrophie, die sich in eine X-Chromosom gebundene Form (XL-EDMD) und eine autosomal rezessive Form (AR-EDMD) unterscheiden lässt (Helbling-Leclerc et al., 2002). XL-EDMD beruht auf einer Mutation des *EMD* Gens, das für Emerin codiert, während AR-EDMD durch Mutationen im *LMNA* Gen ausgelöst wird (Bione et al., 1994; Bonne et al., 1999). Die phänotypische Ausprägung beginnt in der Kindheit mit einem progressiv fortschreitenden Muskelabbau, Herzrhythmusstörungen und Kardiomyopathien (Emery, 1989). Eine weitere Erkrankung ist die sog. Dilatative Kardiomyopathie mit Reizleitungsstörung (DCM-CD), die sich durch eine Dilatation des Myokards und einer reduzierten systolischen Funktion auszeichnet (Fatkin et al., 1999). Interessanterweise ist ein Fall bekannt, bei dem die Erkrankung durch eine Mutation im *LAP2* Gen ausgelöst wird, wobei das mutierte LAP2 Protein eine verminderte Affinität zu den A-Typ Laminen aufweist (Taylor et al., 2005). Die Gliedergürtel-Muskeldystrophie Typ IB (LGMD1B) ist eine Erkrankung die durch Schwäche und Schwund der Muskeln im Schulter- und Beckenbereich gekennzeichnet ist. Interessanterweise werden fast alle beschriebenen Fälle durch eine Mutation an Position 377 (R377H) ausgelöst (Muchir et al., 2000; Charniot et al., 2003; Sebillon et al., 2003; Rudnik-Schoneborn et al., 2007).

#### **1.4.1.2. Erkrankungen mit Beteiligung des peripheren Nervensystems**

Die Charcot-Marie-Tooth Erkrankung lässt sich in eine autosomal rezessive und eine autosomal dominante Form differenzieren. Bei dem autosomal rezessiven Typ (CMT2B1) handelt es sich um eine demyelinierende Form, die

sich durch eine verlangsamte neuronale Signalweiterleitung auszeichnet (Bouhouche et al., 1999; De Sandre-Giovannoli et al., 2002). Die autosomale dominante axonale Form (AD-CMT2) ist gekennzeichnet durch muskuläre Dystrophie, kardiale Erkrankungen und partielle Lipodystrophie (Goizet et al., 2004).

#### **1.4.1.3. Partielle Lipodystrophien**

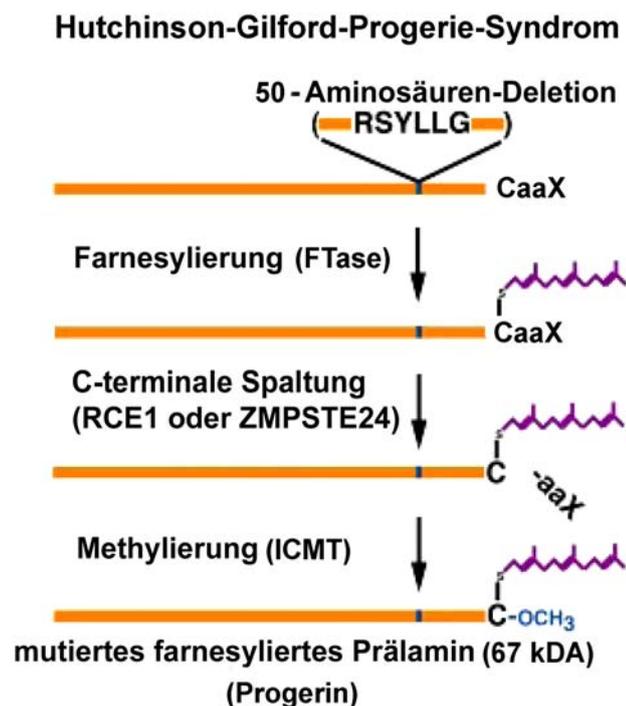
Patienten mit familiärer partieller Lipodystrophie des Dunnigan-Typs (FPLD) zeigen ab Beginn der Pubertät einen fortschreitenden Verlust des subkutanen Fettgewebes der Extremitäten, während Fettgewebe in Gesicht und Nacken akkumuliert. Die Patienten weisen eine Insulinresistenz auf und entwickeln häufig eine Glukoseintoleranz und Diabetes mellitus (Dunnigan et al., 1974).

#### **1.4.1.4. Systemische Laminopathien: Progerie-Syndrome**

##### **1.4.1.4.1. Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom**

Bislang sind vier verschiedene Erkrankungen bekannt, die zu Syndromen führen, die Kennzeichen des vorzeitigen Alterns aufweisen. Die bekannteste Erkrankung ist das Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom (HGPS), das 1886 erstmals beschrieben wurde (Hutchinson, 1886) und mit einer Inzidenz von 1:8 Millionen auftritt. In den ersten Lebensmonaten entwickeln sich die Patienten normal, die ersten Symptome zeigen sich ab einem Alter von 12 Monaten. Zur klinischen Symptomatik gehören eine Wachstumsretardation, Verlust des subkutanen Fettgewebes, Reduktion der Knochendichte, Arteriosklerose, eine verringerte Beweglichkeit der Extremitäten, sowie kraniofaziale Abnormalitäten wie Mikrognathie, hervorstehende Augen und Kahlköpfigkeit (Alopezie). Das durchschnittliche Lebensalter beträgt 13,4 Jahre, wobei als Todesursache normalerweise Myokardinfarkt oder Schlaganfall zu nennen ist (Sarkar et al., 2001). HGPS Patienten weisen keine erhöhte Tumorsuszeptibilität, Kataraktausbildung oder Anzeichen kognitiver Degeneration auf; Symptome, die häufig mit dem normalen Alterungsprozess assoziiert sind (Martin et al., 1989). 2003 wurde die Mutation, die HGPS verursacht, im *LMNA* Gen lokalisiert. Bei der Mutation handelt es sich um eine *de novo* Substitution; eine C-T Transition des Nukleotids 1824 der kodierenden Sequenz, die zu einem Polymorphismus im Codon 608 in Exon

11 führt. Die Mutation führt zu keinem Aminosäureaustausch (G608G), sondern es wird eine kryptische Spleißstelle eingeführt, die bewirkt, dass eine um 150 Nukleotide verkürzte mRNA synthetisiert wird, die zu einer internen Deletion von 50 Aminosäuren im Prälamina A führt. Diese Deletion betrifft die zweite Position für die endoproteolytische Spaltung von ZMPSTE24, so dass das mutierte Prälamina A (Progerin) eine permanent farnesylierte Form darstellt (De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003).



**Abbildung 1.7.: Abnormale Prozessierung von Prälamina A in HGPS.** Eine 50-Aminosäuren-Deletion im Prälamina A (Aminosäuren 607 bis 656) entfernt die Stelle für die zweite endoproteolytische Spaltung durch das Enzym ZMPSTE24. Als Folge dessen wird kein matures Lamin A synthetisiert und es akkumuliert ein mutiertes farnesyliertes Prälamina A (Progerin) in der Zelle (adaptiert aus Young et al., 2006).

#### 1.4.1.4.2. Atypisches Werner-Syndrom

LMNA Mutationen sind mit atypischen Formen des Werner-Syndroms assoziiert. Die klassische Form wird durch eine autosomal-rezessive Mutation im *WRN* Gen verursacht, das für eine 3'-5' RecQ DNA Helikase-Exonuklease kodiert und in die DNA-Reparatur involviert ist. Die Patienten leiden demnach häufig an Krebserkrankungen, andere Symptome sind Katarakte, Arteriosklerose und Diabetes. Die meisten Betroffenen sterben während des vierten Lebensjahrzehnts am Myokardinfarkt (Oshima, 2000; Fry, 2002;

Hickson, 2003). In 15% der Patienten konnten Mutationen im *LMNA*-Gen gefunden werden, die klinische Symptomatik schließt Alopezie, Osteoporose, Lipodystrophie, Diabetes und Muskelatrophie ein (Csoka et al., 2004; Plasilova et al., 2004).

#### **1.4.1.4.3. Mandibuloakrale Dysplasie**

Mandibuloakrale Dysplasie (MAD) ist eine seltene autosomal rezessive Erkrankung, die u.a. durch eine Wachstumsretardation, mandibuläre und klavikuläre Hypoplasie, dentale Abnormalitäten sowie ektodermale Defekte wie Hautatrophien, Alopezie und Nageldysplasien gekennzeichnet ist.

#### **1.4.1.4.4. Restriktive Dermopathie**

Die restriktive Dermopathie ist eine schwerwiegende Erkrankung, die innerhalb der ersten Woche nach der Geburt zum Tode der Patienten führt. Zur klinischen Symptomatik gehören eine intrauterine Wachstumsretardation, eine extrem straffe glänzende glatte Haut mit durchscheinenden Blutgefäßen, kaum ausgebildete bzw. fehlende Augenlider und -brauen sowie pulmonare Hypoplasie (Gillerot und Koulischer, 1987). Es sind neun Fälle bekannt, die durch eine Mutation im *LMNA* Gen entstehen, wobei die mRNA einen teilweisen bis vollständigen Verlust von Exon 11 aufweist. In weiteren Fällen, die zu den sekundären Laminopathien zählen, kommt es zu einer Mutation im *FACE-1* Gen, das das Enzym ZMPSTE24 codiert.

#### **1.4.1.5. Systemische Laminopathien**

Zurzeit sind vier Krankheitsbilder bekannt, bei denen eine Beteiligung verschiedener Gewebearten beobachtet wird. In der Literatur wurde 2005 ein einzigartiger Fall beschrieben, bei dem die Patientin einen Phänotyp aufwies, der sowohl die Symptome einer Myopathie als auch die einer progeroiden Erkrankung aufzeigte (Kirschner et al., 2005). Erste Symptome wie eine allgemeine Muskelschwäche und eine eingeschränkte Fähigkeit, die Kopfbewegungen zu koordinieren, zeigten sich im Alter von zehn Monaten. Weitere Untersuchungen zeigten einen erhöhten Serum-Kreatin-Kinase-Level, der mit einer Muskelatrophie in Verbindung gebracht werden konnte. Im Verlauf der Behandlung zeigten sich Symptome, die typisch für HGPS sind,

u.a. eine Wachstumsretardation, Verlust des subkutanen Fettgewebes, kraniofaziale Disproportionen und fortschreitende Alopezie. Eine Mutationsanalyse zeigte eine C428T Missense-Mutation im Exon 2 des *LMNA* Gens, die zu einer S143F Substitution führt.

Ein Patient, bei dem eine heterozygote *LMNA* R133L Mutation in Exon 2 gefunden wurde, weist einen kombinierten Phänotyp auf, der Kennzeichen des atypischen Werner Syndroms mit Symptomen wie generelle Lipoatrophie und Lebersteatose vereinigt (Caux et al., 2003). Mittlerweile sind zwei weitere Fälle mit der gleichen Mutation bekannt, bei denen die Patienten Symptome des atypischen Werner Syndroms aufweisen (Jacob et al., 2005).

Die Positionen R133 und S143 innerhalb des *LMNA* Gens sind hochkonserviert; sie befinden sich in der Region der Subdomäne 1B, die spezifisch für die nukleären Laminae ist.

### **1.5. Ziel der Arbeit**

Nesprin-2 gehört zur Familie der Spektrine und wurde 2001 erstmals beschrieben. Die Nesprin-2 Giant Isoform hat eine Größe von 796 kDa und besteht aus einer N-terminalen ABD-Domäne, einer Spektrinwiederholungen enthaltenden Stabdomäne und einer C-terminalen KASH-Domäne. Die Lokalisation von Nesprin-2 an der Kernhülle ist abhängig von einem intakten Lamin A/C Netzwerk. Um die Funktion des Nesprin-2 Giant Proteins zu analysieren, sollen primäre Zellen und Gewebe von Nesprin-2 Giant defizienten Mäusen sowie primäre *LMNA* S143F Fibroblasten auf ein verändertes Expressionsmuster und eine veränderte subzelluläre Lokalisation untersucht werden. Die Analyse der strukturellen Rolle des Nesprin-2 Giant Proteins bei der Aufrechterhaltung der Zellkernintegrität soll Hinweise darauf geben, ob Nesprine eine potentielle Rolle bei der Pathogenese von Laminopathien spielen. Zusätzlich soll der Einfluss von Nesprin-2 Giant auf Proteine der inneren Kernmembran untersucht werden, da diese eine wichtige Rolle bei der Genregulation spielen. Im Rahmen dieser Arbeit soll ein transgenes Mausmodell generiert werden, bei dem der Einfluss des Nesprin-2 Proteins auf die Pathogenese skelettmuskelspezifischer Erkrankungen untersucht werden kann.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Labormaterial

Corexröhrchen, 15 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
Elutip-d Säule	Schleicher & Schuell
Gewebekulturflaschen, 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup>	Nunc
Immobilon <sup>TM</sup> -P Transfermembran	Millipore
Kanülen	Terumo, Microlance
6-Loch Platte	Nunc
3MM Filterpapier	Whatman
0,05µm/13mm Filter (VMWP 01300)	Millipore
Nitrocellulose Transfermembran	Schleicher & 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
Elektroporationsgerät, Typ Gene-Pulser	BioRad
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
Kühlzentrifuge 1K15	Sigma
Laser Scan Mikroskop	Leica
Lichtmikroskop, IX70,	CK2 Olympus
Lichtmikroskop, DMR	Leica
Magnetrührer, IKA Combimag RCT	Janke & Kunkel
PCR-Maschine	MWG-Biotech
pH-Meter pH526	WTW
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
Speedvac concentrator DNA 110	Savant
Spektralphotometer, Typ Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech
Sterilbank Hera Safe	Heraeus
Ultraschallgerät UP200S	Dr. Hielscher GmbH
UV-Transilluminator	MWG-Biotech
Vacu-Blot System	Whatman Biometra
Zentrifuge Beckman Avanti J25	Beckman
Zentrifuge Sorvall RC 5C plus	Sorvall

**2.1.3. Kits**

ECL Advance™ Westernblotting Detection Kit	Amersham
Nucleobond AX 100 und 500	Macherey-Nagel
RNeasy® Mini Kit (50)	Qiagen
Cell Line Nucleofector Kit V	Amaxa
Basic Nucleofector Kit for primary fibroblasts	Amaxa
Advantage® 2 PCR Kit	Clontech
NucleoSpin Extract 2 in 1	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plus	Macherey-Nagel

**2.1.4. Puffer und Lösungen**10 x NCP-Puffer (pH 8,0):

12,1 g Tris

87,0 g NaCl

5 ml Tween 20

2,0 g Natriumazid

pH mit HCl auf 8.0 einstellen, mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.

PBG (pH 7,4):

0,5% Rinderserumalbumin

0,1% Fischgelatine

in 1 x PBS

Phosphatpuffer:

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

7,4	77,4	22,6
7,6	84,5	15,5
7,8	89,6	10,4
8,0	93,2	6,8

**Tab.2.1.: Herstellung von Phosphatpuffer**

20 x SSC:

3 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat

TE-Puffer (pH 8,0):

10 mM Tris/HCl, pH 8,0

1 mM EDTA

50 x Tris/Acetatpuffer (TAE), (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

**2.1.5. Chemikalien und Reagenzien**

Acrylamid (Protogel: 30:0,8 AA/Bis-AA)	National Diagnostics
Agar-Agar (BRC-RG)	Biomatic
Agarose (Elektrophoresis Grade)	Biozym
5-Amino-2,3-Dihydro-1,4-Phtalazindion (Luminol)	Sigma
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Adenosin-5'-triphosphat	Gerbu
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
Chelex-100	Bio-Rad

---

Chloroform	Riedel-de Haen
Coomassie-Brillant-Blau R250	Serva
p-Cumarsäure	Fluka
4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma
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
FTI-277	Calbiochem
Glycerin (Glycerol)	Riedel-de Haen
Glycin	Degussa
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
Magnesiumchlorid	Fluka
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Riedel-de Haen
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck

Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Fluka
Natriumcitrat	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat-dihydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Riedel-de Haen
Nukleotide	Roche, Sigma
Oligofectamin™	Invitrogen
Phalloidin (FITC/TRITC)	Sigma
Phenol	Roth
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'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck
Triton X-100 (Octylphenylpoly(ethylenglykolether))	Merck
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan-monolaurat)	Roth
Wasserstoffperoxid (30% ige Lösung)	Merck

### Radioaktive Chemikalien

$\alpha$ - <sup>32</sup> P-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat (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
Proteinase K	Merck
Restriktionsendonukleasen und Puffer	Amersham, Boehringer,

	Gibco-BRL, Life
	Technologie, 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-E-Cadherin (monoklonal aus Maus)	Zymed
anti-Emerin (monoklonal aus Maus)	Novacastra
anti-Emerin (polyklonal aus Kaninchen)	Acris
anti-G3G4 (monoklonal aus Maus)	DSHB
anti-GFP (mAb K3-184-2) (monoklonal aus Maus)	Schreiner, 2000
anti-Golgi (mAb GM130) (monoklonal aus Maus)	BD Transduction Laboratories
anti-HP1 $\beta$ (polyklonal aus Kaninchen)	Sigma
anti-Ki67 (monoklonal aus Maus)	Dako
anti-Keratin 1, 10, 14 (polyklonal aus Kaninchen)	Covance
anti-Lamin A/C (JOL2) (monoklonal aus Maus)	Chemicon
anti-Lamin A/C (sc-20681) (polyklonal aus Kaninchen)	Cell Signaling Technology
anti-LAP2 $\beta$ (monoklonal aus Maus)	BD Biosciences
anti-LAP2 $\alpha$ (polyklonal aus Kaninchen)	Prof. Dr. Foisner
anti-LAP2 (Clone 27) (monoklonal aus Maus)	BD Transduction Laboratories
anti- $\alpha$ 6 $\beta$ 4 Integrin (polyklonal aus Kaninchen)	Dr. Niessen
anti-Nesprin-1 (polyklonal aus Kaninchen)	Padmakumar, 2004
anti-Nesprin-2 (mAb K20-478-4) (monoklonal aus Maus)	Zhen et al., 2002
anti-Nesprin-2 (pAb K1) (polyklonal aus Kaninchen)	Zaim, 2005
anti-Nesprin-2 (mAb K56-286-2) (monoklonal aus Maus)	Zaim, 2005

anti- $\gamma$ -Tubulin (mAb WA3) (monoklonal aus Maus) Dr. Euteneuer

anti- $\gamma$ -Tubulin (GTU-88) (polyklonal aus Kaninchen) Sigma

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

Die Antikörper wurden gemäß Angaben der Hersteller in PBS verdünnt.  
Hybridoma-Überstände wurden unverdünnt eingesetzt.

**2.1.6.3. Inhibitoren**

Inhibitoren:

Benzamidin	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
PIC (Proteinase Inhibitor Cocktail)	Sigma
Ribonuklease-Inhibitor (RNAsin)	Promega

Antibiotika:

Ampicillin	Grünenthal
Kanamycin	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Biochrom

**2.1.7. Oligonukleotide****2.1.7.1. DNA-Oligonukleotide**Primer für MCK-dn Nesprin:

dn-N2F 5'CCACCATGTACCCATACGACGTCC

dn-N2R 5'GCCCATTTGGTGTACCTCAGCATG

Primer für RT PCR:

N2E1F 5'TGCTGCCCACGGAAGATGGAGAG

N2E5R 5'GGCCAGGCGCATCCTTCGAAT

mGAPDHF 5'GTCTACATGTTCCAGTATGACTCCACTCACGG

mGAPDHR 5'GTTGCTGTAGCCGTATTCATTGTCATACCAGG

**2.1.7.2. RNA-Oligonukleotide**Oligonukleotide für den knock down von Nesprin-2 Giant:

N2G Oligo A:

5'AACCAGAAGATGTGGATGTTGAAGCTTGAACATCCACATCTTCT

N2G Oligo B:

5'GATCAAAAAACCAGAAGATGTGGATGTTCAAGCTTCAACATCCA

**2.1.8. Vektoren**

pGem-Teasy®

Promega

pShag-1

**2.1.9. Plasmide**

eGFP-S143FLaminA/C

Dabauvalle, Würzburg

WT LamA

Dabauvalle, Würzburg

HA-tm Nuance

Zaim, 2005

pBluescript-MCK-Promotor

Larochelle, 1997

### 2.1.10. Bakterienstämme, Zell-Linien und primäre Zellen

#### Bakterienstämme:

*E. coli* DH5 $\alpha$  Hanahan, 1983  
XL1 blue

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

HaCaT, *Homo sapiens*, Epidermis (DKFZ, Heidelberg) Boukamp et al., 1988  
PAM212, *Mus musculus*, Epidermis Yuspa et al., 1980  
COS7, *Cercopithecus aethiops*, Niere Gluzman, 1981  
C3H10T1/2, *Mus musculus*, Dermis (TU Braunschweig) Reznikoff et al., 1973

#### primäre Zellen:

humane primäre Fibroblasten:

WT Wehnert, Greifswald  
LMNA S143F Kirschner et al., 2005  
LMNA R133L Caux et al., 2003  
LMNA G608G Eriksson et al., 2003

murine primäre Fibroblasten:

WT  
Nesprin-2 Giant KO

murine primäre Keratinozyten:

WT  
Nesprin-2 Giant KO

### 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.

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
MEM (Earle's Minimum Essential Medium + L-Glutamin)	GIBCO
DMEM High Glucose	GIBCO

Medium für primäre Keratinozyten:

350 ml DMEM Medium  
110 ml Ham's F12  
500 µl EGF  
500 µl Insulin  
50 ml 5mg/ml Hydrocortison  
5 µl Cholera toxin ( $10^{-5}$ M)  
10 ml Penicilin/Streptomycin  
50 ml FCS  
500 µl Adenin ( $1,8 \times 10^{-5}$ M)

Für die Weiterführung der Zellkultur-Linien COS7, HaCaT, und murinen primären Fibroblasten wurde DME Medium mit 10% FBS, 2 mM Glutamin, 2 mM Penicillin und 2 mM Streptomycin benutzt. Für die Weiterführung der humanen primären Fibroblasten wurde MEM plus L-Glutamin mit 15% FBS, 2 mM Glutamin, 2 mM Penicillin, 2 mM Streptomycin und 7,5% Bicarbonat

benutzt. Für die Weiterführung von PAM212 Zellen wurde DMEM High Glucose mit geringer Kalziumkonzentration (0,05 mM CaCl<sub>2</sub>) mit 10% FBS, 1 mM Pyruvat, 2 mM Glutamin; 50 µg/ml Streptomycin und 50 U/ml Penicillin 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 nach Machery-Nagel (2.2.2.). Hierzu wurden 1 ml einer *E. coli*-Übernacht-Kultur in LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthält, abzentrifugiert. Das Pellet wurde dabei in 150 µl der Lösung Puffer I (15 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert. Danach wurden 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 wurden bei diesem Reaktionsschritt die Zellwand und die Zellmembranen zerstört. Nach Zugabe von 150 µl Lösung Puffer III (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) wurden Proteine, chromosomale DNA und andere Zellbestandteile gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 12.000 rpm wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß mit 1 ml Ethanol (96%) überführt. Die durch Ethanolzugabe gefällte Plasmid-DNA wurde für 10 min bei 12.000 rpm pelletiert. Nach einem Waschschrift mit Ethanol (70%) wurde die Plasmid-DNA im „Speedvac concentrator“ getrocknet, in 10-20 µl Wasser aufgelöst und mit 2 µl RNase (10 mg/ml) behandelt.

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

Um bis zu 40 µg saubere Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen zu gewinnen (z.B. Proben für die Sequenzanalyse), wurde das „NucleoSpin Plus“-Kit von der Firma Macherey-Nagel benutzt. Hierzu wurden 5 ml einer *E. coli*-Übernachtkultur in LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt, abzentrifugiert. Das Pellet wird dabei in 250 µl der Lösung A1, die RNase enthält, resuspendiert. Danach wurden 250 µl der Lösung A2 hinzugegeben, drei- bis fünfmal geschüttelt und 5 min bei RT inkubiert. Infolge der SDS- und Alkalibehandlung wurden bei diesem Reaktionsschritt die

Zellwand und -membranen zerstört und die RNA durch die RNase verdaut. Nach Zugabe von 300 µl Lösung A3 wurde die Reaktionsmischung 5 min auf Eis inkubiert. Dadurch wurden Proteine, chromosomale DNA und andere Zellbestandteile gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 12.000 rpm und 4°C wurde der Überstand auf eine NucleoSpin-Säule gegeben. Es wurde 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert, wobei die Plasmid-DNA an das Säulenmaterial bindet. Anschließend wurde die Säule mit 500 µl Puffer AW und dann mit 600 µl Puffer A4 gewaschen. Danach wurde noch einmal zentrifugiert, um Ethanolreste des Puffers A4 zu entfernen. Zur Elution wurden schließlich 30 µl Lösung AE auf die Säule gegeben, 1 min bei RT inkubiert und dann 1 min bei 12.000 rpm 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 Bakterien-Übernachtskultur.

### 2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion 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. Um die template-DNA zu Beginn der Reaktion vollständig zu denaturieren, wird eine initiale Denaturierung von 5 min bei 94°C gewählt. Für den letzten Zyklus wird eine Elongationsdauer von 10 min benutzt, um vollständig synthetisierte Endprodukte zu erhalten. Die Annealing-Temperatur ( $T_H$ ) eines bestimmten Oligonukleotids wird anhand seiner Basenzusammensetzung folgendermaßen abgeschätzt (Suggs et al., 1981):

$$T_H = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T) - 2.$$

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

Standard-PCR-Programm:

I. Initiale Denaturierung: 94°C, 5 min

II. Temperaturzyklus (25-35 Zyklen):

- Denaturierung (94°C, 1 min)

- Primer-Annealing (x°C, abhängig vom Primer-Paar, 30 sek)

- Primer-Extension/DNA-Elongation (72°C, y sek, abhängig von der zu amplifizierenden Länge der DNA)

III. Terminale Verlängerung: 72°C, 10 min

IV. Kühlung auf 4°C

Reaktionsansatz:

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

1 µl Oligonukleotid A (10 pmol/ml)

1 µl Oligonukleotid B (10 pmol/ml)

1 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM)

5 µl 10 x PCR -Puffer (100 mM Tris/HCl (pH 8,3); 500 mM KCl; 20 mM 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 wird 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 Phenol 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 ist es möglich, die jeweiligen Konzentrationen von Plasmid-DNA und RNA in einer Agarose-Gelelektrophorese abzuschätzen. Sie werden durch Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und ermöglichen so eine Abschätzung der Menge durch Vergleich mit bekannten Konzentrationen. Gereinigte RNA wird bei -80°C, Plasmid-DNA wird bei -20°C gelagert.

### **2.2.5. DNA-Agarosegelelektrophorese**

Die Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten erfolgt aufgrund der vom Molekulargewicht abhängigen Laufgeschwindigkeit in einer Agarosegel-Matrix. Je nach Verwendung und Auftrennungsziel werden 0,7-2,5% ige Gele in TAE-Puffer (pH 8.0) verwendet. Zur Herstellung eines Agarosegels wurde die Agarose im Puffer aufgekocht, mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,1 µg/ml) und nach Abkühlung auf einen Gelträger verschiedener Größe (7,5 cm x 8 cm, 11,5 cm x 14 cm, 12,5 cm x 19 cm) mit Taschenformer gegossen. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und in die Probenaschen geladen. Die DNA-Auftrennung erfolgte in TAE-Puffer 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 3.000 rpm 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 12.000 rpm 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 5.000 rpm abzentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es folgten zwei Waschschrte mit je 600 µl und 200 µl Puffer NT3 und Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm. Nach erneuter Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit ohne Zugabe des Puffers NT3 wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt. Anschließend erfolgte die Elution mit 30 µl Puffer NE.

### **2.2.7. 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 et al., 1991)**

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde genomische DNA aus den Schwanzspitzen verwendet. Dazu wurden 0,5-1 cm lange Schwanzspitzen mit 500 µl TNES-Puffer über Nacht 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 dem Überstand wurden 500 µl 100% Ethanol gegeben, abzentrifugiert (12.000 rpm) und mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen. Danach wurden die Proben kurz getrocknet und mit 100 µl 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) resuspendiert. Die Analyse der genomischen DNA erfolgte mittels Southernblot. Von der DNA-Präparation wurden 15 µl für den Restriktionsverdau und die daran anschließende Southernblotanalyse eingesetzt.

#### TNES-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. Phenol/Chloroform-Aufreinigung von DNA**

Die isolierte DNA wurde in 300 µl Tris/HCl Puffer (pH 8,0) aufgenommen und 300 µl Phenol zugegeben. Nach kräftigem Schütteln wurde die DNA 5 min bei 12.000 rpm abzentrifugiert. Die DNA, die sich in der oberen wässrigen Phase befindet, wurde in ein Epicap mit einem Chloroform/Phenol-Gemisch (1/1) gegeben, geschüttelt und erneut abzentrifugiert. Der Überstand mit der DNA wurde auf 300 µl Chloroform gegeben, wieder geschüttelt und abzentrifugiert. Die aufgereinigte DNA wurde in ein Epicap überführt und die Reste des Phenols unter Vakuum abgedampft. Es wurde 1/10 des Volumens Natriumacetat (3 M, pH 5,2) sowie das dreifache Volumen Ethanol hinzugegeben und die DNA 30 min bzw. über Nacht bei -20°C gelagert. Die DNA wurde 30 min bei 12.000 rpm (4°C) zentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30-100 µl Tris/HCl Puffer, pH 8,0 aufgenommen. Die isolierte genomische DNA wurde bei 4°C gelagert.

### **2.2.10. Alkalischer Transfer der DNA für Southernblot (Olszewska und Jones, 1988)**

#### Depurinierungspuffer:

0,25M HCl

#### Denaturierungspuffer:

0,4M NaOH

#### Blotpuffer:

0,4M NaOH

1M NaCl

Für die Genotypisierung der Nesprin-2 Giant defizienten Mäuse wurde das Southernblot-Verfahren nach Olzewska und Jones (1988) angewendet. Dazu wurde die aus Schwanzspitzen isolierte DNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen (Sacl) geschnitten und danach auf einem 0,7% igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Beendigung des Gellaufs wurde das Gel zur späteren Größenbestimmung der Signale mit einem Lineal unter UV-Licht fotografiert. Das Gel wurde daraufhin jeweils 10 bis 15 Minuten in Depurinierungspuffer und Denaturierungspuffer gegeben. Das Gel wurde 30 Minuten zusammen mit der Nylonmembran (Zeta-Probe<sup>®</sup> Transfermembran) in dem Blotpuffer equilibriert. Der Transfer erfolgte mit dem Vacu-Blot System nach den Angaben des Herstellers für 90 min bei 50 mbar.

### **2.2.11. Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit dem Stratagene Prime It II<sup>®</sup> Kit**

Die zur Markierung verwendete DNA wurde mit Restriktionsenzymen aus Plasmiden geschnitten. Es wurden ungefähr 25 ng DNA mit Wasser zu einem Endvolumen von 24 µl aufgefüllt und mit 10 µl „randomoligo nucleotide primer“ versetzt. Die Sonde wurde fünf Minuten auf 95°C erhitzt, zwei Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend mit 10 µl 5x Primer-Puffer, 5µl α-32P-dATP (50 µCi) und 2U Klenow-Enzym versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Zentrifugation bei 3.000 rpm für zwei Minuten über eine 1 ml Sephadex G-50-

Säule in Wasser abgetrennt. Die radioaktiv markierte Probe wurde vor ihrem Einsatz in der Southernblotanalyse bei 98°C für fünf Minuten denaturiert, fünf Minuten auf Eis abgekühlt und danach mit 20 ml Hybridisierungspuffer gemischt.

#### **2.2.12. Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden im Southernblot**

Die Nylonmembran wurde in einer Hybridisierungsröhre 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 100 µl denaturiertem Heringssperma DNA (10mg/ml; Sigma) zur Lösung gegeben. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Probe zur Vorhybridisierungslösung erfolgte die Hybridisierung über Nacht bei 65°C. Danach wurde die radioaktive Probe abgossen 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

### **2.2.13. *In vitro* Rekombination von DNA**

#### **2.2.13.1. Hydrolytische Spaltung der DNA durch Restriktionsendonukleasen**

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

#### **2.2.13.2. 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 wurde in einem 20  $\mu\text{l}$  Ansatz 1-2  $\mu\text{g}$  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  $\text{MgCl}_2$

#### **2.13.3. 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 den benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden. Im Falle kohäsiver Enden wird das zu klonierende Fragment in mindestens fünffachem molarem Überschuss zum Vektor eingesetzt. Dafür wurden in einem 10  $\mu\text{l}$  Ansatz 1-2  $\mu\text{g}$  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  $\text{MgCl}_2$

50 mM DTT

10 mM ATP

#### **2.2.13.4. Primer-Hybridisierung für RNAi Konstrukte**

Die beiden Oligonukleotide wurden mit Wasser verdünnt, so dass sie eine Konzentration von 0,05  $\mu\text{M}$  aufweisen. 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  $\mu\text{l}$  Oligonukleotid 1

1  $\mu\text{l}$  Oligonukleotid 2

48  $\mu\text{l}$  Annealing-Puffer

##### Annealing-Puffer:

100 mM KAc

30 mM HEPES/KOH (pH 7,4)

2 mM MgAc

Nach der Hybridisierung der Primer werden wie in 2.2.13.5. beschrieben, die 5'-Enden der Primer-Dimere phosphoryliert.

#### **2.2.13.5. Phosphorylierung der 5'-Enden der Primer-Dimere**

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

##### Reaktionsansatz:

2  $\mu\text{l}$  der Primer-Hybridisierungs-Reaktion

1  $\mu\text{l}$  T4 Polynukleotidkinase

1  $\mu\text{l}$  1 mM ATP

1  $\mu\text{l}$  T4 Polynukleotidkinase-Puffer

5  $\mu\text{l}$  Wasser

#### **2.2.14. Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugetierzellen mit einem Qiagen Kit**

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

#### **2.2.15. Reverse Transkriptase-Reaktion**

Die reverse Transkriptase (RT) ist ein Enzym, das die RNA in DNA umschreibt. 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 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt und nach dem folgenden Protokoll in cDNA transkribiert:

0,5 µl 10 mM dNTP-Mix

1 µl 50 µM  $p(dN)_6$

0,5 µl M-MLV-Transkriptase

2 µl 5 x RT-Puffer

0,5 µl RNAsin (40 U/µl)

1 µg Gesamt-RNA

mit Wasser auf 10 µl auffüllen und 1 Std bei 37°C inkubieren.

### **2.2.16. RNA-Agarose-Gelelektrophorese (Lehrach et al., 1977)**

Vor der 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 (60°C), hergestellt wurden. Die RNA wurde durch Zugabe von 1/3 Volumen RNA-Puffer und fünf-minütiger Inkubation bei 68°C denaturiert. Nach Zugabe von RNA-Ladungspuffer wurde die RNA in die Probenaschen geladen. Die RNA-Auftrennung erfolgte horizontal in Flachbett-Gelapparaturen mit MOPS-Laufpuffer (pH 7,0).

#### 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

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

#### **2.2.17.1. 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 wurde in 250 ml LB-Medium bei 18°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 angezogen. Die Kultur wurde für 10 min auf Eis inkubiert und danach 10 min bei 2.500 x rpm und 4°C pelettiert. Das Zell-Pellet wurde in 80 ml eiskaltem Transformations-Puffer in einem Eisbad resuspendiert, um danach wieder abzentrifugiert zu

werden. Das Zell-Pellet wurde 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 wurden 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.

#### **2.2.17.2. Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen**

Ein Aliquot der chemokompetenten *E. coli*-Zellen wurde auf Eis angetaut und mit 0,1-0,5 µg Plasmid-DNA oder eines Ligationsansatz versetzt. Nach dreißig-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 30 sek auf 42°C erhitzt und sofort danach wieder für 2 min auf Eis gekühlt. Danach wurden die Zellen mit 1 ml SOC-Medium versetzt und für 1 Std bei 37°C inkubiert. Aliquots von 50, 100 und 500 µl wurden auf entsprechende Selektionsagarplatten ausplattiert.

#### **2.2.18. *E. coli*-Dauerkulturen**

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

#### **2.2.19. Aufreinigung von DNA für die Mikroinjektion**

Zur Generierung eines dominant negativen Mausmodells wurde ein Konstrukt wie in 3.3.1. beschrieben hergestellt. Das Insert MCK-HA-tm-Nu hat eine Größe von 1.835 bp und muss vor der Mikroinjektion aufgereinigt werden, um eine höchstmögliche Reinheit zu garantieren. Dazu wurde das Insert mit dem Enzym *SpeI* aus dem pBluescript Vektor herausgeschnitten und über das

„NucleoSpin Extract 2 in 1“- Kit der Firma Macherey-Nagel aufgereinigt. Danach folgte wie in 2.2.9. beschrieben eine Extraktion über Phenol und Chloroform. Zur Präzipitation wurde die DNA über Nacht bei -20° C gelagert. Anschließend wurde das DNA-Pellet für 30 min bei 9.000 rpm herunterzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen und für 10 min bei 4.800 rpm zentrifugiert. Nach der Trocknung des Pellet bei RT wurde es in 200 µl „Elutip Low Salt Buffer“ nach den Angaben des Herstellers (Schleicher und Schuell) resuspendiert. Eine Elutip-d Säule wurde nach den Angaben des Herstellers präpariert und mit 2-3 ml „Low Salt Buffer“ equilibriert. Die DNA wurde auf die Säule gegeben. Das Eluat wurde aufgefangen und erneut auf die Säule gegeben. Die Säule wurde mit 2 bis 3 ml „Low Salt Buffer“ gewaschen und mit 600 µl „High Salt Buffer“ eluiert. Die DNA wurde in 2x Volumen Ethanol über Nacht präzipitiert. Die DNA wurde anschließend 30 min bei 12.000 rpm abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Die aufgereinigte DNA wurde in 30 µl Injektionspuffer (10 mM Tris, pH 7,4, 0.1 mM EDTA) aufgenommen. Drei Löcher einer 6-Loch Platte wurden mit je 5 ml Injektionspuffer gefüllt und ein 13 mm Filter (VMWP 01300, Millipore) so hineingegeben, dass sie auf der Oberfläche schwimmen. Die DNA wurde als Tropfen auf den ersten Filter gegeben, nach 20 Minuten wurde die Flüssigkeit vorsichtig mit der Pipette aufgenommen und auf dem zweiten Filter platziert. Nach 20 Minuten wurde die DNA wiederum auf den dritten Filter umgesetzt. Die DNA Konzentration wurde abgeschätzt und bis zur Mikroinjektion bei -20° aufbewahrt. Die Mikroinjektion wurde durch das Mikroinjektionslabor des ZMMK durchgeführt.

### **2.2.20. siRNA knock down Strategie**

Der RNA-Interferenz kompetente Vektor pShag-1 (besitzt humanen U6 Promotor; -265 bis +1) wurde in den pTOPO-ENTR/D Vektor (Invitrogen) inseriert (Paddison et al., 2002; [http://kathadin.cshl.org:9331/RNAi\\_web/scripts/main2.pl](http://kathadin.cshl.org:9331/RNAi_web/scripts/main2.pl)). Die Oligonukleotide A und B (2.1.7.2.) wurden nach dem Protokoll auf <http://kathadin.cshl.org:9331/homepage/portal/html/protocols/> erstellt. Die Oligonukleotide wurden hybridisiert (2.2.13.4.) und in den mit *BseRI/BamHI* geschnittenen pShag-1 Vektor ligiert.

## **2.3. Proteinchemische Methoden**

### **2.3.1. Proteinlysate aus Zellen**

#### Lysispuffer:

50 mM Tris-HCl, pH 7,5

150 mM NaCl

1% Nonidet-P40

0,5% Natriumdesoxycholat

PIC (Proteinase Inhibitor Cocktail, 100x)

Zellen einer 90% konfluent bewachsenen Schale wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 5 ml PBS mit Inhibitoren (DTT, Benzamidin, EGTA, PMSF je 1 mM) abgeschabt. Die Zellen wurden fünf Minuten bei 3.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in Lysispuffer gelöst (zwei bis vierfaches Pelletvolumen). Zur Homogenisierung wurde das Lysat fünfmal durch eine 0,4 mm Kanüle gezogen. Nach einer viertelstündigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat ultrabeschallt (50% konstanter Schall, 10 sec). Die Proben wurden in 5x SDS-Probenpuffer (2.3.3.) aufgekocht und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

### **2.3.2. Proteinlysate aus Geweben**

#### Lysispuffer:

Siehe 2.3.1.

Die frisch isolierten Gewebe wurden in eiskaltem PBS gewaschen und Reste des Fettgewebes entfernt. Sie wurden daraufhin in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gewebeproben wurden gewogen und pro 100 mg Gewebe 400 µl Lysispuffer zugegeben. Die Proben wurden mit dem ULTRA TURRAX homogenisiert, 10 bis 20 min auf Eis inkubiert und daraufhin durch eine 0,4 mm Kanüle gezogen bzw. sonifiziert (50% konstanter Schall, 10 sec) und mit 5x SDS-Probenpuffer aufgekocht (2.3.3.). Die Gewebelysate wurden bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

### 2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Größenaufftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE wurde unter denaturierenden Bedingungen in 10-15% igen Trenngelen (Tab. 2.2.) oder 3-15% igen Gradientengelen (Tab. 2.3. und Tab. 2.4.) durchgeführt. Die aufzutrennenden Proteinlösungen wurden je nach Bedarf mit 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und fünf Minuten bei 95°C inkubiert. In der Regel wurden 10-25 µl Proteinlösung in jede Probentasche 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

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

	10% SDS-Trenngel	12% SDS-Trenngel	15% SDS-Trenngel	Sammelgel (5%)
Acrylamid (30%)	20 ml	24 ml	30 ml	4 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	15,1 ml	15,1 ml	15,1 ml	-
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	-	-	-	2,4 ml
SDS-Lösung (10%)	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 2.2. Lösungen zur Herstellung von 12 Minigelen für SDS-Page

	<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>SDS-Lösung (10%)</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 2.3. Stocklösungen für Gradientengele

	<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 µl	8 µl	16 µl
<b>10% APS</b>	15 µl	15 µl	30 µl

Tabelle 2.4. Zusammensetzung eines Gradientengels für Hoeffer SE 260 (1,5 mm Dicke)

### 2.3.4. Färbung von Polyacrylamidgelen

#### 2.3.4.1. Färbung mit Coomassie-Blau

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

#### Färbelösung:

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

50% (v/v) Methanol

10% (v/v) Essigsäure

Danach wird die Färbelösung filtriert.

#### Entfärbelösung:

10% (v/v) Ethanol

7% (v/v) Essigsäure

### **2.3.4.2. Silberfärbung (Blum et al., 1987)**

Für eine Färbung der aufgetrennten Proteine mit einer sensitiveren Methode wie unter 2.3.4.1. beschrieben, wurde die Silberfärbung benutzt. Dazu wurden SDS-Gele 5 min in Fixierungs-Lösung geschüttelt. Nach mehrmaligem Waschen in Wasser (3 x 5 sek, 1 x 5 min, 3 x 5 sek) wurde das Gel in 50% igem Azeton für 5 min inkubiert. Nach Behandlung mit 100 µl 10% igem Natriumthiosulfat-5-hydrat in 60 ml Wasser wurde das Gel mit Wasser gewaschen (3 x 5 sek) und für 8 min in Imprägnier-Lösung geschüttelt. Danach wurde das Gel nochmals gewaschen (2 x 5 sek) und mit Entwickler-Lösung behandelt. Die Reaktion wurde nach 20-30 sek mit der Stopp-Lösung abgestoppt und das Gel mit Wasser abgespült.

#### Fixierungs-Lösung:

60 ml 50% ige Azeton-Lösung

1,5 ml 50% ige Trichloressigsäure

25 µl 37% ige Formaldehyd-Lösung

#### Imprägnier-Lösung:

0,8 ml 20% ige Silbernitrat-Lösung

0,6 ml 37% ige Formaldehyd-Lösung

in 60 ml Wasser.

#### Entwickler-Lösung:

1,2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

25 µl 37% ige Formaldehyd-Lösung

25 µl 10% ige Natriumthiosulfat-5-hydrat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ )

in 60 ml Wasser.

#### Stop-Lösung:

1% ige Essigsäure

### **2.3.5. Übertragung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Westernblot) nach Towbin (1979)**

#### **2.3.5.1. Transfer auf Nitrocellulosemembranen im Halbtrocken-Verfahren**

Proteine mit einem Molekulargewicht bis zu 150 kDa wurden mit dem Semi-Dry- Transfer-Verfahren (Halbtrocken-Transfer) auf Membranen übertragen. Dazu wurde das Gel auf eine mit Towbin-Puffer befeuchtete Nitrocellulosemembran überführt und auf drei mit Towbin-Puffer getränkte 3 MM Whatman-Filterpapiere gelegt. Der Stapel mit dem Gel wurde luftblasenfrei auf die Anode der Blotkammer gelegt. Der Stapel wurde mit drei weiteren, in Towbin-Puffer getränkten, 3 MM Whatman-Filterpapieren überschichtet. Dann wurde die Kammer mit der Kathode verschlossen und der Transfer über 30-60 min bei 10 V durchgeführt.

#### Towbin-Puffer:

Glycin (39 mM)

Tris/HCl pH 8,3 (48 mM)

SDS (0,0375%)

Ethanol (20%)

#### **2.3.5.2. Transfer auf Nitrocellulosemembranen im Nassverfahren**

Besonders für Proteine mit einem Molekulargewicht über 150 kDa ist das Semi-Dry-Verfahren (2.3.5.1.) nicht sehr effizient. Daher werden größere Proteine wie Nesprin-2 im Nassverfahren transferiert. Auf eine Anode wurden zwei mit Transferpuffer getränkte 3 MM Whatman-Filterpapiere gelegt. Darauf wurden die PVDF-Membran (Immobilon™-P Transfermembran) und das Proteingel luftblasenfrei aufgelegt. Das Gel wurde mit zwei weiteren 3 MM Whatman-Filterpapieren abgedeckt und mit der Kathode zusammengedrückt. Um eine gleichmäßige Druckverteilung zwischen Membran und Gel zu gewährleisten, wurde unmittelbar an den Elektroden je ein Schwamm mit eingebunden. Der Transfer erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Blotkammer über drei Tage bei 4 °C und 10 V. Nach dem Transfer wurde 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

20% Ethanol

### **2.3.6. Färbung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen**

Nach dem Blotting-Verfahren wurden die Proteine reversibel mit Ponceau-S-Farbstoff gefärbt. Dies geschieht einerseits, um die Effizienz des Blottens zu überprüfen, andererseits bietet sich so auch die Möglichkeit, den Molekülgrößenmarker zu kennzeichnen. Die Membran wurde dazu für 1-5 min in Ponceau-Färbelösung (1:20 in Wasser verdünnt) geschüttelt. Anschließend wurde sie kurz unter fließendem Wasser abgespült. Sobald Proteinbanden sichtbar wurden, wurden die Banden des Molekülgrößenmarkers dauerhaft markiert. Die vollständige Entfärbung der Membran erfolgte durch NCP-Puffer oder Block-Puffer wie in 2.3.7. beschrieben.

### **2.3.7. Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose**

Nach dem Protein-Transfer wurde die Nitrocellulosemembran 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 (dreimal für 10 min). Danach erfolgte die Inkubation der Membran für 1 Std mit einem sekundären Antikörper, der an Peroxidase gekoppelt ist. Anschließend wurden nicht gebundene Antikörper durch 3 x 10 min Waschen mit Waschpuffer entfernt. Die Immunmarkierung wurde mit Hilfe von Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Dabei oxidiert die an dem 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

### **2.3.8. 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 1 geschüttelt und anschließend mehrmals mit NCP-Puffer ausgiebig gewaschen. Die Membran steht nun für eine erneute Immunmarkierung und Detektion von Proteinen (2.3.7.) zur Verfügung.

Stripping-Puffer 1:

0,2 M NaOH

Führt die oben beschriebene Methode nicht zu einer ausreichenden Entfernung des primären Antikörpers, kann die Membran für 30 min bei 50°C in einem Stripping-Puffer 2, der β-Mercaptoethanol enthält, inkubiert werden. Anschließend wurde die Membran mit NCP-Puffer gewaschen und konnte für eine neue Immundetektion benutzt werden.

Stripping-Puffer 2:

100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
2% Natriumdodecylsulfat  
62,5 mM Tris/HCl (pH 6,7)

**2.3.9. Immunpräzipitation**Lysispuffer:

50 mM Tris/HCl (pH 7,5)  
150 mM NaCl  
1% Nonidet P-40  
0,5% Natriumdesoxycholat  
1xPIC  
1 mM DTT  
1 mM Benzamidin  
0,5 mM PMSF

PBS mit Inhibitoren:

PBS

je 1 mM DTT, Benzamidin, EGTA, PMSF

Die Immunpräzipitation ist eine wichtige biochemische Methode bei der Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen unter *in vivo* Bedingungen. Dabei wird das zu untersuchende Protein aus einem komplexen Lysat mit einem spezifischen Antikörper präzipitiert. Die mit diesem Protein interagierenden Proteine können dabei ko-präzipitiert und durch anschließende Westernblotanalyse identifiziert werden.

Zwei mit PAM212 Keratinozyten konfluent bewachsene 15 cm Kulturschalen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit je 5 ml PBS und Inhibitoren abgeschabt. Die Zellen wurden für 5 min bei 3.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml Lysispuffer resuspendiert. Die Zellen wurden fünfmal zur Zerstörung der Zellmembranen durch eine 0,4mm-Kanüle gezogen und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer zehnssekündigen Ultraschallbehandlung (50% konstanter Schall) wurde das Lysat 10 Minuten bei 12000 rpm abzentrifugiert. Während

der Zentrifugation wurden die Protein A-Sepharose Beads fünfmal mit Lysispuffer gewaschen. Der Überstand der Zellen wurde zur Vorreinigung auf 50 µl Protein A-Slurry gegeben, 2 h moderat geschüttelt, 1 min bei 1.000 rpm zentrifugiert und die Beads verworfen. Für die Antigen-Antikörper-Bindung wurde 5 µg aufgereinigter mAb K56-386-2 Antikörper bzw. mAb GFP zum Überstand gegeben und die Ansätze 1 h moderat bei 4°C geschüttelt. Die gereinigten Überstände wurden auf 150 µl Protein A-Sepharose-Beads gegeben und die Ansätze 4 h oder über Nacht moderat bei 4°C geschüttelt. Nach Zentrifugation (1 min, 1.000 rpm) wurde 50 bis 100 µl des Überstandes entnommen (Input) und mit 5x SDS-Probenpuffer aufgekocht. Die Beads wurden dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen und in 2x SDS-Probenpuffer aufgekocht. Zur weiteren Analyse wurden die Lysate wie beschrieben einer Silberfärbung (2.3.4.2.) und einer Westernblotanalyse mit pAb K1 und mAb K56-386 unterzogen.

### **2.3.10. Sequentielle Salzextraktion**

Wildtyp (WT) und *LMNA* S143F, R133L und G608G Fibroblasten (konfluent bewachsene Schalen) wurden zweimal mit eiskaltem Tris/HCl (10 mM; pH 7,4) gewaschen und mit je 5ml PBS und Inhibitoren (DTT, Benzamidin, EGTA, PMSF je 1 mM sowie 40 µg/ml Digitonin) abgeschabt und die Zellen bei 3.000 rpm abzentrifugiert. Die Zellkerne wurden sequenziell in oben beschriebenen Puffer, supplementiert mit 0,1% Triton-X 100, und ansteigenden Salzkonzentrationen (50, 150, 250 und 500 mM NaCl extrahiert. Nach jedem Extraktionsschritt wurde der Überstand vom Pellet durch einen Zentrifugationsschritt bei 1.000 rpm, 5 min abgetrennt. Der jeweilige Überstand wurde in 5x SDS-Probenpuffer aufgekocht und das Pellet in dem Puffer mit der nächsthöheren Salzkonzentration resuspendiert.

## **2.4. Immunhistologische Methoden**

### **2.4.1. Präparation von Gefrierschnitten**

Wildtyp (WT) und Nesprin-2 Giant defiziente sowie MCK-dn-Nesprin-2 Mäuse wurden durch Äther/Chloroform (im Verhältnis 1:1) betäubt und getötet. Anschließend wurde die Haut bzw. Skelettmuskelproben entnommen und für Gefrierschnitte in Tissue-Tek-Einbett-Lösung (Sakura) auf Trockeneis

eingefroren. Die Blöcke wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Anfertigung von Gefrierschnitten erfolgte bei einer Temperatur von ca.  $-18^{\circ}\text{C}$  in einem Kryostat (Leica). Dabei wurde Schnitte mit einer Dicke von  $7\ \mu\text{m}$  erstellt. Die Schnitte wurden auf Objektträger überführt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## **2.5. Zellbiologische Methoden**

### **2.5.1. Isolierung primärer Keratinozyten und Fibroblasten aus neugeborenen Mäusen**

Ein bis drei Tage alte Mäuse wurden dekapitiert, mit 70% igen Ethanol desinfiziert und in PBS gewaschen. Danach wurde die Rückenhaut isoliert und mit der Dermis nach unten auf Dispase ( $10\ \text{mg/ml}$  in PBS) gelegt und über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach der Dispasebehandlung ließ sich die Epidermis mit einer Pinzette von der Dermis abziehen.

Für die Isolierung der primären Keratinozyten wurde die Epidermis 10 min in Trypsin bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und daraufhin in Medium überführt. Mit einer Pipette wurde die Epidermis dann etwa 20-mal unterspült und so die Keratinozyten aus der Epidermis herausgelöst. Die Zellsuspension wurde daraufhin in 6 cm Schalen auf Feederzellen ausplattiert. Als Feederzellen dienen 3T3 Fibroblasten, die einer zweistündigen Mitomycinbehandlung ( $10\ \mu\text{g/ml}$ ) unterzogen wurden. Um die Differenzierung der Keratinozyten zu verhindern, wurden sie in einem speziellen Medium mit niedrigem Kalziumgehalt kultiviert. Die Zellen wurden zweimal in der Woche mit frischen Feederzellen gefüttert und das Medium dreimal in der Woche gewechselt.

Für die Isolierung der Fibroblasten aus der Dermis wurden diese mit einem Skalpell stark zerkleinert und intensiv mit einer Pipette in 10 ml DMEM-Medium ( $4.500\ \text{mg/ml}$  von GIBCO) resuspendiert. Die Suspension wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, so dass größere Gewebestücke sich absetzen können. Die Überstände mit den isolierten Fibroblasten wurden entnommen und in 6 cm Schalen überführt.

### **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 in entsprechendem Medium (siehe 2.1.11.2.) kultiviert. Die Zellen wurden alle 2 bis 14 Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit 1 ml/10 mm<sup>2</sup> Schale 0,05% Trypsin/EDTA abgelöst (ca. 3 min bei 37°C). Die Zellen wurden im Verhältnis 1:2 bis 1:10 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 Kryo-Röhrchen erfolgte bei -70°C oder in flüssigem Stickstoff. Aufgetaut wurden die Zellen zügig bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen sofort in Medium gegeben.

#### Einfriermedium:

70% DMEM

20% FBS

10% DMSO

### **2.5.4. Fluoreszenzmikroskopie**

#### **2.5.4.1. Fixieren und Permeabilisieren von Säugetierzellen**

Auf Deckgläschen ausgesäte Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur mit 25 µl 3% Paraformaldehyd in PBS für 15 min fixiert und mit 25 µl 0,5% Triton X-100 in PBS für 5 min permeabilisiert. Danach wurden die Deckgläschen 3 x mit PBS gewaschen und konnten für die Fluoreszenz-mikroskopie verwendet werden.

#### **2.5.4.2. Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie**

Mit Hilfe dieser Methode lässt sich die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen in fixierten Zellen nachweisen. Dabei werden die zu untersuchenden Proteine mit ihren korrespondierenden Antikörpern markiert und indirekt nachgewiesen, indem der erste Antikörper mit einem fluoreszierenden zweiten Antikörper gekoppelt wird, 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 10 min mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit sekundärem Antikörper für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 x für 10 min mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden 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. Wundheilungsexperimente**

Nesprin-2 Giant defiziente primäre dermale Fibroblasten und Wildtyp Fibroblasten wurden auf Deckgläschen in 24-Lochplatten in serumhaltigem Medium kultiviert und nach Erreichen der Konfluenz über Nacht in serumfreiem Medium gehalten. Mit einer gelben Pipettenspitze wurde ein Schnitt in die Zellschicht gemacht, serumhaltiges Medium zugegeben und die Zellen 6 Std. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen fixiert und der indirekten Immunfluoreszenz unterzogen.

### **2.5.6. BrdU-Inkorporation**

#### **2.5.6.1. BrdU-Inkorporation in primäre Fibroblasten**

Wildtyp und Nesprin-2 Giant defiziente primäre dermale Fibroblasten wurden auf Deckgläschen in 24-Lochplatten in serumhaltigen Medium kultiviert und über einen Zeitraum von 2 h mit 10 µg/ml BrdU (5'-bromo-2'-deoxyuridin) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen wie oben beschrieben fixiert und permeabilisiert. Um das inkorporierte BrdU Antikörpern zugänglich zu machen, wurden die Zellen 30 min mit 2 M HCl inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen, 1 Std. mit Blockpuffer inkubiert und des

weiteren wie oben beschrieben die indirekte Immunfärbung mit dem primären G3G4 Antikörper durchgeführt.

### **2.5.6.2. *In vivo* BrdU-Inkorporation**

Für die BrdU-Inkorporation in lebende Mäuse wurde BrdU abhängig vom Körpergewicht der Mäuse gespritzt (10µg /g Körpergewicht). Nach 2 h wurden die Mäuse wie in 2.4.1. beschrieben weiterbehandelt.

## **2.5.7. Transfektion von Säugetierzellen**

### **2.5.7.1. Transiente Transfektion von Säugetierzellen durch Elektroporation**

Cos7 Zellen und CH310T1/2 Zellen ( $5 \times 10^6$ ) wurden in 200 µl Medium aufgenommen und mit 10 µg hochreiner Plasmid DNA in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und dann bei 950 µF und 200 V elektroporiert. Die Zellen wurden daraufhin 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden die Zellen in 15 ml Medium aufgenommen, in eine 10 cm Zellkulturschale gegeben und im Brutschrank kultiviert. HaCaT Zellen und primäre murine Fibroblasten wurden mit der Amaxa Nucleofector Technologie entsprechend der Angaben des Herstellers (Amaxa Biosystems) transfiziert. Humane Wildtyp Fibroblasten wurden mit dem Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Invitrogen) transfiziert.

## **2.6. Morphometrische Analyse**

### **2.6.1. Bestimmung des nukleären Kontur-Verhältnisses**

Um das Ausmaß der Deformationen von Zellkernen zu bestimmen, wurden die Zellen fixiert, mit Nesprin-2 Giant spezifischen Antikörpern gefärbt und die Nuklei mit DAPI sichtbar gemacht. Für die statistische Analyse wurden jeweils zwischen 300 und 1500 Zellen ausgewertet. Für die morphometrische Analyse wurde die nukleäre Fläche und der Perimeter der Zellen mit der Leica FW4000 Software ausgewertet. Ausgehend von den erhaltenen Daten kann das nukleäre Kontur-Verhältnis ( $4\pi \times \text{Fläche} / \text{Perimeter}^2$ ) bestimmt werden

(Goldman et al., 2004), das Aussage über die Form des Zellkerns geben kann. Der maximal erreichbare Wert des Kontur-Verhältnisses für einen Kreis ist 1; Zellkerne, die eine ellipsoide Form besitzen, haben einen Wert zwischen 0,8 und 0,85. Bei zunehmender Deformation des Zellkernes sinkt das Kontur-Verhältnis gegen 0.

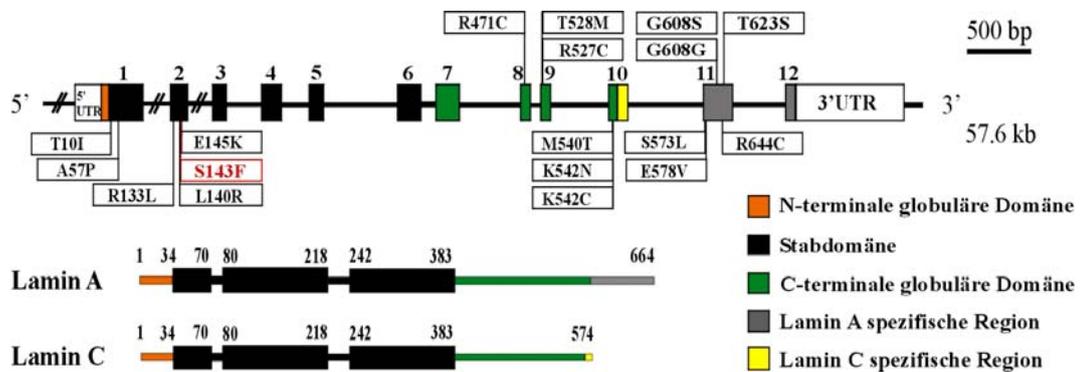
Für die Darstellung der relativen Häufigkeit der berechneten Kontur-Verhältnis-Werte wurden diese in Cluster von 0,025 eingeteilt und ermittelt, wie häufig (in %) diese Werte innerhalb der untersuchten Zellpopulation auftreten. Die ermittelten Häufigkeiten wurden relativ zum Wert 1 dargestellt. Auf diese Weise lässt sich eine genaue Darstellung der Streuung der Kontur-Verhältnis-Werte ermitteln und damit zeigt sich sowohl die Häufigkeit als auch das Ausmaß der Deformationen innerhalb einer spezifischen Zellpopulation.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Charakterisierung von *LMNA* S143F Fibroblasten

##### 3.1.1. Schematische Darstellung der Namen und Positionen von *LMNA* Mutationen in progeroiden Erkrankungen

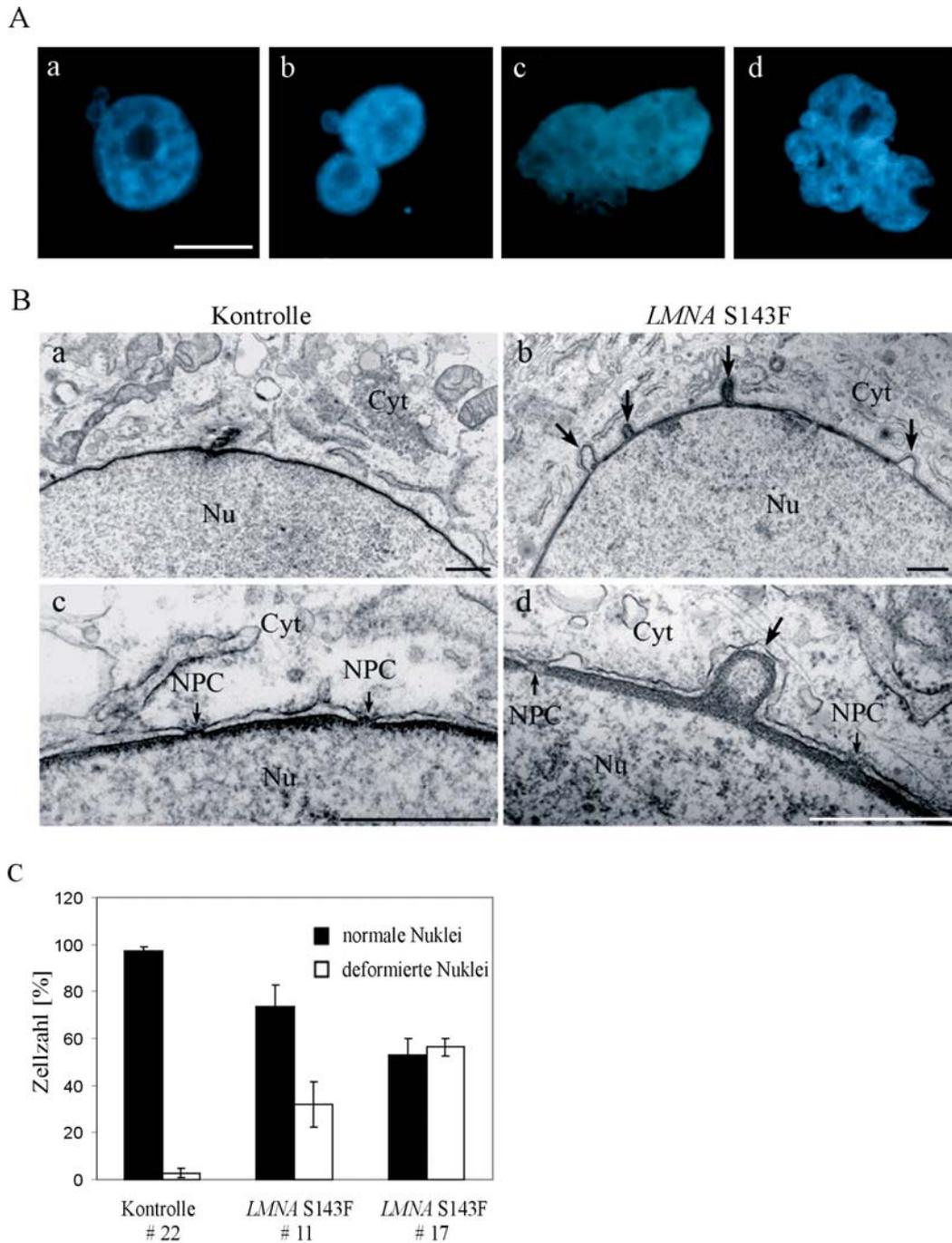
Von den über 200 bekannten Mutationen innerhalb des *LMNA* Gens, die zu verschiedenen gewebsspezifischen Erkrankungen führen, verursachen 18 Mutationen progeroide Erkrankungen, die mit einer vorzeitigen Vergreisung des Patienten einhergehen. Um einen Eindruck von der Position der *LMNA* S143F Mutation zu gewinnen, wurden die funktionellen Domänen sowie die dafür kodierenden Exons schematisch dargestellt (Abb.3.1.).



**Abbildung 3.1.: Schematische Darstellung der Namen und Positionen von *LMNA* Mutationen in progeroiden Erkrankungen (S143F in rot).** Gezeigt sind die funktionellen Domänen der Lamin A/C Isoformen sowie die entsprechenden Positionen der korrespondierenden Aminosäurereste. Die *LMNA* Exons, die für die jeweiligen Domänen kodieren, sind farblich identisch dargestellt.

Die Position S143 liegt in Exon 2 innerhalb einer Heptadwiederholung der Subdomäne 1B, die spezifisch für die nukleären Lamine ist. Während ein Großteil der bekannten Mutationen im C-terminalen Bereich des Lamin A/C Proteins lokalisiert ist und damit innerhalb des für Lamin A spezifischen Bereich liegt, ist die S143F Mutation im N-terminalen Bereich lokalisiert und betrifft damit den für Lamin A und Lamin C gemeinsamen Bereich der Stabdomäne. Die funktionelle Signifikanz dieser Region wird durch die Tatsache hervorgehoben, dass in unmittelbarer Nähe drei weitere Mutationen (R133L, L140R, E145K) gefunden wurden, die ebenfalls mit progeroiden Syndromen assoziiert sind.



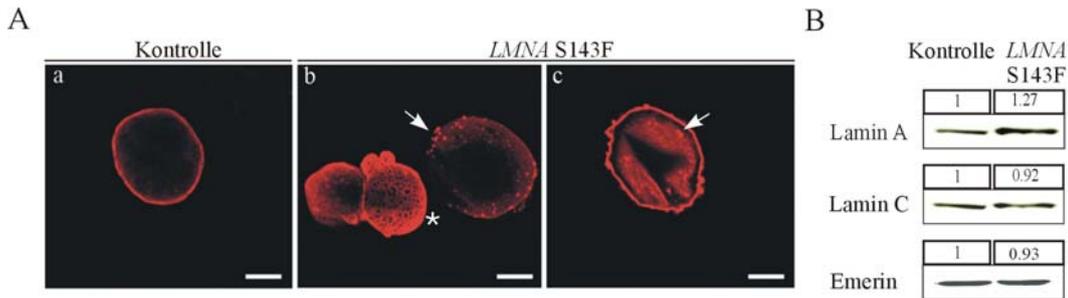


**Abbildung 3.3.: Veränderungen der nukleären Morphologie in *LMNA S143F* Fibroblasten.** (A) Färbung der nukleären DNA mit DAPI zeigt Deformationen verschiedenen Ausmaßes. Balken, 10  $\mu$ m. (B) Elektronenmikroskopische Analyse zeigt die Aufrechterhaltung der Nuklearhüllenstruktur innerhalb der Ausstülpungen (b, d) sowie eine gleichmäßige Verteilung der Kernporenkomplexe entlang der Kernmembran (d) verglichen mit der Kontrolle (a, c). Balken, 1  $\mu$ m. NPC: Kernporenkomplexe, Nu: Nukleus, Cyt: Zytoplasma (C) Statistische Analyse zeigt eine Akkumulation der Deformationen mit steigender Passage in *LMNA S143F* Fibroblasten. Ausgewertet wurden jeweils 300 Zellen.

Bereits mit geringer Passage (# 11) weisen 31,9% der Fibroblasten eine aberrante Zellkernmorphologie auf, wobei sowohl die Ausstülpung kleinerer Blasen als auch die Ausbildung schwerer Deformationen zu beobachten ist.

Während die Kontrollfibroblasten selbst in höherer Passage (# 22) nur geringe Deformationen aufweisen, akkumulieren diese in den *LMNA* S143F Fibroblasten, so dass in höheren Passagen (# 17) 56,4 % der Zellen deformierte Nuklei aufweisen (Abb.3.3.C). Eine elektronenmikroskopische Analyse der *LMNA* S143F Fibroblasten (Kooperation mit S. Kandert, Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie und T. Kleinhenz, Institut für Humangenetik, Universität Würzburg) zeigte, dass die Veränderungen der Kernhülle auf den Bereich der Ausstülpungen beschränkt sind (Abb.3.3.B; Pfeil in b), wobei diese nicht durch eine Ablösung der äußeren von der inneren Nuklearmembran und der damit verbundenen Vergrößerung des perinukleären Raumes entstehen (Abb. 3.3.B; großer Pfeil in d). Innerhalb der Ausstülpungen bleibt die enge Assoziation der Kernhülle mit der Kernlamina und dem Chromatin intakt. Die Kernporenkomplexe weisen in den *LMNA* S143F Fibroblasten keine strukturellen Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle auf (Abb.3.3.B; Pfeile in c) und sind gleichmäßig über die Kernoberfläche verteilt (Abb.3.3.B; Pfeile in b und kleine Pfeile in d).

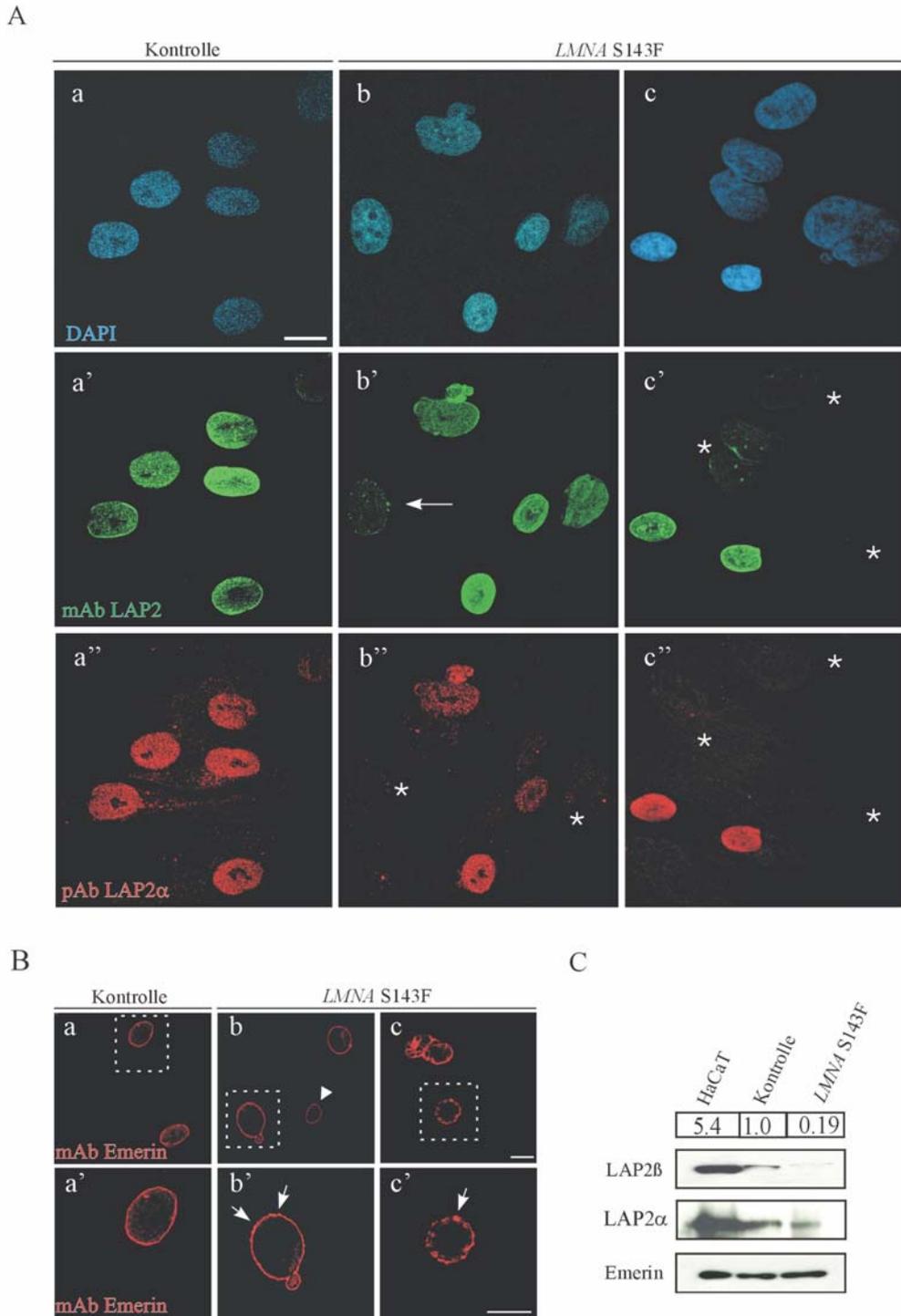
Um die subzelluläre Lokalisation und Organisation von A-Typ Laminen zu untersuchen, wurde eine indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen Lamin A/C durchgeführt (Abb.3.4.A). Kontrollzellen weisen eine gleichmäßige Verteilung von Lamin A/C an der Kernmembran auf (Abb.3.4.A; a), während in *LMNA* S143F Zellen Veränderungen von Lamin A/C zu beobachten sind. Diese treten in Form von Aggregaten an der Kernmembran sowie im Nukleoplasma auf (Abb.3.4.A; Pfeile in b und c) und häufig lässt sich die für Progeriezellen beschriebene Honigwabenstruktur der Lamina beobachten (Abb.3.4.A; Stern in b). Eine Westernblotanalyse von Zellextrakten der *LMNA* S143F Fibroblasten zeigt keine Veränderungen des Expressionsniveaus und -musters verglichen zur Wildtypkontrolle (Abb.3.4.B).



**Abbildung 3.4.: LMNA S143F Fibroblasten weisen Veränderungen in der Lamin A/C Lokalisation, nicht aber im Expressionsniveau auf.** (A) Indirekte Fluoreszenzmikroskopie mit einem LamA/C mAb zeigt die abnormale Lokalisation von Lamin A/C in Form von Aggregaten an der Kernmembran (b; Pfeil) und im Nukleoplasma (c; Pfeil) sowie die Ausbildung der sog. Honigwabenstruktur (b; Stern). Balken, 10 µm. (B) Westernblotanalyse der Zellextrakte von Kontrollfibroblasten und LMNA S143F Fibroblasten. Eine densitometrische Analyse zeigt keine signifikante Veränderung in der Menge von Lamin A und Lamin C. Emerin dient als Ladekontrolle.

### 3.1.3. Abnormale Lokalisation und Expression der Proteine der LEM-Domäne-Familie in LMNA S143F Fibroblasten

Die korrekte Lokalisation und Funktion integraler Proteine der inneren Kernmembran wird über die nukleoplasmatischen Domänen dieser Proteine vermittelt. Die nukleoplasmatischen Domänen binden an Lamine und können direkt oder indirekt über das hochkonservierte BAF Protein eine Bindung zu Chromatin eingehen (Furukawa et al., 1998 und 1999). Da LMNA Mutationen diese Interaktionen stören, wurde die Organisation und Lokalisation der zur LEM-Domäne-Familie gehörenden Proteine LAP2 $\alpha$ , LAP2 $\beta$  und Emerin untersucht. LAP2 $\alpha$  und LAP2 $\beta$  sind strukturell und funktionell verschiedene Isoformen des gleichen Gens. Eine indirekte Immunfluoreszenzanalyse mit einem LAP2 spezifischen mAb, der die verschiedenen LAP2 Isoformen erkennt, zeigt, dass im Gegensatz zum Wildtyp (WT) die Lokalisation und Expression in den LMNA S143F Fibroblasten gestört ist (Abb.3.5.A; a', b', c'). Häufig ist eine Aggregation an der Kernmembran zu erkennen, was auf eine Mislokalisierung des sich an der inneren Kernmembran befindenden LAP2 $\beta$  Proteins hinweist (Abb.3.5.A; Pfeil in b'). Ebenso wird häufig eine schwächere Anfärbung des Nukleoplasmas (LAP2 $\alpha$ ) beobachtet (Abb.2.5.A; Sterne in c'). Ein spezifischer Antikörper gegen diese nukleoplasmatische Isoform zeigt deutlich eine Abschwächung bzw. einen Verlust der Färbung (Abb.3.5.A; Sterne in b'' und c''). Emerin, ein weiteres Protein der inneren Kernmembran, weist in vielen LMNA S143F Fibroblasten ebenfalls eine Aggregation auf

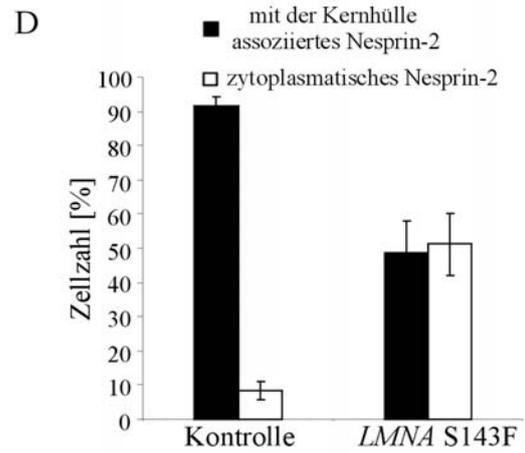
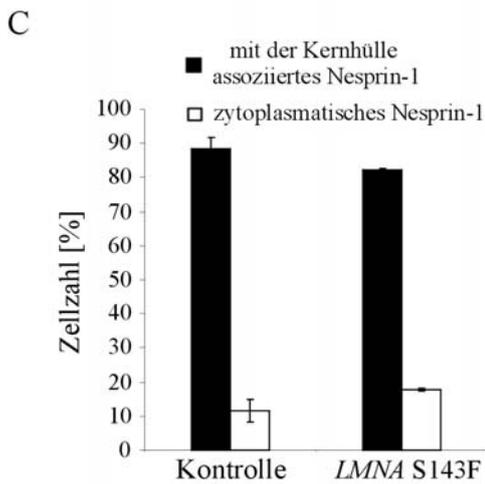
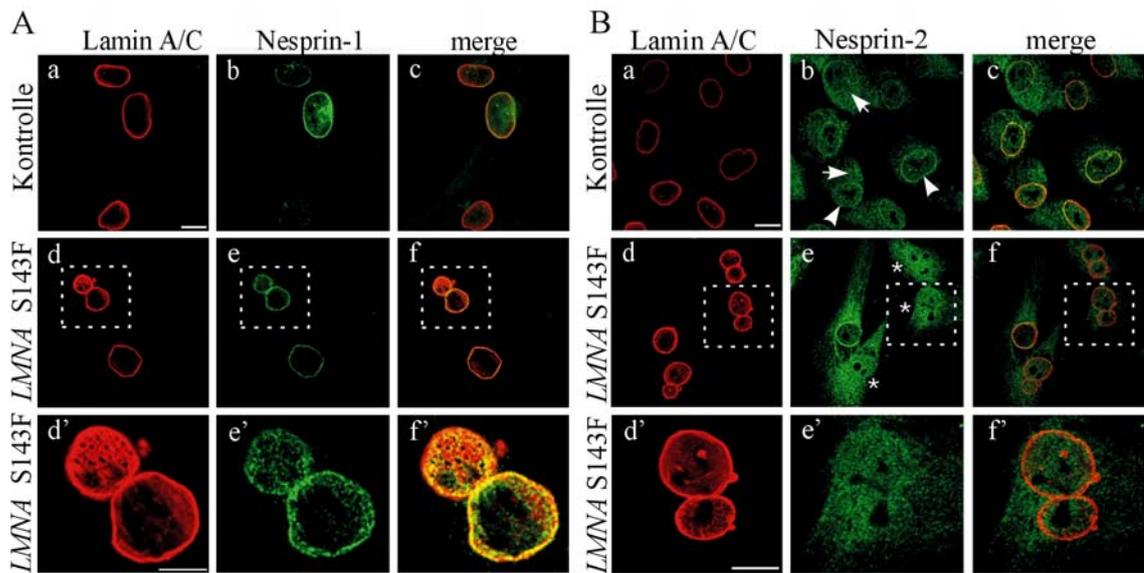


**Abbildung 3.5.: Lokalisation und Expression der Proteine der LEM-Domäne-Familie.** (A) Anormale Lokalisation der LAP2-Isoformen in LMNA S143F Fibroblasten. Kofärbung von Kontroll- und Patientenzellen mit spezifischen mAb LAP2 und pAb LAP2 $\alpha$  Antikörpern zeigt eine Aggregation (b'; Pfeil) entlang der Kernmembran (LAP2 $\beta$ ) und eine Reduktion bzw. den Verlust (c', b'', c''); Sterne) der nukleoplasmatischen Färbung (LAP2 $\alpha$ ). Balken: 10  $\mu$ m. (B) Aggregation von Emerin an der Kernmembran. Indirekte Immunfluoreszenzanalyse mit mAb Emerin zeigt eine Akkumulation in vielen LMNA S143F Fibroblasten (b', c'; Pfeile). Balken: 10  $\mu$ m. (C) Westernblotanalyse der Zellextrakte von Kontroll- und Patientenfibroblasten. Die densitometrische Analyse zeigt eine 5-fach verminderte LAP2 $\beta$  Expression verglichen zur Kontrolle. Während die LAP2 $\alpha$  Expression in LMNA S143F Fibroblasten leicht verringert ist, bleibt die Emerin-Expression unverändert. HaCaT-Zellysate dient als interne Kontrolle.

(Abb.3.5.B; b' und c'). In einer Westernblotanalyse (Abb.3.5.C) zeigt sich, dass *LMNA* S143F Fibroblasten nur 1/5 des LAP2 $\beta$  Expressionslevels im Vergleich zur Kontrolle aufweisen. Für LAP2 $\alpha$  kann eine leichte Reduktion des Expressionslevels nachgewiesen werden, während die Expression von Emerin unverändert ist.

### **3.1.4. Die *LMNA* S143F Mutation beeinflusst die Lokalisation der Nesprin-2 Proteine**

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass die Lokalisation von Nesprin-1 und Nesprin-2 an der Kernmembran von einem intakten Lamin A/C Netzwerk abhängt (Libotte et al., 2005; Zhang et al., 2005). Immunfluoreszenzanalysen mit einem polyklonalen Nesprin-1 Antikörper gegen den C-Terminus zeigen, dass sowohl in Kontrollfibroblasten (Abb.3.6.A; b) als auch in den *LMNA* S143F Fibroblasten (Abb. 3.6.A; e und e') Nesprin-1 an der Kernhülle lokalisiert ist und dort mit Lamin A/C kolokalisiert (Abb.3.6.A; c, f, f'). In Immunfluoreszenzen mit dem gegen den C-Terminus gerichteten polyklonalen Nesprin-2 Antikörper (pAb K1) dagegen lassen sich deutliche Unterschiede zwischen Kontroll- und Patientenfibroblasten erkennen. Während in den Kontrollfibroblasten Nesprin-2 durchgehend sowohl an der Kernhülle (Abb.3.6.B; Pfeilspitzen in b) als auch zytoplasmatisch lokalisiert ist (Abb.3.6.B; Pfeil in b), zeigt sich in den Patientenfibroblasten eine veränderte subzelluläre Lokalisation. In den Patientenzellen, die eine normale Kernmorphologie aufweisen, lässt sich Nesprin-2 wie in der Kontrolle deutlich an der Kernhülle und im Zytoplasma nachweisen (Abb.3.6.B; e). In den deformierten Nuklei dagegen ist Nesprin-2 nicht an der Kernhülle lokalisiert (Abb.3.6.B; Sterne in e und Vergrößerung in e') und kolokalisiert nicht mit Lamin A/C (Abb.3.6.B; f und f'). In einer statistischen Analyse wurde die veränderte subzelluläre Lokalisation des Nesprin-2 Proteins evaluiert. Während in Kontrollfibroblasten 91,6% der Zellen eine Lokalisation des Nesprin-2 Proteins an der Kernhülle aufweisen, sinkt der Anteil bei den *LMNA* S143F Fibroblasten auf 48,7%. Für die zytoplasmatische Lokalisation des Nesprin-1 Proteins lässt sich im Vergleich zur Kontrolle lediglich ein geringer Anstieg von 6,1% nachweisen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die *LMNA* S143F Mutation insbesondere die Nesprin-2 Lokalisation an der Kernhülle beeinträchtigt wird.

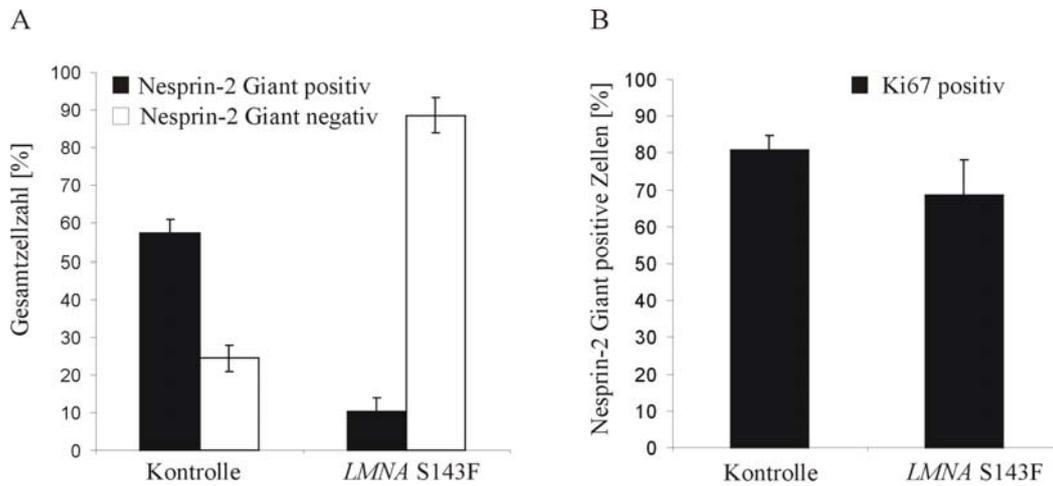


**Abbildung 3.6.: Die LMNA S143F Mutation beeinflusst die Nesprin-2 Lokalisation an der Kernhülle.** (A) Indirekte Immunfluoreszenzanalyse mit dem Nesprin-1 spezifischen polyklonalen Antikörper (b, e, e') und mAb Lam A/C (a, d, d') zeigt in Kontrollfibroblasten (b) und Patientenfibroblasten (e, e') eine Nesprin-1 Lokalisation an der Kernhülle und eine Kolokalisation mit Lamin A/C (c, f, f'). (d'-f') sind Vergrößerungen der markierten Bereiche; Balken: 10 µm. (B) Indirekte Immunfluoreszenzanalyse mit mAb Lam A/C (a, d, d') und dem Nesprin-2 spezifischen polyklonalen Antikörper pAb K1 (b, e, e') zeigt für Nesprin-2 in Kontrollfibroblasten (b) eine zytoplasmatische Lokalisation (Pfeile) und eine Lokalisation an der Kernhülle (Pfeilspitzen). In Patientenzellen mit nukleärer Deformation (e; Sterne) ist Nesprin-2 nicht an der Kernhülle lokalisiert und Nesprin-2 kolokalisiert nicht mit Lamin A/C (f, f'). (d'-f') sind Vergrößerungen der markierten Bereiche; Balken: 10 µm. (C-D) Statistische Auswertung der Lokalisation von Nesprin-1 (C) und Nesprin-2 (D) in Kontroll- und Patientenfibroblasten. Es wurden jeweils 300 Zellen (# 11).

### **3.1.5. Nesprin-2 Giant exprimierende *LMNA* S143F Fibroblasten besitzen eine normale Zellkernmorphologie**

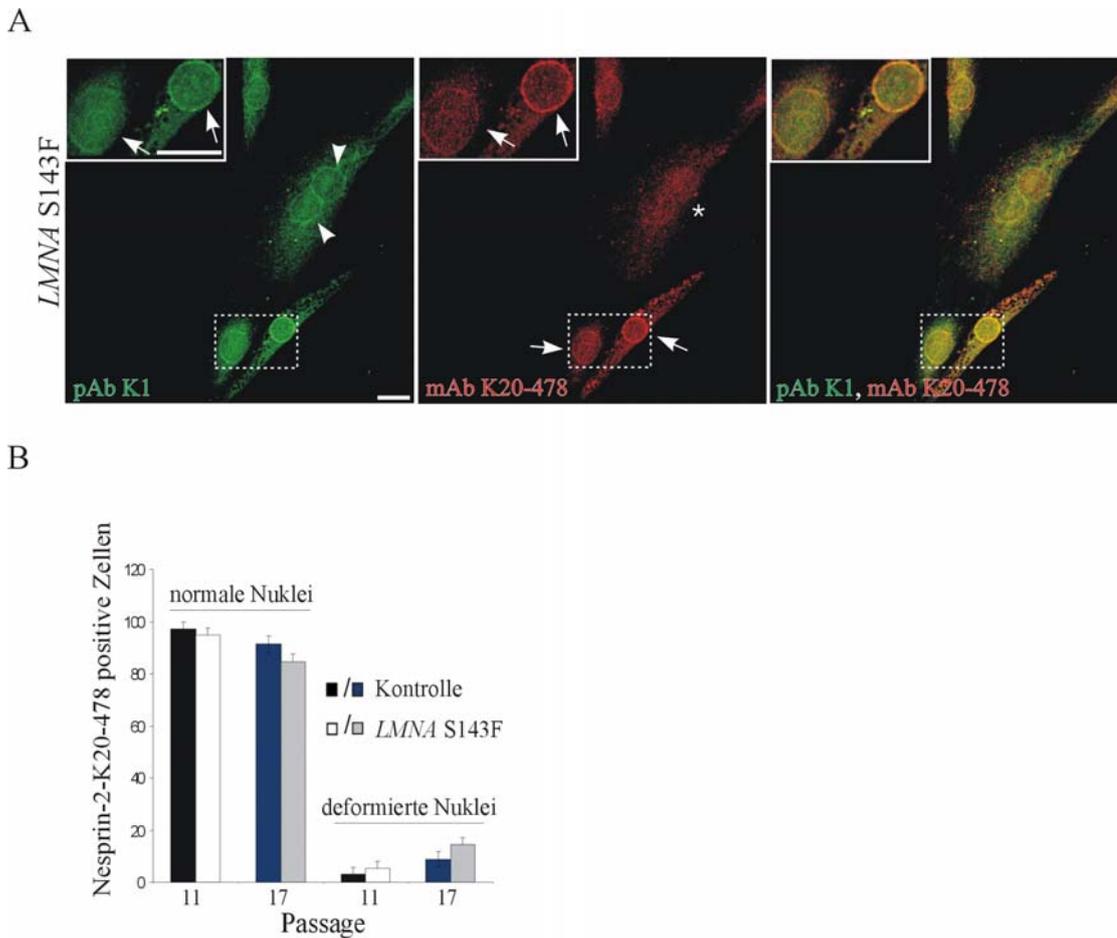
#### **3.1.5.1. Nesprin-2 Giant defiziente Fibroblasten besitzen deformierte Zellkerne**

Um einen tieferen Einblick in die potentielle Bedeutung des Nesprin-2 Proteins in der Pathogenese der *LMNA* S143F Mutation zu gewinnen, wurde die Lokalisation und Expression der verschiedenen Nesprin-2 Isoformen untersucht. Dazu wurden Ko-Immunolokalisationsstudien mit zwei Nesprin-2 Antikörpern durchgeführt, wobei der mAb K20-478 spezifisch die ABD-Domäne der großen Isoform (Nesprin-2 Giant) erkennt, während der polyklonale pAb K1 spezifisch gegen die letzten zwei Spektrin-Wiederholungen am C-Terminus gerichtet ist und somit neben Nesprin-2 Giant auch die kürzeren Isoformen detektiert (siehe Abb.3.18.). Wie in der statistischen Analyse mit pAb K1 in Abb.3.6.D gezeigt, weisen 91,6% der Wildtypfibroblasten (Kontrolle) eine Lokalisation an der Kernhülle auf. Benutzt man mAb K20-478, zeigen 57,5% der Kontrolle und 10,4% der *LMNA* S143F Zellen eine Lokalisation der Nesprin-2 Giant Isoform an der Kernhülle (Abb.3.7.A). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die heterogene Nesprin-2 Giant Expression mit einem proliferativen Status der Zellen koinzidiert. So weisen in der Kontrolle 84,4 % und in der Mutante 77,5% der Nesprin-2 Giant positiven Zellen auch eine Expression von Ki67, einem Proliferationsmarker, auf (Abb.3.7.B). Interessanterweise weisen die Nesprin-2 Giant- und Ki67-positiven Zellen im Wildtyp und in *LMNA* S143F Zellen keine nukleären Deformationen auf.



**Abbildung 3.7.: Expression der Nesprin-2 Giant Isoform koinzidiert mit einem proliferativen Status der Zelle.** (A) Nur eine Subpopulation von WT und *LMNA* S143F Fibroblasten exprimieren die Nesprin-2 Giant Isoform. (B) Nesprin-2 Giant positive Zellen befinden sich in einem proliferativen Status. Ausgewertet für A und B wurden jeweils 300 Zellen, Angaben in Prozent.

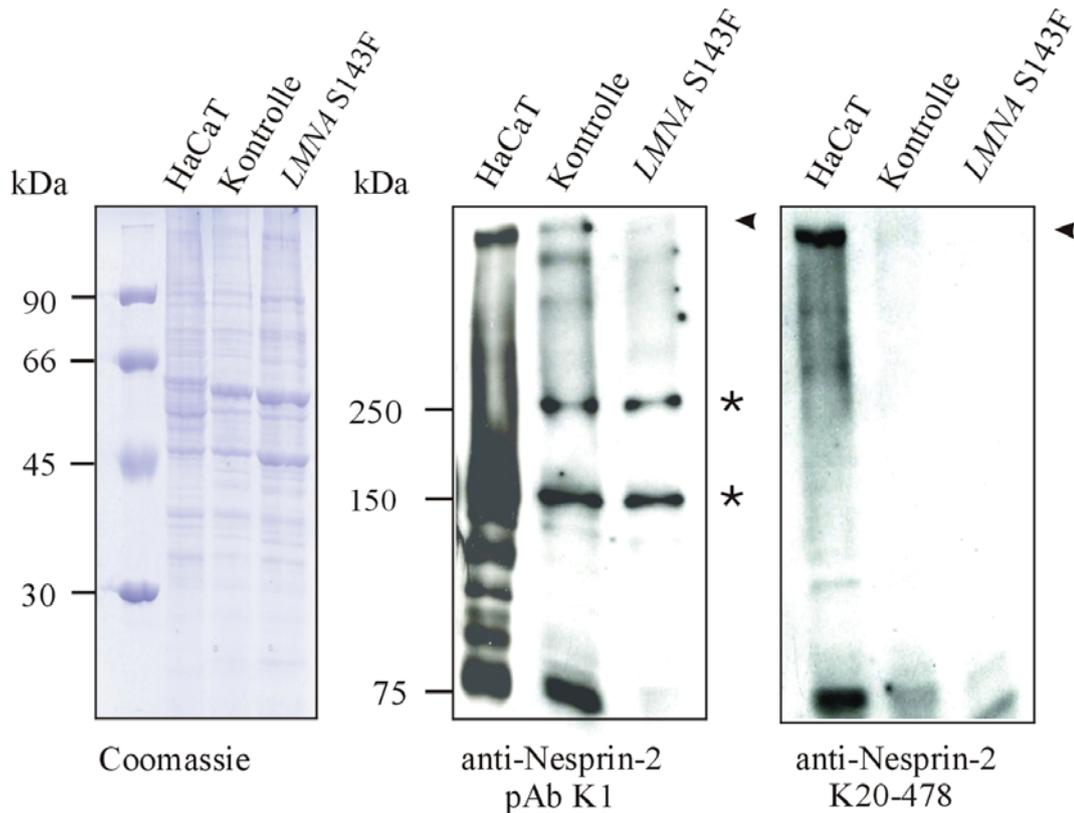
Die Subpopulation der *LMNA* S143F Zellen, die Nesprin-2 Giant an der Kernhülle exprimieren, wurde genauer analysiert und es zeigte sich, dass diese Zellen auch mit pAb K1 eine Lokalisation von Nesprin-2 an der Kernhülle aufweisen und über eine normale Kernmorphologie verfügen (Abb.3.8.A; Pfeile). Ebenso erscheinen diese Nuklei kleiner und kompakter im Vergleich zu denen, die kein Nesprin-2 Giant aufweisen. Sie sind häufig deformiert und die pAb K1 Färbung erscheint diffus (Abb. 3.8.A; Stern und Pfeilspitzen). In einer statistischen Analyse (Abb.3.8.B) konnte gezeigt werden, dass sowohl in der Wildtypkontrolle als auch in der Mutante mAb K20-478 positive Zellen in 97,1% bzw. 94,9% über eine normale Kernmorphologie verfügen (Passage 11). Die Tendenz, dass das Vorhandensein von Nesprin-2 Giant ein Indikator für eine normale Zellkernmorphologie ist, besteht auch in höheren Passagen.



**Abbildung 3.8.: Nesprin-2 Giant exprimierende *LMNA S143F* Fibroblasten besitzen eine normale Zellkernmorphologie.** (A) Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie von *LMNA S143F* Fibroblasten mit pAb K1 und mAb K20-478. Patientenzellen, die eine K20-478 Färbung an der Kernhülle aufweisen (Pfeile) besitzen eine normale nukleäre Morphologie. Im Gegensatz dazu weisen *LMNA S143F* Zellen ohne K20-478 Färbung nukleäre Deformationen auf (Stern) und die pAb K1 Färbung erscheint diffus (Pfeilspitzen). Balken: 10  $\mu$ m. (B) Expression der Nesprin-2 Giant Isoform ist indikativ für eine normale Kernmorphologie. Je 300 mAb K20-478 positive Wildtyp und Patientenfibroblasten wurden ausgewertet.

### 3.1.5.2. Die Expression von Nesprin-2 Giant ist reduziert in *LMNA S14F* Fibroblasten

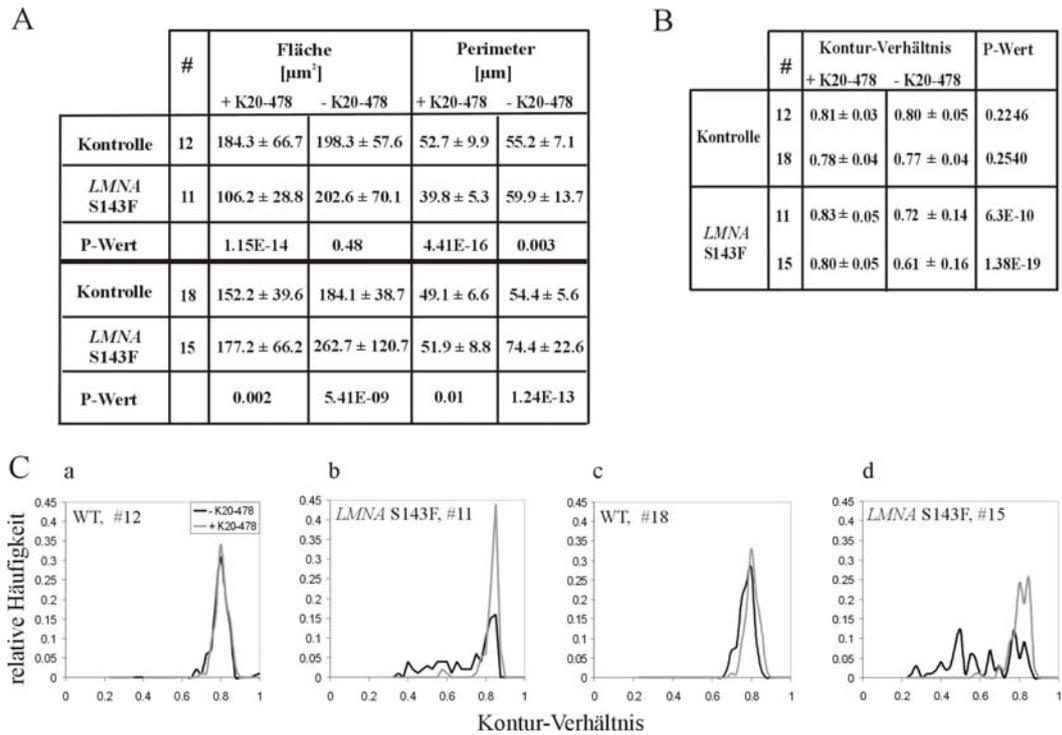
In einer Westernblotanalyse wurden die Expressionsmengen der verschiedenen Nesprin-2 Isoformen untersucht (Abb.3.9). Ein Westernblot mit pAb K1 sowie mAb K20-478 zeigt eine Reduktion der 796 kDa Nesprin-2 Giant Isoform (Pfeilspitzen). Für die kleine 75 kDa Isoform lässt sich eine starke Reduktion beobachten, während die 150 und 250 kDa Banden leicht herunterreguliert sind (Sterne).



**Abbildung 3.9.: Westernblotanalyse von Zellextrakten aus WT- und Patientenfibroblasten.** Analyse mit pAb K1 und mAb K20-478 zeigt eine reduzierte Expression der 796 kDa Isoform in *LMNA S143F* Zellen (Pfeilspitze). HaCaT-Lysat dient als interne Kontrolle; Coomassie-Blau Färbung zeigt gleiche Proteinmengen.

### 3.1.5.3. Nukleäre morphometrische Analyse von *LMNA S143F* Fibroblasten

Um die morphologischen Unterschiede zwischen K20-478 positiven und negativen WT und *LMNA S143F* Nuklei genauer zu evaluieren, wurde eine morphometrische Analyse durchgeführt. Der Perimeter und die Fläche der Nuklei wurde bestimmt (Abb. 3.10.A) und daraus das nukleäre Kontur-Verhältnis errechnet, welches das relative Ausmaß der Deformation anzeigt. Wie in (2.6.1.) beschrieben, liegt der Wert für das nukleäre Kontur-Verhältnis zwischen 0 und 1; wobei der Wert gegen 0 absinkt, wenn die Deformation des Nukleus zunimmt. Wie in Abb.3.10 zu erkennen, sind die nukleären Kontur-Verhältnis-Werte von K20-478 positiven WT und *LMNA S143F* Fibroblasten unabhängig vom Alter der Zellen relativ konstant (> 0.78), was auf eine



**Abbildung 3.10.: Morphometrische Analyse von WT und *LMNA* S143F Fibroblasten.** Ermittlung der nukleären Fläche und des Perimeters (A) und die daraus resultierende Berechnung des nukleären Kontur-Verhältnisses (B). Fibroblasten wurden für A und B mit dem Nesprin-2 Giant spezifischen mAb K20-478 Antikörper gefärbt und die Nuklei mit DAPI sichtbar gemacht. In jungen (#12) und alten (#18) Kontrollfibroblasten lässt sich für das nukleäre Kontur-Verhältnis (B) kein statistischer Unterschied zwischen K20-478 negativen und K20-478 positiven Nuklei ermitteln ( $P > 0.05$ ). Junge (#11) und alte (#18) *LMNA* S143F Fibroblasten ohne K20-478-Färbung haben ein signifikant reduziertes Kontur-Verhältnis verglichen mit K20-478 positiven Fibroblasten ( $P < 0.001$ ). (C) Verteilung der relativen Häufigkeiten der in B ermittelten Kontur-Verhältnis-Werte. Junge (a) und alte (c) Wildtyp-Nuklei zeigen große Kontur-Verhältnis-Werte mit einem deutlichen Maximum. Junge (b) und alte (d) *LMNA* S143F Fibroblasten positiv für K20-478 zeigen wie die Wildtypkontrolle eine ähnliche Verteilung sowie ein deutliches Maximum der relativen Häufigkeiten der ermittelten Kontur-Verhältnis-Werte. Dagegen zeigen junge (b) und alte (d) K20-478 negative *LMNA* S143F Fibroblasten eine breitere Streuung der Kontur-Verhältnis-Werte sowie ein niedrigeres Maximum.

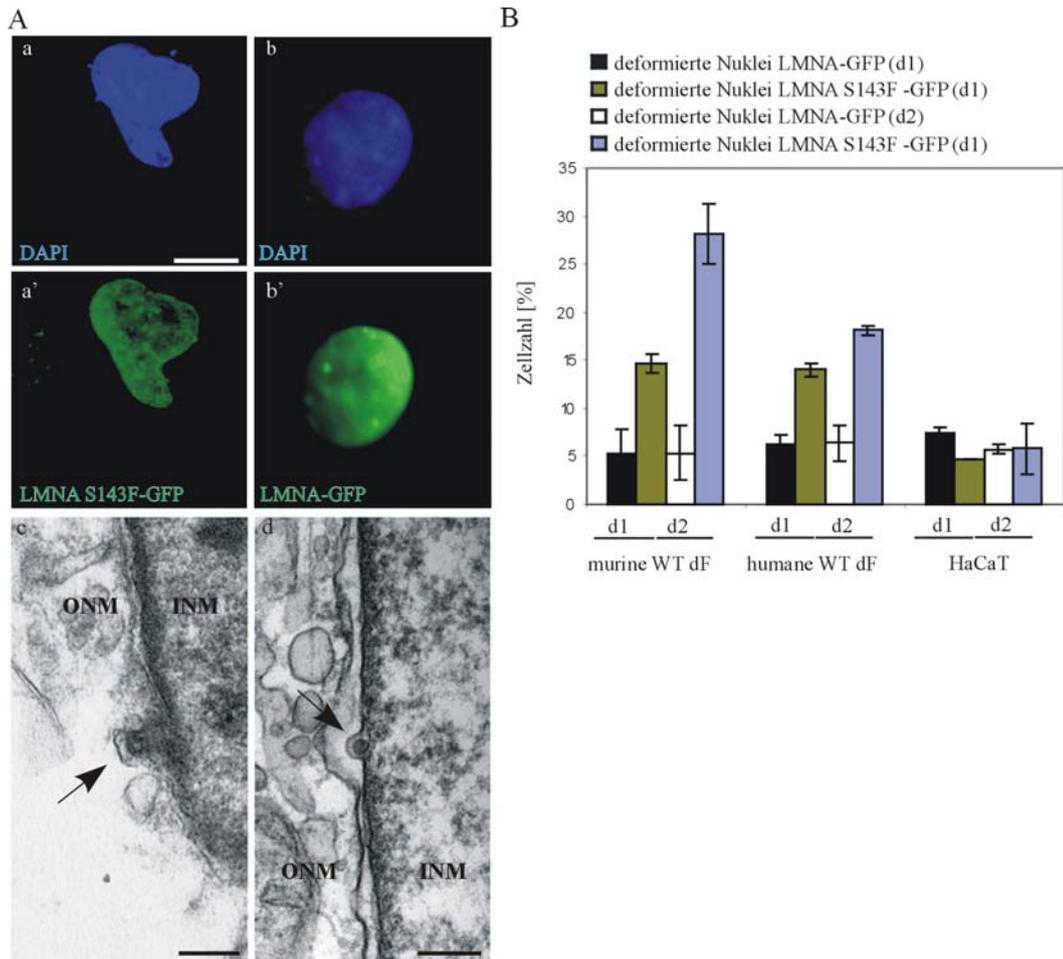
normale Kernmorphologie hinweist. Zusätzlich zeigen auch K20-478 negative Kontrollfibroblasten einen hohen nukleären Kontur-Verhältnis-Wert. In den K20-478 negativen *LMNA* S143F Fibroblasten dagegen lässt sich deutlich erkennen, dass die Werte mit zunehmender Passage stark abfallen; nämlich von 0.72 in Passage 11 auf 0.61 in Passage 15, was auf eine Verstärkung der nukleären Deformationen hinweist. Zusätzlich bewirkt die Abwesenheit von Nesprin-2 Giant eine starke Vergrößerung der nukleären Fläche in *LMNA* S143F Fibroblasten. Diese Tendenz ist ebenfalls in älteren WT Fibroblasten zu erkennen (Abb.3.10.A). Zusätzlich wurde die relative Häufigkeit der ermittelten Werte bestimmt, da so auch die Streuung der Kontur-Verhältnis-Werte innerhalb der Subpopulation analysiert werden kann. Anhand der

Graphiken in Abb.3.10.C lässt sich erkennen, dass K20-478 positive und negative WT Nuklei unabhängig von der Passage (a und c) deutliche Maxima (relative Häufigkeit: 0.34) bei einem Kontur-Verhältnis-Wert von ca. 0.8 aufweisen. Dies bedeutet, dass der Grossteil der jeweiligen Subpopulation normale Nuklei aufweist; ein geringer Anteil weist leichte Deformationen (Kontur-Verhältnis  $\geq$  0.6) auf, während der Anteil der Nuklei, die starke Deformationen besitzen, gegen eine relative Häufigkeit von 0 tendiert. Dieses Bild lässt sich auch auf die jungen (b) und alten (d) K20-478 positiven *LMNA* Fibroblasten übertragen. In den K20-478 negativen Nuklei der Mutante dagegen lässt sich schon in geringer Passage (b) deutlich erkennen, dass es zu einer breiten Streuung der relativen Häufigkeiten der ermittelten Werte kommt. Das Maximum der Kontur-Verhältnis-Werte liegt ebenfalls bei etwa 0.8, ist jedoch nicht so hoch (relative Häufigkeit liegt bei 0.15). Der Anteil deformierter Nuklei innerhalb der Subpopulation steigt demnach an und es lassen sich Kontur-Verhältnis-Werte bis 0.275 ermitteln, was auf sehr starke Deformationen hinweist. In alten *LMNA* S143F K20-478 negativen Nuklei (d) lässt sich kein Maximum mehr ermitteln. Dies bedeutet, dass die Mehrheit der Zellen Deformationen verschiedenen Ausmaßes aufweisen. Es lässt sich schlussfolgern, dass die Nesprin-2 Giant Expression dem pathogenen Einfluss der *LMNA* S143F Mutation auf die nukleäre Morphologie entgegenwirkt und somit kann eine stabilisierende Rolle von Nesprin-2 Giant auf die Kernmembran-Architektur postuliert werden.

### **3.1.6. Ektopische Expression von *LMNA* S143F induziert den für die Patientenfibroblasten charakteristischen Phänotyp**

#### **3.1.6.1. Expression von *LMNA* S143F-GFP induziert zeitabhängige nukleäre Deformationen nur in Zelllinien mit geringem Nesprin-2 Giant Niveau**

Um zu bestimmen, ob die *LMNA* S143F Mutation den beschriebenen zellulären Phänotyp verursacht, wurden WT (*LMNA*-GFP) und mutierte GFP-Lam A (*LMNA* S143F-GFP) Fusionsproteine transient in humanen Wildtypfibroblasten überexprimiert.



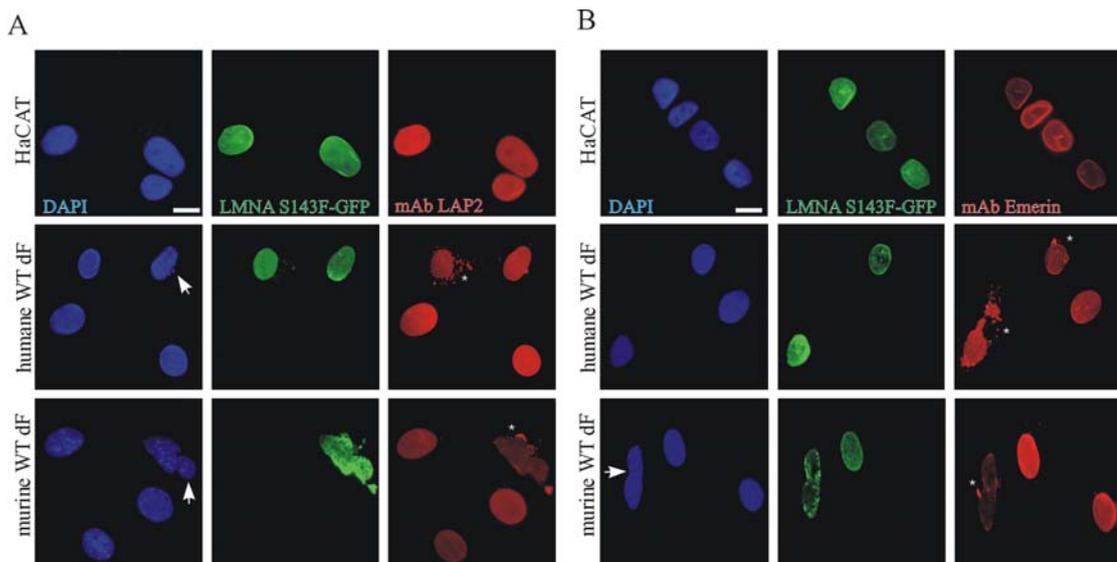
**Abbildung 3.11.: Ektopische Expression von LMNA S143F-GFP induziert den für die Patientenzellen charakteristischen Phänotyp.** (A) Humane Fibroblasten wurden transient mit LMNA S143F-GFP transfiziert und ihre nukleäre Morphologie über direkte Immunfluoreszenz (a, a') und Transmissions-Elektronenmikroskopie (c, d) analysiert. Expression des mutierten Proteins verursacht im Gegensatz zur Kontrolle (b, b') nukleäre Deformationen, die wie in den Patientenzellen nicht durch Ablösung der äußeren von der inneren Kernmembran entstehen (Pfeile in c und d). Balken in a: 10 µm, in c und d: 0,2 µm. (B) Statistische Analyse (je 100 Zellen) der induzierten nukleären Deformationen von mit LMNA S143F-GFP und LMNA-GFP transfizierten humanen und murinen dermalen Fibroblasten (dF) sowie HaCaT-Zellen zeigt eine reziproke Abhängigkeit der induzierten Deformationen von der Nesprin-2 Giant Expression.

Im Gegensatz zu LMNA-GFP exprimierenden Zellen (Abb.3.11.A; b und b'), die einen normal geformten Nukleus aufweisen, zeigen die Zellen, die das mutierte Protein exprimieren, nukleäre Deformationen auf, wie sie auch in Patientenzellen beobachtet wurden (Abb.3.11.A; a und a'). Eine transmissions-elektronenmikroskopische Untersuchung (Kooperation mit S. Kandert, Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie und T. Kleinhenz, Institut für Humangenetik, Universität Würzburg) zeigt den gleichen ultrastrukturellen Phänotyp wie in den Patientenfibroblasten. Auch in den mit dem mutierten Protein transfizierten Zellen lassen sich Ausstülpungen der Kernhülle

beobachten, wobei die Assoziation der äußeren mit der inneren Kernmembran erhalten bleibt (Abb.3.11.A; Pfeile in c und d).

Um die potentielle Beteiligung des Nesprin-2 Giant Proteins bei der Pathogenese der *LMNA* S143F Mutation weiter zu beurteilen, wurden Transfektionsstudien mit drei verschiedenen Zelllinien durchgeführt, die stark in ihren Nesprin-2 Giant Expressionsleveln variieren. Als stark exprimierende Zelllinie wurden HaCaT-Zellen (humane Keratinozyten) benutzt, dagegen exprimiert die murine Fibroblasten-Zelllinie C3H/10T1/2 Nesprin-2 nur in geringen Mengen (Libotte et al., 2005). Primäre humane Fibroblasten weisen ein intermediäres Expressionsniveau auf. Um eine Zeitabhängigkeit der nukleären morphologischen Veränderungen bzw. eine akkumulative Wirkung beurteilen zu können, wurden die Zellen ein und zwei Tage nach Transfektion fixiert, die Nuklei mit DAPI gefärbt und die Anzahl der induzierten Deformationen statistisch evaluiert. Es zeigt sich deutlich eine reziproke Abhängigkeit der Anzahl der nukleären Deformationen von der Nesprin-2 Giant Expression (Abb.3.11.B). In HaCaT-Zellen, die große Mengen Nesprin-2 Giant exprimieren, lassen sich keine signifikanten Veränderungen der Kernmorphologie erkennen. Sowohl in den *LMNA*-GFP exprimierenden als auch in den *LMNA* S143F-GFP exprimierenden Zellen sind zeitunabhängig 4,7-7,5% der Nuklei deformiert. Dagegen lässt sich bereits ein Tag nach Transfektion des *LMNA* S143F-GFP in die humanen und murinen dermalen Fibroblasten eine Induktion nukleärer Deformationen nachweisen, wobei der Anteil deformierter Nuklei zwei Tage nach Transfektion deutlich ansteigt. Der pathogene Effekt der *LMNA* S143F Mutation lässt sich insbesondere in den C3H/10T1/2 Fibroblasten beobachten, die kaum Nesprin-2 Giant exprimieren. Zwei Tage nach Transfektion des *LMNA* S143F-GFP weisen 28,2% der Fibroblasten nukleäre Veränderungen auf, während in der Kontrolle 5,4% der Nuklei deformiert sind. Es lässt sich folgern, dass in Zelltypen, die hohe Nesprin-2 Giant Mengen besitzen, dem pathogenen Einfluss der *LMNA* S143F Mutation auf die Kernmorphologie entgegengewirkt werden kann. Die durch die ektopische Expression des *LMNA* S143F-GFP induzierten Veränderungen beschränken sich nicht auf die Struktur der Nuklei (Abb.3.12; Pfeile), sondern beeinflussen auch die Lokalisation integraler Proteine der inneren

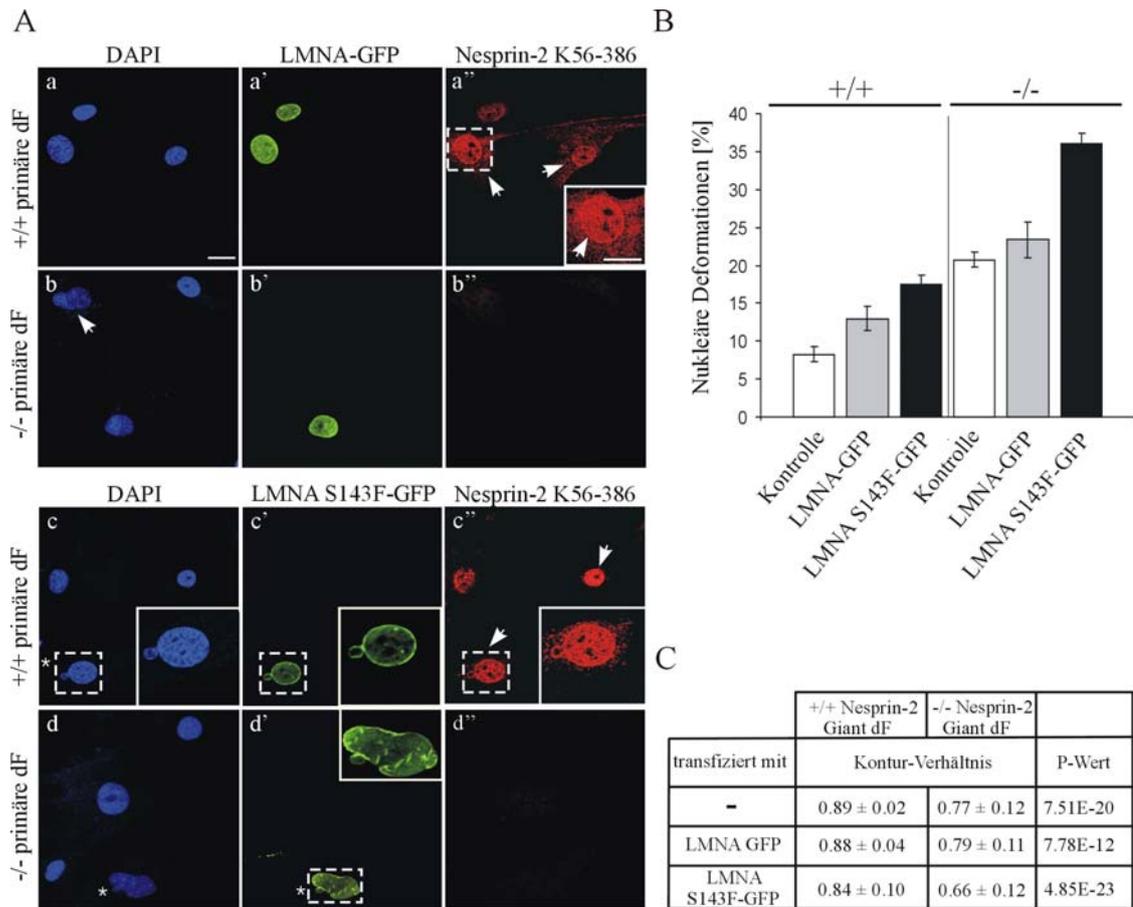
Kernmembran. Immunolokalisationsstudien mit mAb LAP2, der die verschiedenen LAP2 Isoformen detektiert, und mAb Emerin, weisen Veränderungen dieser Proteine in humanen und murinen dermalen Fibroblasten auf, nicht jedoch in HaCaT-Zellen. In beiden Zelllinien lässt sich deutlich eine Aggregation und Mislokalisierung der LAP2 Isoformen und des Emerin Proteins erkennen (Asterisks in Abb.3.12.A und B).



**Abbildung 3.12.:** Ektopische Expression des LMNA S143F-GFP beeinflusst die Lokalisation von LAP2 (A) und Emerin (B) nur in dermalen humanen und murinen WT Fibroblasten (dF, Sterne), nicht jedoch in HaCaT-Zellen. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und eine indirekte Immunfluoreszenzanalyse mit mAb LAP2 und mAb Emerin durchgeführt. Nuklei wurden mit DAPI gefärbt. Balken: 10 µm.

### 3.1.7. Expression von LMNA S143F-GFP in Nesprin-2 Giant KO Fibroblasten erhöht Anzahl und Schwere der nukleären Deformationen

Um zu prüfen, ob die Reduktion oder Abwesenheit des Nesprin-2 Giant Proteins die Nuklei für die pathogenen Effekte der LMNA S143F Mutation empfänglicher macht, wurden WT- und mutierte LMNA-GFP Fusionsproteine in Nesprin-2 Giant defizienten Zellen exprimiert.



**Abbildung 3.13.: Nesprin-2 Giant wirkt dem negativen Effekt der LMNA S134F Mutation entgegen.** (A) Primäre dermale Fibroblasten von Nesprin-2 Giant KO (b-b'' und d-d'') - und WT Mäusen (a-a'' und c-c'') wurden transient mit LMNA S143F-GFP oder LMNA-GFP transfiziert und drei Tage nach Transfektion über indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie mit dem Nesprin-2 Giant spezifischen mAb K56-386 analysiert. Nuklei wurden mit DAPI angefärbt. In primären WT Fibroblasten ist Nesprin-2 Giant an der Kernhülle lokalisiert (Pfeile in a'' und c''), während es in Nesprin-2 Giant KO Fibroblasten abwesend ist (b'' und d''). Im Vergleich zu nicht transfizierten KO Fibroblasten führt die ektopische Expression des LMNA-GFP nicht zu einer Induktion nukleärer Deformationen (b und b'). Expression des LMNA S143F-GFP dagegen bewirkt eine schwere Deformation der Nuklei (d und d'; Sterne), während es in WT Fibroblasten nur zu leichten Deformationen kommt (c-c''). Balken: 10 µm. (B) Statistische Auswertung von je 300 WT und KO Fibroblasten nach Transfektion mit LMNA-GFP oder LMNA S143F-GFP. (C) Morphometrische Analyse der Zellen aus A und B.

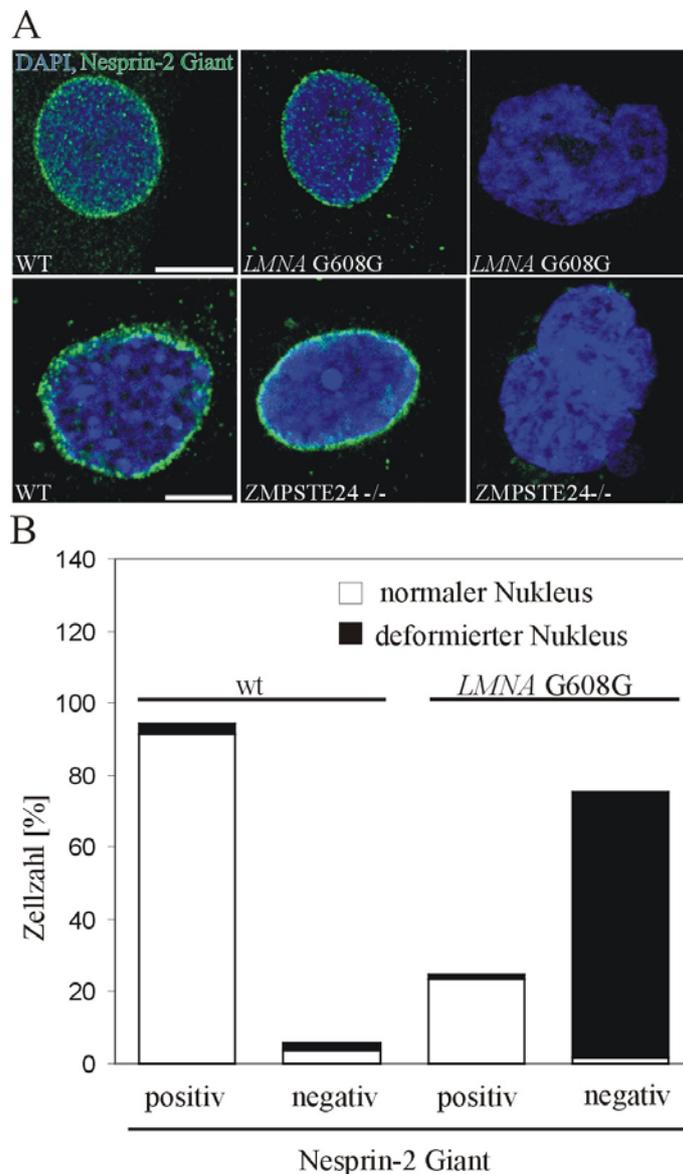
Aus Nesprin-2 Giant KO Mäusen isolierte primäre dermale Fibroblasten weisen nukleäre Deformationen auf (Abb.3.13.A; Pfeil in b). 21,3% der nicht transfizierten Nesprin-2 KO Fibroblasten besitzen nukleäre Defekte und zeigen eine signifikante Reduktion (0.77) des nukleären Kontur-Verhältnisses (Abb.3.13.B und C) im Vergleich zu primären Wildtypfibroblasten (0.89; Abb.3.13.B und C). Die Lokalisation des Nesprin-2 Giant Proteins in primären dermalen Fibroblasten wurde mittels des mausspezifischen mAb K56-386 untersucht, der gegen die ABD-Domäne am N-Terminus gerichtet ist. In den Kontrollfibroblasten ist eine Lokalisation des Nesprin-2 Giant an der Kernhülle

zu sehen (Abb.3.13.A; Pfeile in a'' und c''), während es in den Nesprin-2 Giant KO Fibroblasten abwesend ist (Abb.3.13.A; b'' und d''). Eine Überexpression des WT LMNA-GFP in Nesprin-2 KO Fibroblasten führt nicht zu einer signifikanten Induktion nukleärer Deformation (Anstieg um 1,7%) verglichen mit den nicht transfizierten KO Fibroblasten (Abb.3.13.B). Dagegen führt die ektopische Expression des LMNA S143F-GFP dazu, dass sowohl Anzahl als auch Ausmaß der Deformationen signifikant ansteigen (Abb.3.13.A; Stern in d'). Eine statistische Analyse zeigt, dass die Anzahl der induzierten Deformationen in den Nesprin-2 KO Fibroblasten signifikant auf 36,0% ansteigt. Verglichen dazu bewirkt die ektopische Expression des mutierten Fusionsproteins in den Wildtypfibroblasten lediglich einen Anstieg nukleärer Defekte auf 17,6% (Abb.3.13.B). Die morphometrische Analyse in Abb.3.13.C zeigt eine Reduktion des nukleären Kontur-Verhältnis-Wertes von 0.77 (nicht transfiziert) zu 0.66 in den transfizierten KO Zellen. Dagegen sinkt das nukleäre Kontur-Verhältnis in den Wildtypfibroblasten von 0.89 in den nicht transfizierten Zellen auf lediglich 0.84 in den LMNA S143F-GFP transfizierten Zellen.

### **3.1.8. Nesprin-2 Giant exprimierende *LMNA* G608G und ZMPSTE24 KO Fibroblasten besitzen eine normale Zellkernmorphologie**

Um zu prüfen, ob das Nesprin-2 Giant Protein einen generellen protektiven Effekt auf die Zellkernmorphologie ausübt, wurden auch humane *LMNA* G608G Fibroblasten und ZMPSTE24 knock out (KO) Fibroblasten analysiert. Bei der *LMNA* G608G Mutation handelt es sich um die Mutation, die die klassische Hutchinson-Gilford Progerie auslöst (siehe auch Einleitung 1.4.1.4.1.) und ZMPSTE24 KO Fibroblasten weisen einen Defekt in der Prozessierung des Prälamina A zum murenen Lamin A auf (siehe auch Einleitung 1.4.1.4.4.). Immunfluoreszenzstudien von WT- und mutierten Fibroblasten mit Nesprin-2 Giant spezifischen Antikörpern bestätigen die Schlussfolgerungen, die durch die Analyse der *LMNA* S143F Fibroblasten gewonnen wurden. In Abb.3.14.A ist deutlich ersichtlich, dass die Anwesenheit von Nesprin-2 Giant indikativ für einen normal geformten Kern ist, während die Abwesenheit des Nesprin-2 Giant Proteins mit einer Deformation des Kern korreliert. In einer statistischen Evaluation (Abb.3.14.B) zeigt sich, dass nur

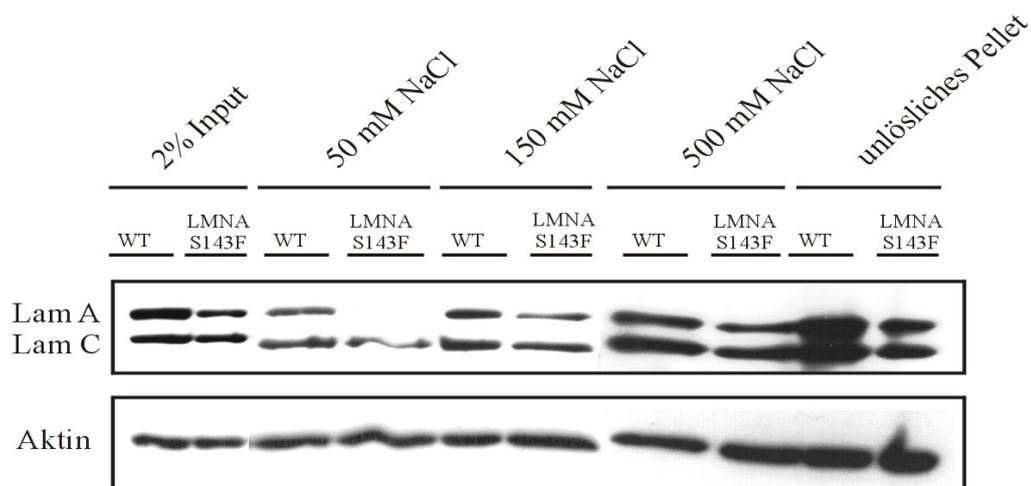
2,9 ± 1,6% der Nesprin-2 Giant exprimierenden Wildtypfibroblasten (94,2 ± 2,5% der Gesamtpopulation) nukleäre Deformationen aufweisen. In den *LMNA* G608G Fibroblasten sinkt der Anteil der Nesprin-2 Giant exprimierenden Zellen auf 24,8 ± 7,1% ab, von diesen Zellen zeigen wiederum nur 1,3 ± 1,0% einen abnormalen Kern. Von den Nesprin-2 Giant negativen *LMNA* G608G Fibroblasten (75,2 ± 7,2% der Gesamtpopulation) weisen 73,7 ± 7,7% nukleäre Deformationen auf. Eine ähnliche Tendenz zeigt sich für die *Zmpste24* KO Fibroblasten. Hier weisen 40,3 ± 3,5% der Nesprin-2 Giant negativen Zellen nukleäre Deformationen auf.



**Abbildung 3.14.: Nesprin-2 Giant exprimierende *LMNA* G608G und *ZMPSTE24* KO Fibroblasten besitzen eine normale Zellkernmorphologie.** (A) Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie mit Nesprin-2 Giant spezifischen Antikörpern. Balken: 10 µm. (B) Statistische Auswertung von je 300 WT und *LMNA* G608G Fibroblasten.

**3.1.9. Lamin A zeigt eine reduzierte Löslichkeit in LMNA S143F Fibroblasten**

In *LMNA* G608G Fibroblasten führt die Akkumulation des mutierten Lamin A ( $\Delta 50$  Lam A) zu einer reduzierten Löslichkeit und einer verringerten Dynamik der Lamina (Dahl et al., 2006). Um zu prüfen, ob die *LMNA* S143F Mutation ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Struktur der Lamina ausübt, wurden sequentielle Extraktionsversuche mit ansteigenden Salzkonzentrationen durchgeführt.



**Abbildung 3.15.: Reduzierte Löslichkeit von Lam A in LMNA S143F Fibroblasten.** Westernblot Analyse der sequentiellen Extraktion von Lam A/C mit ansteigenden Salzkonzentrationen aus WT und *LMNA* S143F Kernen. Lamin A/C wurde mit mAb Lam A/C erkannt. Aktin dient als Ladekontrolle.

Insbesondere bei geringer Salzkonzentration (50 mM NaCl) zeigt das mutierte Lam A eine deutlich reduzierte Löslichkeit im Vergleich zum WT Lam A; mit höheren Salzkonzentrationen ist der Anteil des aus der Lamina extrahierbaren Lam A bei *LMNA* S143F Zellen im Vergleich zum WT verringert. Das mutierte Lamin A geht eine stärkere Assoziation mit der Lamina ein, was darauf hinweist, dass durch die Inkorporation des mutierten Proteins die Dynamik und Löslichkeit der Lamina herabgesetzt wird.

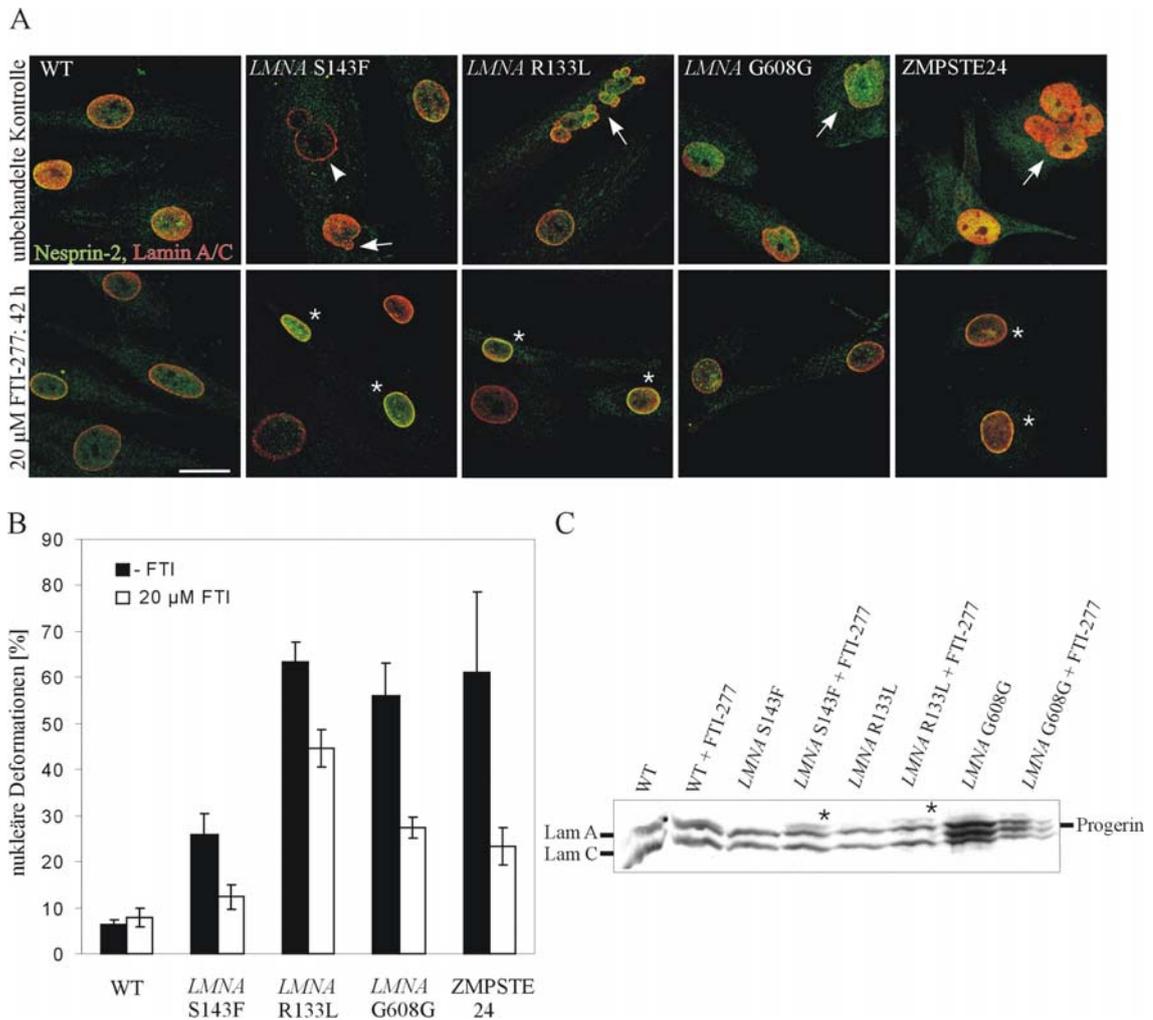
**3.1.10. Einsatz eines Protein-Farnesyltransferase-Inhibitors führt zu einer Verbesserung des nukleären Phänotyps**

Die *LMNA* G608G Mutation, die die klassische Form der Progerie auslöst, führt zu einer internen Deletion von 50 Aminosäuren im Prälamina A. Diese Deletion betrifft die zweite Position für die endoproteolytische Spaltung von

ZMPSTE24, so dass ein mutiertes Prälamina A (Progerin) gebildet und in die Lamina inkorporiert wird (siehe Einleitung 1.4.1.4.1.). Es wird postuliert, dass die Akkumulation dieser permanent farnesylierten Form die eigentliche Ursache für die Ausprägung des Phänotyps darstellt, da sowohl in Patientenfibroblasten als auch in Mausmodellen der Einsatz eines Farnesyltransferase-Inhibitors zu einer Verbesserung des nukleären Phänotyps führt (Fong et al., 2004; Toth et al., 2005). Durch das Fehlen des Farnesyllipidrestes, der die Verankerung in der inneren Kernmembran vermittelt, wird das Protein fehlgeleitet und akkumuliert im Nukleoplasma, wobei die Reduktion des farnesylierten Progerins in der Lamina eine Abschwächung des nukleären Phänotyps bewirkt.

Um zu prüfen, ob generell die Reduktion eines mutierten Lam A Proteins (und nicht die Reduktion der farnesylierten Form eines mutierten Proteins) zu einer Verbesserung des nukleären Phänotyps führt, wurden *LMNA* S143F und *LMNA* R133L Fibroblasten, die eine intakte Lamin A Prozessierung durchlaufen, mit einem Farnesyltransferase-Inhibitor (FTI-277) behandelt. Vergleichend wurden *LMNA* G608G Fibroblasten und ZMPSTE24 KO Fibroblasten eingesetzt, für die bereits eine Verbesserung des Phänotyps nach Einsatz eines FTI beschrieben wurde (Capell et al., 2005; Toth et al., 2005). In den unbehandelten Kontrollen zeigen sich häufig nukleäre Deformationen im Vergleich zum WT (Abb.3.16.A; Pfeile und Abb.3.15.B) sowie eine Abwesenheit des Nesprin-2 Giant Proteins an der Kernhülle (Abb.3.16.A; Pfeilspitze). Nach einer 42-stündigen FTI-Behandlung nimmt das Ausmaß der nukleären Deformationen ab (Abb.3.16.A und B). Die Abnahme der nukleären Deformationen ist besonders ausgeprägt in den *LMNA* G608G und ZMPSTE24 KO Fibroblasten, in denen ein Defekt in der Lamin A Prozessierung vorliegt (Abb.3.16.B), jedoch profitieren auch die *LMNA* S143F und R133L Fibroblasten deutlich von einer Behandlung mit FTI. So lässt sich bei den *LMNA* S143F Fibroblasten eine Reduktion der nukleären Deformationen um 13,5%, bei den *LMNA* R133L Fibroblasten um 18,6% erkennen. Einhergehend mit der Reduktion der nukleären Abnormalitäten lässt sich eine Wiederherstellung der Nesprin-2 Giant Lokalisation an der Kernhülle erkennen (Abb.3.16.A; Stern). Dieser Versuch zeigt deutlich, dass auch Zellen mit *LMNA* missense Mutationen im N-terminalen Bereich von dem Einsatz

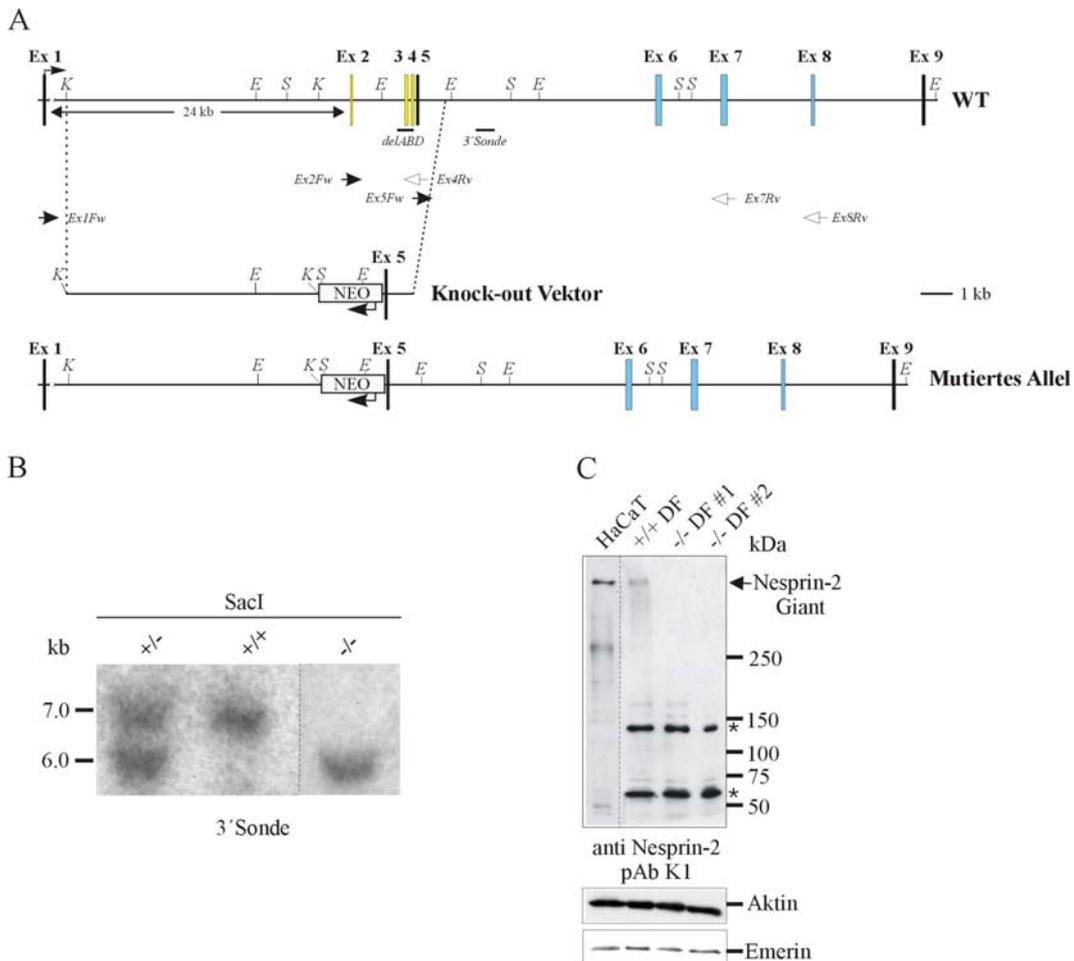
eines Farnesyltransferase-Inhibitors profitieren, da insgesamt das Niveau des inkorporierten mutierten Lamins reduziert wird. Es wird impliziert, dass die farnesylierte Form des mutierten Lam A Moleküls nicht die alleinige Ursache des pathogenen Phänotyps ist.



**Abbildung 3.16.: Einsatz eines Farnesyltransferase-Inhibitors (FTI-277) führt zu einer Reduktion des nukleären Phänotyps in *LMNA* S143F und R133L Fibroblasten.** (A) WT, *LMNA* S143F, R133L und G608G sowie ZMPSTE24 KO Zellen wurden 42 h mit FTI-277 (20 μM) behandelt. Nach Fixierung wurde eine Kofärbung mit mAb Lam A/C und pAb K1 durchgeführt. Unbehandelte Kontrollen zeigen im Gegensatz zum WT häufig nukleäre Deformationen (Pfeile) und eine Abwesenheit von Nesprin-2 Giant an der Kernhülle (Pfeilspitze). Nach FTI-Behandlung zeigt sich eine deutliche Reduktion der nukleären Deformitäten sowie eine Rekrutierung von Nesprin-2 Giant an die Kernhülle (Sterne). Balken: 10 μm (B) Statistische Auswertung von jeweils 600 Zellen in (A) zeigt eine deutliche Reduktion des nukleären Phänotyps sowohl in *LMNA* G608G und ZMPSTE24 KO Fibroblasten, die Defekte in der Lam A Prozessierung aufweisen, als auch in *LMNA* S143F und R133L Fibroblasten, die eine normale Lam A Prozessierung durchlaufen. (C) Westernblotanalyse von mit FTI-277 behandelten WT, *LMNA* S143F, *LMNA* R133L und *LMNA* G608G Fibroblasten. Einsatz eines pAb Lamin A/C zeigt die Akkumulation von nichtfarnesylierten Prälam A und damit eine effiziente Blockade der Prälam A-Farnesylierung (Stern). In *LMNA* G608G Fibroblasten ist deutlich die Bildung des Progerins (67 kDa) zu beobachten.

### 3.2. Charakterisierung einer Nesprin-2 Giant defizienten Maus

Zur Analyse des Nesprin-2 Proteins wurde 1999 in der Arbeitsgruppe Walz, Freiburg, eine Nesprin-2 Giant defiziente Mauslinie generiert. Die Generierung dieses Mausmodells wurde bereits beschrieben (Dissertation Hafida Zaim, 2005).

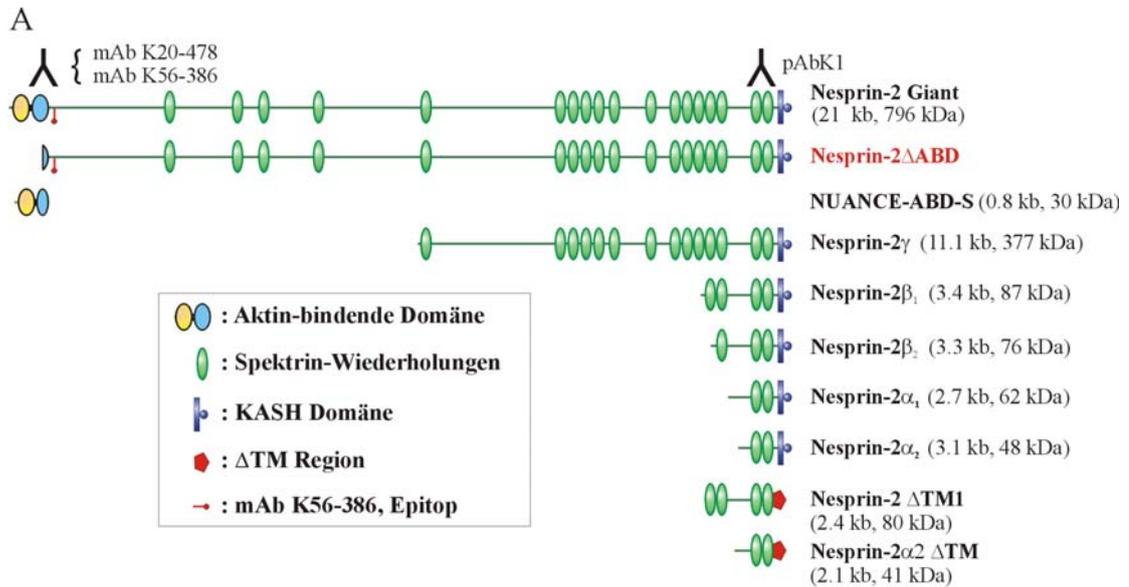


**Abbildung 3.17: Generierung der Nesprin-2 Giant KO Maus.** (A) Schematische Repräsentation der Nesprin-2 Giant KO Strategie. Dargestellt ist die partielle genomische Organisation des Nesprin-2 WT Genorts sowie die für die ABD Domäne kodierenden Exons (gelbe Balken), der verwendete Knock-out Vektor und das mutierte Allel nach erfolgreicher homologer Rekombination. Nesprin-2 Exons 2-4 wurden ersetzt durch ein pgk1-Neomycin Resistenz-Gen (NEO). Position des Nesprin-2 Giant ATG Translationsstart in Exon 1 ist durch einen Pfeil markiert. Die Position der 3' Sonde, die für die Southernblot Analyse benutzt wurde, ist ebenfalls angezeigt. Die Primerpositionen für die RT-PCR sind markiert (siehe auch Abb.3.30.). Abkürzungen: Ex, Exon; S, *SacI*; K, *KpnI*. (B) Southernblotanalyse der aus Schwanzspitzen isolierten genomischen DNA. Für die 3' Sonde wurde die genomische DNA mit *SacI* verdaut. (C) Zellysate von HaCaT Zellen, primären +/+ und -/- Fibroblasten wurden in einem 3-15% Gradienten SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Westernblotanalyse mit pAb K1 zeigt die Abwesenheit des Nesprin-2 Giant Proteins in den KO Fibroblasten (Pfeil). Nesprin-2 C-terminale Isoformen sind in WT und Mutante in vergleichbaren Mengen vorhanden (Sterne). Der HaCaT Blot zeigt Signale nach 5 minütiger ECL Exposition, während die Fibroblastensignale nach 30 minütiger ECL Exposition erhalten wurden. Aktin dient als Ladekontrolle.

Zum besseren Verständnis soll in der vorliegenden Arbeit sowohl die Generierung als auch die Genotypisierung der Nesprin-2 Giant defizienten Maus gezeigt werden. Für die Generierung der Nesprin-2 Giant defizienten Maus wurden die für die CH1- Domäne (Calponin-Homologie Domäne 1) kodierenden Exons 2, 3 und 4 deletiert, die zusammen mit der CH2-Domäne eine funktionelle ABD-Domäne bilden (Gimona et al., 2002) (Abb.3.17.A). Für die vorliegende Arbeit wurde die Genotypisierung der Mäuse durch einen Restriktionsverdau der genomischen DNA mit *SacI* und einer anschließenden Southernblotanalyse mit der 3' Sonde durchgeführt (Abb.3.17.B). In der Dissertationsarbeit von Zaim wurde bereits gezeigt, dass das Nesprin-2 Giant Protein in den homozygoten Mäusen nicht exprimiert wird (Abb.3.17.C). Die Expressionslevel der C-terminalen Nesprin-2 Isoformen (Sterne) sowie des Emerins bleiben unverändert.

### **3.2.1. Identifizierung des reaktiven Epitops eines mausspezifischen Nesprin-2 ABD Antikörpers (mAb K56-386)**

Für die Analyse der Nesprin-2 Giant defizienten Maus wurde ein monoklonaler Antikörper (K56-386) generiert, der gegen den N-Terminus (CH2-Domäne und die darauf folgenden 210 AS) des murinen Nesprin-2 Giant Proteins gerichtet ist (Zaim, 2005). Um zu bestimmen, welche Peptidsequenz vom mAb K56-386 erkannt wird, wurden verschiedene N-terminale Nesprin-2 Fusionsproteine generiert, die es ermöglichten, das Epitop des Antikörpers zu identifizieren (Abb. 3.18.B). In diesem Versuch wurden Ex9-GFP (AKVRDALVWLTQLQEKRFQKMLKDSASETYCNKYH) und Ex9 $\Delta$ -GFP, das aus einem 22 Aminosäuren großen Fragment des Exon 9 (AKVRDALVWLTQLQEKRFQKMLK) besteht, von mAb K56-386 erkannt (siehe auch Abb. 3.30.A).

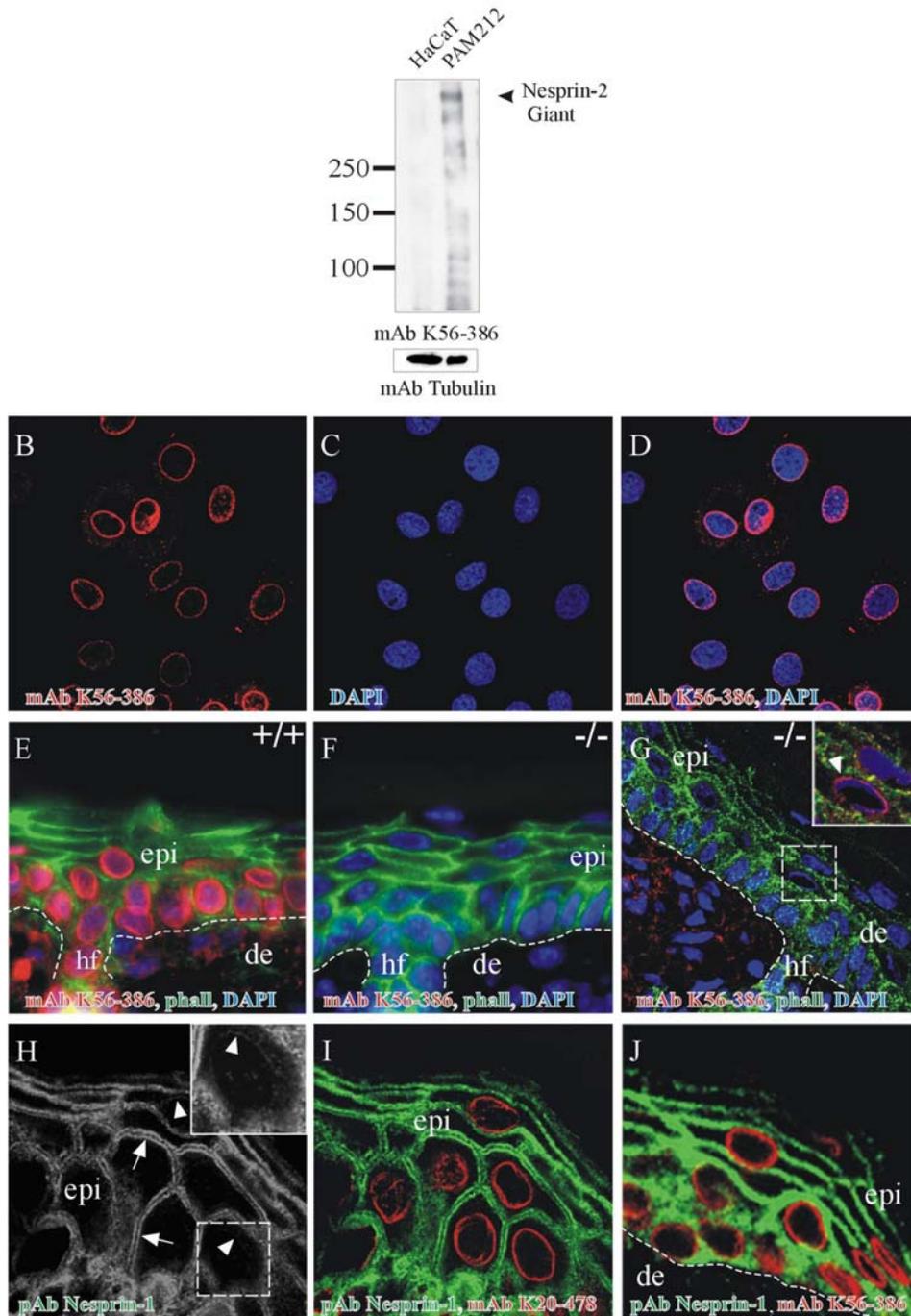


**Abbildung 3.18.: Kartierung des Epitops des gegen die ABD Domäne gerichteten mausspezifischen mAb K56-386. (A)** Schematische Darstellung aller bekannten Nesprin-2 Isoformen. Gezeigt sind die Epitope der verwendeten Antikörper (invertierte Y) einschließlich des identifizierten Epitops des mAb K56-386. **(B)** Exon9 $\Delta$  kodiert für das mAb K56-386 Epitop. GFP-Fusionsproteine mit verschiedenen Nesprin-2 Exons wurden generiert. Ex9 $\Delta$  ist ein 22 Aminosäuren großes Fragment aus Ex9. GFP-Konstrukte wurden transient in COS7 Zellen transfiziert. Zellysate wurden durch SDS-Page aufgetrennt und mit mAb GFP und mAb K56-386 geblottet.

### 3.2.2. Charakterisierung des mAb K56-386

Zaim (2005) konnte bereits zeigen, dass durch Einsatz von K56-386 Hybridoma-Überständen endogenes Nesprin-2 Giant in murinen PAM212 Zellen detektiert werden kann. Des Weiteren konnte Nesprin-2 Giant Protein mit pAb K1 nachgewiesen werden. Nach einer Affinitätsreinigung des Hybridomaüberstandes wurde die Spezies-Spezifität des Antikörpers an Zelllysaten aus humanen HaCaT-Keratinocyten und murinen PAM-212 Keratinocyten überprüft (Abb.3.19.A) und gezeigt, dass mAb K56-382 spezifisch murines Nesprin-2 Giant detektiert.

A



**Abbildung 3.19.: Charakterisierung des mAb K56-386.** (A) Spezies-Spezifität des mAb K56-386. Westernblotanalyse von HaCaT (humane Keratinozyten) und PAM212 (murine Keratinozyten) Lysaten mit mAb K56-386 zeigt die Detektion der 796 kDa Bande nur in murinen PAM212 Zellen. Tubulin dient als Ladekontrolle. In Immunfluoreszenzanalysen (1:10 Verdünnung) kann eine K56-386 Färbung sowohl in PAM212 Zellen an der Kernhülle (B-D) als auch in Gefrierschnitten von muriner WT Haut (E) detektiert werden, während es in Gefrierschnitten der KO Haut nicht nachgewiesen werden kann (F). Zur Darstellung der Plasmamembran wurden die Gefrierschnitte der Haut mit Phalloidin gegengefärbt. Wird mAb K56-386 konzentriert eingesetzt, kann in vereinzelt epidermalen Nuklei eine K56-386 Färbung nachgewiesen werden (Vergrößerung in G, Pfeilspitze). Nesprin-1 Giant Färbung ist sowohl in humaner (I) als auch in muriner (J) Epidermis deutlich verschieden. Neben der Lokalisation an der Kernhülle (Vergrößerung in H) lässt sich Nesprin-1 auch an der Plasmamembran nachweisen (H, Pfeile). Nuklei werden mit DAPI sichtbar gemacht. Epi, Epidermis; de, Dermis.

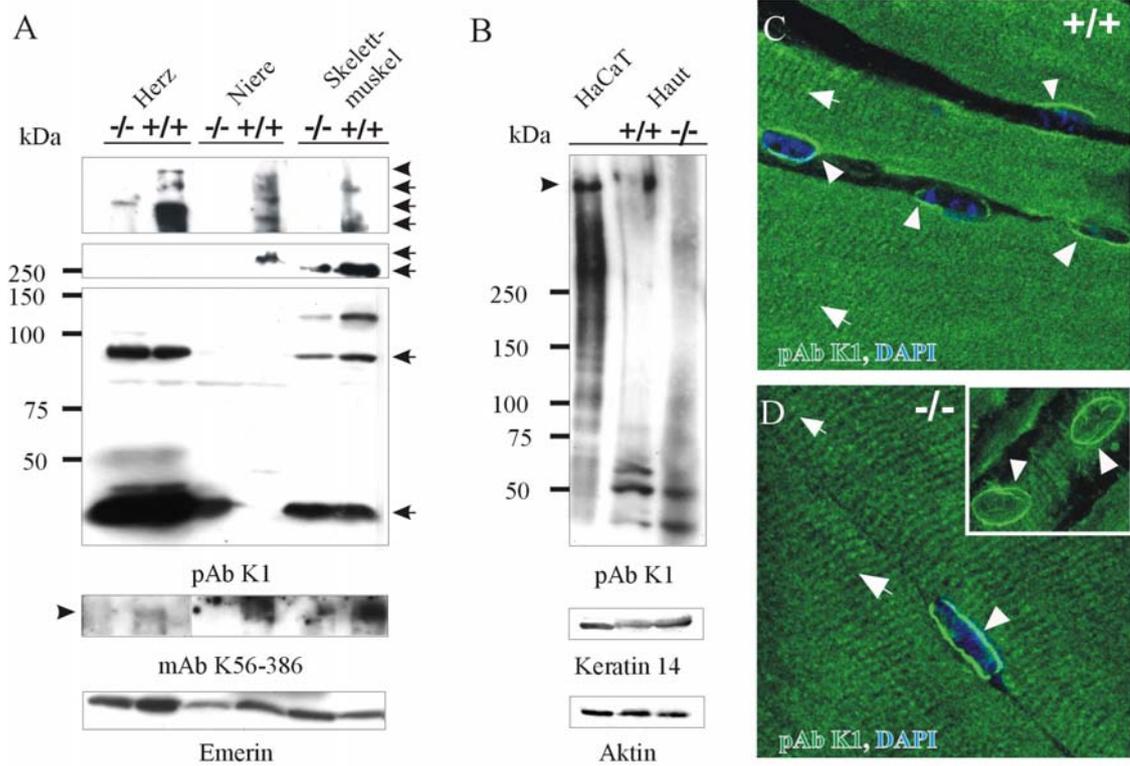
In PAM212 Zellen (Abb.3.19.B-D) und in Hautschnitten neugeborener WT Mäuse (E) färbt mAb K56-386 spezifisch die Kernhülle an. In Hautschnitten von Nesprin-2 Giant defizienten Mäusen ist eine K56-386 Färbung nicht vorhanden (Abb.3.19.F); lediglich bei Einsatz des unverdünnten Antikörpers kommt es in vereinzelt Keratinozyten zu einem schwachen Signal an der Kernhülle (Abb.3.19.H; Pfeilspitze in der Vergrößerung). Eine Kreuzreaktion des mAb K56-386 mit dem eng verwandten Nesprin-1 Giant Protein kann ausgeschlossen werden. Die Nesprin-1 Giant Färbung sowohl in humaner (Abb.3.19.I) als auch in muriner Haut (Abb.3.19.J) unterscheidet sich deutlich von der Nesprin-2 Färbung. Während Nesprin-1 an Zell-Zell-Kontakten (Abb.3.19.H; Pfeile) und an der Kernhülle (Abb.3.19.H; Pfeilspitzen) lokalisiert ist, ist die Nesprin-2 Giant Färbung auf die Kernhülle begrenzt (Abb.3.19.I und J).

### **3.2.3. Die Expression der C-terminalen Nesprin-2 Isoformen ist verändert in Geweben von Nesprin-2 Giant defizienten Mäusen**

Der Großteil der kleinen C-terminalen Nesprin-2 Isoformen wird wahrscheinlich durch den alternativen Gebrauch interner Transkriptions- bzw. Translationsstartpunkte gebildet. Aufgrund der Anwesenheit der Nesprin-2 C-terminalen Isoformen in Nesprin-2 Giant defizienten Fibroblasten (Zaim, Dissertation 2005; siehe auch Abb. 3.17.C), wurde ein Expressionsprofil verschiedener Gewebe (Herz, Niere, Skelettmuskel und Haut) der Nesprin-2 Giant KO Maus im Vergleich zum WT angefertigt. Es wurde bereits gezeigt, dass Nesprin-2 in diesen Geweben stark exprimiert wird (Zaim, Dissertation 2005). Ein Westernblot (Abb.3.20.A) mit zwei verschiedenen Nesprin-2 Antikörpern zeigt die Abwesenheit der Nesprin-2 Giant Isoform in Gewebelysaten von Herz, Niere und Skelettmuskel (Pfeilspitzen). Während die Mengen einzelner Isoformen in Herz- (~ 45 und ~ 95 kDa) und Skelettmuskelgewebe (~ 45 kDa) im Vergleich zum WT unverändert sind, werden für andere Isoformen entweder reduzierte Mengen oder eine völlige Abwesenheit beobachtet. So fehlen bei Gewebelysaten der Nesprin-2 Giant defizienten Maus in der Niere im Vergleich zum WT die ~300, ~400, ~600 und 800 kDa Isoformen und im Skelettmuskel die ~400 und 800 kDa Isoformen. Im Herzgewebe ist die Expression der 400 kDa Isoform verglichen zum WT

reduziert, während die ~600 und 800 kDa Isoformen nicht vorhanden sind (Abb.3.20.A.; Pfeile).

Eine immunhistochemische Analyse des Skelettmuskelgewebes der Nesprin-2 Giant defizienten Maus mit dem pAb K1 Antikörper zeigt eine zum WT identische Färbung der Kernhülle (Abb.3.20.C und D; Pfeilspitzen) sowie der sarkomeren Strukturen wie bereits von Zhang et al. (2005) beschrieben. In Gewebelysaten der Haut (Abb.3.20.B) wurde ebenfalls eine Reduktion der kleineren C-terminalen Isoformen beobachtet. Um diese Veränderungen in den Expressionsprofilen zu erfassen, wurden 20 verschiedene Westernblots mit Proben von je 4 Mäusen ausgewertet (Abb.3.20.E). Die Ergebnisse zeigen, dass es durch den Verlust der Nesprin-2 Giant Isoform in den untersuchten Geweben auch zu einem veränderten Expressionsmuster der C-terminalen Nesprin-2 Isoformen kommt.



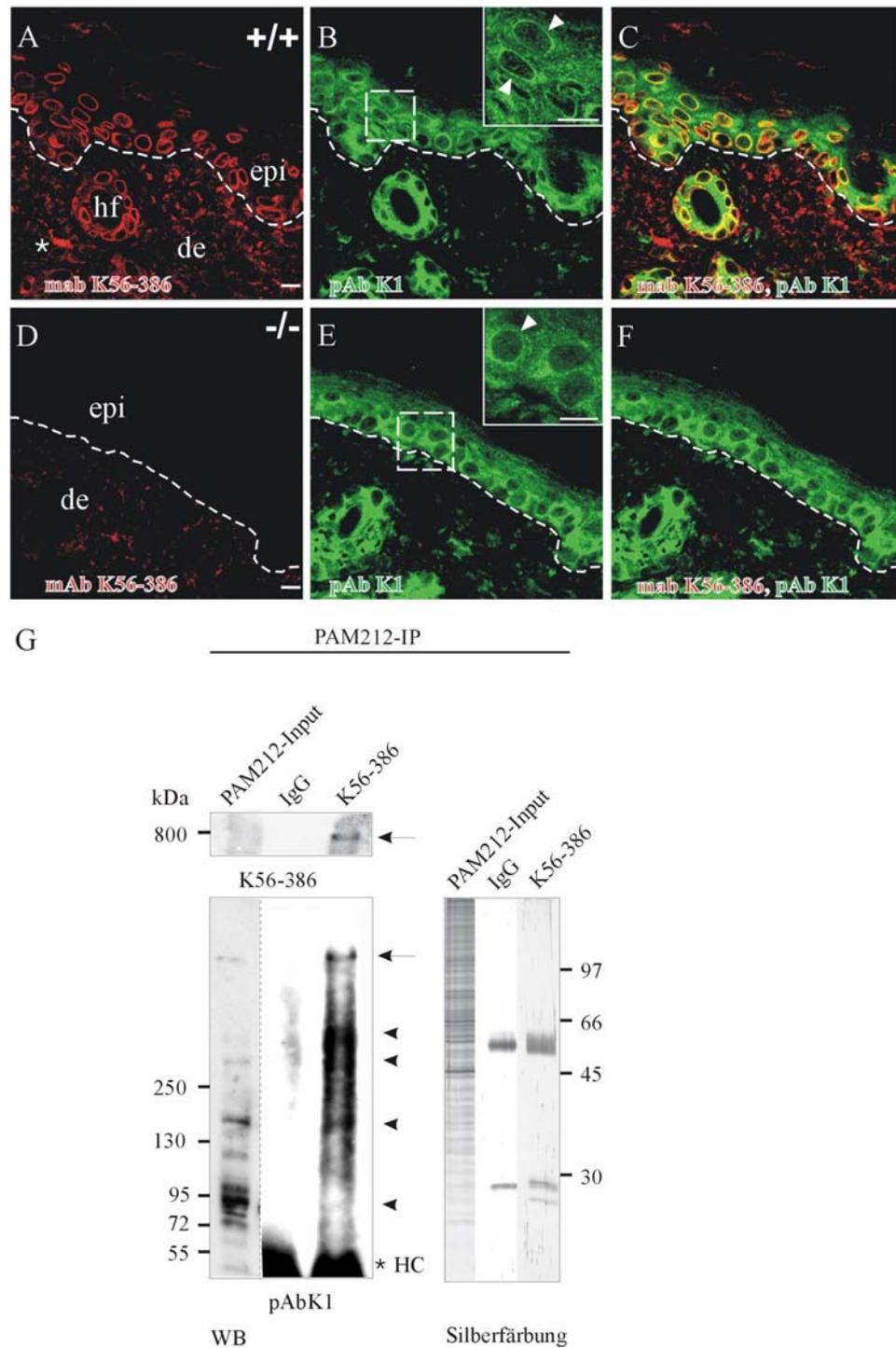
E

kDa \ Gewebe	Herz		Niere		Skelett muskel		Haut	
	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO
800	✓	-	✓	-	✓	-	✓	-
600	✓	-	✓	-			✓	-
400	✓	~	✓	-	✓	-	✓	~
300			✓	-				
250					✓	~	✓	~
130					✓	~		
95	✓	✓			✓	~		
50			✓	~			✓	✓
45	✓	✓			✓	✓		

**Abbildung 3.20.: Verlust der Nesprin-2 Giant Isoform führt zu einem veränderten Expressionsmuster der C-terminalen Isoformen.** (A und B) Westernblotanalyse verschiedener WT und KO Gewebelysate. Verschiedene mit dem pAb K1 Antikörper reaktive C-terminale Isoformen sind abwesend bzw. reduziert in den KO Geweben. Nesprin-2 Giant ist sowohl mit pAb K1 als auch mit mAb K56-386 nicht detektierbar. Geringe Veränderungen des Emerin-Expressionsniveaus lassen sich beobachten. Immunhistochemische Analyse von Gefrierschnitten des Skelettmuskelgewebes zeigt keine Unterschiede zwischen WT und KO. Wie im WT färbt pAb K1 im KO die Kernhülle (Pfeilspitzen) und sarkomere Strukturen (Pfeile). Nuklei wurden mit DAPI angefärbt. (E) Tabellarische Darstellung konsistent vorkommender Nesprin-2 Isoformen in verschiedenen Geweben. 20 verschiedene pAb K1 Westernblots mit Proben von je vier Tieren wurden ausgewertet. Anwesenheit bestimmter Isoformen wird angezeigt durch (✓), Abwesenheit durch (-) und Reduktion durch (~).

### **3.2.4. Nesprin-2 Giant abhängige Lokalisation der C-terminalen Isoformen**

Während im Herz und im Skelettmuskel der Nesprin-2 Giant defizienten Maus C-terminale Nesprin-2 Isoformen (45 kDa) sehr stark exprimiert werden, zeigen diese Isoformen in der Haut nur eine schwache Expression. Weiterführende Studien wurden an Hautgewebe durchgeführt, da hier die Auswirkungen der Nesprin-2 Giant Defizienz auf die C-terminalen Isoformen eher zu einer phänotypischen Ausprägung führen sollte. Eine immunhistochemische Analyse von Hautschnitten neugeborener WT Mäuse zeigt in der Epidermis eine Lokalisation von Nesprin-2 Giant an der Kernhülle, die mit der pAb K1 Färbung kolokalisiert (Abb.3.21.A, C). Zusätzlich färbt pAb K1 zytoplasmatische Strukturen (Abb.3.21.B). In der Dermis erscheint die Lokalisation der Nesprin-2 Proteine diffuser, wobei vereinzelt die Lokalisation an der Kernhülle beobachtet werden kann (Abb.3.20.A; Sterne). In Hautschnitten neugeborener Nesprin-2 Giant KO Mäuse ist Nesprin-2 Giant in der Epidermis nicht nachweisbar (Abb.3.21.D) und pAb K1 zeigt eine ausgeprägte zytoplasmatische Färbung (Abb.3.21.E). Im Gegensatz zur WT Epidermis, in der pAb K1 eine starke Färbung an der Kernhülle zeigt, ist diese in der Mutante stark reduziert (Abb.3.21.E; Pfeilspitze). Während in der Niere die Defizienz von Nesprin-2 Giant keinen Einfluss auf die Lokalisation der Nesprin-2 C-terminalen Isoformen hat, lassen sich durch vorliegende Beobachtungen Rückschlüsse auf eine Targeting-Funktion der Nesprin-2 Giant Isoform in der Haut ziehen. Dies ist besonders interessant, da bislang angenommen wurde, dass die Anwesenheit der C-terminalen KASH-Domäne ausreichend ist für eine Lokalisation an der Kernhülle (Padmakumar et al., 2005). Unsere Ergebnisse lassen nun vermuten, dass die Nesprin-2 Giant Isoform in der Haut die kleinen C-terminalen Nesprin-2 Isoformen durch zusätzliche direkte oder indirekte intermolekulare Interaktionen an der Kernhülle stabilisiert. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurde Nesprin-2 Giant in PAM212 Zellen mit mAb K56-386 immunpräzipitiert (Abb.3.21.G) und anschliessend wurden im Immunpräzipitat mit mAb K56-386 und pAb K1 die C-terminalen Nesprin-2 Isoformen (Abb.3.21.G; Pfeilspitzen) und Nesprin-2



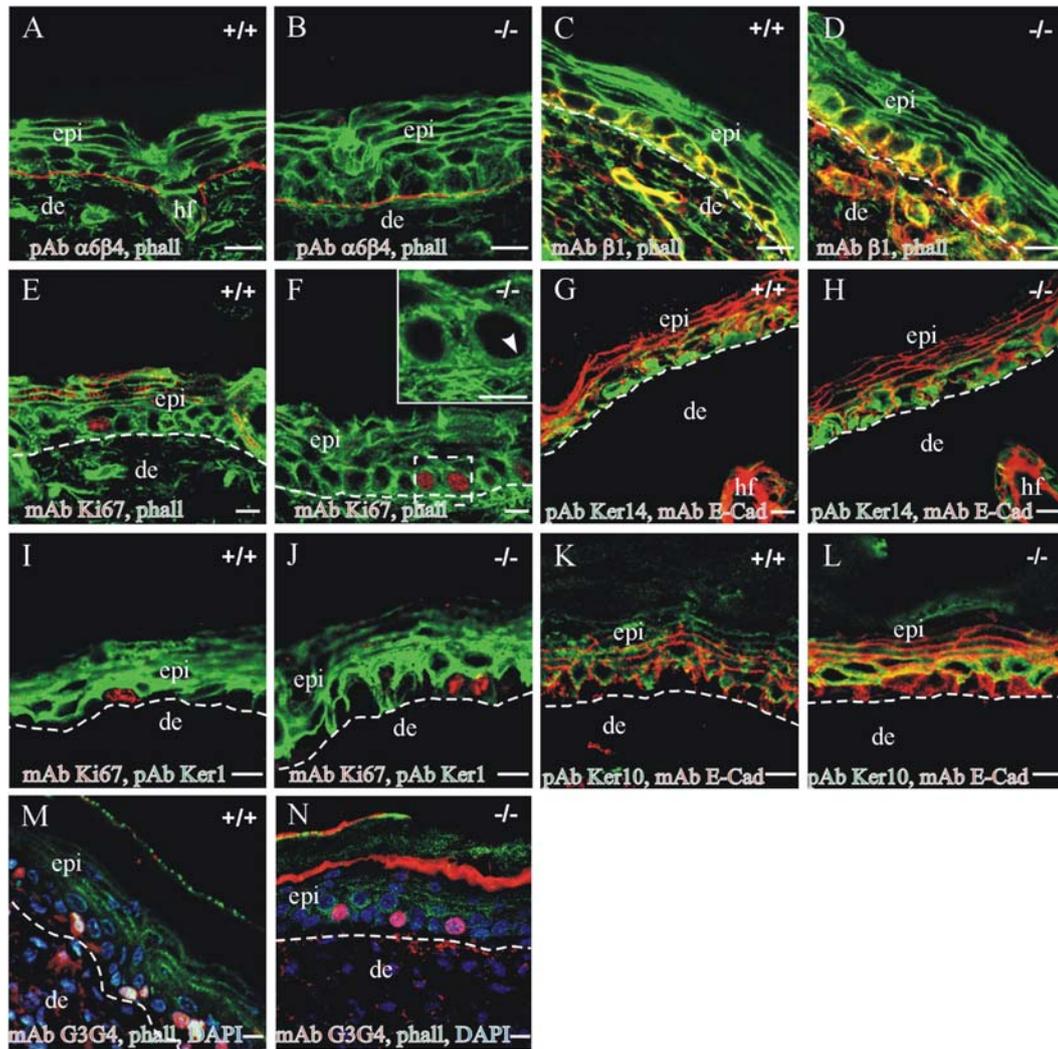
**Abbildung 3.21.: Die Lokalisation der Nesprin-2 C-terminalen Isoformen ist in der Haut der Nesprin-2 Giant KO Maus beeinträchtigt.** (A) Gefrierschnitte von WT (A-C) und KO (D-F) Haut wurden mit mAb K56-386 und pAb K1 angefärbt. Im WT zeigt sich mit pAb K1 in der Epidermis eine intensive Färbung der Kernhülle (B; Pfeilspitze), die im KO kaum erkennbar ist (E; Pfeilspitze). pAb K1 färbt zusätzlich sowohl im WT als auch im KO zytoplasmatische Strukturen. mAb K56-386 färbt in der Epidermis des WT intensiv die Kernhülle (A), diese Färbung ist abwesend im KO (D). Hf, Haarfollikel; de, Dermis; epi, Epidermis. Balken: 10 µm. (G) Nesprin-2 Giant-mAb K56-386 Immunkomplexe aus PAM212 Zellen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Westernblots mit mAb K56-386 und pAb K1 zeigen die Anwesenheit der Nesprin-2 Giant Isoform (Pfeile) und der C-terminalen Isoformen (Pfeilspitzen) nur in der Nesprin-2 Giant IP und nicht in der Kontrolle mit einem mAb GFP. Eine Silberfärbung wurde als Kontrolle angefertigt. (HC: IgG heavy chain).

Giant nachgewiesen (Abb.3.21.G; Pfeile). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Nesprin-2 Proteine in der Haut ein Netzwerk ausbilden, in dem die verschiedenen Isoformen miteinander verknüpft sind.

### **3.2.5. Nesprin-2 Giant beeinflusst die Dicke der Epidermis und die Morphologie der Kerne in der Epidermis**

#### **3.2.5.1. Epidermale Proliferation und Differenzierung ist unverändert in der Nesprin-2 Giant KO Maus**

Eine immunhistologische Untersuchung der Epidermis der Nesprin-2 KO Maus zeigt neben einer Verdickung der Epidermis keine augenfälligen Veränderungen (Abb. 3.22.A und B). Für die Messung der Epidermis wurden die interfollikulären Bereiche gewählt und es wurden je 150-170 nach dem Zufallsprinzip ausgewählte Bereiche ausgewertet. Es zeigte sich im KO ( $121 \pm 17 \mu\text{m}$ ) im Vergleich zum WT ( $96 \pm 16 \mu\text{m}$ ) eine durchschnittliche Verdickung der Epidermis um ca.  $25 \mu\text{m}$  ( $P = 2,6 \times 10^{-33}$ ). Eine Anfärbung des Integrin  $\beta 1$  (Abb.3.21.C und D), das eine wichtige Funktion bei der Regulation der epidermalen Differenzierung und Morphogenese ausübt, zeigt wie im WT eine Färbung nur im Bereich der Basalmembran. Um zu prüfen, ob eine Hyperproliferation der Keratinozyten zu der beobachteten epidermalen Verdickung führt, wurden zum einen Kryoschnitte mit dem Proliferationsmarker Ki67 angefärbt (Abb.3.22.E und F), zum anderen wurde eine *in vivo* Injektion von BrdU durchgeführt, und die erhaltenen Kryoschnitte mit mAb G3G4 gefärbt (Abb.3.22.M und N). Sowohl im WT als auch im KO ist die Lokalisation der proliferierenden Zellen auf die Basalschicht begrenzt. Eine Hyperproliferation konnte zusätzlich durch die Bestimmung des mitotischen Index ausgeschlossen werden (WT 18,9% und KO 14,5%; P-Wert: 0,07). Eine Gegenfärbung der Kryoschnitte mit Phalloidin zeigte im WT und KO einen sehr intensiven F-Aktin Ring an der Kernhülle; dieser Befund impliziert, dass es Nesprin-2 Giant unabhängige Mechanismen gibt, die das Aktin-Zytoskelett mit der Kernhülle verbinden (Abb.3.22.F; Pfeilspitze). Die verschiedenen Stadien der räumlichen und zeitlichen epidermalen Differenzierung, die mittels spezifischer Keratin-Antikörper untersucht wurden (Abb.3.22.G-L), zeigten ebenfalls keine Unterschiede zwischen WT und KO.

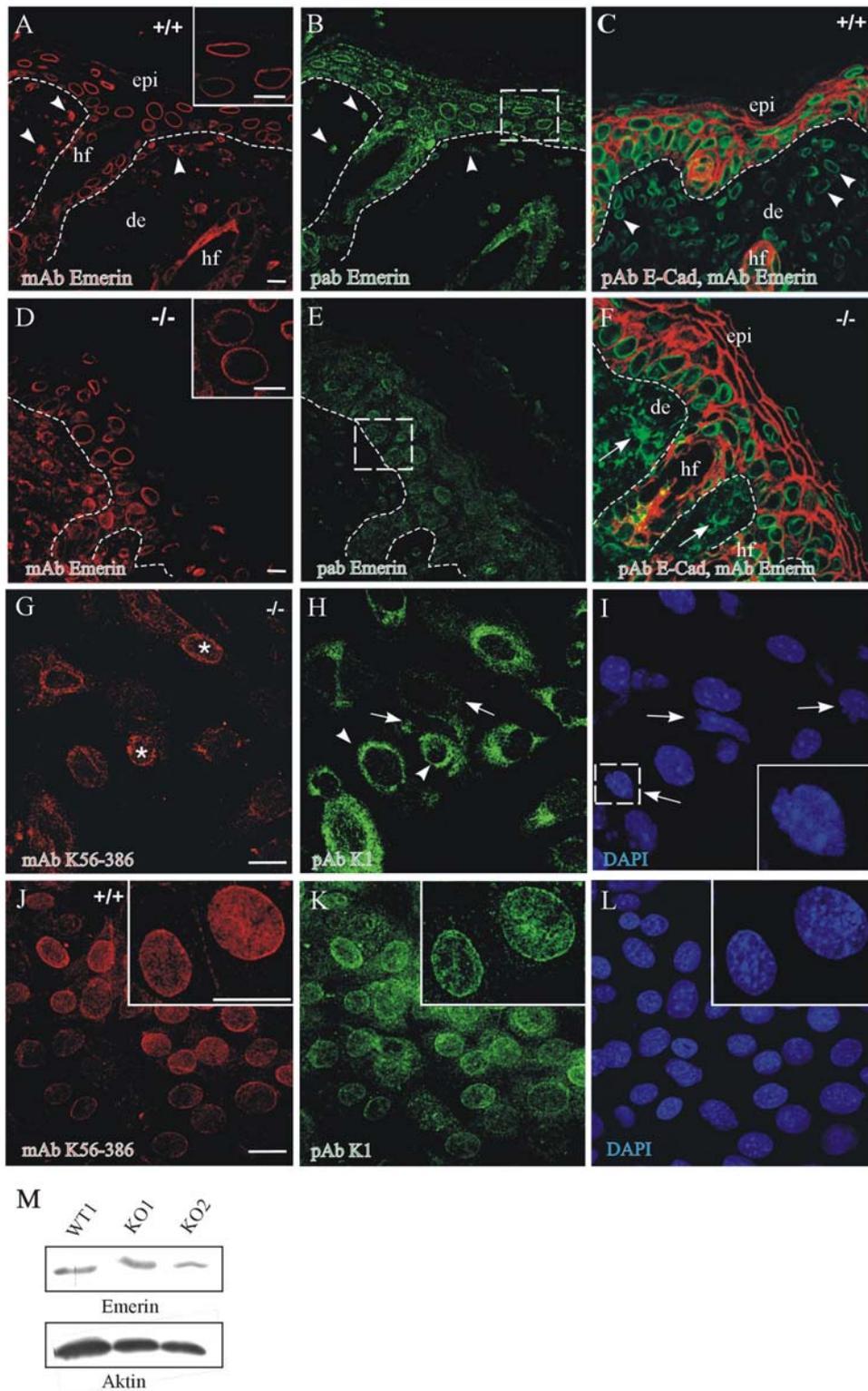


**Abbildung 3.22.: Epidermale Proliferation und Differenzierung ist normal in Nesprin-2 Giant defizienten Mäusen.** 4 Tage alte WT (A, C, E, G, I, K) und KO (B, D, F, H, J, L) Haut wurde fixiert, geschnitten und Immunfluoreszenzen mit spezifischen Antikörpern angefertigt (siehe Beschriftung der einzelnen Bilder). Für die *in vivo* Injektion wurde BrdU intraperitoneal in 2 Tage alte Mäuse injiziert und die Haut nach 2 h weiterverarbeitet. Färbung der Kryoschnitte mit mAb G3G4, der spezifisch inkorporiertes BrdU detektiert (M und N). Gegenfärbung mit Phalloidin dient der Sichtbarmachung der Plasmamembran. Balken: 10 µm. Deutlich zu erkennen ist eine Verdickung der Epidermis in der KO Haut. α6β4, α6β4 Integrin; β1, β1 Integrin; phall, Phalloidin; Ker14, Keratin 14; Ker1, Keratin 1; Ker10, Keratin 10; E-Cad, E-Cadherin. Balken: 10 µm.

### 3.2.5.2. Nesprin-2 Giant beeinflusst die Größe und Morphologie der Kerne in der Epidermis

Es wurde bereits in COS7 Zellen gezeigt, dass Nesprin-2 Giant für die Lokalisation von Emerin notwendig ist (Libotte et al., 2005). Wie in Abb.3.23.A-F gezeigt, kommt es auch zu Veränderungen der Emerin Lokalisation in der Haut der Nesprin-2 Giant defizienten Maus. Während in der Epidermis von WT und KO Emerin an der Kernhülle vorliegt, zeigt sich in der Dermis eine

aberrante Lokalisation. In der KO Dermis ist Emerin nicht länger an der Kernhülle präsent im Gegensatz zum WT (Abb.3.23.A-C; Pfeilspitzen), sondern besitzt eine diffuse subzelluläre Lokalisation (Abb.3.23.F; Pfeile). In einer Westernblotanalyse zeigt sich, dass sich die Veränderungen auf eine veränderte subzelluläre Lokalisation beschränken, da die Expression unverändert ist (Abb.3.23.M). Zusätzlich zeigt sich, dass die Nuklei in der Epidermis der Nesprin-2 Giant KO Maus größer sind als im WT (Abb.3.23.A und D; Insets; sowie C, F). Um die Unterschiede zwischen den Zelltypen der Haut näher zu untersuchen, wurden primäre Keratinozyten und Fibroblasten isoliert und analysiert. Die Immunfluoreszenzanalyse mit mAb K56-386 an primären KO Keratinozyten zeigt überraschenderweise eine heterogene Färbung. Von 200 ausgewerteten Zellen weisen 80% keine Färbung auf, während 20% ein schwaches und diskontinuierliches Signal an der Kernhülle zeigten (Abb.3.23.G; Sterne). Weiterhin verfügen die Zellen dieser Subpopulation über eine normale Kernmorphologie, während Nuklei der Nesprin-2 Giant negativen Keratinozyten schwere Deformationen aufweisen (Abb.3.23.I; Pfeile). Die Subpopulation der Zellen, die ein schwaches K56-386 Signal zeigen, werden im Folgenden als Nesprin-2 $\Delta$ ABD bezeichnet, während die Subpopulation, die negativ für K56-386 ist, weiterhin als Nesprin-2 Giant defizient bezeichnet wird (siehe auch Abschnitt 3.2.8.). Die Nesprin-2  $\Delta$ ABD Keratinozyten weisen eine pAb K1 Färbung an der Kernhülle auf (Abb.3.23.H; Pfeilspitzen), während bei dem Großteil der Nesprin-2 Giant defizienten Keratinozyten kein bzw. ein sehr schwaches Signal vorhanden ist (Abb.3.23.H; Pfeile). Die Nuklei, die kein Signal für pAb K1 zeigen, weisen schwere Deformationen auf (Abb.3.23.I; Pfeile). In WT Keratinozyten zeigen Immunfluoreszenzen mit mAb K56-386 und pAb K1 eine intensive Färbung der Kernhülle an und diese Keratinozyten besitzen eine normale Kernmorphologie (Abb.3.23.J-L).



**Abbildung 3.23.: Nesprin-2 Giant bestimmt nukleäre Fläche und Morphologie in der Epidermis.** Kryoschnitte von WT (A-C) und KO Haut (D-F) wurden mit verschiedenen Antikörpern gegen Emerin angefärbt. Während in der WT Dermis Emerin an der Kernhülle lokalisiert ist (A-C; Pfeilspitzen), weist es in der KO Dermis eine veränderte zytoplasmatische Lokalisation auf (F; Pfeile). Emerin Lokalisation in der Epidermis ist im KO unverändert. Nukleäre Fläche ist vergrößert in der Epidermis des KO (vergleiche C und F). Immunfluoreszenzen mit pAb K1 und mAb K56-386 an primären WT und KO Keratinozyten zeigen eine Subpopulation von K56-386 positiven KO Zellen (G; Sterne). Diese weisen im Gegensatz zu K56-386 negativen Keratinozyten (I; Pfeile) eine normale nukleäre Morphologie (I) und eine pAb K1 Färbung an der Kernhülle auf (H, Pfeilspitzen). Balken: 10 µm.

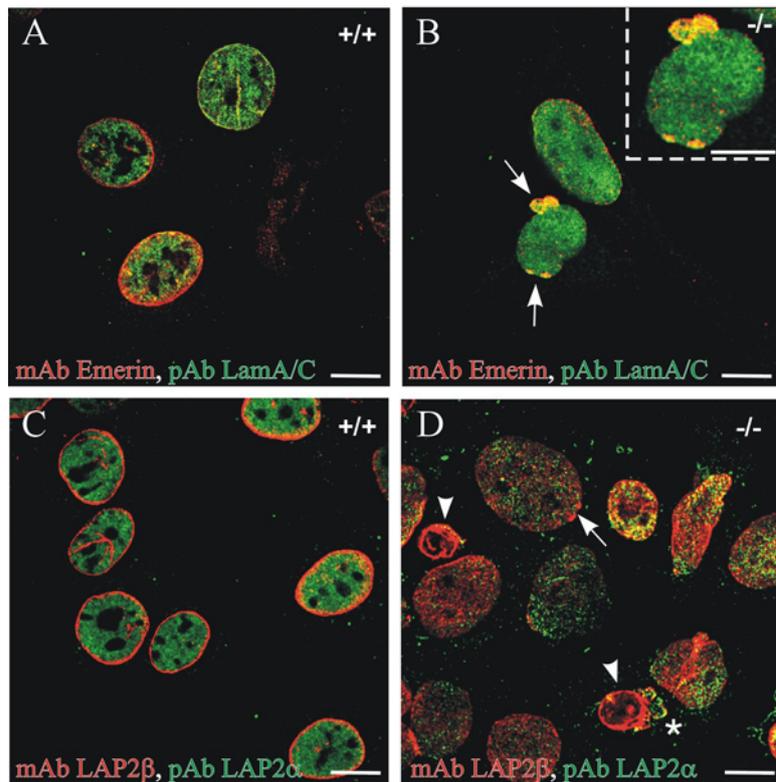
Das Ausmaß der nukleären Deformationen wurde morphometrisch erfasst und das nukleäre Konturverhältnis bestimmt (siehe 2.6.1.), das Auskunft über das Ausmaß nukleärer Deformationen gibt (Abb.3.24). Während die WT Keratinozyten ein nukleäres Kontur-Verhältnis von 0.85 aufweisen, sinkt der Wert auf 0.69 in Nesprin-2 Giant defizienten Keratinozyten. Die nukleäre Fläche nimmt um den Faktor 1.97 zu. Dagegen weisen die Nesprin-2ΔABD Keratinozyten ein nukleäres Kontur-Verhältnis auf, das dem des WT gleicht. Die Fläche dieser Zellen ist jedoch im Vergleich zum WT signifikant vergrößert, was darauf hinweist, dass der Bereich der ABD-Domäne, der in der alternativ gespleißten Nesprin-2ΔABD Isoform fehlt (siehe Abb.3.18.), eine wichtige Funktion bei der Erhaltung der Kerngröße einnimmt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Nesprin-2 Giant die nukleäre Größe und Morphologie in Keratinozyten bestimmt.

	Fläche [μm <sup>2</sup> ]	Perimeter [μm]	Kontur-Verhältnis
WT	104.4 ± 4.1	38.5 ± 1.5	0.85 ± 0.03
Nesprin-2 Giant defizient	205.7 ± 9.1	61.2 ± 2.7	0.69 ± 0.03
P-Wert	7.15E-83	9.2E-118	2.96E-98
Nesprin-2ΔABD	175.2 ± 8.6	50.5 ± 2.5	0.83 ± 0.04
P-Wert	9.45E-41	1.75E-49	3.9E-7

**Abbildung 3.24.: Morphometrische Analyse an Zellkernen von WT, Nesprin-2 Giant defizienten und Nesprin-2ΔABD Keratinozyten.** Das Kontur-Verhältnis in Nesprin-2 Giant defizienten Zellen nimmt signifikant ab im Vergleich zum WT, während die Fläche zunimmt. Ausgewertet wurden 500 Zellen in drei unabhängigen Experimenten.

### 3.2.5.3. Mislokalisierung der Proteine der LEM-Domäne-Familie in Nesprin-2 Giant defizienten Keratinozyten

Da die Abwesenheit des Nesprin-2 Giant Proteins schwerwiegende Veränderungen der Kernmorphologie hervorruft, wurden auch die LEM-Domäne Proteine untersucht, da ihre Fähigkeit, direkt und indirekt mit Chromatin zu interagieren, von einer korrekten Lokalisation und Organisation abhängig ist.

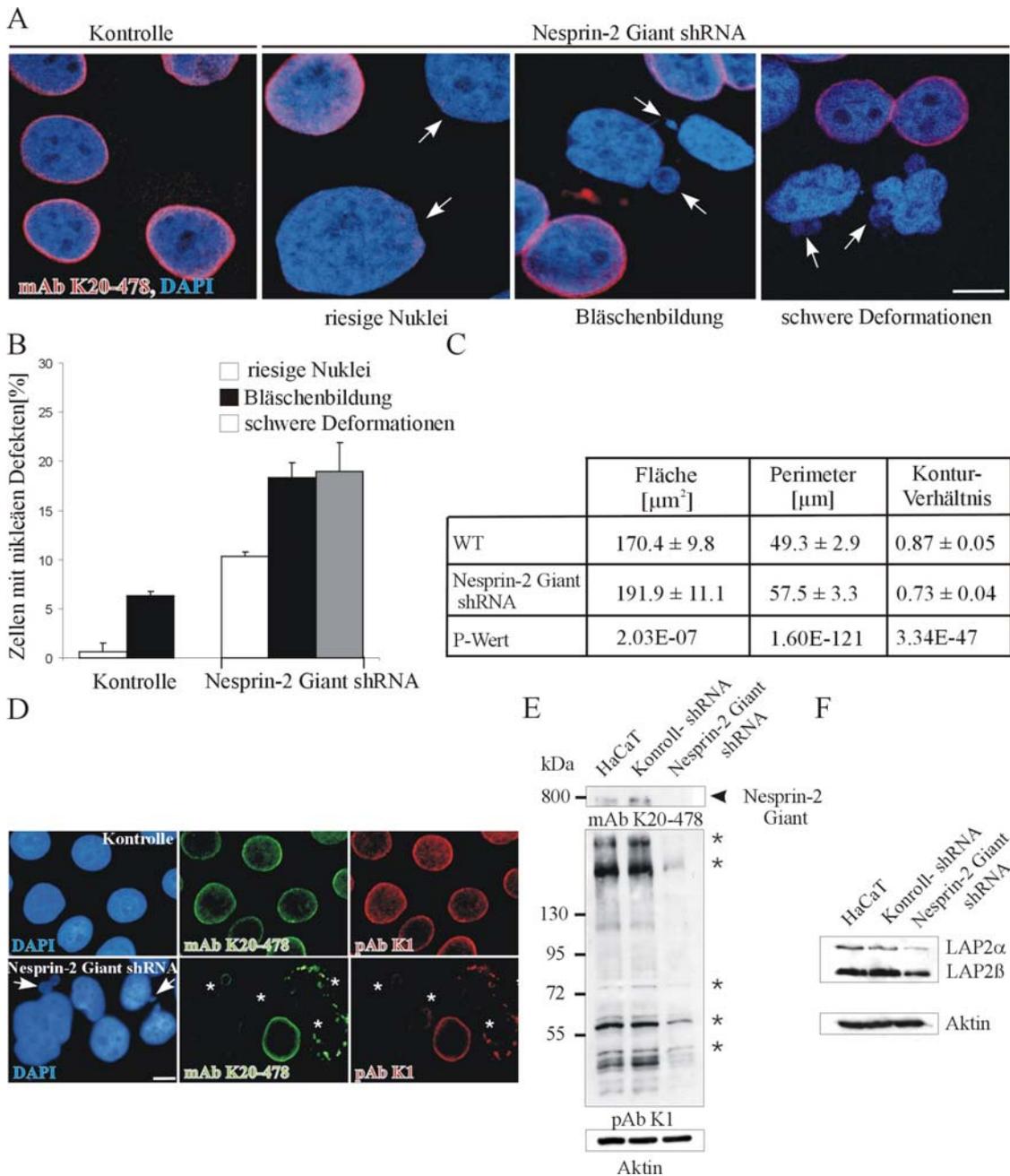


**Abbildung 3.25.: Mislokalisierung der Proteine der LEM-Domäne Familie.** Färbung von primären WT und Nesprin-Giant defizienten Keratinozyten mit mAb Emerin und pAb LamA/C bzw. mAb LAP2β und pAb LAP2α. Balken: 10 μm.

Anhand von Immunfluoreszenzstudien wurde die Lokalisation der integralen Proteine Emerin und LAP2β sowie des nukleoplasmatischen LAP2α Proteins untersucht. Insbesondere für Emerin zeigten sich im KO Aggregatbildungen an der Kernhülle und in den Ausstülpungen (Abb.3.25.B; Pfeile und Inset). LAP2β zeigt ebenfalls vereinzelt eine Aggregatbildung an der Kernhülle (Abb.3.25.D; Pfeil), während das LAP2α Protein im KO stark herunterreguliert ist (Abb.3.25.D; Pfeilspitzen) und sich in den Ausstülpungen der Kernhülle anreichert (Stern). Daraus kann geschlossen werden, dass die Abwesenheit des Nesprin-2 Giant Proteins nicht nur Einfluss auf die strukturelle Integrität des Nukleus nimmt, sondern dass auch durch die Beeinflussung der Lokalisation und Organisation von Proteinen, die wichtige Rollen in der Genregulation einnehmen (siehe Einleitung; Abb.1.3.1.), es zu Veränderungen der transkriptionalen Aktivität kommen kann.

### **3.2.6. Nesprin-2 Giant Silencing in humanen Keratinozyten beeinflusst die nukleäre Morphologie und Nesprin-2 C-terminale Isoformen**

Um die Daten zur Funktion des Nesprin-2 Giant Proteins zu unterstützen, wurden shRNAs (short hairpin RNAs) gegen die CH2 Domäne entwickelt und ihre Wirkung auf die nukleäre Morphologie von HaCaT Keratinozyten analysiert. Immunfluoreszenzanalysen mit mAb K20-478 zeigen einen vollständigen Verlust von Nesprin-2 Giant in 10 % der transfizierten Zellen. Nesprin-2 Giant Silencing induziert morphologische Veränderungen der Kernhülle, die in Keratinozyten, die mit Kontroll-Plasmiden transfiziert wurden, nicht auftraten (Abb.3.26.A). Der knock down von Nesprin-2 Giant führt zu einer Veränderung der nukleären Morphologie in Form kleiner bis sehr schwerer Deformationen sowie zu stark vergrößerten Nuklei (Abb.3.26.A und D; Pfeile). Im Gegensatz zur Kontrolle erhöht sich der Anteil der Zellen mit nukleären Deformationen in Nesprin-2 Giant knock down Keratinozyten (Abb.3.26.B). Eine morphometrische Analyse weist eine Reduktion des nukleären Kontur-Verhältnisses von 0.87 in der Kontrolle auf 0.73 in den Zellen nach, die einen knock down von Nesprin-2 Giant aufweisen (Abb.3.26.C). Das Silencing der Nesprin-2 Giant Isoform beeinflusst auch die C-terminalen Isoformen. In den Zellen, die kein Nesprin-2 Giant aufweisen, ist die pAb K1 Färbung sehr schwach und kolokalisiert mit Nesprin-2 Giant Aggregaten (Abb.3.26.D; Sterne). Das Silencing der Nesprin-2 Giant Isoform und die dadurch bedingte Beeinflussung der C-terminalen Isoformen wurden in Westernblot Analysen bestätigt (Abb.3.26.E). Der Befund, dass die Expression der kleinen C-terminalen Isoformen durch den knock down der Nesprin-2 Giant Isoform beeinträchtigt wird, weist ebenfalls darauf hin, dass eine Nesprin-2 Giant Abhängigkeit der kleinen C-terminalen Isoformen vorliegt. Zusätzlich konnte anhand von Westernblotanalysen gezeigt werden, dass es durch den knock down von Nesprin-2 Giant zu einer verringerten Expression von LAP2 $\alpha$  und LAP2 $\beta$  kommt (Abb.3.26.F).

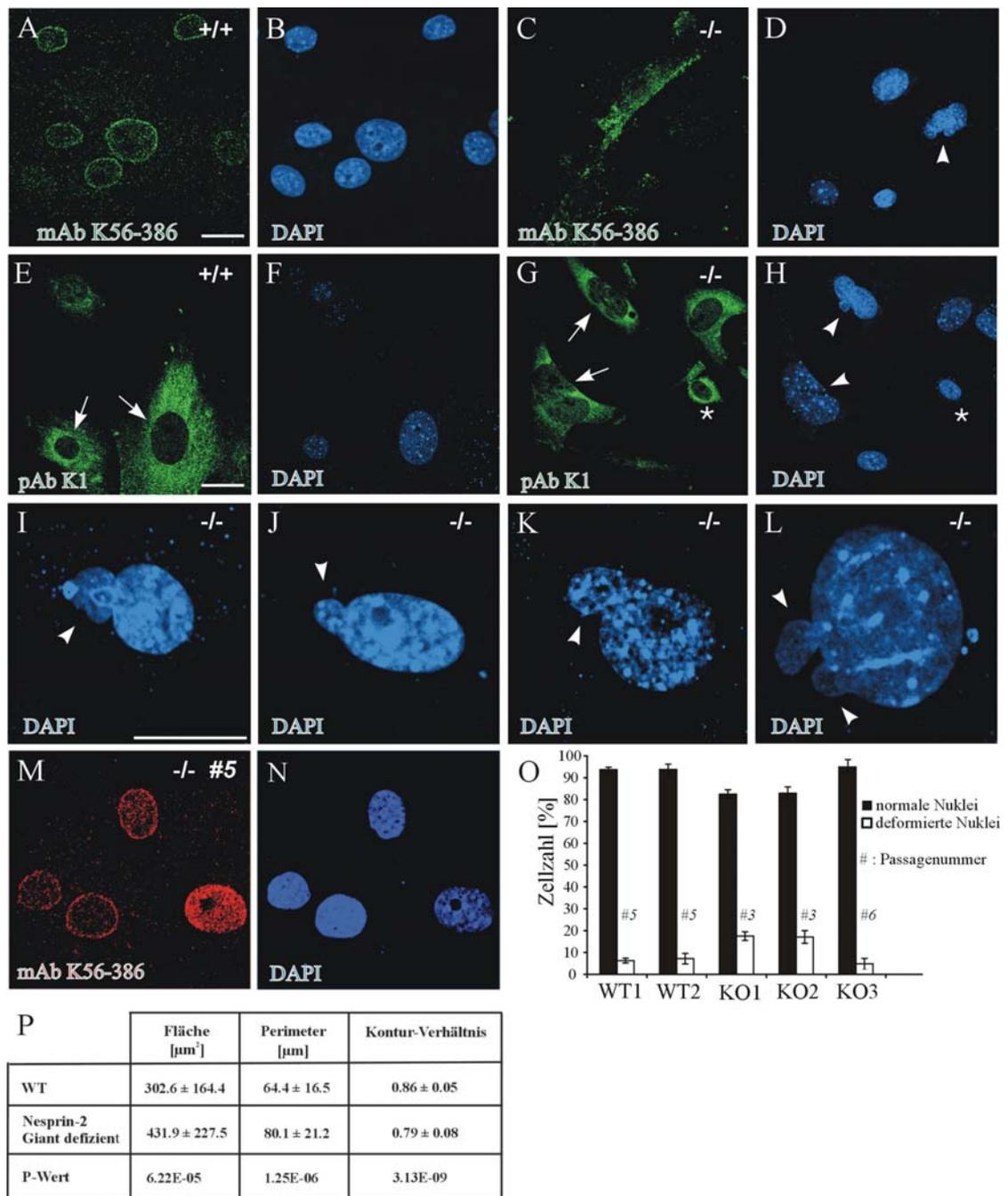


**Abbildung 3.26: Nesprin-2 Giant Silencing in humanen Keratinozyten beeinflusst nukleäre Morphologie und C-terminale Isoformen.** (A) Indirekte Immunfluoreszenzanalyse mit mAb K20-478 von mit Kontrollkonstrukten und Nesprin-2 Giant shRNA transfizierten HaCaT Zellen. Nuklei wurden mit DAPI gefärbt. Pfeile kennzeichnen den beobachteten nukleären Phänotyp. Balken: 10 μm. (B) Statistische Evaluation der Häufigkeit verschiedener nukleärer Phänotypen in HaCaT Zellen, die mit einem Kontrollkonstrukt oder Nesprin-2 Giant shRNA transfiziert wurden. Es wurden je 300 transfizierte Zellen ausgewertet. (C) Nukleäre morphometrische Analyse von Kontrollzellen und Nesprin-2 Giant knockdown Zellen. Es wurden in zwei unabhängigen Experimenten je 300 Zellen ausgewertet. (D) Indirekte Immunfluoreszenzstudien an Kontroll- und Nesprin-2 Giant knock down Zellen mit mAb K20-478 und pAb K1. Balken: 10 μm. (E) Westernblotanalyse von Kontroll- und Nesprin-2 Giant knock down Keratinozyten.

### **3.2.7. Nesprin-2 Giant beeinflusst die Zusammensetzung der Kernhülle in Fibroblasten**

#### **3.2.7.1. Kerndeformationen in Nesprin-2 Giant defizienten primären Fibroblasten**

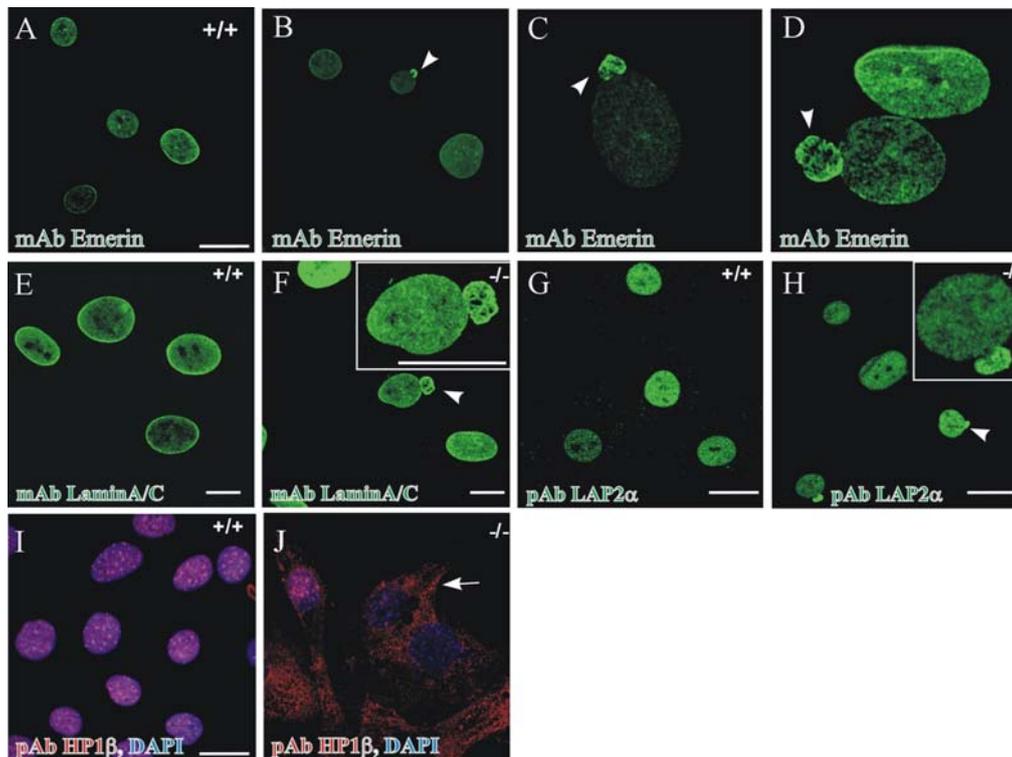
Um zu überprüfen, ob auch dermale Zellen die für Keratinozyten beschriebenen Veränderungen aufweisen, wurden Immunfluoreszenz-Analysen an primären dermalen Nesprin-2 Giant defizienten Fibroblasten durchgeführt. Im Gegensatz zu WT Fibroblasten ist in dermalen KO Fibroblasten (Passage 2) kein K56-386 Signal an der Kernhülle zu beobachten. Die Abwesenheit der Nesprin-2 Giant Isoform ist auch hier von massiven nukleären Deformationen begleitet (Abb.3.27.D; Pfeilspitze). Während pAb K1 im WT neben einer zytoplasmatischen Färbung auch ein deutliches Signal an der Kernhülle gibt (Abb.3.27.E; Pfeile), färbt pAb K1 in einer Subpopulation der KO Fibroblasten nur das Zytoplasma an (Abb.3.27.G; Pfeile), wobei die Nuklei Deformationen aufweisen (Abb.3.27.H; Pfeilspitzen). Eine Subpopulation der KO-Fibroblasten, die über eine normale Kernmorphologie verfügen (Abb.3.27.H; Stern), weist eine pAb K1 Färbung an der Kernhülle auf (Abb.3.27.G; Stern). Die primären Nesprin-2 Giant defizienten Fibroblasten weisen kleine bis schwere Deformationen des Zellkerns auf (Abb.3.27.I-L). Das Ausmaß nukleärer Defomationen wurde in einer morphometrischen Analyse beurteilt (Abb.3.27.P). Es zeigte sich, dass diese nukleären Deformationen nur in niedrigen Passagen auftreten (< 4). Während in jungen KO Fibroblasten (# 3) ca 20 % deformiert sind, sinkt der Anteil in alten Fibroblasten (# 6) auf 4% ab, was dem Anteil deformierter Kerne im WT entspricht (Abb.3.27.O). Die Wiederherstellung des nukleären Phänotyps geht einher mit der Expression einer aberranten K56-386 reaktiven Nesprin-2 Giant Isoform (siehe auch Abschnitt 3.2.8.).



**Abbildung.3.27.: Kerndeformationen in Nesprin-2 Giant defizienten Fibroblasten.** In WT Zellen (A, B, E, F) sind Nesprin-2 Giant (A) und C-terminale Isoformen (E; Pfeile) an der Kernhülle lokalisiert, während primäre KO Zellen (C, D, G, H) negativ für Nesprin-2 Giant sind (C), ein starkes zytoplasmatisches Signal für pAb K1 (G; Pfeile) und nukleäre Deformationen aufweisen (D; Pfeilspitze). Repräsentative nukleäre Deformationen sind in I-L gezeigt und morphometrische Analyse zeigt das Ausmaß nukleärer Deformationen (P). Färbung von pAb K1 an der Kernhülle in KO Zellen koinzidiert mit einer normalen nukleären Architektur (G, H; Sterne). In KO Zellen höherer Passagen verschwinden die nukleären Deformationen (N, O), wahrscheinlich durch die Expression einer aberranten Nesprin-2 Giant Isoform (M). (O) Statistische Analyse nukleärer Deformationen von WT und KO Fibroblasten verschiedener Passagen (> 700 Zellen ausgewertet; Angaben in Prozent). Balken: 10 µm.

### 3.2.7.2. Mislokalisierung nukleärer Proteine in Nesprin-2 Giant defizienten Fibroblasten

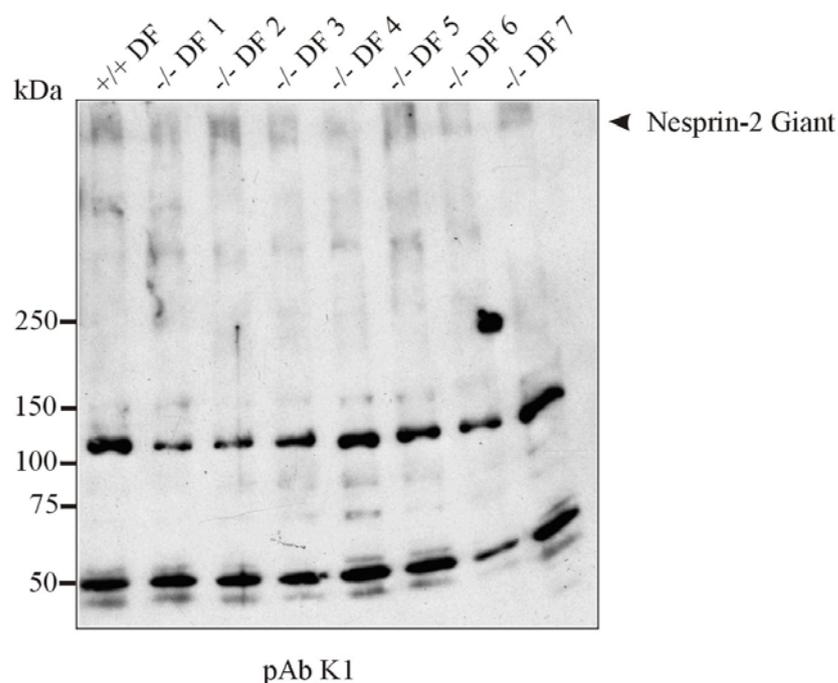
Wie auch bei primären Keratinozyten kommt es zu Veränderungen der zur LEM-Domäne-Familie gehörenden Proteine Emerin und LAP $\alpha$  in Form von Aggregatbildung insbesondere in den nukleären Ausstülpungen (Abb.3.28.C und H; Pfeilspitzen). Wie auch bei Lamin A/C (Abb.3.28.F; Pfeilspitze und Inset) kommt es bei Emerin (Abb.3.28.D; Pfeilspitze) zur Ausbildung der sog. Honigwabenstruktur. Es wurde untersucht, ob die Mislokalisierung dieser Proteine zu einer Veränderung von Proteinen führt, die mit einer Transkriptionsregulation in Verbindung gebracht werden. In Immunfluoreszenzstudien und eine Westernblotanalyse konnte gezeigt werden, dass es zu einer Mislokalisierung von HP1 $\beta$  kommt (Abb.3.28.J), einem Protein, das eine wichtige Rolle bei der transkriptionalen Deaktivierung und der Regulation höhergeordneter Chromatinorganisation spielt (Cheutin et al., 2005).



**Abbildung 3.28.: Mislokalisierung nukleärer Proteine in Nesprin-2 Giant defizienten Fibroblasten.** Immunfluoreszenzanalyse von WT (A, E, G, I) und KO (B, C, D, F, H, J) Zellen mit den Antikörpern wie jeweils angezeigt. Im KO kommt es zu einer Aggregation der Proteine Emerin (C, Pfeilspitze) und LAP2 $\alpha$  (H, Pfeilspitze) in den nukleären Ausstülpungen. Für Emerin (D, Pfeilspitze) und Lam A/C (F; Pfeilspitze) kann in den Ausstülpungen eine Honigwabenstruktur beobachtet werden. HP1 $\beta$  ist im KO in das Zytoplasma mislokalisiert (J). Nuklei sind mit DAPI gefärbt, Balken: 10  $\mu$ m.

### 3.2.8. Generierung der Nesprin-2 $\Delta$ ABD Isoform in KO Zellen durch alternative Translationsinitiation

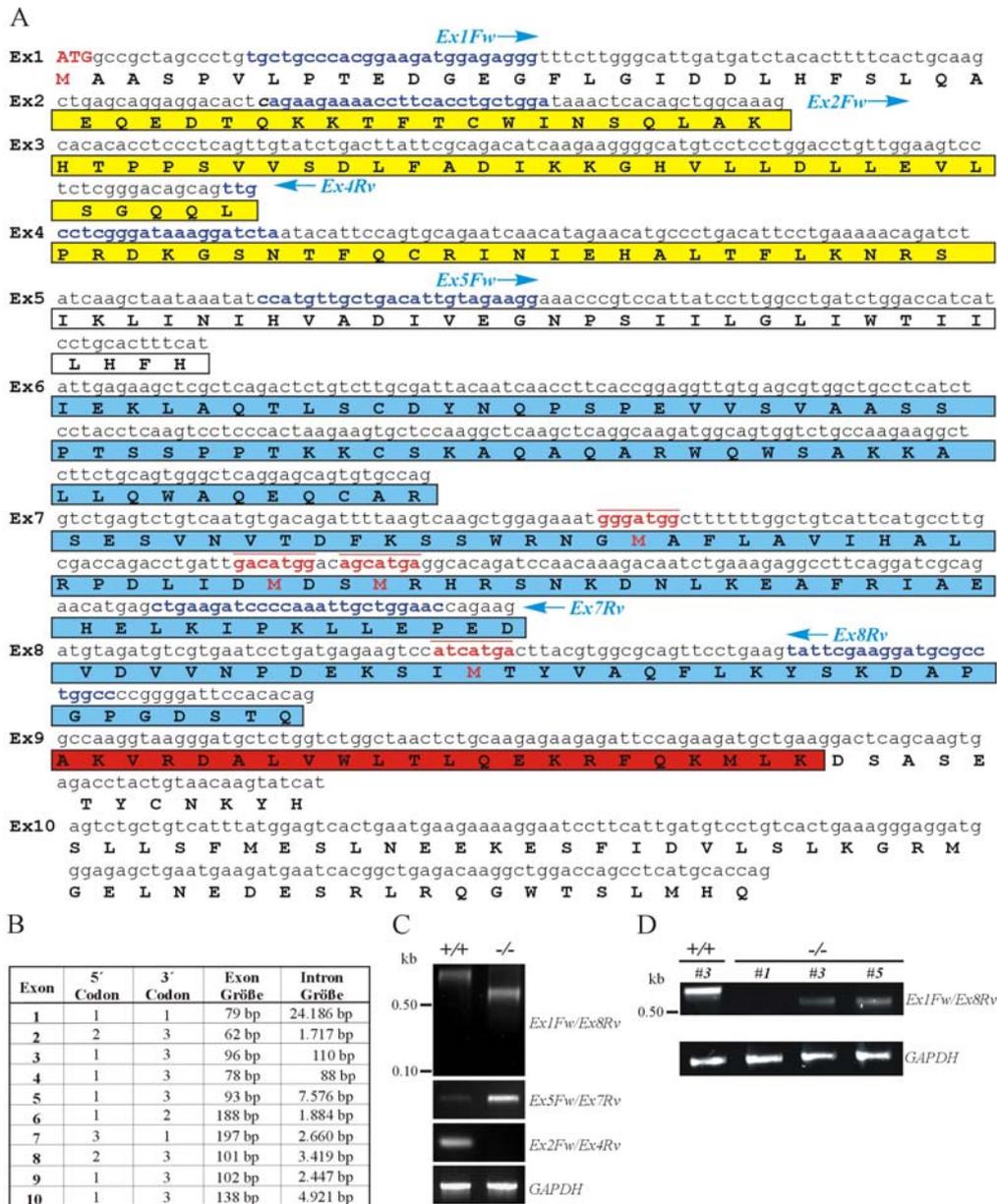
Um zu klären, ob die Expression der Nesprin-2 $\Delta$ ABD Isoform in dem Nesprin-2 Giant defizienten Mausmodell mit der Alterung der Zellen einhergeht (siehe Abb.3.27.M, N, O) wurden Westernblotanalysen von Fibroblastenlysaten mit höherer Passagierung durchgeführt (Abb.3.29). Es zeigt sich deutlich in den analysierten KO Proben, dass es zur Expression einer pAb K1 reaktiven aberranten Nesprin-2 Giant Isoform kommt.



**Abbildung 3.29.:** Nesprin-2 $\Delta$ ABD ist eine Isoform, die nur in alten Fibroblasten exprimiert wird. Immunoblotanalyse von Fibroblastenlysaten (> Passage 6) verschiedener KO Mäuse zeigt die Anwesenheit einer pAb K1 reaktiven Nesprin-2 Giant Isoform (Pfeilspitze).

Deshalb wurde nach alternativen Translationsstartpunkten innerhalb des Nesprin-2 Giant Transkriptes gesucht. Wie in Abb.3.30.A. dargestellt, kommt jedoch nur die Translationsinitiationsstelle innerhalb von Exon 1 für die Ausbildung des Nesprin-2 Giant Transkriptes in Frage. Des Weiteren wurde untersucht, ob es durch alternatives Spleißen zwischen Exon 1 und stromabwärts gelegenen Exons zu einem alternativen Nesprin-2 Giant Transkript kommen kann, bei dem die für die Generierung der KO Maus entfernten Exons 2-4 fehlen. Dies wäre nur durch alternatives Spleißing zwischen Exon 1 und Exon 8 möglich (Abb.3.30.B). Das Leseraster in Exon 1

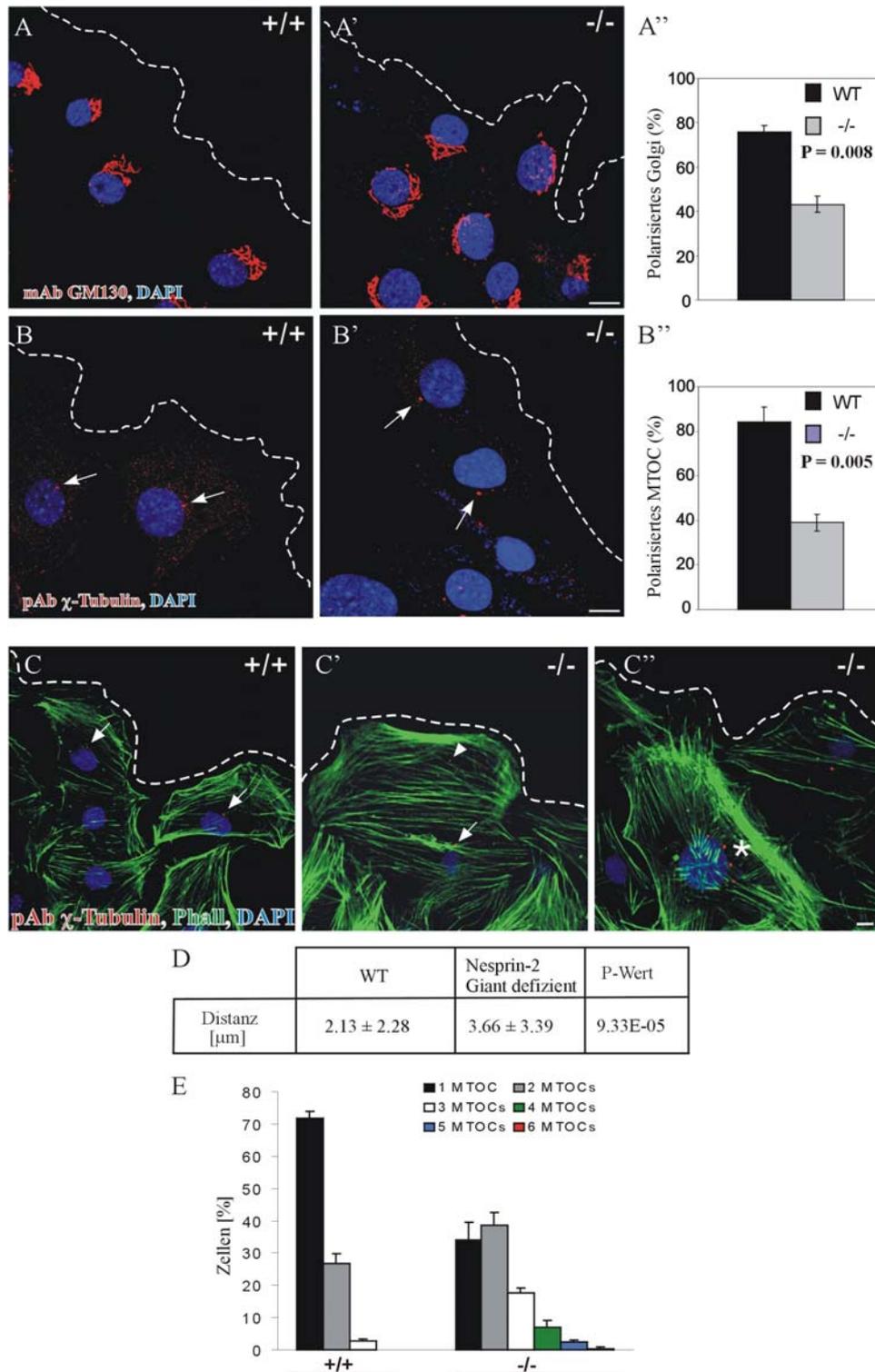
endet mit der ersten Base des Kodons, so dass das nächste Exon mit den beiden letzten Kodons beginnen müsste, um ein intaktes Leseraster zu erhalten. Eine RT-PCR-Analyse mit Exon 1 und Exon 8 spezifischen Primern zeigt im KO anstelle der erwarteten Größe von 130 bp eine Bandengröße von 628 bp, während im WT die erwartete 860 bp Bande (Exon 1 bis 8) zu sehen ist. Eine Sequenzanalyse des 628 bp Fragments weist auf abnormales Spleißen zwischen Exon 1 und Exon 5 hin. Da dies aber nicht zu einem offenen Leseraster führt, wurden die stromabwärts gelegenen Exons nach alternativen Initiationsstellen durchsucht. Es wurden drei Kozak Konsensus-Sequenzen innerhalb von Exon 7 und eine innerhalb von Exon 8 gefunden (Abb.3.30.A; rot markiert und unterstrichen). Anhand der Analyse von cDNA Proben von Fibroblasten unterschiedlichen Alters konnte gezeigt werden, dass junge Fibroblasten (Passage 0 bis 2) das alternative Nesprin-2 $\Delta$ ABD Transkript nicht exprimieren, während es bei älteren Fibroblasten (ab Passage 3) mit steigender Passagierung akkumuliert. Die Daten weisen also auf den Gebrauch einer alternativen Translationsinitiationsstelle hin, die zu der Bildung eines semifunktionellen Nesprin-2 Giant Proteins führt, dem mehr als 215 AS fehlen, die den Großteil der ABD-Domäne ausmachen (Abb.3.18.A). Die Expression dieses alternativen Nesprin-2 Giant Transkriptes ist ausreichend für die Wiederherstellung des nukleären Phänotyps in Nesprin-2 KO Zellen.



**Abbildung 3.30.: Generierung der Nesprin-2 $\Delta$ ABD Isoform in KO Zellen und Geweben durch alternative Translationsinitiation.** (A) Darstellung der kodierenden Nukleotidsequenzen der *Nesprin-2* Exons 1-10 sowie die abgeleitete Aminosäuresequenz. Die ABD Domäne von Nesprin-2 Giant besteht aus zwei CH Domänen und wird von 7 Exons kodiert (CH1 Domäne dargestellt in Gelb, Linkerregion in Weiß und CH2 Domäne in Blau). Exons 2-4 (Gelb) sind in der Nesprin-2 Giant defizienten Maus deletiert. Namen und Sequenzen der Primer für die RT-PCR sind blau markiert. Das K56-386 Epitop in Exon 9 ist rot markiert. (B) Partielle Exon/Intron Organisation von Nesprin-2 Giant. Die Nukleotidpositionen (1,2,3) der Kodon-Triplets an den 5' und 3' Enden der Exons sind angezeigt. Nur alternatives Spleißen von Exon 1 mit Exon 8 führt zur Synthese einer K56-386 reaktiven Nesprin-2 $\Delta$ ABD Isoform in der KO Maus. (C) RT-PCR Analyse der cDNA von WT und KO Fibroblasten mit den Primern aus A zeigt die Abwesenheit der Exons 2-4 (Ex2Fw/Ex4Rv Set). RT-PCR Analyse mit Exon 1 und Exon 8 spezifischen Primern (Ex1Fw/Ex8Rv Set) zeigt nicht die erwartete 130 bp der Exon 1 und 8 cDNA, sondern eine 628 bp Bande, verglichen zur postulierten 860 bp Bande im WT (Exon 1 bis 8). Sequenzanalyse des KO Fragments weist auf alternatives Spleißen zwischen Exon 1 und Exon 5 hin. Die Präsenz dieser Exons wurde mit dem Ex5Fw/Ex7Rv Primerset verifiziert. Alternative Kozak Sequenzen wurden in Exon 7 und 8 identifiziert (rot und unterstrichen). (D) Semiquantitative RT-PCR Analyse von Fibroblasten cDNA mit dem Exon 1 und Exon 8 spezifischen Primerset zeigt die Akkumulation des Nesprin-2 $\Delta$ ABD Transkripts nur in alten Fibroblasten.

### 3.2.9. Nesprin-2 Giant beeinflusst die Polarisation von Fibroblasten

In niederen Eukaryoten sind Nesprin-2 Orthologe an der nukleären Positionierung und Migration beteiligt. Bereits in der Dissertationsarbeit von Zaim (2005) wurde gezeigt, dass die Nesprin-2 Giant Fibroblasten einen Zellwanderungsdefekt aufweisen. In einem scratch-Assay zeigte sich, dass KO Fibroblasten eine der Monolayer zugefügte Wunde langsamer schließen als WT Fibroblasten. Um die Ursache der verlangsamten Antwort zu bestimmen, wurde eine Immunfluoreszenzanalyse des Golgi-Apparates und des Mikrotubuli-Organisationszentrums/Zentrosoms (MTOC) durchgeführt. Der Golgi-Apparat und das MTOC sind Strukturen, die sich in polarisierten Zellen reorientieren und sich so zwischen dem Zellkern und der Migrationsfront positionieren. Eine statistische Analyse zeigt, dass in  $76 \pm 2,6\%$  bzw.  $84 \pm 6,8\%$  der WT-Zellen eine Repositionierung des Golgi-Apparates (Abb.3.31.A, A'') bzw. MTOC (Abb.3.31.B, B'') in einem Radius von  $120^\circ$  zur Wunde aufweisen. Im Gegensatz dazu weisen in KO Fibroblasten nur  $34 \pm 3,7\%$  bzw.  $39 \pm 3,8\%$  einen polarisierten Golgi-Apparat (Abb.3.31.A', A'') bzw. MTOC (Abb.3.31.B', B'') auf. Es ist auffällig, dass in Nesprin-2 Giant defizienten Fibroblasten sowohl die Distanz als auch die Anzahl der MTOCs gestört ist. Im WT ist das MTOC nah am Nukleus lokalisiert (Abb.3.31.C; Pfeile). Während im WT das MTOC durchschnittlich  $2,1 \pm 2,3 \mu\text{m}$  vom Nukleus entfernt ist, vergrößert sich die Distanz im KO auf  $3,7 \pm 3,4 \mu\text{m}$  (Abb.3.31.D; siehe auch C'; Pfeil). Vereinzelt lässt sich eine große Distanz des MTOCs zum Nukleus beobachten (Abb.3.31.C'; Pfeilspitze). Im Gegensatz zum WT, bei dem 97,3% der Zellen je nach Zellzyklusstadium ein oder zwei MTOCs besitzen (Abb.3.31.C und E), weisen Nesprin-2 Giant defiziente Fibroblasten häufig mehr MTOCs auf (Abb.3.31.C''; Asterisk). So ist der Anteil der Zellen, die eine normale MTOC Anzahl aufzeigen, auf 72,6 % reduziert. Es lassen sich in 17,7% der Fibroblasten drei MTOCs und in 9,6% vier bis sechs MTOCs nachweisen (Abb.3.31.E). Neben der verlangsamten Migration der Nesprin-2

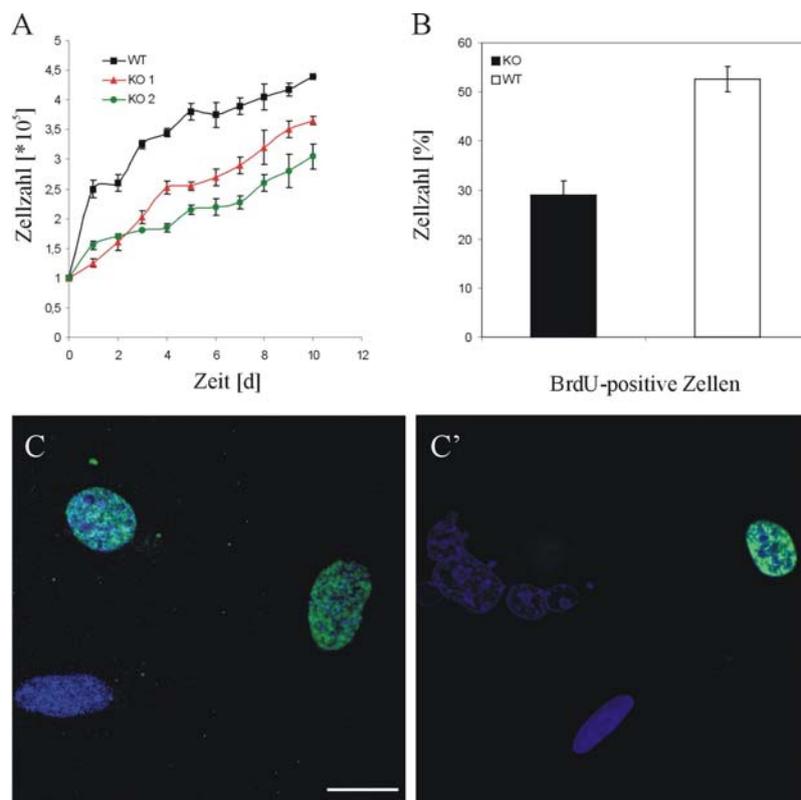


**Abbildung 3.31.: Verlust von Nesprin-2 Giant beeinflusst die Zellpolarisierung.** Sechs Stunden nach Zufügen einer Wunde in eine Monolayer aus WT und KO Fibroblasten (# 2) wurde eine indirekte Immunfluoreszenzanalyse mit spezifischen Antikörpern gegen den Golgi-Apparat (mAb GM-130) (A, A') und das MTOC/Zentrosom (pAb  $\gamma$ -Tubulin) (B, B') durchgeführt. Die gestrichelten Linien repräsentieren die Zellfront, die mit FITC-Phalloidin sichtbar gemacht wurde. Balken: 10  $\mu\text{m}$ . Eine statistische Analyse zeigt eine defekte Polarisation in Nesprin-2 Giant defizienten Fibroblasten (A'', B''). Jeweils 500 Zellen wurden ausgewertet und eine Ausrichtung des Golgi-Apparates bzw. des MTOCs in einem 120° Radius zur Migrationsfront wurden als polarisiert betrachtet. (C-C'') Nesprin-2 defiziente Fibroblasten zeigen eine erhöhte Zentrosomenzahl- und Distanz vom Nukleus. Die erhöhte Distanz (D) und Anzahl (E) lässt sich durch eine statistische Auswertung von jeweils 500 Zellen nachweisen.

defizienten Fibroblasten kommt es also auch zu einer Störung der für die Zellteilung benötigten Zentrosomenamplifikation.

### 3.2.10. Nesprin-2 Giant beeinflusst die Proliferation

Um zu untersuchen, ob eine gestörte Zentrosomenamplifikation zu einer verlangsamten Wachstumsgeschwindigkeit führt, wurden Wachstumskurven erstellt und eine *in vitro* Inkorporation mit BrdU durchgeführt.



**Abbildung 3.32.: Nesprin-2 Giant defiziente Fibroblasten zeigen eine verringerte Wachstumsgeschwindigkeit und Proliferation.** Von verschiedenen primären Fibroblasten-Klonen (# 2) wurden in 2 unabhängigen Experimenten  $1 \times 10^5$  Zellen ausgesät und die Zellzahl über einen Zeitraum von 10 Tagen bestimmt (A). Eine *in vitro* Inkorporation von BrdU zeigt eine Reduktion der proliferierenden Zellen im Vergleich zum WT (B). Es wurden je vier verschiedene WT und KO Klone ausgewertet und jeweils 600 Zellen ausgezählt. Deformierte Nuklei weisen größtenteils einen nicht-proliferativen Status auf (C). Balken: 10  $\mu\text{m}$ .

In den Wachstumskurven (Abb.3.32.A) zeigt sich deutlich eine verringerte Wachstumsgeschwindigkeit für die KO Zellen. Dies geht einher mit einem geringeren proliferativen Status der Zellen (Abb.3.32.B). Während des Untersuchungszeitraumes inkorporieren 52,6% der WT Zellen BrdU in die DNA. Dieser Anteil sinkt im KO auf 28,9%, so dass man hier von einer langsameren Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen ausgehen muss.

Interessanterweise koinzidiert häufig der nichtproliferative Status der Zelle mit dem Auftreten nukleärer Deformationen (Abb.3.32.C').

### **3.3. Generierung einer transgenen dominant negativen Nesprin-2 Maus**

#### **3.3.1. Herstellung des dominant negativen Konstruktes für die Mikroinjektion**

In der vorliegenden Arbeit wurde eine transgene dominant negative Nesprin-2 Maus generiert. Da die Funktion des Nesprin-2 Proteins im Muskel erforscht werden soll, unterliegt der transgene Bereich der Kontrolle eines MCK-Promotors (Muskel-Creatin-Kinase) und das Transgen wird somit nur in Skelettmuskelzellen exprimiert. Für die Generierung des MCK-dn-Nesprin-2 Konstruktes wurde auf das Konstrukt HA-Tm-Nu zurückgegriffen, das in pGEMTEasy vorlag (Zaim, 2005). Dieses Konstrukt besteht aus der Transmembrandomäne und dem luminalen Bereich von Nesprin-2. Zur Detektion ist ein HA-Epitop (Hämagglutinin) vorgeschaltet. Der MCK-Promotor (1350 bp) liegt im Vektor pBluescript vor (LaRochelle, 2002).

Das 485 bp große HA-Tm-Nu Insert wurde mit EcoRI aus dem Vektor pGEMTEasy geschnitten und der Vektor pBluescript-MCK-Promotor mit EcoRI linearisiert. Das HA-Tm Nu Insert wurde in den linearisierten pBluescript MCK Promotor hineinligiert, so dass sich das Insert in 5'3' Richtung stromabwärts des MCK-Promotors befindet. Der MCK-Promotor mit HA-Tm-Nu (1835 bp) wurde mit dem Enzym SpeI geschnitten und für die Mikroinjektion aufgereinigt.

#### **3.3.2. Makroskopische Analyse der transgenen dn Nesprin-2 Maus**

Eine makroskopische Analyse zeigt, dass die transgenen Mäuse im Gegensatz zum WT motorische Defizite aufweisen. Die Koordinationskontrolle der Extremitäten sowie der Körperachse ist beeinträchtigt. So ist es ihnen nicht möglich, kopfüber die parallele Stellung der jeweiligen Extremitäten zueinander aufrecht zu erhalten (Abb.3.33.E; b und c) und es kommt zu einer Verdrehung der Körperachse.



Dies deutet darauf hin, dass es zu starken Beeinträchtigungen der großen Skelettmuskeln kommt.

Diese vorläufigen Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung des Nesprin-2 Proteins bei der Skelettmuskelfunktion hin und mit Hilfe dieses Mausmodells kann eine potentielle Bedeutung des Nesprin-2 Proteins bei skelettmuskelspezifischen Erkrankungen untersucht werden.

## 4. Diskussion

### 4.1. Einfluss der *LMNA* S143F Mutation auf die Integrität der Lamina

#### 4.1.1. *LMNA* S143F Fibroblasten weisen nukleäre Deformationen auf

Lamine sind Typ V Intermediärfilamente, die eine wichtige Rolle bei der strukturellen Aufrechterhaltung des Nukleus, der Chromatinorganisation, Transkription, DNA- Replikation und Genomstabilität einnehmen (Goldman et al., 2002; Worman and Courvalin, 2005). In den letzten Jahren wurden über 200 verschiedene Mutationen im *LMNA* Gen gefunden, die mit gewebsspezifischen Erkrankungen assoziiert werden können. Während die meisten Progerie-auslösenden Mutationen sich im C-terminalen Bereich des *LMNA* Proteins befinden (Abb.3.1.), ist nur wenig über Mutationen bekannt, die am N-Terminus des Proteins lokalisiert sind.

Neben den für Laminopathien charakteristischen Veränderungen der Kernarchitektur wie die Ausbildung nukleärer Deformationen (Abb.3.3. A und C) und die schwerwiegende Störung der Laminorganisation (Abb.3.4.) sind bis jetzt einzigartige ultrastrukturelle Veränderungen der Kernhülle in *LMNA* S143F Fibroblasten beobachtet worden. Die Kernmembranen lösen sich partiell von der darunter liegenden Lamina ab und stülpen sich nach außen vor (Abb.3.3.B). Die Ausstülpungen entstehen also nicht wie bei kardialen Myozyten von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie durch eine Ablösung der äußeren von der inneren Kernmembran (Verga et al., 2003). Auch in Sun1/2 depletierten Zellen ist eine Abtrennung der Nuklearmembranen mit einer Vergrößerung des perinukleären Spaltes und daraus resultierenden Deformationen verbunden (Crisp et al., 2006). Sun Proteine sind wichtige Komponenten des LINC Komplexes (linker of nucleoskeleton and cytoskeleton), der das Aktinzytoskelett über Nesprin-2 Giant mit der Lamina und nukleären Komponenten verknüpft (Padmakumar et al., 2005; Crisp et al., 2006).

#### 4.1.2. Einfluss der *LMNA* S143F Mutation auf die Assemblierung und Dynamik der Lamina

Lamine formen coiled-coil Dimere, die sich longitudinal zusammenlagern und head-to-tail Polymere ausbilden (Strelkov et al., 2004). Für die Ausbildung der typischen linkshändigen coiled coil Struktur muss eine charakteristische Periodizität gegeben sein, die jeweils sieben Aminosäurereste (a,b,c,d,e,f,g) umfasst, wobei die Positionen a und d von kleinen unpolaren Aminosäureresten eingenommen werden. Die Besonderheit der S143 Position besteht darin, dass sie in der Subdomäne 1B innerhalb eines Bereiches von sechs Heptadwiederholungen liegt, der spezifisch für nukleäre Lamine ist und bei zytoplasmatischen Intermediärfilamenten nicht vorhanden ist. S143 ist an Position c so ausgerichtet, dass es nicht zur Störung der Dimerbildung, sondern wahrscheinlich zur Beeinflussung der Ausbildung der Protofilamente oder höhergeordneter Strukturen kommt. Insbesondere unter der Berücksichtigung, dass eine neutrale Aminosäure durch eine große hydrophobe Aminosäure ersetzt wird, ist es naheliegend, dass intermolekulare Interaktionen gestört werden. Durch Mutationsanalysen in *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass bei der Ce-Lamin Mutante Q159K (entspricht der humanen *LMNA* E145K Mutation) die Ausbildung von Ce-Lamin Filamenten gestört ist. Auch hier lässt sich beobachten, dass die Dimerisierung und die head-to-tail Anlagerung normal verläuft, jedoch kommt es zu einer Störung der lateralen Assoziation (Wiesel et al., 2008).

Neben der E145K Mutation sind in unmittelbarer Nähe noch zwei weitere Mutationen gefunden worden (R133L, L140R) und für Position S143 ist eine Mutation (S143P) bekannt, die zur Ausbildung familiärer dilatativer Kardiomyopathie führt (Caux et al., 2003; Chen et al., 2003; Kärkkäinen et al., 2004). Die Häufung von Mutationen in einem Bereich von 13 Aminosäuren innerhalb der Subdomäne 1B lässt vermuten, dass dieser Bereich für die Integrität der Lamina essentiell ist. FRAP Analysen haben gezeigt, dass S143F-LMNA-GFP Fusionsproteine eine verringerte Dynamik verglichen zum WT Lamin A Protein aufweisen (Dabauvalle; persönliche Kommunikation). Des Weiteren konnte in biochemischen Extraktionsanalysen gezeigt werden, dass in *LMNA* S143F Fibroblasten eine reduzierte Löslichkeit von Lamin A, nicht jedoch von Lamin C vorliegt (Abb.3.15.). Das mutierte Lam A Protein

geht im Vergleich zum WT eine stärkere Assoziation mit der Lamina ein, so dass als Folge die Löslichkeit und Dynamik der Lamina herabgesetzt wird. Eine reduzierte Dynamik konnte auch in  $\Delta 50$  GFP-Lam A exprimierenden primären humanen Fibroblasten beobachtet werden (Dahl et al., 2006). Anhand von FRAP Analysen wurde gezeigt, dass mutiertes GFP-Lam A Protein irreversibel mit der Lamina assoziiert ist. In HGPS Zellen wurde durch die Expression des  $\Delta 50$  Lam A nicht nur die Dynamik von Lam A, sondern auch von Lam C herabgesetzt. Die reduzierte Löslichkeit von Lam A und Lam C wurde in biochemischen Extraktionsanalysen von HGPS Zellen sowie von  $\Delta 50$  GFP-Lam A transfizierten HeLa Zellen bestätigt.

#### **4.1.3. Akkumulation eines farnesylierten Progerin ist nicht die alleinige Ursache für die Entstehung des progeroiden Phänotyps**

Die Farnesylierung des Prälamina A ist essentiell für das Targeting dieses Proteins an die Kernhülle, wo durch Spleißen mit ZMPSTE24 matures Lam A freigesetzt wird. In Zellen mit HGPS auslösender *LMNA* G608G Mutation kommt es durch die interne Deletion dieser endoproteolytischen Spleißstelle zur Bildung einer permanent farnesylierten Form eines mutierten Prälamina A Moleküls (Progerin), das irreversibel in die Lamina inkorporiert wird und als eigentliche Ursache für die Entstehung des zellulären Phänotyp angesehen wird (Goldman et al., 2004; Scaffidi et al., 2005). Mehrere Studien zeigen, dass es in HGPS- und ZMPSTE24 defizienten Zellen durch den Einsatz eines Farnesyltransferase-Inhibitors (FTI) zur Reduktion des Progerins an der Kernhülle und damit zur Abschwächung des nukleären Phänotyps kommt. Durch die Inhibition der Farnesylierung wird das Prälamina A nicht in die Lamina inkorporiert, sondern akkumuliert im Nukleoplasma. (Capell et al., 2005; Toth et al., 2005). Auch in einem HGPS knock in Mausmodell und in ZMPSTE24 defizienten Mäusen kommt es durch den Einsatz eines FTIs zur Reduktion des mikroskopischen sowie des makroskopischen Phänotyps. So konnte bei beiden Mausmodellen ein Rückgang der Kerndeformationen beobachtet werden. Die mit FTI behandelten Mäuse zeigten einen Rückgang osteolytischer Frakturen und eine erhöhte Lebenserwartung (Bergo et al., 2002; Yang et al., 2005 und 2008). Aus diesen Versuchen folgerte man, dass

das Niveau und die Persistenz des farnesylierten Prälamins A wichtig für das Ausmaß des nukleären und makroskopischen Phänotyps ist.

In Studien wurden nicht nur Zellen einer FTI-Behandlung unterzogen, die einen Defekt in der Prozessierung von Lam A aufweisen, sondern auch Fibroblasten mit Missense-Mutationen (R644C und E578V) im Lam A spezifischen Bereich des *LMNA* Gens. Auch hier konnte eine Verbesserung des nukleären Phänotyps beobachtet werden, was darauf zurückzuführen ist, dass die Biogenese eines mutierten muren Lam A Proteins verhindert wird (Toth et al., 2005). Es wurde vermutet, dass Zellen mit Mutationen, die sich in dem für Lam A und Lam C identischen Bereich des *LMNA* Gens befinden, kaum von einer FTI-Behandlung profitieren, da das mutierte Lam C Protein weiterhin in die Lamina inkorporiert wird (Toth et al., 2005). Außerdem wurde gezeigt, dass die Lokalisation und Assemblierung von Lamin C abhängig von Lam A ist (Vaughan et al., 2001). Eine Inkubation von *LMNA* S143F Zellen und *LMNA* R133L Zellen mit FTI-277 zeigt deutlich, dass es auch bei Missense Mutationen im Lam A/C gemeinsamen Bereich der Stabdome zu einer Reduktion nukleärer Deformationen kommt (Abb.3.16.). Auch unter der Berücksichtigung, dass Lam C keine reduzierte Löslichkeit in *LMNA* S143F Zellen aufweist (Abb.3.15.), bedeutet dies, dass vor allem das Lam A Protein, nicht jedoch das mutierte Lamin C Protein einen pathogenen Einfluss auf die Lamina besitzt. Diese Daten zeigen zusätzlich, dass die Akkumulation des farnesylierten mutierten Prälamins A (Progerin) nicht die alleinige Ursache für die Entstehung eines progeroiden Phänotyps ist.

#### **4.2. Einfluss der *LMNA* S143F Mutation auf die Lokalisation und Funktion von Proteinen der LEM-Domäne-Familie**

A-Typ Lamine spielen nicht nur eine strukturelle Rolle bei der Aufrechterhaltung der Integrität der Lamina und der Kernmembran, sondern sie wurden auch im Nukleoplasma gefunden (Goldberg et al., 1999; Gotzmann und Foisner, 1999), wo sie dynamische Loci und ein intranukleäres tubuläres Netzwerk ausbilden (Moir et al., 1994; Broers et al., 1999; Dechat et al., 2000). Lamine sind zusätzlich involviert in die Bildung und Aufrechterhaltung funktionaler höhergeordneter Chromatin-Strukturen (Gotzmann und Foisner,

1999) und stellen ein Gerüst für Proteinkomplexe zur Verfügung, die regulatorisch in die Genexpression eingreifen (Cohen et al., 2001). In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass integrale Proteine der inneren Kernmembran (LAP2 $\beta$ , Emerin) nicht nur eine strukturelle Rolle einnehmen, indem sie die Kernmembran mit der darunter liegenden Lamina verknüpfen, sondern dass diese Proteine über zwei strukturell und funktionell unterschiedliche Domänen in der Lage sind, sowohl direkt als auch indirekt an DNA zu binden (Foisner and Gerace, 1993; Ye and Worman, 1994; Furukawa et al., 1997 und 1999). LAP2 $\alpha$ , LAP2 $\beta$  und Emerin verfügen in ihrer N-terminalen nukleoplasmatischen Domäne über eine hochkonservierte sog. LEM-Domäne (Lin et al., 2000). Diese konstante Domäne interagiert mit dem BAF (barrier-to-autointegration-factor) Protein, das als Dimer unspezifisch an DNA bindet. So können Emerin und LAP2 $\beta$  durch Bindung an BAF während der Interphase eine strukturelle Verbindung des Chromatin mit der Kernhülle schaffen (Lee et al., 2001) und eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung höhergeordneter Chromatinstrukturen einnehmen. LAP2 $\alpha$  besitzt ebenfalls separate Bindestellen für BAF, A-Typ Lamine und Chromatin (Dechat et al., 1998; Dechat et al, 2000; Vlcek et al., 2002), ist jedoch nukleoplasmatisch lokalisiert. Es wird vermutet, dass LAP2 $\alpha$  Lamin intranukleär verankert und an der Chromatinorganisation beteiligt ist.

Obwohl die *LMNA* S143F Mutation keinen direkten Einfluss auf die Bindungsregion für Emerin und LAP2 $\alpha$  ausübt, werden trotzdem schwerwiegende Veränderungen in der Lokalisation dieser Proteine induziert. Während Emerin entlang der Kernhülle akkumuliert (Abb.3.5.B), ist für LAP2 $\alpha$  eine Reduktion der nukleoplasmatischen Lokalisation zu beobachten (Abb.3.5.A; b'', c''). Man muss also schließen, dass der pathogene Einfluss der *LMNA* S143F Mutation auf die Struktur der Kernlamina sowie auf die nukleoplasmatischen Lamine so schwerwiegend ist, dass es zu Mislokalisationen von Emerin und LAP2 $\alpha$  kommt, obwohl die jeweiligen Bindestellen nicht direkt beeinflusst sind. Es ist wahrscheinlich, dass diese Veränderungen direkten Einfluss auf die Genregulation nehmen, da beide Proteine an transkriptionale Regulatoren binden. So wurde für Emerin gezeigt, dass es *in vitro* einen Komplex mit Lamin A und GCL, einem transkriptionalen

Repressor, ausbildet (Holaska et al., 2003). Das Retinoblastom-Protein (Rb) bindet in seiner hypophosphorylierten repressiven Form an Lamin A und LAP2 $\alpha$  (Mancini et al., 1994; Markiewicz et al., 2002). Eine Reduktion oder aberrante Lokalisation von LAP2 $\alpha$  führt zu einer Mislokalisierung von Rb, was darauf hinweist, dass LAP2 $\alpha$  und Lam A/C Andockstellen für dieses Protein darstellen (Markiewicz et al., 2002). Auch die Tatsache, dass sowohl die Expression als auch die Lokalisation von LAP2 $\beta$  (Abb.3.5.A.; b', c' und 3.5.C) durch die *LMNA* S143F Mutation beeinträchtigt ist, weist auf die Schwere des pathogenen Einflusses des mutierten Lam A Proteins hin. LAP2 $\beta$  bindet an B-Typ Lamine, nicht jedoch an A-Typ Lamine. Es wurde zwar nachgewiesen, dass A- und B-Typ Lamine *in vitro* Heterodimere ausbilden können (Georgatos et al., 1988; Ye and Worman, 1995; Schirmer et al., 2001), jedoch gibt es zunehmende Hinweise darauf, dass A-Typ- und B-Typ Lamine *in vivo* unabhängige Netzwerke ausbilden (Izumi et al., 2000; Moir et al., 2000a). LAP2 $\beta$  ist ein transkriptionaler Repressor, der spezifisch mit HDAC3 (Histon Deacetylase 3) interagiert und die Deacetylierung von Histon H4 *in vitro* und *in vivo* induziert (Somech et al., 2005). Man kann folgern, dass die LAP2 $\beta$  Mislokalisierung und Reduktion Einfluss auf die Chromatintopologie und Chromatinorganisation hat. Die Modifikation von Histonen über Acetylierungen bzw. Deacetylierungen bestimmt die Dichte des Chromatins und Zugängigkeit für z.B. DNA- und RNA-Polymerasen. So konnte gezeigt werden, dass sowohl die Regulation der Chromatinkondensation über Histon 1 als auch die Histonacetylierung in *LMNA* S143F Zellen beeinflusst ist, ebenso die Verteilung und Aktivität der RNA Polymerase II (Sebastian Kandert; Kooperationspartner Universität Würzburg). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *LMNA* S143F Mutation zum einen strukturelle Auswirkungen auf die Integrität des Zellkerns hat, zum anderen wird direkt und indirekt über Lamin-bindende Proteine die Genregulation, die Chromatinorganisation und transkriptionale Aktivität beeinflusst.

### 4.3. Beteiligung des Nesprin-2 Giant Proteins an der Integrität des Zellkerns

#### 4.3.1. Die Nesprine und deren potentielle Bedeutung in Laminopathien

Nesprin-1 und Nesprin-2 gehören zur Familie der Aktin-bindenden Proteine des  $\alpha$ -Aktinin-Typs. Diese Proteine sind aufgebaut aus einer N-terminalen Aktin-bindenden Domäne (ABD) des  $\alpha$ -Aktinin-Typs, gefolgt von einer Stabdomäne mit einer großen Anzahl von Spektrinwiederholungen und einer Transmembrandomäne (KASH-Domäne) am C-Terminus.

Erste Hinweise darauf, dass Nesprine in Laminopathien involviert sind, gab es 2003 durch eine Studie an Zellen mit einer homozygoten *LMNA* Y259X Mutation, in der gezeigt wurde, dass Nesprin-1 $\alpha$  direkt mit Lamin A/C und Emerin interagiert. Durch Verlust von Lamin A/C werden Nesprin-1 $\alpha$  und Emerin in das endoplasmatische Retikulum fehlgeleitet (Muchir et al., 2003). Bereits 2002 wurde eine direkte Bindung von Nesprin-1 $\alpha$  *in vitro* an Emerin und Lamin A/C beschrieben (Mislow et al., 2002b). In Arbeiten von Libotte et al. (2005) wurde gezeigt, dass der C-terminale Bereich von Nesprin-2 Lamin A/C und Emerin *in vitro* und *in vivo* binden kann. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die Lokalisation von Nesprin-2 Lam A/C-abhängig ist, da in Lam A/C KO Zellen Nesprin-2 in das Zytoplasma fehlgeleitet wird (Zaim, 2005).

Aufgrund der Abhängigkeiten der Nesprine 1 und 2 von Lam A/C wurden diese Proteine in den *LMNA* S143F Fibroblasten untersucht und es wurden insbesondere Veränderungen für das Nesprin-2 Protein gefunden (Abb.3.6). In WT Zellen, die zu 97,2% eine normale Zellkernmorphologie aufweisen (vergleiche auch Abb.3.3.C), ist Nesprin-2 an der Kernhülle sowie im Zytoplasma lokalisiert (Abb.3.6.B), während in deformierten Kernen von *LMNA* S143F Zellen keine Färbung an der Kernhülle nachgewiesen werden kann (Abb.3.6.B; Vergrößerung in e'). Dagegen zeigen nicht deformierte *LMNA* S143F Nuklei eine WT-ähnliche Kernmorphologie und Nesprin-2 Verteilung (Abb.3.6.B). Aufgrund der Tatsache, dass die Nesprin-1 Lokalisation kaum beeinflusst ist (Abb.3.6.A und C), lässt sich schließen, dass, obwohl die

Proteine eine hohe Identität aufweisen (65%), sie unterschiedliche funktionelle Eigenschaften besitzen. Diese Hypothese wird zusätzlich dadurch gestärkt, dass Nesprin-1 in der humanen und murinen WT Epidermis neben der Lokalisation an der Kernhülle auch an der Plasmamembran lokalisiert ist und somit in der Haut bislang unbekannte Funktionen an der Zellperipherie wahrnehmen kann (Abb.3.19.H-J). Zusätzlich zeigen *in vitro* Studien, dass Nesprin-1 und Nesprin-2 nicht miteinander interagieren können (Zhang et al., 2005), sondern dass Nesprin-1 $\alpha$  Homodimere ausbildet (Mislow et al., 2002a).

Um den potentiellen Einfluss der Nesprine bei der Pathogenese von Laminopathien zu untersuchen, wurden nicht nur dermale primäre Fibroblasten von Laminopathie-Patienten analysiert, sondern der direkte Einfluss des Nesprin-2 Proteins wurde mithilfe des Nesprin-2 Giant defizienten Mausmodells untersucht. Durch die Analyse der Patientenzellen kann eine Beteiligung von Nesprin-2 an der Entstehung von Laminopathien untersucht werden, während es durch Analyse des Mausmodells möglich ist, Nesprin-2 als eigentliche Ursache bestimmter Veränderungen zu identifizieren. Für die Generierung der Nesprin-2 Giant defizienten Maus wurden die für die CH1-Domäne kodierenden Exons 2, 3 und 4 deletiert, die zusammen mit der CH2-Domäne eine funktionelle ABD-Domäne bilden (Gimona et al., 2002) (Abb.3.17.A und 3.18.A). In den Nesprin-2 Giant defizienten Mäusen werden also C-terminale Isoformen weiterhin exprimiert, während die Nesprin-2 Giant Isoform abwesend ist (Abb.3.17.C).

#### **4.3.2. Nesprin-2 Giant Abhängigkeit der kleinen C-terminalen Nesprin-2 Isoformen**

Mithilfe Nesprin-2 spezifischer Antikörper, die unterschiedliche Epitope erkennen, wurde die Lokalisation und Expression verschiedener Isoformen in den *LMNA* S143F Fibroblasten untersucht. Während der pAb K1 gegen die letzten zwei Spektrin-Wiederholungen am C-Terminus gerichtet ist und damit ein Gemisch verschiedener C-terminaler Isoformen erkennt, detektiert der mAb K20-478 spezifisch die N-terminale ABD-Domäne (Abb. 3.18.). Eine Expressionsanalyse von humanen WT Fibroblasten zeigte, dass die Nesprin-2 Giant Isoform nur schwach exprimiert wird, und in *LMNA* S143F Fibroblasten

kaum detektierbar ist (Abb. 3.9.). Einhergehend mit diesen Daten zeigen Immunfluoreszenzen, dass nur in einer Subpopulation von *LMNA* S143F Fibroblasten Nesprin-2 Giant an der Kernhülle vorkommt (Abb.3.7.). Die Anwesenheit der 796 kDa großen Nesprin-2 Giant Isoform scheint ein Indikator für eine normale Kernmorphologie zu sein und unabdingbar für die Lokalisierung C-terminaler Nesprin-2 Isoformen an der Kernmembran. In Abwesenheit der Nesprin-2 Giant Isoform kommt es zu einer beeinträchtigten Lokalisation der C-terminalen Isoformen an der Kernhülle (Abb.3.8.). Die Beeinflussung der Lokalisation der C-terminalen Isoformen durch die Abwesenheit der Nesprin-2 Giant Isoform war insofern unerwartet, da in unabhängigen Studien gezeigt wurde, dass bei ektopischer Expression C-terminaler Nesprin-2 Konstrukte die KASH- Domäne ausreichend für eine Lokalisation an der Kernhülle ist (Zhen et al., 2002; Libotte et al., 2005; Padmakumar et al., 2005).

Um Aufschluss über die Interaktionen der kleinen C-terminalen Nesprin-2 Isoformen mit der Nesprin-2 Giant Isoform zu erhalten, wurden Studien an dem Nesprin-2 Giant defizienten Mausmodell durchgeführt. Westernblotanalysen an diversen Geweben der Nesprin-2 defizienten Maus zeigen, dass durch die Abwesenheit des Nesprin-2 Giant Proteins das Expressionsmuster der C-terminalen Isoformen verändert wird (Abb.3.20.A, B und E). So fehlen z.B. im Herz, in der Haut und in der Niere bestimmte Isoformen (z.B. das 600 kDa Protein), die im WT vorhanden sind. Untersuchungen zeigen, dass im Skelettmuskel die Abwesenheit der großen Isoform einen Einfluss auf die Expression, nicht jedoch auf die Lokalisation der vorhandenen Isoformen ausübt (Abb.3.20.C und D). In der Nesprin-2 Giant defizienten Haut ist die Lokalisation C-terminaler Nesprin-2 Isoformen dagegen stark reduziert (Abb.3.21.A-F). Diese und die durch die *LMNA* S143F Fibroblasten gewonnenen Daten lassen schließen, dass in der Haut Nesprin-2 Giant eine wichtige Targeting-Funktion für die C-terminalen Isoformen ausübt und in der Lage ist, die kleinen Isoformen durch direkte oder indirekte Interaktionen an der Kernhülle zu stabilisieren.

Bereits in der Dissertationsarbeit von Zaim (2005) konnte gezeigt werden, dass in PAM212 Zellen durch Einsatz des pAb K1 die Nesprin-2 Giant Isoform immunpräzipitiert werden kann, was auf eine Interaktion der Isoformen schließen lässt. Um diese Aussage zu bestätigen, wurde die große Isoform mit dem für das Nesprin-2 Giant Protein spezifischen K56-386 Antikörper immunpräzipitiert. Nachfolgende Westernblotanalyse mit K56-386 und pAb K1 bestätigte eine Interaktion von Nesprin-2 Giant mit den C-terminalen Isoformen (Abb.3.21.G). Auch ein knock down des Nesprin-2 Giant Proteins durch shRNA Konstrukte gegen die CH2-Domäne der ABD-Domäne führt zu einer reduzierten Expression und Mislokalisierung der C-terminalen Nesprin-2 Isoformen (Abb.3.26.D und E). Eine Interaktion des Nesprin-2 Giant Proteins mit den kleinen C-terminalen Isoformen wäre durch eine intermolekulare Bindung der C-terminalen Spektrin-Wiederholungen möglich wie sie auch für das Nesprin-1 $\alpha$  Protein beschrieben wird. Für Nesprin-1 $\alpha$  Proteine konnte gezeigt werden, dass sie, mit ihren C-Termini an der inneren Kernmembran verankert, antiparallele Homodimere ausbilden, indem die Spektrinwiederholungen 3 und 5 miteinander interagieren (Mislow et al., 2002a).

#### **4.3.3. Nesprin-2 Giant übt eine strukturelle Funktion bei der Stabilisierung der Kernarchitektur aus**

##### **4.3.3.1. Abwesenheit der Nesprin-2 Giant Isoform induziert Kerndeformationen**

Die Anwesenheit der 796 kDa großen Nesprin-2 Giant Isoform in *LMNA* S143F Fibroblasten scheint ein Indikator für eine normale Kernmorphologie zu sein (Abb.3.8.A). In einer statistischen Analyse konnte gezeigt werden, dass je nach Alter der Fibroblasten bis zu 94,6% der Nesprin-2 Giant positiven Fibroblasten eine normale Kernmorphologie aufweisen (Abb.3.8.B). Die Hypothese, dass das Nesprin-2 Giant Protein Einfluss auf die nukleäre Form nimmt, wurde bereits 2005 aufgestellt, als erstmals beschrieben wurde, dass die Abwesenheit von Nesprin-2 Giant an der Kernhülle zu einer Deformation der Zellkerne führt (Dissertation Zaim, 2005).

Eine wichtige Methode zur Evaluierung nukleärer Deformationen ist die morphometrische Analyse zur Berechnung des nukleären Kontur-Verhältnisses. Dieser Wert kann aus der Bestimmung des Perimeters und der Fläche berechnet werden und gibt Aufschluss über das Ausmaß nukleärer Deformationen (Goldman et al., 2004). Zusätzlich kann die Streuung der ermittelten relativen Kontur-Verhältnisse einen Eindruck über die Verteilung der Kerndeformationen innerhalb einer Subpopulation geben.

Nesprin-2 Giant positive und negative *LMNA* S143F und WT Fibroblasten wurden einer morphometrischen Analyse unterzogen und es wurde gezeigt, dass das Nesprin-2 Giant Protein dem pathogenen Einfluss der *LMNA* S143F Mutation entgegenwirken kann (Abb.3.10.). Nur *LMNA* S143F Zellen, die kein Nesprin-2 Giant an der Kernhülle aufweisen, zeigen nukleäre Deformationen, deren Anzahl und Ausmaß mit zunehmender Passagierung ansteigen. Auch Zellkerne von dermalen Nesprin-2 Giant KO Fibroblasten weisen ca. 20% (Abb.3.27.O) und Nuklei von KO Keratinozyten ca. 53% Deformationen auf, wobei das Ausmaß der Deformationen sowohl in Nesprin-2 Giant KO Keratinozyten (Abb.3.23.I) als auch in Fibroblasten (Abb.3.27.I-L) variiert, was durch eine begleitende morphometrische Analyse bestätigt wurde (Abb.3.24. und Abb.3.27.P). Durch die Analyse von *LMNA* G608G und ZMPSTE24 KO Fibroblasten (Abb.3.14.) konnte gezeigt werden, dass das Nesprin-2 Giant Protein einen generellen protektiven Effekt auf die Zellkernmorphologie ausübt und dieser Effekt nicht auf Zellen mit der *LMNA* S143F Mutation beschränkt ist.

#### **4.3.3.2. Eine starke Nesprin-2 Giant Expression wirkt Kerndeformationen entgegen**

In Transfektionsstudien wurde gezeigt, dass die ektopische Expression von *LMNA* S143F in humanen WT Fibroblasten zur Ausbildung der charakteristischen nukleären Deformationen führt, die auch in Patientenzellen beobachtet wurden (Abb.3.11.A.). Da bekannt ist, dass humane WT Fibroblasten nur wenig Nesprin-2 Giant exprimieren (Abb.3.9.), wurde untersucht, ob das Niveau der Nesprin-2 Giant Expression wichtig für die Entstehung des pathogenen Phänotyps in *LMNA* S143F Fibroblasten ist. Es wurden Transfektionsstudien an Zelltypen durchgeführt, die sich stark in

ihrem Expressionsniveau unterscheiden. Dabei zeigte sich, dass es in humanen Keratinozyten (HaCaT-Zellen), die viel Nesprin-2 Giant exprimieren (Abb.3.9.), nicht zur Induktion nukleärer Deformationen kommt (Abb.3.11.B). Dagegen bilden Zelltypen, die wenig Nesprin-2 Giant exprimieren, Deformationen aus. Zur Prüfung der Hypothese, ob das Vorhandensein des Nesprin-2 Giant Proteins die Kernhüllenarchitektur vor dem pathogenen Effekt der *LMNA* S143F Mutation schützt, wurde das mutierte Lam A Protein ektopisch in Nesprin-2 Giant defizienten Fibroblasten exprimiert (Abb.3.13.). Die ektopische Expression des *LMNA* S143F-GFP führt dazu, dass Anzahl und Ausmaß der Deformationen signifikant ansteigen (Abb.3.13.). Verglichen dazu bewirkt die ektopische Expression des mutierten Fusionsproteins in den Wildtypfibroblasten lediglich einen geringen Anstieg nukleärer Defekte (Abb.3.13.B). Auch RNAi Studien in humanen Keratinozyten zeigen deutlich, dass der knock down der Nesprin-2 Giant Isoform zur Ausbildung nukleärer Deformationen verschiedenen Ausmaßes (Abb.3.26.A-C) führt. Unabhängige Studien in primären Fibroblasten von EDMD-Patienten zeigen bedingt durch den knock down von Nesprin-2 ebenfalls die Induktion von Kerndeformationen (Zhang et al., 2007). Aufgrund dieser Daten lässt sich folgern, dass das Nesprin-2 Giant Protein an der Kernhülle eine stabilisierende Funktion ausübt.

#### **4.3.3.3. Verlust von Nesprin-2 Giant führt zu einer Vergrößerung der Zellkerne**

Es wird vermutet, dass auch die Regulation der Kerngröße von der Lamina und deren Interaktion mit dem Zytoskelett abhängig ist. Die Entwicklung von *D. melanogaster* ist in einem bestimmten Stadium dadurch gekennzeichnet, dass die Zellkerne von einer kreisförmigen zu einer ellipsoiden Form wechseln, wobei die Fläche der Nuklei sich stark vergrößert (Foe et al., 1993; Schejter und Wieschaus, 1993). Das Protein Kugelkern besitzt eine putative coiled-coil Domäne am N-Terminus, eine Kernlokalisationssequenz und ein C-terminales CaaX Motiv. Dieses wird, wie bei den Laminen auch, für das Targeting an die innere Kernmembran benötigt, wo es mit Laminen kolokalisiert und die Assoziation des farnesylierten Proteins Kugelkern mit der inneren Kernmembran induziert das Kernwachstum (Brandt et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass der Verlust von Nesprin-2 Giant zu einer Vergrößerung der Zellkerne führt. So zeigen primäre Fibroblasten und Keratinozyten von Nesprin-2 Giant defizienten Mäusen eine Vergrößerung der nukleären Fläche. Besonders in isolierten epidermalen Nesprin-2 Giant defizienten Zellen kommt es zu einer starken Vergrößerung (Faktor 1,97) der Kernfläche (Abb.3.24.). Der Einfluss von Nesprin-2 Giant auf die Kerngröße konnte durch den knock down bestätigt werden (Abb.3.26.A-C). *In vivo* bewirkt die Vergrößerung der Nuklei eine Verdickung der Epidermis in der Nesprin-2 Giant defizienten Maus (Abb.3.23.A-D sowie C und F). Daraus kann man schließen, dass das Nesprin-2 Giant Protein eine regulatorische Rolle bei der Erhaltung der Kerngröße einnimmt. Es ist auch möglich, dass der Einfluß der Lamine auf die Kerngröße zum Teil durch Nesprin-2 vermittelt wird, da die korrekte Lokalisation dieser Proteine von einem intakten Lamin A/C Netzwerk abhängig ist (Libotte et al., 2005; Zhang et al., 2005).

Auch Nesprin 2-Giant negative *LMNA* S143F Fibroblasten weisen eine Vergrößerung der nukleären Fläche im Vergleich zu Nesprin-2 Giant positiven *LMNA* S143F Fibroblasten auf (Faktor 1,7). In WT *LMNA* Fibroblasten kommt es mit steigender Passagierung zu einer Vergrößerung der Nuklei (Faktor 1,2) (Abb.3.10.A). Der Befund, dass es sowohl in seneszenten WT Fibroblasten als auch in *LMNA* S143F Fibroblasten, in denen der Alterungsprozess beschleunigt ist, zu diesem Effekt kommt, ist ein Hinweis darauf, dass es durch Seneszenz-bedingte Veränderungen in der Zelle zu einer Einschränkung der regulatorischen Funktion von Nesprin-2 Giant in Bezug auf die nukleäre Größe kommt.

#### **4.3.3.4. Generierung einer Nesprin-2 $\Delta$ ABD Isoform in KO Zellen durch alternative Translationsinitiation**

Überraschenderweise zeigten primäre Nesprin-2 Giant defiziente Keratinozyten und Fibroblasten unter bestimmten Bedingungen mit mAb K56-386 eine schwache Färbung an der Kernhülle (Abb.3.23.G; Sterne und Abb.3.27.M) sowie die Expression einer 800 kDa Isoform in der Westernblotanalyse (Abb.3.29.). Durch ein alternatives Spleißen zwischen Exon 1 und Exon 5 sowie dem Gebrauch einer alternativen Translations-

initiationsstelle kommt es zur Expression einer semifunktionellen Isoform (Nesprin-2 $\Delta$ ABD) in alten Fibroblasten (Abb.3.30. und Abb.3.18.). Diesem Protein fehlt die CH1-Domäne, die Linkerregion und ein Teil (ca. 30 AS) der CH2-Domäne. Einhergehend mit der Expression dieser aberranten K56-386 reaktiven Isoform kommt es zu einer Verbesserung der Kernmorphologie. Eine morphometrische Analyse zeigt, dass das nukleäre Konturverhältnis sich dem WT annähert, während die Kerngröße erhöht bleibt (Abb.3.24.). Dies bedeutet, dass der Bereich der ABD-Domäne, der in der alternativ gespleißten Nesprin-2 $\Delta$ ABD Isoform fehlt (siehe Abb.3.18.), eine wichtige Funktion bei der Erhaltung der Kerngröße einnimmt. Die Abwesenheit der F-Aktin-Bindestellen der ABD Domäne (Winder et al., 1995) sowie die Beobachtung, dass einzelne CH-Domänen nicht in der Lage sind, die Bindung an F-Aktin zu vermitteln (Gimona und Winder, 1998), lässt allerdings vermuten, dass Nesprin-2 $\Delta$ ABD nicht in der Lage ist, Aktinfilamente zu binden. Es ist möglich, dass die Assoziation von Nesprin-2 mit Aktin nicht für die strukturelle Integrität des Zellkerns notwendig ist, sondern dass diese eher über die Spektrinwiederholungen enthaltende Stabdomäne vermittelt wird (Bennett, 1990).

#### **4.3.4. Das strukturelle Gleichgewicht zwischen Laminen und Nesprin-2 Giant bestimmt die Integrität des Zellkerns**

In Bezug auf die untersuchten *LMNA* Mutanten ist es vorstellbar, dass die Lamine und das Nesprin-2 Giant Protein „strukturelle Gegenspieler“ darstellen, die in einem bestimmten Gleichgewicht zueinander stehen müssen, um eine normale Kernmorphologie zu garantieren. Kommt es aufgrund von Mutationen zu Veränderungen der Integrität der Lamina, kann dem pathogenen Einfluss der Mutation konzentrationsabhängig durch das Vorhandensein von Nesprin-2 Giant entgegengewirkt werden. Ist Nesprin-2 Giant in mutierten Zellen nicht vorhanden, kann die pathogene Wirkung der *LMNA* Mutation sich ausprägen. Wie beschrieben, ist eine Subpopulation von WT Fibroblasten negativ für Nesprin-2 Giant (Abb.3.7.). Diese Zellen besitzen auch in Abwesenheit des Nesprin-2 Giant Proteins eine normale Kernmorphologie, da hier die WT Lamina eine ausreichende Stabilität gewährleistet (Abb.3.10.B und C).

Überträgt man diese Hypothese auf die Ebene der Organe und Gewebe, erwartet man geringe Effekte von *LMNA* Mutationen in Geweben, die ein hohes Niveau der Nesprin-2 Giant Expression aufzeigen, z.B. in der Epidermis, im Gehirn und Skelettmuskel (Zhen et al., 2002). Im Falle der *LMNA* S143F Patientin, die einen kombinierten Phänotyp von progeroiden und myopathischen Charakteristika aufzeigt, ist die Pathologie jedoch komplexer, da hier deutlich auch die Skelettmuskulatur betroffen ist. Es ist möglich, dass die Skelettmuskulatur trotz der hohen Nesprin-2 Giant Expression früh eine phänotypische Ausprägung zeigt, da dieses Gewebe extremen mechanischem Stress ausgesetzt ist. Es ist bekannt, dass das Nesprin-2 Giant Niveau während der Muskeldifferenzierung ansteigt, so dass die Mutation einen spezifischen Einfluss auf die Myoblasten haben könnte, die noch nicht durch die Anwesenheit des Nesprin-2 Giant Proteins geschützt sind (Mislow et al., 2002b ; Zhang et al., 2005). Auf diese Weise wäre der Regenerationsprozess der Skelettmuskulatur beeinträchtigt.

In den letzten Jahren wurden verschiedene, sich überlappende Hypothesen aufgestellt, um die Pathophysiologie von Laminopathien zu erklären. Die strukturelle Hypothese besagt, dass es eine der Hauptaufgaben der Lamina ist, die strukturelle Integrität der Zellen insbesondere unter mechanischem Stress zu gewährleisten. Mutationen führen zu einer Schwächung dieser Funktion und nachfolgendem Zelltod. Je nach Krankheitsbild führt dies zu einem Schwund der Skelettmuskulatur oder zu einer Schwächung der Kardiomyozyten. So haben ultrastrukturelle Untersuchungen von Skelettmuskelproben von Patienten mit AD-EDMD und X-EDMD sowie von Kardiomyozyten von *LMNA* KO Mäusen gezeigt, dass die Kernhülle häufig aufbricht und das Chromatin in das Zytoplasma ragt, was zum Zelltod führt (Fidzianska und Hausmanowa-Petrusewicz, 2003; Fidzianska et al., 1998). Die Genexpressions-Hypothese besagt, dass insbesondere die Assoziation von Laminen mit Chromatin und die daraus resultierenden Beeinflussungen der Genregulation zur Pathophysiologie beitragen (Hutchison und Worman, 2004; Worman und Courvalin, 2004). Die Analyse der *LMNA* S143F Mutation zeigt deutlich, dass beide Theorien eine wichtige Rolle bei der Pathogenese spielen.

#### **4.4. Mislokalisierung nukleärer Proteine in Nesprin-2 Giant defizienten Zellen**

Da die Abwesenheit des Nesprin-2 Giant Proteins schwerwiegende Veränderungen der nukleären Morphologie hervorruft, wurden auch die LEM-Domäne Proteine untersucht, da ihre Funktion, direkt und indirekt mit Chromatin zu interagieren, von einer korrekten Lokalisation und Organisation abhängig ist.

Aufgrund der Tatsache, dass in COS7 Zellen die Emerin-Lokalisation von Nesprin-2 abhängig ist (Libotte et al., 2005), wurde die Verteilung dieses Proteins in Zellen und Hautschnitten der Nesprin-2 defizienten Maus untersucht. Sowohl in Fibroblasten (Abb.3.28.B, C, D) als auch in Keratinozyten (Abb.3.25.B) konnte eine Aggregation von Emerin innerhalb der nukleären Deformationen beobachtet werden. Auch *in vivo* zeigt sich eine gestörte subzelluläre Lokalisation in der Dermis, während die Expression unverändert bleibt (Abb.3.23.A-F; M). Überraschenderweise zeigen auch Proteine, deren Lokalisation nicht von den Nesprinen abhängig ist, Veränderungen in der subzellulären Lokalisation und Organisation. So weisen primäre Nesprin-2 Giant defiziente Zellen dieselben schwerwiegenden Veränderungen der Lam A/C Organisation auf, wie sie auch für Zellen von Laminopathie-Patienten charakteristisch sind (Abb.3.28.F). Insbesondere für das LAP2 $\alpha$  Protein konnten große Veränderungen in Form von Mislokationen, einer verminderten Expression (Abb.3.25.D) und Aggregatbildungen (Abb.3.28.H) beobachtet werden. Durch den knock down von Nesprin-2 Giant konnte eine Reduktion der LAP2 Isoformen nachgewiesen werden (Abb.3.26.F). Die Veränderungen des LAP2 $\alpha$  Proteins könnten dabei Lam A/C vermittelt sein. Die verminderte Expression des B-Typ Lamin abhängigen LAP2 $\beta$  Proteins zeigt, dass die Abwesenheit von Nesprin-2 Giant nicht nur schwerwiegende Konsequenzen auf die A-Typ Lamine sondern auch auf die B-Typ Lamine ausübt. Die beobachteten Veränderungen dieser Proteine beeinflussen die Genregulation, Chromatinorganisation und Transkriptionsaktivität (siehe auch 3.2.). Die Analyse der Nesprin-2 Giant defizienten Maus belegt, dass das Nesprin-2 Giant Protein sowohl eine strukturelle als auch funktionale Rolle an der Kernmembran ausübt und zeigt

erstmals, dass funktionelle Veränderungen, die in Zellen von Laminopathie-Patienten auftreten, auch durch Veränderungen/Verlust des Nesprin-2 Giant Proteins induziert werden.

Neben Veränderungen der Organisation und Lokalisation von Proteinen der LEM-Domäne Familie wurden auch Veränderungen in einem Heterochromatin-assoziierten Protein gefunden. Das Heterochromatin Protein 1 $\beta$  gehört zu einer Familie von Proteinen, die mit Heterochromatin assoziiert sind, als Genrepressoren wirken und eine wichtige Rolle bei der Regulation höhergeordneter Chromatinstrukturen spielen (Cheutin et al., 2005). Darüber hinaus bindet HP1 $\beta$  an den Lamin B Rezeptor (LBR), der Chromosomen direkt an der inneren Kernmembran verankert. In Arbeiten von Zhang et al. (2001, 2005) wurde mittels Goldmarkierung in der Immunelektronenmikroskopie gezeigt, dass Nesprin-1 und -2 während der Interphase mit Heterochromatin kolokalisieren. Durch Transmissions-elektronenmikroskopie von Zellen aus siRNA Experimenten konnte gezeigt werden, dass der knock down von Nesprin-2 zu einer Störung der Heterochromatinorganisation führt (Zhang et al., 2007). Hier wurde in Nesprin-2 Giant defizienten Fibroblasten eine Mislokalisierung des HP1 $\beta$  Proteins gefunden (Abb.3.28.I und J). Solche Veränderungen wurden bislang in Zellen von Laminopathie-Patienten und alten Menschen beschrieben und die Mislokalisierung des Heterochromatin und assoziierter Proteine gilt als typisches Kennzeichen seneszenter Zellen (Smith et al., 2005; Scaffidi und Misteli, 2006). In der Epidermis junger Nesprin-2 Giant defizienter Mäuse ist der mitotische Index im Vergleich zum Wildtyp unverändert (Abb.3.22.E-F, sowie Text). Dies konnte auch durch eine *in vivo* Inkorporation von BrdU bestätigt werden (Abb.3.22.M und N). Untersuchungen an älteren Nesprin-2 Giant defizienten Mäusen müssen klären, ob es zu einem früheren Eintritt Seneszenz-bedingter Veränderungen kommt.

#### **4.5. Nesprin-2 Giant beeinflusst die Polarisation von Fibroblasten**

Die Nesprin-Orthologe Anc-1 in *C. elegans* und MSP-300 in *D. melanogaster* spielen eine wichtige Rolle bei der Positionierung des Zellkerns und Migration (Rosenberg-Hasson et al., 1996; Starr und Han, 2002 und 2003; Yu et al.,

2006). In *C. elegans* vermittelt das KASH-Domäne enthaltende Protein Zyg-12 die Bindung des Zentrosoms an den Zellkern (Malone et al., 2003).

Die Zellmigration ist wichtig für die Entwicklung, Wundheilung und die Funktion des Immunsystems. In migrierenden Zellen, z. B. in Fibroblasten, Endothelzellen, Astrozyten und Neuronen, wird das Mikrotubuli-Organisationszentrum/Zentrosom (MTOC) zwischen der Migrationsfront und dem Zellkern positioniert (Gotlieb et al., 1981; Kupfer et al., 1982; Gundersen und Bulinski, 1988; Euteneuer und Schliwa, 1992; Etienne-Manneville und Hall, 2001; Palazzo et al., 2001). Da der Golgi-Apparat mit dem MTOC kolokalisiert, wird in migrierenden Zellen auch der Golgi-Apparat neu positioniert. So können Membranvorläufer und eventuell auch Aktin-regulierende Faktoren gerichtet zur Migrationsfront transportiert werden (Bergmann et al., 1983; Prigozhina und Waterman-Storer, 2004). 2005 wurde eine Studie veröffentlicht, die besagt, dass das MTOC verankert bleibt, während der Zellkern retrograd bewegt wird. Diese Bewegung ist Aktin- und Myosin II-abhängig. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Positionierung des Zellkerns das initialisierende Moment für die Migration von Zellen ist (Gomes et al., 2005). Neue Studien zeigen, dass Nesprin-2 Giant an der Bewegung des Zellkerns beteiligt ist (Gomes, persönliche Kommunikation). Bereits in der Dissertationsarbeit von Zaim (2005) wurde gezeigt, dass die Nesprin-2 Giant defizienten Zellen einen Defekt in der Zellwanderung aufweisen. In der vorliegenden Arbeit konnte nun als Ursache des Migrationsdefektes die fehlerhafte Ausrichtung des Zellkerns zum MTOC und Golgi-Apparates identifiziert werden (Abb.3.31.A-B''). Zusätzlich ist die Entfernung Zentrosom - Zellkern vergrößert und die Zentrosomenanzahl erhöht. Dies weist auf eine Störung bei der Amplifikation der Zentrosomen hin, die für die Zellteilung benötigt wird. Eine Störung der Zellteilung könnte auch die Ursache für die verringerte Wachstumsgeschwindigkeit und Proliferation sein (Abb.3.32.).

Ob die Veränderungen der Wanderungsgeschwindigkeit von Zellen sowie die gestörte Polarisation und Zentrosomenzahl eine direkte Konsequenz der Nesprin-2 Giant Defizienz ist, muss weiter untersucht werden. Mittlerweile haben verschiedene Studien Hinweise auf eine mechanische Kopplung

zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma gegeben. Lammerding et al., 2004 haben in *LMNA* KO Fibroblasten gezeigt, dass es zu einer Störung mechanosensitiver Signaltransduktionswege kommt. In einer anderen Studie mit *LMNA* KO Fibroblasten wurde eine reduzierte mechanische Stabilität der Zellen nachgewiesen (Broers et al., 2004). 2007 wurde eine Studie veröffentlicht, die zeigt, dass in *LMNA* KO Fibroblasten die Viskoelastizität des Zytoskeletts reduziert ist (Lee et al., 2007). Eine reduzierte Viskosität des Zytoplasmas könnte auch einen Einfluss auf die Migrationsgeschwindigkeit in *LMNA* KO Fibroblasten ausüben, da in wandernden Fibroblasten das Zytoplasma in Richtung der Migrationsfront verstärkt werden muss (Kole et al., 2005). Wie in Nesprin-2 Giant defizienten Zellen wurde auch in *LMNA* defizienten Zellen eine verlangsamte Wanderungsgeschwindigkeit, eine gestörte Zellpolarisation und eine erhöhte Entfernung der Zentrosomen zum Nukleus gefunden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige der in Nesprin-2 Giant defizienten Zellen beobachteten Veränderungen auf das gestörte Lam A/C Netzwerk zurückzuführen sind. Eine detaillierte Analyse von Nesprin-2 Giant defizienten migrierenden Fibroblasten könnte klären, ob eine direkte Beteiligung von Nesprin-2 Giant bei der Polarisation und Zentrosomenamplifikation vorliegt.

#### **4.6. Beteiligung von Nesprin-2 bei skelettmuskelspezifischen Erkrankungen**

Verschiedene Spektrinwiederholungen enthaltende Proteine fungieren als strukturelle Plattform bei der Erhaltung und Organisation zytoplasmatischer Membranstrukturen (Winder et al., 1995; De Matteis and Morrow, 2000). Das in Muskelzellen vorhandene Protein Dystrophin stabilisiert das Sarkolemma und schützt die Muskelfaser während der Kontraktion. Dystrophin verbindet das Aktinzytoskelett über einen Glykoprotein-Komplex, der die Plasmamembran von Muskelzellen durchspannt, mit der extrazellulären Matrix und stellt so eine mechanische Verbindung des intrazellulären Zytoskeletts mit dem extrazellulären Raum dar (Pasternak et al., 1995; Lavidor et al., 2004). Durch Mutation im Dystrophinogen kommt es zur Ausbildung der Duchenne-Muskeldystrophie (DMD); einer Krankheit, die durch die Reduktion bzw. Abwesenheit des Dystrophins in Muskelzellen gekennzeichnet ist und mit

einer großen Fragilität von Muskelzellen einhergeht (Ahn und Kunkel, 1993). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des Nesprin-2 Giant Proteins mit Dystrophin lässt sich vermuten, dass Nesprin-2 Giant auch in die Pathogenese skelettmuskelspezifischer Erkrankungen (z.B. Muskeldystrophien oder Laminopathien mit Beteiligung der Skelettmuskulatur) involviert ist. Eine Verbindung des Zellkern mit der Plasmamembran kann geschaffen werden, indem Nesprin-2 eine Bindung des Zellkerns mit dem Aktinzytoskelett vermittelt. Die Aktinfilamente werden wiederum an Dystrophine gebunden, die über ihre Glykoproteinkomplexe eine Bindung zur Plasmamembran und zur extrazellulären Matrix aufbauen. Nesprine binden im Sarkomer an Proteine, z.B. Titin, die wichtig für die strukturelle Integrität des Muskels sind (Warren et al., 2005). Der knock down des Nesprin Orthologs MSP 300 in *D. melanogaster* führt zu einer gestörten Verbindung zwischen Muskeln und Sehnen und Integrinlokalisierung an der Plasmamembran (Volk et al., 1992) und Mutationen im *MSP-300* Gen sind lethal, da die Embryonen aufgrund eines Defektes in der Muskelmorphogenese sterben (Rosenberg-Hasson et al., 1996; Volk et al., 1992).

In den letzten Jahren wurden mehrere Studien veröffentlicht, die die Beteiligung von Nesprinen bei der Entstehung der Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie aufzeigen (Mislow et al., 2002b; Zhang et al., 2004 und 2007; Wheeler et al., 2007). Patienten mit EDMD weisen Muskelkontraktionen auf, einen Muskelabbau und dilatative Kardiomyopathien (siehe 1.4.1.1.). Da bei nur ca. der Hälfte der Patienten eine Mutation im *LMNA* oder *EMD* Gen gefunden wurde, wurde vorgeschlagen, dass auch Mutationen in anderen Proteinen EDMD auslösen (Bonne et al., 2002 und 2003). Die Lokalisation von Nesprinen und Emerin ist abhängig von Lamin A/C, während die Lokalisation von Emerin an der inneren Kernmembran zusätzlich von Nesprin abhängig ist (Mislow et al., 2002a und 2002b; Zhen et al., 2002; Padmakumar et al., 2004; Libotte et al., 2005; Zhang et al., 2005).

2007 wurde eine Studie veröffentlicht, die eine direkte Beteiligung von Nesprinen in der Entstehung von EDMD nachweist (Zhang et al., 2007). In einer Gruppe von 190 Patienten, bei der die EDMD nicht auf eine Mutation

des *LMNA* oder *EMD* Gen zurückzuführen ist, wurden vier heterozygote missense Mutationen im Nesprin-1 und Nesprin-2 Gen gefunden. Die Nesprin-2 Mutation betrifft die 87 kDa Isoform Nesprin-2 $\beta$ 1. Für die Entstehung der EDMD wird vermutet, dass die Störung der Interaktionen zwischen Laminen, Emerin und Nesprinen zur Ausbildung des Phänotyps führt. Nesprine vermitteln über ihre Bindung an Sun1 und Sun2 eine Verbindung der inneren und äußeren Kernmembran mit dem Zytoskelett über den LINC Komplex (Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton). Durch die Auflösung dieses Komplexes wird sowohl die mechanische Stabilisierung von Muskelzellen herabgesetzt als auch mechano-sensitive Signaltransduktionswege beeinflusst (Davies und Nowak, 2006; Tzur et al., 2006), so dass es dadurch mit zunehmendem Alter der Patienten zur Ausbildung des Phänotyps kommt.

Durch die Generierung eines transgenen Mausmodells, bei dem Nesprin-2 skelettmuskelspezifisch exprimiert wird, soll die Beteiligung von Nesprin-2 an der Entstehung skelettmuskelspezifischer Erkrankungen untersucht werden. In den transgenen Mäusen wird die Transmembrandomäne und der luminal Bereich von Nesprin-2 exprimiert. Zur Detektion dient ein HA-Epitop, das in einer Westernblotanalyse von Skelettmuskellysaten detektiert werden konnte (Abb.3.33.A-D). Da die Kreuzungsexperimente und die Tierzucht einen langen Zeitraum in Anspruch genommen haben, konnte neben der Detektion des Transgens nur eine makroskopische Analyse durchgeführt werden (Abb.3.33.E). Hier konnte beobachtet werden, dass die Expression eines dominant negativen Nesprin-2 Proteins zur Ausbildung motorischer Defizite führt. So ist die Koordination der Extremitäten beeinflusst und die Körperachse ist in sich verdreht. Diese Beobachtungen geben Hinweise auf eine potentielle Beteiligung von Nesprin-2 in der Ausbildung skelettmuskelspezifischer Erkrankungen. In Zukunft kann die Analyse dieses Mausmodells wichtige Kenntnisse über die Funktion von Nesprin-2 im Skelettmuskel vermitteln.

## 5. Zusammenfassung

Das Nesprin-2 Giant Protein (796 kDa) ist ein Mitglied der  $\alpha$ -Aktinin-Superfamilie und zeichnet sich durch das Vorhandensein einer Aktin-Binde-Domäne (ABD-Domäne), einer Spektrinwiederholungen enthaltenden Stabdomäne und einer C-terminalen Transmembrandomäne aus. Mittels des C-Terminus wird Nesprin-2 Giant in der inneren und äußeren Kernmembran verankert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die strukturelle Funktion des Nesprin-2 Giant Proteins bei der Aufrechterhaltung der Zellkernmorphologie untersucht. Hierzu wurden primäre dermale Fibroblasten einer Laminopathie-Patientin analysiert, die eine einzigartige Mutation im N-terminalen Bereich des Lamin A/C Proteins aufweist (*LMNA* S143F). Die Patientin zeigt einen kombinierten Phänotyp, der Charakteristika einer Progerieerkrankung und Myopathie vereint. Einhergehend mit der bekannten Abhängigkeit der Nesprine von Lamin A/C kann in diesen Zellen eine veränderte Expression und Lokalisation von Nesprin-2 Isoformen, insbesondere Nesprin-2 Giant, beobachtet werden. Um zu zeigen, dass die beobachteten Veränderungen eindeutig auf die fehlende Funktion des Nesprin-2 Proteins zurückzuführen sind, wurden Nesprin-2 Giant defiziente Mäuse analysiert. In *LMNA* S143F Zellen sowie in Nesprin-2 Giant defizienten Fibroblasten und Hautschnitten geht der Verlust des Nesprin-2 Giant Proteins mit Kerndeformationen und einer Vergrößerung der nukleären Fläche einher. Es konnte gezeigt werden, dass das Expressionsniveau des Nesprin-2 Giant Proteins wichtig für das Ausmaß der Kerndeformationen ist. Mittels Immunpräzipitation und RNA silencing wurde nachgewiesen, dass die Lokalisation der kleinen C-terminalen Isoformen an der Kernmembran von der Anwesenheit des Nesprin-2 Giant Proteins abhängig ist. Neben strukturellen Veränderungen der Zellkernmorphologie konnte in der Nesprin-2 Giant defizienten Maus ein Einfluss auf Proteine der LEM-Domäne-Familie (Emerin, LAP2 $\alpha$ , LAP2 $\beta$ ) sowie Veränderungen in einem chromatin-assoziierten Protein nachgewiesen werden. Diese Veränderungen sind typische Kennzeichen von Zellen mit *LMNA* Mutationen und wurden bislang als direkte Konsequenz von Lam A/C Mutationen angesehen. In dieser Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass Nesprine einen direkten Einfluss auf Proteine nehmen, die eine wichtige Rolle bei der Genregulation und Chromatinorganisation spielen.

Somit konnte gezeigt werden, dass das Nesprin-2 Giant Protein eine potentielle Rolle in der Pathogenese von Laminopathien einnimmt, indem es Einfluss auf die strukturelle und funktionelle Integrität des Zellkerns ausübt.

## 6. Abstract

Nesprin-2 Giant (796 kDa) is a member of the  $\alpha$ -actinin-superfamily and consists of an actin-binding-domain (ABD-domain), a rod domain containing several spectrin repeats and a C-terminal KASH domain which mediates anchorage to the outer and inner nuclear membrane. In order to characterise the function of this protein, primary cells and tissues obtained from Nesprin-2 Giant deficient mice as well as primary dermal fibroblasts of a patient carrying a *LMNA* S143F mutation in the N-terminal segment of Lamin A/C were analysed. The patient shows a unique phenotype combining features of progeria and myopathy. Consistent with the known Lamin A/C dependency of Nesprin-2, expression levels and localisation of Nesprin-2 isoforms, predominantly Nesprin-2 Giant, were perturbed. In *LMNA* S143F fibroblasts as well as primary cells and skin sections of Nesprin-2 Giant deficient mice, nuclear deformations were frequently observed and accompanied by an increase in nuclear size demonstrating that the level of Nesprin-2 Giant expression is crucial for the induction of nuclear deformations. Using immune precipitation analysis and RNAi silencing a Nesprin-2 Giant dependency of the smaller c-terminal Nesprin-2 isoforms was confirmed. Besides the structural changes, an aberrant expression and localisation of LEM-domain-containing proteins (Emerin, LAP2 $\alpha$ , LAP2 $\beta$ ) as well as a mislocalisation of the heterochromatin associated protein HP1 $\beta$  could be observed in Nesprin-2 Giant deficient mice. As these changes are hallmarks of fibroblasts obtained from patient with laminopathies they were considered as a direct consequence of *LMNA* mutations. Here we show that Nesprins directly influence proteins important for gene regulation and chromatin organisation. We can conclude that Nesprins play an essential role in the pathogenesis of laminopathies by influencing the structural and functional integrity of the nucleus.

## 7. Literatur

Ahn, A. H. & Kunkel, L. M. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet* 3, 283-91 (1993).

Alsheimer, M., von Glasenapp, E., Hock, R. & Benavente, R. Architecture of the nuclear periphery of rat pachytene spermatocytes: distribution of nuclear envelope proteins in relation to synaptonemal complex attachment sites. *Mol Biol Cell* 10, 1235-45 (1999).

Apel, E. D., Lewis, R. M., Grady, R. M. & Sanes, J. R. Syne-1, a dystrophin- and Klarsicht-related protein associated with synaptic nuclei at the neuromuscular junction. *J Biol Chem* 275, 31986-95 (2000).

Beck, L. A., Hosick, T. J. & Sinensky, M. Isoprenylation is required for the processing of the lamin A precursor. *J Cell Biol* 110, 1489-99 (1990).

Bennett, V. Spectrin-based membrane skeleton: a multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm. *Physiol Rev* 70, 1029-65 (1990).

Berger, R. et al. The characterization and localization of the mouse thymopoietin/lamina-associated polypeptide 2 gene and its alternatively spliced products. *Genome Res* 6, 361-70 (1996).

Bergmann, J. E., Kupfer, A. & Singer, S. J. Membrane insertion at the leading edge of motile fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 1367-71 (1983).

Bergo, M. O. et al. Zmpste24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13049-54 (2002).

Biamonti, G. et al. The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. *Mol Cell Biol* 12, 3499-506 (1992).

Bione, S. et al. Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 8, 323-7 (1994).

Blobel, G. Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1496-500 (1980).

Blum, H. et al. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99 (1987)

Bonne, G. et al. 82nd ENMC international workshop, 5th international Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD) workshop, 1st Workshop of the MYO-CLUSTER project EUROMEN (European muscle envelope nucleopathies), 15-16 September 2000, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 12, 187-94 (2002).

Bonne, G. et al. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 21, 285-8 (1999).

Bonne, G. et al. 108th ENMC International Workshop, 3rd Workshop of the MYO-CLUSTER project: EUROMEN, 7th International Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy (EDMD) Workshop, 13-15 September 2002, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 13, 508-15 (2003).

Bouhouche, A. et al. A locus for an axonal form of autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease maps to chromosome 1q21.2-q21.3. *Am J Hum Genet* 65, 722-7 (1999).

Boukamp, P. et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106, 761-71 (1988).

Brandt, A. et al. Developmental control of nuclear size and shape by Kugelkern and Kurzkern. *Curr Biol* 16, 543-52 (2006).

Broers, J. L. et al. Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. *J Cell Sci* 112 ( Pt 20), 3463-75 (1999).

Broers, J. L. et al. Decreased mechanical stiffness in LMNA<sup>-/-</sup> cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies. *Hum Mol Genet* 13, 2567-80 (2004).

Broers, J. L., Ramaekers, F. C., Bonne, G., Yaou, R. B. & Hutchison, C. J. Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev* 86, 967-1008 (2006).

Cai, M. et al. Solution structure of the constant region of nuclear envelope protein LAP2 reveals two LEM-domain structures: one binds BAF and the other binds DNA. *Embo J* 20, 4399-407 (2001).

Capell, B. C. et al. Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12879-84 (2005).

Caux, F. et al. A new clinical condition linked to a novel mutation in lamins A and C with generalized lipodystrophy, insulin-resistant diabetes, disseminated leukomelanodermic papules, liver steatosis, and cardiomyopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 1006-13 (2003).

Charniot, J. C. et al. Functional consequences of an LMNA mutation associated with a new cardiac and non-cardiac phenotype. *Hum Mutat* 21, 473-81 (2003).

Chen, L. et al. LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. *Lancet* 362, 440-5 (2003).

Cheutin, T. et al. Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* 299, 721-5 (2003).

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

Clarke, S., Vogel, J. P., Deschenes, R. J. & Stock, J. Posttranslational modification of the Ha-ras oncogene protein: evidence for a third class of protein carboxyl methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4643-7 (1988).

Clements, L., Manilal, S., Love, D. R. & Morris, G. E. Direct interaction between emerin and lamin A. *Biochem Biophys Res Commun* 267, 709-14 (2000).

Cohen, M., Lee, K. K., Wilson, K. L. & Gruenbaum, Y. Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional evolution of the nuclear lamina. *Trends Biochem Sci* 26, 41-7 (2001).

Corrigan, D. P. et al. Prelamin A endoproteolytic processing in vitro by recombinant Zmpste24. *Biochem J* 387, 129-38 (2005).

Crisp, M. et al. Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol* 172, 41-53 (2006).

Csoka, A. B. et al. Novel lamin A/C gene (LMNA) mutations in atypical progeroid syndromes. *J Med Genet* 41, 304-8 (2004).

Dahl, K. N. et al. Distinct structural and mechanical properties of the nuclear lamina in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10271-6 (2006).

Dai, Q. et al. Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 273, 15030-4 (1998).

Davies, K. E. & Nowak, K. J. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 762-73 (2006).

De Matteis, M. A. & Morrow, J. S. Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *J Cell Sci* 113 ( Pt 13), 2331-43 (2000).

De Sandre-Giovannoli, A. et al. Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300, 2055 (2003).

De Sandre-Giovannoli, A. et al. Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet* 70, 726-36 (2002).

Dechat, T. et al. Detergent-salt resistance of LAP2alpha in interphase nuclei and phosphorylation-dependent association with chromosomes early in nuclear assembly implies functions in nuclear structure dynamics. *Embo J* 17, 4887-902 (1998).

Dechat, T. et al. Lamina-associated polypeptide 2alpha binds intranuclear A-type lamins. *J Cell Sci* 113 Pt 19, 3473-84 (2000).

Dunnigan, M. G., Cochrane, M. A., Kelly, A. & Scott, J. W. Familial lipotrophic diabetes with dominant transmission. A new syndrome. *Q J Med* 43, 33-48 (1974).

Dwyer, N. & Blobel, G. A modified procedure for the isolation of a pore complex-lamina fraction from rat liver nuclei. *J Cell Biol* 70, 581-91 (1976).

Ellenberg, J. et al. Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J Cell Biol* 138, 1193-206 (1997).

Emery, A. E. Emery-Dreifuss syndrome. *J Med Genet* 26, 637-41 (1989).

Eriksson, M. et al. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423, 293-8 (2003).

Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* 106, 489-98 (2001).

Euteneuer, U. & Schliwa, M. Mechanism of centrosome positioning during the wound response in BSC-1 cells. *J Cell Biol* 116, 1157-66 (1992).

Fairley, E. A., Kendrick-Jones, J. & Ellis, J. A. The Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype arises from aberrant targeting and binding of emerin at the inner nuclear membrane. *J Cell Sci* 112 ( Pt 15), 2571-82 (1999).

Fatkin, D. et al. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med* 341, 1715-24 (1999).

Fidzianska, A. & Hausmanowa-Petrusewicz, I. Architectural abnormalities in muscle nuclei. Ultrastructural differences between X-linked and autosomal dominant forms of EDMD. *J Neurol Sci* 210, 47-51 (2003).

Fidzianska, A., Toniolo, D. & Hausmanowa-Petrusewicz, I. Ultrastructural abnormality of sarcolemmal nuclei in Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD). *J Neurol Sci* 159, 88-93 (1998).

Fisher, D. Z., Chaudhary, N. & Blobel, G. cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 6450-4 (1986).

Foe, V. E. & Alberts, B. M. Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *J Cell Sci* 61, 31-70 (1983).

Foisner, R. & Gerace, L. Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell* 73, 1267-79 (1993).

Fong, L. G. et al. Heterozygosity for *Lmna* deficiency eliminates the progeria-like phenotypes in *Zmpste24*-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 18111-6 (2004).

Fry, M. The Werner syndrome helicase-nuclease--one protein, many mysteries. *Sci Aging Knowledge Environ* 2002, re2 (2002).

Furukawa, K. LAP2 binding protein 1 (L2BP1/BAF) is a candidate mediator of LAP2-chromatin interaction. *J Cell Sci* 112 ( Pt 15), 2485-92 (1999).

Furukawa, K., Fritze, C. E. & Gerace, L. The major nuclear envelope targeting domain of LAP2 coincides with its lamin binding region but is distinct from its chromatin interaction domain. *J Biol Chem* 273, 4213-9 (1998).

Furukawa, K., Glass, C. & Kondo, T. Characterization of the chromatin binding activity of lamina-associated polypeptide (LAP) 2. *Biochem Biophys Res Commun* 238, 240-6 (1997).

Furukawa, K. & Hotta, Y. cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *Embo J* 12, 97-106 (1993).

Furukawa, K., Inagaki, H. & Hotta, Y. Identification and cloning of an mRNA coding for a germ cell-specific A-type lamin in mice. *Exp Cell Res* 212, 426-30 (1994).

Furukawa, K., Pante, N., Aebi, U. & Gerace, L. Cloning of a cDNA for lamina-associated polypeptide 2 (LAP2) and identification of regions that specify targeting to the nuclear envelope. *Embo J* 14, 1626-36 (1995).

Gant, T. M., Harris, C. A. & Wilson, K. L. 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, 1083-96 (1999).

Georgatos, S. D., Stournaras, C. & Blobel, G. Heterotypic and homotypic associations between the nuclear lamins: site-specificity and control by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4325-9 (1988).

Gerace, L. & Burke, B. Functional organization of the nuclear envelope. *Annu Rev Cell Biol* 4, 335-74 (1988).

Gillerot, Y. & Koulischer, L. Restrictive dermopathy. *Am J Med Genet* 27, 239-40 (1987).

Gimona, M., Djinnovic-Carugo, K., Kranewitter, W. J. & Winder, S. J. Functional plasticity of CH domains. *FEBS Lett* 513, 98-106 (2002).

Gimona, M. & Winder, S. J. Single calponin homology domains are not actin-binding domains. *Curr Biol* 8, R674-5 (1998).

Gluzman, Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175-82 (1981).

Goizet, C. et al. A new mutation of the lamin A/C gene leading to autosomal dominant axonal neuropathy, muscular dystrophy, cardiac disease, and leuconychia. *J Med Genet* 41, e29 (2004).

Goldberg, M., Harel, A. & Gruenbaum, Y. The nuclear lamina: molecular organization and interaction with chromatin. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 9, 285-93 (1999).

Goldman, R. D., Gruenbaum, Y., Moir, R. D., Shumaker, D. K. & Spann, T. P. Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev* 16, 533-47 (2002).

Goldman, R. D. et al. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8963-8 (2004).

Gomes, E. R., Jani, S. & Gundersen, G. G. Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell* 121, 451-63 (2005).

Gotlieb, A. I., May, L. M., Subrahmanyam, L. & Kalnins, V. I. Distribution of microtubule organizing centers in migrating sheets of endothelial cells. *J Cell Biol* 91, 589-94 (1981).

Gotzmann, J. & Foisner, R. Lamins and lamin-binding proteins in functional chromatin organization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 9, 257-65 (1999).

Gundersen, G. G. & Bulinski, J. C. Selective stabilization of microtubules oriented toward the direction of cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5946-50 (1988).

Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-80 (1983).

Harborth, J., Elbashir, S. M., Bechert, K., Tuschl, T. & Weber, K. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 114, 4557-65 (2001).

Harris, C. A. et al. Structure and mapping of the human thymopoietin (TMPO) gene and relationship of human TMPO beta to rat lamin-associated polypeptide 2. *Genomics* 28, 198-205 (1995).

Heald, R. & McKeon, F. Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* 61, 579-89 (1990).

Helbling-Leclerc, A., Bonne, G. & Schwartz, K. Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Eur J Hum Genet* 10, 157-61 (2002).

Hellemans, J. et al. Loss-of-function mutations in LEMD3 result in osteopoikilosis, Buschke-Ollendorff syndrome and melorheostosis. *Nat Genet* 36, 1213-8 (2004).

Hickson, I. D. RecQ helicases: caretakers of the genome. *Nat Rev Cancer* 3, 169-78 (2003).

Holaska, J. M., Lee, K. K., Kowalski, A. K. & Wilson, K. L. Transcriptional repressor germ cell-less (GCL) and barrier to autointegration factor (BAF) compete for binding to emerin in vitro. *J Biol Chem* 278, 6969-75 (2003).

Holmer, L. & Worman, H. J. Inner nuclear membrane proteins: functions and targeting. *Cell Mol Life Sci* 58, 1741-7 (2001).

Holtz, D., Tanaka, R. A., Hartwig, J. & McKeon, F. The CaaX motif of lamin A functions in conjunction with the nuclear localization signal to target assembly to the nuclear envelope. *Cell* 59, 969-77 (1989).

Hutchinson, J. Case of congenital absence of hair, with atrophic condition of the skin and its appendages, in a boy whose mother had been almost wholly bald from alopecia areata from the age of six. *Lancet* 1, 923 only (1886).

Hutchison, C. J., Alvarez-Reyes, M. & Vaughan, O. A. Lamins in disease: why do ubiquitously expressed nuclear envelope proteins give rise to tissue-specific disease phenotypes? *J Cell Sci* 114, 9-19 (2001).

Hutchison, C. J., Bridger, J. M., Cox, L. S. & Kill, I. R. Weaving a pattern from disparate threads: lamin function in nuclear assembly and DNA replication. *J Cell Sci* 107 ( Pt 12), 3259-69 (1994).

Hutchison, C. J. & Worman, H. J. A-type lamins: guardians of the soma? *Nat Cell Biol* 6, 1062-7 (2004).

Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-8 (1990).

Ishisaki, Z., Takaishi, M., Furuta, I. & Huh, N. Calmin, a protein with calponin homology and transmembrane domains expressed in maturing spermatogenic cells. *Genomics* 74, 172-9 (2001).

Izumi, M., Vaughan, O. A., Hutchison, C. J. & Gilbert, D. M. Head and/or CaaX domain deletions of lamin proteins disrupt preformed lamin A and C but not lamin B structure in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 11, 4323-37 (2000).

Jacob, K. N. et al. Phenotypic heterogeneity in body fat distribution in patients with atypical Werner's syndrome due to heterozygous Arg133Leu lamin A/C mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 6699-706 (2005).

Karkkainen, S. et al. A novel mutation, Ser143Pro, in the lamin A/C gene is common in Finnish patients with familial dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 25, 885-93 (2004).

Kirschner, J. et al. p.S143F mutation in lamin A/C: a new phenotype combining myopathy and progeria. *Ann Neurol* 57, 148-51 (2005).

Kitten, G. T. & Nigg, E. A. The CaaX motif is required for isoprenylation, carboxyl methylation, and nuclear membrane association of lamin B2. *J Cell Biol* 113, 13-23 (1991).

Kole, T. P., Tseng, Y., Jiang, I., Katz, J. L. & Wirtz, D. Intracellular mechanics of migrating fibroblasts. *Mol Biol Cell* 16, 328-38 (2005).

Krohne, G. Lamin assembly in vivo. *Subcell Biochem* 31, 563-86 (1998).

Krohne, G., Waizenegger, I. & Hoger, T. H. The conserved carboxy-terminal cysteine of nuclear lamins is essential for lamin association with the nuclear envelope. *J Cell Biol* 109, 2003-11 (1989).

Krohne, G., Wolin, S. L., McKeon, F. D., Franke, W. W. & Kirschner, M. W. Nuclear lamin LI of *Xenopus laevis*: cDNA cloning, amino acid sequence and binding specificity of a member of the lamin B subfamily. *Embo J* 6, 3801-8 (1987).

Kupfer, A., Louvard, D. & Singer, S. J. Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in cultured fibroblasts at the edge of an experimental wound. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 2603-7 (1982).

Laird, P. W. et al. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* 19, 4293 (1991).

Lammerding, J. et al. Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J Clin Invest* 113, 370-8 (2004).

Lapidos, K. A., Kakkar, R. & McNally, E. M. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res* 94, 1023-31 (2004).

Larochelle, N. et al. The short MCK1350 promoter/enhancer allows for sufficient dystrophin expression in skeletal muscles of mdx mice. *Biochem Biophys Res Commun* 292, 626-31 (2002).

Lee, J. S. et al. Nuclear lamin A/C deficiency induces defects in cell mechanics, polarization, and migration. *Biophys J* 93, 2542-52 (2007).

Lee, K. C. & Lee Kraus, W. Nuclear receptors, coactivators and chromatin: new approaches, new insights. *Trends Endocrinol Metab* 12, 191-7 (2001).

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M. & Boedtker, H. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16, 4743-51 (1977).

Lenz-Bohme, B. et al. Insertional mutation of the *Drosophila* nuclear lamin Dm0 gene results in defective nuclear envelopes, clustering of nuclear pore complexes, and accumulation of annulate lamellae. *J Cell Biol* 137, 1001-16 (1997).

Libotte, T. et al. Lamin A/C-dependent localization of Nesprin-2, a giant scaffold at the nuclear envelope. *Mol Biol Cell* 16, 3411-24 (2005).

Lin, F. et al. MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated polypeptide 2 and emerin. *J Biol Chem* 275, 4840-7 (2000).

Lin, F., Morrison, J. M., Wu, W. & Worman, H. J. MAN1, an integral protein of the inner nuclear membrane, binds Smad2 and Smad3 and antagonizes transforming growth factor-beta signaling. *Hum Mol Genet* 14, 437-45 (2005).

Lin, F. & Worman, H. J. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem* 268, 16321-6 (1993).

Lin, F. & Worman, H. J. Structural organization of the human gene (LMNB1) encoding nuclear lamin B1. *Genomics* 27, 230-6 (1995).

Liu, J. et al. Essential roles for *Caenorhabditis elegans* lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes. *Mol Biol Cell* 11, 3937-47 (2000).

Lopez-Soler, R. I., Moir, R. D., Spann, T. P., Stick, R. & Goldman, R. D. A role for nuclear lamins in nuclear envelope assembly. *J Cell Biol* 154, 61-70 (2001).

Machiels, B. M. et al. An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10. *J Biol Chem* 271, 9249-53 (1996).

Malone, C. J. et al. The *C. elegans* hook protein, ZYG-12, mediates the essential attachment between the centrosome and nucleus. *Cell* 115, 825-36 (2003).

Mancini, M. A., Shan, B., Nickerson, J. A., Penman, S. & Lee, W. H. The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 418-22 (1994).

Mansharamani, M. & Wilson, K. L. Direct binding of nuclear membrane protein MAN1 to emerin in vitro and two modes of binding to barrier-to-autointegration factor. *J Biol Chem* 280, 13863-70 (2005).

Markiewicz, E., Dechat, T., Foisner, R., Quinlan, R. A. & Hutchison, C. J. Lamin A/C binding protein LAP2alpha is required for nuclear anchorage of retinoblastoma protein. *Mol Biol Cell* 13, 4401-13 (2002).

Martin, G. M. Genetic modulation of the senescent phenotype in *Homo sapiens*. *Genome* 31, 390-7 (1989).

McKeon, F. D., Kirschner, M. W. & Caput, D. Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* 319, 463-8 (1986).

Mislow, J. M. et al. Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro. *FEBS Lett* 525, 135-40 (2002a).

Mislow, J. M., Kim, M. S., Davis, D. B. & McNally, E. M. Myne-1, a spectrin repeat transmembrane protein of the myocyte inner nuclear membrane, interacts with lamin A/C. *J Cell Sci* 115, 61-70 (2002b).

Mislow, K. Stereochemical terminology and its discontents. *Chirality* 14, 126-34 (2002).

Moir, R. D., Montag-Lowy, M. & Goldman, R. D. Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication. *J Cell Biol* 125, 1201-12 (1994).

Moir, R. D., Spann, T. P., Herrmann, H. & Goldman, R. D. Disruption of nuclear lamin organization blocks the elongation phase of DNA replication. *J Cell Biol* 149, 1179-92 (2000).

Moir, R. D. et al. The dynamics of the nuclear lamins during the cell cycle--relationship between structure and function. *J Struct Biol* 129, 324-34 (2000).

Mosley-Bishop, K. L., Li, Q., Patterson, L. & Fischer, J. A. Molecular analysis of the klarsicht gene and its role in nuclear migration within differentiating cells of the *Drosophila* eye. *Curr Biol* 9, 1211-20 (1999).

Muchir, A. et al. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet* 9, 1453-9 (2000).

Muchir, A. et al. Nuclear envelope alterations in fibroblasts from LGMD1B patients carrying nonsense Y259X heterozygous or homozygous mutation in lamin A/C gene. *Exp Cell Res* 291, 352-62 (2003).

Newport, J. W., Wilson, K. L. & Dunphy, W. G. A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly. *J Cell Biol* 111, 2247-59 (1990).

Nigg, E. A. The nuclear envelope. *Curr Opin Cell Biol* 1, 435-40 (1989).

Olszewska, E. & Jones, K. Vacuum blotting enhances nucleic acid transfer. *Trends Genet* 4, 92-4 (1988).

Oshima, J. The Werner syndrome protein: an update. *Bioessays* 22, 894-901 (2000).

Ostlund, C., Ellenberg, J., Hallberg, E., Lippincott-Schwartz, J. & Worman, H. J. Intracellular trafficking of emerin, the Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein. *J Cell Sci* 112 ( Pt 11), 1709-19 (1999).

Paddison, P. J. et al. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16, 948-958 (2002).

Padmakumar, V. C. et al. Enaptin, a giant actin-binding protein, is an element of the nuclear membrane and the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* 295, 330-9 (2004).

Palazzo, A. F. et al. Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Curr Biol* 11, 1536-41 (2001).

Pasternak, C., Wong, S. & Elson, E. L. Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J Cell Biol* 128, 355-61 (1995).

Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J. C. & Nigg, E. A. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 61, 591-602 (1990).

Plasilova, M. et al. Homozygous missense mutation in the lamin A/C gene causes autosomal recessive Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *J Med Genet* 41, 609-14 (2004).

Prigozhina, N. L. & Waterman-Storer, C. M. Protein kinase D-mediated anterograde membrane trafficking is required for fibroblast motility. *Curr Biol* 14, 88-98 (2004).

Reznikoff, C. A., Brankow, D. W. & Heidelberger, C. Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Res* 33, 3231-8 (1973).

Rober, R. A., Weber, K. & Osborn, M. Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study. *Development* 105, 365-78 (1989).

Rosenberg-Hasson, Y., Renert-Pasca, M. & Volk, T. A *Drosophila* dystrophin-related protein, MSP-300, is required for embryonic muscle morphogenesis. *Mech Dev* 60, 83-94 (1996).

Rudnik-Schoneborn, S. et al. Mutations of the LMNA gene can mimic autosomal dominant proximal spinal muscular atrophy. *Neurogenetics* 8, 137-42 (2007).

Saiki, R. K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354 (1985).

Sarkar, P. K. & Shinton, R. A. Hutchinson-Guilford progeria syndrome. *Postgrad Med J* 77, 312-7 (2001).

Scaffidi, P. & Misteli, T. Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med* 11, 440-5 (2005).

Scaffidi, P. & Misteli, T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* 312, 1059-63 (2006).

Schejter, E. D. & Wieschaus, E. Functional elements of the cytoskeleton in the early *Drosophila* embryo. *Annu Rev Cell Biol* 9, 67-99 (1993).

Schindler, M., Holland, J. F. & Hogan, M. Lateral diffusion in nuclear membranes. *J Cell Biol* 100, 1408-14 (1985).

Schirmer, E. C., Florens, L., Guan, T., Yates, J. R., 3rd & Gerace, L. Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics. *Science* 301, 1380-2 (2003).

Schirmer, E. C., Guan, T. & Gerace, L. Involvement of the lamin rod domain in heterotypic lamin interactions important for nuclear organization. *J Cell Biol* 153, 479-89 (2001).

Sebillon, P. et al. Expanding the phenotype of LMNA mutations in dilated cardiomyopathy and functional consequences of these mutations. *J Med Genet* 40, 560-7 (2003).

Smith, E. D., Kudlow, B. A., Frock, R. L. & Kennedy, B. K. A-type nuclear lamins, progerias and other degenerative disorders. *Mech Ageing Dev* 126, 447-60 (2005).

Smith, S. & Blobel, G. The first membrane spanning region of the lamin B receptor is sufficient for sorting to the inner nuclear membrane. *J Cell Biol* 120, 631-7 (1993).

Somech, R. et al. The nuclear-envelope protein and transcriptional repressor LAP2beta interacts with HDAC3 at the nuclear periphery, and induces histone H4 deacetylation. *J Cell Sci* 118, 4017-25 (2005).

Soullam, B. & Worman, H. J. The amino-terminal domain of the lamin B receptor is a nuclear envelope targeting signal. *J Cell Biol* 120, 1093-100 (1993).

Soullam, B. & Worman, H. J. Signals and structural features involved in integral membrane protein targeting to the inner nuclear membrane. *J Cell Biol* 130, 15-27 (1995).

Starr, D. A. & Han, M. Role of ANC-1 in tethering nuclei to the actin cytoskeleton. *Science* 298, 406-9 (2002).

Starr, D. A. & Han, M. ANChors away: an actin based mechanism of nuclear positioning. *J Cell Sci* 116, 211-6 (2003).

Strelkov, S. V., Kreplak, L., Herrmann, H. & Aebi, U. Intermediate filament protein structure determination. *Methods Cell Biol* 78, 25-43 (2004).

Stuurman, N., Heins, S. & Aebi, U. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol* 122, 42-66 (1998).

Sullivan, T. et al. Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol* 147, 913-20 (1999).

Taylor, M. R. et al. Thymopoietin (lamina-associated polypeptide 2) gene mutation associated with dilated cardiomyopathy. *Hum Mutat* 26, 566-74 (2005).

Toth, J. I. et al. Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear shape in fibroblasts from humans with progeroid syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12873-8 (2005).

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4 (1979).

Tsuchiya, Y., Hase, A., Ogawa, M., Yorifuji, H. & Arahata, K. Distinct regions specify the nuclear membrane targeting of emerin, the responsible protein for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Eur J Biochem* 259, 859-65 (1999).

Tzur, Y. B., Wilson, K. L. & Gruenbaum, Y. SUN-domain proteins: 'Velcro' that links the nucleoskeleton to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 782-8 (2006).

Vaughan, A. et al. Both emerin and lamin C depend on lamin A for localization at the nuclear envelope. *J Cell Sci* 114, 2577-90 (2001).

Verga, L. et al. Loss of lamin A/C expression revealed by immuno-electron microscopy in dilated cardiomyopathy with atrioventricular block caused by LMNA gene defects. *Virchows Arch* 443, 664-71 (2003).

Vergnes, L., Peterfy, M., Bergo, M. O., Young, S. G. & Reue, K. Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10428-33 (2004).

Vlcek, S. & Foisner, R. A-type lamin networks in light of laminopathic diseases. *Biochim Biophys Acta* 1773, 661-74 (2007).

Vlcek, S., Korbei, B. & Foisner, R. Distinct functions of the unique C terminus of LAP2alpha in cell proliferation and nuclear assembly. *J Biol Chem* 277, 18898-907 (2002).

Volk, T. A new member of the spectrin superfamily may participate in the formation of embryonic muscle attachments in *Drosophila*. *Development* 116, 721-30 (1992).

Warren, D. T., Zhang, Q., Weissberg, P. L. & Shanahan, C. M. Nesprins: intracellular scaffolds that maintain cell architecture and coordinate cell function? *Expert Rev Mol Med* 7, 1-15 (2005).

Weber, K., Plessmann, U. & Traub, P. Maturation of nuclear lamin A involves a specific carboxy-terminal trimming, which removes the polyisoprenylation site from the precursor; implications for the structure of the nuclear lamina. *FEBS Lett* 257, 411-4 (1989).

Wheeler, M. A. et al. Distinct functional domains in nesprin-1alpha and nesprin-2beta bind directly to emerin and both interactions are disrupted in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Exp Cell Res* 313, 2845-57 (2007).

Wiesel, N. et al. Laminopathic mutations interfere with the assembly, localization, and dynamics of nuclear lamins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 180-5 (2008).

Wilhelmsen, K. et al. Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J Cell Biol* 171, 799-810 (2005).

Winder, S. J. et al. Utrophin actin binding domain: analysis of actin binding and cellular targeting. *J Cell Sci* 108 ( Pt 1), 63-71 (1995).

Worman, H. J. & Courvalin, J. C. How do mutations in lamins A and C cause disease? *J Clin Invest* 113, 349-51 (2004).

Worman, H. J. & Courvalin, J. C. Nuclear envelope, nuclear lamina, and inherited disease. *Int Rev Cytol* 246, 231-79 (2005).

Yang, L., Guan, T. & Gerace, L. Lamin-binding fragment of LAP2 inhibits increase in nuclear volume during the cell cycle and progression into S phase. *J Cell Biol* 139, 1077-87 (1997).

Yang, L., Guan, T. & Gerace, L. Integral membrane proteins of the nuclear envelope are dispersed throughout the endoplasmic reticulum during mitosis. *J Cell Biol* 137, 1199-210 (1997).

Yang, S. H. et al. Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear blebbing in mouse fibroblasts with a targeted Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10291-6 (2005).

Yang, S. H., Qiao, X., Fong, L. G. & Young, S. G. Treatment with a farnesyltransferase inhibitor improves survival in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Biochim Biophys Acta* 1781, 36-9 (2008).

Ye, Q. & Worman, H. J. Primary structure analysis and lamin B and DNA binding of human LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *J Biol Chem* 269, 11306-11 (1994).

Ye, Q. & Worman, H. J. Protein-protein interactions between human nuclear lamins expressed in yeast. *Exp Cell Res* 219, 292-8 (1995).

Young, S. G., Meta, M., Yang, S. H. & Fong, L. G. Prelamin A farnesylation and progeroid syndromes. *J Biol Chem* 281, 39741-5 (2006).

Yu, J. et al. The KASH domain protein MSP-300 plays an essential role in nuclear anchoring during *Drosophila* oogenesis. *Dev Biol* 289, 336-45 (2006).

Yuspa, S. H., Hawley-Nelson, P., Koehler, B. & Stanley, J. R. A survey of transformation markers in differentiating epidermal cell lines in culture. *Cancer Res* 40, 4694-703 (1980).

Zaim. Analyse von Nesprin-2 defizienten Mäusen. Dissertation. Universität zu Köln (2005).

Zhang, Q. et al. Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *Hum Mol Genet* 16, 2816-33 (2007).

Zhang, Q., Ragnauth, C., Greener, M. J., Shanahan, C. M. & Roberts, R. G. The nesprins are giant actin-binding proteins, orthologous to *Drosophila melanogaster* muscle protein MSP-300. *Genomics* 80, 473-81 (2002).

Zhang, Q. et al. 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, 673-87 (2005).

Zhang, Q. et al. Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *J Cell Sci* 114, 4485-98 (2001).

Zhen, Y. Y., Libotte, T., Munck, M., Noegel, A. A. & Korenbaum, E. NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 115, 3207-22 (2002).

## Erklärung

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

Köln, im April 2008

### Teilpublikationen:

Sebastian Kandert, Yvonne Lüke, Tobias Kleinhenz, Sascha Neumann, Wenshu Lu, Verena M. Jaeger, Martina Munck, Manfred Wehnert, Clemens R. Müller, Zhongjun Zhou, Angelika A. Noegel, Marie-Christine Dabauvalle and Iakowos Karakesisoglou (2007). Nesprin-2 giant safeguards nuclear envelope architecture in LMNA S143F progeria cells. *Hum Mol Genet* 16, 2944-2959

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

**LEBENS LAUF****Persönliche Daten**

<b>Name</b>	Yvonne Lüke
<b>Geburtsdatum</b>	29.12.1977
<b>Geburtsort</b>	Mönchengladbach

**Schulische Ausbildung**

<b>1984-1998</b>	Abschluss: Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife am Graf-Anthon-Günther Gymnasium, Oldenburg
------------------	---

**Hochschulstudium, Promotion**

<b>1998-1999</b>	Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald Studiengang Biochemie
<b>1999-2004</b>	Carl-von-Ossietzky-Universität Oldenburg Studiengang Biologie
<b>Oktober 2001</b>	Diplomvorprüfung Biologie
<b>Oktober 2003- Juni 2004</b>	Diplomarbeit in der AG Biochemie
<b>September 2004</b>	Diplomprüfung mit den Schwerpunkten Zellbiologie, Genetik, Biochemie
<b>Oktober- Dezember 2004</b>	Wissenschaftliche Hilfskraft in der AG Biochemie
<b>Seit April 2005</b>	Praktische Durchführung der Dissertation bei Prof. Dr. A. A. Noegel am Institut für Biochemie I der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln mit dem Ziel der Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln mit dem Thema „Charakterisierung der Nesprin-2 Giant Funktionen bei der Kernmembranarchitektur und in Laminopathien.“

## Danksagung

Ich möchte mich vor allem bei Frau Prof. Dr. A. A. Noegel für die Gelegenheit, an ihrem renommierten Institut meine Dissertation anfertigen zu dürfen sowie für ihre Bereitschaft meine Arbeit zu korrigieren, bedanken.

Herrn Prof. Dr. Roth und Herrn Prof. Dr. Schwarz danke ich für die freundliche Übernahme der jeweiligen Koreferate.

Besonderem Dank gilt meinem Gruppenleiter Herrn Dr. Iakowos Karakesisoglou für die herausragende fachliche Betreuung der Arbeit sowie seine freundliche und humorvolle Art, die die Arbeitsatmosphäre geprägt hat.

Ich möchte mich bei Berthold, Maria und Martina bedanken, die mir mit ihrer fachlichen Kompetenz bereitwillig geholfen haben, die großen und kleinen Probleme des Laboralltags zu meistern. Zusätzlich möchte ich mich bei Berthold für die tolle Unterstützung in Zellkulturfragen und bei der Tierzucht herzlich bedanken.

Hafida Zaim möchte ich danken, dass sie sich zu Beginn meiner Doktorarbeit die Zeit genommen hat, mich in das Nesprin-2 Giant KO Projekt einzuarbeiten.

Größten Dank gilt meinen lieben „Laborkollegen“ Ria Schneider, Verena M. Jaeger, Wenshu Lu, Sascha Neumann, Åsa Beijer und Martina Munck, die dazu beigetragen haben, das ich immer gerne an die Zeit im Labor und die gemeinsam gemeisterten Höhen und Tiefen zurückdenken werde. Insbesondere danke ich Ria und Verena für ihre Freundschaft und Unterstützung in jeder Situation.

Allen anderen Mitgliedern des Instituts möchte ich für ihre Hilfe und Kollegialität danken.

Ein liebevoller Dank an meine Eltern und Geschwister sowie an Athanasios.